

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Trabajo Fin de Máster

**Empleo de Quantum Dots en el desarrollo de metodologías
fotoluminiscentes basadas en mecanismos de transferencia de
energía para análisis químico**

Mario Menéndez Miranda

Julio 2012, Oviedo

Índice

| | |
|---|-----------|
| A.INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| A.1. TRANSFERENCIA DE ENERGÍA EN EL DESARROLLO DE MÉTODOS FOTOLUMINISCENTES DE ANÁLISIS. | 3 |
| A.2. NUEVA GENERACIÓN DE FLUORÓFOROS: QUANTUM DOTS. | 9 |
| A.3. INTERÉS ANALÍTICO DE LA DETERMINACIÓN DE METILEFEDRINA..... | 21 |
| B. OBJETIVOS DEL TRABAJO | 23 |
| C. EXPERIMENTAL..... | 26 |
| C.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS..... | 27 |
| C.2. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO DEL ACEPTOR (TBPE), EN FUNCIÓN DE LA PRESENCIA DE MEEF EN EL MEDIO Y DEL PH. | 32 |
| C.3. DEMOSTRACIÓN DEL FENÓMENO DE TRANSFERENCIA DE ENERGÍA RESONANTE DE FÖRSTER..... | 36 |
| C.4. ENCAPSULAMIENTO DEL TBPE..... | 43 |
| C.5. INMOVILIZACIÓN SOBRE UN SOPORTE SÓLIDO: DESARROLLO DE UNA FASE SENSORA | 45 |
| D.CONCLUSIONES..... | 48 |
| E.BIBLIOGRAFÍA..... | 51 |

A.INTRODUCCIÓN

A.1. TRANSFERENCIA DE ENERGÍA EN EL DESARROLLO DE MÉTODOS FOTOLUMINISCENTES DE ANÁLISIS.

Una de las limitaciones más importantes en el desarrollo de fases sensoras luminiscentes deriva del número limitado disponible de moléculas indicadoras fotoluminiscentes sensibles y selectivas a un analito de interés. Con el fin de solventar dicha limitación, una de las estrategias que recientemente se viene utilizando está basada en el desarrollo de sistemas fluorescentes basados en mecanismos de transferencia de energía (ET).

A.1.1. Fundamentos.

En los procesos fotoluminiscentes puede tener lugar una transferencia de energía electrónica (ET) entre dos moléculas (un donador y un aceptor) situadas a una distancia muy próxima [1]. Este fenómeno se traduce en una atenuación de la emisión luminiscente del donador, y en el caso de que la molécula aceptora sea luminiscente, se produce un aumento en la emisión del aceptor si esta se excita durante el proceso de transferencia de energía.

La transferencia de energía puede ocurrir a través de dos mecanismos:

1. Procesos que conllevan la emisión de un fotón por un donador y su subsiguiente re-absorción por un aceptor, dando lugar a un descenso de la intensidad emitida por el donador. Por tanto, esta transferencia de energía tiene lugar por *vía radiacional*. Esta transferencia de energía por vía radiacional se trata de un efecto de “filtro interno” (ocurre cuando la longitud de onda de emisión se solapa con un máximo de absorción de la especie aceptora). Muchos autores no consideran este proceso como un verdadero mecanismo de transferencia de energía.
2. Procesos en los que la transferencia de energía desde la molécula excitada tiene lugar por *vía no radiacional*, es decir, la etapa de transferencia de energía desde una molécula donadora a otra aceptora no conlleva la emisión de fotones. A diferencia del mecanismo anterior, además de un descenso de la intensidad luminiscente de la molécula donadora, esta transferencia da lugar una

disminución en el tiempo de decaimiento de dicha molécula. Dentro de este grupo podemos distinguir a su vez dos procesos:

Apagado colisional: la transferencia de energía entre la molécula donadora y aceptora tiene lugar por choque entre ambas. Este fenómeno viene gobernado por la ley de Stern-Volmer y supone una disminución en la intensidad de emisión luminiscente de la molécula donadora, y en la vida media de dicha molécula.

Apagado no colisional o atenuación estática: se produce cuando moléculas donadoras forman, previamente a ser excitadas, agrupaciones (ya sea consigo mismo o con el aceptor), perdiendo la capacidad para excitarse.

Para explicar el proceso de transferencia de energía se han propuesto dos modelos (uno de ellos basado en la interacción dipolo-dipolo, y el otro debido a un proceso de intercambio de electrones). Ambos mecanismos pueden actuar en paralelo, aunque debido a la naturaleza de las transiciones involucradas y a la distancia entre el donador y el aceptor, generalmente es posible determinar cuál de ellos es el mecanismo dominante. Dado su incipiente empleo en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas, a continuación se resumen brevemente los aspectos más importantes de las dos teorías, que se encuentran esquematizadas en la *Figura 1*.

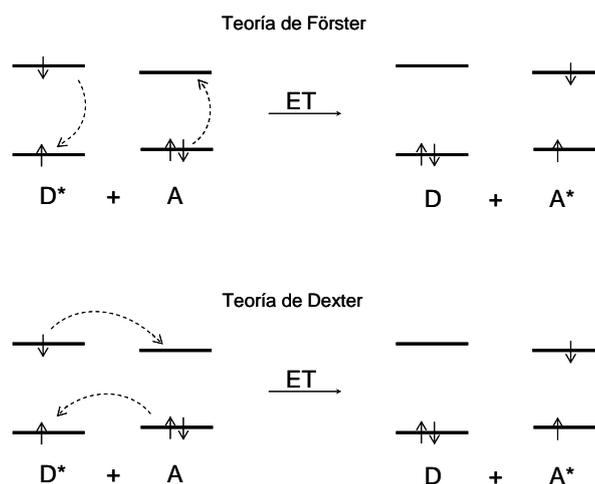


Figura 1. Diagrama de energías que recoge las transiciones electrónicas propuestas por las teorías que explican los mecanismos de los procesos de transferencia de energía. En el modelo de Förster (arriba), la interacción dipolo-dipolo entre donador (D) y aceptor (A) da lugar a la excitación del aceptor mientras que el donador vuelve al

estado fundamental. En el modelo de Dexter (abajo), el electrón excitado del donador es transferido al orbital desocupado más bajo del aceptor, con una transferencia simultánea de un electrón desde el orbital ocupado más alto del aceptor al orbital correspondiente del donador.

➤ ***Modelo de Förster (FRET), modelo dipolar o de transferencia por resonancia.***

En este modelo la molécula donadora se considera que actúa como una antena eléctrica (un dipolo), lo que supone la creación de un campo electromagnético en su proximidad. Las moléculas con capacidad para recibir la energía transferida pueden actuar como antenas receptoras si se encuentran dentro del radio efectivo del campo eléctrico creado por la molécula donadora ($< 100 \text{ \AA}$) [2]. De este modo, tras una excitación de la molécula donadora, las moléculas aceptoras absorben energía del campo eléctrico, resultando en una excitación de su estado electrónico [3].

Según esta teoría la velocidad de transferencia de energía depende de $1/R^6$, siendo R la distancia entre los centros de momento dipolar de ambas moléculas. Además, la probabilidad de que tenga lugar un fenómeno de transferencia de energía está influenciada por la vida media del estado excitado del donador, por lo que las multiplicidades de espín de los estados electrónicos excitados del donador también influyen en la velocidad del proceso. El mecanismo de Förster implica que la transferencia de energía se da sólo hacia el estado singlete del aceptor. Lo más usual es que tanto el donador como el aceptor sean un singulete, pero excepcionalmente puede darse el caso de que el donador sea un triplete. En este caso la transferencia de energía es más lenta, pero se ve compensada con el mayor tiempo de vida del triplete, dando lugar a una transferencia de energía más eficaz.

➤ ***Modelo de Dexter.***

También conocido como el mecanismo de intercambio de electrones, tiene lugar a distancias inferiores a los 10 \AA , lo que supone una gran proximidad entre las nubes electrónicas del donador y del aceptor. Consiste básicamente en un intercambio de

electrones vía no radiacional, pero en este caso la velocidad de transferencia de energía decae rápidamente cuando se incrementa la distancia entre el donador y el aceptor. Al contrario que el mecanismo de Förster, la transferencia de energía puede tener lugar en procesos con transiciones de espín prohibidas.

Existe aún un tercer mecanismo propuesto de ET, muy poco estudiado, denominado “**atrapamiento de carga**”. En este modelo la molécula aceptora atrapa la carga y genera un exciton por recombinación con una molécula cercana de carga opuesta [4].

Dentro del grupo de procesos de transferencia de energía por vía no radiacional empleados en el desarrollo de métodos analíticos fotoluminiscentes se pueden distinguir cuatro fenómenos básicos:

Fluorescencia sensibilizada: en este proceso tiene lugar la transferencia de energía desde el singlete excitado de una molécula fluorófora, que será el analito, al singlete excitado de otra molécula fluorófora que tenga un elevado rendimiento cuántico de la fluorescencia.

Fosforescencia sensibilizada: se produce la transferencia de energía desde el estado triplete excitado de una molécula fosforófora, que será el analito, al estado triplete excitado de otra molécula fosforófora que ha de poseer un alto rendimiento cuántico de la fosforescencia.

Para que ambos procesos tengan lugar (*Figura 2*), es necesario que se cumplan las siguientes condiciones:

- La energía del estado singlete excitado para el caso de la fluorescencia, y la del estado triplete excitado, para el proceso de fosforescencia, han de ser mayores que la energía del aceptor.
- El tiempo de vida del estado excitado de partida ha de ser mayor que el proceso de transferencia de energía.
- El aceptor no debe absorber radiación empleada para la excitación del donador.
- El estado excitado del donador debe tener una población notable.

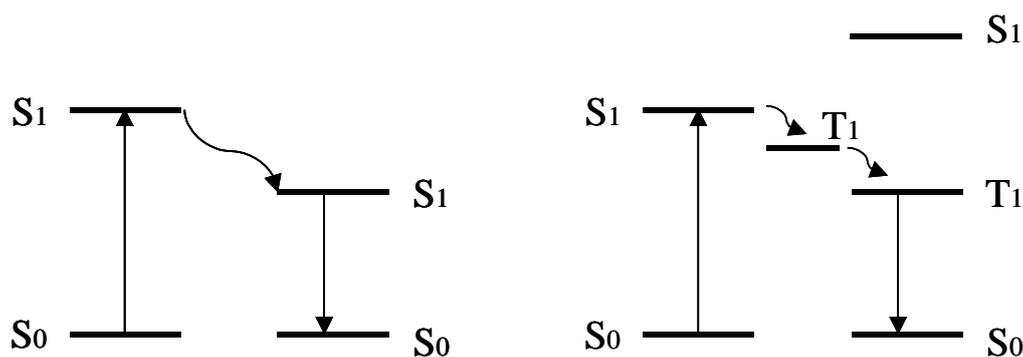


Figura 2. Esquema energético de los procesos de fluorescencia y fosforescencia sensibilizada: (a) Fluorescencia sensibilizada. (b) Fosforescencia sensibilizada.

Desactivación dinámica de la fluorescencia: proceso en el que se produce una transferencia de energía desde el singlete excitado de una molécula fluorófora a una especie absorbente, que en este caso será el analito; esta especie absorbente disipará la energía mediante procesos no radiacionales.

Desactivación dinámica de la fosforescencia: en este fenómeno se produce la transferencia de energía desde el estado triplete excitado de una especie fosforófora a una especie absorbente que será el analito.

Para que ocurran estos procesos de desactivación dinámica de la fluorescencia y de la fosforescencia también han de cumplirse varios requisitos:

- Debe existir un solapamiento espectral de la emisión luminiscente del donador con la absorbancia del aceptor.
- El tiempo de vida del estado excitado del donador debe ser más largo que la etapa de transferencia de energía.
- La especie que genera luminiscencia no debe reaccionar con el analito.

Las ventajas que presentan estos procesos de desactivación dinámica de la luminiscencia son importantes, ya que se pueden determinar especies absorbentes realizando medidas de emisión luminiscente, con lo que se espera una mayor sensibilidad que la obtenida con medidas de absorción molecular (espectrofotométricas).

Además, como los tiempos de decaimiento del estado excitado disminuyen en presencia de analito, se puede realizar la determinación del analito mediante la espectroscopia de luminiscencia de tiempo resuelto, y estas medidas son independientes

de posibles fluctuaciones en componentes instrumentales, turbidez del medio, interferencias de luz ambiente, etc.

Por tanto, podemos afirmar que la transferencia de energía presenta un extraordinario potencial para el desarrollo de nuevas metodologías analíticas basadas en medidas luminiscentes.

A.1.2. Aplicaciones de la transferencia de energía en el desarrollo de sistemas luminiscentes. (Fluorescencia con transferencia de energía).

A la vista de las excepcionales posibilidades que presenta la transferencia de energía, varios grupos de investigación han venido trabajando en el desarrollo de nuevos métodos analíticos luminiscentes empleando este mecanismo. Particularmente, en los últimos años se ha venido aplicando con éxito en el desarrollo de nuevos métodos analíticos la ***fluorescencia con transferencia de energía***, como por ejemplo para la determinación de iones plomo (II) y mercurio (II) utilizando carboxifluoresceína como donador y (DAB-CYL) como especie absorbente para la construcción de un fotosensor [5], o empleando los fluoróforos acrilflavina y rodamina 6G inmovilizados en una matriz polimérica de nafion [6]. También se ha aplicado a la determinación de aniones carboxilo [7] utilizando un quimiosensor basado en el empleo de rodamina como donador, y a la determinación de cianuro en muestras de agua. [8].

La determinación de especies inorgánicas es otra de las aplicaciones en las que se hace uso de medidas de fluorescencia con transferencia de energía. Recientemente se ha desarrollado un sensor de un solo uso para la determinación de Cu^{2+} mediante la generación de un complejo de cobre con el aceptor cuya absorbancia se solapa con la emisión del donador [9]. En esta línea se ha propuesto un sensor para la determinación de Hg^{2+} en medio acuoso basado en el empleo de rodamina B (donador) y nanopartículas de oro que actúan como aceptor [10].

En este contexto, en los últimos años han aparecido en escena metodologías analíticas en las que se emplean nanopartículas luminiscentes conocidas como quantum dots, actuando generalmente como donadores, debido a que, como se verá en la siguiente sección, presentan unas propiedades ópticas óptimas para su empleo en el desarrollo de sistemas basados en ET.

A.2. NUEVA GENERACIÓN DE FLUORÓFOROS: QUANTUM DOTS.

A.2.1. Propiedades.

Los quantum dots, (también conocidos como puntos cuánticos ó “átomos artificiales” [11]), son nanopartículas semiconductoras de forma esférica cuyas dimensiones están comprendidas entre dos y ocho nanómetros de diámetro, y están constituidas por un número de átomos que puede oscilar entre 200 y 1000. Estas nanopartículas pueden estar formadas por átomos de elementos de los grupos II-VI, III-V ó IV de la tabla periódica [12]. Debido a su reducido tamaño las propiedades del semiconductor están dominadas por efectos de confinamiento cuántico, que son los responsables de sus interesantes propiedades optoelectrónicas. En efecto, este tipo de materiales de naturaleza inorgánica, que a tamaño macroscópico son no-luminiscentes, sin embargo, al sintetizarse con estas dimensiones tan reducidas presentan una intensa emisión luminiscente con una elevada fotoestabilidad [13].

Los semiconductores se caracterizan por tener un salto de banda o “band gap” (diferencia de energía entre la banda de conducción y la de valencia) que determina la energía mínima que tiene que tener un electrón para pasar a la banda de conducción. En el caso de los semiconductores convencionales este salto de banda posee una energía definida para cada material. Pero cuando el tamaño del semiconductor se reduce a escala nanométrica (tamaños del orden del excitón de Bohr), los niveles de energía pasan a estar cuantizados, y este salto de energía (band gap) es variable, y está relacionado con el tamaño de la nanopartícula semiconductoras [14]. De esta forma, cuando el tamaño de la nanopartícula es menor, el salto de banda es mayor, y por tanto, después de la absorción de energía, los electrones excitados regresan al estado fundamental mediante la emisión de fluorescencia a una longitud de onda menor. Por lo tanto, las propiedades luminiscentes de los quantum dots se relacionan directamente tanto con la composición como con su forma y tamaño (*ver Figura 3*).

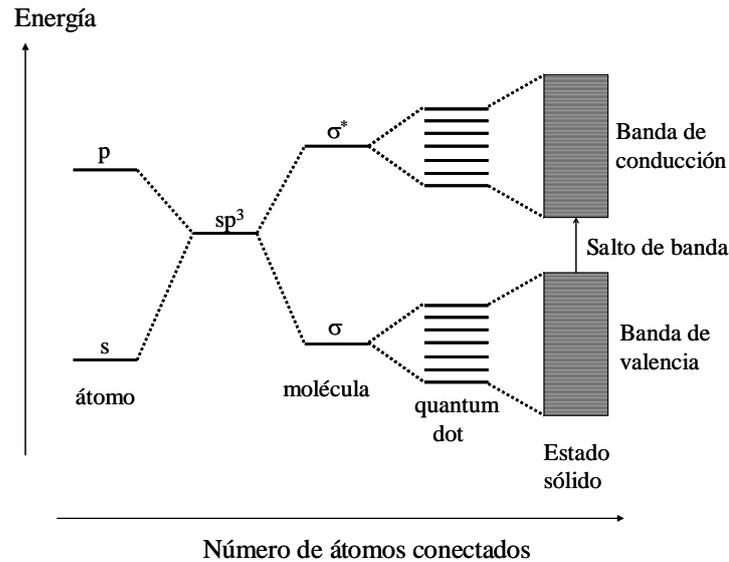


Figura 3. Niveles de energía en función del número de átomos unidos. A medida que aumenta el número de átomos, los niveles discretos típicos de los orbitales atómicos se convierten en bandas de energía (semiconductor convencional).

La absorción de un fotón con una energía superior a la del salto de banda da lugar a la creación de un par hueco/electrón (excitón o plasmón). Dicha absorción tiene mayor probabilidad a mayores energías (menores longitudes de onda), lo que genera un *ancho espectro de absorción*. Esta característica de los quantum dots representa una gran ventaja frente a los compuestos fluoróforos convencionales, en los que los espectros de absorción son generalmente estrechos y con máximos de absorción cercanos a la longitud de onda de emisión.

La recombinación radiacional del par hueco/electrón se caracteriza por *largas vidas medias* (mayores de 10 ns) y da lugar a la *emisión de un fotón en una banda de energía estrecha y simétrica*. Esto supone otra importante ventaja de los quantum dots frente a los fluoróforos orgánicos convencionales, en los que se observan espectros de emisión característicos con una cola hacia longitudes de onda mayores, y tiempos de vida media menores. Los largos tiempos de vida de la fluorescencia de los quantum dots permiten el uso de “medidas de tiempo resuelto” para separar la señal de emisión procedente de las nanopartículas de otras emisiones con menor vida media (como por ejemplo la fluorescencia de otros posibles fluoróforos coexistentes en la muestra) [15] con lo que podemos conseguir un aumento de la sensibilidad de la detección [16].

Así pues, los quantum dots presentan una *fotoluminiscencia que puede ser modificada* simplemente mediante el control de su tamaño, con espectros de excitación anchos, y bandas de emisión simétricas y estrechas, con anchuras de pico a la mitad del máximo de emisión de hasta 25-35 nm (*ver Figura 4*).

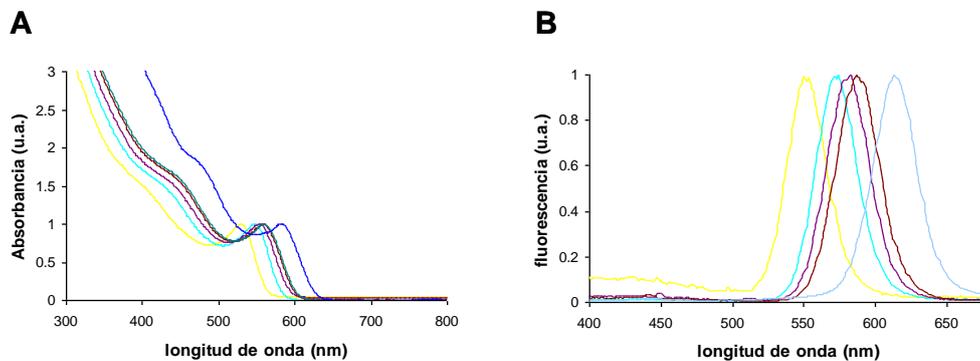


Figura 4. Espectros de absorción (A) y emisión (B) de quantum dots de CdSe/ZnS de diferentes tamaños.

Además, variando la naturaleza y tamaño de la nanopartícula, es posible obtener quantum dots con emisiones luminiscentes que van desde el ultravioleta (UV) hasta el infrarrojo (IR). Es importante tener en cuenta que las propiedades de los quantum dots nos permiten llevar a cabo la excitación simultánea de nanopartículas de distintos tamaños (distinta longitud de onda) con una misma radiación a una determinada longitud de onda (*ver Figura 5*) y la posterior medida de las emisiones a longitudes de onda distintas [17] (característica que es de especial interés cuando se pretende utilizar los quantum dots en aplicaciones de multianálisis). Además, el hecho de que la emisión de luminiscencia pueda ser controlada a través del tamaño de la nanopartícula nos permite seleccionar la emisión de luminiscencia más adecuada a las necesidades de un problema en concreto, mediante la síntesis de un material semiconductor adecuado con un tamaño determinado.

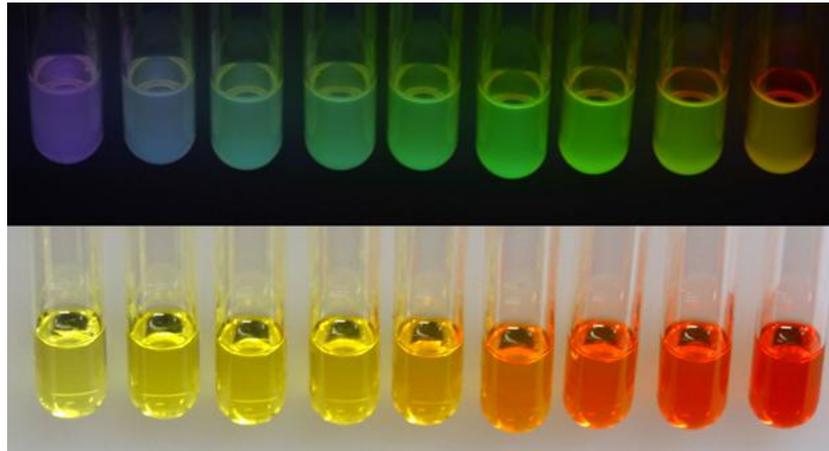


Figura 5. Fotografía de distintas suspensiones de quantum dots de distinto tamaño con núcleo de CdSe recubiertos con ZnS cuando se excitan con una lámpara UV. A medida que aumenta el tamaño de los quantum dots, la emisión se desplaza hacia longitudes de onda mayores [18].

A pesar de las excelentes ventajas que presentan estos nuevos fluoróforos, también presentan algunos inconvenientes. Defectos en la superficie de la estructura del nanocrystal pueden actuar como trampas temporales para el electrón o el hueco, de manera que la recombinación radiacional se puede ver desfavorecida. Por otro lado, una sucesión de procesos de “atrapamiento” y “desatrapamiento” da lugar a una fluorescencia intermitente, conocida como “blinking”, visible a nivel molecular (single molecule level), y que se traduce en una disminución del rendimiento cuántico. Una solución a este problema, y también con el fin de proteger los átomos de la superficie de la oxidación u otras reacciones químicas, consiste en hacer crecer una capa de otro semiconductor con un salto de banda mayor sobre la superficie del nanocrystal. Dicha capa puede ser diseñada de modo que el rendimiento cuántico final obtenido sea cercano al 90% [15]. Además, este proceso también mejora la fotoestabilidad de los quantum dots en varios órdenes de magnitud con respecto a los fluoróforos convencionales.

Debido a las extraordinarias características fotoluminiscentes demostradas por los quantum dots, estas nanopartículas han irrumpido rápidamente como una nueva clase de fluoróforos para diversas aplicaciones. Entre todas ellas cabe destacar su

empleo como marcadores luminiscentes para la monitorización de distintas especies de interés biomédico en muestras biológicas, ya que dichas nanopartículas pueden reducir los inconvenientes que se encuentran cuando se trabaja con fluoróforos tradicionales [19]. Pese a estas ventajas, las aplicaciones reales de los quantum dots todavía no han dado los resultados deseados debido a las dificultades encontradas para convertir estos semiconductores inorgánicos en fases sensoras compatibles con medios acuosos o biológicos [20].

A.2.2. Síntesis de los quantum dots.

Existen dos vías principales para sintetizar quantum dots. Una de las rutas sintéticas es la conocida como “top-down”, en la cual podemos obtener nanopartículas embebidas en una matriz cuando se emplea la litografía como técnica sintética. En este caso se pueden hacer crecer quantum dots sobre un sustrato de otro semiconductor [21]. Otra de las vías sintéticas empleadas, más familiar para los químicos, es la conocida como “bottom up”, basada en las reacciones químicas entre precursores iónicos o moleculares en disolución para generar quantum dots como partículas libres. Esta vía ha sido la estrategia empleada para llevar a cabo los estudios recogidos en el presente Seminario de Investigación, por lo que la describiremos con más profundidad a continuación.

Los quantum dots de seleniuro de cadmio son los más estudiados, y por tanto, los más conocidos dentro de las nanopartículas cristalinas. A pesar de que las primeras síntesis de quantum dots dieron lugar a nanocristales de baja calidad y con grandes distribuciones de tamaños, en 1993 Murray y colaboradores [22] desarrollaron una nueva ruta de síntesis en la que se obtienen nanopartículas con un bajo grado de dispersión. Desde entonces, se han desarrollado una gran variedad de rutas sintéticas, en las cuales se pretende emplear reactivos menos agresivos para el medioambiente, así como para facilitar su manipulación. Entre estas rutas, cabe destacar la diseñada por Peng y colaboradores [23,24] basada en el empleo de óxido de cadmio, así como otras rutas en las que se emplea carbonato de cadmio [25], o acetato de cadmio [26]. Todas estas vías de síntesis evitan el empleo de dimetilcadmio, un reactivo altamente tóxico y pirofórico, y con ellas se obtienen nanopartículas con rendimientos cuánticos de la fotoluminiscencia en torno al 85%.

Los quantum dots de mejor calidad son aquellos que se obtienen cuando la síntesis tiene lugar a elevadas temperaturas en un disolvente orgánico coordinante, como son las trioctilfosfinas (TOP), el óxido de trioctilfosfina (TOPO), o la hexadecilamina (HDA) [22,23]. Estos compuestos orgánicos, que recubren y estabilizan la superficie de la nanopartícula, determinan la solubilidad de la partícula en el medio orgánico y previenen posibles agregaciones de los nanocristales.

En este tipo de síntesis la nucleación de las nanopartículas tiene lugar rápidamente, seguida de un crecimiento epitaxial y un recocido de las nanopartículas. Una vez que se ha alcanzado el tamaño de partícula deseado (podemos monitorizar las características espectroscópicas mediante la extracción de alícuotas del medio de reacción), se puede detener el crecimiento de las nanopartículas bajando la temperatura de la mezcla de reacción. Todo el proceso tiene que llevarse a cabo en atmósfera inerte debido a la reactividad de los precursores en presencia de humedad u oxígeno, pero una vez sintetizados, los quantum dots son estables al aire, lo que facilita su manipulación posterior [16]. En la *Figura 6* podemos ver un esquema típico de las etapas a seguir para llevar a cabo la síntesis de quantum dots con núcleo de CdSe y recubrimiento de ZnS.

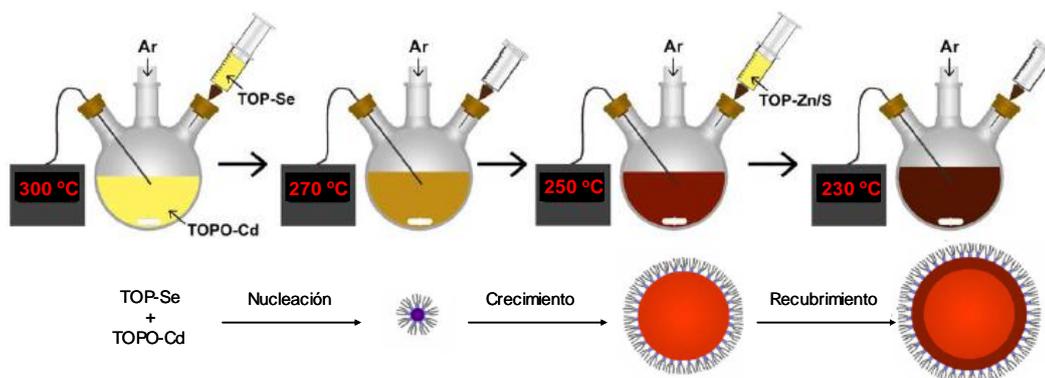


Figura 6. Esquema típico de síntesis de CdSe/ZnS a altas temperaturas. Se disuelven los precursores en un disolvente coordinante cuando se alcanza la temperatura de 300 °C. Se añade a continuación con agitación el precursor de selenio sobre el precursor de cadmio, iniciándose la nucleación de las nanopartículas. La nucleación se para rápidamente en el momento en el que la temperatura disminuye debido a la adición de una disolución que está a temperatura ambiente. Entonces tiene lugar el crecimiento

de las partículas. Una vez alcanzado el tamaño deseado, se añade el precursor de ZnS, y se crea una capa de este semiconductor alrededor del núcleo [16].

Las condiciones experimentales y reactivos añadidos en la síntesis descrita aseguran la obtención de nanopartículas monodispersas y estables. Además la mejora en la estabilidad fotoluminiscente de los quantum dots que se consigue generando una capa de material semiconductor con mayor energía de banda (por ejemplo ZnS) [27] alrededor de la superficie del nanocrystal, debido a la pasivación de la superficie. Se genera así un sistema conocido como “core-shell” ó “núcleo-recubrimiento”.

Para que los quantum dots tengan utilidad analítica, éstos deben poseer un elevado rendimiento cuántico de la luminiscencia, presentar estabilidad de las propiedades luminiscentes en condiciones reales de medida, y ser solubles en el medio de interés. A pesar de que el recubrimiento con otro semiconductor inorgánico ofrece una mejora significativa con respecto a la pasivación con moléculas orgánicas, existen evidencias de que no es perfecto:

- (1) El rendimiento cuántico de la fluorescencia es aproximadamente del 50%, y un porcentaje significativo de las nanopartículas se encuentra permanentemente sin emitir luminiscencia.
- (2) Las nanopartículas con estructura de “core/shell” siguen sufriendo procesos de foto-oxidación.
- (3) La fotoluminiscencia de un quantum dot de CdSe/ZnS exhibe fluctuaciones en la intensidad y el espectro atribuidos a la existencia de canales de carga en la superficie de las nanopartículas.

Actualmente es conocido el hecho de que el recubrimiento de una capa de ZnS sobre la superficie de CdSe de las nanopartículas no da lugar a un recubrimiento completo y esférico. Aunque existe una mejora de las propiedades ópticas, existen evidencias que demuestran que un recubrimiento mixto de los quantum dots de CdSe puede dar lugar a unas características fotoluminiscentes superiores [28].

A.2.3. Solubilización de los quantum dots en medios acuosos.

Los quantum dots obtenidos mediante la vía descrita en el epígrafe anterior, presentan el inconveniente de estar cubiertos con una capa hidrofóbica de cadenas carbonadas que se organizan sobre la superficie de la nanopartícula (cadenas de trioctilfosfinas) [29]. Esto genera nanopartículas que son solubles en disolventes orgánicos no polares, e incompatibles con aplicaciones tanto biológicas como analíticas, donde estos necesitan ser transferidos a un medio acuoso. Por consiguiente, para poder ampliar el campo de aplicación de estas nanopartículas, es necesario llevar a cabo modificaciones sobre su superficie.

Durante los últimos años se han diseñado y estudiado distintos recubrimientos capaces de proporcionar biocompatibilidad a estas nanopartículas. Estos diseños deben ser robustos y versátiles, pero también deben mantener las propiedades originales de la nanopartícula, tanto su tamaño como su luminiscencia. Muchas de estas modificaciones facilitan posteriores conjugaciones, por ejemplo con biomoléculas [20].

Actualmente las principales estrategias de solubilización en medios acuosos pueden dividirse en tres grandes grupos, cuyo esquema se encuentra recogido en la *Figura 7* y que se describen a continuación:

A) Intercambio de ligandos.

Este diseño se basa en la sustitución de las moléculas hidrofóbicas que rodean al nanocrystal (TOP y TOPO) por moléculas bifuncionales que generalmente presentan un grupo tiol (-SH) en uno de los extremos, el cual se une a la superficie del quantum dot, y un grupo polar en el otro extremo de la molécula [30, 31]. De este modo, el grupo polar queda orientado hacia la parte exterior del quantum dot, lo que proporciona solubilidad a la nanopartícula en medios polares. A un pH adecuado, los grupos polares (normalmente carboxílico o sulfónico) permanecen desprotonados, es decir, cargados negativamente, lo que generará repulsiones electrostática entre las nanopartículas y evitará que los quantum dots se agreguen [32]. Este tipo de modificación proporciona dispersiones coloidales con una baja estabilidad, ya que la desorción de este tipo de ligandos bifuncionales de la superficie de la nanopartícula da lugar a una agregación de las nanopartículas, y posteriormente, a una precipitación de dichos agregados [33].

B) Silanización.

Esta estrategia consiste en la formación de una capa de sílice alrededor de la superficie del nanocrystal empleando mercaptopropil(trimetoxisilano) como precursor [31]. En este caso de nuevo se produce una sustitución de los ligandos hidrofóbicos de la superficie del nanocrystal. Este método resulta generalmente bastante tedioso, y con frecuencia no se obtienen recubrimientos homogéneos [34].

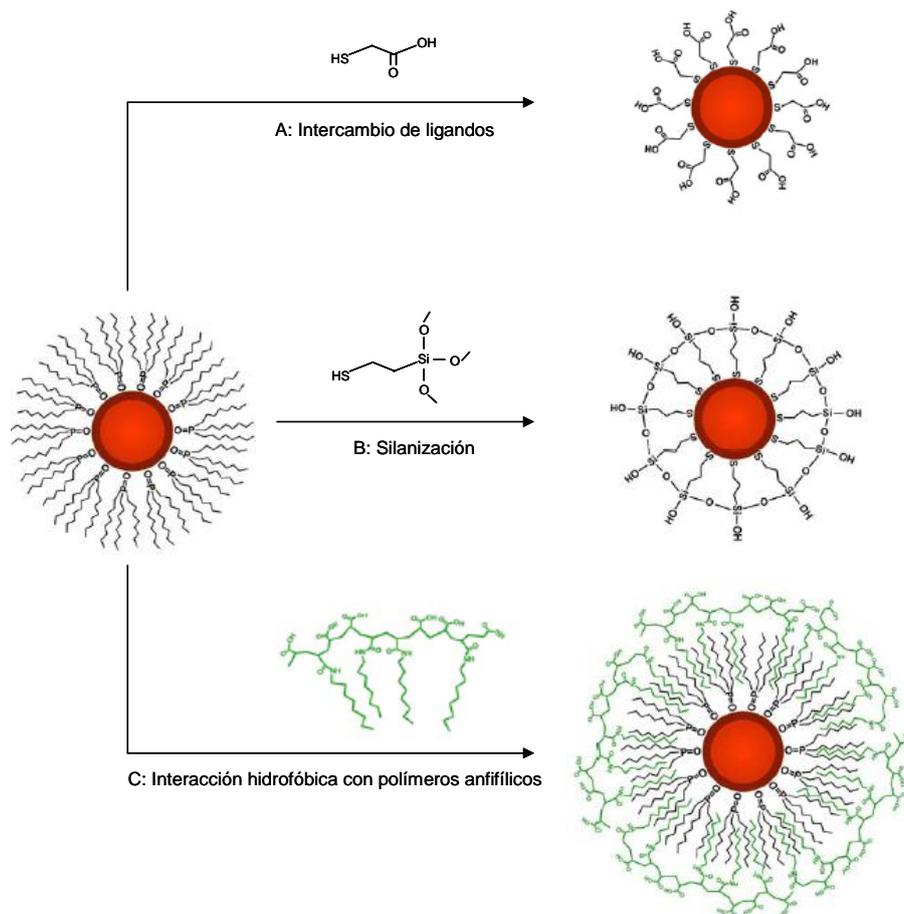


Figura 7. Estrategias de solubilización de los quantum dots en medios acuosos.

C) Interacción hidrofóbica con polímeros anfifílicos.

Se basa en la interacción hidrofóbica de las cadenas carbonadas de un polímero anfifílico (polímero que posee una parte hidrófoba y otra hidrófila) con las cadenas carbonadas de los ligandos que recubren la superficie de las nanopartículas. Así, los grupos hidrofílicos del polímero se orientan hacia el exterior de la nanopartícula,

confiriendo solubilidad en medios polares a los quantum dots [35,36]. Los nanocristales así obtenidos poseen mayor rendimiento cuántico de la fluorescencia, y son más estables que aquellos en los que se produce un intercambio de los ligandos de la superficie, debido principalmente a la retención de las moléculas TOPO, TOP y HDA que rodean a la nanopartícula originalmente. Otra importante ventaja de esta estrategia de solubilización, es que permite modificaciones posteriores de la nanopartícula con (bio)moléculas o con determinados grupos funcionales de interés para una aplicación dada.

A.2.4. Aplicaciones (bio)analíticas de los quantum dots.

La posibilidad de sintetizar quantum dots altamente fluorescentes y biocompatibles mediante la modificación adecuada de su superficie, demostrado por Nie y Alivisatos en sendos artículos de 1998 [31,30], junto con otros importantes desarrollos como la nueva vía muy simple para la síntesis de QDs de alta calidad propuesto en el año 2001 por el grupo de Peng [37], han estimulado el uso de quantum dots para aplicaciones bioquímicas. Así, durante los últimos años se han descrito numerosos trabajos orientados hacia el empleo de QDs como marcadores de biomoléculas, en el desarrollo de inmunoensayos fluorescentes o con el objetivo de llevar a cabo “Bio-imaging” y multi-análisis.

En efecto, durante los últimos diez años, las aplicaciones bioanalíticas de los quantum dots han experimentado un enorme auge. En el campo de la biología y la medicina, los quantum dots se han utilizado para monitorizar y detectar numerosas especies de interés desde el punto de vista biomédico, así como, para llevar a cabo el seguimiento de numerosos procesos biológicos. Una de las primeras aplicaciones en este campo fue publicada por Bruchez y colaboradores [31], que emplearon quantum dots de diferentes tamaños y con diferentes modificaciones superficiales, que presentaban afinidades con biomoléculas distintas. Desde la aparición de los primeros trabajos en esta línea hasta hoy día se han desarrollado numerosas aplicaciones biomédicas de los quantum dots: detección de tejidos cancerosos, estudios de funciones de proteínas celulares, seguimiento de las rutas farmacológicas en el interior del organismo, etc. [38].

Por otro lado, recientemente se ha explorado la posibilidad de utilizar quantum dots como indicadores luminiscentes en análisis químico [39].

La mayoría de las metodologías analíticas propuestas hasta la fecha utilizando quantum dots como indicadores “directos” están basadas en medidas de cambios en la emisión de la fluorescencia de la nanopartícula tras interaccionar el analito con su superficie. De este modo, se han propuesto métodos para llevar a cabo la determinación de distintas especies químicas como por ejemplo:

- Cationes como Hg (II) [40], Cu (II) y Zn (II) [41], Ag (I) [42].
- Aniones, como el yoduro [43] y el cianuro [44,45].
- Gases como trietilamina (activación de la luminiscencia) o benzilamina (desactivación de la luminiscencia) [46].

Estos métodos, basados en la interacción del analito con la superficie de los quantum dots, son sencillos y algunos de ellos han demostrado ser altamente sensibles. Sin embargo, hay que señalar que, por lo general, no se conoce bien el mecanismo por el que estos quantum dots ofrecen respuestas específicas a los analitos. Además, desafortunadamente, parece que este tipo de sistemas está restringido tan solo a la detección de algunas moléculas pequeñas reactivas, o a iones que son capaces de interaccionar directamente con la superficie de los quantum dots modificando sus propiedades luminiscentes. En muchos casos, estas reacciones presentan una limitada selectividad y una gran dependencia de las propiedades de la superficie de las nanopartículas, lo que puede ser un inconveniente ya que posibles interacciones con especies del entorno del nanocrystal pueden modificar las medidas absolutas de fluorescencia, interfiriendo en la determinación del analito.

Una alternativa a la estrategia anteriormente descrita consiste en el desarrollo de metodologías analíticas basadas en el empleo de elementos de reconocimiento selectivos al analito a determinar modificados con quantum dots, que actúen como indicadores luminiscentes y que permitan llevar a cabo la detección del analito reconocido. En esta línea, las dos estrategias más estudiadas hasta la fecha son aquellas basadas en el empleo de anticuerpos, para el desarrollo de inmunoensayos luminiscentes y las basadas en mecanismos de transferencia de energía [47].

Se han desarrollado inmunoensayos fluorescentes basados en el empleo de quantum dots conjugados con anticuerpos encargados de llevar a cabo la detección de la especie de interés [16]. La mayoría de estos ensayos están basados en el empleo de quantum dots de CdSe/ZnS recubiertos con grupos carboxílico en la parte exterior, como ácido mercaptoacético, ácido mercaptosuccínico o ácido dihidrolipoico. Estos grupos pueden ser empleados para conjugar los quantum dots con un anticuerpo mediante el empleo de etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida. Siguiendo esta aproximación, se ha diseñado un “chip” de vidrio para la detección de inmunoglobulina G humana [48]. También se han desarrollado inmunoensayos tipo sandwich para determinar tanto moléculas de gran tamaño como algunas toxinas, así como moléculas pequeñas como el 2,4,6-trinitrotolueno [49]. A pesar de que los límites de detección obtenidos hasta la fecha con estas metodologías generalmente no superan los establecidos por los métodos convencionales, el empleo de quantum dots como marcadores fluorescentes en el desarrollo de inmunosensores resulta de gran valor cuando se pretende poner a punto sistemas de análisis multianalito (requeridos en muchas aplicaciones medioambientales y bioquímicas actuales).

Las metodologías basadas en mecanismos de transferencia de energía presentan un gran potencial haciendo uso de las excepcionales propiedades optoelectrónicas de los quantum dots. A diferencia de las moléculas orgánicas convencionales, el empleo de quantum dots permite obtener un elevado grado de solapamiento entre la emisión del donador y la absorción del aceptor, lo que constituía uno de los factores limitantes de esta metodología. Otra de las ventajas que presentan los quantum dots para el desarrollo de metodologías basadas en procesos de transferencia de energía es su amplio espectro de absorción, lo que permite su excitación a una longitud de onda suficientemente alejada de la longitud de onda de excitación de la molécula aceptor. Además, los espectros de emisión de estos fluoróforos son más estrechos y simétricos, lo que favorece la discriminación entre la emisión del donador y la emisión del aceptor.

A pesar de estas ventajas, los quantum dots no están exentos de inconvenientes. Su tamaño, mayor que el de las moléculas fluorescentes orgánicas exige mantener una distancia mayor entre el donador y el aceptor para que el proceso de transferencia de energía tenga lugar de forma efectiva, ya que normalmente, la transferencia de energía

se produce con mayor eficiencia cuando la distancia donador aceptor está en el rango de los 20 a 60 Å.

Recientemente se ha descrito un sistema tipo FRET para la detección de la enzima proteolítica colagenasa [50] empleando como aceptores nanopartículas de oro unidas a la superficie de los quantum dots mediante un péptido. La presencia de colagenasa rompe la interacción entre el donador y el aceptor, dando lugar a un incremento de la emisión de los quantum dots proporcional a la concentración de enzima en el medio. Se han descrito numerosos estudios que ponen de manifiesto el extraordinario potencial que presentan los quantum dots en ensayos de este tipo. Además, la posibilidad de conjugación con un número elevado de aceptores que ofrecen estas nanopartículas, permitirá generar sistemas mixtos con diferentes aceptores que permitan llevar a cabo ensayos multianalito sencillos. Esta posibilidad se presenta como una interesante oportunidad para la construcción y optimización de nuevos tipos de nanosensores.

A.3. INTERÉS ANALÍTICO DE LA DETERMINACIÓN DE METILEFEDRINA.

A.3.1 MetilEfedrina.

La Metilefedrina (MeEf), es una droga estimulante, con similares efectos a la más conocida de estas drogas (la Metaanfetamina). Al igual que ésta, la Metilefedrina, también es un agente de uso dopante, por tanto es una sustancia prohibida por la Agencia Mundial Anti-doping, así pues su concentración en orina no puede ser superior a $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

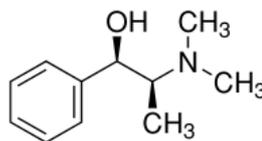


Figura 8. MetilEfedrina

A.3.2 Mecanismo de detección de la MetilEfedrina.

Normalmente el análisis de metilefedrina se lleva a cabo usando técnicas de cromatografía previas a la detección, que tiene lugar habitualmente por espectrometría de masas [51].

Sin embargo, existe un interés creciente en el desarrollo de metodologías de análisis químico rápidas y sencillas que permitan llevar a cabo una determinación directa basadas en el empleo de sensores químicos. Por ello se han desarrollado métodos alternativos, espectrofométricos

La Metilefedrina (MeEf), una amina terciaria, reacciona con el tetrabromophenolphthaleyn ethyl ester (TBPE), formando un compuesto coloreado, que presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 595 nm [52]. Por tanto, en este trabajo se propone el desarrollo de un sistema de detección de la MeEf a través de medidas de fluorescencia con FRET y basado en el descenso de emisión en la fluorescencia de los PQDs debido a un proceso de transferencia de energía resonante de Förster, al aumentar la absorción del compuesto con la MeEf en disolución.

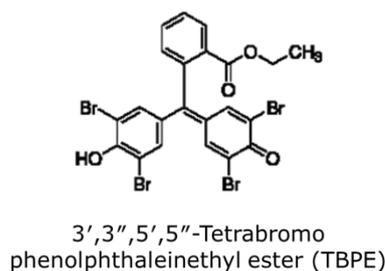


Figura 9. Tetrabromo phenolphthaleinethyl ester(TBPE)

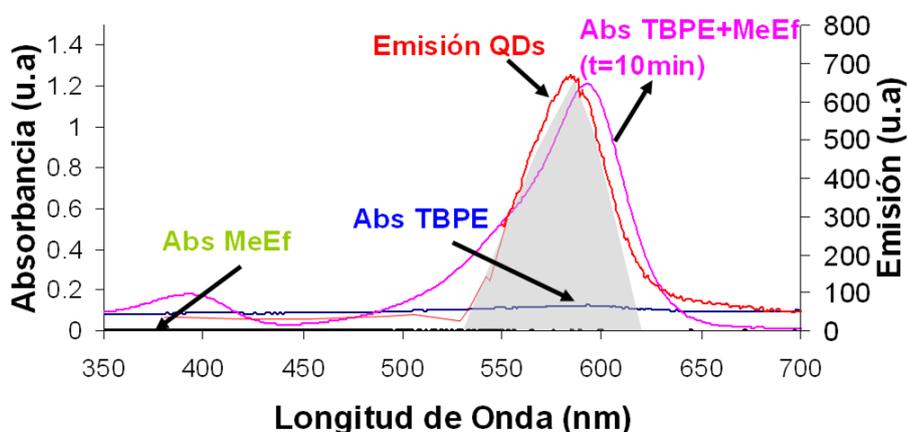


Figura 10. Solapamiento espectral Donor-Aceptor y respuesta del Aceptor a la MeEf

B. OBJETIVOS DEL TRABAJO

En la Introducción del presente Trabajo Fin de Máster, ha quedado patente el creciente interés en el desarrollo de metodologías analíticas que aprovechen las ventajas que ofrecen los nuevos materiales nanométricos, y particularmente las nanopartículas luminiscentes semiconductoras.

En este contexto, en los últimos años se han llevado a cabo distintos diseños experimentales para la producción de FRET entre un Donor (PQDs) y un Aceptor (colorante orgánico que modifica sus características espectrofotométricas en presencia del analito), para el desarrollo de metodologías fotoluminiscentes de análisis la configuración más empleada ha sido la interacción QD-Colorante, a través de una unión covalente, aprovechando los anillos anhídros del polímero que recubre al QD. Sin embargo, una nueva estrategia; a priori, más sencilla y universal consistiría en producir un encapsulamiento del colorante entre las cadenas alifáticas de polímero que rodean al QD. De esta forma se conseguiría un mecanismo mucho más versátil, pues sería factible aplicarlo para cualquier tipo de aceptor, y no exclusivamente aceptores con grupos funcionales que reaccionen con el polímero para su unión covalente.

En esta línea, el objetivo general del presente trabajo, consiste en la síntesis y adecuado recubrimiento de la superficie de los QDs con un polímero orgánico anfifílico y de la encapsulación del aceptor sensible al analito en el mismo proceso en el que se realiza el recubrimiento. Finalmente se evaluará la aplicación de este sistema para el desarrollo de una metodología analítica para la determinación de MeEf en orinas.

Metodológicamente este objetivo general ha sido abordado desde las siguientes líneas de actuación:

1. En una primera etapa se realizó un estudio de la evolución de las características espectrofotométricas del colorante indicador, TBPE, en presencia y ausencia de MeEf, así como el cambio de las mismas en función del pH, para seleccionar así las condiciones de pH y el tiempo de reacción óptimos para poder abordar el estudio basado en transferencia de energía.
2. Una vez seleccionadas las condiciones óptimas para llevar a cabo la reacción de TBPE con MeEf, se estudió el sistema QDs-TBPE-MeEf, para comprobar si se producía el fenómeno de transferencia de energía. Estas pruebas se llevaron a cabo tanto en disolución acuosa como en medio orgánico.

3. Finalmente, se ha comenzado a desarrollar el método de determinación de la MeEf, encapsulando el TBPE, en las cadenas alifáticas de polímero y produciendo el fenómeno de transferencia de energía entre Donor-Aceptor.

Por último, es preciso mencionar que, además de los objetivos científicos anteriormente expuestos, un objetivo fundamental de este Proyecto Fin de Máster consiste en desarrollar un número importante de competencias de aprendizaje, tanto generales como específicas, que sean de utilidad a la hora de enfrentarse a un determinado problema en el ámbito laboral.

De forma particular entre las competencias de aprendizaje que se pretenden desarrollar con la realización del presente Proyecto Fin de Máster engloban, en mayor o menor grado, todas las competencias generales recogidas en la Memoria de Verificación del Máster y las siguientes competencias específicas:

- Conocer los fundamentos y principios teóricos de las técnicas fluorimétricas de análisis, así como la metodología experimental asociada
- Seleccionar y utilizar las técnicas de análisis más adecuadas para el análisis y caracterización de nanomateriales
- Interpretar la información obtenida en el laboratorio con las distintas técnicas de análisis seleccionadas para resolver eficientemente problemas

C. EXPERIMENTAL

C.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS.

C.1.1. Instrumentación utilizada.

- Espectrofotómetro de luminiscencia Varian Cary Eclipse (Varian Ibérica) equipado con lámpara de xenón (potencia de pico equivalente a 75 KW), monocromadores Czerny-Turner y detector mediante tubo fotomultiplicador modelo R-298. El programa de control y tratamiento de datos, Cary Eclipse, opera bajo entorno Windows.
- Espectrofotómetro UV/Vis/NIR modelo Lambda 900 Perkin Elmer, provisto de ordenador con programa de control y tratamiento de datos bajo entorno Windows (W-Winlab).
- pHmetro modelo micro pH2000 (Crison).
- Balanza Precisa 180 A, con precisión hasta $\pm 0,01$ mg.
- Baño de ultrasonidos, J.P.Selecta.
- Equipo de agua Milli-Q Advantage, Millipore.
- Rotavapor Heidolph WB2000/VV2000
- Centrífuga Biofuge Stratus, Heraeus.

C.1.2. Material.

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

- Micropipetas Labmate y Finnipipette de volúmenes ajustables.
- Celda de cuarzo convencional para medidas de luminiscencia, Hellma (modelo 101-QS, con paso óptico de 10 mm).
- Material volumétrico de vidrio de calidad contrastada.

C.1.3. Reactivos y disoluciones.

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

Los reactivos empleados han sido:

- Etanol de la casa Prolabo.
- Metanol anhidro de la casa Aldrich.
- Ácido hexilfosfónico de la casa Alfa Aesar.
- Óxido de trioctilfosfina 99% de la casa Aldrich.
- Trioctilfosfina 90% de la casa Aldrich.
- Óxido de cadmio 99,99% de la casa Sigma.
- Selenio 99,99% de la casa Sigma.
- Hexametildisilazano / Bis (trimetilsilil) sulfuro de la casa Sigma.
- Dietilzinc 1,0 M de la casa Sigma.
- Ácido 2-mercaptoetanosulfónico 98% de la casa Aldrich.
- Ácido 2-mercaptoacético 97 % de la casa Aldrich.
- Hidróxido de tetrabutilamonio de la casa Sigma.

- Cloroformo anhidro de la casa Aldrich.
- NaOH de la casa Sigma.
- Metilefedrina 99% de la casa Sigma.
- Tetrabromo phenophtaleyn ethyl ester 99% de la casa Sigma.
- Argón de la casa Air Liquide.
- Disolución reguladora de borato de sodio 50 mM (2,5 L) pH 12 o pH 9: 250 mL de ácido bórico 0,5 M se mezclan con 2 L de agua Mili-Q. El pH se ajusta añadiendo la cantidad apropiada de hidróxido de sodio 1 M.
- Disolución reguladora HAc/AcNa 50 mM (250 mL) de distintos pH mediante la adición de la cantidad necesaria de acetato de sodio .El pH se ajusta añadiendo la cantidad apropiada de ácido acético 1 M.
- Disolución de polímero anfifílico (PMA75C12) con una concentración estimada de 0,8 M en cloroformo anhidro, sintetizado en el laboratorio a partir de poli(anhídrido isobutilen-alt-maleico) y dodecilamina.
- Disolución de entrecruzador, bis-hexametilentriamina 0,02 M en cloroformo anhidro.

C.1.4. Síntesis de quantum dots.

- La preparación de las disoluciones de reactivos para la síntesis de quantum dots se realiza bajo atmósfera inerte siguiendo un procedimiento ya optimizado en nuestro Grupo de Investigación [47]. En primer lugar se disuelve el polvo de Se (0,0255 g) en trioctilfosfina (1,5 mL). A continuación en un matraz de tres bocas en el que se ha depositado el CdO (0,0315 g) pesamos 0,12 g de HPA (Ácido hexilfosfónico) y 3,5 g de óxido de trioctilfosfina. La disolución que proporciona el recubrimiento de ZnS a la nanopartícula se prepara mezclando: 0,26 mL de bis (trimetrilsilil) sulfuro, 10,25 mL de trioctilfosfina y 1,75 mL de dietilzinc 1,0 M.

- El matraz de tres bocas se coloca en una manta calefactora equipada con un termopar y un controlador de temperatura. La mezcla del matraz se calienta bajo agitación continua a 300 °C bajo un flujo de Ar durante 15-20 minutos para poder disolver completamente el precursor de cadmio en estos disolventes coordinantes. Una vez disuelto se baja la temperatura a 270 °C y se inyectan 1,2 mL de la disolución de Se en trioctilfosfina. Tras la adición se baja la temperatura hasta 250 °C, etapa durante la cual tiene lugar el proceso de nucleación. Una vez alcanzado el tamaño de partícula deseado se reduce de nuevo la temperatura hasta 230 °C y se adicionan 1,5 mL de la mezcla precursores de zinc y azufre de forma lenta para evitar la formación de núcleos de ZnS. Finalmente se mantiene el sistema durante una hora a 100 °C (etapa de recocido) y a continuación se deja a temperatura ambiente, y se procede a su purificación mediante centrifugaciones sucesivas con cloroformo y metanol. Se llevará a cabo un estudio de las propiedades físicas y luminiscentes de las nanopartículas y se seleccionarán aquellas que presenten mejores propiedades luminiscentes y mayor estabilidad.

C.1.5. Síntesis del polímero anfifílico.

- Para sintetizar el polímero anfifílico se sigue un procedimiento ya optimizado previamente en nuestro Grupo de Investigación [53]. Para ello se disuelven 15 mmol de dodecilamina en 100 mL de tetrahidrofurano, que se añaden rápidamente sobre 20 mmol del monómero bajo agitación constante. A continuación se sonica durante 20 segundos, y calienta a 55-60 °C durante 1 h. Después de este proceso, se lleva a cabo la preconcentración de la disolución hasta obtener una tercera parte del volumen inicial para favorecer la reacción entre la amina y el polímero. Una vez que la muestra ha sido concentrada, se agita durante doce horas. Transcurrido este tiempo se evapora lentamente el disolvente hasta sequedad, y el polímero se redisuelve en 25 mL de cloroformo anhidro para obtener una disolución final con una concentración estimada de 0,8 M de monómero.

C.1.6. Medida de la concentración y del tamaño de nanopartícula sintetizado.

La estimación de la concentración y el tamaño de las nanopartículas sintetizadas, se lleva a cabo mediante medidas espectrofotométricas, utilizando la ecuación desarrollada por Peng [54]. Esta ecuación basada en la obtención de curvas empíricas nos permite obtener, a partir de la longitud de onda del primer pico del espectro de absorción, el diámetro de la nanopartícula (expresado en nm), y a partir de este, mediante una nueva ecuación obtenemos el coeficiente de extinción molar. A partir de este coeficiente de extinción molar, y mediante el valor absorbancia a la longitud de onda del primer exciton podemos estimar la concentración de nanopartículas en la disolución mediante la fórmula de Lambert-Beer.

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

C.2. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO DEL ACEPTOR (TBPE), EN FUNCIÓN DE LA PRESENCIA DE MEEF EN EL MEDIO Y DEL PH.

C.2.1. Efecto de la MeEf en la absorbancia del TBPE.

En un primer momento para estudiar el efecto de la MeEf en el comportamiento espectrofotométrico del TBPE, se decidió realizar las medidas espectrales en medio orgánico (cloroformo) debido a que ambas especies son más solubles en fase orgánica que en fase acuosa realizar el experimento utilizando cloroformo como disolvente.

Así pues, se preparó una disolución 10 μM de TBPE en cloroformo a la que se hicieron sucesivamente 3 adiciones de volúmenes distintos de MeEf de la misma concentración 3mM. Se llevaron a cabo las medidas del espectro de absorbancia de cada una de las disoluciones.

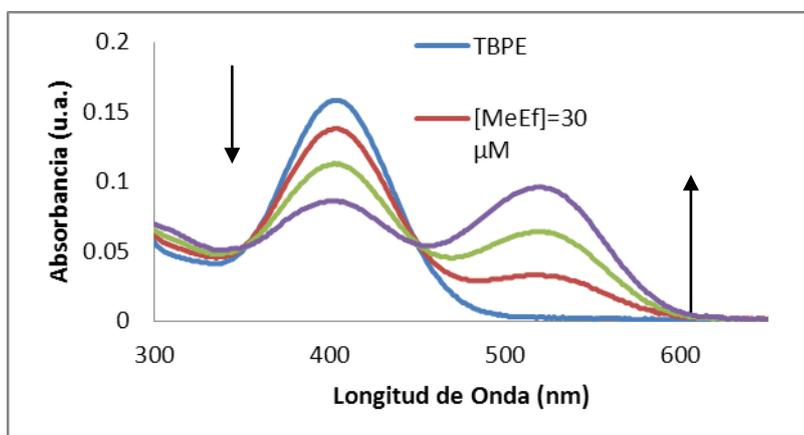


Figura 11. Comportamiento espectrofotométrico del TBPE disuelto en CHCl_3 en presencia de cantidades crecientes de MeEf.

Los espectros botenidos presentan dos bandas centradas en dos máximos de absorbancia, uno a aproximadamente 400 nm y otra banda centrada en aproximadamente 525 nm. Se observó que el efecto que provoca la MeEf sobre ambas bandas ha resultado ser opuesto, un aumento de la concentración de MeEf provoca un aumento en el máximo a 525 nm y un descenso en el máximo a 400 nm

A la vista de los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta que el objetivo planteado consistía en el desarrollo de una metodología analítica para la determinación de MeEf en fase acuosa, se decidió estudiar el comportamiento espectrofotométrico del TBPE en función del pH.

C.2.2. Efecto del pH.

El aceptor (TBPE), es prácticamente insoluble en disolución acuosa, por tanto, es difícil asegurar exactamente la concentración del mismo en disolución. Por esto, se saturó la disolución acuosa, con TBPE, utilizando para ello distintas disoluciones reguladoras:

- Acetato de Sodio/Ácido Acético. pH=5.5
- SBB.pH=12
- PBS pH=7.4

Comportamiento espectrofotométrico TBPE, pH= 5.5.

Para realizar este estudio, se disolvió TBPE en la disolución reguladora de pH=5.5, y a continuación, se hace una adición de MeEf de concentración 5mM. Los espectros obtenidos se recogen en la *Figura 12*.

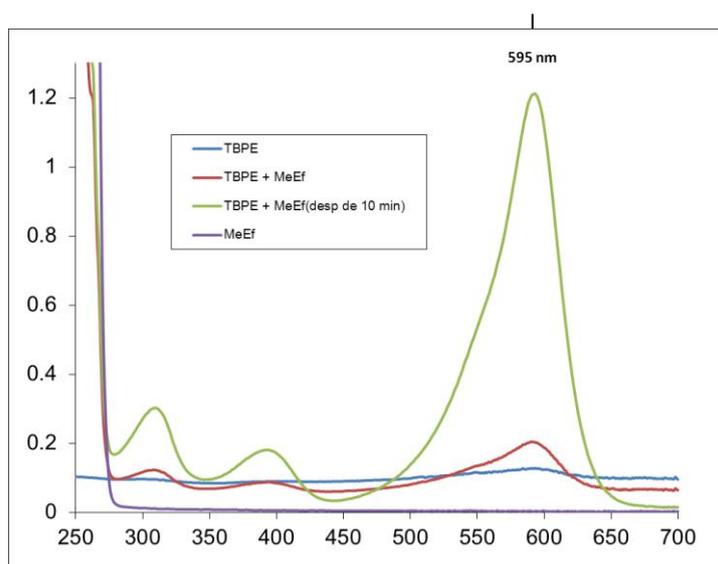


Figura 12. Espectros de absorción, del analito, aceptor y de la mezcla de ambos pH=5.5.

Tras observar, que la absorción a $\lambda = 595$ nm aumenta con la adición de MeEf, y que además dicha absorbancia varía con el tiempo, se repitió el procedimiento, pero monitorizando la absorbancia con el tiempo, para comprobar en qué se obtiene una señal estable.

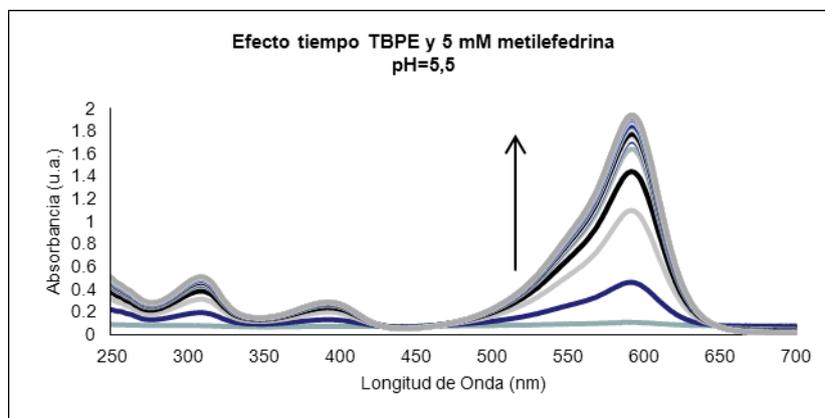


Figura 13. Evolución temporal de la absorbancia del aceptor en presencia de MeEf pH=5.5.

Representando la variación de absorbancia en función del tiempo, se obtiene el siguiente diagrama *Figura 14*.

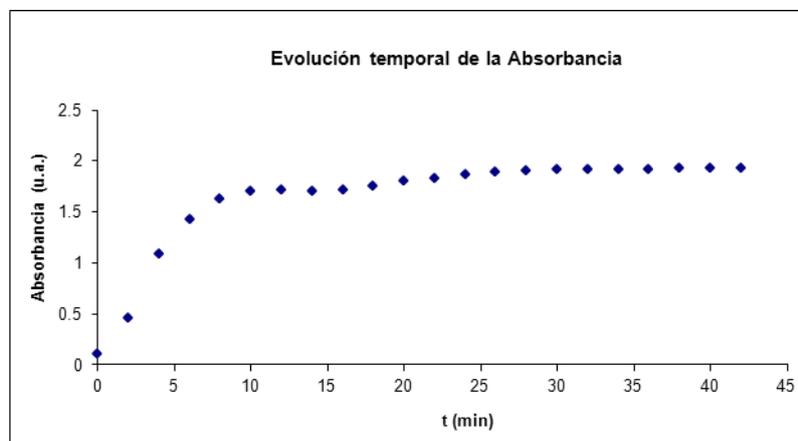


Figura 14. Cambio de la absorbancia del aceptor ($\lambda = 595$ nm) en función del tiempo de reacción pH=5.5.

A la vista de los resultados, se decide esperar un tiempo de 10 minutos tras la adición de la MeEf para realizar las medidas de absorbancia debido que a partir de ese momento se alcanza una señal estable.

Comportamiento espectrofotométrico TBPE, pH= 12.

Se repitió el procedimiento anteriormente descrito para el caso de pH= 5.5 pero en este caso, utilizando una reguladora de SBB pH=12.

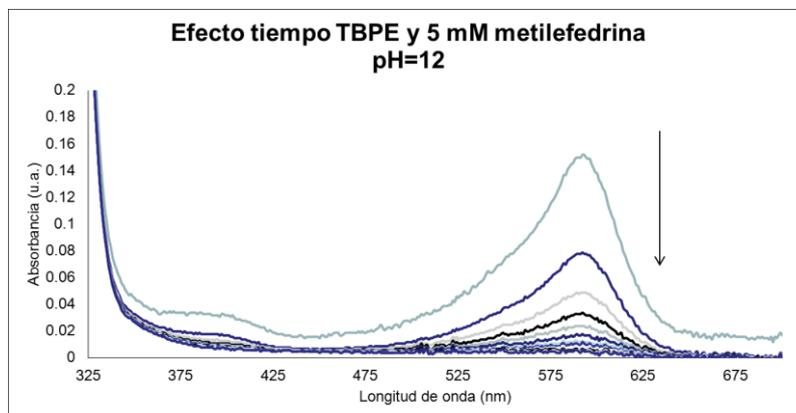


Figura 15. Evolución temporal de la absorbancia del aceptor en presencia de MeEf pH=12

Las Figuras 15 y 16 recogen la representación de la absorbancia con el tiempo, de una disolución de TBPE a la que se le ha añadido una concentración de MeEf de 5mM. En este caso se observa una disminución de la absorbancia de la disolución en función del tiempo y en presencia de la MeEf.

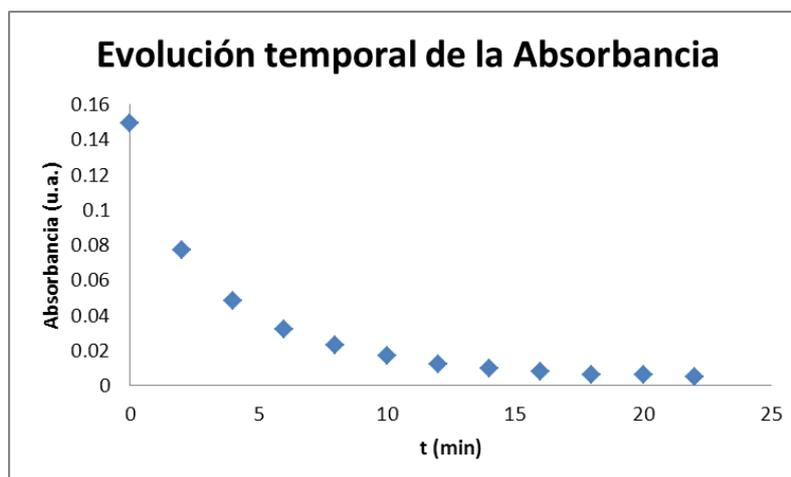


Figura 16. Cambio de la absorbancia del aceptor ($\lambda=595$ nm) en función del tiempo de reacción pH=12.

A la vista de los resultados obtenidos se puede observar cómo, a partir del minuto 10 de reacción, ésta se puede dar por finalizada, pues apenas varía la señal de absorbancia.

Finalmente se llevó a cabo el mismo estudio utilizando un buffer PBS pH=7.4, obteniéndose el mismo comportamiento que para pH=12.

Así pues, se observan dos comportamientos opuestos dependiendo del pH básico o ácido del medio. Por ello, se decidió trabajar a pH= 5.5 y pH= 12 para el resto de estudios, comparando los resultados obtenidos en medios casos.

C.3. DEMOSTRACIÓN DEL FENÓMENO DE TRANSFERENCIA DE ENERGÍA RESONANTE DE FÖRSTER.

C.3.1. Consideraciones generales.

Los quantum dots (QDs) utilizados a lo largo del presente trabajo fueron sintetizadas en nuestro laboratorio [47] siguiendo el método de síntesis descrito por el grupo del Dr. Peng [23] con unas mínimas modificaciones. Las nanopartículas sintetizadas, siguiendo el procedimiento descrito en la sección *C.1.4* de la presente Memoria, están constituidas por un núcleo de CdSe, un recubrimiento de ZnS y finalmente están recubiertas de cadenas de trioctilfosfinas (que les confieren estabilidad en medio orgánico). La relación molar de los precursores Cd/Se utilizada es de 0,95, ya que los quantum dots obtenidos en esas condiciones presentan además de unas buenas propiedades luminiscentes, un tamaño de partícula uniforme.

La caracterización exhaustiva mediante estudios de Espectrofotometría Molecular, Fluorescencia Molecular y Microscopia de Transmisión Electrónica sirve para comprobar que la distribución de las nanopartículas es homogénea, conocer la longitud de onda de emisión fluorescente de los quantum dots, así como el tamaño y concentración de estas nanopartículas respectivamente [54]. Este proceso es necesario para poder realizar modificaciones posteriores a las nanopartículas con objeto de solubilizarlas en medio acuoso.

C.3.2. Estudios en fase orgánica.

Una vez comprobado el comportamiento espectrofotométrico del TBPE en función de la concentración de MeEf y del pH del medio, se procedió a evaluar si hay un proceso FRET entre los QDs (Donor) y el complejo coloreado TBPE-MeEf (especie aceptora).

Para ello se llevaron a cabo varios experimentos:

- a) Comprobación que el compuesto TBPE-MeEf no presenta fluorescencia intrínseca: Se registraron los espectros de emisión fluorescente de cuatro disoluciones preparadas mezclando 500 μL TBPE 10 μM con 3 adiciones sucesivas de 5, 10 y 20 μL de MeEf, 3 mM en CHCl_3 .

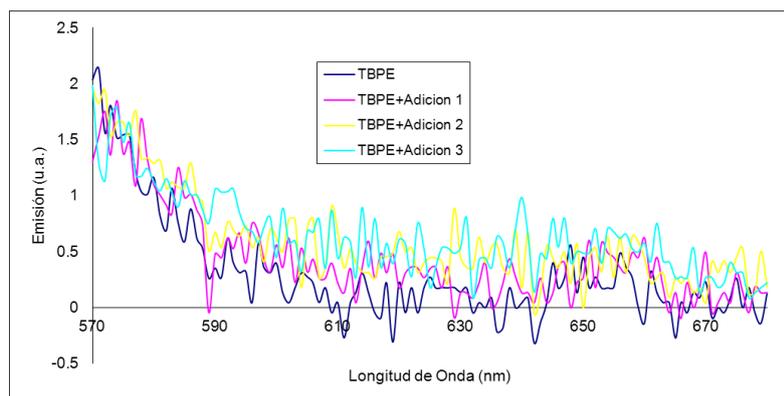


Figura17. Espectros de emisión fluorescente del aceptor (TBPE-MeEf) sólo y en presencia de cantidades crecientes de MeEf, ($\lambda_{\text{exc}}=280$ nm).

- b) En un primer lugar se llevó a cabo el espectro de fluorescencia de los QDs en cloroformo, observando que presenta una emisión fluorescente con un máximo de emisión a 600 nm ($\lambda_{\text{exc}}=280$ nm). Este espectro presenta un alto grado de solapamiento con el espectro de absorbancia de la MeEf-TBPE (recogido en la *Figura 10*). Se cumple pues uno de los requisitos necesarios para asegurar que tenga lugar un proceso FRET entre ambas especies.

En la *Figura 17* se recogen los espectros de absorción medidos a 10 minutos tras mezclar las especies químicas. Se observa cómo no se forma una especie que presente fluorescencia intrínseca apreciable, que pueda interferir en la emisión de los QDs.

- c) Comprobación de que se está produciendo FRET. Se llevó a cabo la preparación de una disolución que contenga mezcla QDs +TBPE, sobre la cual se hicieron adiciones crecientes de MeEf, para estudiar la evolución de las características tanto espectrofotométricas como luminiscentes de la mezcla tras las adiciones. Asimismo se realizó, a modo de blanco, la misma mezcla, pero en lugar de

realizar adiciones de MeEf, se realizan adiciones de cloroformo, para comprobar que en caso de observar algún cambio este no sea debido a un efecto de dilución.

Para ello se mezclan 400 μL QDs 5 μM + 200 μL TBPE 10 μM y se realizan adiciones de MeEf 5mM como se representa en la siguiente tabla:

Tabla 1. Resumen de los volúmenes añadidos y de las concentraciones finales de MeEf en disolución.

| V Disolución (μL) | V adición (μL) | V añadido total (μL) | [MeEf] en disolución (μM) | I emisión (u.a.) |
|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|--|------------------|
| 600 | 0 | 0 | 0 | 582 |
| 605 | 5 | 5 | 41.32 | 547 |
| 610 | 5 | 10 | 81.97 | 492 |
| 615 | 10 | 20 | 162.60 | 450 |
| 625 | 30 | 50 | 400.00 | 421 |
| 655 | 20 | 70 | 534.35 | 424 |
| 675 | 30 | 100 | 740.74 | 407 |
| 705 | 50 | 150 | 1063.83 | 437 |

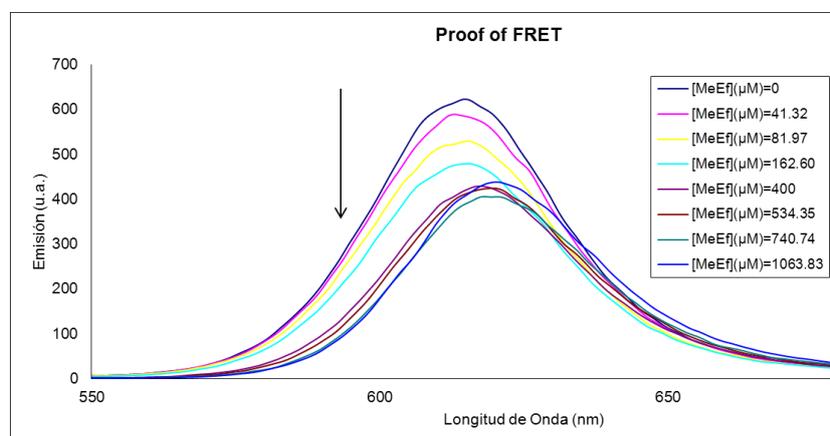


Figura 18. Evolución de la emisión fluorescente de los QDs+TBPE al aumentar la concentración de MeEf en el medio.

Cómo se puede observar en la *Figura 18*, la señal de emisión fluorescente de los QDs, disminuye a medida que aumenta la concentración de MeEf en el medio debido a la reacción entre la MeEf y el TBPE y el consiguiente aumento en la absorbancia.

Para confirmar que no se trata de un posible efecto de dilución por tratarse de adiciones sucesivas sobre la misma disolución, se repite el experimento en las mismas

condiciones, pero en este caso, las adiciones son de cloroformo. Los resultados obtenidos se presentan en la *Figura 19*.

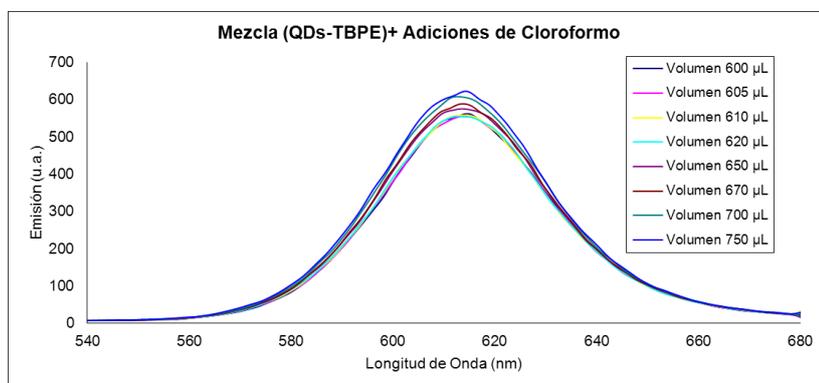


Figura 19. Evolución de la emisión fluorescente de los QDs+TBPE al realizar adiciones de Cloroformo en lugar de MeEf.

Como se observa en la *Figura 19*, no se observan efectos de dilución significativos, al realizar las sucesivas adiciones de cloroformo sobre la disolución de QDs con TBPE. Esto confirma que el descenso observado en la señal luminiscente con la adición de MeEf (*Figura 18*) se debe al fenómeno de transferencia de energía, entre los QDs(Donor) y el complejo formado por la reacción de TBPE-MeEf (Aceptor).

En la *Figura 18* se observa cómo la señal desciende hasta que a partir de una concentración de MeEf empieza a mantenerse constante. Esto puede deberse a que se haya consumido todo el TBPE, que en estas condiciones es el reactivo limitante. Este hecho se observa de forma más clara en la *Figura 20*.

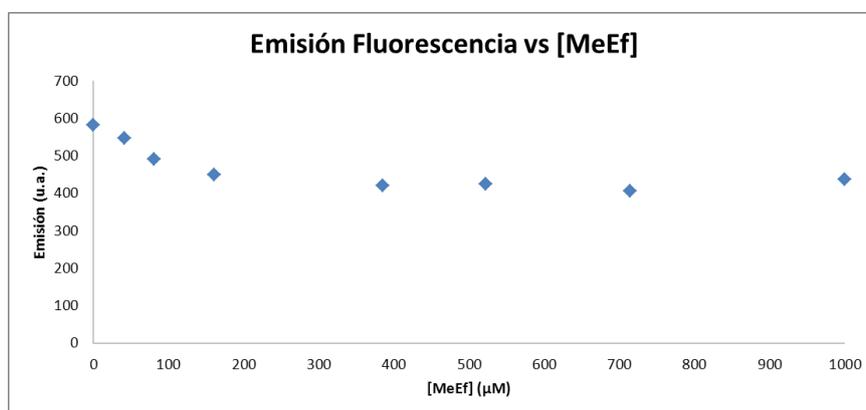


Figura 20. Emisión Fluorescente de QDs+TBPE (605nm) frente a la concentración de MeEf.

Sin embargo, realizando una representación únicamente de la señal respecto de emisión luminiscente frente a la concentración de MeEf en disolución para las concentraciones más bajas, se observa cómo ésta representación presenta cierta linealidad.

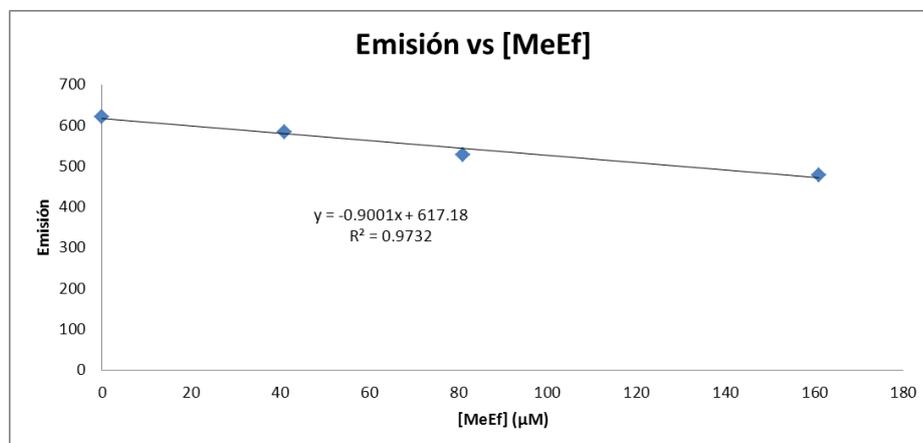


Figura 21. Emisión QDs-TBPE frente concentraciones de MeEf en el rango lineal previo a la saturación.

Así pues, una vez demostrado que tiene lugar un proceso FRET de los QDs al TBPE en fase orgánica en presencia de MeEf, se continúan los experimentos en fase acuosa.

C.3.3. Solubilización de los QDs en medios acuosos.

Los QDs sintetizados según el procedimiento anteriormente descrito son solubles en disolventes orgánicos, aunque insolubles en medios acuosos. Como ya se ha comentado anteriormente a lo largo de la introducción de la presente memoria la modificación de la superficie de los quantum dots puede tener lugar siguiendo diferentes esquemas (*ver figura 7*). Particularmente, las nanopartículas utilizadas en este trabajo han sido modificadas siguiendo la estrategia de “*interacción con un polímero anfifílico*”.

La solubilización de los quantum dots en medio acuoso mediante la *interacción con un polímero anfifílico* requiere la síntesis previa de este, ya que no se dispone de un reactivo comercial que proporcione buenos resultados [53]. En la síntesis del polímero anfifílico PMA75C12 se utiliza como monómero el anhídrido poli (isobutileno-alt-maleico). Cada monómero consta de un anillo anhídrido. La síntesis está basada en la reacción de los grupos amino de la dodecilamina con los anillos anhídrido del monómero. La estequiometría ha sido elegida de forma que el 75% de los anillos

anhídrido disponibles reaccionen con los grupos amino de la dodecilamina. A continuación, el polímero todavía tiene el 25% de los grupos anhídrido que pueden reaccionar con otros grupos. Todos los disolventes empleados en la síntesis son anhídridos con objeto de evitar la apertura de los anillos anhídrido.

El proceso de modificación de los quantum dots por interacción con el polímero anfifílico (**PQDs**) requiere conocer el tamaño de las nanopartículas así como su concentración (que se lleva a cabo según el procedimiento descrito en la sección *C.1.6*). En primer lugar se mezcla la disolución de concentraciones conocidas de nanopartículas de un tamaño determinado con la cantidad necesaria de polímero y se somete a un proceso de agitación para favorecer la interacción hidrofóbica entre las cadenas de trioctilfosfinas y el polímero. Con objeto de estabilizar la estructura se añade finalmente una disolución de bis-hexametilentriamina 0.02 M que actúa como entrecruzador y proporciona estabilidad a la estructura final.

C.3.4. Estudio en fase acuosa.

Para realizar la comprobación de que se produce el fenómeno de transferencia de energía en disolución acuosa desde los QDs (donadores) al TBPE en presencia de MeEf, se decide abordar el estudio siguiendo el mismo procedimiento que para fase orgánica, (en este caso seleccionando un pH=5.5, debido a que el objetivo final de esta metodología sería el análisis de MeEf en orina, un matriz eminentemente ácida).

Por tanto, utilizando el procedimiento anteriormente descrito en el apartado C.3.2, se solubilizaron los QDs de CdSe/ZnS en fase acuosa, y se realizó un calibrado convencional (añadiendo MeEf a una disolución que contiene QDs+TBPE).

En un primer lugar se llevó a cabo la medida del espectro de fluorescencia de los PQDs en medio acuoso (pH=5.5) observando que éstos presentan una emisión fluorescente con un máximo de emisión a 600 nm ($\lambda_{exc}=280$ nm). Este espectro presenta un alto grado de solapamiento con el espectro de absorbancia de la MeEf-TBPE (recogido en la *Figura 10*). Se cumple pues uno de los requisitos necesarios para asegurar que tenga lugar un proceso FRET entre ambas especies.

Hay que destacar, en este momento, que el objetivo planteado es comprobar si se produce el proceso FRET en medio acuoso. Por ello, se utilizan concentraciones de MeEf elevadas, para asegurar que en caso que se produzca algún cambio en la emisión luminiscente de los PQDs, este se apreciaría.

Así pues, se preparó un calibrado externo convencional de la siguiente manera.

500 μ L de PQDs(3.5 μ M) se mezclan con 100 μ L de TBPE (20 μ M)] y con 50 μ L de MeEf de distintas concentraciones (0, 0.1, 0.5, 3 y 5mM)

Tabla 2. Resumen de resultados obtenidos para la prueba en fase acuosa pH=5.5.

| I_0 (PQDs+TBPE) | I (tras adición) | [MeEf](mM) | I/I ₀ |
|-------------------|------------------|------------|------------------|
| 947 | 810 | 0 | 0.86 |
| 726 | 636 | 0.5 | 0.88 |
| 777 | 689 | 1 | 0.89 |
| 819 | 775 | 3 | 0.95 |
| 869 | 869 | 5 | 1 |

Se midió la emisión fluorescente (λ_{exc} =280 nm; λ_{em} = 600 nm) de las disoluciones así preparadas, encontrando los resultados que se recogen en la *Tabla 2* y la *Figura 22*.

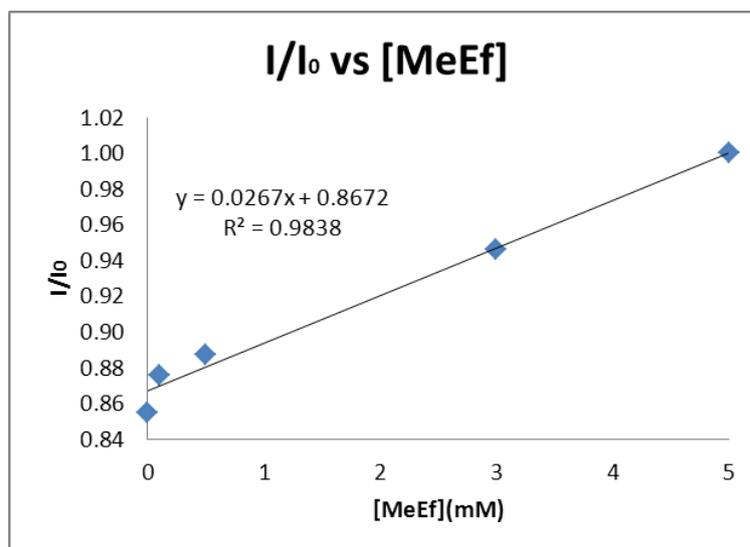


Figura 22. Cociente Intensidad Final : Intensidad Inicial frente concentraciones de MeEf pH=5.5.

Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que se produce el fenómeno de transferencia de energía, entre los PQDs y el TBPE en presencia de MeEf, lo cual se traduce en una disminución en la I de emisión fluorescente de los PQDs como consecuencia del correspondiente aumento en la absorbancia de la especie indicadora a 595 nm (ver *Figura 12*). Una vez demostrado que tiene lugar un fenómeno tipo FRET se procedió a encapsular el colorante indicador TBPE en el recubrimiento polimérico entre las cadenas de polímero anfifílico para mejorar la eficiencia del proceso de transferencia de energía.

C.4. ENCAPSULAMIENTO DEL TBPE.

Cómo se ha comentado previamente, en el apartado referido al proceso de solubilización de QDs, con objeto de dar estabilidad a los QDs en medio acuoso se utiliza un polímero anfifílico para recubrir su superficie. El objetivo perseguido en este apartado, será encapsular dentro de las cadenas alifáticas de dicho polímero a las moléculas de TBPE, para así favorecer el fenómeno de transferencia de energía y mejorar el proceso que tiene lugar y que se observa estando las 3 especies en disolución.

Así pues, el recubrimiento de los QDs se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la sección experimental, pero, en el primer paso de evaporación de disolvente en el que se encuentran los QDs y polímero en disolución añadiendo una cantidad definida de TBPE. Se persigue así atrapar el colorante orgánico entre las cadenas alifáticas que recubren al QD. A continuación, se redisuelve y se añade el entrecruzador de la manera descrita anteriormente.

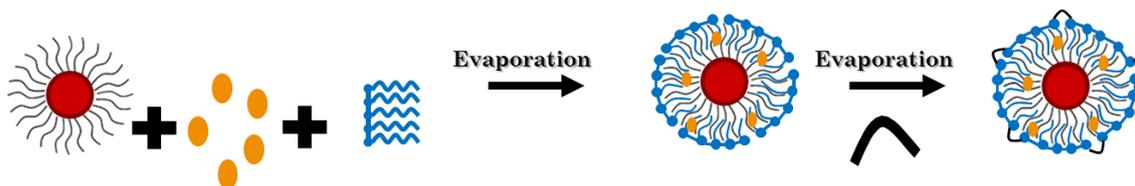


Figura 23. Esquema del proceso de solubilización y encapsulamiento.

Con este proceso, se pretende mejorar la eficacia del proceso de transferencia de energía debido a la menor distancia que existirá entre QD (Donor) y TBPE (Aceptor).

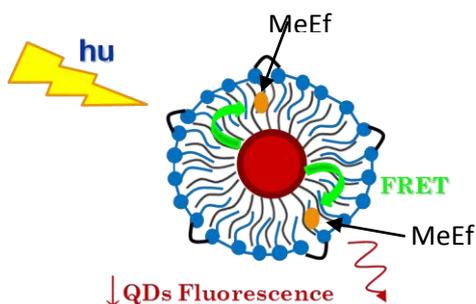


Figura 24. Representación esquemática del proceso de transferencia de energía.

Cómo se observa en la *Figura 24*, el objetivo es que el TBPE, quede encapsulado dentro del recubrimiento polimérico que protege la superficie del QD, debido a la afinidad que dicha molécula orgánica presenta con las cadenas alifáticas del polímero.

Se evaluaron distintas relaciones molares TBPE:Polímero. Concretamente las siguientes: 0.05%; 0.1%; 0.5%; 1%.

La última relación ensayada es 1%, debido a que a concentraciones tan altas de TBPE la disolución toma un color verdoso, y apenas se aprecia la emisión de los QDs.

C.4.1. Efecto de la adición de MeEf sobre PQDs-TBPE

Se ha investigado el efecto provocado por la presencia de MeEf sobre la fluorescencia de los PQDs funcionalizados con TBPE. Para ello, se evaluaron sistemas indicadores obtenidos a partir de relaciones PQDs:TBPE del 0.5 %, 0.1% y 0.05%. Hay que señalar que no se observaron cambios significativos en el comportamiento de la señal luminiscente para los PQDs-TBPE preparados con las distintas relaciones antes señaladas, por lo que, a modo de ejemplo, se muestran los resultados para PQDs-TBPE 0.05% .

Nota: es preciso recordar que la notación: 0.05%, indica 0.05 mol TBPE/100 mol Polímero, siendo los moles de polímero, los necesarios para producir el recubrimiento en el proceso de solubilización de los QDs.

Los resultados preliminares obtenidos de este estudio han demostrado que, como cabría esperar, la emisión fluorescente de los PQDs aumenta en presencia de concentraciones crecientes de MeEf, sin embargo, desafortunadamente, los resultados previos han dado lugar a un pobre comportamiento lineal y una baja sensibilidad analítica.

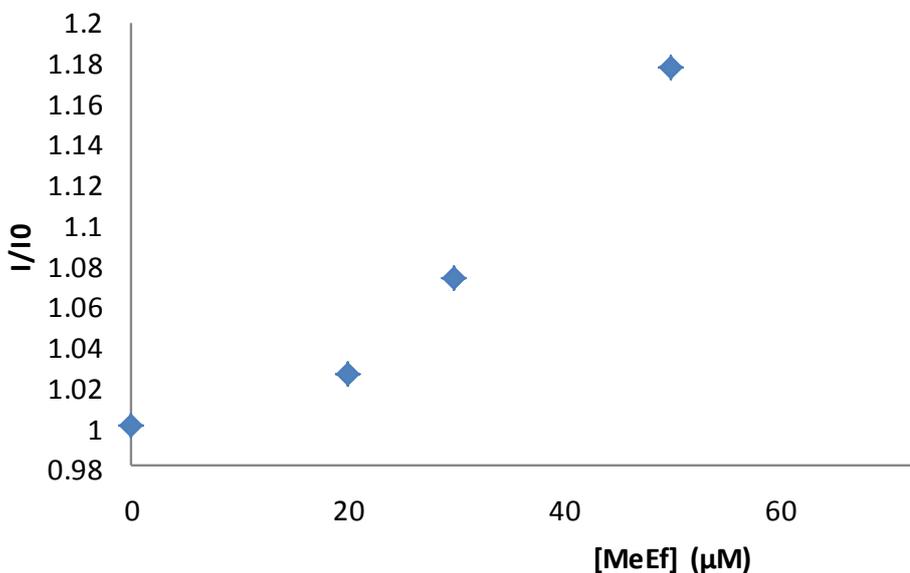


Figura 25. Cociente Intensidad Final frente a Intensidad Inicial frente concentraciones de MeEf crecientes pH=12.

Así pues, los estudios realizados ponen de manifiesto que parece que existe un proceso de transferencia de energía entre los PQDs y el TBPE incorporado en el recubrimiento polimérico en presencia de MeEf en el medio. Sin embargo, por el momento no se ha alcanzado el desarrollo de la metodología adecuada para la determinación de MeEf utilizando QDs como donador en el fenómeno de transferencia de energía.

C.5. INMOVILIZACIÓN SOBRE UN SOPORTE SÓLIDO: DESARROLLO DE UNA FASE SENSORA

Finalmente se ha investigado, de forma alternativa, un procedimiento sencillo de inmovilización de los QDs coloidales (en medio orgánico) sobre soporte sólido (membrana de filtración de naturaleza de PTFE), con objeto de desarrollar una verdadera fase sensora, para la determinación de MeEf.

El procedimiento desarrollado consistió en depositar una gota de disolución coloidal de QDs en cloroformo sobre la membrana de PTFE de 4,5 cm de diámetro y 0,2 mm de diámetro de poro. Tras dejar la membrana durante aprox. 10 minutos (para permitir la evaporación del disolvente) se lleva a cabo la coinmovilización de la especie indicadora TBPE junto con los QDs.

Para ello, una gota de disolución de TBPE en metanol se deposita en el centro de la membrana de PTFE y se deja evaporar el disolvente.

Se evaluó la posibilidad de utilizar la membrana así preparada para llevar a cabo la determinación de trazas de MeEf en muestras acuosas midiendo el cambio en la fluorescencia de los QDs debido al proceso FRET que tiene lugar entre los QDs y el producto formado al reaccionar la MeEf y el TBPE co-inmovilizado con los QDs en la membrana.

La *Figura 27* muestra una fotografía con el aspecto de las membranas de PTFE antes y después de la inmovilización de los QDs y TBPE.

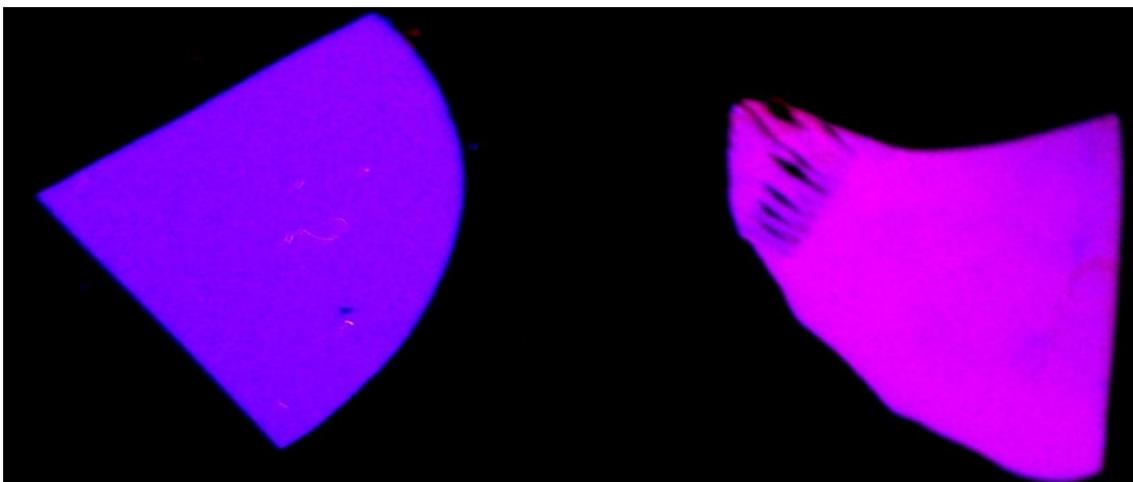


Figura 27. Fluorescencia Membrana Inicial y Final (iluminadas con luz UV 255nm).

Para llevar a cabo las medidas de emisión fluorescente de los QDs inmovilizados en la membrana se empleó un sistema de fibra óptica como el que se muestra en la *Figura 28*.



Figura 28. Sistema de fibra óptica para la medida de la luminiscencia de la membrana de PTFE con los QDs y TBPE inmovilizados

Finalmente, la *Figura 29* recoge los resultados preliminares obtenidos tras la incubación de la membrana sensora con una disolución de MeEf. Como puede observarse, tiene lugar un proceso de disminución en la emisión fluorescente de los QDs inmovilizados como consecuencia del aumento de la absorbancia del TBPE en presencia de la MeEf.

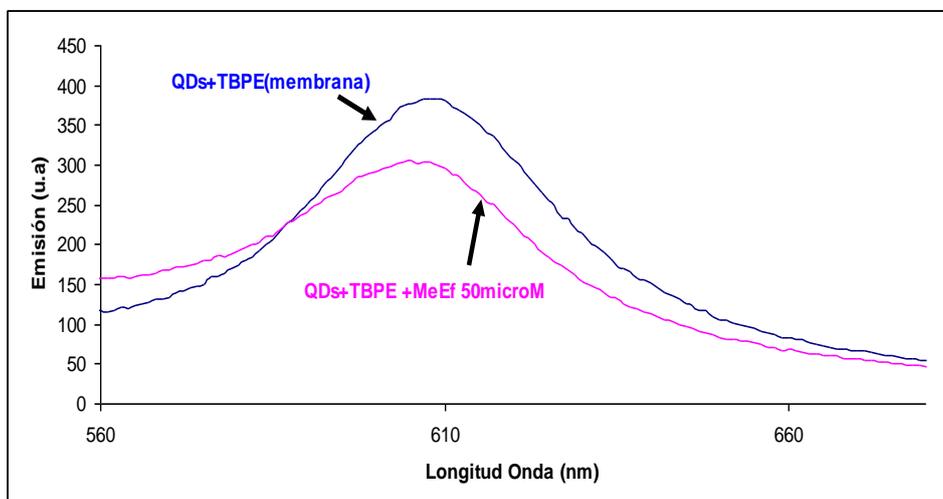


Figura 29. Variación de la emisión fluorescente de los QDs inmovilizados en la membrana de PTFE en presencia de concentraciones crecientes de MeEf

D.CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. En una primera etapa se realizó un estudio de la evolución de las características espectrofotométricas de un colorante indicador, TBPE, sensible a la MeEf, en presencia y ausencia del analito, así como el cambio de las mismas en función del pH, para seleccionar así las condiciones de pH y el tiempo de reacción óptimos para poder abordar el estudio basado en transferencia de energía.
2. Se estudió el sistema QDs-TBPE, para comprobar que tiene lugar un fenómeno de transferencia de energía en presencia de MeEf. Estas pruebas se llevaron a cabo tanto en disolución acuosa como en medio orgánico. Se ha observado que, en efecto, entre el colorante (actuando como aceptor) con los quantum dots (que actúan como donadores) tiene lugar un proceso de transferencia de energía, que puede ser utilizado para llevar a cabo el desarrollo posterior de una fase sensora de MeEf fotoluminiscente.
3. Se ha comenzado a desarrollar un método de determinación de la MeEf en medios acuosos, encapsulando el TBPE, en las cadenas alifáticas de polímero y midiendo el cambio en la emisión luminiscente de los QDs debido al fenómeno de transferencia de energía entre Donor-Aceptor que tiene lugar en presencia de concentraciones crecientes de MeEf. Es preciso trabajar en el sistema para mejorar las propiedades de sensibilidad y reproducibilidad de las medidas.
4. Finalmente, en una etapa posterior, se ha estudiado la co-inmovilización, en una membrana de PTFE, del indicador espectrofotométrico (sensible a cambios en la concentración de MeEf del medio) con los QDs luminiscentes para el desarrollo de un sistema fluorescente con transferencia de energía. Se ha observado que, en efecto, tras la inmovilización del TBPE con los QDs tiene lugar un proceso de transferencia de energía, que cambia con la presencia de MeEf, y que puede ser utilizado para llevar a cabo el desarrollo posterior de una fase sensora de MeEf fotoluminiscente.

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

1. Llevar a cabo búsquedas bibliográficas en bases de datos científicas y ser capaz de gestionar adecuadamente la información obtenida, mejorando así la capacidad de análisis y síntesis.
2. Mejorar la capacidad para el trabajo en grupo, así como para relacionarse con científicos que trabajan en otros campos, aspecto indispensable para llevar a cabo investigación multidisciplinar de calidad.
3. Interpretar la información obtenida en el laboratorio con las distintas técnicas de análisis seleccionadas para resolver eficientemente problemas analíticos, y desarrollar la capacidad de tomar decisiones en función de los resultados de obtenidos.
4. Familiarización con la síntesis, manipulación y caracterización de nanopartículas luminiscentes para análisis químico.

E.BIBLIOGRAFÍA

-
-
- [1] B. San Vicente de la Riva, J.M. Costa-Fernández, W.J. Jin, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Analytica Chimica Acta*, 455 (2002) 179.
- [2] IUPAC Compendium of Chemical Terminology. Glossary of terms used in photochemistry 68 (1996) 2243.
- [3] A. Fernández Gutiérrez, S.G. Schulman, “Fosforescencia molecular analítica: una aproximación práctica”, Ed. Universidad de Granada, Granada 2001.
- [4] R.C. Evans, P. Douglas, C.J. Winscom, *Coordination Chemistry Reviews*, 250 (2006) 2093.
- [5] C.W. Liu, C. Huang, H. T. Chang, *Analytical Chemistry*, 81 (2009) 2383.
- [6] V. Misra, H. Mishra, H. C. Joshi, T. C. Pant, *Sensors and Actuators B*, 82 (2002) 133.
- [7] C. Kaewtong, J. Noiseephum, Y. Uppa, N. Morakot, N. Morakot, B. Wannoo, T. Tuntulani, B. Pulpoka, *New Journal of Chemistry*, 34 (2010) 1104.
- [8] M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa, R. Pereiro, A. Sanz, *Analytica Chimica Acta*, 491 (2003) 27.
- [9] C. Cano-Raya, M.D. Fernández-Ramos, L.F. Capitán-Vallvey, *Analytica Chimica Acta*, 555 (2006) 299.
- [10] C. Huang, H. Chang, *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 8332.
- [11] P. Alivisatos, *Nature Biotechnology*, 22 (2004) 47.
- [12] A.J. Sutherland, *Current Opinion in Solid State Materials Science*, 6 (2002) 365.
- [13] C.J. Murphy, *Analytical Chemistry*, 74 (2002) 520A.
- [14] A.P. Alivisatos, *Science* 271(1996) 933.
- [15] 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, *Science* 307 (2005) 538.
- [16] R.E. Bailey, A.M. Smith, S. Nie, *Physica E*, 25 (2004) 1.
- [17] E. R. Goldman, E. D. Balighian, H. Mattoussi, M. K. Kuno, J. M. Mauro, P. T. Tran, G. P. Anderson, *Journal of the American Chemical Society*, 124 (2002) 6378.
- [18] M. Han, X. Gao, J.Z. Su, S. Nie, *Nature Biotechnology*, 19 (2001) 631.
- [19] S.G. Penn, L. Hey, M.J. Natan, *Current Opinion in Chemical Biology*, 7 (2003) 609.

-
-
- [20] F. Pinaud, X. Michalet, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose1, J.J. Li, G. Iyer, S. Weiss, *Biomaterials* 27 (2006) 1679.
- [21] G. Schmidt, *Nanoparticles: from theory to applications*, Ed. Wiley-VCH, 2004.
- [22] C.B. Murray, D.J. Norris, M.G. Bawendi, *Journal of the American Chemical Society*, 115 (1993) 8706.
- [23] Z.A. Peng, X. Peng, *Journal of the American Chemical Society*, 123 (2001) 183.
- [24] L. Qu, X. Peng, *Journal of the American Chemical Society*, 124 (2002) 2049.
- [25] L. Qu, Z. A. Peng, X. Peng, *Nano Letters*, 1 (2001) 333.
- [26] J. Aldana, Y.A. Wang, X. Peng, *Journal of the American Chemical Society*, 123 (2001) 8844.
- [27] B.O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F.V. Mikulec, J.R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K.F. Jensen, M.G. Bawendi, *Journal of Physical Chemistry B*, 101 (1997) 9463.
- [28] Z. Yu, L. Guo, H. Du, T. Krauss, J. Silcox, *Nano Letters*, 5 (2005) 565.
- [29] A. M. Smith, S. Nie, *Analyst*, 129 (2004) 672.
- [30] W.C. W. Chan, S. Nie, *Science*, 281 (1998) 2016.
- [31] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, P. Alivisatos, *Science*, 281 (1998) 2013.
- [32] W.J. Parak, T. Pellegrino, C. Plank, *Nanotechnology*, 16 (2005) R9.
- [33] W.C.W. Chan, D.J. Maxwell, X.H. Gao, R.E. Bailey, M.Y. Han, S. Nie, *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (2002) 40.
- [34] D. Gerion, F. Pinaud, S.C. Williams, W.J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, A.P. Alivisatos, *Journal of Physical Chemistry B*, 105 (2001), 8861.
- [35] X.Y. Wu, H.J. Liu, J.Q. Liu, K.N. Haley, J.A. Treadway, J.P. Larson, N.F. Ge, F. Peale, M.P. Bruchez, *Nature Biotechnology*, 21 (2003) 41.
- [36] B. Dubertret, P. Skourides, D.J. Norris, V. Noireaux, A.H. Brivanlou, A. Libchaber, *Science*, 298 (2002) 1759.
- [37] Z.A. Peng, X.G. Peng, *Journal of the American Chemical Society*, 123 (2001) 1389.
- [38] W. Russ Algar, Ulrich J. Krull, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008) 1609.

-
-
- [39] W.J. Jin, M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A.Sanz-Medel, *Chemical Communications*, (2005) 883.
- [40] Y. Xia, C. Zhu, *Talanta*, 75 (2008) 215.
- [41] Y. Chen, Z. Rosenzweig, *Analytical Chemistry*, 74 (2002) 5132.
- [42] J.L. Chen, C. Q. Zhu, *Analytica Chimica Acta*, 546 (2005) 147.
- [43] J.R. Lakowicz, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, C.J. Murphy, *Journal of Physical Chemistry B*, 103 (1999) 7613.
- [44] S.K. Sarkar, N. Chandrasekharan, S. Gorer, G. Hodes, *Applied Physics Letters*, 81 (2002) 5045.
- [45] W.J. Jin, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Analytica Chimica Acta*, 522 (2004) 1.
- [46]. A. Y. Nazzal, L. Qu, X. Peng, M. Xiao, *Nano Letters*, 3 (2003) 819.
- [47] M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Analyst* 133 (2008) 444.
- [48] B. Sun, W. Xie , G. Yi, D. Chen , Y. Zhou , J. Cheng, *Journal of Immunological Methods*, 249 (2001) 85.
- [49] E.R. Goldman, G.P. Anderson, P.T. Tran, H. Mattoussi, P.T. Charles, J.M. Mauro, *Analytical Chemistry*, 74 (2002) 841.
- [50] E. Chang, J.S. Miller, J. Sun, W.W. Yu, V.L. Colvin, R. Drezek, J.L. West, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334 (2005) 1317.
- [51] Hsu, K.F.; Chien, K.-Y.; Chang-Chien, G.P.; Lin, S.F.; Hsu, P.H.; Hsu, M.-C, *Journal of Analytical Toxicology* Volume 35 (2011) 665
- [52] T. Sakai, N. Ohno, *Analytical Sciences*, 2 (1986), 275
- [53] M.T. Fernández-Argüelles; A. Yakovlev; R.A. Sperling; C. Luccardini; S. Gaillard; A.S. Medel; J.Mallet; J.Brochon; A.Feltz; M.Oheim; W.J.Parak, *Nano letters* 7 (2007) 2613.
- [54] W.W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, *Chemistry of Materials*, 15 (2003) 2854.