



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Física y Analítica

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

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE QUANTUM DOTS
DOPADOS CON MANGANESO Y EVALUACIÓN DE SU
POTENCIAL COMO MARCADORES FOSFORESCENTES
PARA (BIO)ANÁLISIS**

TESIS DOCTORAL

EMMA SOTELO GONZÁLEZ

Oviedo, 2013

ÍNDICE

A.	INTRODUCCIÓN	1
A.1	Nanociencia y Nanotecnología.....	3
A.1.1	Definición	3
A.1.2	Impacto social de la Nanociencia y la Nanotecnología	4
A.1.3	Nanociencia y Química Analítica	6
A.1.4	Nanomateriales. Definición, clasificación y fabricación.....	7
A.2	Quantum Dots.....	10
A.2.1	Propiedades ópticas de los quantum dots.....	14
A.2.2	Composición.....	15
A.2.3	Síntesis de quantum dots.....	17
A.2.4	Estrategias para la solubilización de quantum dots en medios acuosos.	19
A.2.5	Inmovilización de quantum dots.....	23
A.3	Dopaje de Quantum Dots	25
A.3.1	Síntesis de QDs dopados (d-dots)	26
A.3.2	Propiedades luminiscentes de los QDs dopados	29
A.3.3	Ventajas de los d-dots para bioanálisis.....	34
A.4	Técnicas de caracterización de nanopartículas.....	35
A.4.1	Tamaño y distribución de tamaños.....	36
A.4.2	Estructura.....	38
A.4.3	Composición.....	39
A.4.4	Recubrimiento superficial	40
A.4.5	Propiedades intrínsecas	41
A.4.6	QDs dopados	41
A.4.7	Otras técnicas.....	42
A.5	Aplicaciones analíticas de los Quantum Dots basadas en la detección luminiscente	43
A.5.1	Aplicaciones en análisis químico	45
A.5.2	Bioanálisis.....	46
A.5.3	Aplicaciones biomédicas	50
A.6	Toxicidad inducida por nanopartículas	53
A.6.1	Nanopartículas en el medio ambiente.....	53
A.6.2	Toxicidad en los medios biológicos	55
A.7	Artículo de revisión	64
A.8	Bibliografía	78
B.	OBJETIVOS	97

C.	EXPERIMENTAL	101
C.1	Instrumentación de medida empleada	103
C.2	Material y reactivos.....	105
C.2.1	Material empleado para la síntesis de quantum dots.....	105
C.2.2	Material empleado en los sistemas de análisis por inyección de flujo	106
C.2.3	Material empleado para los cultivos celulares.....	106
C.2.4	Material general	106
C.3	Reactivos y disoluciones.....	107
C.4	Procedimientos experimentales.....	110
C.4.1	Síntesis de quantum dots de ZnS dopados con Mn	110
C.4.2	Dispersiones coloidales de quantum dots.....	111
C.4.3	Síntesis de sol-geles dopados con quantum dots	112
C.4.4	Cultivos celulares.....	112
C.4.5	Tratamiento y recogida de células	113
C.4.6	Sistemas experimentales.....	114
C.5	Bibliografía.....	116
D.	RESULTADOS Y DISCUSION	117
D.1	Síntesis y caracterización de Quantum Dots de ZnS dopados con Mn: Estimación de la concentración de partículas y de la estequiometría ligando-nanopartícula.	119
D.1.1	Introducción y objetivos.....	121
D.1.2	Artículo científico I:	123
D.1.3	Artículo científico II.....	135
D.2	Aplicación de los d-dots fosforescentes al desarrollo de nuevas metodologías analíticas y fases sensoras para la determinación de acetona en medios acuosos.....	165
D.2.1	Introducción y objetivos.....	167
D.2.2	Artículo científico III.....	171
D.2.3	Artículo científico IV	181
D.3	Evaluación de la toxicidad de quantum dots de Mn:ZnS recubiertos de L-Cisteína mediante estudios <i>in vitro</i>	191
D.3.1	Introducción y objetivos.....	193
D.3.2	Artículo científico V	195
E.	Conclusiones	217
F.	Sugerencias para trabajos futuros	221
G.	Informe del Factor de impacto de las publicaciones presentadas	225
H.	Publicaciones relacionadas con la Tesis Doctoral	229

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Áreas de aplicación actuales de la Nanotecnología ¹⁴	5
Figura 2. Relación entre Nanociencia y Nanotecnología con Química Analítica.....	7
Figura 3. Clasificación de los nanomateriales en función de sus dimensiones.....	9
Figura 4. Comparación entre el tamaño de los QDs y otras especies conocidas.	11
Figura 5. Diagrama de niveles de energía en función del número de átomos. A medida que aumenta el número de átomos, los niveles discretos típicos de los orbitales atómicos se convierten en bandas de energía (semiconductor convencional).	12
Figura 6. A) Correlación del máximo de emisión luminiscente con el tamaño de QDs de diferente composición. B) Intervalos de emisión fotoluminiscente aproximados de QDs de diferente naturaleza.	13
Figura 7. Espectros de absorción (A) y emisión fluorescente (B) típicos de QDs de diferente tamaño con núcleo de CdSe y recubrimiento de ZnS.	13
Figura 8. Representación esquemática de la alineación de los niveles de energía de diferentes sistemas núcleo/recubrimiento. Los bordes superiores e inferiores de los rectángulos se corresponden con los bordes de las bandas de conducción y valencia del núcleo y el recubrimiento, respectivamente.	16
Figura 9. A) Ligando enlazado a la superficie del QD. B) Interacción entre un polímero anfifílico y las cadenas carbonadas de los ligandos de la nanopartícula.	20
Figura 10. Diferencia de tamaño de partícula para un quantum dot A) funcionalizado mediante intercambio de ligandos con DHLA y B) recubierto con polímero anfifílico.	22
Figura 11. Intervalo de emisión luminiscente de varios QDs dopados.....	26
Figura 12. Esquema de dos posibles estrategias para la introducción de iones dopantes en la estructura de quantum dots: nucleación-dopaje (superior) y crecimiento-dopaje (inferior).....	29
Figura 13. Esquema que representa el proceso de emisión de QDs dopados con manganeso en el primer escenario ⁹⁹	31
Figura 14. Esquemas que recogen el proceso de emisión de QDs de CdSe dopados con manganeso en función del tamaño de nanopartícula ¹⁰²	32
Figura 15. Emisión de QDs de Mn:ZnS tras su excitación con uno, dos o tres fotones. La excitación se puede producir con la energía correspondiente a un fotón de 300 nm (1P), dos fotones de 600 nm (2P) o tres fotones de 900 nm (3P). La emisión fluorescente debida al núcleo de ZnS se centra en torno a 430 nm, mientras que la emisión debida al dopaje con iones de manganeso (Mn:ZnS QDs) ocurre en torno a 590 nm ¹¹⁸	34
Figura 16. Representación esquemática de los tamaños de nanopartícula obtenidos empleando técnicas diferentes para un quantum dot con núcleo inorgánico (gris claro) recubierto de una capa de ligandos (gris oscuro) que interaccionarán con el medio en el que se encuentren.	38
Figura 17. Resumen de las principales aplicaciones de los QDs en (bio)análisis.....	43

Figura 18. Ilustración que muestra ejemplos de la química superficial y diferentes estrategias de bioconjugación empleadas con los QDs. El perímetro gris alrededor de la nanopartícula representa un recubrimiento genérico de la superficie del QD que puede estar asociado a la superficie del QD vía interacciones específicas (e) o por coordinación de ligandos (a y b). La solubilidad acuosa del recubrimiento se consigue por grupos amino o carboxilo (c) o el ligando PEG funcionalizado (d). Las estrategias comúnmente empleadas para la bioconjugación están representadas por (a), (b), (f), (g), (h), (i) y (j). La figura no está escalada.	47
Figura 19. Posibles vías de incorporación de las nanopartículas en el medio ambiente.	54
Figura 20. A) Diagrama de los componentes de una célula eucariota con dimensiones. B) Ampliación de una membrana celular que incorpora diversas proteínas y una nanopartícula de 10 nm.	57
Figura 21. Esquema que muestra los principales de citotoxicidad inducida por quantum dots.	58
Figura 22. Diferentes mecanismos por los que las NPs pueden inducir efectos genotóxicos o afectar las rutas de señalización intracelular.	60
Figura 23. Esquema del proceso de síntesis de quantum dots de Mn:ZnS.	111
Figura 24. Esquema del proceso de preparación de un xerogel poroso dopado con d-dots.	112
Figura 25. Definición del tiempo de demora (t_d) y de integración (t_g).	114
Figura 26. Esquema de las diferentes celdas de luminiscencia utilizadas: A) 101-QS; B) 114F-QS; C) 176.052-QS; D) 176.052-QS.	115
Figura 27. Esquema del sistema FIA utilizado para la caracterización de las fases sensoras sol-gel.	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Resumen de las principales propiedades ópticas de d-dots.</i>	29
Tabla 2. <i>Lista de reactivos utilizado a lo largo de la presente Tesis Doctoral, agrupados según el procedimiento experimental donde se han utilizado.</i>	107
Tabla 3. <i>Relación de publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral. Datos obtenidos del Journal Citations Reports®</i>	227

ACRÓNIMOS

AAS	Espectroscopia de Absorción Atómica
AFM	Microscopio de Fuerza Atómica
AUC	Ultracentrifugación Analítica
BRET	Bioluminiscencia Transferencia de Energía Resonante
CRET	Quimioluminiscencia Transferencia de Energía Resonante
DHLA	Ácido dihidrolipoico
DMEM	Medio celular " <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> "
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DMSs	Semiconductores magnéticos diluidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDX o EDS	Espectrómetro de Energía Dispersada
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
EPR	Resonancia Paramagnética Electrónica
ESI-MS	Espectrometría de Masas mediante Ionización por Electrospray
FBS	Suero fetal bovino
FESEM	Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo
FFF	Sistema de fraccionamiento en flujo
FIA	Análisis por inyección en flujo
FISH	Hibridación Fluorescente In Situ
FRET	Fluorescencia por Transferencia de Energía Resonante
GC-AAS	Espectroscopia de Absorción Atómica con Horno de Grafito
HRTEM	Microscopio Electrónico de Transmisión de alta resolución
ICP-OES	Espectrometría de Emisión Óptica con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo
ICP-MS	Espectrometría de masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo
ISO	Organización Internacional de Estandarización

LDH	Lactato deshidrogenasa
MAA	Ácido mercaptoacético
MALDI-MS	Espectrometría de Masas mediante Ionización/Desorción por Láser asistida por Matriz
MIP	Polímero de Impronta Molecular
Mn:ZnS QDs	QDs de ZnS dopados con manganeso
MRI	<i>Imaging</i> por Resonancia Magnética
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NPs	Nanopartículas
PMMA	Poli(metilmacrilato)
PEG	Polietilenglicol
Q	Rendimiento cuántico
QDs	“Quantum dots” o puntos cuánticos
RBS	Espectrometría de Retrodispersión Rutherford
REACH	Marco Reglamentario Europeo de Gestión de las Sustancias Químicas
REL	Retículo Endoplasmático Liso
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SEC	Cromatografía de Exclusión por Tamaños
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido
STEM	Microscopio Electrónico de Transmisión de Barrido
TEM	Microscopio Electrónico de Transmisión
TOP	Trioctilfosfina
TOPO	Óxido de tricocilfosfina
UE	Unión Europea
XRD	Difracción de Rayos X
XPS	Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X

A. INTRODUCCIÓN

A.1 NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA

El espectacular desarrollo científico de la llamada Nanotecnología en los últimos años ha propiciado que la Nanociencia y la Nanotecnología se acepten hoy como nuevas disciplinas científico/tecnológicas de tal modo que la Nanotecnología se ha considerado la “Revolución Industrial del siglo XXI”¹.

A la hora de introducir los conceptos de Nanociencia y Nanotecnología conviene, en primer lugar, distinguir los dos términos que los componen: “ciencia” y “tecnología”. El primero se refiere a la búsqueda de principios capaces de explicar el comportamiento de las entidades que nos rodean y de nosotros mismos; el segundo se refiere al conjunto de conocimientos, instrumentos y procedimientos que nos permiten manipular y modificar nuestro entorno². Por otro lado, el prefijo “nano” (término griego que significa “enano”) denota una amplia gama de fenómenos y objetos cuyas dimensiones se encuentran en el orden de magnitud de una millonésima de milímetro (10^{-9} m). En esta dimensión, las propiedades físico-químicas de los materiales están controladas por fenómenos diferenciados, característicos de dicha nanoescala. La definición para la “nanoescala”³ según la *International Organization for Standardization* (ISO) es el intervalo de tamaños comprendido desde aproximadamente 1 nm hasta 100 nm.

En el año 1959, el Premio Nobel de Física Richard P. Feynman⁴, en su famosa conferencia “There’s plenty of room at the bottom”, pronosticaba que se producirían grandes e importantes descubrimientos si se conseguía manipular los materiales a dimensiones atómicas o moleculares. Sin saberlo, Feynman establecía así las bases de un nuevo campo científico. Más tarde, en 1974, el japonés Norio Taniguchi⁵ empleó por primera vez el término “Nanotecnología” para señalar la capacidad de manejar materiales a nivel nanométrico.

A.1.1 Definición

Resulta complejo elaborar una definición de Nanociencia y Nanotecnología que satisfaga a todos los investigadores y tecnólogos que trabajan en dichas disciplinas

Si bien existen múltiples definiciones posibles, una de las definiciones de la **Nanociencia** más completa y actual es la que considera esta disciplina como el estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales a nivel atómico, molecular o macromolecular, donde las características o propiedades físicas o químicas difieren significativamente de las presentadas por el mismo material a una escala mayor^{6,7}. Otra definición alternativa, más general, considera

la Nanociencia como aquella ciencia basada en diversas estructuras de la materia que tienen dimensiones en el entorno de 10^{-9} m⁸.

Por otra parte, el término **Nanotecnología** se puede entender como el diseño, caracterización, producción y uso de estructuras, dispositivos y sistemas cuya forma y tamaño se controlan a escala nanométrica⁶. Otra definición mucho más amplia de este término es que la Nanotecnología estaría constituida por una combinación de técnicas de muy diversa procedencia cuya finalidad es la investigación y desarrollo tecnológico a nivel atómico, molecular y supramolecular para suministrar el conocimiento fundamental de los fenómenos y los materiales en la escala nanométrica, con objeto de poder crear y usar estructuras, dispositivos y sistemas con nuevas propiedades y funciones originadas por el especial comportamiento de la materia cuando su tamaño deja de ser macroscópico.

A partir de estas definiciones, y dejando aparte el tamaño, la Nanotecnología desarrolla aplicaciones emergentes derivadas de la Nanociencia, mientras que la Nanociencia trata de sistemas funcionalizados, bien basados en el uso de subunidades que tienen propiedades específicas dependientes del tamaño, o bien en subunidades funcionalizadas individuales o combinadas⁹. Puesto que el término Nanotecnología abarca un amplio conjunto de herramientas, técnicas y aplicaciones potenciales, la *Royal Society of Science* ha encontrado más apropiado emplear el término Nanotecnologías⁶.

Alternativamente, la Comisión Europea¹⁰ considera que la Nanociencia y la Nanotecnología (de forma conjunta) son un compendio de nuevos enfoques de la investigación y el desarrollo cuya finalidad es controlar la estructura fundamental y el comportamiento de la materia en el nivel de los átomos y moléculas. De manera que, por un lado, es posible ampliar el conocimiento básico de los fenómenos a escala atómica/molecular (ciencia); y por otro, desarrollar nuevos materiales y dispositivos con nuevas propiedades, funciones y aplicaciones, que se diferencian significativamente de las esperadas para tales materiales/dispositivos con dimensiones por encima de los 100 nm (aproximadamente).

A.1.2 Impacto social de la Nanociencia y la Nanotecnología

Los progresos científicos y tecnológicos conseguidos en los últimos años en este campo han permitido el desarrollo de nuevos conceptos, herramientas y técnicas para diseñar, fabricar y caracterizar materiales o dispositivos “nano” con gran precisión. De este modo, la Nanotecnología se va diferenciando de otras disciplinas más conocidas tales como la Ciencia de los Materiales, la Química, etc., a la vez que contribuye poderosamente a su expansión¹¹.

De hecho, las aplicaciones de esta ciencia/tecnología han alcanzado casi todos los aspectos de nuestra vida ¹²: así la Figura 1 muestra, esquemáticamente, algunas de las áreas científico-tecnológicas donde ya se emplean materiales y/o procesos en el ámbito de la nanoescala con avances importantes en campos tan diversos como la medicina, producción y almacenamiento de energía, electrónica y comunicaciones, seguridad y defensa y transportes. Es decir, su impacto es multidisciplinar y transversal, se debilitan las fronteras clásicas entre la Física, la Química y la Biología y se favorecen nuevas y numerosas áreas de aplicación ^{2,13,14}.

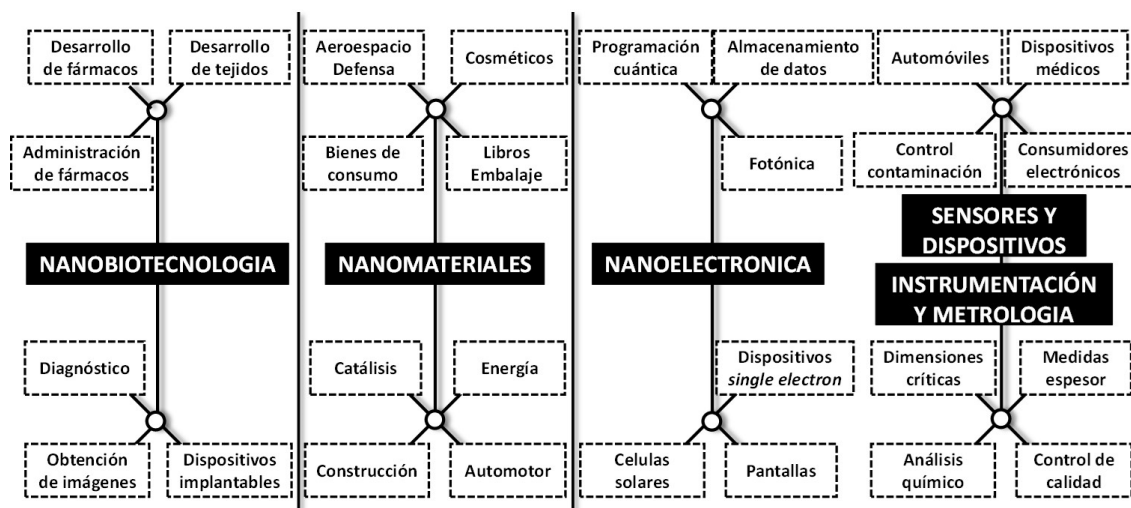


Figura 1. Áreas de aplicación actuales de la Nanotecnología¹⁴.

Además, la Nanociencia y la Nanotecnología han tenido un gran impacto económico (que ha despertado enorme interés entre los organismos de financiación tanto públicos como privados) en los países más desarrollados del mundo. En realidad, en los últimos años, la Nanociencia y la Nanotecnología presentan uno de los crecimientos más rápidos en Investigación y Desarrollo (I+D). Así, Estados Unidos creó en el año 2000, un programa gubernamental conocido como NNI (*National Nanotechnology Initiative*) en el que ya ha invertido más de 2700 millones de dólares. Los países asiáticos industrializados han promovido, desde los sectores industriales y gubernamentales, el desarrollo de la Nanotecnología con inversiones similares a las de EE.UU. Igualmente, Europa ha fomentado la investigación en Nanotecnología como una línea prioritaria, dentro de los Programa Marco VI (FP6) y VII (FP7), a través de las áreas de conocimiento denominadas NMP (Nanotecnologías y Nanociencias, materiales y producción de nuevas tecnologías) y TICs (Tecnologías de la Información y la Comunicación). Además se han creado más de 160 redes nacionales o regionales para desarrollar y divulgar la Nanotecnología en Europa. Para el futuro (periodo de 2014 a 2020), la Comisión Europea acaba de elaborar un nuevo Programa Marco (conocido como Horizonte 2020¹⁵) que prevé invertir más de 17.000 millones de euros en innovaciones basadas en la Nanotecnología en diferentes ámbitos de

conocimiento y/o aplicación (tecnologías, transporte, energía y medio ambiente, las TIC y electrónica, salud y biotecnología, y otros sectores tradicionales como textil, construcción y cerámica).

El vertiginoso desarrollo de estas disciplinas ha favorecido también la incorporación de nanomateriales en bienes de consumo como cosméticos, pinturas, alimentos, etc. Debido a la composición, estructura y especiales propiedades de los nanomateriales, su liberación al medio ambiente introduce un importante riesgo para la salud humana y el medio ambiente que deberá evaluarse y, eventualmente, controlarse. De hecho, algunos científicos han expresado ya su preocupación sobre los efectos a largo plazo asociados con ciertas aplicaciones nanotecnológicas. En la actualidad se reconoce ya la urgente necesidad de realizar estudios que identifiquen los riesgos, determinen la probabilidad de exposición y en último lugar evalúen las posibles consecuencias de la liberación de nanomateriales artificiales al medio ambiente. Esta información permitirá diseñar estrategias que reduzcan la exposición y se anticipen a sus posibles efectos negativos sobre la salud, lo que permitirá establecer las medidas preventivas y de control convenientes^{6,16,17}.

A.1.3 Nanociencia y Química Analítica

Uno de los principales objetivos de la Química Analítica es el desarrollo de nuevos métodos de análisis bien para mejorar los ya existentes o para satisfacer las demandas de información química que plantean los nuevos problemas sociales y económicos. Así pues, la Química Analítica puede jugar un papel primordial en Nanociencia y Nanotecnología: por un lado, existe una demanda de información sobre la composición química y caracterización de los materiales que se generan, mientras por otro lado, los productos nanotecnológicos pueden ser utilizados en el desarrollo de nuevas herramientas de análisis químico y nuevos procedimientos analíticos con superiores prestaciones a los actualmente existentes¹².

Las herramientas de análisis capaces de caracterizar al máximo y predecir propiedades físico-químicas de los nanomateriales proceden de muy diversos ámbitos del conocimiento científico. Por otro lado, el desarrollo de métodos analíticos basados en Nanotecnologías puede contribuir a la simplificación y/o mejora de los procesos analíticos o mejora de al desarrollo de nuevos métodos de análisis (innovación). Es decir, la Nanociencia y la Nanotecnología necesitan de la Química Analítica para la adecuada caracterización de los nanomateriales y al mismo tiempo, estos nanomateriales pueden ofrecer vías prometedoras y de innovación en Química Analítica. Esta idea se resume en la Figura 2, donde se distinguen dos facetas clave de la relación entre *Nanociencia*, *Nanotecnología* y *Química Analítica*. Como puede verse, los nanomateriales se

pueden considerar como herramientas útiles para la optimización e innovación de cualquiera de las etapas del proceso analítico, o bien pueden ser el objeto del análisis (p. ej. su caracterización físico-química).

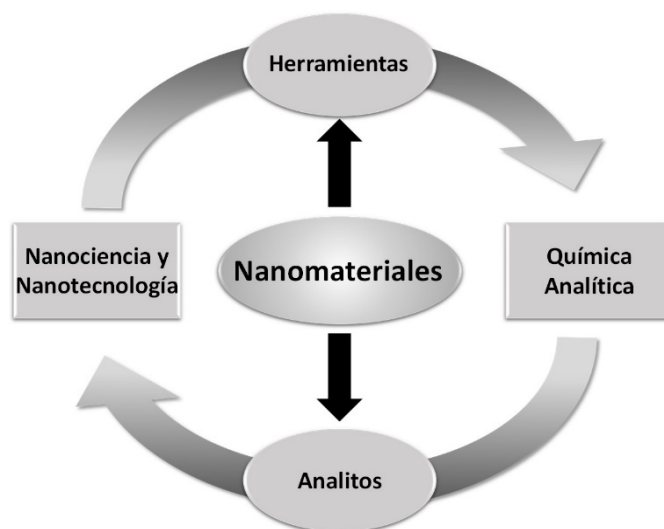


Figura 2. Relación entre Nanociencia y Nanotecnología con Química Analítica.

En efecto, los nanomateriales pueden participar de manera diferente en cada una de las etapas del proceso analítico por sus propiedades excepcionales (p. ej. mejorando las etapas de purificación y preconcentración, permitiendo generar nuevas fases estacionarias basadas en nanomateriales y participando en la etapa de detección)¹². En resumen, la Nanociencia y la Nanotecnología están doblemente integradas y en los fines de la Química Analítica actual dando lugar a un nuevo campo que denominamos **Nanociencia y Nanotecnología Analíticas**.

A.1.4 Nanomateriales. Definición, clasificación y fabricación.

A.1.4.1 Definición

En la literatura se pueden encontrar múltiples definiciones del término nanomaterial¹⁸. Por esta razón, a finales del año 2011, la Unión Europea (UE) adoptó una definición formal de “nanomaterial” para su empleo en próximas normativas y legislaciones. Sin embargo, esta definición trata de tener en cuenta la heterogeneidad de nanomateriales existentes actualmente y contempla la amplia variedad de aplicaciones que pueden ser reguladas o contempladas en la normativa en actual, pero es muy probable que como definición única no cubra todas las necesidades futuras¹⁹. Por ello, el Comité Científico de la UE deja claro que se trata de una definición de referencia (basada en el tamaño), es decir, a efectos reglamentarios, que debe ser aplicable al conjunto de la legislación de la Unión Europea y que posteriormente, se puede adaptar y modificar a las normas a las que se aplique.

En definitiva, la Unión Europea define **nanomaterial** como: *material natural, accidental o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50 % o más de las partículas en la distribución de tamaños presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm²⁰.*

En casos específicos y cuando se justifique por la preocupación por el medio ambiente, la salud, la seguridad o la competitividad, la distribución de tamaños umbral del 50% puede ser sustituida por un umbral de entre 1% y 50%.

Como ya se ha comentado, esta definición debe adaptarse a cada situación o problema concretos, y debe completarse con información más precisa sobre los nanomateriales a definir. Cuando las nanopartículas se emplean como reactivos o simples plataformas, es necesario conocer previamente su composición y estructura. Esta es la razón por la que el análisis químico de nanopartículas supone un reto y está en continua evolución. Es importante subrayar que cualquiera que sea la aplicación y naturaleza de las nanopartículas, estas deberían poseer una composición conocida y estable o, en caso de ser modificadas, su comportamiento debería haber sido estudiado y conocido de antemano²¹.

A.1.4.2 Clasificación de los nanomateriales

Existe una amplia variedad de productos, en continua evolución, que pertenecen a la categoría de “nanomaterial”: desde nanopartículas (NPs) y nanotubos, hasta nanohilos y nanohojas, con distinta composición química, morfología, propiedades, etc. Por esta razón, existen diferentes clasificaciones de los nanomateriales en función del criterio utilizado para su clasificación.

La definición de nanomaterial de la Comisión Europea¹⁹, mencionada anteriormente, incluye una clasificación de acuerdo a su origen o naturaleza. Así, clasifica los nanomateriales en naturales (cenizas volcánicas que incluyen fullerenos u óxidos de hierro), accidentales (originadas como consecuencia de la actividad humana, óxidos de titanio, sílice o aluminio) y fabricados de manera intencionada para su empleo en procesos industriales y bienes de consumo (como las nanopartículas de plata, nanotubos de carbono, los quantum dots, etc.).

Por otro lado, la EPA (Agencia de protección ambiental de Estados Unidos) clasifica los principales tipos de nanomateriales en cuatro categorías²²:

- Materiales de base carbono: compuestos constituidos mayoritariamente por carbono. Pueden presentar forma de esferas huecas o elipsoides (conocidos como fullerenos) o tubos cilíndricos (nanotubos de carbono).

- Materiales de base metálica: se incluyen las nanopartículas metálicas (generalmente de oro o plata), los nanocristales semiconductores (quantum dots) y NPs de óxidos metálicos.
- Dendrimeros: se trata de polímeros a escala nanométrica contruidos a partir de unidades ramificadas. La superficie del dendrímoro posee numerosas cadenas finales, que se pueden modificar con determinados grupos funcionales. Además los dendrimeros tridimensionales contienen cavidades en su interior que pueden incluir otras moléculas.
- Composites: Se trata de materiales que combinan distintas nanopartículas entre sí, o con otros materiales de mayor tamaño (escala macrométrica).

De forma más simple, los nanomateriales se pueden clasificar en aquellos de naturaleza orgánica, inorgánica o mixta, distinguiendo dentro de las inorgánicas entre nanopartículas metálicas y las semiconductoras^{23,24}.

Sin embargo, las clasificaciones arriba mencionadas pueden resultar poco útiles ya que un mismo material puede pertenecer a más de una categoría, de modo que sería útil una clasificación genérica e inequívoca.

Una de las clasificaciones más extendidas de los nanomateriales utiliza sus dimensiones como criterio. Así, la Figura 3 muestra nanoestructuras de 0D, 1D, 2D y 3D. Los **materiales nanoestructurados 0D** tienen todas sus dimensiones dentro de la escala nanométrica (p. ej. nanopartículas metálicas, quantum dots o los nanoclusters). Los **nanomateriales 1D** se refieren a materiales con una de las dimensiones en el orden micro/macrométrico, entre ellos están los nanohilos, nanofibras o nanotubos. En el grupo de **nanoestructuras 2D**, los materiales poseen dos dimensiones dentro de la escala micro/macrométrica, p. ej. nanorecubrimientos superficiales y películas delgadas de nanocapas. Por último, los **nanomateriales 3D**, constituidos por agrupaciones de nanomateriales de 0D, 1D o 2D, presentan las tres dimensiones del material resultante fuera de la escala nanométrica, es decir, por encima de los 100 nm.

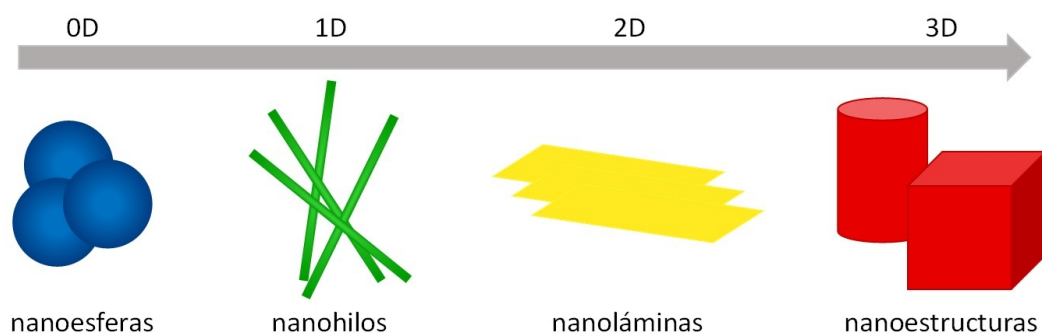


Figura 3. Clasificación de los nanomateriales en función de sus dimensiones²⁵.

A.1.4.3 Principales vías para la fabricación de nanomateriales

La fabricación de nanomateriales y el control de su producción precisa de tecnologías que permitan trabajar de forma fiable, precisa y reproducible a escala nanométrica.

En general, se distinguen dos estrategias para la producción, caracterización y modelado de nanomateriales^{6,13,26}:

a) La alternativa **“top-down”** (de arriba hacia abajo) usualmente se emplea en la industria y se refiere a procedimientos de fabricación que obtienen nanomateriales por reducción de tamaño (grabado, fresado o mecanizado) y que requieren el empleo de instrumentación compleja. Esta estrategia depende, en gran medida, de los avances futuros para obtener mejor precisión en la producción y ensamblaje de las partes que conforman el material final. Los métodos **“top-down”** más utilizados son el mecanizado ultrapreciso y técnicas litográficas como la fotolitografía y la litografía por haces de electrones, las cuales ofrecen buena fiabilidad pero generalmente consumen mucha energía y producen más residuos que otras alternativas. Empleando esta estrategia ha sido posible conseguir chips comerciales capaces de almacenar millones de bits de información y también espejos ópticos de alta calidad.

b) Un enfoque diferente se basa en la posibilidad de construir objetos de mayor tamaño a partir de sus componentes atómicos y moleculares. Esta alternativa, que se conoce como **“bottom-up”** (de abajo hacia arriba), fue propuesta por E. Drexler en 1986 y utiliza las propiedades de las moléculas individuales para que se produzca la organización espontánea de las mismas en una conformación particular; obteniendo un grado de control de tamaño y propiedades muy difícil de conseguir mediante las técnicas **“top-down”**. Un ejemplo de esta vía es la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), que habitualmente se emplea para obtener imágenes a escala atómica de la estructura de los materiales pero también puede emplearse para reemplazar o reorganizar átomos en una superficie. Los métodos de síntesis de ciertas nanopartículas que se generan tras una reacción adecuada de compuestos que contienen los elementos que forman un material semiconductor sería otro ejemplo de esta alternativa.

A.2 QUANTUM DOTS

El término Quantum dot (QD) se emplea para definir un tipo de nanomaterial constituido por nanocristales semiconductores coloidales. Pueden recibir otros nombres como átomos artificiales²⁷, nanopartículas semiconductoras, semiconductores nanométricos o puntos cuánticos, si se realiza la traducción del término al idioma español²⁸. Se trata de partículas nanoestructuradas OD ya que todas sus dimensiones se encuentran en la escala nanométrica.

Están formados por un núcleo de material inorgánico compuesto por agrupaciones de elementos pertenecientes a los grupos 12-16, 13-15 y 14-16 de la Tabla Periódica, que puede contener entre cientos y miles de átomos. Su forma es aproximadamente esférica, con un diámetro que oscila entre 1 y 12 nanómetros. El núcleo de los QDs normalmente se encuentra rodeado de una capa exterior de moléculas de tensoactivo o ligandos que le confiere estabilidad en medios líquidos (disoluciones coloidales) evitando su agregación²⁹.

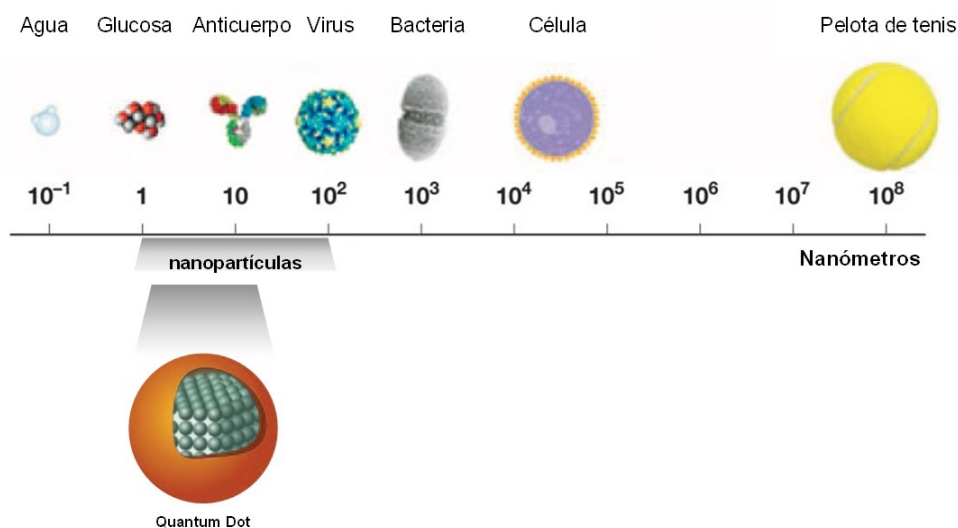


Figura 4. Comparación entre el tamaño de los QDs y otras especies conocidas.

Cuando el tamaño del material semiconductor que constituye el quantum dot se encuentra dentro de la escala nanométrica, este material presenta un comportamiento que difiere del observado para el mismo a escala macroscópica o para los átomos individuales que los conforman. De hecho, las propiedades de estas nanopartículas están dominadas por efectos de confinamiento cuántico en vez de seguir las leyes de la física clásica que se aplican para los materiales macroscópicos³⁰. El confinamiento cuántico se produce porque el tamaño de las partículas se ha reducido hasta asemejarse al radio del excitón de Bohr: cuando se genera un par hueco/electrón (*excitón*) en el material semiconductor, este quedará confinado en un espacio muy reducido. Como consecuencia, la estructura de los niveles energéticos y las propiedades ópticas y eléctricas del material se modifican considerablemente. Los niveles de energía pasan a ser discretos y finitos, y dependen fuertemente del tamaño de la nanopartícula²⁹⁻³².

Para poder prever las propiedades físicas de los quantum dots es necesario conocer y entender su estructura de niveles energéticos. Existen dos aproximaciones para calcular los niveles energéticos de sistemas como los QDs: la evolución desde una estructura de bandas típica de un sólido macroscópico hasta que el tamaño se reduce a unos pocos nanómetros; o bien

considerar los estados electrónicos de un solo átomo de forma aislada y ver su evolución cuando los átomos se aproximan e interaccionan entre sí (Figura 5).

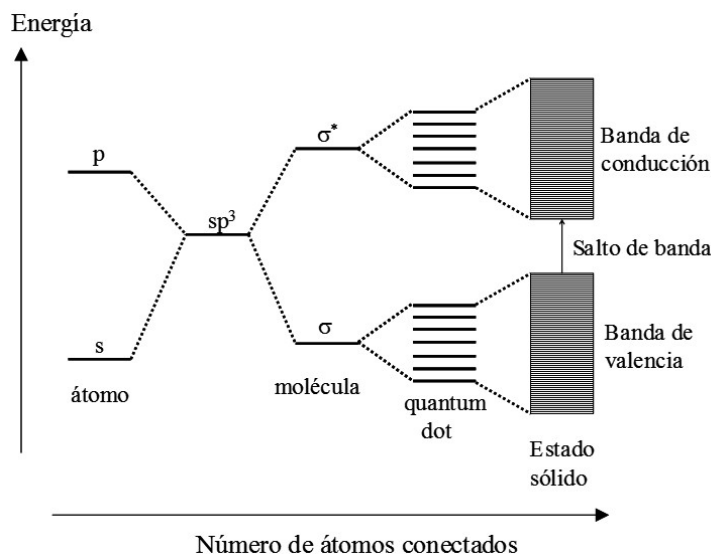


Figura 5. Diagrama de niveles de energía en función del número de átomos. A medida que aumenta el número de átomos, los niveles discretos típicos de los orbitales atómicos se convierten en bandas de energía (semiconductor convencional).

Cuando varios átomos se combinan para formar una molécula, los niveles de energía discretos de los orbitales atómicos formarán niveles discretos para los orbitales moleculares. Cuando el tamaño del sistema poliatómico se incrementa de forma progresiva, el cálculo de su estructura electrónica como combinación de orbitales atómicos resulta inviable. Sin embargo, si el sistema es periódico, es decir, un cristal infinito, los cálculos se simplifican ya que la estructura energética de un sólido consiste en bandas de energía (no en niveles de energía discretos) donde cada banda puede ser ocupada con un número limitado de portadores de carga, como se observa en la Figura 5. La estructura electrónica de los niveles de energía de un nanocrystal será una situación intermedia entre los niveles de energía de un sistema atómico y la estructura de bandas de un sistema macroscópico. En la Figura 5 se muestra que los niveles de energía de un nanocrystal son discretos, su densidad mayor y su espaciado menor que el correspondiente a los niveles de un átomo. Los niveles atómicos altamente ocupados de las especies atómicas interaccionan entre sí para formar la banda de valencia del nanocrystal. Igualmente, los niveles más bajos no ocupados interaccionan entre sí para formar la banda de conducción del nanocrystal. La diferencia de energía entre la banda de valencia y la banda de conducción da como resultado el salto de banda en el nanocrystal.

En los semiconductores convencionales el salto de banda determina la energía mínima que debe tener un electrón para pasar de la banda de valencia a la banda de conducción, y esta diferencia

de energía varía en función del material. Cuando se reducen las dimensiones a escala nanométrica, los niveles de energía pasan a estar cuantizados, y el salto de banda está directamente relacionado con el tamaño de la nanopartícula semiconductor; a menor tamaño del quantum dot, el salto de banda es mayor, y por tanto la longitud de onda de emisión menor (análogamente a la partícula en una caja de la mecánica cuántica, la energía de la partícula aumenta cuando se reduce el tamaño de la caja³³). Por tanto, las propiedades ópticas de los quantum dots están íntimamente relacionadas tanto con la composición de los mismos (Figura 6) como con su tamaño (ver Figura 7).

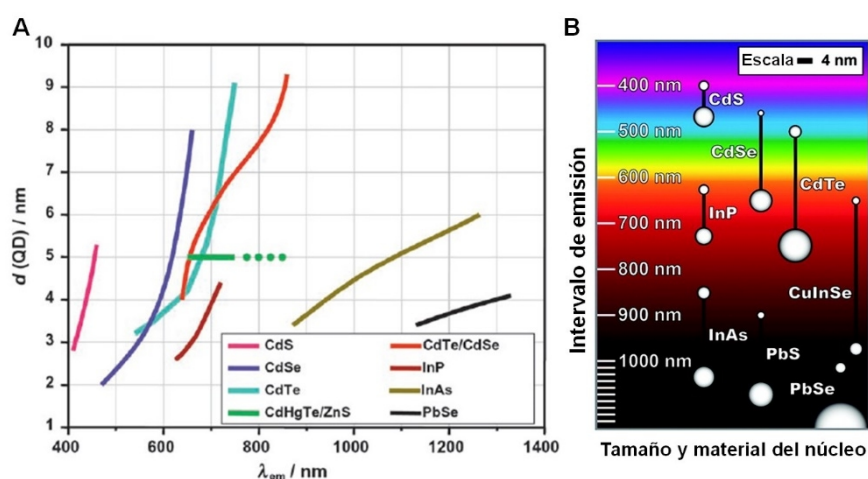


Figura 6. A) Correlación del máximo de emisión luminiscente con el tamaño de QDs de diferente composición³⁴. B) Intervalos de emisión fotoluminiscente aproximados de QDs de diferente naturaleza³².

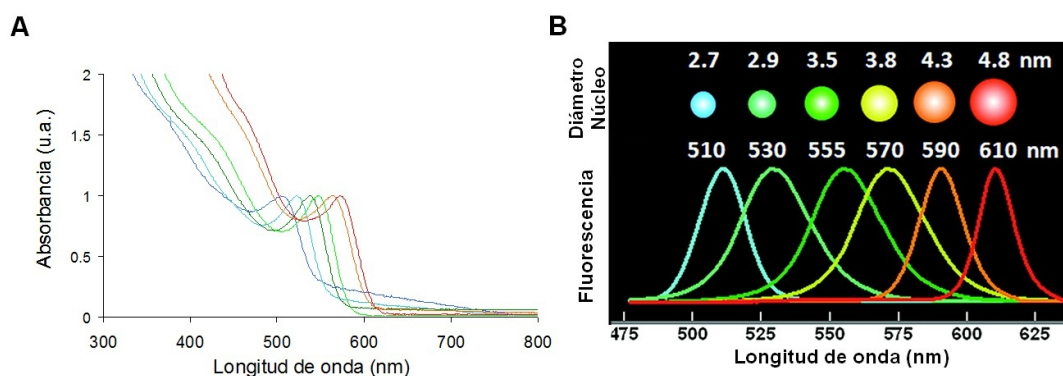


Figura 7. Espectros de absorción (A) y emisión fluorescente (B) típicos de QDs de diferente tamaño con núcleo de CdSe y recubrimiento de ZnS³².

A.2.1 Propiedades ópticas de los quantum dots

La interacción de la luz con los QDs puede dar lugar a distintos procesos que pueden ocurrir de forma simultánea. Los más importantes son:

Absorción: La absorción de un fotón con una energía superior a la del salto de banda da lugar a la formación de un excitón. La probabilidad de que se produzca la absorción aumenta a energías altas, lo que produce espectros de absorción anchos, ligeramente desplazados hacia el azul (*blue shift*) respecto del material macroscópico.

Fotoluminiscencia: El excitón formado estará confinado en el interior del nanocrystal y su energía de enlace dependerá del salto de banda del semiconductor. Por ello, la recombinación radiativa de este excitón generará la emisión de un fotón, el cual se puede sintonizar mediante el control de la naturaleza y tamaño de la nanopartícula, siendo esta una de las características más explotadas de los quantum dots. El tipo de emisión fotoluminiscente observado, se puede dividir en dos categorías, fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la configuración electrónica del estado excitado y la vía de desactivación radiacional.

Como la emisión se produce desde niveles electrónicos discretos, los QDs presentan bandas de emisión fluorescente estrechas y simétricas (20-30 nm de anchura de pico a la mitad de la intensidad de emisión máxima). Además, gracias a sus anchos espectros de excitación, es posible realizar la excitación simultánea de nanopartículas de distinto tamaño, observándose la emisión de fluorescencia a longitudes de onda de emisión diferentes (esta propiedad es especialmente interesante para el desarrollo de sensores luminiscentes multianálito).

Se puede también modificar la emisión luminiscente de los QDs añadiendo pequeñas cantidades de ciertas impurezas metálicas durante el proceso de síntesis de las nanopartículas, obteniendo así QDs dopados³². Este tipo de QDs son los que se han empleado para los estudios realizados en esta Tesis Doctoral por lo que serán abordados en mayor profundidad en la sección A.3.

Blinking: Una característica particular de los QDs coloidales es que si se observa detenidamente la emisión fluorescente de un QD individual tras una excitación continua, la emisión resulta intermitente (fenómeno conocido como *blinking*). El proceso de apagado puede durar desde varios milisegundos hasta minutos y está relacionado con la fotoionización Auger³¹. Como esta propiedad sólo se observa en QDs coloidales (no en quantum dots agregados o ensamblados), actualmente esta característica se usa de forma rutinaria para el seguimiento de QDs empleados en la distribución de medicamentos mediante imagen^{32,35}.

Eficiencia de la emisión: Otras excepcionales características fotoelectrónicas de los QDs son su elevada fotoestabilidad, los altos coeficientes de extinción molar (10^5 - 10^6 M⁻¹cm⁻¹), rendimientos cuánticos (Q) típicamente superiores al 10-20 % y los largos tiempos de vida del estado excitado (pudiendo alcanzarse valores en torno a los 10-100 ns). Así, y en comparación con los fluoróforos convencionales, los QDs pueden someterse a tiempos de exposición más largos sin perder eficiencia luminiscente^{28,32,36}.

Sin embargo, la estructura cristalina de los nanocristales puede presentar trampas superficiales para los excitones formados tras la absorción de luz y esto favorece procesos de recombinación no radiativos. Estos defectos superficiales pueden deberse a vacantes en la estructura cristalina, enlaces interrumpidos, moléculas adsorbidas a la superficie o a la presencia de impurezas (relacionadas con el proceso de síntesis). El electrón o el hueco pueden quedar atrapados dentro de estos estados de mínima energía y por lo tanto, el proceso de recombinación radiativa resulta menos probable³³. La formación de estas trampas superficiales no tiene efectos sobre el espectro de absorción de los quantum dots, sin embargo, si produce alteraciones en la emisión de los nanocristales, en la intensidad o en la longitud de onda máxima³⁷. Una solución para minimizar este problema consiste en hacer crecer una capa protectora de otro material sobre la superficie del QD (p. ej. generar una capa de otro material semiconductor sobre el núcleo, así se obtienen QDs tipo núcleo/recubrimiento que se discutirán más adelante).

Fotoactivación: Este fenómeno consiste en el incremento de la luminiscencia de los QDs inducido por la acción de la luz (bien luz natural o bajo irradiación continua con luz ultravioleta) que provoca cambios en la superficie de las nanopartículas. Pese a que se trata de un fenómeno conocido y empleado por numerosos autores, se desconoce el mecanismo global involucrado en dicho proceso, que generalmente depende de la propia naturaleza de los QDs, de las modificaciones posteriores realizadas y del medio que rodea a la nanopartícula, etc³⁸.

Aparte de las propiedades ópticas mencionadas hasta el ahora, los QDs pueden actuar como fotosensibilizadores, un aspecto que reviste gran interés en el área biomédica para terapias fotodinámicas³².

A.2.2 Composición

Los quantum dots más comunes están compuestos por materiales semiconductores binarios formados por elementos de los grupos 12-16 y 14-16 de la Tabla Periódica. Algunos ejemplos son los QDs de sulfuro de zinc, plomo o mercurio (ZnS, PbS, HgS), sulfuro de cadmio (CdS), seleniuro de cadmio (CdSe) y telururo de cadmio (CdTe). También, aunque son menos habituales, se han descrito en la bibliografía quantum dots compuestos por elementos de los

grupos 13-15 como el fosfuro de indio (InP), arseniuro de indio (InAs) y nitruro de galio (GaN). Además, hay QDs formados por combinaciones ternarias de elementos, donde dos de los elementos comparten los sitios de los cationes o los aniones; entre ellos están CdZnS, CdSSe, CdTeSe, CuInSe o InNP. La mayoría de estas nanopartículas semiconductoras cristaliza como estructura cúbica tipo *blenda* o hexagonal tipo *wurtzita*, y aunque menos común como cúbica tipo *halita*, pero también se pueden dar situaciones intermedias³⁹.

Una de las tendencias más empleadas en la actualidad, es trabajar con QDs de estructura tipo núcleo/recubrimiento (*core/shell*), entre ellos, los más utilizados son los QDs de CdSe/ZnS y CdSe/CdS. Esta estrategia consiste en generar una capa de un material semiconductor (diferente al núcleo del QD) alrededor de la superficie del nanocrystal. El salto de banda del material semiconductor del recubrimiento es diferente del correspondiente valor del semiconductor del núcleo. Así, dependiendo de salto de banda y de la posición relativa de los niveles de energía electrónica de los semiconductores involucrados, el recubrimiento puede cumplir diferentes funciones. La Figura 8 muestra que es posible identificar tres tipos de QDs núcleo/recubrimiento: Tipo I, Tipo I Inverso y Tipo II²⁹:

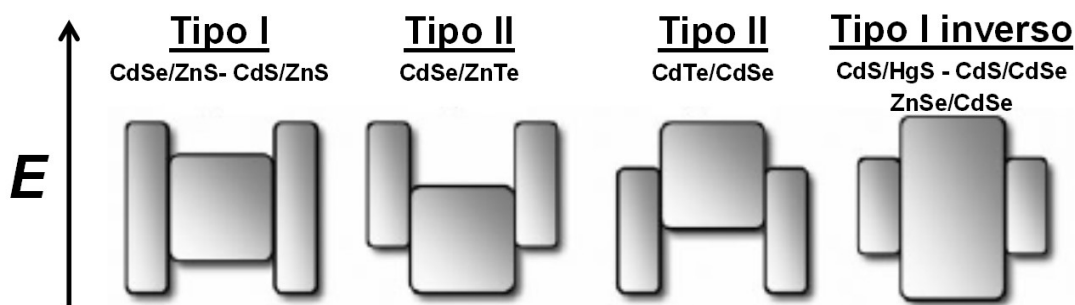


Figura 8. Representación esquemática de la alineación de los niveles de energía de diferentes sistemas núcleo/recubrimiento. Los bordes superiores e inferiores de los rectángulos se corresponden con los bordes de las bandas de conducción y valencia del núcleo y el recubrimiento, respectivamente²⁹.

En el Tipo I el salto de banda del recubrimiento es mayor que el correspondiente al del núcleo de la nanopartícula, de manera que los electrones y huecos se encuentran confinados en el núcleo favoreciendo así el proceso de emisión luminiscente de los QDs.

En el Tipo I inverso, el salto de banda del recubrimiento es menor que el del núcleo, y dependiendo del espesor del recubrimiento, los electrones y los huecos estarán parcial o completamente confinados en el recubrimiento. De esta manera se puede modular la emisión luminiscente de la nanopartícula variando el espesor del recubrimiento. La estabilidad de la

emisión luminiscente y el rendimiento cuántico de estas nanopartículas se puede mejorar añadiendo una segunda capa de un semiconductor con un salto de banda mayor.

En el Tipo II, el borde de la banda de valencia o de conducción del recubrimiento se localiza en el salto de banda del núcleo (ver Figura 8). Cuando se produce la excitación del nanocrystal tiene lugar una separación del electrón y el hueco en diferentes regiones de la nanopartícula, generándose así excitones de mayor duración antes de la recombinación.

En todos los casos, la incorporación de una capa de semiconductor adicional genera un desplazamiento de la emisión a longitudes de onda mayores (desplazamiento hacia el rojo o *red shift*) y este fenómeno se intensifica para los QDs tipo II.

Otro parámetro importante para trabajar con QDs núcleo/recubrimiento consiste en que ambos semiconductores deberían cristalizar en la misma fase cristalina y presentar así, una continuidad en su estructura cristalográfica que asegure la disminución de los defectos en la interfase o en el recubrimiento.

A.2.3 Síntesis de quantum dots

Como se comentó en la sección A.1.4.3, existen diferentes estrategias para llevar a cabo la síntesis de nanomateriales, y en este caso concreto, de QDs. Las estrategias “top-down” (como la litografía) han permitido obtener quantum dots embebidos en estructuras compuestas por láminas finas de otros semiconductores³¹. Pero los procesos más habituales, son las vías de síntesis tipo “bottom-up”, ya que se obtienen quantum dots en forma de suspensión coloidal homogénea tras la reacción de sus precursores en disolución acuosa. Los QDs así obtenidos presentan un coste reducido ya que su síntesis no requiere instrumentación compleja ni costosa. Además, desde el punto de vista analítico, las nanopartículas sintetizadas son muy versátiles para biofuncionalizaciones posteriores.

De forma general, el proceso de síntesis de quantum dots coloidales³¹ consiste en hacer reaccionar una mezcla que contiene todos los compuestos que controlan la nucleación y el crecimiento en estado líquido en un reactor. Cada una de las especies atómicas que formaran parte de los nanocrystal se introduce en la mezcla en forma de un precursor (es decir, molécula o complejo que contiene una o más de las especies atómicas requeridas para el crecimiento de los nanocrystal). A continuación, los precursores se descomponen formando nuevas especies reactivas (monómeros) que provocarán la nucleación y crecimiento de las nanopartículas. La energía necesaria para descomponer los precursores es proporcionada por el líquido del reactor,

bien por colisiones térmicas o por reacción química entre el medio líquido y los precursores, o por la combinación de ambos mecanismos.

El parámetro clave para controlar el crecimiento de los nanocristales coloidales es la presencia de una o más moléculas que actúen como agentes coordinantes (también llamadas moléculas “surfactantes”). Los agentes coordinantes son moléculas que se adsorben de forma dinámica sobre la superficie del QD en crecimiento bajo las condiciones de reacción; deben ser lo suficientemente móviles como para permitir el acceso de más unidades de monómero, y lo suficientemente estables para prevenir la agregación de los nanocristales. La elección del agente coordinante adecuado depende cada caso, si la molécula se enlaza con demasiada fuerza a la superficie de la nanopartícula no permitirá el crecimiento de la misma; sin embargo, un enlace débil generará la formación de partículas de gran tamaño o agregados. Los agentes coordinantes más adecuados incluyen, p. ej. alquiltioles, óxidos de fosfina, fosfatos, fosfonatos, amidas o aminas, ácidos carboxílicos y compuestos aromáticos que contienen nitrógeno. Si el crecimiento del nanocrystal se lleva a cabo a temperaturas elevadas, la molécula coordinante debe ser estable en esas condiciones para poder controlar el crecimiento. Al disminuir la temperatura, se interrumpe el crecimiento de la nanopartícula, y la molécula coordinante se une con más fuerza a la superficie del nanocrystal determinando así la solubilidad en función del disolvente empleado.

Este recubrimiento con un agente coordinante proporciona una gran flexibilidad química ya que puede ser intercambiado con otro recubrimiento de moléculas orgánicas (con diferente polaridad o grupos funcionales), o se puede eliminar esta capa y permitir el crecimiento de una segunda capa de material con otras propiedades eléctricas, ópticas o magnéticas sobre la nanopartícula inicial. Además, las moléculas coordinantes permiten controlar el tamaño y/o la forma de la nanopartícula durante el proceso de síntesis mediante el control de la proporción de moléculas coordinantes, el volumen de inyección, la concentración de monómero o el tiempo de reacción^{31,40}.

La síntesis de QDs coloidales, en concreto de nanocristales de CdSe, es una de las más extendidas y perfeccionada, y suele emplear TOP/TOPO como moléculas coordinantes a altas temperaturas. Cabe reseñar que esta síntesis fue introducida por Bawendi y *col.*⁴¹ en 1993, y optimizada por Peng y *col.*⁴² en el año 2000. Aunque existen diferentes protocolos, tras el proceso de síntesis se obtienen nanopartículas monodispersas y estables, pero hidrofóbicas. Estos QDs sólo son solubles en disolventes no polares como el cloroformo y el tolueno, por lo que tienen una limitada aplicabilidad para el desarrollo de aplicaciones tanto analíticas como biológicas. Así

pues, es necesario que estas nanopartículas sean sometidas a un proceso posterior de solubilización en medios acuosos, manteniendo sus características originales (p. ej. ópticas).

En los últimos años han surgido nuevas rutas sintéticas que emplean bajas temperaturas y sistemas acuosos para obtener directamente nanopartículas solubles en agua. Estas metodologías emplean como precursores sales inorgánicas de los metales de interés y sulfuro o seleniuro de sodio. En este caso, se utilizan alquiltioles o polifosfatos como medio de reacción (ya que presentan alta solvatación) y además, actúan como ligando protector, puesto que permite la solubilización de la nanopartícula en medios acuosos directamente⁴³. En este tipo de síntesis es necesario controlar y ajustar el pH de la mezcla de síntesis y escoger de forma apropiada la concentración relativa y absoluta de los componentes de la reacción⁴⁴.

A.2.4 Estrategias para la solubilización de quantum dots en medios acuosos.

A pesar de que existen rutas sintéticas de QDs para obtener partículas directamente solubles en medios acuosos, la mayoría de los quantum dots empleados se sintetizan en disolventes orgánicos y altas temperaturas.

El diseño de recubrimientos posteriores para obtener nanopartículas hidrofílicas ha sido abordado por muchos investigadores durante los últimos años. El objetivo final no es sólo conseguir la solubilidad en medios acuosos, sino ofrecer la posibilidad de incorporar determinados grupos funcionales a la superficie del nanocrystal que permitan en último término establecer uniones (covalentes, electrostáticas, etc.) con una molécula o biomolécula de interés mediante reacciones de derivatización (bioconjugaciones). Un recubrimiento ideal³² para los QDs debería cumplir:

- alta afinidad por la superficie de los QDs.
- estabilidad coloidal a largo plazo en un amplio rango de pH y fuerza iónica.
- capacidad de bioconjugación.
- minimizar el tamaño hidrodinámico de la nanopartícula resultante.
- biocompatibilidad (ni tóxico ni inmunogénico) y con reducidas uniones inespecíficas.

Además, si los QDs se van a emplear como marcadores biológicos⁴⁵, las nanopartículas obtenidas deberían presentar baja citotoxicidad, limitadas uniones inespecíficas a tejidos biológicos, elevado rendimiento cuántico y tiempos de vida estables.

Conseguir QDs recubiertos que cumplan todas las características simultáneamente es una tarea difícil. Así, en los últimos diez años, se han llevado a cabo numerosos trabajos con el objetivo de

mejorar la química superficial de los QDs y otros nanomateriales. Las estrategias desarrolladas para transferir las nanopartículas disueltas en medio orgánico a medio acuoso se pueden agrupar en dos categorías principales^{43,45}:

- 1) Intercambio de ligandos hidrofóbicos por ligandos hidrofílicos.
- 2) Encapsulación de los QDs mediante interacciones hidrofóbicas.

Como se observa en la Figura 9, los recubrimientos conservan dos elementos esenciales: una molécula anclada a la superficie de la nanopartícula y un grupo funcional hidrófilo para la dispersión acuosa.

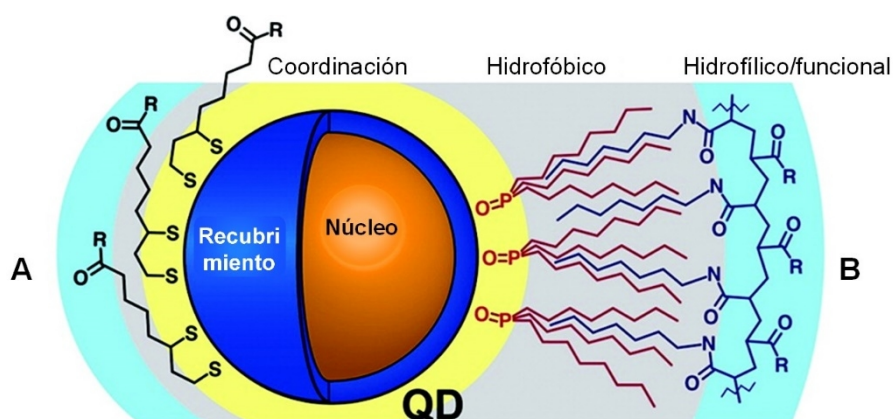


Figura 9. A) Ligando enlazado a la superficie del QD. B) Interacción entre un polímero anfifílico y las cadenas carbonadas de los ligandos de la nanopartícula³².

La estrategia de **intercambio de ligandos** consiste en la sustitución de las moléculas hidrofóbicas (p. ej. TOP/TOPO) que rodean los nanocristales por moléculas bifuncionales, las cuales generalmente contienen un grupo tiol (-SH) en uno de los extremos, que se une a la superficie del nanocrystal por afinidad, y un grupo funcional polar en el otro extremo orientado hacia la parte exterior del QD, otorgando a la nanopartícula la solubilidad en medios polares.

El grupo tiol presenta una gran afinidad por la superficie de QDs conteniendo Cd, Zn o Pb debido a la gran componente covalente del enlace metal-azufre. Chan y *col.*⁴⁶ fueron pioneros en emplear esta estrategia, utilizando ácido mercaptoacético (MAA) como ligando bifuncional. Otros ejemplos incluyen el ácido mercaptosuccínico, ditiotreitól, o los aminoácidos cisteína o histidina. En función del pH de trabajo, el grupo funcional se encuentra protonado o desprotonado, confiriendo al sistema carga positiva o negativa, lo que provocará la repulsión electrostática entre las nanopartículas y evitará la agregación de las mismas⁴⁷.

Los QDs recubiertos con ligandos tiol monodentados son muy fáciles de obtener, pero presentan algunos inconvenientes ya que puede producirse la desorción de los ligandos de la superficie

fácilmente y por tanto, las nanopartículas tenderán a agregarse en pocos días, generando nanopartículas de baja estabilidad coloidal. Como alternativa, se ha propuesto el empleo de ligandos bifuncionales bidentados (poseen dos grupos tiol)⁴⁸, que confieren una unión más fuerte y robusta con la NP. También es posible emplear ligandos tipo “dendrón”⁴⁹ que minimizan la liberación de las moléculas del recubrimiento a la disolución, o ligandos como el polietilenglicol (PEG) y derivados. Estos permiten minimizar las interacciones electrostáticas inespecíficas observadas entre nanopartículas modificadas con ligandos monodentados y proteínas, anticuerpos o superficies celulares. Además, reducen la toxicidad celular e incrementan los tiempos de circulación *in vivo*⁵⁰.

Otra alternativa estudiada es el empleo de ligandos “*zwitterionicos*”⁵¹ (que presentan las mismas ventajas que los PEG) pero proporcionan dimensiones hidrodinámicas más pequeñas) e incluso el empleo de péptidos⁵² (con un dominio hidrofóbico y otro hidrofílico) o fosfinas oligoméricas⁵³ como ligandos para recubrir la superficie. Estas estrategias están limitadas debido a su elevado coste o a la necesidad de complejos procesos de purificación.

El proceso de silanización es una estrategia que, si bien antes era considerada de forma independiente, actualmente se trata como una alternativa más de intercambio de ligandos ya que se produce una sustitución de los ligandos hidrofóbicos de la superficie del nanocrystal. La silanización consiste en la formación de una capa de sílice alrededor de la superficie del nanocrystal empleando mercaptopropil(trimetoxisilano) como precursor⁵⁴. La capa de ligando que se obtiene está altamente entrecruzada y por tanto, es muy resistente a la desorción. Además el QD está físicamente protegido por lo que se mejora su fotoestabilidad⁴⁵. Sin embargo, este método resulta generalmente bastante tedioso, y con frecuencia no se obtienen recubrimientos homogéneos de sílice con espesor inferior a 5 nm y pueden aparecer problemas de agregación⁵⁵.

Las principales desventajas de la estrategia de intercambio de ligandos consisten en que la estabilidad coloidal de las nanopartículas está determinada por el ligando empleado y que el rendimiento cuántico del QD disminuye respecto a su valor en medio orgánico (esta reducción puede deberse a la generación de trampas en la superficie del quantum dot que favorecen la desactivación no radiacional de su emisión luminiscente)³².

La segunda estrategia propuesta consiste en la **encapsulación de los QDs en polímeros anfifílicos**. Este proceso tiene lugar debido a la interacción hidrofóbica^{56,57} de las cadenas carbonadas de un polímero anfifílico con las cadenas carbonadas de los ligandos que recubren la superficie de las nanopartículas. Los polímeros anfifílicos combinan cadenas alquil

hidrofóbicas y grupos hidrofílicos (p. ej. grupos carboxilo, amino, segmentos de PEG) que están orientados hacia el exterior (el medio que rodea a la nanopartícula) y cargados, de manera que le confieren la solubilidad necesaria a la nanopartícula. En el polímero anfifílico, una sola cadena de polímero posee numerosas cadenas hidrofóbicas, por lo que la unión con el QD está favorecida por los numerosos puntos de contacto entre las cadenas hidrofóbicas.

El hecho de conservar los agentes coordinantes originales durante el proceso de modificación hace que los QDs modificados sean más estables que los obtenidos a través de intercambio de ligandos³². Esta modificación es menos agresiva y provoca menores cambios del rendimiento cuántico de los quantum dots (p. ej. la superficie de la nanopartícula apenas interacciona con el ligando anfifílico). En la actualidad, los polímeros anfifílicos más utilizados se basan en un esqueleto de poli(anhídrido maleico) con cadenas laterales hidrofóbicas como tetradeceno⁵⁶, octadecano⁵⁸ o dodecil⁵⁹. Estos polímeros recubren la superficie del QD y están unidos entre sí mediante el empleo de un entrecruzador.

Un inconveniente del empleo de estos polímeros es su elevado peso molecular, lo cual incrementa notablemente el diámetro hidrodinámico de la nanopartícula⁶⁰ (como se puede observar en la Figura 10), ya que hay que tener en cuenta que los nanocristales también conservan la capa nativa de ligandos hidrófobos. Por todo ello, se han investigado otros recubrimientos alternativos (p. ej. el anhídrido maleico-poliestireno) y la eliminación del empleo de entrecruzador⁶¹.

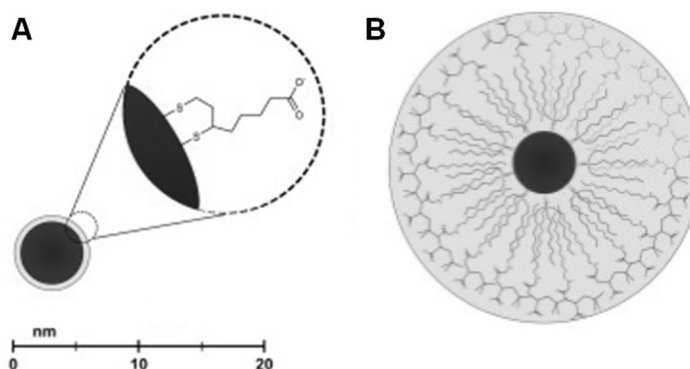


Figura 10. Diferencia de tamaño de partícula para un quantum dot A) funcionalizado mediante intercambio de ligandos con DHLA y B) recubierto con polímero anfifílico.

Para terminar, solo resaltar que en medio acuoso se debe disponer de nanopartículas compatibles, cuyo recubrimiento (idealmente) debería evitar que los QDs se agreguen durante periodos de almacenamiento largos, que mantengan el rendimiento cuántico de la emisión luminiscente y el tamaño global del QD por debajo de los 10 nm. Por desgracia, los recubrimientos ensayados hasta el momento no cumplen todas estas condiciones

simultáneamente por lo que actualmente se continúa trabajando para perfeccionar los procedimientos de solubilización de las nanopartículas.

A.2.5 Inmovilización de quantum dots

Las excelentes propiedades optoelectrónicas que muestran los quantum dots, junto con las mejoras logradas en el proceso de solubilización de los mismos en medios acuosos, han permitido el desarrollo de un gran número de aplicaciones analíticas donde son utilizados en forma de dispersión coloidal. Sin embargo, para el desarrollo de sensores es necesario inmovilizar las nanopartículas en un soporte sólido adecuado para logra fabricar fases sólidas activas. En un soporte ideal las nanopartículas deben ser retenidas (evitando el posible lixiviado de las mismas) pero sin perder sus propiedades ópticas.

Las formas de inmovilización de los QDs en un soporte sólido dependen del tipo de análisis que se va a desarrollar y pueden ser: atrapamiento físico, unión covalente, enlaces dativos/coordinados, interacciones electrostáticas y de afinidad (o por combinación de varios de estos mecanismos). Cualquiera que sea el método escogido para llevar a cabo la inmovilización debe tener en cuenta los medios disponibles para la bioconjugación, la proximidad requerida entre los QDs y el medio de reconocimiento, así como el tamaño y movilidad del analito. En algunas aplicaciones la estabilidad de la inmovilización y la densidad de quantum dots en la interfase resultan importantes. Así, la mayoría de los bioensayos y biosensores para ácidos nucleicos o proteínas requieren la inmovilización de la nanopartícula en forma de láminas en un sustrato, en lugar de una red tridimensional.

La inmovilización de quantum dots se ha llevado a cabo en diferentes soportes sólidos como polímeros, vidrios y sol-geles, obteniéndose materiales sólidos (fases activas) con quantum dots inmovilizados. En muchos casos el proceso de síntesis se realiza consiguiendo el crecimiento de la nanopartícula en el interior del material sólido o en su precipitación en el interior de un medio estructurado⁶². Por desgracia, este crecimiento *in situ* no permite el control sobre la superficie del QD (estados superficiales, forma, pasivación, etc.). Además, otra limitación importante de la preparación directa de los nanomateriales en el interior del soporte sólido, es que para estructuras más complejas como nanohilos, *nanorods*, o QDs tipo núcleo/recubrimiento, el proceso de síntesis se complica y puede ser difícil encapsularlos mediante estos procedimientos⁶³.

En esta línea, las fases sensoras basadas en matrices inorgánicas tipo **sol-gel** han demostrado ofrecer materiales muy adecuados para el desarrollo de sensores ópticos luminiscentes, simplemente por el atrapamiento de la molécula indicadora (incluyendo QDs) dentro de la

estructura inorgánica, durante el proceso de polimerización del sol-gel⁶⁴. Este tipo de materiales permite la encapsulación de moléculas frágiles y térmicamente sensibles tales como: enzimas, proteínas y anticuerpos⁶⁵. Entre las propiedades más destacadas de este tipo de soportes cabe resaltar su elevada estabilidad y resistencia a la degradación. La mayoría de las aplicaciones publicadas sobre sol-gel dopados con QDs explotan las favorables propiedades optoelectrónicas de las nanopartículas (p. ej. medios activos en láseres sintonizables o en placas solares). Sin embargo, la incorporación de QDs en materiales tipo sol-gel ofrece un rico potencial en el campo de los (bio)sensores. No obstante, hay que mencionar que estos prometedores materiales también presentan ciertos inconvenientes, incluyendo posibles cambios de la polaridad, reacciones sobre la superficie de los quantum dots durante el proceso sol-gel, e incluso la lixiviación de los QDs durante el proceso de medida.

Otra posibilidad para el desarrollo de sensores químicos basados en QDs es incorporar las NPs en el interior de polímeros (p. ej. se han usado QDs de CdSe embebidos en la matriz polimérica de PMMA (poli (metilmetacrilato)) para detectar cambios de temperatura⁶⁶ o nanoesferas acrílicas de QDs para detectar iones⁶⁷). Además, también se pueden incorporar los QDs en el interior de polímeros de impronta molecular (MIPs). Estos MIPs exhiben una alta selectividad por el analito de interés, ya que se generan tras la polimerización y entrecruzamiento de los correspondientes monómeros funcionales alrededor de una molécula molde cuya estructura es similar al analito o el propio analito. Tras la extracción de la molécula molde, en el interior de la estructura polimérica existirán cavidades complementarias al analito en tamaño, forma geométrica y orientación de grupos funcionales. Así, se han evaluado MIPs modificados con quantum dots como sensores químicos fluorescentes⁶⁸. La emisión luminiscente de los QDs incluidos en la estructura polimérica cambia debido a procesos de transferencia de energía entre las nanopartículas y las moléculas tras el reconocimiento por el MIP, obteniéndose una señal analítica medible²⁸.

Otras estrategias descritas incluyen la deposición de nanocristales en sustratos hidrofílicos (empleando la técnica Langmuir-Blodgett⁶⁹) o la fabricación de capas autoensambladas electrostáticamente⁷⁰.

A.3 DOPAJE DE QUANTUM DOTS

En los últimos años el **dopaje de QDs** ha demostrado que puede jugar un papel importante en el desarrollo de nuevas aplicaciones tecnológicas y analíticas.

Es bien conocido que la incorporación de impurezas o defectos en la estructura de un semiconductor es uno de los principales medios para el control de su conductividad eléctrica y también puede causar un gran efecto sobre sus propiedades ópticas, luminiscentes, magnéticas, etc.⁷¹⁻⁷³. A modo de ejemplo, mientras el ZnO estequiométrico puro es un aislante, la conductividad de este compuesto puede crecer 10 órdenes de magnitud introduciendo pequeños cambios en la concentración de los defectos nativos y no nativos en la estructura cristalina (adición de zinc o aluminio intersticial)⁷⁴.

El dopaje de semiconductores se puede clasificar en tres categorías⁷⁴, según los dopantes actúen como:

- iones magnéticos. Los semiconductores contienen impurezas magnéticas y son conocidos como semiconductores magnéticos diluidos (DMSs).
- activadores luminiscentes en nanocristales semiconductores. Esta es la categoría estudiada en la presente tesis doctoral y que se abordará más adelante en profundidad. La adición de iones como el Mn^{2+} o el Eu^{3+} puede ampliar el intervalo útil de propiedades espectroscópicas que pueden conseguirse con este tipo de nanomateriales.
- dopantes electrónicos, de manera que se introducen portadores de carga que actúan como donadores o aceptores dentro de la estructura de bandas del semiconductor. Esta es la categoría menos estudiada hasta la fecha.

Esta Tesis Doctoral se centra en la síntesis y empleo de quantum dots dopados con impurezas metálicas para obtener nanopartículas cuyas propiedades luminiscentes difieren de las que presentan en ausencia del dopante. Por ello, en esta sección se revisarán los antecedentes clave del dopaje de quantum dots empleando impurezas metálicas como activadores luminiscentes.

En un trabajo pionero publicado en 1994 por Bhargava y Gallagher⁷⁵, se propuso el dopaje de QDs como alternativa para manipular las propiedades magnéticas y optoelectrónicas de los QDs. Los resultados obtenidos sugerían que los nanocristales semiconductores dopados podían formar una nueva clase de materiales luminiscentes con un amplio intervalo de aplicaciones en fabricación de pantallas, iluminación, sensores y láseres^{76,77}.

La estrategia para obtener quantum dots dopados (d-dots) consiste en la adición controlada de impurezas metálicas durante el proceso de síntesis de las nanopartículas. La selección de la

impureza es un proceso crítico si se pretende obtener un dopaje efectivo, ya que el tamaño y estado de oxidación de la impureza deben ser compatibles con el material semiconductor que compone el núcleo del quantum dot^{78,79}. Además, se ha comprobado que únicamente una pequeña fracción de las impurezas metálicas añadidas durante la síntesis es finalmente incorporada en la estructura del nanocristal.

Las impurezas metálicas empleadas pueden ser muy variadas, normalmente incluyen elementos como metales de transición, Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} o lantánidos incluyendo el Eu^{3+} , Tb^{3+} , Er^{3+} o Sm^{3+} ^{77,80,81}. La Figura 11 muestra la variedad de nanopartículas dopadas descritas y su emisión en diferentes regiones del espectro. Seguramente son los QDs dopados con Mn o Cu los más estudiados hasta la fecha⁸². El dopaje con lantánidos es menos favorable debido a que sus propiedades químicas (radio iónico y estado de valencia) difieren bastante de los cationes metálicos que componen el núcleo del semiconductor⁸⁰, aunque existen trabajos donde se ha conseguido un dopaje óptimo y se ha observado su emisión característica^{83,84}. Recientemente se ha puesto especial interés en el dopaje dual o co-dopaje de QDs, obteniendo nanopartículas dopadas con Cu^{2+} - Co^{2+} , Cu^{2+} - Mn^{2+} , Cu^{2+} - Pb^{2+} , Cu^{2+} -lantánidos o combinaciones de Mn^{2+} - Eu^{3+} ⁸¹. La composición del núcleo también debe escogerse cuidadosamente. Los núcleos más estudiados son aquellos semiconductores formados por elementos de los grupos 12-16 de la Tabla Periódica, que presentan un salto de banda grande, principalmente ZnS ($E_g \sim 3.6$ eV), ZnSe ($E_g \sim 2.7$ eV), ZnO ($E_g \sim 3.2$ eV), CdS ($E_g \sim 2.42$ eV) y CdSe ($E_g \sim 1.73$ eV). Entre ellos, conviene destacar el ZnS por ser el más estudiado (empleado).

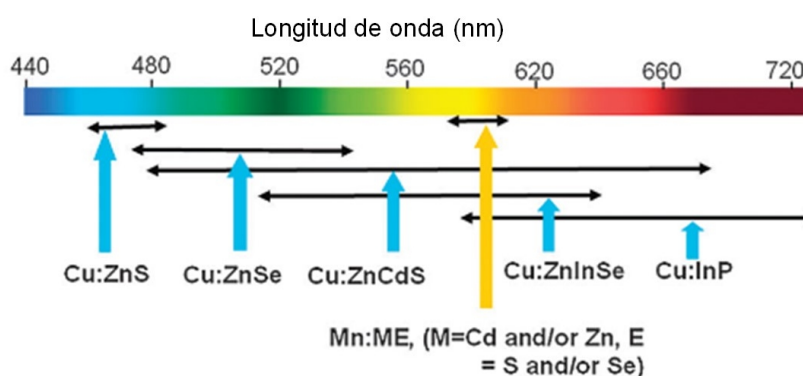


Figura 11. Intervalo de emisión luminiscente de varios QDs dopados⁸⁵.

A.3.1 Síntesis de QDs dopados (d-dots)

Aunque la incorporación de una cantidad significativa de dopantes en la estructura de los nanocristales es difícil⁷⁹, existen varias rutas de síntesis para obtener QDs dopados, que se pueden agrupar en métodos de síntesis en fase acuosa o en fase orgánica.

A.3.1.1 Métodos de síntesis en fase acuosa

Las rutas de síntesis que se llevan a cabo en medios acuosos son las más empleadas porque permiten obtener los átomos de impurezas distribuidos uniformemente en las nanopartículas, y además, controlar el tamaño y forma de los nanocristales, así como, el rendimiento de producción y reducir los costes. Las vías más populares de síntesis se conocen como “métodos químicos suaves” e incluyen la precipitación química y el empleo de microemulsiones.

La obtención de QDs dopados tras una reacción de precipitación en disolución acuosa consiste típicamente en la *co-precipitación* de los iones dopantes y los cationes precursores (sales de Zn^{2+} o Cd^{2+} como acetatos, sulfatos, nitratos, percloratos o cloruros) con el anión de interés (normalmente S^{2-} o Se^{2-}) en presencia de los agentes coordinantes apropiados, normalmente tioles, fosfatos, polímeros o incluso proteínas. Los precursores utilizados, la temperatura de reacción y el pH son tres factores que determinarán las propiedades de los QDs dopados obtenidos, influyendo en la distribución y tamaño de partícula y en su emisión luminiscente. En este tipo de síntesis, la temperatura de reacción es normalmente baja (menor de 100 °C) y esto no permite eliminar eficazmente los defectos superficiales de las nanopartículas (lo que puede traducirse en bajas eficiencias luminiscentes). Esta reducción de la luminiscencia puede subsanarse empleando los métodos comentados en la sección A.2.4 o mediante la adición de un recubrimiento con otro semiconductor^{80,81}.

Otra estrategia para la síntesis de d-dots en medios acuosos menos común es el método de *micelas inversas*. En este caso, las disoluciones acuosas de todos los precursores se disuelven en agua y se mezclan también con un disolvente orgánico no polar como heptano u octano y un surfactante apropiado. Sin embargo, las nanopartículas así obtenidas muestran una pobre eficiencia luminiscente aunque el recubrimiento con otro semiconductor (QDs tipo núcleo/recubrimiento dopados) permite mejorar sus propiedades luminiscentes^{86,87}.

Con el fin de mejorar los procedimientos sintéticos en medios acuosos, se han propuesto rutas alternativas que consiguen un incremento de la temperatura por encima del punto de ebullición del agua.

En el proceso de *síntesis hidrotermal*^{88,89} la mezcla de los precursores empleados en la síntesis convencional, se lleva a cabo en un recipiente cerrado que se calienta a la temperatura deseada. El problema de esta síntesis es que se obtienen NPs con tamaños superiores a los 10 nm. No obstante, esta vía está indicada para obtener fácilmente nanomateriales 1D dopados, con buenas propiedades luminiscentes. La *síntesis asistida por microondas*⁹⁰ también permite

conseguir temperaturas más elevadas obteniendo un dopaje efectivo y con un crecimiento de las nanopartículas muy rápido.

A.3.1.2 Métodos de síntesis en fase orgánica

Los quantum dots dopados (d-dots) obtenidos mediante síntesis orgánica presentan una alta calidad y se consiguen empleando disolventes orgánicos y elevadas temperaturas (mayores de 300 °C). Así se logra mejorar la superficie de las nanopartículas obtenidas y minimizar los defectos superficiales. Sin embargo, este tipo de estrategias dificulta la incorporación de los dopantes en la estructura de la nanopartícula⁹¹.

Se han propuesto diferentes teorías para explicar los problemas relacionados con el dopaje de QDs sintetizados en fase orgánica^{71,72}. La primera teoría propuesta por **D. Turnbull**⁹² en 1950, propone que el proceso de dopaje se complica cuanto menor es el tamaño del cristal, ya que esta disminución de tamaño implica la formación de cristales con menor número de átomos (que estadísticamente son más estables cuanto mayor es su pureza). Por otro lado, una de las explicaciones más aceptada se basa en **fundamentos termodinámicos**, y postula que los nanocristales experimentan un proceso de “autopurificación”⁹³ debido a que la difusión de la impureza es menor en el material semiconductor. Esto implica que los nanocristales son difíciles de dopar y finalmente las impurezas son expulsadas. Por otro lado, si los **factores cinéticos**^{74,78} son los que controlan el proceso de dopaje, las impurezas son adsorbidas en su mayoría en la superficie del nanocristal ya que su enlace es favorable. La superficie de la nanopartícula depende de la estructura cristalina y de la forma del nanocristal, siendo, por tanto, estos dos factores los que afectan al dopaje⁹⁴.

Se han descrito tres estrategias para introducir impurezas en la estructura cristalina de los QDs durante el proceso de síntesis en fase orgánica, dependiendo del momento en que se introducen los iones dopantes 1) junto con los precursores que forman el núcleo del QD, 2) antes de que se produzca la formación del núcleo (Figura 12, diagrama superior) y 3) durante la formación del recubrimiento del QD (Figura 12, diagrama inferior).

La primera estrategia es similar a la que se emplea en la típica síntesis en fase acuosa, donde se introducen simultáneamente en el sistema los precursores de los iones dopantes y de los elementos que forman la nanopartícula. Desafortunadamente, una parte significativa de los QDs así obtenidos no está dopada y presenta las impurezas adsorbidas en la superficie⁹⁵. Además, en este caso, la eficacia del dopaje depende principalmente del tipo de precursor empleado para introducir la impureza⁹⁶ y del tamaño de partícula⁹⁷.

La segunda y la tercera estrategias de dopaje mencionadas, *nucleación-dopaje* y *crecimiento-dopaje*, se basan en la disociación del proceso de dopaje de la etapa de nucleación del QD y/o de la etapa de crecimiento⁹⁸. La Figura 12 describe esquemáticamente ambos procesos.

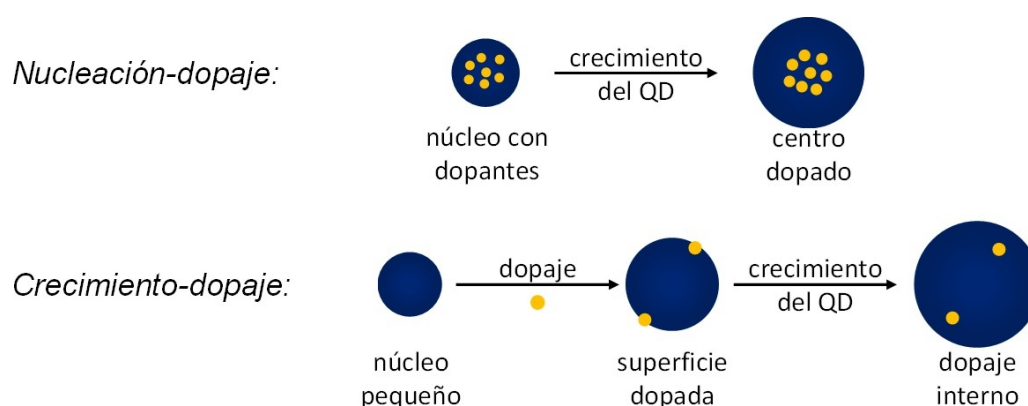


Figura 12. Esquema de dos posibles estrategias para la introducción de iones dopantes en la estructura de quantum dots: *nucleación-dopaje* (superior) y *crecimiento-dopaje* (inferior).

Normalmente, este tipo de estrategias para la síntesis de d-dots en medio orgánico requieren el empleo de reactivos organometálicos como precursores metálicos p. ej. reactivos químicos genéricos y estables al aire. Sin embargo, los precursores de S o Se suelen estar disueltos en disolventes pirofóricos, tóxicos y caros por lo que se están estudiando nuevos reactivos menos perjudiciales y acordes con la llamada “*química verde*”⁸¹.

A.3.2 Propiedades luminiscentes de los QDs dopados

La Tabla 1 recoge las propiedades luminiscentes más relevantes de quantum dots dopados con diferentes iones reportados en la bibliografía. En la siguiente sección se enumeran con mayor detalle las propiedades específicas de los quantum dots dopados con Mn^{2+} por ser los utilizados en la presente Tesis Doctoral.

Tabla 1. Resumen de las principales propiedades ópticas de d-dots⁸¹.

Ion dopante	Composición del QD	$\lambda_{emisión}$ del dopante	Tiempo de vida	Rendimiento cuántico (%)
Mn^{2+}	ZnS, ZnSe, CdS, CdSe (<3,3 nm), CuInS ₂ , AgInS ₂	590 nm principalmente	ms	10-60
$Cu^{+,2+}$	ZnS, ZnSe, CdS, InP, ZnCdS, ZnInSe	Vis-NIR, depende del núcleo del QD	μs	10-30

INTRODUCCIÓN

Ni ²⁺	ZnS, CdS, ZnO, ZnSe, CdZnS	Vis-NIR, depende del núcleo del QD	μs	5-30
Ag ⁺	ZnS, CdS, CdSe, CdZnS	490-630 nm, depende del núcleo del QD	sin datos	5-58
Pb ²⁺	ZnS	650 nm	ms(a bajas T)	sin datos
Ln ³⁺	ZnS, ZnSe, ZnO, CdS	Depende del Ln(III)	μs-ms	sin datos

Solo para los QDs dopados con Mn²⁺ la fotoestabilidad reportada⁸¹ es excelente.

A.3.2.1 Quantum dots dopados con Mn²⁺

Mecanismo luminiscente

Según la *teoría del campo cristalino*, el ion Mn²⁺ tiene una configuración electrónica d⁵, donde el estado fundamental es ⁶A₁ y su primer estado excitado es ⁴T₁. La transición d-d desde el estado ⁴T₁ al ⁶A₁ está prohibida por el spin, lo que da lugar a constantes de desactivación del estado excitado por vía radiacional muy bajas y asimismo, bajos coeficientes de extinción molar para las absorciones de energía correspondientes a las transiciones entre los estados ⁶A₁ y ⁴T₁⁹⁹.

Por otro lado, los nanocristales semiconductores compuestos por elementos de los grupos 12-16 de la Tabla Periódica presentan unos coeficientes de extinción molar muy superiores a los del Mn²⁺ (típicamente entre 4 o 5 órdenes de magnitud mayores), lo que posibilita que éstos actúen como centros radiacionales altamente eficaces^{100,101}. Como resultado de introducir iones dopantes (Mn²⁺) en la estructura del QD, se produce una fuerte interacción entre los estados electrónicos d del Mn²⁺ con los estados s-p de las bandas del semiconductor que constituye la nanopartícula. Así pues, la existencia de iones Mn²⁺ en los nanocristales semiconductores proporcionará nuevas propiedades típicas de esta clase de materiales (particularmente se observa una intensa emisión fotoluminiscente con largos tiempos de vida media).

Existen dos escenarios fundamentales que describen la emisión fotoluminiscente de los d-dots dopados con Mn²⁺. En el primero de ellos, los estados energéticos del Mn²⁺ se encuentran dentro del salto de banda del semiconductor. El segundo escenario es cualitativamente distinto (y menos habitual) y tiene lugar cuando los niveles energéticos del ion dopante (Mn²⁺) no se encuentran dentro del salto de banda del nanomaterial.^{99,102,103}

En el primer escenario (Figura 13), se utilizan QDs formados por semiconductores de ZnS, ZnSe o CdS que presentan una gran diferencia de energías entre la banda de valencia y la de

conducción, de forma que los niveles energéticos del Mn^{2+} se encuentran dentro del salto de banda de la nanopartícula. Tras la excitación del QD, se produce la transferencia de energía desde los niveles energéticos excitados del material semiconductor a los niveles energéticos excitados del manganeso y se registra la desactivación radiacional debida a la transición típica del Mn (${}^4\text{T}_1 \rightarrow {}^6\text{A}_1$) en torno a 590 nm^{71,80,85,99}. Esta emisión presenta altos rendimientos cuánticos y tiempos de vida media largos (ms). Las propiedades de estos d-dots los hacen muy adecuados para aplicaciones foto- o electro-luminiscentes.

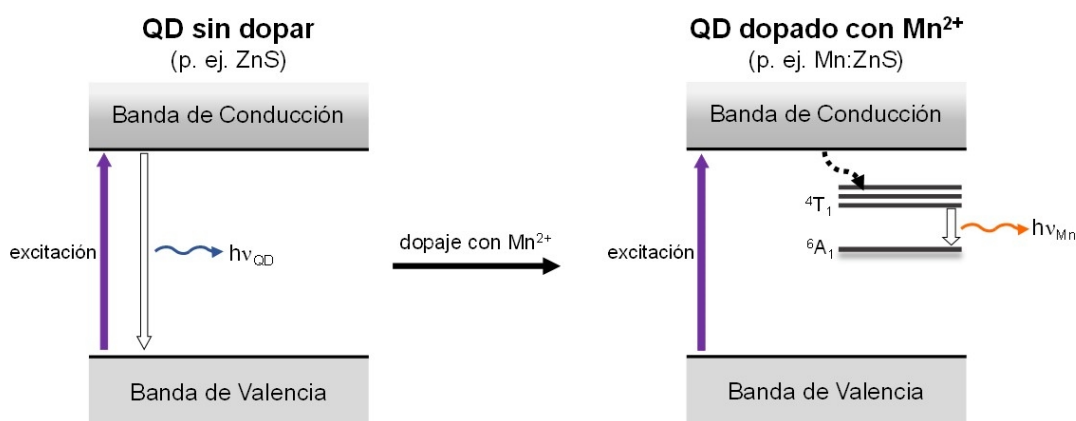


Figura 13. Esquema que representa el proceso de emisión de QDs dopados con manganeso en el primer escenario⁹⁹.

Además, si se controla la cantidad de manganeso que se incorpora como dopante, es posible obtener espectros de emisión luminiscente con dos máximos de emisión. Una banda correspondiente a la transición d-d del Mn en torno a 590 nm y una segunda banda a menores longitudes de onda (420-470 nm), emisión debida a la recombinación del par electrón-hueco del semiconductor nanométrico.

En este tipo de QDs dopados, la emisión es menos energética que la debida al salto de banda del semiconductor (longitud de onda de emisión desplazada hacia el rojo). Por tanto, dicha emisión no es adsorbida por el material que compone el QD, minimizando los problemas de autoabsorción⁸¹.

El segundo escenario descrito es mucho menos habitual y se produce cuando los estados energéticos del manganeso no se encuentran dentro del salto de banda del semiconductor, por lo que no es posible la transferencia de energía desde el estado excitado del semiconductor a los niveles energéticos excitados del manganeso (es decir, los excitones del semiconductor tienen menor energía que los estados energéticos d del dopante)⁹⁹.

Este escenario se ha descrito empleando semiconductores tipo CdSe. En este tipo de nanocristales semiconductores, la emisión se puede sintonizar en función de su tamaño (lo cual

varía la energía del salto de banda del QD). Pero además, el dopaje de QDs de CdSe resulta muy interesante debido a que la adición de Mn añade un grado de libertad adicional para controlar sus propiedades foto-físicas^{99,103}. Esto se puede observar en la Figura 14¹⁰², si se emplean CdSe QDs de tamaño inferior a 3,3 nm, la energía del salto de banda del semiconductor es mayor que la energía de los estados excitados del Mn²⁺ y por tanto se observa la emisión debida a la transición d-d del ion dopante (emisión fosforescente), que corresponde a la situación descrita en el primer escenario. Sin embargo, si se incrementa el tamaño del semiconductor, la emisión que se produce con mayor probabilidad es la debida a los nanocristales sin dopar (emisión fluorescente) ya que los estados energéticos del Mn no se encuentran en el salto de banda del semiconductor.

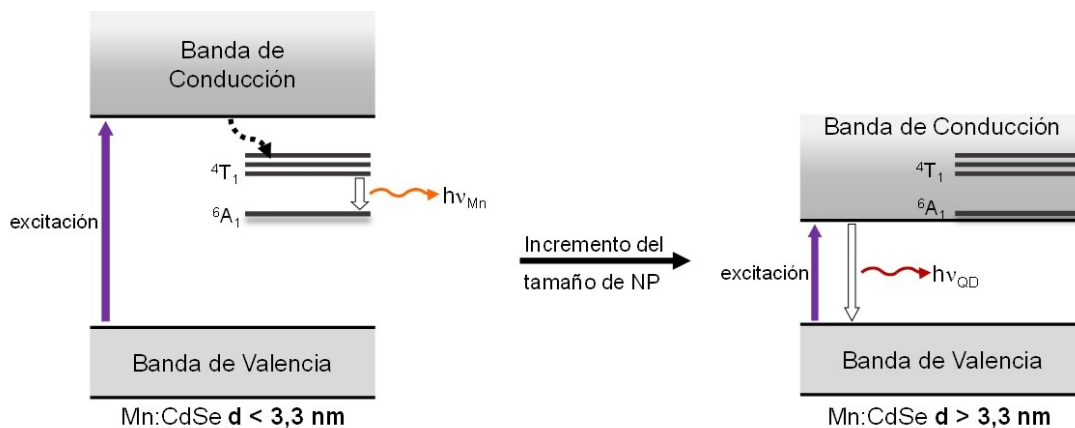


Figura 14. Esquemas que recogen el proceso de emisión de QDs de CdSe dopados con manganeso en función del tamaño de nanopartícula¹⁰².

Tiempo de vida de la emisión luminiscente

Como es lógico, debido a la transición ${}^4T_1 \rightarrow {}^6A_1$, los QDs dopados con Mn presentan un tiempo de vida media largo (ms) característico de la emisión fosforescente independiente del semiconductor que compone los QDs. Además, este tiempo de vida es mucho más elevado que los QDs fluorescentes convencionales (ns)^{104,105}.

Estos tiempos de vida tan largos permiten (como en fosforescencia molecular) evitar las interferencias típicas de autofluorescencia y luz dispersada.

Modificación de la emisión del Mn²⁺

En principio, la emisión fotoluminiscente debida al Mn²⁺ en los QDs dopados está centrada en torno a 590 nm, independientemente del tamaño, forma y naturaleza de la nanopartícula. Dicha emisión se debe únicamente a la transición entre los estados d ${}^4T_1 \rightarrow {}^6A_1$ del Mn²⁺ (transición d-d).

Sin embargo, estudios recientes^{106,107} han demostrado que es posible modificar la longitud de onda de emisión del Mn dentro de un intervalo limitado. Esto se consigue localizando los iones Mn^{2+} en la región del núcleo, sub-superficie y superficie de los nanocristales. Es decir que la emisión debida al Mn está íntimamente influenciada por el entorno estructural en el que se encuentran los iones Mn^{2+} atrapados en el semiconductor^{71,77,108}.

Otra posibilidad interesante para modificar la emisión de los quantum dots dopados con Mn^{2+} es incluir además otro ion diferente como el Cu^{2+} . Las partículas dopadas con manganeso mantendrán su emisión característica en 590 nm, mientras que la impureza de Cu^{2+} proporcionará un máximo de emisión modificable en función del tamaño y naturaleza del semiconductor en la región azul-verde¹⁰⁹. Este tipo de nanopartículas tienen un futuro prometedor como diodos emisores de luz blanca (WLEDs), puesto que emiten en una amplia región del espectro visible, similar a la luz del sol y la luz detectable por el ojo humano¹¹⁰.

Finalmente, las variaciones en las condiciones de presión y temperatura utilizadas durante la síntesis también pueden modificar la emisión luminiscente de los d-dots. En concreto, se ha demostrado que la temperatura produce un descenso en la intensidad de emisión luminiscente para quantum dots de ZnS dopados con Mn, ya que la variación de la temperatura puede afectar la interacción excitón-fonón y la velocidad de transferencia de energía desde el excitón al ion dopante^{111,112}. También para QDs de ZnS dopados con Mn (Mn:ZnS) se ha observado que un incremento de la presión provoca cambios en la intensidad de la emisión (que dependen del tamaño de las nanopartículas)^{113,114}. El aumento de la presión produce un decrecimiento en la distancia interatómica lo que se traduce en un incremento del solapamiento entre los orbitales electrónicos contiguos que, de nuevo, influye en la interacción excitón-fonón. Estos efectos deben tenerse en cuenta para el desarrollo de aplicaciones basadas en quantum dots dopados.

Los QDs dopados con Mn pueden además, mostrar el fenómeno conocido como “*upconverting*”. El término *upconverting* se refiere a un proceso óptico no lineal que está caracterizado por la absorción secuencial de dos o más fotones que conduce a la emisión de radiación a longitudes de onda más cortas que la de longitud de onda de excitación¹¹⁵. Esta propiedad es muy atractiva para aplicaciones médicas de *imaging* (técnica de imagen) ya que posibilita utilizar elevadas longitudes de onda de excitación alejadas de la región ultravioleta del espectro (que resulta dañina para las células vivas).

El empleo del ion Mn^{2+} como dopante otorga a los QDs las propiedades luminiscentes que caracterizan el fenómeno de *upconverting*. Tras la excitación, la banda de emisión obtenida es similar a la propia del fenómeno luminiscente convencional, pero ligeramente desplazada hacía

el rojo (longitudes de onda más largas); además, el tiempo de vida de este tipo de emisión es más corto. El efecto observado sobre ambos parámetros se relaciona con la potencia empleada para la excitación con dos fotones¹¹⁶. Recientemente, también se ha demostrado que es posible emplear tres fotones para excitar los QDs dopados con manganeso. Esto se consigue mediante el empleo de un láser de femtosegundos en la región del infrarojo cercano (900-990 nm), este proceso se conoce como *upconversion* de tres fotones¹¹⁷. En la Figura 15 se recoge un diagrama que describe el proceso de excitación de los QDs con uno, dos y tres fotones¹¹⁸.

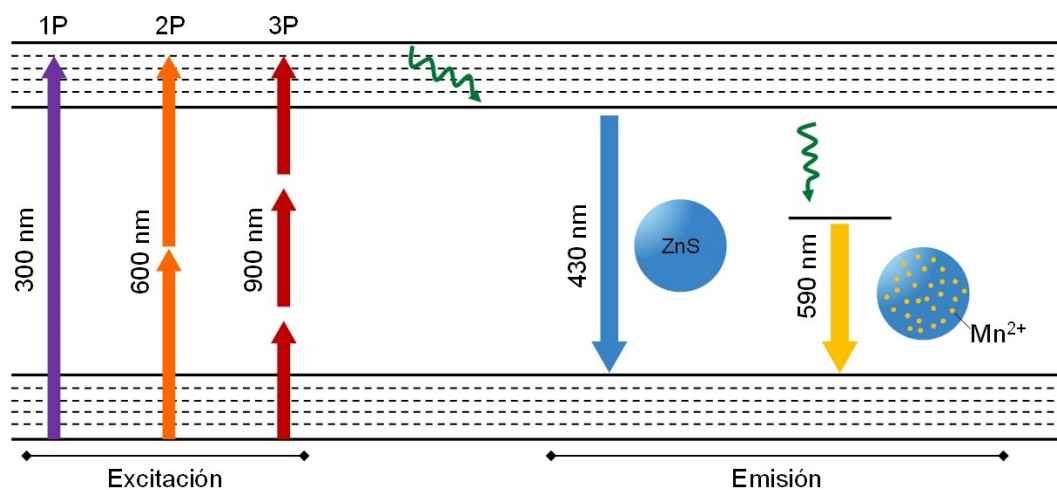


Figura 15. Emisión de QDs de Mn:ZnS tras su excitación con uno, dos o tres fotones. La excitación se puede producir con la energía correspondiente a un fotón de 300 nm (1P), dos fotones de 600 nm (2P) o tres fotones de 900 nm (3P). La emisión fluorescente debida al núcleo de ZnS se centra en torno a 430 nm, mientras que la emisión debida al dopaje con iones de manganeso (Mn:ZnS QDs) ocurre en torno a 590 nm¹¹⁸.

A.3.3 Ventajas de los d-dots para bioanálisis

Si comparamos los d-dots (p. ej. de ZnS) con QDs tradicionales (p. ej. CdSe o CdTe), existen dos ventajas obvias: las características de la emisión luminiscente y su composición potencialmente menos tóxica.

El tiempo de vida y la emisión conferida por el dopante (metal de transición o lantánido) ofrecen tiempos de vida más largos que la emisión fluorescente típica del QD o la propia autofluorescencia de medios biológicos. Esto unido a la gran separación entre la longitud de onda de excitación y emisión (característica de la emisión fosforescente) ofrece la posibilidad de llevar a cabo medidas de tiempo resuelto y por tanto emplear estos QDs para el desarrollo de aplicaciones más ventajosas en biología y medicina^{43,81}. Además, la composición química de estos d-dots no incluye metales pesados en su estructura, lo que podría mitigar los problemas de toxicidad asociados a otros núcleos que contienen Cd, Te o Pb. Aunque también se han

empleado semiconductores como el CdSe o CdS para obtener d-dots, los más utilizados hoy son los d-dots de ZnS y ZnO (por su mayor atractivo para el desarrollo de aplicaciones *in vivo*).

A.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

El término Nanometrología (ciencia de la medida aplicada a la nanoescala⁶) se utilizó por primera vez en 1991¹¹⁹. La habilidad de medir y caracterizar materiales nanométricos es crucial para fabricar nanomateriales y nanodispositivos con alto grado de exactitud y fiabilidad (nanofabricación), y permite la correcta caracterización de los nanomateriales sintetizados, controlando sus aplicaciones potenciales²¹.

La nanometrología se refiere tanto a medidas de tamaño y longitud como a medidas de fuerzas, masas, propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas, etc. de dichos materiales. Los instrumentos y técnicas de medida empleados hoy para la caracterización de nanomateriales son muchos y muy variados. Se debe resaltar que llevar a cabo medidas con precisión nanométrica no está exento de dificultades, por ejemplo cambios mínimos en las condiciones de temperatura o pequeñas vibraciones pueden tener grandes efectos sobre el resultado obtenido. Los equipos deben estar correctamente calibrados pero en la práctica no existen patrones adecuados para su calibración por lo que resulta muy complejo desarrollar y validar procedimientos de medida estándar en la nanoescala¹²⁰. Esto hace que, en ocasiones, en función de la metodología empleada para la caracterización se obtengan resultados dispares. Así ciertos autores han señalado que el tamaño del nanomaterial especificado por algunos fabricantes puede variar dependiendo de la metodología empleada para su medida, e incluso se han llegado a encontrar diferencias de dos órdenes de magnitud empleando dos técnicas diferentes¹²¹.

Los **parámetros físico-químicos** de mayor interés de los nanomateriales desde el punto de vista analítico son: tamaño y distribución de tamaños del nanomaterial, forma, estado de agregación, pureza, composición química, características superficiales, potencial zeta (o carga total superficial), estabilidad y solubilidad. Si la nanopartícula se somete a procesos de modificación posteriores (p. ej. recubrimiento o bioconjugación) sería necesario incluir otros parámetros para una adecuada caracterización de la NP (p. ej. estequiometría, volumen hidrodinámico, etc.).

A continuación se recogen de forma resumida, las técnicas de mayor interés empleadas para identificación y caracterización de nanopartículas.

A.4.1 Tamaño y distribución de tamaños

El tamaño y la forma de partícula son dos características importantes que afectan a la estabilidad física y al comportamiento de las NPs en disolución. Por tanto, conocerlas es esencial tanto para comprobar el éxito de la síntesis como para entender su comportamiento posterior.

La microscopía se puede utilizar para observar directamente la morfología de las nanopartículas (tamaño y forma) y medir sus dimensiones. Las técnicas de microscopía electrónica son muy comunes y fiables para la caracterización de los nanomateriales tras el bombardeo de la muestra con un haz de electrones. El microscopio electrónico de barrido (**SEM**) analiza los electrones secundarios que proceden de la superficie de la muestra, y proporciona información sobre el tamaño y forma de las nanopartículas. Sin embargo, no está recomendado para el estudio de QDs tipo núcleo/recubrimiento ya que no permite distinguir entre los dos materiales que conforman la nanopartícula. A menudo el microscopio SEM está equipado con un espectrómetro de energía dispersada (EDX o EDS). Este dispositivo monitoriza los rayos X que son simultáneamente emitidos por la muestra cuando es bombardeada con los electrones permitiendo llevar a cabo un análisis elemental (cualitativo y cuantitativo) de la muestra en diferentes secciones de la misma. Recientemente, se ha demostrado que el microscopio FESEM (SEM de emisión de campo) permite obtener imágenes con mayor magnificación que el SEM tradicional y proporciona información sobre la rugosidad de la superficie analizada. En el microscopio electrónico de transmisión (**TEM**) se generan imágenes a partir del haz de electrones que atraviesa la muestra (por lo que el espesor de la muestra es un parámetro muy importante) y también permite generar imágenes con mayor resolución que en el caso del SEM; es posible también confirmar la formación de QDs núcleo/recubrimiento, aportando datos sobre el recubrimiento (p. ej. su espesor y uniformidad). Si se emplea la técnica de **HRTEM** (microscopio de transmisión electrónica de alta resolución) se puede obtener una medida más precisa del tamaño de nanopartícula, visualizar los límites del entramado cristalino, obtener información cristalográfica sobre las fases cristalinas y los parámetros estructurales de los nanocristales que conforman el nanomaterial. Además, es posible acoplar otras unidades como la unidad de barrido por transmisión (STEM) (permite obtener mapas de composición de las muestras) o un espectrómetro de pérdida de energía de electrones (EELS) para mejorar la información estructural obtenida de la muestra¹²².

Otra alternativa para obtener información sobre la morfología de la muestra es emplear técnicas de microscopía de barrido con sonda (SPM). Donde la microscopía de fuerza atómica (**AFM**) es la técnica de elección para caracterizar quantum dots coloidales. Esta técnica se basa en el empleo de una sonda dotada de una punta muy fina (del tamaño de décimas de nanómetro)

que es guiada por la superficie de la muestra pudiendo realizarse el análisis en modo contacto o no contacto), y que monitoriza las interacciones entre la punta y la muestra¹²³. Esta técnica permite monitorizar muestras conductoras y no conductoras. Asimismo, tanto si las nanopartículas han sido o no bioconjugadas, permite obtener información sobre la topografía superficial y sobre las posibles interacciones entre el nanomaterial y la biomolécula^{122,124}.

Se puede afirmar que las técnicas basadas en el empleo de la microscopía resultan fundamentales a la hora de caracterizar los nanomateriales. Sin embargo, la preparación de la muestra puede resultar laboriosa y afectar a la morfología original de los nanomateriales. La preparación de muestra hace necesario depositar la muestra en un soporte sólido y a continuación someterla a condiciones de vacío o sequedad, lo que puede alterar la estructura nativa que presentan las nanopartículas dispersas en medio acuoso. Otro inconveniente a considerar es que debido al proceso de preparación de muestra pueden producirse agregados u aglomerados de NPs.

Junto con las técnicas de microscopía electrónica, los métodos basados en medidas de dispersión de luz son imprescindibles a la hora de caracterizar el tamaño (y la distribución de tamaños) de los nanomateriales. Dependiendo de la técnica aplicada se puede obtener información de la estructura, morfología, diámetro hidrodinámico, estado de agregación, y conformación molecular de nanomateriales o sus bioconjugados.

El **DLS** (Dynamic Light Scattering) resulta especialmente útil cuando se persigue obtener información sobre la distribución de tamaños de las nanopartículas. La información obtenida se corresponde con el diámetro hidrodinámico de la nanopartícula, que considera no sólo el núcleo inorgánico, sino también los ligandos que rodean a la nanopartícula (para conferirle su estabilidad en el medio en el que se encuentra) y las moléculas de disolvente (ver Figura 16). El DLS es una técnica simple, no invasiva, no destructiva y relativamente barata. Se basa en medidas de las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada, para determinar el coeficiente de difusión de la partícula, que finalmente se relaciona directamente con su tamaño hidrodinámico¹²⁵.

Otra técnica alternativa es el **MALS** (Multi-Angle Light Scattering), que proporciona información acerca de la conformación de la nanopartícula. Este tipo de detección es aplicable en un intervalo de tamaños desde 1 nm hasta 1 μ m, aunque su sensibilidad decrece a medida que decrece el tamaño de la nanopartícula. La precisión de las medidas por DLS y MALS en muestras complejas es baja, aunque se puede mejorar la medida si se combina la detección por DLS o MALS con técnicas de separación en función del tamaño.

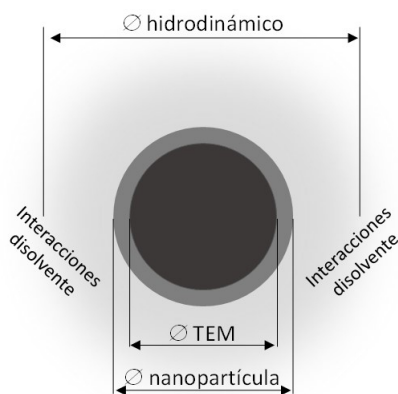


Figura 16. Representación esquemática de los tamaños de nanopartícula obtenidos empleando técnicas diferentes para un quantum dot con núcleo inorgánico (gris claro) recubierto de una capa de ligandos (gris oscuro) que interactuarán con el medio en el que se encuentren.

Si el equipo de DLS está equipado con una unidad de medida del **potencial Z**, se puede determinar la carga neta superficial de las nanopartículas dispersas además de la distribución de tamaños de la muestra. Para ello, se aplica un campo eléctrico a través de la muestra y se mide la velocidad a la que se mueven las especies cargadas hacia un electrodo. Este parámetro está fuertemente influenciado por el pH, la concentración de nanopartículas, de sales o agente dispersante, la presencia de tensoactivos, la temperatura o la naturaleza de los ligandos superficiales. Conocer el valor de la carga neta superficial es importante porque dicha carga condicionará las interacciones electrostáticas de las nanopartículas, y por tanto, proporcionará información acerca de la estabilidad de la dispersión coloidal en el medio en el que se encuentra^{124,126}. Generalmente se utiliza como valor de referencia ± 30 mV. Valores superiores indican que la estabilidad de la dispersión de nanopartículas que conforma la muestra es estable mientras que, valores inferiores indicaran inestabilidad o tendencia de la muestra a la aglomeración¹²⁴.

A.4.2 Estructura

La difracción de Rayos X (**XRD**) es una técnica de rutina empleada para obtener información estructural de muestras cristalinas, y para identificar sustancias desconocidas mediante la comparación de los datos de difracción obtenidos con bases de datos del Centro Internacional de Datos de Difracción. Se usa frecuentemente para caracterizar materiales que contienen componentes de tamaño nanométrico integrados en una matriz biológica, o materiales nanobioconjugados dispuestos en capas (nanobiohíbridos)^{124,126}. Esta técnica proporciona información sobre la cristalinidad, la estructura cristalográfica, la identificación de fases

cristalinas (o mezcla de fases), parámetros de red o tamaño de nanocrystal mediante un tratamiento (refinamiento) matemático adecuado de los difractogramas obtenidos. Cuando esta técnica se emplea para el análisis de nanomateriales, se observa un ensanchamiento en los picos de difracción que se atribuye al reducido tamaño de las nanopartículas (lo que complica, en algunos casos, la obtención de información útil).

A.4.3 Composición

Como se mencionó previamente, la técnica EDX permite el análisis elemental cualitativo y cuantitativo de nanopartículas. Esta es una técnica sencilla, rápida, directa y de fácil interpretación para caracterizar la composición de las nanopartículas, aunque posee una resolución espacial limitada y no es efectiva para detectar elementos de bajo número atómico.

Actualmente existe un gran interés en poder determinar la composición y estequiometría elemental de las nanopartículas (número de átomos que forman la nanopartícula y relación entre los elementos que la conforman). Por ello, los primeros estudios encaminados a la determinación de la composición elemental de los QDs hicieron uso de técnicas atómicas como la espectroscopia de Absorción Atómica (**AAS**) con atomizador de llama y más tarde, con horno de grafito (**GF-AAS**)¹²⁷. Posteriormente, la espectrometría de Emisión Óptica con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (**ICP-OES**) y la espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (**ICP-MS**) introdujeron importantes mejoras con respecto a AAS en la caracterización elemental¹²⁸.

La espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (**ICP-MS**) es hoy la técnica más versátil y poderosa para la determinación elemental a niveles de traza y ultratrazas en Química Analítica y ha demostrado ser una herramienta muy valiosa para la detección ultrasensible y la caracterización de los elementos que componen las nanopartículas incluso en matrices complejas^{129,130}.

Existen, además, otras técnicas de espectrometría de masas que ofrecen un enorme potencial analítico en el campo de la caracterización de NPs como la espectrometría de Masas mediante Ionización por Electrospray (**ESI-MS**) y la espectrometría de Masas mediante Ionización/Desorción por Láser asistida por Matriz (**MALDI-MS**). Ambas técnicas aportan información elemental y molecular sobre la composición, cuantificación, estructura, estado químico y la bioconjugación de nanopartículas a biomoléculas de interés¹³¹.

Por otro lado, la espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (**XPS**) y la espectrometría de retrodispersión Rutherford (**RBS**) son técnicas no destructivas útiles para el análisis de la

composición de superficies. La primera de ellas, XPS, requiere condiciones de ultra-alto vacío ya que la muestra se bombardea mediante un haz monocromático de rayos X de alta energía (1 KeV). La energía de los fotoelectrones que abandonan la muestra se determina con un analizador de electrones de alta resolución, y se obtiene un espectro con una serie de picos correspondientes a los fotoelectrones. La energía de enlace de los picos es característica de cada elemento, por lo que es posible determinar la composición superficial de los nanomateriales. A modo de ejemplo, se ha empleado esta técnica para estudiar el recubrimiento de QDs de CdSe/ZnS¹³² o la localización de iones dopantes en la superficie de las nanopartículas¹⁰⁷. Además, la forma y energía de enlace de los picos puede proporcionar información sobre el estado de oxidación del elemento en la muestra^{40,133}.

La técnica RBS presenta una elevada sensibilidad y proporciona de forma precisa la composición elemental a través de la medida de los iones dispersados por la muestra. Así, se puede determinar la composición del núcleo o del núcleo/recubrimiento de nanocristales depositados en una superficie⁴⁰.

A.4.4 Recubrimiento superficial

Para estudiar con detalle las capas de ligandos que recubren una NP se puede optar por la resonancia magnética nuclear (RMN). Esta técnica proporciona información física, química, estructural o del entorno de las especies sobre la superficie de la nanopartícula, y también aporta información acerca de las interacciones de los ligandos con otras moléculas¹²⁴. La RMN se basa en medidas del momento magnético de ciertos núcleos magnéticos, típicamente hidrógeno (¹H), carbono (¹³C) y fósforo (³¹P), en presencia de un campo magnético aplicado. Esta técnica permite llevar a cabo la monitorización de reacciones de intercambio de ligandos sobre la superficie del nanomaterial pero no es válida para nanopartículas con baja solubilidad¹³⁴.

La espectroscopia vibracional, y en concreto la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (**FTIR**) es también una técnica muy poderosa para obtener información relacionada con los enlaces químicos entre los ligandos y las nanoestructuras; así se puede obtener información sobre la presencia o ausencia de grupos funcionales específicos y determinadas estructuras químicas. En ocasiones, se producen desplazamientos en la frecuencia de absorción característica de las bandas y cambios en la intensidad, lo que sugieren cambios en la estructura química de las moléculas¹³⁵.

A.4.5 Propiedades intrínsecas

Dependiendo de la composición de las nanopartículas, el empleo de la espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible (**UV-Vis**) es una medida indispensable para la caracterización de sus propiedades ópticas y espectroscópicas, que también se puede emplear en algunos casos para evaluar su concentración, tamaño y estado de agregación¹²⁴. La “anchura a la mitad del máximo” de emisión fluorescente se emplea para estimar la distribución de tamaños de la población de quantum dots que compone la muestra: a menor anchura del máximo de emisión mayor calidad de las nanopartículas. Asimismo, el rendimiento cuántico de la fotoluminiscencia puede aportar cierta información sobre la presencia de defectos en la superficie del nanocristal¹²⁴.

Tanto en el caso de la absorción UV-Vis como de la luminiscencia, un cambio en el entorno de los ligandos o en la composición del disolvente suele provocar variaciones en los espectros de absorción y emisión de los QDs. Por todo esto, ambas técnicas se emplean profusamente y constituyen la base firme para el desarrollo de gran cantidad de sensores ópticos¹³⁶.

Finalmente mencionar que los métodos electroquímicos proporcionan información útil sobre los niveles de energía superficiales de nanopartículas semiconductoras tras los procesos de transferencia de carga¹⁰⁷. Para la caracterización de las propiedades electroquímicas de las nanopartículas (p. ej. potencial redox y reversibilidad del sistema) se puede emplear la Voltametría Cíclica (**CV**) pero pueden presentarse problemas debido a la baja solubilidad de las NPs en las disoluciones electrolíticas¹³⁷.

A.4.6 QDs dopados

Una caracterización apropiada de los d-dots requiere controlar la concentración de los elementos dopantes y determinar su localización en el nanomaterial⁷². Algunas de las técnicas mencionadas anteriormente permiten detectar la presencia de las impurezas metálicas introducidas en los d-dots. El dopaje de los nanocristales puede provocar variaciones en los parámetros estructurales de las redes cristalinas o incluso la aparición de nuevas fases que se pueden detectar mediante XRD. La XPS o RBS permiten conocer la localización de los iones dopantes si estos se encuentran en la superficie de los nanocristales e incluso determinar su estado de oxidación⁷⁴. Por otro lado, el empleo del ICP permite el análisis y la cuantificación de todos los átomos que conforman la NP. Además, dado que la luminiscencia proporciona información sobre los procesos radiativos que se producen en el interior de las nanopartículas, se puede emplear como herramienta de rutina para comprobar el éxito del proceso de dopaje.

Sin duda, la espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica (**EPR**) puede considerarse como una técnica específica para la caracterización de d-dots puesto que es sensible a la presencia de electrones paramagnéticos (como el Mn). Esta técnica permite conocer el estado de oxidación de los iones paramagnéticos, obtener información de la simetría y/o de la distribución electrónica de un ion paramagnético en relación a los átomos de los ligandos que constituyen el entorno del mismo y finalmente cuantificar la concentración del ion dopante en la nanopartícula^{74,138}.

Recientemente, se ha propuesto la posibilidad de conocer la localización de las impurezas metálicas en los d-dots de forma directa mediante la toma de imágenes combinando el empleo de microscopía de transmisión electrónica con análisis estadístico multivariante^{139,140}.

A.4.7 Otras técnicas

Para concluir esta sección hay que destacar que muchas de las técnicas anteriormente descritas son complementarias y se emplean para llevar a cabo la caracterización del nanomaterial en su forma aislada. Sin embargo, en la mayoría de las aplicaciones, las nanopartículas se someten a procesos de modificación o derivatización posterior (p. ej. solubilización en medios acuosos o derivatización con algún tipo de biomolécula) para adaptar el material a las exigencias de la aplicación que se pretende desarrollar¹²⁴. En estos casos, además de las técnicas de caracterización que hemos discutido a lo largo de esta sección, puede ser necesario emplear otras técnicas diferentes para la caracterización o la purificación.

Las técnicas de separación son relativamente baratas y normalmente están disponibles en la mayoría de los laboratorios. Algunas ya se emplean de forma rutinaria para la purificación de las NPs (aisladas o funcionalizadas), pero también pueden ser bastante efectivas para una caracterización posterior. Las técnicas cromatográficas, y en concreto la cromatografía líquida de alta eficacia (**HPLC**), acoplada a una columna adecuada ya ha demostrado su utilidad para la caracterización de nanopartículas bioconjugadas. En concreto, la cromatografía de exclusión por tamaños (**SEC**) se ha aplicado a la separación de muestras complejas de nanopartículas, entre ellas QDs (aunque estos métodos están limitados por la estabilidad coloidal de las partículas, que pueden agregarse o adsorberse en la fase estacionaria)^{141,142}.

Por otro lado, los métodos electroforéticos resultan también de gran utilidad para la caracterización de NPs bioconjugadas. Bajo las condiciones óptimas, la electroforesis en gel ha mostrado buena resolución, siendo capaz de separar nanopartículas marcadas con solo una, dos o tres biomoléculas sobre su superficie¹⁴³. Otra técnica muy empleada para la purificación de nanomateriales es la ultracentrifugación analítica (**AUC**). Su mayor ventaja es su efectividad para

trabajar con nanopartículas que presentan dispersión de tamaños. La velocidad de sedimentación de las partículas depende de la densidad de las mismas y del medio en el que estén suspendidas y no del tamaño de partícula. Consecuentemente, las NPs se comportan de forma distinta cuando se someten a una fuerza centrífuga^{124,125}.

Por último, la técnica **FFF** (Field-Flow Fractionation)¹⁴⁴ es una herramienta de separación hidrodinámica de flujo asistido que permite la separación física de pequeñas cantidades (masas en el intervalo de ng- μ g) de macromoléculas o partículas. Esta técnica se considera hoy clave por ser muy versátil y con un alto potencial para separar, detectar y cuantificar NPs en matrices medioambientales¹⁴⁵. La separación de las nanopartículas tiene lugar en función de su diámetro hidrodinámico (en ausencia de una fase estacionaria), mientras que la detección dependerá del detector concreto (acoplado en línea) seleccionado.

A.5 APLICACIONES ANALÍTICAS DE LOS QUANTUM DOTS BASADAS EN LA DETECCIÓN LUMINISCENTE

Las especiales propiedades de los quantum dots explican su gran atractivo para desarrollar aplicaciones analíticas nuevas en diferentes campos (Figura 17), en especial en (bio)química, biología y medicina.

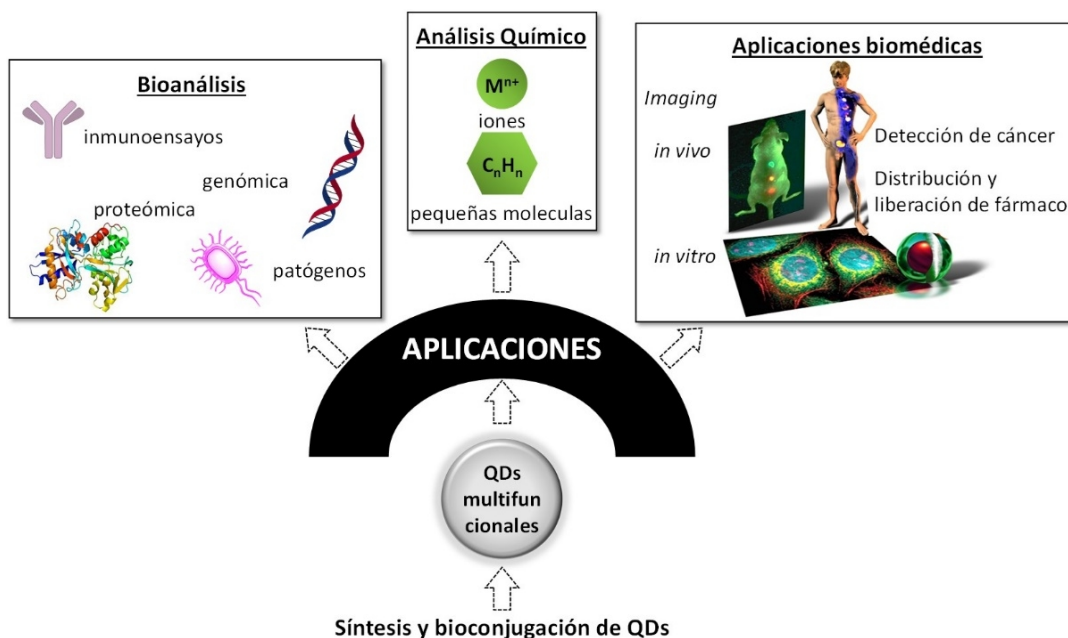


Figura 17. Resumen de las principales aplicaciones de los QDs en (bio)análisis.

Los QDs ofrecen una excelente alternativa a los fluoróforos convencionales. La emisión luminiscente de los QDs puede ser sensible a la presencia de ciertas moléculas, lo que da lugar a una alteración de la emisión luminiscente de la nanopartícula (señal analítica) debido a la transferencia de electrones, de energía (FRET-Föster o Fluorescence Resonance Energy Transfer) o la aparición de trampas o defectos¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Es decir, la medida de tales señales permite el desarrollo de nuevos sensores luminiscentes de los analitos correspondientes.

Por ejemplo, la emisión fotoluminiscente de un QD está fuertemente influenciada por el estado de su superficie. Los pares hueco/electrón creados en el núcleo del QD están espacialmente confinados por el tamaño de la nanopartícula. Por ello, cualquier cambio superficial o interacción física o química de una especie dada con la superficie del nanocrystal podría causar la creación de trampas que, obviamente, pueden provocar cambios en la eficiencia de la recombinación de los excitones, afectando a la emisión luminiscente¹⁴⁹. Las alteraciones de la emisión de los nanocrystal puede estar causada por diversos fenómenos como las interacciones con iones, procesos de recombinación no radiativa, procesos de transferencia de electrones o efectos de filtro interno¹⁵⁰.

Los mecanismos de transferencia de energía, en concreto, se han empleado ampliamente en bioanálisis. En particular los QDs presentan una serie de ventajas como fluoróforos “donadores” en procesos FRET¹⁵¹: su emisión es sintonizable lo cual permite aumentar el grado de solapamiento espectral que junto con el elevado rendimiento cuántico de los QDs, posibilita mantener un proceso FRET eficaz para distancias de separación aceptor-donador (A-D) mayores. Además, el empleo de quantum dots dopados como donadores en sistemas FRET resulta muy atractivo debido a los largos tiempos de vida del estado excitado (que permiten eliminar las interferencias de los medios biológicos)⁸¹.

CRET (Chemiluminescence Resonance Energy Transfer) y BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) son dos procesos de transferencia de energía quimioluminiscente o bioluminiscente que generan un estado excitado donador debido a una reacción química o bioquímica, respectivamente. En ambos casos, una vez que se produce el estado excitado donador, la eficiencia de la transferencia de energía se puede modelar como en el caso del FRET. Una ventaja de CRET y BRET sobre FRET es su bajo fondo, incluso en muestras complejas. La ausencia de excitación óptica evita la autofluorescencia de la muestra, la dispersión de la luz procedente de la fuente y la excitación directa del aceptor. En este caso, los QDs resultan aceptores de energía ideales debido a sus anchos espectros de emisión que permiten un gran solapamiento espectral y una buena separación entre la emisión del donador y el aceptor. Sin

embargo, conviene mencionar que el CRET tiene limitaciones ya que oxidantes como el H_2O_2 , necesarios para este proceso, pueden desactivar la emisión de los QDs^{146,152}.

A.5.1 Aplicaciones en análisis químico

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, la interacción directa de un analito con la superficie de los QDs puede provocar cambios en las propiedades luminiscentes (fluorescencia o fosforescencia) de la nanopartícula y puede emplearse en la detección de pequeñas moléculas e iones empleando QDs de diferente naturaleza²⁸.

Los mecanismos de estos cambios de la luminiscencia de los QDs son variados. En uno de los trabajos pioneros que emplean esta metodología, se mostraba un **incremento** en la emisión de luminiscencia de QDs de CdS en presencia de Cd^{2+} que se atribuyó a la formación de $\text{Cd}(\text{OH})_2$ sobre la superficie de la nanopartícula (de esta forma se evita la recombinación no radiacional de los portadores de carga)¹⁵³. Efectos similares se observaron al añadir bien Zn^{2+} o Cu^{2+} , simplemente variando el ligando que recubre la nanopartícula de CdS¹⁵⁴, o Ag^+ sobre nanopartículas de CdS modificadas con L-cisteína¹⁵⁵. Sin embargo, la mayoría de las aplicaciones analíticas propuestas hasta la fecha utilizan los QDs como indicadores directos y están basadas en medidas de la **desactivación** de la luminiscencia tras la interacción con el analito. En general, la atenuación de la emisión se atribuye a efectos de filtro interno, vías de recombinación no radiativas y procesos de transferencia electrónica. En la bibliografía es posible encontrar métodos para la detección de diferentes cationes de forma individual (Hg^{2+} ¹⁵⁶⁻¹⁵⁸, Cu^{2+} ^{159,160}, Ag^+ ¹⁶¹) o conjunta (Cu^{2+} y Ag^+ ¹⁶², varios metales de transición¹⁶³), y también aniones de interés (yoduro¹⁶⁴, cianuro^{165,166}). Además, siguiendo este tipo de mecanismo se han podido determinar otras especies químicas como la presencia de nitrocompuestos¹⁶⁷ (el explosivo trinitrotolueno (TNT) o nitrobenzeno) o medicamentos como la sulfadiacina¹⁶⁸ o espironolactona¹⁶⁹ en medios acuosos. Otros estudios incluyen la determinación de contaminantes como el p-nitrofenol o 1-naftol empleando QDs recubiertos con β -ciclodextrina¹⁷⁰.

Aunque se han detectado proteínas como la BSA y aminoácidos como la L-cisteína en fluidos biológicos¹⁷¹, estos métodos parecen limitarse a la detección de solo unos pocos metabolitos (moléculas pequeñas) debido a la complejidad de las muestras reales analizadas.

Asimismo, previa encapsulación de los quantum dots en polímeros, se ha descrito el análisis de compuestos volátiles como la benzilamina y trietilamina¹⁷², hidrocarburos (xilenos y toluenos)¹⁷³ o formaldehído¹⁷⁴. Los gases se ensayaron individualmente; pero empleando el análisis multiparamétrico se ha podido detectar de forma simultánea más de un vapor usando QDs de

diferente tamaño¹⁷⁵ o usando nanopartículas de CdSe/ZnS incorporadas en una matriz tipo sol-gel¹⁷⁶.

Sin duda, la detección más empleada en este tipo de sensores ópticos se basa en medidas de fluorescencia, pero los QDs dopados podrían ofrecer alternativas a dicha detección favorables (p. ej. la fosforescencia, quimioluminiscencia, electroquimioluminiscencia y dispersión de la luz, dependiendo de la impureza seleccionada). Normalmente, la emisión debida al dopante presenta una mayor fotoestabilidad que la debida a la emisión del semiconductor base de la nanopartícula (que depende fuertemente de las condiciones de síntesis y del medio en el que se encuentren).

A.5.2 Bioanálisis

Como hemos visto, estos QDs son especialmente adecuados para el campo del bioanálisis (uso de/en inmunoensayos, detección de ácidos nucleicos y biomoléculas, monitorización de procesos de catálisis, etc.).

La mayoría de las aplicaciones bioanalíticas descritas hasta la fecha utilizan los QDs como marcas luminiscentes, lo cual requiere la conjugación previa de la nanopartícula a una determinada biomolécula (o al menos con una molécula “puente”) para propiciar el reconocimiento del analito de interés. Entre las biomoléculas “de reconocimiento” empleadas se incluyen proteínas, anticuerpos, aptámeros, oligonucleótidos, etc., y como resultado, se obtiene una nanopartícula bifuncional que aúna las propiedades de ambos materiales: las propiedades fotoluminiscentes de los QDs y la función biológica de la biomolécula.

Hasta el momento los métodos químicos más empleados para establecer la unión nanopartícula-biomolécula se basan en la química tradicional de marcaje de proteínas. En la Figura 18 se recogen las estrategias generales más representativas de **bioconjugación** de quantum dots. Así, es frecuente que los enlaces se establezcan por medio de los grupos amino, ácido, tiol, o bien a través de la química de la carbodiimida, succinimidil ésteres o maleimida^{43,146}.

Sin embargo, a pesar de que estos procesos están ya muy controlados, cuando se trabaja con nanopartículas pueden aparecer problemas en el proceso de: agregación (por entrecruzamiento), de valencias múltiples (diferente número de biomoléculas por nanopartícula), o incluso de pérdida de actividad biológica de la biomolécula.

Idealmente, en todos los procesos de bioconjugación¹⁷⁷, debería existir un control sobre:

- El número de biomoléculas por QD (“valencia” del conjugado) importante a la hora de desarrollar aplicaciones cuantitativas de análisis.

- La orientación espacial, aspecto clave durante los procesos de unión estable de la biomolécula o de catálisis.
- Disposición y distancia de la biomolécula al núcleo del QD, esencial en el desarrollo de aplicaciones tipo FRET o de transferencia de carga (CT).
- La estabilidad del conjugado final, un parámetro crítico en el caso de aplicaciones que impliquen el empleo del bioconjugado final durante periodos de tiempo relativamente largos.
- La retención de la actividad biológica de los “elementos de reconocimiento” utilizados.
- La reproducibilidad del proceso global de síntesis.

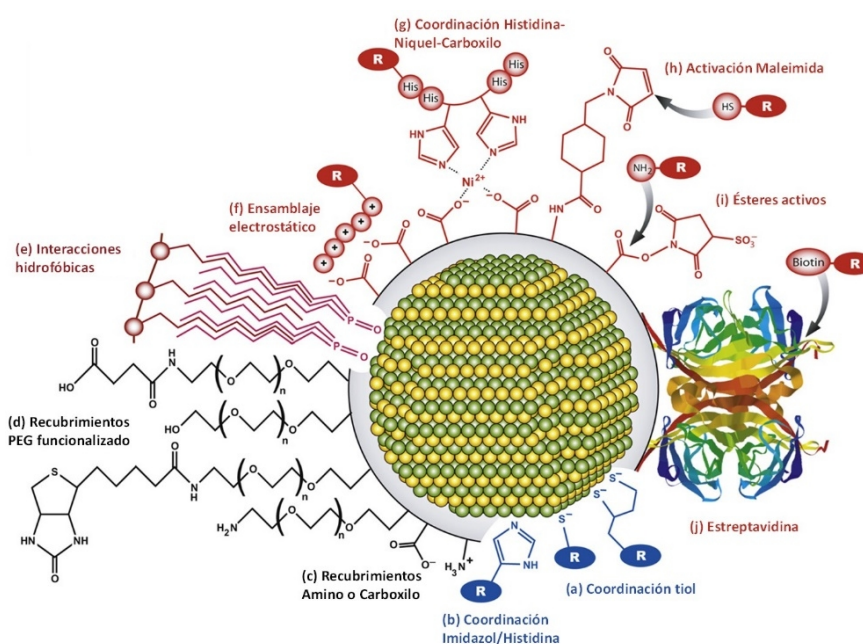


Figura 18. Ilustración que muestra ejemplos de la química superficial y diferentes estrategias de bioconjugación empleadas con los QDs. El perímetro gris alrededor de la nanopartícula representa un recubrimiento genérico de la superficie del QD que puede estar asociado a la superficie del QD vía interacciones específicas (e) o por coordinación de ligandos (a y b). La solubilidad acuosa del recubrimiento se consigue por grupos amino o carboxilo (c) o el ligando PEG funcionalizado (d). Las estrategias comúnmente empleadas para la bioconjugación están representadas por (a), (b), (f), (g), (h), (i) y (j). La figura no está escalada¹⁴⁶.

Tal vez uno de los tipos de conjugación que proporciona mejores resultados, en términos de control de la bioconjugación, es la conocida interacción biotina-avidina. En todo caso, conseguir la bioconjugación que cumpla todos los requisitos mencionados anteriormente todavía es uno de los mayores obstáculos actuales al avance de los QDs para bioanálisis³². Además, en la mayoría de los casos, la estrategia de conjugación más adecuada debe seleccionarse

dependiendo de la aplicación posterior y de otros aspectos tales como simplicidad, disponibilidad de los reactivos o su coste⁴³.

A.5.2.1 Inmunoensayos basados en Quantum Dots

Hasta la fecha se han desarrollado numerosos formatos de inmunoensayos utilizando nanomateriales fluorescentes como marcadores¹⁷⁸. De hecho se han desarrollado fluoroinmunoensayos competitivos basados en conjugados QD-anticuerpo para la detección de diferentes analitos, desde pequeñas moléculas hasta proteínas, virus y bacterias¹⁷⁹⁻¹⁸². En estos ensayos, los QDs pueden ser utilizados como marca del anticuerpo, primario o secundario, para lograr la detección del residuo o analito de interés.

En la línea de análisis multiparamétrico, se han conseguido detectar de forma simultánea varios analitos (p. ej. la toxina del cólera, shiga-like, enterotoxina y ricina¹⁸³). Para ello, QDs de distintos tamaños (distinta emisión fluorescente) fueron modificados con DHLA (ácido dihidrolipoico) y se recubrieron con MBP (*Maltose binding protein*) y la proteína G (PG) (MBP se utiliza como herramienta de purificación del exceso de anticuerpo durante la formación del bioconjugado y la PG como puente de unión con el anticuerpo antitoxina). Sin embargo, esta metodología exige un tratamiento de datos complejo para la deconvolución de los espectros de fluorescencia obtenidos. También se ha publicado la detección simultánea de residuos de medicamentos¹⁸⁴ en tejido muscular de pollo, de biomarcadores infecciosos¹⁸⁵ (hepatitis B, hepatitis C, VIH) en muestras de suero humano y de cinco residuos de drogas ilegales¹⁸⁶ en China, mediante el empleo de conjugados de anticuerpo-QD de diferentes colores usando un inmunoensayo tipo sándwich. Aunque la detección multicanal se consigue fácilmente (modificando la emisión de los QDs empleados) existen problemas debido a uniones inespecíficas (*cross-reactivity*) que pueden limitar el número de analitos detectados en el sistema experimental de forma simultánea¹⁸⁷.

A.5.2.2 Empleo de quantum dots en genómica y proteómica

Los QDs, como las NPs de oro o plata, se han empleado con éxito durante los últimos años para llevar a cabo la detección de ácidos nucleicos, proteínas y pequeñas biomoléculas). La conjugación de los QDs a “elementos de reconocimiento” específicos como segmentos de ácidos nucleicos de cadena sencilla, tanto ADN como ARN (denominados aptámeros¹⁸⁸) u oligonucleótidos que se conjugan en la superficie de la nanopartícula es el punto de partida para la determinación selectiva de proteínas y/o ácidos nucleicos a través de inmunoensayos. Las

técnicas de análisis más empleadas para estos ensayos incluyen FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) y microarrays.

A modo de ejemplo, se ha desarrollado un método para la **detección de hibridación** de ADN basado en la co-localización multicolor de oligonucleótidos marcados con QDs de diferentes colores¹⁸⁹. De forma similar, Wang y col.¹⁹⁰ usaron tres QDs con diferente emisión luminiscente para la detección de tres secuencias del gen BCRA1 relacionado con el cáncer de mama.

Además de los ensayos de hibridación para la detección de genes conviene mencionar los ensayos de “ensamblaje electrostático” de ácidos nucleicos¹⁴⁶ y aquellos basados en el proceso FRET^{191,192}. En una línea similar, Y. He y col.¹⁹³ proponen la alteración de la emisión fosforescente de quantum dots de Mn:ZnS para la detección de ADN de cadena doble.

Otra posibilidad interesante consiste en usar los QDs como donadores unidos a un tipo de oligonucleótidos que reciben el nombre de *molecular beacons*¹⁹⁴. Este oligonucleótido posee en un extremo la especie donadora (normalmente QD) y en el otro la aceptora. En presencia de una sonda complementaria o diana, se inducirá un cambio conformacional en el oligonucleótido que provocará una variación en la distancia del par donador/aceptor. Dicho cambio se registrará como una alteración medible de la luminiscencia del donador (frente a los fluoróforos convencionales, los QDs consiguen mejorar la fotoestabilidad).

Los aptámeros marcados con QDs han sido una vía muy empleada para el reconocimiento de proteínas ya que son capaces de modificar su conformación estructural tras la hibridación. Probablemente, el aptámero más utilizado y estudiado es el aptámero de unión a la trombina, aunque también se han empleado otros (p. ej. para detección de proteínas de relevancia en cáncer, de diferentes factores de crecimiento, de citoquinas, etc.)^{188,195}.

También resulta de interés analítico, el empleo de QDs en estudios de actividad enzimática. Se han descrito aplicaciones para determinar la actividad de proteasas^{183,196} que juegan un papel importante en los procesos bioquímicos, de tripsina¹⁹⁷, lisozima¹⁹⁸ o colagenasa¹⁹⁶. El esquema general se basa en la conjugación de los QDs seleccionados con numerosas copias del mismo péptido que también estará marcado con el aceptor, si la detección es tipo FRET, o en la conjugación de los QDs con una proteína de interés. La adición de una enzima específica provoca la ruptura del péptido o proteína, lo que desestabiliza el complejo con el QD y altera de forma progresiva la señal luminiscente, permitiendo monitorizar la actividad de la enzima en función del tiempo.

Un campo emergente y de gran interés potencial es la bioconjugación de QDs con aptámeros o anticuerpos capaces de reconocer la superficie de microorganismos patógenos. Un ejemplo

ilustrativo puede ser la evaluación del efecto de dos aminoácidos, L-cisteína o histidina, como ligandos de QDs de Mn:ZnS, en el crecimiento y proliferación de *Escherichia coli* (*E. coli*)¹⁹⁹. También se ha publicado muy recientemente el empleo de tales QDs recubiertos de quitosán para la detección de *E. coli*, al permitir que los d-dots penetren en las células microbianas y puedan usarse como marcas luminiscentes internas²⁰⁰.

A.5.3 Aplicaciones biomédicas

Las primeras aplicaciones biomédicas empleando QDs como marcadores fotoluminiscentes fueron desarrolladas de forma simultánea por Alivisatos y col.⁵⁴ y Nie y col.⁴⁶ en 1998. En el primer caso se emplearon QDs con dos emisiones luminiscentes diferentes, recubiertos de una capa de sílice, y modificados con grupos funcionales apropiados en cada caso para permitir observar su afinidad por el núcleo de las células. En el segundo caso⁴⁶, los QDs se modificaron con ácido mercaptoacético para permitir el estudio de la absorción de la proteína transferrina en células tipo HeLa. Ambos trabajos constituyen un hito esencial en el desarrollo y empleo de los QDs para aplicaciones biomédicas ya que describen, por primera vez, la posibilidad de sintetizar QDs biocompatibles y con capacidad de bioconjugación.

Desde estos dos trabajos pioneros, los QDs se han empleado como marcadores en el seguimiento de proteínas en la superficie celular o en los orgánulos intracelulares o también en el estudio de procesos de transducción, transporte y localización de las funciones específicas de una biomolécula a tiempo real^{53,201,202}.

El método más general (por su simplicidad, resolución, sensibilidad y robustez) para visualizar células o estructuras proteicas y moléculas en células así como monitorizar procesos celulares es la microscopía de fluorescencia (con resolución subcelular)²⁰³. Tras el marcaje de células con QDs, es posible realizar el seguimiento biomolecular en células y la tinción de tejidos para finalmente llevar a cabo la detección por imagen (*imaging in vitro*)^{47,203}. Se ha demostrado que el marcaje con QDs permite visualizar las células bajo iluminación continua, obteniendo una emisión multicolor (dependiente de las nanopartículas empleadas), con gran resolución, selectividad y precisión²⁰⁴. Para este propósito, normalmente es necesario emplear nanopartículas bioconjugadas con moléculas apropiadas (normalmente péptidos o anticuerpos) para el reconocimiento específico de los receptores celulares. Dichos QDs bioconjugados con péptidos o anticuerpos específicos se pueden emplear para detectar componente subcelulares una vez internalizados por las células de interés (si la estructura de interés se halla en la superficie de la célula, lógicamente no es necesario que los conjugados atraviesen la membrana celular, el reconocimiento se consigue allí con el receptor de membrana específico).

Estos estudios celulares o subcelulares normalmente se realizan *in vitro*, lo cual requiere la extracción previa de las células, el crecimiento de las mismas en cultivos (fijación celular) y por último el sacrificio de las células para realizar los estudios y ensayos correspondientes. Sin embargo, la tendencia actual son los ensayos *in vivo*, esta investigación se realiza incorporando los QDs funcionalizados en células y tejidos vivos de modo que los estudios se realizan a tiempo real. En estos casos, se dice que los QDs actúan como *agentes de contraste*²⁰³. Tanto en los estudios *in vitro* como *in vivo*, los mecanismos de internalización de los quantum dots en la célula resultan críticos^{204,205}, y su conocimiento es clave en el desarrollo de nuevas aplicaciones farmacológicas (transporte y distribución de medicamentos)^{47,206}.

En el ámbito clínico, es destacable el enorme esfuerzo investigador en el empleo de QDs como indicadores luminiscentes para el diagnóstico del cáncer. Los medios actualmente existentes para el diagnóstico de esta grave enfermedad están limitados a la detección de tumores de tamaño relativamente grande (0,5-1 cm) e implican la exposición de los pacientes a radiación y el empleo de técnicas invasivas (p. ej. Biopsias). Por ello, actualmente existe una demanda urgente de técnicas de “alarma temprana”, que permitan el diagnóstico de tumores malignos de forma precoz (diagnóstico precoz). En este contexto, los QDs pueden jugar un gran papel para desarrollar biomarcadores de diagnóstico temprano y en técnicas de imágenes (*imaging*) para diagnóstico clínico^{207,208}.

Los elevados rendimientos fluorescentes de los QDs justifican además su empleo en el estudio de tejidos profundos (*imaging* o detección *in vivo*). Además, los QDs pueden servir como sondas luminiscentes sensibles para examinar varios marcadores tumorales simultáneamente (por su capacidad de detección multianálisis gracias a su amplio intervalo de emisión luminiscente modulable). No obstante, la propia autofluorescencia de los tejidos puede enmascarar la fluorescencia de quantum dots por lo que existen QDs de emisión en la región del infrarrojo para evitar tales problemas de autofluorescencia (es decir, se minimizan las interferencias del fondo luminiscente propio de la matriz biológica del tejido)²⁰⁹. Otra alternativa de interés que se ha investigado recientemente es utilizar las técnicas de microscopía multifotón (excitación de los fluoróforos por la absorción casi simultánea de dos o tres fotones de menor energía²¹⁰) con lo que se consigue mayor penetración en los tejidos, mejora la sensibilidad y se minimiza la fotodegradación de las nanopartículas. Así, se han descrito ejemplos de este tipo de estrategia de bioanálisis empleando quantum dots de CdSe/ZnS²¹¹ o d-dots de ZnS dopados con Mn¹¹⁸.

En este tipo de aplicaciones biomédicas deben considerarse a fondo problemas relacionados con la toxicidad, debido a los largos tiempos de residencia de las nanopartículas y la posible liberación de metales pesados.

Además, los quantum dots se han empleado en el desarrollo de tecnologías para el transporte y liberación de fármacos específicamente en el lugar dañado o enfermo, permitiendo transportar fármacos, vacunas y ADN a las células y tejidos afectados pero sin interferir negativamente en otras zonas del cuerpo (tanto en células como en pequeños animales)^{212,213}. Los QDs de ZnS y ZnSe dopados con metales de transición (como los empleados en esta Tesis) *a priori* son menos nocivos para los organismos vivos, por lo que son muy prometedores también para su empleo en dicha distribución selectiva de medicamentos. De hecho, Xu y col.²¹⁴ han empleado QDs de Mn:ZnS recubiertos con glicopolipéptidos para el transporte y distribución *in vitro* de ibuprofeno. Este recubrimiento permite transportar grandes cantidades del medicamento pero también su liberación controlada.

Existen, además, nanopartículas “híbridas”, que combinan QDs y nanopartículas magnéticas y que poseen la habilidad para combinar funciones terapéuticas y de diagnóstico (*theranostic nanoparticles*)^{187,215}. Por un lado es posible la detección del analito de interés (biomarcador) por *imaging* óptico o magnético (MRI) ya que las nanopartículas contienen en su estructura iones con propiedades paramagnéticas y, por otro, estos sistemas permiten el transporte intracelular de las especies de interés²¹⁶.

Otra alternativa prometedora para aplicaciones *in vivo* consiste en el empleo de los QDs como aceptores de un proceso de transferencia de energía bioluminiscente (BRET). Empleando como enzima la luciferasa, que cataliza la reacción de la coelenterazina²¹⁷, inmovilizada sobre la superficie de la nanopartícula, la adición del sustrato provoca la generación de fotones y por tanto la excitación de los QDs (que actúan como aceptores) consiguiéndose así su auto-iluminación. Este fenómeno posibilita el empleo de estos bioconjugados como sensores para la monitorización de procesos *in vivo* o para la toma de imágenes sin necesidad de emplear una fuente de excitación o lámpara externa, evitando los problemas mencionados anteriormente de la autofluorescencia de los tejidos o células, así como problemas de penetración de la fuente externa en los tejidos a estudio.

En este contexto, al final de esta Introducción (sección A7) se incluye nuestro artículo de revisión analítica, publicado en la revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry*: “*Nanoparticles as fluorescent labels for optical imaging and sensing in genomics and proteomics*” que resume el uso de QDs como marcadores en estudios de genómica y proteómica.

A.6 TOXICIDAD INDUCIDA POR NANOPARTÍCULAS

Cualquier nueva tecnología emergente puede causar un efecto adverso e inesperado sobre importantes aspectos sociales, económicos y medioambientales en nuestro mundo. A menudo, tales problemáticas aparecen después de que un nuevo producto haya sido comercializado y ampliamente usado a nivel mundial²¹⁸. Las consecuencias de su empleo a gran escala incluyen tanto problemas de salud humana como daños al medio ambiente, que exigen grandes y costosos esfuerzos de limpieza *a posteriori* así como nuevas regulaciones (y sanciones).

El crecimiento emergente de la industria nanotecnológica (bienes de consumo) pone de manifiesto la necesidad de considerar de forma global el impacto de los nanomateriales, tanto en la salud humana como en el medioambiente, así como la seguridad de su manipulación ya que, en términos generales, se desconoce su persistencia y acumulación a largo plazo²¹⁹⁻²²¹. Por ello, agencias reguladoras como la EPA y la Unión Europea (Programa REACH) ya han incluido ciertos nanomateriales en las listas de contaminantes emergentes^{17,222,223} y se ha alertado respecto a la necesidad de investigar sus posibles riesgos, su impacto medioambiental (persistencia y comportamiento) y sus efectos en los sistemas biológicos (efectos *in vivo*, a nivel celular, subcelular y molecular). Así que, paralelamente a la intensa actividad investigadora orientada hacia la búsqueda de nuevas NPs o mejorar las existentes, sumado al interés por desarrollar nuevas aplicaciones, por otro lado, se ha creado un área específica de investigación relacionada con la toxicología, la **Nanotoxicología**²²⁴.

Cuando se disminuye el tamaño de una partícula, tiende a aumentar su toxicidad, incluso si el material de partida es inerte²²⁵. Por ello, para evaluar la toxicidad de un nanomaterial, es imprescindible su caracterización adecuada. Dicha caracterización debe considerarse como una parte esencial del proceso de evaluación toxicológica²²⁴. Sin embargo, no debe olvidarse que hoy por hoy no existen protocolos estandarizados ni materiales de referencia para realizar estos ensayos, por lo que la comunidad investigadora intenta buscar y establecer las metodologías idóneas para llevar a cabo la evaluación toxicológica de las NPs²²³.

A.6.1 Nanopartículas en el medio ambiente

La creciente producción y empleo de nanomateriales provoca, inevitablemente, su acumulación en el medio ambiente y esto puede acarrear importantes riesgos para la salud humana y medioambiental. Por tanto, la investigación de la seguridad de las NPs se ha convertido en un problema general mundial^{226,227}.

El reparto de las nanopartículas en los diferentes compartimentos medioambientales (ver Figura 19) ha sido ampliamente estudiado en función de su movilidad, biodegradación y persistencia, entre otros factores. Todos estos parámetros dependen de las propiedades físico-químicas de las NPs²²⁶. A la hora de evaluar el impacto medioambiental, la toxicidad inherente de la NP aislada no es la única característica a tener en cuenta, ya que una vez en el medio, las nanopartículas pueden interactuar con la materia orgánica, y otras partículas de diferente tamaño que alteran su estabilidad. Además, las nanopartículas también pueden sufrir diversas transformaciones debido a la acción de la luz, o la presencia de oxidantes y microorganismos^{23,228}. De hecho, la agregación de las partículas y su carga superficial son parámetros muy importantes que influye en gran medida en la biodisponibilidad y en el comportamiento de las NPs y determina su transporte en aguas superficiales y subterráneas y su posible sedimentación en suelos^{227,229}.

Conocer las transformaciones sufridas por las nanopartículas por la interacción con el medio (atmósfera, ecosistema acuático y en los suelos) es hoy de enorme importancia (ver Figura 19), así como un complejo que necesita ser analizado en su totalidad para entender el comportamiento de estas NPs en el medio ambiente²³⁰. De hecho, hoy es crucial estudiar las diferencias en la especiación química de las NPs (entre iones de las NPs disueltos, NPs coloidales o partículas en suspensión) como consecuencia de su disolución y agregación bajo las condiciones ambientales²²⁸.

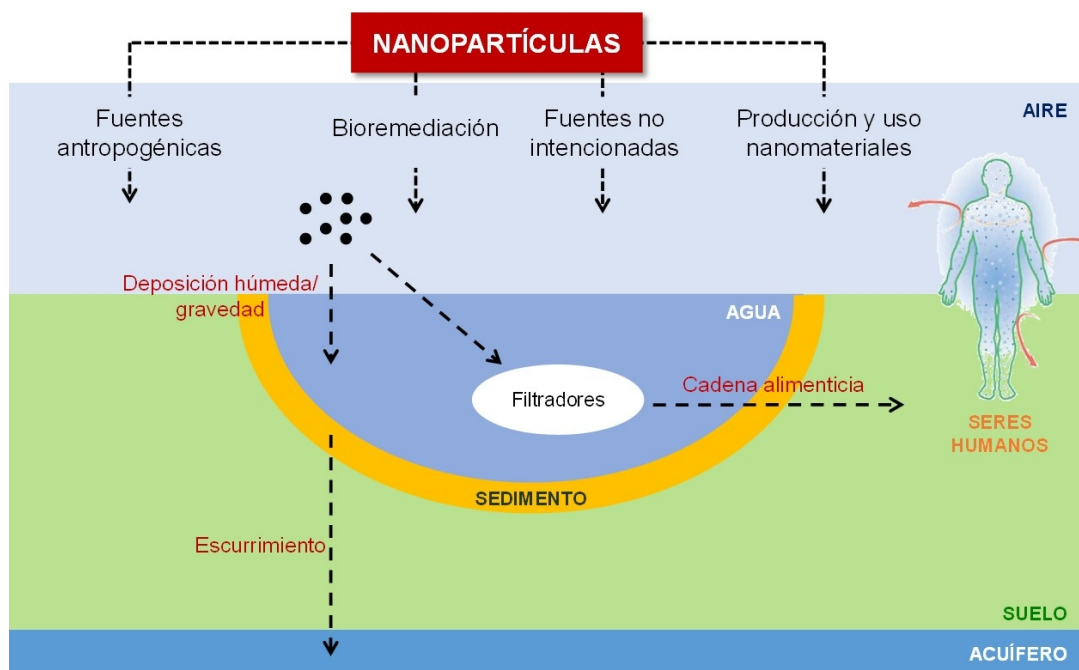


Figura 19. Posibles vías de incorporación de las nanopartículas en el medio ambiente.

A.6.2 Toxicidad en los medios biológicos

La utilización generalizada de NPs, y en concreto de QDs, en aplicaciones biomédicas y en productos de uso cotidiano, favorece su acceso a tejidos, células y moléculas biológicas, dentro del cuerpo, de forma no intencionada. Como resultado, las células son frecuentemente expuestas a una amplia variedad de nanopartículas.

El pequeño tamaño y gran área superficial de las NPs incrementa su probabilidad para atravesar la membrana celular. Como su tamaño es similar a los componentes celulares, podrían inducir cambios estructurales en proteínas y ácidos nucleicos. Estas interacciones afectarían potencialmente a procesos vitales como la función de enzimas, la transcripción y traducción de genes. Al mismo tiempo, su gran área superficial incrementa su reactividad química por lo que las nanopartículas podrían actuar como medio de transporte de otros contaminantes y por tanto les proporciona un transporte rápido y de largo alcance^{221,231}.

Por tanto, resulta prioritario establecer ensayos fiables y efectivos capaces de evaluar el riesgo de la exposición de las células vivas a las nanopartículas²³². Por desgracia, los mecanismos de interacción entre las nanopartículas y los sistemas biológicos son en su mayoría desconocidos todavía. Así es posible encontrar bibliografía que pone en evidencia la falta de consenso actual sobre los diferentes efectos causados y su evaluación. Esto se debe fundamentalmente a la gran diversidad de variables involucradas tales como^{231,233, 234}:

- Tipo de nanopartícula y su recubrimiento superficial
- Parámetros físico-químicos de las nanopartículas (diámetro, carga, topografía y área superficial)
- Condiciones del experimento, incluyendo los diferentes tipos de ensayo, exposición (tiempo y dosis) y tipos de células o especie animal empleadas

Como consecuencia, resulta muy complejo estandarizar los sistemas experimentales necesarios para realizar comparaciones entre los resultados obtenidos en diferentes estudios y llevados a cabo por diferentes grupos de investigación²³⁵.

A.6.2.1 Modelos de ensayo

La evaluación de la toxicidad se puede realizar en dos tipos de ensayos, *in vitro* e *in vivo*.

En los **estudios *in vitro*** se investiga la toxicidad debida al efecto de los nanomateriales en cultivos celulares (citotoxicidad). Estos experimentos son una herramienta muy útil para la nanotoxicología porque permiten predeterminar la toxicidad potencial y posibles mecanismos,

antes de administrar las nanopartículas en un organismo vivo. Además, estos ensayos son más rápidos, menos costosos, permiten un mayor control y minimizan las cuestiones éticas ya que no utilizan animales de laboratorio. Los cultivos celulares son sensibles a cambios en el medio tales como fluctuaciones de temperatura, de pH y concentración de nutrientes o desechos aparte de la presencia del agente tóxico ensayado^{234,236}. Las líneas celulares más empleadas son células hepáticas (ya que las NPs tienden a acumularse en hígado y bazo) y fibroblastos (por ser el principal constituyente celular del tejido conectivo fibroso). Lógicamente los efectos tóxicos observados dependen de la línea celular empleada²³⁸.

Las condiciones experimentales empleadas en estos ensayos suelen utilizar concentraciones de QDs mucho más elevadas y tiempos de exposición más largos que los ensayos *in vivo*; a pesar de ello, los ensayos *in vitro* son los preferidos para seleccionar las NPs más adecuadas para investigaciones posteriores con animales^{236,239}.

En los **ensayos *in vivo*** se emplean modelos animales para obtener una visión general más compleja de las interacciones biológicas en organismos vivos y constituyen el paso siguiente a los ensayos *in vitro* para evaluar la toxicidad de las NPs. Los modelos animales más estudiados son el pez cebra (*Danio rerio*), el ratón o la rata. Debido a la utilización y sacrificio de los animales es necesario tener en cuenta consideraciones éticas. Estos estudios permiten conocer los efectos a largo plazo, la localización en los tejidos, la biodistribución y la retención/excreción de las nanopartículas tras la exposición. La toxicidad *in vivo* se puede estudiar para un órgano concreto y el daño generado puede depender de la forma de introducción de las nanopartículas o del tipo de órgano que se va a estudiar. En general, los QDs son internalizados en órganos que actúan como defensa del organismo (p. ej. hígado, bazo o ganglios linfáticos)^{236,237}.

La gran controversia en la comunidad investigadora sobre el empleo de NPs en organismos vivos deriva de los primeros estudios de toxicidad de QDs *in vitro*^{237,239}. Como se ha apuntado previamente, estos ensayos emplean condiciones y concentraciones de nanopartículas muy elevadas, y además la interacción célula-QD se produce en un cultivo celular concreto y en unas condiciones determinadas. Sin embargo, es claro que la extrapolación de estos resultados a estudios *in vivo* no es correcta porque la interacción de los QDs con las estructuras biológicas está en constante flujo y solo una fracción de las NPs inyectadas interaccionará con las células de interés. Es importante hacer notar que la toxicidad de los QDs empleando dosis fisiológicas adecuadas en modelos animales no se ha documentado suficientemente hasta la fecha.

A.6.2.2 Citotoxicidad inducida por quantum dots

Los QDs son realmente un grupo heterogéneo de materiales lo que dificulta aún más establecer pautas generales para evaluar su posible toxicidad. Su variabilidad incluye la composición química del núcleo y posible recubrimiento, tamaño y forma, y su química superficial. El núcleo de los quantum dots está generalmente compuesto por metales tóxicos como el Cd, Te, Pb y As, esto eleva la preocupación sobre su posible toxicidad. Además, hemos visto que la superficie de los quantum dots se puede modificar para mejorar su solubilidad en medios acuosos y su biocompatibilidad (su superficie puede tener moléculas bifuncionales, recubrirse con polímeros anfifílicos y/o se pueden atrapar en el interior de micelas). Además, se pueden modificar con ligandos con reconocimiento molecular como oligonucleótidos, péptidos o anticuerpos (que permiten la unión directa de los QDs al analito de interés o su localización específica dentro de la célula). Por tanto, es posible obtener un gran número de variedades de QDs con propiedades físico-químicas muy diferentes. Esto condicionará la interacción de cada tipo de nanopartícula con el medio biológico^{233,239}.

La citotoxicidad se refiere a la toxicidad a nivel celular generada por la interacción de los QDs con la membrana celular o con los constituyentes intracelulares y orgánulos²⁴⁰. En la Figura 20 A se recoge un diagrama de los componentes de una célula eucariota y en la Figura 20 B una ampliación de la membrana celular.

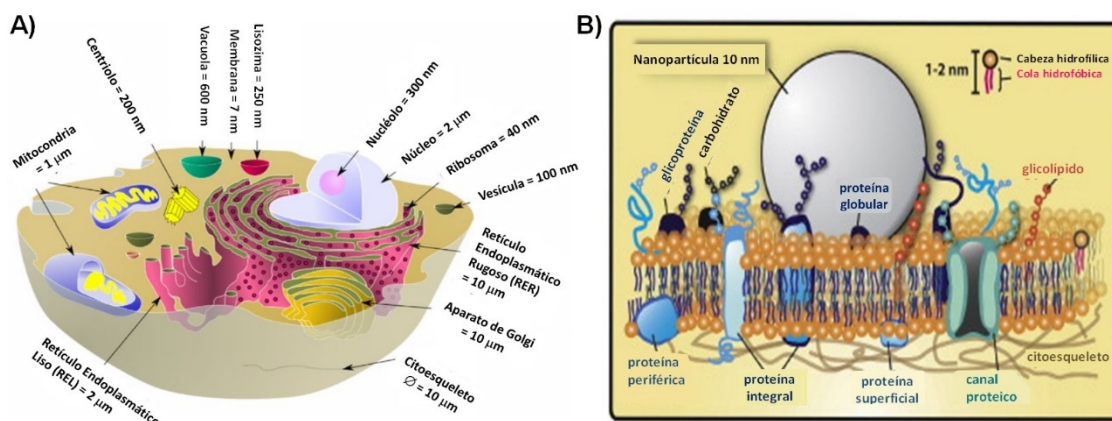


Figura 20. A) Diagrama de los componentes de una célula eucariota con dimensiones. B) Ampliación de una membrana celular que incorpora diversas proteínas y una nanopartícula de 10 nm.

Respecto a los principales mecanismos de toxicidad, que pueden ser inducidos por los QDs, los más importantes se muestran esquemáticamente en la Figura 21.

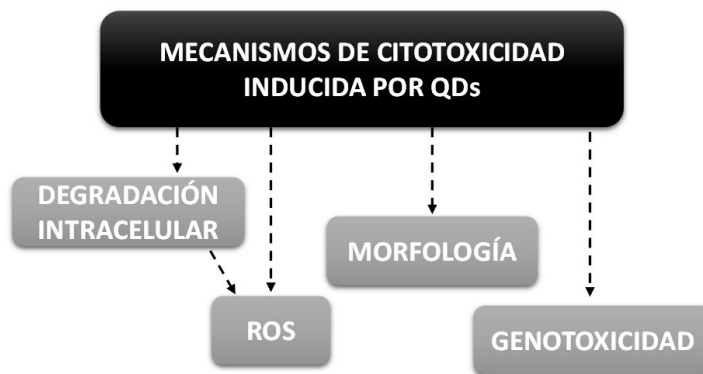


Figura 21. Esquema que muestra los principales de citotoxicidad inducida por quantum dots.

Conocer el mecanismo de entrada de las nanopartículas en la célula es crucial. Aunque existen diferentes mecanismos para explicar la entrada de las nanopartículas en la célula, la mayoría se produce por **endocitosis**, un mecanismo simple y no específico que depende no solo del tamaño de los QDs sino también de su recubrimiento y carga superficial^{241,242}. En este mecanismo los quantum dots son secuestrados dentro de vesículas, donde el pH del medio oscila entre 4.5 (lisosomas) y 6 (endosomas tempranos). Este pH tan ácido favorece la degradación de los ligandos que recubren los quantum dots, que también pueden verse afectados por la acción de enzimas presentes en el citosol celular. El resultado final es la **degradación intracelular de los quantum dots** que genera la liberación de iones en el interior de la célula y la pérdida de funcionalidad de la nanopartícula. Por ello, generalmente, la liberación de metales pesados tóxicos (p. ej. Cd^{2+}), se considera la causa principal de la toxicidad celular inducida por QDs^{231,237}. Sin embargo, Mahto y *col.* han demostrado que la presencia de estos iones no es la única razón que explica la toxicidad de quantum dots de CdSe/ZnS en fibroblastos celulares²⁴³. Otros factores importantes son la degradación de los ligandos superficiales y la subsiguiente tendencia a la agregación, ambos factores relativos a la estabilidad de las nanopartículas. Por ello hoy se tiende a emplear los quantum dots recubiertos con una capa de otro semiconductor (QDs núcleo/recubrimiento) o bien utilizar QDs cuya composición no incluya metales pesados tóxicos (p. ej. ZnS o ZnSe).

La **generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)** es un fenómeno bastante común como reacción de las células a la presencia de especies foráneas, pero puede afectar muy negativamente a las funciones celulares²³¹. Los ROS pueden producir daños en las proteínas celulares, lípidos y ADN. Las especies generadas pueden ser superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo (OH^*) o peróxido (ROO^*), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). En general, los cambios de concentración de ROS pequeños y transitorios son tolerados por la mayoría de las células, en cambio, para niveles de estrés oxidativo altos y persistentes, el sistema de defensa

antioxidante se encuentra saturado por el exceso de radicales libres que puede dar lugar a un mal funcionamiento mitocondrial (incluso apoptosis celular). La generación de ROS depende de la composición química de los quantum dots, pero los efectos tóxicos finales dependen de la línea celular elegida^{237,244}.

El tamaño de los quantum dots también es un factor importante a considerar desde el punto de vista toxicológico (ver Figura 20 B) ya que determina su ruta de entrada en la célula y, en función del volumen intracelular que ocupe, puede producir alteraciones en la **morfología celular** o afectar a la estructura del citoesqueleto²³¹. Hasta la fecha, apenas existen trabajos donde se documente la deformación del citoesqueleto celular ni modificaciones de la morfología de la célula por efecto de los QDs.

Una vez que los quantum dots se hallan en el interior celular el delicado balance de la homeostasis celular y las complejas rutas de señalización intracelular pueden verse alteradas. Estas modificaciones pueden ocurrir por diferentes mecanismos como: **efectos genotóxicos** causados por altos niveles de ROS (Figura 22a) o por la interacción de los quantum dots con el ADN (Figura 22f), alteraciones de la expresión de genes y proteínas debido a la presencia de NPs en la región perinuclear (que afecta a la traducción y transcripción de proteínas) (Figura 22b) o la presencia de metales tóxicos (Figura 22c), activación de los receptores superficiales por interferencia de los QDs (Figura 22d), o alteración de la expresión de genes en respuesta al estrés celular que inducen las NPs (Figura 22e)²³¹. Mientras que los efectos causados por las NPs en la expresión de genes y proteínas se han estudiado poco hasta la fecha, los daños en el ADN (consecuencia de los altos niveles de especies reactivas de oxígeno) han sido más investigados. Las alteraciones del ADN incluyen su fragmentación, daños en la doble hebra, supresión de sus funciones, como replicación y transcripción²³⁷. Si los QDs causan mutaciones sin alcanzarse la muerte celular, sus efectos se pueden propagar a futuras generaciones de células y finalmente generar una enfermedad²³⁹.

Además, debido a la elevada área superficial de los QDs, pueden interactuar con moléculas biológicas como las proteínas y los lípidos incluso antes de entrar en la nanopartícula (con los componentes del medio celular de cultivo). Estas interacciones pueden generar nanopartículas con un comportamiento diferente al que mostrarían los quantum dots originales (en el caso de las proteínas, se forman las proteínas corona²⁴⁵); además, los QDs pueden inducir cambios conformacionales en las proteínas existentes en la célula, por lo que dejarían de ser reconocidas por la misma, y finalmente eliminadas alterando el normal el comportamiento celular²³¹.

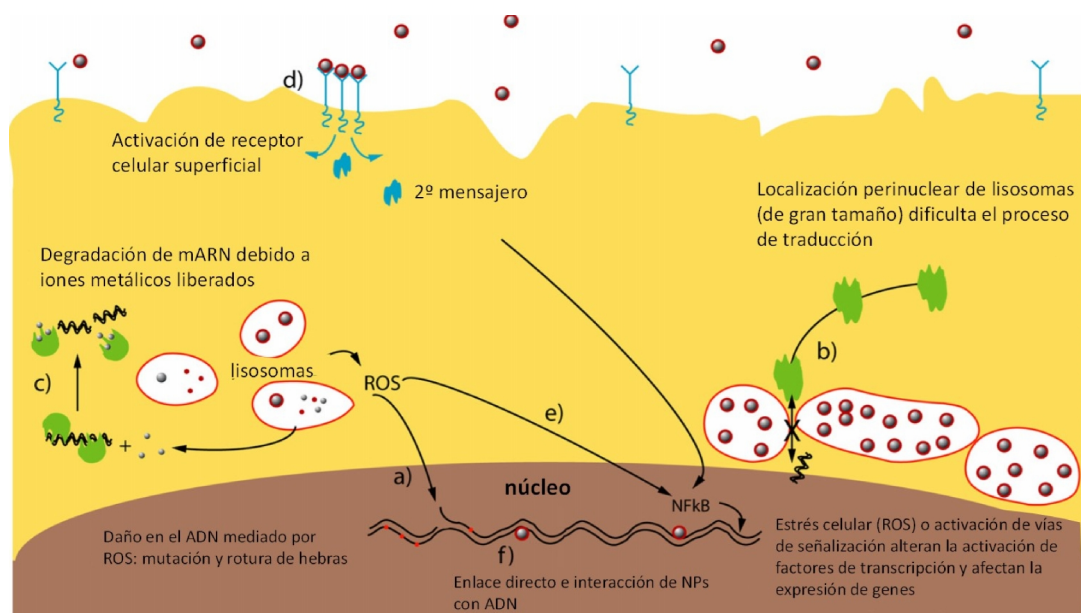


Figura 22. *Diferentes mecanismos por los que las NPs pueden inducir efectos genotóxicos o afectar las rutas de señalización intracelular*²³¹.

A.6.2.3 Ensayos para evaluar la citotoxicidad de QDs

En la actualidad, el primer paso para evaluar la toxicidad de un tipo de nanopartícula exige la caracterización completa de la misma, antes de realizar los ensayos adecuados. Los principales componentes de las nanopartículas que se deben analizar para fines toxicológicos serían:

- Composición elemental (ICP-MS)
- Tamaño del núcleo, forma y dispersión (TEM/AFM)
- Diámetro hidrodinámico (DLS)
- Carga superficial (Potencial Z)

Uno de los problemas relacionados con la toxicidad de los QDs está relacionado con la expresión de la concentración de los QDs. Lógicamente, si se incrementa la concentración de las nanopartículas, aumenta el riesgo de efecto tóxico. Normalmente, la forma más sencilla de expresar la concentración de QDs o la dosis de nanopartículas que se van a emplear en los cultivos celulares se expresa en términos de concentración como masa de nanomaterial por volumen de disolución (mg mL^{-1}). Sin embargo también existen otras formas de expresar la concentración de NPs como mol, mg Kg^{-1} o número de QDs por célula. El problema asociado a la expresión en términos de masa es que no todas las nanopartículas tienen la misma composición de núcleo inorgánico ni el mismo recubrimiento superficial^{237,245}.

Esta problemática demuestra, una vez más, la necesidad de estandarizar estrategias para la caracterización de las nanopartículas así como los protocolos y ensayos empleados para determinar su toxicidad, tanto *in vitro* como *in vivo*^{231,239}.

Internalización y localización de los QDs

La entrada de quantum dots en la célula debe ser evaluada y preferiblemente cuantificada ya que la mayoría de los efectos citotóxicos dependen del número total de nanopartículas internalizadas y no de la dosis de NPs empleada en los cultivos celulares. Chang *y col.*²⁴⁶ demostraron que únicamente la concentración de QDs intracelular (y no la extracelular) se correlaciona con la citotoxicidad.

La entrada y localización, que requiere el análisis con resolución espacial, se realiza generalmente por diferentes técnicas microscópicas (TEM, microscopía laser confocal, etc.)^{236,238}.

El TEM permite discriminar los quantum dots localizados en el interior celular de los que se encuentran en la superficie celular y además proporciona una visión detallada de la interacción de las NPs con las estructuras celulares. Para llevar a cabo estos estudios es necesario fijar previamente las células de forma adecuada. Posteriormente las células se embeben en una resina que permite su corte en secciones que luego son analizadas por TEM^{234,238}.

También es posible evaluar la localización de los QDs en células individuales mediante Microscopía de Fluorescencia o Microscopía Láser Confocal utilizando las propiedades luminiscentes inherentes de estas nanopartículas²³⁶. El microscopio láser confocal permite obtener secciones ópticas de alta resolución y contraste a distintas profundidades para una misma célula sin tener que cortar físicamente la muestra. Además, el uso adicional de otros fluoróforos para marcar diferentes orgánulos celulares permite obtener imágenes de las diferentes partes de la célula.

La cuantificación de los QDs y de los iones liberados en el interior de la célula se lleva a cabo por técnicas elementales muy sensibles (p. ej. el ICP acoplado a diferentes detectores)^{234,238}. A veces la agregación de NPs recomienda realizar una digestión previa de las muestras que reduce los efectos de matriz o la extracción asistida por ultrasonidos que permite eliminar los agregados de nanopartículas. Como alternativa al ICP, también es posible utilizar otras técnicas elementales como la Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama o con horno de grafito. En cualquier caso, las técnicas atómicas no permiten diferenciar los iones liberados de los iones en las nanopartículas internalizadas de modo que se hace necesario su acoplamiento a técnicas de separación²³⁸.

Ensayos de citotoxicidad in vitro

Los ensayos de citotoxicidad se basan en el análisis de las consecuencias producidas por agentes tóxicos en las funciones básicas de las células; por tanto, su toxicidad se puede evaluar por medidas del daño celular.

Existen diferentes clasificaciones de los métodos usados para evaluar la citotoxicidad *in vitro*. Marquis y col. clasifican los ensayos más comunes en dos categorías: la evaluación de la viabilidad celular (relación células vivas/muertas) y el mecanismo de toxicidad²³⁶.

Los ensayos de viabilidad se organizan en ensayos de proliferación y necrosis o apoptosis. El principal mecanismo de toxicidad evalúa el estrés oxidativo o el daño del ADN.

Dentro de los ensayos de proliferación, uno de los más utilizados es el ensayo del **MTT** (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Este ensayo se emplea como un indicador de alarma temprana de la existencia de daño celular ya que evalúa la actividad mitocondrial de la célula. Se trata de un ensayo colorimétrico en el cual, únicamente, las células sanas tienen capacidad para reducir el reactivo MTT a formazán (generando un producto coloreado) debido a la actividad metabólica de la célula. Existen variaciones de este ensayo donde se emplean otros reactivos pero en cualquier caso se trata de un ensayo rápido y que requiere la mínima manipulación²³⁶.

La integridad de la membrana celular se puede ver comprometida por la presencia de agentes citotóxicos luego es otro parámetro de estudio común. Los ensayos más empleados para ello son el ensayo de *Trypan Blue* y de *Neutral Red*. En el primer caso, el colorante únicamente es permeable a las células que tienen su membrana dañada, por tanto, las células muertas se tiñen de azul mientras las vivas permanecen sin teñir y la cantidad de células muertas se determina por microscopía óptica. En el segundo caso, el colorante se acumula en los lisosomas dentro de la célula y si la membrana celular se altera, la entrada de colorante no es posible por lo que disminuye su contenido intracelular e incluso puede liberarse, lo que permite distinguir entre células vivas y muertas. La cuantificación de la citotoxicidad se realiza por medidas espectrofotométricas. Otro ensayo utilizado para evaluar la necrosis celular consiste en monitorizar la presencia en el medio de cultivo de sustancias que normalmente se encuentran en el interior de la célula (sana), como por ejemplo, la monitorización de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

Las técnicas descritas de exclusión de un colorante (como consecuencia del daño en la membrana) solo son capaces de detectar la necrosis o apoptosis tardía. Por ello a menudo se combinan con ensayos de detección de apoptosis lo cual permite obtener una visión más

completa de la muerte celular. Las estrategias para evaluar el grado de apoptosis se basan en la medida de diferentes parámetros²³⁸. Hay varios marcadores proteicos de apoptosis como Bax, Bcl2, p53 y caspasas que son fácilmente monitorizados mediante Western Blot. La apoptosis también puede visualizarse estudiando la morfología del núcleo, en concreto la condensación de cromosomas, empleando colorantes que tiñen específicamente el núcleo como el DAPI y Hoechst en combinación con la microscopía de fluorescencia. Sin embargo, la técnica más general es la Citometría de Flujo en combinación con la medida del potencial de la membrana mitocondrial o el ensayo de la Anexina V²³⁶.

Como se mencionó anteriormente, no todos los daños celulares producen defectos en la membrana o en la función metabólica de la célula. La presencia de nanopartículas en las células puede alterar el balance de especies oxidativas, que se pueden evaluar mediante la medida de los niveles de glutatión (GSH), potente sistema antioxidante celular. Además, la alta concentración de estas especies también genera otros eventos intracelulares como la peroxidación de lípidos y que puede ser monitorizada²³⁸.

Los daños generados en el ADN (genotoxicidad) se estudian generalmente con el “ensayo del Cometa”, un método rápido, sensible y simple para detectar los daños en el ADN a nivel de células individuales. Tras embeber las células en un gel de agarosa, éstas se lisan y a continuación, se desnaturaliza el ADN y se marca con bromuro de etidio (para la cuantificación por fluorescencia). La cantidad de ADN dañado se indica por la cantidad de cola o fragmentos de ADN que se generan, tras la separación por electroforesis de dichos fragmentos²³⁸.

Alteraciones de la morfología celular

La visualización de cambios (microscopía) en la morfología de la célula se puede considerar un factor relevante para observar los cambios de las células tras la exposición a agentes citotóxicos. Las técnicas de microscopía electrónica SEM o TEM son muy útiles, pero también el microscopio óptico de Contraste de Fase que permite examinar células vivas en su estado natural sin necesidad de etapas previas de fijación o deshidratación²³⁸.

A.7 ARTÍCULO DE REVISIÓN

Anal Bioanal Chem (2011) 399:29–42
DOI 10.1007/s00216-010-4330-3

REVIEW

Nanoparticles as fluorescent labels for optical imaging and sensing in genomics and proteomics

Ana María Coto-García · Emma Sotelo-González ·
María Teresa Fernández-Argüelles · Rosario Pereiro ·
José M. Costa-Fernández · Alfredo Sanz-Medel

Received: 13 September 2010 / Revised: 7 October 2010 / Accepted: 10 October 2010 / Published online: 30 October 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Optical labelling reagents (dyes and fluorophores) are an essential component of probe-based biomolecule detection, an approach widely employed in a variety of areas including environmental analysis, disease diagnostics, pharmaceutical screening, and proteomic and genomic studies. Recently, functional nanomaterials, as a new generation of high-value optical labels, have been applied to molecular detection. The great potential of such recent optical labels has paved the way for the development of new biomolecule assays with unprecedented analytical performance characteristics, related to sensitivity, multiplexing capability, sample throughput, cost-effectiveness and ease of use. This review aims to provide an overview of recent advances using different nanoparticles (such as quantum dots, rare earth doped nanoparticles or gold nanoparticles) for analytical genomics and proteomics, with particular emphasis on the outlook for different strategies of using nanoparticles for bioimaging and quantitative bioanalytical applications, as well as possibilities and limitations of nanoparticles in such a growing field.

Keywords Proteomics · Nanoparticle · Bioanalysis · Genomics · Imaging

Ana María Coto-García and Emma Sotelo-González contributed equally to this work.

Published in the special issue *Nanomaterials for Improved Analytical Processes* with Guest Editors Miguel Valcárcel and Bartolomé M. Simonet.

A. M. Coto-García · E. Sotelo-González ·
M. T. Fernández-Argüelles · R. Pereiro · J. M. Costa-Fernández ·
A. Sanz-Medel (✉)
Department of Physical and Analytical Chemistry,
Faculty of Chemistry, University of Oviedo,
Julian Clavería, 8,
33006 Oviedo, Spain
e-mail: asm@uniovi.es

Introduction

Bioanalysis for proteomics and genomics often requires labelling of biochemical compounds for detection. Mass spectrometry techniques offer a label-free and powerful method of detection and are increasingly used in the field. However, they are expensive and cannot be easily applied to fast screening tests or in vivo studies. Alternatively, most other widely used bioanalytical techniques, including detection of isotopes, enzyme-linked chromophore/fluorophores, chemiluminescence and bioluminescence, are methods that could require appropriate analyte labelling. Among them, fluorescent labels play a key role in today's proteomic and genomic studies.

The actual success of fluorescence spectrometry for protein and gene detection today derives from several well-established advantages, including [1]:

- Fast signal acquisition: each individual fluorescent label can potentially provide 107–108 photons per second for detection.
- Multicolour dyes can be used for multiplexed assays.
- High sensitivity of the detection (today many applications of fluorescence are even focusing on single molecule detection).
- The luminescent signal is localized (unlike using some enzyme-linked amplification schemes).
- The labelling process can be straightforward provided that appropriate functional groups are available on the target analyte.

Of course, there are also some important limitations of fluorescence detection in bioanalytics, most of them arising from the organic fluorescent labelling reagents commonly used. Apart from possible difficulties with the labelling reaction, many of the used fluorophore reagents suffer from

photobleaching problems, pH sensitivity, reduced quantum yields or short excited luminescence lifetimes [1].

The recent emergence of synthesis strategies for mass fabrication of nanosized luminescent agents may lead to some of those limitations being overcome, paving the way for the development of more powerful bioanalytical tools. It appears that nanoparticles (NPs) with a variety of shapes, sizes and compositions (such as fluorescent quantum dots and gold nanoparticles) are poised to fundamentally change the bioanalytical fluorescence measurement landscape. The use of NPs could overcome many of the significant chemical and spectral limitations of classical molecular dye fluorophores. Equally important, methods for preparation and handling of nanoparticle–biomolecule conjugates are proliferating and such bioconjugation-ready NPs are becoming commercially available. Moreover, NPs are now being developed for absorbance and emission in the near-infrared (NIR) region—a development which is expected to allow for real-time and deep tissue imaging via optical routes.

The focus of this review is to highlight advances in the use of nanoparticles for bioanalytical applications, particularly in the field of proteomic and genomic studies. Nanoparticles can be used in a wide variety of bioanalytical formats. We will discuss here NPs as optical labels for optical imaging applications, and also their use in the development of bioassays and biosensors of quantitative nature.

The first part of the review focuses on the use of nanoparticles for optical imaging of proteins and genes. Bioimaging always requires an appropriate contrast agent in the target site. This is nowadays often achieved efficiently by using engineered nanoparticles as contrast agents [2]. First, the use of nanoparticles entails accessing target molecules (e.g. proteins or genes) hidden behind tissue barriers, through conjugation of specific targeting groups on their surface. Moreover, for imaging applications with low sensitivity, the highly valuable optoelectronic properties typical of nanoparticles could provide important signal amplification, resulting in higher detection sensitivities. Some representative imaging applications that have been successfully demonstrated by using different nanomaterials (including semiconductor nanocrystals, gold nanoparticles, up-converting nanocrystals or carbon nanoparticles) will be reviewed here.

On the other hand, over the last decade, research efforts to improve the performance of biochemical sensors and bioassays by incorporating different kinds of nanostructures as labels have gained considerable momentum [3]. Therefore, in the second part of this review we summarize the latest developments in the use of nanoparticles as labels, especially in the development of bioaffinity sensors for the detection of nucleic acids and proteins. Inorganic nano-

particle labels based on noble metals and semiconductor quantum dots, combined into highly selective recognition elements (e.g. antibodies or more recently aptamers) appear to be the most versatile systems for these bioanalytical applications.

For development of such applications different analytical instrumental techniques have been employed. Particularly, UV–Vis absorption spectroscopy and surface plasmon resonance were mainly employed when using gold nanoparticles as labels. However, most of the applications described rely on luminescence spectroscopy. Particularly, as will be described below, different photoluminescent techniques have been widely employed in such developments, including conventional fluorescence spectroscopy (very often fluorescence resonance energy transfer mechanisms are employed), fluorescence correlation spectroscopy (based on the analysis of fluctuations on the fluorescence intensity), time-resolved fluorescence spectroscopy (based on the measurement of fluorescence lifetimes), steady-state fluorescence (based on the measurement of the long-term average fluorescence of a sample when irradiated with UV, visible or NIR light), NIR fluorescence (highly valuable for *in vivo* applications, owing to the low backgrounds from the tissues at such wavelengths) or fluorescence microscopy (mainly used in imaging applications).

Optical imaging of proteins and genes with nanoparticles

Imaging of biological specimens, both *in vitro* and *in vivo*, has long relied on optical microscopy (e.g. fluorescence imaging) and is currently attracting increasing attention as a powerful bioanalytical tool for proteomic and genomic studies as technological advances provide enhanced capabilities. Biochemical imaging research has leveraged the benefits of significant advances in electronics, information technology and, more recently, nanotechnology. Substantial progress in the ability to fabricate high-quality NPs and the discovery and understanding of their outstanding and size-dependent physical and chemical features have stimulated their use in imaging. Particularly, introduction of multifunctional nanoparticles could overcome some of the limitations of more conventional contrast agents (organic dyes) and could constitute a significant thrust in new developments of bioimaging methodologies [2].

Nanoparticles should fulfil some basic requirements in order to be used as labels in imaging applications. NPs are desired to be highly bright, photostable and exhibit excitation and emission without interference from the biological matrix; in addition, NPs have to be soluble in biological buffers, biocompatible and non-cytotoxic. Of course, bioconjugation of NPs to recognition reagents (e.g.

antibodies) has to be possible and effective for them to then be used advantageously for fluorescent labelling of the bioanalytes [4]. Of course, all these conditions are not met yet and the pursuit of such NPs in research laboratories is still a challenging task.

Imaging reagents can be divided into endogenous and exogenous agents. Endogenous agents typically use an enzyme-mediated process inside the body to generate measurable visible light when a given substrate is degraded. The most commonly employed reporter systems are the fluorescent proteins, such as the green fluorescent protein and the luciferin/luciferase bioluminescent system. A drawback of such photoluminescent proteins is that typically they exhibit relatively low emission wavelengths (in the region of 500 nm) often overlapping with the autofluorescence of many tissues (high backgrounds).

Alternatively, exogenous imaging agents, by far the most familiar contrast agents to today's researchers and scientists, range from simple colorimetric contrast dyes to sensitive fluorescent probes and beyond. Nanoparticle-based exogenous optical contrast agents such as quantum dots (QDs), gold nanoparticles (AuNPs), organically modified dye-doped silica, up-converting phosphors and lanthanide-based contrast agents are recent additions to the list of exogenous contrast agents which combine a number of desired features such as resistance to photobleaching, high quantum yield and absorbance, emission in the NIR window or adequate dispersibility in the biological environment. Thus, main advantages and some selected applications for genomics and proteomics imaging of gold nanoparticles, quantum dots, rare earth doped NPs, up-converting nanocrystals and carbon dots are critically discussed below.

Gold nanoparticles

Although nanosized metals like gold and silver are not still commonly used in fluorescence methodologies, they can provide colorimetric contrast induced by surface plasmon resonance (SPR), whose magnitude is a function of the size, shape and dielectric constant of the medium. Actually, a large number of rather simple colorimetric methods using gold nanoparticles (AuNPs) have been reported.

In fact, AuNPs are now finding increased applications in bioimaging [5], as changes in their optical properties are exploited for applications in hybridization assays, DNA sequencing [6] or detection of genetic disorders [7], among others. Actually, it is possible to use specific organic moieties to fabricate and design nanoparticle aggregates whose spectra are sensitive to particle rearrangements. Typically, stable gold colloids of around 15-nm size with small particle diameters and no aggregation appear red in colloidal solution, and a change of the solution to blue or

violet will indicate aggregation of AuNPs. Based on such an effect, measurements of changes in the optical properties of AuNPs have been proposed for DNA hybridization detection based on a specific DNA target used as linking molecule to aggregate AuNPs containing complementary probe sequences [8]. This measurement allows detection of genetic disorders as well [7].

AuNPs bioconjugates have been applied to polynucleotide detection, using mercaptoalkyl oligonucleotide-modified AuNPs, by exploiting the change in optical properties resulting from plasmon-plasmon interactions between locally adjacent gold nanoparticles [9]. Gold nanoshells have also been fabricated for NIR resonance, and antibodies against target antigens were conjugated to the nanoshell surfaces [10]. When introduced into samples containing the appropriate antigen, the antibody-antigen linkage caused the gold nanoshells to aggregate, shifting the resonant wavelength further into the IR region.

AuNPs have also been used as luminescent agents for fluorescence imaging of proteins. In 2005, gold nanorods were evaluated as two-photon luminescence (TPL) imaging agents. 3D in vivo imaging of single nanorods in mouse ear blood vessels was carried out, observing a TPL around 60 times brighter than that obtained when using the common imaging reagent rhodamine, thereby proving the great potential of these agents for biological imaging [11].

More recently, Ren and co-workers investigated the fluorescent properties of AuNPs for cancer cell imaging [12]. For this purpose, they employed AuNPs with diameters between 16 and 55 nm, which emitted a stable fluorescence emission centred at 610 nm, for imaging of human epithelial cervical cancer cells (HeLa cells). After labelling the HeLa cells with AuNPs, they were illuminated with an intense light source, giving rise to a photobleaching effect of the cellular autofluorescence, but allowing detection of the stable fluorescence emitted by the AuNPs attached to the cell membrane or inside the cells.

In this vein, Chen and co-workers recently reported the use of gold nanocubes with high quantum yield for imaging cell lines of human liver cancer and human embryo kidney [13]. They observed much higher quantum yield with gold nanocubes than with gold nanorods (about 200 times higher). Of course, these high quantum yield NPs are a leap forward in the search for useful fluorescent AuNPs.

In any case, colloidal AuNPs show much weaker fluorescence than that observed with alternative nanoparticles, but they exhibit some added features that make them attractive for bioimaging applications. For instance, they do not suffer from any photodecomposition and largely retain their optical properties (however, their emission may vary depending upon the surrounding medium), they are apparently not toxic (in sharp contrast to other more fluorescent nanoparticles) and they have good

colloidal stability. Moreover, the ability to shift their optical properties, in a controlled fashion, to the spectral region best suited for optical bioimaging applications could open the way to numerous applications in the field [2]. The weakest point, however, is still AuNPs' comparatively low emission quantum yields which should be enhanced [14].

Quantum dots

Quantum dots (QDs) are nearly spherical, luminescent nanosized crystals made of semiconductor materials of the order of 2- to 10-nm diameter, with size-dependent optical properties [15]. A decrease in the crystal size causes an increase in energy shift between the absorbing and the emitting state. High quantum yields, narrow size-tunable emission and high resistance to photobleaching or to chemical degradation so far make QDs the preferred fluorescent probes for imaging applications. These nanocrystals have unparalleled sensitivity and spatial resolution, as compared to the organic fluorophores currently used [15]. Also, QDs with an organic capping perform even better. Such QDs typically have a nanocrystal core with an inorganic capping and an outer organic group to help further conjugations or functionalization. For instance, a ZnS-capped CdS QD is 20 times brighter than rhodamine and at the same time 100 times more stable to photobleaching [16]. Moreover, QDs of different sizes can be excited at a single wavelength and emit at multiple wavelengths, allowing their application in multiplexed assays [17].

Owing to all these exceptional optoelectronic characteristics, the use of QDs as luminescence probes in bioimaging has increased significantly since the first examples from Alivisatos [15] and Nie's [16] groups. The strategies proposed in such pioneering developments solved the problem of water-solubilization and biocompatibility of QDs, opening new avenues for their application in bioimaging. During recent years QDs have been used as fluorescent imaging labels for the study of live cell single-molecule dynamics, monitoring of intracellular protein-protein interactions, disease detection in deeper tissues, detection of tumour cells based on selective binding of bioconjugated QDs to known cancer biomarkers, and much more [18]. Fluorescent QDs have been widely applied to *in vitro* cellular imaging, biomolecular tracking in cells and tissue staining [19]. As an example, QDs linked to IgG and streptavidin were used to label different types of targets (breast cancer marker Her2, actin, microtubule fibres or nuclear antigens) at different locations (surface, intracellular or inside the nucleus) [20]. Recent fluorescent imaging research makes use of different types of biomolecules, such as peptides, antibodies or aptamers conjugated to the QDs, allowing the selective detection of different tumour bio-

markers, actin filaments, specific cells, etc. Many examples are reviewed in recent articles [19]. Quantum dots were also demonstrated to be very important for optical imaging in the NIR spectral region and, actually, some important bioanalytical applications have been developed [21]. The practical application of QDs in biomedical imaging can be widened by the synthesis of novel NIR QDs [21].

In parallel, great effort has been made to obtain a facile method for robust and efficient cellular delivery of QDs for *in vivo* imaging. In particular, many studies have focused on achieving appropriate delivery of the nanoparticles to the cytosol of cells (this has been found to be more complex than extracellular targeting) as different factors could affect the uptake of the QDs into cells. Different intracellular labelling approaches have been evaluated, including passive uptake, receptor-mediated and non-specific endocytosis, liposome-mediated intracellular delivery, electroporation or micro-injection [22]. However, as QD material or surface ligand chemistry was found to be determinant for the final uptake of the nanoparticles, more work needs to be done in this direction in order to avoid QD aggregation or deposition in endosomes or lysosomes [23].

Nowadays, QDs are widely employed for *in vivo* imaging of the vascular networks of mammals such as lymphatic and cardiovascular systems (see Fig. 1) [24]. Owing to their suitable particle size, and the NIR bright emission, QDs possess some important advantages, such as fast movement through the lymphatic network allowing a highly sensitive real-time observation [25].

It is worth mentioning that QDs have a promising future in cancer diagnosis and therapy [26]. Cancer cells possess surface receptors that can be employed as targets which can be recognized by specific antibodies, peptides or proteins conjugated to QDs. Examples of those receptors are Her2 (human epidermal growth factor receptor 2), ER (estrogen receptor), EGFR (epithelial growth factor receptor) and mTOR (mammalian target of rapamycin). In this sense, the first *in vivo* application of QDs for cancer imaging was carried out in 2002 by Åkerman and co-workers by conjugating QDs to three different peptides with affinity for tumour cells, which allowed their guidance to tumour vasculatures in mice [27].

Research in this field continues to grow [28] and more recent applications of QDs to *in vivo* fluorescent imaging of proteins for cancer diagnosis include early detection of primary tumours such as prostate [29], pancreatic [30] or liver cancer [31].

Considering that QDs of different sizes can be excited at a single wavelength but emit luminescence at multiple wavelengths, such nanoparticles are specially suited for multiplexed imaging. To this end, Nie and co-workers very recently performed a multiplexed immunohistological

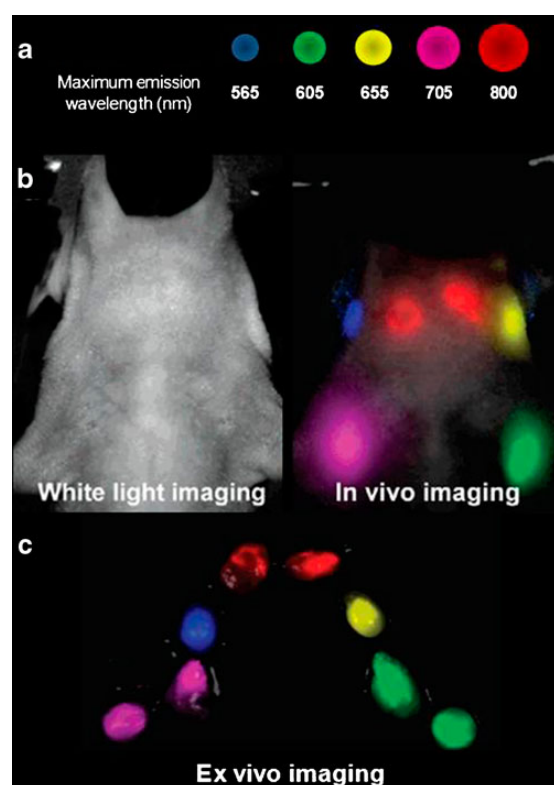


Fig. 1 **a** Schematic representation of different carboxyl QDs employed in fluorescence imaging of a mouse. **b** Five QDs were injected intracutaneously in primary draining lymph nodes and were simultaneously visualized as different colours through the skin in the in vivo image. **c** Ex vivo fluorescence image of lymph nodes after surgical resection. (Reprinted with permission from REFERENCE [24]. Copyright 2007 American Chemical Society)

staining in order to carry out a molecular mapping of tumour heterogeneity on human prostate cancer [32]. For this purpose, four protein biomarkers (E-cadherin, high molecular weight cytokeratin, p63, and α -methylacyl CoA racemase) were conjugated to four QDs of different emission wavelengths, thus targeting diverse tumour areas with different colours when they were excited simultaneously. Tumour heterogeneity was observed at the molecular, cellular and architectural levels, allowing direct visualization of their structural transitions—an achievement not possible with traditional organic dyes.

Within a few years QDs have gained recognition as very versatile nanomaterials for fluorescence imaging in vitro and in vivo, and particularly for multiplexing studies. They are available in a large variety of surface chemistries and there are today many conjugation strategies for derivatization with virtually any biologically active molecule. QDs will be the probe of choice for long-term, high sensitivity

and multicontrast imaging of molecular dynamics in biological samples. However, there are still a number of issues pending that warrant attention before QDs' full potential in this field can be realized. After nanoparticle surface coating (to improve its dispersion in water and bioconjugation) the observed dimensions of a QD are close to those of large proteins (10–25 nm) and this may limit access of the fluorescent labels to the biomolecules in cells for in vivo imaging. Another negative photophysical aspect of these nanoparticles which limits their use in bioimaging applications, is the phenomena of fluorescence intermittency (blinking), typically affecting QDs [33]. Moreover, nowadays there is a great controversy about the toxicity linked to such particles. In fact, the widespread replacement of organic fluorophores with QDs in bioimaging is hindered by the inherent chemical cytotoxicity expected from the individual ions (such as Cd^{2+} , Se^{2+} and Te^{2+}) that the QDs are composed of. Novel materials are being investigated for QDs preparation with the aim of avoiding many of these limitations, and much more work should be carried out in this direction.

Rare earth doped particles and carbon dots

Conventional fluorescence imaging is based on single-photon excitation, in which a high energy source is employed. However, the possibility exists of taking advantage of alternative “up-conversion fluorescence” imaging mode. This is based on the conversion of two or more low energy excitation photons (from the infrared spectral region) to higher energy emission photons (in the Vis spectral region), also known as anti-Stokes emission. In this mode, some weaknesses found in conventional fluorescence imaging (like tissue autofluorescence, short tissue penetration depth, DNA damage or cell death upon long-term exposures to high energy radiation) are minimized as infrared excitation is employed [34].

Again, present nanotechnology advances are playing a critical role in the progress of up-conversion fluorescence imaging. Recent advances in the synthesis of up-converting nanocrystals (UCNs) could be used in the development of higher sensitivity imaging techniques for biochemical applications. Nanosized up-converting particles typically consist of a LaF_3 , YF_3 , Y_2O_3 , LaPO_4 or NaYF_4 host lattice which is doped with trivalent rare earth ions, such as Yb^{3+} , Er^{3+} and Tm^{3+} [35]. These nanocrystals are excited in the IR or NIR region and emit in the Vis–NIR. Importantly, because the autofluorescence is minimal in such spectral regions, the observed background signal is much lower with such materials. Moreover, up-converting nanomaterials show excellent photostability, low toxicity and the emission wavelength can be altered by changing the doping metals within UCNs. These

properties make them a promising non-toxic alternative for clinical imaging applications [36].

UCNs have been recently evaluated for optical imaging of blood vessels [37] or lymphatic nodes in mice [36] and they have been used as carriers of porphyrin for photodynamic therapy [38]. One of the most relevant applications described so far was developed by Chatterjee and co-workers [34] who demonstrated the great potential of UCNs, when compared to green-emitting QDs, for imaging of deep tissues in rats, which might be a prelude to the use of UCNs in bigger animals [34]. Another recent example is the use NaYF₄-type UCNs modified with carboxylic groups and conjugated to streptavidin in the development of a fluorescence (or Förster) resonance energy transfer (FRET)-based nanoprobe for DNA imaging by attachment of a biotinylated oligonucleotide [39].

Another promising type of new-generation nanoparticles for optical imaging are carbon dots. As mentioned before, the high content of toxic metals in typical semiconductor QDs has prompted health and environmental concerns. This might represent a serious limitation for their *in vivo*, and even *in vitro*, applications. Thus, research on the use of alternative low-toxicity nanomaterials is an important and urgent requirement [40].

For this purpose, nanosized pure carbon particles, known as carbon dots (C-dots), constitute one of the new-generation nanomaterials showing a bright and colourful photoluminescence when their surface is passivated with organic molecules via covalent linkage or chemical adsorption, such as polyethylene glycol (PEG) derivatives or poly(propionylethyleneimine-*co*-ethyleneimine (PPEI-EI) [41]. Even though these nanoparticles exhibit luminescence with lower quantum yields than those of QDs, advantages in terms of biocompatibility and toxicity have been reported in cell lines and mice, and their applicability for both *in vitro* and *in vivo* imaging applications has been already demonstrated [42, 43].

C-dots have also been used for *in vivo* biosensing applications based on NIR fluorescence. Excitation of the nanoparticles with a pulsed laser in the NIR (800 nm) afforded low backgrounds and minimized the light scattering. For example, two-photon luminescence microscopy has been successfully used for imaging of human breast cancer cells with internalized carbon dots [43].

Further improved emissions and applications of this new type of novel nanoparticles for biochemical imaging are expected in the near future. However, we have to take into account that synthesis protocols and characterization tools of carbon dots are not well established yet (they are a new type of emerging and novel nanomaterials). Therefore, they have several shortcomings, mainly related to the low reproducibility. For instance, some studies showed a limited homogeneity of the C-dots in terms of fluorescence

brightness at the individual dot level [43]. Further improvements in the synthesis and characterization procedures of such nanoparticles are still required.

Nanoparticles as quantitation labels in biochemical sensors and assays

In the past few years, nanoparticles have also actively entered the field of analytical biosensors, by using them as transducers of hybridization phenomena. In fact, the exciting properties of NPs have been exploited to develop new biosensing and bioassay approaches; here we will highlight their use in the proteomics and genomics fields.

Although the use of NPs for bioimaging does not necessarily imply quantitative analytical measurements (i. e. DNA or protein determinations), biosensing requires quantitative approaches. For such quantitative biochemical applications, nanoparticles are conjugated with biospecific recognition molecules such as antibodies, DNA probe molecules, biotin and streptavidin, or enzymes. Upon binding with biotarget molecules, the binding event can be detected via individual nanoparticles or nanoparticle clusters by monitoring changes in some of the unique optical properties of the nanoparticles.

Thus, this section of the review illustrates a selection of developed strategies and applications of nanoparticles in the quantitative bioanalytical field, with relevance to sensors and assays.

Nanoparticle-mediated fluorescence resonance energy transfer

Fluorescence (or Förster) resonance energy transfer (FRET) is a spectroscopic process by which a donor molecule nonradiatively transfers energy over a long distance (1–10 nm) to an acceptor molecule. Because the efficiency of this process is highly sensitive to the distance between the donor–acceptor pair, FRET is an effective tool for investigating a variety of biological phenomena involving changes in molecular proximity or conformation. FRET has been used in a wide variety of applications, ranging from measuring static and dynamic conformational changes in proteins to biosensing or to binding studies.

Several factors complicate the analysis of FRET signals, including photobleaching, spectral crosstalk and direct acceptor excitation; however, these complications could be overcome by exploiting the aforementioned optical properties of nanoparticles. In fact, many of the bioanalysis methodologies reported so far are based on the use of nanoparticles involved in FRET mechanisms to provide versatile biosensing platforms to probe a variety of biological processes. Many FRET-based bioassays for

protein quantification have been already developed based on the use of gold nanoparticles and quantum dots.

Gold nanoparticles

The high molar extinction coefficient of gold nanoparticles (AuNPs) makes them excellent fluorescent acceptor materials for the development of FRET-based biosensors [44]. As an example, AuNPs were employed as acceptor species in the development of a biosensor for thrombin [45] and several biosensing strategies were evaluated. In a first approach, a thrombin aptamer was immobilized on the surface of the AuNPs and a complementary dye-labelled single-strand DNA (ssDNA) was then hybridized with the AuNP-aptamer so the fluorescence of the dye (donor) was quenched by gold nanoparticles. After thrombin addition, the binding between thrombin and aptamer causes dissociation from ssDNA and, thus, the dye fluorescence subsequently recovered. In a second approach, a dye-labelled thrombin aptamer was hybridized with AuNP modified with ssDNA. The binding of thrombin released the labelled thrombin aptamer and the fluorescence from the dye was detected. The second approach involves more laborious procedures, but results were more homogeneous and the recognition exhibited better detection limit than the first approach. Finally, a dye-labelled thrombin aptamer was adsorbed on AuNPs and, consequently, its fluorescence was quenched. With the addition of thrombin, the binding between thrombin and aptamer induced a conformational change in the aptamer causing the release of the aptamer and subsequent fluorescence recovery. This latter approach was more simple, fast and convenient, but results were highly inhomogeneous and the detection limit was worse than in the previous strategies [45].

Alternatively, gold nanoparticles were also employed as fluorescent donors in the development of a FRET-based bioassay. In this approach, AuNP bioconjugated with a platelet-derived growth factor (PDGF) aptamer (Apt-AuNP) acts as a quencher, while fluorescent gold nanodots (AuNDs) modified with PDGF emit photoluminescence. As a result of the high affinity between aptamer and target, when AuND-PDGF and AuNP-aptamer are in the same solution the photoluminescence of AuNDs decreases due to a quenching process occurring between Apt-AuNP and PDGF-AuNDs. This method was applied to the detection of PDGF in urine samples from healthy persons [46].

Quantum dots

One of the most frequently employed strategies involving QDs as fluorescent labels is their use as energy donor molecules in FRET [47]. QDs exhibit several properties that can benefit their use as donors: their large surface area

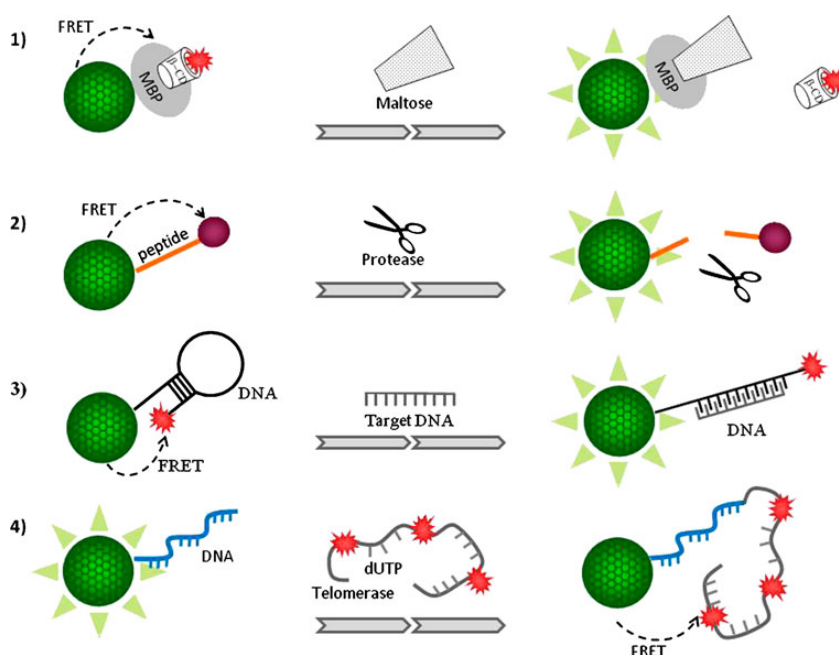
enables the binding of several proximal acceptors (proteins, peptides or oligonucleotides) to one NP, providing a highly efficient spectral overlap. Another key feature is the possibility to control their emission by changing the core size, which facilitates the spectral overlap between donor and acceptor. Therefore, theoretically we will always be capable of selecting an adequate QD that matches the acceptor dye, just by controlling the QDs size and material. The QDs' large Stokes shift and their wide absorption spectra also reduce direct excitation of the acceptor. Hence, all these advantageous properties offer the possibility to achieve "multiplex" energy transfer configurations, making use of just one excitation source.

In fact, QDs have been used in different FRET-based assays for protein and gene detection. For this purpose, a FRET-based bioassay was developed by using QDs functionalized with appropriate proteins to recognize and bind a similar target. In this assay, the bioconjugate captures the dye-labelled analogue, leading to loss of emission fluorescence when the FRET process takes place. The presence of the target molecule competes for its labelled analogue, and binds to the receptor protein. Thus, the acceptor is displaced from the QD surface, giving rise to a progressive enhancement of the fluorescent signal. Making use of this methodology, one can obtain information about the kinetics or the dissociation constant. This scheme was first employed by Mauro and co-workers for the development of a maltose biosensor [48]. Maltose binding protein (MBP) was attached to the QD surface via metallic affinity interaction. The QDs were previously modified with beta-cyclodextrin (β -CD) and the quencher QSY9, providing an efficient fluorescent quenching. The addition of maltose competes for binding sites in MBP, displacing the β -CD-QSY9, and an increase in fluorescence intensity was recorded. Figure 2 summarises different approaches to the use of QDs in FRET bioassays.

Very recently, a novel platform for effective sensing of biomolecules was designed by measuring the FRET efficiency from QDs modified with a molecular beacon (MB) to graphene oxide (GO). After GO was added to the QD-MB bioconjugate a strong quenching effect was detected due to an energy transfer from the QD to the GO. In the presence of the target DNA a change in the FRET efficiency occurs, providing the basis of the biomolecule (e.g. thrombin) biosensing [49].

QDs, as donor agents, have been employed to develop FRET-based biosensors to determine many other proteins such as thrombin, caspase, collagenase and chymotrypsin [50]. Moreover, through immobilization of different fluorescent acceptors on different sized QDs, multiplexed detection of biological enzymes, such as protease, polymerase and nuclease, can be achieved [51].

Fig. 2 FRET strategies for analyte-mediated distance changes. 1 Analyte displaces fluorescent ligand. 2 Analyte cleaves donor–acceptor linkage. 3 Analyte changes the conformation of acceptor–donor linkage. 4 Analyte mediates donor–acceptor binding. (Reprinted from REFERENCE [86] with permission)



The use of QDs as energy acceptors in FRET-based methodologies is not so common. In those approaches, the donor used has to emit luminescence at a wavelength shorter than that of the QD (to allow the FRET process to occur). As a most recent example Geissler et al. developed a time-resolved fluoroimmunoassay format based on a FRET process from visible-emitting lanthanide complexes of europium and terbium streptavidin labelled (as energy donors) to semiconductor CdSe/ZnS biotin coated nanocrystals (as energy acceptors). This strategy allowed the determination of five biomarkers in a highly sensitive multiplexed assay [52].

QD-FRET has also been incorporated into nanosensors for genetic analysis. Zhang et al. developed a DNA nanosensor comprising a QD and a pair of sequence-specific probes for detection of nucleic acid targets. A biotinylated capture probe and a Cy5-labelled reporter probe cohybridize to target DNA to form a sandwich structure that can be captured by a streptavidin-conjugated QD. The QD functions both as a FRET donor and as a scaffold that increases local target concentration for signal amplification. This QD-FRET nanosensor has an extremely low level of fluorescence background and produces a very distinct FRET signal upon binding to even a small amount of DNA targets [53].

Immunoreaction-based nanoparticle assays

Immunoassays, based on the highly selective interaction and binding of antibodies to antigens, can be monitored by

measuring the analytical signal provided by a label, attached either to the antigen or to the antibody. Although new techniques for direct and specific monitoring of such antibody and antigen interaction have become available in recent years (e.g. surface plasmon resonance and related techniques), the most common quantitative assays rely on indirect approaches based on chemical labelling strategies [54].

Different types of nanoparticles have attracted increasing interest for bioanalytical labelling applications in recent years. Actually, nanoparticles with anchor groups for linkage to biomolecules are today commercially available, enabling simple linkage to peptides/proteins via functional groups (e.g. $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$) attached to the surface of the nanoparticles. The driving force behind the use of nanoparticles as tags in biological assays is to eliminate the need for either organic fluorophores or radioactive labelling, both of which have shortcomings. In fact, many labelling experiments already described using nanoparticles would not have been possible with organic dyes (e.g. multicolour labelling with a minimal set of filters, long-term monitoring of dynamic processes).

Semiconductor quantum dots are often used in the development of improved immunoassays and immunosensors. QDs have been employed as luminescent labels in the development of a high number of immunoassays to study biorecognition events and for quantification of different biochemical species such as proteins or nucleic acids [4]. In this vein, a recent assay evaluated the use of nanohybrids to

build agglomerates in the presence of a specific antigen, which were more than one order of magnitude larger than their individual components. The final agglomerate size depends on several factors such as relative concentrations of conjugates and antigen molecules, and it can be characterized by flow cytometry. This methodology allowed the detection of agiopoietin-2 and mouse IgG at the sub-picomolar level. The main advantage of this approach is that it enables simultaneous detection of multiple antigenic biomarkers in physiological media, which can be especially useful in early detection (alarm sensors) or screening of tumours and other diseases [55].

As many biotinylated antibodies are now commercially available, one of the most employed strategies to attach the NPs to biomolecules is the avidin–biotin interaction. This approach was employed by Goldman et al. in the first QD-based simultaneous multianalyte assay, in which avidin–QDs were used as fluorescent labels [56]. After this first attempt, other similar immunoassays for the detection of foodborne pathogenic bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella*, were developed. QDs with different emission wavelengths were conjugated to anti-*E. coli* and anti-*Salmonella* antibodies. Target bacteria were separated from the sample by using magnetic beads coated with specific antibodies. These beads then reacted with QD–antibody conjugates to form bead–QD complexes, and fluorescent emission from the QDs was used for the determination of *E. coli* and *Salmonella* cells [57].

Several limitations of QDs have been described which hinder their applicability in the development of immunoassays, particularly limitations due to the big size of the QD–antibody bioconjugates and the lack of specific sites in the antibodies after binding the QD [58].

Alternatively, for colorimetric immunosensing assays, the use of gold nanoparticles as labels is exceptionally attractive. When using AuNPs as labels, the basis of the immunoreactions detection is the colour change due to the interparticle plasmon coupling during AuNPs aggregation (red to purple/blue) or during redispersion of AuNP aggregates (purple to red). In addition to the advantageous properties of such nanoparticles already described, the high extinction coefficient of AuNPs allows the development of highly sensitive immunosensors. In fact, different examples of the application of AuNPs in immunosensing assays for proteomic studies have been described.

Peptide-stabilized AuNPs have been enzymatically biotinylated by a kinase-catalysed reaction using biotin–ATP as a co-substrate. Upon mixing with avidin-modified particles, solutions of biotinylated particles change colour from red to blue, indicating aggregation of the nanoparticles. On the basis of this reaction, Wang et al. developed a simple colorimetric test to monitor kinase inhibitor activity [59]. A similar approach, based on

peptide-induced aggregation of AuNPs, was developed to sense phosphatase activity. Once the phosphate group is eliminated by alkaline phosphatase, peptide-induced AuNP aggregation is triggered, resulting in a significant change in absorbance at 650 nm [60]. This format assay allows simple, quick and inexpensive monitorization of the dephosphorylation reaction, which is a challenging task because the loss or gain of nucleotide phosphate group cannot be easily distinguished by conventional spectroscopic methods [61].

Surface derivatization of AuNPs with antibodies or proteins has also been used to determine proteins or protein–protein interactions in biological samples. In this way, Pittner and co-workers developed an optical immuno-chip biosensor for allergen detection (ovalbumin and ovomucoid) in complex matrices using AuNPs as signal transducers [62]. Based on this approach, a simple and rapid colorimetric solid-phase immunoassay has been reported, in direct and sandwich formats, with a readout system that does not require complex instrumentation.

The increasing number of applications of nanoparticles in immunoassays shows their growing importance and analytical potential. The amplification effect on the signal, reduced photobleaching effects, safe handling in comparison with radioisotopes, use of one less reaction step compared with ELISAs, and the possibility of performing multiplexing assays are great advantages which warrant the increased use of NPs-based bioassays in the future.

Multiplexed assays

Nanoparticles hold particular promise as the next generation barcodes for multiplexing experiments (see Fig. 3). Genomic and proteomic research demands greater information from single experiments. Conventional experiments utilize multiple organic dyes to barcode different analytes in a single experiment, but positive identification may be difficult due to spectral crosstalk among the different dyes.

Taking advantage of the narrow emission and broad excitation spectra of QDs, several assays have been developed to detect various analytes simultaneously. In this sense, several methodologies are based on the use of specific antibodies bioconjugated with QDs. In an early typical development, Goldman and co-workers bioconjugated four types of luminescent QDs with four different specific antibodies to perform a multiplexed fluoroimmunoassay for the simultaneous detection of cholera toxin, ricin, shiga-like toxin 1 and staphylococcal enterotoxin B in single wells of a microtiter plate [56].

In a further development, Algar and Krull demonstrated the potential of aptamer–QD assemblies to develop a simultaneous two-colour diagnostic scheme based on FRET. For this purpose, two different colour QDs were

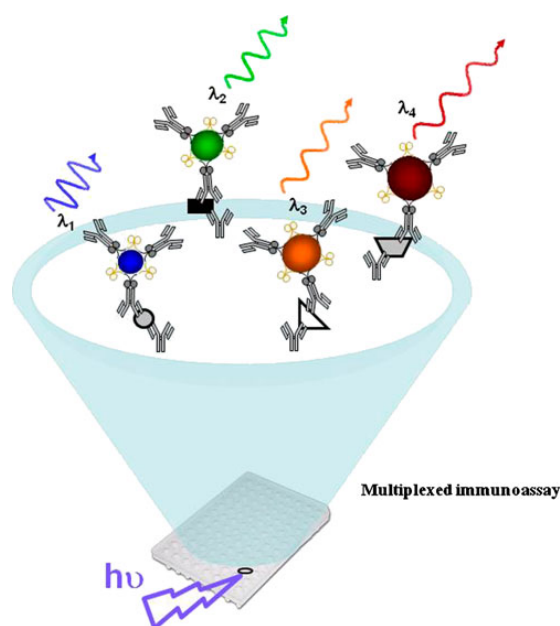


Fig. 3 Scheme of multianalyte immunoassay. Four analytes can be detected simultaneously in a sandwich assay format from a single well of a microtiter plate. Antibodies against all four analytes are adsorbed on the wells of plates, exposed to a mix of all four analytes, and analytes detected by anti-toxin antibodies conjugated to the various QDs. (Reprinted from REFERENCE [87] with permission)

conjugated with oligonucleotide probes acting as donors, and after hybridization with the two target sequences of oligonucleotides, labelled with organic fluorophores as acceptors for each QD, the FRET process takes place allowing the simultaneous detection of two nucleic acids [63].

In a third interesting example, QDs of different sizes were coated onto magnetic microbeads generating nanobarcode beads (Qbeads). The spectrum of the resulting microparticles provided an optical code for the specific composition of the particles. The further conjugation of gene-specific oligonucleotide probes to the surface of each nanobarcode bead allows the creation of a multiplexed panel, which was evaluated to carry out multiplexed gene expression analysis [64].

Nanoparticles in aptamer-based detection of genes and proteins

Aptamers are short single-strand DNAs/RNAs with high affinity and specificity towards a great variety of molecules, from ions to whole cells and even intact viral particles. They are selected from combinatorial libraries of oligonucleotides with different sequences, via an *in vitro* iterative process of adsorption, recovery and reamplification known

as systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) [65]. Aptamers offer several advantages to being used in biosensing including cost-effective synthesis, high binding affinities for their targets and flexibility for signal transduction and detection. Moreover, in principle aptamers are superior to antibodies in bioanalysis because they are stable against biodegradation and denaturation and provide a useful response against non immunogenic molecules.

Aptamers conjugated with NPs can be employed for the recognition of targets by exploiting conformational changes of the molecular structure when a variation in their local environment takes place because these changes alter the emission properties of the corresponding luminescent labels [66]. In this sense, different types of conjugation between NPs and aptamers have been reported for bioanalytical applications, including direct covalent linkage (through the use of heterobifunctional linkers) and non-covalent interactions (e.g. electrostatic interactions, groove binding, intercalation or complementary single-strand DNA binding) [67, 68].

Both colorimetric and fluorescent highly sensitive biosensors, based on aptamers conjugated to AuNPs, have been developed and reported for the detection of specific oligonucleotide sequences. There, aptamers act as functional targeting molecules while AuNP act as indicators. Thus, when the target sequence is present, the NPs aggregate and a colour change is observed [69].

Anti-thrombin aptamer has been widely used to detect thrombin [65]. It has been evaluated in different formats taking advantage of the fact that each thrombin molecule interacts with two thrombin aptamers. In this sense, Willner and co-workers functionalized AuNPs with an anti-thrombin aptamer, and the presence of thrombin produced turbidity in the NP solution as consequence of the generation of aggregates [70]. Another approach for the detection of thrombin designed by Becker et al. was based on the immobilization of aptamers onto a glass surface. After carrying out a sandwich format binding assay, functionalized AuNPs could be localized on the glass surface for colorimetric detection [71]. Later, in 2008, Jana and Ying improved this methodology by using a nitrocellulose membrane for the immobilization and detection [72]. Recently, other types of NPs such as gold nanorods have been used to carry out the specific aptamer–thrombin recognition [73].

AuNPs conjugated to aptamers have also been used in the development of bioassays for determination of cancer biomarkers, proteins and disease cells. As an example, Chang and co-workers employed AuNPs modified with an aptamer to detect platelet-derived growth factors (PDGFs) by monitoring a visible red-to-purple colour change that, once again, occurs as a result of aggregation [74]. A

schematic representation of the aggregation of Apt-AuNPs in the presence of PDGFs at different concentrations is given in Fig. 4. Detection of the protein IgE was also carried out in a new working mechanism named hairpin sticky-end pairing induced AuNP assembly based on the discovery of unique aggregation behaviour of aptamer-functionalized AuNPs [75]. The use of AuNPs conjugated with the corresponding aptamers allowed the development of a direct colorimetric assay for disease cells, which showed a distinct colour change while healthy cells did not change their colour [76].

Recent advances in this field have given rise to a multiplexed system for the simultaneous detection of several analytes (adenosine, cocaine and potassium ions). For this purpose, ssDNAs were co-assembled at the surface of AuNPs. The sequences of these three strands are complementary to those of three aptamers labelled with different dyes (one for each analyte); then hybridization with their complementary sequences takes place at the surface of AuNPs, generating the multicolour gold nanoprobe [77].

Quantum dots and AuNPs have also been used in combination with aptamers to develop different bioassays. Early research includes the bioconjugation of aptamers with QDs to detect thrombin by using a competition assay format, in which aptamer-QDs are hybridized with complementary ssDNA labelled with an acceptor dye: the induced fluorescence quenching of QDs by thrombin which displaces the labelled ssDNA is restored and so thrombin concentrations are measured [78].

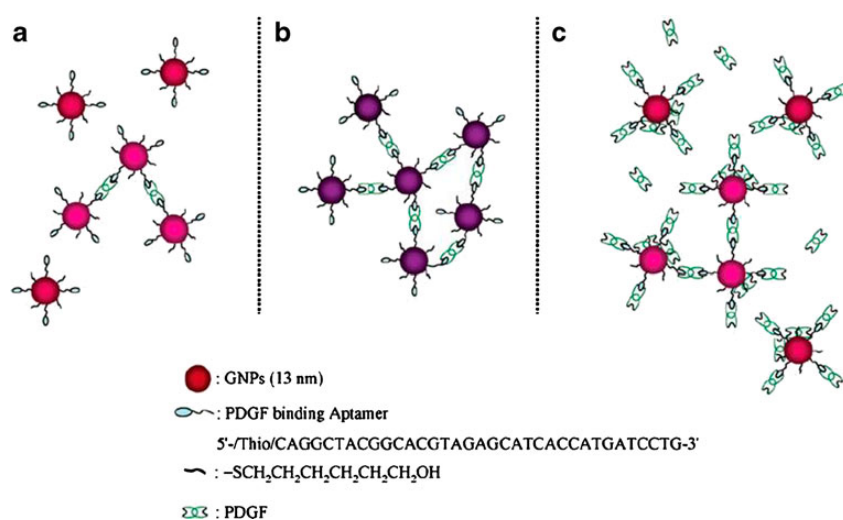
The use of QD-aptamer conjugates combined with FRET has also been used for detection of a tumour biomarker, the glycoprotein MUC1. In this approach,

quantitative detection of MUC1 is reported by using QDs-labelled DNA and a DNA strand containing aptameric region for MUC1 and a strand with a quencher partially prehybridized. In the absence of the biomarker, strong fluorescence intensity of the QD was observed. The presence of MUC1 produces a successive decrease of fluorescence intensity because MUC1 binds to the aptamer strand in a way that the donor and acceptor are brought into close proximity and so an efficient FRET process occurs [79].

Semiconductor QDs and AuNPs have also been used together, combined with aptamers, in the development of FRET-based bioassays: singly-labelled QDs plus AuNPs containing complementary DNA oligonucleotides were used to develop a fluorescence competition assay for DNA detection. In that assay, QD fluorescence emission was quenched due to the close contact with AuNP after DNA hybridization. The presence of higher amounts of complementary oligonucleotides without acceptor molecule brought about a release of the AuNP from the QD and the consequent QD fluorescence regeneration that was measured [80]. The same concept and format were also employed for the detection of avidin [81] and glycoproteins [82].

In the last few years, the optical properties of QDs have also been exploited for DNA labelling and for the development of new DNA-based microarrays, particularly aimed at the detection of a great number of analytes simultaneously (multiplex determination). As an example, different colour QDs were used for the detection of single-nucleotide polymorphism in human oncogene p53 and for the simultaneous detection of the hepatitis B and the hepatitis C virus in microarray configurations [83].

Fig. 4 Schematic representation of the aggregation of Apt-GNPs with PDGFs at **a** low, **b** medium and **c** high concentrations. (Reprinted with permission from REFERENCE [74]. Copyright 2005 American Chemical Society)



One important advantage of the use of aptamers as recognition elements is the possibility to carry out the discrimination of single-base-mismatched target DNA. Kim et al. proposed the use of different sized QDs conjugated to different ssDNA which possess a quencher at the end of the sequence. When the target was not complementary, the hybridization process between DNA strands was not complete and, thus, donor and acceptor were in close proximity, giving rise to a fluorescence decrease [84]. This approach is also the basis of the research developed by Zhang and Johnson to study the sequence-specific interaction between Rev and RRE, essential for the expression of the structural genes and for HIV replication. Rev is an HIV-1 regulatory protein that specifically binds the RNA molecule in the RRE region of the HIV *env* gene. Specific RNA (containing RRE region) attached to QDs was conjugated with Cy5-labelled Rev peptide. Therefore, FRET interactions were produced, and QD photoluminescence was quenched as peptide concentration increased [85].

Conclusions and future prospects

Although the use of nanoparticles as labels in bioanalysis is still in its infancy, nanoparticles offer a powerful detection approach in optical imaging and biosensing assays for proteomics and genomics applications. The initial challenge of achieving proper coating of the nanoparticles to preserve their stability, water solubility and ability to label targets is slowly being met. A great deal of progress has been made on this front in the last years and new reagent sets should eventually be effective for multiparameter detection (multiplexed detection) with microarray devices. Continuous advances in the synthesis of nanoparticles and in surface chemistry for tailored modifications have improved the reliability of nanoparticle-based reagents for bioassays. Further progress is expected to push detection limits further into the sub-femtomolar range (or lower) and lead to development of new assay formats for multiplex determinations, particularly of proteins.

An important issue to be considered regarding the use of nanoparticles, particularly for *in vivo* applications, is their eventual toxicity and biocompatibility. In fact, actual applications of QDs for *in vivo* applications are hindered by the inherent chemical cytotoxicity expected from the individual ions (such as Cd^{2+} , Se^{2+} and Te^{2+}) that can be leached out from the core of the QDs. Novel synthetic routes to QDs, their encapsulation in appropriate inert matrices or the modification of their surface with polymeric layers are some approaches that are being studied in order to reduce the toxicity of such high-performance nanocrystals. Of course, another alternative could be the development of alternative low-toxicity nanomaterials, such

as carbon dots, gold nanoparticles or doped silica nanoparticles, which have demonstrated a lower toxicity and higher biocompatibility. In any case, nowadays there is still a great controversy about the toxicity linked to such nanoparticles and exhaustive toxicological studies are urgently demanded.

Despite the outstanding potential of NPs in bioanalytical research, there are still many challenges that pose significant barriers to their further applications and development. For example, as the properties of nanoparticles are strongly dependent on the nanoparticle size, nanoparticle materials synthesis (with reproducible properties for any reliable applications) should carefully and precisely control the nanoparticle size. Unfortunately, we must acknowledge, after a few decades of research endeavour in nanoparticle synthesis, that reproducibility of nanoparticle production remains a major issue in nanoparticle research.

A second key point and challenge is how to avoid loss of activity of the biomolecules once they are conjugated to nanoparticles. The loss of activity of biomolecules upon adsorption to an interface such as air–water or water–solid substrate has been a long-standing problem.

Another issue concerning nanoparticle bioconjugates is the number of biomolecules attached per nanoparticle. Usually multiple biomolecules can be attached to an individual nanoparticle and, in fact, the number of biomolecules attached per particle cannot be controlled appropriately so far (in part due to our relatively poor control on the nanoparticle size via wet chemical synthesis as mentioned previously).

Let us conclude by saying that much work must be carried out if the chemistry and physics of nanocrystals are to be understood, if the general concepts for bioconjugation are to be established, and if new NPs methods, taking advantage of their discussed unique features, are to be developed to solve present bioanalysis challenges posed by biology, biochemistry and medicine.

Acknowledgements Financial support from project CTQ2006-02309/BQU (Spanish Ministry of Science and Innovation cofinanced by the EU FEDER Programme) is gratefully acknowledged.

References

1. Waggoner A (2006) Fluorescent labels for proteomics and genomics. *Curr Opin Chem Biol* 10:62–66
2. Sharma P, Brown S, Walter G, Santra S, Moudgil B (2006) Nanoparticles for bioimaging. *Adv Colloid Interface Sci* 123:471–485
3. Willard DM (2003) Nanoparticles in bioanalytics. *Anal Bioanal Chem* 376:284–286
4. Gill R, Zayats M, Willner I (2008) Semiconductor quantum dots for bioanalysis. *Angew Chem Int Ed Engl* 47:7602–7625
5. Sperling RA, Rivera Gil P, Zhang F, Zanella M, Parak WJ (2008) Biological applications of gold nanoparticles. *Chem Soc Rev* 37:1896–1908

6. Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, Storhoff JJ (1996) A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* 382:607–609
7. Taton TA, Mirkin CA, Letsinger RL (2000) Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes. *Science* 289(8):1757–1760
8. He L, Musick MD, Nicewamer SR, Salinas FG, Benkovic SJ, Natan MJ, Keating CD (2000) Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of DNA hybridization. *J Am Chem Soc* 122:9071–9077
9. Elghanian R, Storhoff JJ, Mucic RC, Letsinger RL, Mirkin CA (1997) Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science* 277:1078–1081
10. Hirsch LR, Jackson JB, Lee A, Halas NJ, West JL (2003) A whole blood immunoassay using gold nanoshells. *Anal Chem* 75:2377–2381
11. Wang H, Huff TB, Zweifel DA, He W, Low PS, Wei A, Cheng J (2005) In vitro and in vivo two-photon luminescence imaging of single gold nanorods. *PNAS* 102:15752–15756
12. He H, Xie C, Ren J (2008) Nonbleaching fluorescence of gold nanoparticles and its applications in cancer cell imaging. *Anal Chem* 80:5951–5957
13. Wu X, Ming T, Wang X, Wang P, Wang J, Chen J (2010) High-photoluminescence-yield gold nanocubes: for cell imaging and photothermal therapy. *ACS Nano* 4:113–120
14. Lin CJ, Yang T, Lee C, Huang SH, Sperling RA, Zanella M, Li JK, Shen J, Wang H, Yeh H, Parak WJ, Chang WH (2009) Synthesis, characterization, and bioconjugation of fluorescent gold nanoclusters toward biological labeling applications. *ACS Nano* 3:395–401
15. Bruchez M Jr, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP (1998) Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 281:2013–2016
16. Chan WCW, Nie SM (1998) Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 281:2016–2018
17. Wagner MK, Li F, Li J, Li X, Le XC (2010) Use of quantum dots in the development of assays for cancer biomarkers. *Anal Bioanal Chem* 397:3213–3224
18. Am S, Ruan G, Rhyner MN, Nie S (2006) Engineering luminescent quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Ann Biomed Eng* 34:3–14
19. Wang C, Gao X, Su X (2010) In vitro and in vivo imaging with quantum dots. *Anal Bioanal Chem* 397:1397–1415
20. Wu XY, Liu HJ, Liu JQ, Haley KN, Treadway JA, Larson JP, Ge NF, Peale F, Bruchez MP (2002) Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 21:41–46
21. Aswathy RG, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS (2010) Near infrared quantum dots for deep tissue imaging. *Anal Bioanal Chem* 397:1417–1435
22. Delehanty JB, Bradburne CE, Boeneman K, Susumu K, Farrell D, Mei BC, Blanco-Canosa JB, Dawson G, Dawson PE, Mattoussi H, Medintz IL (2010) Delivering quantum dot-peptide bioconjugates to the cellular cytosol: escaping from the endolysosomal system. *Integr Biol* 2:265–277
23. Smith AM, Duan H, Mohs AM, Nie S (2008) Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 60:1226–1240
24. Kobayashi H, Hama Y, Koyama Y, Barrett T, Regino CAS, Urano Y, Choyke PL (2007) Simultaneous multicolor imaging of five different lymphatic basins using quantum dots. *Nano Lett* 7:1711–1716
25. Hikage M, Gonda K, Takeda M, Kamei T, Kobayashi M, Kumasaka M, Watanabe M, Satomi S, Ohuchi N (2010) Nano-imaging of the lymph network structure with quantum dots. *Nanotechnology* 21:185103 (8pp)
26. Peng CW, Li Y (2010) Application of quantum dots-based biotechnology in cancer diagnosis: current status and future perspectives. *J Nanomater* 676839 (11pp)
27. Åkerman ME, Chan WCW, Laakkonen P, Bhatia SN, Ruoslahti E (2002) Nanocrystal targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12617–12621
28. Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, Noireaux V, Brivanlou AH, Libchaber A (2002) In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 298:1759–1762
29. Gao X, Cui Y, Levenson RM, Chung LWK, Nie S (2004) In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 22(8):969–976
30. Yang L, Mao H, Wang YA, Cao Z, Peng X, Wang X, Duan H, Ni C, Yuan Q, Adams G, Smith MQ, Wood WC, Gao X, Nie S (2009) Single chain epidermal growth factor receptor antibody conjugated nanoparticles for in vivo tumor targeting and imaging. *Small* 5:235–243
31. Yu X, Chen L, Li K, Li Y, Luo S, Liu J, Deng L, Pang D, Wang (2007) Immunofluorescence detection with quantum dot bioconjugates for hepatoma in vivo. *J Biomed Opt* 12:014008
32. Liu J, Lau SK, Varma VA, Moffitt RA, Caldwell M, Liu T, Young AN, Petros JA, Osunkoya AO, Krogstad T, Leyland-Jones B, Wang MD, Nie S (2010) Molecular mapping of tumor heterogeneity on clinical tissue specimens with multiplexed quantum dots. *ACS Nano* 4:2755–2765
33. Kuno M, Fromm DP, Hamann HF, Gallagher A, Nesbitt DJ (2000) Hydrolysis of sulfur trioxide to form sulfuric acid in small water clusters. *J Chem Phys* 112:3117–3120
34. Chatterjee DK, Rufaihah AJ, Zhang Y (2008) Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals. *Biomaterials* 29:937–943
35. Wang H, Nann T (2009) Monodisperse upconverting nanocrystals by microwave-assisted synthesis. *ACS Nano* 3:3804–3808
36. Kobayashi H, Kosaka N, Ogawa M, Morgan NY, Smith PD, Murray CB, Ye X, Collins J, Kumar GA, Bellid H, Choyke PL (2009) In vivo multiple color lymphatic imaging using upconverting nanocrystals. *J Mater Chem* 19:6481–6484
37. Hilderbrand SA, Shao F, Salthouse C, Mahmoodb U, Weissleder R (2009) Upconverting luminescent nanomaterials: application to in vivo bioimaging. *Chem Commun* 4188–4190
38. Ungun B, Prud'homme RK, Budijono SJ, Shan J, Lim SF, Ju Y, Austin R (2009) Nanofabricated upconversion nanoparticles for photodynamic therapy. *Opt Express* 17:80–86
39. Chen Z, Che H, Hu H, Yu M, Li F, Zhang Q, Zhou Z, Yi T, Huang C (2008) Versatile synthesis strategy for carboxylic acid functionalized upconverting nanophosphors as biological labels. *J Am Chem Soc* 130:3023–3029
40. Sun Y, Zhou B, Lin Y, Wang W, Fernando KAS, Pathak P, Meziani MJ, Harruff BA, Wang X, Wang H, Luo PG, Yang H, Kose ME, Chen B, Veca LM, Xie S (2006) Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *J Am Chem Soc* 128:7756–7757
41. Cao L, Wang X, Meziani MJ, Lu F, Wang H, Luo PG, Lin Y, Harruff BA, Veca LM, Murria D, Xie S, Sun Y (2007) Carbon dots for multiphoton bioimaging. *J Am Chem Soc* 129:11318–11319
42. Yang S, Wang X, Wang H, Lu F, Luo PG, Cao L, Meziani MJ, Liu J, Liu Y, Chen M, Huang Y, Sun Y (2009) Carbon dots as nontoxic and high-performance fluorescence imaging agents. *J Phys Chem C* 113:18110–18114
43. Yang S, Cao L, Luo PG, Lu F, Wang X, Wang H, Meziani MJ, Liu Y, Qi G, Sun Y (2007) Carbon dots for optical imaging in vivo. *J Am Chem Soc* 131:11308–11309
44. Li L, Song J, Li S, Fan C (2009) Biomolecular sensing via coupling DNA-based recognition with gold nanoparticles. *J Phys D Appl Phys* 42:203001–203012
45. Wang W, Chen C, Qian M, Zhao X (2008) Aptamer biosensor using gold nanoparticles. *Anal Bioanal Chem* 373:213–219
46. Huang CC, Chiang K, Lin ZH, Lee KH, Chang HT (2008) Bioconjugated gold nanodots and nanoparticles for protein assays based on photoluminescence quenching. *Anal Chem* 80:1497–1504

47. Mendintz IL, Mattoussi H (2009) Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology. *Phys Chem Chem Phys* 11:17–45
48. Medintz IL, Clapp AR, Mattoussi H, Goldman ER, Fisher B, Mauro JM (2003) Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors. *Nat Mater* 2:630–638
49. Dong H, Gao W, Yan F, Ji H, Ju H (2010) Fluorescence resonance energy transfer between quantum dots and graphene oxide for sensing biomolecules. *Anal Chem* 82:5511–5517
50. Medintz IL, Clapp AR, Brunel FM, Tiefenbrunn T, Uyeda HT, Chang EL, Deschamps JR, Dawson PE, Mattoussi H (2006) Proteolytic activity monitored by fluorescence resonance energy transfer through quantum-dot-peptide conjugates. *Nat Mater* 5:581–589
51. Suzuki M, Husimi Y, Komatsu H, Suzuki K, Douglas KT (2008) Quantum dot FRET biosensors that respond to pH, to proteolytic or nucleolytic cleavage, to DNA synthesis, or to a multiplexing combination. *J Am Chem Soc* 130:5720–5725
52. Geissler D, Charbonniere LJ, Ziessel RF, Butlin NG, Löhmansröben H-G, Hildebrandt N (2010) Quantum dot biosensors for ultrasensitive multiplexed diagnostics. *Angew Chem Int Ed Engl* 49:1396–1401
53. Zhang C-Y, Yeh H-C, Kuroki MT, Wang T (2005) Single quantum dot-based DNA nanosensor. *Nat Mater* 4:826–831
54. Price CP, Newman DJ (1997) Principles and practice of immunoassay. Stockton, New York
55. Soman CP, Giorgio TD (2008) Quantum dot self-assembly for protein detection with sub-picomolar sensitivity. *Langmuir* 24:4399–4404
56. Goldman ER, Clapp AR, Anderson GP, Uyeda HT, Mauro JM, Medintz IL, Mattoussi H (2004) Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents. *Anal Chem* 76:684–688
57. Yang LJ, Li YB (2006) Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium using quantum dots as fluorescence labels. *Analyst* 131:394–401
58. Wei Q, Lee M, Yu X, Lee EK, Seong GH, Choo J, Cho YW (2006) Development of an open sandwich fluoroimmunoassay based on fluorescence resonance energy transfer. *Anal Biochem* 358:31–37
59. Wang Z, Levy R, Femig DG, Mathias Brust M (2006) Kinase-catalyzed modification of gold nanoparticles: a new approach to colorimetric kinase activity screening. *J Am Chem Soc* 128:2214–2215
60. Choi Y, Ho N-H, Tung C-H (2007) Sensing phosphatase activity by using gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl* 46:707–709
61. Zhao W, Chiuman W, Lam JCF, Brook MA, Li Y (2007) Simple and rapid colorimetric enzyme sensing assays using non-crosslinking gold nanoparticle aggregation. *Chem Commun* 3729–3731
62. Maier I, Morgan MRA, Lindner W, Pittner F (2008) Optical resonance-enhanced absorption-based near-field immunochip biosensor for allergen detection. *Anal Chem* 80:2694–2703
63. Algar WR, Krull UJ (2007) Towards multi-colour strategies for the detection of oligonucleotide hybridization using quantum dots as energy donors in fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Anal Chim Acta* 581:193–201
64. Eastman PS, Ruan WM, Doctolero M, Nuttall R, Feo GD, Park JS, Chu JFS, Cooke P, Gray JW, Li S, Chen FQF (2006) Qdot nanobarcode for multiplexed gene expression analysis. *Nano Lett* 6:1059–1064
65. Tombelli S, Minunni M, Mascini M (2007) Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis. *Biomol Eng* 24:191–200
66. Wang G, Wang Y, Chen L, Choo J (2010) Nanomaterials-assisted aptamers for optical sensing. *Biosens Bioelectron* 25:1859–1868
67. De M, Ghosh PS, Rotello VM (2008) Applications of nanoparticles in biology. *Adv Mater* 20:4225–4241
68. Mairal T, Özalp VC, Lozano-Sánchez P, Mir M, Katakis I, O'Sullivan CK (2008) Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal Bioanal Chem* 390:989–1007
69. Han MS, Lytton-Jean AKR, Oh BK, Heo J, Mirkin CA (2006) Colorimetric screening of DNA-binding molecules with gold nanoparticles probes. *Angew Chem Int Ed Engl* 45:1807–1810
70. Pavlov V, Xiao Y, Shlyahovsky B, Willner I (2004) Aptamer-functionalized Au nanoparticles for the amplified optical detection of thrombin. *J Am Chem Soc* 126:11768–11769
71. Becker RC, Spencer FA (1998) Thrombin: structure, biochemistry, measurement, and status in clinical medicine. *J Thromb Thrombolys* 5:215–229
72. Jana NR, Ying JY (2008) Synthesis of functionalized Au nanoparticles for protein detection. *Adv Mater* 20:430–434
73. Zhen SJ, Huang CZ, Wang J, Li YF (2009) End-to-end assembly of gold nanorods on the basis of aptamer-protein. *J Phys Chem C* 113:21543–21547
74. Huang CC, Huang YF, Cao Z, Tan W, Chang HT (2005) Aptamer-modified gold nanoparticles for colorimetric determination of platelet-derived growth factors and their receptors. *Anal Chem* 77:5735–5741
75. Wu ZS, Lu HX, Liu XP, Hu R, Zhou H, Shen G, Yu RQ (2010) An inhibitory effect of target binding on hairpin aptamer sticky-end pairing-induced gold nanoparticles assembly for light-up colorimetric protein assay. *Anal Chem* 82:3890–3898
76. Medley CD, Smith JE, Tang Z, Wu Y, Bamrungsap S, Tan W (2008) Gold nanoparticle-based colorimetric assay for the direct detection of cancerous cells. *Anal Chem* 80:1067–1072
77. Zhang J, Wang L, Zhang H, Boey F, Song S, Fan C (2010) Aptamer-based multicolour fluorescent gold nanoprobe for multiplex detection in homogeneous solution. *Small* 6:201–204
78. Levi M, Cater SF, Ellington AD (2005) Quantum-dot aptamer beacons for the detection of proteins. *ChemBiochem* 6:2163–2166
79. Cheng AKH, Su H, Wang YA, Yu HZ (2009) Aptamer-based detection of epithelial tumor marker Mucin 1 with quantum dot-based fluorescence readout. *Anal Chem* 81:6130–6139
80. Dyakusha L, Yin H, Jaiswal S, Brown T, Baumberg JJ, Booy FP, Melvin T (2005) Quenching of CdSe quantum dot emission, a new approach for biosensing. *Chem Commun* 3201–3203
81. Oh E, Hong MY, Lee D, Nam SH, Yoon HC, Kim HS (2005) Inhibition assay of biomolecules based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) between quantum dots and gold nanoparticles. *J Am Chem Soc* 127:3270–3271
82. Oh E, Lee D, Kim YP, Cha SY, Oh DB, Kang HA, Kim J, Kim HS (2006) Nanoparticle-based energy transfer for rapid and simple detection of protein glycosylation. *Angew Chem Int Ed Engl* 45:7959–7963
83. Gerion D, Chen F, Kannan B, Fu A, Parak WJ, Chen DJ, Majumdar A, Alivisatos AP (2003) Room-temperature single-nucleotide polymorphism and multiallele DNA detection using fluorescent nanocrystals and microarrays. *Anal Chem* 75:4766–4772
84. Kim JH, Chaudhary S, Ozkan M (2007) Multicolour hybrid nanoprobe of molecular beacon conjugated quantum dots: FRET and gel electrophoresis assisted target DNA detection. *Nanotechnology* 18:195105
85. Zhang CY, Johnson LW (2006) Quantum-dot-based nanosensor for RRE IIB RNA–Rev peptide interaction assay. *J Am Chem Soc* 128:5324–5325
86. Fernandez-Argüelles MT, Costa Fernández JM, Pereiro R, Sanz Medel A (2010) Chap. 12, The supramolecular chemistry of organic–inorganic hybrid materials, John Wiley & Sons, Inc
87. Rurack K, Martínez-Mañez R (2010) Chap. 12, The supramolecular chemistry of organic–inorganic hybrid materials, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey

A.8 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ M. H. A. Hassan, *Small things and big changes in the developing world*. Science **2005**, 309, 65-66.
- ² P. A. Serena, A. Correia, *Nanotecnología: el motor de la próxima revolución tecnológica*. Apuntes de Ciencia y Tecnología, **2003**, 9, 32-42.
- ³ *Definición del término nanoescala recogido por la Organización Internacional de Estandarización (ISO)* [Online]. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:ts:12805:ed-1:v1:en:term:3.2> (última consulta Julio 2013).
- ⁴ R. P. Feynman, *There's plenty of room at the bottom: An invitation to enter a new field of physics*. Engineering and Science **1960**, 23, 22-36.
- ⁵ N. Taniguchi, *On the basic concept of Nanotechnology*. Proceeding of International Conference on Production Engineering, **1974**, 2, 18-23.
- ⁶ *Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties*; The Royal Society and The Royal Academy of Engineering: Plymouth, UK, **2004**. Este artículo se puede encontrar en http://www.raeng.org.uk/news/publications/list/reports/nanoscience_nanotechnologies.pdf (última consulta Julio 2013)
- ⁷ M. J. Pitkethly, *Nanomaterials – the driving force*. Nanotoday **2004**, 7, 20-29
- ⁸ C. P. Poole, F. J. Owens. *Introduction to nanotechnology*. Wiley: New Jersey, USA, **2003**.
- ⁹ H. Brune, H. Ernst, A. Grunwald, W. Grünwald, H. Hofmann, H. Krug, P. Janich, M. Mayor, W. Rathgeber, G. Schmid, U. Simon V. Vogel, D. Wyrwa, F. Wütscher. *Nanotechnology: Assesment and Perspectives*; Springer: Berlin, Alemania, 2006.
- ¹⁰ Página web de la *Comisión Europea* dedicada a *Investigación e Innovación*, sección referida a la *Nanotecnología* [online]. <http://ec.europa.eu/nanotechnology/faq/faqs.cfm?lg=es&pg=faq&sub=details&idfaq=28847&fhome=1> (última consulta Julio 2013)
- ¹¹ M. J. Pitkethly, *Nanomaterials – the driving force*. Nanotoday **2004**, 7, 20-29.
- ¹² M. Valcárcel, B.M. Simonet, *Nanomaterials for improved analytical processes*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **2001**, 399, 1-2.
- ¹³ A. Correia, M. Pérez, J. J. Sáenz, P. A. Serena, *Nanotechnology applications: a driving force for R&D investment*. Physica Status Solidi **2007**, 204, 1611-1622.

- ¹⁴ Oxford Instruments, *Nanotechnology: Technology and market dynamics – a unique opportunity*, **2006**.
- ¹⁵ Página web de la *Comisión Europea* dedicada al *programa Horizonte 2020* [online]. http://ec.europa.eu/research/horizon2020/index_en.cfm (última consulta Julio 2013).
- ¹⁶ R. W. Whatmore, *Nanotechnology-what is it? Should we be worried?* *Occupational Medicine* **2006**, 56, 295-299.
- ¹⁷ A. Lapresta-Fernández, A. Fernández, J. Blasco. *Public concern over ecotoxicology risks from nanomaterials: pressing need for research-based information*. *Environment International* **2012**, 39, 148–149.
- ¹⁸ W. G. Kreyling, M. Semmler-Behnke, Q. Chaudhry, *A complementary definition of nanomaterial*. *Nanotoday* **2010**, 5, 165-168.
- ¹⁹ E. A. J. Bleeder, W. H. de Jong, R.E. Geertsma, M. Groenewold, E. H. E. Heugens, M. Koers-Jacquemijns, D. van de Meent, J. R. Popma, A. G. Rietveld, S. W. P. Wijnhoven, F. R. Cassee, A. G. Oomen, *Considerations on the EU definition of a nanomaterial: Science to support policy making*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2013**, 65, 119-125.
- ²⁰ Recomendación de la Comisión Europea, de 18 de Octubre de 2011 relativa a la definición de nanomaterial (2011/696/UE).
- ²¹ R.W. Murray, *Nanoparticles: An emerged and lasting frontier*, *Analytical Chemistry* **2009**, 81, 1723.
- ²² Página web de la *Clasificación de nanomateriales, los cuatro tipos principales de nanomateriales producidos de manera intencionada* [online]. <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1872> (última consulta Agosto 2013).
- ²³ B. Ferreira da Silva, S. Perez, P. Gardinalli, R. K. Singhal, A. A. Mozeto, D. Barceló, *Analytical chemistry of metallic nanoparticles in natural environments*. *Trends in Analytical Chemistry* **2011**, 30, 528-540.
- ²⁴ A.I. López-Lorente, B. M. Simonet, M. Valcárcel, *Analytical potential of hybrid nanoparticles*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, 399, 43-54.
- ²⁵ J.A. García-Calzón, M.E. Díaz-García, *Synthesis and analytical potential of silica nanotubes*. *Trends in Analytical Chemistry* **2012**, 35, 27-38.
- ²⁶ T. Sánchez, V. Velasco Rodríguez, J.M. Martínez Duart, *Nanociencia y nanotecnología: la tecnología fundamental del siglo XXI*. *Física para todos* **2005**, 19-22.

- ²⁷ P. Alivisatos, *The use of nanocrystals in biological detection*. Nature biotechnology **2004**, 22, 47-52.
- ²⁸ J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *The use of luminescent quantum dots for optical sensing*. Trends in Analytical Chemistry **2006**, 25, 207-218.
- ²⁹ P. Reiss, M. Protière, L. Li, *Core/shell semiconductor nanocrystals*. Small **2009**, 5, 154-168.
- ³⁰ G. Schmid, *Chapter 1: General Introduction*, 1-3. En *Nanoparticles from theory to application*. G. Schmid; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Alemania, **2004**.
- ³¹ W. J. Parak, L. Manna, F. C. Simmel, D. Gerion, P. Alivisatos, *Chapter 2: Quantum Dots*, 4-49. En *Nanoparticles from theory to application*. G. Schmid; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Alemania, **2004**.
- ³² W. R. Algar, K. Susumu, J. B. Delehanty, I. L. Medintz, *Semiconductor quantum dots in bioanalysis: Crossing the valley of death*. Analytical Chemistry **2011**, 83, 8826-8837.
- ³³ C. J. Murphy, J. L. Coffey, *Quantum dots: a premier*. Applied spectroscopy **2002**, 56, 16A-27A.
- ³⁴ X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Quantum Dots for live cells in vivo imaging and diagnostics*. Science **2005**, 307, 538-544.
- ³⁵ A. M. Smith, S. Nie, *Semiconductor nanocrystals: Structure, properties and band gap engineering*. Accounts of Chemical Research **2010**, 43, 190-200.
- ³⁶ M. P. Bruchez, *Turning all the lights on: quantum dots in cellular assays*. Current Opinion in Chemical Biology **2005**, 9, 533-537.
- ³⁷ S. K. Sarkar, N. Chandrasekharan, S. Gorer, G. Hodes, *Reversible adsorption-enhanced quantum confinement in semiconductor quantum dots*. Applied Physics Letters **2002**, 81, 5045-5047.
- ³⁸ C. Carrillo-Carrion, S. Cardenas, B. M. Simonet, M. Valcarcel, *Quantum dots luminescence enhancement due to illumination with UV/Vis light*. Chemical Communications **2009**, 35, 5214-5226.
- ³⁹ A.P. Alivisatos, *Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals*. Journal of Physical Chemistry **1996**, 100, 13226-13239.
- ⁴⁰ S. J. Rosenthal, J. McBride, S. J. Pennycook, L. C. Feldmann, *Synthesis, surface studies, composition and structural characterization of CdSe, core/shell and biologically active nanocrystals*. Surface Science Reports **2007**, 62, 111-157.

- ⁴¹ C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, *Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E=sulphur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites*. Journal of the American Chemical Society **1993**, 115, 8706-8715.
- ⁴² X. Peng, L. Manna, W. Yang, J. Wickham, E. Scher, A. Kadavanich, A. P. Alivisatos, *Shape control of CdSe nanocrystals*. Nature **2000**, 404, 59-61.
- ⁴³ F. A. Esteve-Turrillas, A. Abad-Fuentes, *Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes*. Biosensors and Bioelectronics **2013**, 41, 12-29.
- ⁴⁴ N. Gaponik, S. G. Hickey, D. Dorfs, A. L. Rogah, A. Eychmüller, *Progress in the light emission of colloidal semiconductor nanocrystals*. Small **2010**, 6, 1364-1378.
- ⁴⁵ F. Zhang, E. Lees, F. Amin, P. Rivera_Gil, F. Yang, P. Mulvaney, W. J. Parak, *Polymer-coated nanoparticles: A universal tool for biolabelling experiments*. Small **2011**, 22, 3113-3127.
- ⁴⁶ W. C. W. Chan, S. Nie, *Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection*, Science **1998**, 281, 2016 -2018.
- ⁴⁷ W. J. Parak, T. Pellegrino, C. Plank, *Labelling of cells with quantum dots*. Nanotechnology **2005**, 16, R9-R25.
- ⁴⁸ H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, M. G. Bawendi, *Self-Assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein*. Journal of the American Chemical Society **2000**, 122, 12142-12150.
- ⁴⁹ Y. Liu, M. Kim, Y. Wang, X. Peng, *Highly luminescent, stable, and water soluble CdSe/CdS core-shell dendron nanocrystals with carboxylate anchoring groups*. Langmuir **2006**, 22, 6341-6345.
- ⁵⁰ J. Lipka, M. Semmler-Behnke, R. A. Sperling, A. Wenk, S. Takenaka, C. Scheleh, T. Kissel, W. J. Parak, W. G. Kreyling, *Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratacheal installation and intravenous infection*. Biomaterials **2010**, 31, 6574-6581.
- ⁵¹ V. V. Breus, C. D. Heyes, K. Tron, G. U. Nienhaus, *Zwitterionic biocompatible quantum dots for wide pH stability and weak nonspecific binding to cells*. ACS Nano **2009**, 3, 2573-2580.
- ⁵² F. Pinaud, D. King, H-P. Moore, S. Weiss, *Bioactivation and cell targeting of semiconductor CdSe/ZnS nanocrystals with phytochelatin-related peptides*. Journal of the American Chemical Society **2004**, 126, 6115-6123.
- ⁵³ S. Kim, M. G. Bawendi, *Oligomeric ligands for luminescent and stable nanocrystals quantum dots*. Journal of the American Chemical Society **2003**, 125, 14652-14653.

- ⁵⁴ M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels*. *Science* **1998**, 281, 2013-2016
- ⁵⁵ D. Gerion, F. Pinaud, S.C. Williams, W.J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, A.P. Alivisatos, *Synthesis and properties of biocompatible water-soluble silica-coated CdSe/ZnS semiconductor quantum dots*, *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, 105, 8861-8871.
- ⁵⁶ T. Pellegrino, L. Manna, S. Kudera, T. Liedl, D. Koktysh, A. L. Rogach, S. Keller, J. Radler, G. Natile, W. J. Parak, *Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: A general route to water soluble nanocrystals*. *Nano Letters* **2004**, 4, 703-707.
- ⁵⁷ R. E. Anderson, W. C. W. Chan, *Biocompatible, single, and small ZnS capped quantum dots with amphiphilic polymers*. *ACS Nano* **2008**, 2, 1341-1352.
- ⁵⁸ Y. Yan, S. Wang, Z. Liu, H. Wang, D. Huang, *CdSe-ZnS quantum dots for selective and sensitive detection and quantification of hypochlorite*. *Analytical Chemistry* **2010**, 82, 9775-9781.
- ⁵⁹ M. T. Fernandez-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, *Synthesis and characterization of polymer-coated quantum dots with integrated acceptor dyes as FRET-based nanoprobess*, *Nano Letters* **2007**, 7, 2613-2617.
- ⁶⁰ R. A. Sperling, T. Liedl, S. Duhr, S. Kudera, M. Zanella, C. A. J. Lin, W. H. Chang, D. Braun, W. J. Parak, *Size determination of (bio)conjugated water-soluble colloidal nanoparticles: A comparison of different techniques*. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, 111, 11552-11559.
- ⁶¹ E. E. Lees, T. L. Nguyen, A. H. A. Clayton, P. Mulvaney, *The Preparation of colloidally stable, water-soluble, biocompatible, semiconductor nanocrystals with a small hydrodynamic diameter*. *ACS Nano* **2009**, 3, 1121-1128.
- ⁶² J. D. Mackenzie, E. P. Bescher, *Chemical routes in the synthesis of nanomaterials using the sol-gel process*. *Accounts of Chemical Research* **2007**, 40, 810-818.
- ⁶³ S. T. Selvan, C. Bullen, M. Ashokkumar, P. Mulvaney, *Synthesis of tunable, highly luminescent QD-glasses through sol-gel processing*. *Advanced Materials* **2001**, 13, 985-988.
- ⁶⁴ R. Reisfield, T. Saraidov, *Innovative materials based on sol-gel technology*. *Optical Materials* **2006**, 28, 64-70.
- ⁶⁵ V. B. Kandimalla, V. S. Tripathi, H. Ju, *Immobilization of biomolecules in sol-gels: biological and analytical applications*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2006**, 36, 73-106.

- ⁶⁶ G. W. Walker, V. C. Sundar, C. M. Rudzinski, A. W. Wun, M. G. Bawendi, D. G. Nocera, *Quantum-Dot optical temperature probes*. Applied Physics Letter **2003**, 83, 3555-3557.
- ⁶⁷ M. J. Ruedas-Rama, X. Wang, E. A. Hall, A multi-ion particle sensor. *Chemical Communications* **2007**, 1544-1546.
- ⁶⁸ S. Tokonami, H. Shiigi, T. Nagaoka, *Micro- and nanosized molecularly imprinted polymers for high-throughput analytical applications*. Analytica Chimica Acta **2009**, 641, 7-13.
- ⁶⁹ A. Gole, N. R. Jana, S. T. Selvan, J. Y. Ying, *Langmuir-blodgett thin films of quantum dots: Synthesis, surface modification and fluorescence resonance energy transfer (FRET) studies*. Langmuir **2008**, 24, 8181-8186.
- ⁷⁰ C. A. Constantine, K. M. Gattás-Asfura, S. V. Mello, G. Crespo, V. Rastogi, T.-C. Cheng, J. J. DeFrank, R. M. Leblanc, *Layer-by-layer biosensor assembly incorporating functionalized quantum dots*. Langmuir **2003**, 19, 9863-9867.
- ⁷¹ D. J. Norris, A. L. Efros, S. C. Erwin, *Doped nanocrystals*. Science **2008**, 319, 1776-1779.
- ⁷² R. Buonsanti, D. J. Milliron, *Chemistry of doped colloidal nanocrystals*. Chemistry of materials **2013**, 25, 1305-1317.
- ⁷³ S. Shen, Q. Wang, *Rational tuning the optical properties of metal sulphide nanocrystals and their applications*. Chemistry of materials **2013**, 24, 1166-1178.
- ⁷⁴ J. D. Bryan, D. R. Gamelin, *Chapter 2: Doped semiconductor nanocrystals: Synthesis, characterization, physical properties, and applications*, 47-126. En *Progress in inorganic chemistry*, vol. 54. D. D. Karlin; John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA, **2005**.
- ⁷⁵ R.N. Bhargava, D. Gallagher, X. Hong, A. Nurmikko, *Optical properties of manganese-doped nanocrystals of ZnS*. Physical Review Letters **1994**, 72, 416-419.
- ⁷⁶ A. A. Bol, A. Meijerink, *Doped semiconductor nanoparticles – a new class of luminescent materials?* Journal of Luminescence **2000**, 87-89, 315-318.
- ⁷⁷ H. Wu, W. Zhang, *Synthesis and properties of transition metals and rare-earth metals doped ZnS nanoparticles*. Optical Materials **2006**, 28, 536-550.
- ⁷⁸ S. C. Erwin, L. Zu, M. I. Haftel, A. L. Efros, T. A. Kennedy, D. J. Norris, *Doping semiconductor nanocrystals*. Nature **2005**, 436, 91-94.
- ⁷⁹ A. Nag, S. Chakraborty, D. D. Sarma, *To dope Mn²⁺ in a semiconducting nanocrystal*. Journal of the American Chemical Society **2008**, 130, 10605-10611.

- ⁸⁰ H. Yang, S. Santra, P. H. Holloway, *Syntheses and applications of Mn-doped II-VI semiconductor nanocrystals*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2005**, 5, 1364-1375.
- ⁸¹ P. Wu, X.-P. Yan, *Doped quantum dots for chemo/biosensing and bioimaging*. *Chemical Society Reviews* **2013**, 42, 5489-5521.
- ⁸² N. S. Karan, D. D. Sarma, R. M. Kadam, N. Pradhan, *Doping transition metal (Mn or Cu) ions in semiconductor nanocrystals*. *Physical Chemistry Letters* **2010**, 1, 2863-2866.
- ⁸³ P. S. Chowdhury, A. Patra, *Role of dopant concentration and surface coating on photophysical properties of CdS:Eu³⁺ nanocrystals*. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, 8, 1329-134.
- ⁸⁴ K. Zhang, Y. Yu, S. Sun, *Influence of Eu doping on the microstructure and photoluminescence of CdS nanocrystals*. *Applied surface science* **2012**, 258, 7658-7663.
- ⁸⁵ N. Pradhan, D. D. Sarma, *Advances in light-emitting doped semiconductor nanocrystals*. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2011**, 2, 2818-2826.
- ⁸⁶ H. Yang, P. H. Holloway, *Efficient and photostable ZnS-passivated CdS:Mn luminescent nanocrystals*. *Advanced functional materials* **2004**, 14, 152-156.
- ⁸⁷ H.R. Shakur, *A detailed study of physical properties of ZnS quantum dots synthesized by reverse micelle method*. *Physica E: Low-dimensional systems and nanostructures* **2011**, 44, 641-646.
- ⁸⁸ P. T. K. Chin, J. W. Stouwdam, R. A. J. Janssen, *Highly luminescent ultranarrow Mn Doped ZnSe nanowires*. *Nano Letters* **2009**, 9, 745-750.
- ⁸⁹ P. V. Radovanovic, C. J. Barrelet, S. Gradečak, F. Qian, C. M. Lieber, *General synthesis of manganese-doped II-VI and III-V semiconductor nanowires*. *Nano Letters* **2005**, 5, 1407-1411.
- ⁹⁰ L.-W. Jiang, J. Zhou, X.-Z. Yang, X.-Z. Yang, X.-N. Peng, H. Jiang, D.-Q. Zhuo, L.-D. Chen, X.-F. Yu, *Microwave-assisted synthesis of surface-passivated doped ZnSe quantum dots with enhanced fluorescence*. *Chemical Physics Letters* **2011**, 510, 135-138.
- ⁹¹ F. V. Midulec, M. Kuno, M. Bennati, D. A. Hall, R. G. Griffin, M. G. Bawendi, *Organometallic synthesis and spectroscopic characterization of manganese-doped CdSe nanocrystals*. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 2532-2540.
- ⁹² D. Turnbull, *Formation of crystal nuclei in liquid metals*. *Journal of Applied Physics* **1950**, 21, 1022-1028.
- ⁹³ G. M. Dalpian, J. R. Chelikowsky, *Self-purification in semiconductor nanocrystals*. *Physical Review Letters* **2006**, 96, 226802 (4 páginas).

- ⁹⁴ P. I. Archer, S. A. Santangelo, D. R. Gamelin, *Inorganic cluster syntheses of TM²⁺-doped quantum dots (CdSe, CdS, CdSe/CdS): Physical property dependence on dopant locale*. Journal of the American Chemical Society **2007**, 129, 9808-9818.
- ⁹⁵ .M.-H. Du, S. C. Erwin, A.L. Efros, *Trapped-dopant model of doping in semiconductor nanocrystals*. Nano Letters **2008**, 8, 2878-2882.
- ⁹⁶ L. Zu, A.W. Wills, T. A. Kennedy, E. R. Glaser, D. J. Norris, *Effect of different manganese precursors on the doping efficiency in ZnSe nanocrystals*. Journal of Physical Chemistry C **2010**, 114, 21969-21975.
- ⁹⁷ A. Nag, S. Sapra, C. Nagamani, A. Sharma, N. Pradhan, S. V. Bhat, D. D. Sarma, *A study of Mn²⁺ doping in CdS nanocrystals*. Chemistry of Materials **2007**, 19, 3252-3259.
- ⁹⁸ N. Pradhan, D. Goorskey, J. Thessing, X. Peng, *An alternative of CdSe nanocrystals emitters: pure and tunable impurity emissions in ZnSe nanocrystals*. Journal of the American Chemical Society **2005**, 127, 17586-17587.
- ⁹⁹ R. Beaulac, P. I. Archer, D. R. Gamelin, *Luminescence in colloidal Mn²⁺-doped semiconductor nanocrystals*. Journal of Solid State Chemistry **2008**, 181, 1582-1589.
- ¹⁰⁰ S. Mahamuni, A. D. Lad, S. Patole, *Photoluminescence properties of manganese-doped zinc selenide quantum dots*. The Journal of Physical Chemistry C **2008**, 112, 2271-2277.
- ¹⁰¹ S. Sapra, A. Prakash, A. Ghangrekar, N. Periasamy, D. D. Sarma, *Emission properties of manganese-doped ZnS nanocrystals*. The Journal of Physical Chemistry B **2005**, 109, 1663-1668.
- ¹⁰² R. Beaulac, P. I. Archer, X. Liu, S. Lee, G. M. Salley, M. Dobrowolska, J. K. Furdyna, D. R. Gamelin, *Spin-polarizable excitonic luminescence in colloidal Mn²⁺-doped CdSe quantum dots*. Nano Letters **2008**, 8, 1197-1201.
- ¹⁰³ R. Beaulac, P. I. Archer, S. T. Ochsenein, D. R. Gamelin, *Mn²⁺-doped CdSe quantum dots: new inorganic materials for spin-electronics and spin-photonics*. Advanced Functional Materials **2008**, 18, 3873-3891.
- ¹⁰⁴ A. A. Bol, A. Meijerink, *Long-lived Mn²⁺ emission in nanocrystalline ZnS:Mn²⁺*. Physical Review B (Condensed Matter and Materials Physics) **1998**, 58, R15997-16000.
- ¹⁰⁵ J.H. Chung, C. S. Ah, D.-J. Jang, *Formation and distinctive decay times of surface- and lattice-bound Mn²⁺ impurity luminescence in ZnS nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry B **2001**, 105, 4128-4132.

- ¹⁰⁶ A. Nag, R. Cherian, P. Mahadevan, A. V. Gopal, A. Hazarika, A. Mohan, A. S. Vengurlekar, D. D. Sarma, *Size-dependent tuning of Mn²⁺ d emission in Mn²⁺-doped CdS nanocrystals: bulk vs surface*. The Journal of Physical Chemistry C **2010**, 114, 18323-18329.
- ¹⁰⁷ B. Shen, H. Zhou, Z. Chen, Z. Wang, Y. Sheng, J. Chen, B. Geng, *Synthesis and optoelectrochemical properties of ZnS:Mn nanocrystals*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology **2012**, 12, 3931-3937.
- ¹⁰⁸ K. Sooklal, B. S. Cullum, S. M. Angel, C. J. Murphy, *Photophysical properties of ZnS nanoclusters with spatially localized Mn²⁺*. The Journal of Physical Chemistry **1996**, 100, 4551-4555.
- ¹⁰⁹ S. K. Panda, S. G. Hickey, H. V. Demir, A. Eychmüller, *Bright white-light emitting manganese and copper co-doped ZnSe quantum dots*. Angewandte Chemie International Edition **2011**, 50, 4432-4436.
- ¹¹⁰ Q. Dai, C. E. Duty, M. Z. Hu, *Semiconductor-nanocrystals- based white light-emitting diodes*. Small **2010**, 6, 1577-1588.
- ¹¹¹ M. Tanaka, Y. Masumoto, *Very weak temperature quenching in orange luminescence of ZnS:Mn²⁺ nanocrystals in polymer*. Chemical Physics Letters **2000**, 324, 249-254.
- ¹¹² A. A. Bol, R. van Beek, J. Ferwerda, A. Meijerink, *Temperature dependence of the luminescence of nanocrystalline CdS/Mn²⁺*. Journal of Physics and Chemistry of Solids **2003**, 64, 247-252.
- ¹¹³ F. H. Su, Z. L. Fang, B. S. Ma, K. Ding, G. H. Li, *Pressure dependence of Mn²⁺ luminescence in differently sized ZnS:Mn nanoparticles*. The Journal of Physical Chemistry B **2003**, 107, 6991-6996.
- ¹¹⁴ W. Chen, F. Su, G. Li, A. G. Joly, J.-O. Malm, J.-O. Bovin, *Temperature and pressure dependences of the Mn²⁺ and donor-acceptor emissions in ZnS:Mn²⁺ nanoparticles*. Journal of Applied Physics **2002**, 92, 1950-1955.
- ¹¹⁵ F. Wang, X. Liu, *Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals*. Chemical Society Reviews **2009**, 38, 976-989.
- ¹¹⁶ D. More, Ch. Rajesh, A. D. Lad, G. Ravindra Kumar, S. Mahamuni, *Two photon absorption in Mn²⁺-doped ZnSe quantum dots*. Optics Communications **2010**, 283, 2150-2154.
- ¹¹⁷ J.H. Yu, S.-H. Kwon, Z. Petrásek, O. K. Park, S. W. Jun, K. Shin, M. Choi, Y. I. Park, D. Park, H. B. Na, N. Lee, D. W. Lee, J. H. Kim, P. Schwillle, T. Hyeon, *High-resolution three-photon biomedical imaging using doped ZnS nanocrystals*. Nature Materials **2013**, 12, 359-366.
- ¹¹⁸ K. Zagorovsky, W. C. W. Chan, *Illuminating the Deep*. Nature Materials **2013**, 12, 285-287.

- ¹¹⁹ K. Nakayama, M. Tanaka, F. Shiota, K. Kuroda, *Precision physical measurements and nanometrology*. *Metrología* **1991**, 28, 483-502.
- ¹²⁰ Página web de la *Fundación Phantoms* que centra sus actividades en la Nanociencia y la Nanotecnología. Artículo relacionado con la Nanometrología [online]. http://www.phantomsnet.net/Resources/files/Nanometrologia_alta.pdf (última consulta Julio 2013).
- ¹²¹ R. Domingos, M. A. Baalousha, Y. Nam, M. Marciareid, M. M. Reid, N. Tufenkji, J. Lead, G. G. Leppard, K. Wilkinson, *Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes*. *Environmental science and technology* **2009**, 43, 7277-7284.
- ¹²² R. G. Chaudhuri, S. Paria, *Core/shell nanoparticles: Classes, properties, synthesis mechanisms, characterization and applications*. *Chemical Reviews* **2012**, 112, 2373-2433.
- ¹²³ C. Barth, A. S. Foster, C. R. Henry, A. L. Shluger, *Recent trends in surface characterization and chemistry with high-resolution scanning force methods*. *Advanced Materials* **2011**, 23, 477-501.
- ¹²⁴ K. E. Sapsford, D. M. Tyner, B. J. Dair, J. R. Deschamps, I. L. Medintz, *Analyzing nanomaterial bioconjugates: A review of current and emerging purification and characterization techniques*. *Analytical Chemistry* **2011**, 83, 4453-4488.
- ¹²⁵ L. Calzolari, D. Gilliland, F. Rossi, *Measuring nanoparticles size distribution in food and consumer products: a review*. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2012**, 29, 1183-1193.
- ¹²⁶ C. Domingo, J. Saurina, *An overview of the analytical characterization of nanostructured drug delivery systems: Towards Green and sustainable pharmaceuticals: A review*. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 744, 8-22.
- ¹²⁷ X. Jiang, K. Huang, D. Deng, H. Xia, X. Hou, C. Zheng, *Nanomaterials in analytical atomic spectrometry*. *Trends in Analytical Chemistry* **2012**, 39, 38-59.
- ¹²⁸ M. De Wit, R. Blust, *Determination of metals in saline and biological matrices by axial ICP-AES using microconcentric nebulisation*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1997**, 12, 1239-1246.
- ¹²⁹ B. Fernandez, J. M. Costa, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Inorganic mass spectrometry as a tool for characterisation at the nanoscale*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, 396, 15-29.
- ¹³⁰ P. Krystek, A. Ulrich, C. C. Garcia, S. Manohar, R. Ritsema, *Application of plasma spectrometry for the analysis of engineered nanoparticles in suspensions and products*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2011**, 26, 1701-1721.

- ¹³¹ A. R. Montoro Bustos, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, *Mass spectrometry for the characterisation of nanoparticles*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **2013**, 405, 5637-5643.
- ¹³² B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, M. G. Bawendi, *(CdSe)ZnS core-shell Quantum Dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites*. The Journal of Physical Chemistry B **1997**, 101, 9463-9475.
- ¹³³ J. E. B. Katari, V. L. Colvin, A. P. Alivisatos, *X-Ray photoelectron spectroscopy of CdSe nanocrystals with applications to studies of the nanocrystal surface*. Journal of Physical Chemistry **1994**, 98, 4109-4117.
- ¹³⁴ B. Zhang, B. Yan, *Analytical strategies for characterizing the surface chemistry of nanoparticles*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **2010**, 396, 973-982.
- ¹³⁵ H. Liu, T. J. Webster, *Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools*. Biomaterials **2007**, 28, 354-369.
- ¹³⁶ G. Orellana, *Luminiscent optical sensors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **2004**, 379, 344-346.
- ¹³⁷ S. N. Inamdar, P. P. Ingole, S. K. Haram, *Determination of band structure parameters and the quasi-particle gap of CdSe quantum dots by cyclic voltammetry*. ChemPhysChem **2008**, 9, 2574-2579.
- ¹³⁸ P. J. Alonso Gascón, *La resonancia paramagnética electrónica. Una técnica multidisciplinar*. Discurso de ingreso leído por el académico electo en el acto de su recepción solemne. Sociedad Cooperativa de Artes Gráficas, Zaragoza (España) **2002**.
- ¹³⁹ A. A. Gunawan, K. A. Mkhoyan, A. W. Wills, M. G. Thomas, D. J. Norris, *Imaging "invisible" dopant atoms in semiconductor nanocrystals*. Nano Letters **2011**, 11, 5553-5557.
- ¹⁴⁰ M. D. Rossell, Q. M. Ramasse, S. D. Findlay, F. Rechberger, R. Erni, M. Niederberger, *Direct imaging of dopant clustering in metal-oxide nanoparticles*. ACS Nano **2012**, 6, 7077-7083.
- ¹⁴¹ K.M. Krueger, A. M. Al-Somali, J. C. Falkner, V. L. Colvin, *Characterization of nanocrystalline CdSe by size exclusion chromatography*. Analytical Chemistry **2005**, 77, 3511-3515.
- ¹⁴² L. Trapiella-Alfonso, A. R. Montoro Bustos, J. Ruiz Encinar, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *New integrated elemental and molecular strategies as a diagnostic tool for the quality of water soluble quantum dots and their bioconjugates*. Nanoscale **2011**, 3, 954-957.
- ¹⁴³ U. Pyell, *Characterization of nanoparticles by capillary electromigration separation techniques*. Electrophoresis **2010**, 31, 814-831.

- ¹⁴⁴ F. Kammer, S. Legros, E. H. Larsen, K. Loeschner, T. Hofmann, *Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation*. Trends in Analytical Chemistry **2011**, 30, 425-436.
- ¹⁴⁵ S. Dubascoux, I. Le Hecho, M. Hassellöv, F. Von Der Kammer, M. Potin Gautier, G. Lespes, *Field-flow fractionation and inductively coupled plasma mass spectrometer coupling: History, development and applications*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry **2010**, 25, 613-623.
- ¹⁴⁶ W. R. Algar, A. J. Tavares, U. J. Krull, *Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction*. Analytica Chimica Acta **2010**, 673, 1-25.
- ¹⁴⁷ F. M. Raymo, I. Yildiz, *Luminescent chemosensors based on semiconductor quantum dots*. Physical Chemistry Chemical Physics **2007**, 9, 2036-2043.
- ¹⁴⁸ D. Jimenez de Aberasturi, J.-M. Montenegro, I. Ruiz de Larramendi, T. Rojo, T. A. Klar, R. Alvarez-Puebla, L.M. Liz-Marzan, W. J. Parak, *Optical sensing of small ions with colloidal nanoparticles*. Chemistry of materials **2012**, 24, 738-745.
- ¹⁴⁹ D. E. Moore, K. Patel, *Q-CdS photoluminescence activation on Zn²⁺ and Cd²⁺ salt introduction*. Langmuir **2001**, 17, 2541-2544.
- ¹⁵⁰ J. Goicoechea, F. J. Arregui, I. R. Matias, *Chapter 6: Quantum dots for sensing*, 131-181. En *Sensors based on nanostructured materials*. F. J. Arregui; Springer Science+Business Media, New York, **2009**.
- ¹⁵¹ A. R. Clapp, I. L. Medintz, H. Mattoussi, *Föster Resonance Energy Transfer investigations using Quantum-Dot*. A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry **2006**, 7, 47-57.
- ¹⁵² Q. Ma, X. Su, *Recent advances and applications in QDs-based sensors*. Analyst **2011**, 136, 4883-4893.
- ¹⁵³ L. Spanhel, M. Haase, H. Weller, A. Henglein, *Photochemistry of colloidal semiconductors. 20. Surface modification and stability of strong luminescing CdS particles*. Journal of the American Chemical Society **1987**, 109, 5649-5655.
- ¹⁵⁴ Y. Chen, Z. Rosenzweig, *Luminescent CdS quantum dots as selective ion probes*. Analytical Chemistry **2002**, 74, 5132-5138.
- ¹⁵⁵ J.-L. Cheng, C.-Q. Zhu, *Functionalized cadmium sulfide quantum dots as fluorescence probe for silver ion determination*. Analytica Chimica Acta **2005**, 546, 147-153.
- ¹⁵⁶ Y.-S. Xia, C.-Q. Zhu, *Use of surface-modified CdTe quantum dots as fluorescent probes in sensing mercury (II)*. Talanta **2008**, 75, 215-221.

- ¹⁵⁷ M. Koneswaran, R. Narayanaswamy, *Mercaptoacetic acid capped CdS quantum dots as fluorescence single shot probe for mercury (II)*. *Sensors and Actuators B* **2009**, 139, 91-96.
- ¹⁵⁸ H. Li, Y. Zhang, X. Wang, D. Xiong, Y. Bai, *Calixarene capped quantum dots as luminescent probes for Hg²⁺ ions*. *Material Letters* **2007**, 61, 1474-1477.
- ¹⁵⁹ M. T. Fernandez-Arguelles, W. J. Jin, J. M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Surface-modified CdSe quantum dots for the sensitive and selective determination of Cu(II) in aqueous solutions by luminescent measurements*. *Analytica Chimica Acta* **2005**, 549, 20-25.
- ¹⁶⁰ M. Koneswaran, R. Narayanaswamy, *L-Cysteine-capped ZnS quantum dots based fluorescence sensor for Cu²⁺ ion*. *Sensors and Actuators B* **2009**, 139, 104-109.
- ¹⁶¹ B.-H. Zhang, L. Qi, F.-Y. Wu, *Functionalized manganese-doped zinc sulfide core/shell quantum dots as selective fluorescent chemodosimeters for silver ion*. *Microchimica Acta* **2010**, 170, 147-153.
- ¹⁶² K. M. Gattás-Asfura, R. M. Leblanc, *Peptide-coated CdS quantum dots for the optical detection of copper (II) and silver (I)*. *Chemical Communications* **2003**, 2684-2685.
- ¹⁶³ J. Chen, A. Zheng, Y. Gao, C. He, G. Wu, Y. Chen, X. Kai, C. Zhu, *Functionalized CdS quantum dots-based luminescence probe for detection of heavy and transition metal ions in aqueous solution*. *Spectrochimica Acta Part A* **2008**, 69, 1044-1052.
- ¹⁶⁴ J. R. Lakowicz, I. Gryczynski, Z. Gryczunsky, C. J. Murphy, *Luminescence spectral properties of CdS nanoparticles*. *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103, 7613-7620.
- ¹⁶⁵ W. J. Jin, M. T. Fernandez-Arguelles, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Photoactivated luminescent CdSe quantum dots as sensitive cyanide probes in aqueous solutions*. *Chemical Communications* **2005**, 883-885.
- ¹⁶⁶ L. Shang, L. Zhang, S. Dong, *Turn-on fluorescent cyanide sensor based on copper modified CdTe quantum dots*. *Analyst* **2009**, 134, 107-113.
- ¹⁶⁷ G. H. Shi, Z. B. Shang, Y. Wang, W. J. Jin, T. C. Zhang, *Fluorescence quenching of CdSe quantum dots by nitroaromatic explosives and their relative compounds*. *Spectrochimica Acta A* **2008**, 70, 247-252.
- ¹⁶⁸ M. Liu, L. Xu, W. Cheng, Y. Zheng, Z. Yan, *Surface-modified CdS quantum dots as luminescent probes for sulfadiazine determination*. *Spectrochimica Acta A* **2008**, 70, 1198-1202.
- ¹⁶⁹ J. Liang, S. Huang, D. Zeng, Z. He, X. Ji, X. Ai, H. Yang, *CdSe quantum dots as luminescent probes for spironolactone determination*. *Talanta* **2006**, 69, 126-130.

- ¹⁷⁰ H. Li, C. Han, *Sonochemical synthesis of cyclodextrin-coated quantum dots for optical detection of pollutant phenols in water*. *Chemistry of Materials* **2008**, 20, 6053-6059.
- ¹⁷¹ S. Huang, Q. Xiao, R. Li, H.-L. Guan, J. Liu, X.-R. Liu, Z.-K. He, Y. Liu, *A simple and sensitive method for L-Cysteine detection based on the fluorescence intensity increment of quantum dots*. *Analytica Chimica Acta* **2009**, 645, 73-78.
- ¹⁷² A. Y. Nazzal, L. Qu, X. Peng, M. Xiao, *Photoactivated CdSe nanocrystals as nanosensors for gases*. *Nano Letters* **2003**, 3, 819-822.
- ¹⁷³ O. V. Vassitsova, Z. Zhao, M. A. Petrukhina, M. A. Carpenter, *Surface-functionalized CdSe quantum dots for the detection of hydrocarbons*. *Sensors and Actuators B* **2007**, 123, 522-529.
- ¹⁷⁴ Q. Ma, H. Cui, X. Su, *Highly sensitive gaseous formaldehyde sensor with CdTe quantum dots multilayer films*. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, 25, 839-844.
- ¹⁷⁵ R. A. Potyrailo, A. M. Leach, *Selective gas nanosensors with multisize CdSe nanocrystal/polymer composite films and dynamic pattern recognition*. *Applied Physics Letters* **2006**, 88, 134110/1-134110/3.
- ¹⁷⁶ M. Hasani, A. M. Coto Garcia, J. M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel, *Sol-gels doped with polymer coated ZnS/CdSe quantum dots for the detection of organic vapors*. *Sensors and Actuators B* **2010**, 144, 198-202.
- ¹⁷⁷ W. R. Algar, D. E. Prasuhn, M. H. Stewart, T. Jennings, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, I. L. Medintz, *The controlled display of biomolecules on nanoparticles: a challenge suited to bioorthogonal chemistry*. *Bioconjugate Chemistry* **2011**, 22, 825-858.
- ¹⁷⁸ E. R. Goldman, I. L. Medintz, H. Mattoussi, *Luminescent quantum dots in immunoassays*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, 384, 560-563.
- ¹⁷⁹ S. Kale, A. Kale, H. Gholap, A. Rana, R. Desai, A. Banpurkar, S. Ogale, P. J. Shastri, *Quantum dot bio-conjugate: as a western blot probe for highly sensitive detection of cellular proteins*. *Journal of Nanoparticle Research* **2012**, 14, 732 (15 páginas).
- ¹⁸⁰ L. Yang, Y. Li, *Simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium using quantum dots as fluorescence labels*. *Analyst* **2006**, 131, 394-401.
- ¹⁸¹ Z. Zou, D. Du, J. Wang, J. N. Smith, C. Timchalk, Y. Li, Y. Lin, *Quantum dot-based immunochromatographic fluorescent biosensor for biomonitoring trichloropyridinol, a biomarker of exposure to Chlorpyrifos*. *Analytical Chemistry* **2010**, 82, 5125-5133.

- ¹⁸² X. Xu, X. Liu, Z. Nie, Y. Pan, M. Guo, S.Z. Yao, *Label-free fluorescent detection of protein kinase activity based on the aggregation behaviour of unmodified quantum dots*. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 52–59.
- ¹⁸³ E. R. Goldman, A. R. Clapp, G. P. Anderson, H. T. Uyeda, J. M. Mauro, I. L. Medintz, H. Mattoussi, *Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents*. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 684-688.
- ¹⁸⁴ S. Ding, J. Chen, H. Jiang, J. He, W. Shi, W. Zhao, J. Shen. *Application of quantum dot–antibody conjugates for detection of sulfamethazine residue in chicken muscle tissue*. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 6139-6142.
- ¹⁸⁵ J. M. Klostranec, Q. Xiang, G. A. Farcas, J. A. Lee, A. Rhee, E. I. Lafferty, S. D. Perrault, K. C. Kain, W. C. W. Chan. *Convergence of quantum dot barcodes with microfluidics and signal processing for multiplexed high-throughput infectious disease diagnostics*. *Nano Letters* **2007**, *7*, 2812-2818.
- ¹⁸⁶ C. Peng, Z. Li, Y. Zhua, W. Chena, Y. Yuana, L. Liua, Q. Li, D. Xua, R. Qiaob, L. Wang, S. Zhua, Z. Jin, C. Xua, *Simultaneous and sensitive determination of multiplex chemical residues based on multicolor quantum dot probes*. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24*, 3657-3662.
- ¹⁸⁷ Y. Wang, R. Hu, G. Lin, I. Roy, K.-T. Yong, *Functionalized quantum dots for biosensing and bioimaging and concerns on toxicity*. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5*, 2786-2799.
- ¹⁸⁸ S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini, *Analytical applications of aptamers*. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, *20*, 2424-2434.
- ¹⁸⁹ Y.-P. Ho, M. C. Kung, S. Yang, T.-H. Wang, *Multiplexed hybridization detection with multicolour colocalization of quantum dot nanoprobe*. *Nano Letters* **2005**, *5*, 1693-1697.
- ¹⁹⁰ J. Wang, G. Liu, A. Merkoçi, *Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets*. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 3214-3215.
- ¹⁹¹ H. Peng, L. Zhang, T. H. M. Kjällman, C. Soeller, J. Travas-Sejdic, *DNA hybridization detection with blue luminescent quantum dots and dye-labeled single-stranded DNA*. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 3048-3049.
- ¹⁹² X. Gao, L. Niu, X.-G. Su, *Detection of DNA via the fluorescence quenching of Mn-doped ZnSe dots/Doxorubicin/DNA ternary complexes system*. *Journal of Fluorescence* **2012**, *22*, 103-109.
- ¹⁹³ Y. He, X.-P. Yan, *Mn-doped ZnS quantum dots/methyl violet nanohybrids for room temperature phosphorescence sensing of DNA*. *Science China Chemistry* **2011**, *54*, 1254-1259.

- ¹⁹⁴ J. H. Kim, D. Morikisa, M. Ozkan, *Adaptation of inorganic quantum dots for stable molecular beacons*. Sensors and Actuators B: Chemical **2004**, 102, 315-319.
- ¹⁹⁵ S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini, *Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis*. Biomolecular Engineering **2007**, 24, 191-200.
- ¹⁹⁶ L. Shi, V. De Paoli, N. Rosezweig, *Synthesis and applications of quantum dots FRET-based protease sensors*. Journal of the American Chemical Society **2006**, 128, 10378-10379.
- ¹⁹⁷ X. Gao, G. Tang, Y. Li, X. Su, *A novel optical nanoprobe for trypsin detection and inhibitor screening based on Mn-doped ZnSe quantum dots*. Analytica Chimica Acta **2012**, 743, 131-136.
- ¹⁹⁸ P. Wu, T. Zhao, Y. Tian, L. Wu, X. Hou, *Protein-directed synthesis of Mn-doped ZnS quantum dots: a dual-channel biosensor for two proteins*. Chemistry: A European Journal **2013**, 19, 7473-7479.
- ¹⁹⁹ S. Mazumder, J. Sarkar, R. Dey, M. K. Mitra, S. Mukherjee, G. C. Das, *Bifunctionalised quantum dots for sensing and identification of waterborne bacterial pathogens*. Journal of Experimental Nanoscience **2010**, 5, 438-446.
- ²⁰⁰ S. Baruah, C. Ortinero, O. V. Shipin, J. Dutta, *Manganese doped zinc sulphide quantum dots for detection of Escherichia coli*. Journal of Fluorescence **2012**, 22, 403-408.
- ²⁰¹ F. Pinaud, X. Michalet, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Iyer, S. Weiss, *Advanced in fluorescence imaging with quantum dots bio-probes*. Biomaterials **2006**, 27, 1679-1687.
- ²⁰² E. Hutter, D. Maysinger, *Gold nanoparticles and quantum dots for bioimaging*. Microscopy Research and Technique **2011**, 74, 592-604.
- ²⁰³ A. M. Smith, G. Ruan, M. N. Rhyner, S. Nie, *Engineering luminescent quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging*. Annals of biomedical engineering **2006**, 34, 3-14
- ²⁰⁴ M. J. Ruedas-Rama, J. D. Walters, A. Orte, E. A. H. Hall, *Fluorescent nanoparticles for intracellular sensing: A review*. Analytica Chimica Acta **2012**, 751, 1-23.
- ²⁰⁵ Y. Xiao, S. P. Forry, X. Gao, R. D. Holbrook, W. G. Telford, A. Tona, *Dynamics and mechanism of quantum dot nanoparticle cellular uptake*. Journal of Nanobiotechnology **2010**, 8-13.
- ²⁰⁶ A. Bhirde, J. Xie, M. Swierczewska, X. Chen, *Nanoparticles for cell labeling*. Nanoscale **2011**, 3, 142-153.
- ²⁰⁷ X. Gao, H. Zhang, Y. Li, X. Su, *Mn-doped ZnSe d-dots-based α -methylacyl-CoA racemase probe for human prostate cancer cell imaging*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **2012**, 402, 1871-1877.

- ²⁰⁸ A.L. Rogach, M. Ogris, *Near-infrared-emitting semiconductor quantum dots for tumor imaging and targeting*. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* **2010**, 12, 331-339.
- ²⁰⁹ H. Mattoussi, G. Palui, H. Bin Na, *Luminescent quantum dots as platforms for probing in vitro and in vivo biological processes*. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64, 138-166.
- ²¹⁰ C. Petibois, *Imaging methods for elemental, chemical, molecular and morphological analyses of single cells*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, 397, 2051-2065.
- ²¹¹ D. R. Larson, W. R. Zipfel, R. M. Williams, S. W. Clark, M. P. Bruchez, F. W. Wise, W. W. Webb, *Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence in vivo*. *Science* **2003**, 300, 1434-1436.
- ²¹² G. P. C. Drummen, *Quantum dots – From synthesis to applications in biomedicine and life sciences*. *International Journal of Molecular Sciences* **2010**, 11, 154-163.
- ²¹³ L. Qi, X. Gao, *Emerging application of quantum dots for drug delivery and therapy*. *Expert Opinion on Drug Delivery* **2008**, 5, 263-267.
- ²¹⁴ Z. Xu, B. Li, W. Tang, T. Chen, H. Zhang, Q. Wang, *Glycopolypeptide-encapsulated Mn-doped ZnS quantum dots for drug delivery: Fabrication, characterization, an in vitro assessment*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2011**, 88, 51-57.
- ²¹⁵ S. Chapman, M. Dobrovolskaia, K. Farahani, A. Goodwin, A. Joshi, H. Lee, T. Meade, M. Pomper, K. Ptak, J. Rao, R. Singh, S. Sridhar, S. Stern, A. Wang, J. B. Weaver, G. Woloschak, L. Yang, *Nanoparticles for cancer imaging: The good, the bad, and the promise*. *Nanotoday* **2013**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2013.06.001>.
- ²¹⁶ R. N. Mitra, M. Doshi, X. Zhang, J. C. Tyus, N. Bengtsson, S. Fletcher, B. D. G. Page, J. Turkson, A. J. Gesquiere, P. T. Gunning, G. A. Walter, S. Santra, *An activatable multimodal/multifunctional nanoprobe for direct imaging of intracellular drug delivery*. *Biomaterials* **2012**, 33, 1500-1508.
- ²¹⁷ M. So, C. Xu, A. M. Loening, S. S. Gambhir, J. Rao, *Self-illuminating quantum dots conjugates for in vivo imaging*. *Nature Biotechnology* **2006**, 24, 339-343.
- ²¹⁸ A. Elsaesser, C. V. Howard, *Toxicology of nanoparticles*. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64, 129-137.
- ²¹⁹ R. Hardman, *A toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors*. *Environmental Health Perspectives* **2006**, 114, 165-172.
- ²²⁰ M. R. Winchester, R. E. Sturgeon, J. M. Costa-Fernandez, *Chemical characterization of engineered nanoparticles*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, 396, 951-952.

- ²²¹ M. Farre, J. Sanchis, D. Barcelo, *Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment*. *Trends in Analytical Chemistry* **2011**, 30, 517-527.
- ²²² S. D. Richardson, *Water analysis: emerging contaminants and current issues*. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, 4645-4677.
- ²²³ J. R. Peralta-Videa, L. Zhao, M. L. Lopez-Moreno, G. de la Rosa, J. Hong, J. L. Gardea-Torresdey, *Nanomaterials and the environment: A review from the biennium 2008-2010*. *Journal of Hazardous Materials* **2011**, 186, 1-15.
- ²²⁴ D. R. Boverhof, R. M. David, *Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, 396, 953-961.
- ²²⁵ M. Farre, K. Gajda-Schrantz, L. Kantiani, D. Barcelo, *Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 939, 81-95.
- ²²⁶ C.-P. Tso, C.-M. Zhung, Y.-S. Shih, Y.-M. Tseng, S.-C. Wu, R.-A. Doong, *Stability of metal oxide nanoparticles in aqueous solutions*. *Water Science & Technology* **2010**, 61, 127-133.
- ²²⁷ A. Lapresta-Fernandez, A. Fernandez, J. Blasco, *Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms*. *Trends in Analytical Chemistry* **2012**, 32, 40-59.
- ²²⁸ S. J. Klaine, P. J. J. Alvarez, G. E. Batley, T. F. Fernandes, R. D. Handy, D. Y. Lyon, S. Mahendra, M. J. McLaughlin, J. R. Lead, *Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2008**, 27, 1825-1851.
- ²²⁹ B. M. Simonet, M. Valcarcel, *Monitoring nanoparticles in the environment*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 393, 17-21.
- ²³⁰ B. Nowack, *The behaviour and effects of nanoparticles in the environment*. *Environmental Pollution* **2009**, 157, 1063-1064.
- ²³¹ S. J. Soenen, P. Rivera-Gil, J.-M. Montenegro, W. J. Parak, S. C. De Smedt, K. Braeckmans, *Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation*. *Nanotoday* **2011**, 5, 446-465.
- ²³² M. Tarantola, D. Schneider, E. Sunnick, H. Adam, S. Pierrat, C. Rosman, V. Breus, C. Sönnichsen, T. Basche, J. Wegener, A. Janshoff, *Nanoparticles indicated by cellular micromotility*. *ACS Nano* **2009**, 3, 213-222.
- ²³³ N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, *Cytotoxicity of nanoparticles*. *Small* **2008**, 4, 26-49.

- ²³⁴ A. Dhawan, V. Sharma, *Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **2010**, 398, 589-605
- ²³⁵ M. Horie, H. Kato, K. Fujita, S. Endoh, H. Iwahashi, *In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles*. Chemical Research in Toxicology **2012**, 25, 605-619.
- ²³⁶ B. J. Marquis, S. A. Love, K. L. Braun, C. L. Haynes, *Analytical methods to assess nanoparticle toxicity*. Analyst **2009**, 134, 425-439.
- ²³⁷ K.-T. Yong, W.-C. Law, R. Hu, L. Ye, L. Liu, M. T. Swihart, P. N. Prasad, *Nanotoxicity assessment of quantum dots: from cellular to primate studies*. Chemical Society Reviews **2013**, 42, 1236-1250.
- ²³⁸ J. L. Luque-Garcia, R. Sanchez-Diaz, I. Lopez-Heras, P. Martin, C. Camara, *Bioanalytical strategies for in-vitro and in-vivo evaluation of the toxicity induced by metallic nanoparticles*. Trends in Analytical Chemistry **2013**, 43, 254-268.
- ²³⁹ K. M. Tsoi, Q. Dai, B. A. Alman, W. C. W. Chan, *Are quantum dots toxic? Exploring the discrepancy between cell culture and animal studies*. Accounts of chemical research **2013**, 46, 662-671.
- ²⁴⁰ P. N. Prasad. *Introduction to Nanomedicine and Nanobioengineering*. Wiley: New Jersey, USA, **2012**.
- ²⁴¹ L. W. Zhang, N. A. Monteiro-Riviere, *Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake*, Toxicological Sciences **2009**, 110, 138-155.
- ²⁴² F. Zhao, Y. Zhao, Y. Liu, X. Chang, C. Chen, Y. Zhao, *Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of nanomaterials*. Small **2011**, 7, 1322-1337.
- ²⁴³ S. K. Mahto, C. Park, T. H. Yoon, S. W. Rhee, *Assessment of cytocompatibility of surface-modified CdSe/ZnSe quantum dots for BALB/3T3 fibroblast cells*. Toxicology in vitro **2010**, 24, 10-70-1077.
- ²⁴⁴ B. Diaz, C. Sanchez-Espinel, M. Arruebo, J. Faro, E. de Miguel, S. Magadan, C. Yagüe, R. Fernandez-Pacheco, M. Ricardo Ibarra, J. Santamaria, A. Gonzalez-Fernandez, *Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates*. Small **2008**, 4, 2025-2034.
- ²⁴⁵ P. Rivera-Gil, D. Jimenez de Aberasturi, V. Wulf, B. Pelaz, P. del Pino, Y. Zhao, J. M. de la Fuente, I. Ruiz de Larramendi, T. Rojo, X.-J. Liang, W. J. Parak, *The challenge to relate the physicochemical properties of colloidal nanoparticles to their cytotoxicity*. Accounts of Chemical Research **2013**, 46, 743-749.
- ²⁴⁶ E. Chang, N. Thekkek, W. W. Yu, V. L. Colvin, R. Drezek, *Evaluation of Quantum Dot cytotoxicity based on intracellular uptake*. Small **2006**, 2, 1412-1417.

B. OBJETIVOS

Según lo expuesto anteriormente en la Introducción, en los últimos años se han conseguido numerosos y fascinantes avances en el campo de la Nanociencia y la Nanotecnología ya que los nuevos nanomateriales (con excepcionales propiedades físico-químicas) ofrecen una plataforma única para el desarrollo de nuevas aplicaciones.

Además se hace cada vez más imprescindible la caracterización lo más completa posible de los mismos en términos de morfología, estructura, composición así como de su comportamiento en los diferentes entornos y condiciones donde deben ser empleados. Es decir, se precisan técnicas analíticas muy diversas para comprender realmente las excepcionales propiedades que presentan estos nanomateriales.

En particular los quantum dots (QDs) ofrecen unas propiedades físico-químicas excepcionales que los hacen especialmente útiles para el desarrollo de nuevas metodologías de bioanálisis (p. ej. metodologías de análisis luminiscente con gran potencial para desarrollar nuevos sensores ópticos). La capacidad de detección que ofrecen los QDs puede resultar muy superior a la ofrecida por los marcadores luminiscentes tradicionales (colorantes fluorescentes). Finalmente hoy es posible la síntesis y modificación de los QDs y su dopaje por adición de iones metálicos para obtener QDs con propiedades luminiscentes mejoradas (p. ej. mayores tiempos de vida media del fenómeno luminiscente).

Por otro lado, el incremento de aplicaciones basadas en QDs también ha generado una gran preocupación social respecto a su posible toxicidad. Se hace pues necesario analizar sus efectos en el medio ambiente y en los organismos vivos, vía estudios de toxicidad de los QDs que permitan minimizar o incluso evitar los riesgos derivados de su abundante empleo actual.

En este contexto, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es doble: por un lado **la síntesis y caracterización de quantum dots de ZnS dopados con manganeso (Mn) para su aplicación en el desarrollo de ventajosas metodologías luminiscentes de análisis químico**, y por otro, **la evaluación de su toxicidad mediante ensayos *in vitro***.

Este objetivo general se abordará en la Tesis a través de tres etapas u objetivos parciales:

1. Síntesis de quantum dots de Mn:ZnS (d-dots) y su caracterización por técnicas analíticas complementarias. Como hemos visto, el dopaje con átomos metálicos adecuados durante el proceso de síntesis de los quantum dots permite obtener nanopartículas cuyas propiedades luminiscentes varían en función de la naturaleza de los átomos dopantes seleccionados. En nuestro caso, se ha seleccionado el ion Mn^{2+} como dopante de quantum dots de ZnS para obtener una emisión característica en torno a 590 nm, con largos tiempos de vida media. Se

estudiará la influencia de la concentración de iones manganeso durante el proceso de síntesis, evaluándose la estructura y parámetros luminiscentes de las nanopartículas resultantes. Para la caracterización, complementaria y multiparamétrica apropiada de los d-dots obtenidos se emplearán diferentes técnicas analíticas. La combinación de toda la información analítica debería permitir la estimación del número de nanopartículas presentes en una disolución (concentración en número de NPs) y de la estequiometría ligando-nanopartícula.

2. Aplicación de los d-dots fosforescentes en el desarrollo de nuevas y ventajosas metodologías analíticas.

Evaluaremos el uso de QDs de Mn:ZnS recubiertos con L-cisteína como indicadores luminiscentes para la determinación directa de la presencia de acetona (como analito modelo) en muestras reales. Para ello, se estudiarán aquellas variables que pueden afectar el proceso emisión fosforescente de los d-dots, tratando de esclarecer el mecanismo de interacción entre el analito y los ligandos superficiales que recubren los d-dots responsables de la señal analítica (p. ej. de la modificación de la emisión luminiscente). La incorporación de los d-dots en el interior de un soporte sólido se ensayará para el desarrollo de una fase sensora activa selectiva al analito “modelo” acetona. Aprovechando la experiencia previa de nuestro Grupo de Investigación, con tal objeto se estudiará el empleo de la tecnología sol-gel para obtener un soporte sólido estable, inerte y transparente donde los d-dots se encuentren atrapados sin que sus propiedades luminiscentes sean alteradas.

3. Evaluación de los efectos tóxicos producidos por incorporación de quantum dots de Mn:ZnS en cultivos celulares.

Las favorables propiedades luminiscentes de los quantum dots explican su importancia actual para el desarrollo de nuevas aplicaciones, sobre todo en el área de la biomedicina. Por desgracia, todavía se desconocen los efectos más o menos nocivos de los quantum dots sobre células y organismos vivos, a pesar de su importancia crucial en aplicaciones biomédicas. Por ello, se consideró de interés actual intentar evaluar si los QDs de Mn:ZnS obtenidos constituyen una alternativa de baja toxicidad y biocompatible a los QDs convencionales, los cuales se conoce que presentan dichos problemas, debido a su composición (presencia de metales tóxicos). Este trabajo se realizó en colaboración con el grupo de Biotecnología y Terapia Experimental (vinculado al Departamento de Biología y Morfología Celular de la Universidad de Oviedo y al Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, IUOPA). Se emplearan cultivos celulares *in vitro* y en primer lugar se investigará la posible entrada de los d-dots en las células y su localización en el interior de las mismas. En segundo lugar, se iniciarán estudios comparativos para evaluar los efectos producidos en las células por la exposición a diferentes dosis de d-dots y tiempos de incubación.

C. EXPERIMENTAL

C.1 INSTRUMENTACIÓN DE MEDIDA EMPLEADA

- * Espectrómetro de luminiscencia Varian Cary Eclipse (Varian Ibérica) equipado con lámpara pulsante de Xenón (potencia de pico equivalente a 75 KW), monocromadores Czerny-Turner y un tubo fotomultiplicador modelo R-298 como detector. El programa de control y tratamiento de datos, Cary Eclipse, opera bajo entorno Windows.
- * Espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer Modelo LS-50B, provisto de ordenador con programa de control y tratamiento de datos bajo entorno Windows (FL-Winlab).
- * Espectrómetro UV/Vis/NIR modelo Lambda 900 Perkin Elmer, provisto de ordenador con programa de control y tratamiento de datos bajo entorno de Windows (W-Winlab).
- * Espectrómetro UV/Vis modelo Genesys 10S UV-Vis Thermo Scientific.
- * Espectrómetro UV-Vis modelo Cary 50 Bio UV-Vis (Varian, Agilent Technologies), provisto de un lector de placas automático Cary 50-MPR-Microplate reader (Varian, Agilent Technologies).
- * Espectrofotómetro para medidas en la región espectral del infrarrojo, con transformada de Fourier (FTIR), acoplado a un microscopio con sistema de formación de imágenes (Varian 620-IR y Varian 670-IR) con tres sistemas de detección: uno en el espectrómetro (un detector de conductividad térmico tipo DLaTGS “deuterated L-alanine doped triglycine sulfate”), y dos en el microscopio (Focal Plane Arra -FPA, para formación de imágenes y Mercury-cadmium teluride-MCT para medidas puntuales). El equipo posee un dispositivo de medida por reflexión total atenuada (ATR) que permite el análisis de superficies y/o de sólidos directamente sin necesidad de preparación de pastilla de KBr.
- * Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd.). Equipo empleado para realizar medidas de DLS. Proporciona información sobre tamaño hidrodinámico y potencial Z de las nanopartículas.
- * Microscopio Electrónico de Transmisión (MET JEOL-200 EXII) de kilovoltaje máximo 200 kV, poder de resolución 3,4 Å entre líneas. Sistema fotográfico: cámara de placas 6,5x9,5 y película 35 mm, e imagen digitalizada con salida a PC (sistema digital micrograph GATAN).
- * Microscopio Electrónico de Transmisión de Alta Resolución (JEOL JEM-2100F) que opera con un voltaje de 200 kV. Está equipado con un cañón de emisión de campo (FEG) y una lente objetivo de alta resolución que permite alcanzar una resolución de 2.3 Å entre puntos y 1.0 Å entre líneas. Además, está equipado con una cámara CCD de alta resolución (Gatan), un microanalizador por Energía de Rayos X Dispersados (EDX) que permite la detección y

cuantificación de los elementos presentes, una unidad de barrido por transmisión (STEM) con detectores de campo claro (BF) y campo oscuro (DF), que permite obtener mapas de composición de las muestras, un sistema de filtro de energías post columna (GIF) para la adquisición de imágenes filtradas, un espectrómetro de pérdida de energía de electrones (EELS), y sistema de precesión del haz para difracción de electrones.

- * Microscopio Electrónico de Barrido (MEB JEOL-6610LV) con cañón de electrones de filamento de wolframio, con posibilidad de trabajo de 0,5 a 30 kV y una resolución máxima de 3.0 nm. Capacidad de amplificación de imagen entre x5 hasta x50.000 aumentos. Está dotado de detectores de electrones secundarios y de electrones retrodispersados (composición, topografía y sombreado). Además, consta de un equipo de microanálisis integrado (INCA Energy 350 - Xmax 50) con detector SDD modelo Xmax 50 con resolución de energías inferior a 125 eV a 5,9 KeV y a 20.000 cps, y área activa de 50 mm². También contiene una ventana ultra fina que permite detección y análisis de elementos ultraligeros (C, N, O).
- * Microscopio de barrido de punta equipado para microscopía de fuerzas (Nanotec Electronics) que permite realizar las medidas en modo estático o dinámico, así como, al aire o en celda de líquidos. Las imágenes se analizan empleando el software WSxM 5.0 software (Nanotec Electronics).
- * Difractómetro de Rayos X Bruker D8 DISCOVER. Puede configurarse para diversas aplicaciones de difracción de polvo incluyendo la identificación y análisis de fases, estudios estructurales de materiales, microdifracción (resolución espacial), análisis de capas finas, difracción de alta resolución, reflectometría y mapeo del espacio recíproco. Dispone de un goniómetro horizontal de 250 mm equipado con un detector LunxEye PSD, ranura de divergencia de 0.6 mm, y ranuras Soller primarias y secundarias de 2.5°, y filtro de rayos Ni K α . El software que se emplea para el tratamiento de los difractogramas es el DIFFRAC.EVA (Bruker AXS, Karlsruhe, Alemania).
- * Equipo ICP-MS de doble enfoque o alta resolución modelo ELEMENT2 de Thermo Electron. Este equipo está provisto de un nebulizador tipo cross-flow, una cámara de nebulización de doble paso tipo Scott sin refrigeración y una antorcha de cuarzo tipo Fassel, con un canal central de 1 mm de diámetro interno. Los conos “*sampler*” y “*skimmer*” empleados son de níquel, con un diámetro de 1 mm y 0,7 mm, respectivamente. El equipo presenta un sistema analizador de doble enfoque: un sector magnético y uno electroestático dispuestos conforme a una geometría Nier-Johnson inversa (el enfoque magnético se realiza previo al electroestático) y permite trabajar en tres tipos de resolución: baja (>300), media (>4000) y

alta (>10000). El detector utilizado por este equipo es un multiplicador de electrones secundarios que opera de forma dual (analógico y digital).

- * Analizador elemental Vario MACRO CNHS/O (Elementar Analysensysteme GmbH, Alemania) que permite la determinación de la concentración de carbono total, nitrógeno total, hidrógeno total y azufre mediante la combustión a altas temperatura en presencia de oxígeno. La separación de los compuestos volátiles formados se realiza mediante columnas de adsorción/desorción específicas y la detección se produce en por conductividad térmica.
- * Microscopio contraste de fase (Leica DM IL LED, de Leica Microsystem) con potencia máxima 20 W y contraste de modulación para 10x, 20x, 32x y 40x.
- * Microscopio Confocal Leica TCS-SP2-AOBS que consta de una configuración multiláser (diodo láser de 405 nm, láser de Argón -458nm, 476nm, 488nm, 496nm, 514nm, láser de Helio-Neón -543 nm y láser de Helió-Neón -633 nm). El programa de adquisición de imágenes es Leica confocal software LCS (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Alemania) y el programa de procesamiento y análisis de imágenes es ConfocalUniovi ImageJ (A. Martínez Nistal, Unidad de microscopía fotónica y proceso de imágenes, Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo).
- * Citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter Inc). La integración de los datos y el análisis se realizó por medio del programa Modfit LT 3.0 de “Verity Software House” (Topsham, EE.UU.).
- * Incubador Galaxy S Series 170S CO₂ (New Brunswick Scientific).

C.2 MATERIAL Y REACTIVOS

C.2.1 Material empleado para la síntesis de quantum dots

- * 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).
- * Línea de vacío.
- * Jeringas, agujas y material de vidrio general.

C.2.2 Material empleado en los sistemas de análisis por inyección de flujo

- * Celda de cuarzo de flujo convencional para medidas de luminiscencia, Hellma Suprasil 176.052-QS de 1,5 mm de paso óptico.
- * Bomba peristáltica de cuatro canales modelo Miniplus 2 (Scharlab).
- * Tubos para bomba peristáltica Kendall Elkay, tubería de PTFE de 0,8 mm de diámetro interno y conectores suministrados por Ommifit.
- * Tubos bomba peristáltica (rojo-rojo) (Scharlab).

C.2.3 Material empleado para los cultivos celulares

- * Placas Petri 250 y 100 mm
- * Placas 96, 24 y 6 pocillos.
- * Cámara de Neubauer (Brand GMBH) para el contaje de células.
- * Contador de células (Tanaco industrial Co.)

C.2.4 Material general

- * pH metro modelo micro pH 2000 (Crison Instruments).
- * Balanza Precisa 180 A, con precisión hasta $\pm 0,01$ mg.
- * Granatario SCALTEC, con precisión hasta $\pm 0,01$ g.
- * Baño de ultrasonidos J. P. Selecta.
- * Equipo de generación de agua destilada/desionizada Milli-Q Advantage, Millipore.
- * Rotavapor Heidolph WB2000/VV2000.
- * Centrífuga Biofuge Stratus, Heraeus.
- * Estufa de laboratorio, Memmert modelo 100.
- * Celda de cuarzo de flujo convencional para medidas de luminiscencia, Hellma Suprasil 176.052-QS de 1,5 mm de paso óptico.
- * Celda de cuarzo convencional para medidas de luminiscencia, Hellma (modelo 101-QS con paso óptico de 10 mm).
- * Celda de cuarzo convencional para medidas de luminiscencia, Hellma (modelo 114F-QS con paso óptico de 10 mm).

- * Celda de cuarzo convencional para medidas de luminescencia, Hellma Suprasil (modelo ultra-micro 105.254-QS con paso óptico de 3 mm y volumen de cámara de 45 μL).
- * Micropipetas Eppendorf y Finnipipette de volúmenes variables.
- * Filtros PVDF 0,22 y 0,45 μm (Teknokroma).
- * Tamices con diversos diámetros de poro.
- * Mortero de ágata.
- * Material volumétrico de vidrio de calidad contrastada.
- * Portaobjetos de vidrio para microscopio para la medida de fluorescencia.

C.3 REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Todos los reactivos utilizados a lo largo de la presente Tesis Doctoral se recogen en la Tabla 2. Todos los reactivos empleados son de calidad analítica y han sido utilizados directamente sin llevar a cabo ningún tipo de purificación previa. Las disoluciones acuosas empleadas han sido preparadas disolviendo la cantidad adecuada de reactivo sólido y utilizando agua ultrapura desionizada (Mili-Q, cuya resistividad es 18, 2 $\text{M}\Omega \text{cm}^{-1}$).

Tabla 2. Lista de reactivos utilizado a lo largo de la presente Tesis Doctoral, agrupados según el procedimiento experimental donde se han utilizado.

REACTIVO	PUREZA	CASA COMERCIAL
Síntesis de QDs		
Hidrocloreuro de L-cisteína monohidratado	99,9 %	MERCK
Cloruro de manganeso tetrahidratado	99%	MERCK
Sulfato de zinc heptahidratado	Grado ACS	MERCK
Cloruro de zinc	Grado ACS	MERCK
Sulfuro de sodio nonahidratado	99 %	SIGMA
Argón	99,9999 %	Air Liquid

Síntesis de sol-gel		
(3-aminopropil) trietoxisilano (APTES)	≥98 %	FLUKA
Tetrametilortosilicato (TMOS)	≥98 %	FLUKA
Cloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)	98 %	FLUKA
Cultivos celulares		
Células NIH3T3 (Catálogo CRL-1658)	---	American Type Culture Collection
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	---	SIGMA
Suero bovino fetal (FBS)	---	Gib Gibco-BRL Life Technologies
Coctel antimicótico-antibiótico -(contiene penicilina, estreptomina y anfotericina B)	---	Gibco-BRL Life Technologies
Glutamina	---	Gibco-BRL Life Technologies
HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)] etanosulfónico)	≥99,5 %	SIGMA-ALDRICH
Tensoactivos		
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)	---	ALDRICH
Bromuro de trimetil(tetradecil)amonio (TDAB)	---	ALDRICH
TRITON X-100	---	ALDRICH
Dodecilsulfato sódico (SDS)	98,5 %	ALDRICH
Matriz de orina		
Urea	99,5 %	Acros Organic
Hidrocloruro de creatinina	---	SIGMA
Cloruro de sodio	---	MERCK

Sulfato de potasio	---	MERCK
Sulfato de magnesio	---	MERCK
Bishidrógeno fosfato de potasio	---	MERCK
Hidrógeno fosfato de potasio	---	MERCK
Ácido clorhídrico	37 %	MERCK
Patrones ICP		
Zn (II) 1000 mg L ⁻¹	CertiPUR	MERCK
Mn (II) 1000 mg L ⁻¹	CertiPUR	MERCK
Ga(III) 1000 mg L ⁻¹	CertiPUR	MERCK
Azufre (SO ₄ ²⁻) 1000 mg L ⁻¹	CertiPUR	MERCK
Disoluciones reguladoras		
Ácido Acético	99,8 %	SIGMA
Acetato de sodio	---	MERCK
Hidrogeno fosfato de sodio	---	MERCK
Dihidrógeno fosfato de potasio	---	MERCK
Ácido bórico	---	MERCK
Disolventes orgánicos		
2-propanol	99,8 %	MERCK
Acetona	Grado HPLC	VWR PROLABO
Acetonitrilo	99,9 %	VWR PROLABO
Etanol absoluto	99,9 %	VWR PROLABO
Metanol	Grado HPLC	SIGMA-ALDRICH
Otros reactivos		
Ácido nítrico	Suprapur	MERCK
Bromuro de potasio	99,999 %	MERCK
Cloruro de calcio dihidratado	98 %	MERCK

Cloruro de europio (III) hexahidratado	99,9 %	ALDRICH
Cloruro de potasio	99 %	PANREAC
DL-Histidina	>99 %	FLUKA
Glucosa	Grado ACS	SIGMA
Hidróxido de sodio	>97 %	SIGMA
Patrón acetona 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol:agua (9:1)	Grado analítico	SUPELCO
Patrón acetona 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en metanol:agua (9:1)	Grado analítico	SUPELCO
Peróxido de hidrógeno	Suprapur	MERCK
Sulfato de magnesio	97 %	MERCK
Sulfito de sodio	98 %	MERCK
Yoduro de potasio	99,5 %	MERCK

C.4 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

C.4.1 Síntesis de quantum dots de ZnS dopados con Mn

El procedimiento de síntesis de los QDs de Mn:ZnS ha sido optimizado en nuestro Grupo de Investigación, basándose en el procedimiento descrito por He y *col*¹. Todas las disoluciones acuosas de los precursores utilizadas se prepararon el mismo día de la síntesis. El proceso de síntesis se realiza en varias etapas tal y como se recoge esquemáticamente en la Figura 23. En primer lugar, se mezcla, en un vaso de precipitados, 50 mL de L-cisteína 0,02 M, 5 mL de ZnCl₂ 0,1 M, 0,15 mL de MnCl₂ 0,1 M y 1,35 mL de agua Milli-Q. A continuación, se incrementa el pH hasta 11 con NaOH 1 M. Seguidamente, se vierte la mezcla en un matraz de tres bocas. La mezcla se mantiene bajo agitación constante y expuesta a un flujo de argón durante 30 minutos para su desoxigenación. Tras este periodo, y bajo la misma atmósfera inerte, se inyectan rápidamente 5 mL de Na₂S 0,1 M, manteniendo durante 20 minutos adicionales la agitación y el borboteo con un flujo de argón. La inyección de Na₂S propicia la co-precipitación gradual de ZnS y MnS², que finalmente originara los quantum dots de ZnS dopados con manganeso (Mn:ZnS). A continuación, la temperatura de la disolución contenida en el matraz de reacción se eleva hasta 50°C, durante dos horas bajo atmósfera de aire y agitación continua. Durante esta etapa final se

somete a las nanopartículas a un proceso de envejecimiento, que mejora su cristalinidad, y disminuye los defectos superficiales.

Finalmente, la disolución obtenida se transfiere a un vaso de precipitados y se diluye 1:1 con etanol. Para completar el proceso de purificación, se somete la mezcla final a un proceso de centrifugación a 5000 r.p.m. durante 5 minutos para separar los QDs del exceso de reactivos presente en el sobrenadante. La fase líquida del sobrenadante se decanta para eliminar cualquier exceso de reactivos. Posteriormente, los d-dots (sólido marrón) se someten a un proceso de secado a vacío, obteniéndose finalmente los d-dots solubles en agua en forma de un polvo de color pardo.

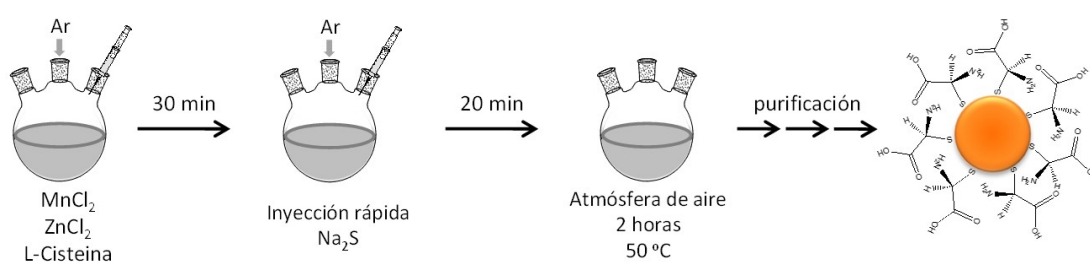


Figura 23. Esquema del proceso de síntesis de quantum dots de Mn:ZnS.

Los QDs de ZnS sin dopar se sintetizaron siguiendo el mismo procedimiento experimental, pero eliminando la etapa de adición del precursor de manganeso ($MnCl_2$).

A lo largo de esta Tesis Doctoral, se evaluó el empleo de dos precursores diferentes de Zn^{2+} , el $ZnSO_4$ y el $ZnCl_2$, seleccionándose este último para los experimentos en los que se realizaran medidas por ICP-MS con objeto de evitar la interferencia del azufre procedente del $ZnSO_4$ en la determinación del azufre contenido en los núcleos de los d-dots y en los ligandos cisteína. El empleo de $ZnCl_2$ no afecta en ningún caso la calidad de los nanocristales obtenidos.

C.4.2 Dispersiones coloidales de quantum dots

Tras el proceso de síntesis, los quantum dots obtenidos se encuentran en forma de sólido pulverulento de color pardo. Con el objeto de obtener las nanopartículas solubles en medio acuoso, estas se redispersan directamente en el medio de interés correspondiente: agua, disolución reguladora o medio celular (DMEM). Así pues, la concentración de nanopartículas en disolución se puede expresar fácilmente, en términos de masa, como masa de nanopartícula por volumen de disolución ($mg L^{-1}$).

C.4.3 Síntesis de sol-geles dopados con quantum dots

La síntesis de sol-geles dopados con QDs se basó en estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación³⁻⁵. En este caso, los silicatos precursores seleccionados fueron tetrametoxisilano (TMOS) y 3-(aminopropil)triethoxisilano (APTES).

La disolución matriz del sol-gel se sintetiza por reacción entre una mezcla de etanol, agua y la disolución de d-dots, con la mezcla de precursores (APTES/TMOS), el entrecruzador (EDC) y el catalizador (NaOH) bajo agitación constante para que se produzca la etapa de polimerización. A continuación, comienza la etapa de secado (la mezcla comienza a solidificarse inmediatamente después del proceso de mezcla) que se prolongará durante al menos dos semanas para eliminar los disolventes (ver esquema de la Figura 24).

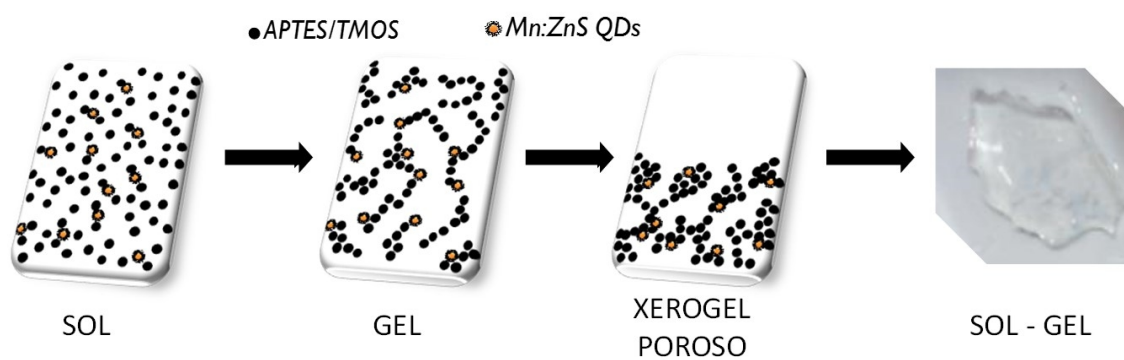


Figura 24. Esquema del proceso de preparación de un xerogel poroso dopado con d-dots.

La síntesis de los sol-geles se ha llevado a cabo mezclando, bajo agitación constante, en el siguiente orden: 2,5 mL de etanol, 1 mL de d-dots de Mn:ZnS dispersos en una disolución reguladora de PBS pH 7.4 (con objeto de alcanzar una concentración final de d-dots en la mezcla final del orden de 8 mg L^{-1}) y 2,9 mL de agua desionizada. A continuación, se añaden 750 μL APTES e inmediatamente después se añade la disolución de EDC (en una proporción QD:EDC 1:100), 750 μL de TMOS y finalmente 50 μL de hidróxido de sodio 0,1 M. Tras el proceso de homogeneización, se inicia la polimerización de la mezcla y a continuación, se inicia el proceso de secado a temperatura ambiente. El sólido final o xerogel obtenido tras dos semanas de secado a temperatura ambiente se fragmenta en un mortero de ágata, y se clasifican las distintas fracciones del sólido obtenido por tamizado entre los tamaños de interés. La fracción de partículas de tamaño seleccionadas para estudios posteriores fue 200 μm - 250 μm .

C.4.4 Cultivos celulares

Los experimentos de toxicidad *in vitro* de QDs de Mn:ZnS se realizaron empleando una línea celular de fibroblastos embrionarios murinos de ratón, NIH3T3. Las células NIH3T3 se cultivaron

en DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de glutamina, 15 mM de HEPES y un 1% de un cóctel antimicótico-antibiótico que contiene 100 unidades mL⁻¹ de penicilina, 10 µg mL⁻¹ de estreptomicina y 25 µg mL⁻¹ de anfotericina B.

Las células se cultivaron a 37 °C en un incubador de CO₂ (Heraeus) en un entorno humidificado con una atmósfera enriquecida en CO₂ hasta un 5%. El medio de cultivo fue cambiado cada dos días y se añadió medio fresco antes del inicio de todos los ensayos. Antes de cada experimento, las células fueron recogidas con tripsina (0,25% de tripsina y 0,53 mM de ácido etilendiaminotetraacético-EDTA) a temperatura ambiente durante 3 minutos. La tripsina se inactivó añadiendo 1% de FBS estéril. Las células se sembraron en las placas adecuadas 24 horas antes del inicio del experimento, favoreciendo su adhesión a la placa durante toda la noche.

Para los ensayos de citotoxicidad, se sintetizaron utilizó una disolución madre de d-dots dispersos en medio celular (DMEM) que posteriormente se diluyó directamente en el medio hasta alcanzar la concentración deseada.

C.4.5 Tratamiento y recogida de células

Las células fueron cultivadas en placas Petri de 250 mm de diámetro a una densidad de 40.000 células mL⁻¹ con 20 mL de medio de cultivo. Antes de cada tratamiento, se cambió el medio de todas las placas por medio fresco (controles) o medio conteniendo los d-dots dispersos a la concentración de interés y previamente filtrados con filtro PVDF de 0,22 µm (tratamiento con d-dots). Se sembraron tres réplicas para cada grupo experimental.

Tras el tiempo de incubación, las células se lavaron con 10 mL de disolución reguladora de PBS frío (pH fisiológico), y se recogieron mediante raspado. Posteriormente se centrifugaron las muestras dos veces durante 5 minutos a 400 xg (4°C), los sobrenadantes se recogieron para su análisis y se tomó una alícuota de 10 µL de la suspensión celular para realizar el ensayo de *Trypan Blue*. Tras una nueva centrifugación a 400 xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se recogió una alícuota de 200 µL para el estudio proteico, y otra de 120 µL para el estudio del ciclo celular. Finalmente, tras otra centrifugación a 400 xg durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µL de agua mili-Q estéril. Las muestras se congelaron a -80 °C durante 15 minutos, y posteriormente se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Esta operación se repitió dos veces para provocar la ruptura de las membranas plasmáticas y la liberación del contenido intracelular.

C.4.6 Sistemas experimentales

C.4.6.1 Medidas de luminiscencia de los quantum dots

Las medidas de fluorescencia y fosforescencia se llevaron a cabo en un espectrómetro de luminiscencia (para algunos estudios se empleó un equipo modelo Varian Cary Eclipse mientras que en otros estudios se seleccionó el equipo Perkin Elmer modelo LS-50B). Las variables instrumentales, incluyendo los anchos de las rendijas de excitación y emisión, voltaje del detector, etc., se optimizaron debidamente en cada medida, a fin de obtener la mayor sensibilidad en la detección de la luminiscencia de los QDs evaluados en cada medida.

Para realizar las medidas de fosforescencia, fue necesario optimizar además dos nuevas variables instrumentales, el tiempo de demora (t_d) y el tiempo de integración (t_g) (ver Figura 25). El primero indica el tiempo a partir del cual se integra la señal fosforescente, debe estar comprendido entre el tiempo que dura el pulso de la lámpara y el impuesto por la vida media del compuesto fosforescente. El tiempo de integración es el tiempo durante el cual se integra la señal fosforescente. Ambos parámetros, t_d y t_g , afectan a la sensibilidad y selectividad de los métodos propuestos.

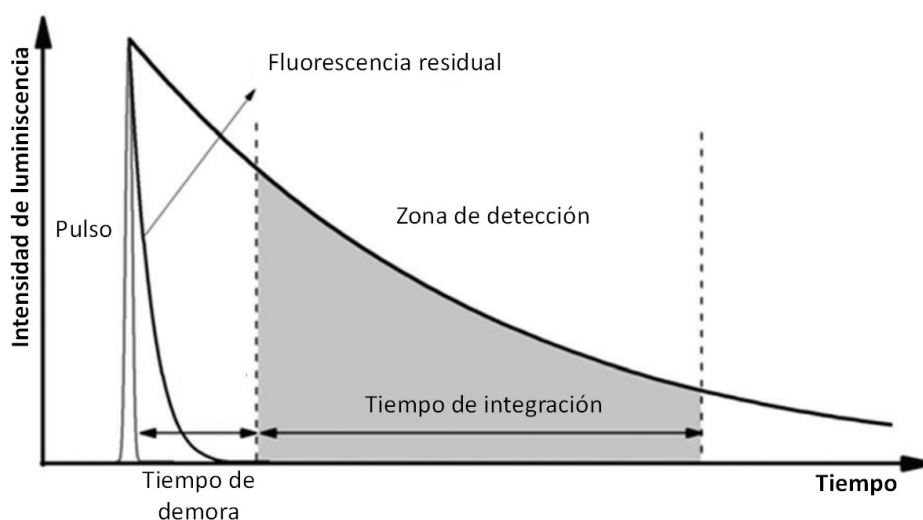


Figura 25. Definición del tiempo de demora (t_d) y de integración (t_g).

Medidas en discontinuo

Para llevar a cabo las medidas de fluorescencia y fosforescencia en discontinuo, se empleó una celda de luminiscencia convencional de cuarzo Hellma (modelo 101 –QS) con un paso óptico de 10 mm. En el caso de trabajar con volúmenes más pequeños, se utilizaron celda de luminiscencia de menor volumen, modelo 114F-QS y modelo 176.052-QS (Ver Figura 26 A, B y C).

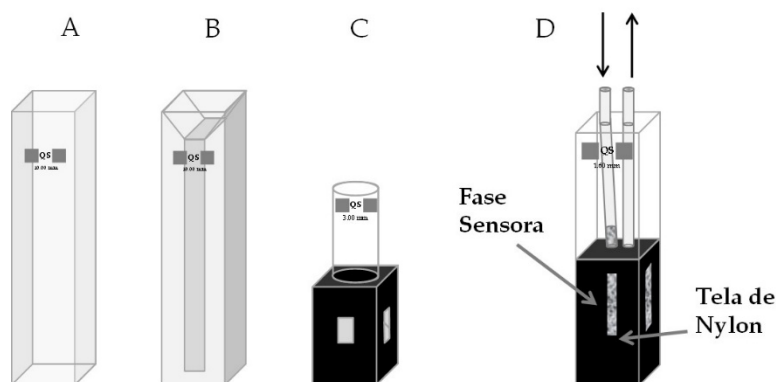


Figura 26. Esquema de las diferentes celdas de luminiscencia utilizadas: A) 101-QS; B) 114F-QS; C) 176.052-QS; D) 176.052-QS.

Medidas de análisis por inyección en flujo (FIA)

El sistema experimental empleado para la caracterización fotoluminiscente de las diferentes matrices sol-gel dopadas con QDs (así como para el desarrollo del sensor óptico basado en mecanismos de desactivación de la fosforescencia) consiste básicamente en: una bomba peristáltica de cuatro canales Miniplus 2 (Scharlab) que genera un flujo de disolución portadora (agua destilada) de 1 mL/min. Las canalizaciones empleadas en el sistema FIA son tubos de PTFE con un diámetro interno de 0,8 mm.

El soporte sólido sol-gel que contiene los d-dots inmovilizados, una vez tamizado, se empaqueta en la celda de flujo de luminiscencia Hellma modelo 176.052-QS (Mullhein, Alemania) con un paso óptico de 1,5 mm (Ver Figura 26 D). La celda se dispone en el compartimento de cubetas convencional del luminómetro en donde se monitorizan de forma continua las emisiones fotoluminiscentes del material empaquetado a temperatura ambiente (20 ± 3 °C) (Ver Figura 27). Para asegurar que las partículas de sol-gel permanecen en el interior de la celda de flujo, es preciso colocar una tela de nylon en su interior, pero asegurándonos que queda fuera del paso óptico de la celda. Este material, que actúa como una especie de filtro, permite el paso de una disolución o un gas a su través y evita al mismo tiempo que la fase sea arrastrada por el flujo.

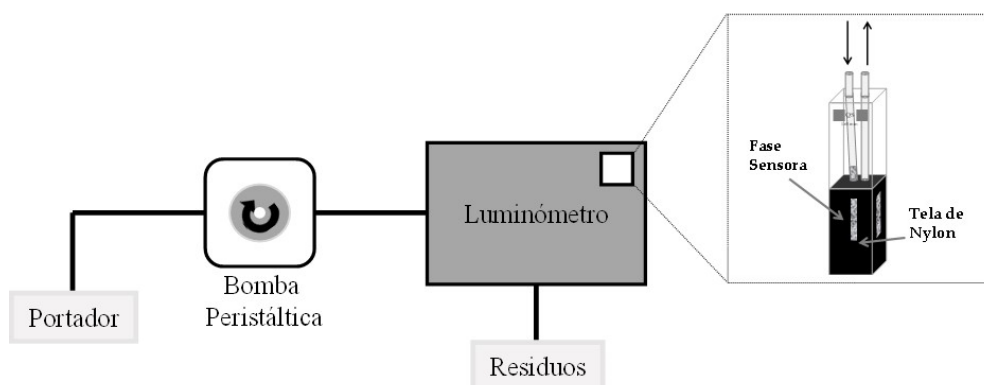


Figura 27. Esquema del sistema FIA utilizado para la caracterización de las fases sensoras sol-gel.

C.5 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Y. He, H.-F. Wang, X.-P. Yan, *Exploring Mn-doped ZnS quantum dots for the room-temperature phosphorescence detection of enoxacin in biological fluids*. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, 3832-3837.
- ² J. Zhuang, X. Zhang, G. Wang, D. Li, W. Yang, T. Li, *Synthesis of water-soluble ZnS:Mn²⁺ nanocrystals by using mercaptopropionic acid as stabilizer*. *Journal of Materials Chemistry* **2013**, 13, 1853-1857.
- ³ J. M. Costa-Fernández, M. E. Diaz-García, A. Sanz-Medel, *Sol-gel immobilized room-temperature phosphorescent metal-chelate as luminescent oxygen sensing material*. *Analytica Chimica Acta*, **1998**, 360, 17- 26
- ⁴ I. Sánchez- Barragán, J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, *Tailoring the pH response range of fluorescent-based pH sensing phases by sol-gel surfactants co-immobilization*. *Sensors and Actuators B*, **2006**, 107, 69-76
- ⁵ A. M. Coto-García, M. T. Fernandez-Argüelles, J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, *Entrapment of quantum dots in sol-gel matrices to develop sensing material based on fluorescence resonance energy transfer*. *Chemical Communications* **2009**, 5454-5456.

D. RESULTADOS Y DISCUSION

**D.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE QUANTUM DOTS DE ZnS DOPADOS
CON Mn: ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PARTÍCULAS Y DE
LA ESTEQUIOMETRIA LIGANDO-NANOPARTÍCULA.**

D.1.1 Introducción y objetivos

Tal y como ha quedado reflejado en la Introducción de la presente Memoria en los últimos años ha tenido lugar un creciente desarrollo de materiales a escala nanométrica así como su incorporación en múltiples productos y dispositivos. En este sentido, los quantum dots son un tipo de nanopartículas que han destacado debido a las excelentes propiedades optoelectrónicas que presentan como consecuencia de los efectos de confinamiento cuántico que tienen lugar al sintetizar esos materiales a escala nanométrica.

En este contexto, a lo largo de los últimos años, numerosos esfuerzos investigadores se han dedicado hacia el perfeccionamiento de los procesos de síntesis y modificación superficial de los quantum dots para obtener nanopartículas de alta calidad y con gran potencial para ser aplicadas como marcas luminiscentes en aplicaciones biomédicas. Entre las propiedades más relevantes de los QDs se encuentra la capacidad de modular su emisión luminiscente controlando su tamaño, forma y composición. Sin embargo, existe otra alternativa para conseguir sintonizar su emisión luminiscente que consiste en el dopaje de quantum dots mediante la introducción de átomos metálicos en su estructura de forma controlada. Esto permite modular sus propiedades ópticas, luminiscentes y magnéticas entre otras propiedades. Así se consiguen quantum dots que pueden combinar las propiedades optoelectrónicas de las nanopartículas sin dopar y asimismo, obtener nuevas y mejoradas características que resultan interesantes para aplicaciones bioanalíticas.

En efecto, uno de los campos de aplicación de mayor interés para los quantum dots es su empleo en aplicaciones biomédicas, tanto como marcas luminiscentes como en diagnóstico y terapia. Sin embargo, su enorme potencial va acompañado de cierta incertidumbre respecto a su integración en medios biológicos y sus posibles efectos tanto para el medio ambiente como para la salud humana. Con objeto de minimizar los riesgos asociados a su empleo y obtener mayor información de las nanopartículas sintetizadas se hace necesaria una caracterización adecuada de las NPs que permita obtener información sobre su composición real, estructura cristalina, estado superficial y estabilidad así como conocer sus propiedades para poder optimizar su uso y minimizar riesgos asociadas a su empleo en organismos vivos.

En esta línea, en la presente Tesis Doctoral se propone llevar a cabo la síntesis y el empleo de quantum dots con naturaleza de ZnS dopados con Mn, con la intención de obtener un tipo de QDs con una emisión fosforescente, que resulta especialmente apropiada en bioanálisis. En este tipo de nanopartículas dopadas es muy difícil controlar el proceso de dopaje así como conocer la posición exacta de los átomos de impureza (manganeso) en la estructura de los nanocristales,

lo cual influye significativamente en su comportamiento luminiscente. En este contexto, la combinación de diferentes técnicas analíticas permitiría obtener la información necesaria referente a los quantum dots obtenidos tras su proceso de síntesis permitiendo su optimización para así posteriormente, desarrollar las aplicaciones de interés.

Por todo lo expuesto anteriormente, el objetivo general de este capítulo consiste en la síntesis y caracterización de QDs de Mn:ZnS, mediante el empleo de técnicas analíticas complementarias buscando optimizar y seleccionar el proceso de síntesis que da lugar a nanopartículas con prestaciones superiores para el desarrollo de futuras aplicaciones analíticas.

Dicha investigación se llevó a cabo a través de las siguientes etapas sucesivas.

1. Síntesis y estudio estructural y luminiscente de la influencia de la concentración de cantidades crecientes de Mn^{2+} en quantum dots de Mn:ZnS. Selección las nanopartículas que presenten mejores propiedades luminiscentes.

2. Caracterización de la morfología y recubrimiento superficial de los QDs de Mn:ZnS mediante la combinación de diferentes técnicas complementarias (microscopía, luz dispersada, FTIR).

3. Estudio exhaustivo de las características luminiscentes de las nanopartículas obtenidas.

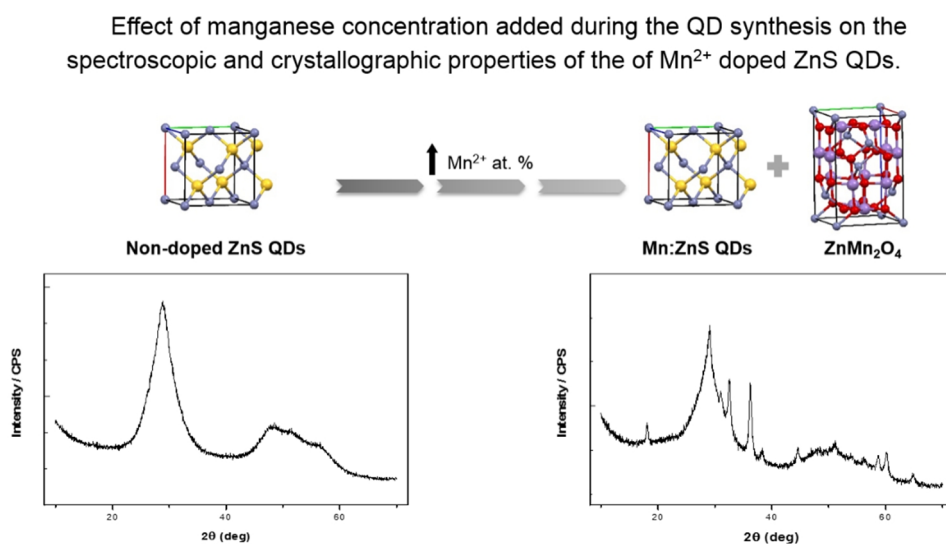
4. Evaluación de la composición elemental de los QDs mediante el empleo de técnicas cualitativas (EDS y análisis elemental) y la espectroscopia de masas con fuente de acoplamiento inductivo para la cuantificación. Estudio de diferentes pretratamientos para la muestra de nanopartículas.

5. Desarrollo de una metodología analítica para la estimación de la concentración de dots en una disolución expresada en número de nanopartículas por unidad de volumen así como para conocer la estequiometría ligando-nanopartícula aspecto de crucial interés para futuras aplicaciones cuantitativas.

Los artículos titulados: *"Influence of Mn^{2+} concentration on Mn^{2+} -doped ZnS quantum dot synthesis: evaluation of the structural and photoluminescent properties"* publicado en la revista especializada en nanomateriales *Nanoscale* (2013, 5, 9156-9161) de la Royal Society of Chemistry y *"Determination of the concentration of colloidal Mn^{2+} doped ZnS quantum dots from ICP-MS measurements"* enviado para su publicación a la revista especializada en materiales *Chemistry of Materials* de la American Chemical Society, resumen el trabajo y conclusiones de las investigaciones reseñadas más arriba para este primer Capítulo de la Tesis.

D.1.2 Artículo científico I:**Nanoscale, 2013, 5, 9156-9161**

Emma Sotelo-Gonzalez, Laura Roces, Santiago Garcia-Granda, Maria T. Fernandez-Arguelles, Jose M. Costa-Fernandez and Alfredo Sanz-Medel.



Cite this: *Nanoscale*, 2013, 5, 9156

Influence of Mn²⁺ concentration on Mn²⁺-doped ZnS quantum dot synthesis: evaluation of the structural and photoluminescent properties†

Emma Sotelo-Gonzalez, Laura Rocas, Santiago Garcia-Granda, Maria T. Fernandez-Arguelles, Jose M. Costa-Fernandez* and Alfredo Sanz-Medel*

The intentional introduction of transition metal impurities into semiconductor nanocrystals is an attractive approach for tuning quantum dot photoluminescence emission. Particularly, doping of ZnS quantum dots with Mn²⁺ (Mn:ZnS QDs) results in a phosphorescence-type emission, attributed to the incorporation of manganese ions into the nanocrystal structure, so that delayed radiational deactivation of the energy of nanoparticles, excited through the energy levels of the metal, is enabled. However, the development of effective doping strategies can be challenging, especially if a highly efficient photoluminescent emission within a known crystalline core structure, is required (e.g. for analytical phosphorescence applications). The spectroscopic properties and the crystal structure of Mn²⁺-doped ZnS QDs are studied here to provide a better understanding on how the luminescence emission and the crystalline composition are influenced by the presence of Mn²⁺ and its concentration used during the synthesis. In order to further control and optimize the synthesis of doped QDs for future bioanalytical applications, different complementary techniques including photoluminescence and X-ray powder diffraction have been employed. The information obtained has allowed standardization of the synthesis conditions of these doped QDs and the identification and quantification of the crystal phases obtained under different synthesis conditions.

Received 10th May 2013
Accepted 9th July 2013

DOI: 10.1039/c3nr02422a

www.rsc.org/nanoscale

Introduction

Semiconductor nanocrystals or quantum dots (QDs) have attracted special attention over the last decade due to their exceptional optoelectronic properties.^{1,2} Their unique features are determined by the change of the energy level structure of such materials at the nanometer size scale and are also defined by the core composition of the nanoparticle (comprising elements from the periodic groups II–VI, III–V or IV–VI) and its shape. Thus, the achieved tunability of band-edge emissions can be explained in terms of the nanoparticles' quantum confinement effects.^{1,3,4}

Bhargava and Gallagher proposed, in a pioneering work, an alternative approach to further modulate the optoelectronic and magnetic characteristics of QDs.⁵ This approach consists of the addition of metal impurities during the nanoparticle synthesis to obtain doped quantum dots (d-dots).⁶ In order to ensure an effective dopant process, the metallic impurities must be carefully chosen; particularly, their size and valence state must be in

accordance with the selected host material.^{7,8} Only a small fraction of the impurities added during the synthesis will be finally incorporated within the nanocrystal structure, but they modify the optoelectronic properties of the obtained doped quantum dots depending on the dopant selected.^{4,9}

In particular, ZnS nanoparticles are widely employed as a host material to synthesize d-dots because of its high characteristic energy band-gap (3.6 eV). Different transition metals or rare earth ions have also been evaluated as impurities.¹⁰ For instance, Mn²⁺ is one of the most extensively used dopant metal because its luminescence emission is size-independent. However, several authors have pointed out that such luminescence is affected by the structural environment of Mn²⁺ ions.^{4,11} The emission of Mn²⁺-doped QDs is centred around 590 nm and corresponds to a tetrahedral coordination of the ion.^{12,13} After d-dot excitation, an exciton (an electron–hole pair) is generated in the host levels. If some of the delocalized electrons from these excitons can reach Mn²⁺ atoms, the deactivation process occurs through the well-known d–d transition of manganese, ⁴T₁–⁶A₁. As this transition is spin forbidden, d-dots show a delayed luminescence emission that features typical phosphorescence emissions (e.g. millisecond lifetimes and wide separation between excitation and emission wavelengths).^{10,12}

So far, Mn:ZnS quantum dots have demonstrated excellent optical emission characteristics to be employed in (bio)chemical analysis. In this vein, Mn:ZnS QDs have been used for

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Avda, Julian Claveria 8, 33006, Oviedo, Spain. E-mail: jcostafe@uniovi.es; asm@uniovi.es; Tel: +34 985102970

† Electronic supplementary information (ESI) available: Rietveld refinement parameters and plot for each sample are summarized in Fig. S1–S4 and Table S1. See DOI: 10.1039/c3nr02422a

monitoring environmental pollutants based on direct sensing^{14–17} or after NP immobilization on solid supports.^{18–20} They have been also applied as probes for the detection of drugs,^{21,22} proteins²³ and important biomarkers.^{24–26} In addition to the inherent advantages of phosphorescence emission (*e.g.*: the long emission wavelength and the larger value of the excited state lifetime of the phosphorescence phenomena simplify the design of robust and inexpensive instrumentation based on decay time measurements), Mn:ZnS QDs are also suitable for use in bioimaging applications because these nanoparticles are cadmium free, and therefore, are less toxic compared to the well-known CdSe based QDs.^{27,28}

However, although considerable progress has been made in the controlled synthesis of such type of doped-QDs, further studies are needed to understand the crystallite core structure, and the effect of Mn²⁺ concentration on the optical properties of such nanocrystals. In fact, it is known that the number of dopant ions per nanocrystal particle may produce changes in the observed optical properties of the QDs.^{8,29} This type of information is needed in order to standardize such RTP synthesis processes of nanoparticles, and to characterise their crystal structure along with the elemental stoichiometry within the nanoparticle. These goals are of critical importance to improve further the present applications of such interesting metal-doped nanoparticles in bioanalysis.³⁰

In this context, here we report the effect of the concentration of manganese added during the QD synthesis over the spectroscopic and crystallographic properties of the resulting Mn²⁺-doped ZnS QDs. The synthesised ZnS QDs doped with increasing amounts of Mn²⁺ ions were further investigated to characterise their optical and structural properties using Phosphorescence Emission Spectroscopy and X-ray powder diffraction (XRD). Other important parameters such as the colour and aqueous solubility of QDs have also been evaluated as a function of the Mn²⁺ content.

Experimental

Reagents

All chemical reagents used were of analytical-reagent grade and used as received, without any further purification.

Zinc chloride dihydrate, manganese chloride tetrahydrate and L-cysteine hydrochloride monohydrate were purchased from MERK (Darmstadt, Germany). Sodium sulfide nonahydrate and sodium hydroxide were obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA).

De-ionized Milli-Q water was employed in the preparation of all solutions.

Experimental procedures

Preparation of doped and non-doped nanoparticles. Mn²⁺-doped and non-doped ZnS quantum dots were synthesized in our laboratory *via* the procedure described by He *et al.*²¹ with some slight modifications. Briefly, L-cysteine used as a capping agent and Zn²⁺ and Mn²⁺ precursors (ZnCl₂ and MnCl₂, respectively) were mixed in a beaker, and the pH was adjusted to

11 using 1 M NaOH. The reactant mixture was placed in a three-necked flask and stirred vigorously for 30 minutes under an argon atmosphere. Then, Na₂S solution was swiftly injected into the three-necked flask to allow nucleation of the nanoparticles for 20 minutes at room temperature with continuous stirring. Afterwards, the solution was aged at 50 °C under an air atmosphere for 2 h in order to improve the quality of the L-cysteine capped Mn²⁺-doped ZnS QDs. The non-doped ZnS QDs were synthesized following the same experimental procedure, but without the addition of MnCl₂. The purification process was carried out by precipitation of the nanoparticles with ethanol in a centrifuge at 5000 rpm for 5 minutes (the procedure was repeated 3 times). Finally, the QDs were dried under vacuum and stored under an inert argon atmosphere as a solid powder.

Six powder samples have been synthesized, non-doped ZnS QDs and Mn²⁺-doped ZnS QDs containing Mn²⁺ concentrations were in the range from 0 to 15% (percentage of Mn to Zn atomic ratio).

Phosphorescence measurements. Photoluminescence spectra from the synthesized nanoparticles were recorded using a Varian Cary Eclipse (Varian Iberica) luminescence spectrophotometer equipped with a xenon discharge lamp. All measurements were carried out using conventional 1 cm quartz luminescence cuvettes (Hellma, Germany).

The following general procedure was used to evaluate the phosphorescence emission of the QDs at room temperature. The aqueous samples containing colloidal QDs doped with different manganese concentrations (0, 1, 3, 5 and 10 at.% Mn²⁺) were dissolved in ultrapure water to get a final concentration of 150 mg L⁻¹. The emission spectra were recorded upon excitation at 300 nm and under RTP conditions, with a delay time of 0.1 milliseconds and a gate time of 2 ms, and excitation and emission slit widths of 10 nm. All measurements were made at a constant temperature (20 °C) and atmospheric pressure.

Phosphorescence decay curves of different Mn²⁺-doped QDs were also recorded using fixed excitation and emission wavelengths of 300 and 590 nm respectively, and a delay and gate time of 0.1 ms. Collected data were fitted to a double exponential function and two lifetime components were obtained from the data.

XRD measurements and data evaluation. X-ray powder diffraction measurements were performed using a D8 Advance diffractometer (Bruker AXS, Karlsruhe, Germany) with a goniometer radius of 250 mm equipped with a LynxEye PSD detector, a 0.6 mm divergence slit, 2.5° primary and secondary Soller slits and a Ni Kβ filter. The powder samples were placed on a flat amorphous silica sample holder. XRD patterns from 10° to 70° 2θ were recorded at room temperature using CuKα radiation (λ = 1.5418 Å) under the following measurement conditions: a tube voltage of 40 kV, tube current of 40 mA, fast PSD scan mode with a step size of 0.03° 2θ and a counting time of 1 s per step.

The XRD pattern evaluation and phase identification were performed using DIFFRAC.EVA (Bruker AXS, Karlsruhe, Germany). The quantitative analysis of the crystal phases present on each sample was performed using the Rietveld method as implemented in TOPAS 4.2 (Bruker AXS, Karlsruhe, Germany). A

fundamental parameter approach was employed for the separate calculation of the instrumental and sample inherent contributions to the X-ray diffraction peak profiles. The background was fitted to a Chebyshev function of 7 terms. In the first stage, the microstructure of the two phases was refined for each dataset using the *le Bail* full pattern decomposition method. The starting structure models for Rietveld refinement were adopted from the literature, and fixed isotropic temperature factors were introduced in all the models. A spherical harmonics model was used to deal with the correction for preferred orientation. The best quantitative phase analysis result reproducibility was obtained when 2θ ranges from 22° to 42° were included in the final stage of the refinement. The final Rietveld refinement parameters and plot for each sample are summarized in the ESI (Fig. S1–S4 and Table S1).†

ICP-MS analysis. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) measurements were carried out in order to register elemental compositions of nanoparticles. Thus, these measurements were performed on a high resolution double focusing ICP-MS Element 2 (Thermo Scientific, Bremen, Germany). The sample preparation for final ICP-MS measurements consisted of the digestion of solid samples with 1 mL of sub boiled nitric acid–hydrogen peroxide 4 : 1 v/v and dilution with ultrapure water to 50 mL. Prior to ICP-MS measurements the digested samples were further diluted with 1% v/v sub boiled nitric acid employing Ga as the internal standard.

Results and discussion

It is known that the quality of the nanoparticles depends on the synthetic route.³¹ In particular, the initial concentration of manganese ions used for the synthesis of Mn^{2+} -doped ZnS QDs might have a great influence on the surface, subsurface and core regions of the obtained nanocrystals, affecting both, the luminescence efficiency and deactivation processes.^{11,32}

Therefore, a study was conducted by synthesising different doped nanoparticles following the general procedure but increasing the amount of Mn^{2+} used in the precursor mixture. Along the manuscript, the level of the Mn^{2+} dopant used for the synthesis is always referred to the Mn:Zn ratio of the precursors (atom%). Assayed Mn^{2+} concentrations were in the range from 0 to 15% (atoms relating to Zn).

Effect of Mn^{2+} concentration on the yield of synthesis and on the physical properties of doped-QDs

Once the synthesis was carried out, it was observed that some visual physical properties, including the mass of the powder obtained and its colour, were different for each sample. For instance, the mass of d-dots obtained by varying the Mn^{2+} concentration used in the synthesis from 0 up to 15% changed noticeably (the moles of Zn and S precursors were maintained constant). Results showed that nanoparticles with higher concentrations of Mn^{2+} gave rise to a larger mass of d-dots.

Moreover, as can be seen in the images shown in Fig. 1, the colour of the solid powder obtained was greatly altered by increasing the Mn^{2+} percentage: the observed powder colour

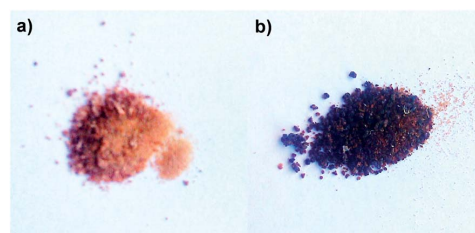


Fig. 1 Images of solid powders obtained after synthesis of Mn:ZnS QDs using Mn^{2+} doping concentrations of (a) 3% and (b) 10%.

became darker as the amount of Mn^{2+} incorporated as the dopant was higher. These phenomena might be related to changes in the composition of the samples and will be discussed later.

Such visible and prominent changes, however, evidenced that some other physical and/or optical properties might be affected by increasing the concentration of Mn^{2+} ions used in the synthesis. For instance, the water solubility of the d-dots decreased when Mn^{2+} levels used during the synthesis were higher than 5%. It was observed that the solubility of Mn:ZnS QDs synthesised using 10% of Mn^{2+} was significantly lower and, the nanoparticles obtained were almost insoluble when the Mn^{2+} level in the precursor mixture was 15% (thus, hampering any future bioanalytical application of such nanomaterials).

XRD characterization of the Mn:ZnS QDs

In order to get a deeper insight into the effect of the concentration of Mn^{2+} in the final nanostructure of the synthesized d-dots, X-ray diffraction (XRD) measurements of non-doped and Mn^{2+} -doped ZnS QDs were performed.

The XRD patterns of the studied samples (Fig. 2) exhibited broad peaks typical of nanosized materials. The diffraction peaks present for the 0 and 1% Mn:ZnS QD samples corresponded to the pattern of the cubic zinc-blende (JCPDS no. 05-0566). However, when the Mn:Zn molar ratio of the precursors is higher than 1% new diffraction peaks appear which do not correspond to that phase. Moreover, the intensity of this secondary structure or impurity increases with the concentration of Mn^{2+} . These emerging peaks can be identified as those of the mixed oxide of zinc and manganese, ZnMn_2O_4 , hetaerolite (JCPDS no 24-1133). Fig. 3 shows the diffraction patterns of the 10% Mn:ZnS QD sample. In this figure, peaks corresponding to both phases, zinc-blende and hetaerolite, can be clearly observed.

The quantitative analysis of the crystal phases present in each sample was performed using the Rietveld method as implemented in TOPAS 4.2 (Bruker AXS, Karlsruhe, Germany). The details of the analysis are given in the Experimental section and the fittings are shown in the ESI.†

The results of the quantitative phase analysis of different QDs obtained by Rietveld refinements are given in Table 1. The values reported here represent the relative amounts of crystalline phases normalized to 100%. Although in the case of

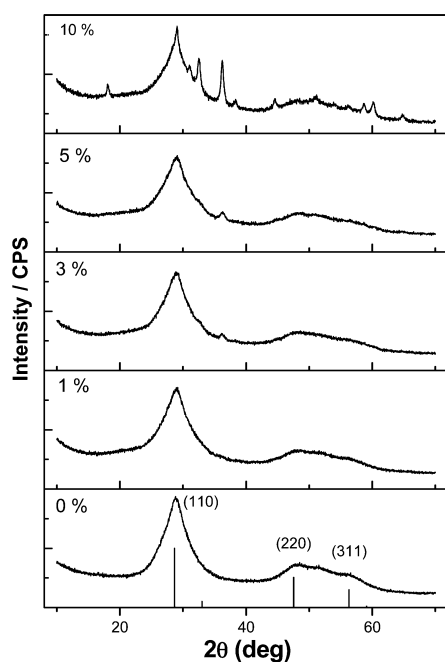


Fig. 2 XRD pattern evolution of Mn:ZnS QDs doped with different manganese concentrations (at.%). The vertical lines denote the diffraction peaks of ZnS with the cubic zinc blende structure (JCPDS no. 05-0566).

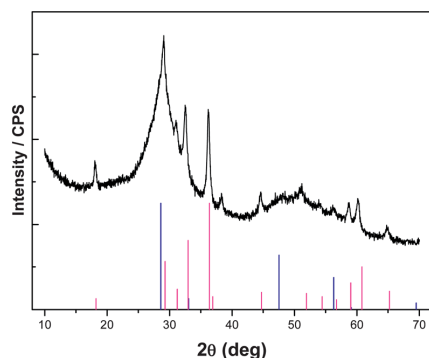


Fig. 3 XRD pattern of doped ZnS QDs (synthesised using 10 at.% Mn²⁺). The blue and pink vertical lines indicate the diffraction peak characteristics of the cubic blende and hetaerolite structure, respectively.

QDs obtained using lower concentrations of metal dopant in the synthesis, the main component of the sample is the blende, the presence of a second phase corresponding to hetaerolite is clearly distinguished as the percentage of Mn²⁺ used during nanocrystal synthesis increases (as can be seen in Table 1). In fact, when the Mn:Zn molar ratio used in the synthesis is 10%, the secondary phase of hetaerolite reaches 44% of the sample.

Table 1 Relative amounts of crystalline phases in the nanomaterials calculated from XRD data depending on the % of manganese used in the synthesis

Atom % Mn	% Blende	% Hetaerolite
0	100	—
1	98.30 ± 0.32	1.70 ± 0.32
3	91.94 ± 0.51	8.06 ± 0.51
5	85.50 ± 0.12	14.50 ± 0.12
10	55.80 ± 0.76	44.20 ± 0.40

Effect of Mn²⁺ concentration on the photoluminescence emission of the doped-QDs

On one hand, the amount of Mn²⁺ used in the synthesis might lead to completely different luminescence quantum yields, as dopant Mn ions would create intermediate energy states below the excitonic states of ZnS nanocrystals, thus changing the photophysical relaxation process.³³ Therefore, it was decided to assess the effect of the concentration of Mn²⁺ on the luminescence properties of the Mn:ZnS QDs.

For this study, aliquots of 1.5 mg of each solid (synthesized nanoparticles) were dissolved in Milli-Q water to obtain aqueous solutions with the same final nanoparticle concentration (150 µg of nanoparticles per mL). As aforementioned, the use of Mn²⁺ as the dopant ion gives rise to a phosphorescence-type emission centered around 590 nm due to a Mn²⁺ d-d transition. The luminescence emission of different solutions was then collected under room temperature phosphorescence (RTP) measurement conditions.

As shown in Fig. 4a, significant changes in the luminescence emission intensity from the samples were observed when varying Mn:Zn molar ratios were used during the synthesis. Such an experimental behaviour could evidence that the presence of the hetaerolite impurity, observed for high values of Mn²⁺ concentration in the sample, implies that the manganese incorporated in the d-dots must be lower than expected. Therefore, the RTP spectra were normalized (in intensities) according to the amount of the blende phase calculated by XRD measurements in the final nanomaterial (Mn²⁺-doped QDs).

As expected, the nanoparticles obtained without Mn²⁺ dopant ions did not show detectable phosphorescence emission. Moreover, in the doped NPs the intensity of the phosphorescence emission initially increases with the increase of the Mn²⁺ levels used in the synthesis (Fig. 4b), probably as a result of a higher incorporation of the Mn dopant ions in the QD structure. It was also observed that the RTP peak position is independent of the manganese concentration.

The low luminescence emission intensity observed for low doping concentrations (1 at.% Mn²⁺) reflects that the amount of Mn²⁺ ions incorporated in the ZnS QD nanocrystal structures was not enough to ensure an efficient energy transfer from the ZnS host to dopant ions.³⁴ Conversely, emission intensity is much higher for nanocrystals obtained from 3 or 5 at.% Mn²⁺ as compared to those synthesized using 10% Mn²⁺.

In order to find an explanation to such a change in the trend, Mn²⁺ levels incorporated in the nanomaterial were determined

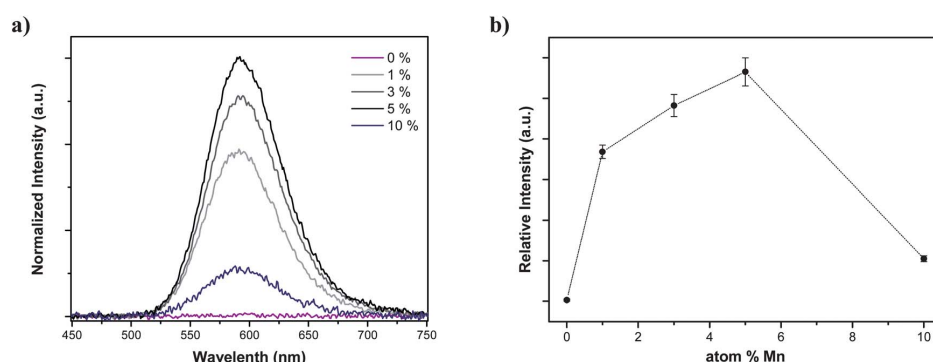


Fig. 4 Photoluminescence from Mn:ZnS QDs obtained with increased concentrations of Mn²⁺ (a) RTP emission spectra. The emission intensities have been normalized as a function of the amount of the blend phase contained in each sample. (b) Relative luminescence intensity values.

by the ICP-MS analysis of the synthesized NPs. It was found that the final amount of manganese in the solid was higher for those samples synthesized using 10% initial Mn²⁺ (16.7 at.% was found in the final solid) as compared to those synthesized using a 3% of Mn²⁺ (3.4 at.% was measured in the obtained solid). From such experimental results, it could be assumed that the Mn dopant ions are expelled from the QDs at high doping levels.^{32,35} As described before, a second nanocrystal phase is obtained (ZnMn₂O₄) for high Mn levels. Thus, although the Mn²⁺ levels were higher in the solid nanomaterial resulting from the 10 at.% Mn (as seen by ICP-MS measurements), the percentage of the Mn dopant ions in the quantum dots (*i.e.* in the ZnS nanocrystal blend phase) is reduced in such nanomaterials. This could explain, in part, the low emission intensities found for the ZnS QDs doped with 10 at.% Mn.

Moreover, such high concentration of dopants could facilitate energy transfer from manganese dopant ions to other identical ions, resulting in a decrease of the luminescence. Both effects, the expelling of manganese from the ZnS-blend phase (resulting in the second nanocrystal phase) and the Mn-Mn recombination processes, could explain that the increase in manganese concentration above a certain value leads to the observed reduction in RTP emission intensity.³⁶

On the other hand, it is well known that the luminescence lifetime is a parameter that is almost unaffected by the concentration of the luminophore and so we have also carried out lifetime measurements of the different d-dots synthesized. Obtained results are provided in Table 2.

The decay curves have been fitted using a double exponential time course, with two components, the first one within the

range of 0.3 ms and the second one around 2 ms. The deactivation curve has been also registered for non-doped QDs but their data could not be fitted because of the absence of phosphorescence emission at 590 nm.

For doped QDs, the first lifetime component has been attributed to different processes like fluorescent deactivation of the ZnS host or to surface-exposed Mn²⁺ ions.^{12,37,38} The second slowest component is related to the emission *via* dopant energy levels. The energy levels, introduced by Mn in ZnS nanoparticles, result in the d-d transition ⁴T₁₋₆A₁, which is a forbidden transition by spin selection rules and its probability is very low, thus resulting in long lifetimes as observed in the second slowest component. This process depends on the homogeneous distribution of the metal dopant within the nanocrystal structure due to the fact that the efficiency of emission in doped QDs is related to spatial confinement of the exciton in the same local environment as that of the dopants.³⁹

However, although the second lifetime component could be attributed to Mn²⁺ deactivation, it can be observed that there is no correlation between the d-dots showing higher phosphorescent lifetime (τ_2) and the doped QDs that show higher phosphorescence intensity. All d-dots have lifetime values on a similar order of magnitude, so this parameter remained unaltered independent of the nanoparticle concentration of each sample as we have mentioned before.

Conclusions

Overall, the obtained data indicate that Mn:ZnS nanoparticles, synthesized using an initial Mn:Zn molar ratio between 3% and 5%, exhibit the best luminescent properties in terms of long phosphorescent lifetime and high emission intensity, better aqueous solubility and higher crystallinity.

However, further increase of the Mn doping concentration had no positive effects on the RTP intensity of the Mn²⁺-doped ZnS nanocrystals. In fact, higher metal-dopant concentrations produce a significant quenching of the luminescence emission of the nanocrystals. Actually, Mn:ZnS QDs synthesized using 10% or higher Mn²⁺ levels present poorer solubility and dark colour of the solid material.

Table 2 Lifetimes of Mn²⁺ (1–10 at.%) doped ZnS quantum dots

Atom % Mn	τ_1 (ms)	τ_2 (ms)
1	0.23 ± 0.10	1.96 ± 0.05
3	0.31 ± 0.10	2.01 ± 0.05
5	0.29 ± 0.10	1.99 ± 0.05
10	0.39 ± 0.10	2.59 ± 0.20

XRD experiments showed that different concentrations of the metal-dopant used during the QD synthesis produce nanomaterials containing different nanostructures. One of them corresponds to the expected doped quantum dots (d-dots), the doping level depending on the concentration of dopant ions in the synthesis. The other one seems to be an impurity, with a different nanocrystal phase, generated by the excess of dopant ions during the synthesis process.

The knowledge about the effect of Mn^{2+} on the optical and crystallographic characteristics of the Mn:ZnS QDs would allow standardization of synthesis processes. Moreover, such information is critical to assess the elemental stoichiometry of the metals within the nanoparticle core, which is of key importance to improve further applications of these metal-doped nanoparticles as elemental and molecular labels in bioanalysis.

Acknowledgements

This work was supported by the project CTQ-2010-02309 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain). Emma Sotelo-Gonzalez acknowledges the predoctoral grant (BP08-063) from Consejería de Educación y Ciencia del Principado de Asturias (Spain).

References

- 1 A. M. Smith and S. Nie, *Analyst*, 2004, **129**, 672–677.
- 2 J. M. Costa-Fernandez, R. Pereiro and A. Sanz-Medel, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**, 207–218.
- 3 M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss and A. P. Alivisatos, *Science*, 1998, **281**, 2013–2016.
- 4 B. Shen, H. Zhou, Z. Chen, Z. Wang, Y. Sheng, J. Chen and B. Geng, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2012, **12**, 3931–3937.
- 5 R. N. Bhargava and D. Gallagher, *Phys. Rev. Lett.*, 1994, **72**, 416–419.
- 6 R. Thakar, Y. Chen and P. T. Snee, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 3429–3432.
- 7 S. C. Erwin, L. Zu, M. I. Haftel, A. L. Efros, T. A. Kennedy and D. J. Norris, *Nature*, 2005, **436**, 91–94.
- 8 A. Nag, S. Chakraborty and D. D. Sarma, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 10605–10611.
- 9 H. Hu and W. Zhang, *Opt. Mater.*, 2006, **28**, 536–550.
- 10 H. Yang, S. Santra and P. H. Holloway, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2005, **5**, 1364–1375.
- 11 N. Pradhan and X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 3339–3347.
- 12 R. Beaulac, P. I. Archer and D. R. Gamelin, *J. Solid State Chem.*, 2008, **181**, 1582–1589.
- 13 Y. A. Wu and J. H. Warner, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 417–424.
- 14 R. Tu, B. Liu, Z. Wang, D. Gao, F. Wang, Q. Fang and Z. Zhang, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 3458–3465.
- 15 Y.-Q. Wang and W.-S. Zou, *Talanta*, 2011, **85**, 469–475.
- 16 W.-S. Zou, D. Sheng, X. Ge, J.-Q. Qiao and H.-Z. Lian, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 30–37.
- 17 E. Sotelo-Gonzalez, M. T. Fernandez-Arguelles, J. M. Costa-Fernandez and A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **712**, 120–126.
- 18 E. Sotelo-Gonzalez, A. M. Coto-Garcia, M. T. Fernandez-Arguelles, J. M. Costa-Fernandez and A. Sanz-Medel, *Sens. Actuators, B*, 2012, **174**, 102–108.
- 19 H.-F. Wang, Y. He, T.-R. Ji and X.-P. Yan, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 1615–1621.
- 20 J. Liu, H. Chen, Z. Lin and J.-M. Lin, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 7380–7386.
- 21 Y. He, H. Wang and X. Yan, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 3832–3837.
- 22 H. Wu and Z. Fan, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2012, **90**, 131–134.
- 23 P. Wu, L.-N. Miao, H.-F. Wang, X.-G. Shao and X.-P. Yan, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 8118–8121.
- 24 H. Wang, Y. Li, Y. Wu, Y. He and X. Yan, *Chem.-Eur. J.*, 2010, **16**, 12988–12994.
- 25 H.-B. Ren and X.-P. Yan, *Talanta*, 2012, **97**, 16–22.
- 26 P. Wu, Y. He, H.-F. Wang and X.-P. Yan, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 1427–1433.
- 27 M. E. Mathew, J. C. Mohan, K. Manzoor, S. V. Nair, H. Tamura and R. Jayakumar, *Carbohydr. Polym.*, 2010, **80**, 442–448.
- 28 M. Geszke, M. Murias, L. Balan, G. Medjahdi, J. Lorzynski, M. Moritz, J. Lulek and R. Schneider, *Acta Biomater.*, 2011, **7**, 1327–1338.
- 29 O. Ehlert, W. Bücking, J. Riegler, A. Merkulov and T. Nann, *Microchim. Acta*, 2008, **160**, 351–356.
- 30 K. E. Sapsford, K. M. Tyner, B. J. Dair, J. R. Deschamps and I. L. Medintz, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 4453–4488.
- 31 A. A. Bol and A. Meijerink, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 10197–10202.
- 32 K. Zhang, Y. Yu and S. Sun, *Appl. Surf. Sci.*, 2012, **258**, 7658–7663.
- 33 D. J. Norris, A. L. Efros and S. C. Erwin, *Science*, 2008, **319**, 1776–1779.
- 34 F. Xue, J. Liang and H. Han, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2011, **83**, 348–352.
- 35 G. M. Dalpian and J. R. Chelikowsky, *Phys. Rev. Lett.*, 2006, **96**, 226802–226805.
- 36 A. Patra, E. Sominski, R. Ramesh, Yu. Koltypin, Z. Zhong, A. Gedanken, H. Minti and R. Reisfeld, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 3361–3365.
- 37 J. H. Chung, C. S. Ah and D. J. Jang, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **105**, 4128–4132.
- 38 H. Yang and P. H. Holloway, *Adv. Funct. Mater.*, 2004, **14**, 152–157.
- 39 P. I. Archer, S. A. Santangelo and D. R. Gamelin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 9808–9818.

Supporting Information for:

**INFLUENCE OF THE Mn²⁺ CONCENTRATION ON
Mn-DOPED ZnS QUANTUM DOTS SYNTHESIS:
EVALUATION OF THE STRUCTURAL AND
PHOTOLUMINESCENT PROPERTIES**

Emma Sotelo-Gonzalez, Laura Roces, Santiago Garcia-Granda, Maria T. Fernandez-Arguelles, Jose M. Costa-Fernandez^(†) and Alfredo Sanz-Medel^(*)

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo
Avda. Julian Claveria 8, E-33006, Oviedo, Spain

Supplementary figures

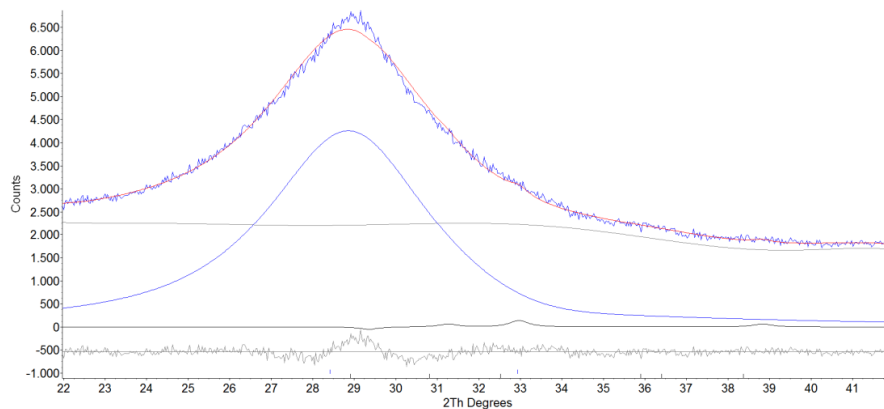


Figure S1. Rietveld refinement plot for sample synthesized using 1 % of dopant manganese.

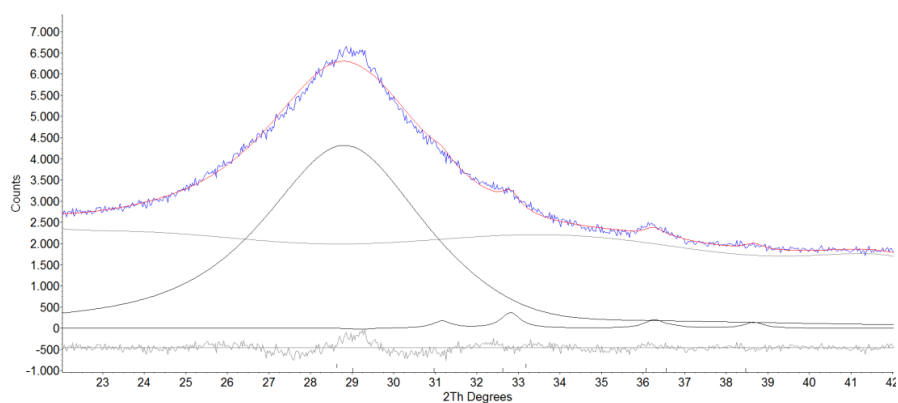


Figure S2. Rietveld refinement plot for sample synthesized using 3 % of dopant manganese.

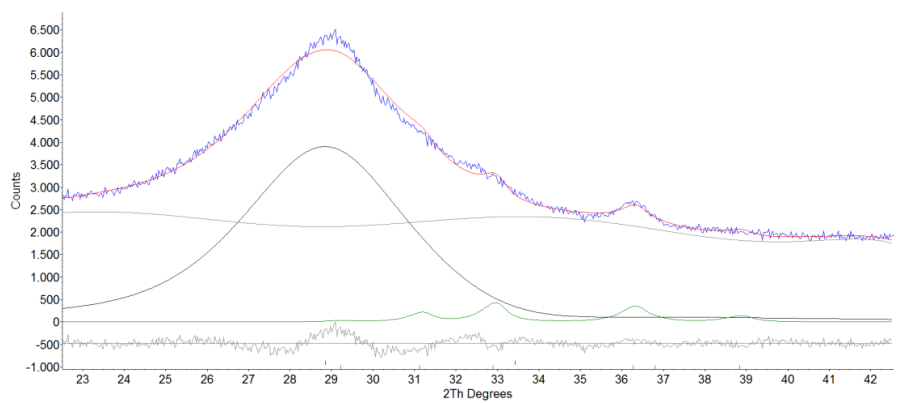


Figure S3. Rietveld refinement plot for sample synthesized using 5 % of dopant manganese.

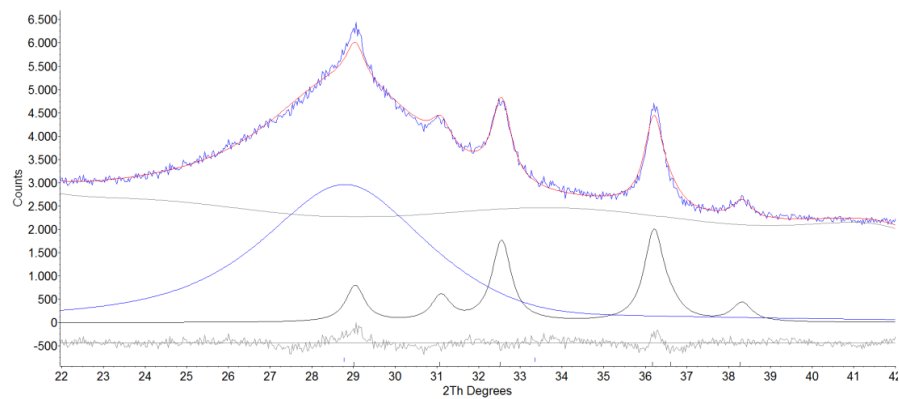


Figure S4. Rietveld refinement plot for sample synthesized using 10 % of dopant manganese.

Supplementary table

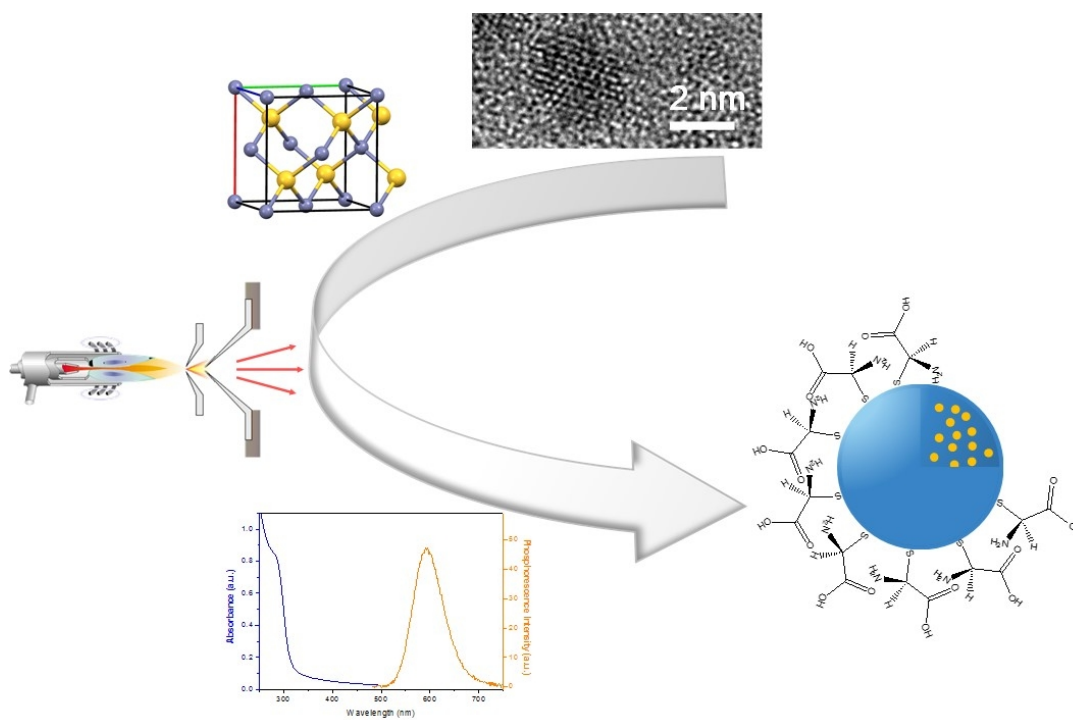
Table S1. Rietveld refinement details for samples synthesized using 0, 1, 3, 5 and 10 at. % of dopant manganese (parameters as defined in Topas, Bruker AXS, Karlsruhe, Germany).

Sample	0 % Mn	1 % Mn	3 % Mn	5 % Mn	10 % Mn
R_{exp} (%)	2.03	1.72	1.73	1.73	1.69
R_p (%)	7.83	2.03	2.12	2.42	1.90
R_{wp} (%)	10.16	2.50	2.60	2.93	2.39
GOF	5.00	1.45	1.50	1.70	1.42
R-Bragg blende	2.701	0.078	0.106	0.130	0.083
R-Bragg hetaerolite	--	1.286	0.917	0.852	0.575

D.1.3 Artículo científico II

Chemistry of Materials, *enviado para publicación*

Emma Sotelo-Gonzalez, M. Teresa Fernandez-Arguelles, Jose M. Costa Fernandez, Alfredo Sanz-Medel



Determination of the concentration of colloidal Mn²⁺ doped ZnS quantum dots from ICP-MS measurements

Emma Sotelo González, María T. Fernández-Argüelles, José M. Costa-Fernández and
Alfredo Sanz-Medel^(*)

*Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo
Avda. Julian Claveria 8, E-33006, Oviedo, Spain.*

^(*) corresponding author: Tel: +34-985103474
 Fax: +34-985103474
 Email: asm@uniovi.es

URL: <http://www.uniovi.es/analyticalspectrometry/>

† Electronic Supplementary Information (ESI) available:.

Abstract

Results from the synthesis and comprehensive (spectroscopic and morphological) characterization of quantum dots with a core of ZnS doped with manganese (Mn:ZnS QDs) and coated with a layer of cysteine, which makes the nanoparticles soluble in water media, are presented here. The quantum dots synthesized exhibit an intense and highly stable phosphorescent emission, even in aqueous media and without the need of deoxygenation of the sample. The phosphorescence-type emission detected could be attributed to the incorporation of manganese in the structure of the nanocrystal, so favoring radiational deactivation of the energy of nanoparticles excited through the energy levels of the metal, observing the corresponding transition emission ${}^4T_1 \rightarrow {}^6A_1$ of manganese.

In order to control and optimize the processes of synthesis of nanoparticles and to allow for an exhaustive characterization, essential to be able to be used in quantitative bioanalytical applications, complementary analytical techniques such as UV-VIS, photoluminescence, absorption spectrometry, electron and probe microscopy, X-Ray diffraction, high performance liquid chromatography and inductively coupled mass spectrometry (ICP-MS), that provides elemental quantitative information, have been employed.

The information obtained through the complementary techniques used allowed us to estimate the performance of the reaction of synthesis of nanoparticles, the distribution of elements within the nanocrystal structure, the number of metal atoms embedded in the structure of the quantum dot, the concentration of nanoparticles in a given sample (number of nanoparticles in a given volume) and the number of cysteine molecules coating a single quantum dot (stoichiometry ligand-nanoparticle). This information is of a high value to further use these nanocrystals as luminescent markers in quantitative bioanalytical applications.

KEYWORDS: *doped Quantum Dots; d-dots; Nanoparticle characterization; Phosphorescence, elemental analysis, concentration*

1. Introduction

Recent advances in nanotechnology allowed the synthesis of high-quality nanomaterials with exceptional properties, which could be used in a wide variety of improved applications and devices. In this context, colloidal metal semiconductor nanomaterials, known as Quantum Dots (QDs), have received great attention during the last decades because of their unique size-tunable optical advantageous properties. Due to their reduced nanocrystal dimensions, that are smaller than the exciton diameter, quantum confinement effects appear. This could explain the special photophysical properties of the QDs [1-3], including broad absorption spectra, long photoluminescence lifetimes, narrow and symmetric intense emission bands and high photostability.

Moreover, the incorporation of metal impurities into the nanoparticle host resulted to be a highly interesting approach in order to obtain metal doped quantum dots (d-dots) as an alternative to modify the optical, electrical, and magnetic properties of the nanocrystals [4,5]. In 1994, in one of the pioneer articles on such topic, Bhargava *et al* reported the properties of doped QDs with high luminescence efficiencies. At that time, these novel nanomaterials were considered as a new class of luminescent materials [6]. The most common d-dots are constituted by nanocrystalline II-VI semiconductors as host lattice, mainly ZnS, ZnSe and CdS since they offer a wide band-gap (3.6, 2.69 and 2.49 eV, respectively). Transition metals, such as Mn^{2+} , Cu^{2+} or Co^{2+} , and rare-earth ions including Tb^{3+} , Eu^{3+} and Er^{3+} , are employed as dopant impurities [7,8]. The critical parameters that must be control to ensure an effective dopant process during the synthesis are the dopant location, concentration and oxidation state.

Among other, ZnS quantum dots are emerging as a biocompatible and environmentally-friendly alternative to traditional cadmium based quantum dots. The emission of these nanocrystals is size independent but dopant dependent [7,9]. So, the addition of manganese ions to ZnS host provide dopant energy levels in the semiconductor band-gap, allowing that, after the excitation of the nanocrystals, the deactivation process occurs through dopant energy levels. The characteristic orange emission is obtained from the $Mn^{2+} \ ^4T_1-^6A_1$ transition, centered at 590 nm. Moreover, since this is a forbidden transition, long lifetimes of the order of milliseconds are typical of Mn doped QDs [10-12]. These features, typically offered by phosphorescent compounds, make that QDs can be employed as a new class of phosphorescent labels for chemical analysis and biomedical uses [13-14].

It is increasingly recognized that the information about the nanoparticles (whether free or functionalized), their properties and their quality -whatever the final use of the NPs- should be ensured for improve their intended applications. Thus, many efforts are been required for getting well-controlled synthesis process and an adequate and comprehensive characterization of their physicochemical properties [15-17]. In this sense, multi-technique analysis involving microscopy, scattering, UV-Vis, luminescence and mass spectroscopy and chromatographic separations are usually applied to the NP characterization since they give reliable information about nanoparticle composition, size and structure, surface modifications, optical and magnetic properties and stability among others. [15,17-19]. Moreover, information provided by the NPs characterization may minimize the risks associated with environmental, health and safety (EHS) aspects, an important issue nowadays [19-21].

In this paper, Mn doped ZnS quantum dots capped with L-cysteine have been synthesized and their properties have been studied. In order to establish the effect of the presence of manganese ions on the nanoparticles obtained, their optical properties have been critically studied and compared with those from non-doped nanocrystals. Moreover, the size, shape and morphological structure of d-dots have been investigated. Elemental composition of Mn:ZnS QDs have been studied using different techniques such as inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS), In addition, research has been focused in determining quantitatively the amount of L-cysteine attached to the surface of nanoparticles. Finally, the combination of the QD information leads to estimate the concentration of nanocrystals in solution, a key parameter for developing reliable quantitative applications of the quantum dots, particularly those related to bioanalysis [22].

2. Results and Discussion

2.1 Optical properties of Mn²⁺-doped ZnS quantum dots.

The UV-VIS and photoluminescence spectra of the L-cysteine capped Mn:ZnS QDs synthesised in the laboratory are shown in Figure 1. Fluorescence spectra of the corresponding non-doped and doped ZnS QDs are also shown in Fig S1 of ESI.

The UV-visible absorption spectra of an aqueous solution containing Mn²⁺-doped ZnS QDs has an absorption band with a band peak centred at 290 nm, which can be attributed to the characteristic absorption band edge on the ZnS nanoparticle core (see Fig 1.).

The photoluminescence spectra of the synthesised d-dots were collected ensuring phosphorescence conditions (with a delay time of 0.1 ms and a gate time of 2.0 ms). As shown in Fig 1 (black line), the emission band observed for Mn:ZnS QDs is centered on 590 nm and it is attributed to well-known Mn²⁺ d-d transition, ⁴T₁-⁶A₁.

The deactivation process occurs via an energy transfer to Mn²⁺ and the efficiency of this transition depends on the uniform distribution of the dopant ion within the ZnS host [12]. In addition, as this transition is spin forbidden, high quantum efficiencies and long luminescent lifetimes are achieved. In fact, decay curves of phosphorescence emission of d-dots were also collected and two lifetime components were obtained, a short one in the range of 0.3 ms and the long component with a lifetime of around 2.1 ms. This is in agreement with Chung *et al* [23] that reported Mn:ZnS quantum dots that can show several lifetimes associated to defect-related ZnS host (nanoseconds) and exterior and interior Mn²⁺ ions (lower than 1 millisecond and around 2 ms, respectively).

As expected, this phosphorescence-type emission band, observed for the Mn:ZnS QDs, did not appear for non-doped QDs confirming that energy levels of the manganese are within the band-gap of the semiconductor host. Fluorescence spectra of the corresponding non-doped ZnS QDs (see Fig. S1) showed typical blue emission band at 420 nm, nevertheless this emission has not been found for doped nanocrystals indicating that Mn²⁺ ions have been successfully incorporated within ZnS host.

Luminescence properties of the NPs could be sensitive to some physicochemical parameters of the microenvironment. Therefore an study was performed trying to evaluate the effect, on the luminescence of the Mn:ZnS of variations in several parameters that typically affect strongly the molecular phosphorescence [24]. Among others, the presence of oxygen, heavy atoms or rigid environments have been evaluated. The emission of Mn:ZnS QDs in presence of sodium sulphite as oxygen scavenger (up to 20 mM) have been registered. No changes were observed in term of phosphorescent intensity and luminescent lifetimes. The addition of salts containing high concentrations of bromine or iodine (1.2 M) as heavy atoms or the presence of surfactants (at levels above their critical micellar concentrations) in the media, might produce any enhancement of optical properties of doped quantum dots. Conversely, obtained results reveal that solutions

containing QDs aggregates were observed in presence of high concentrations of heavy atoms and surfactants.

The characteristic behaviour observed for Mn:ZnS QDs in presence of species typically affect phosphors could be explain because nanoparticles possess discrete energy levels confined to a small volume while conventional organic phosphorescent molecules have molecular energy levels which are more susceptible to be disturbed by these factors.

The pH of the aqueous solution is also a relevant feature that might affect the spectroscopic properties of doped quantum dots. For evaluating the influence of this parameter, Mn:ZnS QDs was dissolved in buffer solutions of different pHs. Results are showed in Fig. 2. Solutions in acid media (5.5 and 6.5) present a reduction on the emission intensities in comparison with alkaline media. Indeed, the phosphorescence emission of d-dots in pHs between 7.4 and 10 barely exhibit remarkable differences. The major emission intensity was observed for nanoparticles solubilized in solution buffer of pH 12. These results may be explained attending to the protonation/deprotonation processes of functional end groups in the surrounding of surface ligands (the *pKa* of carboxylic and amino group are 2.05 and 10.25, respectively). In fact, it has been observed colloidal stability of d-dots increase when nanocrystals are solubilized in alkaline buffers [25,26]. At low pH values, short-term stability (a week) was observed and nanoparticle aggregates were generated after a week probably due to the desorption of surface ligands [27].

At acidic pH media (5.5), solutions containing Mn:ZnS QDs exhibit a positive and high value *Z*-potential (+24 mV) confirming the presence of positive charges on the surface of the QDs, due to the protonation of the amine group of the L-cystein molecules used to modify the QDs surface in order to provide water-solubilization. Moreover, such high *Z*-potential value certifies the high stability of the d-dots in colloidal aqueous solutions.

It is known that the exposure of colloidal QDs to UV or visible light is an important role to get an enhancement of the photoluminescence properties of the nanocrystals. The process allows the elimination of topological surface defects thus reducing the number of surface traps sites for non-radiative recombinations [28,29]. Therefore, we considered the evaluation of the photostability of Mn:ZnS QDs. No remarkable changes on the phosphorescent signal were observed upon d-dots exposition to both sunlight and UV light (290 nm). These results indicate that the annealing performed during the synthesis process gets an improvement in the quality of the nanoparticles obtained.

2.3 Structural analysis of the Mn-doped ZnS quantum dots

The structural analysis of the nanoparticles was performed using X-ray powder diffraction (XRD) and Fourier transform infrared measurements (FTIR).

X-ray powder diffraction patterns of non-doped and doped quantum dots are shown in Fig. 3 (a). The characteristic broadening of the diffraction peaks is due to the small size of the nanocrystals obtained. The (111), (220), and (311) planes are indexed and showed the pattern of the cubic zinc-blende (JCPDS No. 05-0566). Although the level of doping did not change the lattice structure of host ZnS nanocrystals (the lattice parameter $a=0.540$ nm is the same as the value from the standard card 0.546 nm), a low percentage of diffraction peaks from an impurity were detected in the sample and it is corresponded to hetaerolite - $ZnMn_2O_4$ - (JCPDS No 24-1133). The contribution of each crystal phase was calculated using Rietveld refinements and the main component of d-dots is blende (91.94 %) while the impurity only represent an 8.06 %.

Moreover, the average size of the nanocrystals was calculated using the Rietveld method which take account the type of sample and instrumental parameters. As it can be observed, the mean crystalline size of Mn:ZnS QDs is approximately 2.3 nm. This value is in good agreement with TEM measurements because XRD is only sensitive to the crystalline core size and detects the size of defect-free domains [30].

A proper QD surface modification is critical because capping ligands provide QD physical and chemical stability and may act as a platform for further modifications in the developing of bioanalytical applications. In this study, L-Cysteine was selected as a surface ligand, because it is an amino acid biologically compatible, with acid character (providing water solubility to the nanoparticle) and could provide appropriate functional groups enabling the capability to further attach appropriate biomolecules to the nanoparticle.

Hence, in order to confirm the bond between L-Cysteine and QDs and evaluate the orientation of L-cysteine molecules, the FTIR spectra of the as prepared Mn:ZnS nanocrystals and L-cysteine ligands were recorded and are shown in Fig. 3(b). On comparison of both spectra, the characteristic stretching band of SH group (2540 cm^{-1}) was only observed in the amino acid molecule. The absence of SH band in d-dots spectra confirms the formation of bonds between functional thiol group and the surface of ZnS. Thus, the amino and carboxylic groups of L-cysteine are extended away from the QD rendering water solubility to the NP and remaining free for further modifications [8].

Indeed, other coexisting bands were found for both, L-cysteine and d-dots, although remarkably C=O stretching vibration (1750 cm^{-1}) exhibit a slightly shift to lower wavenumbers probably due to the conformation of capping ligands in the surface of nanocrystal [31,32].

Another important parameter related to capping ligands is the long-term stability after solid storage. The better storage conditions for our doped QDs as solid powder was evaluated. It noticed that keeping d-dots under argon atmosphere and in absence of light to preserve L-cysteine coating of surface oxidations that might affect their solubility properties.

2.2 Morphology of Mn:ZnS QDs

The morphology of the nanoparticles was determined in terms of average particle size and the particle shape using microscopic techniques, TEM and AFM.

Fig. 4(a) shows HR-TEM image of d-dots. It is noted that NPs have spherical in shape, and smaller diameters (in the range of 3-4 nm). The SAED pattern presented in the Fig 4(b) shows the crystallinity of the fabricated nanoparticles and it was indexed as (111), (200), (220), and (311) planes of cubic ZnS-blende which is in well agreement with the powder XRD. As a consequence of the drying step during sample preparation, some TEM images interestingly revealed low density areas where individual NPs are indistinguishable and the organic ligands (L-cysteine) are evidenced.

Atomic force microscopy (AFM) images confirmed the spherical shape of d-dots and an average size of the nanoparticle that is in agreement to data obtained from HR-TEM and XRD (see Fig S2 of ESI). So we can estimate that nanoparticle size is within the range of $3.5 \pm 0.5\text{ nm}$.

Moreover, the hydrodynamic diameter (R_h) of Mn:ZnS QDs in aqueous solution was measured by DLS and compared with sizes obtained from TEM and AFM. The average hydrodynamic diameter was 27 nm with a polydispersity index of 0.236. It should be note that the diameter obtained differ from microscopic measurements because surface ligands and weakly bound solvent molecules contribute to the hydrodynamic diameter [33].

2.4 Elemental composition of Mn:ZnS QDs

Elemental composition of the synthesised nanoparticles was qualitatively and quantitatively evaluated. For such purpose, X-ray energy-dispersive spectroscopy (EDS)

analysis of the Mn-doped ZnS QDs provide us with some qualitative chemical information about the elemental composition of the nanoparticles. As it can be observed in Figure S3 of the ESI, the spectra obtained from EDS analysis of the nanoparticles confirmed the presence of the nanoparticle core components, Mn, Zn and S. Indeed, C and O – contained in ligands molecules – were also identified by this way.

Further, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) has been employed to quantify the amount of Mn, Zn and S in powder Mn:ZnS QD samples.

Sample preparation for ICP-MS analysis must be carefully made because the sulphur in the sample might be volatilized as sulphur oxide. Hence, three different treatments for sample digestion were assessed. Acidic digestion allowed complete sample dissolution. In our case, two different protocols were assayed, with or without microwave assisted. Furthermore, an alkaline digestion assisted by microwave was also evaluated. Results from the analysis of the same sample type, but digested following the three different treatments are summarized in Table 1. High differences in the data obtained were observed for S quantification (probably due to losses of such element as volatile species during the sample digestion), however only slight differences were observed for Zn determination using the three assayed methods. Thus, sample pretreatment for measuring Zn contained in Mn:ZnS QDs by ICP-MS seems not to be critically. Nevertheless, data obtained (Table 1) showed that sample pretreatment for Mn and S analysis required microwave assisted digestion. Moreover, an alkaline medium is necessary to preserve sulphur content in nanoparticles due to avoid sulphur losses as volatile species in acid media.

The study of five samples of Mn:ZnS QDs have showed that the mass ratio Zn to nanoparticle found was highly reproducible (38.1 % with a precision of 2.5 %).

As mentioned in the introduction section, the amount of dopant ion incorporated within d-dot is an important parameter that may affect photochemical properties of doped quantum dots [30]. For this purpose, the concentration of manganese into the ZnS host (theoretical Mn/Zn ratio for QDs synthesis) was always adjusted at 3 % during the synthesis process (3 % at. Mn:ZnS QDs ratio of the precursors). However, as expected, analysis of the final obtained nanoparticles by ICP-MS resulted in a rather different Mn:Zn doping concentration. The at. % Mn^{2+} found (independent of the sample digestion process carried out) resulted higher than the initial ratio, around 4 ± 1 at. % of Mn, and demonstrates an incorporation of 98 % of manganese in the QDs.

On the other hand, elemental analysis of the nanoparticles allowed the determination of the total sulphur in the Mn:ZnS QDs sample, obtaining a value of 32% in weight of S to nanoparticle. This value represents both, sulphur from the nanoparticle host and the one from the capping L-cysteine.

Therefore, further studies were carried out to characterize the capping ligands linked to the surface of nanoparticles (a very important parameter because capping ligands allow developing new quantitative applications after bioconjugation to appropriate analyte recognition molecules). Therefore, we have assessed the amount of L-cysteine attached to QDs. For this purpose, a colorimetric assay previously reported by Liu *et al.* [16] for effective quantification of adsorbed protein onto a nanomaterial was selected. The amount of L-cysteine in colloidal solutions of Mn:ZnS QDs was determined by the rapid and highly sensitive bicinchoninic acid (BCA) protein assay, with BSA as a standard. Reproducible results can be observed in Table 2. Independently of QDs concentration in solution, a relative ratio QDs:L-Cys (expressed in micromoles) 1:3 was calculated.

2.4 Estimation of QD nanoparticle concentration

Expressing the concentration of nanoparticles in solution is one of the major problems in nanotechnology. In this sense, there are several methods to estimate the concentration of nanoparticles in solution but there is no agreement about what method must to be used and commonly depends on the NP composition [22,34]. Actually, concentration of Mn:ZnS QDs obtained as a powder have been expressed as amount of d-dots dissolve in a volume of solution.

Nevertheless, a protocol has been proposed to estimate the number of nanoparticles present in a given volume based on the data obtained after the characterization of Mn:ZnS QDs by XRD and ICP-MS analysis [35,36].

From the X-ray diffraction pattern and Rietveld data treatment, the number of Zn atoms present in a QD can be estimated. Both, the diameter of nanocrystal d and the lattice parameter a were obtained after the indexing of the crystal phase as cubic-blende. Assuming that quantum dots are spherical in shape and the Mn content in d-dots is negligible, there will be 4 Zn atoms in a unit cell. So, the number of atoms in a unit cell could be easily calculated by using Equation 1, which shows a result of 164 ± 12 Zn atoms per QDs.

$$n_{Zn}^{at}(QD) = \frac{4\pi}{6} \left(\frac{d}{a}\right)^3 \quad (1)$$

The amount of Zn in a model sample was measured by ICP-MS, and denoted as M (μg). A 91.94 % of the sample is blende which implies that 97 % of Zn in the sample comes from the quantum dot. The concentration of NP in the sample was calculated by Equation 2:

$$c_{QDs}(\mu\text{mol}) = \frac{M_{Zn}(\mu\text{g}) \times 0.97}{n_{Zn}^{at} \times M_w^{Zn}(\text{g/mol})} \quad (2)$$

If ICP-MS measurements of Zn in Mn:ZnS QDs were not performed, our experiments have demonstrated that the mass of Zn in powder QDs is corresponded to 0.37 %. Considering Y (μg) the amount of powder doped QDs, the concentration of NPs might be calculated by Equation 3:

$$c_{QDs}(\mu\text{mol}) = \frac{Y_{QD}(\mu\text{g}) \times 0.37 \times 0.97}{n_{Zn}^{at} \times M_w^{Zn}(\text{g/mol})} \quad (3)$$

So, as it is shown in Table 2, according to Equation 3, solution of 300 mg L⁻¹ is corresponded to a concentration of 8 μM .

3. Materials and Methods

3.1. Reagents and solutions

All chemical reagents used were of analytical-reagent grade and used as received, without any further purification. De-ionized ultrapure water (Milli-Q Advantage, Millipore) was employed in all the experiments.

Zinc chloride dihydrate, manganese chloride tetrahydrate, L-cysteine hydrochloride monohydrate, nitric acid and standard solutions of zinc, manganese sulphur and gallium (1000 mg L⁻¹) were obtained from MERK (Darmstadt, Germany). Sodium sulfide nonahydrate and sodium hydroxide were obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WIS, USA). BCATM Protein Assay Kit was purchased from Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA).

3.2 Synthesis of non-doped and doped ZnS quantum dots

Mn²⁺ doped and non-doped ZnS quantum dots were prepared using the chemical precipitation method reported previously by He et al. [37] with some slight modifications. The molar ratio of Mn to Zn was set at an optimum concentration of 3 %. In the typical synthesis procedure, 50 mL of 0.02 M L-cysteine (which acts as capping agent and

solvent) were mixed with 5 mL of 0.1 M ZnCl₂ and 0.15 mL of 0.1 M MnCl₂, and then, pH was adjusted to 11 using NaOH 1 M. The solution was placed in a three-necked flask and vigorously stirred for 30 minutes under argon for deoxygenation.

Then, 5 mL of 0.1 M Na₂S solution was swiftly injected into the reaction vessel and the solution was maintained for 20 minutes at room temperature and continuous stirring allowing nanoparticles growth. Afterwards, the solution was aged at 50 °C under air atmosphere for 2 h in order to improve the quality of the L-cysteine capped Mn²⁺-doped ZnS QDs. The non-doped ZnS QDs were synthesized following the same experimental procedure, but without the addition of manganese precursor.

Purification process was carried out by precipitation of the nanoparticles with ethanol in a centrifuge at 5000 rpm for 5 minutes (the procedure was repeated for 3 times). Finally, the QDs were dried under vacuum and stored under inert argon atmosphere as a brown fine powder.

It should be considered that in our experiments, ZnCl₂ was selected as Mn²⁺ precursors instead of ZnSO₄ (that was used in ref 37) in order to avoid mistakes for sulphur measurements in ICP-MS.

3.3 Optical measurements

After solubilisation process, the optical measurements of the resulting water solubilised QDs were made at room temperature and atmospheric pressure. All measurements were carried out using quartz cuvettes (Hellma, Germany).

UV-Vis absorption spectra were measured on a Genesys 10S UV-Vis Thermo Scientific spectrophotometer and photoluminescence spectra were recorded on a Varian Cary Eclipse (Varian Iberica) luminescence spectrophotometer equipped with a xenon discharge lamp. Fluorescence spectra were recorded using a fixed excitation wavelength of 290 nm with both, excitation and emission slits widths of 10 nm. Phosphorescence spectra were recorded upon excitation at 290 nm, using RTP conditions, with a delay time of 0.1 milliseconds and a gate time of 2 ms, and slit widths set at 10 nm.

Phosphorescence decay curves of Mn²⁺-doped QDs were also carried out using fixed excitation and emission wavelengths of 290 and 590 nm respectively, and both, delay and gate time of 0.1 ms. Collected data were adjusted to a double exponential time course and two lifetime components were obtained from data.

3.4 Characterization

3.4.1 Microscopy images

The high-resolution TEM (HR-TEM) images and selected area electron diffraction (SAED) patterns were collected on a JEOL JEM-2100F field emission transmission electron microscope (Tokyo, Japan) operated at an accelerating voltage of 200 kV and equipped with an ultrahigh-resolution pole piece that provided a point-resolution better than 0.19 nm.

Samples were prepared by placing several drops of diluted QDs solution in ultrapure water onto a carbon-coated copper TEM grids and then allowed to air-dry, finally, SOLARUS 950 Advanced Plasma Cleaning System was used to clean samples before loading in the microscope.

Microanalysis of the Mn:ZnS QDs was performed using scanning electron microscope JEOL-6610LV (Tokyo, Japan) with accelerating voltage at 5kV coupled with energy-dispersive X-ray analyzer (SEM-EDX). Prior to the analysis, samples were coated with a gold thin layer using a vaporization chamber SCD 004 Sputter Coater (Balzers, Bal Tec AG, Fürstentum, Lichtenstein) for 100 seconds to improve the electrical conductivity of the sample.

Atomic force microscopy measurements were performed using atomic force microscope (Nanotec Electronics, Madrid, Spain). Analysis were carried out in dynamic mode (non-contact) using PointProbe Plus tips (Nanosensors, Neuchatel, Switzerland). Samples were prepared by applying of a droplet of colloidal quantum dots (10 mg L⁻¹ of aqueous solution of nanoparticles in ultrapure water) over silicon wafers and remaining water was dried off. AFM images were analyzed using WSxM 5.0 software from Nanotec Electronics.

3.4.2 X-ray powder diffraction

X-ray powder diffraction analysis was obtained on a D8 Advance diffractometer (Bruker AXS, Karlsruhe, Germany) with a goniometer radius 250 mm equipped with a LynxEye PSD detector, a 0.6 mm divergence slit, 2.5° primary and secondary Soller slits and a Ni K α filter. The samples were prepared by depositing QDs powder on a flat amorphous silica sample holder. XRD patterns from 10 to 70° 2 θ were recorded at room temperature using CuK α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) with the following measurement conditions: tube

voltage of 40 kV, tube current 40 mA, fast PSD scan mode with a step size of $0.03^\circ 2\theta$ and a counting time of 1 s per step.

The XRD patterns evaluation and phase identification was performed using DIFFRAC.EVA (Bruker AXS, Karlsruhe, Germany). Then, data analysis were performed using the Rietveld method as implemented in TOPAS 4.2 (Bruker AXS, Karlsruhe, Germany).

3.4.4 Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

The characteristic FTIR absorption spectra of coating ligands (L-cysteine) and Mn:ZnS QDs have been obtained using a Varian 670 IR FT-IR spectromete. Typical data have been acquired within the spectral range of 4000 to 600 cm^{-1} . For our experiments, the measurements have been done using attenuate total reflectance measurements.

3.4.5 Dynamic light scattering measurements

Zeta potential and hydrodynamic diameters of d-dots were performed at room temperature using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom) equipped with a 633 nm laser filter. Zeta potential measurements were performed using folded capillary cells (DTS1060). Samples were measured ensuring an acidic medium and a solid concentration of 10 mg L^{-1} . The hydrodynamic diameter measurements were carried out of 10 mg L^{-1} QDs solutions in ultrapure water using disposable cuvettes.

3.4.6 Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) analysis

Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) measurements were carried out in order to register elemental compositions of nanoparticles. Thus, these measurements were performed on a high resolution double focusing ICP-MS Element 2 (Thermo Scientific, Bremen, Germany).

Three different sample pretreatments were evaluated for ICP-MS measurements. The acidic digestion of Mn:ZnS QDs consisted on the digestion of powder samples with 1 mL of subboiled nitric acid/hydrogen peroxide 1:3 v/v and dilution with ultrapure water to 50 mL. Prior to ICP-MS measurements the digested samples were further diluted 1:10 with 1% v/v sub boiled nitric acid. The alkaline treatment, firstly reported by Sola *et al.* [38], consisted on the digestion of powder nanoparticles with 8 mL of 25% tetramethyl ammonium hydroxide (TMAH) and dilution with ultrapure water to 20 mL. For ICP-MS analysis, samples were further diluted 1:10 with ultrapure water.

In selected cases, microwave digestion was carried out in an Ethos One microwave sample preparation system (Milestone SRL, Sorisole (BG) Italy).

The Zn, Mn and S concentration was determined using the 66, 55 and 34 isotope, respectively. The internal standard used was Ga-71. All measurements were conducted in triplicate.

On the other hand, the supernatant liquid phase was also collected containing any excess of reagents and the ethanol used in NPs precipitation. So, firstly, the ethanol was eliminated by evaporation using a rotary evaporator (Laborota 4000, Heidolph Instrument, Schwabach, Germany) and then, aqueous samples were treated with 0.05 mL of subboiled nitric acid.

3.4.7 Colorimetric assay

The amount of L-cysteine capping doped QDs was determined by measuring the amino acid concentration in d-dots colloidal solutions, using BCA protein assay [16,39]. The approach selected was the standard addition method to determine L-cysteine concentration acting as capping ligands.

The test tubes were prepared following the next protocol: over aliquots of 25 mL of QDs solution (pH 7.4), increasing amounts of L-cysteine solution (3 nM in PBS 7.4) are spiked in each test tube. Then, 2 mL of BCA working reagent is added and mix well. After incubation of test tubes for 30 minutes at 37 °C, the absorbance at 562 nm is registered. A calibration curve is calculated representing net absorbance versus L-cysteine concentration. The representation gives rise to a linear plot. Finally, it is extrapolated the regression line up to intercept on the x-axis and this value is the concentration of L-cysteine capping Mn:ZnS QDs.

4. Conclusions

It has been carried out the synthesis of photoluminescent colloidal QDs (made of a core ZnS and doped with Mn ions) with the surface coated with L-cysteine molecules to allow a solubilization in water media. Complementary analytical techniques were used for their appropriate characterization.

A study was made in order to estimate of the amount of L-cysteine incorporated in the nanoparticle, obtaining a value 1:3. This aspect is essential to establish the stoichiometry ligand / nanoparticle.

The data obtained by ICP-MS provide information on the number of existing atoms by nanoparticle, allowing to optimize the performance of the nanoparticle synthesis and to estimate the concentration of quantum dots in a sample (a critical parameter for further quantitative applications of the nanoparticles).

Acknowledgements

This work was supported by the project CTQ-2010-16636 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain). Emma Sotelo-Gonzalez acknowledges the predoctoral grant (BP08-063) from Consejería de Educación y Ciencia del Principado de Asturias (Spain). We would like to thank also all the staff from the nontechnology service and the different areas of the SCTs (University of Oviedo) for their help and fruitful discussions.

References

- [1] Smith, A. M.; Nie, S. Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots. *Analyst* **2004**, 129, 672-677.
- [2] Bruchez, M.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A.P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* **1998**, 281, 2013–2016.
- [3] Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mater.* **2005**, 4, 435-446.
- [4] Bryan, J.D., Gamelin, D.R. Doped semiconductor nanocrystals: synthesis, characterization, physical properties, and applications, *Prog.Inorg. Chem.* **2005**, 54, 47–126.
- [5] Buonsanti, R.; Milliron, D.J. Chemistry of doped colloidal nanocrystals, *Chem. Mater.* **2013**, 25, 1305-1317.
- [6]. Bhargava, R.N; Gallagher, D. Optical properties of Manganese-doped nanocrystals of ZnS. *Phys. Rev. Lett.* **1994**, 72, 416-419.
- [7] Yang, H.; Santra, S.; Holloway, P.H. Syntheses and applications of Mn-doped II-IV semiconductor nanocrystals. *J. Nanosci. Nanotech.* **2005**, 5, 1364-1375.
- [8] Pradhan, N.; Battaglia, D.M.; Liu, Y.; Peng, X. Efficient, stable, small, and water-soluble doped ZnSe nanocrystal emitters as non-cadmium biomedical labels. *Nano Lett.* **2007**, 7, 312-317.

- [9] Nag, A.; Cherian, R.; Mahadevan, P.; Gopal, A.V.; Hazarika, A.; Mohan, A.; Vengurlekar, A.S.; Sarma, D.D. Size-dependent tuning of Mn²⁺ d emission in Mn²⁺-doped CdS nanocrystals: bulk vs surface. *J. Phys. Chem. C*. **2010**, 114, 18323-18329.
- [10] Nag, A.; Chakraborty, S.; Sarma, D.D. To dope Mn²⁺ in a semiconducting nanocrystal. *J. Amer. Chem. Soc.* 2008, 130, 10605-10611.
- [11] Thakar, R.; Chen, Y.; Snee, P.T. Efficient Emission from core/(doped) shell nanoparticles: Applications for chemical sensing. *Nano Lett.* **2007**, 7, 3429-3432.
- [12] Beaulac, R.; Archer, P.I.; Gamelin, D.R. Luminescence in colloidal Mn²⁺-doped semiconductor nanocrystals. *J. Solid State Chem.* **2008**, 181, 1582-1589.
- [13] Wu, P.; Yan, X.-Y. Doped quantum dots for chemo/biosensing and bioimaging, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 5489-5521.
- [14] Li, H.; Li, M.; Shih, W.Y.; Lelkes, P.I.; Shih, W.-H.; Cytotoxicity tests of water soluble ZnS and CdS Quantum dots, *J. Nanosci. Nanotech.* **2011**, 11, 3543-3551.
- [15] Sapsford, K.E.; Tyner, K.M.; Dair, B.J.; Deschamps, J.R.; Medintz, I.L. Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current emerging purification and characterization techniques. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 4453-4488.
- [16] Liu, H.; Webster, T.J. Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials* **2007**, 28, 354-369.
- [17] Fernandez, B.; Costa, J.M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A. Inorganic mass spectrometry as a tool for characterisation at the nanoscale. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 396, 15-29.
- [18] Chaudhuri, R.G.; Paria, S. Core/Shell nanoparticles: Classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. *Chem. Rev.* **2012**, 112, 2373-2433.
- [19] Farre, M.; Sanchis, J.; Barcelo, D. Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment. *Trends in Anal. Chem.* **2011**, 30, 517-527.
- [20] Winchester, M.R.; Sturgeon, R.E.; Costa, J.M.; Chemical characterization of engineered nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 396, 951-952.
- [21] Park, H.; Grassian, V.H. Commercially manufactured engineered nanomaterials for environmental and health studies: important insights provided by independent characterization. *Environ. Toxicol. Chem.* **2010**, 29, 715-721.

- [22] Kuçur, E.; Boldt, F.M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Ziegler, J.; Nann, T. Quantitative analysis of cadmium selenide nanocrystal concentration by comparative techniques, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 8987-8993.
- [23] Chung, J.H.; Ah, C.S.; Jang, D-J. Formation and distinctive decay times of surface- and lattice-bound Mn²⁺ impurity luminescence in ZnS nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 2001 105, 4128-4132.
- [24] Sanchez-Barragan, I.; Costa-Fernandez, J.M.; Valledor, M.; Campo, J.C.; Sanz-Medel, A. Room-temperature phosphorescence (RTP) for optical sensing. *Trends in Anal. Chem.* **2006**, 25, 958-967.
- [25] Aldana, J.; Lavelle, N.; Wang, Y.; Peng, X. Size-dependent dissociation pH of thiolate ligands from cadmium chalcogenide nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2946-2504.
- [26] Hezinger, A.F.E.; Tebmar, J.; Göpferich, A. Polymer coating of quantum dots – A powerful tool toward diagnostics and sensorics, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 68, 138–152
- [27] Coto-Garcia, A.M.; Fernandez-Arguelles, M.T.; Costa-Fernandez, J.M.; Sanz-Medel, A. The influence of surface coating on the properties of water-soluble CdSe and CdSe/ZnS quantum dots. *J. Nanopart. Res.* **2013**, 15, 1330 (11 pp).
- [28] Briones Cruz, A.; Shen, Q; Toyoda, T. The effect of ultraviolet irradiation on the photothermal, photoluminescence and photoluminescence excitation spectra of Mn-doped ZnS nanoparticles. *Thin solid films* **2006**, 499, 104-109.
- [29] Valledor Llopis, M; Campo Rodriguez, J.C.; Ferrero Martin, F.J.; Coto, A.M.; Fernandez-Arguelles, M.T.; Costa-Fernandez, J.M.; Sanz-Medel, A. Dynamic analysis of the photoenhancement process of colloidal quantum dots with different surface modifications, *Nanotechnology*, **2011**, 22, 385703 (9pp).
- [30] Shen, B.; Zhou, H.; Chen, Z.; Wang, Z.; Sheng, Y.; Chen, J.; Geng, B. Synthesis and optoelectrochemical properties of ZnS:Mn nanocrystals. *J. Nanosci. Nanotech.* 2012, 12, 3931–3937.

- [31] Sotelo-Gonzalez, E.; Fernandez-Argüelles, M.T.; Costa-Fernandez, J.M.; Sanz-Medel, A. Mn-doped ZnS quantum dots for the determination of acetone by phosphorescence attenuation, *Anal. Chim. Acta* **2012**, 712, 120-126.
- [32] Chen, J.; Zheng, A.F.; Gao, Y.; He, C.; Wu, G.; Chen, Y.; Kai, X.; Zhu, C.; Funtionalized CdS quantum dots-based luminescence probe for detection of heavy and transition metal ions in aqueous solution, *Spectrochim. Acta A* **2008**, 69, 1044-1052.
- [33] Bücking, W.; Massadeh, S.; Merkulov, A.; Xu, S.; Nann, T.; Electrophoretic properties of BSA-coated quantum dots. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 396, 1087-1094.
- [34] Sewell, S.L.; Giggins, M.M.; Bell, C.S.; Giorgio, T.D. Quantification of quantum dot concentration using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). *J. Biomed. Nanotech.* **2011**, 7, 685-690.
- [35] Zhu, Z-J.; Yeg, Y-C; Tang, R.; Yan, B.; Tamayo, J.; Vachet, R.W.; Rotello, V.M. Stability of quantum dots in live cells. *Nature Chemistry*, **2011**, 3, 963-968.
- [36] Hoa, T.T.Q.; Binh, L-T.T.; Vu, L.V., Long, N.N., Hanh, V.T.H., Chinh, V.D.; Nga, P.T. Luminescent ZnS:Mn/thioglycerol and ZnS:Mn/ZnS core/shell nanocrystals: Synthesis and characterization. *Opt. Materials* **2012**, 35, 136-140.
- [37] He, Y.; Wang H.-F.; Yan, X.-P. Exploring Mn-doped ZnS Quantum Dots for the room-temperature phosphorescence detection of enoxacin in biological fluids. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 3832–3837.
- [38] Solà Vázquez, A.; Costa-Fernandez, J.M.; Ruiz Encinar, J.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A. Bromine determination in polymers by inductively coupled plasma-mass spectrometry and its potential for fast first screening of brominated flame retardants in polymers and paintings. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 623, 140-145.
- [39] Dyal, A.; Loos, K.; Noto, M.; Chang, S.W., Spagnoli, C.; Shafi, K.V.P.M.; Ulman, A.; Cowman, M.; Gross, R.A. Activity of candida rugosa lipase immobilized on γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1684-1685.

LEGENDS OF THE FIGURES

Figure 1. Absorption (grey line) and phosphorescent emission (black line) spectra of colloidal L-cysteine capped Mn-doped ZnS QDs.

Figure 2. Effect of pH on the phosphorescent intensity emission of the colloidal Mn:ZnS QDs.

Figure 3. (a) X- ray diffraction patterns for nanoparticles of non-doped (light grey) and Mn²⁺-doped ZnS QDs (dark grey). The vertical lines indicate the diffraction peaks of ZnS with the cubic zinc blende structure (JCPDS No. 05-0566). (b) FT-IR spectra of Mn:ZnS QDs (dark grey line) and L-cysteine (light grey line).

Figure 4. (a) HR-TEM image of Mn²⁺-doped ZnS QDs. (b) SAED pattern of d-dots shows the cubic structure of the nanocrystals.

Figure 1

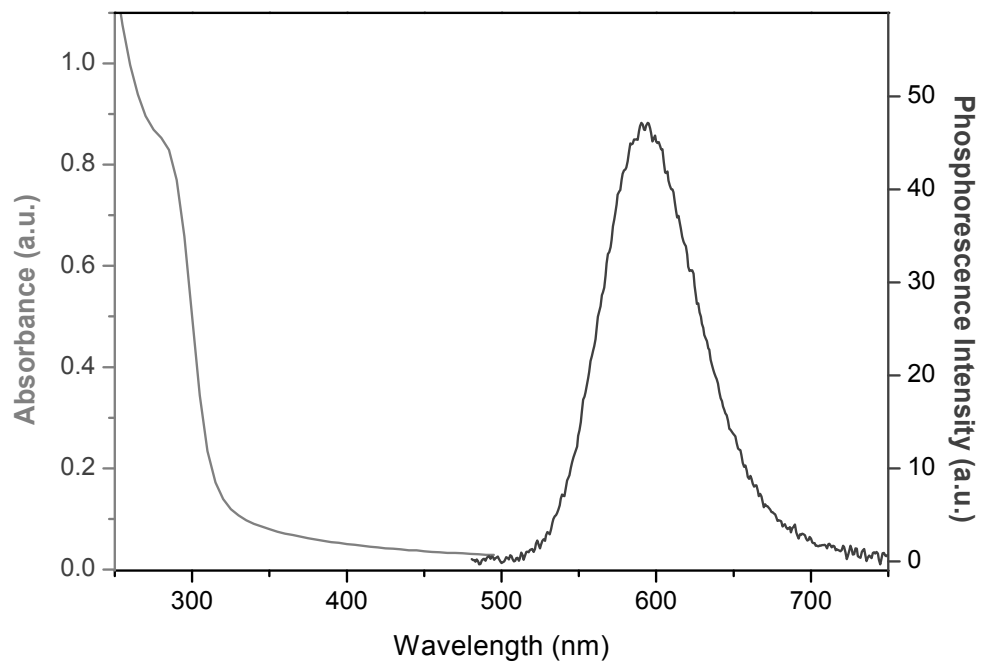


Figure 2

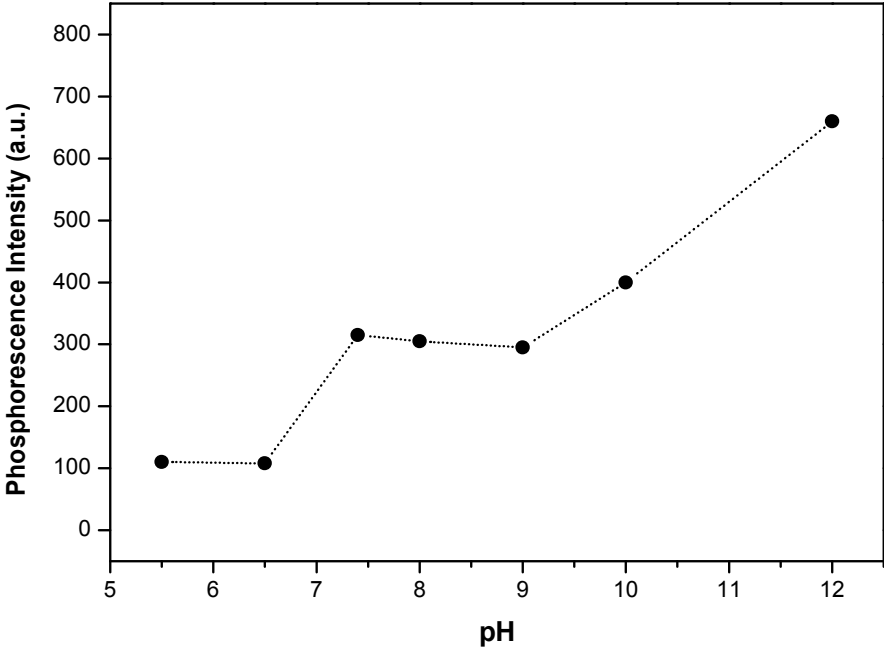


Figure 3

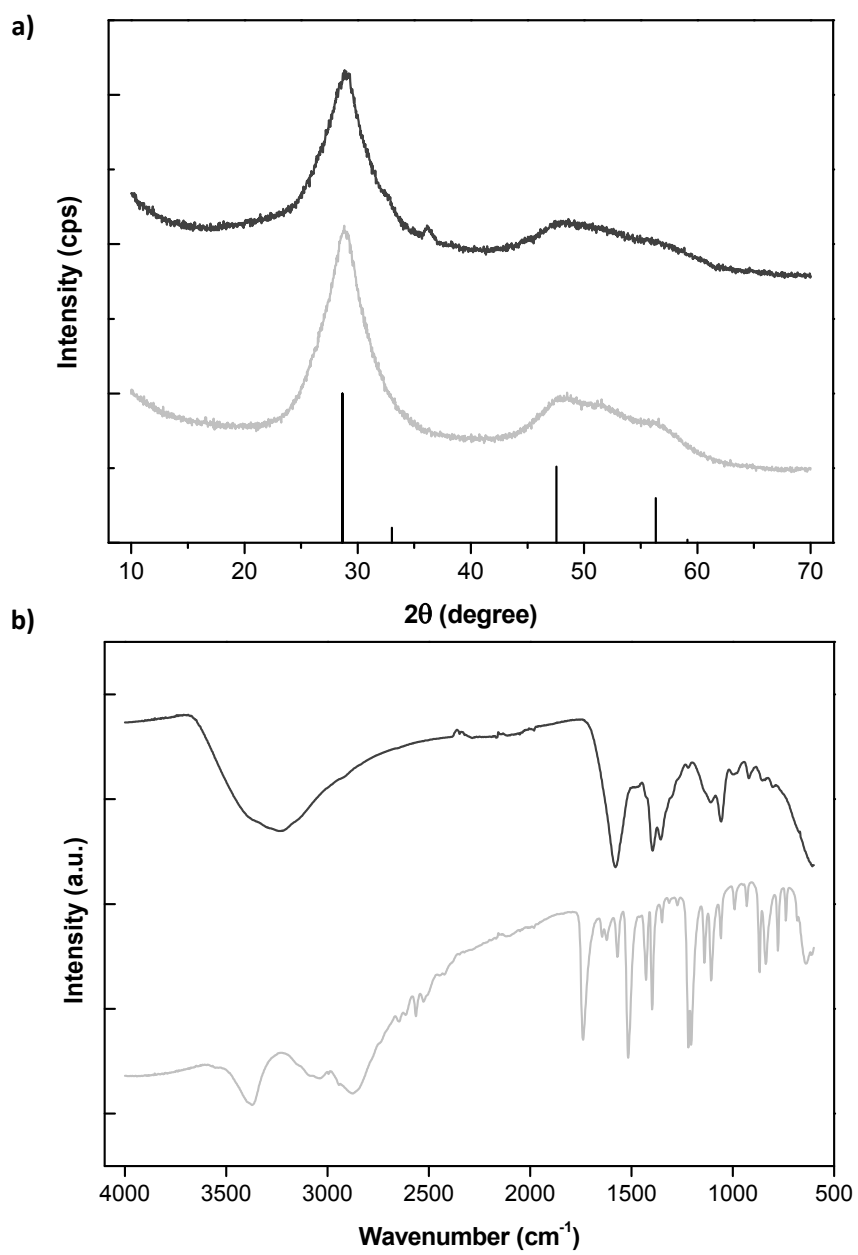


Figure 4

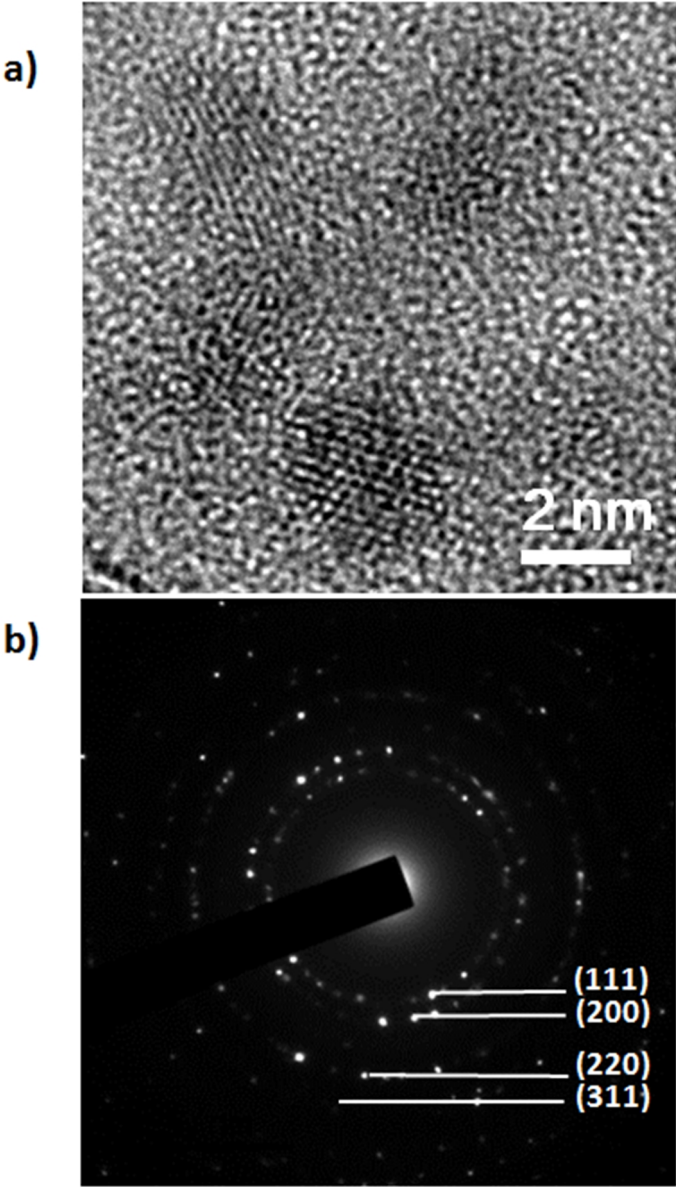


Table 1

	Acidic treatment		Alkaline treatment
	No MW (wt %)	Microwave assisted (wt %)	Microwave assisted (wt %)
Mn	1.60 ± 0.06	1.88 ± 0.04	1.7 ± 0.1
Zn	37.3 ± 0.8	38.5 ± 0.7	39.3 ± 1.1
S	n.d.	23.3 ± 0.5	31.6 ± 1.3

Table 2

[QDs] mg L ⁻¹	[QDs] μM	[L-cysteine] μM
300	8.1	25
200	5.4	18
100	2.7	9
50	1.4	5

Supporting Information for:

**Determination of the concentration of colloidal Mn²⁺
doped ZnS quantum dots from ICP-MS measurements**

Emma Sotelo-Gonzalez, , Maria T. Fernandez-Arguelles, Jose M. Costa-Fernandez and Alfredo
Sanz-Medel^(*)

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo

Avda. Julian Claveria 8, E-33006, Oviedo, Spain

Supplementary figures

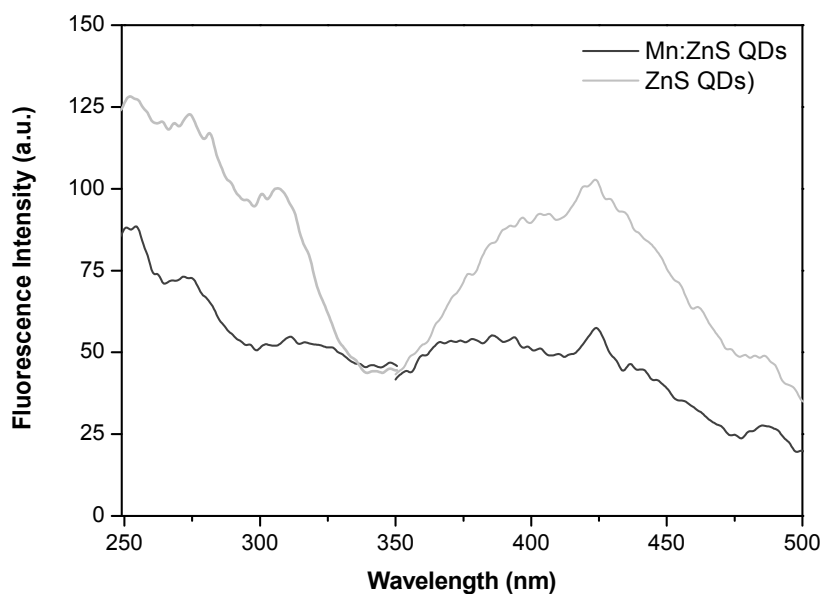


Figure S1. Fluorescence spectra of Mn:ZnS QDs (black line) and ZnS QDs (light grey line).

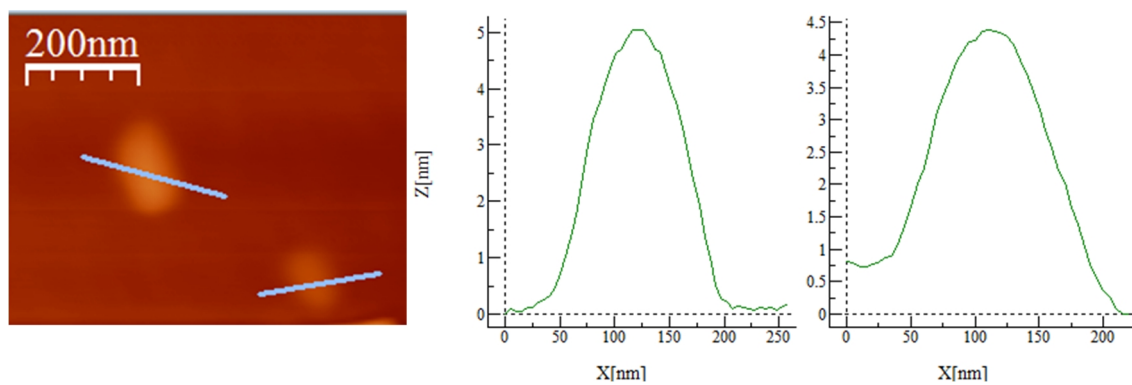


Figure S2. Topographical AFM image of Mn:ZnS QDs deposited onto silica surface.

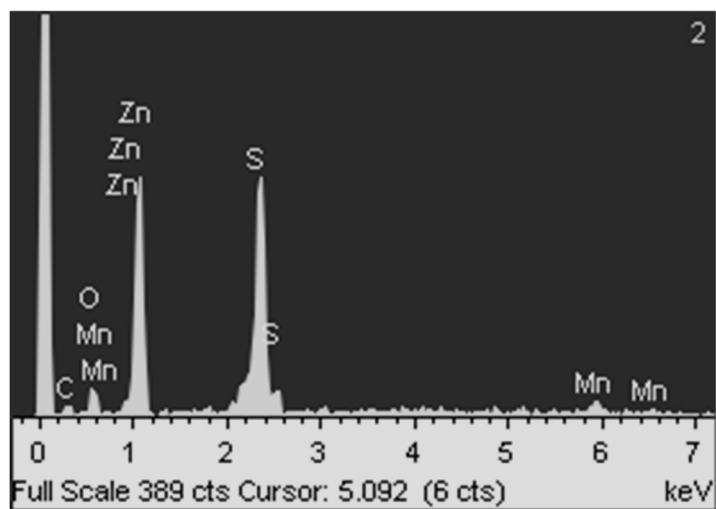


Figure S3. EDS spectra of Mn:ZnS QDs capped with L-Cysteine.

**D.2 APLICACIÓN DE LOS D-DOTS FOSFORESCENTES AL DESARROLLO DE
NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS Y FASES SENSORAS PARA LA
DETERMINACIÓN DE ACETONA EN MEDIOS ACUOSOS**

D.2.1 Introducción y objetivos

Las excelentes características optoelectrónicas que presentan los QDs resultan especialmente ventajosas si se comparan con las características de las moléculas orgánicas fluorescentes habitualmente empleadas en el desarrollo de metodologías luminiscentes de análisis, que muestran problemas como la necesidad de excitación altamente energética, pobre fotoestabilidad o tiempos de vida cortos.

Además, las propiedades luminiscentes de los QDs son muy sensibles a cualquier alteración que se puede producir en su superficie. Esto se traduce en que cualquier interacción física o química entre especies químicas presentes en el entorno y la superficie de las nanopartículas producirá cambios en la eficiencia de la recombinación de los pares hueco/electrón responsables del proceso de emisión luminiscente, resultando en cambios en la señal medibles y cuantificables. Por ello, este fenómeno ha sido la base de una gran actividad investigadora en el campo del desarrollo de nuevos sensores ópticos basados en QDs.

En este sentido, las propiedades luminiscentes características de los d-dots (p. ej. de los QDs de Mn:ZnS) resultan especialmente interesantes ya que el proceso de dopaje genera la existencia de estados energéticos adicionales, los cuales proporcionan tiempos de vida de la emisión debida a los dopantes más largos que la emisión del semiconductor convencional. Desde el punto de vista analítico, esta emisión se puede detectar como fluorescencia convencional, fosforescencia o fluorescencia a tiempo resuelto, permitiendo los dos últimos modos de detección eliminar problemas típicos que ofrecen las matrices biológicas como la autofluorescencia o la dispersión si se recoge la señal debida al analito con un tiempo de demora durante el cual se eliminan estas señales de corta duración.

La mayoría de las metodologías luminiscentes de análisis basadas en QDs para la detección de analitos están restringidas al empleo de las nanopartículas solubilizadas directamente en el medio de análisis, donde tras la interacción con la especie de interés, se recogerá la respuesta luminiscente generada (primera parte del trabajo desarrollado en este capítulo). Sin embargo, la posibilidad de llevar a cabo una inmovilización apropiada de las nanopartículas en un soporte sólido adecuado sería una estrategia excelente que permitiría el desarrollo de sistemas sensores basados en QDs.

Los sensores químicos resulta una herramienta analítica ideal ya que permiten realizar medidas a tiempo real e *"in situ"*. Como se ha señalada anteriormente, para el desarrollo de un sensor es necesario que las nanopartículas luminiscentes indicadoras sean inmovilizadas en un soporte sólido adecuado para construir así la fase sensora del sistema. La selección del soporte sólido no

es sencilla ya que este influye sobre la eficiencia cuántica del indicador inmovilizado, sobre su estabilidad y sobre la capacidad de interacción del indicador con el analito. Por esto, un aspecto de permanente interés es la búsqueda de materiales sólidos o soportes con prestaciones apropiadas que permitan la inmovilización del luminóforo, manteniendo intactas sus propiedades luminiscentes, asegurando una elevada estabilidad y garantizando una alta sensibilidad respecto al analito. En este sentido, las matrices inorgánicas tipo sol-gel son una solución muy versátil ya que posibilita la encapsulación de las NPs dentro de una matriz porosa. El proceso de síntesis resulta sencillo, se produce a temperatura ambiente y permite variar su rigidez, composición y porosidad dentro de un amplio intervalo variando la composición de mezcla de precursores. Además estos materiales presentan una elevada transparencia óptica y elevada estabilidad mecánica y química, lo que ha favorecido su empleo para el desarrollo de nuevas fases sensoras luminiscentes.

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, el objetivo general de este capítulo es el desarrollo de una metodología luminiscente de análisis basada en quantum dots dopados para la determinación de acetona en muestras acuosas y biológicas.

Para ello, en una primera fase se estudiará el empleo de QDs de Mn:ZnS como elementos activos en la determinación de acetona directamente en medios acuosos. Esta meta se desarrollará a lo largo de las siguientes etapas:

1. Síntesis y evaluación de las propiedades luminiscentes de quantum dots dopados de Mn:ZnS. Selección de las condiciones experimentales óptimas para el análisis.
2. Evaluación del efecto de la concentración de acetona sobre la emisión fosforescente de los d-dots, así como el efecto de la presencia de posibles interferentes.
3. Aplicación de la metodología desarrollada a la determinación de acetona en muestras medioambientales y muestras biológicas (orina).
4. Propuesta de un mecanismo explicativo del proceso luminiscente ocasionado tras la interacción del analito con la superficie de los d-dots.

En una segunda etapa, se investigará el empleo de los d-dots como indicadores fosforescentes tras su inmovilización en un soporte sólido tipo sol-gel para el desarrollo de un optosensor sensible a la presencia de acetona disuelta en muestras acuosas. Para ello se seguirá el siguiente esquema de trabajo:

1. Inmovilización de los QDs de Mn:ZnS en una matriz inorgánica tipo sol-gel. Estudio de las relaciones óptimas de los precursores para la selección de la fase sensora con mejores prestaciones analíticas.

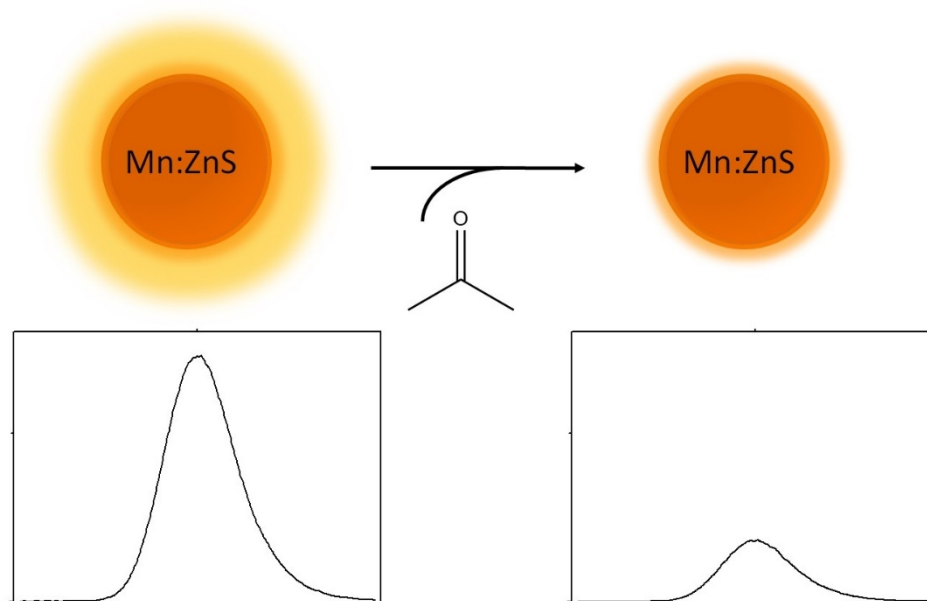
2. Estudio detallado de las características luminiscentes de los d-dots inmovilizados en el soporte sólido.

3. Evaluación de la fase sensora obtenida para la determinación directa de acetona en muestras acuosas por análisis en flujo. Estudio de las características analíticas de la metodología propuesta.

Los artículos titulados: *"Mn-doped ZnS quantum dots for the determination of acetone by phosphorescence attenuation"* publicado en la revista especializada en Química Analítica *Analytica Chimica Acta* (2012, 712, 120-126) de Elsevier y *"Immobilization of phosphorescent quantum dots in a sol-gel matrix for acetone sensing"* publicado en la revista especializada en Química Analítica *Sensors and Actuators B* (2012, 174, 102-108) de Elsevier, resumen el trabajo y conclusiones del segundo capítulo de la presente Tesis.

D.2.2 Artículo científico III**Analytica Chimica Acta, 2012, 712, 120-126**

Emma Sotelo-Gonzalez, Maria T. Fernandez-Arguelles, Jose M. Costa-Fernandez, Alfredo Sanz-Medel.





Mn-doped ZnS quantum dots for the determination of acetone by phosphorescence attenuation

Emma Sotelo-Gonzalez, María T. Fernandez-Argüelles, Jose M. Costa-Fernandez, Alfredo Sanz-Medel*

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Avda. Julian Claveria 8, E-33006 Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 June 2011

Received in revised form 7 November 2011

Accepted 8 November 2011

Available online 19 November 2011

Keywords:

Quantum dots

Phosphorescence

Luminescence

Acetone determination

Nanoparticles

ABSTRACT

Quantum dot (QD) nanoparticles (NPs) are increasingly used as highly valuable fluorescent biomarkers and as sensitive (bio)chemical probes. Interestingly, if certain metal impurities are incorporated during the NPs synthesis, phosphorescent QDs with analytical potential can be obtained.

We report here the synthesis of colloidal manganese-doped ZnS nanoparticles which have been surface-modified with L-cysteine that exhibit an intense room temperature phosphorescence (RTP) emission in aqueous media even in the presence of dissolved oxygen (i.e. sample deoxygenation is not needed). An exhaustive RTP photoluminescent and morphological characterization of the synthesized QDs and their potential for development of phosphorescent analytical methodologies is described. Application to analytical control of acetone ("model analyte" from the ketones family) in water and urine samples is carried out by measuring the QDs phosphorescence quenching rate.

The observed results showed a high selectivity of Mn²⁺-doped ZnS QDs towards acetone. The linear range of the developed methodology turned out to be at least up to 600 mg L⁻¹ with a detection limit (DL) for acetone dissolved in aqueous medium of 0.2 mg L⁻¹. The developed methodology was finally applied for acetone determination in different spiked water and urine samples, and the recoveries fall in the range of 93–107%.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Acetone is a solvent widely used in various industrial processes particularly in manufacturing strengthened plastic fibres and shoes. The presence of acetone in the environment results from different sources such as sewage disposal, industrial leaching or emissions from automobiles or turbines [1] and their toxic effects on the human organisms are known for a long time [2]. Interest in acetone determination in waters, along with many other low molecular weight carbonyl compounds, have increased in recent years owing to the wide variety of its sources, the risk of contamination by acetone and its potential adverse health effects in drinking water [3,4]. In surface waters, the presence of such compounds was also ascribed to the photodegradation of dissolved organic matter and to microbial processes [5]. Moreover, detection of acetone levels in urine (known as ketonuria) and blood (known as diabetic ketoacidosis) can be used as a potential biomarker for diagnosis of some diseases such as Diabetes Mellitus or starving [6–8].

The vast majority of analytical methods used for acetone determination are based on chromatographic techniques. Fre-

quently, such methods require complex and long-lasting sample pretreatment steps (e.g. solid-phase microextraction, sample derivatizations, etc.). Additionally, photoluminescence approaches for sensitive acetone detection using organic molecules as photoluminescent probes are common today. In this vein, in the last few years improvements in nanotechnology allowed replacement of conventional organic fluorophores by alternative advantageous luminescent nanomaterials such as quantum dots which have recently demonstrated their high potential in the development of novel luminescent bioanalytical methodologies [9–12].

Quantum dots (QDs) are nanocrystals of semiconductor materials with particle sizes between 2 and 10 nm exhibiting unexpected optical and electronic properties [13]. Quantum confinement effects are responsible for such remarkable properties, which depend on their size and composition. Such effects offer the analyst high fluorescent quantum yields, narrow and symmetric size-tunable emission spectra, high resistance to photobleaching and long fluorescence lifetimes, features which can be highly useful in luminescence based analysis [14–16].

Luminescence of quantum dots is very sensitive to their surface states. Therefore, eventual chemical or physical interactions between a given chemical species with the surface of the nanoparticles could result in changes of the efficiency of the core electron-hole recombination [17]. This was the basis of the recent increasing research activity on the development of novel analytical

* Corresponding author. Tel.: +34 985103474; fax: +34 985103474.

E-mail addresses: jcostafe@uniovi.es (J.M. Costa-Fernandez), asm@uniovi.es (A. Sanz-Medel).

methodologies based on QDs for direct analysis of small molecules and ions [9,18]. Methods based on direct chemical or physical interactions between target chemical species (analyte) and the surface of the nanoparticles are very simple and have demonstrated high sensitivity features. Unfortunately, very often those methods lack of an appropriate selectivity.

To improve selectivity of QDs based sensors, elimination of interferences from other concomitant fluorescent compounds emissions is a must. Recent investigations have evaluated the use of metallic dopants with quantum states remote from the valence and conduction band edges of the semiconductor nanoparticles to generate different radiative processes [19,20]. In this vein, Mn²⁺-doped ZnS QDs have attracted considerable attention lately because doping Mn²⁺ ions may act as recombination centres for the excited electron-hole pairs and result in strong and characteristic luminescence at longer wavelengths. Upon Mn²⁺ doping, a characteristic emission band centred at around 590 nm, is developed for the well-known ⁴T₁-⁶A₁ d-d transition of Mn²⁺ ions on Zn²⁺ sites of the QD (where Mn²⁺ is coordinated by S²⁻) [21–23]. When compared with traditional QDs such as CdSe or ZnS, the resulting Mn²⁺-doped ZnS QDs exhibit both, longer Stokes shift between excitation and emission wavelengths and longer luminescent lifetimes (in the order of a few ms), properties which are typical from phosphorescent emission [24]. Hence, it is possible to perform time resolved measurements allowing simple discrimination between the luminescence emission from Mn:ZnS QDs from the background fluorescence of the sample (in which luminescent lifetime is shorter). Additionally, when compared to the commonly used CdSe or CdS QDs, the absence of Cd²⁺ in Mn²⁺-doped ZnS quantum dots can minimize toxicity of such nanocrystals (particularly important in live-experiments) due to the eventual release of such toxic metal ions from the nanocrystals. These advantages make Mn²⁺-doped ZnS QDs very exciting advanced nanomaterials as analytical luminescent labelling agents for imaging and sensing.

In this context, in a pioneer work, surface-modified Mn²⁺-doped ZnS QDs were used for direct sensing of the antibiotic enoxacin in biological fluids based on quenching of the phosphorescence emission of the nanoparticles [25]. More recently, enhancement of the phosphorescence emission of Mn:ZnS QDs in presence of ascorbic acid was used for the determination of such essential nutritional factor. For this purpose, QDs were coated with sodium tripolyphosphate, which forms a chelate with ascorbic acid. Authors proposed that the chelate formed extracted Mn and Zn from the surface of the QDs, generating more holes and allowing the reduction of Mn³⁺ to Mn²⁺, enhancing the emission of the QDs [26]. The same Mn:ZnS QDs were conjugated to glucose oxidase (GOD) to carry out an enzymatic determination of glucose. In this approach, the presence of glucose generated the formation of H₂O₂, which is an effective quencher of the phosphorescence of Mn:ZnS [27]. Very recently, the use of Mn-doped QDs have been proposed for the development of multidimensional sensing devices for discrimination of proteins based on measurements of fluorescence, phosphorescence and light scattering. Values of these three parameters were obtained for eight different proteins after interaction with the QDs, and a fingerprint pattern was obtained after a Principal Component Analysis [28].

In this paper, colloidal Mn²⁺-doped ZnS nanoparticles exhibiting room temperature phosphorescence (RTP) emission have been synthesized and water solubilized by capping the QDs surface with L-cysteine. Such coating of the nanoparticle with cysteine groups did not affect their emission properties, allowing their analytical application for acetone determination (selected as model ketone specie) in aqueous media by measuring the quenching on the RTP emission of such QDs after direct interaction with the analyte.

2. Experimental

2.1. Reagents

All chemical reagents used were of analytical-reagent grade and used as received, without any further purification. De-ionized Milli-Q water was employed in the preparation of all solutions.

Zinc sulfate heptahydrate, manganese chloride tetrahydrate, L-cysteine hydrochloride monohydrate, potassium bromide, potassium iodide, sodium sulfite, 2-propanol and standard solutions of different cations (Ag⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, and Fe³⁺) were obtained from MERK (Darmstadt, Germany). Sodium sulfide nonahydrate, D-glucose, Triton X-100, hexadecyltrimethylammonium-bromide (CTAB), trimethyl(tetradecyl)ammonium bromide, sodiumdodecyl sulfate (SDS), sodium hydroxide, acetone solution (2000 µg mL⁻¹ in methanol:water (9:1) and 5000 µg mL⁻¹ in methanol:water (9:1)) and methanol HPLC gradient grade was purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Urea and DL-histidine were from Fluka (Basel, Switzerland). Acetone and acetonitrile HPLC gradient grade were purchased from Prolabo (Leuven, Belgium).

2.2. Instrumentation

Phosphorescence and fluorescence spectra were performed on a PerkinElmer LS-50B luminescence spectrometer and Varian Cary Eclipse fluorescence spectrometer (Madrid, Spain), both equipped with xenon discharge lamps. For these measurements, diluted aqueous solutions of QDs were placed in 1 cm quartz cuvettes and their corresponding luminescence was measured. The morphology and microstructure of the QDs were characterized with a transmission electron microscope (TEM) 2000 EXII, JEOL (Tokyo, Japan) and an atomic force microscope (AFM) (Nanotec Electronics, Madrid). FT-IR spectra were collected in a Varian 670 IR FT-IR spectrometer using attenuate total reflectance measurements. Z-potential was measured using a Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom) using colloidal QDs in acid medium. All measurements were made at room temperature and atmospheric pressure.

2.3. Synthesis of aqueous ZnS and Mn²⁺-doped ZnS quantum dots

Colloidal water-soluble ZnS and Mn²⁺-doped ZnS quantum dots were synthesized in our laboratory via the procedure described by He et al. [25] with some slight modifications. Briefly, 50 mL of 0.02 M L-cysteine, 5 mL of 0.1 M ZnSO₄, and 0.15 mL of 0.1 M MnCl₂ were mixed in a beaker and pH was adjusted with NaOH 1 M to pH 11. The solution was placed in a three-necked flask and deoxygenated in an argon atmosphere under continuous stirring for 30 min. Then, 5 mL of 0.1 M Na₂S were swiftly injected into the solution to allow the nucleation of the nanoparticles. The mixture was stirred for 20 min, and then the solution was aged at 50 °C under air for 2 h to improve the crystalline structure of the L-cysteine capped Mn²⁺-doped ZnS QDs. Similarly, ZnS QDs were synthesized using the same procedure but without the addition of MnCl₂. Purification of the QDs was carried out by precipitation of the nanoparticles with ethanol in a centrifuge at 5000 rpm for 5 min (the procedure was repeated for 3 times). Finally, the QDs were dried under vacuum and stored under inert argon atmosphere as a water soluble brown solid powder.

2.4. Analytical procedure for acetone measurement

The following general procedures were used to evaluate the effect of the presence of acetone in the nanoparticles environment over luminescence emission of the synthesized phosphorescent QDs.

The optimization studies and calibration curves for acetone determination were obtained by adding increasing amounts of standard water solution of acetone over colloidal suspension of Mn:ZnS QDs in a buffer solution. Once mixed, luminescence emission measurements were performed.

In a similar way, in order to evaluate the effect of potential interfering species on the luminescence emission of Mn²⁺-doped ZnS QDs, increasing amounts of the assayed chemical species were added over quantum dots buffered solution, and then, QDs phosphorescence emission was measured.

For real sample analysis a simple pre-treatment was used, consisting on a filtration of the samples through 0.45 μm and 0.22 μm filter devices consecutively. Real water samples were prepared by mixing 9 mL of spiked water samples with 1 mL of the synthesized water soluble Mn:ZnS QDs solution at pH 12. Additionally, urine samples were prepared by mixing 1 mL of spiked urine samples with 3 mL of water soluble Mn:ZnS QDs solution at pH 12. Then, the luminescence measurements were performed.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of Mn²⁺-doped ZnS QDs

3.1.1. Morphological characterization of Mn:ZnS QDs

Size characterization was carried out measuring the diameter of the nanocrystal core by transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM). Images obtained by TEM (see Fig. 1) show Mn²⁺-doped ZnS QDs having nearly spherical shape and almost uniform core size in diameter (about 4 nm).

Conversely, images obtained by atomic force microscopy (AFM) also showed the presence of bigger nanoparticles, with diameters of around 20 nm (see Fig. 2). Such larger particles can be attributed to a partial aggregation of several colloidal nanoparticles that might occur during the sample preparation procedure carried out for AFM measurements (e.g. during the drying process required previous to the AFM analysis). Images from AFM showed also a second population of nanocrystals with lower particle size of about 5 nm (see Fig. 2b). Such low-sized QDs would correspond to single nanocrystals of Mn:ZnS (not aggregated).

In addition, Fourier transform infrared spectroscopy was carried out in order to confirm the bonding of L-cysteine to the nanoparticle surface and to assess the orientation of such L-cysteine ligands surrounding the nanocrystal core. Results showed that the stretching band of the SH thiol group, which can be observed when measuring L-cysteine at around 2540 cm⁻¹ (ν S–H), is not observed when the nanoparticles are evaluated. However, the characteristic band for –COO⁻ (~1403 cm⁻¹, ν COO⁻) and –COOH (1750 cm⁻¹, ν C=O shift to 1570 cm⁻¹ as reported by Chen et al. [29]) are still detected in the FT-IR spectra from the L-cysteine stabilized QDs. Thus, we can conclude that the L-cysteine ligands are bound to the nanocrystal

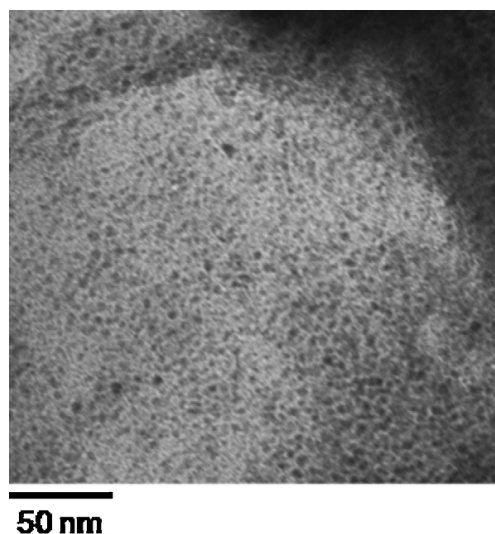


Fig. 1. TEM image of an aqueous solution of the colloidal Mn:ZnS QDs here synthesized.

surface through the thiol group, leaving the amino and carboxylate functional groups to the outer part of the shell. This is in agreement with previous findings, using CdSe/ZnS QDs, demonstrating that QDs covered with Zn-containing shells exhibit high affinity to thiol groups from molecules used to solubilize the nanoparticles [30].

3.1.2. Spectral characteristics of Mn:ZnS QDs

The synthesized QDs were dispersed in sodium borate buffer (SBB) pH 12. Photoluminescent measurements were carried out at optimized phosphorescence instrumental conditions, with a delay time of 0.04 ms and a gate time of 2 ms. As shown in Fig. 3a, no phosphorescent emission was observed when studying QDs of ZnS without Mn²⁺. However, when such nanocrystals are doped with Mn²⁺ (solid line in Fig. 3a) an intense emission band centred at around 595 nm, which is attributed to the ⁴T₁–⁶A₁ prohibited transition, is apparent. Studies showed that no residual fluorescence at 420 nm, typical from the ZnS core QDs [31], was observed, indicating that the doping process of the QDs with Mn²⁺ was highly efficient and no ZnS cores without Mn²⁺ ions seem to exist. Experimental RTP measurement conditions, such as excitation and emission wavelengths at 290 and 595 nm, respectively, were selected for further experiments.

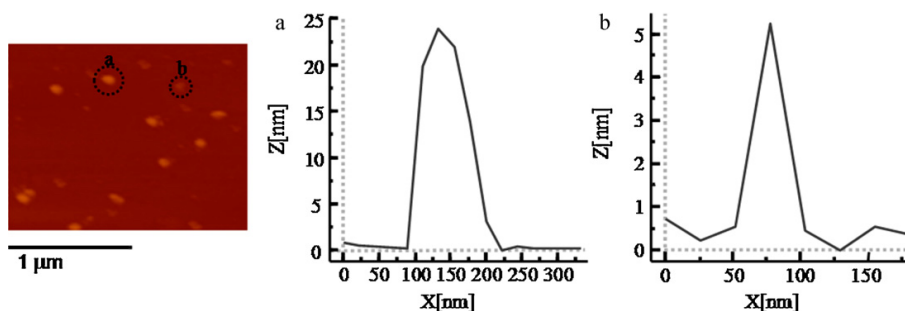


Fig. 2. Topographical AFM image of Mn:ZnS QDs deposited onto a silica surface. Two populations of Mn:ZnS QDs, exhibiting different size-profiles, were obtained.

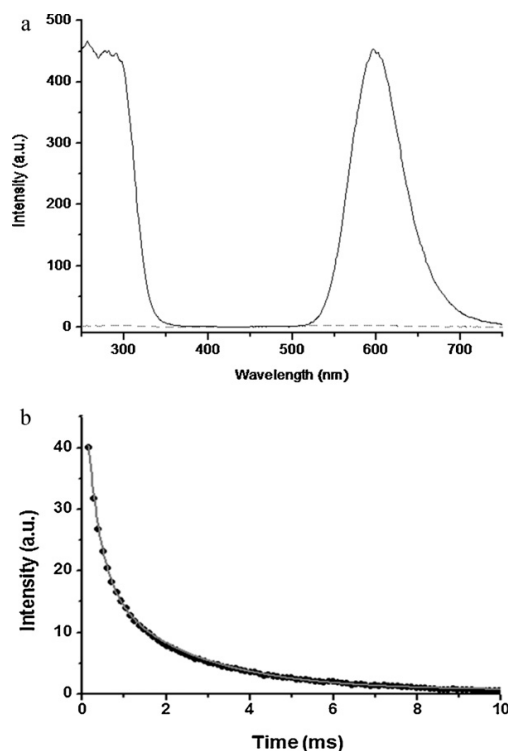


Fig. 3. (a) Excitation and emission spectra of colloidal Mn:ZnS QDs (solid-line) and of colloidal ZnS QDs (dotted line) and (b) Decay curve of luminescence emission of colloidal Mn:ZnS QDs. Emission spectra were obtained by excitation at 290 nm of aqueous solutions of QDs.

Moreover, lifetime measurements of Mn doped ZnS QDs were also carried out and obtained results are shown in Fig. 3b. After excitation by short pulse, the excited state of the QD typically decays following a double exponential time course, with a first lifetime component in the range of 0.3 ms and a second longer lifetime component around 2.1 ms. Such lifetime is very long when compared to ZnS QDs, which present a lifetime on the order of the nanoseconds.

3.1.3. Effect of Mn^{2+} stoichiometry on phosphorescence emission signals

It is well known by now that Mn^{2+} stoichiometry could affect both phosphorescence and fluorescence emission of Mn^{2+} -doped ZnS QDs [32]. In order to investigate nanocrystals composition exhibiting optimum phosphorescence emission characteristics, QDs doped with different Mn:ZnS ratios, ranging 0.3–30 (mol% relative to Zn^{2+}) were synthesized. Photoluminescent studies showed that as the amount of Mn^{2+} increased, the fluorescence emission observed at 420 nm (characteristic from the ZnS core) was lower, and the phosphorescent signal registered was higher. At Mn^{2+} concentrations over a 3% a plateau in the phosphorescent signal was observed. Additionally, measured phosphorescence decay times showed that whereas τ_1 remained constant, τ_2 decreased slightly with increasing concentration of Mn^{2+} . Therefore, Mn^{2+} doped ZnS QDs used for further experiments were selected ensuring 3% Mn^{2+} (relative to Zn^{2+}) in the precursors mixture.

3.1.4. Effect of experimental conditions

In general terms, prediction of the effect of the environment and/or surface functionalization on the optical properties of QDs is

difficult. Some parameters of the microenvironment, such as matrix polarity and proticity (hydrogen bonding ability), viscosity, pH along with the presence of surfactants or fluorescence quenchers (e.g. oxygen) can have a strong influence on luminescence intensity [15]. Furthermore, traditional phosphorescence emission is also affected by several parameters, including presence of oxygen, organized media (by adding surfactants) or heavy atoms. Therefore, the eventual effect of all those factors on the RTP emission intensity from Mn^{2+} -doped ZnS QDs was investigated.

Evaluation of pH effect was performed by dissolving the nanoparticles in different buffers of pHs values of: 5, 7.4, 9 and 12. Results showed that pHs between 5 and 9 barely show a difference on the phosphorescence emission, while NPs dispersed in pH 12 buffer showed a substantial increase on the phosphorescence recorded. This could be attributed to the deprotonation of the amino group (pK_a 10.25) of the L-cysteine nanoparticles layer.

It is well known that dissolved molecular oxygen is a strong quencher of the molecular phosphorescence emission in liquid solutions. Hence, emission of Mn^{2+} -doped QDs was evaluated under different oxygen concentrations by addition of different concentrations of sodium sulphite (up to 20 mM), a well known and effective oxygen scavenger [33]. Unexpectedly, no significant change on the RTP intensity or in luminescence lifetimes from Mn:ZnS QDs (in presence or absence of dissolved oxygen) was observed. This is of course an advantageous feature when compared to traditional phosphorescence emission where removal of oxygen is mandatory [34].

Another critical parameter playing an important role in traditional phosphorescence analytical methods is the presence of heavy atoms in the medium to favor the population of the triplet excited state. Although the transition here is of different nature to those typical triplet–singlet transitions that take place in organic reagents used for RTP, the effect of the presence of high concentration of a heavy atom, including Br and I containing salts (1.2 M) in aqueous media, on the luminescence emission from Mn:ZnS QDs solution was also evaluated. We did not observe any significant variation on the luminescence emission or lifetimes from the Mn^{2+} doped QDs. In fact, the highest values were those obtained for the Mn:ZnS QDs dispersions without presence of such high concentration of salts (which could affect the colloidal stability of the nanoparticles or produce quenching of RTP).

As compared to conventional phosphorescent molecules, the emission of the here-synthesized QDs is highly insensitive to different parameters that typically affect significantly the phosphorescence from the organic molecules. This observed characteristic could be attributed to the difference between the discrete energy levels characteristic of the QDs and those molecular energy levels of conventional organic phosphorescent molecules. Hence, factors that typically affect to transitions of organic molecules do not necessarily affect to transitions that occurs during the emission of QDs.

Finally, since an organized medium is known to enhance the probability of RTP to occur, the effect on RTP of the addition to colloidal Mn:ZnS QDs aqueous solution of surfactants of different nature (anionic as 0.01 M SDS, cationic as 0.001 M CTAB, and 0.005 M TDAB, and non-ionic as 0.002 M Triton X100), at levels above their critical micellar concentrations, was also investigated. It was found that none of the surfactants produced any enhancement of the phosphorescence intensity. Conversely, the observed emission spectra from QDs solutions containing surfactants presented low signal to noise ratios (probably due to the formation of NPs aggregates resulting in undesirable light scattering and background).

From such experiments it can be concluded that the phosphorescence-like emission of Mn^{2+} -doped ZnS QDs is not significantly affected by typical parameters that usually modify the emission of traditional organic phosphors (e.g. pH, dissolved

oxygen, presence of heavy atoms or rigidity afforded by organized media). Such robustness of the delayed emission of Mn doped opens the way to simpler, more precise and more robust RTP analytical methodologies, as compared with conventional organic dyes-based existing RTP analytical methods.

3.1.5. Photostability

Several authors demonstrated that exposure of colloidal QDs, after their synthesis or further functionalization, to UV or visible light results in an important increase of the nanoparticles photoluminescence [35–37].

Such phenomenon, frequently known as photoactivation process, is aimed at removing of topological surface defects in the QDs eventually originated during the synthesis processes lowering the emitted luminescence [35–37]. Therefore, we have also evaluated the eventual effect of a photoactivation process on Mn²⁺-doped ZnS QDs synthesized in our laboratory.

For this purpose, Mn:ZnS QDs were illuminated under a 290 nm source excitation for 2 h and no significant variation on the observed luminescence signal was noticeable. Again, the synthetic procedure here followed resulted in high-quality Mn:ZnS QDs, exhibiting a very stable phosphorescent signal at room temperature, without the need of previous photoactivation.

3.2. Effect of acetone on Mn:ZnS QDs phosphorescence

The study of the interaction of different chemical species with the surface of colloidal QDs, widely reported in the literature, has revealed that luminescence properties of these nanomaterials strongly depends on their surface atoms and their environment [9,38]. In this sense, previous research carried out in our laboratory has demonstrated the strong effect of the presence in the QDs environment of organic vapours [39], metallic cations [40] or inorganic anions [41] on the fluorescence emission of CdSe QDs. The mechanism proposed in each application depends on the reactive species (e.g. electrostatic interaction with the QDs surface ligands [29], electron transfer from conductive band of QD to unoccupied molecular orbital of the analyte [42], or a simple adsorption onto the surface of the semiconductor nanoparticles [43]). This was the basis of the recent increasing research activity on the development of novel optical sensors based on QDs probes [9].

Following this approach, and based on our experience with CdSe QDs, in this article Mn:ZnS QDs have been investigated for optical sensing of acetone based on a phosphorescence detection. For such purpose, Mn:ZnS QDs capped with L-cysteine were selected. The presence of L-cysteine on the QDs surface ensures water solubility of the nanoparticles. Moreover, terminal functional groups of the aminoacid might easily interact with acetone present in the medium, and, eventually, this interaction would affect to the luminescence of the QDs, which would be used to develop the acetone sensor aforementioned.

Thus, first studies were aimed to explore the behaviour of Mn²⁺-doped ZnS QDs for phosphorescence detection-based acetone analysis. Spectroscopic measurements were performed in aqueous solutions buffered with SBB pH 12 as described in the general analytical procedure. The phosphorescence response of Mn²⁺-doped ZnS QDs upon addition of increasing amounts of acetone, varying from 0.5 mg L⁻¹ up to 600 mg L⁻¹, in aqueous solution is shown in Fig. 4. As it can be observed, the addition of acetone efficiently quenches the phosphorescence emission of the evaluated nanocrystal colloidal solution.

The dependence of the measured phosphorescent intensity signal with increasing concentrations of acetone was fitted to a Stern–Volmer equation. For this purpose, $(I_0/I)-1$ has been represented versus acetone concentration, where I_0 is the phosphorescent emission of Mn:ZnS QDs without presence of acetone,

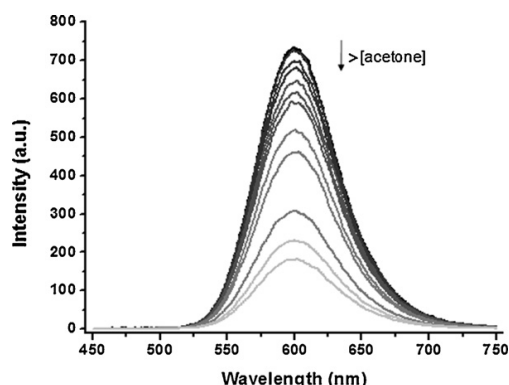


Fig. 4. Effect of the addition of acetone (from 0.5 mg L⁻¹ up to 600 mg L⁻¹) on the phosphorescence emission of Mn:ZnS QDs.

and I is the phosphorescent emission of Mn:ZnS QDs in presence of increasing concentrations of acetone. The Stern–Volmer representation gives rise to a linear plot up to a concentration of at least 600 mg L⁻¹ of acetone, which was the maximum concentration of analyte assayed. Such acetone quenching effect can be attributed to an interaction with the L-cysteine ligands present in the NPs surface, used to stabilize the QDs in aqueous solutions, as discussed in the next section.

4. Proposed mechanism

It is well known that acetone can act as an electrophile group. Therefore, there is a high probability of an interaction of the acetone with the amino group from the L-cysteine of the QDs, which is a nucleophile, to form an imine. Then, addition of more acetone to the medium could give rise to a further generation of an oxazolidone cycle. Based on its chemical structure, imine could act as an efficient electron acceptor. Therefore, such eventual chemical transformation of the L-cysteine in the presence of acetone would result in a quenching of the photoluminescence emission from the QDs probably due to an electron transfer process. Hence, if this occurs, changes on the surface charge of the QDs should be observed in the presence of acetone.

In order to confirm such possible quenching mechanism we carried out the measurement of the Z-potential of the QDs solution before and after the addition of acetone (see Fig. 6). When the Z-potential was measured in acidic medium (using acetic acid), a value of +24.4 mV was obtained (a positive value attributed to the protonation of the amino group of the L-cysteine). Conversely, this Z-potential decreases to a value around 0 mV when acetone is added to the QDs sample. This variation could be explained considering the loss of the positive charge from the amino group (see Fig. 5) when the imine or the oxazolidone are generated upon acetone addition.

Furthermore, the effect of different aliphatic and aromatic ketones, such as 2-heptanone and cyclohexanone, on the RTP emission from the QDs was also investigated. Results showed that such species produced also a significant quenching of the luminescence emission from the nanoparticles, thus probing the proposed imine formation between cysteine and the ketones.

4.1. Analytical performance characteristics

The analytical performance characteristics of the new RTP method were evaluated under the optimized experimental conditions. Calibration graphs were prepared from the results of

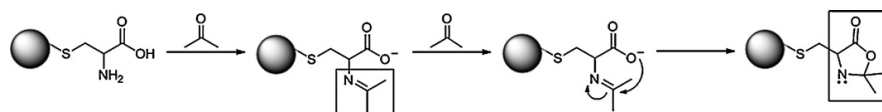


Fig. 5. Scheme of the proposed sensing mechanism.

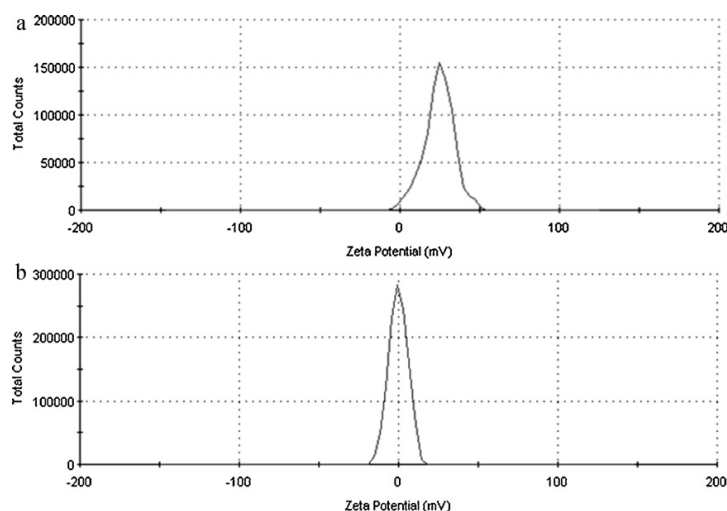


Fig. 6. Z-potential of a colloidal solution of Mn:ZnS QDs (a) in water media and (b) in the presence of acetone.

triplicate analysis of acetone standard water solutions of increasing concentration and proved to be linear at least up to 600 mg L^{-1} of acetone (maximum concentration assayed). The detection limit, calculated as the concentration of acetone which produced an analytical signal three times the standard deviation of 10 injections of a blank, turned out to be 0.2 mg L^{-1} of acetone. The precision of the proposed method was evaluated as the relative standard deviation of three replicates of a sample containing 15 mg L^{-1} of acetone and turned out to be $\pm 2\%$.

The selectivity of the proposed methodology was assessed by studying the effect of the presence of different potential interferents on the QDs RTP signals. In this sense, it could be expected that the presence of metallic cations reacting with L-cysteine coating would alter the surface of the nanoparticles so changing the phosphorescent emission. Thus, emission of Mn:ZnS QDs was studied under increasing concentrations of some metal cations potentially present in environmental samples (using the optimized procedure previously described). The presence of Na(I), Eu(III), Zn(II) and Mn(II) up to 10 mg L^{-1} result in deviations of the fluorescence signal lower than 5%. However, the presence of Cu(II), Fe(III), Ag(I) or Hg(II) at a concentration level over 0.04 mg L^{-1} produced a change on the measured luminescence over 10% when working at acid or neutral pHs. In order to avoid such interferences, the same study was performed at a higher pH (pH 12). In such basic medium, it was observed that none of the assayed species produced any detectable interferent effect at concentrations below 1 mg L^{-1} .

Another type of compounds that could be present in polluted water samples includes different organic solvents, such as methanol, ethanol, 2-propanol, and acetonitrile. Results found showed again that none of such potential interferents assayed produced a detectable effect on the RTP emission of the QDs (even at the maximum concentration assayed of 5% (v/v).

As this methodology might be potentially applicable to RTP determination of acetone in urine samples, the effect of other components commonly present in urine at physiologically relevant levels was also evaluated. In this sense, histidine and L-cysteine were assayed at concentrations up to 1 mM, Na(I) up to 5 mM, K(I), Ca(II), Mg(II), D-glucose at concentrations up to 10 mM and finally urea—the main component of urine— up to 400 mM. As can be seen in Fig. 7, only L-cysteine and Ca(II) ion produced slight interference effects on the acetone signal. Moreover, it is worth noting that even high concentrations of glucose did not produce any noticeable change on the RTP of the QDs. This fact is particularly important for the eventual application of this RTP NPs-based methodology to the determination of acetone in patients suffering from Diabetes Mellitus.

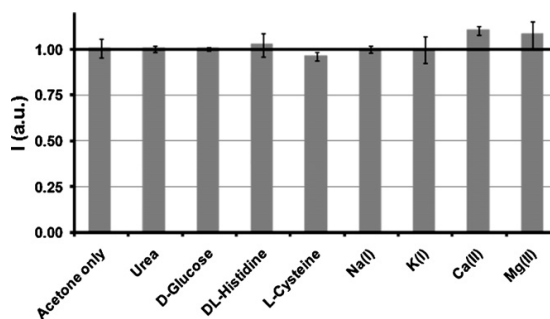

 Fig. 7. Interference assay for acetone determination. 100 mg L^{-1} acetone was added in all cases, either alone or together with the potential chemical interferents assayed. Three replicates per point.

Table 1
Determination of acetone in enriched samples by using the phosphorescent QDs.

Type of sample	Acetone spiked (mg L ⁻¹)	Acetone measured (mg L ⁻¹)	Recovery (%)
Mineral water	6.3	6.8 ± 0.6	107
Tap water	9.5	9.3 ± 2.0	98
Sea water	8.2	8.6 ± 0.7	105
Matrix urine 1	24.9	25.5 ± 2.0	99
Matrix urine 2	73.9	76.9 ± 0.9	104
Matrix urine 3	98.9	91.1 ± 2.0	93
Urine 1	192.3	184.9 ± 1.2	96
Urine 2	535.7	547.9 ± 1.8	102

5. Real sample applications

The usefulness of the proposed method for the determination of acetone in natural water (tap, water, mineral and sea water) was first evaluated by following the general procedure. Water samples, spiked with known concentrations of acetone, were analyzed after filtration through 0.45 μm and 0.22 μm filter devices without any other sample pre-treatment. Then, 9 mL of the water samples were thoroughly mixed with 1 mL of Mn:ZnS QDs solution at pH 12 and the luminescence measurements were performed. Table 1 collects the results obtained after the analysis of trace levels of acetone in three different contaminated water samples.

Acetone determination in urine was also demonstrated at different acetone concentrations. The levels of acetone selected in order to carry out this study were on the same order of magnitude that those analyzed with commercial test strips. In a similar way to water samples analyses, urine samples were analyzed after filtration, and 1 mL of the urine samples were thoroughly mixed with 3 mL of Mn:ZnS QDs solution at pH 12. Unfortunately, results obtained for direct real urine samples analyses showed a deviation from values obtained with an external calibration. Thus, with the aim of avoiding such matrix effects, analysis of acetone in urine was carried out using a standard addition methodology. Luminescence measurements were performed and results obtained for the phosphorescent determination of acetone are collected in Table 1.

Good recoveries for the determination of acetone were obtained in all cases, thus indicating the validity of the proposed method for direct analysis of acetone in different types of water and urine samples.

6. Conclusions

In summary, Mn²⁺-doped ZnS QDs exhibiting a strong and highly stable phosphorescence emission were successfully synthesized and exhaustively characterized. Several factors that have a strong influence over the classical phosphorescence emission do not modify the emission of the Mn:ZnS QDs, making this type of nanoparticles very robust for real sample applications. The nanoparticles have demonstrated a high selectivity for the acetone determination in aqueous media by measuring the phosphorescence quenching effect observed after analyte interaction with the colloidal nanoparticles. A possible mechanism was also proposed to explain the process of the acetone effect on the QDs phosphorescence.

Acknowledgements

This work was supported by the project CTQ-2006-02309 (Ministerio de Educacion y Ciencia, Spain). Emma Sotelo-Gonzalez

acknowledges a grant (BP08-063) from Consejería de Educacion y Ciencia of the Principado de Asturias. We thank to Nanotechnology and Electronic Microscopy and Microanalysis of SCTs of University of Oviedo for their help in nanoparticle characterization and Ainhoa Diaz-Pardo for their help.

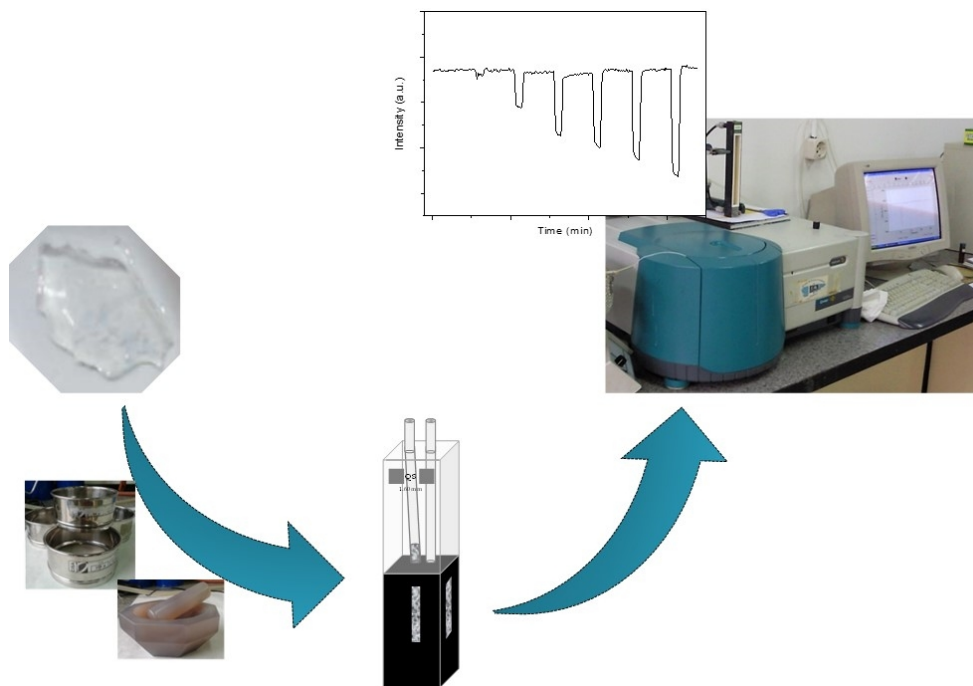
References

- [1] E. Zervas, X. Montagen, J. Lahaye, *Atmos. Environ.* 35 (2001) 1301–1306.
- [2] A. Brega, P. Villa, G. Quadrini, A. Quadro, C. Lucarelli, *J. Chromatogr.* 553 (1991) 249–254.
- [3] D.L. Giokas, G.Z. Tsogas, A.G. Vlessidis, *Anal. Chim. Acta* 651 (2009) 188–195.
- [4] E.D. Hudson, K. Okuda, P.A. Ariya, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1275–1282.
- [5] G. Burini, R. Coli, *Anal. Chim. Acta* 511 (2004) 155–158.
- [6] L. Dong, X. Shen, C. Deng, *Anal. Chim. Acta* 569 (2006) 91–96.
- [7] P. Yang, C. Lau, X. Liu, J. Lu, *Anal. Chem.* 79 (2007) 8476–8485.
- [8] R. Garrido-Delgado, L. Arce, C.C. Perez-Marín, M. Valcarcel, *Talanta* 78 (2009) 863–868.
- [9] J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 207–218.
- [10] J. Riegler, T. Nann, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 913–919.
- [11] M.F. Frasco, N. Chaniotakis, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 229–240.
- [12] D.M. Willard, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 284–286.
- [13] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A.P. Alivisatos, *Science* 281 (1998) 2013–2016.
- [14] A.M. Smith, S. Nie, *Analyst* 129 (2004) 672–677.
- [15] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, *Nat. Methods* 5 (2008) 763–775.
- [16] S.G. Penn, L. He, M.J. Natan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (2003) 609–615.
- [17] D.E. Moore, K. Patel, *Langmuir* 17 (2001) 2541–2544.
- [18] C.A.J. Lin, T. Liedl, R.A. Sperling, M.T. Fernandez-Argüelles, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, W.H. Chang, W.J. Parak, *J. Mater. Chem.* 17 (2007) 1343–1346.
- [19] H. Yang, S. Santra, P.H. Holloway, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 5 (2005) 1364–1375.
- [20] N.S. Karan, D.D. Sarma, R.M. Kadam, N. Pradhan, *J. Phys. Chem. Lett.* 1 (2010) 2863–2866.
- [21] R. Beaulac, P.I. Archer, X. Liu, S. Lee, G.M. Salley, M. Dobrowolska, J.K. Furdyna, D.R. Gamelin, *Nano Lett.* 8 (2008) 1197–1201.
- [22] R. Beaulac, P.I. Archer, D.R. Gamelin, *J. Solid State Chem.* 181 (2008) 1582–1589.
- [23] M. Wang, L. Sun, X. Fu, C. Liao, C. Yan, *Solid State Commun.* 115 (2000) 493–496.
- [24] A. Segura-Carretero, A. Salinas-Castillo, A. Fernández-Gutiérrez, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 35 (2005) 3–14.
- [25] Y. He, H.F. Wang, X.P. Yan, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3832–3837.
- [26] H.F. Wang, Y. Li, Y.-Y. Wu, Y. He, X.-P. Yan, *Chem. Eur. J.* 16 (2010) 12988–12994.
- [27] P. Wu, Y. He, H.-F. Wang, X.-P. Yan, *Anal. Chem.* 82 (2010) 1427–1433.
- [28] P. Wu, L.-N. Miao, H.-F. Wang, X.-G. Shao, X.-P. Yan, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 8118–8121.
- [29] J. Chen, A. Zheng, Y. Gao, C. He, G. Wu, Y. Chen, X. Kai, C. Zhu, *Spectrochim. Acta A* 69 (2008) 1044–1052.
- [30] A.F.E. Hezinger, J. Tessmara, A. Göpferich, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008) 138–152.
- [31] B. Gammelgaard, O. Jons, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 867–874.
- [32] A.A. Bol, A. Meijerink, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 10197–10202.
- [33] M.E. Diaz-Garcia, A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1436–1440.
- [34] T. Vo-Dinh, *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*, Wiley, New York, 1984.
- [35] C. Carrillo-Carrion, S. Cardenas, B.M. Simonet, M. Valcarcel, *Chem. Commun.* 35 (2009) 5214–5226.
- [36] C.T. Yuan, W.C. Chou, D.S. Chu, Y.N. Chen, C.A. Lin, W.H. Chang, *Appl. Phys. Lett.* 92 (2008) 183108–183111.
- [37] M. Oda, J. Tsukamoto, A. Hasegawa, N. Iwami, K. Nishiura, I. Hagiwara, N. Ando, H. Horiuchi, T. Tani, *J. Lumin.* 122–123 (2007) 762–765.
- [38] L. Qu, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 2049–2055.
- [39] M. Hasani, A.M. Coto-Garcia, J.M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel, *Sens. Actuators B: Chem.* 144 (2010) 198–202.
- [40] M.T. Fernandez-Argüelles, W.J. Jin, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 549 (2005) 20–25.
- [41] W.J. Jin, M.T. Fernandez-Argüelles, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Chem. Commun.* (2005) 883–885.
- [42] R. Tu, B. Liu, Z. Wang, D. Gao, F. Wang, Q. Fang, Z. Zhang, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3458–3465.
- [43] A.V. Isarov, *J. Chrysochoos, Langmuir* 13 (1997) 3142–3149.

D.2.3 Artículo científico IV

Sensors and Actuators B, 2012, 174, 102-108

Emma Sotelo-Gonzalez, Ana M. Coto-Garcia, Maria T. Fernandez-Arguelles, Jose M. Costa-Fernandez, Alfredo Sanz-Medel.





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Sensors and Actuators B: Chemical

journal homepage: www.elsevier.com/locate/snb

Immobilization of phosphorescent quantum dots in a sol–gel matrix for acetone sensing

Emma Sotelo-Gonzalez, Ana M. Coto-Garcia, Maria T. Fernandez-Argüelles*, Jose M. Costa-Fernandez, Alfredo Sanz-Medel**

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Avda. Julian Claveria 8, E-33006 Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 May 2012
Received in revised form 26 July 2012
Accepted 28 July 2012
Available online xxx

Keywords:
Quantum dots
Phosphorescence
Luminescence
Acetone sensing
Sol–gel

ABSTRACT

Quantum dots (QDs) are semiconductor nanoparticles (NPs) that are increasingly used in optical sensing applications due to their exceptional optoelectronic properties. When such nanocrystals are doped with certain metal impurities, a phosphorescence-like emission can be obtained, allowing the development of novel robust and highly selective sensing phases (it is possible to perform time resolved measurements enabling a simple discrimination between the luminescence emission from the QDs from the background fluorescence of the sample, in which luminescent lifetime is shorter).

In this context, a phosphorescent sensing material for acetone control in water media has been developed based on the immobilization of phosphorescent quantum dots in an inorganic sol–gel solid matrix.

For such purpose, colloidal manganese-doped ZnS nanoparticles (Mn:ZnS QDs) surface-modified with L-cysteine (for water solubilisation) were synthesised. The Mn:ZnS QDs exhibit an intense room temperature phosphorescence (RTP) emission in aqueous media even in the presence of dissolved oxygen. Further, a simple and general procedure is proposed to incorporate the colloidal L-cysteine Mn:ZnS QDs in a sol–gel matrix.

Application of the developed sensing material to analytical control of acetone dissolved in contaminated water samples was performed based on measurement of the quenching effect of the analyte on the QDs phosphorescence emission. The sol–gel procedure (e.g. nature and concentration of the silica precursors used) employed for immobilization of the QDs was optimized trying to obtain the best analytical features for detection of acetone. The optimized sensing material showed a high selectivity of the sensing material towards acetone. The linear range of the developed methodology turned out to be at least up to 50% acetone:water (v/v) with a detection limit (DL) for acetone dissolved in aqueous medium of 0.16% acetone:water (v/v). The developed sensing phase was finally applied for acetone determination in different spiked water samples, and the recoveries fall in the range of 93–109%.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Quantum dots (QDs) are luminescent nanocrystals of semiconductor materials with diameter sizes between 2 and 10 nm with fascinating optical and electronic properties [1]. The quantum confinement effects are responsible for their remarkable properties that depend on their size and composition, allowing high fluorescent quantum yields and very large molar extinction coefficients, broad excitation coupled to narrow and symmetric size-tuneable emission spectra, high resistance to photobleaching and fluorescence lifetimes on the order of 20–50 ns [2–4].

Luminescence of quantum dots is very sensitive to their surface states. Therefore, eventual chemical or physical interactions between a given chemical species with the surface of the nanoparticles could result in changes of the efficiency of the core electron–hole recombination. This was the basis of the development of novel sensing approaches, based on QDs, for direct analysis of small molecules and ions. In fact, in the last years, the use of quantum dots has replaced conventional organic fluorophores in diverse applications such as direct sensing [5,6] of ions [7–10], gases [11] or other small molecules [12,13]. Unfortunately, although very simple and highly sensitive, very often, those “direct” sensing approaches lack of an appropriate selectivity. To improve selectivity of QDs based sensors, elimination of interferences from other concomitant fluorescent compounds emissions is a must.

In this context, recent investigations have demonstrated that, when certain metal impurities are incorporated during nanoparticles synthesis, phosphorescence-like emission quantum dots

* Corresponding author. Tel.: +34 985103000x5365.

** Corresponding author. Tel.: +34 985103474.

E-mail addresses: fernandezteresa@uniovi.es (M.T. Fernandez-Argüelles), asm@uniovi.es (A. Sanz-Medel).

could be obtained [14–18]. These QDs present features typically offered by phosphorescent compounds [19]. Moreover, since the excited states that are involved in the emission of phosphorescence when using nanoparticles which are different from those involved in conventional organic molecules, typical parameters that affect the emission of phosphorescence might not affect the emission of luminescence of the QDs, such as presence of heavy atoms or dissolved oxygen, necessity of a rigid environment, etc.

In this vein, Mn²⁺-doped ZnS QDs have attracted considerable attention because doping Mn²⁺ ions may act as recombination centres for the excited electron–hole pairs and result in strong and characteristic luminescence at longer wavelengths. Upon Mn²⁺ doping, a characteristic emission band, centred at around 590 nm, is obtained for the well-known ⁴T₁–⁶A₁ d–d transition of Mn²⁺ ions on Zn²⁺ sites of the QD (where Mn²⁺ is coordinated by S²⁻) [17,18]. When compared with the traditional QDs such as CdSe or ZnS, the resulting Mn²⁺-doped ZnS QDs exhibit both, longer Stokes shift between excitation and emission wavelengths and longer luminescent lifetimes (in the order of a few ms), properties which are typical from phosphorescent emission. Hence, it is possible to perform time resolved measurements allowing simple discrimination between the luminescence emission from Mn:ZnS QDs from the background fluorescence of the sample (in which luminescent lifetime is shorter). Such improved emission properties make the Mn²⁺-doped ZnS QDs very exciting advanced nanomaterials as analytical luminescent labelling agents for sensing purposes.

A step further towards the development of QD-based sensing materials requires the immobilization of the QDs in an adequate solid supports in order to obtain an active solid sensing phases [6]. For this purpose, it is known that sol–gel based technology might be an outstanding method to entrap the nanoparticles inside a solid matrix due to the simplicity of the sol–gel preparation, the chemical inertness of the matrix, the tuneable porosity achieved by changing the amounts of silica precursors, the mechanical stability and the negligible swelling behaviour. In addition, the optical transparency offered by sol–gel materials makes them an excellent option for the development of optical sensing phases [20].

In the present work, incorporation of colloidal phosphorescent Mn:ZnS QDs in a sol–gel matrix has been carried out in order to fabricate “active” solid phases for acetone determination. Acetone, a highly volatile chemical reagent which is commonly analysed in environmental samples, was used as model analyte. Acetone, along with formaldehyde and acetaldehyde are the most abundant representatives of low molecular weight carbonyl compounds in water samples, representing more than 90% of total carbonyl content. Short-chain carbonyl compounds can appear in drinking water as pollutants due to the wide variety of their sources, mainly after disinfection treatments of natural waters or from migration from plastic containers into bottled water. Although the maximum contaminant levels in drinking water are still not applicable by the International Advisory Committees, the development of screening methods to test water samples is a necessity in order to control these compounds which can produce adverse health effects (from irritation of mucous membranes to problems in the central nervous system) and also organoleptic alterations [21–24].

Entrapment of the QDs in the sol–gel matrix was performed by incorporation of the nanoparticles in the precursor's mixture during the polymerization procedure. The sol–gel process was optimized to ensure that the QDs optical properties are retained (avoiding degradation or easy leaching into the solution) while maintain appropriate acetone sensing features.

2. Material and methods

2.1. Reagents

All chemical reagents used were of analytical-reagent grade and without further purification. Zinc sulphate heptahydrate, manganese chloride tetrahydrate, L-cysteine hydrochloride monohydrate and 2-propanol were obtained from MERK (Darmstadt, Germany). Sodium sulphide nonahydrate, sodium hydroxide, and methanol were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Acetone, methanol, ethanol and acetonitrile HPLC gradient grade were purchased from Prolabo (Leuven, Belgium). Sol–gel silicate precursors, tetramethoxysilane (TMOS) and 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) were obtained from Fluka Chemie (Steinheim, Germany) and N-ethyl-N-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) was purchased from Fluka (Basel, Switzerland). Freshly prepared ultrapure deionized water (Milli-Q3 RO/Milli-Q2 system, Millipore, UK) was used in all the experiments.

2.2. Synthesis of aqueous ZnS and Mn²⁺-doped ZnS quantum dots

Colloidal water-soluble Mn²⁺-doped ZnS quantum dots were synthesised in our laboratory via the procedure described by He et al. [25] with some slight modifications.

Mn²⁺-doped ZnS QDs show both phosphorescence and fluorescence emission that are affected by the manganese stoichiometry. Thus, based on previous studies carried out in our laboratory to optimize the amount of dopant added for the synthesis of the QDs, a 3% Mn:ZnS QDs (% molar ratio Mn/Zn) was selected, which was found to be the molar ratio of precursors that gives rise to the best phosphorescence emission.

Briefly, the following procedure was then used: 50 mL of 0.02 M L-cysteine, 5 mL of 0.1 M ZnSO₄, and 0.15 mL of 0.1 M MnCl₂ were mixed in a beaker and pH was adjusted with NaOH 1 M to pH 11. The mixture of the precursors was placed in a three-necked flask and deoxygenated in an argon atmosphere under continuous stirring for 30 min. Then, 5 mL of 0.1 M Na₂S was swiftly injected into the solution to allow the nucleation of the nanoparticles. The mixture was stirred for 20 min, and then the solution was aged at 50 °C under air for 2 h to improve the crystallinity of the L-cysteine capped Mn²⁺-doped ZnS QDs. Purification of the QDs was carried out by precipitation of the nanoparticles with ethanol in a centrifuge at 5000 rpm for 5 min (the procedure was repeated for 3 times). Finally, the QDs were dried under vacuum and stored under inert argon atmosphere as a water-soluble brown solid powder.

2.3. Sol–gel synthesis procedure for Mn:ZnS QDs immobilization

Based on previous studies carried out in our laboratory [26,27], sol–gels were synthesised by trapping QDs into the sol–gel matrix during the polymerization process. For this purpose, sol–gels were prepared by using different ratios of (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and tetramethoxysilane (TMOS) as silica precursors, ethanol and water as solvents, N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) to retain the nanoparticles covalently bound to the sol–gel matrix, and sodium hydroxide as catalizer for the polymerization process.

Reagents were added under constant stirring in the following order: 2.5 mL of ethanol was mixed with 1 mL of Mn:ZnS QDs in aqueous phosphate buffer pH 7.4. Then, 750 μL of APTES was added, and immediately afterwards 100 μL EDC was added. Finally, 750 μL of TMOS and 50 μL of sodium hydroxide 0.1 M were added to the recipient. After homogenization of the mixture, the polymerization process takes place and the mixture was left to dry for 2 weeks, until a constant weight is achieved. The xerogel obtained is grinded in

an agate mortar and a fraction between 200 and 250 μm is selected for further experiments.

2.4. Instrumentation

Phosphorescence and fluorescence spectra were performed on a Varian Cary Eclipse Luminescence spectrometer (Madrid, Spain), equipped with a xenon discharge lamp. In order to measure the solid sensing phase, the QDs-doped sol-gel fragmented particles were directly packed into a conventional Hellma luminescence flow-through cell made of quartz (Model 176.052-QS, Mullheim, Germany) of 1.5 mm of light path, as previously described [28]. A peristaltic pump (model Minipuls 2, Scharlab, Barcelona, Spain) was used to generate the flow of the carrier solution through the system. 0.8 mm i.d. PTFE tubes were used throughout the flow system. All measurements were made at constant temperature (20 °C) and atmospheric pressure.

3. Results and discussion

3.1. Immobilization of the phosphorescent QDs in a sol-gel matrix

During the development of the luminescent sensing materials for acetone detection, the phosphorescent QDs, prepared as described above, have been encapsulated into sol-gel matrices by trapping the nanoparticles into the sol-gel silica matrix during the polymerization process. Different synthetic routes reported in the literature for sol-gel immobilization of QDs resulted in undesirable heterogeneous matrix and problems of lixiviation of the nanoparticles from the sol-gel, with the subsequent loose of the luminescence (particularly important when the sol-gel was exposed to a water flow). In order to solve such low stability of the QDs-doped sol-gel materials different silica precursors can be used for the synthesis of the sol-gels.

In this context, since the phosphorescent Mn:ZnS QDs here employed are coated with a L-cysteine surface layer (for water solubilization), it was expected that the use of a precursor with an amino functional group might reduce the lixiviation of the QDs due to the generation of a covalent bond between the amino groups from the sol-gel precursors and the carboxylic functional groups from the L-cysteine.

For this purpose, different ratios of TMOS and APTES varying from 17:83 to 83:17, respectively, and an excess of the carbodiimide (100:1 ratio EDC:QD) for the synthesis of the sol-gels were employed and evaluated. During the sol-gel synthesis, 1 mL of the phosphorescent QDs (50 mg L⁻¹) were added to the polymerization mixture. From these studies, it was observed that the addition order of the reagents was significant in order to obtain homogeneous sol-gels with optimum spectroscopic characteristics.

Once the sol-gels were dried, crunched and grinded, the luminescence characteristics of the QDs-doped sensing materials were evaluated. To do that, the sol-gel particles were packed in the flow-cell, as detailed in Section 2, and luminescence excitation and emission spectra were registered. Photoluminescent measurements of the QDs-doped sol-gel materials packed in the flow-cell were carried out ensuring phosphorescent instrumental conditions, with a delay time of 0.1 ms and a gate time of 5 ms, and excitation and emission wavelengths at 290 and 590 nm, respectively. Fig. 1 shows the photoluminescence emission spectra of the QDs before and after being entrapped into the sol-gel matrix. As can be seen, the nanoparticles retain their optical properties after immobilization.

As mentioned before, the dry QDs-doped sol-gels were crunched and fragmented before used. Particles with diameters between 80 and 300 μm were selected using different sieves, and

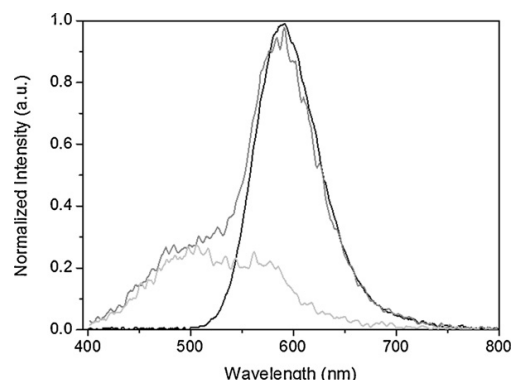


Fig. 1. Comparison of the emission spectra of Mn:ZnS QDs in solution (black line) and incorporated in the sol-gel (grey line). As it can be observed, no spectral shift of broadening of the luminescence emission has been observed. Light grey line is referred to the emission spectra obtained from the blank of sol-gel (inorganic matrix without quantum dots).

their phosphorescence emission compared. The optimum particle diameter size, selected for further experiments, was found to be between 200 and 250 μm , which is the size that provided a more stable and intense luminescent signal when compared to the other particle sizes evaluated. Smaller particle sizes can give rise to higher intensity signals; however they were discarded due to the significant problems of overpressure in the flow cell observed.

All of the different sol-gels synthesised, except those prepared with the highest and the lowest APTES amount assayed, showed a good behaviour in terms of stability, since no lixiviation of the QDs was observed for long periods. However, the prepared sol-gels showed different features in terms of maximum emission signal (even considering that all of the sol-gel materials were synthesised using the same amount of colloidal QDs in the polymerization mixture). Results showed that the most intense phosphorescence emission signal is obtained for a 57:43 (v/v) TMOS:APTES ratio, and as such ratio increases or decreases, the intensity of the emission is lower, suggesting that this is the best ratio. Nevertheless, in order to select the optimum sol-gel for the determination of acetone, the response of the different sol-gels to the presence of acetone was also evaluated. For this purpose, the change on the luminescence (quenching) observed for the different sol-gels when adding the same amount of acetone (2.5%) was measured. Results are shown in Fig. 2, where the ratio between the initial intensity (I_0) and the

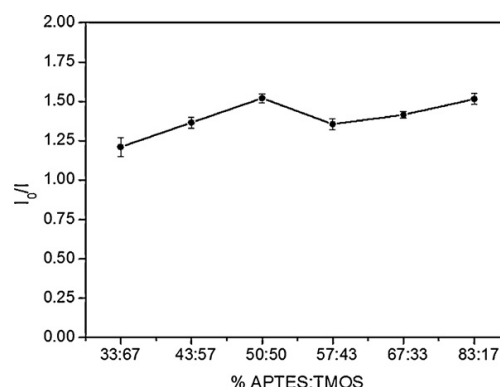


Fig. 2. Optimization of the APTES:TMOS ratio. Response of the different sol-gels to the presence of the same concentration of acetone.

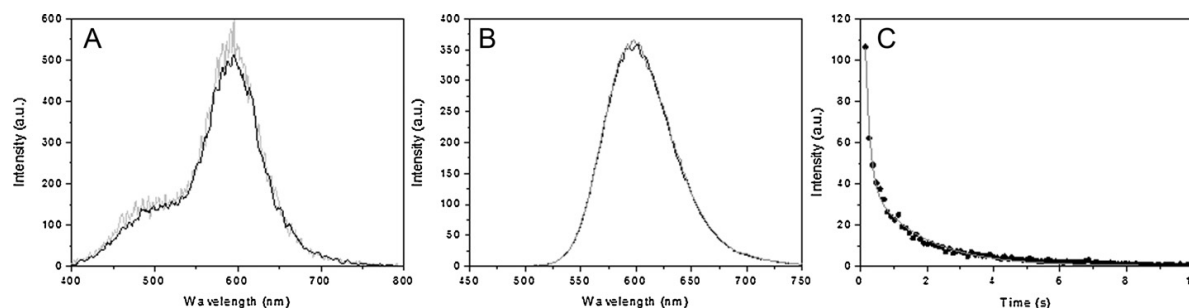


Fig. 3. (A) Comparison of the emission spectra of Mn:ZnS QDs entrapped in sol-gel matrix in absence (grey line) or presence (black line) of water carrier. (B) Phosphorescent signal of the sensing phase in the presence (black line) and absence (grey line) of dissolved oxygen in the carrier. (C) Lifetime of Mn:ZnS QDs immobilized onto the sol-gel matrix.

intensity in the presence of acetone (*I*) is represented for the different sol-gels. The highest change on the signal produced for the same concentration of acetone turned out to be for the sol-gel prepared from a 50:50 ratio (v/v) APTES:TMOS precursors ratio. Thus, taking into account the results obtained in both studies, a 50:50 (v/v) ratio of silica precursors was selected for further experiments.

3.2. Phosphorescent behaviour of QDs trapped in the sol-gels

Before analytical application of the sensing material, it was performed a detailed study of the emission characteristics of the QDs immobilized in the sol-gel matrix.

First of all, it is important to mention that, after synthesis of the doped sol-gel materials, they were initially exposed to a UV lamp (290 nm) for at least 1 h before use. Upon irradiation, the brightness from the entrapped QDs was gradually recovered to a stable level, and the stabilized emission profile was similar to that of the colloidal QDs in the original solution. This photoactivation was found to be always necessary and resulted in an increase of the measured luminescence providing us reliable and reproducible sensing phases for further studies. Although the mechanism which explains this photoactivation is not clear, it is thought that a reconstruction of the surface atoms of the nanoparticle or an optimization of surface-ligand passivation could take place leading to the observed enhancement of the measured luminescence [29]. In this context, during the first hour under a continuous excitation UV source an amplification of about 40% of the luminescence emission from the sol-gel sensing material has been observed until a constant value is reached.

Another important key factor when designing a sensing phase is the stability of immobilization of the sensing element in the solid matrix. In this sense, the stability of the signal was evaluated for long time periods. Results showed that phosphorescence emission of the QDs is not altered even after several hours of measurement in the flow system, which indicates that there is no lixiviation of the nanoparticles from the solid support as the carrier passes through the flow cell.

Thus, before using the sol-gels for acetone sensing they should be efficiently photoactivated. Once the sensing phase was appropriately photoactivated (a constant emission signal is observed with the irradiation time), no significant changes were observed in the luminescence emission properties from the Mn:ZnS QDs immobilized in the sol-gel for, at least, 1 year (maximum period evaluated).

The sol-gels obtained presented high luminescence signal in both, air and water flow keeping the main spectroscopic characteristics of the QDs such as no shift on the maximum emission wavelength and no broadening of the emission band (see Fig. 3A).

It is well known that traditional phosphorescence emission is affected by the presence of molecular oxygen, which acts as a

quencher of the emission. In order to evaluate the eventual effect of the presence of oxygen on the phosphorescence emission from the sol-gel sensing material, its luminescence was recorded when an oxygen-saturated water flow and a deoxygenated water flow (by argon bubbling) was passed through the sensing phase. As it can be observed in Fig. 3B, unexpectedly the phosphorescence emission from the Mn:ZnS QDs retained in the sol-gel material was not significantly modified in the presence or absence of dissolved oxygen. This is of course an advantageous feature when compared with traditional phosphorescence emission where removal of oxygen is mandatory [30].

Finally, the emission lifetime of the Mn:ZnS QDs immobilized onto the sol-gel matrix was evaluated and adjusted to a double exponential function, being the first and second lifetime components 0.1 and 1.6 ms, respectively (see Fig. 3C). Such long decay values are typical from a phosphorescence-type phenomenon.

3.3. Application of the sol-gel sensing material to acetone determination

The study of the interaction of different chemical species with the surface of colloidal QDs, widely reported in the literature, has revealed that luminescence properties of these nanomaterials strongly depends on their surface atoms and their environment [31]. In this sense, previous research carried out in our laboratory has demonstrated the strong effect of the presence in the Mn:ZnS QDs environment of acetone on the phosphorescence emission of the colloidal Mn:ZnS QDs. This was the bases of the sol-gel sensing material here synthesised.

First experiments to study the acetone effect on the luminescent signal of the phosphorescent QDs were carried out using the colloidal Mn:ZnS QDs in water media [32]. It was observed that the phosphorescence emission of the QDs decreased as microvolumes of acetone were added (a linear plot can be obtained through the representation of the Stern-Volmer equation). This quenching effect was attributed to the generation of an oxazolidone cycle, and further formation of an imine acting as an efficient electron acceptor. As consequence, an electron transfer process from the QDs to the imine produces a decrease on the measured phosphorescence [32]. The proposed quenching mechanism is based on the known role of acetone as electrophile group, and according to the nature of the surface-coating of the QDs with L-cysteine, which would give rise to the generation of an imine and, later, probably to a non-charged oxazolidone cycle. In order to prove such mechanism for acetone-quenching we have carried out RMN and IR experiments, but, unfortunately, without conclusive results. Therefore, Z-potential experiments were performed, and we could confirm that there is a change on the surface charge of the QDs, which is in agreement with the proposed mechanism.

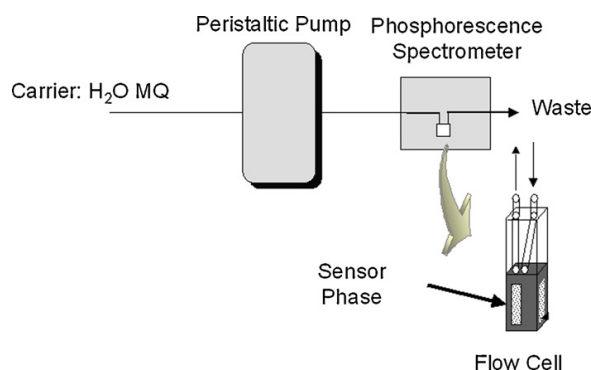


Fig. 4. Experimental set up used for all the measurements.

Considering that the quenching on the emission of the QDs is attributed to an interaction of the ketone group with the cysteine molecules that are in the surface of the nanoparticle, before the development and characterization of the sensing material, it was necessary to evaluate if the QDs signal is still affected by the presence of acetone when they are covalently immobilized inside the solid sol-gel matrix. To evaluate the effect of the exposure of the Mn:ZnS QDs when they were entrapped in the sol-gel matrices to acetone, a conventional flow system designed continuous monitoring of acetone in water was designed (see Fig. 4). The synthesised sol-gel materials doped with the QDs were packed in a conventional flow through cell and the phosphorescence signal was continuously measured in a luminometer as described in previous papers [33,34]. The carrier employed for the measurements was Milli-Q water, and once the emission of the immobilized Mn:ZnS QDs was stable, increasing amounts of acetone dissolved in water were injected in the system. As discussed before, prior to the acetone exposures, the sensor were phototreated under 290 nm irradiation.

As it can be observed in Fig. 5, the QDs entrapped in the sol-gel matrix are capable to interact with acetone dissolved in the water flow (a growing quenching effect on the phosphorescence from the QDs entrapped in the sol-gel is observed in the presence of increasing concentrations of acetone). In fact, it was observed that the response of the active sensing phase was linear in a wide range of acetone concentrations. Furthermore, an advantageous feature is that the emission signal is recovered to the base line without the addition of any regenerator, which makes the sensing phase

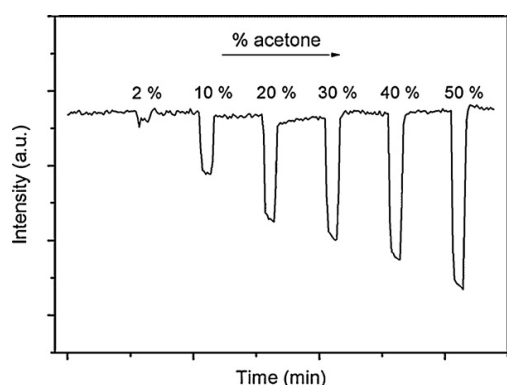


Fig. 5. Effect of increasing concentrations of acetone in a water flow on the QDs immobilized on a sol-gel support.

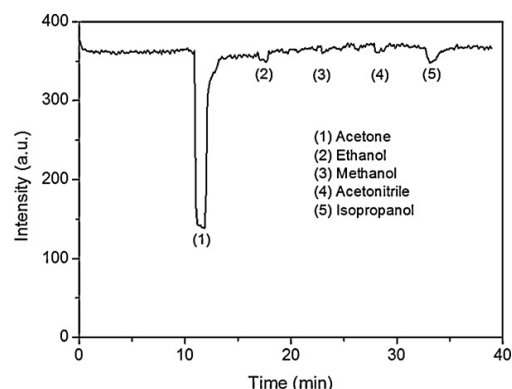


Fig. 6. Effect of acetone and other hydrocarbons (50% concentration) present in a water flow over the emission signal of the sensing phase.

suitable for the potential design of a reversible sensor for water dissolved acetone.

The analytical performance characteristics of the method were evaluated under optimum conditions. Calibration graphs were prepared from the results of triplicate measurements of acetone standard water solutions of increasing concentration from 0.5% (v/v) up to 50% (v/v). The detection limit, calculated as the concentration of acetone which produced an analytical signal 3 times the standard deviation of 10 injections of a blank, turned out to be 0.16% (v/v) of acetone dissolved in water. The precision of the proposed method was evaluated as the relative standard deviation of three replicates of a sample containing 1% and 20% of acetone and turned out to be $\pm 0.3\%$ and $\pm 0.2\%$, respectively.

It is important to mention that most of the analytical procedures for acetone determination are based on relatively complex and tedious chromatographic methods, which also require previous derivatization steps, allowing high sensitivity and selectivity. Moreover, other procedures have been also described for the determination of carbonyl compounds in water samples based on spectrophotometry, fluorimetry and chemiluminescence. However, we propose a screening method to detect ketones in water samples, using acetone as a model analyte. The proposed methodology is very simple and does not need any other sample treatment than a filtration to remove big solid particles.

Any eventual further application of the designed sensing phase for the determination of acetone should ensure that it is unaffected by the presence of other species that might be present in real samples. In this sense, other organic compounds including methanol, ethanol, 2-propanol, and acetonitrile have been evaluated. For this purpose, monitorization of the phosphorescent signal when solutions containing such organic compounds with concentrations up to 50% passed through the sol-gel matrix have been carried out. As it can be observed in Fig. 6, the presence of 50% acetone produces a quenching of the signal, but the aforementioned compounds do not quench the phosphorescence emission even at the maximum concentration assayed of 50% (v/v) in water.

3.4. Real sample application

The proposed phosphorescent QDs-based sol-gel sensing material was evaluated for the determination of acetone in natural water samples (mineral, tap, fountain and river water) following the general procedure. For this purpose, water samples were filtrated through a 0.45 μm filter.

Water samples, spiked with acetone at a concentration levels between 0.6% and 1%, were injected in the flow system, and the

Table 1

Real sample analysis. Each result corresponds to the mean of three samples that were previously spiked with known concentrations of acetone.

Type of sample	Acetone spiked (%)	Acetone measured (%)	Recovery (%)
Tap water 1	0.50	0.53 ± 0.03	106
Tap water 2	0.75	0.79 ± 0.08	105
Tap water 3	1.00	0.96 ± 0.03	96
Mineral water 1	0.75	0.8 ± 0.1	107
Mineral water 2	1.00	1.09 ± 0.02	109
Mineral water 3	1.00	1.01 ± 0.06	101
Fountain water	0.60	0.63 ± 0.02	105
River water	0.75	0.71 ± 0.03	95

signal was recorded as the acetone passed through the sensing phase following the general procedure. Table 1 collects the results for the phosphorescent determination of acetone. As it can be observed, good recoveries for the determination of acetone were obtained in all the samples thus indicating the suitability of the proposed methodology for direct analysis of acetone in different types of water samples.

4. Conclusions

In summary, a sensing material for dissolved acetone determinations in water samples has been synthesised and characterized. For such purpose, a very simple and general procedure for the immobilization of phosphorescent Mn:ZnS QDs in a sol–gel matrix has been described, keeping the luminescent features of the nanoparticles unaltered after immobilization. The acetone sensing phase is based on the measurement of the deactivation of the emission signal from phosphorescent Mn²⁺-doped ZnS QDs entrapped inside a sol–gel matrix in the presence of the analyte.

The proposed methodology is very simple, fast, selective and suitable for the measurement of the presence of dissolved acetone in different types of water including river and sea water, tap, fountain and commercial drinking water. In addition to the simplicity of the developed method, it presents the advantage of no reagents consumption once the sol–gels are prepared, since no reagents are needed in order to perform the measurement or to recover the emission signal of the sensing phase, thus enhancing the potential applicability of the proposed system for routine water acetone analysis.

Moreover, it has been demonstrated that several factors that have a strong influence over the classical phosphorescence emission do not modify the emission of the Mn:ZnS QDs, making this sensing phase very robust for real sample applications.

Acknowledgements

This work was supported by the project CTQ-2010-02309 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain). Emma Sotelo-Gonzalez acknowledges a grant (BP08-063) from Consejería de Educación y Ciencia of the Principado de Asturias.

References

[1] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A.P. Alivisatos, Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels, *Science* 281 (1998) 2013–2016.
 [2] A.M. Smith, S. Nie, Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots, *Analyst* 129 (2004) 672–677.
 [3] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels, *Nature Methods* 5 (2008) 763–775.
 [4] S.G. Penn, L. He, M.J. Natan, Nanoparticles for bioanalysis, *Current Opinion in Chemical Biology* 7 (2003) 609–615.
 [5] C.A.J. Lin, T. Liedl, R.A. Sperling, M.T. Fernandez-Argüelles, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, W.H. Chang, W.J. Parak, Bioanalytics and biolabeling with semiconductor nanoparticles (quantum dots), *Journal of Materials Chemistry* 17 (2007) 1343–1346.

[6] J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, The use of luminescent quantum dots for optical sensing, *Trends in Analytical Chemistry* 25 (2006) 207–218.
 [7] M. Koneswaran, R. Narayanaswamy, L-Cysteine-capped ZnS quantum dots based fluorescence sensor for Cu²⁺ ion, *Sensors and Actuators B: Chemical* 139 (2009) 104–109.
 [8] M.T. Fernandez-Argüelles, W.J. Jin, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Surface-modified CdSe quantum dots for the sensitive and selective determination of Cu(II) in aqueous solutions by luminescence measurements, *Analytica Chimica Acta* 549 (2005) 20–25.
 [9] J. Chen, A. Zheng, Y. Gao, C. He, G. Wu, Y. Chen, X. Kai, C. Zhu, Functionalized CdS quantum dots-based luminescence probe for detection of heavy and transition metal ions in aqueous solution, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 69 (2008) 1044–1052.
 [10] W.J. Jin, M.T. Fernandez-Argüelles, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Photoactivated luminescent CdSe quantum dots as sensitive cyanide probes in aqueous solutions, *Chemical Communications* 7 (2005) 883–885.
 [11] A.Y. Nazzari, L. Qu, X. Peng, M. Xiao, Photoactivated CdSe nanocrystals as nanosensors for gases, *Nano Letters* 3 (2003) 819–822.
 [12] M. Liu, L. Xu, W. Cheng, Y. Zheng, Z. Yan, Surface-modified CdS quantum dots as luminescent probes for sulfadiazine determination, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 70 (2008) 1198–1202.
 [13] Y. Yu, Y. Lai, X. Zheng, J. Wu, Z. Long, C. Liang, Synthesis of functionalized CdTe/CdS QDs for spectrofluorimetric detection of BSA, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 68 (2007) 1356–1361.
 [14] R. Bhargava, D. Gallagher, Optical properties of manganese-doped nanocrystals of ZnS, *Physical Review Letters* 72 (1994) 416–419.
 [15] R.N. Bhargava, Doped nanocrystalline materials—physics and applications, *Journal of Luminescence* 70 (1996) 85–94.
 [16] M. Wang, L. Sun, X. Fu, C. Liao, C. Yan, Synthesis and optical properties of ZnS:Cu(II) nanoparticles, *Solid State Communications* 115 (2000) 493–496.
 [17] R. Beaulac, P.I. Archer, D.R. Gamelin, Luminescence in colloidal Mn²⁺-doped semiconductor nanocrystals, *Journal of Solid State Chemistry* 181 (2008) 1582–1589.
 [18] R. Beaulac, P.I. Archer, X. Liu, S. Lee, G.M. Salley, M. Dobrowolska, J.K. Furdyna, D.R. Gamelin, Spin-polarizable excitonic luminescence in colloidal Mn²⁺-doped CdSe quantum dots, *Nano Letters* 8 (2008) 1197–1201.
 [19] A. Segura-Carretero, A. Salinas-Castillo, A. Fernández-Gutiérrez, A review of heavy-atom-induced room-temperature phosphorescence: a straightforward phosphorimetric method, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 35 (2005) 3–14.
 [20] V.B. Kandimalla, V.S. Tripathi, H.X. Ju, Immobilization of biomolecules in sol–gels: biological and analytical applications, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 36 (2006) 73–106.
 [21] A. Brega, P. Villa, G. Quadri, A. Quadri, C. Lucarelli, High-performance liquid chromatographic determination of acetone in blood and urine in the clinical diagnostic laboratory, *Journal of Chromatography* 553 (1991) 249–254.
 [22] N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Determination of short-chain carbonyl compounds in drinking water matrices by bar adsorptive micro-extraction (BAMe) with in situ derivatization, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398 (2010) 3155–3163.
 [23] D.L. Giokas, G.Z. Tsogas, A.G. Vlessidis, On-line derivatization coupled to flow injection permanganate chemiluminescence detection of total carbonyl compounds in natural waters and drinking water, *Analytica Chimica Acta* 651 (2009) 188–195.
 [24] E.D. Hudson, D. Okuda, P.A. Ariya, Determination of acetone in seawater using derivatization solid-phase microextraction, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2007) 1275–1282.
 [25] Y. He, H.F. Wang, X.P. Yan, Exploring Mn-doped ZnS quantum dots for the room-temperature phosphorescence detection of enoxacin in biological fluid, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 3832–3837.
 [26] J.M. Costa-Fernandez, M.E. Diaz-Garcia, A. Sanz-medel, Sol–gel immobilized room-temperature phosphorescent metal–chelate as luminescent oxygen sensing material, *Analytica Chimica Acta* 360 (1998) 17–26.
 [27] A.M. Coto-Garcia, M.T. Fernandez-Argüelles, J.M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel, Entrapment of quantum dots in sol–gel matrices to develop sensing material based on fluorescence resonance energy transfer, *Chemical Communications* 144 (2009) 5454–5456.
 [28] R. Pereiro Garcia, Y.M. Liu, M.E. Diaz Garcia, A. Sanz-Medel, Solid-surface room-temperature phosphorescence optosensing in continuous flow systems: an approach for ultratrace metal ion determination, *Analytical Chemistry* 63 (1991) 1759–1763.
 [29] M. Valledor-Llopis, J.C. Campo-Rodríguez, F.J. Ferrero-Martín, A.M. Coto-García, M.T. Fernandez-Argüelles, J.M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel, Dynamic analysis of the photoenhancement process of colloidal quantum dots with different surface modifications, *Nanotechnology* 22 (2011) 385703.
 [30] T. Vo-Dinh, *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*, Wiley, New York, 1984.
 [31] L. Qu, X. Peng, Control of photoluminescence properties of CdSe nanocrystals in growth, *Journal of the American Chemical Society* 124 (2002) 2049–2055.
 [32] E. Sotelo-Gonzalez, M.T. Fernandez-Argüelles, J.M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel, Mn-doped ZnS quantum dots for the determination of acetone by phosphorescence attenuation, *Analytica Chimica Acta* 712 (2012) 120–126.
 [33] B.S. Vicente de la Riva, J.M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Flow-through room temperature phosphorescence optosensing for the determination of lead in sea water, *Analytica Chimica Acta* 395 (1999) 1–9.

- [34] J. Rodríguez-Fernández, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Simple detector for oral malodour based on spectrofluorimetric measurements of hydrogen sulphide in mouth air, *Analytica Chimica Acta* 398 (1999) 23–31.

Biographies

Emma Sotelo-Gonzalez is a PhD student in analytical chemistry at the University of Oviedo. In December 2007, she joined the “Analytical Spectrometry” research group (University of Oviedo, Spain) headed by Prof. Alfredo Sanz-Medel. Currently, she is working under the supervision of Dr. Jose Manuel Costa-Fernández and Prof. Sanz-Medel on the line of research “Functional materials based on luminescent nanoparticles for the development of bioanalytical applications”.

Ana M. Coto-García is a Ph.D. Student in Analytical Chemistry at the University of Oviedo. In October 2006, she joined the “Analytical Spectrometry” Research Group (University of Oviedo, Spain) headed by Prof. Alfredo Sanz-Medel. Currently, she is working under the supervision of Dr. Jose Manuel Costa-Fernández and Prof. Alfredo Sanz-Medel on the line of investigation “Synthesis and solubilization of quantum dots: application to photoluminescent chemical sensors development”.

María Teresa Fernández-Argüelles is an assistant professor LOU in analytical chemistry at the Department of Physical and Analytical Chemistry of the University of Oviedo since March 2007. In September 2001, she joined the “Analytical

Spectrometry” research group (University of Oviedo, Spain) headed by Prof. Alfredo Sanz-Medel, where she obtained her M.S. in chemistry (analytical chemistry) in 2001 and her European PhD in chemistry in May 2008. She is co-author of 13 research articles and reviews, 3 book chapters in several books and two patents. Her research interests are mainly focused on the synthesis, surface modification, characterization and (bio)analytical application of semiconductor nanoparticles (quantum dots).

José Manuel Costa Fernández is a senior lecturer in analytical chemistry at the Department of Physical and Analytical Chemistry of the University of Oviedo (Spain). He is author or co-author of more than 80 research articles, several reviews, two patents and different chapters in several books. His research interests are mainly focused into instrumental development and application of photoluminescent techniques (fluorescence and phosphorescence) to the development of new bioanalytical methodologies and fiber optic (bio)sensors, based on nanomaterials.

Alfredo Sanz-Medel is full professor in analytical chemistry since 1982 and the Head of the “Analytical Spectrometry” research group (<http://www.unioviado.es/analyticalspectrometry>) at the University of Oviedo (Spain). He is author or co-author of more than 500 scientific publications in international journals, several patents, and books. His current research interests include new atomic detectors and ion sources for ultra-trace analysis, new molecular optical sensors (particularly those based on the use of MIPs and quantum dots), and hybrid techniques (coupling a separation unit and an atomic detector) for ultra-trace and trace metal speciation to solve biological and environmental problems and for proteomics. He has been an editor of analytical and bioanalytical chemistry since 2002.

**D.3 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE QUANTUM DOTS DE Mn:ZnS
RECUBIERTOS DE L-CISTEÍNA MEDIANTE ESTUDIOS *IN VITRO*.**

D.3.1 Introducción y objetivos

Como se ha puesto de manifiesto en la sección A.6 de la presente Memoria, en la actualidad, la incorporación de nanomateriales tanto en procesos industriales como en productos y bienes de consumo es una realidad que, además, ha supuesto un importante grado de desarrollo para los sectores científico-tecnológicos de la Nanociencia y la Nanotecnología.

En esta línea, los recientes avances en la síntesis y funcionalización de las nanopartículas han supuesto una verdadera revolución en el campo de la biomedicina, habiéndose desarrollado hasta la fecha numerosas aplicaciones bioanalíticas basadas en el empleo de nanopartículas (p. ej. para *imaging* de células y tejidos, transporte y liberación de medicamentos o detección de moléculas de interés). En este contexto, los quantum dots son un tipo de nanopartículas que resultan muy atractivos debido a su elevada área superficial y sus propiedades fotoluminiscentes, destacándose su elevada fotoestabilidad, sus anchos espectros de absorción y su capacidad para modular la emisión en función de su composición y tamaño.

Sin embargo, previamente a cualquier aplicación de un nuevo material a estudios *in vivo*, se precisa dar respuesta a ciertas cuestiones tales como la biocompatibilidad con los sistemas biológicos de los nuevos materiales y su eventual efecto tóxico. En este contexto, los QDs tradicionales y más estudiados (constituídos generalmente por un núcleo de CdSe o CdTe) están compuestos por átomos de metales pesados que junto con su reducido tamaño constituyen dos de los principales factores por los que pueden ser considerados potencialmente tóxicos para los organismos vivos. Con el fin de superar estas limitaciones se han propuesto varias alternativas. Por un lado, el empleo de recubrimientos superficiales más resistentes y biocompatibles. Por otro lado, los QDs dopados representan una alternativa ya que generalmente el semiconductor que compone el núcleo está libre de metales pesados, y presentan unas propiedades luminiscentes muy adecuadas para evitar los problemas de autofluorescencia de los medios biológicos como se remarcó en el capítulo anterior.

En este sentido, para estudiar la toxicidad inducida por nanopartículas, los ensayos *in vitro* resultan una herramienta muy interesantes porque principalmente, permiten reducir costes pero además controlar y reproducir fácilmente los ensayos seleccionados. Para estos ensayos, las células se exponen directamente a los QDs contenidos en el medio de cultivo celular para, posteriormente analizar parámetros relacionados con la internalización de las nanopartículas en las células y los efectos que se producen como consecuencia en los procesos celulares.

Por todo lo expuesto hasta el momento, el objetivo principal de este capítulo consiste en valorar la biocompatibilidad de los QDs de ZnS mediante estudios preliminares de toxicidad empleando un modelo de ensayo *in vitro*.

Cabe resaltar que para llevar a cabo este objetivo, previamente a abordar los estudios de toxicidad celular, resulta imprescindible la caracterización exhaustiva de los d-dots que se ha llevado a cabo en el primer capítulo de la presente Tesis Doctoral y que permite conocer parámetros, como el tamaño y la estabilidad de las NPs, que tienen gran importancia en la entrada de los QDs y en su comportamiento intracelular.

El desarrollo de este objetivo consta de las siguientes etapas:

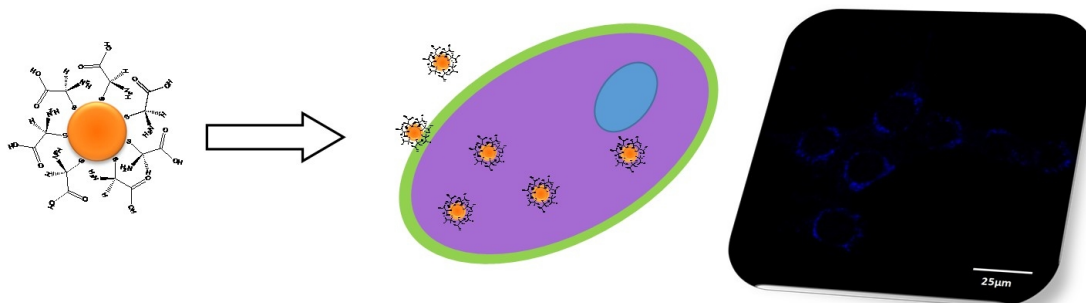
1. Evaluación de la entrada y localización de los d-dots en células mediante el empleo de microscopía confocal y la fosforescencia intrínseca de los d-dots.
2. Estimación de la concentración de quantum dots dopados contenida en el interior de las células mediante el empleo de ICP-MS como técnica de análisis elemental.
3. Estudio de los efectos citotóxicos producidos como consecuencia de la exposición a diferentes dosis de d-dots (diferentes concentraciones de QDs en el medio celular). Evaluación de cambios en las variables estudiadas: morfología, viabilidad celular y alteraciones del ciclo celular.

El artículo titulado: "*In vitro evaluation of the cellular uptake and toxicity of engineered L-cysteine capped Mn²⁺-doped ZnS quantum dots*" enviado para su publicación a la revista especializada en nanomateriales *Nanoscale* de la Royal Society of Chemistry resume el trabajo y conclusiones de los estudios destacados anteriormente para el tercer Capítulo de la Tesis.

D.3.2 Artículo científico V

Nanoscale, *enviado para publicación (Octubre 2013)*

Emma Sotelo-Gonzalez, Henar Muñoz-Cimadevilla, David Hevia, Maria T. Fernandez-Arguelles, Rosa Sainz, Juan Carlos Mayo, Jose M. Costa-Fernandez, Alfredo Sanz-Medel.



***In vitro* evaluation of the cellular uptake and toxicity of engineered L-cysteine capped Mn²⁺-doped ZnS quantum dots**

Emma Sotelo-Gonzalez^{a,‡}, Henar Muñoz-Cimadevilla^{b,‡}, David Hevia^{b,c,*}, Maria T. Fernandez-Arguelles^a, Rosa Sainz^{b,c}, Juan Carlos Mayo^{b,c}, Jose M. Costa-Fernandez^a and Alfredo Sanz-Medel^{a,*}

^a*Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad de Oviedo, E-33006, Oviedo, Spain.*

^b*Department of Cellular Morphology and Biology, Faculty of Medicine, Universidad de Oviedo, E-33006, Oviedo, Spain*

^c*Instituto Universitario de Oncología of Principado de Asturias (IUOPA), Oviedo, Spain*

[‡] Both authors contributed equally to this work

(*) corresponding authors

ABSTRACT

Metal-doped ZnS nanoparticles, exhibiting a phosphorescence-like emission, are currently used in several fields including biomedical applications, although no conclusive information on their eventual cytotoxicity is available.

Herein, possible cytotoxicity of such water-soluble phosphorescent nanoparticles, surface stabilized with cysteine molecules, has been investigated in detail. The behaviour of mouse embryonic fibroblast, NIH3T3, cells to the exposure to the Mn²⁺ doped ZnS QDs have been investigated using *in vitro* studies.

After incubation of the cells with different amounts of Mn:ZnS quantum dots at different exposure times, the cellular uptake and quantum dots location have been assessed and quantified. For all cases, quantitative values for the nanoparticle uptake by the cells are given.

Different complementary analytical techniques have been employed and obtained values are correlated with microscope images in which the uptake of the particles by the cells has been also investigated. Our data suggest that quantum dots are trapped in intracellular organelles and outside of the cell nucleus. The presence in the culture media of medium to high levels of QDs does not affect the morphology of the NIH3T3. However, after long exposure times to the QDs a severe cellular damage has been observed.

Keywords: *doped Quantum dots; Nanoparticles; Phosphorescence; in vitro toxicity.*

Introduction

Engineered nanoparticles (NPs) integrated with imaging modalities (such as photoluminescence) and therapeutic drugs are promising candidates for diseases diagnostics and therapy. Among the different types of nanoparticles available, the excellent optical properties exhibited by colloidal metal semiconductor nanocrystals (known as “quantum dots”, QDs) make them a highly valuable alternative to organic luminescent dyes for labelling biomolecules and for non-invasive and long-term imaging of tissues.^{1,2-3} However, while imaging of tumour cells has been the one major focus in engineering nanoparticle probes, biocompatibility of the nanoparticles and minimal toxicity are two crucial aspects to be considered before any eventual clinical application. Since nanoparticles are different from their respective bulk material due to their size, it is necessary to ask for potential risks arising not only from their chemical composition but particularly from their small size.

Traditional QDs are composed of atoms from the periodic groups II-VI, III-V or IV-VI.⁴ Their nanometric size and their inherent chemical composition, often comprising heavy metals like cadmium, lead or arsenic (which might be toxic if they are released in the cell media), have generated a great concern about the potential toxicity of this class of nanoparticles^{5,6}. To overcome these limitations, several different alternatives have been proposed, including the search for more biocompatible and robust QD coatings⁷ or the synthesis of semiconductor nanoparticles with cores made of less toxic agents (e.g. ZnS or ZnSe).^{8,9}

On the other hand, the intentional introduction of transition metal impurities in semiconductor nanocrystals (doped quantum dots, d-dots) is an attractive approach for tuning quantum dot photoluminescence emission.¹⁰ Particularly, doping ZnS quantum dots with Mn²⁺ (Mn:ZnS QDs) results in a phosphorescence-type emission, attributed to the incorporation of manganese ions within the nanocrystal structure. Mn:ZnS QDs photoluminescence properties include both, large Stokes shifts and longer lifetimes (better than traditional fluorescent QDs).¹¹ Hence, it is possible to avoid typical problems in biological and biomedical applications related to high autofluorescence backgrounds, affecting significantly to the sensitivity and selectivity of such bioanalytical applications.

Therefore, as compared to the conventional Cd-based QDs typically used as fluorescent labels, Mn:ZnS QDs are expected to be more suitable for bioimaging applications because, in addition to the inherent advantages of phosphorescence emission,

these nanoparticles are cadmium free, and therefore, they are expected to be less toxic.^{8,12} However, up to date, there are only very few studies, exhibiting contradictory results, dealing with the toxic effects of the exposure of cells to ZnS QDs.^{9,13-16}

Overall, *in vitro* studies are a common approach to evaluate the toxicity of any nanoparticle prior *in vivo* studies because these experiments are faster, cheaper and allowing a better control of the conditions than *in vivo* assessments.^{17,18} For *in vitro* studies, cultured cells are exposed to solutions containing nanoparticles and some parameters such as cell viability and biochemical processes involve in toxicity mechanism are assessed.¹⁷ Cytotoxicity depends on several parameters like incubation conditions (concentration of NPs and exposition time), cell line type, assays used and parameters evaluated.¹⁹⁻²¹

In this context, in the present work, we have studied the interaction of L-cysteine capped Mn²⁺ doped ZnS QDs on fibroblast cells in order to evaluate the potential toxicity effect of this type of nanoparticles. For this purpose, murine fibroblast cells (NIH3T3) were used as model to check *in vitro* toxicity as previous step to future animal studies. After cells exposition to L-cysteine Mn:ZnS quantum dots, we have assessed the internalization and the localization of the d-dots by confocal fluorescence microscopy and phosphorescence. The intracellular doped QDs concentration was estimated by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) monitoring both metals, manganese and zinc. In addition, *in vitro* cytotoxicity was evaluated. For this purpose, several complementary toxicological assays were carried out to obtain information about the cells responses after QDs interactions at different concentrations and exposition times.

Experimental

1. Synthesis of Mn:ZnS QDs

QDs were obtained following a procedure described by He *et al*²² with slight modifications. Typically, the capping agent L-cysteine (50 mL, 0.02 M), and the metallic precursors ZnCl₂ (5 mL, 0.1 M) and MnCl₂ (0.15 mL, 0.1 M) were mixed in a beaker and pH was adjusted with NaOH 1 M to pH 11. The solution was placed in a three-necked flask and deoxygenated in an argon atmosphere under continuous stirring for 30 min. Then, the sulfur precursor Na₂S (5 mL, 0.1 M) were swiftly injected into the solution to allow the nucleation of the nanoparticles. The mixture was stirred for 20 min, and then the solution was aged at 50 °C under air for 2 h to improve the crystalline structure of the

L-cysteine capped Mn:ZnS QDs. Purification of the QDs was carried out by precipitation of the nanoparticles with ethanol in a centrifuge at 5000 rpm for 5 min (the procedure was repeated for 3 times). Finally, the QDs were dried under vacuum and stored under inert argon atmosphere as a water soluble brown solid powder.

2. Characterization of the Mn²⁺ doped ZnS QDs

The morphology and nanostructure of doped QDs were characterized with a high resolution transmission electron microscope (HR TEM) JEOL JEM 2100 (Tokyo, Japan) and advance diffractometer (Bruker AXS, Karlsruhe, Germany). FT-IR spectra were collected in a Varian 670 IR FT-IR spectrometer using attenuate total reflectance measurements. Z-potential was measured with a Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom) using colloidal QDs in aqueous solution.

3. Study of the interaction of doped QDs and NIH3T3 cells

3.1. Cell growth and viability assays. Cell growth was evaluated by Hoechst staining. Cells were seeded in a 96 well plates at a density of 25,000 cells mL⁻¹ of complete media. They were allowed to attach overnight and then incubated with the adequate treatment for the times indicated. After 48 hours, media was removed and cells were frozen at -80°C. After thawing, 100 µL of ddH₂O was added to each well and cells were incubated 1 hour at RT. After that, cells were frozen once more to ensure cell lysis. Finally, cells were incubated with 20 µg/mL of Hoechst 33258 in TNE buffer (10 mM Tris pH 7.4, 2 M NaCl) for 1 hour at 37°C. Fluorescence was measured in an automatic microplate reader (µQuant, Biotek, Winooski, VT, USA) at 350 nm excitation / 460 nm emission filters. Results are shown as the media of six independent samples.

Cell viability determination was evaluated by MTT reduction assay. Briefly, 2,500 cells per well were seeded in 96-multiwell plates. Cells were left to attach overnight and incubation with several concentrations of freeze-dried beer. Forty-eight hours later, MTT from a stock solution (5 mg mL⁻¹ in H₂O) at a final concentration of 1 mg mL⁻¹ was added. Plates were incubated 4 hour at 37°C. Lysing buffer (20% SDS, 50% N,N-dimethylformamide, pH 4.7) was added and cells were incubated overnight at 37°C. Samples were read on automatic microplate reader (µQuant, Biotek, Winooski, VT, USA) reader at a wavelength of 570 nm. Results are shown as the media of six independent samples.

3.2. Cell cycle analysis. Cells were seeded in 100 mm dishes and cultured in DMEM supplemented with 10% FBSch. After harvesting, cells were stained with 500 μL propidium iodide (PI) staining solution ($100\mu\text{g mL}^{-1}$ PI, 1000 Kunitz RNase–DNase free in DPBS plus glucose) for 30 minutes at room temperature in darkness. At least, 20,000 nuclei were analyzed by using a Becton–Dickinson Immunocytometry Systems FACStar Plus flow cytometer, equipped with an argon-ion laser.

3.3. Immunoblotting. After being treated, the cells were washed with ice-cold PBS and lysed in RIPA lysis buffer containing 1 mM dithiothreitol and the protease inhibitors 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ leupeptin, 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aprotinin, and 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pepstatin and 200 μM sodium orthovanadate and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Total protein lysates were clarified by centrifugation at 13,000 g for 15 min at 4 °C and protein was quantified using Bradford reagent. Protein was subjected to SDS–PAGE and electrophoretic transfer to polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). The following antibodies were used: Anti-Bcl2 (Calbiochem, Merck Chemicals Ltd, Nottingham, UK), Anti-BAX (Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, California, USA) Calbiochem), proliferation cell nuclear antigen (PCNA, Santa Cruz Biotechnology). Primary antibodies were visualized by binding of horseradish peroxidase-conjugated antimouse (Calbiochem), or anti-rabbit (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) secondary antibodies and detected with chemiluminescence substrate (Millipore). Blots were scanned (300 dpi gray scale).

3.4. Fluorescence microscopy. NIH3T3 cells were grown on Thermanox coverslides inside plates. After treatment, cells growth out of cover slides were used to trypan blue assay and cells growth inside cover slides were used to fluorescence microscopy. So, for trypan blue assay, cells after tripsinization were stained with trypan blue (Sigma-Aldrich, USA) and counted in a hemacytometer (Hausser scientific, Horsham, PA) under microscope (Leica Microsystem Gmbh). After treatment, confocal microscopy (Leica TCS AOBS SP2)-40x objective (NA 1.25-0.75) was used to acquire images of coverslides.

3.5. Evaluation of QDs uptake. The QD solution was removed from the plates and the cells were washed twice with PBS to remove any extracellular QDs. Once obtained the

cellular pellet, cells were counted by hemocytometer and lysed in cold water by two cycles of freeze-thaw, in the last cycle the complete lysed was checked under microscopy.

All phosphorescent measurements were performed at room temperature with a 50 μ L quartz cuvette (Hellma, Germany) on a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrometer (Madrid, Spain). Quantum dots were excited at a wavelength of 300 nm and photoluminescence was collected at optimized phosphorescence instrumental conditions, with a delay time of 0.1 ms and a gate time of 2 ms. Excitation/emission slits were set on 20/20 and 700 V of PMT power.

Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) measurements were carried out on a high resolution double focusing ICP-MS Element 2 (Thermo Scientific, Bremen, Germany). Equal number of cells (45.000 cells) were subjected to elemental analysis by inductively coupled mass spectrometry. Prior to ICP-MS measurements, QDs digestion is required. The samples were digested with 1 mL of subboiled nitric acid 1:2 (v/v). By monitoring the isotopes 66 and 55 of Zn and Mn, respectively, the concentration of QDs was determined. Ga-71 was used as an internal standard.

For the estimation of cell volume, NIH3T3 cells were processed according to a new protocol previously developed in our laboratory. Briefly, coverslips were placed inside culture dishes (6 well-plates, BD Biosciences, New Jersey, USA). Then, cells were seeded at 5×10^4 cells ml^{-1} and let to further attach for 48h inside incubator. Coverslips (Menzel-Gläser, Germany) were washed with 2 ml of fresh complete RPMI medium containing 0.2% FBS. Then, 20 μ l of acridine orange (1 mg/ml) was added to each well plate and stained for 10 minutes at RT. After that, each coverslip with cells attached were placed upside-down on a clean slide. After mounting, cells were observed under confocal microscopy. Series of 1 μ m depth consecutive images were captured with a 40x objective in a confocal microscopy (Leica TCS AOBS SP2, Germany) and stored for further processing. Signal was detected at 506-590 nm. To ensure reproducibility, same process as described was repeated until a minimum of 100 cells were analyzed. Then images were processed by using '3D Imaris' software and all geometric parameter were acquired by computer.

Results and discussion

1. Morphological and luminescent characterization of Mn:ZnS QDs

L-Cysteine capped Mn:ZnS QDs were obtained in the laboratory by following a synthetic route described in the Experimental section. The nanoparticles synthesised were morphologically and chemically characterized because the quantum dots-cell interaction and the further mobility and biodistribution of the d-dots depends on several factors including the size and surface coating properties and the formation of agglomerates which can result in local accumulations or sedimentation.²³

First of all, the size of the nanoparticles has been estimated using transmission electron microscopy (TEM). Figure 1a shows a high resolution TEM image of Mn:ZnS QDs disperse in water solution with a rather uniform nanoparticle size (3.5 ± 0.5 nm) and spherical shape.

X-ray diffraction patterns obtained from QDs powder are given in Figure 1b. The diffraction peaks can be indexed as crystalline cubic ZnS phase (blende) though a small percentage of another nanostructure is generated during the doping process with Mn.²⁴

FT-IR spectroscopy was also performed in order to obtain information about the QDs coating. The FTIR spectra of the L-Cysteine molecules and Mn:ZnS QDs (showed in Fig. 1c) confirms that L-cysteine is attached to the surface of QDs through the thiol group, due to the great affinity between sulphur and metal ions like Zn. Thus, QDs solubility is owed to the orientation of free carboxylic and amine groups of the ligands to the solution phase. The orientation of the capping agents has been further confirmed by measurements of the Z-potential of the d-dots. At acidic pH media (5.5), solutions containing Mn:ZnS QDs exhibit a positive and high value Z-potential (+24 mV) confirming the presence of positive charges on the surface of the QDs, due to the protonation of the amine group. Moreover, such high Z-potential value certifies the high stability of the d-dots in colloidal aqueous solutions.

The photoluminescence spectra of Mn:ZnS QDs are shown in Fig. 1d. An intense emission peak at 590 nm is observed, which corresponds to the well-known energetic transitions from Mn (${}^4T_1-{}^6A_1$). The emission measurements were carried out ensuring phosphorescence instrumental conditions (emission was registered at a delay time after excitation). Fluorescence emission from the doped-QDs (typical from the ZnS core, centred on 420 nm) is also observed. However, such fluorescent emission is very weak

as a result of the highly efficient doping process of d-dots (Mn incorporation in the nanocrystal produces a fluorescence quenching effect).

Elemental composition of the doped QDs was determined by using elemental inductively coupled mass spectrometry (ICP-MS). The isotopes of the elements that eventually constitute the nanoparticles, e.g.: ^{32}S , ^{66}Zn and ^{55}Mn were measured confirming the presence of core components, Mn, Zn and S, in the nanoparticles. Moreover, quantification of the Zn amount by ICP-MS allowed the quantitative determination of Mn:ZnS QDs present in samples used as culture media.

2. Cellular uptake and localization

Intracellular location of QDs should be evaluated for estimation of the cell toxicity.²⁵ Nevertheless, both localization and quantification of NPs uptake in cells presents significant analytical challenges. Therefore, three different strategies were used here in order to obtain such crucial information about the extent of doped QDs taken up by cells as well as their intracellular distribution.

The intrinsic luminescence of the doped QDs was used to identify the intracellular localization of Mn:ZnS QDs in mouse embryonic fibroblast NIH3T3 cells after 24, 48 and 72 hours of exposure via fluorescent imaging using confocal laser scanning microscopy. The QDs concentration used in this experiment was the highest assayed ($8.1\ \mu\text{M}$) to ensure a detectable emission signal from QDs present inside cells. The confocal fluorescence images of d-dots observed in Fig. 2 indicated that already only after 24 hours of incubation (2B), nanoparticles were located inside the cells and randomly distributed through the cytoplasmic area. No specific interactions with sub-cellular organelles have been observed nor their presence inside nucleus. These data are in concordance with previous results obtained in murine and rat cells with CdTe QDs.²⁵ Interestingly, after 48 hours (2C), images show that doped QDs are predominantly accumulated around the perinuclear area. During the first 48 hours, NIH3T3 cells show a normal morphology although they grow less than control cells. When exposition time is prolonging to 72 hours, a high cellular death was observed (the emission of subcellular fragments containing d-dots is shown in Figure 2D). Previous reports about toxicity of ZnS QDs in human endothelial cells (EA hy926) have shown that these QDs are not toxic under $10\ \mu\text{M}$ at least when cells were cultured up to six days.²⁶ However in our experiments, we have observed that Mn:ZnS QDs in NIH3T3 cells are already toxic at a $8.1\ \mu\text{M}$

concentration level when these cells were cultured for 72h. It should be noted that the nanomaterials used in our studies exhibit limited long term stability due to the unstable surface coating (mono-thiol alkyl ligands). This instability could be even higher in complex biological media. Therefore, any measurable deleterious effects on cell viability could be attributed to the surface coating (e.g. detachment of the ligands and aggregation in the cell media) and not to the QD core itself.

Another approach carried out to evaluate the uptake of quantum dots was to measure the phosphorescence emission of the nanoparticles, avoiding the interference of cell autofluorescent backgrounds. In these experiments the phosphorescence intensity from the doped QDs was only used to provide qualitative information about QDs uptake by cells. Prior to analysis, cells were washed with PBS to remove non-internalized QDs from cell surface and then, RTP emission from all d-dots contained in lysed cells was measured. In this case it can be deduced from confocal images that all the QDs contributing to RTP emission come from cytosol.

Phosphorescence emission of cell samples was recorded after 1, 2, 4, 12, 18 and 24 hours of treatment. As it can be observed in Fig. 3, phosphorescence measurements of lysed cells allows to confirm the presence of Mn:ZnS QDs inside cells. Moreover, d-dots emission intensity increases upon more exposition hours so this fact indicate QDs are gradually taken up by cells over time. For the longer exposition times assayed (48 and 72 hours) the beginning of cellular death process was observed. Therefore, although phosphorescence emission was also registered, it was not represented in the scheme because it lacks of representatively (a high variability was observed in the registered signals).

In order to perform the quantification of the nanoparticles taken up by cells ICP-MS detection was selected, as it offers a high sensitivity (due to large number of metal atoms that can be detected per nanoparticle), high robustness and low matrix effects. The amount of Mn:ZnS quantum dots was measured monitoring the Mn and Zn contained in samples (cellular pellet and supernatant media) for each concentration of nanoparticles assayed (1.4, 2.7 and 5.4 μM) before the experiment and after 24 and 48 hours of incubation.

The results shown in Fig. 4 confirm that the nanoparticle uptake depends on the concentration of the QDs dose and the exposure time. Longer exposures were evaluated but results were discarded because although it appears that an increase in cellular uptake is occurring, in fact a trend in the data observed actually corresponds to an increase in cell

death.²⁷ By using a method previously reported in material and methods section NIH3T3 cell volume was estimated and therefore, we were able to calculate QDs concentration inside cells. These values were found to be in the micromol range. Concentration of QDs detected inside the cells after 48 hours was 5 times higher than at 24 hours. Furthermore, such concentration measurements seem to indicate that cells can actively incorporate QDs that are concentrated in the cytoplasm.

3. Cytotoxicity and cellular assays

A cytotoxicity assay was performed to evaluate whether QDs exposition to cells would eventually produce modifications at the cellular level (e.g. due to NPs interactions with cell components such as the membrane, mitochondria or nucleus). Since cytotoxicity of QDs was found to be dose dependent²⁸, therefore the *in vitro* studies were carried out ensuring a wide range of QDs concentrations used at different incubation times (24, 48 and 72 hours).

First, cell viability of NIH3T3 cells has been evaluated by analysing the metabolic activity of cells using MTT assay and results are shown in Figure 5a. For low exposure concentrations of d-dots (0.03-0.7 μM), at the initial stages of incubation, the presence of nanoparticles induce NIH3T3 cell proliferation rather than cell death. Conversely, long-time incubation times or high Mn:ZnS concentrations (even at the initial stages) induced a significant inhibition in cell proliferation. These long-term toxicity could be explained as result of an internal accumulation nanoparticles by NIH3T3 cells. Furthermore, trypan blue exclusion technique showed a high viability in the first 48h, even when high concentrations of QDs were used.

It is interesting to note that, conversely to other QDs with Cd cores, in our experiments with Mn:ZnS no significant changes in cell morphology or structure were observed after 48 hours of incubation time even at the highest concentrations used here.

Cell cycle and protein expression studies were carried out to confirm previous information obtained by MTT assay and to provide further information about cellular process when QDs are used in high concentration in culture medium of NIH3T3. Cell cycle showed a significant halt in S phase at 24 hours and lower at 48h after treatment with 5.4 μM of QDs (Fig 5b). This is further confirmed by high levels of PCNA protein at 24 hours (Fig 5c). However after 72 hours of treatment, a sub-G0 phase appears thus indicating of apoptosis events. Both anti-apoptotic (Bcl2) and pro-apoptotic (BAX) proteins levels were analysed by western blotting. Ratio of BAX/Bcl2 is 4 times higher

at 48 hours of treatment than in control cells. This result confirms that apoptosis event occurs when NIH3T3 cells are treated with high concentration of QDs.

Conclusions

We propose the use of confocal microscopy, phosphorescence spectrometry and ICP-MS to motorize colloidal Mn-doped QDs (stabilized with L-cysteine) uptake in NIH3T3 cells and to screen the eventual NPs toxicity.

We highlighted that cytotoxicity results can be better understood, thus more correctly interpreted, when combined with cell interaction studies by confocal images and ICP-MS techniques. In our work, confocal analysis showed that exposure of NIH3T3 cells to the colloidal Mn:ZnS QDs results in an internalization of the nanoparticles inside the cells, after only few hours. The quantum dots were trapped in intracellular organelles and outside of the cell nucleus. Moreover, the QDs uptake was quantified by ICP-MS, revealing that the total Mn content in cells (from the Mn:ZnS QDs) increased in a time-dependent manner without reaching a plateau in the first 24 h.

Moreover, our results revealed cytotoxicity only in cells treated for at least 72 h with the Mn:ZnS QDs, while no cytotoxic effects was found in cells exposed to medium-high levels of QDs (not significant damage of the morphology of the NIH3T3 cells was observed).

Finally, cell cycle analysis of NIH3T3 cells after QDs treatment lead to NIH3T3 cells arrested in S phase which is consistent with the results obtained from proliferation assays.

Aknowledgements

This work was supported by the project CTQ-2010-02309 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain). Emma Sotelo-Gonzalez acknowledges the predoctoral grant (BP08-063) from Consejería de Educación y Ciencia del Principado de Asturias (Spain).

References

- 1 A.M. Coto-Garcia, E. Sotelo-Gonzalez, M.T. Fernandez-Argüelles, R. Pereiro, J.M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **399**, 29-42.
- 2 D.V. Talapin, J.-S. Lee, M.V. KOvalenko, E.V. Shevchenko, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 389-458.
- 3 J.A. Barreto, W. O'Malley, M. Kubeil, B. Graham, H. Stephan, L. Spiccia, *Adv. Mater.*, 2011, **23**, H18-H40.
- 4 J.M. Costa, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**, 207-218.
- 5 R. Hardman, *Environ. Health Perspect.*, 2006, **114**, 165-172.
- 6 K.M. Tsoi, Q. Dai, B. A. Alman, W.C.W. Chan, *Accounts Chem. Res.*, 2013, **46**, 662-671.
- 7 H. Kobayashi, N. Kosaka, M. Ogawa, N. Y. Morgan, P. D. Smith, C. B. Murray, X. Ye, J. Collins, G. A. Kumar, H. Bell, P. L. Choyke, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 6481-6484.
- 8 N. Pradhan, M.B. David, Y. Liu, X. Peng, *Nano Letters*, 2005, **7**, 312-317.
- 9 K. Manzoor, S. Johny, D. Thomas, S. Setua, D. Mnenon, S. Nair, *Nanotechnology*, 2009, **20**, 065102 (13pp).
- 10 H. Yang, S. Santra, P.H. Santra, P.H. Holloway, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2005, **5**, 1364-1375.
- 11 E. Sotelo-Gonzalez, M.T. Fernandez-Argüelles, J.M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **712**, 120-126.
- 12 R. Beaulac, P.I. Archer, D.R. Gamelin, *J. Solid State Chem.*, 2008, **181**, 1582-1589.
- 13 Y. Cao, H-J. Wang, C. Cao, Y-Y Sun, L. Yang, B-O Wang, J-G Zhou, *J. Nanopart. Res.*, 2011, **13**, 2759-2767.
- 14 J. Aswathy, S. Jahnvi, R.Krishna, K. Manzoor, S. Nair, D. Menon, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2011, **11**, 7611-7620.
- 15 H. Li, M. Li, W.Y. Shih, P.I. Lelkes, W-H. Shih, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2011, **11**, 3543-3551.
- 16 M. Gaceur, M. Giraud, M. Hemadi, S. Nowak, N. Menguy, J.P. Quisefit, K. David, T. Jahanbin, S. Benderbous, M. Boissiere, S. Ammar, *J. Nanopart. Res.*, 2012, **14**, 932-947.
- 17 B.J. Marquis, S.A. Love, K.L. Braun, C.L. Haynes, *Analyst*, 2009, **134**, 425-439.
- 18 N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, *Small*, 2008, **4**, 26-49.
- 19 S.J. Soenen, P. Rivera-Gil, J.M Montenegro, W.J. Parak, S.C. De Smedt, K. Braeckmans, *Nanotoday*, 2011, **6**, 446-465.
- 20 A. Elsaesser, C.V. Howard, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2012, **64**, 129-137.

- 21 J.L. Luque-Garcia, R. Sanchez-Diaz, I. Lopez-Heras, P. Martin, C. Camara, *Trends Anal. Chem.*, 2013, **43**, 254-268.
- 22 Y. He, H.-F. Wang, X.-P. Yan, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 3832-3837.
- 23 D. Lison, F. Huaux, *Nature Nanotechnology*, 2011, **6**, 332-333.
- 24 E. Sotelo-Gonzalez, L. Roces, S. Garcia-Granda, M.T. Fernandez-Arguelles, J.M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel, *Nanoscale*, 2013, **5**, 9156-9161.
- 25 J. Lovric, H.S. Bazzi, Y. Cuie, G.R.A. Fortin, F.M. Winnik, D. Maysinger, *J. Mol. Med.*, 2005; **83**, 377-385.
- 26 H. Li, M. Li, W.Y. Shih, P.I. Lelkes, W-H. Shih, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2011, **11**, 3543–3551.
- 27 R. Coradeghini, S. Gioria, C.P. Garcia, P. Nativo, F. Franchini, D. Gilliland, J. Ponti, F. Rossi, *Toxicol. Lett.*, 2013, **217**, 205-216.
- 28 A. Shiohara, A. Hoshino, K. Hanaki, K. Suzuki, K. Yamamoto, *Microbiol. Immunol.*, 2004, **48**, 669-675.

LEGENDS OF THE FIGURES

Figure 1 High resolution TEM image of Mn:ZnS QDs disperse in water solution; (b) X-ray diffraction patterns obtained from d-dots powder (the vertical lines denote the diffraction peaks of cubic zinc blende structure, JCPDS no. 05-0566); (c) FTIR spectra of the L-Cysteine amino acid (purple line) and the L-cysteine capped Mn:ZnS QDs (grey line); (d) Absorption (dark grey line) and phosphorescence emission (light grey line) spectra of Mn:ZnS QDs.

Figure 2. Confocal fluorescence images of NIH3T3 cells incubated without (a. control) and with Mn:ZnS QDs for b) 24 h, c) 48 h and d) 72 h of exposition.

Figure 3. Phosphorescence emission intensities of cell samples recorded after 1, 2, 4, 12, 18 and 24 hours of treatment. The emission intensity was normalized with the cell number.

Figure 4. Levels of QDs (pmol) detected inside the NIH3T3 cells incubated with Mn:ZnS QDs for 24 and 48 at three different concentration levels.

Figure 5. (a) Cell viability of NIH3T3 cells evaluated by analysing their metabolic activity using a MTT assay, (b) Cell cycle and protein expression studies, (c) Western Blot analysis of PCNA, BAX and Bcl2 in NIH3T3 cells after 24 and 48 hours of exposition.

Figure 1

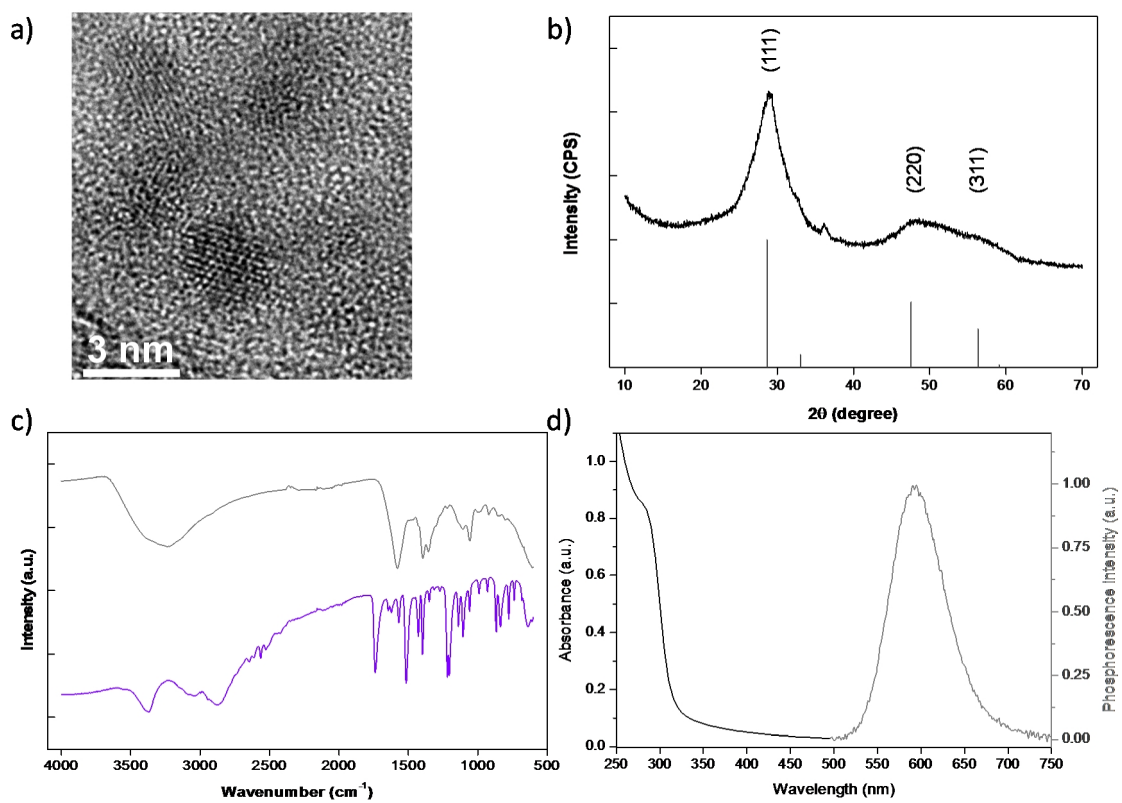


Figure 2

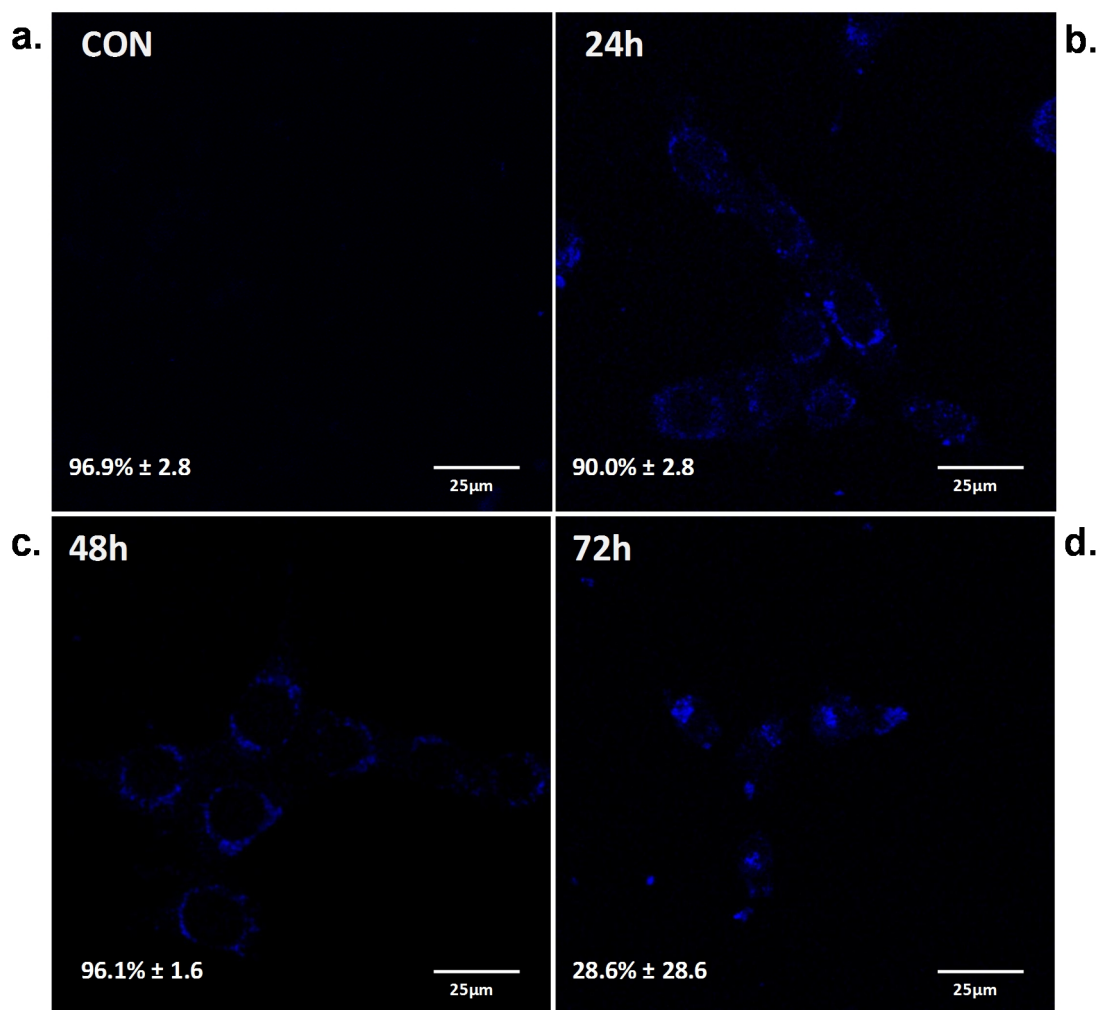


Figure 3

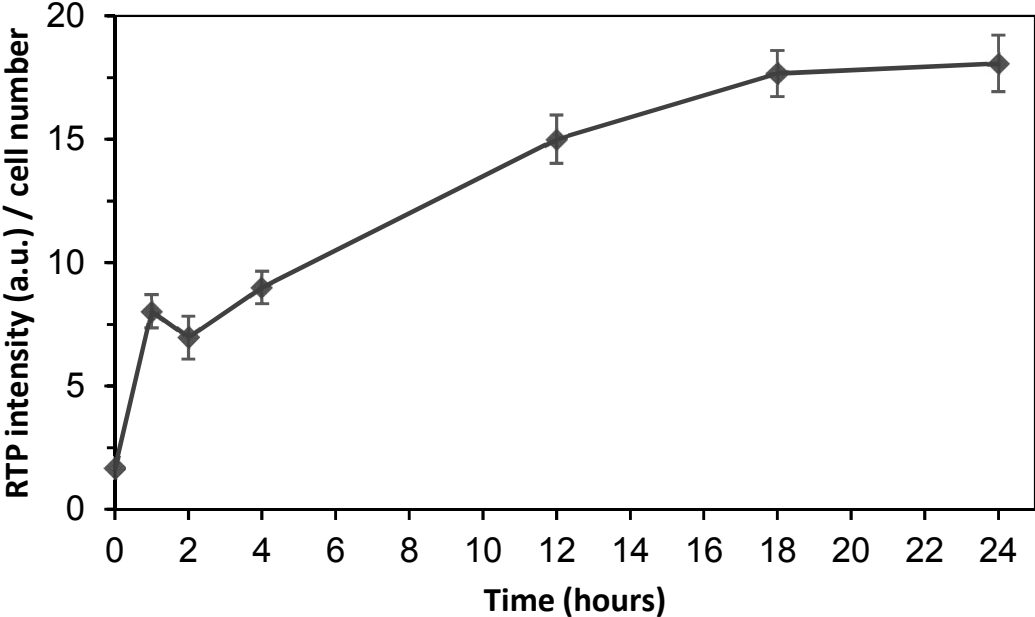


Figure 4

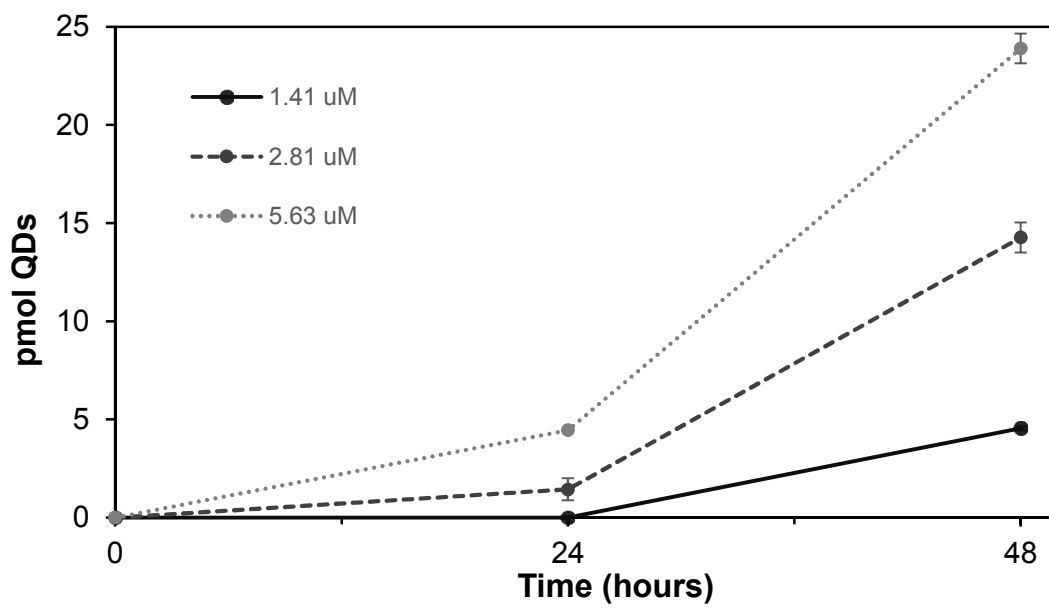
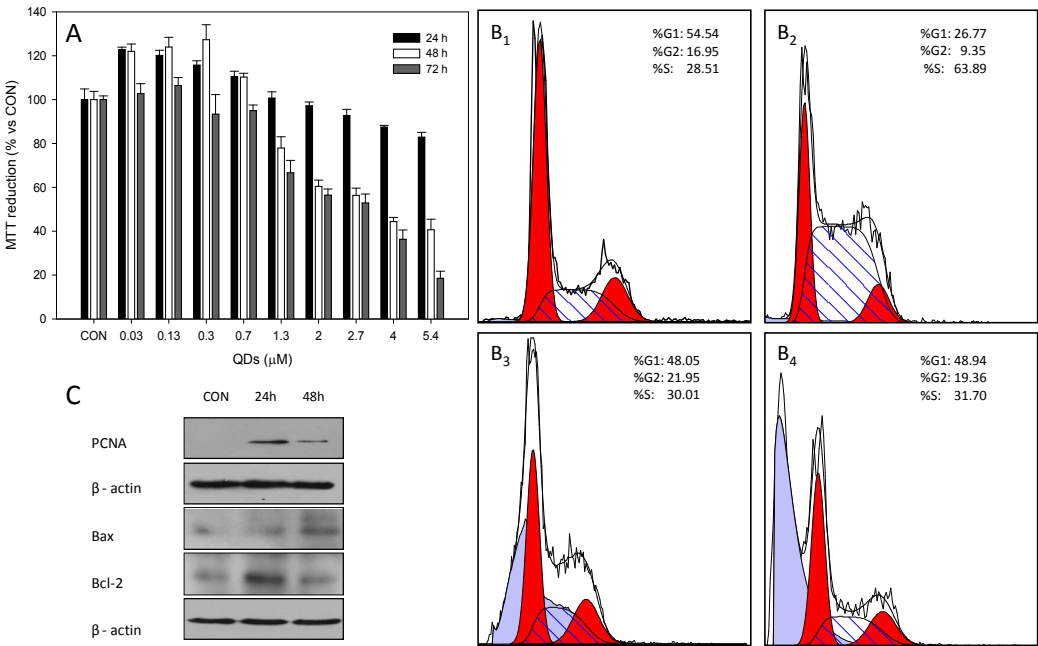


Figure 5



E. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de la presente Tesis Doctoral pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Se ha llevado a cabo la síntesis de quantum dots de sulfuro de zinc dopados con manganeso (QDs de Mn:ZnS) modificando la relación atómica de Mn respecto a Zn empleados en la mezcla de precursores. Las nanopartículas sintetizadas empleando una relación de 3 % (at. Mn:Zn) en la mezcla de precursores han sido las más apropiadas ya que presentan las mejores propiedades luminiscentes en cuanto a largos tiempos de vida y alta intensidad de emisión fosforescente, además de buena solubilidad en medios acuosos y alta pureza cristalina; por ello, se seleccionaron estas nanopartículas como las más apropiadas. Por otro lado, el empleo de la técnica de difracción de rayos X (XRD) ha permitido conocer que los d-dots cristalizan en la fase cúbica tipo blenda. Sin embargo, se ha observado que el incremento la relación Mn:Zn empleada durante el proceso de síntesis, da lugar a nanopartículas que presentan una menor solubilidad en medios acuosos y un empeoramiento de las características luminiscentes. Esto puede atribuirse a la existencia de una segunda nanoestructura que cristaliza en otra fase (considerada como una impureza) generada por el exceso de iones manganeso durante la síntesis.

2. Se ha llevado a cabo una caracterización exhaustiva de los QDs de Mn:ZnS estudiados en la presente Tesis Doctoral. La combinación de técnicas de microscopía electrónica y de fuerza atómica ha permitido conocer la morfología de las nanopartículas, que presentan forma de esfera con diámetro de nanopartícula de 3.5 nm. Se ha confirmado la disposición de las moléculas de L-cisteína (ligando superficial) en torno al núcleo de la nanopartícula y se ha comprobado la estabilidad coloidal mediante medidas de potencial Z. Asimismo, se ha confirmado la composición elemental de las nanopartículas mediante medidas de EDX. Además, se ha empleado el ICP-MS como herramienta para la cuantificación de la composición elemental de los d-dots. Estas medidas han permitido conocer la relación molar entre manganeso y zinc en las nanopartículas

Por otro lado, se han estudiado las propiedades luminiscentes de los QDs de Mn:ZnS mediante medidas de su emisión fluorescente, fosforescente y tiempo de vida media del proceso luminiscente. Las medidas de fosforescencia han confirmado la presencia de los iones dopados en un entorno adecuado ya que se observa la emisión característica de la transición debida al manganeso en torno a 590 nm. Igualmente se ha realizado un estudio de aquellas variables que típicamente afectan la emisión de las moléculas fosforescentes. Únicamente se ha observado

que la luminiscencia de los d-dots se ve afectada por el pH del medio, aunque esta influencia se debe al efecto del pH sobre los ligandos superficiales que recubren los quantum dots.

3. Se ha diseñado una metodología sencilla para la determinación de acetona (como analito modelo) en muestras reales (aguas contaminadas y en orina) basada en medidas de la desactivación de la emisión fosforescente de los QDs de Mn:ZnS como consecuencia de la interacción directa entre el analito de interés y los QDs presentes en el medio de análisis. Además se ha propuesto un mecanismo que explica el efecto de la acetona sobre las moléculas de L-cisteína, que actúan como ligandos superficiales en los d-dots, responsable del proceso de desactivación de la emisión fosforescente de los mismos (señal analítica registrada).

4. Se ha llevado a cabo la inmovilización de QDs de Mn:ZnS en una matriz inorgánica sol-gel para desarrollar una nueva fase sensora fosforescente, basada en la metodología puesta a punto anteriormente en nuestro Grupo de Investigación. Se han examinado las propiedades luminiscentes de la fase sensora obtenida y se ha evaluado su aplicabilidad para la detección y monitorización de acetona en muestras acuosas, comprobado la selectividad de la misma frente a otros compuestos orgánicos que podrían interferir en el análisis de las muestras reales.

5. Se han iniciado estudios dirigidos a conocer el comportamiento de los QDs de Mn:ZnS en medios celulares. La investigación se centró por un lado en la evaluación de la entrada y localización de las nanopartículas tras la exposición de cultivos celulares in vitro a las nanopartículas. Para ello, se empleó la luminiscencia intrínseca de los d-dots y se cuantificó su concentración intracelular mediante el empleo de ICP-MS. Por otro lado, se han estudiado los efectos producidos en las células como consecuencia de la exposición a los d-dots y se comprobó la dependencia entre la toxicidad inducida con la dosis de NPs (concentración de nanopartículas en los cultivos celulares) y el tiempo de incubación.

F. SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

A partir de los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral y considerando las conclusiones expuestas anteriormente, es posible sugerir algunas líneas de investigación futura en este campo, entre las que destacamos:

1. Evaluación de nuevas modificaciones superficiales de los QDs de Mn:ZnS para obtener una mejor estabilidad coloidal. En esta Tesis hemos evaluado las características de los QDs Mn:ZnS recubiertos con el aminoácido L-cisteína como ligando superficial. Empleando la estrategia de intercambio de ligandos sería posible lograr, de forma sencilla, otro tipo de modificaciones superficiales de la misma naturaleza pero que pueden otorgar mayor estabilidad coloidal a los d-dots, como ligandos bidentados (DHLA) o cadenas de polietilenglicol (PEG).

2. Empleo de los quantum dots de Mn:ZnS como indicadores pasivos. Las metodologías basadas en medidas de la emisión fosforescente resultan de especial interés en bioanálisis ya que minimizan problemas típicos de la fluorescencia tales como los altos fondos espectrales debido a la autofluorescencia de los medios biológicos. Sin embargo, el empleo de los d-dots como marcas fosforescentes en aplicaciones bioanalíticas requiere su conjugación a elementos de reconocimiento apropiados selectivos al analito de interés. Los recubrimientos empleados para solubilizar los quantum dots ofrecen además, la versatilidad necesaria para permitir la conjugación de biomoléculas que actúen como elementos de reconocimiento. Aunando las excepcionales características luminiscentes de los quantum dots dopados con manganeso y la selectividad hacia el analito proporcionado por el elemento de reconocimiento se puede desarrollar una herramienta versátil para su empleo tanto en la cuantificación de especies de interés como su empleo como marcas luminiscentes para el desarrollo de aplicaciones de *imaging* en medios biológicos.

3. Uso de la fase sensora basada en d-dots para la detección de compuestos volátiles. En la presente Tesis hemos demostrado las posibilidades que ofrece un soporte sólido tipo sol-gel y dopado con QDs para el desarrollo de un sensor sensible a la presencia de acetona en muestras acuosas. En la actualidad existe una fuerte demanda de sensores químicos con capacidad de reconocimiento rápido y específico, en particular de especies volátiles. Particularmente, la acetona es un compuesto altamente volátil cuya presencia debe ser controlada en ambientes de trabajo ya que está comprobado que puede producir efectos adversos para la salud. Por esta razón, se propone emplear la estrategia de dopaje de matrices sol-gel con nanopartículas fosforescentes para desarrollar fases sensoras para la monitorización de compuestos volátiles de la familia de las cetonas como método de screening sencillo, fiable y selectivo.

4. Estudio de la influencia de los ligandos superficiales en la toxicidad de QDs de Mn:ZnS.

Varios trabajos han demostrado que existe una fuerte relación entre la entrada de los QDs en las células y la carga superficial de los QDs. Además, la carga superficial también influye en la localización intracelular de las nanopartículas y en los procesos biológicos y moleculares que se produzcan en el interior celular. Por ello una posible línea de trabajo futura podría ir orientada hacia la realización de una comparación entre el comportamiento de d-dots modificados con L-cisteína y con ligandos superficiales alternativos. Este tipo de estudios podrían aclarar los mecanismos de entrada de los QDs en las células.

**G. INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO DE
LAS PUBLICACIONES PRESENTADAS**

De acuerdo con el Reglamento de los Estudios de Doctorado aprobado por el Consejo de Gobierno de la Universidad de Oviedo el 17 de Junio de 2013 (Boletín Oficial del Principado de Asturias, número 146 de 25-VI-2013), para presentar la Tesis Doctoral como compendio de publicaciones (artículo 27) la normativa exige incluir en la presente memoria “*un informe con el factor de impacto de las publicaciones presentadas junto con un detalle informativo sobre la calidad de las mismas, basado en el índice de impacto y la posición que ocupa la revista científica dentro de una determinada categoría*”. Dicho informe se recoge en la Tabla 3. Cabe destacar que todos los trabajos científicos derivados del trabajo realizado a lo largo de la Tesis Doctoral han sido publicados en revistas científicas internacionales de relevante prestigio, y además todas ellas se encuentran situadas dentro del primer cuartil de su campo.

Tabla 3. *Relación de publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral. Datos obtenidos del Journal Citations Reports®*

REFERENCIA	ÍNDICE DE IMPACTO	POSICIÓN
Nanoscale, 2013, 5, 9156-9161	6.233 (JRC 2012)	Química multidisciplinar (20/152) Nanociencia y Nanotecnología (12/69) Ciencia de los materiales, multidisciplinar (19/239)
Analytica Chimica Acta, 2012, 712, 120-126	4.387 (JRC 2012)	Química Analítica (7/75)
Sensors and Actuators B, 2012, 174, 102-108	3.535 (JRC 2012)	Química Analítica (11/75)
Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 399, 29-42	3.778 (JRC 2011)	Química Analítica (13/73)
Enviado para publicación a Chemistry of Materials, 2013	8.238 (JRC 2012)	Ciencia de los materiales, multidisciplinar (13/239)
Enviado para publicación a Nanoscale, 2013	6.233 (JRC 2012)	Química multidisciplinar (20/152) Nanociencia y Nanotecnología (12/69) Ciencia de los materiales, multidisciplinar (19/239)

H. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL

In-line measurement of dissolved acetone using a nanostructured optical sensor

M Valledor, JC Campo Rodriguez, F Ferrero Martín
 Dpto. Ingeniería Eléctrica, Electrónica C y S
 Universidad de Oviedo
 Gijón, Spain
 campo@uniovi.es

N Fernandez, E Sotelo, JM Costa, A Sanz-Medel
 Dpto. de Química Física y Analítica
 Universidad de Oviedo
 Oviedo, Spain
 jcostafe@uniovi.es

Abstract—In this paper we present a method for measuring dissolved acetone by employing a new sensor based on luminescent nanocrystals and a ratiometric measurement. The developed sensor shows an excitation peak at 280 nm and a long lived emission at 590 nm by adding Mn in the synthesis process. The sensor was immobilized in a low luminescent sol-gel matrix. In presence of acetone, the intensity of the long lived emission decreases; however, its decay time is always the same. A measurement method based on employing the luminescence of the solid support as reference is presented. Experimental results have been obtained using a deep UV-LED as the excitation light source and a lab prototype for measuring intensities and phase shifts using GPIB instruments.

Semiconductor nanoparticles; quantum dots; acetone; ratiometric; luminescence

I. INTRODUCTION

Luminescent semiconductor nanocrystals, also known as quantum dots (QDs), are a type of nanomaterials that presents fascinating optical and electronic properties. These novel materials are employed as high-valuable alternative luminescent materials over conventional organic fluorophores in numerous applications, such as direct analysis of ions, gases or other compounds such as proteins. Their nanometric size is the main responsible of their special features, including narrow and symmetric size-tunable emission spectra and high fluorescent yields [1-2].

Recently, it was observed that, if certain metal impurities are incorporated during nanoparticles synthesis, phosphorescent quantum dots could be obtained [3-4]. These nanoparticles show the same properties of common fluorescent QDs, but also the advantages offered by phosphorescence-type emission. The phosphorescent process is more selective, the excitation and emission wavelengths show largest Stock shift, and phosphorescent lifetimes are on the order of 10^4 – 10 seconds so the instrumentation needed is less complex.

Acetone is a highly volatile chemical reagent which is commonly analyzed in biological and environmental samples [5]. The presence of acetone in the media is considered as a weak pollutant but it may result from irritation of mucous membranes to problems in the central nervous system. In fact, acute and sub-acute effects have been reported when short-term exposures to relatively low gas concentrations of acetone.

Moreover, this is a metabolite present in low concentrations in mammals as a result of body fats degradation. Recently their use as a potential biomarker in biological samples –urine and blood- have been signalled when an increase of acetone levels involve diseases like Diabetes Mellitus or starving [6].

In this context, a procedure has been proposed for immobilization of the Mn-doped ZnS QDs synthesized in a sol-gel matrix. Sol-gel material is a type of solid support which exhibits an important number of advantages in terms of high rigidity, long-term stability, chemical inertness, optical transparency and low probability of leaching.

The synthesised sol-gel material was coupled to a prototype for the development of an in-line system for acetone sensing based on phosphorescent quantum dots and luminescent ratiometric measurements methods. The active phase is excited by means of a light emitting diode (LED) at approximately 280 nm, exhibiting an intense phosphorescence emission dependent on the Mn^{2+} concentration. The effect of acetone on the luminescence of the quantum dots immobilized in a sol-gel support was here studied in order to develop an electronic prototype to control the concentration of this analyte in liquid media.

The measurement principle of the developed laboratory prototype is based on a ratiometric measurement to allow the correction of unspecific experimental fluctuations that affect single-intensity measurements such as movements of the sensor, changes in the LED, variations in the optical path, etc.

II. SENSOR AND MEASUREMENT PRINCIPLE

Mn-doped ZnS QDs were synthesized via the procedure described in reference [4] with some slight modifications. The most important one consists of reducing the Mn^{2+} concentration during the synthesis process nearly 20 times. These nanoparticles show lifetimes of several milliseconds much longer than fluorescent QDs and strong phosphorescence emission peak at 590 nm -attributed to the transition of $Mn(II) {}^4T_1-{}^6A_1$ - and low fluorescence emission. Fig. 1 shows the decay time when exciting the sensor with a 10 Hz square wave and after averaging the result 128 times.

The luminescence decay fits well with an exponential function. The decay time measured is 2.550 ms in water and it does not show variations with the presence of acetone.

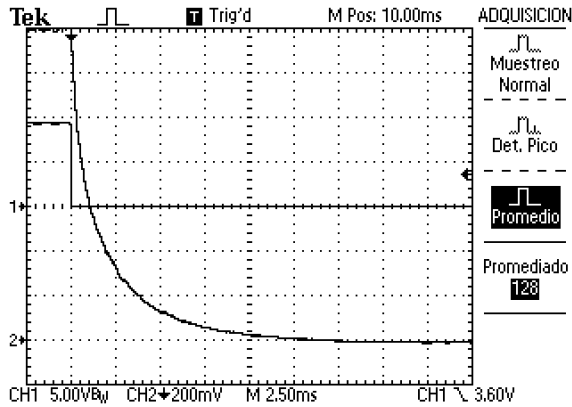


Fig. 1. Luminescence decay of the sensor after exciting with a square-wave modulated LED. Channel 1 shows the reference signal and channel 2 shows the decay (signal averaged 128 times).

The phosphorescent QDs of ZnS doped with Mn²⁺ synthesised (coated with L-cysteine to allow their solubilization in aqueous media) were explored to acetone sensing. It was observed that acetone produces a deactivating effect on the fluorescent emission of quantum dots. This effect can be attributed to the formation of thioacetals. These structures are very stable and quickly formed in the presence of acetone. A reaction between acetone and L-cysteine thiol groups or even the sulphur atoms which form the nanoparticle core, leading to a destabilization of the structure of QDs, results in the decrease of phosphorescent emission.

Immobilization of the colloidal phosphorescent QDs in appropriate solid supports is needed to fabricate “active” solid phases where their sensing and optical properties are retained, (avoiding degradation or easy leaching into the solution). Sol-gel material is a type of solid support which exhibit an important number of advantages in terms of high rigidity, long-term stability, chemical inertness, optical transparency, low probability of leaching.

Fig. 2 shows the spectral response of the sensor when it is immobilized in the solid support and the response of the support without the sensor. The luminescence of the sensor at 590 nm is much higher than the luminescence of the support and it depends on the acetone concentration (the peak near 300 nm is due to the tail of the spectral response of LED). The decay time of the luminescence of the solid support is very small (nanoseconds) compared to the decay time of the luminescence due to the sensor.

To measure the acetone concentration based on the variation of the luminescence at 590 nm, a ratiometric method is proposed. Ratiometric techniques have emerged to reduce the problems associated to intensity measurements and lifetime measurements [7-14]. They are based on dual emission or dual excitation indicators that possess separated spectral areas with different behavior or in dynamic characteristics of the sensor. Moreover the characteristics of the deep-UV LED [15-16] that is used to excite de sensor increase the interest in using ratiometric techniques.

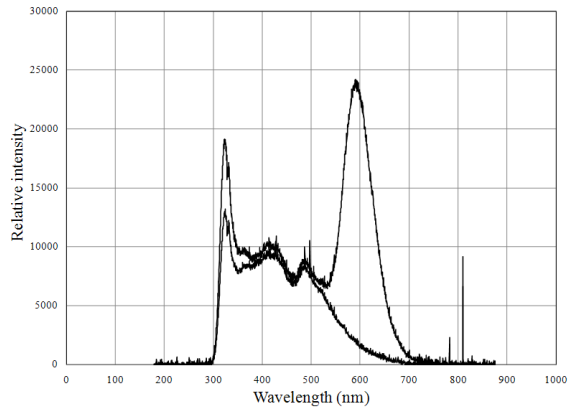


Fig. 2. Spectral response of the solid support and the solid support with the QD based sensor when exciting with a 280 nm LED. (Obtained using an Ocean Optics USB-2000+ spectrometer)

The technique proposed in this paper is based on employing the luminescence of the support as reference and using only one optical path.

If I_{supp} is the intensity of the luminescence response of the solid support, I_{sen} is the intensity luminescent response of the sensing phase at low frequency, the measured intensity at a frequency f , is:

$$I(f) = I_{supp} \sqrt{\frac{(2\pi f \tau)^2 + (1+m)^2}{(2\pi f \tau)^2 + 1}} \quad (1)$$

where τ is the decay time of the long lived emission and m is:

$$m = \frac{I_{sen}}{I_{supp}} \quad (2)$$

If the responses $I(f_1)$ and $I(f_2)$ are measured at two different frequencies, f_1 and f_2 , m can be obtained:

$$m_f = 2\pi\tau \cdot \sqrt{\frac{[2\pi f_1 \tau I(f_1) f_2]^2 + [I(f_1) f_2]^2 - [2\pi f_2 \tau I(f_1) f_2]^2 - [I(f_2) f_1]^2}{[2\pi f_1 \tau I(f_1) f_1]^2 + [I(f_1)]^2 - [2\pi f_2 \tau I(f_1) f_2]^2 - [I(f_2)]^2}} - 1 \quad (3)$$

Another way to obtain the ratio m consists of measuring the phase shift, ϕ , between the excitation and the emission:

$$m_{ps} = -\frac{1 + (2\pi f \tau)^2}{\tan(\phi) - 2\pi f \tau} \tan(\phi) \quad (4)$$

Only one phase shift is needed to obtain m .

The sensitivity when measuring intensity is:

$$S_I(f) = \frac{dI(f)}{dm} = \frac{A(2m+2)}{2 \sqrt{\frac{(2\pi f \tau)^2 + (1+m)^2}{(2\pi f \tau)^2 + 1}}} \quad (5)$$

and the sensitivity when measuring phase shift is:

$$S_{ps}(f) = \frac{d\phi(f)}{dm} = \frac{2\pi f \tau}{(2\pi f \tau)^2 + (1+m)^2} \quad (6)$$

III. EXPERIMENTAL RESULTS

In order to obtain in-line experimental results, the sensor was introduced in a quartz tube surrounded by pore caps. A peristaltic pump was used to pass a solution of water and acetone at different concentrations. The flow rate was maintained at 20 ml/min.

The LED used to excite the sensor is an UVTOP280. Its peak wavelength is 280 nm. A photodiode with an orange filter is used to measure the luminescence. Using this filter, the maximum expected ratio m is around 4.

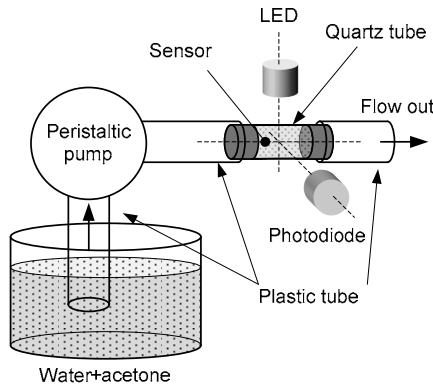


Fig. 3. Flow-cell configuration

Fig. 4 shows the block diagram of the equipment used to obtain the results. A computer is used to control the GPIB instruments and to show the results using LabVIEW. A function generator provides the reference for a current-source based LED driver. The luminescence is measured using a Hamamatsu photodiode and a high gain I/V amplifier is used for signal conditioning. A lock-in amplifier is used to measure the amplitude of the response and the phase shift between the reference and the emission.

To obtain the phase-shift based result only one measurement is needed. The frequency for this measurement has been obtained by calculating the frequency where the sensitivity reaches the maximum value:

$$\frac{dS_{ps}(f)}{df} = 0 \quad (7)$$

The value obtained is:

$$f_{ps} = \frac{m+1}{2\pi\tau} \quad (8)$$

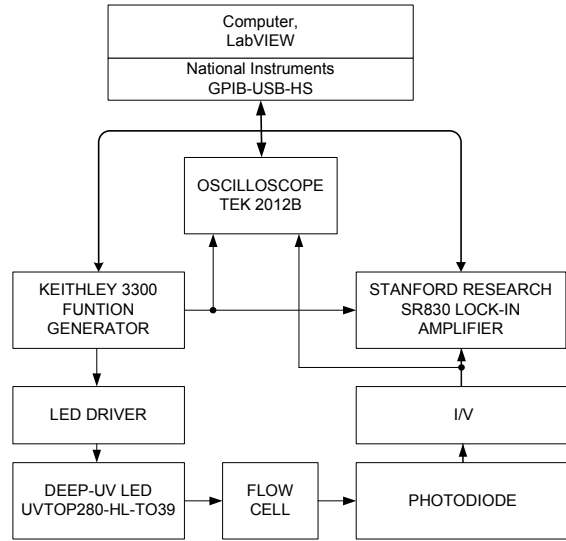


Fig. 4. Block diagram of the instrumentation

Since the expected values for m are between 3 and 4, and the decay time is constant, the frequency used to modulate the LED was 300 Hz. The sensitivity of the phases shift is 4.5 degrees/m (around 15% of the phase shift at the selected frequency).

When using the intensity based measurements, two frequencies are needed. The prototype measures the amplitude of the response at one frequency during several seconds and then changes the frequency and measures the amplitude again. The first frequency has been obtained following the same procedure than for the previous measurement obtaining a value of 0 Hz. Since the dc excitation is undesirable and the lock-in amplifier does not offer very stable results at low frequencies, a value of 70 Hz was used. The second frequency was obtained by analyzing the effect of the propagation of an error $\pm x$ in measuring the amplitude. The result is that this frequency should be highly enough so that the short decay should be enough attenuated. For instance, this may be achieved one decade above $1/(2\pi\tau)$. Due the bandwidth characteristics of the I/V converter, a value of 450 Hz was selected.

To measure the response to the acetone concentration, several solutions of acetone in water have been prepared with 0%, 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2.5%, 5% and 10% (v/v). These solutions have been passed through the sensor using the flow cell configuration shown in Fig. 3. After passing each solution, pure water is passed through the sensor to study its recovering characteristics. Fig. 5 shows the spectral response during the essay saved at 30 seconds intervals. As can be seen, the response at 590 nm suffer significant variations due to the presence of acetone.

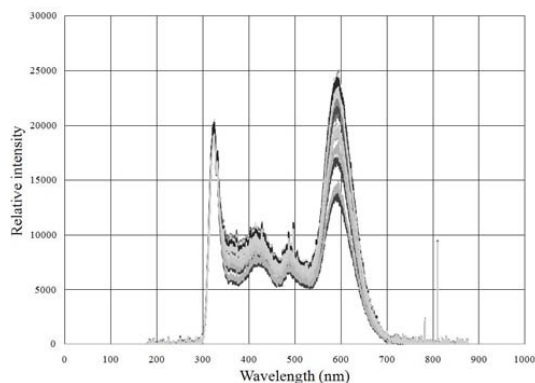


Fig. 5. Spectral response during an assay consisting on passing solutions of acetone in water with different concentrations.

Fig. 6 shows the m values obtained when using the intensity based method. As can be seen, the m value decreases, as expected, when the concentration of acetone increases, and the sensor recovers its initial properties when the acetone is removed. The response time is mainly affected by the flow-rate of the peristaltic pump.

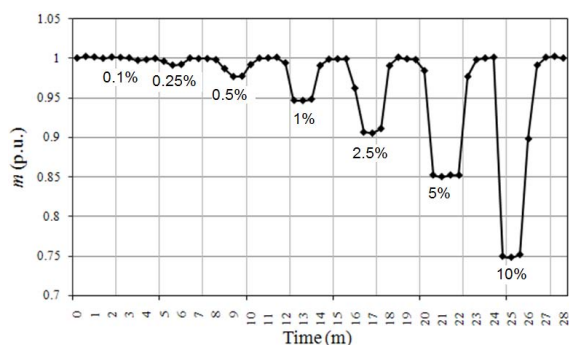


Fig. 6. Evolution of the ratio between the sensor luminescence and the support luminescence at different acetone concentrations using the intensity based method.

IV. CONCLUSIONS

A ratiometric technique to measure acetone has been presented employing a new quantum dots based sensor. This sensor shows a long lived emission at 590 nm depending on the acetone concentration. The luminescence of the support has been employed as a reference signal to avoid fluctuations in the results. Results have been obtained using an in-line scheme and GPIB based equipment.

The limit of detection is around 2200 ppm. Although this is enough for some applications [5], future works will be focusing in reducing this limit so that other interesting ranges of acetone concentration can be measured, such as biomarkers for animals and human disease.

ACKNOWLEDGMENT

Financial support from Project DPI2008/03297 (Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- [1] Jr M Bruchez, M Moronne, P Gin, S Weiss, AP Alivisatos, "Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels," *Science*, vol. 1281, pp. 2013–2016, 1998.
- [2] J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, "The use of luminescence quantum dots for optical sensing", *Trends Anal. Chem.*, vol. 25, pp. 207, 2006.
- [3] R. Beaulac, P.I. Archer, X. Liu, S. Lee, G.M. Salley, M. Dobrowolska, J.K. Furdyna, D.R. Gamelin, "Spin-polarizable excitonic luminescence in colloidal Mn²⁺-doped CdSe quantum dots," *Nanoletters*, vol. 8, pp. 1197, 2008
- [4] Y. He, H-F Wang, X-P Yan, "Exploring Mn-doped ZnS quantum dots for the room-temperature phosphorescence detection of enoxacin in biological fluids", *Anal. Chem.*, vol. 80, pp. 3832, 2008.
- [5] O. Hernandez, "Acetone CAS n° 67-64-1," *SIDS Initial Assessment Report for th 9th SIAM*, Paris, France, June 1999.
- [6] R. Garrido-Delgado, L. Arce, C.C. Pérez-Marín, M. Valcárcel, "Use of ion mobility spectroscopy with an ultraviolet ionization source as a vanguard screening system for the detection and determination of acetone in urine as a biomarker for cow and human disease", *Talanta*, vol.78, pp. 863, 2009
- [7] Y. Kostov, G. Rao, "Low-cost optical instrumentation for biomedical measurements", *Review of scientific instruments*, vol.71, pp. 4361- 4374, 2000.
- [8] J. Q. Brown and M. J. McShane, "Core-Referenced Ratiometric Fluorescent Potassium Ion Sensors Using Self- Assembled Ultrathin Films on Europium Nanoparticles", *IEEE Sensors Journal*, vol. 5, no.6, pp. 1197, December 2005 .
- [9] M. Valledor, J.C. Campo, F.J. Ferrero, J.C. Viera, M. Gonzalez, C. Blanco, J.M. Costa, I. Sanchez, A. Sanz-Medel, "A Ratiometric Method for Oxygen Measurement Using a Luminescence Sensor", *IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference*, Victoria, BC, Canada 2005.
- [10] F. J. Ferrero, J. C. Campo, J. C. Alvarez, J. C. Viera Perez, I. Sanchez-Barragan, J. M. Costa-Fernandez, and A. Sanz-Medel, "Design of a Low-Cost Optical Instrument for pH Fluorescence Measurements," *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*. vol 55, pp. 1215-122 1, August 2006.
- [11] M. Valledor, J.C. Campo, I. Sanchez, J.C. Viera, J.M. Costa, A. Sanz-Medel, "Luminescent ratiometric method in the frequency domain with dual phase-shift measurements: Application to oxygen sensing", *Sensors and Actuators B*, vol. 117, pp. 266-273, 2006
- [12] G. Dooly, C. Fitzpatrick, P. Chambers and E. Lewis "Development of a Fibre-Optic DOAS Sensor for the Detection of Exhaust Gases Using Ratiometric Separation Techniques" pp.1287, *IEEE Sensors Conf.*, Atlanta, GA, USA 2007.
- [13] M. Valledor, J.C. Campo, F.J. Ferrero, J.C. Viera, M. Gonzalez, C. Blanco, I. Sanchez-Barragan, J.M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel, "Ratiometric Methods For Optical Fiber Instrumentation Based On Luminescence Sensors ", *IEEE International Instrumentation and Measurement Technology Conference*, Victoria, BC, Canada 2008.
- [14] H. Lam, Y. Kostov, G. Rao and L. Tolosa, "A luminescence lifetime assisted ratiometric fluorimeter for biological applications", *Review of Scientific Instruments*, Vol.80, pp. 124302 – 124302, 2009.
- [15] M. Shatalov et al, "Reliability of deep UV LEDs", *Conference on Quantum electronics and Laser Science Conference*, pp. 1-2, Baltimore MD, USA, June 2009
- [16] L. Rovati, S. Catini, "On the use of deep UV-LEDs for monitoring dialysis," *Instrumentation and Measurement Technology Conference Proceedings*, pp. 956-960, Victoria, BC, Canada 2008.