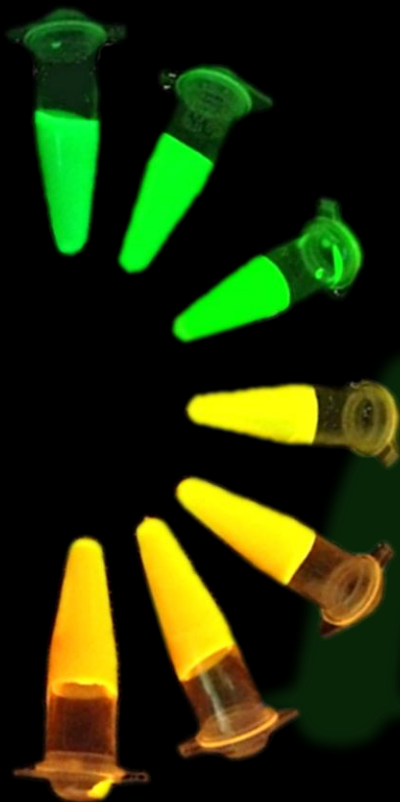


*Sondas fluorescentes
acuosolubles
para metales
tóxicos*











Tesis doctoral

*Sondas fluorescentes acuosolubles para
metales tóxicos*

Margarita Vázquez González

Universidad de Santiago de Compostela
Facultad de Farmacia
Departamento de Química Inorgánica

Santiago de Compostela
Enero 2016





Memoria presentada por la graduada
Margarita Vázquez González para
optar al Grado de Doctor en Química
por la Universidad de Santiago de
Compostela





Departamento de Química Inorgánica

M^a ÁNGELES SÁNCHEZ GONZÁLEZ Y M^a SOLEDAD GARCÍA TASENDE,
PROFESORAS TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA DE LA
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HACEMOS CONSTAR,

Que el presente trabajo de investigación titulado: ***Sondas fluorescentes acuosolubles para metales tóxicos***, fue realizado bajo nuestra dirección por la Graduada en Química Doña MARGARITA VÁZQUEZ GONZÁLEZ en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Santiago de Compostela, y autorizamos su presentación como Tesis Doctoral para la obtención del Grado de Doctor por parte de la interesada.

Santiago de Compostela, 8 de Enero de 2016

M^a Ángeles Sánchez González

M^a Soledad García Tasende

Margarita Vázquez González



Agradecimientos

En primer lugar mostrar mi agradecimiento a las directoras de este trabajo, las Drs M^a Soledad García y M^a Ángeles Sánchez por toda su ayuda y apoyo. En especial a Soledad por su paciencia y horas dedicadas.

A los demás miembros del grupo, Sergio Casas, Agustín Sánchez y José Sordo, por acogerme como una más desde el primer momento, y por toda la ayuda a lo largo de estos años.

A todo el departamento, destacando a la Dra Isabel García, por las agradables charlas y consejos.

A la Dra Laura Sánchez Piñón y a su grupo de investigación por su contribución a este trabajo con los ensayos in vivo.

Al Dr Wolfgang Parak por darme la oportunidad de trabajar en su grupo, y a toda la gente que contribuyeron a que mi estancia en Marburg fuese una experiencia muy agradable.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) por la beca FPI, Ref: BES-2010-032652, proyecto Ref: CTQ2009-10738.

A todos mis amigos. Especialmente a las que sufrieron más de cerca todo este período, Bego, Ale, Noelia e Iria, gracias por vuestros ánimos en los momentos de desesperación.

A toda mi familia, y sobre todo a las más imprescindibles, mamá, Beti y Rocio, gracias por vuestro apoyo incondicional.

Y como no, a las alegrías de la casa, Carla y Mauro, los únicos capaces de sacarme una sonrisa en los peores momentos.

A los que ya no están y en los que nunca podré dejar de pensar.



Índice

Abreviaturas

Capítulo 1. Introducción

1.1 Puntos cuánticos	7
1.1.1 Descripción y propiedades	7
1.1.2 Estructura y composición	9
1.1.3 Síntesis	13
1.2 Bioconjugación y aplicaciones de PCs CdTe	22
1.2.1 PCs CdTe como sensores de iones	25
1.2.1.1 Detección de iones metálicos basada en la fluorescencia de los PCs	26
1.2.1.1.1 Sensores basados en la interacción directa PC-ión metálico	26
1.2.1.1.2 Sensores basados en el desplazamiento del ligando existente en la superficie del PC	34
1.2.1.1.3 Sensores basados en la extinción y posterior restauración de la fluorescencia (Sistemas off-on)	36
1.2.1.1.4 Sensores basados en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)	38
1.2.1.1.5 Otras estrategias	40
1.2.1.2 Otros métodos de detección	41
1.2.1.3 Sondas celulares	43
1.3 Toxicidad y biodistribución PCs CdTe	44
1.3.1 Estudios <i>in vitro</i>	44
1.3.1.1 Citotoxicidad	44
1.3.1.2 Entrada y distribución celular	47
1.3.2 Estudios <i>in vivo</i> en pez cebra	49

Capítulo 2. <i>Objetivos y Plan de trabajo</i>	53
---	----

Capítulo 3. *Síntesis y caracterización de puntos cuánticos CdTe*

3.1 Reactivos y disolventes	57
3.2 Técnicas experimentales	58
3.3 Síntesis de puntos cuánticos CdTe.....	61
3.3.1 Condiciones de síntesis de PCs CdTe.....	62
3.3.1.1 Puntos cuánticos DMPS-CdTe (PC1).....	62
3.3.1.2 Puntos cuánticos TGA·DMPS-CdTe (PC2).....	63
3.3.2 Condiciones de síntesis de PCs núcleo/coraza CdTe/ZnS.....	64
3.3.2.1 Puntos cuánticos TGA-CdTe/DMPS-ZnS (PC3).....	65
3.3.2.2 Puntos cuánticos TGA-CdTe/DMSA-ZnS (PC4).....	66
3.3.2.3 Puntos cuánticos TGA·DMPS-CdTe/DMSA-ZnS (PC5)	66
3.3.3 Condiciones de síntesis de PCs núcleo/coraza CdTe/CdS.....	67
3.3.3.1 Puntos cuánticos TGA·DMPS-CdTe/DMPS-CdS (PC6)	67
3.3.4 Seguimiento de las reacciones de síntesis de PCs CdTe, CdTe/ZnS y CdTe/CdS	69
3.4 Caracterización	77
3.4.1 IR-ATR.....	77
3.4.2 UV-VIS y fluorescencia.....	82
3.4.3 TEM.....	86
3.4.4 DRX	89
3.4.5 FRX.....	91

Capítulo 4. Puntos cuánticos CdTe como sensores de iones metálicos

4.1 Parte experimental.....	95
4.2 Resultados y discusión.....	98
4.2.1 Fluorescencia de los PCs preparados en presencia de diferentes cationes metálicos.....	98
4.2.1.1 Puntos cuánticos DMPS-CdTe (PC1).....	98
4.2.1.2 Puntos cuánticos TGA·DMPS-CdTe (PC2).....	104
4.2.1.3 Puntos cuánticos TGA-CdTe/DMPS-ZnS (PC3).....	110
4.2.1.4 Puntos cuánticos TGA-CdTe/DMSA-ZnS (PC4).....	116
4.2.1.5 Puntos cuánticos TGA·DMPS-CdTe/DMSA-ZnS (PC5).....	121
4.2.1.6 Puntos cuánticos TGA·DMPS-CdTe/DMPS-CdS (PC6).....	127
4.2.2 Análisis comparativo del efecto ejercido por cada catión metálico sobre la fluorescencia de los PCs.....	133
4.2.2.1 Mercurio(II).....	133
4.2.2.2 Cobre(II).....	137
4.2.2.3 Plata(I).....	141
4.2.2.4 Niquel(II).....	145
4.2.2.5 Plomo (II).....	147
4.2.3 Identificación selectiva de Hg(II), Cu(II), Ag(I), Ni(II) y Pb(II). Propuesta.....	149

Capítulo 5. Ensayos de toxicidad

5.1 Parte experimental.....	155
5.1.1 Reactivos.....	155
5.1.2 Técnicas experimentales.....	156
5.1.3 Estudios <i>in vitro</i> : citotoxicidad.....	157

5.1.3.1	Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	157
5.1.3.2	Ensayos de citotoxicidad	158
5.1.3.3	Obtención de imágenes mediante microscopía confocal.....	159
5.1.3.4	Obtención de imágenes mediante microscopía electrónica de transmisión.....	160
5.1.4	<i>Estudios in vivo</i> : toxicidad en embriones de pez cebra	161
5.1.4.1	Condiciones de mantenimiento de los peces	161
5.1.4.2	Desarrollo del test de toxicidad	162
5.1.4.3	Estudios de internalización	167
5.2	Resultados y discusión.....	167
5.2.1	<i>Estudios in vitro</i>	167
5.2.1.1	Ensayos de citotoxicidad	167
5.2.1.2	Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia.....	178
5.2.1.3	Imágenes de microscopía electrónica de transmisión.....	190
5.2.2	<i>Estudios in vivo</i>	195
5.2.2.1	Ensayos de mortalidad en pez cebra.....	195
5.2.2.2	Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia.....	201
Capítulo 6.	Conclusiones	209

Abreviaturas y acrónimos

A-427	Células de cáncer de pulmón humano
AO	Alcohol oxidasa
APDC	Pirrolidinditiocarbamato amónico
BRB	Butilrodamina B
BSA	Albumina sérica bovina
CA	Cisteamina
CL	Quimioluminiscencia
Cys	Cisteína
Cy5	Fluoróforo de cianina
DMAET	Dimetilaminoetanotiol
DMEM	Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco
DMPS	2,3-Dimercapto-1-propanosulfónico o su sal sódica
DMSA	Ácido <i>meso</i> -2,3-dimercaptosuccínico
DMSO	Dimetilsulfóxido
dOB	Ovoalbúmina desnaturalizada
DPA	D-Penicilamina
DRX	Difracción de rayos X
DTPA	Ácido dietilentriaminopentaacético
ECL	Electroquimioluminiscencia
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloreuro
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Di-[2-(N,N-dicarboximetil)amino]etil éter

EMIDCA	1-Etil-3-metilimidazolio dicianoamida
EPA	Agencia Americana de Protección Medioambiental
FB	Fluoróforo
FBS	Suero fetal bovino
FP	Fluorescencia de polarización
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
FRX	Fluorescencia de rayos X
Glyp	Glifosato
GSH	Glutathiona
HAP	Hidroxiapatito
HEK293	Células embrionarias de riñón humano
HeLa	Células de adenocarcinoma de cérvix humano
HepG2	Células de hepatocarcinoma humano
IR-ATR	Espectroscopía infrarroja con reflexión total atenuada
LED	Diodos emisores de luz
LLC-PK1	Células de túbulo renales proximales de cerdo
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MA	Mercaptoetilamina
MCF-7	Células de cáncer de mama humano
MDCK	Células de riñón de perro
MPA	Ácido mercaptopropiónico
MSA	Ácido mercaptosuccínico
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
MUA	Ácido mercaptoundecanoico
N9	Células microgliales murinas

NAC	N-Acetilcisteína
NHS	N-Hidroxisulfosuccinamida
NPs	Nanopartículas
OEDC	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Punto cuántico
PC3-M	Células de cáncer de prostata humano
PEC	Fotoelectroquímica
PEI	Polietilenimina
PFR	Resina de fenol formaldehído
Phen	Fenantrolina
PNMA	Poly-(N-metiloacrilamida)
R6G	Rodamina 6G
ROS	Especies de oxígeno reactivas
SDS	Dodecilsulfato sódico
TAMRA	Fluoroforo de tretametiltrodamina
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TG	Tioglicerol
TGA	Ácido tioglicolico
UV-Vis	Espectroscopía ultravioleta visible





Capítulo 1

Introducción



1.1 Puntos cuánticos

1.1.1 Descripción y propiedades

En las últimas décadas se han producido notables avances en los campos de la nanociencia y la nanotecnología. La confluencia de múltiples disciplinas científicas permitió crear nuevos materiales, con propiedades mejoradas y, además, a escala nanométrica. Entre estos materiales se encuentran los semiconductores nanocristalinos, más comúnmente conocidos como puntos cuánticos (PCs).

Los puntos cuánticos son estructuras cristalinas, típicamente esféricas, con un diámetro comprendido entre 2 y 10 nm.¹ Presentan un comportamiento diferente respecto del material macroscópico de la misma composición debido al confinamiento cuántico, resultado de su reducido tamaño. Así, un PC puede definirse como un semiconductor cuyos excitones están confinados en las tres direcciones del espacio. Cuando un fotón entra en un semiconductor y es capturado por un electrón de la banda de valencia, puede emigrar a la banda de conducción dejando un hueco positivo (h^+) en la primera banda (Figura 1). El conjunto e^- y h^+ se llama excitón y su recombinación origina una emisión fluorescente cuando el electrón cae de nuevo a la banda de valencia. Estas emisiones tienen una energía menor que la que separa a e^- y h^+ .

Los portadores de carga e^- y h^+ pueden estar a distancias grandes cuando el tamaño de los cristales del semiconductor es más grande que su radio del excitón de Bohr (distancia física entre el electrón en la banda de conducción y el hueco en la banda de valencia). En el caso que el tamaño del semiconductor sea menor que el radio de Bohr, los portadores están físicamente confinados, lo que incrementa de forma notable el rendimiento cuántico. Se denomina así a la eficiencia con la que los fotones absorbidos se reemiten sin que su energía se disipe como calor u otros efectos.

¹ J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Trend. Anal. Chem.*, 25(3) (2006) 207.

La densidad de los estados energéticos, que es continua en el material macroscópico, deja de serlo en el nanomaterial, existiendo ahora diferentes niveles de energía discretos. Además, como consecuencia del fuerte confinamiento que presentan los portadores de carga, la energía de la banda prohibida (gap) aumenta (Figura 1).

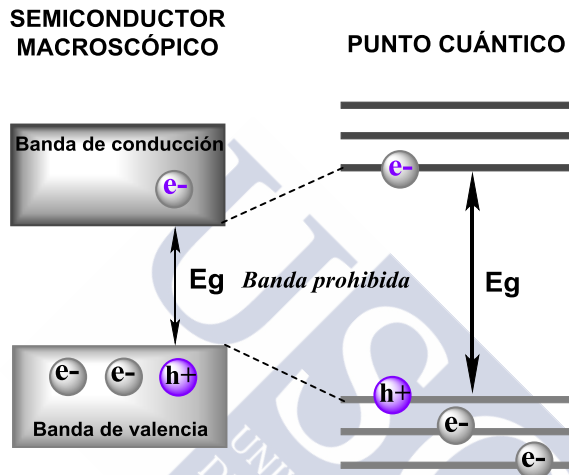


Figura 1. Diagrama de los niveles de energía en un semiconductor macroscópico y en un punto cuántico.

Los PCs presentan, por tanto, unas propiedades ópticas excepcionales y su longitud de onda de emisión fotoluminiscente se puede modificar simplemente por variación de su tamaño y de su composición^{2,3} (Figura 2). Además de un elevado rendimiento cuántico de la emisión fotoluminiscente, los PCs tiene un largo tiempo de vida, una gran separación entre sus longitudes de onda de excitación y de emisión, espectros de excitación anchos y espectros de emisión estrechos y simétricos. Poseen también una alta estabilidad química y elevada fotoestabilidad.

² C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (1993) 8076.

³ J. E. Bowen-Katari, V. L. Colvi, A. P. Alivisatos, *J. Phys. Chem.*, 98 (1994) 411.

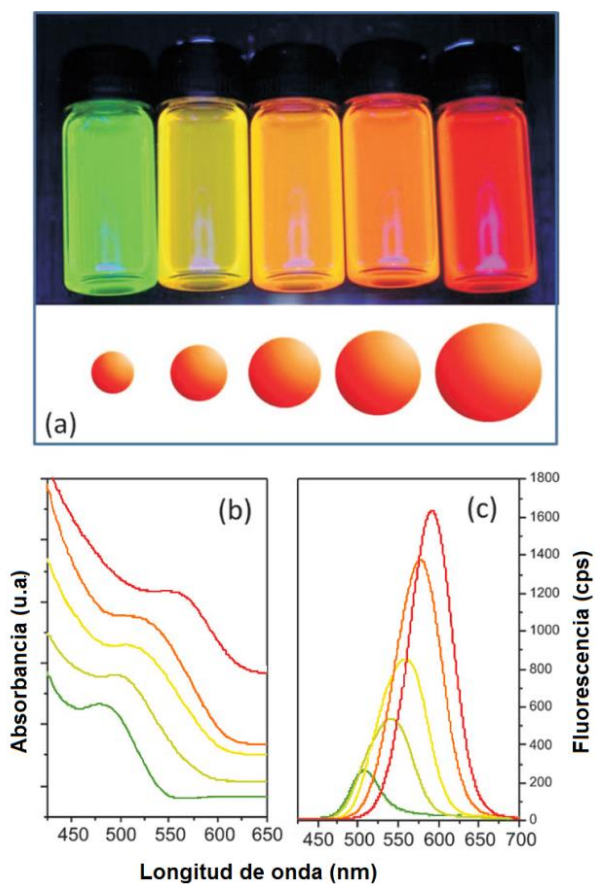


Figura 2. Variación del color de emisión de dispersiones coloidales acuosas de PCs CdTe (a) y los correspondientes espectros de absorción UV-Vis (b) y de fotoluminiscencia (c).⁴

1.1.2 Estructura y composición

Estructuralmente, un punto cuántico está formado por una partícula inorgánica (núcleo, corazón o core) que se encuentra rodeada por una capa de ligandos orgánicos (Figura 3). El núcleo semiconductor es el responsable de las propiedades descritas en el apartado anterior y los ligandos que lo rodean son, en gran medida, los responsables de su formación y estabilización (evitan el crecimiento indefinido de la nanopartícula, su agregación, aportan la carga

⁴ F. O. Silva, L. C. de Souza Viol, D. L. Ferreira, J. L. A. Alves, M. A. Schiavon, *Quim. Nova*, 33 (2010) 1933.

necesaria para neutralizar las trampas de superficie, etc.) y permiten modificar las propiedades de la superficie del PC.

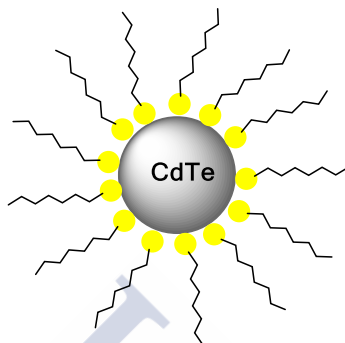


Figura 3. Punto cuántico CdTe.

La naturaleza de la unión entre la superficie del núcleo y el ligando fue entendida, inicialmente, como un enlace coordinado dativo, en el que el ligando orgánico aporta la densidad de carga necesaria para establecer el enlace; sin embargo, estudios más recientes apuntan a un cierto carácter iónico para el enlace ligando-partícula.⁵

La naturaleza híbrida orgánica-inorgánica de estos nanomateriales amplía enormemente las posibilidades para el control de sus propiedades, ya que ambos componentes pueden ser modificados de forma independiente para lograr u optimizar una propiedad deseada. Por otra parte, las interacciones sinérgicas pueden dar lugar a nuevas propiedades.⁶

Se conocen una amplia variedad de PCs, siendo los más comunes aquellos cuyo núcleo está constituido por elementos pertenecientes a los grupos II-VI como CdSe, CdS, CdTe, ZnSe y ZnS, a los grupos III-V como InP, GaP, GaAs y InAs o a los IV-VI como PbS, PbSe y PbTe.⁷ Como se muestra en la Tabla 1, la emisión fluorescente de los PCs abarca desde la región visible a la infrarroja, dependiendo de su composición y tamaño.

⁵ B. H. Juárez, *An. Quim.*, 107 (2011) 229.

⁶ C. de Mello Donegá, *Chem. Soc. Rev.*, 40 (2011) 1512.

⁷ M. McDowell, A. E. Wright, N. I. Hammer, *Materials*, 3 (2010) 614.

Tabla 1. Composición del núcleo, tamaño y rango de emisión de diversos PCs.^{8,9}

Composición del núcleo	Rango de tamaño (nm)	Rango de emisión
ZnSe	~4.3-6.0	UV, Visible
ZnSe:Mn	~2.7-6.3	UV, Visible
CdSe	~1.0-2.5	Visible
CdS	~1.0-6.0	UV, Visible
CdTe	~2.0-8.0	Visible, IR cercano
InP	3.0-4.6	UV, Visible, IR cercano
InAs	~2.8-6.0	IR
GaP	~2.0-3.0	UV, Visible
GaInP ₂	~2.5-6.5	UV, Visible
PbSe	3-12	IR medio y cercano
SnTe	1.5-4.5	IR medio

Como ligandos estabilizadores, dependiendo de si se requiere un recubrimiento hidrofóbico o hidrofílico, los más empleados, en medio hidrofóbico son: trioctilfosfina, óxido de trioctilfosfina, hexadecilamina, ácido oleico y algunos ácidos fosfónicos. Éstos se componen de una parte apolar (generalmente un hidrocarburo de cadena larga) y un grupo polar terminal (-SH, -COOH, -NH₂, ...). En medio hidrofílico se emplean ligandos de cadena más corta, con al menos un grupo tiol y un segundo grupo responsable de la solubilidad en agua (carboxilato, alcohol, amino, etc.), siendo los más empleados los ácidos tioglicólico (TGA) y mercaptopropiónico (MPA) y la glutatona (GSH) (*vide infra*).

Una estrategia empleada para aumentar la estabilidad del PC frente a la foto-oxidación y mejorar el rendimiento cuántico es el crecimiento de una coraza que envuelva al núcleo (Figura 4).

⁸ M. A. Walling, J. A. Novak, J. R. E. Shepard, *Int. J. Mol. Sci.*, 10 (2009) 441.

⁹ X. Chen, L. Li, Y. Lai, J. Yan, Y. Tang, X. Wang, *Int. J. Mol. Sci.*, 16 (2015) 11500.

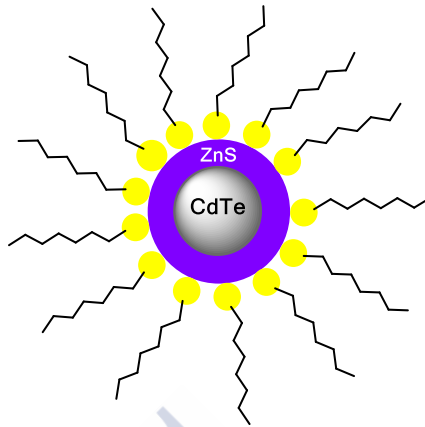


Figura 4. Punto cuántico núcleo/coraza CdTe/ZnS.

Esta coraza proporciona una barrera física entre el núcleo ópticamente activo y el entorno del punto cuántico. Ésta es también un semiconductor inorgánico, que crece alrededor del núcleo, disponiéndose entre éste y los ligandos. Se obtienen así PCs núcleo/coraza (o incluso multicoraza) que, en función del valor de la energía de la banda prohibida y de la posición relativa de las bandas de valencia y de conducción de los diferentes semiconductores, se clasifican en tipo I, I inverso y II.¹⁰ En los semiconductores tipo I, la banda prohibida de la coraza es mayor que la del núcleo y el excitón está confinado en el núcleo. En los tipo I inverso, la banda prohibida de la coraza es menor que la del núcleo, y dependiendo del grosor de la coraza, huecos y electrones estarán parcial o totalmente confinados en la coraza. En los semiconductores tipo II, o bien el límite de la banda de valencia o bien el de la banda de conducción se localizan (en valores de energía) en la banda prohibida del núcleo, lo que conduce a la separación espacial de hueco y electrón en diferentes regiones de la estructura núcleo/coraza (Figura 5).

¹⁰ P. Reiss, M. Ptrotière, L. Li, *Small*, 5 (2009) 154.



Figura 5. Alineación para los niveles de energía en los diferentes tipos de PCs núcleo/coraza (BV: banda de valencia, BC: banda de conducción).¹⁰

El mecanismo de formación de la coraza sobre el núcleo es mediante el crecimiento epitaxial. Por lo tanto, además del alineamiento adecuado de las bandas de energía, otro factor a tener en cuenta es que los materiales de núcleo y de la coraza deben de cristalizar en la misma estructura y exhibir parámetros de red similares. De lo contrario, el crecimiento de la coraza genera tensiones y la formación de defectos en la interfaz núcleo/coraza o en el interior de la coraza, pudiendo rebajar la fluorescencia de la nanopartícula.¹⁰

1.1.3 Síntesis

La síntesis es un aspecto fundamental en el desarrollo de estos nanomateriales ya que sus propiedades más notables están relacionadas con su composición y dependen, en gran medida, de la homogeneidad de su tamaño. Por tanto, la preparación de muestras uniformes en composición, tamaño, forma, estructura interna y química superficial es esencial para poder explotar sus propiedades. En consecuencia, su preparación exige un control minucioso de su composición y crecimiento.

Los métodos de síntesis en estas nanopartículas o en cualesquiera otras, pueden seguir procedimientos descendentes (*top down*) o ascendentes (*bottom up*) (Figura 6). Es decir, procesos que parten del material bruto y lo disgregan progresivamente hasta llegar al tamaño de partícula deseado (métodos físicos), o sistemas que hacen crecer partículas que inicialmente no llegan al tamaño nanométrico hasta llegar a él (métodos químicos). Mediante técnicas físicas es posible producir nanomateriales a gran escala, pero se ve comprometida la obtención de nanocristales con tamaños uniformes. Sin embargo, mediante

métodos químicos coloidales pueden obtenerse nanocristales con un rango de tamaños estrecho, si bien en pequeñas cantidades de material. Actualmente son estos métodos de síntesis ascendente los que dominan y serán seguidamente comentados.

Para la obtención de PCs mediante métodos químicos coloidales existen dos estrategias generales:

- I. Síntesis organometálica, basada en la pirólisis de los precursores a temperatura elevada.
- II. Síntesis en medio acuoso, que emplea generalmente fosfatos o tioles (tioalcoholes, tioácidos, aminoácidos,...) como agentes estabilizadores.

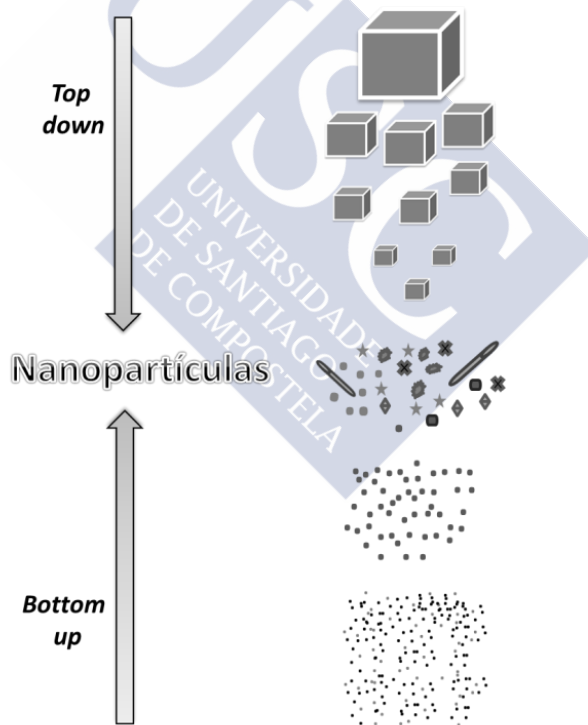


Figura 6. Procedimientos generales de obtención de nanopartículas.

La síntesis acuosa coloidal constituye una ruta alternativa ventajosa respecto de la organometálica, que fue la más utilizada inicialmente. Entre estas ventajas están el que no se requieren altas temperaturas, el empleo de precursores menos tóxicos y más fácilmente manipulables, así como el empleo del disolvente más universal y biocompatible. Este método permite preparar con éxito, directamente en agua, una serie de nanomateriales semiconductores, empleando condiciones de síntesis suaves.

Si bien los PCs CdS fueron los primeros preparados en agua,¹¹ el ejemplo más exitoso de este tipo de materiales (calcogenuros de cadmio) son los PCs CdTe, ya que presentan propiedades ópticas únicas.

Para ilustrar este tipo de química, describiremos como ejemplo los PCs sintetizados en medio acuoso que contienen CdTe en su núcleo y ZnS o CdS en la coraza, por ser además los nanomateriales preparados en este trabajo.

i) Síntesis de núcleos CdTe en disolución acuosa¹²

Los puntos cuánticos CdTe fueron obtenidos directamente en agua por primera vez por Henglein y col.,¹³ empleando como precursores $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$ y Na_2Te y como ligando estabilizante un polifosfato de sodio. Mediante un proceso análogo al anterior, pero que incorpora además el ligando tioglicerol (TG), Rajh y col.¹⁴ prepararon PCs más estables frente a la oxidación, con distribución de tamaños más estrecha y con diámetros comprendidos entre 2 y 4 nm. El rendimiento cuántico resultó ser superior cuanto menor era el tamaño, alcanzando un valor del 20 % en los PCs más pequeños. La optimización del proceso continuó con los trabajos de Rogach y col., en los cuales se emplearon

¹¹ L. Spanhel, M. Haase, H. Weller, A. Henglein, *J. Am. Chem. Soc.*, 109 (1987) 5649.

¹² V. Lesnyak, N. Gaponik, A. Eychmüllera, *Aqueous Synthesis of Colloidal CdTe Nanocrystals, Cadmium Telluride Quantum Dots Advances and Applications*, Ed. J. F. Donegan, Y. P. Rakovich, CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, FL (2013).

¹³ U. Resch, H. Weller, A. Henglein, *Langmuir*, 5 (1989) 1015.

¹⁴ T. Rajh, O. I. Mičić, A. J. Nozick, *J. Phys. Chem.*, 97 (1993) 11999.

como estabilizadores ligandos tiólicos de cadena corta (mercaptoalcoholes, mercaptoácidos, ...).¹⁵⁻¹⁷

El protocolo de síntesis típico para obtener PCs CdTe en medio acuoso estabilizados por tioles es un proceso que incluye las siguientes etapas:

- 1.- Formación de un complejo Cd-tiol.
- 2.- Inyección del precursor de Te^{2-} , sobre la disolución anterior, para dar lugar a la formación de monómeros CdTe.
- 3.- Nucleación y crecimiento de nanocristales.

Los precursores de cadmio más empleados son las sales CdCl_2 y $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2$, si bien en ocasiones se emplean otras como sulfato y acetato.

Los ligandos tiol más habitualmente utilizados se muestran en la Figura 7. Dependiendo del ligando (o mezcla de ligandos empleados) se ajusta el pH al valor deseado, generalmente básico, para asegurar la desprotonación de los grupos tiol y su coordinación al Cd. Estos ligandos deben presentar un comportamiento *on/off* alrededor de los nanocristales, a veces permitiendo el crecimiento de estos nanomateriales (*off* o estado desconectado de la superficie) y, a veces, bloqueando el crecimiento de éstos (en estado *on*, vinculado a la superficie).¹⁸ Resultados experimentales y cálculos teóricos demuestran que la naturaleza del ligando tiene un papel clave en el proceso de crecimiento y en el rendimiento cuántico de los PCs CdTe preparados en medio acuoso.¹⁹

¹⁵ A. L. Rogach, L. Katsikas, A. Kornowski, D. Su, A. Eychmueller, H. Weller, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 100 (1996) 1772.

¹⁶ A. L. Rogach, L. Katsikas, A. Kornowski, D. Su, A. Eychmuller, H. Weller, *Berich. Bunsen. Gesell.*, 101 (1997) 1668.

¹⁷ M. Gao, S. Kirstein, H. Moehwald, A. L. Rogach, A. Kornowski, A. Eychmueller, H. Weller, *J. Phys. Chem. B*, 102 (1998) 8360.

¹⁸ S. Sapra, A. L. Rogach, J. Feldmann, *J. Mater. Chem.*, 16 (2006) 3391.

¹⁹ C.-L. Wang, H. Zhang, S.-H. Xu, N. Lv, Y. Liu, M.-J. Li, H.-Z. Sun, J.-H. Zhang, B. Yang, *J. Chem. Phys. C*, 113 (2009) 827.

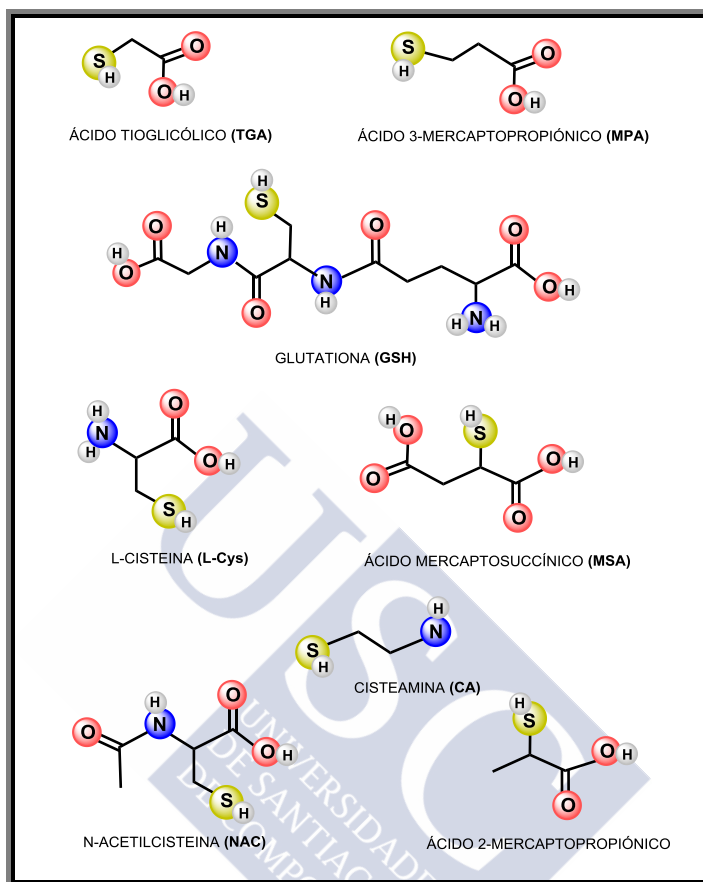


Figura 7. Ligandos más habituales en la síntesis de PCs CdTe.

Los precursores de telurio más empleados son $\text{H}_2\text{Te}(\text{g})$ y $\text{NaHTe}(\text{ac})$. Ambos se oxidan rápidamente en presencia de aire para formar Te^0 , por lo que deben mantenerse, en todo momento, en atmósfera inerte. Dada su baja estabilidad, habitualmente se emplean recién preparados. El $\text{H}_2\text{Te}(\text{g})$ se obtiene por adición lenta de H_2SO_4 concentrado sobre Al_2Te_3 , y el gas generado se burbujea sobre la disolución que contiene el precursor de cadmio. Si el precursor empleado es $\text{NaHTe}(\text{ac})$, éste se obtiene por reacción en agua (previamente desoxigenada) de telurio en polvo con NaBH_4 en exceso. Una vez preparado, se inyecta rápidamente sobre la disolución del precursor de cadmio fuertemente agitada. La mezcla obtenida se calienta para inducir la formación de los núcleos CdTe.

La formación de los PCs en medio acuoso consta de una etapa de nucleación rápida seguida por una fase lenta de crecimiento o maduración (maduración de Ostwald, *Ostwald ripening*). La sobresaturación de los precursores da lugar a la formación de monómeros (o algunos pequeños clusters), siendo este proceso el responsable de la nucleación. La maduración de Ostwald o crecimiento ocurre después gracias a la difusión de los monómeros. También se considera que, simultáneamente con la maduración, puede coexistir un mecanismo denominado de fusión orientada, que ocurre cuando dos nanopartículas orientadas cristalográficamente se combinan para formar una de mayor tamaño.

La cinética del crecimiento de los PCs está determinada fundamentalmente por la concentración de los precursores, la naturaleza de los ligandos estabilizadores, la relación Cd/Te/tiol, el pH de la disolución y la temperatura.

Yang y col.²⁰ propusieron que el crecimiento de los PCs CdTe tiene lugar por efectos electrostáticos que ocurren sobre la superficie de las nanopartículas. De acuerdo con esto, la naturaleza de la capa difusa influye en la habilidad de difusión del monómero y, por tanto, en la velocidad de crecimiento. Así, las condiciones de reacción que reducen el grosor de la doble capa eléctrica benefician la difusión del monómero y el rápido crecimiento de las nanopartículas. Al mismo tiempo, la capa difusa también regula la transferencia selectiva de carga de los monómeros de Cd. Los monómeros neutros, tales como el complejo Cd(MPA), migran a través de la capa difusa más fácilmente que los cargados Cd(MPA)₂²⁻, Cd(MPA)₃⁴⁻, facilitando así el crecimiento de los PCs. Los efectos electrostáticos juegan un papel importante, no solo en la difusión del monómero, sino también en la interacción entre partículas, especialmente en la etapa inicial de la reacción, donde los PCs CdTe crecen mediante la aglomeración de pequeños clusters. En esta etapa, la disminución de la repulsión electrostática facilita la agregación y, consecuentemente, el crecimiento de los PCs.

²⁰ H. Zhang, Y. Liu, C. Wang, J. Zhang, H. Sun, M. Li, B. Yang, *Chem. Phys. Chem.*, 9 (2008) 1309.

ii) Formación de la coraza ZnS (o CdS) sobre los núcleos CdTe

Para mejorar la estabilidad y aumentar la eficiencia cuántica de los PCs se recurre a su recubrimiento con una capa o coraza inorgánica, que se extiende, en este caso, sobre el núcleo CdTe.

Esta coraza está constituida por otro semiconductor de banda prohibida más ancha que la del núcleo CdTe (banda prohibida, 1.43 eV, Figura 8), en este caso ZnS (banda prohibida, 3.61 eV) o CdS (banda prohibida, 2.49 eV). La coraza ZnS contribuye a rebajar la toxicidad de los PCs y a mejorar la pasivación del núcleo CdTe. Sin embargo, el desajuste entre los parámetros de red de CdTe y ZnS puede inducir cierta tensión en la interfase entre el núcleo y la coraza y, consecuentemente, generar dislocaciones en la estructura del nanocrystal cuando aumenta el grosor de la coraza. Hay que mencionar también que el engrosamiento de la coraza puede provocar una mayor distribución de tamaños de partícula. La discordancia en los parámetros de red es menor entre CdTe y CdS, lo que conduce a PCs CdTe/CdS con mayor fotoestabilidad.²¹

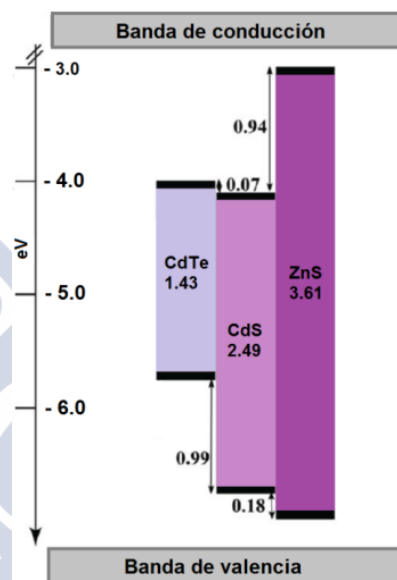


Figura 8. Límites para las bandas de valencia y conducción en los semiconductores CdTe, CdS, ZnS Adaptada de la referencia 22.

En general, una vez preparados los núcleos CdTe del tamaño deseado, empleando la propia disolución de síntesis o tras su purificación y redisolución en agua, se añaden, lentamente y en proporción adecuada, los reactivos para

²¹ Z. Yuan, P. Yang, *Mater. Res. Bull.*, 48 (2013) 2640.

²² A. Samanta, Z. Deng, Y. Liu, *Langmuir*, 28 (2012) 8205.

llevar a cabo la formación de la coraza $\text{ZnS}^{21,23-28}$ o $\text{CdS}^{21,29-40}$ (Figura 9).

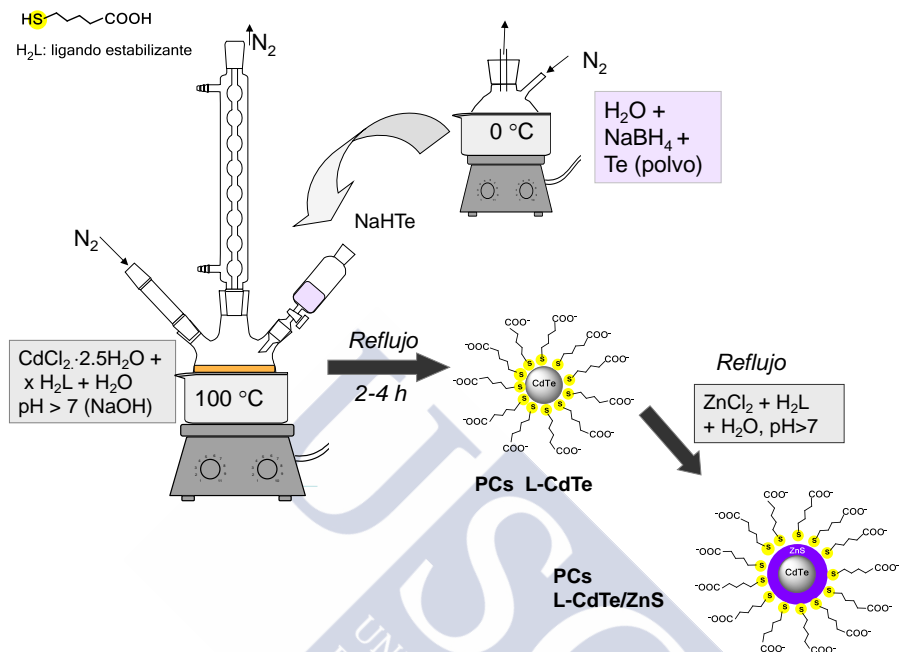


Figura 9. Síntesis de PCs núcleo/coraza.

- ²³ W. Bian, F. Wang, H. Zhang, L. Zhang, L. Wang, S. Shuang, *Luminiscence*, 30 (2015) 1064.
- ²⁴ B. Liu, C. Tong, L. Feng, C. Wang, Y. He, C. Lü, *Chem. Eur. J.*, 20 (2014) 2132.
- ²⁵ C.-X. Sui, Y.-F. Liu, P.-A. Li, D. Zhang, F. Xia, *Anal. Methods*, 5 (2013) 1695.
- ²⁶ X. Wang, Y. Lv, X. Hou, *Talanta*, 84 (2011) 382.
- ²⁷ L.-X. Qin, W. Ma, D.-W. Li, Y. Li, X. Chen, H.-B. Kraatz, T. D. James, Y.-T. Long, *Chem. Eur. J.*, 17 (2011) 5262.
- ²⁸ Y.-F. Liu, J.-S. Yu, *J. Colloid Interf. Sci.*, 351 (2010) 1.
- ²⁹ H. Bao, Y. Gong, Z. Li, M. Gao, *Chem. Mater.*, 16 (2004) 3853.
- ³⁰ Y. He, H.-T. Lu, L.-M. Sai, W.-Y. Lai, Q.-L. Fan, L.-H. Wang, W. Huang, *J. Phys. Chem. B*, 110 (2006) 13370.
- ³¹ C. Wang, H. Zhang, J. Zhang, M. Li, H. Sun, B. Yang, *J. Phys. Chem. C*, 111 (2007) 2465.
- ³² Y.-F. Liu, J.-S. Yu, *J. Colloid. Interf. Sci.*, 333 (2009) 690.
- ³³ Y.-F. Liu, B. Xie, Z.-G. Yin, S.-M. Fang, J.-B. Zhao, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2010) 1501.
- ³⁴ Z. Liu, S. Liu, P. Yin, Y. He, *Anal. Chim. Acta*, 745 (2012) 78.
- ³⁵ R. Gui, X. An, H. Su, W. Shen, Z. Chen, X. Wang, *Talanta*, 94 (2012) 257.
- ³⁶ U. T. D. Thuy, N. Q. Liem, *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*, 4 (2013) 045010.
- ³⁷ Y. Zhu, C. Li, Y. Xu, D. Wang, *J. Alloy. Compd.*, 608 (2014) 141.
- ³⁸ Q. Mu, Y. Li, H. Xu, Y. Ma, W. Zhu, X. Zhong, *Talanta*, 119 (2014) 564.
- ³⁹ J. Chen, A. Xia, Z. Zhang, Y. Yu, Z. Yan, *Spectrochim. Acta A*, 151 (2015) 506.
- ⁴⁰ M. Molaei, H. Hasheminejad, M. Karimipour, *Electron. Mater. Lett.*, 11 (2015) 7.

Como precursores para la formación de las corazas ZnS o CdS se emplean disoluciones acuosas conteniendo generalmente, además de una sal de Zn (cloruro, perclorato o sulfato) o de Cd, un ligando tiólico que se descompone fácilmente y genera los iones sulfuro necesarios, pudiendo ser este ligando el mismo que finalmente funcionará como recubrimiento de la nanopartícula. Con frecuencia, para facilitar la formación de la coraza se añade, además, sulfuro sódico o algún compuesto sulfuro inestable como glutatona, tioacetamida, tiourea, tiosulfato o sulfuro de hidrógeno.

Entre los factores a tener en cuenta para optimizar el proceso destaca la temperatura a la cual se realiza la reacción. Una temperatura moderada evita iniciar una nueva nucleación y favorece el crecimiento de la coraza. Si la temperatura es muy próxima a la de la síntesis del núcleo, las partículas de éste pueden seguir creciendo, afectando así a la distribución de tamaños.

Además de la temperatura, hay otros parámetros de importancia como la concentración de los precursores y la velocidad de adición, los cuales son cruciales para un buen crecimiento y control del espesor de la coraza. Durante esta etapa, se depositan un pequeño número de monocapas (de 1 a 5) del material de la coraza sobre los núcleos CdTe. La cantidad de precursores necesarios para un espesor de coraza deseado puede obtenerse mediante la determinación de la concentración del núcleo.

El efecto de la deposición controlada de una coraza ZnS sobre el comportamiento de la fluorescencia y fotoestabilidad de PCs CdTe fue estudiada en detalle recientemente.⁴¹ Las propiedades fluorescente de los PCs CdTe/ZnS resultaron ser superiores a las del núcleo CdTe, tanto en cloroformo como en agua, indicando la pasivación efectiva de la superficie de los PCs CdTe por la capa ZnS. Tanto la fotoactivación como la fotocorrosión, dos procesos que tienen lugar sobre los PCs MPA-CdTe, fueron evitados cuando estos PCs se recubrieron con una coraza ZnS, sugiriendo la protección del núcleo CdTe a perturbaciones externas.

⁴¹ S. Patra, S. Seth, A. Samanta, *Chem. Phys. Chem.*, 16 (2015) 3871.

Tanto la formación de los núcleos CdTe como de las corazas ZnS o CdS pueden verse facilitadas cuando las reacciones de síntesis son asistidas, por ejemplo, por radiación de ultrasonidos^{31,37} o microondas.^{30,40}

Los PCs CdTe o CdTe/MS (M= Zn, Cd) así obtenidos se precipitan, tras concentrar la disolución, con n-propanol y se separan por centrifugación. Para su purificación se redisuelven en agua y se precipitan de nuevo, hasta tres o cuatro veces.

1.2 Bioconjugación y aplicaciones de PCs CdTe

Debido a sus propiedades únicas, previamente mencionadas, los PCs CdTe exhiben un extenso rango de aplicaciones. Estas nanopartículas son ampliamente utilizadas como sensores de diferentes moléculas^{42,43} e iones,^{44,45} constituyendo, este último, el tema específico de este trabajo, por lo que se discutirá con detalle posteriormente. Sus propiedades ópticas y electrónicas regulables los hacen, también, bloques de construcción muy útiles en dispositivos optoelectrónicos,⁴⁶ fotovoltaicos⁴⁷ y diodos emisores de luz (LED).⁴⁸

Otro campo de gran interés son sus aplicaciones biológicas, que incluyen la detección,^{49,50} marcaje,⁵¹ seguimiento de procesos celulares,⁵² terapia fotodinámica,^{53,54} inmunoensayo...^{55,56} Destacar que, a diferencia de los PCs

⁴² W. Che, Ch. Peng, Z. Jin, R. Qiao, W. Wang, S. Zhu, L. Wang, Q. Jin, Ch. Xu, *Biosens. Bioelectron.*, 24 (2009) 2051.

⁴³ A. C. Vinayaka, S. Basheer, M. S. Thakur, *Biosens. Bioelectron.*, 24 (2009) 1615.

⁴⁴ Y. Lou, Y. Zhao, J. Chen, J.-J. Zhu, *J. Mater. Chem. C*, 2 (2014) 595.

⁴⁵ P. Wu, T. Zhao, S. Wang, X. Hou, *Nanoscale*, 6 (2014) 43.

⁴⁶ Y. Li, L. Jing, R. Qiao, M. Gao, *Chem. Commun.*, 47 (2011) 9293.

⁴⁷ N. Gaponik, A. L. Rogach, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12 (2010) 8685.

⁴⁸ Y. Chang, X. Yao, Z. Zhang, D. Jiang, Y. Yu, L. Mi, H. Wang, G. Li, D. Yu, Y. Jiang, *J. Mater. Chem. C*, 3 (2015) 2831.

⁴⁹ J. Sun, L. Guo, H. Xu, J. Tang, J. Xie, *Biosens. Bioelectron.*, 43 (2013) 446.

⁵⁰ B. Wang, X. Huang, M. Ma, Q. Shi, Z. Cai, *Food Control*, 35 (2014) 26.

⁵¹ L. N. Chen, J. Wang, W. T. Li, H. Y. Han, *Chem. Commun.*, 48 (2012) 4971.

⁵² D. Ag, R. Bongartz, L. E. Dogan, M. Seleci, J.-G. Walter, D. O. Demirkol, F. Stahl, S. Ozelicik, S. Timur, T. Scheper, *Colloid. Surface. B*, 114 (2014) 96.

⁵³ S.-M. Wu, X.-J. Sun, L.-L. Wang, M.-Y. Fei, Z.-Y. Yan, *J. Nanopart. Res.*, 16 (2014) 2701.

⁵⁴ D. A. Tekdas, M. Durmus, H. Yanik, V. Ahsen, *Spectrochim. Acta A*, 93 (2012) 313.

CdSe/ZnS, unos de los más utilizados en biomedicina, los PCs CdTe pueden emitir en el infrarrojo cercano, ventana biológica de transmisión, convirtiéndolos, en herramientas prometedoras para bioimagen.^{57,58}

Para muchas de las aplicaciones, sobre todo en el campo de la biomedicina, es necesaria su modificación con ciertas biomoléculas selectivas, que permiten lograr el “reconocimiento” e interacción de los PCs con otras moléculas específicas. A esta modificación se le denomina bioconjugación.

Mademova y col.⁵⁹ fueron pioneros en llevar a cabo la bioconjugación de PCs CdTe. Su estudio se centró en la conjugación de PCs L-Cys-CdTe con albumina sérica bovina (BSA), utilizando glutaraldehído como interconector. Del mismo modo, Wang y col.⁶⁰ llevaron a cabo la conjugación de PCs CdTe/CdS recubiertos de GSH con concanavalina A, lo que les permitió construir un sensor de glucosa con un límite de detección (LOD) de 0.01 mM. Uno de los grupos aldehído del glutaraldehído forma una base de Schiff con los grupos amino presentes en la superficie del PC y el otro, reacciona con los grupos amino de la biomolécula a conjugar (Figura 10).

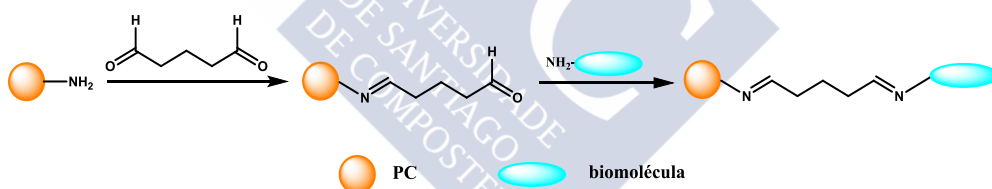


Figura 10. Bioconjugación de PCs utilizando glutaraldehído.

La mayor parte de los PCs CdTe sintetizados en medio acuoso poseen en su superficie grupos carboxilato. La conjugación, en este caso, suele llevarse a

⁵⁵ Y.-J. Li, M.-J. Ma, J.-J. Zhu, *Anal. Chem.*, 84 (2012) 10492.

⁵⁶ J. Tian, L. Zhou, Y. Zhao, Y. Wang, Y. Peng, X. Hong, S. Zhao, *J Fluoresc.*, 22 (2012) 1571.

⁵⁷ L. M. Maestro, J. E. Ramírez-Hernandez, N. Bogdan, J. A. Capobianco, F. Vetrone, J. García Solé, D. Jaque, *Nanoscale*, 4 (2012) 298.

⁵⁸ Y. He, Y. Zhong, Y. Su, Y. Lu, Z. Jiang, F. Peng, T. Xu, S. Su, Q. Huang, Ch. Fan, S.-T. Lee, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50 (2011) 5695.

⁵⁹ N. N. Mamedova, N. A. Kotov, *Nano Lett.*, 1 (2001) 281.

⁶⁰ J.-H. Wang, Y.-Q. Li, H.-L. Zhang, H.-Q. Wang, S. Lin, J. Chen, Y.-D. Zhao, Q.-M. Luo, *Colloid. Surface. A*, 364 (2010) 82.

cabo por reacción de los grupos carboxílicos con N-hidroxisulfosuccinamida (sulfo-NHS) y/o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida hidrocloreto (EDC), para dar lugar a la formación de un sulfo-NHS éster, que posteriormente reacciona con los grupos amino de la biomolécula (Figura 11). Esta estrategia es muy utilizada para la bioconjugación con proteínas⁶¹ y anticuerpos.^{55,56} Un ejemplo lo constituyen PCs MSA-CdTe conjugados con transferrina férrica, que permitieron cuantificar y evaluar la distribución de los receptores de transferrina, cuya sobreexpresión se relaciona con varios tipos de cáncer en dos líneas celulares de glioblastoma humano.

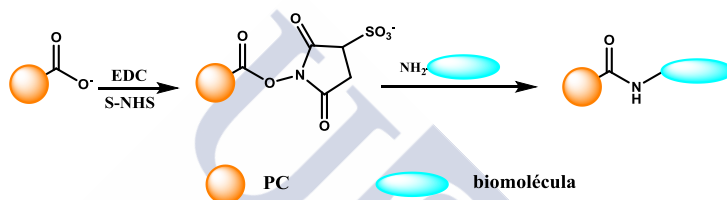


Figura 11. Bioconjugación de PCs utilizando sulfo-NHS y EDC.

Una alternativa a la conjugación covalente es la conjugación a través de interacciones electrostáticas. Esta estrategia fue utilizada, por ejemplo, en la funcionalización de PCs MPA-CdTe con estreptavidina⁶² y, también, en algunos ensayos de hibridación del ADN en los que los PCs, previamente recubiertos con polímeros catiónicos, permiten la interacción ADN-PC.^{63,64}

En ocasiones, la bioconjugación se lleva a cabo a través de un intercambio directo con los ligandos de la superficie. De este modo Hu y col.⁶⁵ crearon PCs CdTe/CdS funcionalizados con HS-ssADN-biotina, que posteriormente se

⁶¹ P. E. Cabral Filho, A. L. C. Cardoso, M. I. A. Pereira, A. P. M. Ramos, F. Hallwass, M. M. C. A. Castro, C. F. G. C. Geraldés, B. S. Santos, M. C. Pedrosa da Lima, G. A. L. Pereira, A. Fontes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1860 (2016) 28.

⁶² M. Stanisavljevic, L. Janu, K. Smerkova, S. Krizkova, N. Pizurova, M. Ryvolova, V. Adam, J. Hubalek, R. Kizek, *Chromatographia*, 76 (2013) 335.

⁶³ H. Peng, L. Zhang, T. H. M. Kjällman, Ch. Soeller, J. Travas-Sedjdic, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 3048.

⁶⁴ G. Jiang, A. S. Susa, A. A. Lutich, F. D. Stefani, J. Feldmann, A. L. Rogach, *ACS Nano*, 3 (2009) 4127.

⁶⁵ M. Hu, Y. He, S. Song, J. Yan, H. T. Lu, L.-X. Weng, L.-H. Wang, Ch. Fan, *Chem. Commun.*, 46 (2010) 6126.

conjugaron con estreptavidina y fueron utilizados como sondas fluorescentes para la detección de biomarcadores cancerígenos con chips de microfluidos.

1.2.1 PCs CdTe como sensores de iones

Dada la gran importancia ambiental y biológica de los iones metálicos, existe una gran demanda en el desarrollo de nuevas estrategias para su detección, tanto en el medioambiente como en seres vivos.

Algunos metales pesados, como el mercurio, plomo y cadmio han atraído una gran atención debido a que son tóxicos para la mayor parte de los organismos, incluso a concentraciones muy bajas. Existen diferentes métodos analíticos tradicionales para su detección, tales como la espectroscopía de absorción atómica^{66,67} o la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente,^{68,69} sin embargo estos métodos requieren una amplia instrumentación y preparación de la muestra.

Debido a sus propiedades fotofísicas únicas, la utilización de los PCs como sensores de iones metálicos ha experimentado un gran desarrollo desde el trabajo pionero de Chen y Rosenzweig en 2002,⁷⁰ quienes utilizaron PCs CdS recubiertos con polifostato, Cys o TG como sondas acuosolubles para la detección de cobre, zinc y hierro. Su gran aportación fue encontrar que los ligandos utilizados en el recubrimiento juegan un papel muy importante en la detección. De este modo, mientras que los PCs recubiertos con polifostato mostraron un comportamiento *on-off* pero no selectividad, los PCs recubiertos con TG fueron selectivos para iones Cu(II) y Fe(III) frente a otros iones metálicos de transición y los PCs recubiertos de Cys respondieron de forma selectiva a los iones Zn(II).

En dos publicaciones recientes se revisa extensamente el uso de PCs como sensores de iones metálicos.^{44,45}

⁶⁶ P. Pohl, *TrAC. Trends Anal. Chem.*, 28 (2009) 117.

⁶⁷ A. Orham, *Talanta*, 65 (2005) 672.

⁶⁸ S. Ashoka, B. M. Peake, G. Bremner, K. J. Hageman, M. R. Reid, *Anal. Chim. Acta*, 653 (2009) 191.

⁶⁹ N. H. Bings, A. Boagaents, J. A. C. Broekaert, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 3917.

⁷⁰ Y. Chen, Z. Rosenzweig, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 5132.

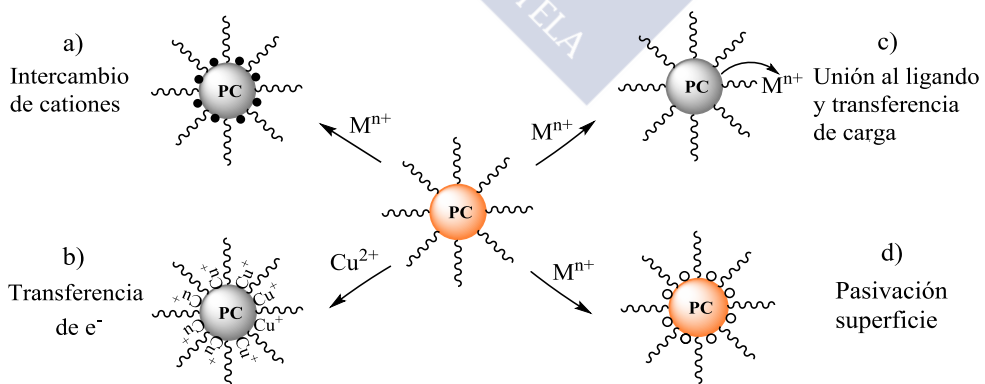
A continuación se analizarán diferentes estrategias utilizadas para la detección de iones metálicos, centrándonos exclusivamente en PCs con una composición CdTe para su núcleo. Se hará especial hincapié en el uso de la fluorescencia para la detección, aunque también se mencionarán otros métodos.

1.2.1.1 Detección de iones metálicos basada en la fluorescencia de los PCs

1.2.1.1.1 Sensores basados en la interacción directa PC-ión metálico

Generalmente, la interacción directa entre los PCs y los diferentes iones metálicos es la estrategia más intuitiva y ampliamente utilizada en la detección. La fotoluminiscencia de los PCs surge de la recombinación de los excitones. Es entonces razonable, que la interacción física o química de un determinado analito con los PC pueda afectar a las propiedades de su superficie, tales como la carga y los estados trampa, afectando así a la recombinación hueco-electrón y, consecuentemente, a la eficiencia de la luminiscencia. Siguiendo este principio es posible diseñar sensores basados en el aumento o en la disminución de la fluorescencia de estos semiconductores nanocristalinos.

El uso generalizado de la interacción PC-metal no implica que se trate de un proceso sencillo, de hecho, existen diferentes vías de interacción que pueden actuar conjuntamente (Esquema 1).



Esquema 1. Resumen de las vías de interacción directa PC-ion metálico.

En la Tabla 2 se recogen los sistemas CdTe basados en estas interacciones (a-d), junto con los sistemas ratiométricos (r) y películas delgadas (p). Se especifican, además, los ligandos utilizados en su recubrimiento, dada su importancia en la sensibilidad y selectividad, así como el rango lineal y el límite de detección (LOD) cuando están disponibles.

Tabla 2. Sensores de iones metálicos basados en la interacción directa PC-metal.

PCs (interacción)	Ligando	Iones	Rango lineal (nM)	LOD (nM)	Ref
CdTe ^(a,b)	TGA	Cu(II)	0.25-617.53	0.04	71
CdTe/ZnS ^(a,b)	MPA	Cu(II)	2.5-1750	1.5	23
CdTe/CdS ^(a,b,c)	TGA-Glyp	Cu(II)	380-440000	20	34
CdTe ^(a)	L-Cys	Cu(II)	315-4721	150	72
CdTe/CdS ^(a)	TGA/SiO ₂	Cu(II)	0-3000	42	73
CdTe/Fe ₃ O ₄ ^(a)	MPA	Cu(II)	100-100000	1800	74
CdTe ^(a,b)	MPA/HAP	Cu(II)	56-54000	56	75
CdTe/CdSe ^(b)	MPA	Cu(II)	50-50000	20	76
CdTe ^(b)	MPA	Cu(II)	50-4000	20	77
CdTe ^(c)	GSH	Cu(II)	2200-30000	670	78
CdTe ^(c)	DPA	Cu(II)	5-3000	0.4	79
CdTe ^(c)	TGA	Cu(II)		7.6	80
Fe ₃ O ₄ /C/CdTe ^(c)	MSA	Cu(II)	1000-10000		81
CdTe ^(c)	MPA	Cu(II)	0-4029	3	82
CdTe	TGA	Cu(II)			83
CdTe ^(r)	MPA	Cu(II)	50-500	1.1	84

⁷¹ A. Wang, L. Fu, T. Rao, W. Cai, M.-F. Yuen, J. Zhong, *Opt. Mater.*, 42 (2015) 548.

⁷² Y. Wang, J. Lu, Z. Tong, H. Huang, *J. Chil. Chem. Soc.*, 54 (2009) 274.

⁷³ Y. Cao, A. Zhang, Q. Ma, N. Liu, P. Yang, *Luminescence*, 28 (2013) 287.

⁷⁴ J. Han, X. Zhang, Y. Zhou, Y. Ning, J. Wu, S. Liang, H. Sun, H. Zhang, B. Yang, *J. Mater. Chem.*, 22 (2012) 2679.

⁷⁵ W. Xiang, F. Zheng, L. Jinku, Z. Xinhua, Y. Bangce, *Chin. J. Chem.*, 28 (2010) 1005.

⁷⁶ Y. Xia, Ch. Zhu, *Analyst*, 133 (2008) 928.

⁷⁷ Y.-S. Xia, Ch. Cao, Z. Ch.-Q. Zhu, *Chin. J. Chem.*, 25 (2007) 1836.

⁷⁸ A. S. Lima, S. S. M. Rodrigues, M. G. A. Korn, D. S. M. Ribeiro, J. L. M. Santos, L. S. G. Teixeira, *Microchem. J.*, 117 (2014) 144.

⁷⁹ R. Mahammad-Rezaei, H. Razmi, H. Abdolmohammad-Zadeh, *Luminescence*, 28 (2013) 503.

⁸⁰ H. Wang, S. Yan, W. Wang, L. Wang, F. Yang, *Adv. Mat. Res.*, 601 (2013) 1060.

⁸¹ H. Wang, L. Sun, Y. Li, X. Fei, M. Sun, Ch. Zhang, Y. Li, Q. Yang, *Langmuir*, 27 (2011) 11609.

⁸² Ch. Bo, Z. Ping, *Anal. Bioanal. Chem.*, 381 (2005) 986.

⁸³ H. Dong, Y. Liu, Z. Ye, W. Zhang, G. Wang, Z. Liu, J. Yuan, *Helv. Chim. Acta*, 92 (2009) 2249.

⁸⁴ J. Yao, K. Zhang, H. Zhu, F. Ma, M. Sun, H. Yu, J. Sun, S. Wang, *Anal. Chem.*, 85 (2013) 6461.

Tabla 2. Continuación

PCs ^(interacción)	Ligando	Iones	Rango lineal (nM)	LOD (nM)	Ref
CdTe ^(r)	TGA	Cu(II)	1-1000000		85
CdTe ^(r)	TGA	Cu(II)			86
CdTe ^(p)	MSA	Cu(II)	10-1000		87
CdTe ^(a)	MSA	Ag(I)	400-8000	54	88
CdTe ^(a)	MPA	Ag(I)	400-3200	41	89
CdTe/CdS ^(a)	TGA/SiO ₂	Ag(I)	0-7000	39.40	73
CdTe/Fe ₃ O ₄ ^(a)	MPA	Ag(I)	100-100000	1400	74
CdTe ^(a)	MPA/HAP	Ag(I)	20-50000	20	75
CdTe ^(a)	MPA/BSA	Ag(I)	80-10660	10	90
CdTe ^(a,b)	TGA	Ag(I)			91
CdTe ^(c,d)	MPA	Ag(I)	500-8000	120	92
CdTe	homocisteína	Ag(I)			93
CdTe	MPA	Ag(I)			94
CdTe ^(a,c)	NAC	Hg(II)	20-430	8	95
CdTe ^(a,b)	TGA	Hg(II)			91
CdTe ^(c)	L-Cys	Hg(II)			96
CdTe ^(c)	CA	Hg(II)	6-450	40	97
CdTe/CdS@ZnS ^(c)	MPA/NAC-SiO ₂	Hg(II)			98
CdTe/Fe ₃ O ₄ ^(c)	L-Cys/SiO ₂	Hg(II)	1000-10000		99
CdTe ^(c)	MPA	Hg(II)	8-2000	2.7	100
CdTe ^(c)	TGA/dBSA	Hg(II)	12-1500	4	101

⁸⁵ Q. Chen, T. Zhou, Ch. He, Y. Jiang, X. Chen, *Anal. Methods*, 3 (2011) 1471.

⁸⁶ Y. Song, X. Cao, Y. Guo, P. Chen, Q. Zhao, G. Shen, *Chem. Mater.*, 21 (2009) 68.

⁸⁷ Q. Ma, E. Ha, F. Yang, X. Su, *Anal. Chim. Acta*, 701 (2011) 60.

⁸⁸ Ch. Cai, H. Cheng, Y. Wang, H. Bao, *RSC Adv.*, 4 (2014) 59157.

⁸⁹ T.-T. Gan, Y.-J. Zhang, N.-J. Zhao, X. Xiao, G.-F. Yin, S.-H. Yu, H.-B. Wang, J.-B. Duan, Ch.-Y. Shi, W.-Q. Liu, *Spectrochim. Acta A*, 99 (2012) 62.

⁹⁰ J.-H. Wang, H.-Q. Wang, H.-L. Zhang, X.-Q. Li, X.-F. Hua, Y.-Ch. Cao, Z.-L. Huang, Y.-D. Zhao, *Anal. Bioanal. Chem.*, 288 (2007) 969.

⁹¹ A. S. Susha, A. M. Javier, W. J. Parak, A. L. Rogach, *Colloid. Surf. A*, 281 (2006) 40.

⁹² Y.-S. Xia, Ch. Cao, Ch.-Q. Zhu, *J. Luminescence*, 128 (2008) 166.

⁹³ H. Jiao, L. Zhang, Z. Liang, G. Peng, H. Lin, *Microchim. Acta*, 181 (2014) 1393.

⁹⁴ Ch. Dong, H. Qian, N. Fang, J. Ren, *J. Phys. Chem. B*, 110 (2006) 11069.

⁹⁵ T. Yang, Q. He, Y. Liu, Ch. Zhu, D. Zhao, *J. Anal. Meth. Chem.*, (2013) 902951.

⁹⁶ L. Xu, J. Hao, T. Yi, Y. Xu, X. Niu, C. Ren, H. Chen, X. Chen, *Electrophoresis*, 36 (2015) 859.

⁹⁷ X. Ding, L. Qu, R. Yang, Y. Zhou, J. Li, *Luminescence*, 30 (2015) 465.

⁹⁸ J. Wang, N. Li, F. Shao, H. Han, *Sensor. Actuat. B: Chem*, 207 (2015) 74.

⁹⁹ H. Wang, Y. Li, X. Fei, L. Sun, L. Zhang, Z. Zhang, Y. Zhang, Y. Li, Q. Yang, *New J. Chem.*, 34 (2010) 2996.

¹⁰⁰ J. Duan, L. Song, J. Zhan, *Nano Res.*, 2 (2009) 61.

¹⁰¹ Y.-S. Xia, Ch.-Q. Zhu, *Talanta*, 75 (2008) 215.

Tabla 2. Continuación

PCs ^(interacción)	Ligando	Iones	Rango lineal (nM)	LOD (nM)	Ref
CdTe	TGA/EMIDCA	Hg(II)		230	102
CdTe	CA	Hg(II)	80-333	70	103
CdTe	MPA/dOB	Hg(II)			104
CdTe/CdS	MPA	Hg(II)	5-300	3.1	38
CdTe ^(r)	MPA	Hg(II)		5.6	105
CdTe ^(r,p)	MPA	Hg(II)	1-1000	4.5	106
CdTe ^(r)	TGA	Hg(II)			86
CdTe ^(p)	MSA	Hg(II)	5-500		87
CdTe ^(p)	MSA	Hg(II)	10-1000		107
CdTe ^(c)	TGA	Pb(II)	1.96-25-9	4.7	108
CdTe ^(c,d)	NAC/PNMA	Pb(II)	8-3000	4.2	109
CdTe	GSH	Pb(II)			110
CdTe	TGA	Pb(II)	2000-100000	270	111
CdTe ^(r)	TGA	Pb(II)			86
CdTe ^(c)	MPA/TGA/TG/MA	Cr(III)/Cr(IV)			112
CdTe/CdS ^(c)	DMAET	Cr(IV)	3-200	0.57	113
CdTe ^(c)	TG	Mn(II)			114
CdTe	TGA	Mn(II)			115
CdTe	MPA	Fe	74.5-1791	22.4	116
CdTe ^(c)	TGA	Co(II)	33.2-3620	7.3	117
CdTe	TGA	Co(II)			115
CdTe ^(r)	TGA	Cd(II)	1000-15000	12.8	118

¹⁰² M.-R. Chao, Y.-Z. Chang, J.-L. Chen, *Biosens. Bioelectron.*, 42 (2013) 397.

¹⁰³ J. Pei, H. Zhu, X. Wang, H. Zhang, X. Yang, *Anal. Chim. Acta*, 757 (2012) 63.

¹⁰⁴ Y.-Q. Wang, Y. Liu, X.-W. He, W.-Y. Li, Y.-K. Zhang, *Talanta*, 99 (2012) 69.

¹⁰⁵ X. Sun, B. Liu, Y. Xu, *Analyst*, 137 (2012) 1125.

¹⁰⁶ F. Yang, Q. Ma, W. Yu, X. Su, *Talanta*, 84 (2011) 411.

¹⁰⁷ Ch. Wang, J. Zhao, Y. Wang, N. Lou, Q. Ma, X. Su, *Sensor. Actuat. B: Chem.*, 139 (2009) 476.

¹⁰⁸ W. Zhong, C. Zhang, Q. Gao, H. Li, *Microchim. Acta*, 176 (2012) 101.

¹⁰⁹ X. Guo, C.-F. Wang, Y. Fang, L. Chen, S. Chen, *J. Mater. Chem.*, 21 (2011) 1124.

¹¹⁰ H. Gonçalves, C. Mendonça, J. C. G. Esteves da Silva, *J. Fluoresc.*, 19 (2009) 141.

¹¹¹ H. Wu, J. Liang, H. Han, *Microchim. Acta*, 161 (2008) 81.

¹¹² J. Han, X. Bu, D. Zhou, H. Zhang, B. Yang, *RSC Adv.*, 4 (2014) 32946.

¹¹³ Ch.-X. Sui, Y.-F. Liu, W.-H. Zhang, P.-A. Li, D. Zhang, *Microchim. Acta*, 181 (2014) 347.

¹¹⁴ S. Xu, Ch. Wang, H. Zhang, Q. Sun, Z. Wang, Y. Cui, *J. Mater. Chem.*, 22 (2012) 9216.

¹¹⁵ J. Li, D. Bao, X. Hong, D. Li, J. Li, Y. Bai, T. Li, *Colloid. Surface. A*, 257 (2005) 267.

¹¹⁶ S. S. M. Rodrigues, A. S. Lima, L. S. G. Teixeira, M. G. A. Korn, J. Santos, *Fuel*, 117 (2014) 520.

¹¹⁷ W. Zhong, J. Liang, J. Yu, *Spectrochim. Acta A*, 74 (2009) 603.

¹¹⁸ R. Gui, X. An, W. Huang, *Anal. Chim. Acta*, 767 (2013) 134.

La baja solubilidad de los calcogenuros de muchos de los iones metálicos a detectar (Tabla 3) puede dar lugar a una reacción de intercambio de estos cationes por los cationes Cd(II) o Zn(II) existentes en la superficie de los PCs (Esquema 1a). Como resultado, se generan defectos de superficie que conducen a la recombinación no radiante de los excitones y, por tanto, a la extinción de la fluorescencia.

Tabla 3. Características físicas de algunos semiconductores.

Metal	Sulfuros		Telururos	
	pK _{ps}	Banda prohibida (eV)	pK _{ps}	Banda prohibida (eV)
Zn	22.2	3.6	33.3	2.39
Cd	27.1	2.42	42	1.45
Ni	23.8	0.4	38.1	
Cu	35.5(CuS)	1.72	53.8(CuTe)	1.62
	47.5(Cu ₂ S)	1.1	62.3(Cu ₂ Te)	1.12
Ag	49.2	0.92	71.7	0.67
Hg	51.8	2	69.6	-0.41
Pb	29.15	0.37	48	0.31

Esta estrategia (a) es ampliamente utilizada para la detección de Ag(I)^{73-75,88-91} y Cu(II).^{23,34,71-74} Utilizando PCs TGA-CdTe⁷¹ se pudo detectar Cu(II) con una excelente selectividad y un LOD de 0.04 nM (Figura 12c) y PCs CdTe recubiertos de MSA⁸⁸ permitieron la detección de Ag(I) con un LOD de 54 nM. Mientras que para los PCs TGA-CdTe se propone la formación de CuTe, para los PCs MSA-CdTe se propone la formación de Ag₂S. Puesto que la energía de la banda prohibida de Ag₂S (Tabla 3) es inferior a la de CdTe, un signo típico del intercambio es el desplazamiento hacia el rojo de las bandas de absorción y emisión. En ambos casos se sintetizaron PCs de diferentes tamaños, mientras que los más sensibles para Cu(II) fueron los más pequeños (tamaño aproximado de 2.7 nm), para Ag(I) mostraron mayor sensibilidad los de un tamaño intermedio (3 nm), poniéndose de manifiesto la gran importancia del tamaño de las nanopartículas, tanto en la sensibilidad como en la selectividad. Existen, también, algunos ejemplos para la detección de Hg(II).^{75,91,95} En este caso el

intercambio catiónico da lugar a la formación de una aleación $\text{Cd}_x\text{Hg}_{1-x}\text{Te}$ que emite en el infrarrojo.

Otro vía de extinción de la fluorescencia es la reducción de los iones metálicos adsorbidos en la superficie de los PCs (Esquema 1b), observado principalmente para Cu(II) .^{23,34,71,77} Este proceso puede representarse de la siguiente forma: $\text{CdTe} + \text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{CdTe}^+ + \text{Cu}^+$. Junto con la extinción de la fluorescencia, producida por el Cu(I) , debida a la recombinación no radiante de los electrones excitados en la banda de conducción y los huecos en la banda de valencia, se produce un desplazamiento del máximo de emisión a longitudes de onda mayores, asociado a $\text{CdTe}^+-\text{Cu}^+$. Este es el modo de interacción propuesto por Wang y col.⁷¹ para justificar la disminución de la fluorescencia observada en PCs TGA-CdTe en presencia de altas concentraciones de Cu(II) (Figura 12). El mismo mecanismo se propone para la detección de Ag(I) utilizando PCs TGA-CdTe⁹¹ y MPA-CdTe.⁷⁵

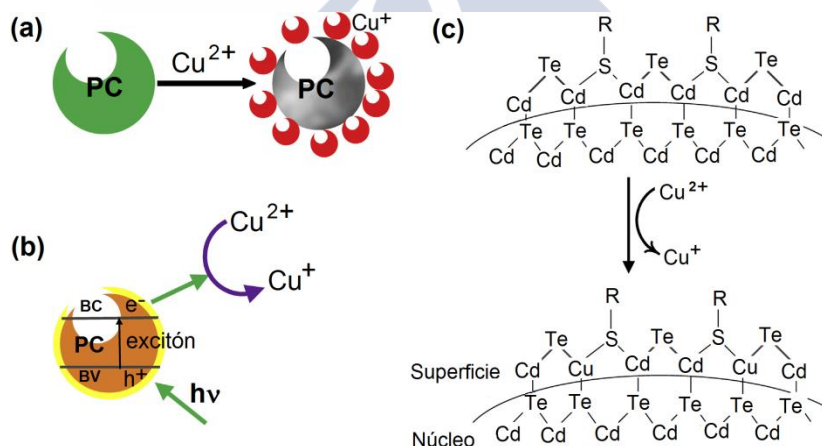


Figura 12. Recombinación no radiante inducida por transferencia de electrones (a), Cu(II) como aceptor de electrones desde la banda de conducción (b), reemplazamiento de Cd(II) por Cu(I) (c).⁷¹

Si los iones metálicos interactúan con los ligandos utilizados en el recubrimiento de los PCs, bien electrostáticamente o mediante coordinación (Esquema 1c), la extinción de la fluorescencia se produce por transferencia de electrones de la banda de conducción del PC al metal. Existen ejemplos de la

utilización de esta vía de extinción para la detección de diversos metales.^{34,78-82,92,95-101,108,109,112-114,117} Gracias a la afinidad del Cu(II) por la D-penicilamina (DPA), PCs CdTe recubiertos con este ligando permitieron desarrollar un sensor para Cu(II) con un límite de detección de 0.4 nM⁷⁹ (Figura 13). Basándose en la interacción electrostática entre PCs CdTe recubiertos con diferentes ligandos (TGA, MPA, MA y TG) y Cr(III)/Cr(IV), Jishu y col.^{112,113} pudieron discriminar entre ambos iones.

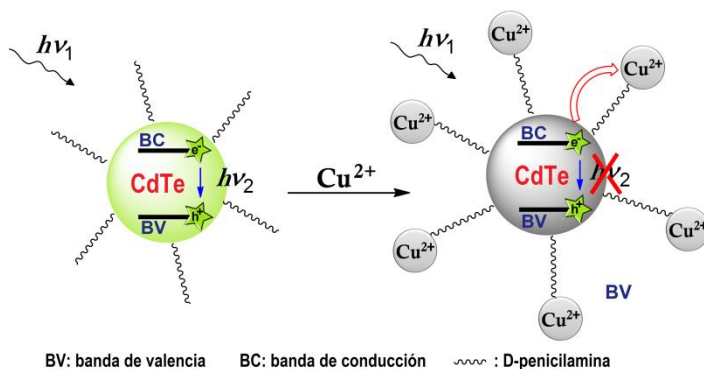


Figura 13. Representación de la desactivación de la fluorescencia de PCs DPA-CdTe por Cu(II).⁷⁹

La interacción directa PC-metal también puede dar lugar a un aumento de la intensidad de la fluorescencia, aunque dicha estrategia no está tan ampliamente explorada como la extinción (Esquema 1d). Xin y col.¹⁰⁹ utilizando PCs CdTe recubiertos de NAC embebidos en hidrogeles observaron que, tras la adición de concentraciones crecientes de Pb(II), se produce la extinción de la fluorescencia. Sin embargo, la adición de Cd(II), Zn(II) o Mn(II) resulta en un aumento de la intensidad, lo que puede asociarse con la pasivación de los defectos superficiales existentes en los nanocristales. Una vez alcanzada cierta concentración de Zn(II) y Mn(II) la intensidad de la fluorescencia deja de aumentar y comienza a producirse la extinción. El exceso de metal, una vez saturados los defectos, puede dar lugar a la transferencia de electrones entre los ligandos del PC y el metal y, por lo tanto, a la recombinación no radiante. Un estudio llevado a cabo con PCs de diferentes tamaños puso de manifiesto que la

pasivación y la transferencia electrónica inducida por iones Ag(I)^{92} es dependiente de los estados de superficie y del tamaño del PC. La fluorescencia de los PCs más pequeños, aumenta o disminuye, dependiendo de la concentración del metal, sin embargo, para las partículas de mayor tamaño solo se produce la extinción. Además, los PCs más pequeños resultaron ser los más sensibles y selectivos.

Todos los sistemas mencionados utilizan una única señal óptica (cambio en la intensidad de la fluorescencia de una única banda) para la detección, sin embargo existen algunos ejemplos de sistemas ratiométricos.^{38,84-86,105,106,118} Su funcionamiento se basa en comparar la intensidad de la fluorescencia a dos longitudes de onda diferentes, antes y después del reconocimiento del analito. Una muestra es la sonda de emisión dual para detección de Hg(II) creada por Qin y col.,³⁸ utilizando PCs CdTe/CdS de diferentes tamaños. Mientras que los PCs de mayor tamaño, embebidos en nanopartículas de sílice, son insensibles al Hg(II) , la intensidad de la fluorescencia de los más pequeños, unidos covalentemente a la superficie de las nanopartículas de sílice, va disminuyendo a medida que se incrementa la concentración de Hg(II) (Figura 14).

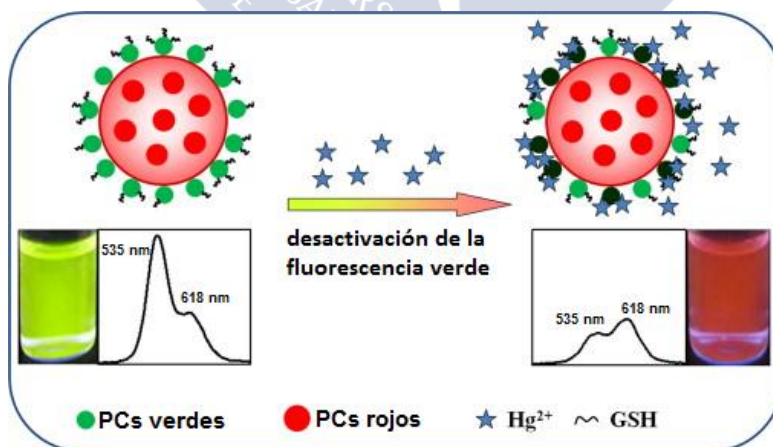


Figura 14. Representación de una sonda de emisión dual basada en PCs CdTe/CdS para la detección de Hg(II) .³⁸

También se han desarrollado algunos sensores en los que se utilizan películas delgadas de PCs.^{87,106,107} La deposición de PCs MSA-CdTe sobre portaobjetos de cuarzo, mediante interacciones electrostáticas con poli(cloruro de dimetildialilamonio), dio lugar a la creación de una sonda para Hg(II) y Cu(II) basada en la recuperación de la fluorescencia tras la adición de GSH.⁸⁷

1.2.1.1.2 Sensores basados en el desplazamiento del ligando existente en la superficie del PC

Dada su alta afinidad por los grupos tiol presentes en una buena parte de los recubrimientos más comunes, algunos iones metálicos pueden competir por los ligandos que recubren la superficie del PC. El desplazamiento de dichos ligandos crea defectos en la superficie que pueden atrapar a los electrones de la banda de conducción, produciendo la extinción de la fluorescencia y, finalmente, la agregación de las nanopartículas. Los sistemas que se basan en esta estrategia se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Sensores basados en el desplazamiento del ligando de la superficie del PC.

PCs	Ligando recubrimiento	Iones	Rango lineal (nM)	LOD (nM)	Ref
CdTe	L-Cys	Hg(II)			96
CdTe	GSH	Hg(II)		5	119
Au-CdTe	BSA/GSH	Hg(II)	131-710	9	120
CdTe/Zns	L-Cys	Ni(II)	4-500	0.59	25
CdTe	GSH	As(III)	5000-250000	20	26

En un estudio reciente de la interacción de Hg(II) con PCs L-Cys-CdTe,⁹⁶ utilizando electroforesis capilar junto con otras técnicas, se pone de manifiesto la presencia de dos productos diferentes (Figura 15). A bajas concentraciones de metal existe una interacción entre el Hg(II) y los grupos amino y carboxilato de la cisteína, lo que conlleva a un aumento del tamaño de los PCs y, consecuentemente, a una reducción de la movilidad electroforética. Sin embargo, a medida que se incrementa la concentración de Hg(II) se produce la

¹¹⁹ X. Zhu, Z. Zhao, X. Chi, J. Gao, *Analyst*, 138 (2013) 3230.

¹²⁰ B. Paramanik, S. Bhattacharyya, A. Patra, *Chem. Eur. J.*, 19 (2013) 5980.

pérdida de los ligandos de la superficie, lo que se corrobora mediante la existencia de un pico correspondiente a Hg-L-Cys en el electroforegrama, y la aparición de un pico en el espectro de masas asociado a la formación de $[\text{Hg}(\text{L-Cys})_2\text{-2H}]^+$. Esta misma estrategia se utiliza para la detección de Ni(II) y As(II), usando PCs L-Cys-CdTe/ZnS²⁵ y GSH-CdTe²⁶ respectivamente, obteniéndose un LOD de 0.59 nM para Ni(II) y 20 nM para As(II).

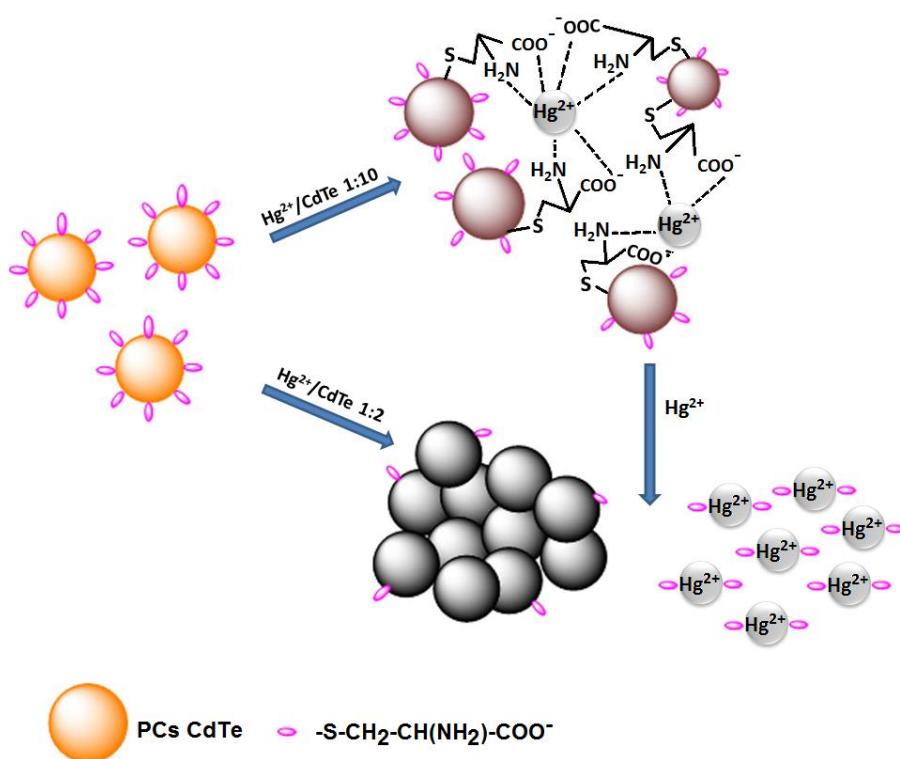


Figura 15. Representación de los diferentes productos resultantes de la interacción entre PCs L-Cys-CdTe y Hg(II).⁹⁶

1.2.1.1.3 Sensores basados en la extinción y posterior restauración de la fluorescencia (Sistemas off-on)

Esta estrategia se utiliza, principalmente, para la detección de Cd^{35,121-123} y Zn^{122,124} aunque también existe algún ejemplo con otros metales¹²⁵ (Tabla 5). La detección se basa en la restauración de la fluorescencia de los PCs previamente apagados, bien por creación de defectos^{35,121-123} o por interacción con un ligando específico.^{121,124,125}

Tabla 5. Sistemas off-on.

PCs	Ligando recubrimiento	Iones	Rango lineal (nM)	LOD (nM)	Ref
CdTe	TGA	Cd(II)	0.02-600	0.01	121
CdTe/CdS	MPA	Cd(II)	100-2000	6	35
CdTe	MPA	Cd(II)	1300-35000	500	122
CdTe	MPA	Cd(II)	50-1000	10	123
CdTe	MPA	Zn(II)	1600-35000	1200	122
CdTe	GSH	Zn(II)	480-90000	140	124
CdTe	TGA	Ca(II)	19963-79850	16469	125

El ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) produce el apagado de PCs GSH-CdTe debido a la interacción, mediante enlaces de hidrogeno, de la GSH y el DTPA.¹²⁴ Debido a la alta afinidad del Zn(II) por el DTPA, tras la adición de dicho metal se forma un complejo Zn(II)-DTPA y se recupera la fluorescencia (Figura 16). La adición de fenantrolina (Phen) da lugar a la extinción de la fluorescencia de PCs TGA-CdTe mediante un mecanismo de transferencia de huecos fotoinducida.¹²¹ En presencia de Cd(II) la formación del complejo [Cd(Phen)₂(H₂O)₂]²⁺ restaura la fluorescencia.

Otra estrategia se basa en la creación de defectos en la superficie del PC. PCs recubiertos de MPA se apagan tras añadir ácido etilendiaminotetracético

¹²¹ X. Hu, K. Zhu, Q. Guo, Y. Liu, M. Ye, Q. Sun, *Anal. Chim. Acta*, 812 (2014) 191.

¹²² H. Xu, R. Miao, Z. Fang, X. Zhong, *Anal. Chim. Acta*, 687 (2011) 82.

¹²³ P. Wu, X.-P. Yan, *Chem. Commun.*, 46 (2010) 7046.

¹²⁴ Ch. Hao, S. Liu, W. Liang, D. Li, L. Wang, Y. He, *Microchim. Acta*, 182 (2015) 2009.

¹²⁵ S. S. M. Rodrigues, D. R. Prieto, D. S. M. Ribeiro, E. Barrado, J. A. V. Prior, J. L. M. Santos, *Talanta*, 134 (2015) 173.

(EDTA)¹²³ o pirrolidinditiocarbamato amónico (APDC).³⁵ La adición de Cd(II) produce la pasivación de los defectos creados y la recuperación de la fluorescencia (Figura 17). De manera similar, la fluorescencia de PCs MPA-CdTe/Cds fue inactivada tras la adición de S²⁻ y, seguidamente, recuperada por adición de Cd(II) o Zn(II).¹²²

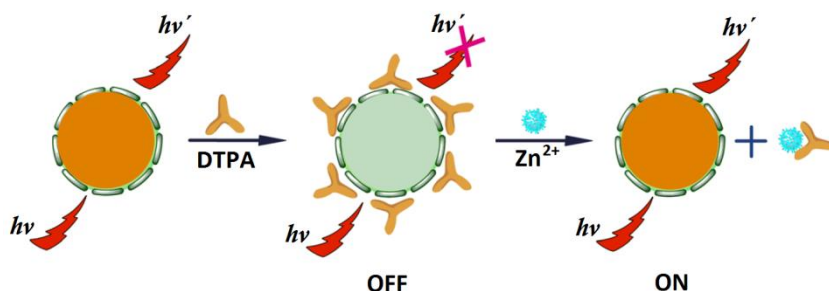


Figura 16. Representación del mecanismo de detección de Zn(II) mediante la utilización de sistemas DTPA y PCs GSH-CdTe.¹²⁴

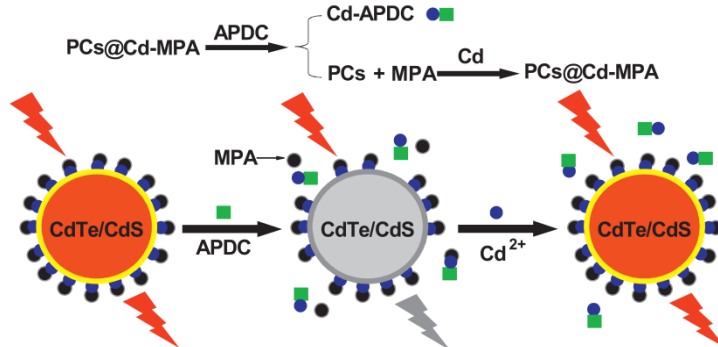


Figura 17. Representación de un sistema "off-on" basado en PCs MPA-CdTe/CdS para la detección de Cd(II).³⁵

1.2.1.1.4 Sensores basados en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)

Los procesos FRET consisten en la transferencia de energía no radiante entre dos cromóforos a través de interacciones dipolo-dipolo. Uno de los cromóforos, en el estado excitado, actúa como dador y el otro, en el estado fundamental, como aceptor. Para que se produzca dicha transferencia es imprescindible el solapamiento del espectro de emisión del dador con el de UV-Vis del aceptor.

Los altos rendimientos cuánticos, espectros de emisión estrechos y simétricos, la separación de las longitudes de onda de emisión y excitación y la variación de la longitud de onda de absorción y emisión con el tamaño, hacen que los PCs sean considerados excelentes candidatos para el diseño de nuevos sensores basados en FRET. En la Tabla 6 se recogen los sistemas que incluyen PCs CdTe y que utilizan esta estrategia para la detección de iones metálicos.

Tabla 6. Sensores basados en FRET.

Dador	Aceptor	Iones	Rango lineal (nM)	LOD (nM)	Ref
MPA-CdTe	PEI-Cu	Cu(II)	30-160	31.2	126
MA-CdTe	PFR NPs	Cu(II)		160	127
MPA-CdTe	Cy5	Ag(I)	0-20	2.5	128
MPA-CdTe	TAMRA	Hg(II)	0-20	1.5	128
FB	TGA-CdTe	Hg(II)	0.04-4	0.003	129
TGA-CdTe	BRB	Hg(II)	62.5-2500	20.3	130
CA-CdTe	MUA-Au	Pb(II)	1060-21800	1445	131

La interacción electrostática entre PCs MPA-CdTe y nanopartículas mesoporosas de sílice fluorescentes recubiertas de polietilenimina (PEI) da lugar a la formación de un nanomaterial híbrido con emisión dual centrada en 500 y 717 nm, que puede ser utilizado como una sonda para la detección de Cu(II). La

¹²⁶ J. Sha, C. Tong, H. Zhang, L. Feng, B. Liu, Ch. Lü, *Dyes Pigments*, 113 (2015) 102.

¹²⁷ P. Yang, Y. Zhao, Y. Lu, Q.-Z. Xu, X.-W. Xu, L. Dong, S.-H. Yu, *ACS Nano*, 5 (2011) 2147.

¹²⁸ C. Hao, L. Xua, Ch. Xing, H. Kuang, L. Wang, Ch. Xu, *Biosens. Bioelectron.*, 36 (2012) 174.

¹²⁹ H. Tao, X. Liao, M. Xu, S. Li, F. Zhong, Z. Yi, *J. Luminescence*, 146 (2014) 376.

¹³⁰ J. Li, F. Mei, W.-Y. Li, X.-W. He, Y.-K. Zhang, *Spectrochim. Acta A*, 70 (2008) 811.

¹³¹ X. Wang, X. Guo, *Analyst*, 134 (2009) 1348.

formación de un complejo entre el Cu(II) y los grupos amino del PEI apaga la fluorescencia de los PCs por transferencia de energía.¹²⁶

Wang y col.¹²⁸ detectaron simultáneamente Ag(I) y Hg(II) con límites de detección de 2.5 y 1.8 nM, respectivamente, utilizando PCs MPA-CdTe funcionalizados con ADN como dadores y sADN-TAMRA y sADN-Cy5 como aceptores. La transferencia de energía dador-aceptor se produce debido a la formación de los complejos T-Hg²⁺-T y C-Ag⁺-C (Figura 18).

La detección de Pb(II) fue posible por interrupción de la transferencia de energía existente entre PCs CdTe recubiertos de CA y nanopartículas de Au (AuNPs).¹³¹ La adición de Pb(II) inhibe la interacción PC-AuNPs y, por tanto, reduce la eficiencia de la transferencia de energía (Figura 19).

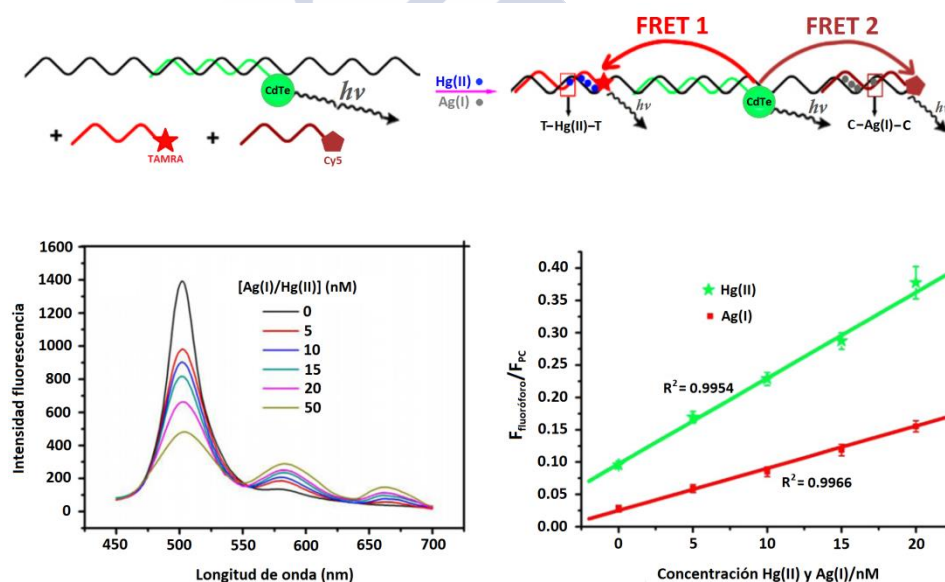


Figura 18. Representación de un sistema de detección de Ag(I) y Hg(II) basada en FRET entre PCs MPA-CdTe y dos fluoróforos (TAMRA y Cy5).¹²⁸

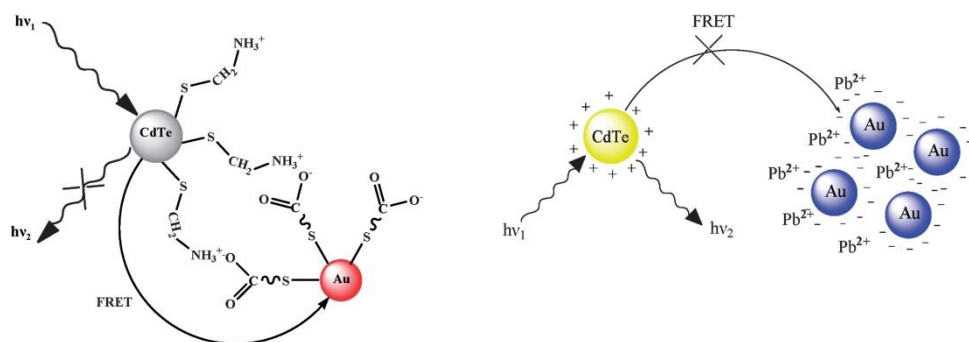


Figura 19. Representación de un sistema de detección de Pb(II) basado en la modulación de la eficiencia FRET entre PCs CA-CdTe y AuNPs.¹³¹

1.2.1.1.5 Otras estrategias

Otra estrategia para la detección consiste en la funcionalización específica de la superficie de las nanopartículas con macrociclos. La encapsulación de PCs CdTe en esferas de sílice, mediante un proceso sol-gel, y posterior funcionalización con un calixareno C[6] dio lugar a un sensor de mercurio con un límite de detección 1.55 nM. Las nanopartículas C[6]/SiO₂/CdTe presentan mayor fluorescencia que su precursor SiO₂/CdTe debido a las unidades benceno del calixareno ricas en electrones. Tras la adición de Hg(II), el ión es reconocido selectivamente por la cavidad del calixareno y, consecuentemente, se produce la extinción de la fluorescencia.¹³²

Los iones metálicos, en lugar de interactuar directamente con los PCs o conjugados de éstos, pueden reaccionar con un transductor para producir un producto intermedio, que es el que apaga la fluorescencia. Wu y col.¹³³ fueron pioneros en probar esta estrategia para la determinación de Fe(II) en presencia de Fe(III) utilizando un sistema híbrido GSH-CdTe-Fenton. La reacción de Fenton origina radicales hidroxilo que pueden extinguir la fluorescencia de los PCs. Esta extinción tiene lugar a través de la transferencia de electrones, de la banda de conducción a un orbital molecular ocupado por un solo electrón de los radicales hidroxilo. Del mismo modo, la utilización de otro sistema híbrido MPA-CdTe-

¹³² T. Li, Y. Zhou, J. Sun, D. Tang, S. Guo, X. Ding, *Microchim. Acta*, 175 (2011) 113.

¹³³ P. Wu, Y. Li, X.-P. Yan, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 6252.

alcohol oxidasa (AO) permitió la detección de Cu(II) con un LOD de 2.75 nM.¹³⁴ La AO cataliza la oxidación del metanol a formaldehído generando H₂O₂, que induce la extinción de la fluorescencia de los PCs. La adición de Cu(II) inhibe la reacción de oxidación y reduce la eficacia del apagado.

La utilización de PCs funcionalizados con aptámeros, junto con estrategias para amplificar la señal de fluorescencia de polarización (FP) permitieron preparar sensores para Hg(II).^{135,136} Un ejemplo de ellos, es la utilización de AgNPs y PCs TGA-CdTe/CdS funcionalizados con aptámeros ricos en timina. La adición de Hg(II) produce la hibridación entre los PCs y las NPs, provocando un aumento de la masa molecular, que se traduce en un incremento de la intensidad de la señal de FP.¹³⁵

1.2.1.2 Otros métodos de detección

A parte del uso de la fluorescencia para la detección de iones metálicos, también existen otros métodos que utilizan PCs CdTe, tales como la electroquimioluminiscencia (ECL), fotoelectroquímica (PEC) y quimioluminiscencia (CL). En la Tabla 7 se recogen ejemplos de la utilización de cada una de estas estrategias. A continuación se describen brevemente algunos de ellos.

Existen ejemplos de ECL (luminiscencia producida durante una reacción electroquímica en disolución) tanto anódica como catódica utilizando PCs CdTe. Wang y col.¹³⁷ estudiaron, recientemente, las propiedades electroluminiscentes en el infrarrojo de PCs MPA-CdTe/CdS en electrodos de óxido de indio y de estaño. La adición de Cu(II) da lugar a la extinción de la electroluminiscencia debido al desplazamiento de los ligandos MPA. La creación de un microchip utilizando PCs CdTe recubiertos del ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS) permitió la detección de Cu(II) con un límite de detección de 6.7 pM.¹³⁸

¹³⁴ C. Guo, J. Wang, J. Cheng, Z. Dai, *Biosens. Bioelectron.*, 36 (2012) 69.

¹³⁵ Y. Jiang, J. Tian, K. Hu, Y. Zhao, S. Zhao, *Microchim. Acta*, 181 (2014) 1423.

¹³⁶ J. Zhang, J. Tian, Y. He, Y. Zhao, S. Zhao, *Chem. Commun.*, 50 (2014) 2049.

¹³⁷ J. Wang, X. Jiang, *Sensor. Actuat. B: Chem.*, 207 (2015) 552.

¹³⁸ S. Deng, T. Zhang, Y. Zhang, D. Shan, X. Zhang, *RSC Adv.*, 4 (2014) 29239.

Tabla 7. Sensores basados en ECL, PEC y CL.

PC	Ligando recubrimiento	Iones	Método de detección	Rango lineal (nM)	LOD (nM)	Ref
CdTe/CdS	MPA	Cu(II)	ECL	100-10000	20	137
CdTe	DMPS	Cu(II)	ECL	0.01-1000000	0.0067	138
CdTe	DMSA	Cu(II)	ECL	5-7000	3	139
CdTe/CdS	MPA	Cu(II)	ECL	14-210	6.1	140
CdTe	MSA	Cu(II)	ECL	40-3200	30	141
CdTe	DMSA	Cu(II)	PEC	60-100000	5.9	142
CdTe	TGA	Cu(II)	CL	70-5000	40	143
CdTe	TGA	Ag(I)	CL	50-2000	30	143
CdTe	TGA	Hg(II)	CL	100-20000	67	143
CdTe	GSH-TGA	Pb(II)	ECL		0.26	144
CdTe	TGA	Cd(II)	ECL	6.3-3400	2.1	145
CdTe	TGA	Ce(IV)	CL	4-10000	0.38	146

PCs CdTe recubiertos de ácido *meso*-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) inmovilizados en electrodos de carbono mostraron un emisión electroluminiscente intensa alrededor de 0.87 V. El Cu(II), de nuevo, puede competir con el ligando de la superficie, apagando dichos PCs.¹³⁹ La utilización de una mezcla de ligandos TGA y GSH mejora la intensidad ECL de PCs CdTe y la sensibilidad en la detección de Pb(II).¹⁴⁴ La ECL de PCs TGA-CdTe fue inicialmente apagada por sulfuro y, posteriormente, restaurada en presencia de Cd(II).¹⁴⁵

La detección PEC se basa en la obtención de corriente como señal de detección tras la excitación de los PCs sobre un electrodo. La eficiencia de conversión fotoeléctrica de PCs DMSA-CdTe sobre electrodos dopados de óxido de estaño se ve disminuida por la presencia de Cu(II), debido a la creación de trampas para los excitones¹⁴² (Figura 20).

¹³⁹ L. Cheng, X. Liu, J. Lei, H. Ju, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 3359.

¹⁴⁰ Y.-L. Mei, H.-S. Wang, Y.-F. Li, Z.-Y. Pan, W.-L. Jia, *Electroanal.*, 22 (2010) 155.

¹⁴¹ L. Zhang, L. Shang, S. Dong, *Electrochem. Commun.*, 10 (2008) 1452.

¹⁴² P. Wang, X. Ma, M. Su, Q. Hao, J. Lei, H. Ju, *Chem. Commun.*, 48 (2012) 10216.

¹⁴³ Z. Sheng, H. Han, J. Liang, *Luminescence*, 24 (2009) 271.

¹⁴⁴ H. Wang, Q. Chen, Z. Tan, X. Yin, L. Wang, *Electrochim. Acta*, 72 (2012) 28.

¹⁴⁵ H. Song, M. Yang, X. Fan, H. Wang, *Spectrochim. Acta A*, 133 (2014) 130.

¹⁴⁶ Ch. Sun, B. Liu, J. Li, *Talanta*, 75 (2008) 447.

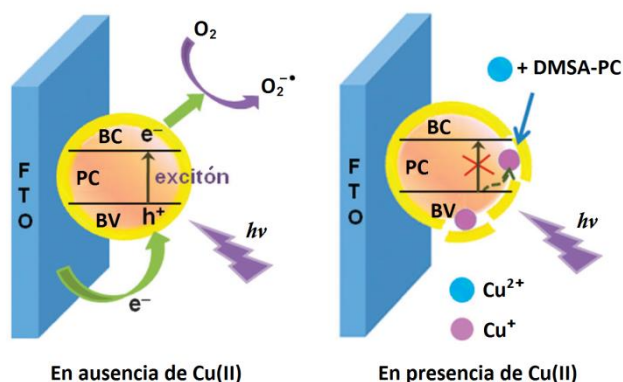


Figura 20. Representación de la detección fotoelectroquímica de Cu(II) mediante la creación de trampas para excitones.¹⁴²

También existen algunos ejemplos de sensores basados en la CL (luminiscencia generada por una reacción química). Zhon y col.¹⁴³ encontraron que el peróxido de hidrógeno podía oxidar directamente a PCs TGA-CdTe generando una fuerte señal quimioluminiscente en condiciones básicas. La detección de Cu(II), Ag(I) y Hg(II) es posible porque la presencia de dichas especies metálicas inhiben la reacción de oxidación.

1.2.1.3 Sondas celulares

Aunque la aplicación de nanosondas basadas en PCs CdTe para la detección de iones metálicos en el interior celular está todavía poco desarrollada, sí existen algunos ejemplos.

Así, PCs recubiertos con carboximetilquitosano permitieron la detección de Hg(II) en células renales de perro (MDCK)^{147,148} y de Zn(II) en células humanas de cáncer de próstata (PC3-M).¹⁴⁹ Mediante citometría de flujo se observó que la intensidad de la fluorescencia, tras incubar células MDCK con concentraciones variables de Hg(II) durante 24 h, va disminuyendo progresivamente hasta que se alcanza una concentración de metal de 70 $\mu\text{g/L}$, a la que los PCs se apagan

¹⁴⁷ Z. He, P. Zhou, H. Zhu, *Spectrochim. Acta A*, 139 (2015) 179.

¹⁴⁸ Z. He, H. Zhu, P. Zhou, *Ecotoxicol.*, 23 (2014) 2030.

¹⁴⁹ Q. Ma, Z.-H. Lin, N. Yang, Y. Li, X.-G. Su, *Acta Biomater.*, 10 (2014) 868.

totalmente. Sin embargo, la adición de Zn(II) provoca un incremento de la fluorescencia en células PC3-M, que puede observarse claramente al microscopio tras 2 h de incubación.

Hu y col.¹⁵⁰ desarrollaron un sistema FRET constituido por PCs NAC-CdTe (dador) y un derivado de la Rodamina 6G (R6G) conjugado con Hg(II) (aceptor) que permitió la detección de Hg(II) en células de adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa). La adición del metal desactiva la fluorescencia de los PCs y, simultáneamente, interacciona con el conjugado de R6G para formar un complejo fluorescente.

Los cambios en la concentración intracelular de Ca(II) inducidos por el ácido jasmónico fueron detectados mediante el cambio de la intensidad de la señal de fluorescencia de PCs MA-CdTe conjugados con di[2-(N,N-dicarboximetil)amino]etil éter,¹⁵¹ a través de microscopía confocal de fluorescencia.

1.3 Toxicidad y biodistribución PCs CdTe

Debido a la creciente utilización de los puntos cuánticos en múltiples aplicaciones, resulta crítico conocer su toxicidad y biodistribución, tanto *in vitro* como *in vivo*.

1.3.1 Estudios *in vitro*

1.3.1.1 Citotoxicidad

Resulta complejo comparar y generalizar los resultados de citotoxicidad de los diferentes estudios, dada la gran variedad de PCs, de líneas celulares y de métodos analíticos empleados. Por otra parte, diversas investigaciones mostraron que la biocompatibilidad de estas nanopartículas no solo depende de

¹⁵⁰ B. Hu, L.-L. Hu, M.-L. Chen, J.-H. Wang, *Biosens. Bioelectron.*, 49 (2013) 499.

¹⁵¹ J. Xia, Y. Yu, Q. Liao, Y. Cao, B. Lin, X. Hu, J. Wu, *J. Inorganic Biochem.*, 118 (2013) 39.

su composición, sino que otros factores como la forma, el tamaño y la carga son determinantes.¹⁵²

Centrándonos en PCs CdTe, pequeños cambios en su síntesis dan lugar a modificaciones en su superficie que afectan a sus propiedades fisicoquímicas y, por tanto, a su interacción y distribución celular. Su citotoxicidad ha sido interpretada utilizando el cambio que inducen en diferentes parámetros: crecimiento o morfología celular, actividad metabólica o apoptosis. Esta variabilidad hace que sea difícil extraer conclusiones consistentes. No obstante, se han propuesto varios mecanismos como responsables de la toxicidad.

La toxicidad ha sido asociada, principalmente, con la existencia de Cd(II) libre, resultado de la degradación u oxidación de la superficie de los PCs. Su y col.¹⁵³ pusieron de manifiesto que, mientras que los PCs CdTe y CdTe/CdS son citotóxicos, la adición de una coraza ZnS mejora la biocompatibilidad y no se observan efectos tóxicos en diferentes líneas celulares, incluso a altas concentraciones y a largos tiempo de incubación, lo que es posible debido al efecto protector ejercido por la coraza, que evita la liberación de Cd(II). Sin embargo, en estudios posteriores¹⁵⁴ comprobaron que la citotoxicidad de los PCs CdTe no podía atribuirse solamente a la liberación de Cd(II), dado que estos PCs eran más citotóxicos que disoluciones de CdCl₂, incluso aun cuando la concentración intracelular de Cd(II) existente en células humanas embrionarias de riñón (HEK293) tratadas con ambos era idéntica. Por otra parte, observaron que cuando se trataban las células con una concentración 300 nM de PC o 20 μM de CdCl₂, pese a que la concentración intracelular de Cd(II) era mucho menor en presencia de los PCs, sorprendentemente, la mortalidad celular era mucho mayor. Esta aparente discrepancia la atribuyeron a una distribución intracelular heterogénea de las nanopartículas, que se acumularon en pequeñas áreas de la región perinuclear.

¹⁵² Q. Zhang, D. Shao, W. Ji, J. Li, L. Chen, J. Song, *Toxicol. Reports*, 1 (2014) 137.

¹⁵³ Y. Su, Y. He, H. Lu, L. Sai, Q. Li, W. Li, L. Wang, P. Shen, Q. Huang, Ch. Fan, *Biomaterials*, 30 (2009) 19.

¹⁵⁴ Y. Su, M. Hu, Ch. Fan, Y. He, Q. Li, W. Li, L. H. Wang, P. Shen, Q. Huang, *Biomaterials*, 31 (2010) 4829.

Otro estudio llevado a cabo por Cho y col.,¹⁵⁵ centrado en determinar la concentración intracelular de Cd(II) en células humanas de cáncer de mama (MCF-7) tratadas con PCs CdTe recubiertos con diferentes ligandos (MPA, Cys y NAC), revela también que no existe una correlación entre la concentración intracelular de Cd(II) y la viabilidad celular. El daño observado en los lisosomas fue atribuido, no solo a la presencia de Cd(II), sino también a la liberación de especies de oxígeno reactivas (ROS).

Lovric y col.¹⁵⁶ relacionaron también la muerte celular por apoptosis, inducida por PCs CdTe recubiertos de MPA en células MCF-7, con la presencia de ROS. Inicialmente detectaron daños en la membrana plasmática y en el núcleo celular con agregación de la cromatina, tras 24 h de incubación observaron además la existencia de mitocondrias deformadas en la región perinuclear, todos ellos signos característicos de apoptosis. La adición de NAC minimizó la reducción en la viabilidad celular, debido a la reducción de ROS y a la inducción de la síntesis de glutatona, uno de los antioxidantes más efectivos. Del mismo modo, estudios centrados en investigar el mecanismo a través del cual PCs CdTe inducen toxicidad en células de hepatocarcinoma humano (HepG2) revelan la presencia de estrés oxidativo, interferencias con los sistemas de defensa antioxidante y la activación de proteinquinasas, dando lugar a la apoptosis.¹⁵⁷ Sin embargo, Yan y col.¹⁵⁸ sugieren que PCs recubiertos de MSA inducen toxicidad endotelial a través de la activación de la muerte mitocondrial, aunque también admiten que las ROS ejercen un papel importante.

Recientemente, Lai y col.¹⁵⁹ centraron sus estudios en el efecto ejercido por PCs CdTe recubiertos con dos ligandos diferentes (MPA y BSA) sobre la mitocondria. Los resultados mostraron que los PCs inducen modificaciones en la permeabilidad mitocondrial, lo que conduce a hinchazón, colapso del potencial de membrana, permeabilización de la membrana interna a H⁺ y K⁺, incremento de la fluidez de la membrana, depresión de la respiración celular, alteraciones en

¹⁵⁵ S. J. Cho, D. Maysinger, M. Jain, B. Röder, S. Hackbarth, F. M. Winnik, *Langmuir*, 23 (2007) 1974.

¹⁵⁶ J. Lovric, S. J. Cho, F. M. Winnik, D. Maysinger, *Chem. Biol.*, 12 (2005) 1227.

¹⁵⁷ K. C. Nguyen, W. G. Willmore, A. F. Tayabali, *Toxicol.*, 306 (2013) 114.

¹⁵⁸ M. Yan, Y. Zhang, K. Xu, T. Fu, H. Qin, X. Zheng, *Toxicol.*, 282 (2011) 94.

¹⁵⁹ L. Lai, J.-Ch. Jin, Z.-Q. Xu, Y.-S. Ge, F.-L. Jiang, Y. Liu, *J. Membrane Biol.*, 248 (2015) 717.

la ultraestructura y liberación de citocromo c. El recubrimiento de los PCs con BSA reduce la liberación de Cd(II), sin embargo, el efecto que ejercen en el hinchazón mitocondrial, en la permeabilidad de la membrana interna a H^+ y K^+ y en la fluidez de la membrana es mayor que el ejercido por los PCs recubiertos de MPA, lo que de nuevo confirma que la liberación de Cd(II) no es la única causa de la disfunción mitocondrial.

Un estudio comparativo entre PCs MSA-CdTe y SiO_2 -CdTe pone de manifiesto que estas nanopartículas también pueden causar daños en el ADN.¹⁶⁰ El daño provocado por los PCs MSA-CdTe es mayor, tanto en la oscuridad como bajo irradiación UV, lo que puede deberse al efecto protector ejercido por la sílica, que ralentiza la oxidación de la superficie y, por tanto, la generación de radicales libres.

1.3.1.2 Entrada y distribución celular

La entrada y distribución de los PCs en la célula depende, al igual que la citotoxicidad, de factores como el tamaño, la carga y la línea celular empleada en el estudio. Aunque el mecanismo de entrada no está totalmente claro, parece que la vía principal es la endocitosis. Cuando los PCs se añaden en el medio de cultivo, las proteínas del suero se adsorben en su superficie y median su entrada por endocitosis asistida por clatrina. Una vez en la célula, la ubicación del PC está mediada por vesículas endosomales o lisosomales.¹⁶¹

Wang y col.¹⁶² llevaron a cabo estudios con PCs MSA-CdTe de diferentes tamaños (2.3 y 5.4 nm). Tras incubar células HeLa con las nanopartículas disueltas en tampón fosfato salino (PBS), los PCs más pequeños, en diez minutos, se encuentran distribuidos por el citoplasma. Sin embargo, aunque tras tres minutos de incubación se observa una acumulación de los PCs de mayor tamaño en la membrana celular, no hay internalización hasta los treinta minutos. Este comportamiento sugiere la existencia de dos mecanismos de entrada diferentes: los PCs de mayor tamaño entran principalmente por endocitosis, mientras que

¹⁶⁰ Ch. Wang, X. Gao, X. Su, *Talanta*, 80 (2010) 1228.

¹⁶¹ L. Lai, J.-Ch. Jin, Z.-Q. Xu, P. Mei, F.-L. Jiang, Y. Liu, *Chemosphere*, 135 (2015) 240.

¹⁶² T. Wang, X. Jiang, *Appl. Mater. Inter.*, 5 (2013) 1190.

los más pequeños lo hacen, en parte, por difusión pasiva. Cuando el ensayo se repite en DMEM (medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco) con un 10 % de suero fetal bovino (FBS), la entrada de los PCs pequeños se reduce y se observa acumulación en la membrana, lo que sugiere que alguno de los componentes del medio celular fueron adsorbido por las nanopartículas, cambiando las propiedades de su superficie y, consecuentemente, su mecanismo de entrada.

En un análisis cuantitativo, realizado utilizando espectroscopía de fluorescencia de correlación integrada con métodos de máxima entropía, se pone de manifiesto que PCs CdTe recubiertos con diferentes ligandos (NAC, MSA, TGA y MPA) se internalizan fácilmente en células humanas de cáncer de pulmón (A-427), distribuyéndose por el citoplasma, y que la cantidad absorbida no está influida tanto por la carga, como por el radio hidrodinámico de las nanopartículas.¹⁶³

Lovric y col.¹⁶⁴ propusieron una localización diferente, dependiente del tamaño, para PCs recubiertos de cisteamina en células microgliales murinas (N9). Los PCs de mayor tamaño, 5.2 nm, están distribuidos por el citoplasma, mientras que los de 2.2 nm se encuentran en el núcleo. Además, se observa que la localización de los PCs más pequeños incrementa su toxicidad. Esta localización dependiente del tamaño también se observó en células fagocíticas y epiteliales utilizando técnicas de análisis de alto contenido. Mediante la permeabilización parcial de las células antes de la adición de los PCs CdTe, es posible evitar los mecanismos endocitóticos y el reconocimiento específico de membrana, demostrándose una compartimentalización subcelular determinada por el tamaño. Además, esta compartimentalización es específica del tipo de células utilizadas.¹⁶⁵ Williams y col.¹⁶⁶ demostraron que los PCs con un diámetro de 2.1

¹⁶³ Ch. Dong, J. Irudayaraj, *J. Phys. Chem. B*, 116 (2012) 12125.

¹⁶⁴ J. Lovric, H. S. Bazzi, Y. Cuie, G. R. A. Fortin, F. M. Winnik, D. Maysinger, *J. Mol. Med.*, 83 (2005) 377.

¹⁶⁵ Y. Williams, J. Conroy, Y. Volkov, Biocompatibility and Cellular Localisation of CdTe quantum dots en *Cadmium Telluride Quantum Dots. Advances and Applications*, Ed. J. F. Donegan, Y. P. Rakovich, CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, FL (2013).

¹⁶⁶ Y. Williams, A. Sukhanova, M. Nowostawska, A. M. Davies, S. Mitchell, V. Oleinikov, Y. Gun'ko, I. Nabiev, D. Kelleher, Y. Volkov, *Small*, 5 (2009) 2581.

nm y 3.1 nm pueden entrar en el núcleo, localizándose los más pequeños en el nucleolo tanto en macrófagos como en células epiteliales, mientras que los de diámetro 3.1 nm solo pueden entrar en el nucleolo de los macrófagos. Los PCs de 3.4 nm entran más lentamente en ambas líneas celulares y se distribuyen en el citoplasma.

1.3.2 Estudios *in vivo* en pez cebra

Como se expuso previamente, un buen método para estudiar la toxicidad de los PCs es la utilización de ensayos *in vitro*, dado que se trata de métodos más simples y menos costosos que los ensayos *in vivo*. Desafortunadamente, los resultados obtenidos *in vitro* no son trasladables a los sistemas *in vivo*.

A pesar de que los ratones siguen siendo uno de los modelos *in vivo* más comúnmente utilizados, el pez cebra (*Danio rerio*) está emergiendo como un modelo prometedor para evaluar la nanotoxicidad de diferentes biomateriales.¹⁶⁷ Su uso se debe a su facilidad de manutención y alimentación de bajo coste, ciclo reproductivo rápido y elevado número de huevos por puesta, fecundación externa, lo que permite realizar ensayos a nivel embrionario. A esto se le suma que el embrión es transparente, facilitando el seguimiento de todos los estadios de desarrollo, que su desarrollo embrionario es rápido y está bien documentado, y que presenta un alto grado de homología con el genoma humano. Además, los embriones pueden metabolizar pequeñas moléculas disueltas en el medio acuoso donde se encuentran, lo que permite evaluar la toxicidad de compuestos solubles en el mismo.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰

Si bien existen algunos estudios con diferentes nanopartículas utilizando el pez cebra como modelo, pocos se centran en PCs CdTe.

¹⁶⁷ S.-K. Ko, X. Chen, J. Yoon, I. Shin, *Chem. Soc. Rev.*, 40 (2011) 2120.

¹⁶⁸ J. Duan, Y. Yu, Y. Li, Y. Yu, Y. Li, P. Huang, X. Zhou, S. Peng, Z. Sun, *J. Nanopart. Res.*, 15 (2013) 1700.

¹⁶⁹ K. Henn, T. Braunbeck, *Comp. Biochem. Phys.*, 153 (2010) 91.

¹⁷⁰ C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, T. F. Schilling, *Dev. Dynam.*, 203 (1995) 253.

Ensayos con PCs CdTe recubiertos de TGA¹⁷¹ y GSH¹⁶⁸ ponen de manifiesto que estos afectan a la mortalidad, disminuyen la tasa de eclosión y el ritmo cardíaco, inducen malformaciones embrionarias tales como edema pericardial, edema del saco vitelino y curvatura en la columna vertebral y afectan a la actividad locomotora y a los patrones vasculares del embrión. Además, se observa que el responsable de la toxicidad no parece ser solamente el cadmio liberado y que los PCs, acumulados en la región intestinal, fueron principalmente los responsables de las malformaciones del saco vitelino y de la bradicardia.

Zhang y col.¹⁷² estudiaron la presencia conjunta de PCs TGA-CdTe y Cu(II) ya que con tiempos largos de exposición, debido a la fuerte atracción electrostática, el Cu(II) puede adsorberse en la superficie de los PCs. En este estudio se observó que los PCs facilitan la acumulación de Cu(II) en los peces cebra, y que al igual que se describió anteriormente, se produce un aumento de la mortalidad, disminución de la tasa de eclosión, la aparición de malformaciones y una alteración de los patrones vasculares. En resumen, se concluyó que los efectos sinérgicos juegan un papel importante durante la exposición conjunta.

¹⁷¹ W. Zhang, K. Lin, Y. Miao, Q. Dong, Ch. Huang, H. Wang, M. Guo, X. Cui, *J. Hazard. Mater.*, 213 (2012) 413.

¹⁷² W. Zhang, Y. Miao, K. Lin, L. Chen, Q. Dong, Ch. Huang, *Environ. Pollut.*, 176 (2013) 158.



Capítulo 2

Objetivos y plan de trabajo



Los objetivos del presente trabajo se centraron en:

- I. La síntesis de puntos cuánticos acuosolubles y el estudio de su eficacia como posibles sensores de iones metálicos en disolución acuosa.
- II. El estudio de la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de los PCs preparados.

De acuerdo con estos objetivos, la planificación experimental fue la siguiente:

1. Preparación de PCs CdTe acuosolubles utilizando como ligandos estabilizantes el ácido tioglicólico (TGA), el ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) y el ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS) y posterior recubrimiento de los mismo con corazas ZnS o CdS. Los ligandos DMSA y DMPS fueron elegidos por razones de composición química e interés toxicológico. Dado que una de las principales preocupaciones que suscita el uso de los PCs en los medios biológicos es su potencial toxicidad derivada de un ocasional desprendimiento de los metales tóxicos que, como el Cd(II) en este caso, forman parte de su núcleo, un recubrimiento con DMSA y DMPS, que son antídotos acreditados en el tratamiento de las intoxicaciones por metales pesados, constituye un valor añadido a su función estabilizadora.
2. Caracterización física y fisicoquímica de los PCs preparados, empleando las técnicas habituales; atendiendo particularmente a su comportamiento óptico, en particular, a su fluorescencia.
3. Análisis de la modificación que sufre su emisión fluorescente en presencia de diversos iones metálicos monocargados y dicargados que serán seleccionados atendiendo a su interés químico y bioquímico, así como a la existencia de información previa sobre su interacción con otros PCs.
4. Estudio de la toxicidad *in vitro* de las nuevas nanopartículas, mediante ensayos de viabilidad celular empleando células HeLa (línea recientemente utilizada para estudiar los mecanismos de internalización

celular de PCs CdTe) y células renales LLC-PK1 (por ser el riñón el órgano diana de muchos metales tóxicos)

5. Estudio, mediante microscopía confocal, de la internalización y distribución celular de los PCs preparados.
6. Estudio de la toxicidad *in vivo* de alguno de los PCs, utilizando como modelo el pez cebra (modelo emergente en estudios de nanotoxicidad en diversos biomateriales).





Capítulo 3

*Síntesis y caracterización de
puntos cuánticos CdTe*



3.1 Reactivos y disolventes

Reactivos

Ácido 2,3- dimercaptosuccínico (DMSA, Alfa-Aesar)

Ácido tioglicólico (TGA, 99 %, Sigma-Aldrich)

Borohidruro sódico (NaBH_4 , 98.5 %, Sigma-Aldrich)

Cloruro de cadmio (CdCl_2 , 99 %, Aldrich)

Cloruro de cadmio hidratado ($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$, 99 %, Sigma-Aldrich)

Cloruro de zinc (ZnCl_2 , VWR Prolabo)

Hydrogenoteluro sódico (NaHTe , sintetizado*)

Hidróxido sódico (NaOH , VWR Prolabo)

Rodamina B (5.5 g/L etilenglicol, Kit validación VDK-840, Jasco)

Rodamina 6G (Sigma-Aldrich)

Sal sódica del ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico monohidratado (DMPS, 95 %, Sigma-Aldrich)

Sulfuro sódico (Na_2S , Aldrich)

Teluro en polvo (Te , -60 mesh, 99.999 %, Alfa Aesar)

* Síntesis NaHTe(ac)

Las disoluciones acuosas del precursor de telurio empleadas en la síntesis de los PCs se prepararon por reacción en agua (0.3-0.4 mL), bajo atmósfera de argón, de borohidruro sódico y telurio en polvo, en relación molar 5:1. La mezcla se calentó ligeramente (40-50 °C) hasta que se observó la formación de un precipitado blanco y la completa desaparición del Te(0) . Sobre ésta suspensión

se añadió 1 mL de agua y la disolución obtenida se inyectó rápidamente al balón de reacción de la síntesis del punto cuántico.

Disolventes

Agua Milli-Q (desoxigenada mediante calentamiento a reflujo durante dos horas bajo atmósfera de argón)

2-Propanol (Scharlau)

Etanol (Scharlau)

3.2 Técnicas experimentales

Espectroscopía vibracional

Los espectros de infrarrojo con reflexión total atenuada (IR-ATR) se registraron en un espectrofotómetro VARIAN 670 perteneciente a la Unidad de Espectroscopía Vibracional de la RIAIDT de la Universidad de Santiago de Compostela.

Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)

Las medidas de absorbancia se realizaron utilizando un espectrómetro Jasco V-630 y cubetas de cuarzo de 10 mm.

Espectroscopía de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia se realizaron utilizando un espectrofluorímetro Jasco FP-8300. La longitud de onda de excitación fue 365 nm, con un ancho de banda de 5 nm para la excitación (no polarizada) y la emisión (no polarizada).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los estudios de TEM se realizaron con un microscopio electrónico de transmisión Phillips CM-12 a 120 kV o Zeiss Libra 200 FE Omega con EDX, ambos de la Unidad de Microscopía Confocal y Electrónica de la RIAIDT de la Universidad de Santiago de Compostela. Las muestras se prepararon depositando una gota de una disolución acuosa de la nanopartícula sobre rejillas de carbono y posterior evaporación.

Difracción de rayos X de polvo (DRX)

Las medidas de difracción de rayos X de polvo se llevaron a cabo utilizando un difractómetro PaNalytical-EMPYREAM (radiación Cu K α 1, λ = 1.5406 Å) de la Unidad de Rayos X de la RIAIDT de la Universidad de Santiago de Compostela.

Espectroscopía de fluorescencia de rayos X (FRX)

Para la identificación de Cd, Zn y Te se utilizó un espectrómetro de fluorescencia de Rayos X de ánodo de molibdeno, y para identificar la presencia de S un espectrómetro con ánodo secundario de pirografito y hierro, ambos pertenecientes a la Unidad de Difracción de Rayos X de la RIAIDT de la Universidad de Santiago de Compostela.

Determinación del rendimiento cuántico (ϕ_x)

El rendimiento cuántico (ϕ_x) de los PCs fue determinado según un método previamente descrito.¹ Como referencia estándar se empleó rodamina 6G. Se prepararon disoluciones de la referencia (en etanol) y de los PCs (en agua) con absorbancias comprendidas entre 0.1 y 0.05 a la longitud de onda de excitación (460 nm). Se midieron los espectros de absorción y de fluorescencia de estas disoluciones y se calculó el rendimiento cuántico (ϕ_x) empleando la expresión:

$$\phi_x = \phi_{st} \frac{F_x A_{st} n_x^2}{F_{st} A_x n_{st}^2}$$

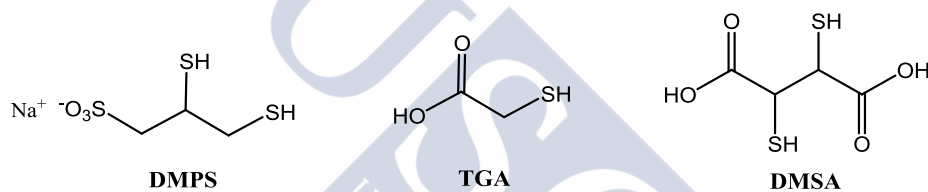
¹ J. W. Liu, Y. Zhang, C. W. Ge, Y. L. Jin, S. L. Hu, N. Gu, *Chin. Chem. Lett.*, 20 (2009) 977.

donde ϕ_{st} es el rendimiento cuántico del estándar (rodamina 6G en etanol, 95 %), F_x y F_{st} son las áreas bajo las curvas de emisión (previamente corregidas) para la muestra y el estándar, A_x y A_{st} son las absorbancias para la muestra y el estándar a la longitud de onda de excitación (460 nm) y n_x y n_{st} son los índices de refracción de los disolventes.



3.3 Síntesis de puntos cuánticos CdTe

La síntesis de los diferentes puntos cuánticos (PCs) se llevó a cabo directamente en agua utilizando NaHTe y CdCl₂ como precursores, y como estabilizantes (Esquema 1) la sal sódica del ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS), el ácido tioglicólico (TGA) o una mezclas de ellos, tomando como referencia procedimientos experimentales previamente descritos con algunas modificaciones.²⁻⁴ Estos PCs fueron, en ocasiones, recubiertos con una coraza ZnS o CdS, utilizando disoluciones de CdCl₂ o ZnCl₂ y DMPS o el ácido *meso*- 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA, Esquema 1).^{3,5}



Esquema 1. Ligandos estabilizantes empleados en la síntesis de los PCs.

Se describen en primer lugar las condiciones de síntesis (relaciones molares, orden de adición de reactivos, pH, etc) que permitieron el aislamiento de los diferentes PCs CdTe, CdTe/ZnS y CdTe/CdS. Se incluye, además, el valor del rendimiento cuántico de las nanopartículas formadas en cada caso, ya que éste fue el criterio utilizado para seleccionar las mejores condiciones de síntesis. Una vez descritas las condiciones experimentales de la preparación, se describe el seguimiento de estas reacciones mediante espectroscopía UV-Vis y de fluorescencia.

² X. Fan, S. Liu, Y. He, *Colloid. Surface. B*, 88 (2011) 23.

³ Y. Liu, J. Yu, *J. Colloid. Interf. Sci.*, 351 (2010) 1.

⁴ J. Tian, R. Liu, Y. Zhan, G. Zu, S. Zhao, *J. Colloid. Interf. Sci.*, 336 (2009) 504.

⁵ L. Qin, W. Ma, D. Li, Y. Li, X. Chen, H. Kraatz, T. D. James, Y. Long, *Chem. Eur. J.*, 17 (2011) 5262.

3.3.1 Condiciones de síntesis de PCs CdTe

3.3.1.1 Puntos cuánticos DMPS-CdTe (PC1)

Para llevar a cabo la síntesis de estos PCs se ensayaron las relaciones molares $\text{Cd}^{2+}:\text{DMPS}:\text{Te}^{2-}$ recogidas en la Tabla 1, si bien solamente se obtuvieron resultados favorables cuando se empleó la relación 1:0.5:0.2. Esta síntesis se describe en detalle seguidamente, incluyendo, además, las condiciones óptimas de pH y dilución.

Tabla 1. Relaciones molares ensayadas para la síntesis de PC1 y rendimiento cuántico obtenido.

Cd^{2+}	DMPS	Te^{2-}	Rendimiento cuántico (%)
1	1.3	0.5	-
1	1	0.5	-
1	1	0.2	-
1	0.75	0.2	-
1	0.65	1.5	-
1	0.65	1	-
1	0.65	0.9	-
1	0.65	0.8	-
1	0.65	0.6	-
1	0.65	0.5	-
1	0.65	0.4	-
1	0.65	0.3	-
1	0.5	0.4	-
1	0.5	0.2	2-10

En un balón de tres bocas se disolvieron 119 mg (0.64 mmoles) de $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$ en 75 mL de agua Milli-Q previamente desoxigenada. Sobre esta disolución se añadieron 74 mg (0.325 mmoles) de DMPS y se ajustó el pH entre 9-11 por adición de NaOH 1 M. La disolución resultante se agitó durante 30 min bajo atmósfera de N_2 y seguidamente se le inyectó la disolución acuosa de NaHTe previamente preparada. Esta mezcla se calentó a reflujo y se mantuvo agitando hasta que los PCs adquirieron el tamaño deseado (teniendo en cuenta

los espectros de absorción⁶ y emisión). A continuación se dejó enfriar hasta 50 °C y se redujo el volumen a un tercio en el rotavapor. Finalmente, los PCs se precipitaron con propanol y se centrifugaron durante 10 min a 4000 rpm para eliminar el sobrenadante. El sólido aislado se lavó tres veces redisolviéndolo parcialmente en una mezcla agua:propanol 1:5 y precipitándolo con propanol. El sólido obtenido se secó a vacío.

3.3.1.2 Puntos cuánticos TGA·DMPS-CdTe (PC2)

Teniendo en cuenta las relaciones molares $\text{Cd}^{2+}:\text{DMPS}:\text{Te}^{2-}$ que condujeron a la formación de PC1, y tratando de obtener nanopartículas con mejores propiedades ópticas, se prepararon PCs CdTe mixtos estabilizados por una mezcla de los ligandos TGA y DMPS.

Las relaciones molares utilizadas para llevar a cabo la síntesis de estos PCs se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Relaciones molares ensayadas para la síntesis de PC2 y rendimiento cuántico obtenido.

Cd^{2+}	DMPS	TGA	Te^{2-}	Rendimiento cuántico (%)
1	0.3*	0.6*	0.23	5-30
1	0.3	0.6*	0.23	5-55
1	0.3	0.6*	0.19	20-35
1	0.4*	0.2	0.23	15-20
1	0.4	0.2*	0.23	15-20
1	0.4	0.2*	0.19	15-20
1	0.4*	0.1	0.23	5
1	0.4	0.1*	0.23	10
1	0.4	0.1*	0.15	1

*Ligando añadido en primer lugar sobre la disolución de $\text{Cd}^{2+}(\text{ac})$.

En todas las relaciones molares ensayadas se aislaron nanopartículas fluorescentes, si bien en algunos casos se obtuvieron rangos muy amplios para el rendimiento cuántico de los PCs formados en condiciones de síntesis análogas

⁶ W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, *Chem. Mater.*, 15 (2003) 2854.

(mismas relaciones molares). Los resultados más reproducibles corresponden a las síntesis resaltadas en la Tabla 2. Todas se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento, modificando en algunos casos el orden de adición de los ligandos, por lo que solo se describirá detalladamente la síntesis para la relación molar $\text{Cd}^{2+}:\text{DMPS}:\text{TGA}:\text{Te}^{2-}$ 1:0.3:0.6:0.19.

En un balón de tres bocas, bajo atmósfera de N_2 , se disolvieron 148 mg (0.65 mmoles) de CdCl_2 en 75 mL de agua Milli-Q previamente desoxigenada. Sobre esta disolución se añadieron 28.8 μL (0.39 mmoles) de TGA y se ajustó el pH a 11 por adición de NaOH 1M. A continuación se añadieron 44.5 mg (0.195 mmoles) de DMPS y se ajustó de nuevo el pH a 11. La disolución resultante se agitó durante 30 min antes de inyectar la disolución de NaHTe previamente preparada. La mezcla obtenida se calentó a reflujo y se mantuvo en agitación. Cuando los PCs adquirieron el tamaño deseado se dejó enfriar a 50 °C y se redujo el volumen a un tercio en el rotavapor. Finalmente, los PCs se precipitaron con propanol y se centrifugaron durante 10 min a 4000 rpm para eliminar el sobrenadante. El sólido aislado se redisolvió en agua y se volvió a precipitar con propanol, repitiéndose este proceso de purificación hasta tres veces.

3.3.2 Condiciones de síntesis de PCs núcleo/coraza CdTe/ZnS

Una vez preparados los PCs CdTe (PC1 y PC2) se procedió a su recubrimiento mediante la formación de una coraza ZnS empleando disoluciones acuosas de DMPS-ZnCl_2 o DMSA-ZnCl_2 .

Todos los intentos por preparar PCs núcleo/coraza CdTe/ZnS a partir de los PCs DMPS-CdTe y $\text{TGA}\cdot\text{DMPS-CdTe}$ empleando DMPS-ZnCl_2 para formar la coraza, resultaron infructuosos. En todos los casos, tras la adición del complejo DMPS-ZnCl_2 se observó la formación de un precipitado blanco muy insoluble y la pérdida de la fluorescencia de los núcleos previamente formados. Sin embargo, la aparición de este precipitado se evitó cuando se partió de núcleos TGA-CdTe , pudiendo aislarse así PCs núcleo/coraza TGA-CdTe/DMPS-ZnS con buenas propiedades ópticas.

Cuando se trató de introducir la coraza empleando DMSA-ZnCl₂, los mejores resultados se obtuvieron a partir de núcleos TGA-CdTe y TGA-DMPS-CdTe. El recubrimiento del núcleo DMPS-CdTe dio lugar a nanopartículas (cuyo IR-ATR se incluye en la Figura 19b a efectos comparativos) con propiedades ópticas muy pobres, razón por la que su síntesis no se describe en esta Memoria.

3.3.2.1 Puntos cuánticos TGA-CdTe/DMPS-ZnS (PC3)

En primer lugar se llevó a cabo la síntesis del núcleo CdTe³ utilizando como ligando estabilizante el TGA y una relación molar Cd²⁺:TGA:Te²⁻ de 1:1.5:0.25. A continuación se procedió, sin previo aislamiento, a su recubrimiento con un coraza ZnS utilizando como ligando DMPS y una relación molar Cd²⁺_{núcleo}:Zn²⁺:DMPS que inicialmente fue de 1:2.5:2.5.

Para ello, en un balón de tres bocas, bajo atmósfera de N₂, se disolvieron 91.3 mg (0.4 mmoles) de CdCl₂ en 100 mL de agua Milli-Q. A esta disolución se le añadieron 44 µL (0.6 mmoles) de TGA y se ajustó el pH a 11 por adición, gota a gota, de una disolución de NaOH 0.5 M. La mezcla resultante se mantuvo en agitación 30 min, tras los cuales se le añadió la disolución de NaHTe previamente preparada. A continuación se calentó a reflujo y una vez obtenidos los PCs del tamaño deseado se le añadió una disolución DMPS-ZnCl₂ a pH 9, preparada disolviendo 136.4 mg (1 mmol) de ZnCl₂ y 228 mg (1 mmol) de DMPS en 15 mL de agua Milli-Q. La mezcla se mantuvo a reflujo, y cuando los PCs alcanzaron un tamaño adecuado se enfrió a 50 °C y se redujo el volumen a un tercio en el rotavapor. Finalmente, los PCs se precipitaron con propanol y se centrifugaron durante 10 min a 4000 rpm para eliminar el sobrenadante. El sólido aislado se redisolvió en agua y se volvió a precipitar con propanol tres veces, obteniéndose nanopartículas con un rendimiento cuántico comprendido entre un 10 y un 20 %.

Se repitió el mismo procedimiento utilizando una relación molar Cd²⁺_{núcleo}:Zn²⁺:DMPS de 1:2.5:5 en la formación de la coraza, observándose una disminución en la fluorescencia.

3.3.2.2 Puntos cuánticos TGA-CdTe/DMSA-ZnS (PC4)

Esta síntesis se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior pero empleando el ligando DMSA en la formación de la coraza. Las relaciones molares $Cd^{2+}_{núcleo}:Zn^{2+}:DMSA$ utilizadas en la formación de dicha coraza se recogen en la Tabla 3, así como los rendimientos cuánticos de los PCs formados.

Tabla 3. Relaciones molares ensayadas para la formación de la coraza en PC4 y rendimiento cuántico obtenido.

Cd^{2+}	Zn^{2+}	DMSA	Rendimiento cuántico (%)
1	2	1.5	23
1	2.5	2.5	10
1	2.5	6.25	-

3.3.2.3 Puntos cuánticos TGA·DMPS-CdTe/DMSA-ZnS (PC5)

En primer lugar se sintetizó el núcleo TGA·DMPS-CdTe siguiendo el protocolo anteriormente descrito, empleando relaciones molares $Cd^{2+}:DMPS:TGA:Te^{2-}$ 1:0.4:0.2:0.23 y 1:0.3:0.6:0.19. A continuación se procedió, sin aislar el núcleo, a su recubrimiento con una coraza ZnS utilizando como ligando DMSA. Inicialmente se utilizó una relación molar $Cd^{2+}_{núcleo}:Zn^{2+}:DMSA$ de 1:2.5:2.5. Con ambas relaciones molares para la síntesis del núcleo, tras la adición de la coraza se produjo la precipitación de un sólido negro, por lo que se redujo la cantidad de DMSA, utilizando una relación molar $Cd^{2+}_{núcleo}:Zn^{2+}:DMSA$ de 1:2.5:1.875 en la formación de la coraza y manteniendo las relaciones empleadas en la formación del núcleo. Solamente empleando el núcleo cuya relación molar $Cd^{2+}:DMPS:TGA:Te^{2-}$ fue 1:0.3:0.6:0.19 se obtuvieron resultados positivos. En este caso se logró duplicar la fluorescencia, alcanzando estos PCs un rendimiento cuántico comprendido entre un 40 y un 45 %. Los detalles de la formación de la coraza se describen seguidamente.

Una vez formado el núcleo, se le añadió lentamente una mezcla DMSA-ZnCl₂ (pH 9), preparada por disolución de 221.4 mg (1.625 mmoles) de ZnCl₂ y

221.8 mg (1.22 mmoles) de DMSA en 20 mL de agua Milli-Q. Se mantuvo el calentamiento a reflujo y cuando los PCs alcanzaron el tamaño adecuado se enfrió a 50 °C y se redujo el volumen en el rotavapor. Finalmente, los PCs se precipitaron con propanol y se centrifugaron durante 10 min a 4000 rpm para eliminar el sobrenadante. El sólido aislado se purificó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

3.3.3 Condiciones de síntesis de PCs núcleo/coraza CdTe/CdS

Ante la imposibilidad de introducir la coraza ZnS empleando DMPS-ZnCl₂ sobre núcleos que contenían el ligando DMPS, se prepararon PCs núcleo/coraza CdTe/CdS. La formación de la coraza sobre los núcleos TGA·DMPS-CdTe, empleando DMPS-CdCl₂ y Na₂S, permitió aislar PCs con muy buenas propiedades ópticas.

3.3.3.1 Puntos cuánticos TGA·DMPS-CdTe/DMPS-CdS (PC6)

Al igual que en el caso anterior en primer lugar se prepararon los núcleos TGA·DMPS-CdTe, comenzando con la relación molar Cd²⁺:DMPS:TGA:Te²⁻ de 1:0.3:0.6:0.19. A continuación se procedió, sin previo aislamiento, a su recubrimiento con una coraza CdS utilizando como ligando el DMPS. Para ello se añadieron, lentamente y de forma simultánea, las disoluciones de DMPS-CdCl₂ y de Na₂S. Las relaciones molares utilizadas se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Relaciones molares ensayadas para la formación de la coraza en PC6 (núcleo Cd²⁺_{núcleo}:DMPS:TGA:Te²⁻ 1:0.3:0.6:0.19) y rendimiento cuántico obtenido.

Cd ²⁺ núcleo	Cd ²⁺ coraza	DMPS	Na ₂ S	Rendimiento cuántico (%)
1	2.5	1.875	-	20*
1	2.5	1.875	0.25	42 [†]
1	1.5	0.75	0.75	40-45
1	0.75	0.375	0.375	35-40
1	0.75	0.375	0.75	14*

* No se observó mejora respecto del núcleo.

[†] Muestra muy impurificada debido al exceso de complejo DMPS-Cd²⁺.

Los mejores resultados se obtuvieron para las relaciones resaltadas en la Tabla 4. Dado que siempre se utilizó el mismo procedimiento experimental, se describirá detalladamente la síntesis con una relación de moles $\text{Cd}^{2+}_{\text{núcleo}}:\text{Cd}^{2+}:\text{DMPS}:\text{S}^{2-}$ de 1:1.5:0.75:0.75.

Una vez formado el núcleo y sobre éste a reflujo se añadieron, gota a gota, una disolución de DMPS- CdCl_2 a pH 9 preparada disolviendo 223 mg (0.975 mmoles) de CdCl_2 y 111.3 mg (0.4875 mmoles) de DMPS en 10 mL de agua Milli-Q, y una disolución de Na_2S preparada por disolución de 36.9 mg (0.4875 mmoles) de Na_2S en 2 mL de agua Milli-Q. La mezcla se mantuvo a reflujo y agitando hasta que los PCs alcanzaron un tamaño deseado. A continuación se dejó enfriar a temperatura ambiente y se concentró la disolución en el rotavapor. Finalmente, los PCs se aislaron y purificaron siguiendo el procedimiento ya descrito anteriormente.

Los detalles experimentales para la síntesis partiendo del núcleo preparado con relaciones molares $\text{Cd}^{2+}:\text{DMPS}:\text{TGA}:\text{Te}^{2-}$ de 1:0.4:0.2:0.19 se recogen en la Tabla 5. El procedimiento seguido fue básicamente el indicado anteriormente con ligeras modificaciones indicadas al pie de la tabla.

Tabla 5. Relaciones molares ensayadas para la formación de la coraza en PC6 (núcleo $\text{Cd}^{2+}_{\text{núcleo}}:\text{DMPS}:\text{TGA}:\text{Te}^{2-}$ 1:0.4:0.2:0.19) y rendimiento cuántico obtenido.

	Cd^{+2} núcleo	Cd^{+2} coraza	DMPS	Na_2S	Rendimiento cuántico (%)
	1	1.5	0.75	-	*
	1	1.5	0.75	0.75	*
	1	1.5	0.75	0.375	17-31
(a)	1	1.5	0.75	0.1125	45
(b)	1	0.75	0.375	0.375	36
(c)	1	0.75	0.375	0.04	40

* No se observó mejora respecto del núcleo.

(a) Se añade en primer lugar el complejo y seguidamente la disolución del Na_2S .

(b) Adición a 80 °C.

(c) Adición muy lenta.

3.3.4 Seguimiento de las reacciones de síntesis de PCs CdTe, CdTe/ZnS y CdTe/CdS

Todas las reacciones fueron monitorizadas mediante espectroscopía de absorción y de fluorescencia. En las Figuras 1 a 4 se muestra el seguimiento de las reacciones de síntesis de PC1 (Figuras 1a y 2) y PC2 (Figuras 1b, 3 y 4).

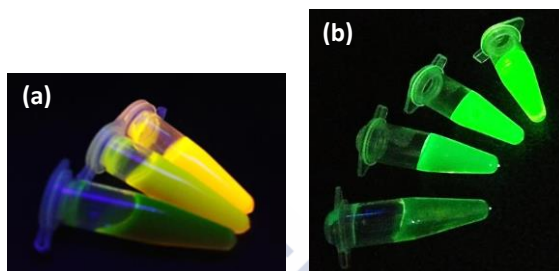


Figura 1. Alícuotas del seguimiento de la síntesis de PC1 (a) y PC2 (b) bajo radiación UV.

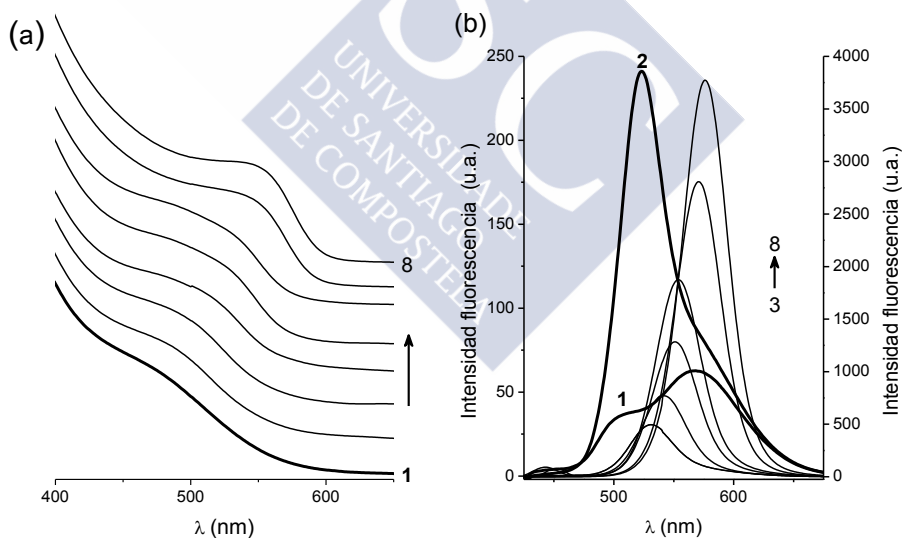


Figura 2. Espectros UV-Vis (a) y de fluorescencia (curvas 1 y 2, escala izquierda) (b) del seguimiento de la síntesis de PC1 [1 ($t = 0$), 2 (5 min), 3 (10 min), 4 (20 min), 5 (30 min), 6 (35 min), 7 (1½ h), 8 (2 h)].

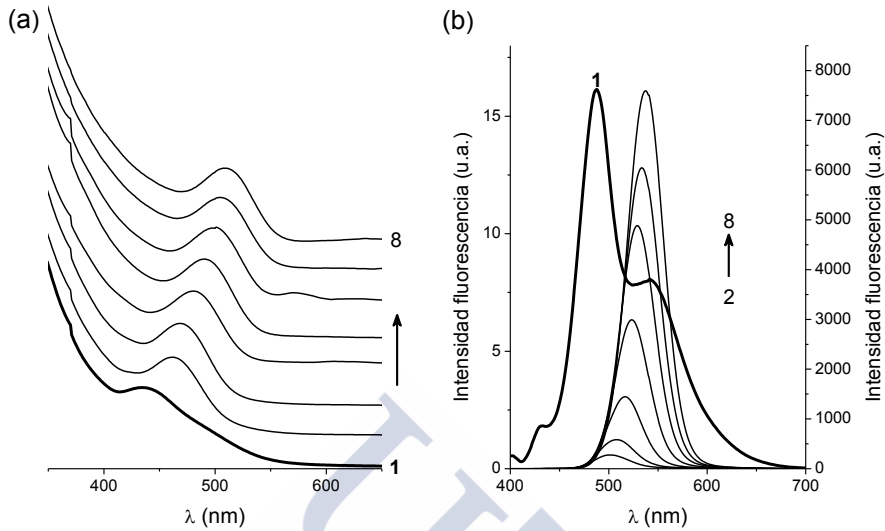


Figura 3. Espectros UV-Vis (a) y de fluorescencia (curva 1, escala izquierda) (b) del seguimiento de la síntesis de PC2 (Cd^{2+} :DMPS:TGA 1:0.3:0.6) [1 ($t = 0$), 2 (5 min), 3 (10 min), 4 (30 min), 5 (1 h), 6 (1 h 36 min), 7 (2 h 20 min), 8 (3 h)].

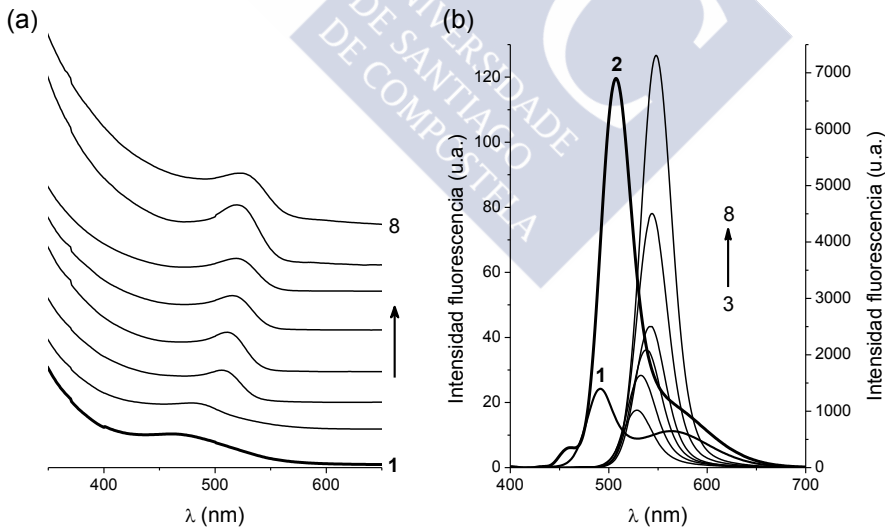


Figura 4. Espectros UV-Vis (a) y de fluorescencia (curvas 1 y 2, escala izquierda) (b) del seguimiento de la síntesis de PC2 (Cd^{2+} :DMPS:TGA 1:0.4:0.2) [1 ($t = 0$), 2 (2 min), 3 (10 min), 4 (20 min), 5 (50 min), 6 (1 h 20 min), 7 (1 h 45 min), 8 (2 h 40 min)].

En los espectros de emisión de ambos PCs (Figuras 2b, 3b y 4b) a tiempo cero ($t = 0$, comienzo del reflujó de las disoluciones que contienen los precursores de Cd y Te y los correspondientes ligandos) se observa el solapamiento de dos bandas. La banda a menor longitud de onda corresponde a la emisión de la banda prohibida y la existente a longitudes de onda mayores podría ser atribuida a la emisión desde estados trampa (estados de superficie, estados que se encuentran en la banda prohibida de energía y que se deben a imperfecciones existentes en los nanocristales sintetizados, causadas principalmente por la gran relación superficie/volumen inicial).

A medida que transcurre el tiempo, la banda situada a longitudes de onda menores se desplaza hacia el rojo debido al crecimiento de las nanopartículas y se produce la desaparición de la banda correspondiente a los efectos de superficie. Así mismo, en los espectros de absorción (Figuras 2a, 3a y 4a) también se produce un desplazamiento de la banda correspondiente al primer pico de absorción.⁷

Ni el tamaño de las nanopartículas ni el tiempo de reflujó es el mismo, pero centrándonos en lo que ocurre en la síntesis hasta que todos los PCs alcanzan una longitud de onda de emisión de 540 nm (longitud de onda de emisión de los PCs más pequeños), se puede afirmar que la velocidad de crecimiento es mayor para los PCs que solo poseen DMPS y a medida que aumenta la cantidad de TGA esta velocidad va disminuyendo. Por otra parte, cuando hay TGA, un ligando que provoca menor impedimento estérico que el DMPS, es probable que exista una mayor densidad de ligandos en torno a la superficie y por tanto, una mejor pasivación, mostrando estos PCs un mayor rendimiento cuántico.⁸

⁷ A. Veamatahau, B. Jiang, T. Seifert, S. Makuta, K. Latham, M. Kanehara, T. Teranishi, Y. Tachibana, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 17 (2015) 2850.

⁸ F. O. Silva, M. S. Carvalho, R. Mendóça, W. A. A. Macedo, K. Balzuweit, P. Reiss, M. A. Sciavon, *Nanoscale Res. Lett.*, 7 (2012) 536.

Para preparar PC3 y PC4 los núcleos TGA-CdTe fueron recubiertos con una coraza ZnS empleando los ligandos DMPS y DMSA, respectivamente. En las Figuras 5 a 7 se representa la evolución de estos PCs durante la síntesis. Las curvas 1 (Figuras 6 y 7) corresponden a los espectros del PC sin coraza y las siguientes al seguimiento de la formación de la coraza a diferentes tiempos de reflujo. Aunque en el inicio de la formación de la coraza se produce una disminución de la fluorescencia, posteriormente dicha fluorescencia no sólo se recupera sino que aumenta progresivamente, al mismo tiempo que se produce un desplazamiento, tanto de la banda de emisión como del primer pico de la banda de absorción. Tras un tiempo de reflujo se inicia una disminución de la fluorescencia, por lo que se detiene la reacción. Esto puede atribuirse a que a largos tiempos de reflujo aumenta el grosor de la coraza y se generan tensiones debido a los diferentes parámetros de red de CdTe y ZnS⁹, y a que se producen equilibrios de adsorción-desorción asociados con el fenómeno de maduración de Ostwald que dan lugar a una pasivación incompleta de la superficie del PC.⁸

En los PCs en los que se utilizó DMSA como estabilizante se produjo un mayor desplazamiento de la banda de fluorescencia en un tiempo menor. Esto podría deberse a una mayor descomposición térmica del DMSA, lo que daría lugar a la producción de una mayor cantidad de sulfuro, y a la formación más rápida de la coraza.

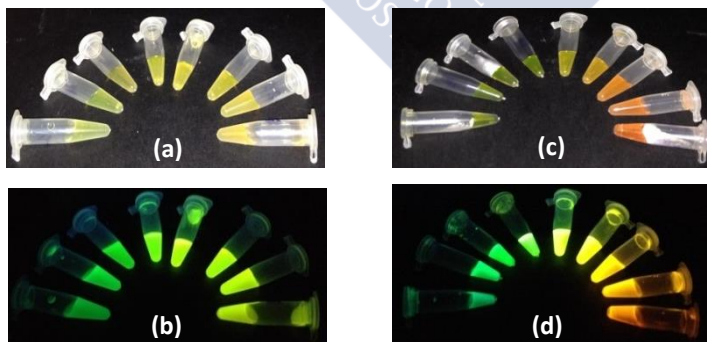


Figura 5. Alícuotas del seguimiento de la síntesis de PC3 (a, b) y PC4 (c, d) bajo luz natural y radiación UV.

⁹ Z. Yuan, P. Yang, Mater. Res. Bull., 48 (2013) 2640.

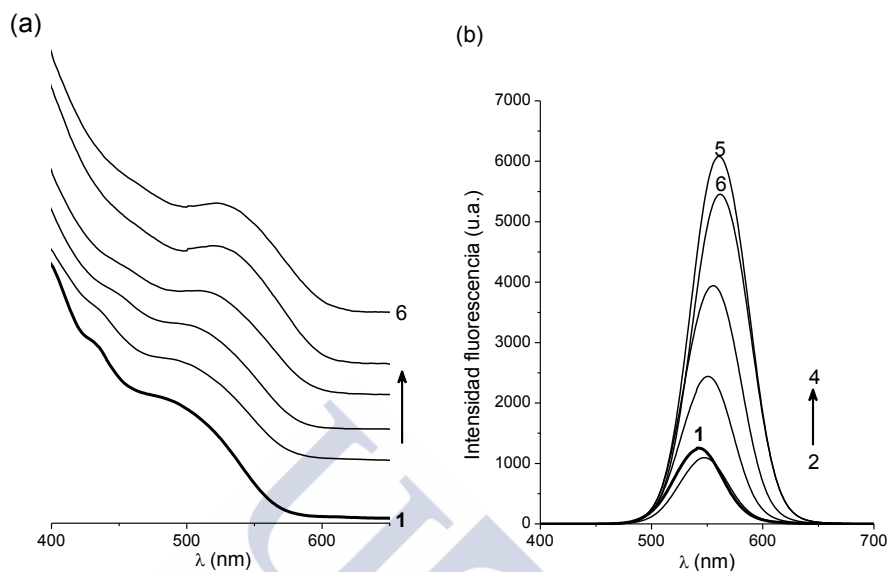


Figura 6. Espectros UV-Vis (a) y de fluorescencia (b) del seguimiento de la reacción de formación de la coraza en PC3 [1 (núcleo TGA-CdTe), 2 ($t = 0$), 3 (20 min), 4 (1 h 50 min), 5 (4 h 25 min), 6 (4 h 55 min)].

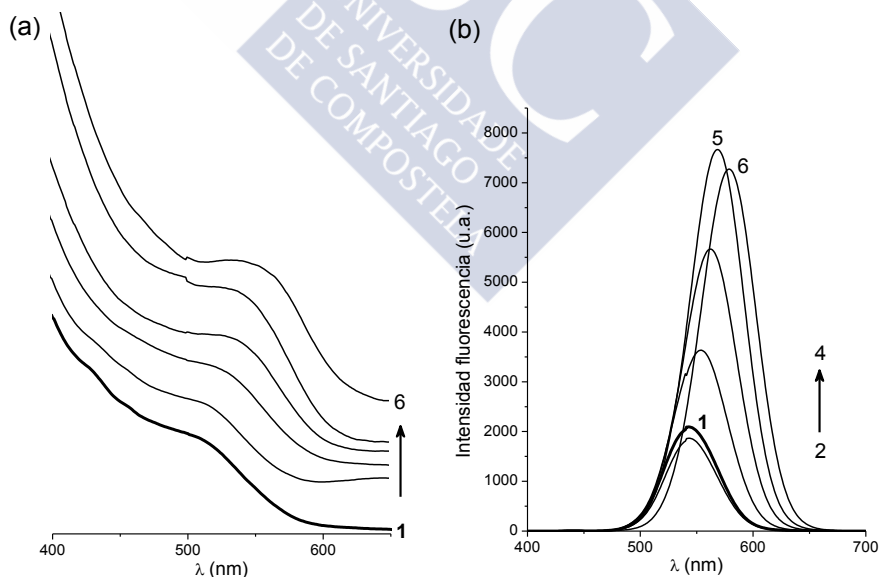


Figura 7. Espectros UV-Vis (a) y de fluorescencia (b) del seguimiento de la reacción de formación de la coraza en PC4 [1 (núcleo TGA-CdTe), 2 ($t = 0$), 3 (20 min), 4 (45 min), 5 (1 h 5 min), 6 (1 h 50 min)].

El recubrimiento de los núcleos TGA·DMPS-CdTe empleando DMSA-ZnCl₂ o DMPS-CdCl₂-Na₂S permitió aislar los PCs núcleo/coraza PC5 y PC6. Destacar que en el caso de PC6, cuando se utilizan núcleos con una proporción mayor de DMPS, se necesita una menor cantidad de Na₂S (ver Tabla 4 y 5) y la formación de la coraza es más rápida, lo que puede ser debido a que el grado de descomposición térmica del DMPS es mayor que el del TGA.

Los espectros UV-VIS y de fluorescencia obtenidos en el seguimiento de la formación de la coraza de estos dos PCs, así como algunas imágenes de estos, se muestran en las Figuras 8 a 13.



Figura 8. Alícuotas del seguimiento de la reacción de PC5 bajo luz natural (a) y radiación UV (b).

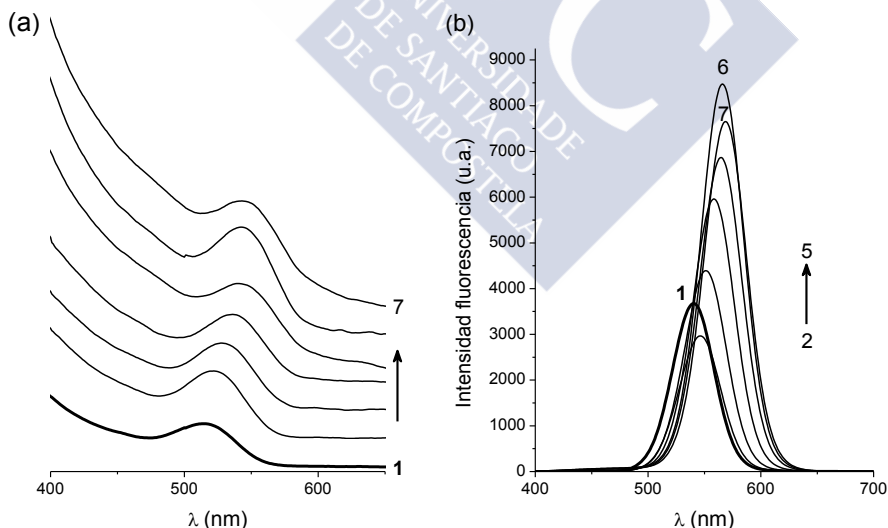


Figura 9. Espectros UV-Vis (a) y de fluorescencia (b) del seguimiento de la reacción de formación de la coraza en PC5 [1 (núcleo TGA·DMPS-CdTe), 2 (t = 0), 3 (5 min), 4 (20 min), 5 (40 min), 6 (1 h 9 min), 7 (1 h 25 min)].

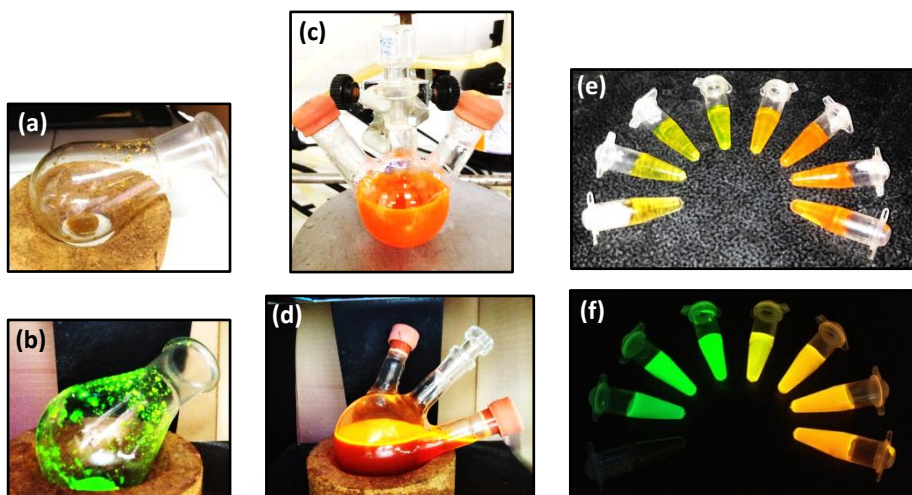


Figura 10. PC6: núcleo con luz natural (a) y bajo radiación UV (b), coraza con luz natural (c) y bajo radiación UV (d), alícuotas del seguimiento de la reacción con luz natural (e) y bajo radiación UV (f).

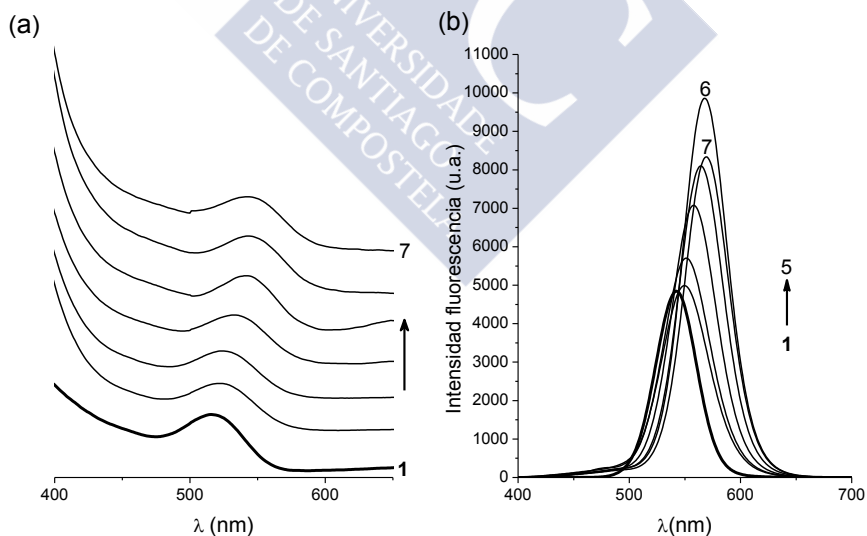


Figura 11. Espectros UV-Vis (a) y de fluorescencia (b) del seguimiento de la reacción de la formación de la coraza en PC6 [1 (núcleo TGA·DMPS·CdTe; Cd²⁺:DMPS:TGA 1:0.3:0.6), 2 (3 min), 3 (10 min), 4 (40 min), 5 (1h 20 min), 6 (1h 50 min), 7 (2h)].

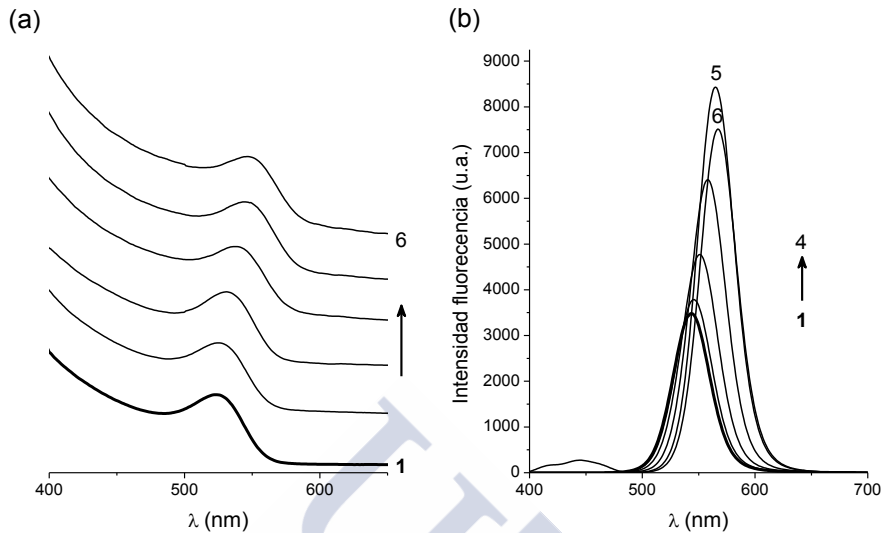


Figura 12. Espectros UV-Vis (a) y de fluorescencia (b) del seguimiento de la reacción de la formación de la coraza en PC6 [1 (núcleo TGA·DMPS·CdTe; Cd²⁺:DMPS:TGA 1:0.4:0,2), 2 (5 min), 3 (15 min), 4 (30 min), 5 (50 min), 6 (55 min)].

En general, la formación de las corazas condujo a una mejora importante de las propiedades ópticas cuando se emplearon núcleos TGA·DMPS·CdTe que tenían un rendimiento cuántico en torno a 20 % y una longitud de onda de emisión próxima a 540 nm. Sin embargo, el recubrimiento de aquellos núcleos TGA·DMPS·CdTe con las mejores propiedades ópticas (rendimiento cuántico \approx 50 %, $\lambda_{\text{emisión}} \approx$ 550 nm) modificó sólo ligeramente la emisión de los PCs núcleo/coraza formados (Figura 13).

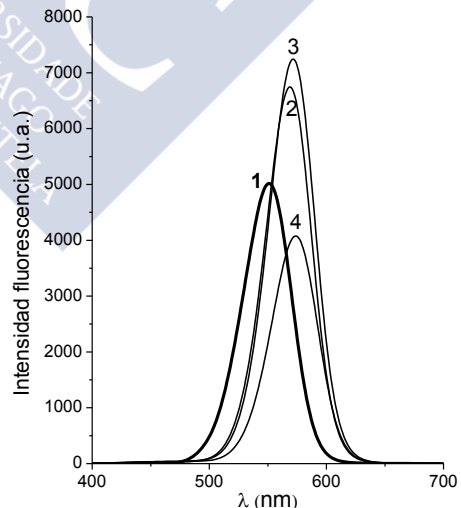


Figura 13. Espectros de fluorescencia del seguimiento de la reacción de formación de la coraza en PC5 [1 (núcleo TGA·DMPS·CdTe), 2 (10 min), 3 (20 min), 4 (30 min)].

3.4 Caracterización

La caracterización de todos los PCs sintetizados se llevó a cabo utilizando, siempre que fue posible, las técnicas de espectroscopía infrarrojo de reflectancia total atenuada (IR-ATR), la espectroscopía ultravioleta visible (UV-VIS), la espectroscopía de fluorescencia, la microscopía electrónica de transmisión (TEM), la difracción de rayos X de polvo (DRX) y la fluorescencia de rayos X (FRX).

3.4.1 IR-ATR

La presencia de los diferentes ligandos como estabilizadores en el recubrimiento de los PCs se confirmó mediante espectroscopía IR-ATR. En la Figura 14 se representan los espectros IR-ATR de los ligandos libres y en la Tabla 6 se muestran las asignaciones de las bandas más significativas.^{10,11}

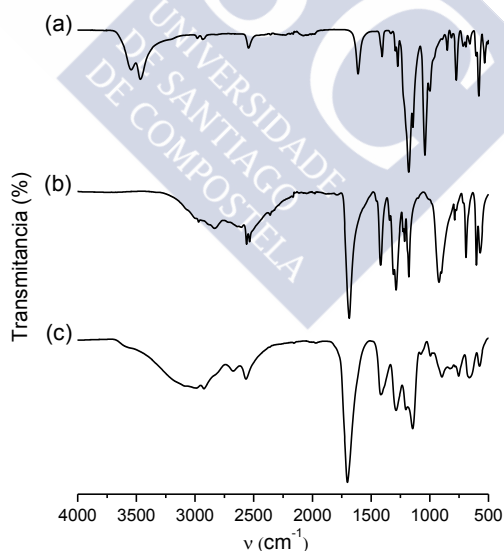


Figura 14. Espectro IR-ATR de los ligandos DMPS (a), DMSA (b) y TGA (c).

¹⁰ Z. Tang, B. Xu, B. Wu, M. W. Germann, G. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 3367.

¹¹ E. Sevinç, F. S. Ertras, G. Ulusoy, C. Ozen, H. Y. Acar, *J. Mater. Chem.*, 22 (2012) 5137.

Tabla 6. Asignación de las bandas más significativas (cm^{-1}) de los espectros IR-ATR de los ligandos estabilizadores.

	ν (SH)	ν (C=O)	ν (SO_3^-)
DMPS	2544 (d)*	-	1079/1042 (f)
DMSA	2563/2535 (d)	1685 (f)	-
TGA	2566 (d)	1701 (f)	-

* d = débil, f = fuerte

Las Figuras 15 a 19 contienen los espectros de los PCs descritos anteriormente. Para ser utilizados a efectos comparativos y facilitar el análisis de los espectros de los PCs que contienen mezcla de ligandos se prepararon también, por procedimientos similares, los PCs TGA-CdTe/ZnS y DMPS-CdTe/DMSA-ZnS y se registraron sus espectros IR-ATR, incluidos en la Figura 19.

En el espectro de PC1 (Figura 15), las bandas correspondientes a los grupos $-\text{SO}_3^-$ (1171 y 1040 cm^{-1}) permanecen cercanas a su posición en el ligando libre, lo que permite descartar su interacción con la superficie de los PCs. Desaparece además la banda $\nu(\text{SH})$, lo que es coherente con la desprotonación de estos grupos y su posible interacción con la superficie de los PCs.

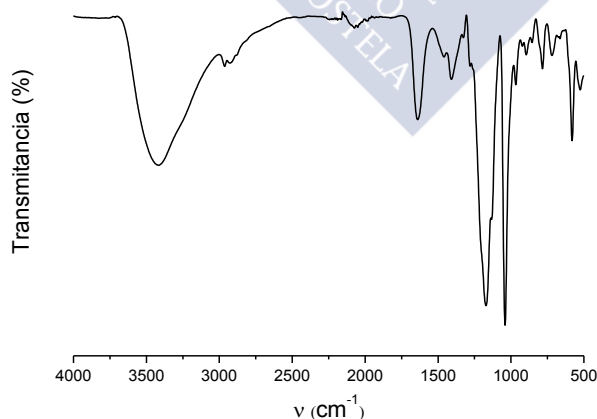


Figura 15. Espectro IR-ATR de PC1.

En los espectros de PC2 (Figura 16), PC3 (Figura 17) y PC6 (Figura 18) la presencia de bandas correspondientes al grupo $-\text{SO}_3^-$ confirma la existencia de los ligandos DMPS en el recubrimiento de estos PCs. Además, si se comparan estos espectros con los del ligando TGA libre (Figura 14c) se observa la desaparición de la banda a 1701 cm^{-1} asociada a la vibración de tensión del grupo $\text{C}=\text{O}$ y la aparición de dos nuevas bandas en torno a 1560 y 1380 cm^{-1} correspondientes, respectivamente, a la tensión asimétrica y simétrica del grupo $-\text{COO}^-$.

En particular, en los espectros IR-ATR de PC2 preparado con diferentes relaciones molares de los ligandos, se observa que a medida que disminuye la proporción de TGA hay una disminución en la intensidad de las bandas correspondientes a los grupos $-\text{COO}^-$, mientras que la intensidad de las señales correspondiente al ligando DMPS se incrementa (Figura 16).

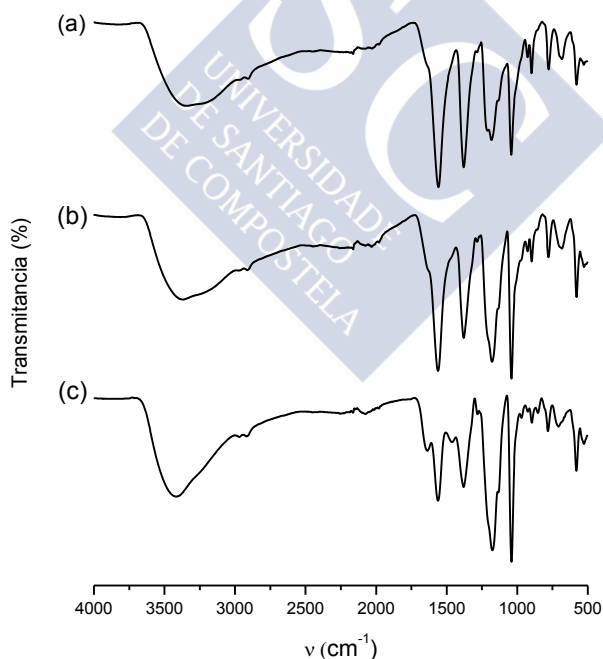


Figura 16. Espectros IR-ATR de PC2 con relaciones molares $\text{Cd}^{2+}:\text{DMPS}:\text{TGA}$ 1:0.3:0.6 (a), 1:0.4:0.2 (b) y 1:0.4:0.1 (c).

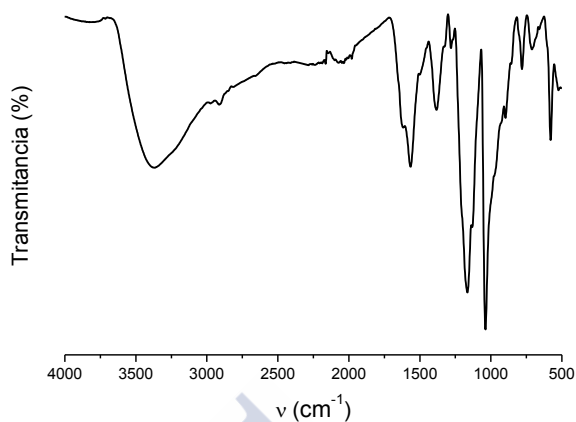


Figura 17. Espectro IR-ATR de PC3.

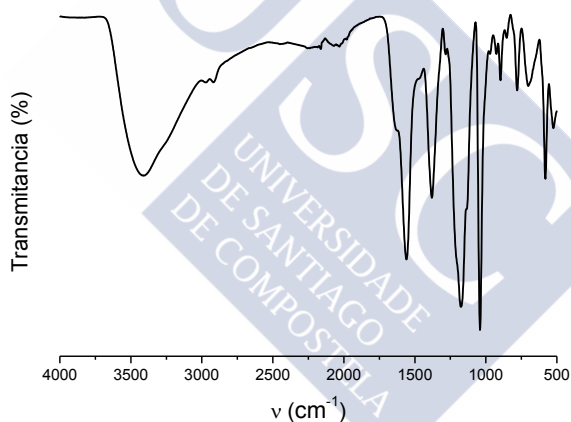


Figura 18. Espectro IR-ATR de PC6.

La asignación de los espectros IR-ATR de PC4 y PC5 (Figuras 19c y d) resulta más compleja, si bien estos espectros apoyan, como se comenta seguidamente, la formulación propuesta para estas nanopartículas. En ambos espectros se observan dos bandas situadas a 1561 y 1363 cm^{-1} para PC4 (Figura 19c) y a 1567 y 1369 cm^{-1} para PC5 (Figuras 19d), que corresponden, respectivamente, a la tensión antisimétrica y simétrica del grupo $-\text{COO}^-$ de los ligandos TGA y DMSA. Además, en ambos PCs existe una banda a 1231 cm^{-1} para

PC4 y a 1223 cm^{-1} para PC5, también presente en los PCs TGA-CdTe/ZnS (Figura 19a), correspondiente a la flexión simétrica fuera del plano del grupo $-\text{CH}_2\text{S}^{-2}$, y una banda a 1279 cm^{-1} que, por comparación de los espectros de estos PCs con el espectro de los PCs DMPS-CdTe/DMSA-ZnS (Figura 19b), se puede atribuir al DMSA. PC5 posee también las bandas características del grupo $-\text{SO}_3^-$ (1183 y 1043 cm^{-1}) del DMPS aunque poco intensas en este caso, debido probablemente a una sustitución parcial del ligando DMPS por DMSA mientras se llevó a cabo la formación de la coraza en estos PCs.

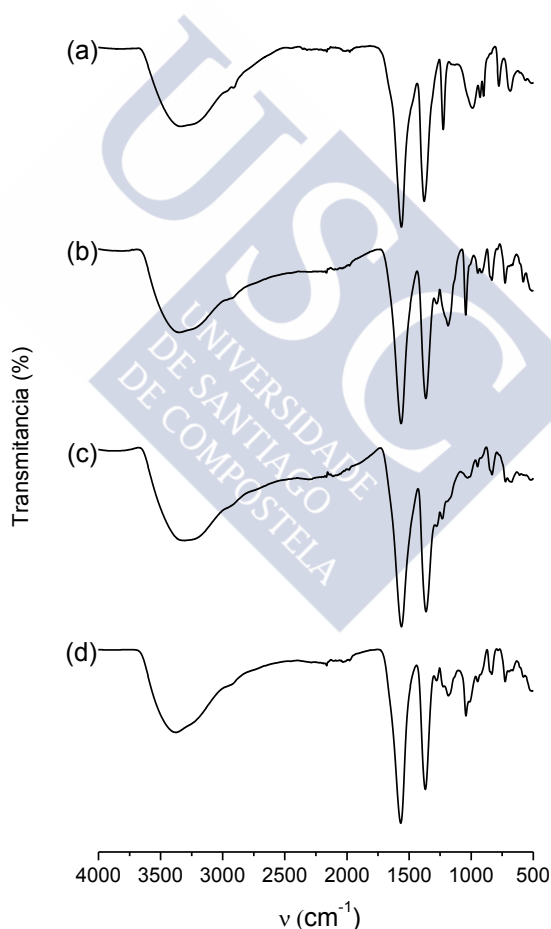


Figura 19. Espectros IR-ATR de PCs TGA-CdTe/ZnS (a), DMPS-CdTe/DMSA-ZnS (b), PC4 (c) y PC5 (d).

Finalmente, señalar que en todos los PCs se produjo la desaparición de las bandas correspondientes a los grupos $-SH$ existentes en los ligandos libres (Figura 14, Tabla 6), lo que sugiere su desprotonación y posible unión por este grupo a la superficie de las nanopartículas.

3.4.2 UV-VIS y fluorescencia

La espectroscopía de absorción y la de emisión (fluorescencia) proporcionan información sobre las propiedades ópticas (longitud de onda de absorción y emisión, anchura de la banda a media altura (fwhm), desplazamiento de Stokes y rendimiento cuántico) de los PCs preparados. En las Figuras 20 a 26 se resumen las características de cada uno de los PCs y se adjuntan espectros de cada uno de ellos a modo de ejemplo. Dado que la mayor parte de las síntesis de los diferentes PCs fueron repetidas un elevado número de veces, para cada una de las propiedades se adjunta un rango de valores. Los valores del rendimiento cuántico fueron ya incluidos en el apartado de síntesis

Todo los PCs poseen una primera banda de absorción bien definida, y espectros de emisión estrechos y simétricos, indicando una buena homogeneidad en el tamaño.

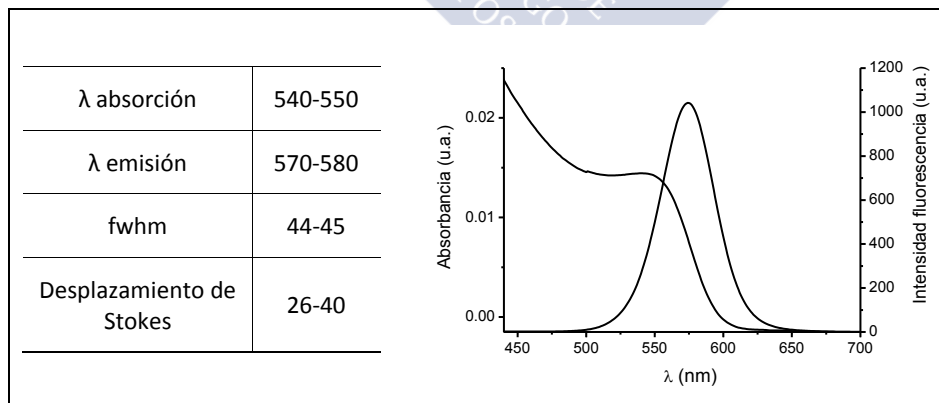


Figura 20. Propiedades ópticas de los puntos cuánticos PC1.

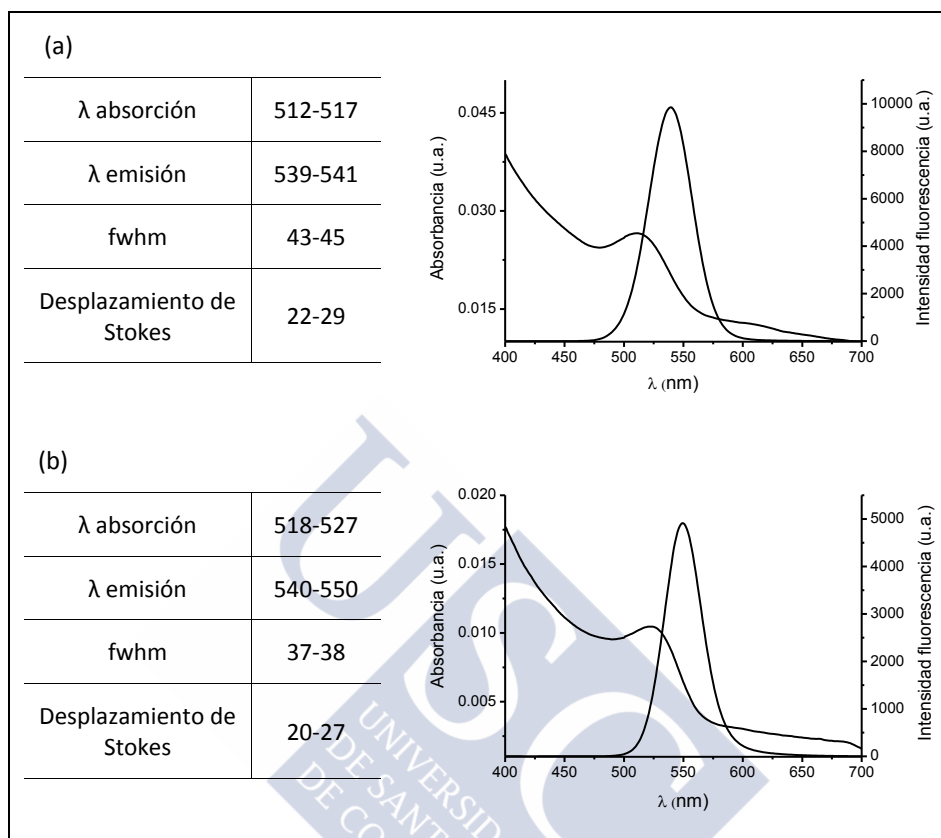


Figura 21. Propiedades ópticas de los puntos cuánticos PC2 preparados con relaciones molares Cd^{2+} :DMPS:TGA 1:0.3:0.6 (a) y 1:0.4:0.2 (b).

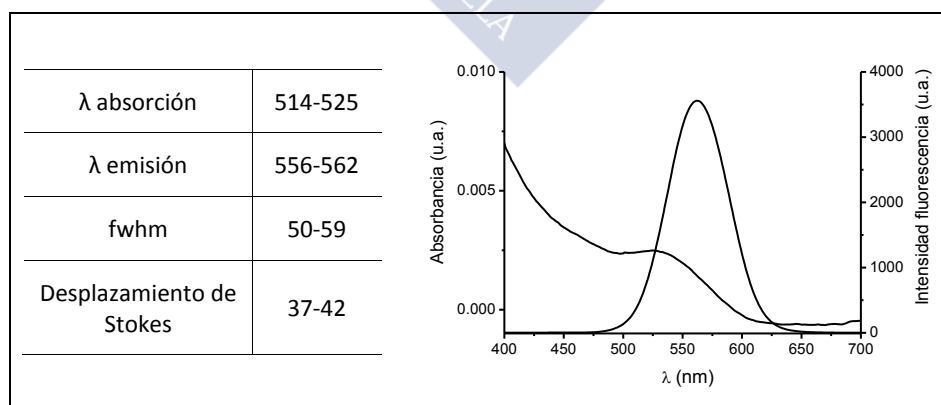


Figura 22. Propiedades ópticas de los puntos cuánticos PC3.

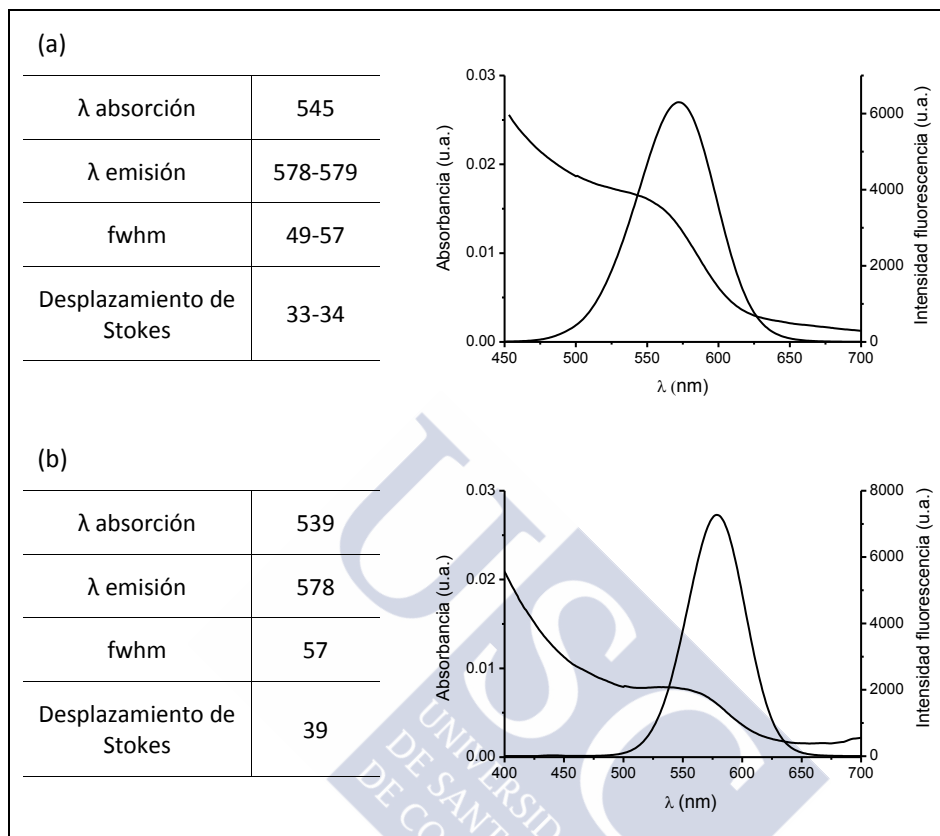


Figura 23. Propiedades ópticas de los puntos cuánticos PC4 preparados con relaciones molares $\text{Cd}^{2+}:\text{Zn}^{2+}:\text{DMSA}$ 1:2.5:2.5 (a) y 1:2:1.5 (b).

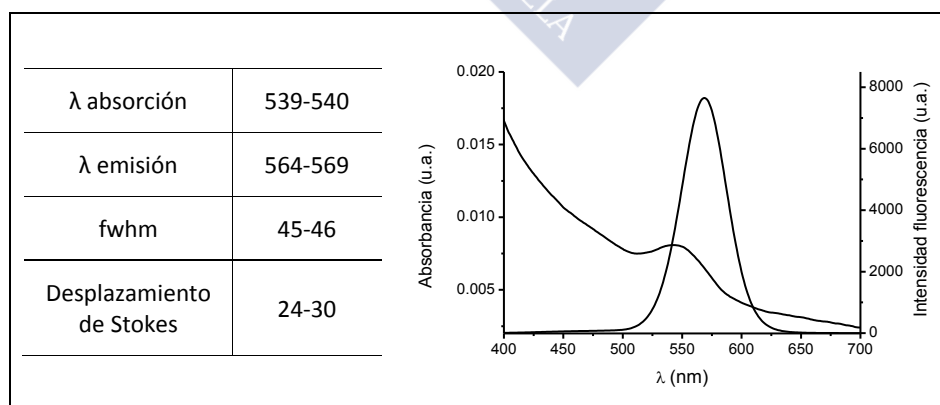


Figura 24. Propiedades ópticas de los puntos cuánticos PC5.

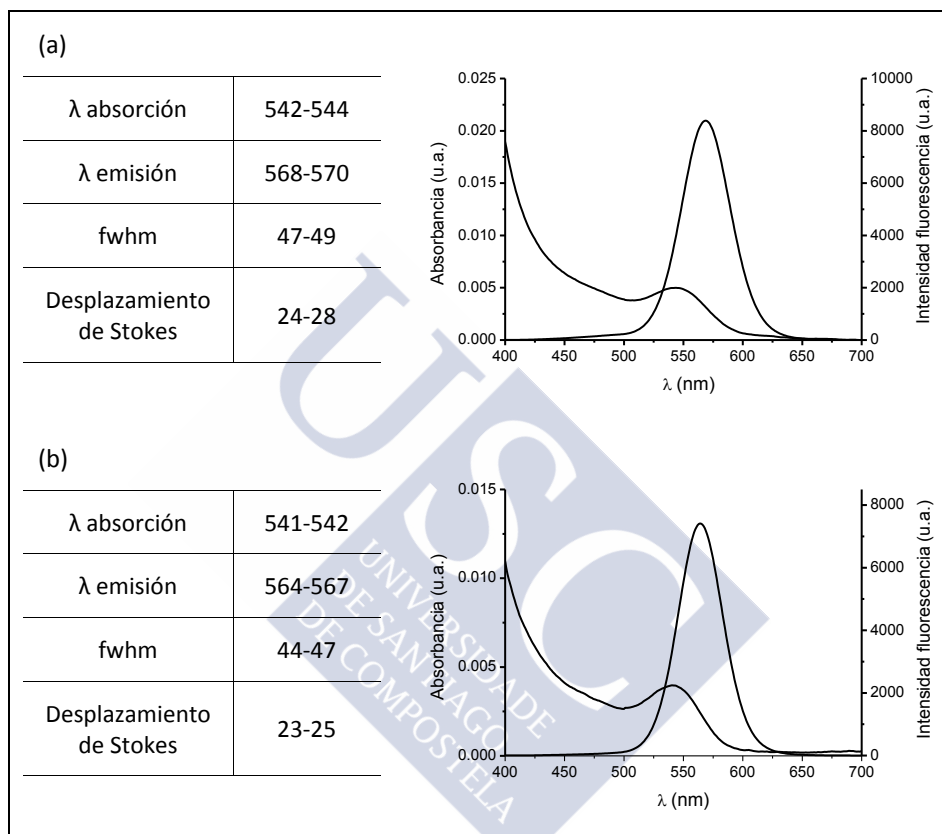


Figura 25. Propiedades ópticas de los puntos cuánticos PC6 (núcleo Cd^{2+} :DMPS:TGA 1:0.3:0.6) preparados con relaciones molares $\text{Cd}^{2+}_{\text{núcleo}}:\text{Cd}^{2+}_{\text{coraza}}:\text{DMPS}:\text{S}^{2-}$ 1:1.5:0.75:0.75 (a) y 1:0.75:0.375:0.375 (b).

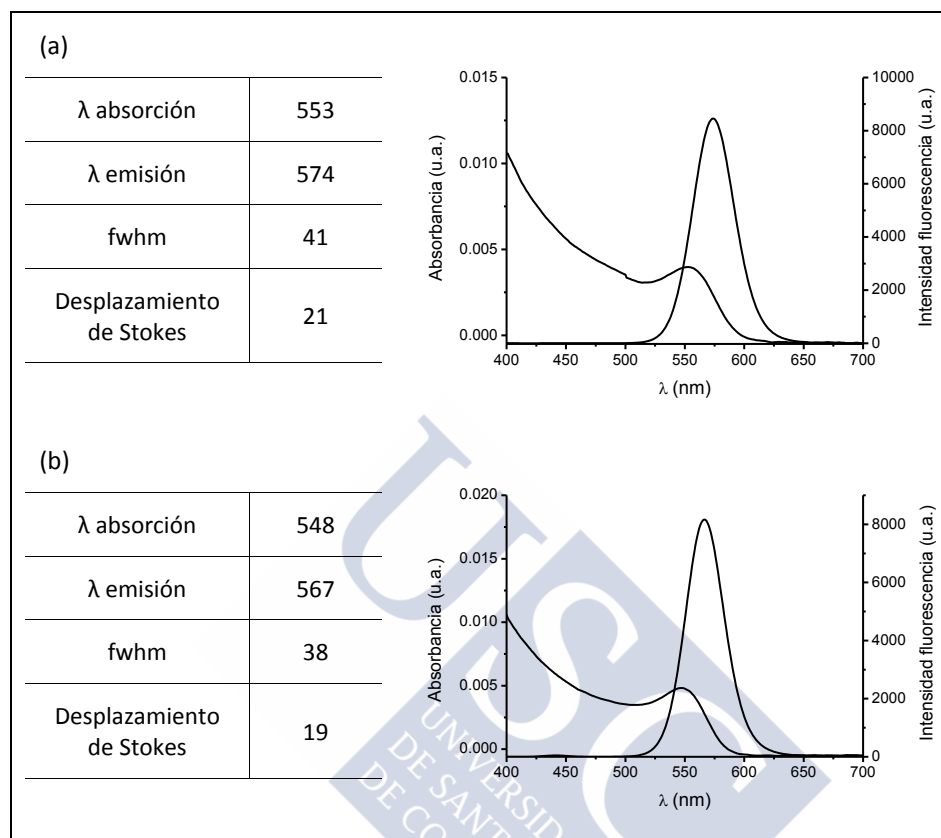


Figura 26. Propiedades ópticas de los puntos cuánticos PC6 (núcleo Cd^{2+} :DMPS:TGA 1:0.4:0.2) preparados con relaciones molares $\text{Cd}^{2+}_{\text{núcleo}}:\text{Cd}^{2+}_{\text{coraza}}:\text{DMPS}:\text{S}^{2-}$ 1:1.5:0.75:0.1125 (a) y 1:0.75:0.375:0.04 (b).

3.4.3 TEM

Mediante microscopía electrónica de transmisión se obtuvieron imágenes que permitieron estudiar la morfología y el tamaño de las diferentes nanopartículas. En las Figuras 27 a 32 se muestra una imagen de TEM y los diagramas de distribución de tamaño para un PC de cada tipo. En el caso del PC4 no fue posible calcular el diagrama de distribución por la baja calidad de la imagen. Todos ellos poseen forma esférica y una buena monodispersión. Los tamaños obtenidos mediante esta técnica están de acuerdo con los calculados

(incluidos en la Tabla 7) mediante la fórmula empírica desarrollada por Peng y col.:⁶

$$D = (9.8127 \times 10^{-7}) \lambda^3 - (1.7147 \times 10^{-3}) \lambda^2 + 1.0064 \lambda - 194.84$$

en donde D (nm) es el diámetro de PCs CdTe, y λ (nm) es la longitud de onda del primer pico de absorción.

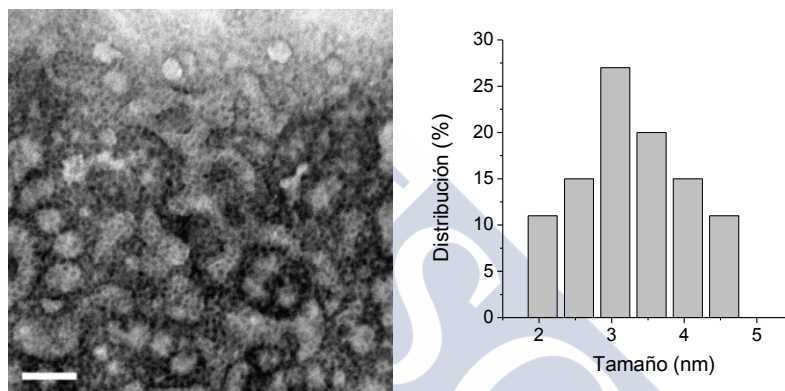


Figura 27. Imagen TEM de PC1 (escala 50 nm) y diagrama de distribución de tamaños.

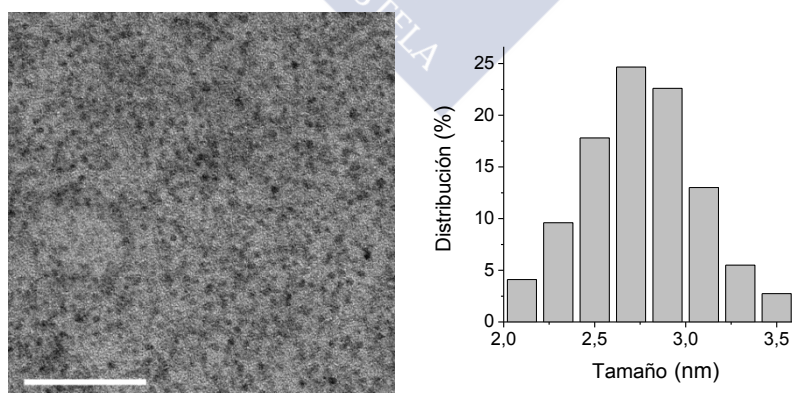


Figura 28. Imagen TEM de PC2 (escala 50 nm) y diagrama de distribución de tamaños.

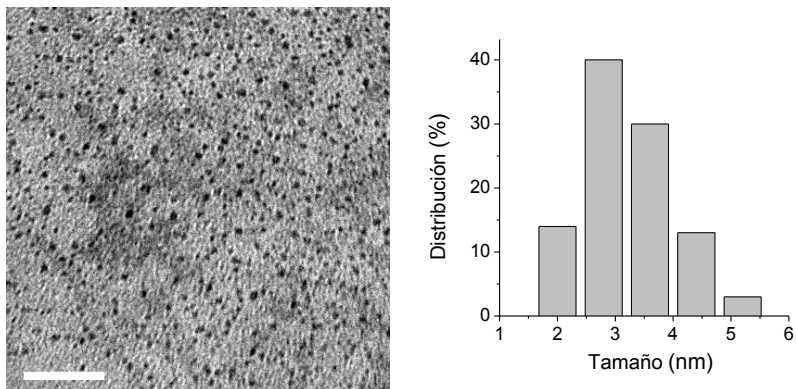


Figura 29. Imagen TEM de PC3 (escala 50 nm) y diagrama de distribución de tamaños .

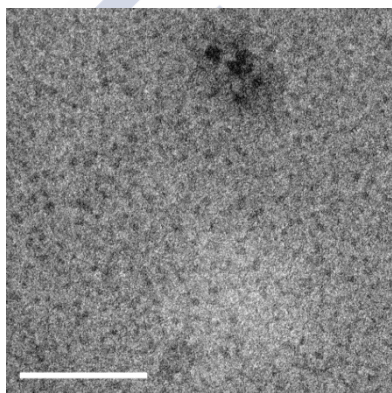


Figura 30. Imagen TEM de PC4 (escala 50 nm).

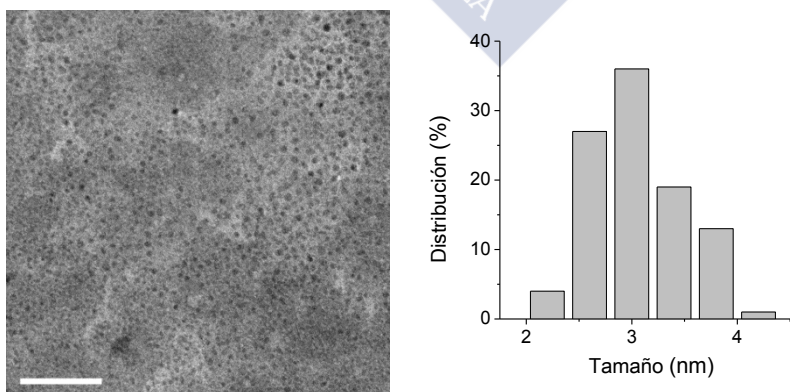


Figura 31. Imagen TEM de PC5 (escala 50 nm) y diagrama de distribución de tamaños.

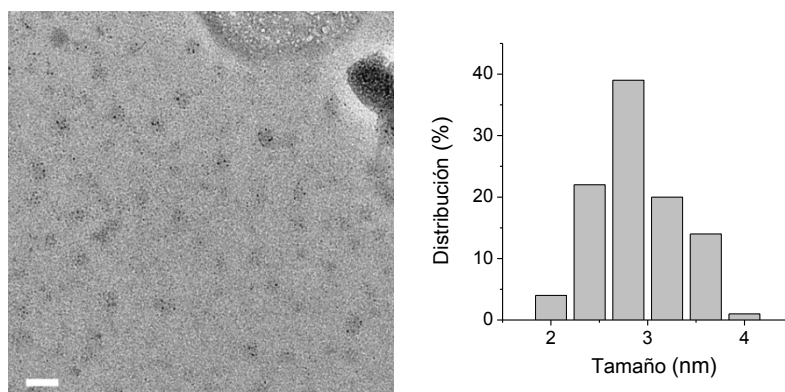


Figura 32. Imagen TEM PC6 (escala 50 nm) y diagrama de distribución de tamaños.

Tabla 7. Tamaño de los PCs preparados (nm).

Punto cuántico	Tamaño (TEM)	Tamaño (Ref 6)
PC1	3.4 ± 0.7	3.3
PC2	2.78 ± 0.4	2.6
PC3	3.1 ± 0.7	3.2
PC4	*	3.2
PC5	3.05 ± 0.4	3.15
PC6	2.9 ± 0.4	3.1

*Las imágenes obtenidas no permitieron determinar el tamaño.

3.4.4 DRX

Aunque los patrones de difracción de rayos X de polvo (Figura 33) de los PCs preparados poseen bandas anchas debido al reducido tamaño de las nanopartículas, los picos de difracción más intensos, recogidos en la Tabla 8, se corresponden con los planos característicos para una estructura de blanda de zinc. La posición de los picos de los PCs CdTe coincide con la de los picos correspondientes al semiconductor CdTe.^{12,13} Sin embargo, tanto en los PCs con coraza ZnS como en los que poseen una coraza CdS se produce un desplazamiento de estos picos a ángulos mayores, hacia las posiciones correspondientes a los semiconductores ZnS y CdS respectivamente.¹⁴⁻¹⁶

¹² M. Shen, W. Jia, Y. You, Y. Hu, F. Li, S. Tian, J. Li, Y. Jin, D. Han, *Nanoscale Res. Lett.*, 8 (2013) 253.

¹³ E. Vaishnavi, R. Renganathan, *Spectrochim. Acta A*, 115 (2013) 603.

Además, la anchura y la forma de los picos apenas cambia a medida que se incrementa el tamaño de las nanopartículas, lo que corrobora la formación de la coraza en lugar de una aleación.¹⁷

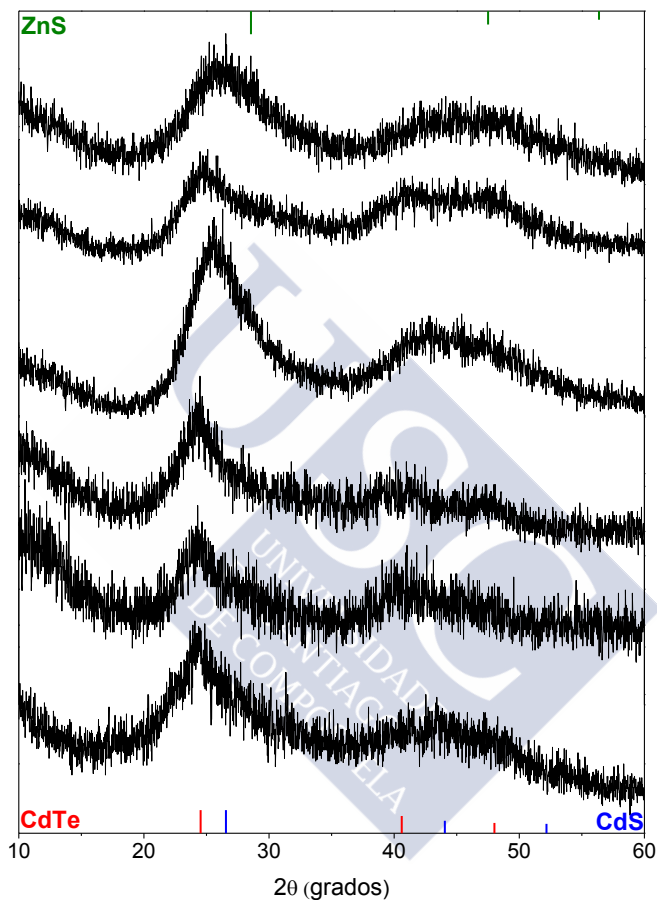


Figura 33. Difractogramas para PC1-PC6 (de abajo arriba).

¹⁴ D. Ag, R. Bongartz, L. E. Dogan, M. Selej, J.-G. Walter, D. O. Dermirkol, F. Stahl, S. Orcelik, S. Timur, T. Scheper, *Colloid. Surface. B*, 114 (2014) 96.

¹⁵ L. Jing, K. Ding, S. Kalytchuk, Y. Wang, R. Qiao, S. V. Kershaw, A. L. Rogach, M. Gao, *J. Phys. Chem. C*, 117 (2013) 18752.

¹⁶ L. Li, Y. Cheng, Y. Ding, S. Gu, F. Zhang, W. Yu, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 14 (2013) 2564.

¹⁷ B. Wang, H. Shang, C. Nie, Q. Wang, M. Ma, Z. Cai, *J. Luminescence*, 143 (2013) 262.

Tabla 8. Posiciones de los picos de difracción para cada uno de los PCs.

Puntos cuánticos	Planos (2θ (°))		
	(1 1 1)	(2 2 0)	(3 1 1)
DMPS-CdTe (PC1)	24.10	44.00 [#]	
TGA·DMPS-CdTe (PC2)	24.14	40.51	47.82
TGA-CdTe/DMPS-ZnS (PC3) (2.96/3.19)*	24.32	40.72	47.98
TGA-CdTe/DMSA-ZnS (PC4) (1.57/3.18)	25.50	42.60	47.24
TGA·DMPS-CdTe/DMSA-ZnS (PC5) (2.77/3.09)	24.64	40.70	47.98
TGA·DMPS-CdTe/DMPS-CdS (PC6) (2.72/3.17)	26.08	44.12	48.22

* Tamaño en nm antes y después de la formación de la coraza calculado a partir de la absorbancia.

[#] Solapamiento de los planos (2 2 0) y (3 1 1).

Teniendo en cuenta el tamaño de los PCs antes y después de la formación de la coraza ZnS (Tabla 8), se observa que a medida que aumenta el grosor de ésta hay un mayor desplazamiento de los picos de difracción.¹⁸

3.4.5 FRX

Los espectros de fluorescencia de rayos X de los PCs que contienen coraza ZnS se muestran en las Figuras 34 a 36. Como puede observarse todos ellos contienen Cd, Te, Zn y S, confirmando la formación de dicha coraza.

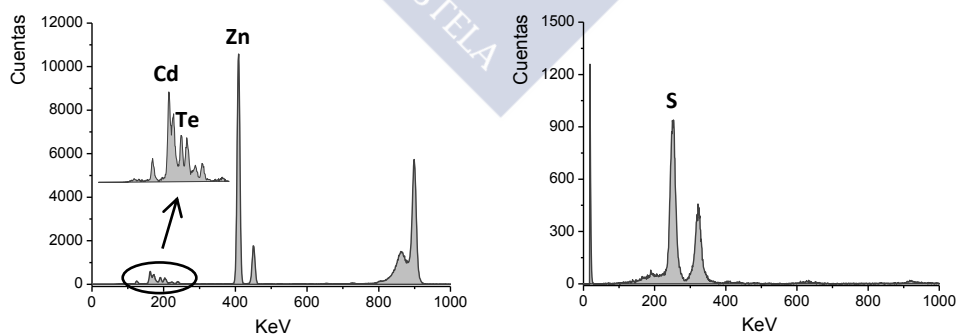


Figura 34. Espectros de FRX de PC3.

¹⁸ Z. Li, C. Dong, L. Tang, X. Zhu, H. Chen, J. Ren, *Luminescence*, 26 (2011) 439.

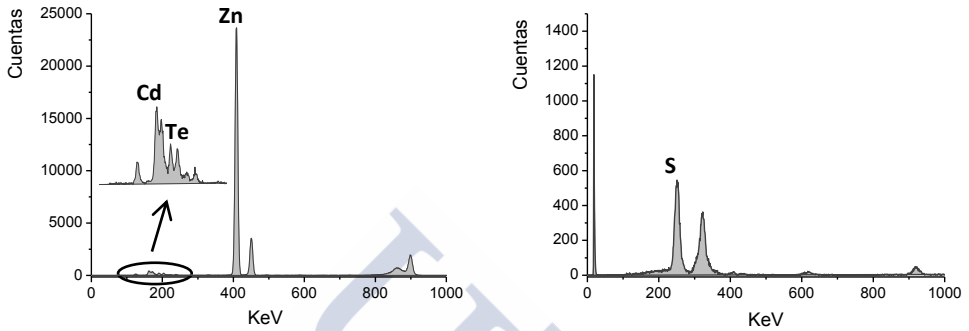


Figura 35. Espectros de FRX de PC4.

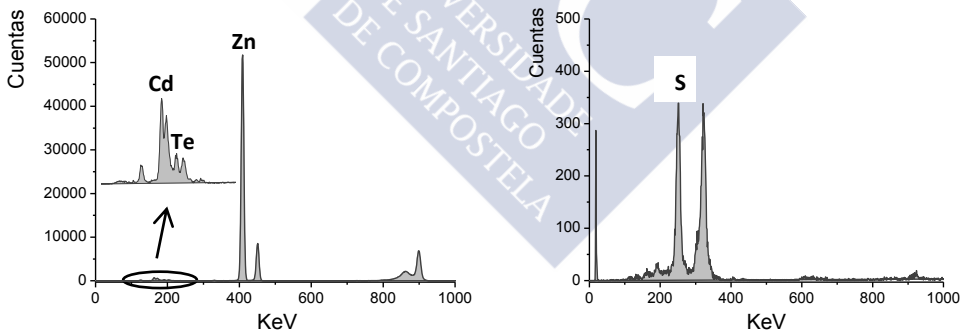


Figura 36. Espectros de FRX de PC5.



Capítulo 4

*Puntos cuánticos CdTe
como sensores de iones metálicos*



Con la intención de analizar qué posibilidades tienen los diferentes PCs sintetizados de ser utilizados como potenciales sensores de diferentes sales metálicas, se estudió el efecto que ejercen dichas sales sobre las propiedades ópticas de los mismos.

4.1 Parte experimental

Se prepararon inicialmente disoluciones acuosas 1×10^{-3} M de sales metálicas de grado analítico (generalmente nitratos, excepto $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, NiSO_4 y HgCl_2) de diferentes cationes metálicos M(I o II) tanto esenciales [Na(I), K(I), Ca(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II)] como pesados [Ag(I), Cd(II), Hg(II) y Pb(II)]. Por dilución de estas disoluciones se prepararon otras de concentración variable. A 1.5 ml de estas disoluciones de concentración $[\text{M}^{n+}]$ se le añadió 1.5 ml de la disolución del correspondiente PC a una concentración aproximada de 100 nM (concentración determinada mediante UV-Vis utilizando el valor de la absorbancia en el primer pico de absorción¹). Las mezclas resultantes se dejaron en reposo, a temperatura ambiente y en ausencia de luz, durante 2 horas y se registraron sus espectros de fluorescencia. Las medidas se realizaron por quintuplicado, excepto en algún caso que se hicieron por triplicado.

En todos los casos la concentración final de PC fue aproximadamente 50 nM. Concentraciones más bajas de PC mejorarían la sensibilidad (es decir concentraciones bajas de metal provocarían mayores cambios en la intensidad de la fluorescencia), pero mostraron peor reproducibilidad.

Las concentraciones finales de metal ensayadas fueron seleccionadas, en cada caso, después de un ensayo preliminar con un rango amplio de concentraciones que generalmente osciló entre 1 nM y 100 μM , dependiendo de la sensibilidad del correspondiente PC a cada metal.

Los ensayos se llevaron a cabo directamente en agua Milli-Q, sin utilización de ningún tampón, dado que no se observaron cambios significativos en las propiedades ópticas de los PCs con ligeras modificaciones del pH.

¹ W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, *Chem. Mater.*, 15 (2003) 2854.

La posible interacción entre los PCs y los aniones presentes en las diferentes sales metálicas empleadas (nitrato, acetato, sulfato y cloruro) se descartó previamente, mediante la realización de ensayos con las correspondientes sales sódicas de estos aniones.

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo utilizando un espectrofluorímetro Jasco FP-8300. La longitud de onda de excitación fue 365 nm, con un ancho de banda de 5 nm para la excitación y 1, 2.5 o 5 nm para la emisión.

Para evaluar los cambios provocados por el metal en la fluorescencia del PC se representará, en cada caso, la fluorescencia relativa (I/I_0 , I_0 e I representan, respectivamente, la fluorescencia en ausencia y en presencia de metal) frente a la concentración de metal, $[M^{n+}]$. Como se verá más adelante, salvo raras excepciones, estas modificaciones, si las hay, implican la desactivación (quenching, apagado) del PC. Si bien son diversas las interacciones moleculares que pueden provocar esta desactivación, los mecanismos para explicar este proceso son dos, *estático y dinámico*.² Ambos tipos de mecanismos requieren el contacto molecular entre el fluoróforo (PC) y el desactivante (catión metálico). En el caso de la desactivación dinámica o colisional, el desactivante debe difundir hasta el fluoróforo durante el tiempo de vida del estado excitado; mientras que en el mecanismo estático la desactivación ocurre como consecuencia de la formación de un complejo en el estado fundamental, entre el fluoróforo y el desactivante. La desactivación del fluoróforo puede ocurrir por uno sólo de estos mecanismos, o por una combinación de ambos.

El análisis detallado del mecanismo de desactivación es, generalmente, bastante complicado y no es el objetivo de este trabajo. No obstante, se hará un análisis preliminar para determinar si, en los sistemas ensayados, la desactivación ocurre mediante un único tipo de mecanismo o por una combinación ambos. Para ello se tendrá en cuenta que, cuando solo uno de los mecanismos tienen lugar, éste se describe bien por la ecuación de Stern-Volmer :

$$I_0/I = 1 + K_{sv} [Q]$$

² J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3ª Ed, Springer (2006).

donde I_0 e I son la intensidad de la fluorescencia en ausencia y presencia del desactivante, $[Q]$ es la concentración del desactivante, y K_{sv} es la constante de desactivación (K_D) si el mecanismo es el dinámico, o la constante de asociación (K_S) si es el estático.

En ambos casos la representación de I_0/I frente a $[Q]$ es lineal. Sin embargo, si la desactivación ocurre por combinación de ambos mecanismos la representación muestra una curvatura hacia el eje "y" que sigue la ecuación:

$$I_0/I = 1 + (K_D + K_S) [Q] + K_D K_S [Q]^2$$

Si además de ambos mecanismos hay otros factores que influyen en la desactivación, la ecuación que describe el fenómeno puede ser todavía más compleja (cúbica,...).

Adicionalmente, la existencia de la desactivación de la fluorescencia a través de un mecanismo dinámico se puede corroborar aplicando la ecuación de Lineweaver-Burk.³

$$\frac{1}{I_0 - I} = \frac{1}{I_0 + 1/(K_{LB} I_0 [Q])}$$

donde K_{LB} es la constante de desactivación.

En aquellos sistemas en los que se produce la desactivación del PC por el metal, se hace también un análisis de regresión lineal para determinar el rango lineal y los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). Estos parámetros permitirán una primera evaluación sobre la aplicación de estas nanopartículas en la determinación analítica de los diferentes metales. Las ecuaciones para la recta de regresión varían de unos sistemas a otros en cuanto a la definición de la variable y ($y= I, I_0/I...$) pero, generalmente, son las encontradas para sistemas análogos a éstos en la bibliografía.⁴⁻⁸

³ A. Gong, X. Zhu, Y. Hu, S. Yu, *Talanta*, 73 (2007) 668.

⁴ A. Wang, L. Fu, T. Rao, W. Cai, M.-K. Yuen, J. Zhong, *Opt. Mater.*, 42 (2015) 548.

⁵ L. Chen, Q. Zhao, X.-Y. Zhang, G.-H. Tao, *Chinese Chem. Lett.*, 25 (2014) 261.

⁶ J. Ma, Y. Chen, Z. Hou, W. Jiang, L. Wang, *Biosens. Bioelectron.*, 43 (2013) 84.

⁷ M. Koneswaran, R. Narayanaswamy, *Sensor. Actuat. B: Chem.*, 139 (2009) 104.

⁸ Y. Chen, Z. Rosenzweig, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 5132.

4.2 Resultados y discusión

En primer lugar se hará un análisis, para cada uno de los PCs, de las modificaciones que experimenta su fluorescencia en presencia de los diferentes cationes metálicos seleccionados. A continuación se analizará, comparativamente, la influencia de cada catión sobre la fluorescencia de los diferentes PCs. Finalmente se discutirá la posibilidad de utilizar los PCs preparados para la identificación selectiva de algunos cationes metálicos.

4.2.1 Fluorescencia de los PCs preparados en presencia de diferentes cationes metálicos

4.2.1.1 Puntos cuánticos DMPS-CdTe (PC1)

En las Figuras 1 y 2 se muestra cómo afecta la presencia de los diferentes cationes metálicos ensayados a la intensidad de la fluorescencia de estos PCs.

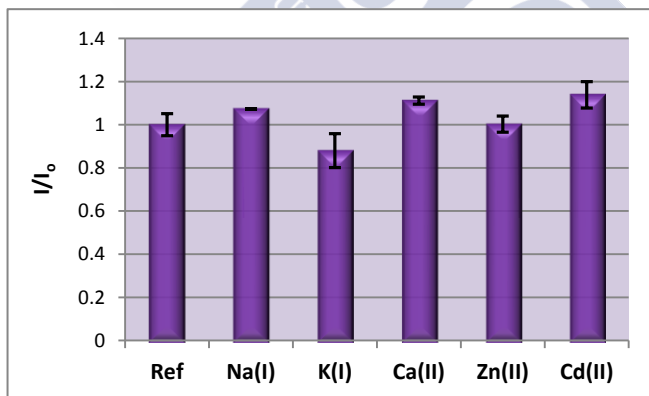


Figura 1. Efecto de los cationes Na(I), K(I), Ca(II), Zn(II) y Cd(II) (100 μ M) en la intensidad de la fluorescencia de PC1.

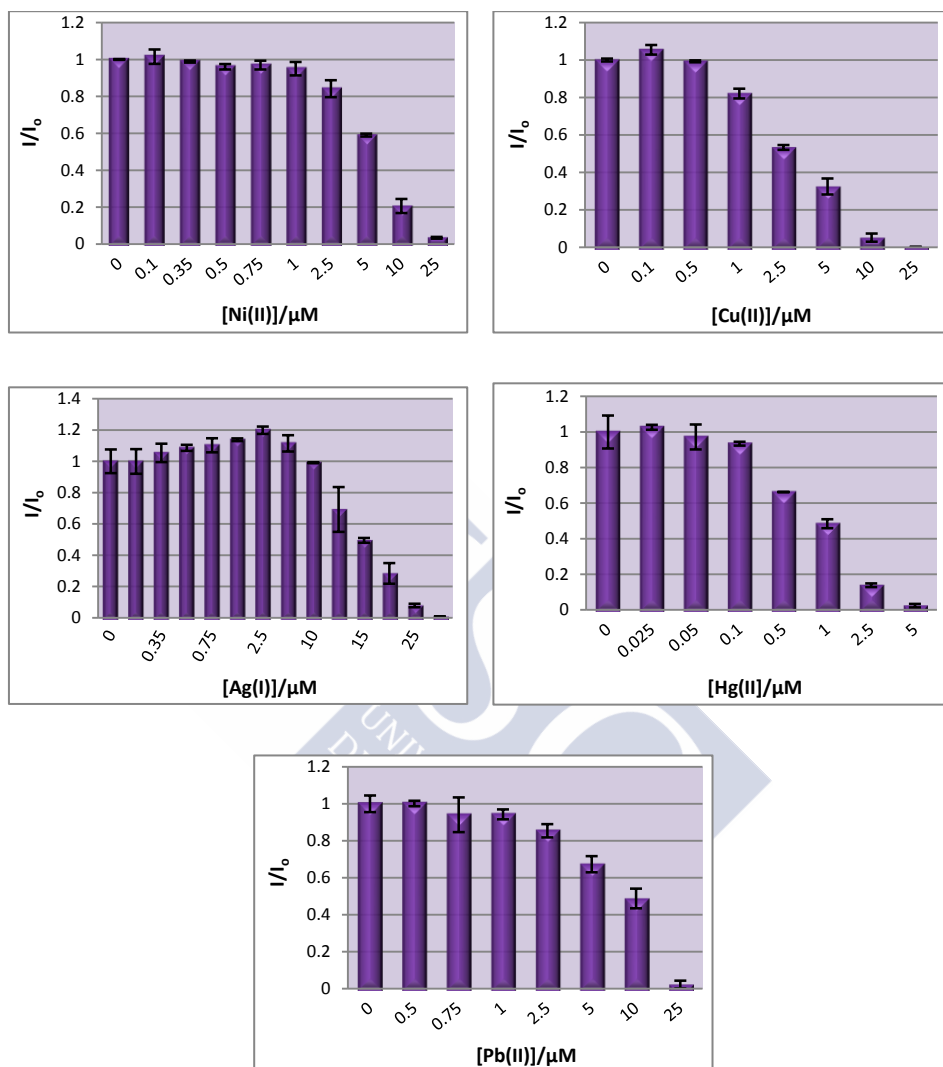


Figura 2. Intensidad relativa de la fluorescencia de PC1 a diferentes concentraciones de los cationes Ni(II), Cu(II), Ag(I), Hg(II) y Pb(II).

Concentraciones 100 μM de Na(I), K(I), Ca(II), Zn(II) y Cd(II) no afectan significativamente a las propiedades fluorescentes de estos sistemas (Figura 1). Sin embargo, a medida que se incrementa la concentración de los cationes metálicos pesados Hg(II) y Pb(II), y de Ni(II) y Cu(II) se produce una disminución progresiva de la intensidad de la fluorescencia. En presencia de Ag(I) el

comportamiento es ligeramente diferente, ya que inicialmente se produce un pequeño incremento de la intensidad de la fluorescencia y a medida que se aumenta la concentración, al igual que en los cationes mencionados previamente, existe un decaimiento progresivo (Figura 2).

Pese a que se produce una desactivación de la fluorescencia frente a varios cationes metálicos, cabe destacar que estos PCs, tal y como se muestra en la Figura 3, son más sensibles a la presencia de Hg(II). A una concentración 0.1 μM ya existen cambios significativos en la intensidad de la fluorescencia, y a una concentración 0.5 μM de metal el decaimiento ya es superior al 35 %. Sin embargo, se necesitan concentraciones 10 veces superiores (o incluso mayores) para que estos PCs se vean afectados por la presencia de Ni(II), Cu(II) o Pb(II).

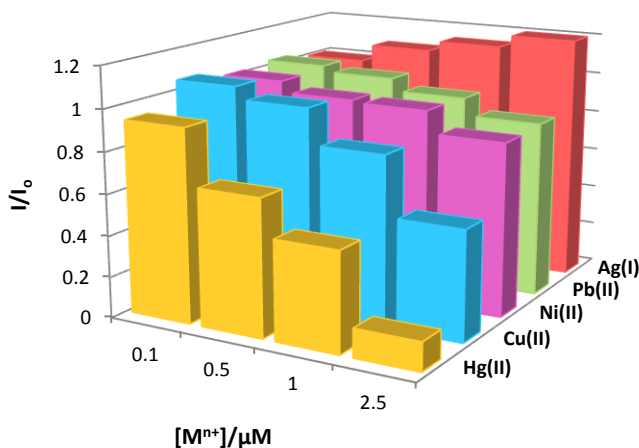


Figura 3. Comparación del efecto ejercido por diferentes cationes en la intensidad de la fluorescencia de PC1.

A medida que se aumenta la concentración de Ag(I) y Hg(II) se produce, también, un desplazamiento del máximo de emisión hacia el rojo. Analizando dicho desplazamiento ($\Delta\lambda$) frente a la reducción de la intensidad de la fluorescencia (desactivación), éste es más significativo en presencia de Ag(I) (Figura 4a). No obstante, cabe destacar que se necesitan concentraciones

menores de Hg(II) para que el desplazamiento sea apreciable. Así, a una concentración 0.5 μM de Hg(II), el desplazamiento del máximo de emisión es de 3 nm y, sin embargo, en presencia de la misma concentración de Ag(I) no hay ningún cambio significativo (Figura 4b).

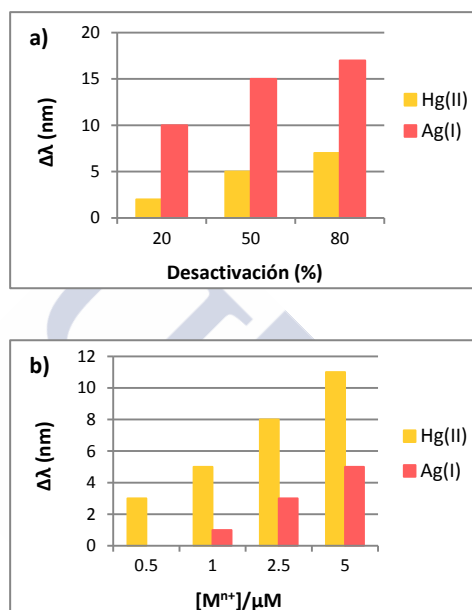


Figura 4. Desplazamiento batocrómico del máximo de emisión ($\Delta\lambda$, nm) de PC1 en presencia de Ag(I) y Hg(II) frente al % de desactivación (a) y a la concentración de metal (b).

Como se puede observar en la Figura 5, las representaciones de Stern-Volmer para los cationes metálicos que afectan a las propiedades fluorescentes de estos PCs se desvían de la linealidad. Para Ni(II) se ajusta a una ecuación de segundo orden, poniendo de manifiesto la existencia simultánea de mecanismos de desactivación estáticos y dinámicos. Sin embargo, para Cu(II), Ag(I), Hg(II) y Pb(II) se ajustan a ecuaciones de mayor orden, lo que sugiere la existencia de ambos mecanismos de desactivación y otros factores adicionales.⁹

⁹ T.-T. Gan, Y.-J. Zhang, N.-J. Zhao, X. Xiao, G.-F. Yin, S.-H. Yu, H.-B. Wang, J.-B. Duan, Ch.-Y. Shi, W.-Q. Liu, *Spectrochim. Acta A*, 99 (2012) 62.

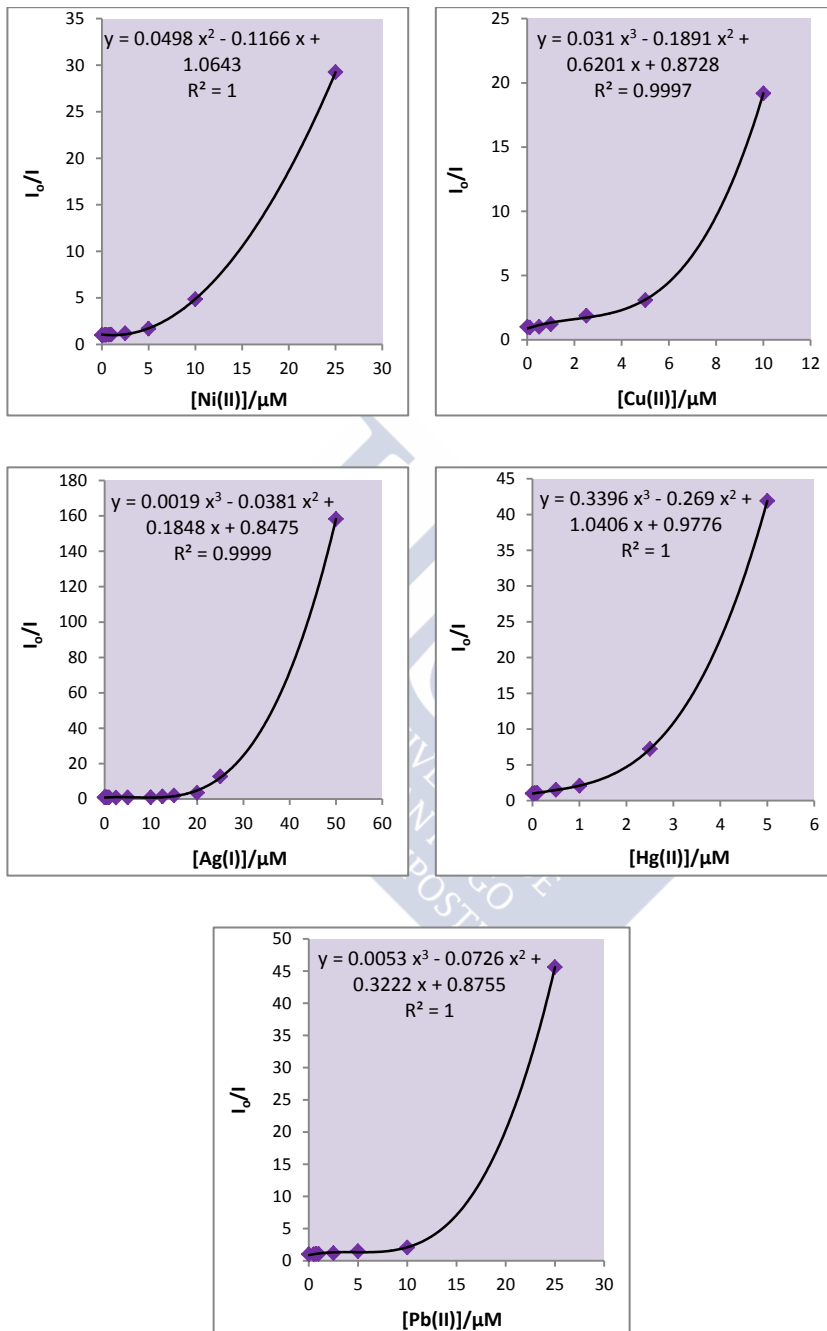


Figura 5. Representaciones de Stern-Volmer (I_0/I frente a $[M^{n+}]$) para PC1 y diferentes cationes metálicos.

Para estos metales, se buscaron también las condiciones óptimas que permitieron obtener una recta de calibrado (Figura 6). A partir de dichas rectas se calcularon los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) siguiendo los criterios de la IUPAC (que define el LOD como $3\sigma/m$ y el LOQ como $10\sigma/m$, siendo σ la desviación estándar de 11 medidas del blanco, y m la pendiente de la recta de calibrado), así como otros parámetro de interés, todos ellos recogidos en la Tabla 1.

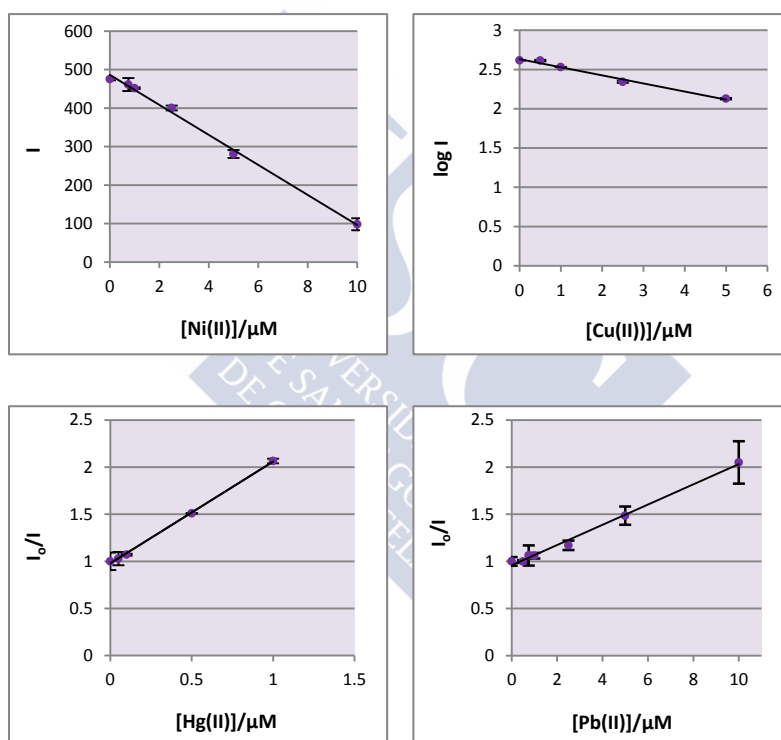


Figura 6. Rectas de calibrado para los cationes metálicos que producen una desactivación de la fluorescencia de PC1.

Tabla 1. Parámetros de interés para la determinación de M^{n+} con PC1.

Metal	Recta de calibrado	R^2	R	Rango lineal (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)
Ni(II)	$I = -38.997 C + 486.41$	0.9963	0.9981	0.75-10	0.679	2.266
Cu(II)	$\log I = -0.1031 C + 2.6325$	0.9862	0.9931	0.5-5	0.246	0.819
Hg(II)	$I_0/I = 1.0804 C + 0.9782$	0.999	0.9994	0.05-1	0.054	0.180
Pb(II)	$I_0/I = 0.1074 C + 0.9581$	0.9932	0.9965	0.5-10	0.549	1.830

Los datos disponibles no permitieron obtener un buen ajuste en el caso de Ag(I). Para el resto de los cationes se obtuvieron ajustes con unos buenos coeficientes de regresión, obteniéndose para el mercurio un LOD mucho más bajo, tal y como cabría esperar.

4.2.1.2 Puntos cuánticos TGA·DMPS-CdTe (PC2)

Tal y como se muestra en la Figura 7, al igual que en los PCs descritos anteriormente, concentraciones 100 μM de Na(I), K(I), Ca(II), Zn(II) y Cd(II) no afectan significativamente a las propiedades fluorescentes de estos sistemas, y a medida que se incrementa la concentración de los cationes metálicos Ni(II), Cu(II), Ag(I), Hg(II) y Pb(II), se produce una disminución progresiva de la intensidad de la fluorescencia (Figura 8).

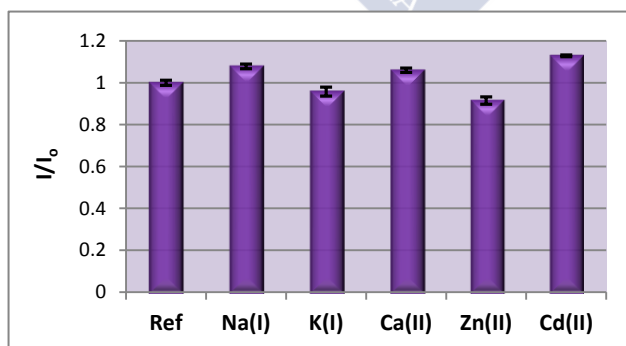


Figura 7. Efecto de los cationes Na(I), K(I), Ca(II), Zn(II) y Cd(II) (100 μM) en la intensidad de la fluorescencia de PC2.

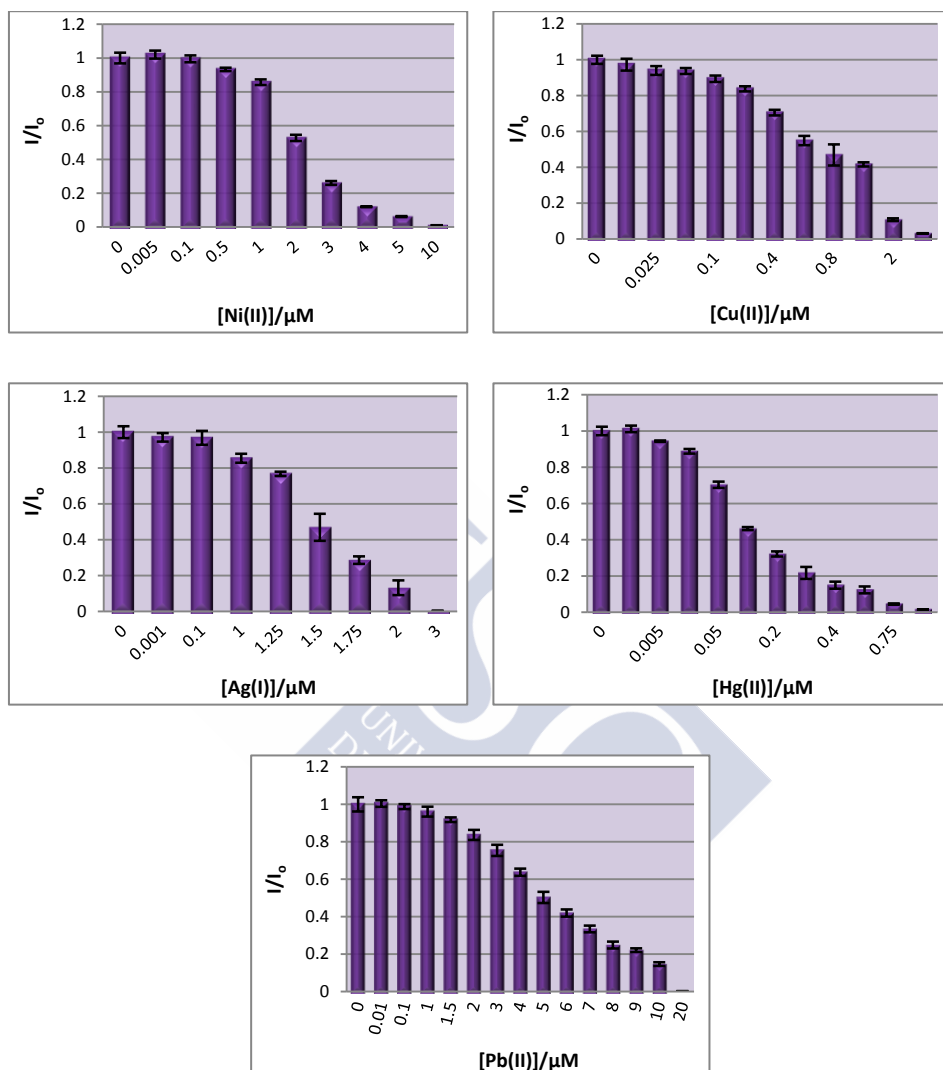


Figura 8. Intensidad relativa de la fluorescencia de PC2 a diferentes concentraciones de los cationes Ni(II), Cu(II), Ag(I), Hg(II) y Pb(II).

De nuevo, estos PCs son mucho más sensibles a la presencia de Hg(II). Como se muestra en la Figura 9, a una concentración $0.01 \mu\text{M}$ del metal ya se produce una reducción de la intensidad mayor del 10 %, y a una concentración $0.5 \mu\text{M}$ ya están prácticamente apagados (reducción de la intensidad de la fluorescencia del 90 %). En presencia de Cu(II), a esa misma concentración,

también se producen cambios significativos, con una reducción de la fluorescencia de un 40 %. Sin embargo, se necesitan concentraciones iguales o mayores que 1 μM para que dichos PCs se vean apreciablemente afectados por la presencia de Ni(II), Ag(I) y Pb(II).

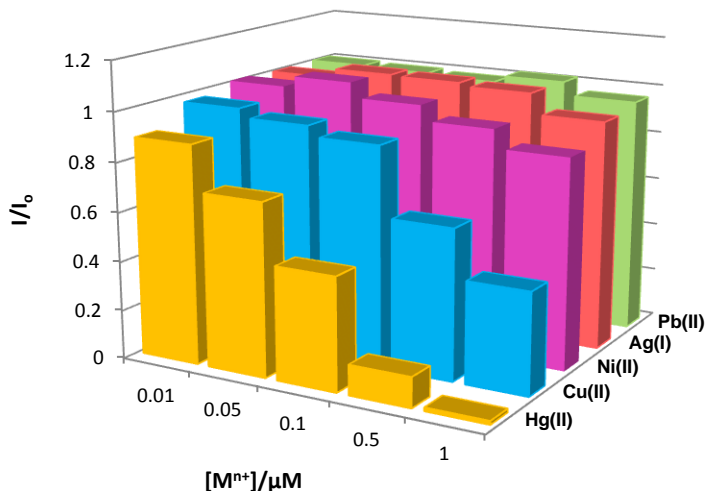


Figura 9. Comparación del efecto ejercido por diferentes cationes metálicos en la intensidad de la fluorescencia de PC2.

En las Figuras 10 y 11 se pone de manifiesto que a medida que aumenta la concentración de los cationes metálicos Cu(II), Ag(I), Hg(II) y Pb(II) también se produce un desplazamiento batocrómico del máximo de emisión. Para los cationes Hg(II) y Pb(II) dicho desplazamiento es poco significativo, ya que es necesaria una reducción de la intensidad de la fluorescencia de un 80 % para que se produzca un desplazamiento de 2-3 nm del máximo de emisión. Para Cu(II) el desplazamiento empieza a ser significativo cuando la reducción de la intensidad de la fluorescencia es superior al 50 %. Sin embargo, en presencia de Ag(I), una reducción de la fluorescencia del 20 % produce un desplazamiento del máximo de emisión superior a 15 nm (Figura 10). Incluso a una concentración 0.5 μM ,

para la que no hay pérdida de fluorescencia, ya se produce un desplazamiento de 10 nm (Figura 11).

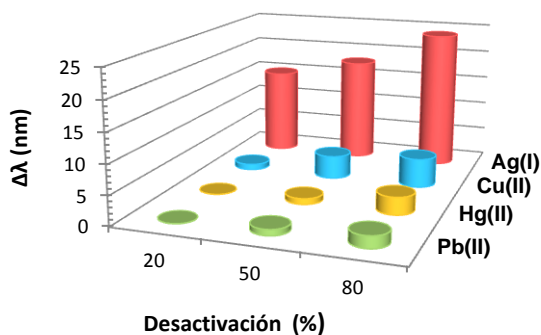


Figura 10. Desplazamiento batocrómico del máximo de emisión ($\Delta\lambda$, nm) en PC2 frente al % de desactivación para diferentes cationes metálicos.

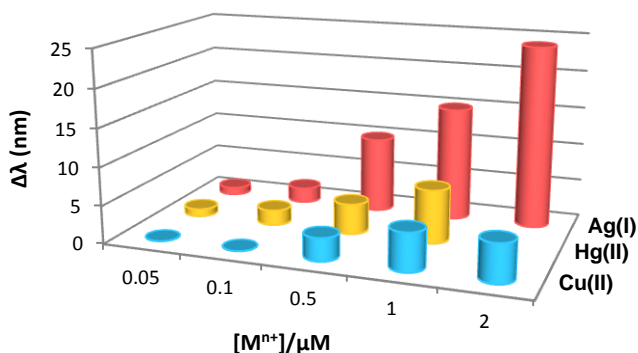


Figura 11. Desplazamiento batocrómico del máximo de emisión ($\Delta\lambda$, nm) en PC2 para diferentes concentraciones de diversos cationes metálicos.

Las representaciones de Stern-Volmer (Figura 12) muestran un grado de no linealidad, ajustándose en todos los casos a ecuaciones de tercer orden o mayor. Se pone así de manifiesto la existencia simultánea de mecanismos de desactivación de la fluorescencia dinámicos y estáticos, así como de otros factores adicionales.

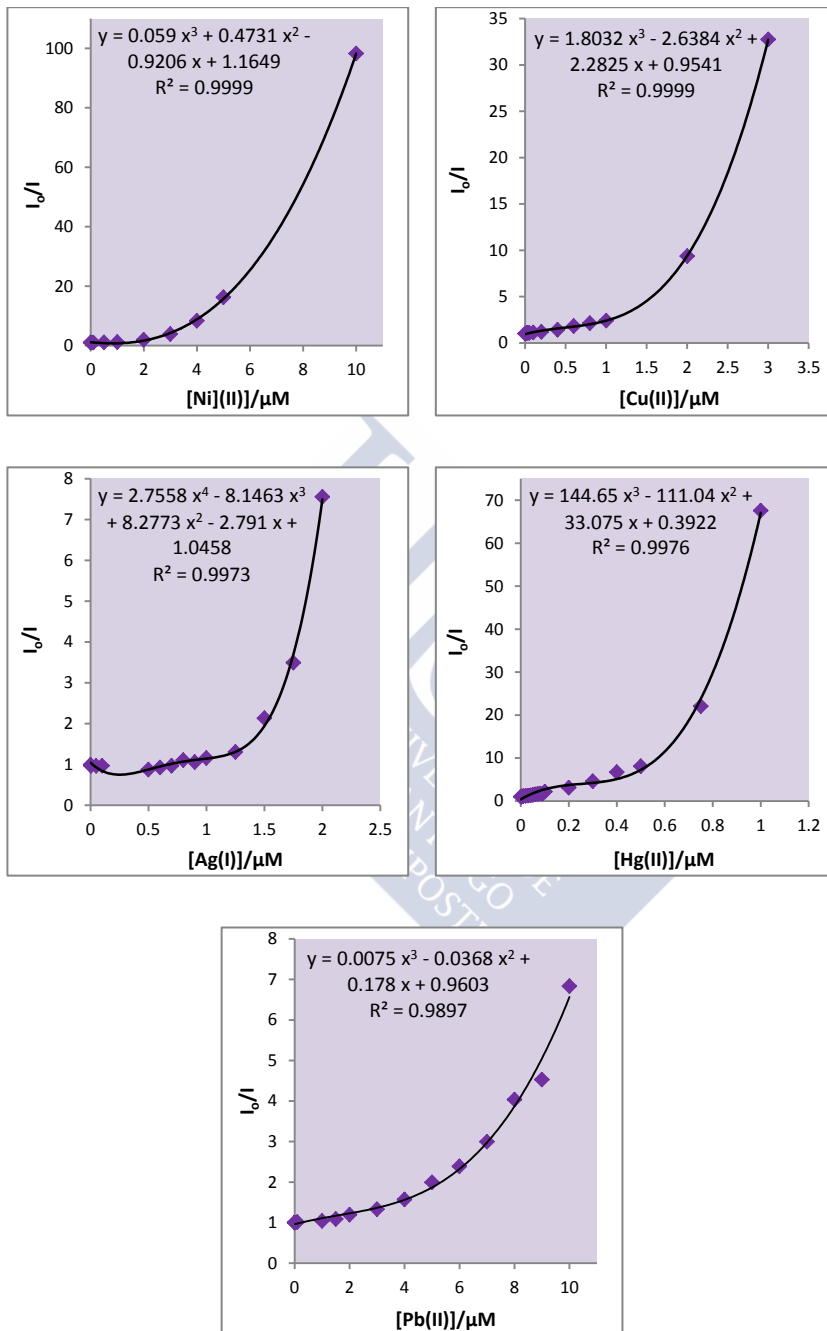


Figura 12. Representaciones de Stern-Volmer (I_0/I frente a $[M^{n+}]$) para PC2 y diferentes cationes metálicos.

En la Figura 13 se representan las rectas de calibrado para los diferentes cationes metálicos y en la Tabla 2 se recogen otros parámetros de interés.

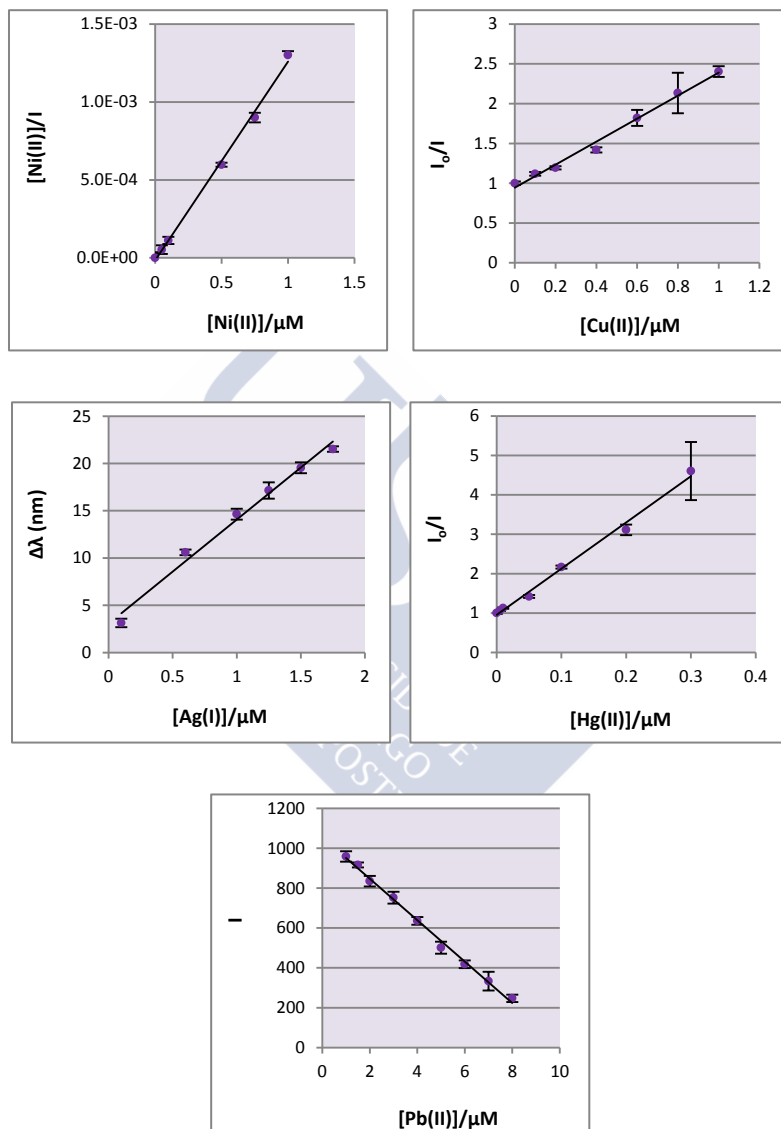


Figura 13. Rectas de calibrado para los cationes metálicos que producen la desactivación de la fluorescencia de PC2.

Tabla 2. Parámetros de interés para la determinación de M^{n+} con PC2.

Metal	Recta de calibrado	R ²	R	Rango lineal (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)
Ni(II)	$C/I = 0.0013 C - 2 \times 10^{-5}$	0.9973	0.9986	0.05-1	0.0442	0.147
Cu(II)	$I_o/I = 1.4458 C + 0.9438$	0.9900	0.9950	0.1-1	0.0353	0.118
Ag(I)	$\Delta\lambda = 11.01 C + 3.0525$	0.9867	0.9933	0.1-1.75	0.0640	0.213
Hg(II)	$I_o/I = 11.725 C + 0.9566$	0.9931	0.9965	0.005-0.3	0.00436	0.0145
Pb(II)	$I = -103.87 C + 1054.6$	0.9953	0.9976	1-8	0.419	1.396

En el caso de Ag(I) no fue posible obtener buenos ajustes utilizando las modificaciones en la intensidad de la fluorescencia, por lo que se empleó el desplazamiento del máximo de emisión para obtener la recta de regresión y calcular los valores de LOD y LOQ.

Al igual que para PC1, el LOD más bajo se obtuvo para Hg(II), si bien con esta sonda la sensibilidad es mucho mayor.

4.2.1.3 Puntos cuánticos TGA-CdTe/DMPS-ZnS (PC3)

Las Figuras 14 y 15 muestran cómo afecta la presencia de los diferentes cationes metálicos ensayados a la intensidad de la fluorescencia de estos PCs.

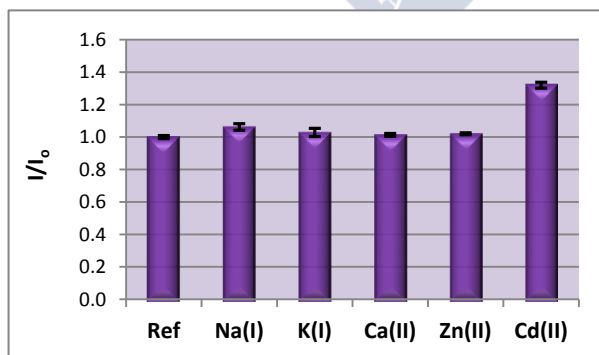


Figura 14. Efecto de los cationes Na(I), K(I), Ca(II), Zn(II) y Cd(II) (100 μM) en la intensidad de la fluorescencia de PC3.

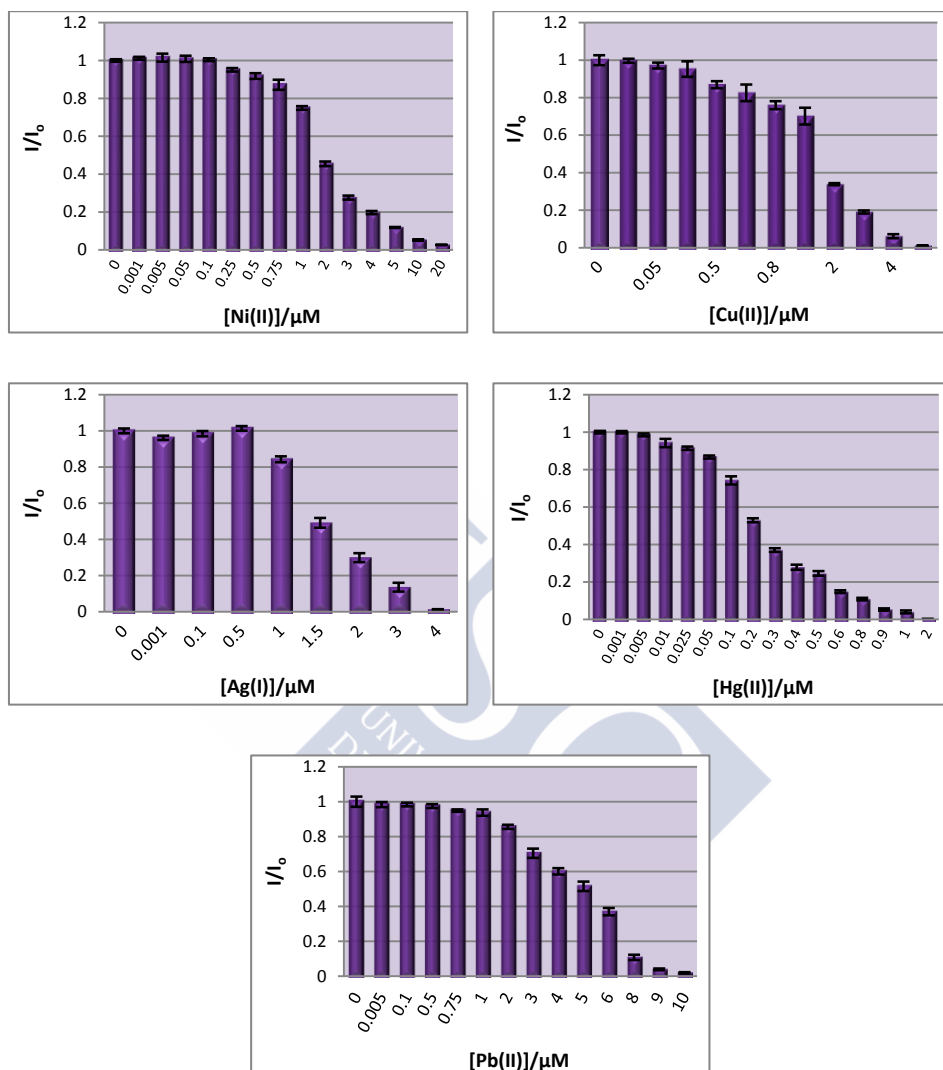


Figura 15. Intensidad relativa de la fluorescencia de PC3 a diferentes concentraciones de los cationes Ni(II), Cu(II), Ag(I), Hg(II) y Pb(II).

Concentraciones 100 μM de Na(I), K(I), Ca(II) y Zn(II) no afectan a las propiedades fluorescentes de estos sistemas. En presencia de Cd(II) se produce un ligero aumento en la intensidad de la fluorescencia (Figura 14). A medida que se incrementa la concentración de los cationes Ni(II), Cu(II), Ag(I), Hg(II) y Pb(II)

se produce una disminución progresiva de la intensidad de la fluorescencia (Figura 15).

De nuevo, estos PCs son mucho más sensibles a la presencia de Hg(II). Así una concentración 0.025 μM de metal produce una reducción de la fluorescencia de un 10 %, y una concentración 0.5 μM reduce la fluorescencia en un 80 %. A esta misma concentración solo Ni(II) y Cu(II) ejercen alguna influencia, un decaimiento de un 10 %. Sin embargo, se requieren concentraciones mayores que 1 μM de Pb(II) para provocar algún efecto (Figura 16).

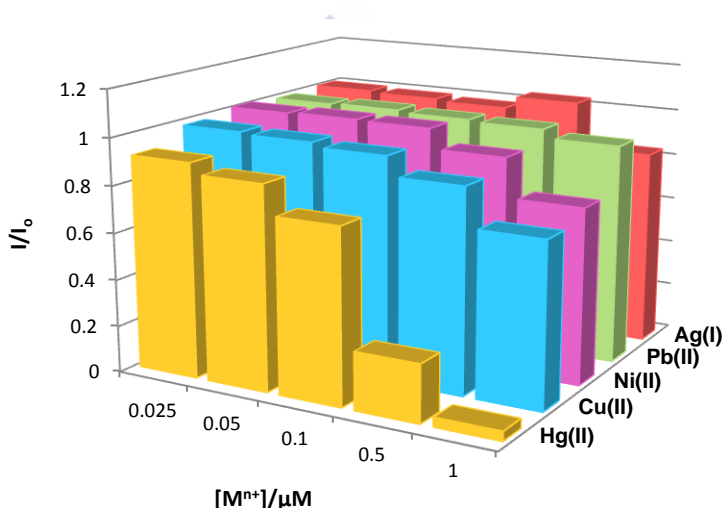


Figura 16. Comparación del efecto ejercido por diferentes cationes metálicos en la intensidad de la fluorescencia de PC3.

A medida que aumenta la concentración de los cationes metálicos Cu(II), Ag(I), Hg(II) y Pb(II) se produce un desplazamiento batocrómico del máximo de emisión (Figuras 17 y 18). Para Cu(II), Hg(II) y Pb(II) dicho desplazamiento solo es significativo cuando se produce una reducción de la fluorescencia mayor al 50 %. Sin embargo, en presencia de Ag(I), con tan solo una reducción de la fluorescencia del 20 % ya se observa un desplazamiento mayor de 13 nm (Figura 17).

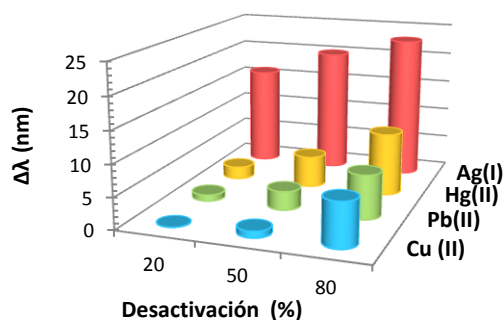


Figura 17. Desplazamiento batocrómico del máximo de emisión ($\Delta\lambda$, nm) frente al % de desactivación para PC3 en presencia de diferentes cationes metálicos.

A una concentración $0.5 \mu\text{M}$ el desplazamiento es significativo en presencia de Ag(I) y Hg(II), sin embargo para Cu(II) y Pb(II) dicho desplazamiento solo es apreciable a concentraciones mayores a $2 \mu\text{M}$ (Figura 18).

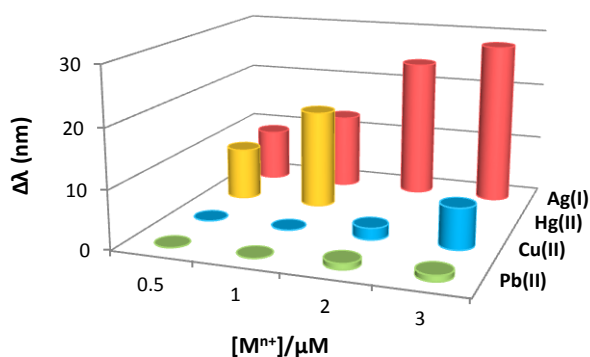


Figura 18. Desplazamiento batocrómico del máximo de emisión ($\Delta\lambda$, nm) para PC3 en presencia de diferentes concentraciones de diversos cationes metálicos.

Las representaciones de Stern-Volmer (Figura 19) obtenidas para estos cationes no son lineales. Para Ni(II) y Ag(I) se ajustan a ecuaciones de segundo orden, poniendo de manifiesto la existencia simultánea de mecanismos de desactivación estáticos y dinámicos. Sin embargo para Cu(II), Hg(II) y Pb(II) se ajustan a ecuaciones de mayor orden, lo que sugiere la existencia de mecanismos de desactivación más complejos.

Las rectas de calibrado se representan en la Figura 20 y en la Tabla 3 se recogen otros parámetros de interés.

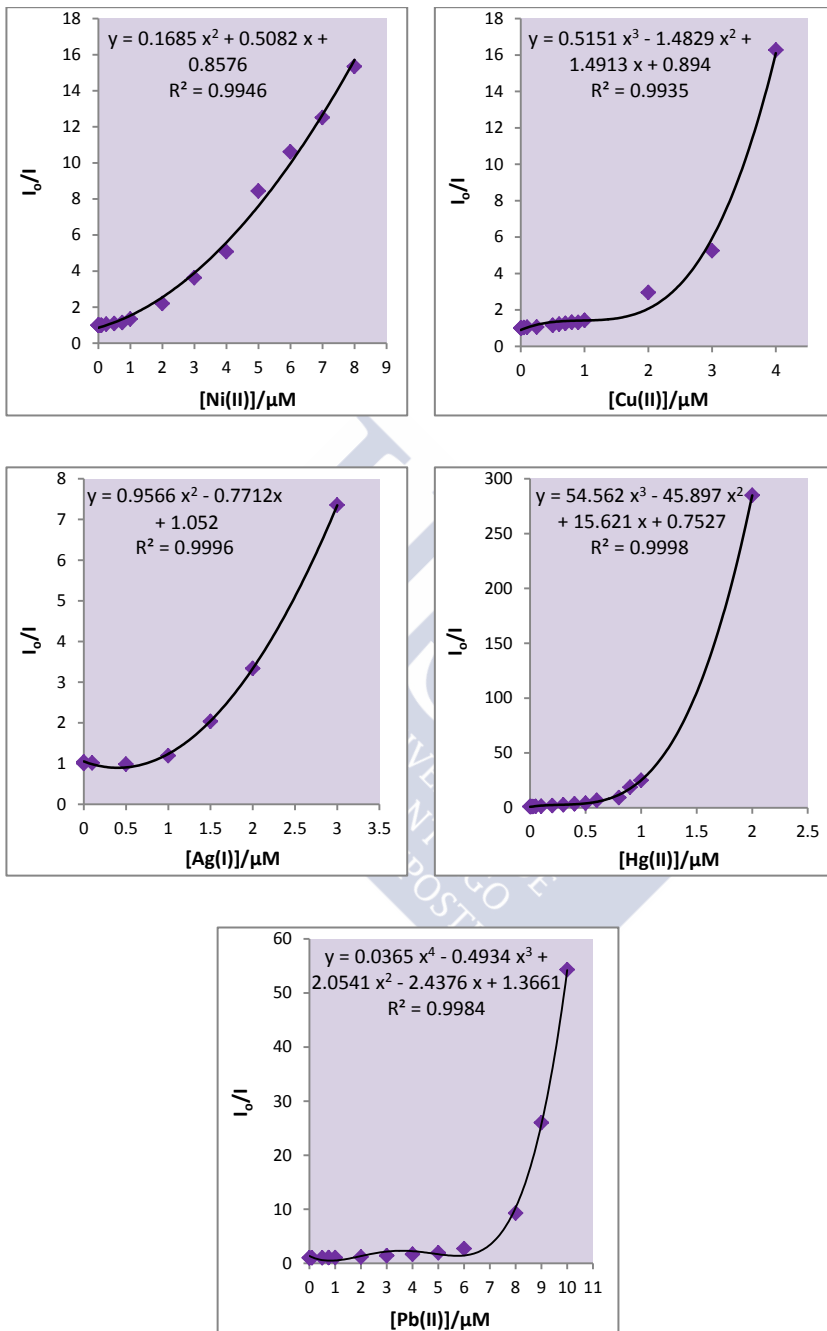


Figura 19. Representaciones de Stern-Volmer (I_0/I frente a $[M^{n+}]$) para PC3 y diferentes cationes metálicos.

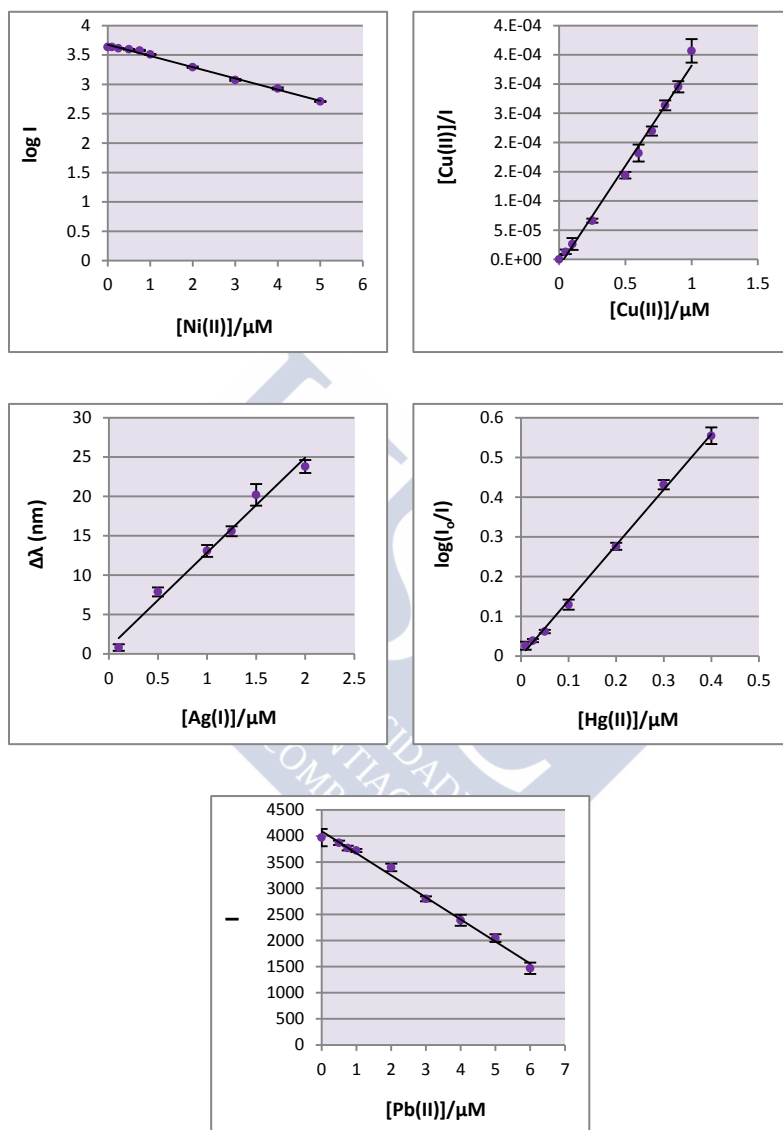


Figura 20. Rectas de calibrado para los cationes metálicos que producen la desactivación de la fluorescencia de PC3.

Tabla 3. Parámetros de interés para la determinación de M^{n+} con PC3.

Metal	Recta de calibrado	R ²	R	Rango lineal (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)
Ni(II)	$\log I = -0.1907 C + 3.6737$	0.9940	0.9970	0.1-5	0.0873	0.291
Cu(II)	$C/I = 0.0003 C - 1 \times 10^{-5}$	0.9904	0.9955	0.05-1	0.0362	0.120
Ag(I)	$\Delta\lambda = 12.072 C + 0.7768$	0.9838	0.9919	0.1-2	0.0808	0.269
Hg(II)	$\log (I_0/I) = 1.395 C + 0.0006$	0.9981	0.9990	0.01-0.4	0.0119	0.0398
Pb(II)	$I = -422.61 C + 4092.3$	0.9918	0.9959	0.5-6	0.373	1.244

En el caso de Ag(I) el mejor ajuste fue el obtenido cuando se emplean los valor de $\Delta\lambda$. Al igual que para PC1 y PC2, el LOD más bajo se obtuvo con Hg(II).

4.2.1.4 Puntos cuánticos TGA-CdTe/DMSA-ZnS (PC4)

Las Figuras 21 y 22 ilustran cómo se modifica la intensidad de la fluorescencia de estos PCs en presencia de los diferentes cationes metálicos ensayados.

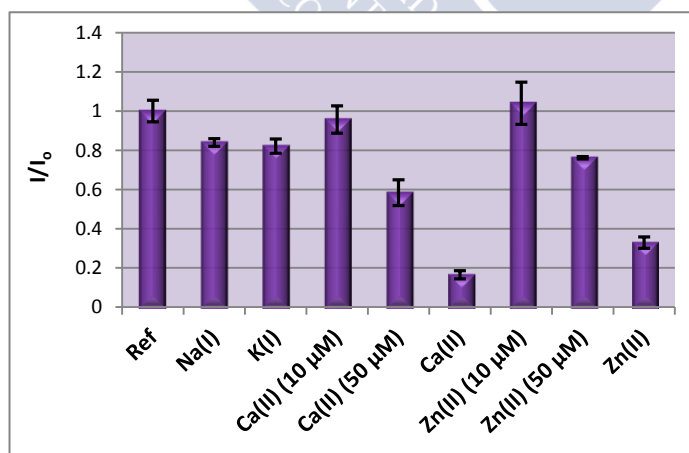


Figura 21. Efecto de los cationes Na(I), K(I), Ca(II) y Zn(II) (100 μM , excepto los indicados) en la intensidad de la fluorescencia de PC4.

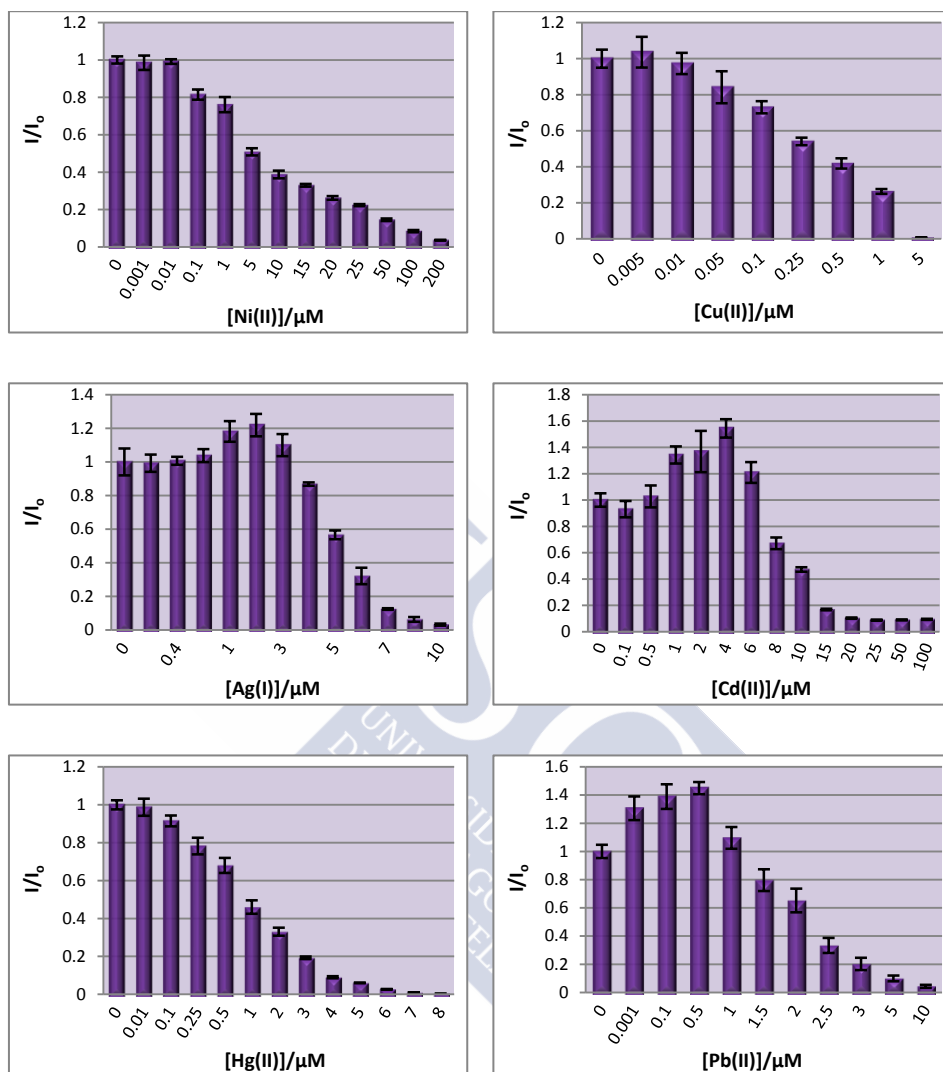


Figura 22. Intensidad relativa de la fluorescencia de PC4 a diferentes concentraciones de los cationes Ni(II), Cu(II), Ag(I), Cd(II), Hg(II) y Pb(II).

Concentraciones 100 μM de Na(I) y K(I) no afectan significativamente a las propiedades fluorescentes de estos sistemas. Ca(II) y Zn(II) ejercen efectos significativos solo a concentraciones mayores a 10 μM (Figura 21). Sin embargo, a medida que se incrementa la concentración de los cationes metálicos Ni(II), Cu(II) y Hg(II) se produce una disminución progresiva de la intensidad de la

fluorescencia. En presencia de Ag(I), Cd(II) y Pb(II) se produce inicialmente un incremento de la intensidad de la fluorescencia, pero a medida que aumenta la concentración de estos cationes la fluorescencia va disminuyendo progresivamente, hasta que a concentraciones elevadas desaparece (Figura 22).

Los resultados obtenidos para Ni(II) y Pb(II) en diversos ensayos siguen una tendencia general, pero muestran mayor variabilidad de la esperada, por lo que no se hará un análisis detallado de los mismos.

Como se muestra en la Figura 23, aunque el comportamiento frente a Cu(II) y Hg(II) es similar, cabe destacar que estos PCs son más sensibles a la presencia del primero. A una concentración 0.05 μM de este metal ya se produce una reducción de la intensidad mayor del 10 %; sin embargo a dicha concentración no existen efectos apreciables en el caso del Hg(II).

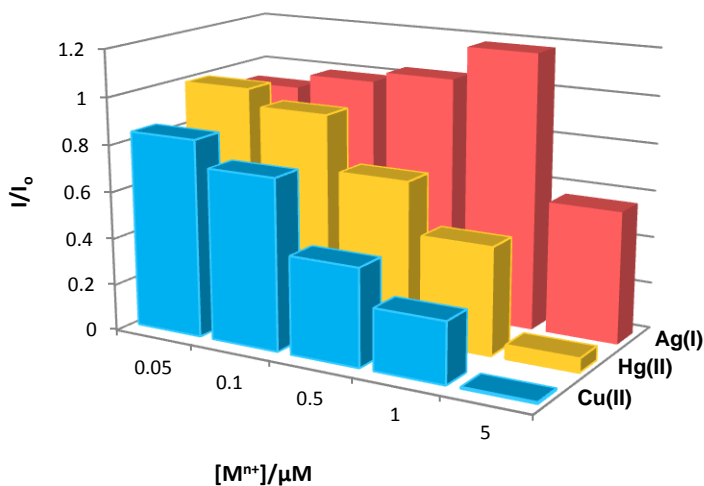


Figura 23. Comparación del efecto ejercido por Cu(II), Ag(I) y Hg(II) en la intensidad de la fluorescencia de PC4.

A medida que aumenta la concentración de los cationes metálicos Cu(II), Ag(I) y Hg(II) se produce un desplazamiento batocrómico del máximo de emisión. Para Cu(II), dicho desplazamiento solamente es apreciable cuando la reducción

de la intensidad de la fluorescencia es superior al 50 %. Sin embargo, en presencia de Ag(I) y Hg(II), el máximo de emisión se desplaza incluso a concentraciones de metal muy bajas, que apenas afectan a la intensidad de la fluorescencia. Así, cuando la reducción de la intensidad de la fluorescencia es de un 20 %, $\Delta\lambda$ es de 3 nm en presencia de Hg(II) y 8 nm en presencia de Ag(I) (Figura 24).

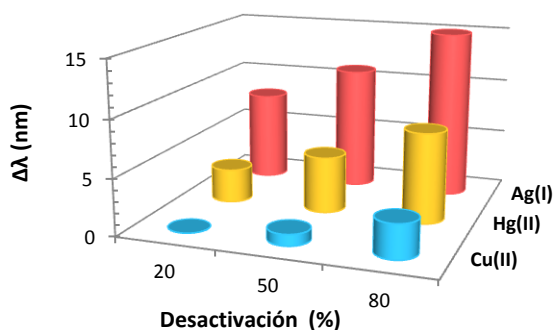


Figura 24. Desplazamiento batocrómico del máximo de emisión ($\Delta\lambda$, nm) frente al % de desactivación para PC4 en presencia de Cu(II), Ag(I) y Hg(II).

En la Figura 25 se muestran las representaciones de Stern-Volmer para PC4 en presencia de los diferentes cationes metálicos. Para Cu(II) dicha representación es lineal, poniendo de manifiesto que la desactivación de la fluorescencia ocurre mediante un único mecanismo (dinámico o estático). Sin embargo, para los otros cationes metálicos ensayados existe una desviación de la linealidad. Todos ellos se ajustan a ecuaciones de orden tres, lo que pone de manifiesto la existencia simultánea de mecanismos de desactivación estáticos y dinámicos, así como otros factores.

En la Figura 26 se muestran las rectas de calibrado para Ag(I) y Hg(II), a partir de las cuales se calcularon los valores de LOD Y LOQ, así como otros parámetros de interés (Tabla 4). Para Cu(II) se utilizó la recta obtenida en la representación de Stern-Volmer (Figura 25). En el caso de Cd(II) no fue posible obtener un buen ajuste.

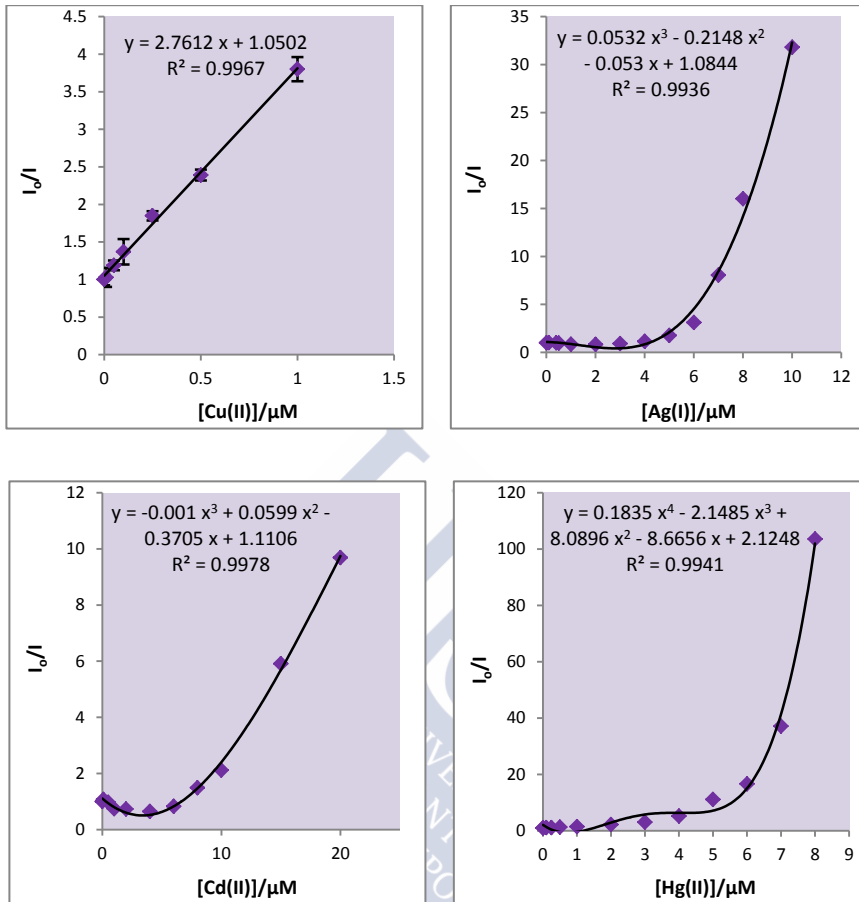


Figura 25. Representaciones de Stern-Volmer (I_0/I frente a $[M^{n+}]$) para PC4 y diferentes cationes metálicos.

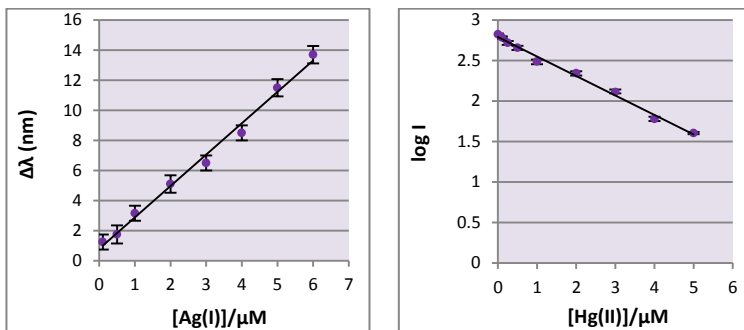


Figura 26. Recta de calibrado para Ag(I) y Hg(II) con PC4.

Tabla 4. Parámetros de interés para la determinación de M^{n+} con PC4.

Metal	Recta de calibrado	R^2	R	Rango lineal (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)
Cu(II)	$I_o/I = 2.7612 C + 1.052$	0.9967	0.9983	0.01-1	0.0181	0.0605
Ag(I)	$\Delta\lambda = 2.0831 C + 0.8081$	0.9923	0.9961	0.1-6	0.752	2.510
Hg(II)	$\log I = -0.2409 C + 2.7917$	0.9930	0.9965	0.1-5	0.0912	0.304

A diferencia de los de PCs anteriores, el límite de detección más bajo fue el obtenido para Cu(II).

4.2.1.5 Puntos cuánticos TGA·DMPS-CdTe/DMSA-ZnS (PC5)

En las Figuras 27 y 28 se muestra el efecto de los diferentes cationes metálicos ensayados, a diversas concentraciones, sobre la intensidad de la fluorescencia de estos PCs.

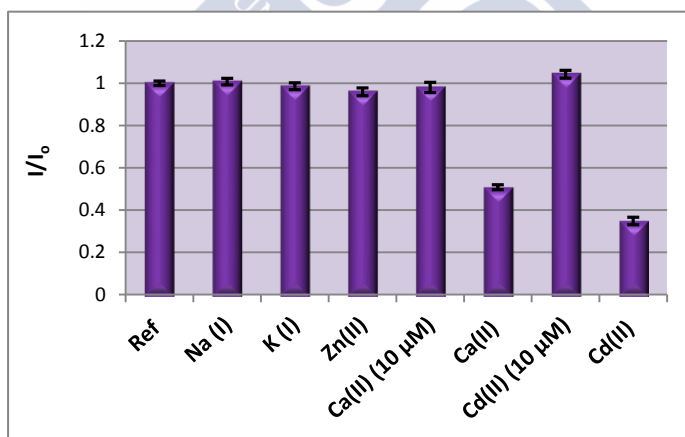


Figura 27. Efecto de los cationes Na(I), K(I), Ca(II), Zn(II) y Cd(II) (100 μM , excepto los indicados) en la intensidad de la fluorescencia de PC5.

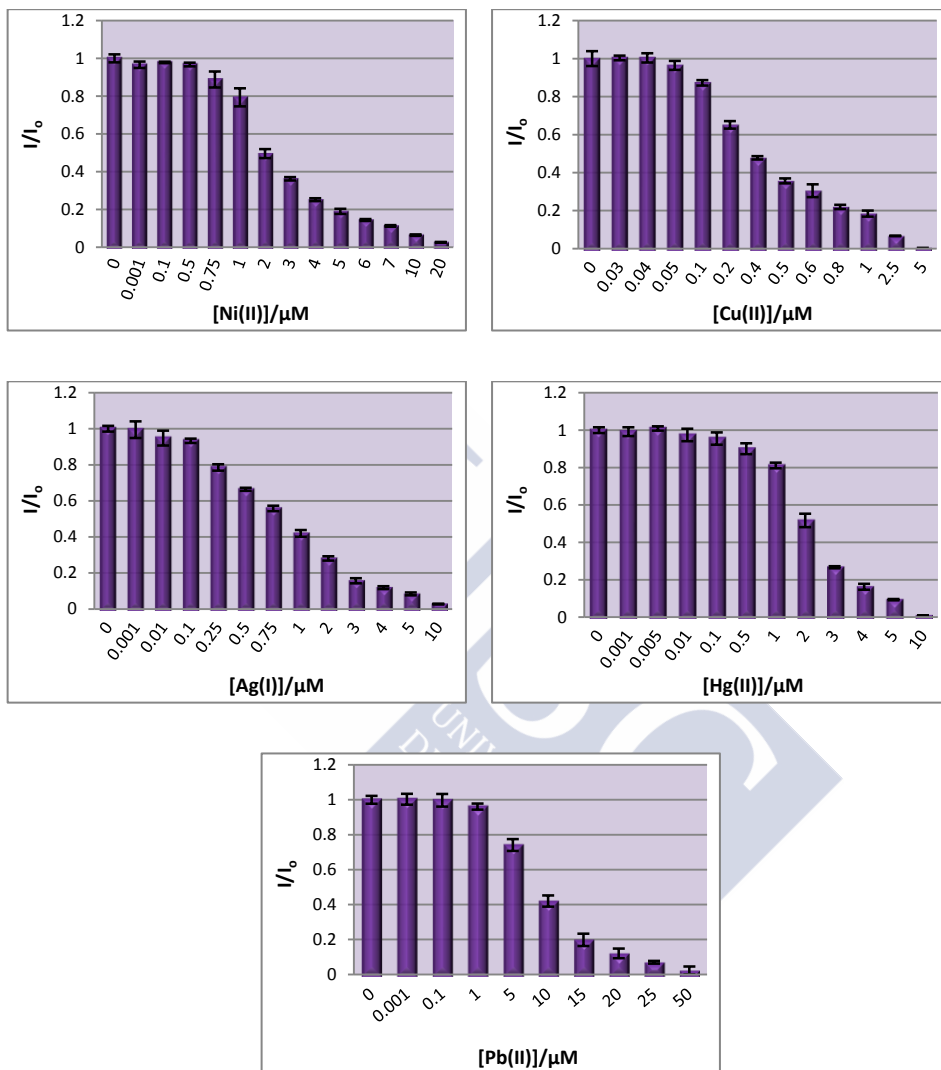


Figura 28. Intensidad relativa de la fluorescencia de PC5 a diferentes concentraciones de los cationes Ni(II), Cu(II), Ag(I), Hg(II) y Pb(II).

Mientras concentraciones 100 μM de Na(I), K(I) y Zn(II) no afectan significativamente a las propiedades fluorescentes de estos PCs, Ca(II) y Cd(II) si ejercen efectos significativos a esta concentración (Figura 27), si bien a 10 μM desaparecen. Sin embargo Ni(II), Cu(II), Ag(I), Hg(II) y Pb(II) producen una disminución progresiva de la intensidad de la fluorescencia a medida que se

incrementa su concentración (Figura 28). No obstante, tal y como se muestra en la Figura 29, cabe destacar que estos PCs son más sensibles a la presencia de Cu(II). A una concentración 0.1 μM de metal ya se produce una reducción de la intensidad superior al 10 %. A esta misma concentración, en presencia de Ag(I), no se producen cambios significativos. Cuando se duplica la concentración, Cu(II) produce una desactivación del 40 %, mientras que con Ag(I) solamente de un 20 %. Para que los efectos ejercidos por Ni(II), Hg(II) y Pb(II) sean apreciables se requieren concentraciones en torno a 1 μM o mayores.

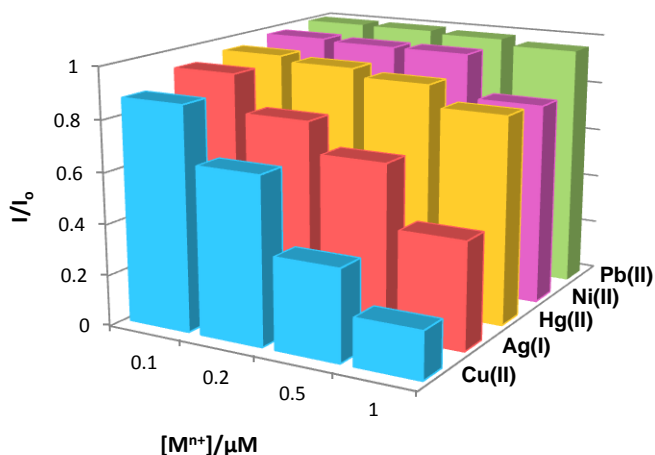


Figura 29. Comparación del efecto ejercido por diferentes cationes metálicos en la intensidad de la fluorescencia de PC5.

Cuando aumenta la concentración de los cationes Ag(I), Hg(II) y Pb(II) se produce un desplazamiento batocrómico del máximo de emisión. Para Pb(II) dicho desplazamiento es poco significativo, y solo es apreciable cuando la reducción de la fluorescencia es mayor del 50 %. Sin embargo, en presencia de Ag(I) y Hg(II) el máximo de emisión comienza a desplazarse cuando la reducción de la intensidad de la fluorescencia es de tan solo un 10 % (Figura 30). Cabe destacar que dicho desplazamiento es mucho más acusado para Ag(I), ya que

una concentración cercana a 0.25 μM ya produce un $\Delta\lambda$ de 3 nm y a medida que se incrementa $[\text{Ag(I)}]$ el desplazamiento aumenta considerablemente (Figura 31).

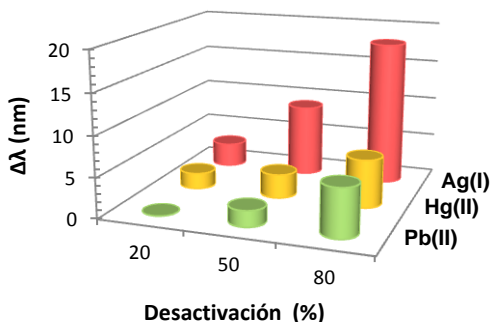


Figura 30. Desplazamiento batocrómico del máximo de emisión ($\Delta\lambda$, nm) frente al % de desactivación para PC5 en presencia de Ag(I), Hg(II) y Pb(II).

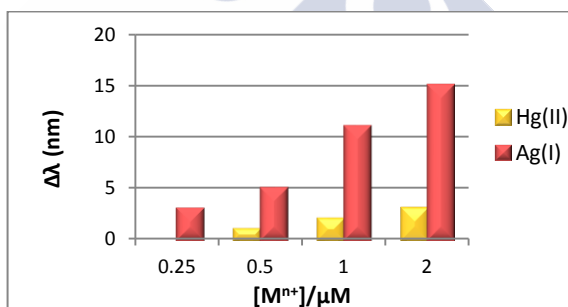


Figura 31. Desplazamiento batocrómico del máximo de emisión ($\Delta\lambda$, nm) de PC5 en presencia de diferentes concentraciones de Ag(I) y Hg(II).

Las representaciones de Stern-Volmer (Figura 32) se desvían de la linealidad en todos los casos. Para Ag(I) se ajusta a una ecuación de segundo orden, poniendo de manifiesto la existencia simultánea de mecanismos de desactivación estáticos y dinámicos, mientras que para Ni(II), Cu(II), Hg(II) y Pb(II) se ajustan a ecuaciones de mayor orden, sugiriendo la presencia de ambos mecanismos de desactivación, además de la presencia de otros factores.

En la Figura 33 se representan las rectas de calibrado y en la Tabla 5 se recogen otros parámetros de interés.

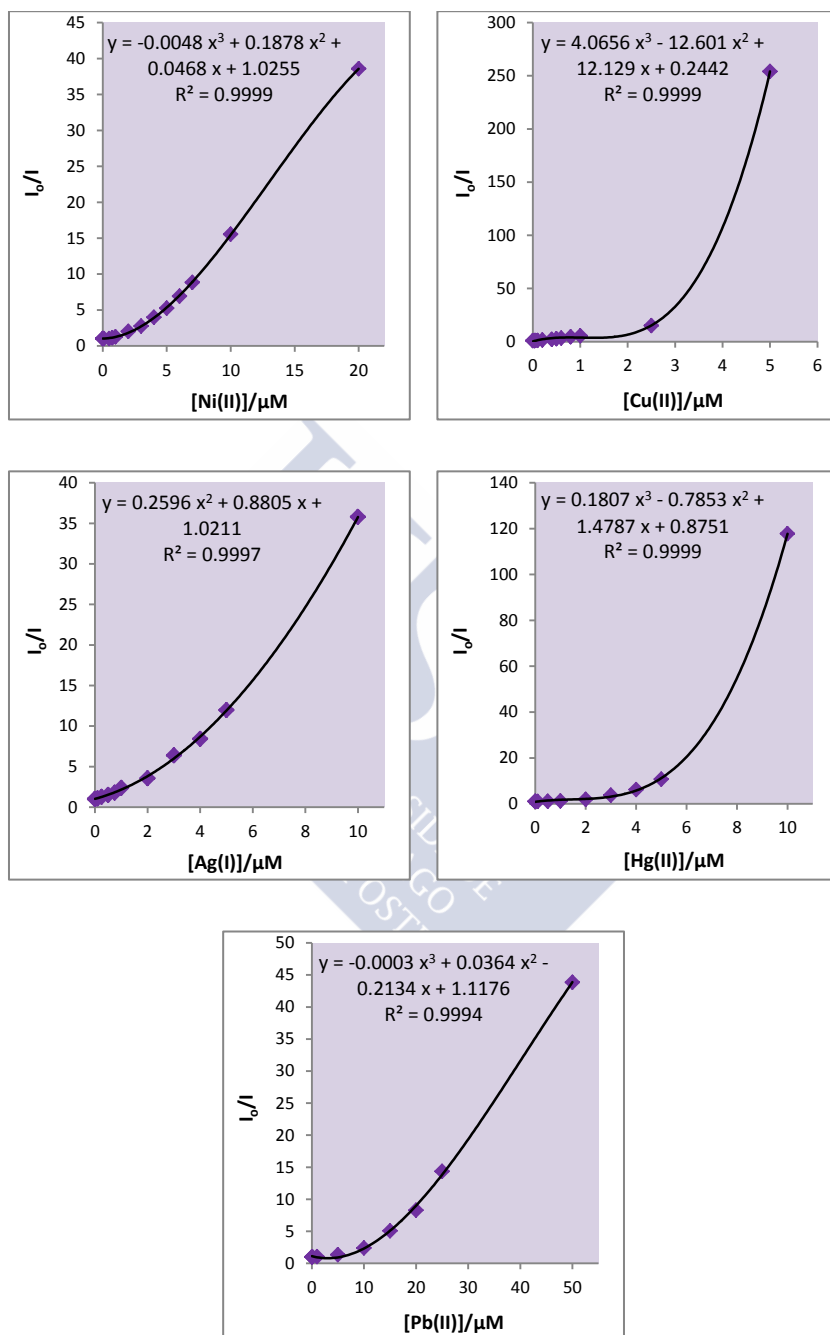


Figura 32. Representaciones de Stern-Volmer (I_0/I frente a $[M^{n+}]$) para PC5 y diferentes cationes metálicos.

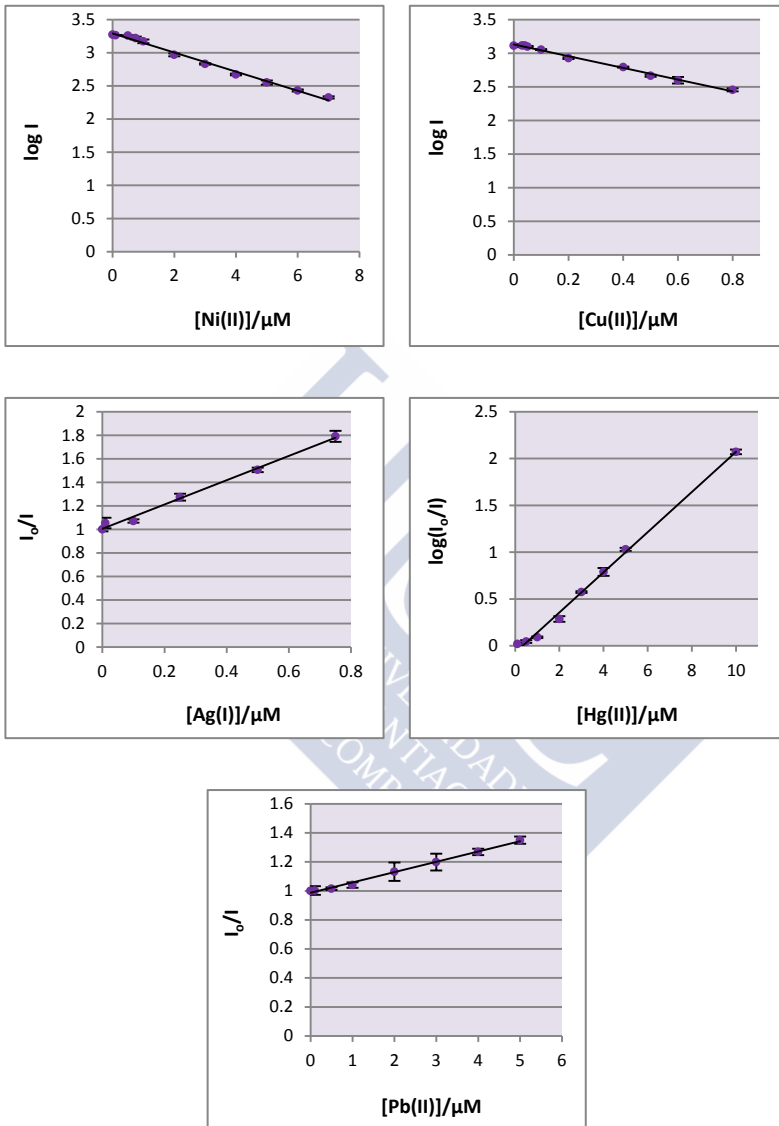


Figura 33. Rectas de calibrado para los cationes metálicos que producen una desactivación de la fluorescencia de PCs.

Tabla 5. Parámetros de interés para la determinación de M^{n+} con PC5.

Metal	Recta de calibrado	R ²	R	Rango lineal (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)
Ni(II)	$\log I = -0.1441 C + 3.2909$	0.9923	0.9961	0.1-7	0.06	0.2
Cu(II)	$\log I = -0.8739 C + 3.131$	0.9939	0.9970	0.03-0.8	0.02	0.066
Ag(I)	$I_o/I = 1.0313 C + 1.00059$	0.993	0.9965	0.01-0.75	0.019	0.06
Hg(II)	$\log(I_o/I) = 0.2144 C - 0.0729$	0.9960	0.9980	0.1-10	0.067	0.207
Pb(II)	$I_o/I = 0.0712 C + 0.9873$	0.9946	0.9973	0.1-5	0.415	1.383

Para todos los metales se obtuvieron ajustes con un coeficiente de regresión (R) superior a 0.995. Este PC mostró una sensibilidad elevada y análoga a Cu(II) y Ag(I).

4.2.1.6 Puntos cuánticos TGA·DMPS-CdTe/DMPS-CdS (PC6)

En las Figuras 34 y 35 se muestra el efecto que ejercen los diferentes cationes metálicos ensayados sobre la intensidad de la fluorescencia de estos PCs.

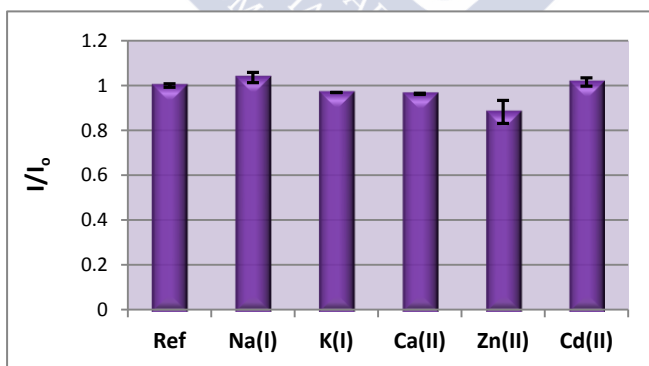


Figura 34. Efecto de los cationes Na(I), K(I), Ca(II), Zn(II) y Cd(II) (100 μM) en la intensidad de la fluorescencia de PC6.

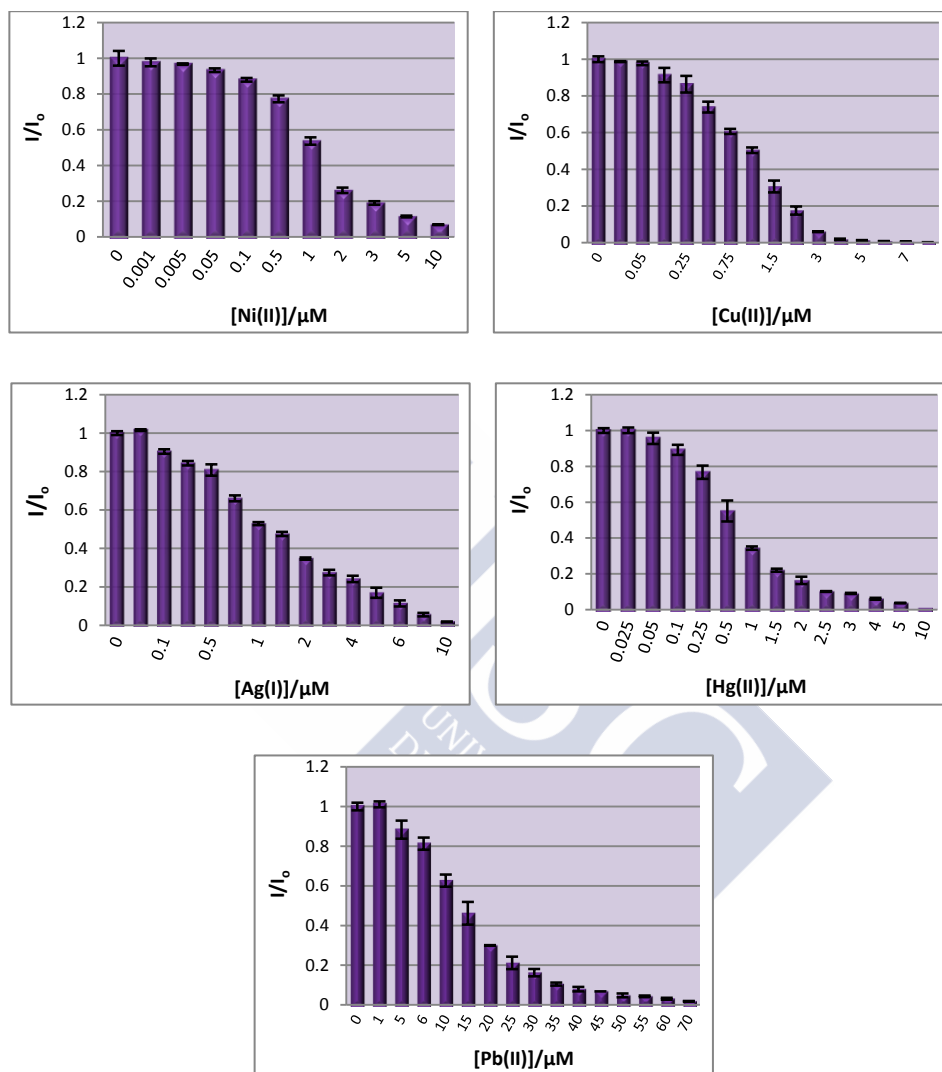


Figura 35. Intensidad relativa de la fluorescencia de PC6 a diferentes concentraciones de los cationes Ni(II), Cu(II), Ag(I), Hg(II) y Pb(II).

Concentraciones 100 μM de Na(I), K(I), Ca(II), Zn(II) y Cd(II) no afectan a las propiedades fluorescentes de estos sistemas (Figura 34). Ni(II), Cu(II), Ag(I), Hg(II) y Pb(II) producen una disminución progresiva de la intensidad de la fluorescencia a medida que se incrementa su concentración (Figura 35).

Ni(II), Cu(II), Ag(I) y Hg(II) a concentración 0.25 μM producen una reducción de la intensidad de la fluorescencia en torno al 10-20 %. Sin embargo, a medida que se incrementa la concentración, la disminución de la intensidad de la fluorescencia es más acusada en presencia de Hg(II). Así, a una concentración 0.5 μM de metal la intensidad de la fluorescencia se reduce en un 50 % en el caso de Hg(II), y en un 20-30 % en el caso de Cu(II) y Ag(I). Para Pb(II) se requieren concentraciones superiores a 2 μM para que se produzcan cambios significativos en la fluorescencia de PC6 (Figura 36).

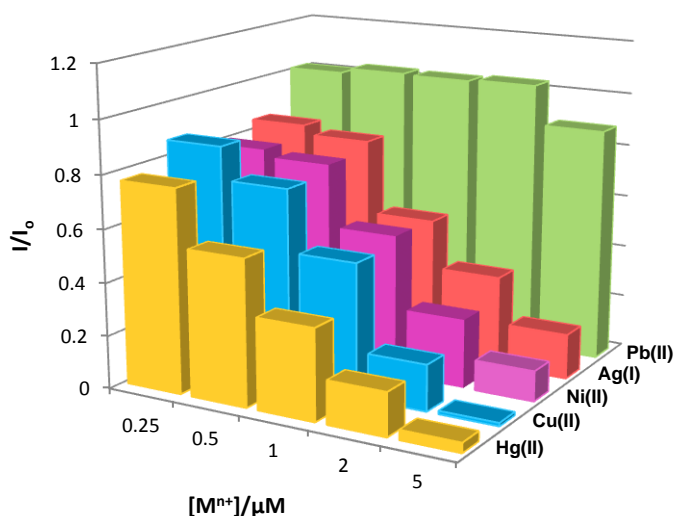


Figura 36. Comparación del efecto ejercido por diferentes cationes metálicos en la intensidad de la fluorescencia de PC6.

El aumento de la concentración de los cationes Ni(II), Cu(II), Ag(I), Hg(II) y Pb(II) produce también un desplazamiento batocrómico del máximo de emisión. Para Ni(II), Cu(II) y Pb(II) dicho desplazamiento es poco significativo, siendo únicamente apreciable cuando se produce una reducción de la fluorescencia próxima al 80 %. Para Hg(II) el desplazamiento empieza a ser relevante cuando la desactivación es del 50 % (desplazamiento del máximo de emisión de 3 nm), sin embargo, a la misma desactivación en presencia de Ag(I) ya se produce un desplazamiento del máximo de emisión de 12 nm (Figuras 37 y 38).

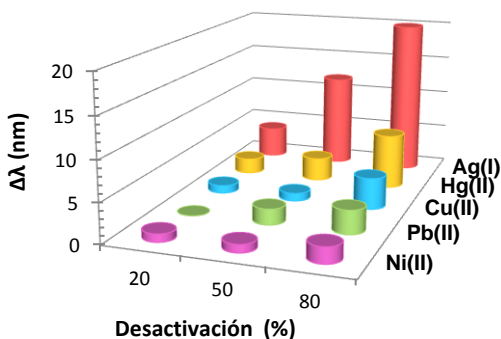


Figura 37. Desplazamiento batocrómico del máximo de emisión ($\Delta\lambda$, nm) frente al % de desactivación de PC6 en presencia de diferentes cationes metálicos.

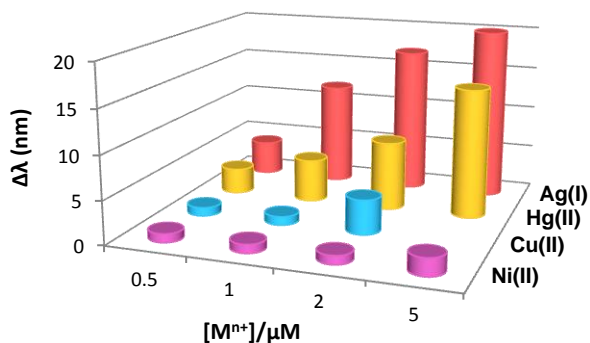


Figura 38. Desplazamiento batocrómico del máximo de emisión ($\Delta\lambda$, nm) para PC6 en presencia de diferentes concentraciones de diversos cationes metálicos.

En la Figura 39 se muestran las representaciones de Stern-Volmer para PC6 y los diferentes metales. Para Ni(II) dicha representación es lineal, poniendo de manifiesto un único tipo de mecanismo de desactivación (estático o dinámico). Sin embargo, para el resto de cationes existe una desviación de la linealidad. La representación para Hg(II) se ajusta a una ecuación de segundo orden, lo que implica la existencia simultánea de mecanismos de desactivación estáticos y dinámicos. Sin embargo, Cu(II), Ag(I) y Pb(II) se ajustan a ecuaciones de mayor orden, lo que indica una complejidad aún mayor de los mecanismos de desactivación.

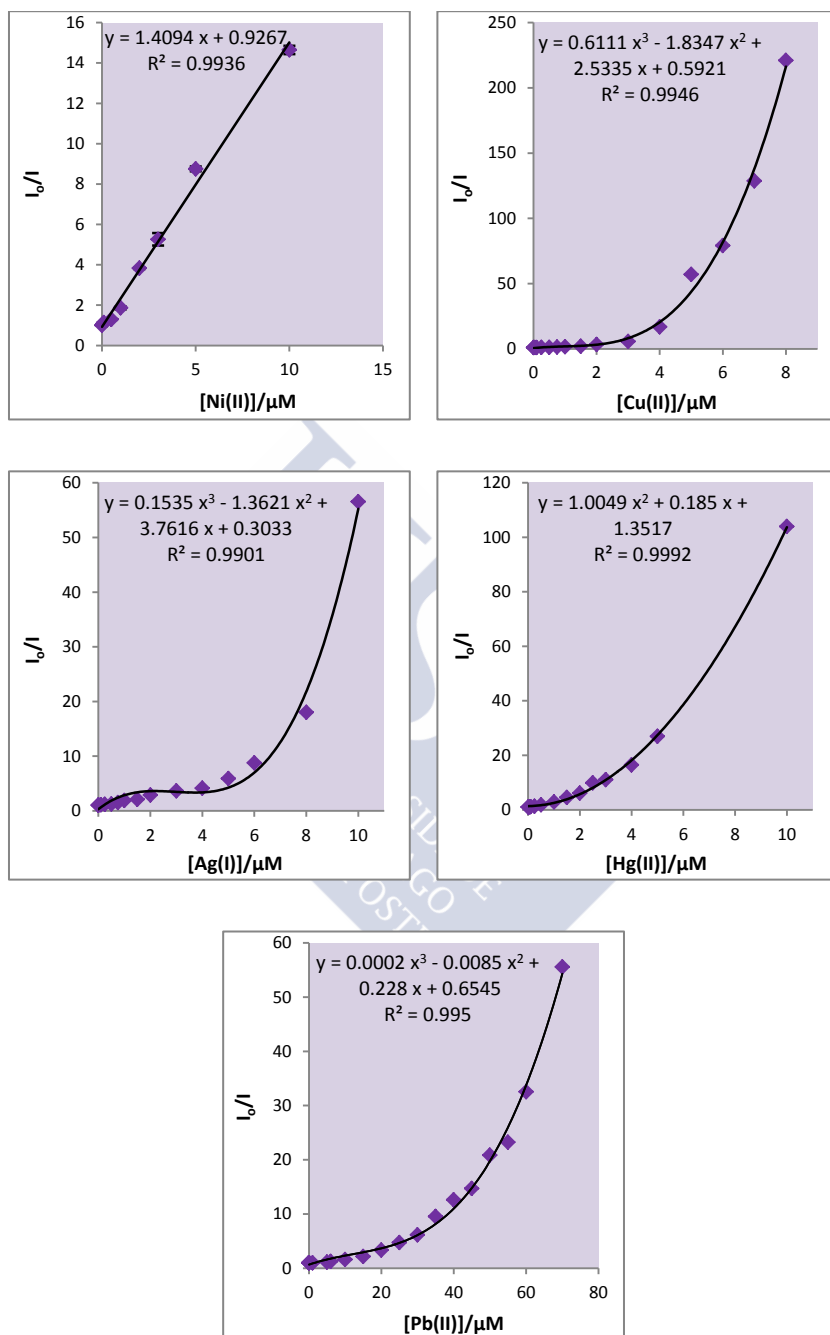


Figura 39. Representaciones de Stern-Volmer (I_0/I frente a $[M^{n+}]$) para PC6 frente a diferentes cationes metálicos.

En la Figura 40 se representan las rectas de calibrado. En el caso de Ni(II) se utilizó la recta obtenida al representar la ecuación de Stern-Volmer (Figura 39). En la Tabla 6 se recogen otros parámetros de interés.

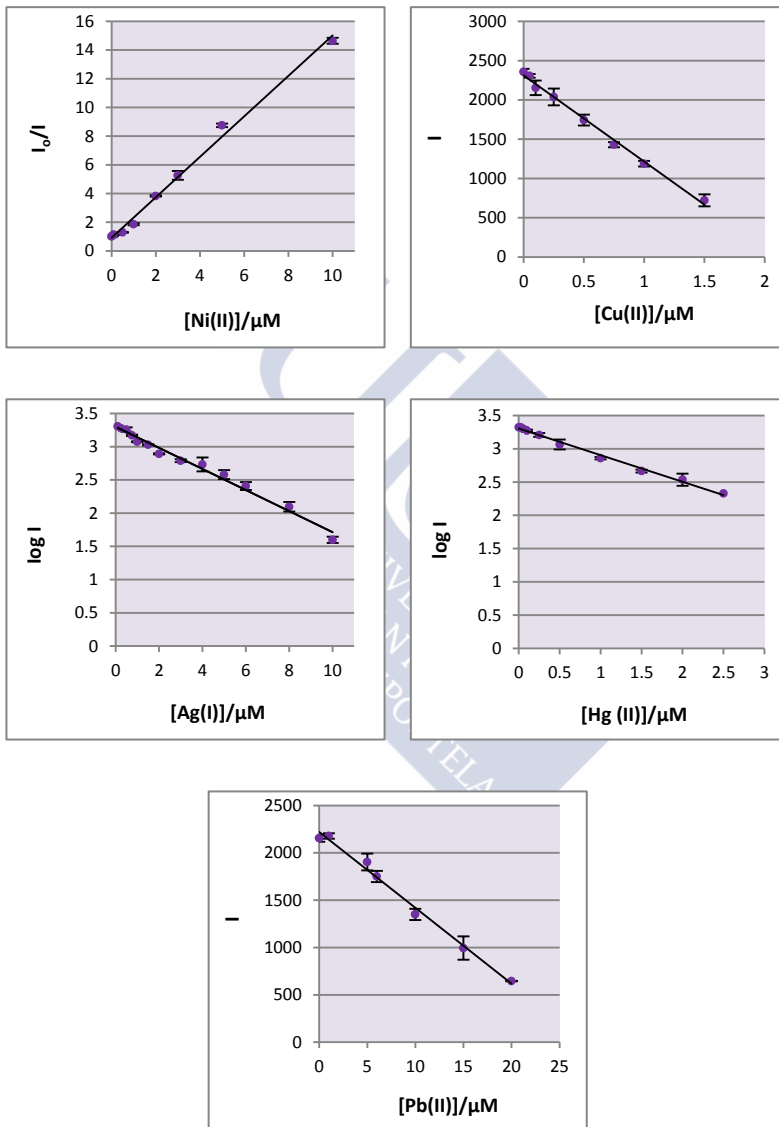


Figura 40. Rectas de calibrado para los cationes metálicos que producen una desactivación de la fluorescencia de PC6.

Tabla 6. Parámetros de interés para la determinación de M^{n+} con PC6.

Metal	Recta de calibrado	R ²	R	Rango lineal (μM)	LOD (μM)	LOQ (μM)
Ni(II)	$I_0/I = 1.4094 C + 0.9267$	0.9936	0.9968	0.05-10	0.0108	0.0359
Cu(II)	$I = -1096.2 C + 2311$	0.9940	0.9970	0.05-1.5	0.0335	0.112
Ag(I)	$\log I = -0.1586 C + 3.2994$	0.9845	0.9922	0.1-10	0.0359	0.120
Hg(II)	$\log I = -0.4005 C + 3.3056$	0.9930	0.9965	0.025-2.5	0.0156	0.052
Pb(II)	$I = -80.08 C + 2220.1$	0.9909	0.9954	1-20	1.1	3.65

Se obtuvieron buenos ajustes para todos los metales, si bien en el caso de la Ag(I) R es ligeramente inferior a 0.995. Para este PC los límites de detección más bajos se obtienen para Ni(II) y Hg(II).

4.2.2 Análisis comparativo del efecto ejercido por cada catión metálico sobre la fluorescencia de los PCs.

4.2.2.1 Mercurio(II)

Como ya se mencionó anteriormente, la intensidad de la fluorescencia de los diferentes PCs sintetizados se ve afectada por la presencia de Hg(II), si bien, existen diferencias que caben ser mencionadas y se ponen de manifiesto en la Figura 41.

En general los PCs que contienen DMPS como ligando estabilizante son mucho más sensibles a la presencia de dicho catión metálico; es decir, sufren una reducción de la intensidad de la fluorescencia (I/I_0) mayor a concentraciones bajas y poseen unos límites de detección y cuantificación menores (Tabla 6).

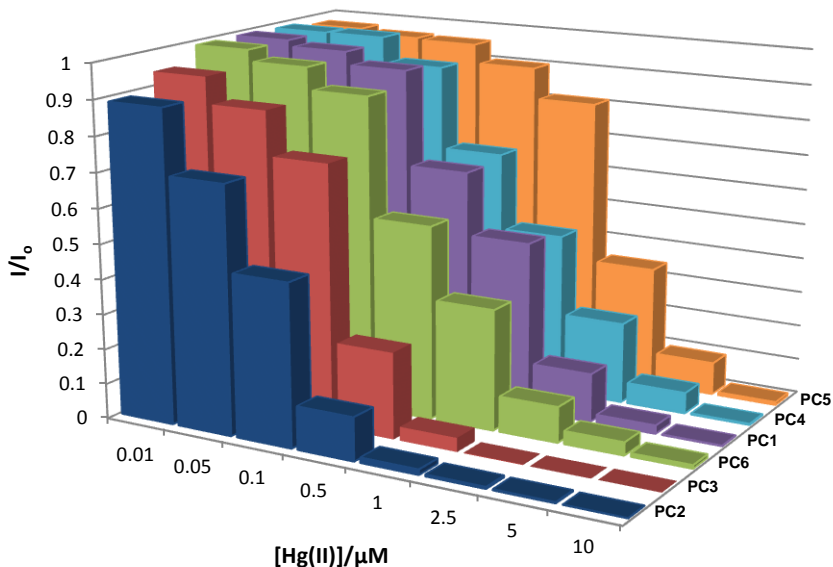


Figura 41. Comparación del efecto ejercido por la presencia de diferentes concentraciones de Hg(II) en la fluorescencia de los PCs sintetizados.

Tabla 6. Límites de detección y cuantificación de Hg(II) para los diferentes PCs.

PC	LOD (μM)	LOQ (μM)
PC1	0.0534	0.178
PC2	0.00436	0.0145
PC3	0.0119	0.0398
PC4	0.0912	0.304
PC5	0.067	0.207
PC6	0.0156	0.052

Cabe destacar, sobre todo, a PC2 en el que ya se produce una reducción superior al 10 % con una concentración 0.01 μM de metal. Su límite de detección es comparable, o incluso más bajo, al de otros sistemas de CdTe análogos

(Tabla 7)¹⁰⁻¹⁴ e inferior al límite tolerable de mercurio en agua permitido por la OMS (Organización Mundial de la Salud, 5 nM) o la EPA (Agencia Americana de Protección Medioambiental, 10 nM). Sin embargo, son necesarias concentraciones 10 veces superiores para que se observen cambios significativos en la fluorescencia de los puntos cuánticos PC1, PC4 y PC6, y 100 veces mayores para que PC5 se vea apreciablemente afectado por la presencia del metal.

Tabla 7. Límites de detección de Hg(II) para diferentes sistemas CdTe.

PC	LOD (nM)	Ref
Ácido 3-mercaptopropiónico-CdTe	2.7	10
L-Cisteamina-CdTe	4	11
Glutathiona-CdTe	5	12
N-Acetil-L-cisteína-CdTe	8	13
Cisteamina-CdTe	70	14
PC2	4.4	

A medida que se reduce la intensidad de la fluorescencia también se produce un desplazamiento del máximo de emisión, aunque dicho desplazamiento, sobre todo en el caso de PC2, es poco significativo (Tabla 8).

Tabla 8. Desplazamiento del máximo de emisión ($\Delta\lambda$, nm) de los diferentes PCs preparados a diferentes porcentajes de desactivación en presencia de Hg(II).

Desactivación (%)	$\Delta\lambda$ (nm)					
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
20	2	0	1	2	3	2
50	5	2	5	3	5	3
80	7	3	9	7	8	5

¹⁰ J. Duan, L. Song, J. Zhan, *Nano Res.*, 2 (2009) 61.

¹¹ X. Ding, L. Qu, R. Yang, Y. Zhou, J. Li, *Luminescence*, 30 (2015) 465.

¹² X. Zhu, Z. Zhao, X. Chi, J. Gao, *Analyst*, 138 (2013) 3230.

¹³ T. Yang, Q. He, Y. Liu, Ch. Zhu, D. Zhao, *J. Anal. Method. Chem.*, (2013) 902951.

¹⁴ J. Pei, H. Zhu, X. Wang, H. Zhang, X. Yang, *Anal. Chim. Acta*, 757 (2012) 63.

Los mecanismos previamente propuestos para describir la interacción de Hg(II) y PCs análogos a los aquí sintetizados son: i) la interacción con los ligandos de la superficie del PC y posterior transferencia de carga, lo que facilita la recombinación no radiante de los excitones;¹⁵⁻¹⁸ ii) la formación de sulfuros o telururos de mercurio por desplazamiento de los átomos de Cd(II) o Zn(II) presentes en la superficie del PC, debido a que el producto de solubilidad de los calcogenuros (S^{2-} , Te^{2-}) de mercurio es mucho menor que el de los telururos y sulfuros de cadmio y zinc, lo que va, además, acompañado de un desplazamiento batocrómico del máximo de emisión;¹⁹ y iii) la pérdida de los ligando que recubren la superficie del PC, creándose imperfecciones que provocan una disminución del rendimiento cuántico y que finalmente pueden causar la agregación de las nanopartículas.^{12,20} Esta agregación cuando es extensa también puede conducir al desplazamiento hacia el rojo del máximo de emisión.

Aunque como se dedujo a partir de las representaciones de Stern-Volmer (ver Apartado 4.2.1) probablemente coexistan diferentes mecanismos de desactivación. El predominante en estos PCs, fundamentalmente en PC2, podría ser la pérdida de los ligandos de la superficie, ya que debido a la naturaleza “blanda” del mercurio, la posibilidad de la formación de complejos a través de grupos tiol, tanto del DMPS como el DMSA, es elevada. Esto es coherente con el elevado rango lineal para PC2 de las ecuaciones de Stern- Volmer (ver Apartado 4.2.1.2) y de Lineweaver-Burk²¹ (Figura 42), y el escaso desplazamiento del máximo de emisión. El desplazamiento batocrómico existente en los restantes PCs podría justificarse por la aglomeración de los mismos, lo que conllevaría un aumento del radio del excitón Bohr, aunque no puede descartarse la formación de los correspondientes telururos o sulfuros de mercurio.

¹⁵ J. Wang, N. Li, F. Shao, H. Han, *Sensor. Actuat. B: Chem.*, 270 (2015) 74.

¹⁶ Q. Mu, Y. Li, H. Xu, Y. Ma, W. Zhu, X. Zhong, *Talanta*, 119 (2014) 564.

¹⁷ H. Tao, X. Liao, M. Xu, S. Li, F. Zhong, Z. Yi, *J. Luminescence*, 145 (2014) 376.

¹⁸ Y.-S. Xia, Ch.-Q. Zhu, *Talanta*, 75 (2008) 215.

¹⁹ K. Zhang, Y. Yu, S. Sun, *Appl. Surf. Sci.*, 276 (2013) 333.

²⁰ L. Xu, J. Hao, T. Yi, Y. Xu, X. Niu, C. Ren, H. Chen, X. Chen, *Electrophoresis*, 36 (2015) 859.

²¹ H. Wu, J. Liang, H. Han, *Microchim. Acta*, 161 (2008) 81.

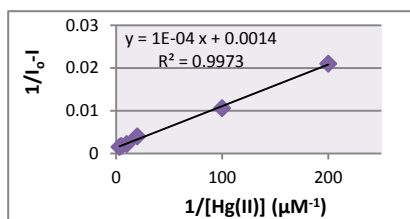


Figura 42. Representación de Lineweaver-Burk.

Dado que el mecanismo propuesto para la interacción del catión Hg(II) con los diferentes PCs es análogo en todos los casos, la mayor sensibilidad de PC2 podría estar relacionada, al menos en parte, con su tamaño ligeramente inferior al de los demás PCs, lo que conlleva una mayor cantidad de átomos, en proporción, en su superficie, así como un mayor radio de desactivación.^{22,23} Por otra parte, las diferencias existentes entre los otros PCs que incluyen DMPS en el recubrimiento están en concordancia con las constantes de estabilidad de los complejos de Cd y Zn con DMPS.²⁴ Parece razonable que los PCs recubiertos por una coraza ZnS sean más sensibles, dado que la estabilidad del complejo Zn-ligando es ligeramente menor que la del Cd-ligando, y por lo tanto se podría producir más fácilmente la pérdida de dicho ligando.

4.2.2.2 Cobre(II)

El Cu(II) es uno de los cationes metálicos para los que más ampliamente se estudió la interacción con puntos cuánticos como método para su detección por fluorometría.^{25,26} Esto se debe, fundamentalmente, a dos razones: i) el potencial redox Cu(II)/Cu(I) hace este catión metálico muy apropiado para la transferencia efectiva de electrones desde el punto cuántico al metal para formar Cu(I),^{4,27} lo cual generalmente provoca la pérdida de fluorescencia del PC, y ii) Cu²⁺

²² W. Zhong, C. Zhang, Q. Gao, H. Li, *Microchim. Acta*, 176 (2012) 101.

²³ X. Yung-Sheng, C. Chun, Z. Chang-Qing, *Chin. J. Chem.*, 25 (2007) 1836.

²⁴ a) X. Fang, F. Hua, Q. Fernando, *Chem. Res. Toxicol.*, 9 (1996) 284; b) Eds L. G. Sillén, A. E. Martell, *Stability Constants of Metal-Ion Complexes*, 2^aEd, Chemical Society, London (1964); c) Eds D. D. Perrin, *Stability Constants of Metal-Ion Complexes Part b*, IUPAC Chemical Data Series, Pergamon Press, Oxford (1979).

²⁵ Y. Lou, Y. Zhao, J. Chen, J.-J. Zhu, *J. Mater. Chem.*, 2 (2014) 559.

²⁶ P. Wu, T. Zhao, S. Wang, X. Hou, *Nanoscale*, 6 (2014) 43.

²⁷ A.V. Isarov, J. Chrysochoos, *Langmuir*, 13 (1997) 3142.

interacciona fácilmente con la superficie de los PCs debido a la alta constante de afinidad de los complejos ligando-Cu(II). Esto puede conducir al desplazamiento químico de los iones Cd(II) y/o (Zn(II) y a la formación de combinaciones Cu_xE ($x = 1, 2$; $E = S, Se, Te$),²⁷⁻³³ muy insolubles, que facilitan la recombinación no radiante hueco-electrón, provocando la desactivación del PC y en ocasiones el desplazamiento de la banda de emisión hacia el rojo.

La Figura 43 representa la influencia de diferentes concentraciones del catión metálico Cu(II) sobre la intensidad de la fluorescencia de los diferentes PCs preparados, y en la Tabla 9 se recogen los desplazamientos en la posición del máximo de emisión.

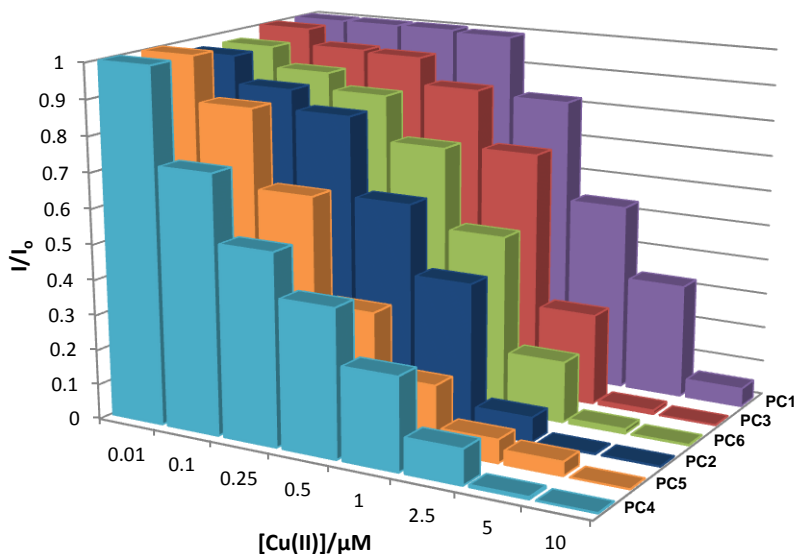


Figura 43. Comparación del efecto ejercido por la presencia de diferentes concentraciones de Cu(II) en la fluorescencia de los PCs sintetizados.

²⁸ A. Eychmuller, A. Hasselbarth, L. Katsikas, H. Weller, *Phys. Chem.*, 95 (1991) 79.

²⁹ Z. Liu, S. Liu, P. Yin, Y. He, *Anal. Chim. Acta*, 745 (2012) 78.

³⁰ Y. Cao, A. Zhang, Q. Ma, N. Liu, P. Yang, *Luminescence*, 28 (2013) 287.

³¹ W. Bian, F. Wang, H. Zhang, L. Zhang, L. Wang, S. Shuang, *Luminescence*, 30 (2015) 1064.

³² X. Wang, Z. Fang, J. Liu, X. Zhong, B. Ye, *Chin. J. Chem.*, 28 (2010) 1005.

³³ Y. Wang, J. Lu, Z. Tong, H. Huang, *J. Chil. Chem. Soc.*, 54 (2009) 274.

Tabla 9. Desplazamiento hacia el rojo del máximo de emisión ($\Delta\lambda$, nm) provocado por Cu(II) a diferentes porcentajes de desactivación.

Desactivación (%)	$\Delta\lambda$ (nm)					
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
20	0	0	0	0	1	1
50	0	3	1	0	1	1
80	0	5	7	5	1	4

Según muestra la Figura 43 , y como ya se comentó en el Apartado 4.2.1, la presencia de Cu(II) reduce, en mayor o menor medida, la intensidad de la fluorescencia de todos los PCs preparados, si bien se observan algunas diferencias que también se ponen de manifiesto por los valores de los límites de detección y de cuantificación (Tabla 10). Así, los PCs PC4 y PC5, que muestran las mayores reducciones en la intensidad de la emisión (valores de I/I_0 menores) a concentraciones más bajas, son también los que muestran los mejores límites de detección, de 18 y 20 nM, respectivamente. El valor ligeramente más bajo para PC4 es razonable teniendo en cuenta que una concentración 50 nM produce una reducción de la fluorescencia del 18 % en PC4 y del 5 % en PC5. Los otros tres PCs para los que se pudo hacer el análisis de la regresión muestran límites de detección muy similares entre ellos (33-36 nM), como es de esperar por el comportamiento de los valores de I/I_0 a las concentraciones más bajas de catión metálico.

Tabla 10. Límites de detección y de cuantificación de Cu(II) para los diferentes PCs.

PC	LOD (μM)	LOQ (μM)
PC1	0.246	0.819
PC2	0.0353	0.118
PC3	0.0362	0.1205
PC4	0.0181	0.0605
PC5	0.020	0.066
PC6	0.0335	0.112

Estos valores caen dentro del rango de los encontrados para otros sistemas análogos CdTe o CdTe/MS (M=Cd, Zn) previamente publicados (Tabla 11) y, en cualquier caso, son inferiores a la concentración máxima de cobre permitida en agua de bebida por la OMS (31.5 μ M) o la EPA (20 μ M).

Tabla 11. Límites de detección de Cu(II) para algunos PCs CdTe y CdTe/MS (M = Zn, Cd).

PC	LOD (nM)	Ref
Ácido tioglicólico-CdTe	0.04	4
L-Cisteína-CdTe	150	33
Ácido 3-mercaptopropionico-CdTe	56	32
D-penicilamina-CdTe	0.4	34
SiO ₂ -ácido tioglicólico-CdTe	42.37	30
Ácido tioglicólico-CdTe	7.6	35
Ácido 3-mercaptopropionico-CdTe/ZnS	1.5	31
Ácido tioglicólico, glifosato-CdTe/CdS	20.5	29

Los valores de I/I_0 y de los límites de detección muestran que aquellos PCs que contienen el ligando DMSA formando parte del recubrimiento, son más sensibles a la presencia de Cu(II) que aquellos que no lo contienen. En particular, PC4 es dos veces más sensible que su análogo con el ligando DMPS, PC3, poniendo de manifiesto la importancia de los ligandos en la interacción entre el PC y el catión metálico. En relación con esto, apuntar que la pequeña diferencia en los LODs obtenidos con PC4 y PC5, pudiera estar relacionada con la presencia de una pequeña cantidad de DMPS en PC5 (ver espectros IR, Apartado 3.4.1, Figura 19).

Los puntos cuánticos PC2, PC3, PC4 y PC6 muestran ligeros desplazamientos en la posición del máximo de la banda de emisión (Tabla 9) a medida que aumenta la concentración de Cu(II) y el porcentaje de reducción de la fluorescencia. Estos desplazamientos, cuando se producen, solo son

³⁴ R. Mohammad-Rezaei, H. Razmi, H. Abdolmohammad-Zadeh, *Luminiscence*, 28 (2013) 503.

³⁵ H. Wang, S. Yan, W. Wang, L. Wang, F. Yang, *Adv. Materials Res.*, 610 (2013) 1060.

significativos a porcentajes de desactivación elevados, cuando la concentración de Cu(II) es 1 μM o mayor, a la que probablemente ya se estén depositando sulfuros o telururos de cobre (Cu_xS , Cu_xTe , $x= 1, 2$) sobre la superficie de los PCs.

Si bien los datos disponibles no permiten determinar de manera fehaciente el mecanismo por el cual el Cu(II) provoca la reducción de la fluorescencia de los PCs preparados, probablemente éste pueda ser análogo al propuesto previamente en sistemas similares^{4,36} y que implica uno o los dos procesos previamente comentados al inicio de este apartado.

Por otra parte, teniendo en cuenta la naturaleza de los ligandos DMPS y DMSA (ambos son ditioles) y la elevada estabilidad de los enlaces Cu-S, no puede descartarse que el Cu(II) compita por ellos con el cadmio o con el cinc, pudiendo provocar la descomposición parcial de los PCs, contribuyendo así a la formación de nuevas trampas para el excitón.^{37,38}

4.2.2.3 Plata(I)

Todos los PCs sintetizados se ven afectados por la presencia de Ag(I), si bien cabe destacar la existencia de diferencias en cuanto a sus límites de detección y cuantificación, así como a su comportamiento en presencia del metal (Figura 44).

En la Tabla 12 se recogen los límites de detección y cuantificación. Los puntos cuánticos PC5 y PC6 son los que presentan límites de detección más bajos, coherente con que ambos son los que necesitan una concentración menor de Ag(I) para que la intensidad de su fluorescencia se vea afectada (Figura 44). Dichos LODs son, además, comparables con los de otros sistemas CdTe análogos (Tabla 13)^{9,39-41}.

³⁶ M. Liu, H. Zhao, S. Chen, H. Wang, X. Quan, *Inorg. Chim. Acta*, 392 (2012) 236.

³⁷ P. Wang, X. Ma, M. Su, Q. Hao, J. Lei, H. Ju; *Chem. Commun.*, 48 (2012) 10216.

³⁸ L. Zhang, L. Shang, S. Dong, *Electrochem. Commun.*, 10 (2008) 1452.

³⁹ H. Jiao, L. Zhang, Z. Liang, G. Peng, H. Lin, *Microchim. Acta*, 181 (2014) 1393.

⁴⁰ Ch. Cai, H. Cheng, Y. Wang, H. Bao, *RSC Adv.*, 4 (2014) 59157.

⁴¹ J. Wang, J. Liang, Z. Sheng, H. Han, *Microchim. Acta*, 167 (2009) 281.

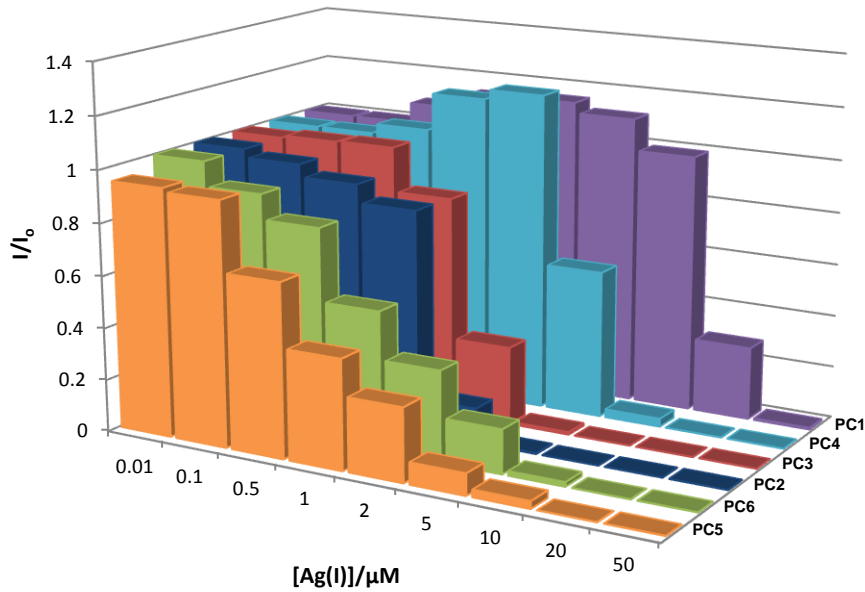


Figura 44. Comparación del efectos ejercido por Ag(I) en la fluorescencia de los PCs sintetizados.

Tabla 12. Límites de detección y cuantificación de Ag(I) para los diferentes PCs.

PC	LOD (μM)	LOQ (μM)
PC2*	0.0640	0.213
PC3*	0.0808	0.269
PC4*	0.752	2.510
PC5	0.019	0.06
PC6	0.0359	0.120

*LODs Y LOQs calculados a partir de $\Delta\lambda$

Tabla 13. Límites de detección de Ag(I) para diferentes sistemas CdTe.

PC	LOD (nM)	Ref
Homocisteína-CdTe	8.3	39
Ácido mercaptopropiónico-CdTe	41	9
Ácido tioglicólico-CdTe	50	41
Ácido mercaptosuccínico-CdTe	54	40
PC5	19	

En los puntos cuánticos PC1 y PC4 se produce, inicialmente, un incremento de la fluorescencia. Esto podría atribuirse a la adsorción de iones Ag(I) y formación de los correspondientes sulfuros o telururos que pasivan los defectos superficiales existentes debidos a la insaturación de los iones de Te^{2-} o S^{2-} , pudiendo ayudar, además, a la inmovilización de los ligandos que recubren la superficie del PC. Una vez saturados dichos defectos el exceso de Ag(I) facilita la recombinación no radiante dando lugar al decaimiento de la fluorescencia.⁴²⁻⁴⁴ En el resto de los PCs se observa únicamente este segundo fenómeno. Debido a la baja solubilidad de Ag_2Te y Ag_2S , comparada con la de CdS o CdTe, se puede producir un desplazamiento de los cationes Cd(II) por cationes Ag(I), dando lugar a la formación de partículas ultra pequeñas de Ag_2Te o Ag_2S que se depositan sobre la superficie del punto cuántico produciéndose un decaimiento efectivo de la emisión.^{9,40,45} Ambos mecanismos van acompañados de un importante desplazamiento del máximo de emisión hacia el rojo (Figura 45), dado que en ambas situaciones se están produciendo modificaciones de los estados de superficie de los puntos cuánticos.

Si bien el mecanismo de desactivación propuesto para PC2, PC3, PC5 y PC6 es análogo, destacar que para PC2 y PC3 $\Delta\lambda$ ya es muy significativo cuando la disminución de la fluorescencia es todavía poco apreciable. Esto podría estar

⁴² N. Butwong, W. Ngeontae, R. Burakham, S. Srijaranai, *Microchim. Acta*, 180 (2013) 1101.

⁴³ T. Khantaw, Ch. Boonmee, Th. Tuntulani, W. Ngeontae, *Talanta*, 115 (2013) 849.

⁴⁴ Y.-S. Xia, Ch. Cao, Ch.-Q. Zhu, *J. Luminescence*, 128 (2008) 166.

⁴⁵ J.-H. Wang, H.-Q. Wang, H.-L. Zhang, X.-Q. Li, X.-F. Hua, Y.-Ch. Cao, Z.-L. Huang, Y.-D. Zhao, *Anal. Bional. Chem.*, 388 (2007) 969.

relacionado, sobre todo en el caso de PC2, con la formación del Ag_2Te en lugar de Ag_2S , el cual presenta menor solubilidad y también una banda prohibida de menor energía.

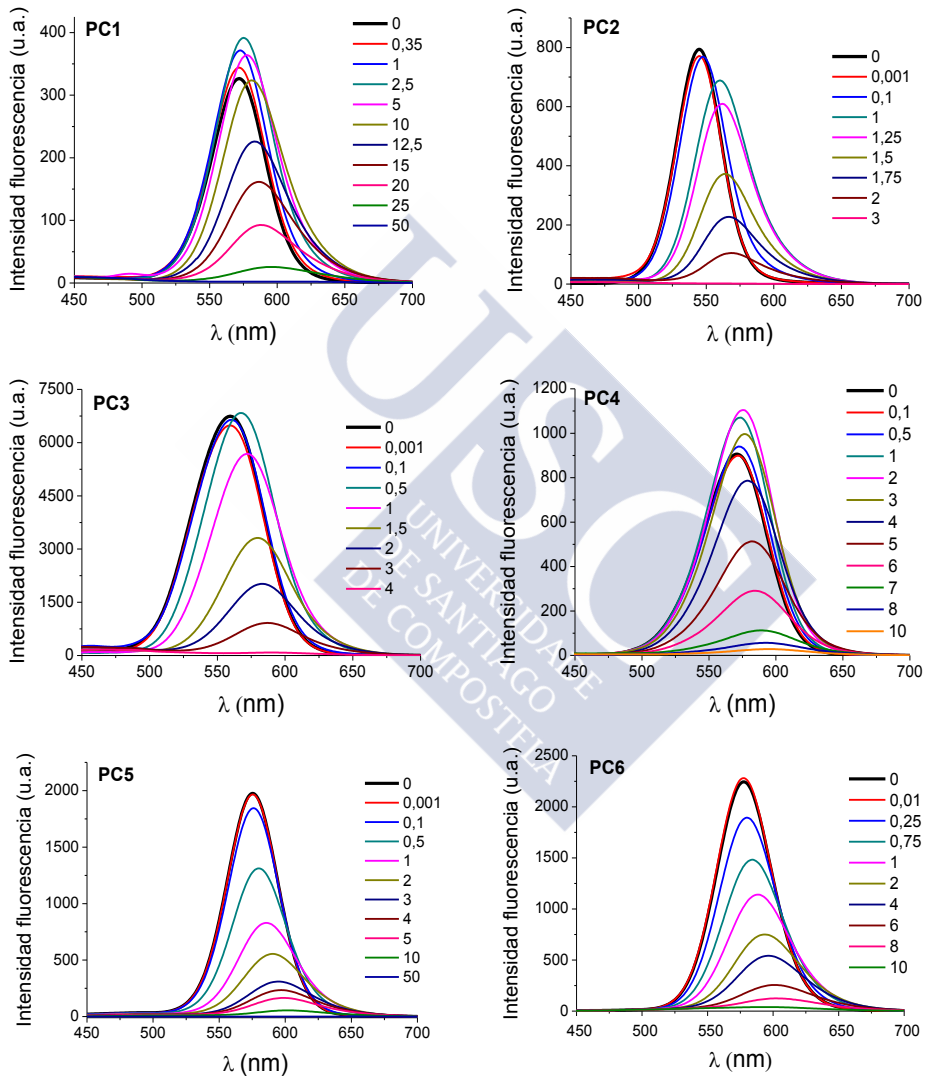


Figura 45. Desplazamiento del máximo de emisión de los diferentes PCs en presencia de Ag(I) .

4.2.2.4 Niquel(II)

La bibliografía relacionada con el empleo de puntos cuánticos para la detección de Ni(II) es escasa. El único sistema descrito⁴⁶ está formado por PCs CdTe/ZnS recubiertos con L-cisteína, cuyo límite de detección es 0.59 nM. Hay además algún sistema en el que se emplean PCs CdTe como sensores fluorescentes “turn-on” (restauración de la fluorescencia) para la detección de histidina, los cuales son previamente desactivados por Ni(II).^{47,48} El límite de detección de Ni(II) calculado para uno de estos sistemas es 0.33 μM .⁴⁸

En la Figura 46 se muestra el efecto ejercido por diferentes concentraciones de Ni(II) sobre la intensidad de la fluorescencia (I/I_0) de los diferentes PCs preparados. Los resultados obtenidos con PC4 resultaron ser poco reproducibles y no se incluyen en esta discusión.

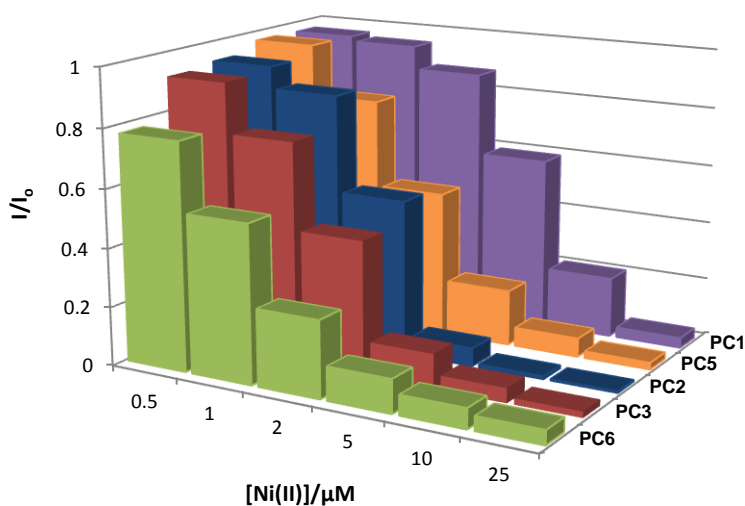


Figura 46. Efecto ejercido por diferentes concentraciones de Ni(II) sobre la fluorescencia de los diferentes PCs.

⁴⁶ C.-X. Sui, Y.-F. Liu, P.-A. Li, D. Zhang, F. Xia, *Anal. Method.*, 5 (2013) 1695.

⁴⁷ F. Shi, S. Liu, X. Su, *Talanta*, 125 (2014) 221.

⁴⁸ P. Wu, X.-P. Yan, *Biosen. Bioelectron.*, 26 (2010) 485.

Cuando se comparan, para los diferentes PCs, los valores de I/I_0 a las concentraciones de Ni(II) ensayadas, se ponen de manifiesto algunas diferencias en la respuesta de estos sensores a la presencia del catión metálico. Así, de un primer análisis de la Figura 46 se pueden deducir tres tipos diferentes de comportamiento. Por una parte, PC1 muestra una baja sensibilidad a Ni(II) ya que requiere concentraciones próximas a $2 \mu\text{M}$ para reducir su fluorescencia en torno a un 10-15 %. Los puntos cuánticos PC2, PC3 y PC5, más sensibles que PC1, muestran una respuesta similar entre ellos, con una desactivación del 20-25 % a concentraciones $1 \mu\text{M}$ o ligeramente inferiores. Por último, PC6 es el que mayores cambios experimenta en su emisión, con una reducción del 25 % a una concentración $0.5 \mu\text{M}$ del metal.

Los valores obtenidos para los límites de detección y cuantificación calculados a partir del ajuste de regresión lineal en cada caso se recogen en la Tabla 14.

Tabla 14. Límites de detección y de cuantificación de Ni(II) para los diferentes PCs.

PC	LOD (μM)	LOQ (μM)
PC1	0.679	2.266
PC2	0.0442	0.147
PC3	0.0415	0.293
PC5	0.0600	0.200
PC6	0.0108	0.0359

Estos valores son coherentes con lo comentado anteriormente, siendo PC6 el que presenta el valor más bajo; y son mejores, en todos los casos, que el descrito para L-cisteína-CdTe/ZnS.⁴⁶

En cuanto al tipo de interacción PC-Ni(II) que puede conducir a la desactivación de la fluorescencia, dado que las solubilidades de NiS y NiTe son mayores que las de CdS y CdTe, parece poco probable el intercambio del catión Cd(II) por Ni(II) en la superficie de los PCs; mientras que en el caso del cinc, cuyos sulfuros y telururos son más solubles que los de Ni(II), este intercambio si sería

posible. Sin embargo, teniendo en cuenta que los espectros de emisión para los distintos PCs reducen gradualmente su intensidad al aumentar la concentración de Ni(II) sin que se produzcan cambios en la posición de la banda, el intercambio de cationes y/o la formación de sulfuros o telururos de níquel podría descartarse, probablemente, en todos los casos. Por otra parte, teniendo en cuenta la elevada afinidad de los ligandos del recubrimiento por Zn(II) y fundamentalmente por Cd(II), parece también poco probable que la reducción de la emisión se deba a su desplazamiento de la superficie por el Ni(II) para posteriormente formar complejos con este metal. De hecho, el PC más sensible es PC6, cuya coraza (CdS) quizá sea la que con mayor fuerza retiene el recubrimiento (TGA, DMPS). Por tanto, el proceso de desplazamiento de ligandos parece poco probable.

Cuando se analiza detalladamente la composición de los PCs más sensibles a este catión metálico, se observa que esta sensibilidad no guarda tanta relación con el propio núcleo (o núcleo/coraza) semiconductor (CdTe/CdS > CdTe/ZnS > CdTe > CdTe/ZnS > CdTe) como con los ligandos del recubrimiento (TGA, DMPS, DMSA). De hecho, parece que la presencia simultánea de los ligandos TGA y DMPS, debe jugar un papel importante en la interacción del PC con el Ni(II), ya que esta combinación de ligandos está presente en los tres PCs más sensibles. La interacción del Ni(II) de forma simultánea con los grupos carboxilato (TGA) y sulfonato (DMPS) podría dar lugar a una transferencia de carga más efectiva desde el PC al metal, conduciendo a una mayor reducción de la fluorescencia.

4.2.2.5 Plomo (II)

Todos los PCs sintetizados se ven afectados por la presencia Pb(II) (Figura 47), aunque son mucho menos sensibles a éste catión metálico que a los mencionados previamente, y ninguno de los LODs obtenidos (Tabla 15) se encuentra por debajo de los límites tolerables en agua permitidos por la EPA (72 nM).

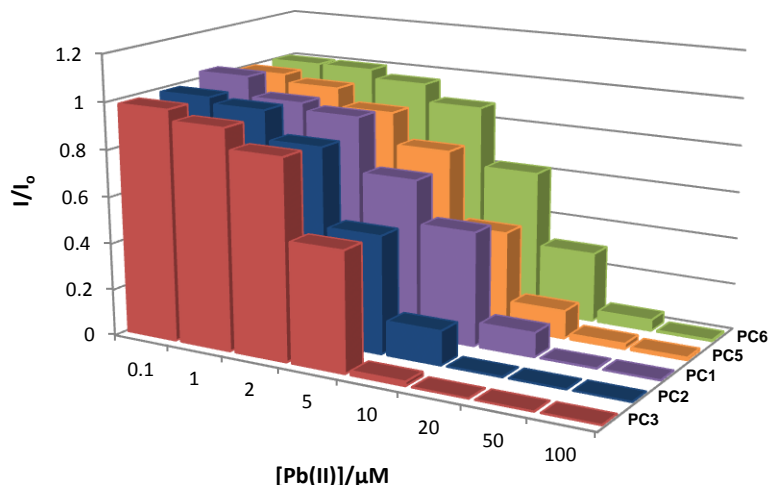


Figura 47. Comparación del efectos ejercido por la presencia de diferentes concentraciones de Pb(II) en la fluorescencia de los PCs sintetizados.

Tabla 15. Límites de detección y cuantificación de Pb(II) para los diferentes PCs.

PC	LOD (μM)	LOQ (μM)
PC1	0.549	1.830
PC2	0.419	1.396
PC3	0.373	1.244
PC5	0.415	1.383
PC6	1.1	3.65

Los mecanismos propuestos para la interacción entre dicho metal y los PCs son análogos a los propuestos para Hg(II),⁴⁹⁻⁵⁴ si bien tanto los sulfuros como los telururos de plomo son mucho más solubles que los de mercurio, por lo que

⁴⁹ D. Vasudevan, A. Trinchi, S. G. Hardin, I. S. Cole, *J. Luminiscence*, 166 (2015) 88.

⁵⁰ W. Zhong, C. Zhang, Q. Gao, H. Li, *Microchim. Acta*, 176 (2012) 101.

⁵¹ Z. Cai, B. Shi, L. Zhao, M. Ma, *Spectrochim. Acta Part A*, 97 (2012) 909.

⁵² W. Lua, H. Yang, Z. Wan, B. Yuan, X. Yu, S.-T. Tu, *J. Nanopart. Res.*, 14 (2012) 762.

⁵³ J. Ren, H. L. Chen, C. L. Ren, J. F. Sun, Q. Liu, M. Wang, X. G. Chen, *Mater. Res. Innovations*, 14 (2012) 33.

⁵⁴ H. Gonçalves, C. Mendonça, J. C. G. Esteves da Silva, *J. Fluoresc.*, 19 (2009) 141.

el intercambio de los átomos de Pb(II) por los átomos de Cd(II) o Zn(II) presentes en la superficie del PC está menos favorecido. De hecho, en ninguno de los PCs se observa un desplazamiento muy significativo del máximo de emisión por este metal (Tabla 16). Solamente en el caso de PC3 y PC5, y cuando el decaimiento de la fluorescencia es muy elevado podrían formarse dichos calcogenuros de Pb(II). Lo más plausible es que exista una interacción con los ligandos de la superficie del PC a través de los grupos carboxilato o sulfonato. Por otra parte, a elevadas concentraciones podría producirse también la pérdida de los ligandos, y la formación de complejos Pb-S. Sin embargo, dado que el Pb se considera un ácido de dureza “intermedia”, según Pearson, la formación de dichos complejos está menos favorecida que para Hg(II).

Tabla 16. Desplazamiento del máximo de emisión ($\Delta\lambda$, nm) a diferentes porcentajes de desactivación.

Desactivación (%)	$\Delta\lambda$ (nm)				
	PC1	PC2	PC3	PC5	PC6
20	0	0	1	0	0
50	0	1	3	2	2
80	0	2	6	6	3

4.2.3 Identificación selectiva de Hg(II), Cu(II), Ag(I), Ni(II) y Pb(II). Propuesta

Dado que los puntos cuánticos preparados resultaron ser poco selectivos para los metales ensayados cuando se utilizan individualmente, a continuación se plantean diversas propuestas, basadas en los resultados descritos previamente y pendientes de confirmación, que permitirían identificar selectivamente a los diferentes cationes metálicos empleando combinaciones de dos o tres PCs.

En el Esquema 1 se ordenan los PCs, excluyendo a PC4, de mayor a menor sensibilidad frente a cada catión metálico, lo que puede deducirse fácilmente a

partir de las figuras del Apartado 4.2.2, en las que se representa la respuesta de los diferentes PCs frente a un determinado metal.



Esquema 1. Sensibilidad de los PCs frente a diferentes cationes metálicos.

Teniendo en cuenta el orden del Esquema 1, sería posible que combinaciones de los puntos cuánticos PC2, PC3 y PC6 o PC2, PC5 y PC6 permitiesen distinguir entre todos los cationes metálicos, dado que el orden de sensibilidad de los PCs frente a los diversos metales ensayados es diferente. A modo de ejemplo, si se tiene una disolución que contiene Hg(II) y se utiliza la combinación de PC2, PC3 y PC6, la reducción en la intensidad de la fluorescencia debida a la presencia de dicho metal siempre será mayor para PC2, seguido de PC3 y de PC6, y en ninguno de los otros metales se seguirá este orden [Cu(II): PC2, PC6, PC3; Ni(II): PC6, PC3, PC2; Pb(II): PC3, PC2, PC6; Ag(I): PC6, PC2, P3].

Dicha identificación se podrá realizar en un rango dado de concentraciones de metal, ya que es necesario que al menos la fluorescencia de los dos primeros PCs se reduzca en parte en presencia del metal que se quiere identificar. En la Tabla 17 se muestra la mínima concentración de cada metal que se podría detectar utilizando estas combinaciones.

Tabla 17. Concentración de M^{n+} detectable por las diferentes combinaciones de PCs.

Combinaciones PCs	Concentración mínima detectable de M^{n+} (μM)				
	Hg(II)	Cu(II)	Ni(II)	Pb(II)	Ag(I)
PC2, PC3, PC6	0.01	0.5	0.5	1	0.1
PC2, PC5, PC6	0.05	0.25	0.5	2	0.5

Estas combinaciones y, en especial, la combinación de los PCs PC2, PC3 y PC6 permiten la detección selectiva de concentraciones bajas de Hg(II).

Si se tiene en cuenta que los efectos ejercidos por la Ag(I) en la intensidad de la fluorescencia de los diferentes PCs, y en especial en PC2, siempre van acompañados de desplazamientos muy significativos del máximo de emisión, estos desplazamientos ya permitirían una identificación selectiva de Ag(I). Por otra parte, teniendo esto en cuenta ($\Delta\lambda$), también sería posible hacer combinaciones de tan solo dos PCs, lo que permitiría reducir la concentración mínima detectable de Ni(II). Analizando el esquema se observa que PC6 es más sensible que PC2 (o PC3) a la presencia de Ni(II) y Ag(I), mientras que para el resto de los metales esa sensibilidad se invierte. Puesto que Ag(I) se puede detectar fácilmente a partir de los desplazamiento de la banda, si tal desplazamiento no se produce y la reducción de la fluorescencia es mayor en PC6 que en PC2 (o PC3) se puede confirmar la presencia de Ni(II). Así se podrían detectar concentraciones 10 veces inferiores a las detectadas utilizando las combinaciones anteriores de tres PCs. Del mismo modo, combinaciones de PC5 y PC3 permitirían detectar concentraciones $0.1 \mu\text{M}$ de Cu(II).





Capítulo 5

Ensayos de toxicidad



5.1 Parte experimental

5.1.1 Reactivos

- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Merck). Utilizado en los estudios de citotoxicidad.
- Aquadur (JLB). Utilizado en los estudios de toxicidad en peces cebra.
- Alexa Fluor® 647 phalloidin (disuelto en 1.5 mL de metanol, Molecular Probes by Life Technologies). Utilizado en la tinción de las células para microscopía confocal de fluorescencia.
- Azul de metileno (Merck). Utilizado en los estudios de toxicidad en peces cebra.
- Bodipy®phalloidin 650/665 (disuelto en 1.5 mL de metanol, Invitrogen). Utilizado en la tinción de las células para microscopía confocal de fluorescencia.
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich). Utilizado en los estudios de citotoxicidad.
- Dodecilsulfato sódico (SDS, Sigma-Aldrich). Utilizado en los estudios de citotoxicidad.
- EPON (Eponate 12TM, TED PELLA). Utilizado en la preparación de los bloques de inclusión para microscopía electrónica de transmisión.
- Glutaraldehído (disolución acuosa al 25 %, Sigma-Aldrich). Utilizado en la fijación de las células para microscopía electrónica de transmisión.
- Suero fetal bovino (FBS, Biostar S.A.). Añadido al medio de cultivo celular.
- Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich). Medio de montaje para las preparaciones de microscopía confocal de fluorescencia.

- Nanopartículas de ZnO (Sigma-Aldrich). Utilizado como control positivo en los estudios de toxicidad en peces cebra.
- Paraformaldehído (Sigma-Aldrich). Utilizado en la fijación de las células para microscopía confocal de fluorescencia: 0.4 g de paraformaldehído se disolvieron en 10 mL de PBS (2x) caliente. Cuando mostró turbidez se le añadieron unas gotas de NaOH 0.1 M para favorecer la completa disolución.
- Phalloidin CruzFluor™ 647 Conjugate (disuelto en 30 µL de DMSO, Santa Cruz Biotechnology). Utilizado en la tinción de las células para microscopía confocal de fluorescencia.
- Tampón fosfato salino (PBS, Sigma). Utilizado para el lavado de las células: 3 tabletas de PBS se disolvieron en 300 mL de agua [PBS (2x)] y a partir de ésta, por dilución 1:2, se preparó la disolución PBS (1x).
- Tricaina (MS-22, Sigma-Aldrich). Utilizada para anestésiar los embriones de pez cebrá en los ensayos de internalización y biodistribución.
- Tripsina-EDTA 1x (Sigma-Aldrich T3924). Utilizada en la preparación de las muestras para microscopía electrónica de transmisión.
- Tritón™ X-100 (Acros Organics). Utilizado para la permeabilización de las células: 10 mg de tritón se disolvieron en 10 mL de PBS (1x) (0.1 % p/v).
- Vectashield® (Vector Laboratories). Medio de montaje para las preparaciones de microscopía confocal de fluorescencia.

5.1.2 Técnicas experimentales

Microscopía confocal de fluorescencia

Las imágenes de la internalización de los compuestos en las células y peces cebrá se obtuvieron mediante microscopía confocal de fluorescencia.

Las imágenes de las células fueron tomadas con un microscopio confocal Leica AOBs-SP5X utilizando un objetivo 63x de la Unidad de Microscopía

electrónica y confocal de la RIAIDT de la Universidad de Santiago de Compostela. Para la visualización de PC1 se usó como fuente el láser de argón (excitación 488 nm) y una ventana de adquisición de 500-607 nm. Para el resto de los PCs se utilizó como fuente el diodo azul (excitación 405 nm) y una ventana de adquisición de 549-622 nm.

Las imágenes de los peces cebra fueron tomadas con un microscopio confocal Leica DMI8 TSC-SPE del grupo de investigación ACUIGEN (Departamento de Genética, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo), utilizando como fuente el láser de argón (excitación 488 nm).

Todas las imágenes se generaron utilizando el programa Leica Confocal Software Lite Version.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las imágenes de TEM se obtuvieron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011 y se fotografiaron con una cámara digital Megaview G2 y software de adquisición de imágenes *Análisis* (Olympus), de la Unidad de Microscopía Electrónica de la RIAIDT de la Universidad de Santiago (Campus de Lugo).

5.1.3 Estudios *in vitro*: citotoxicidad

5.1.3.1 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Los estudios se llevaron a cabo en células de las líneas LLC-PK1 (American Type Culture Collection, ATCC: CL-101) y HeLa-229 (ATCC: CCL-2.1). Las células LLC-PK1, procedentes de túbulos renales proximales de cerdo, se mantuvieron en cultivo en Medium 199 conteniendo 1.5 g/L de hidrogenocarbonato sódico y suplementado con un 3 % de FBS. La línea celular HeLa-229, un adenocarcinoma de cérvix humano, se mantuvo en medio de crecimiento DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) conteniendo 4.5 g/L de glucosa y 3.7 g/L de NaHCO₃ y suplementado con un 10 % de FBS y L-Glutamina 2 mM.

En primer lugar se realizaron diversos ensayos de viabilidad celular para evaluar el grado de citotoxicidad de los puntos cuánticos. Seleccionadas las concentraciones adecuadas y las condiciones óptimas de cultivo, se llevaron a cabo nuevos experimentos para la obtención de imágenes mediante microscopía confocal de fluorescencia, con el objetivo de observar si se produjo o no la penetración de los puntos cuánticos en las células y si mantuvieron las propiedades ópticas mostradas en disolución.

Con el fin de observar los posibles cambios morfológicos inducidos por la presencia de los puntos cuánticos, se obtuvieron también imágenes de células tratadas con PC2 mediante microscopía electrónica de transmisión.

5.1.3.2 Ensayos de citotoxicidad

La citotoxicidad de los sistemas preparados se determinó por medio de los estudios de viabilidad celular mediante un ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio]. Las sales de tetrazolio (MTT), acuosolubles y de color amarillo, son especialmente útiles para cuantificar la viabilidad celular ya que se transforman en formazano (compuesto insoluble y de color púrpura) por la actuación de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas.¹

Para evaluar la citotoxicidad se sembraron las células en placas estériles de 96 pocillos, a una densidad de 5000 (HeLa-229) o 10000 (LLC-PK1) células/pocillo y se incubaron a 37 °C en el medio de crecimiento apropiado. Transcurridas 24 horas el medio se reemplazó por medio de cultivo fresco conteniendo los PCs en disolución a diferentes concentraciones.

Al cabo de 90 min, 2 h o 24 h más de incubación se añadieron en cada pocillo 10 µL de una disolución de MTT (5 mg/mL en PBS) y se incubaron nuevamente las placas durante 4 h. Los cristales de formazano se disolvieron en 100 µL de una disolución de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10 % en HCl 0.01 M. Después de 12-14 h de incubación (una noche), se leyó la absorbancia de cada

¹ M. C. Alley, D. A. Scudiero, A. Monks, M. L. Hursey, M. J. Czerwinski, D. L. Fine, B. J. Abbott, J. G. Mayo, R. H. Shoemaker, M. R. Boyd, *Cancer Res.*, 48 (1988) 589.

una de las muestras a una longitud de onda de 595 nm (Espectrofotómetro Tecan Ultra Evolution).

Todos los experimentos se realizaron con puntos por triplicado. La medida de la absorbancia se valoró entre un punto que contenía 5000 o 10000 células en el medio de cultivo sin factores de crecimiento, manteniéndose así estable la concentración celular, y otro punto que contenía el medio de crecimiento habitual y que permite medir el crecimiento máximo a las 24 h.

Posteriormente se midió la absorbancia en los pocillos que contenían concentraciones específicas de los PCs y los resultados de viabilidad celular se expresaron en %:

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{AO}{AT} \times 100$$

AO = absorbancia observada en los pocillos con el compuesto objeto de estudio

AT = absorbancia observada en los pocillos control

5.1.3.3 Obtención de imágenes mediante microscopía confocal

Incubación

Para la observación de las células al microscopio los ensayos se realizaron en placas de cultivo estériles de 12 pocillos y se colocó en cada pocillo un cubreobjetos redondo, de 12 mm de diámetro, previamente esterilizado. Sobre el cubreobjetos se sembraron 100000 células HeLa, o 150000 células LLC-PK1, en 1 mL del medio de cultivo apropiado, y se incubaron las placas a 37 °C. En estas condiciones las células crecieron en monocapa adheridas al cubre. Transcurridas 24 h el medio de cultivo fue reemplazado por 1 mL de medio fresco, conteniendo 40 µg del compuesto a estudiar, y se incubaron nuevamente las placas a 37 °C durante 2 h para PC1 y durante 90 min para el resto de PCs.

Preparación de las muestras

Después de la incubación se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS (1x), se fijaron con paraformaldehído (4 % en PBS, pH = 7.4), se lavaron nuevamente con PBS y se permeabilizaron con tritón (0.1 % en PBS) durante 5 min. Transcurrido este tiempo se retiró el tritón, se lavaron las células y se procedió a la tinción con una disolución de phalloidina conteniendo un 1 % de BSA (albúmina sérica bovina). Transcurrido el tiempo de tinción (45 min) se lavaron las células con PBS, se retiró cada cubreobjetos de la placa y, una vez seco, se montó sobre un portaobjetos para su observación al microscopio con medio de montaje para fluorescencia.

5.1.3.4 Obtención de imágenes mediante microscopía electrónica de transmisión

Incubación

Para la observación de las células al microscopio electrónico los ensayos se realizaron en placas de cultivo estériles de 12 pocillos, sembrando 100000 células HeLa o 150000 células LLC-PK1 en 1 mL del medio de cultivo apropiado y se incubaron las placas a 37 °C. Transcurridas 24 h, el medio de cultivo fue reemplazado por 1 mL de medio fresco en el caso de las células control o por medio de cultivo conteniendo 40 o 250 µg del compuesto a estudiar. Las placas se incubaron, nuevamente, a 37 °C durante 90 min.

Preparación de las muestras

Para la observación de material biológico al microscopio electrónico de transmisión, las muestras se someten a un tratamiento previo de fijación, deshidratación, infiltración e inclusión en una resina plástica antes de ser cortadas con el ultramicrotomo.

Se siguió el protocolo estándar de doble fijación con glutaraldehído y tetraóxido de osmio. Después de la incubación se retiró el medio de cultivo, se trataron las células con tripsina-EDTA 1x y se centrifugaron. El pellet obtenido se

lavó con PBS y se centrifugó antes de la fijación con glutaraldehído al 2.5 % en PBS (1x). Transcurridos 30 min, se retiró el glutaraldehído, se lavaron y centrifugaron las células y se mantuvieron refrigeradas a 4 °C en PBS. Cada pellet se postfijó con OsO₄ al 1 % en disolución buffer cacodilato 0.1 M durante 1 h, y posteriormente se incluyó en agar al 2 % para formar un pellet compacto. Las muestras se deshidrataron en etanol, incluyendo un paso con alcohol al 70 % conteniendo un 0.5 % de acetato de uranilo.

Finalmente, se incluyeron en una resina epóxica (EPON), se cortaron cortes ultrafinos en un ultramicrotomo LEICA ULTRACUT UCT y se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo.

5.1.4 Estudios *in vivo*: toxicidad en embriones de pez cebra

Se llevó a cabo el estudio de toxicidad en embriones de pez cebra FET (fish embryo toxicity test), propuesto por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD).²

La línea de pez cebra utilizada fue la salvaje, “wild-type”, cuyo adulto posee un patrón determinado de pigmentación, con cinco bandas horizontales en ambos lados del cuerpo que se extienden hasta la aleta caudal (Figura 1).

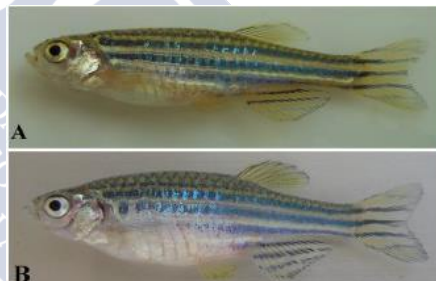


Figura 1. Dimorfismo sexual. A: macho, B: hembra.

5.1.4.1 Condiciones de mantenimiento de los peces

El stock de los peces reproductores salvajes se mantuvo en peceras de vidrio, en el interior de una cámara isoterma, a una temperatura de 26 °C. El agua del sistema, que proviene de la traída, se purificó mediante un filtro de

² Guideline for the testing of Chemicals. Draft Proposal for a New Guideline. Fish Embryo Toxicity (FET) Test. OECD (2012).

ósmosis inversa, un filtro físico de partículas y un filtro de carbón activo fundamentalmente para eliminar el cloro. La densidad máxima de los acuarios fue de 1 pez/L y se mantuvo una relación hembras:macho de 2:1. El fotoperiodo fue de 14 h de luz y 10 h de oscuridad, y se controlaron las condiciones óptimas de filtrado y de alimentación.

Para la realización de los experimentos de toxicidad, el stock de reproductores no habrá estado expuesto previamente a ningún compuesto tóxico, y se conocerá su ratio de fertilidad para poder ser utilizados como productores de huevos. No tendrán síntomas macroscópicos de infección o enfermedad, ni habrán sido sometidos a tratamiento farmacéutico en los 2 meses anteriores a las puestas.

5.1.4.2 Desarrollo del test de toxicidad

La puesta de huevos tiene lugar a primera hora de la mañana. Para la recolección se utilizaron contenedores con una malla o separación física que mantenga los huevos liberados lejos del alcance de los adultos, ya que en esta especie existe predación sobre los huevos debido a su alto aporte energético.³ Inmediatamente después de la puesta, se recogieron los huevos y se transfirieron a una placa Petri con agua procedente del filtro de ósmosis inversa con un 3 ‰ de azul de metileno, para disminuir la incidencia de muerte por hongos en los huevos.

Los huevos fertilizados comienzan su división en torno a los 15 min, dando lugar a los estadios de 4, 8, 16 y 32 blastómeros. El test deberá comenzar en las primeras 4-5 h posteriores a la puesta (h.p.f.), como muy tarde en estadio de 16 células y los huevos se disponen, individualmente, en placas de 96 pocillos donde se desarrollará el test de toxicidad.

El análisis comienza con la exposición de los huevos recién fertilizados a concentraciones crecientes de los puntos cuánticos seleccionados. Para cada compuesto a estudiar se prepararon entre 5 y 9 diluciones y se expusieron, a cada una de ellas, 20 embriones de pez cebra. En los ensayos del compuesto PC1

³ R. Spence, G. Gerlach, C. Lawrence, C. Smith, *Biol. Rev.*, 83 (2008) 13.

se usó el agua procedente del filtro de ósmosis inversa, mientras que en los ensayos de PC2 y PC6 el agua de ósmosis se trató, para incrementar su dureza, con 300 mg/L de Aquadur. En los experimentos se incluyeron, en cada placa del ensayo, controles negativos, positivos y negativos internos. Tanto en el control negativo como en el interno de cada placa, se utilizó agua de ósmosis inversa sin tratar (PC1) o tratada con Aquadur (PC2 y PC6). Como control positivo el compuesto que se utiliza habitualmente, en el caso de estudios con nanosistemas, son nanopartículas de ZnO, de tamaño menor a 50 nm y a una concentración de 10 mg/L.^{4,5} En la Figura 2 se recoge el diseño experimental.

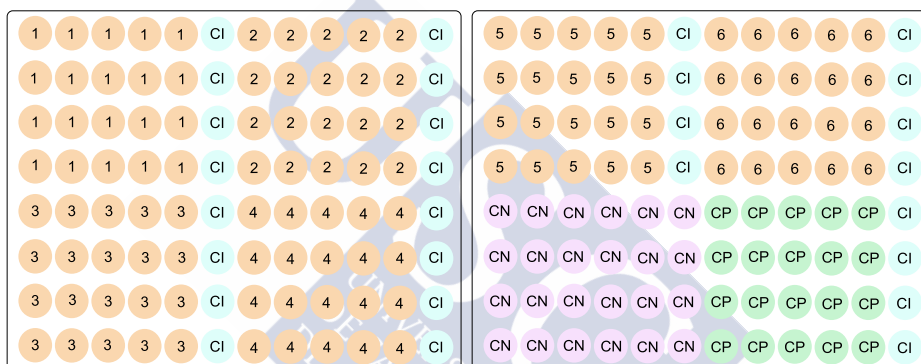


Figura 2. Diseño experimental del test de toxicidad: 1-6 = concentraciones de PC; CI = Control interno (agua); C N = Control negativo (agua); C P = Control positivo (ZnO).

Las placas se incubaron a 26 °C, durante 4 días, y se realizaron observaciones de los embriones cada 24 horas mediante la utilización de un microscopio invertido. El estudio llevado a cabo es un estudio de mortalidad, por lo que las observaciones se limitaron a los cuatro “*indicadores de letalidad*” siguientes:²

i) Coagulación del embrión: los huevos coagulados son blancos lechosos y aparecen oscuros bajo el microscopio invertido. Durante el inicio de la coagulación los huevos muestran una gran variedad de inclusiones opacas (Figura 3).

⁴ X. Zhu, J. Wang, X. Zhang, Y. Chang, Y. Chen, Y.,. *Nanotechnology*, 20 (2009) 95.

⁵ W. Bai, Z. Zhang, W. Tian, X. He, Y. Ma, Y. Zhao, Z. Chai, *J. Nanopart. Res.*,12 (2010) 1645.

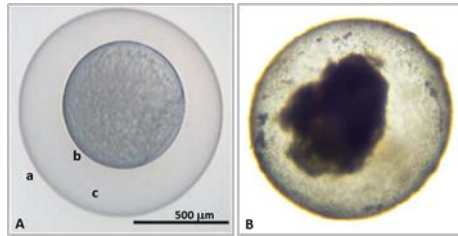


Figura 3. A: Zigoto normal rodeado por el corion (a) y la membrana vitelina (b), con un espacio perivitelino en el interior (c). B: Embrión coagulado.

ii) Ausencia de la formación de somitos: los somitos son masas de mesodermis, distribuidas lateralmente al tubo neural, que van a desarrollar la dermis, el músculo esquelético y las vértebras. El número de somitos es el indicador más útil para diferenciar el estadio de desarrollo. Cuando éste es normal a las 24 h.p.f. es posible observar la presencia de 20 somitos (Figura 4A). La ausencia o malformación se consideran características letales y la presencia de movimientos espontáneos de la cola (contracciones de lado a lado) son indicadores de una correcta formación de los mismos.

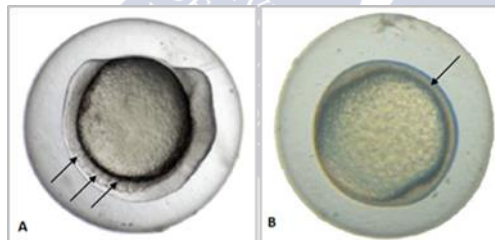


Figura 4. Embrión de 24 h.p.f.: con los somitos bien desarrollados (A) y con ausencia total de somitos (B).

iii) Ausencia de separación del final de la cola del saco vitelino: en un pez cebra con desarrollo normal la separación de la cola del saco vitelino se observa tras la elongación del cuerpo a las 18 h.p.f. (Figura 5).

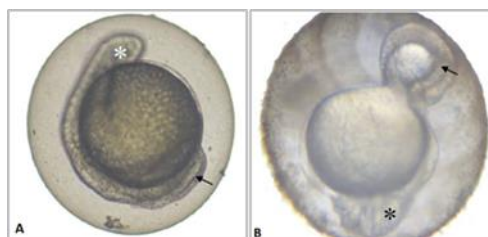


Figura 5. Embrión de 96 h.p.f. sin separación del final de la cola del saco vitelino: vista lateral (A) y vista frontal (B).

iv) Ausencia de latido cardíaco: en un pez cebra con desarrollo normal el latido cardíaco es visible a las 48 h.p.f.. El latido irregular o la visualización del latido cardíaco sin circulación en la aorta abdominal, no deben ser considerados como indicadores de letalidad. Para una correcta evaluación de esta característica, los embriones deben ser observados con un aumento de 80 (80x) al menos durante un minuto (Figura 6).

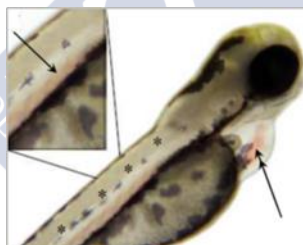


Figura 6. Localización del latido cardíaco.

Al finalizar el tiempo de exposición, se determina la toxicidad de los compuestos, basándose en la aparición de cualquiera de las cuatro observaciones analizadas, y se calcula la concentración letal 50 (LC₅₀, concentración que provoca la muerte del 50 % de los individuos expuestos con respecto al grupo control). Los experimentos se realizaron por triplicado para aumentar el valor estadístico del ensayo.

Criterios de aceptación del análisis

Para considerar los resultados aceptables han de cumplirse los siguientes requisitos:

- La tasa de fertilización de los huevos empleados debe ser superior al 70 %.
- La temperatura del agua en el transcurso del experimento debe mantenerse a 26 ± 1 °C.
- En el control negativo, al final del tiempo de exposición, la supervivencia total de los embriones debe ser igual o superior al 90 % y la tasa de eclosión superior al 80 %.
- El número de embriones muertos, en el control negativo interno, no puede exceder de 1 por cada concentración de compuesto ensayada. En caso contrario, dicha concentración será rechazada.
- En el control positivo, la mortalidad mínima de los embriones al final del tiempo de exposición debe ser del 30 %.

Si no se cumple alguno de los criterios anteriores, la réplica afectada es rechazada y excluida del análisis estadístico.

Resultados

Con el objetivo de aportar resultados estadísticamente significativos, el experimento se realizó por triplicado, y la similitud de resultados de las tres réplicas se analizó empleando un análisis de varianza (ANOVA) mediante el cual se comprobó que el coeficiente de variación (CV) es menor del 20 %.

Estudios previos demostraron que ignorar la mortalidad ocurrida en el control negativo, incluso aunque ésta sea inferior al 10 % establecido por la OECD, provoca una subestimación de la concentración letal 50 (LC₅₀).⁶ Para evitar

⁶ J. A. Hoekstra, *Water Air Soil Poll.*, 35 (1987) 311.

este error, los datos fueron corregidos con respecto a la mortalidad en el control negativo, mediante la fórmula de Abbott:⁷

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{X - Y}{100 - Y} \times 100$$

X = % mortalidad en los embriones sometidos al compuesto objeto de estudio

Y = % mortalidad en el control negativo

Los datos se analizaron mediante el software de análisis TOXRAT® SOLUTIONS GMBH (Toxicity Response Analysis and Testing).

5.1.4.3 Estudios de internalización

Para el compuesto PC6 se realizaron también estudios de internalización mediante microscopía confocal de fluorescencia, siguiendo el mismo procedimiento y durante el mismo tiempo de exposición (4 días) que los estudios de toxicidad descritos en el apartado anterior. Para ello, los embriones expuestos a una concentración de 1000 µg/mL de PC6, fueron anestesiados con tricaina, colocados sobre un portaobjetos y observados al microscopio. Cada 24 h se tomaron imágenes de los embriones tratados.

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Estudios *in vitro*

5.2.1.1 Ensayos de citotoxicidad

En las Tablas 1 a 7 y Figuras 7 a 13 se muestra la viabilidad celular en las dos líneas ensayadas (HeLa y LLC-PK1), tras la incubación en presencia de los diferentes PCs sintetizados. Adicionalmente, cuando fue posible su cálculo a partir de las curvas dosis respuesta, se adjuntan los valores de la IC₅₀,

⁷ W. S. Abbott, *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 2 (1987) 302.

concentración a la que se produce una reducción de la viabilidad celular del 50 %.

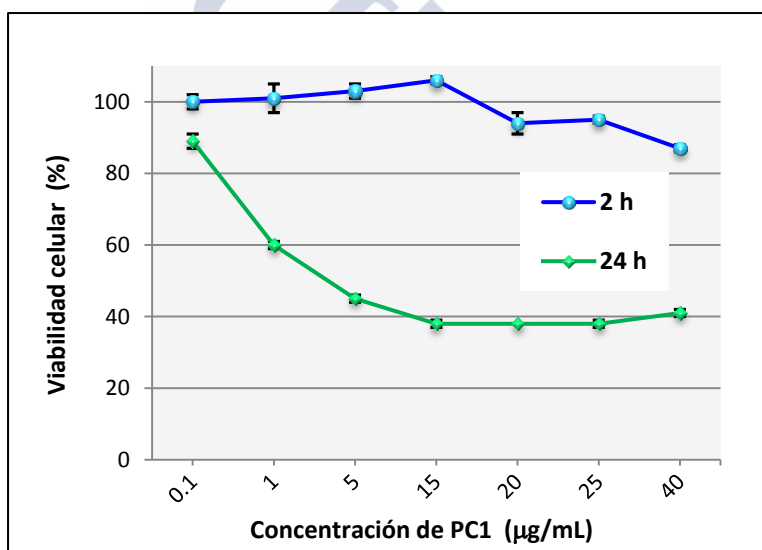
Para establecer las condiciones experimentales de los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo varios experimentos preliminares con el punto cuántico PC1. Fijadas estas condiciones, detalladas en la parte experimental, se realizaron dos ensayos adicionales, con concentraciones de PC1 entre 0.05 y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a dos tiempos de incubación diferentes: 2 h y 24 h (Tablas 1 y 2, Figuras 7 y 8). Con los restantes PCs sintetizados se realizaron los ensayos de citotoxicidad con 7-8 concentraciones diferentes, a un tiempo de incubación de 24 h (Tablas 3 a 7 y Figuras 9 a 13) y, adicionalmente, se repitieron los ensayos con la concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a un tiempo de incubación de 90 minutos, por ser éstas las condiciones seleccionadas para llevar a cabo los estudios de microscopía confocal.

Tabla 1. Viabilidad celular para la línea HeLa-229 en presencia de PC1.

Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Viabilidad celular (% \pm S.D.)	
	t incubación = 2 h	t incubación = 24 h
0.1	100 \pm 2	89 \pm 2
1	101 \pm 4	60 \pm 1
5	103 \pm 2	45 \pm 1
15	106 \pm 1	38 \pm 1
20	94 \pm 3	38 \pm 1
25	95 \pm 1	38 \pm 0
40	87 \pm 1	41 \pm 1

Tabla 2. Viabilidad celular para la línea LLC-PK1 en presencia de PC1.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidad celular (% \pm S.D.)	
	t incubación = 2 h	t incubación = 24 h
0.05	100 \pm 1	102 \pm 2
0.1	99 \pm 2	99 \pm 1
0.5	100 \pm 3	100 \pm 1
1	100 \pm 1	90 \pm 1
5	101 \pm 1	92 \pm 2
20	80 \pm 1	53 \pm 2
40	85 \pm 1	13 \pm 0

**Figura 7.** Viabilidad celular para la línea HeLa-229 en presencia de PC1.

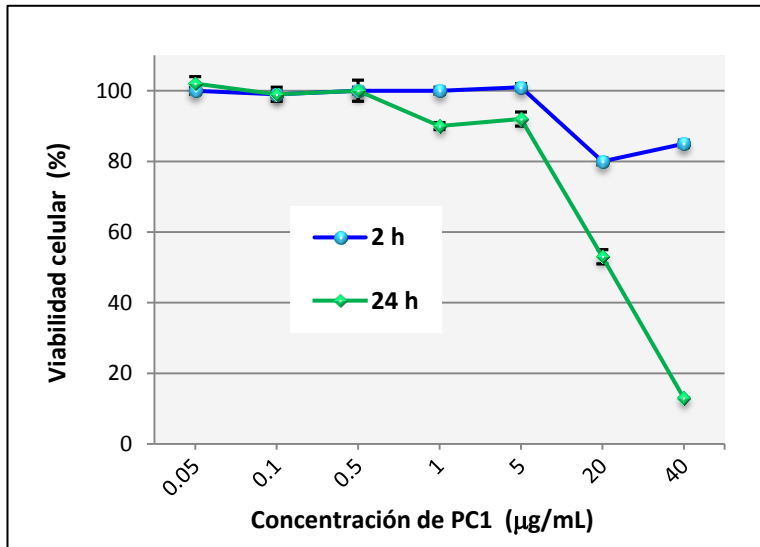
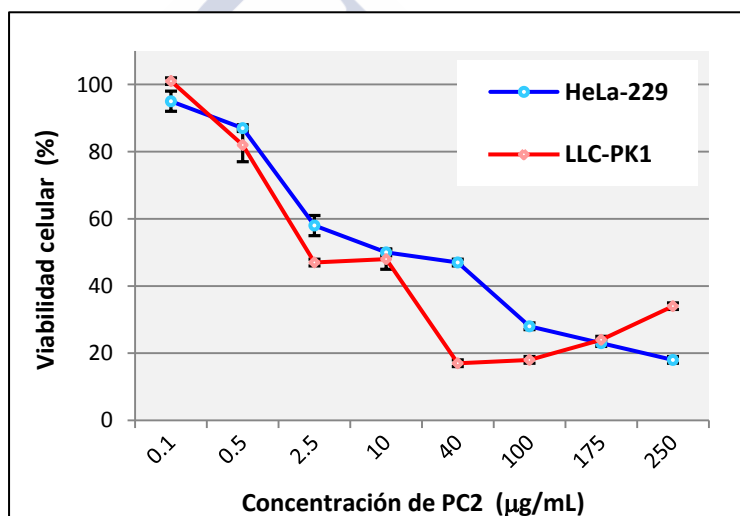


Figura 8. Viabilidad celular para la línea LLC-PK1 en presencia de PC1.

Como se puede observar en las Figuras 7 y 8, el efecto citotóxico de PC1 frente a la línea celular HeLa es dependiente del tiempo de incubación. La viabilidad celular supera el 85 % después de 2 h, pero cuando el tiempo de incubación se incrementa hasta 24 h la viabilidad celular se reduce hasta valores comprendidos entre el 40 y el 60 % (si se excluye la concentración más baja ensayada, 0.1 µg/mL). El efecto de PC1 frente a las células renales LLC-PK1, es independiente del tiempo de incubación hasta que se alcanza la concentración de 5 µg/mL sugiriendo que, frente a esta línea celular, y a concentraciones menores de 5 µg/mL, PC1 no es citotóxico. Sin embargo, la viabilidad celular disminuye drásticamente cuando se incrementa la concentración.

Tabla 3. Viabilidad de las células HeLa-229 y LLC-PK1 tras 24 h de incubación con PC2.

Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Viabilidad celular (% \pm S.D.)	
	Células HeLa	Células LLC-PK1
0.1	95 \pm 3	100 \pm 2
0.5	87 \pm 1	82 \pm 5
2.5	58 \pm 3	47 \pm 1
10	50 \pm 1	48 \pm 3
40	47 \pm 1	17 \pm 1
100	28 \pm 1	18 \pm 1
175	23 \pm 1	24 \pm 1
250	18 \pm 1	34 \pm 1

**Figura 9.** Viabilidad de las células HeLa-229 y LLC-PK1 tras 24 h de incubación con PC2.

El efecto tóxico de PC2 (Tabla 3, Figura 9) es muy similar, en ambas líneas celulares, hasta una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con una reducción de la viabilidad celular a esta concentración de aproximadamente el 50 %. A 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observa una mayor diferencia entre ambas líneas. Cuando se sobrepasa esta dosis, mientras que en HeLa se obtiene la respuesta gradual esperada, una disminución de la viabilidad al aumentar la concentración de tóxico, en LLC-PK1 la viabilidad se mantiene constante o aumenta ligeramente. Dado que ambas

líneas celulares crecen en dos medios de cultivos diferentes no puede descartarse la posibilidad de que su diferente composición de lugar, a altas concentraciones de PC2, a un mayor estado de agregación de éste en el medio de cultivo de la línea LLC-PK1, disminuyendo su concentración efectiva y, por tanto, su efecto tóxico.

Tabla 4. Viabilidad de las células HeLa-229 y LLC-PK1 tras 24 h de incubación con PC3.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidad celular (% \pm S.D.)	
	Células HeLa	Células LLC-PK1
0.1	95 \pm 2	98 \pm 1
0.5	84 \pm 1	98 \pm 1
10	58 \pm 1	64 \pm 2
40	27 \pm 1	43 \pm 1
100	15 \pm 1	21 \pm 1
200	17 \pm 1	23 \pm 1
300	17 \pm 1	25 \pm 1

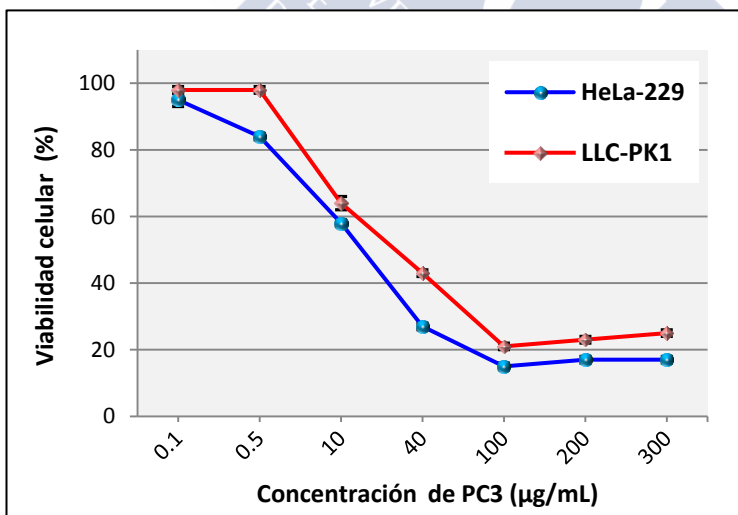


Figura 10. Viabilidad de las células HeLa-229 y LLC-PK1 tras 24 h de incubación con PC3.

El punto cuántico PC3 muestra un comportamiento dosis dependiente y muy similar en ambas líneas celulares (Tabla 4, Figura 10), requiriéndose concentraciones ligeramente superiores a 10 $\mu\text{g/mL}$ para que se produzca una reducción de la viabilidad del 50 %. El efecto tóxico similar en ambas líneas celulares se pone también de manifiesto en sus valores de IC_{50} , calculados a partir de las correspondientes curvas dosis-respuesta: 12.5 $\mu\text{g/mL}$ en HeLa y 13.7 $\mu\text{g/mL}$ en LLC-PK1.

Tabla 5. Viabilidad de las células HeLa-229 y LLC-PK1 tras 24 h de incubación con PC4.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidad celular (% \pm S.D.)	
	Células HeLa	Células LLC-PK1
0.1	90 \pm 3	90 \pm 2
0.5	75 \pm 1	75 \pm 2
2.5	53 \pm 1	58 \pm 2
10	46 \pm 1	39 \pm 1
40	46 \pm 2	23 \pm 1
100	35 \pm 3	19 \pm 1
200	20 \pm 1	26 \pm 1
300	18 \pm 1	32 \pm 1

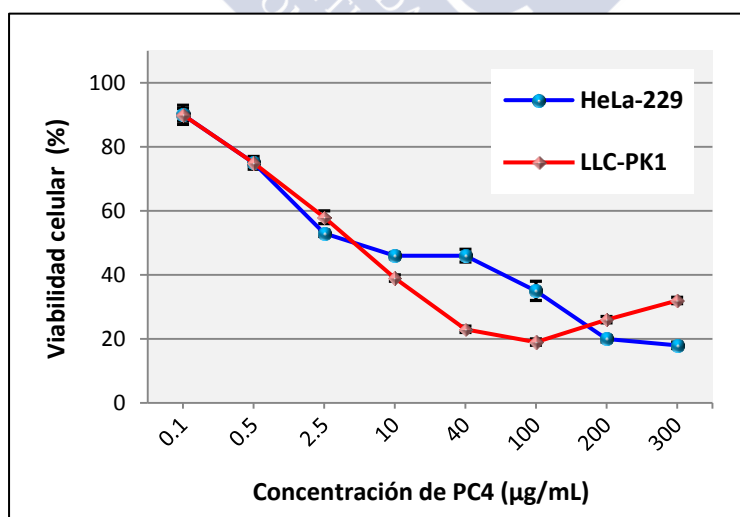


Figura 11. Viabilidad de las células HeLa-229 y LLC-PK1 tras 24h de incubación con PC4.

El comportamiento del punto cuántico PC4 es muy similar al de PC2. Las curvas viabilidad/concentración de PC4 (Figura 11) prácticamente se superponen a bajas concentraciones ($\leq 10 \mu\text{g/mL}$), mientras que a concentraciones mayores o iguales a $40 \mu\text{g/mL}$, el efecto tóxico frente a las células renales aumenta con respecto al observado en HeLa. También en este caso, en contra de lo esperado, a concentraciones mayores de $100 \mu\text{g/mL}$ la viabilidad de las células renales aumenta ligeramente.

Tabla 6. Viabilidad de las células HeLa-229 y LLC-PK1 tras 24h de incubación con PC5.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidad celular (% \pm S.D.)	
	Células HeLa#	Células LLC-PK1
0.1	99 \pm 1	85 \pm 2
0.5	91 \pm 9	77 \pm 2
2.5	78 \pm 7	79 \pm 1
10	46 \pm 4	57 \pm 3
40	64 \pm 9	37 \pm 2
100	65 \pm 3	24 \pm 1
200	58 \pm 6	24 \pm 1
300	44 \pm 9	30 \pm 1

Valor medio de dos ensayos independientes

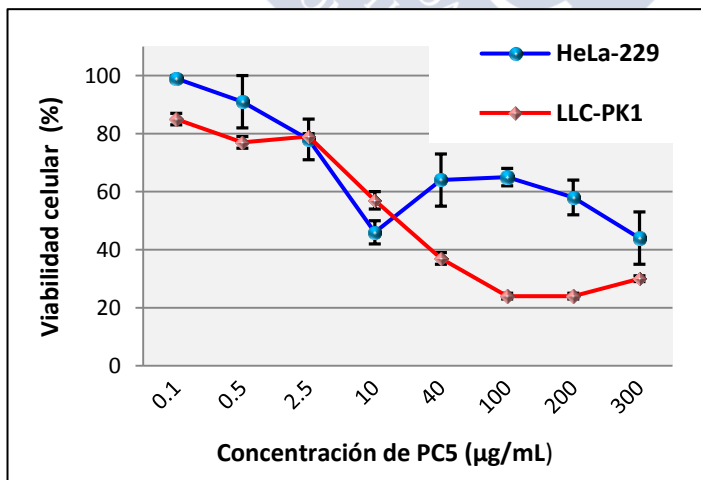


Figura 12. Viabilidad de las células HeLa-229 y LLC-PK1 tras 24h de incubación con PC5

Como se muestra en la Tabla 6 y Figura 12 a concentraciones bajas PC5 es poco citotóxico en ambas líneas celulares. En la línea celular LLC-PK1 se observa el comportamiento regular esperado: la viabilidad va disminuyendo a medida que se incrementa la concentración de PC. Este mismo comportamiento se observa en la línea celular HeLa hasta una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en donde alcanza un mínimo de viabilidad y, sin embargo, a concentraciones superiores la citotoxicidad parece disminuir. Este incremento de la viabilidad celular a concentraciones elevadas, podría relacionarse con un incremento significativo en el estado de agregación y con una menor internalización de las nanopartículas.

El valor de IC_{50} , calculado para la línea celular LLC-PK1, es 16.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabla 7. Viabilidad de las células HeLa-229 y LLC-PK1 tras 24h de incubación con PC6.

Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Viabilidad celular (% \pm S.D.)	
	Células HeLa#	Células LLC-PK1
0.1	99 \pm 2	93 \pm 3
0.5	94 \pm 9	91 \pm 3
2.5	91 \pm 5	84 \pm 2
10	67 \pm 9	80 \pm 1
40	47 \pm 8	77 \pm 1
100	40 \pm 3	52 \pm 1
200	39 \pm 1	33 \pm 1
300	37 \pm 1	35 \pm 1

Valor medio de dos ensayos independientes

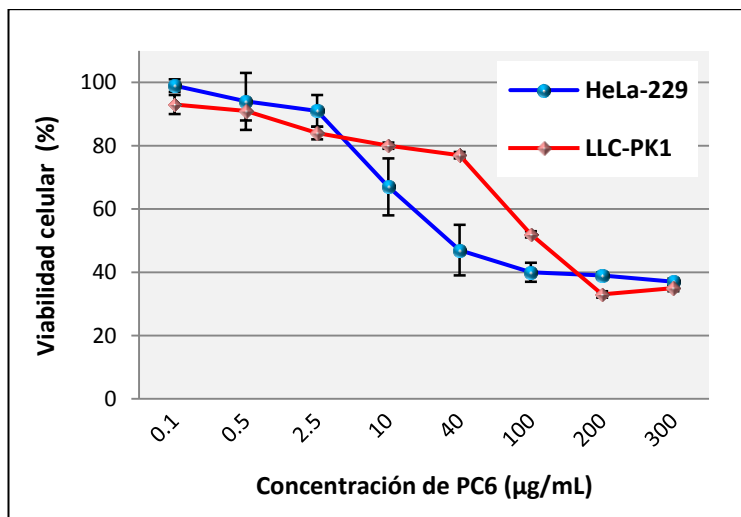


Figura 13. Viabilidad de las células HeLa-229 y LLC-PK1 tras 24h de incubación con PC6.

En la Tabla 7 y Figura 13 se observa que el punto cuántico PC6 muestra un comportamiento dosis dependiente. A bajas concentraciones no es citotóxico y la viabilidad va disminuyendo a medida que se incrementa la concentración, siendo menos citotóxico en la línea celular LLC-PK1 (IC_{50} , 70 $\mu\text{g/mL}$) que en la línea celular HeLa (IC_{50} 11.7 $\mu\text{g/mL}$).

Como ya se ha comentado previamente (Capítulo 1), el efecto tóxico de las nanopartículas es dependiente de la línea celular utilizada, ya que cada línea posee un mecanismo endocitótico propio y requiere un medio de cultivo específico. Por otra parte, los PCs aquí descritos no están específicamente conjugados, de modo que una vez dispersos en el medio de cultivo podrían establecer interacciones, en mayor o menor medida, con proteínas y otras biomoléculas existentes en el mismo,⁸⁻¹¹ modificando así de forma diferente sus propiedades.

⁸ L. Lai, J.-Ch. Jin, Z.-Q. Xu, P. Mei, F.-L. Jiang, Y. Liu, *Chemosphere*, 135 (2015) 240.

⁹ J. Liu, R. Hu, J. Liu, B. Zhang, Y. Wang, X. Liu, W.-Ch. Law, L. Liu, L. Ye, K.-T. Yong, *Mat. Sci. Eng. C*, 57 (2015) 222.

¹⁰ T. Wang, X. Jiang, *Appl. Mater. Interfaces*, 5 (2013) 1190.

Los efectos tóxicos observados en las células renales LLC-PK1 son los esperados, al menos en parte, teniendo en cuenta la composición de los PCs. Así los PCs más citotóxicos son PC1 y PC2, ambos constituidos únicamente por un núcleo CdTe. El recubrimiento de PC2 con una coraza ZnS para dar PC5 y CdS para dar PC6 incrementó, como era de esperar,¹² el valor de IC₅₀: 1.3 µg/mL para PC2 y 16.2 µg/mL y 70 µg/mL para PC5 y PC6, respectivamente.

La mayor toxicidad de PC5 con respecto a PC6, en contra de lo esperado, podría relacionarse con una menor estabilidad de PC5, derivada de la naturaleza de la coraza ZnS (rápida formación y mayor discordancia en los parámetros de red¹³) y de la presencia del ligando DMSA (fácil descomposición) en su recubrimiento.

Respecto a los puntos cuánticos PC3 (IC₅₀, 12.5 µg/mL) y PC4 (IC₅₀, 3.2 µg/mL), ambos preparados a partir de núcleos TGA-CdTe, se observó un efecto citotóxico ligeramente menor para PC3, lo que de nuevo podría estar relacionado con la diferente naturaleza de los ligandos utilizados en el recubrimiento (DMPS en PC3 y DMSA en PC4).¹⁴⁻¹⁷

También cabe destacar que a concentraciones elevadas dejan de observarse diferencias en el comportamiento de los distintos PCs, lo que está de acuerdo con que su toxicidad no puede atribuirse solamente a la liberación de Cd(II), y que otros mecanismos, como la liberación de especies de oxígeno reactivas (ROS), deben de estar involucrados.¹⁴⁻¹⁷

La relación entre la composición y el efecto tóxico de los PCs en la línea celular HeLa no es tan clara, no existiendo grandes diferencias entre ellos. Este comportamiento similar podría ser debido a una mayor interacción con las

¹¹ Y. Song, D. Feng, W. Shi, X. Li, H. Ma, *Talanta*, 116 (2013) 237.

¹² Y. Su, Y. He, H. Lu, L. Sai, Q. Li, W. Li, L. Wang, P. Shen, Q. Huang, Ch. Fan, *Biomaterials*, 30 (2009) 19.

¹³ Z. Yuan, P. Yang, *Mater. Res. Bull.*, 48 (2013) 2640.

¹⁴ K. C. Nguyen, W. G. Willmore, A. F. Tayabali, *Toxicol.*, 306 (2013) 114.

¹⁵ Y. Su, M. Hu, Ch. Fan, Y. He, Q. Li, W. Li, L. H. Wang, P. Shen, Q. Huang, *Biomaterials*, 31 (2010) 4829.

¹⁶ S. J. Cho, D. Maysinger, M. Jain, B. Röder, S. Hackbarth, F. M. Winnik, *Langmuir*, 23 (2007) 1974.

¹⁷ J. Lovric, S. J. Cho, F. M. Winnik, D. Maysinger, *Chem. Biol.*, 12 (2005) 1227.

proteínas del medio de cultivo, que posibilita que finalmente la superficie de los diferentes PCs sea análoga en todos los casos; si bien, al igual que en la línea celular LLC-PK1, PC3 y PC6 parecen ser menos citotóxicos.

La toxicidad de los PCs en la línea celular HeLa es, en general, comparable a la de los sistemas previamente estudiados, MPA-CdTe/CdS⁸ y MPA-CdTe.¹⁸

5.2.1.2 Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia

Una vez realizados los ensayos de citotoxicidad, se llevaron a cabo estudios de microscopía confocal de fluorescencia para analizar la posible internalización celular de los PCs y los posibles cambios morfológicos que experimentan las células en su presencia. Las imágenes obtenidas tras la incubación de las células durante 90 min (o 2 h con PC1) en presencia de 40 µg/mL de los diferentes PCs, se muestran en las Figuras 14 a 25. Para cada PC y línea celular se adjuntan las proyecciones máximas del canal del PC y del canal de la phalloidina utilizada para teñir la célula (Bodipy Phalloidine o Alexa Fluor), junto con una superposición de ambos canales (*merge*). Se muestran también proyecciones ortogonales ilustrando la localización de los PCs en el interior celular.

Las Figuras 14 y 15 corresponden a imágenes de las células control teñidas con Bodipy Phalloidine y Alexa Fluor, respectivamente.

¹⁸ J. Wang, N. Li, F. Shao, H. Han, *Sensor. Actuat. B: Chem.*, 207 (2015) 74.

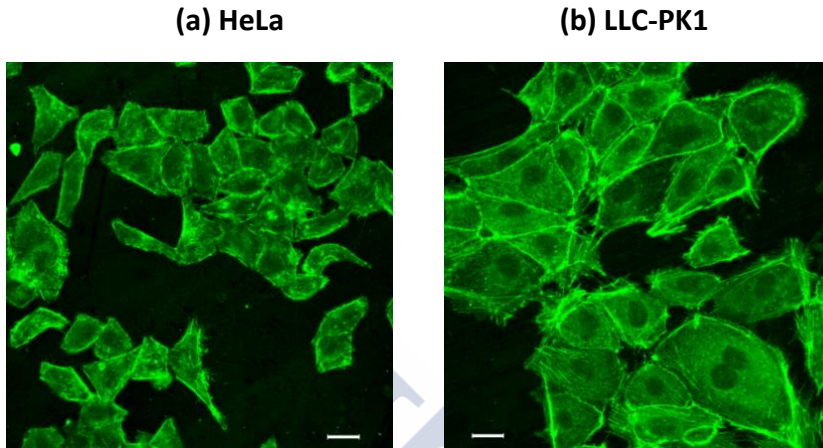


Figura 14. Imágenes confocal (proyección máxima) del control en células HeLa (a) y LLC-PK1 (b) teñidas con Bodipy (escala 20 μm).

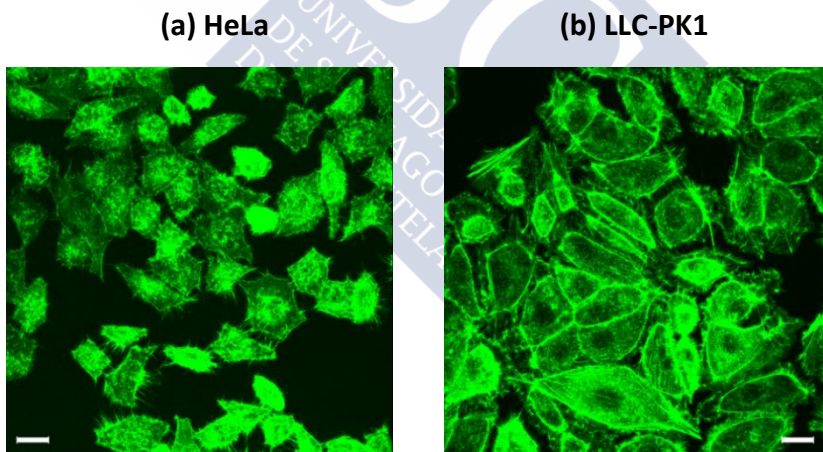


Figura 15. Imágenes confocal (proyección máxima) del control en células HeLa (a) y LLC-PK1 (b) teñidas con Alexa-Fluor (escala 20 μm).

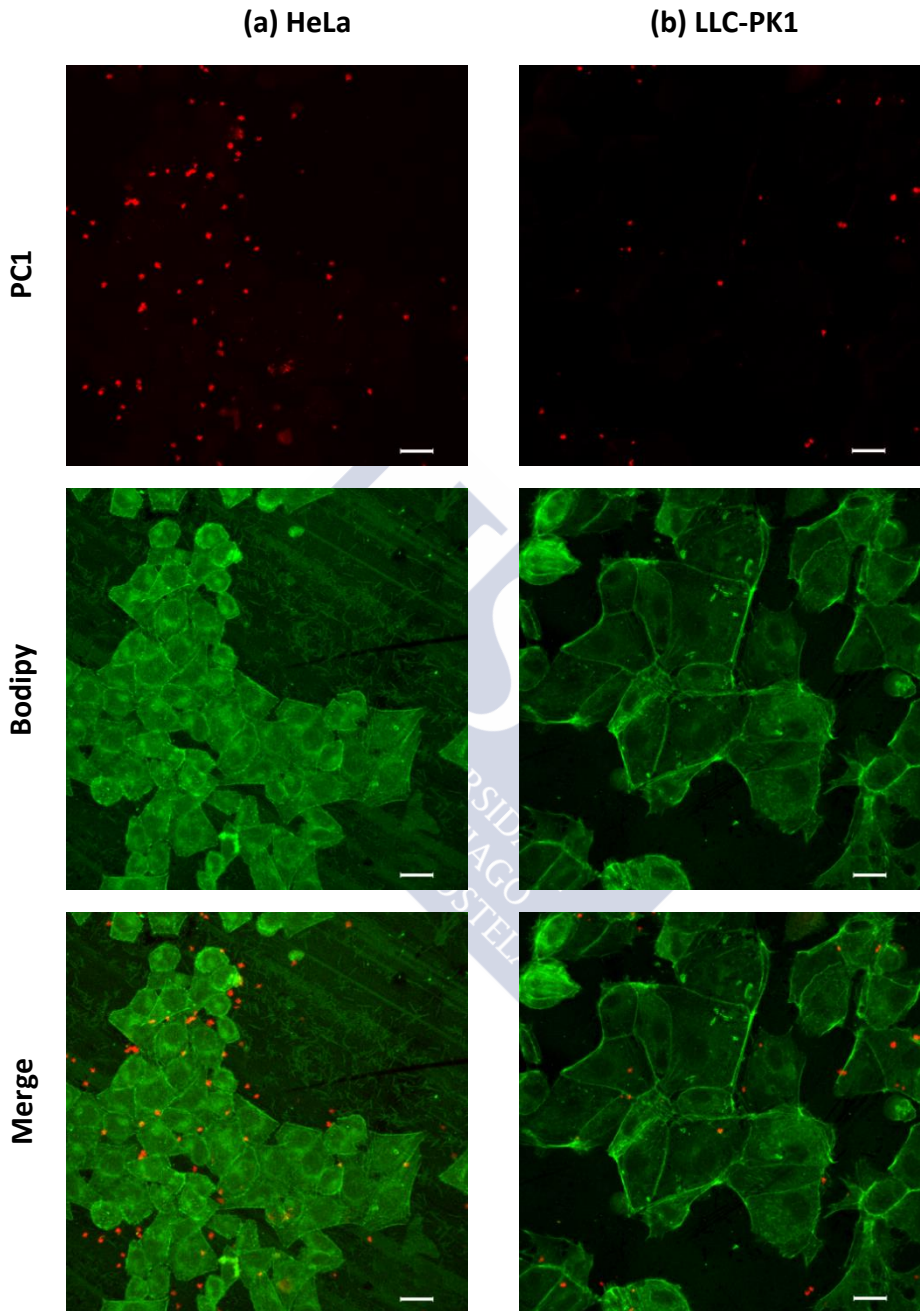


Figura 16. Imágenes confocal (proyección máxima) de células HeLa (a) y LLC-PK1 (b) después de 2 h de incubación con PC1 (escala 20 μm).

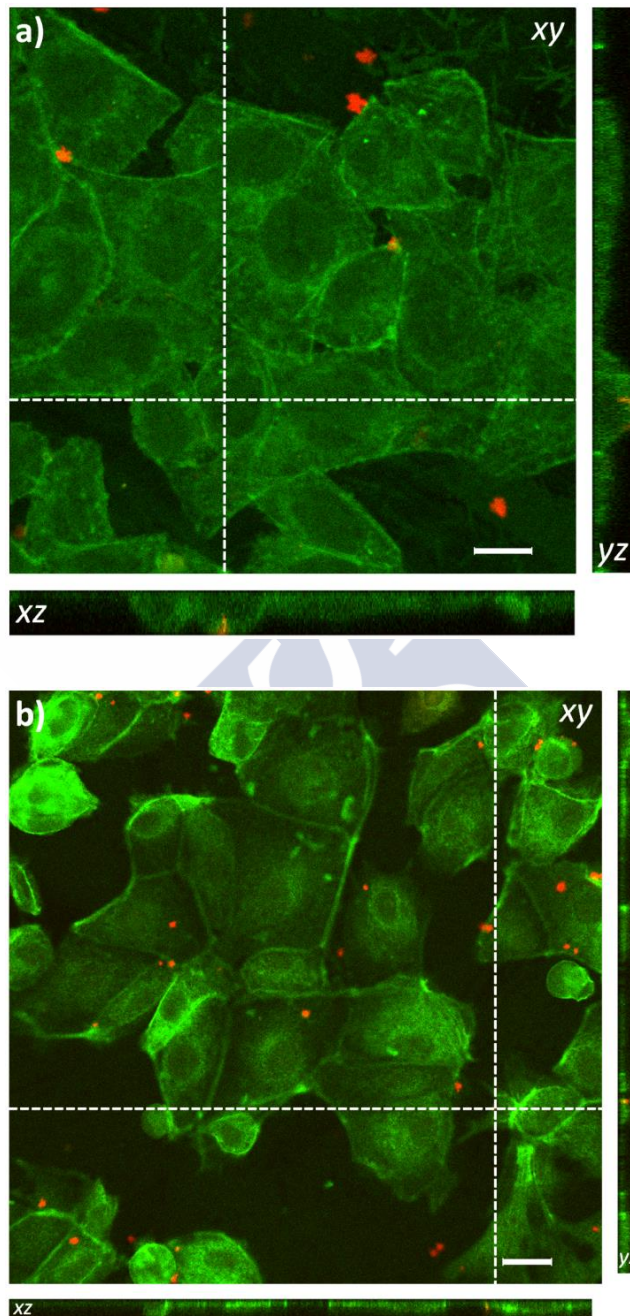


Figura 17. Imágenes confocal mostrando la internalización de PC1 en células HeLa (escala 10 µm) (a) y en LLC-PK1 (escala 20 µm) (b).

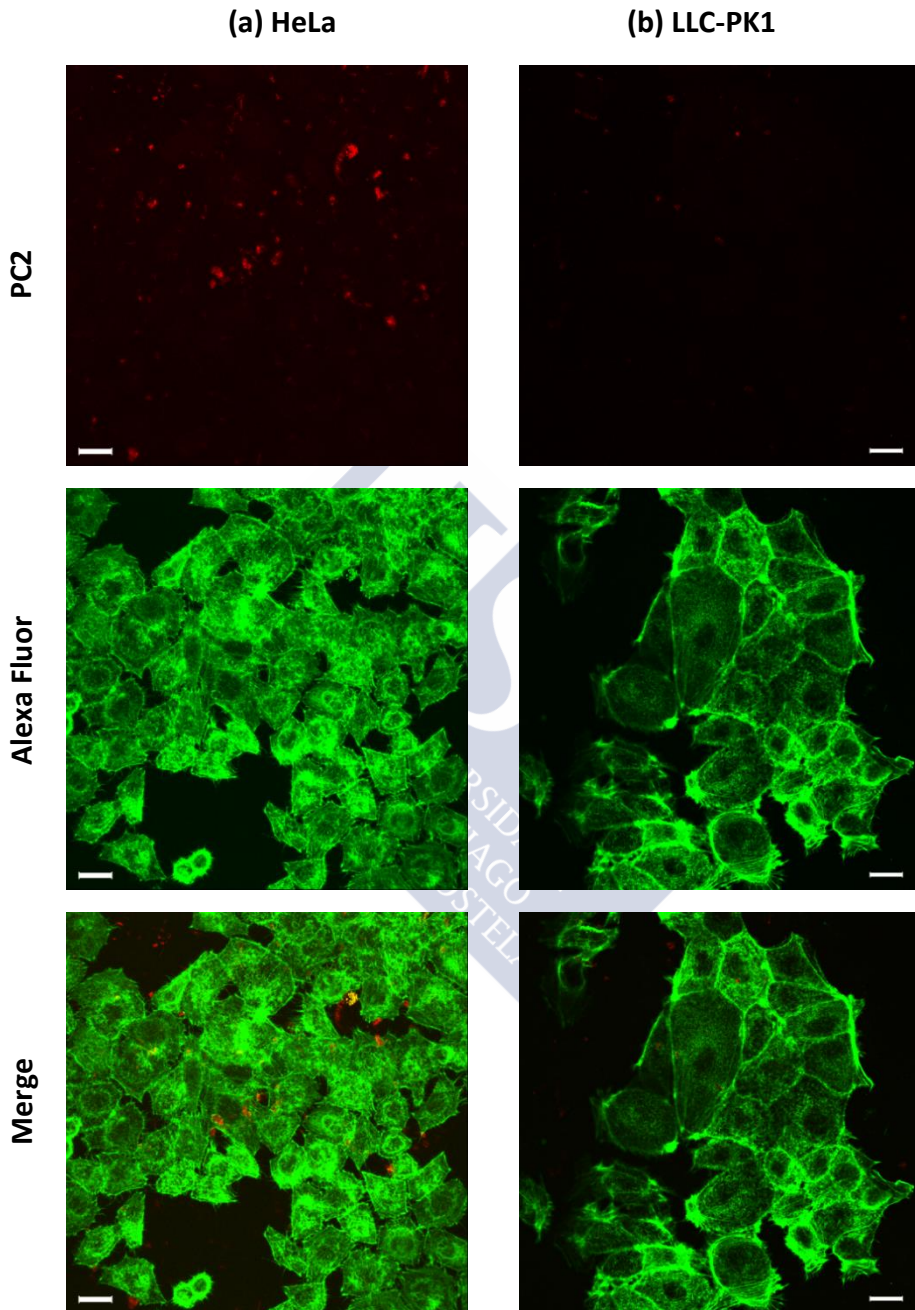


Figura 18. Imágenes confocal (proyección máxima) de células HeLa (a) y LLC-PK1 (b) después de 90 min de incubación con PC2 (escala 20 μm).

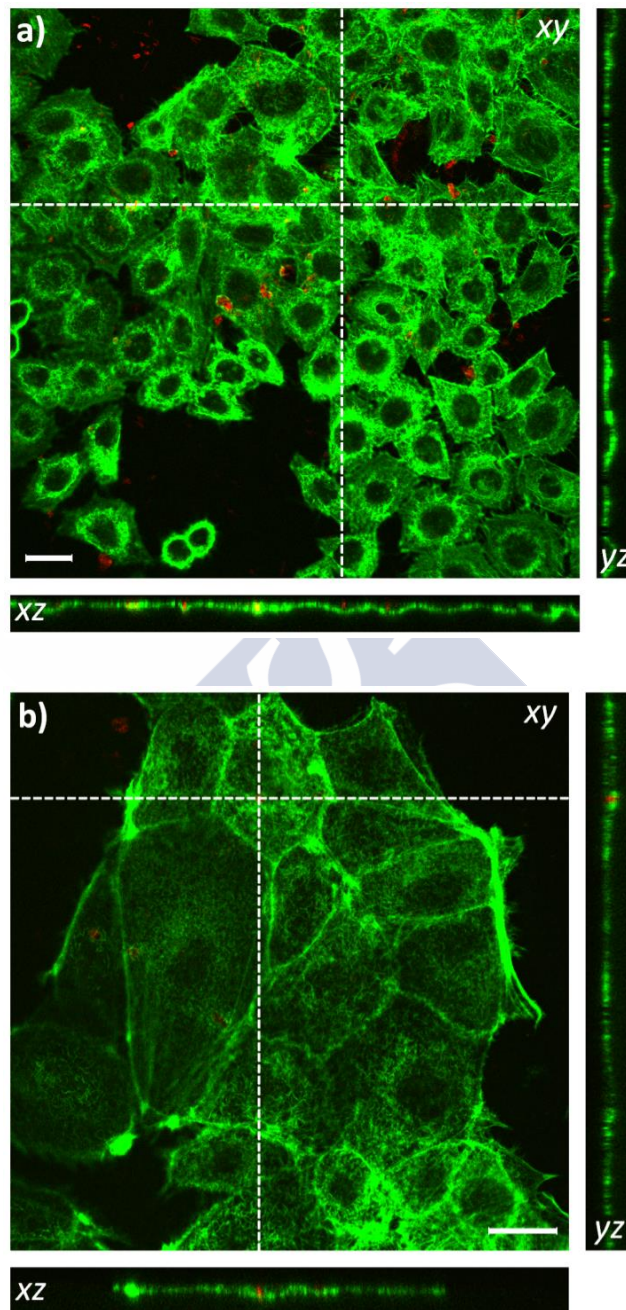


Figura 19. Imágenes confocal mostrando la internalización de PC2 en células HeLa (a) y LLC-PK1 (b) (escala 20 μm).

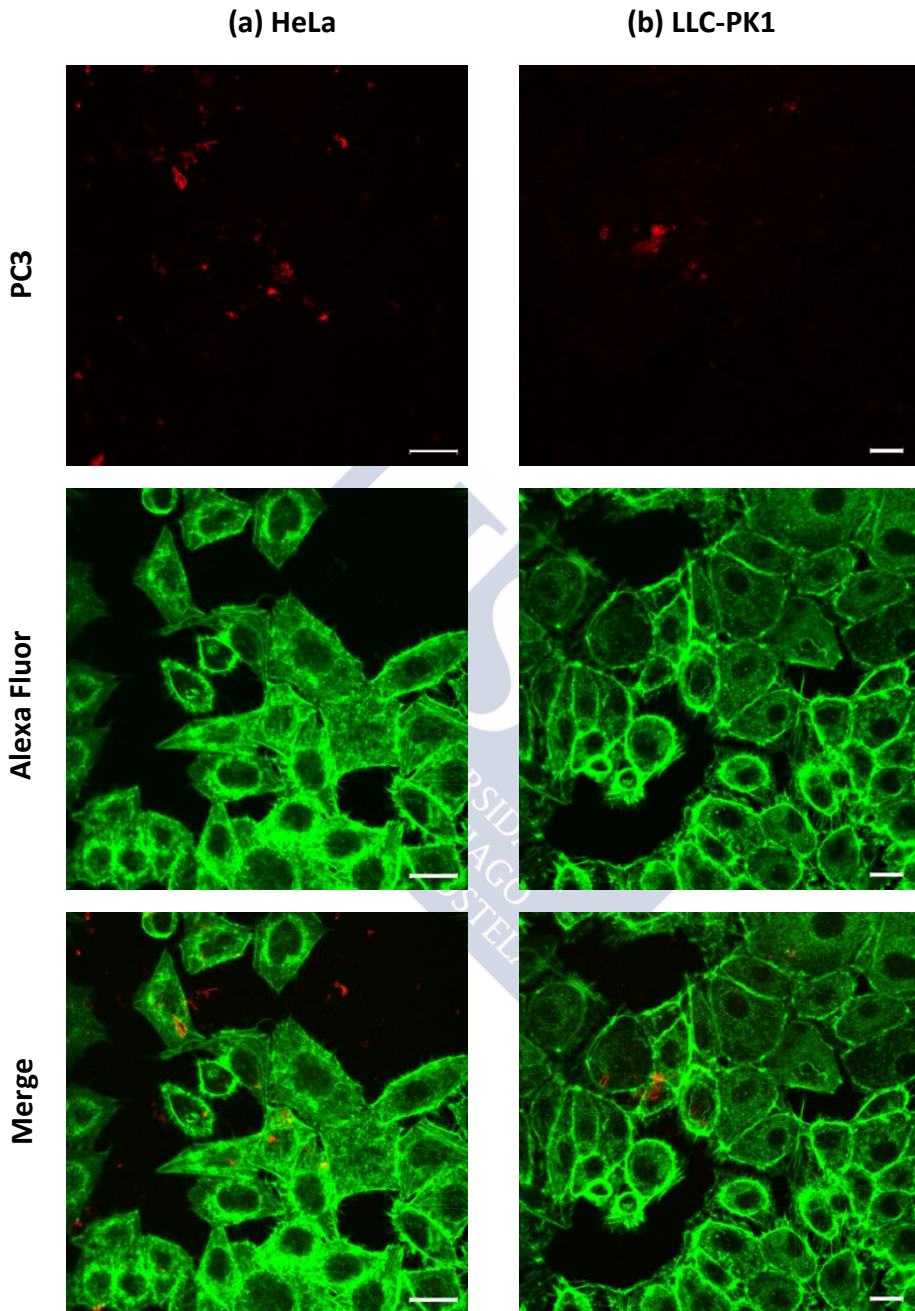


Figura 20. Imágenes confocal (proyección máxima) de células HeLa (a) y LLC-PK1 (b) después de 90 min de incubación con PC3 (escala 20 μ m).

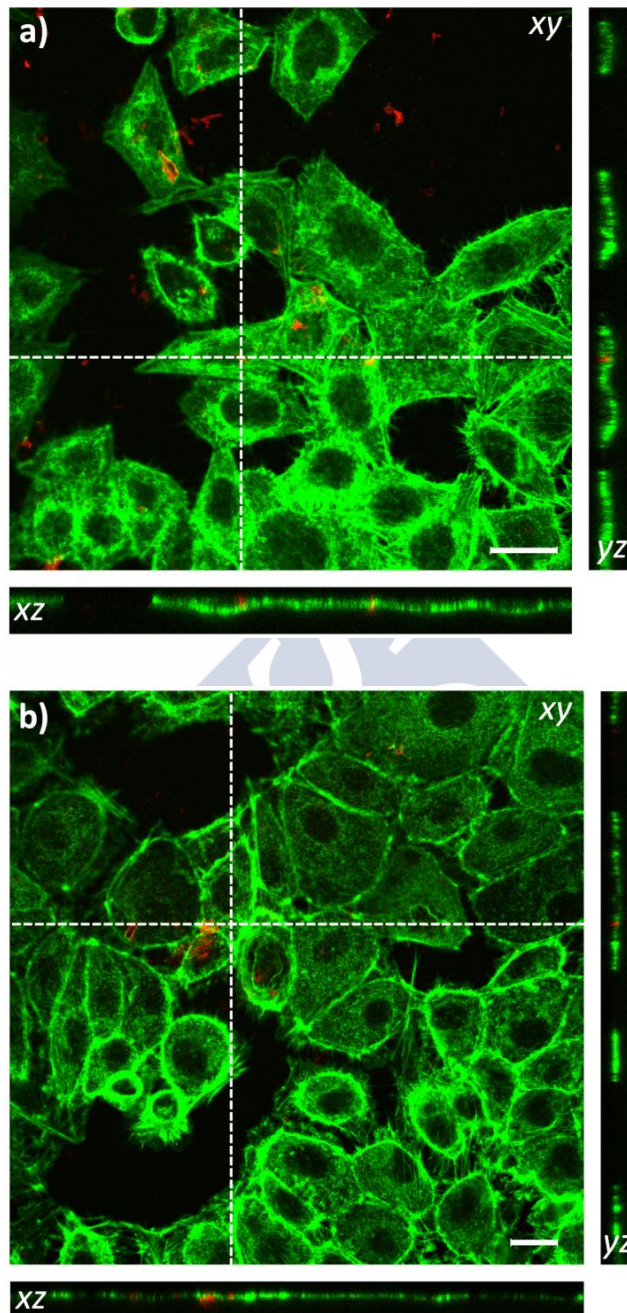


Figura 21. Imágenes confocal mostrando la internalización de PC3 en células HeLa (a) y LLC-PK1 (b) (escala 20 μm).

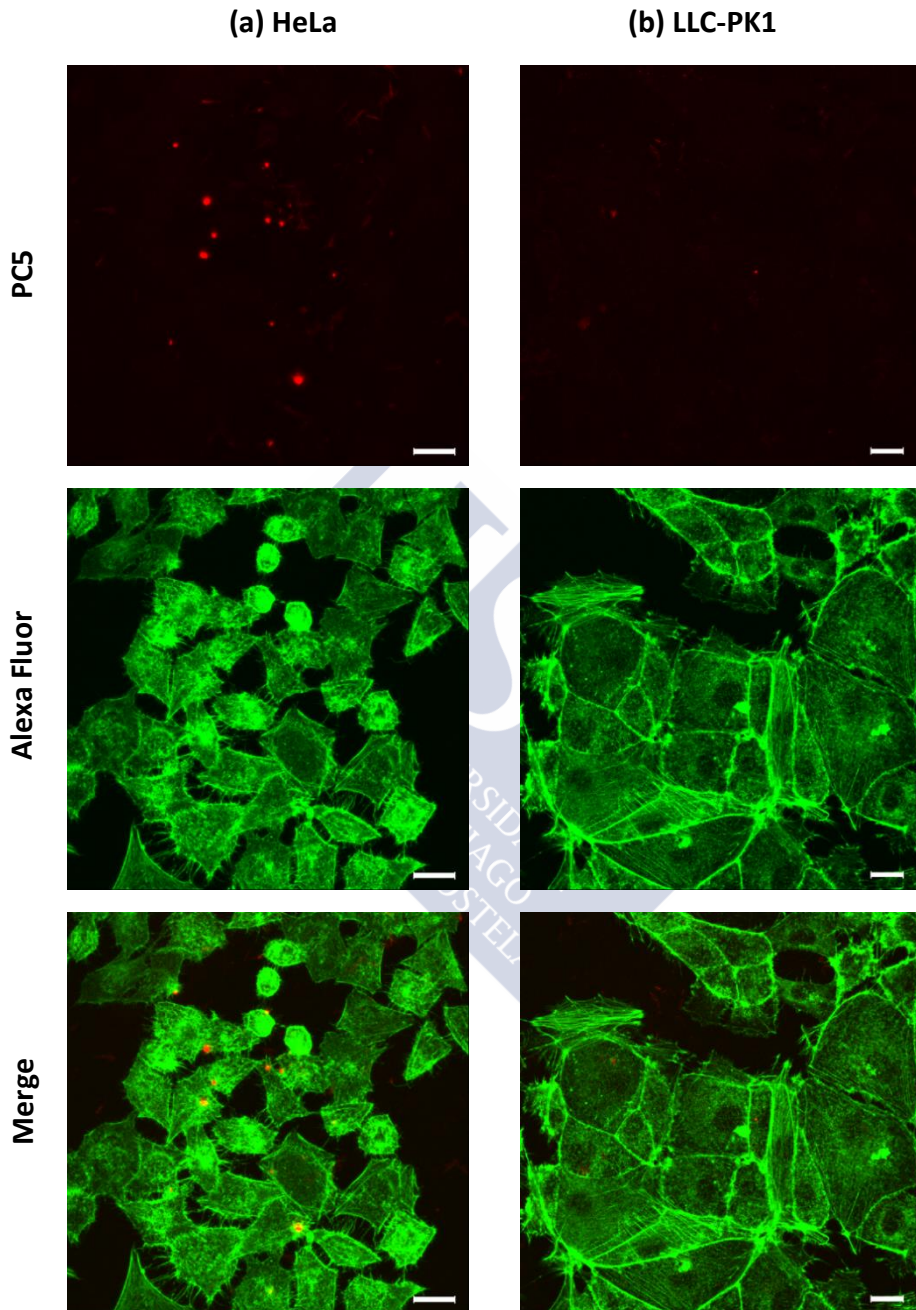


Figura 22. Imágenes confocal (proyección máxima) de células HeLa (a) y LLC-PK1 (b) después de 90 min de incubación con PC5 (escala 20 μ m).

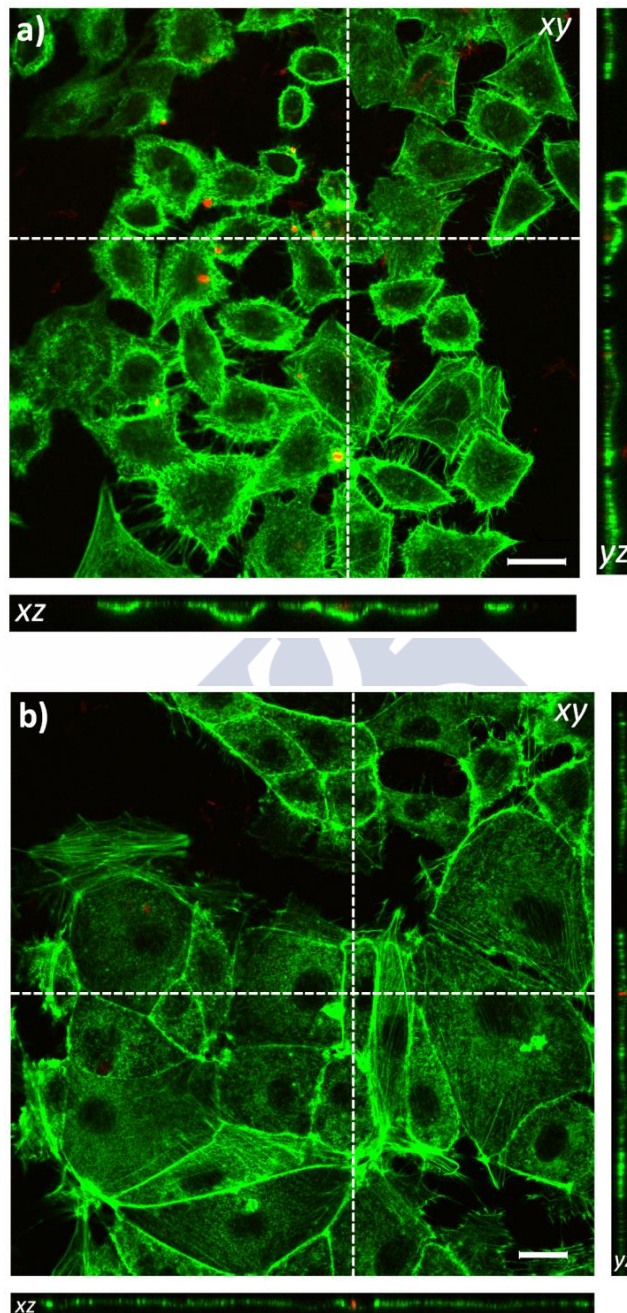


Figura 23. Imágenes confocal mostrando la internalización de PC5 en células HeLa (a) y LLC-PK1 (b) (escala 20 μm).

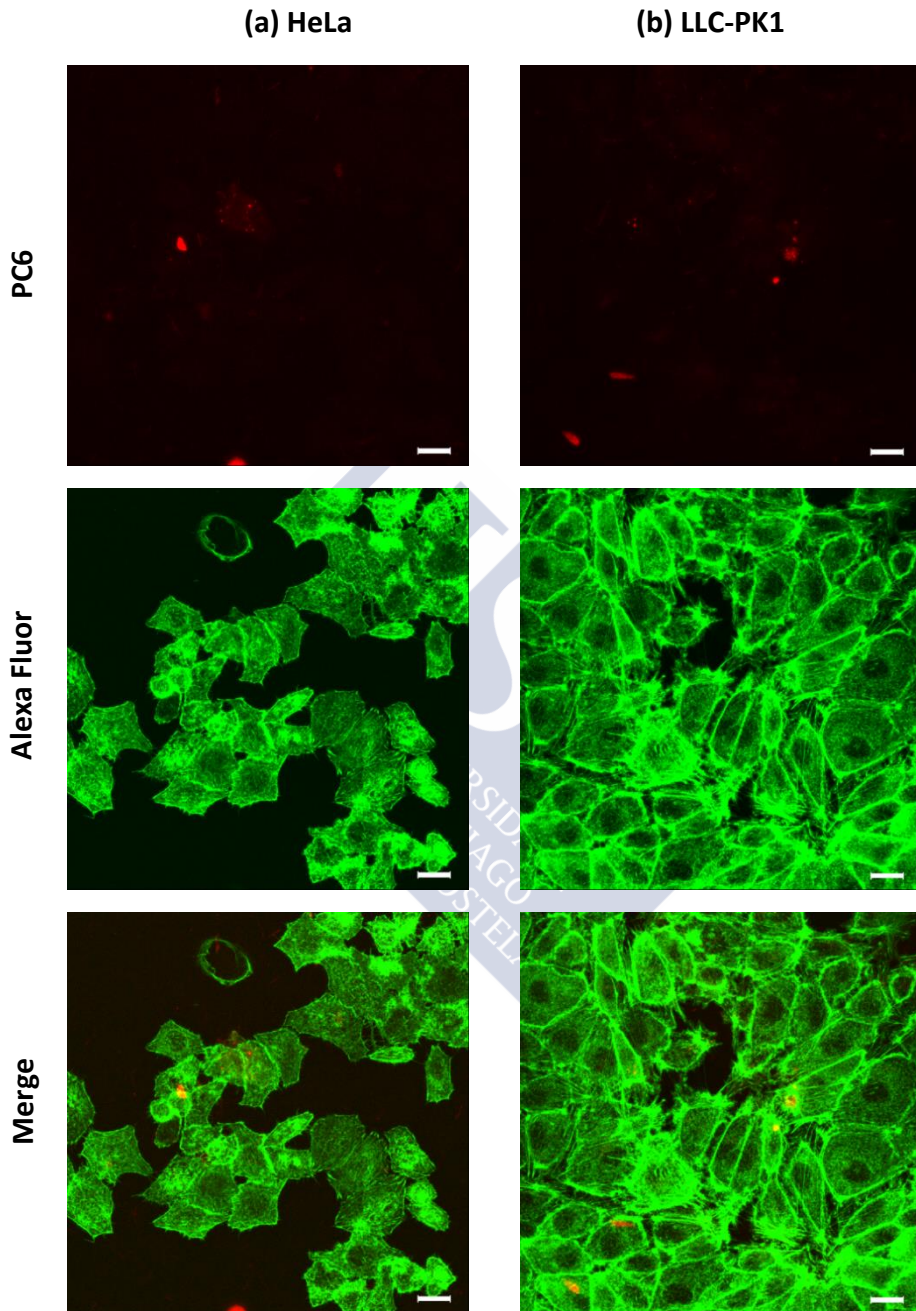


Figura 24. Imágenes confocal (proyección máxima) de células HeLa (a) y LLC-PK1 (b) después de 90 min de incubación con PC6 (escala 20 μ m).

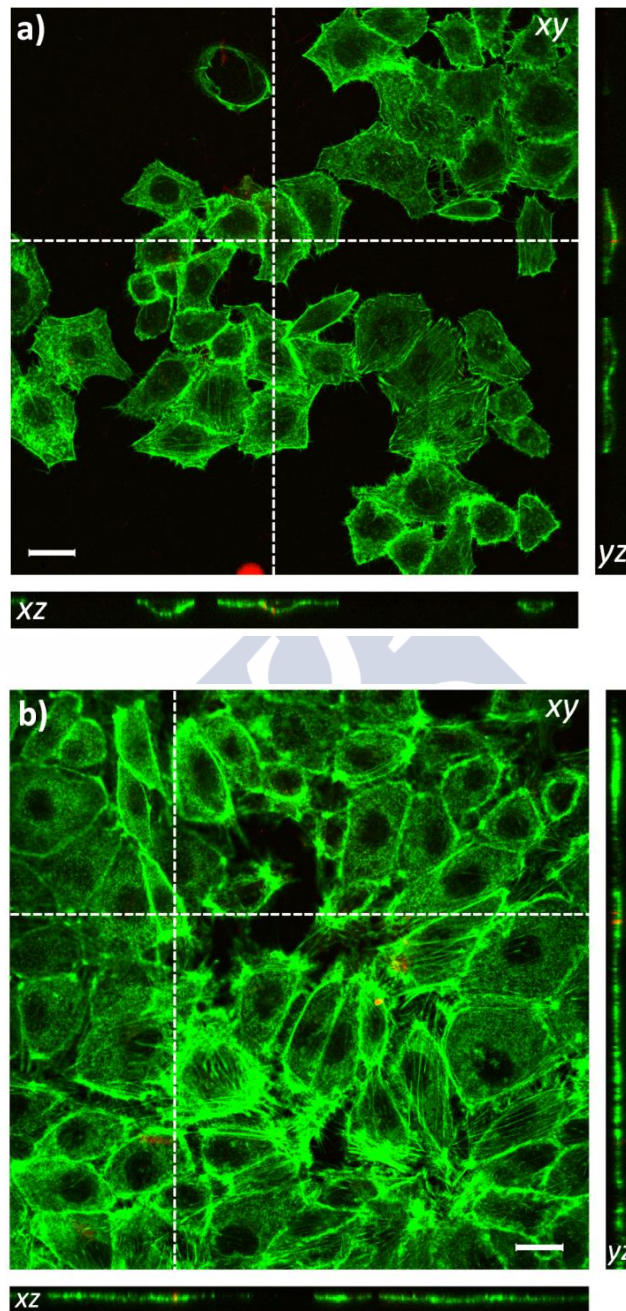


Figura 25. Imágenes confocal mostrando la internalización de PC6 en células HeLa (a) y LLC-PK1 (b) (escala 20 μm).

Estas imágenes indican que, en las condiciones ensayadas, no se produjeron cambios significativos en la morfología celular. Los puntos rojos fluorescentes observados revelan que las nanopartículas conservan, en buena medida, las propiedades ópticas mostradas en disolución.

Las proyecciones ortogonales sugieren que se ha producido la internalización de los PCs en ambas líneas celulares y muestran su distribución en el espacio intracelular. Todos los PCs se sitúan, principalmente, en la región perinuclear (Figuras 17, 19, 21, 23 y 25). Esta distribución no homogénea podría ser, en parte, la responsable de la mayor toxicidad asociada a los PCs respecto a la provocada por Cd(II) libre,¹⁹ el cual se distribuye homogéneamente en el citoplasma. La baja densidad de los PCs observada en las células renales LLC-PK1 podría atribuirse a un incremento del estado de agregación que dificultaría su internalización, o a que un elevado grado de dispersión en el citoplasma y su pequeño tamaño impidan su visualización.

Si bien la mayor parte de las imágenes muestran una localización de los PCs en la región perinuclear, las Figuras 18a y 19a son compatibles con la presencia de PC2 en el núcleo de las células HeLa. Esta localización podría estar relacionada con su menor tamaño y mediada por la interacción entre las nanopartículas, negativamente cargadas, y las histonas, cargadas positivamente.²⁰

5.2.1.3 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión

Para evaluar los posibles cambios morfológicos inducidos por los PCs se examinó la ultraestructura de células HeLa y LLC-PK1 mediante microscopía electrónica de transmisión. Tal y como se describe en la parte experimental, las células se incubaron en presencia de 40 y 250 µg/mL de PC2 durante 90 min.

¹⁹ N. Chen, Y. He, Y. Su, X. Li, Q. Huang, H. Wang, X. Zhang, R. Tai, Ch. Fan, *Biomaterials*, 33 (2012) 1238.

²⁰ Y. Williams, J. Conroy, Y. Volkov, *Biocompatibility and Cellular Localisation of CdTe quantum dots en Cadmium Telluride Quantum Dots. Advances and Applications*, Ed. J. F. Donegan, Y. P. Rakovich, CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, FL (2013).

A 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no se observaron cambios significativos, en concordancia con los resultados de su baja citotoxicidad, a tiempos cortos incubación, y con las imágenes de microscopía confocal de fluorescencia. Las imágenes que se muestran en las Figuras 26 a 31 corresponden a la concentración más alta, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PC2.

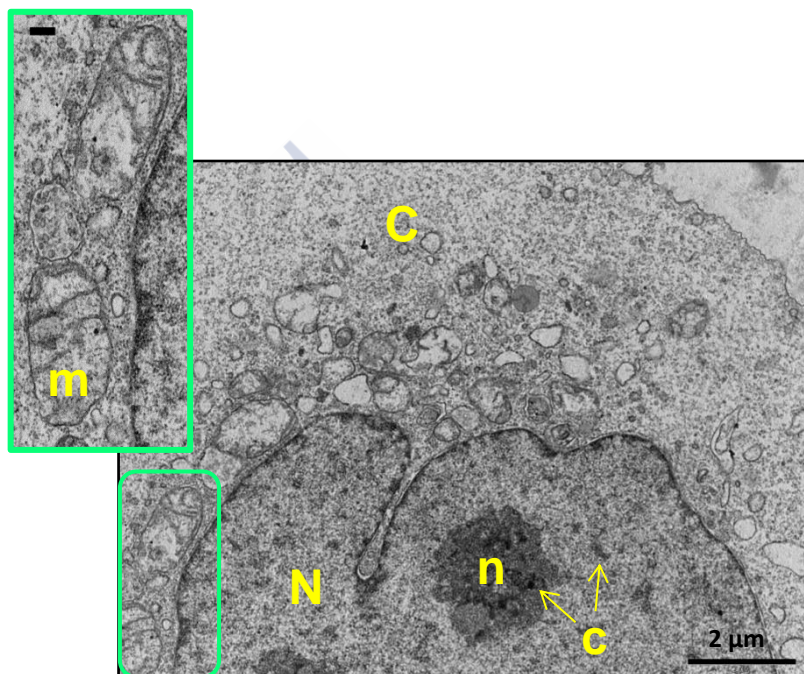


Figura 26. Imagen TEM del control en la línea celular HeLa con una ampliación de las mitocondrias (escala 300 nm). C = citoplasma, N = núcleo, n = nucleolo, m = mitocondria, c = cromatina.

En la Figura 26 se muestra una célula HeLa control con el núcleo en la parte inferior, con la cromatina fina e islotes de cromatina densa pegados a la membrana nuclear, un nucleolo grande y una invaginación en la que se pueden observar más claramente los poros de la membrana. El citoplasma está ocupado por ribosomas (granulado fino) y vesículas que, en su mayoría, son mitocondrias, alguna de las cuales ha perdido parte de sus crestas en el procesado de la muestra, tal como se observa en la ampliación de la Figura 26.

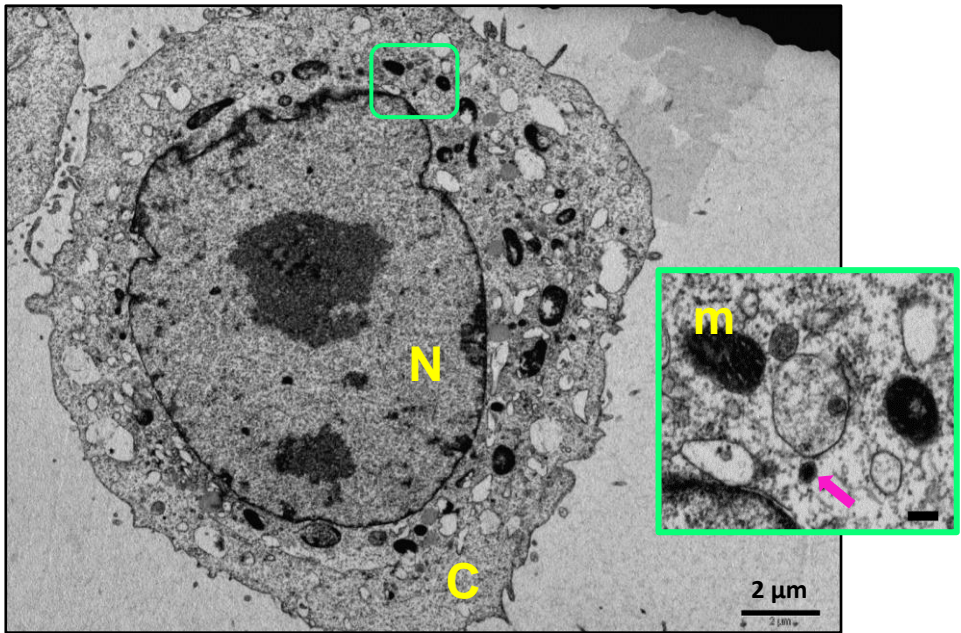


Figura 27. Imagen TEM de células HeLa incubadas con PC2 (escala ampliación 200 nm).
C = citoplasma, N = núcleo, m = mitocondria.

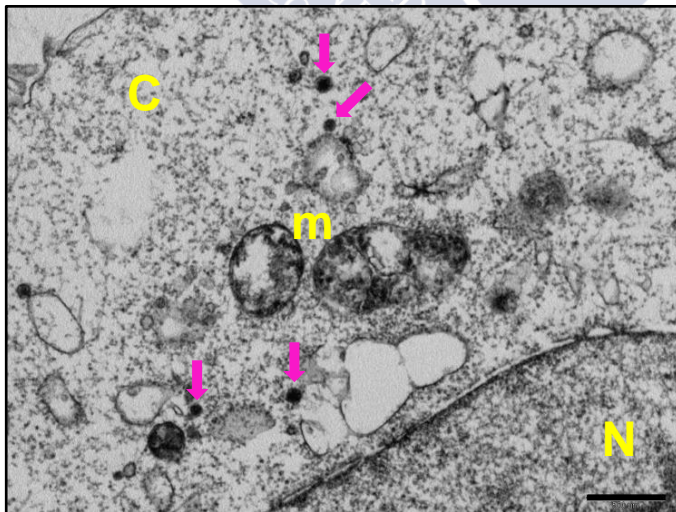


Figura 28. Imagen TEM de células HeLa incubadas con PC2 (escala 500 nm).
C = citoplasma, N = núcleo, m = mitocondria.

En las Figuras 27 y 28 se muestran imágenes de células tratadas con PC2 cuyo núcleo y cromatina tienen caracteres similares al control. Nótese que el contenido vesicular del citoplasma es mucho más elevado. La zona perinuclear está ocupada por estructuras ovals y electrodensas, en cuyo interior se observan restos de crestas mitocondriales y un contenido granular denso compatible con la presencia de PC2. En ambas figuras, se observan también pequeñas vesículas lisosómicas rodeadas de membrana (señaladas con flechas), que contienen cúmulos de partículas, probablemente puntos cuánticos.

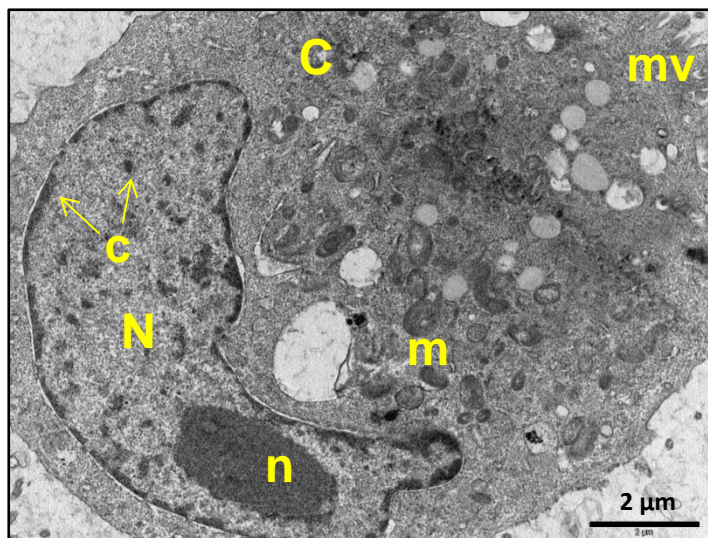


Figura 29. Imagen TEM del control en la línea celular LLC-PK1. C = citoplasma, N = núcleo, n = nucleolo, m = mitocondria, c = cromatina, mv = microvilli.

En la imagen TEM de una célula renal control (Figura 29) se observa la presencia del núcleo a la izquierda con un gran nucleolo, cromatina fina e islotes de cromatina adheridos a la membrana con espacios de poro entre ellos. La membrana celular, en su mayor parte de contorno liso, muestra la presencia de microvilli. El citoplasma es rico en ribosomas (grano fino), contenido mitocondrial disperso y abundancia de vesículas de distinto tamaño y forma.

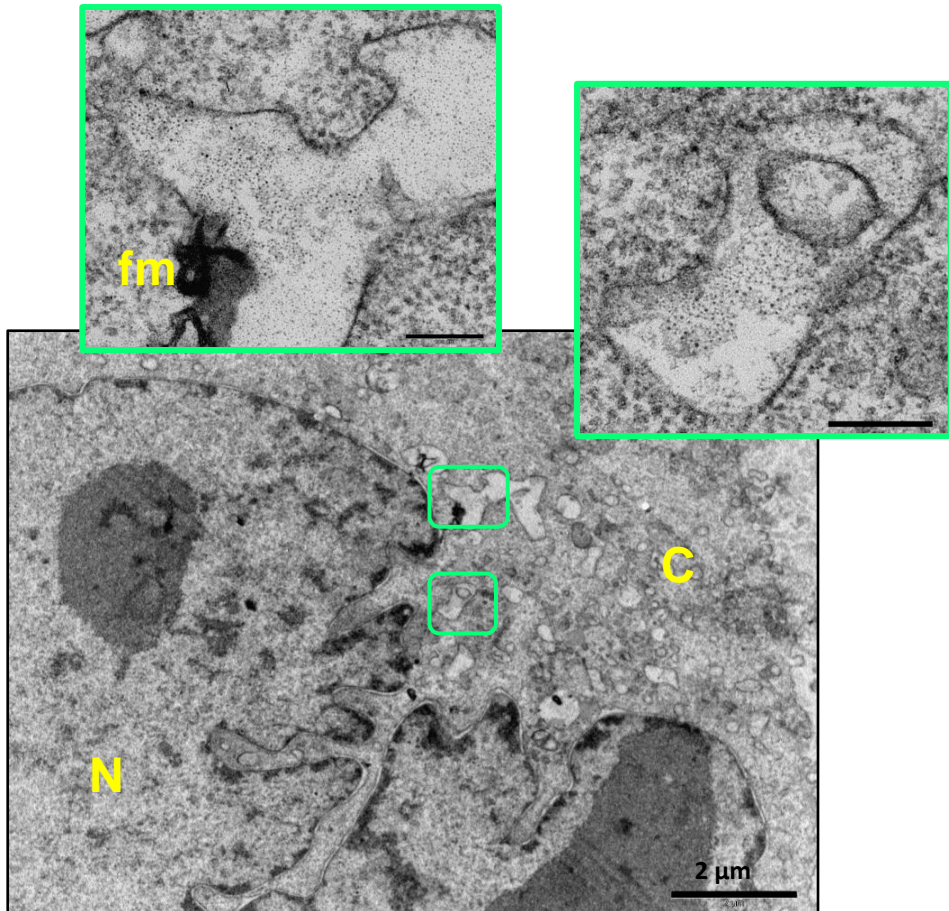


Figura 30. Imagen TEM de células LLC-PK1 incubadas con PC2 (escala ampliaciones 200 nm). C = citoplasma, N = núcleo, fm = figuras mielínicas

Las Figuras 30 y 31 muestran imágenes TEM de células renales LLC-PK1 tratadas con PC2. La Figura 30, en la concavidad nuclear presenta un sistema de vesículas de contorno irregular con figuras mielínicas y contenido granular de alta densidad (ver ampliaciones) con un tamaño comprendido entre 2.5 y 6 nm, compatible con la presencia de PC2. El componente mitocondrial es abundante, se mantiene la presencia de crestas y, al contrario que en las células HeLa tratadas, no presentan densidades incrementadas (Figura 31a). Sin embargo, se detecta la presencia de vesículas lisosómicas con membrana (señaladas con

flechas), que son similares a las encontradas en células HeLa, de contenido granular electrodenso, también compatibles con la presencia de PCs

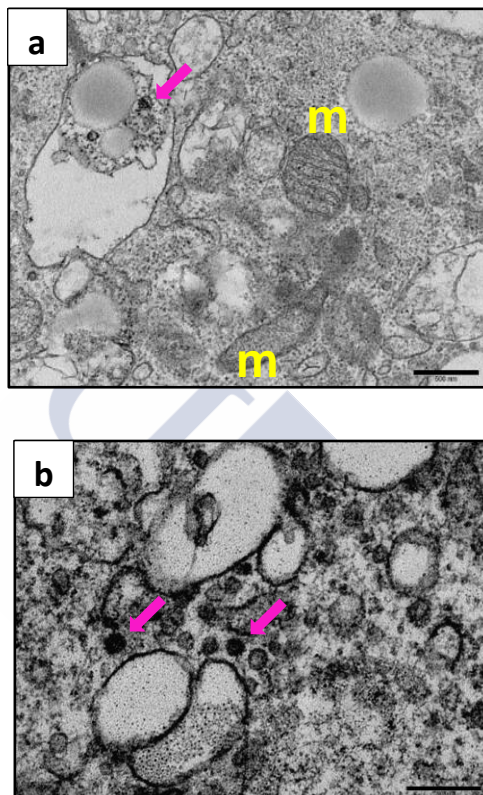


Figura 31. Imagen TEM de células LLC-PK1 incubadas con PC2 (escala 200 nm).
m = mitocondrias

5.2.2 Estudios *in vivo*

5.2.2.1 Ensayos de mortalidad en pez cebra

Para los estudios *in vivo* se seleccionaron los PCs que mostraron la mayor citotoxicidad, PC1 y PC2, y el PC que resultó ser menos tóxico frente a las células renales, PC6. Inicialmente se analizó la toxicidad de PC1, en agua de ósmosis no tratada, tal como se indica en la parte experimental, a concentraciones entre 1 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los ensayos posteriores con PC2 y PC6 se llevaron a cabo en agua de

ósmosis tratada con Aquadur, con el fin de incrementar su dureza. En estas condiciones disminuyó la solubilidad de PC2, por lo que las disoluciones fueron filtradas y la concentración del filtrado se calculó a partir de los datos de absorbancia.

El porcentaje de mortalidad y la fracción de supervivencia de los embriones, a cada concentración empleada, durante todo el periodo del ensayo (4 días), permitieron hacer un análisis de la toxicocinética de los PCs estudiados.

En las Tablas 8 a 10 se recoge el % de mortalidad a las diferentes concentraciones ensayadas de cada uno de los PCs y en las Figuras 32 a 34 la fracción de supervivencia.

Tabla 8. Mortalidad de los embriones de pez cebra en presencia de PC1.

Concentración		Mortalidad (%)*			
µg/ml	nM	24 h.p.f	48 h.p.f	72 h.p.f	96 h.p.f
1	6.4	0	0	0	0
5	32	8.33	8.33	8.33	8.33
10	64	11.67	11.67	11.67	23.33
15.625	100	10	13.75	13.75	46.25
20	128	8.33	15	21.66	71.67
31.25	200	6.25	35	50	90
62.5	400	10	70	92.5	100
125	800	10	52.5	100	100
250	1600	12.5	72.5	100	100

*Valor medio de cuatro ensayos independientes.

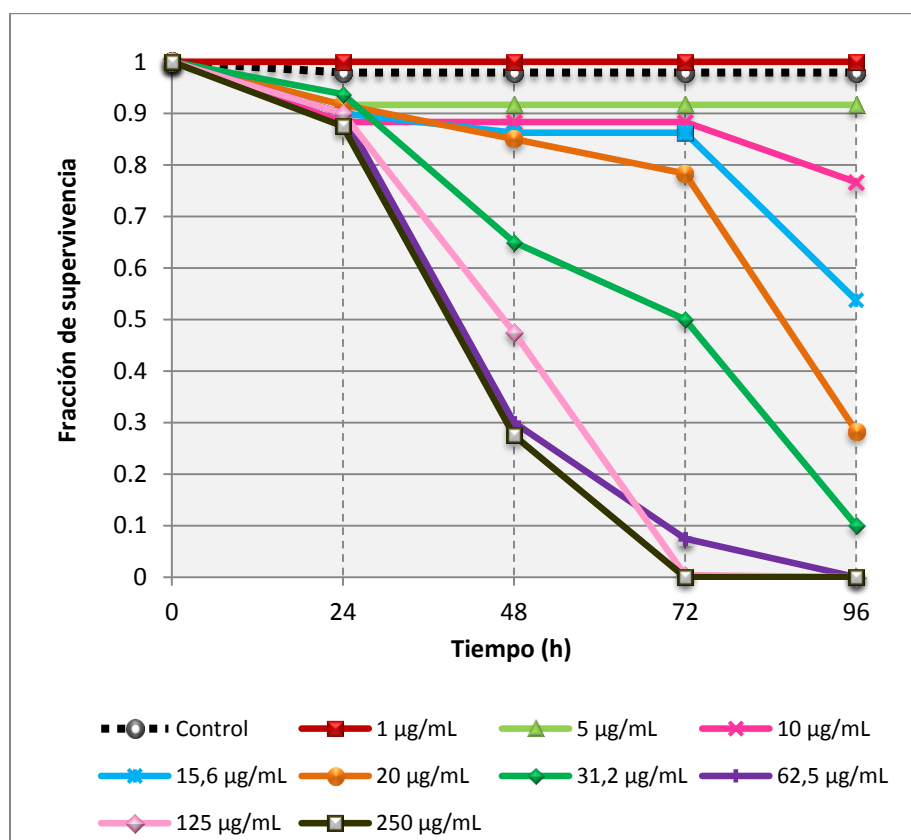


Figura 32. Fracción de supervivencia de los embriones de pez cebra en presencia de PC1.

Como se observa en la Tabla 8 y la Figura 32, la mortalidad de los embriones de 24 h.p.f. en presencia de la concentración más alta de PC1 (250 µg/mL), es tan solo ligeramente superior al 10 %. Sin embargo, en los embriones de 48 h.p.f. a las concentraciones más elevadas (mayores a 31.25 µg/mL) la mortalidad aumenta bruscamente, siendo en todos los casos superior al 50 % y a las 72 h.p.f. se alcanza o aproxima al 100 %. A concentraciones menores a 31.25 µg/mL la mortalidad se mantiene prácticamente constante hasta las 72 h.p.f. y a las 96 h.p.f., dependiendo de la concentración, la mortalidad aumenta en mayor o menor medida.

Tabla 9. Mortalidad de los embriones de pez cebra en presencia de PC2.

Concentración (nM)	Mortalidad (%)*			
	24 h.p.f	48 h.p.f	72 h.p.f	96 h.p.f
35	3.75	3.75	5	7.5
70	7.5	7.5	8.75	11.25
140	6.667	6.667	6.667	18.33
280	12.5	12.5	13.75	20
560	18.75	18.75	21.25	76.25
1120	23.75	23.75	23.75	80
2240	40	40	40	98.33

*Valor medio de cuatro ensayos independientes

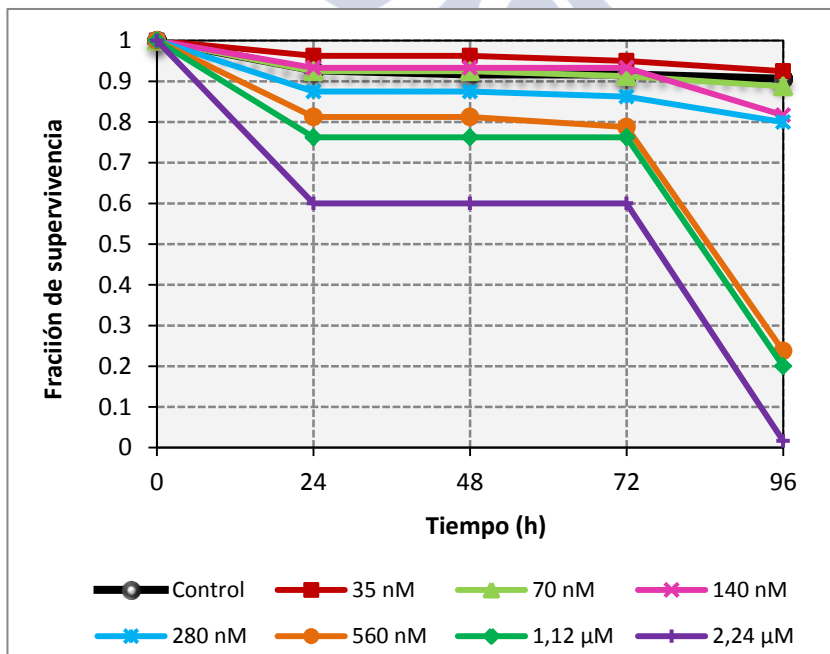


Figura 33. Fracción de supervivencia de los embriones de pez cebra en presencia de PC2.

La mortalidad de los embriones de 24 h.p.f. en presencia de las concentraciones de PC2 más elevadas (mayores a 140 nM) supera en todos los casos el 10 %, alcanzándose un valor del 40 % a la concentración más alta. Esta mortalidad se mantiene constante hasta las 72 h.p.f. y a las 96 h.p.f. aumenta considerablemente en las concentraciones más elevadas (0.56-2.24 μ M), hasta alcanzar el 98 % a 2.24 μ M.

Tabla 10. Mortalidad de embriones de pez cebra en presencia de PC6.

Concentración		Mortalidad (%)*			
μ g/ml	nM	24 h.p.f	48 h.p.f	72 h.p.f	96 h.p.f
125	575	3.33	3.33	3.33	10
250	1150	8.33	8.33	8.33	10
500	2300	5	5	5	6.67
750	3450	17.50	17.50	17.50	36.25
1000	4600	18.75	18.75	18.75	31.25

*Valor medio de cuatro ensayos independientes.

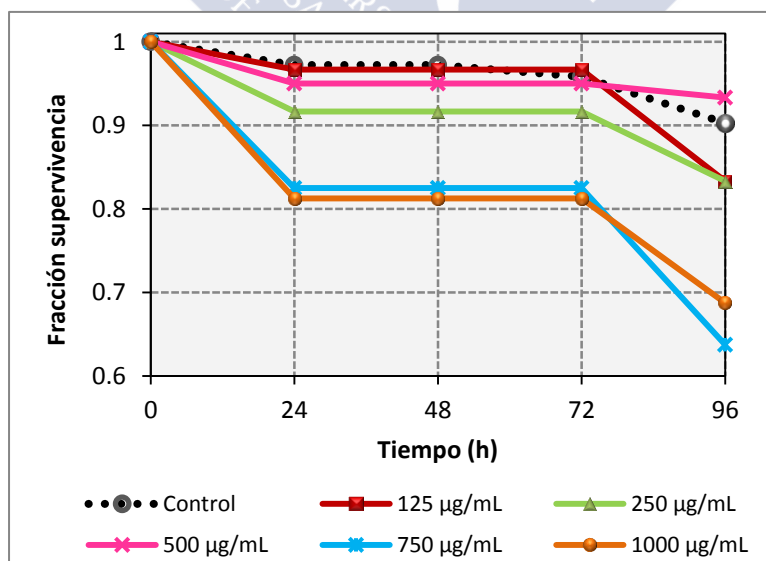


Figura 34. Fracción de supervivencia de embriones de pez cebra en presencia de PC6.

Los ensayos preliminares con PC6 mostraron una baja toxicidad por lo que, finalmente, se analizaron solo 5 concentraciones entre 125 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Aunque la concentración más alta ensayada es muy elevada, no se alcanzó el 100 % de mortalidad.

Con las dos concentraciones más elevadas de PC6 (superiores a 500 $\mu\text{g/mL}$, concentración que no se alcanzó en ninguno de los otros PCs) la mortalidad para los embriones de 24 h.p.f se aproxima al 20 %, para luego mantenerse constante y alcanzar a las 96 h.p.f. un valor en torno al 30 %.

Una vez analizada la toxicocinética, la representación de las curvas de % mortalidad/concentración (Figura 35) permitió calcular, para PC1 y PC2, los valores de LC_{50} y el parámetro b (Tabla 11). LC_{50} es la concentración que provoca la muerte del 50 % de los individuos expuestos con respecto al grupo de control. El parámetro b, pendiente de la recta transformada mediante el método Probit a partir de la curva % mortalidad/concentración, es un parámetro importante para determinar la toxicidad concentración-dependiente de una sustancia, ya que cuanto más alto es este valor, más aumenta la mortalidad para un mismo incremento de la concentración.

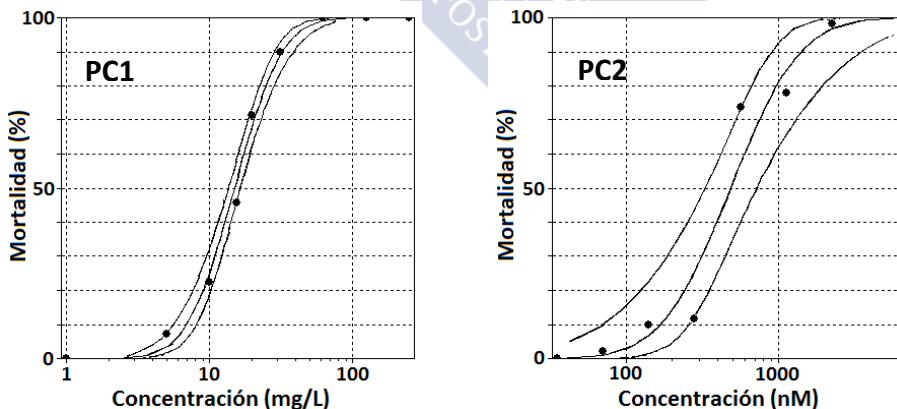


Figura 35. Curvas % mortalidad/concentración para PC1 y PC2.

Tabla 11. Parámetros toxicológicos para PC1 y PC2.

PC	LC ₅₀ (nM)	b
PC1	95.96	3.816
PC2	480.25	2.768

Según el valor obtenido para la LC₅₀, expresada en concentración molar, PC1 es más tóxico que PC2. Dado que ambos PCs están formados por un núcleo CdTe, la diferencia existente en su toxicidad podría estar relacionada con los ligandos utilizados en el recubrimiento. Mientras que PC1 solo contiene DMPS, PC2 contiene además TGA. La adición conjunta de ambos ligandos parece influir en su recubrimiento, tal y como se comentó en el Capítulo 1, en su mayor estabilidad y, por lo tanto, en su menor toxicidad.

Cuando se compara el parámetro b de ambos PCs, la pendiente de la recta transformada para PC1 es aproximadamente 1.4 veces mayor que la de PC2, lo que significa que, para un mismo aumento de la concentración, la mortalidad inducida por PC1 en embriones de pez cebra es 1.4 veces mayor que la inducida por PC2.

Al igual que se observó en los ensayos celulares, el recubrimiento de PC2 con una coraza CdS para formar PC6, disminuyó considerablemente la toxicidad. Teniendo en cuenta que se ensayaron concentraciones muy altas de PC6 y que la mortalidad máxima obtenida fue de un 30 %, puede decirse que, prácticamente, este punto cuántico no es tóxico.

5.2.2.2 Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia

Para el punto cuántico PC6 se realizó un ensayo preliminar de su internalización y distribución en embriones de pez cebra mediante microscopía confocal de fluorescencia. Para ello se tomaron imágenes de diferentes embriones expuestos a 1000 µg/mL de PC6 a las 24, 48, 72 y 96 h.p.f.

Las imágenes obtenidas se muestran en las Figuras 36 a 40, adjuntándose en todos los casos la proyección máxima del canal del PC, la del canal del pez cebra y una superposición de ambos canales (*merge*). A efectos comparativos se incluye una imagen de un embrión no tratado de 96 h.p.f. (Figura 36).

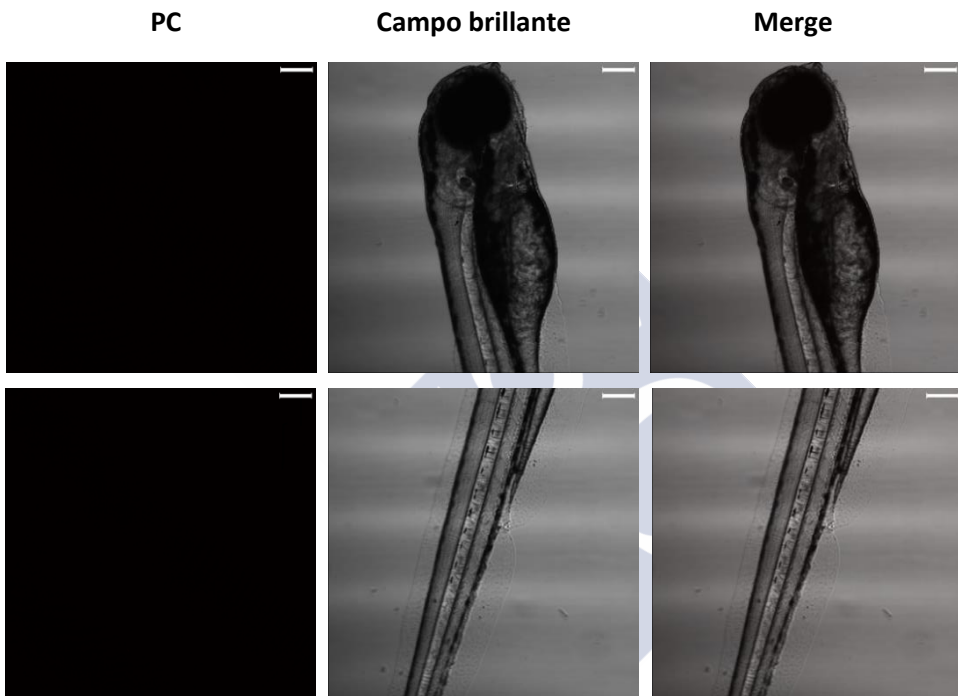


Figura 36. Imagen confocal del control: embrión de 96 h.p.f (escala 150 μm).

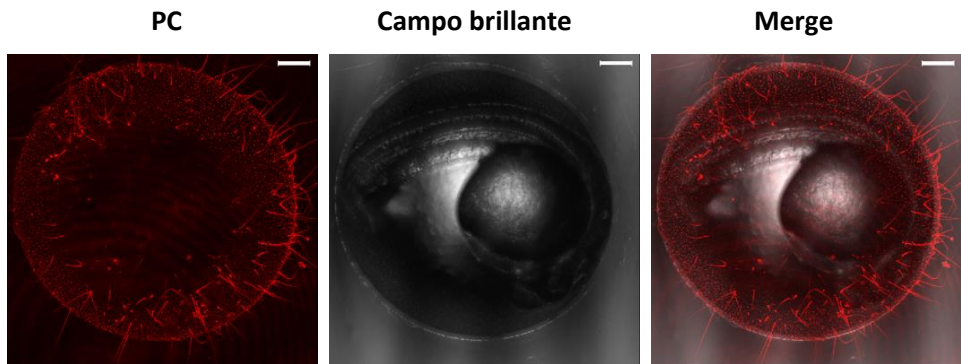


Figura 37. Embrión de pez cebra de 24 h.p.f expuesto a PC6 (escala 150 μm).

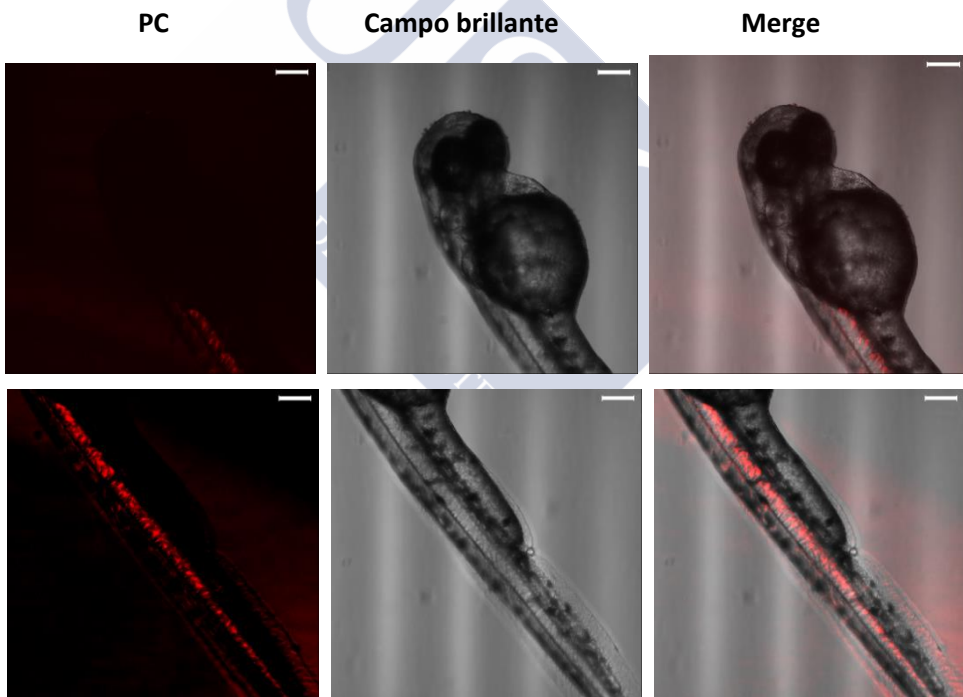


Figura 38. Embrión de pez cebra de 48 h.p.f expuesto a PC6 (escala 150 μm).

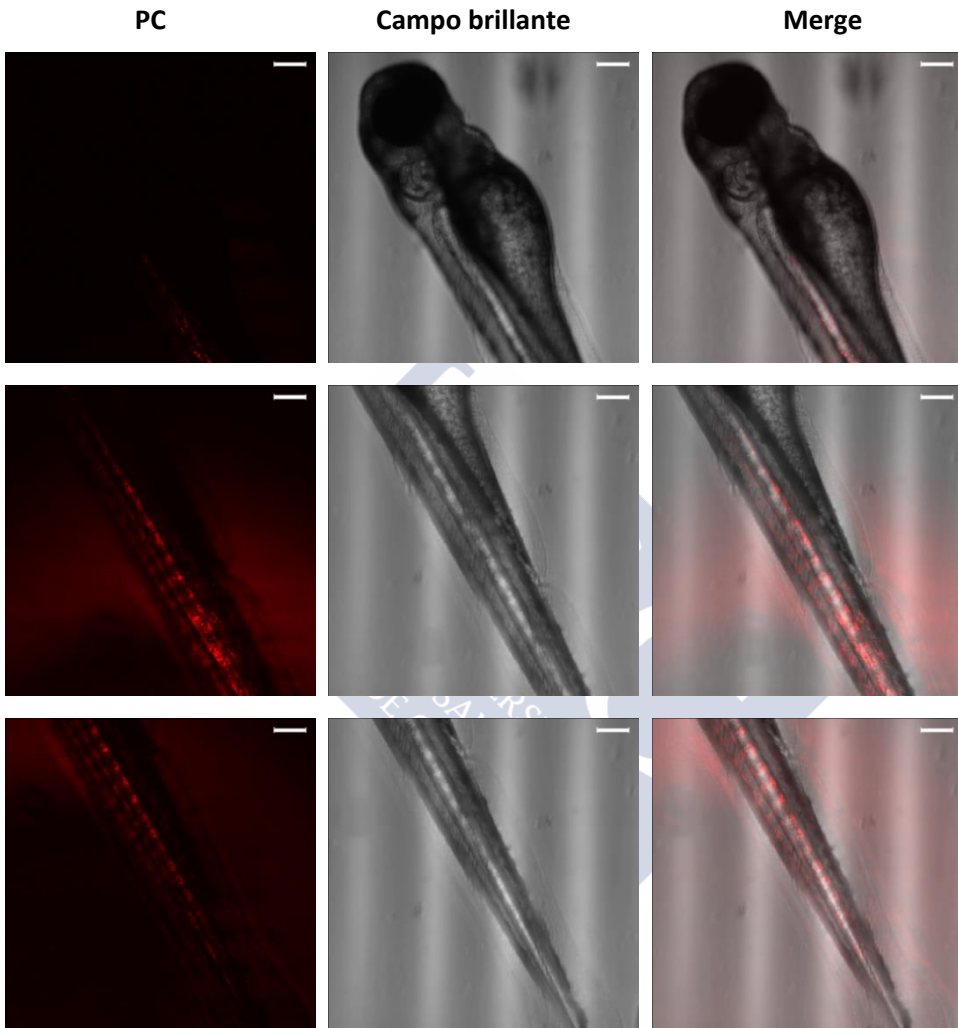


Figura 39. Embrión de pez cebra de 72 h.p.f expuesto a PC6 (escala 150 μ M).

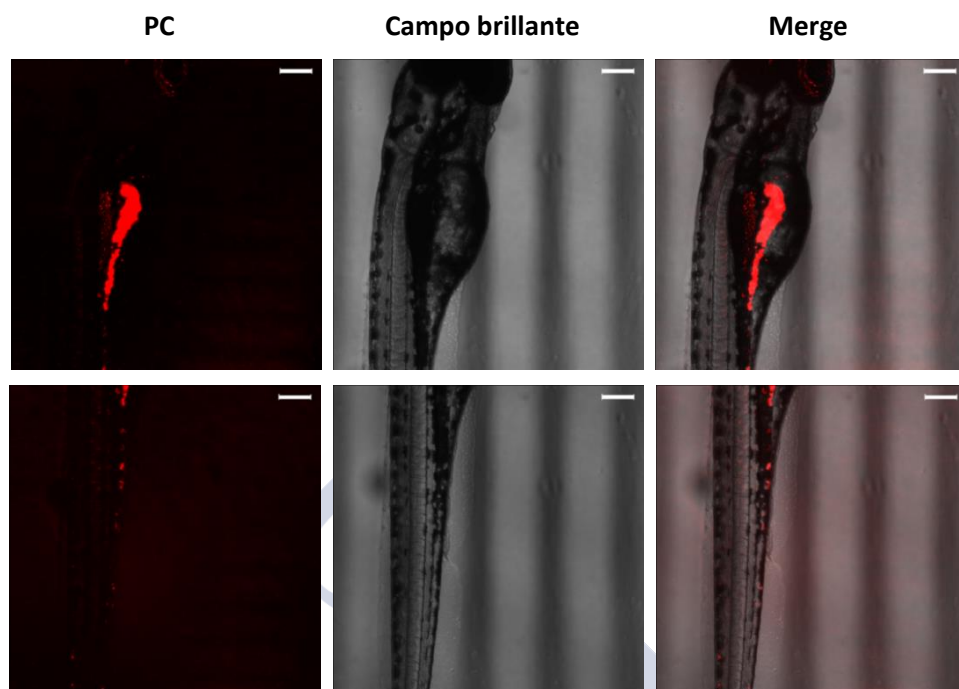


Figura 40. Embrión de pez cebra de 96 h.p.f expuesto a PC6 (escala 150 μM) .

El embrión de 24 h.p.f expuesto a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PC6 no muestra la internalización de las nanopartículas (Figura 37). Sin embargo, tras la eclosión se observa, tanto a las 48 (Figura 38) como a las 72 h.p.f. (Figura 39), la internalización y localización de PC6 en el sistema circulatorio del embrión.

En la imagen tomada a 96 h.p.f. (Figura 40), la cantidad de punto cuántico que se observa es mucho mayor localizándose, probablemente en el tubo digestivo, lo que está en concordancia con los estudios realizados por Duan y col.²¹ en PCs CdTe recubiertos de GSH y Cys.

²¹ J. Duan, Y. Yu, Y. Li, Y. Yu, Y. Yu, Y. Li, P. Huang, X. Zhou, S. Peng, Z. Sun, *J. Nanopart. Res.*, 15 (2013) 1700.





Capítulo 6

Conclusiones



1. El control estricto de las relaciones molares Cd:DMPS:Te y del pH, del grado de dilución y de los volúmenes empleados permitió la formación y estabilización, en disolución acuosa, de puntos cuánticos DMPS-CdTe (PC1). Si bien el control de todos estos factores resultó determinante, la mayor dificultad de la síntesis residió en encontrar las relaciones molares óptimas de los precursores, ya que ninguno de los PCs CdTe descritos hasta el momento se había estabilizado a relaciones molares Cd/ligando y Cd/Te tan elevadas como las necesarias en este caso. En condiciones óptimas, el rendimiento cuántico de estas nanopartículas es del 10 %.
2. El empleo conjunto de DMPS y TGA como ligandos estabilizadores permitió preparar PCs mixtos TGA-DMPS-CdTe (PC2) con mejores propiedades ópticas que las de PC1. Así, en todas las relaciones molares ensayadas, se obtuvieron nanopartículas fluorescentes. Las mejores propiedades se alcanzaron cuando se utilizó una relación molar Cd:DMPS:TGA:Te de 1:0.6:0.3:0.19, mostrando los PCs formados un rendimiento cuántico en torno al 50 %.
3. Tratando de reducir la toxicidad y mejorar las propiedades de los PCs preparados, se abordó su recubrimiento mediante una coraza de ZnS. Todos los intentos para preparar PCs núcleo/coraza CdTe/ZnS a partir de PC1 y PC2 empleando DMPS y ZnCl_2 como precursores, resultaron infructuosos, formándose en todos los casos un sólido blanco no fluorescente y muy poco soluble. Sin embargo, cuando se emplearon núcleos TGA-CdTe fue posible aislar PCs TGA-CdTe/DMPS-ZnS (PC3) con un rendimiento cuántico en torno al 20 %. Estos núcleos TGA-CdTe también permitieron la formación de PCs CdTe/ZnS utilizando DMSA como ligando en la formación de la coraza. Las nanopartículas formadas, TGA-CdTe/DMSA-ZnS (PC4), muestran propiedades ópticas similares a PC3. De forma análoga, partiendo de una disolución coloidal de PC2 y utilizando como precursores DMSA y ZnCl_2 se obtuvieron PCs TGA-DMPS-CdTe/DMSA-ZnS (PC5) con un rendimiento cuántico que duplica el de los núcleos de partida.

4. Finalmente, se prepararon PCs con coraza CdS TGA-DMPS-CdTe/DMPS-CdS (PC6), mediante la adición simultánea de disoluciones acuosas de DMPS-CdCl₂ y Na₂S sobre disoluciones coloidales de PC2. Al igual que PC5, estas nanopartículas con coraza duplican el rendimiento cuántico de PC2.
5. Las propiedades ópticas de todos los puntos cuánticos preparados se determinaron mediante espectroscopias UV-Vis y de fluorescencia, a partir de cuyos espectros se pudieron calcular los desplazamientos de Stokes, los rendimientos cuánticos y el tamaño de las nanopartículas. Mediante Espectroscopia IR-ATR se comprobó la presencia de los ligandos estabilizadores (TGA, DMPS y DMSA) y mediante fluorescencia de rayos X se confirmó la formación de las corazas de ZnS. La obtención de imágenes mediante microscopia electrónica de transmisión puso de manifiesto la forma aproximadamente esférica de los PCs y permitió calcular, salvo para PC4, la distribución de tamaños. Éstos oscilan entre los 2.78 nm encontrados para PC2 y los 3.6 nm encontrados para PC1. La difracción de rayos X de polvo ayudó a confirmar la naturaleza del núcleo y la coraza y permitió concluir que estos PCs cristalizan en una fase cúbica tipo blenda.
6. El estudio sistemático del cambio experimentado por la fluorescencia de las nanopartículas preparadas en presencia de diversas sales metálicas, a diferentes concentraciones, permitió analizar su posible aplicación como sondas para la detección dichos metales en disolución acuosa. Estos cambios implicaron, generalmente, la desactivación del PC y/o el desplazamiento batacrómico de la banda de emisión. Un análisis preliminar del mecanismo por el cual se produce la desactivación mediante representaciones de Stern-Volmer, apunta a que ésta se origina, mayoritariamente, por mecanismos complejos (mecanismos dinámico, estático y otros factores adicionales). Cuando fue posible, se realizó también un análisis de regresión lineal que permitió determinar el rango y los límites de detección y cuantificación, parámetros que permitieron hacer una primera evaluación sobre la posible aplicación de estas nanopartículas como sondas para metales.

7. La fluorescencia de los PCs preparados se ve afectada, en mayor o menor medida, por la presencia de los iones Ni(II), Cu(II), Ag(I), Hg(II) y Pb(II). Estos cationes producen la desactivación de la emisión de los diferentes PCs, excepto en el caso Ag(I), que a bajas concentraciones incrementa ligeramente la intensidad de la fluorescencia de PC4 y PC1, y de Pb(II) que tiene un efecto análogo sobre PC1.

Adicionalmente, algunos iones metálicos producen un desplazamiento hacia el rojo del máximo de emisión. Así, para PC2 y PC3 en presencia de Ag(I), dicho desplazamiento es ya apreciable antes de que se inicie el decaimiento de la fluorescencia.

8. En general, los cationes metálicos que mayor reducción de la emisión provocan son Hg(II), con límites de detección que van de 4 nM para PC2 a 91 nM para PC4, y Cu(II), con LODs que oscilan entre 18 nM para PC4 y 0,25 μ M para PC1. Además, Ag(I) reduce de manera significativa la fluorescencia de PC5 con un LOD de 18 nM y Ni(II) de PC6, con un LOD de 11 nM. El ion Pb(II) reduce en menor medida la fluorescencia de los PCs preparados, siendo PC3 el que mayor sensibilidad presenta a este metal.
9. Mientras que los PCs que contienen DMPS como ligando estabilizante son mucho más sensibles a la presencia de Hg(II), los PCs que poseen DMSA formando parte de su recubrimiento lo son a Cu(II). La presencia conjunta de TGA y DMPS parece mejorar la sensibilidad a Ni(II). Sin embargo, la elección del ligando utilizado en el recubrimiento no parece ser un factor determinante en la detección de Ag(I) y Pb(II).
10. Los estudios *in vitro* ponen de manifiesto que los efectos citotóxicos observados en la línea celular LLC-PK1 dependen de la composición de los PCs, siendo PC1 y PC2 los más citotóxicos. Tras la adición sobre PC2 de las corazas DMSA-ZnS (PC5) y DMPS-CdS (PC6) se produce, en ambos casos, un aumento de la viabilidad celular, si bien la menor toxicidad corresponde a PC6.

Los PCs núcleo/coraza CdTe/ZnS, PC3 y PC4, también resultaron menos citotóxicos que los puntos cuánticos CdTe, PC1 y PC2, y de nuevo el recubrimiento con el ligando DMPS (presente en PC3) dio mejores resultados que el recubrimiento con el ligando DMSA (en PC4).

En la línea celular HeLa el comportamiento es menos sistematizable resultando los puntos cuánticos PC3 y PC6 los menos citotóxicos.

11. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia de células HeLa y LLC-PK1, incubadas de 1.5 a 2 h con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de los PCs, ponen de manifiesto que todos los PCs conservan, en buena medida, las propiedades ópticas mostradas en disolución. En ambas líneas celulares, las nanopartículas atraviesan la membrana celular y se distribuyen en el citoplasma, fundamentalmente en la región perinuclear. En la línea celular HeLa el punto cuántico más pequeño, PC2, se localiza también, probablemente, en el núcleo.
12. Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión ponen de manifiesto que, tras la incubación de ambos tipos de células durante 90 min con 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PC2, no se producen cambios morfológicos significativos, cambios que sí se originan cuando se incuban con 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En la línea celular HeLa, la presencia de PC2 afecta principalmente al sistema mitocondrial, estando la zona perinuclear ocupada por estructuras ovales y electrodensas en cuyo interior se aprecian restos de crestas mitocondriales y un contenido granular compatible con la presencia de PC2. Además, se observan también vesículas lisosómicas con cúmulos de nanopartículas.

En la línea celular LLC-PK1, el componente mitocondrial mantiene la presencia de crestas y no presenta densidades incrementadas. Sin embargo, se detectan, al igual que en la línea celular HeLa, vesículas lisosómicas de contenido granular electrodenso, y en la concavidad nuclear un sistema de vesículas de contorno irregular con contenido

granular de pequeño tamaño y alta densidad, que puede asociarse a la presencia de PC2.

13. Los estudios preliminares de toxicidad *in vivo* se llevaron a cabo mediante ensayos de mortalidad en embriones de pez cebra, utilizando para ello los puntos cuánticos que resultaron más tóxicos (PC1 y PC2) y menos tóxicos (PC6) *in vitro*. Los resultados obtenidos son, en líneas generales, coherentes con los encontrados *in vitro*, poniendo de manifiesto que, mientras PC1 y PC2 inducen una elevada mortalidad de los embriones, ésta es muy reducida en el caso de PC6, de manera que estas últimas nanopartículas pueden considerarse, en las condiciones ensayadas, no tóxicas.
14. Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de los embriones de pez cebra incubados con elevadas concentraciones del punto cuántico PC6 a diversos tiempos, ponen de manifiesto que éste conserva, prácticamente íntegras, sus excelentes propiedades ópticas tras su biodistribución en los sistemas circulatorio y digestivo.

