



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Instituto de Ciencia Molecular

Departamento de Química Orgánica

Doctorado en química Sostenible

Nanomateriales basados en lantánidos: caracterización y visualización

Juan Ferrera González

Directoras:

Prof. Dra. Julia Pérez Prieto

Dra. María González Béjar

Septiembre 2022

La Dra. Julia Pérez Prieto, Profesora Catedrática de Química Orgánica de la Universitat de València y la Dra. María González Béjar, Profesora Titular de la Universitat de València.

CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral, titulada: ***Nanomateriales basados en lantánidos: caracterización y visualización***, se ha realizado bajo su dirección en el Instituto de Ciencia Molecular (ICMol) de la Universitat de València por el graduado en Química Juan Ferrera González y autorizan su defensa.

En Valencia, de Julio de 2022

Fdo. Dra. Julia Pérez Prieto

Directora

Fdo. Dra. María González Béjar

Directora

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría empezar agradeciendo a mis directoras de tesis, Julia y María, por ofrecerme la oportunidad de realizar la tesis y formarme en su grupo. Han ejercido, considero, una dirección y guía muy buena y exigente. Estoy inmensamente agradecido por la formación que he recibido del grupo y por introducirme y mostrarme cómo funciona el mundo de la investigación en Química. En la parte personal, incluyo a Raquel Galián por supuesto, son unas excelentes personas, y su relación cercana con todos los componentes del grupo ha permitido crear un ambiente muy agradable en el laboratorio. Sin duda, son responsables directas del ambiente de trabajo tan bueno que hay en el grupo. De ellas, he aprendido cuestiones académicas, pero también aptitudes de trabajo en equipo como discusión y colaboración/cooperación para alcanzar objetivos comunes. En definitiva, ha sido una suerte poder realizar la tesis en el grupo de reactividad fotoquímica. A Julia, por su simpatía, energía inagotable y conocimientos. A María, por su rigurosidad, curiosidad, motivación y, por supuesto, conocimientos.

Asimismo, me gustaría agradecer al antiguo Ministerio de Educación, Cultura y Deportes, ahora Ministerio de Universidades, por la financiación recibida a través de la ayuda para la formación de profesorado universitario (FPU) que me han permitido realizar la presente tesis.

A Eva, mi compañera de vida, por su amor, apoyo constante e incondicional, paciencia y hacerme feliz.

A mis padres, por su amor, apoyo y consejo en todos los proyectos/estudios en que me he embarcado. A mi hermano Pablo por estar ahí. A mi familia, los que están y los que ya no, por su educación y amor. Son mis referentes y hogar.

A mis amigos en Valencia, que me han hecho la estancia en esta ciudad mucho más divertida y con los que he pasado muchos ratos inolvidables, que me guardo

para mí. A Irene, mi hermana postiza, por su humor, alegría y fuerza... ¡cómo se puede ser tan divertida! A Agus, un señor tan interesante como sorprendente. A Fany, por su alegría, humor y amor a la fiesta.

A mis amigos de la isla, Javi, Carlos, Rober, Alber y Dacio, por estar siempre ahí. Por volver y recuperar la conversación justo donde la habíamos dejado. Por su paciencia, humor, franqueza y los buenos momentos que hemos pasado y que seguiremos pasando juntos.

A los colegas del laboratorio, por todos los ratos que hemos pasado juntos, por el buen ambiente que hemos disfrutado, en el que cada uno aporta una parte fundamental. A Néstor, por ser un muy buen maestro, un amigo y por su buen humor. A Sora y Laura, por su experiencia, profesionalidad y colaboración. A Nacho, compañero de batalla, por su innegable predisposición a ayudar y actitud. A todos los chicos del lab: Irene, Rita, Delia, Álex, Ales, Miguel, Carlos, Lorena, Salva y Luciana, que han hecho que cada día fuera mejor que el anterior.

Al servicio central de apoyo a la investigación (SCSIE) de la Universitat de València, a la sección de rayos X, análisis elemental y microscopía, en especial agradecer al Dr. Enrique Navarro Raga por su predisposición y colaboración.

Abreviaturas y símbolos

Φ : rendimiento cuántico

λ : longitud de onda

$^1\text{O}_2$: oxígeno singlete

2PE: excitación bifotónica

AFM: microscopía de fuerza atómica

AgNP: nanopartícula de plata

AOM: modulador acusto-óptico

AuNP: nanopartícula de oro

CB: cucurbit[7]urilo

CCD: cámara de dispositivo de carga acoplado

CLEM: microscopía correlativa de luz y electrónica

CT: tomografía computerizada

CS: sensibilización cooperativa

DE: dipolo eléctrico

DEI: dipolo eléctrico inducido

DLS: dispersión de luz dinámica

DM: dipolo magnético

EDX: análisis de energía de dispersión de rayos X

ESA: absorción de estado excitado

ETU: transferencia de energía upconversion

FLIM. microscopía de imagen de tiempo de vida de fluorescencia

FRET: transferencia de energía resonante tipo Förster

FTIR: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

F: fluoresceína

GSA: absorción del estado fundamental

HRTEM: microscopía electrónica de transmisión de alta resolución

ICP: plasma acoplado inductivamente

IR: infrarrojo

LC: luminiscencia cooperativa

LED: diodo emisor de luz

LRET: transferencia de energía resonante de lantánidos

MC: microscopía confocal

MCS: escalado multicanal

ME: microscopía electrónica

MM: microscopía multifotónica

MRI: imagen de resonancia magnética nuclear

MS: espectrometría de masas

NIR: infrarrojo cercano

NIRES: nanoscopía de saturación de emisión NIR

NIR-LSM: microscopía de barrido de láser de NIR

NP: nanopartícula

OP: reactor único (*one pot*)
PA: avalancha fotónica
PDT: terapia fotodinámica
PET: tomografía de emisión de positrones
PLIM: microscopía de imagen de tiempo de vida de fosforescencia/fotoluminiscencia
PMT: fotomultiplicador
PS: fotosensibilizador
QD: punto cuántico (*quantum dot*)
QE: cuadrupolo eléctrico
RB: rosa de bengala
ROS: especies reactivas de oxígeno
SHG: generación de segundo armónico
SIM: microscopía de iluminación estructurada
SLBL: síntesis capa por capa (*layer-by-layer*)
SPECT: tomografía computerizada de emisión de fotones únicos
STED: microscopía de depleción de luz estimulada
STM: microscopía de efecto túnel
TCSPC: recuento de fotones individuales correlacionados en el tiempo (*time-correlated single photon counting*)
TEM: microscopía electrónica de transmisión
TIRF: microscopía de reflexión interna total de fluorescencia
TGI: microscopía limitada por intervalos temporales
UC: *upconversion*
UCNH: nanohíbrido *upconversion*
UCNP: nanopartícula *upconversion*
UCQY: rendimiento cuántico *upconversion*
UV: ultravioleta
vis: visible
WM: microscopía de campo ancho (*wide-field*)
XRD: difracción de rayos X (*X-ray diffraction*)

Índice de contenidos

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 1.1. Breves reseñas históricas..... | 3 |
| 1.2. Lantánidos..... | 5 |
| 1.2.1. Estructura electrónica y campo cristalino en lantánidos..... | 7 |
| 1.2.2. Absorción de los lantánidos..... | 10 |
| 1.2.3. Luminiscencia directa (<i>downshifting</i>) en los lantánidos..... | 12 |
| 1.2.4. Transferencias de energía entre iones lantánidos..... | 15 |
| 1.2.5. Procesos <i>upconversion</i> | 18 |
| 1.3. Upconversion en la escala nanométrica..... | 22 |
| 1.3.1. Propiedades luminiscentes a medida..... | 24 |
| 1.3.2. Síntesis..... | 29 |
| 1.3.3. Modificación de la superficie..... | 32 |
| 1.3.4. Caracterización..... | 35 |
| 1.3.5. Aplicaciones..... | 36 |
| 1.4. Referencias..... | 40 |
| 2. OBJETIVOS..... | 52 |
| 2.1. Objetivo general..... | 52 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 52 |
| 3. MICROSCOPÍA DE BARRIDO DE LÁSER NIR..... | 55 |
| 3.1. Introducción y antecedentes..... | 55 |
| 3.2. Objetivos..... | 62 |
| 3.3. Resultados y discusión..... | 63 |
| 3.3.1. Microscopio multifotón FV100MPE..... | 63 |
| 3.3.2. Resolución temporal con NIR-LSM..... | 65 |
| 3.3.3. Evaluación de la homogeneidad de la funcionalización: colocación en UCNH..... | 77 |
| 3.4. Conclusión..... | 84 |
| 3.5. Procedimiento experimental..... | 85 |
| 3.5.1. Métodos..... | 85 |
| 3.5.2. Materiales..... | 87 |
| 3.5.3. Protocolos sintéticos y preparativos..... | 87 |
| 3.5.4. Estimación de la resolución de tiempo de vida de NIR-LSM..... | 89 |
| 3.5.5. Estimación de la energía de excitación..... | 90 |
| 3.5.6. Resolución espacial y tamaño del spot del láser..... | 91 |
| 3.5.7. Caracterización adicional..... | 92 |
| 3.6. Referencias..... | 94 |
| 4. ALARGAMIENTO DEL TIEMPO DE VIDA DE FLUORESCENCIA DE FLUORÓFOROS CONVENCIONALES..... | 101 |

| | |
|---|------------|
| 4.1. Introducción y antecedentes | 101 |
| 4.2. Objetivos | 110 |
| 4.3. Resultados y discusión | 111 |
| 4.3.1. UC@Rod110 en NIR-LSM | 111 |
| 4.4. Conclusión | 127 |
| 4.5. Procedimiento experimental | 128 |
| 4.5.1. Materiales | 128 |
| 4.5.2. Protocolos sintéticos y preparativos | 128 |
| 4.5.3. La fluoresceína como sonda de pH en UC _{Tm} @CB@Y@F | 131 |
| 4.5.4. Estimación de F en UC _{Tm} @CB@Y@F | 133 |
| 4.5.5. Procedimiento eliminación de la dispersión (<i>scattering</i>) de los espectros de atenuación. | 135 |
| 4.6. Caracterización adicional | 138 |
| 4.6.1. UC _{Tm} @Rod110 | 138 |
| 4.6.2. UC _{Tm} @CB@Y@F | 140 |
| 4.7. Referencias | 143 |
| 5. ESTUDIO PRELIMINAR DE CITOTOXICIDAD DE UCNP RECUBIERTAS CON CUCURBITURILO | 151 |
| 5.1. Introducción y antecedentes | 151 |
| 5.2. Objetivos | 157 |
| 5.3. Resultados y discusión | 158 |
| 5.4. Conclusiones | 172 |
| 5.5. Procedimiento experimental | 173 |
| 5.5.1. Métodos | 173 |
| 5.5.2. Materiales | 177 |
| 5.5.3. Protocolos sintéticos y preparativos | 177 |
| 5.6. Caracterización adicional | 179 |
| 5.7. Referencias | 183 |
| 6. ESTUDIO DE LA FOTOFÍSICA DEL NANOHÍBRIDO UC_{Er}@RB | 189 |
| 6.1. Introducción y antecedentes | 189 |
| 6.2. Objetivos | 206 |
| 6.3. Resultados y discusión | 207 |
| 6.3.1. Síntesis del UC _{Er} @RB | 207 |
| 6.3.2. Agregación del RB en la superficie de la UCNP | 208 |
| 6.3.3. Fotofísica del RB en la superficie de la UCNP | 213 |
| 6.3.4. Estudio de las emisiones UC..... | 226 |
| 6.4. Conclusiones | 230 |
| 6.5. Procedimiento experimental | 231 |
| 6.5.1. Materiales | 231 |
| 6.5.2. Protocolos sintéticos y preparativos | 231 |

| | |
|--|------------|
| 6.5.3. Determinación de la cantidad de moléculas de RB en UCNH | 233 |
| 6.5.4. Estudio de agregación RB en DMF | 235 |
| 6.6. Caracterización adicional | 237 |
| 6.7. Referencias | 241 |
| 7. CONCLUSIONES | 251 |
| 8. TÉCNICAS INSTRUMENTALES | 254 |
| 9. PUBLICACIONES..... | 262 |
| Artículos | 262 |
| Capítulos de libro | 263 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1. Número de publicaciones por año..... | 4 |
| Figura 1.2. Densidad de probabilidad de las funciones de onda radiales para los niveles de energía 4f, 5s, 5d y 6s para el Gd^+ | 7 |
| Figura 1.3. Diagrama de niveles de energía o de Dieke para iones lantánidos Ln^{3+} dopantes de una matriz con baja simetría, LaF_3 , de 0 a 50000 cm^{-1} | 8 |
| Figura 1.4. Diagrama de energía parcial para Eu^{3+} ($[Xe] 4f^6$) que muestra la magnitud de la repulsión interelectrónica, el acoplamiento espín-órbita, el efecto del campo de ligandos y el de campo magnético. | 9 |
| Figura 1.5. Energía de las transiciones 4f-5d en $CaF_2:Ln^{3+}$ (negro) y de las transiciones de transferencia de carga de ligando a metal (2p(O)-4f, rojo). | 11 |
| Figura 1.6. Diagrama de coordenadas de configuración para la emisión de un fluoróforo orgánico (izquierda) y un ión lantánido (derecha)..... | 13 |
| Figura 1.7. Procesos básicos de transferencia de energía entre iones. S^* es el ión sensibilizador en estado excitado y A es el ión activador. | 15 |
| Figura 1.8. Mecanismos de emisión upconversion..... | 19 |
| Figura 1.9. Diagrama de energía y espectros de emisión ($\lambda_{exc}= 980$ nm) para nanopartículas de $\beta-NaYF_4:Yb^{3+}, Tm^{3+}$ y $\beta-NaYF_4:Yb^{3+}, Er^{3+}$ | 21 |
| Figura 1.10. (a) Mecanismo de sensibilización a 800 nm de UCNP mediante la estrategia de shell activos. (b) Sensibilización de activadores sin estados intermedios de energía mediante la migración de energía..... | 25 |
| Figura 1.11. Esquema de UCNH y del efecto antena del UCNH $NaYbF_4:Tm^{3+}(0.5\%)@NaYF_4:Nd^{3+}(30\%)@IR-808$ | 28 |
| Figura 1.12. Modelo de nucleación y crecimiento homogéneo propuesto por LaMer. . | 30 |
| Figura 1.13. Posibilidades de modificación superficial de UCNP..... | 33 |
| Figura 1.14. Fotoisomerización reversible de ariletenos..... | 39 |
| | |
| Figura 3.1. Campo de visión frente a resolución de algunas técnicas de microscopía.. | 58 |
| Figura 3.2. Esquema del microscopio multifotón FV1000MPE y fundamento del NIR-LSM..... | 63 |
| Figura 3.3. Imagen TEM de $UC_{Er,2}$, $UC_{Er,20}$, UC_{Ho} y UC_{Tm} | 66 |
| Figura 3.4. Emisión e imágenes NIR-LSM de $UC_{Er,2}$, UC_{Ho} y UC_{Tm} ($\lambda_{exc}= 975$ nm)..... | 67 |
| Figura 3.5. Fundamento de la resolución temporal de NIR-LSM..... | 69 |
| Figura 3.6. Imagen de NIR-LSM y perfiles de intensidad del mismo aglomerado de UC_{Tm} a distintos dwell time..... | 73 |
| Figura 3.7. Perfiles cinéticos en el C2 de $UC_{Er,2}$, $UC_{Er,20}$, UC_{Ho} y UC_{Tm} ($\lambda_{exc}= 975$ nm)..... | 75 |
| Figura 3.8. Imagen NIR-LSM y perfiles cinéticos de $UC_{Tm}@Rod110$ ($\lambda_{exc}= 975$ nm)..... | 76 |
| Figura 3.9. Ensayo de colocalización mediante NIR-LSM de $UC_{Tm}@Rod101$ y $UC_{Tm}@Rod110$ | 81 |
| Figura 3.10. Resolución espacial de NIR-LSM..... | 83 |
| Figura 3.11. Análisis de colocalización de $UC_{Tm}@Rod101$ | 85 |
| Figura 3.12. Análisis de colocalización de $UC_{Tm}@Rod110$ | 86 |
| Figura 3.13. Imagen de SEM de $UC_{Er,2}$ | 89 |

| | |
|---|-----|
| Figura 3.14. Representación esquemática a escala del tamaño de píxel y del tamaño del spot en el límite de difracción para un láser de 975 nm sobre una imagen SEM de las muestras de UCNP | 92 |
| Figura 3.12. Difractogramas de XRD de $UC_{Er,2}$, UC_{Ho} , UC_{Tm} y referencia de $NaYF_4$ en fase hexagonal..... | 93 |
| Figura 3.14. Ajuste monoexponencial de una cinética obtenida en el NIR-LSM..... | 93 |
| | |
| Figura 4.1. Eficiencia de la FRET (η_{FRET}) en función de la distancia entre el dador y el aceptor (r) | 104 |
| Figura 4.2. Intervalos de emisión en el espectro electromagnético de $NaYF_4: Yb^{3+}, X^{3+}$ ($X= Er, Tm$ u Ho), junto con los de absorción y de emisión de algunos cromóforos utilizados para UCNH | 106 |
| Figura 4.3. Fotofísica de $UC_{Tm}@Rod110$ e imagen NIR-LSM de un aglomerado de $UC_{Tm}@Rod110$ | 112 |
| Figura 4.4. Perfiles cinéticos y ajuste del C1 de NIR-LSM de un aglomerado representativo de (a) UC_{Tm} y (b) $UC_{Tm}@Rod110$ | 113 |
| Figura 4.5. (a) Molécula macrocíclica de cucurbit[7]urilo. (b) Propiedades espectrales de absorción y emisión de F y emisión UC de la UC_{Tm} . (c) Esquema del procedimiento sintético de obtención del UCNH..... | 116 |
| Figura 4.6. Espectros FTIR que muestra la eliminación de los ligandos oleato superficiales de UC_{Tm} y la adición de CB a $UC_{Tm}@CB$ | 118 |
| Figura 4.7. (a) Espectro FTIR de F, $UC_{Tm}@CB$, $UC_{Tm}@CB@Y$ y $UC_{Tm}@CB@Y@F$ Imágenes de HRTEM de (b) $UC_{Tm}@CB$ y (c) $UC_{Tm}@CB@Y@F$ | 119 |
| Figura 4.8. Espectros de atenuación, absorción y emisión de $UC_{Tm}@CB@Y@F$ en medio acuoso y DMF..... | 120 |
| Figura 4.9. Estudio NIR-LSM de $UC_{Tm}@CB@Y$ y $UC_{Tm}@CB@Y@F$ | 121 |
| Figura 4.10. Imagen NIR-LSM en el C2 de $UC_{Tm}@CB@Y@F$ | 122 |
| Figura 4.11. $UC_{Tm}@CB@Y@F$ como sonda de pH..... | 123 |
| Figura 4.12. DLS de $UC_{Tm}@CB@Y@F$ en (a) agua MilliQ, (b) PBS y (c) 0,1 M NaCl | 124 |
| Figura 4.13. Evolución de la emisión de $UC_{Tm}@CB@Y@F$ ($\lambda_{exc}= 980$ nm; 0,5 mg/mL) en (a) medio acuoso y (b) medio fisiológico..... | 125 |
| Figura 4.14. Influencia de la fuerza iónica en la respuesta del sensor ratiométrico de $UC_{Tm}@CB@Y@F$ | 126 |
| Figura 4.15. Especies de la F en función del pH del medio..... | 132 |
| Figura 4.16. Especies que F en función del pH en $UC_{Tm}@CB@Y@F$ | 133 |
| Figura 4.17. Estudio de la resta manual de la dispersión en espectros de absorción .. | 136 |
| Figura 4.18. Imagen TEM, espectro de extinción en DMF y difractograma XRD de $UC_{Tm}@Rod110$ | 138 |
| Figura 4.19. Imágenes NIR-LSM de $UC_{Tm}@Rod110$ | 139 |
| Figura 4.20. Análisis de colocalización de $UC_{Tm}@Rod110$ | 139 |
| Figura 4.21. Imagen TEM y difractograma de XRD de $UC_{Tm}@CB@Y@F$ | 140 |
| Figura 4.22. Imágenes NIR-LSM y ajuste cinético de un aglomerado/conjunto de UCNH adyacentes representativo de $UC_{Tm}@CB@Y$ y $UC_{Tm}@CB@Y@F$ | 141 |
| Figura 4.23. Espectros de atenuación de $UC_{Tm}@CB@Y@F$ en pH ácidos y básicos. | 142 |
| Figura 4.24. Evolución de la absorción de $UC_{Tm}@CB@Y@F$ con el pH. | 142 |

| | |
|---|-----|
| Figura 5.1. Niveles de evaluación de la eficacia, calidad y seguridad y diagrama de decisión para desarrollar aplicaciones biomédicas con UCNP..... | 156 |
| Figura 5.2. Imagen TEM, imagen HRTEM, espectro de emisión, potencial zeta y DLS de UC _{Er} y UC _{Er} @CB | 158 |
| Figura 5.3. Estructuras químicas de las sondas químicas y mecanismos de actuación de los ensayos celulares..... | 160 |
| Figura 5.4. Morfología de células HeLa y RAW 264.7 expuestas a UC _{Er} y UC _{Er} @CB.... | 162 |
| Figura 5.5. Estudio de la internalización celular de UC _{Er} y UC _{Er} @CB en células RAW 264.7 y células HeLa mediante NIR-LSM..... | 163 |
| Figura 5.6. Tiempos de vida de desactivación de la luminiscencia de UC _{Er} y UC _{Er} @CB internalizadas en células HeLa y RAW 264.7. | 165 |
| Figura 5.7. Viabilidad celular en células (a) EAhy 926, (b) HeLa y (c) RAW 264.7 a diferentes dosis de UC _{Er} y UC _{Er} @CB determinada por el ensayo de actividad deshidrogenasa. (d) Gráfico de columnas del ensayo de liberación de LDH en células EAhy 926 expuestas a diferentes dosis de UC _{Er} y UC _{Er} @CB..... | 167 |
| Figura 5.8. Gráfico de columnas con los porcentajes de células vivas, muertas y apoptóticas de células (a-b) HeLa y (c-d) RAW 264.7 expuestas a diferentes dosis de UC _{Er} y UC _{Er} @CB | 170 |
| Figura 5.9. Morfología de células endoteliales EAhy 926 (a) no tratadas y (b) expuestas a un control positivo de partículas de poliestireno de 20 nm | 179 |
| Figura 5.10. Morfología de las células HeLa y RAW 264.7 expuestas UC _{Er} y UC _{Er} @CB | 180 |
| Figura 5. 11. Diagramas de contorno de citometría de flujo del ensayo de tinción con calceína-AM y homodímero-1 de etidio en células RAW 264.7 con UC _{Er} a distintas dosis | 181 |
| Figura 5.12. Diagramas de contorno de citometría de flujo del ensayo de tinción con calceína-AM y homodímero-1 de etidio en células RAW 264.7 con UC _{Er} @CB a distintas dosis..... | 182 |
| | |
| Figura 6.1. Esquema con el diagrama de Jablonski de un PS orgánico, los tipos de reacciones generadoras de ROS y algunos mecanismos de citotoxicidad. | 190 |
| Figura 6.2. Curva de energía potencial para los tres estados electrónicos menos energéticos del O ₂ | 191 |
| Figura 6.3. Intervalos de emisión en el espectro electromagnético de NaYF ₄ : Yb ³⁺ , X ³⁺ (X= Er, Tm o Ho), junto con los de absorción de algunos PS utilizados para UCNH | 194 |
| Figura 6.4. (a) Espectro de emisión de UC de NaYF ₄ :Yb ³⁺ ,Er ³⁺ superpuesto con la absorción de los dos PS (MC540 y ZnPc) que funcionalizan al UCNH | 196 |
| Figura 6.5. Esquema de un proceso de generación de ¹ O ₂ mediante la sensibilización del RB a través de la emisión UC del Er ³⁺ | 205 |
| Figura 6.6. Imagen TEM de UC _{Er} | 207 |
| Figura 6.7. Momento de transición dipolar de la rodamina B y representación de los agregados tipo H y tipo J que puede formar..... | 208 |
| Figura 6.8. Efecto de la formación de agregados en dispersiones acuosas de colorantes xanténicos: (a) pironina Y y (b) azul de metileno | 210 |

| | |
|--|-----|
| Figura 6.9. (a) Absorción y (b) emisión del RB libre y del RB en UC _{Er} @RB en DMF normalizadas. Rendimiento cuántico de fluorescencia del (c) RB y (d) UC _{Er} @RB en función de la longitud de onda de excitación (λ_{exc})..... | 211 |
| Figura 6.10. Distribución de tamaño en (a) intensidad y (b) número para UC _{Er} y UC _{Er} @RB..... | 213 |
| Figura 6.11. Tiempo de vida de fluorescencia y ajustes de una disolución de RB libre y UC _{Er} @RB en DMF y atmósfera de N ₂ | 215 |
| Figura 6.12. Espectro de absorción de especies transitorias de (a) RB y (b) UC _{Er} @RB en atmósfera de N ₂ en DMF..... | 216 |
| Figura 6.13. Espectro de absorción de especies transitorias a distintos tiempos respecto al pulso láser de (a) RB y (b) UC _{Er} @RB RB en atmósfera de N ₂ | 217 |
| Figura 6.14. Cinéticas de absorción del ³ RB a 610 nm y del bleaching del ¹ RB..... | 218 |
| Figura 6.15. Detalle del espectro de absorción del (a) RB y (b) del UC _{Er} @RB 20 ns después del pulso láser en atmósfera de N ₂ | 219 |
| Figura 6.16. Espectro y cinética de la fosforescencia de RB y UC _{Er} @RB en atmósfera de aire y de N ₂ en fluorímetro..... | 220 |
| Figura 6.17. Espectro de fosforescencia y fluorescencia retardada para RB y UC _{Er} @RB en DMF..... | 221 |
| Figura 6.18. Espectro de emisión NIR de RB, UC _{Er} y UC _{Er} @RB en N ₂ y aire (λ_{exc} = 560 nm)..... | 222 |
| Figura 6.19. Diagrama de energía de procesos fotofísicos del RB en atmósfera de (a) N ₂ y de (b) aire (λ_{exc} =560 nm). | 222 |
| Figura 6.20. Diagrama de energía de procesos fotofísicos de UC _{Er} @RB en atmósfera de (a) N ₂ y de (b) aire (λ_{exc} =560 nm) | 223 |
| Figura 6.21. Desactivación de la emisión a 975 nm y 1550 nm de UC _{Er} @RB en N ₂ y aire (λ_{exc} = 560 nm) | 225 |
| Figura 6.22. Desactivación de la emisión de ¹ O ₂ a 1275 nm del RB y UC _{Er} @RB en DMF y atmósfera de aire (λ_{exc} = 560 nm, lámpara μ F2). | 226 |
| Figura 6.23. Espectro de emisión UC normalizado a 841 nm de dispersiones de UC _{Er} y UC _{Er} @RB a distintas concentraciones (λ_{exc} = 980 nm). | 227 |
| Figura 6.24. Cinéticas de desactivación de la emisión y ajustes a (a) 520, (b) 540, (c) 600, (d) 655, (e) 1050 y (f) 1550 nm (λ_{exc} = 980 nm) de UC _{Er} y UC _{Er} @RB en DMF en N ₂ y aire | 228 |
| Figura 6.25. Rendimiento cuántico absoluto upconversion de UC _{Er} y de UC _{Er} @RB en DMF..... | 228 |
| Figura 6.26. Curva de calibrado de RB y espectro de atenuación de UC _{Er} @RB | 234 |
| Figura 6.27. Estudio de la agregación de RB en DMF | 236 |
| Figura 6.28. Espectro de absorción de una disolución de RB y de atenuación de UC _{Er} @RB en DMF | 237 |
| Figura 6.29. (a) Espectros de absorción de una disolución de RB, de atenuación y absorción de una dispersión de UC _{Er} @RB en DMF. (b) Espectro de emisión de la disolución de RB y UC _{Er} @RB..... | 237 |
| Figura 6.30. Cinéticas de absorción del ³ RB y del bleaching del ¹ RB normalizadas de RB y UC _{Er} @RB ($\lambda_{exc,probe}$ = 560 nm) en atmósfera de N ₂ | 238 |
| Figura 6.31. Espectro de absorción de especies transitorias del RB y del UC _{Er} @RB 20,00 ns después del pulso láser en atmósfera de N ₂ ($\lambda_{exc,probe}$ = 560 nm). | 238 |

Índice de tablas

| | |
|---|-----|
| Tabla 1.1. Reglas de selección para absorción y emisión de Ln^{3+} e intensidad relativa para las transiciones $4f-5d$ y $4f-4f$ | 12 |
| Tabla 3.1. Composición de las muestras por EDX..... | 92 |
| Tabla 4.1. Sensores de pH basados en UCNH | 108 |
| Tabla 4.2. Tiempos de vida de desactivación para UC_{Tm} y $\text{UC}_{\text{Tm}}@{\text{Rod110}}$ | 113 |
| Tabla 4.3. Tiempos de vida de desactivación para $\text{UC}_{\text{Tm}}@{\text{CB@Y}}$ y $\text{UC}_{\text{Tm}}@{\text{CB@Y@F}}$.. | 122 |
| Tabla 4.4. Composición de la muestra UC_{Tm} recubierta de oleato | 138 |
| Tabla 4.5. Composición elemental de la muestra UC_{Tm} utilizada para construir $\text{UC}_{\text{Tm}}@{\text{Rod110}}$ | 140 |
| Tabla 5.1. Composición de la muestra UC_{Er} determinada por EDX..... | 179 |
| Tabla 6.1. Características relevantes de los UCNH desarrollados para PDT basados en UCNP | 198 |
| Tabla 6.2. Propiedades fotofísicas en atmósfera de N_2 y DMF ($\lambda_{\text{exc}}=560$ nm)..... | 214 |
| Tabla 6.3. Resultados de los ajustes para las cinéticas de absorción de RB y $\text{UC}_{\text{Er}}@{\text{RB}}$ | 219 |
| Tabla 6.4. Intensidad de las emisiones NIR a la longitud de onda de excitación especificada para UC_{Er} y $\text{UC}_{\text{Er}}@{\text{RB}}$ | 223 |
| Tabla 6.5. Condiciones de medida y resultados de los ajustes exponenciales para las disoluciones/dispersiones indicadas ($\lambda_{\text{exc}}=560$ nm) | 225 |
| Tabla 6.6. Propiedades de emisión UC en atmósfera inerte..... | 227 |
| Tabla 6.7. Resultados del análisis ICP-MS para UC_{Er} | 237 |
| Tabla 6.8. Condiciones de medida y resultados de los ajustes exponenciales para las disoluciones/dispersiones indicadas. | 239 |

Índice de ecuaciones

| | |
|--|-----|
| Ecuación 1.1. Tiempo de vida de emisión en función de procesos de desactivación radiativos y no radiativos..... | 14 |
| Ecuación 1.2. Rendimiento cuántico..... | 14 |
| Ecuación 1.3. Probabilidad de transferencia de energía radiativa..... | 16 |
| Ecuación 1.4. Probabilidad de transferencia de energía no radiativa resonante..... | 17 |
| Ecuación 1.5. Probabilidad de intercambio electrónico..... | 17 |
| | |
| Ecuación 3.1. Estimación del τ_{\min} de resolución de NIR-LSM..... | 89 |
| Ecuación 3.2. Estimación del τ_{\max} de resolución de NIR-LSM..... | 89 |
| Ecuación 3.3. Estimación de energía de excitación de NIR-LSM..... | 91 |
| | |
| Ecuación 4.1. Eficiencia FRET..... | 103 |
| Ecuación 4.2. Distancia de Förster..... | 103 |
| | |
| Ecuación 6.1. Eficiencia de los procesos desde un estado excitado singlete para moléculas no reactivas..... | 215 |
| | |
| Ecuación 8.1. Tiempo de vida promedio para ajustes multiexponenciales..... | 259 |

Introducción

Capítulo 1

1. Introducción

Las nanopartículas *upconversion* (UCNP) comenzaron a desarrollarse a inicios del presente siglo, generando una gran expectación e interés por sus propiedades fotofísicas particulares. Las UCNP son nanomateriales capaces de producir el fenómeno *upconversion* (UC) mediante el cual fotones de baja energía (de la región del infrarrojo cercano, NIR) se transforman en fotones de alta energía (en la región del UV-vis). Los principales actores del fenómeno son los iones lantánidos que se encuentran como dopantes de una matriz nanométrica transparente. Por tanto, en las UCNP, a diferencia de las nanopartículas (NP) semiconductoras, el confinamiento nanométrico no es el responsable de las propiedades ópticas sino las interacciones entre los iones lantánidos de la matriz. Aunque, sin duda, la escala nanométrica afectará a sus propiedades emisivas.

Esta tesis estructurada en cuatro capítulos comienza con una introducción a las propiedades ópticas de las UCNP, con unas breves reseñas históricas y una descripción detallada de los protagonistas de este fenómeno tan inusual como interesante: los iones lantánidos. En el primer capítulo se describe una técnica de microscopía desarrollada por el grupo y que permite caracterizar con resolución temporal la luminiscencia de las emisiones *upconversion* (UC). En el segundo se demuestra cómo la técnica anterior permite medir el alargamiento del tiempo de vida de un colorante orgánico funcionalizado en la superficie de la UCNP con una

Capítulo 1. Introducción

estrategia basada en un ligando macrocíclico, específicamente de cucurbit[7]urilo. El nanohíbrido upconversion (UCNH) resultante incorpora sinérgicamente las propiedades únicas de la UCNP con las de detección de la sonda orgánica, dando lugar a un sensor prueba de concepto. En el tercer capítulo se evalúa la citotoxicidad de la plataforma utilizada para desarrollar el sensor en comparación con la UCNP de partida. Por último, el cuarto capítulo profundiza en la caracterización fotofísica de un UCNH prueba de concepto compuesto por UCNP y un colorante orgánico. De tal manera que el hilo conductor de la tesis es la caracterización fotofísica de las UCNP y de los UCNH, pues es precisamente la limitación en el desarrollo de estos materiales. Cada capítulo está, a su vez, apoyado en una introducción inicial con resultados bibliográficos relevantes que describen la motivación que llevó a empezar la investigación. Asimismo, cuenta con una sección de objetivos, resultados y discusión y conclusiones. Finalmente, se concluye la tesis con las conclusiones más relevantes obtenidas en cada capítulo.

1.1. Breves reseñas históricas

Las UCNP comienzan a desarrollarse a inicios del 2000 en el contexto de un importante y creciente interés por materiales en la escala nanométrica (*boom* de los nanomateriales) para aplicaciones tecnológicas y biomédicas que se venía experimentando desde la década de los 80-90 del siglo pasado.^{1,2} La figura 1.1 nos da una idea del origen de la investigación en los nanomateriales. Las NP semiconductoras puntos cuánticos (*quantum dots*, QD; material 0D) abrieron camino, como un desarrollo lógico, después de los pozos cuánticos (*quantum well*, material 2D) e hilos cuánticos (*quantum wires*, material 1D), con aplicaciones tecnológicas.³ Poco después comenzó el desarrollo de nanopartículas metálicas, otras nanopartículas semiconductoras, nanomateriales de carbono y nanopartículas poliméricas, todas con potencial interés biomédico. El desarrollo de las NP dopadas con lantánidos con emisión de Stokes o *downshifting*,⁴⁻⁷ tuvo lugar más tarde con el desarrollo de las técnicas necesarias para sintetizarlas y con la esperanza de que la

Capítulo 1. Introducción

escala nanométrica mejorara sus propiedades emisivas,^{5,7} como había ocurrido con otros materiales.⁸ Por último, se produjo la irrupción de las UCNP. Es cierto que, la producción científica relacionada con las UCNP no presenta tantas publicaciones como el resto de NP ni un crecimiento exponencial, como ocurrió con los QD, debido a la limitación instrumental que supone la detección de la emisión UC. Sin embargo, es un campo joven, aún en crecimiento, en el que se han desarrollado multitud de aplicaciones y estrategias para modular sus propiedades.

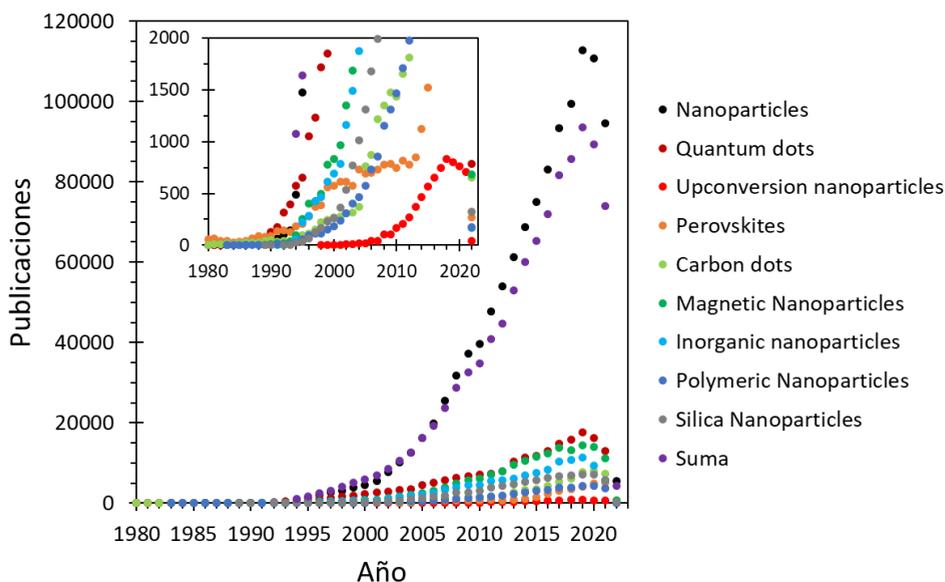


Figura 1.1. Número de publicaciones por año para las búsquedas en la Web Of Science de los términos mostrados en la leyenda (Topic, sin comillas, a 15/01/2022). Los datos “Suma” son el sumatorio de todos los tipos de nanopartículas buscadas.

H.X. Zhang *et al.*⁹ en el 2000 fueron los primeros en sintetizar en estado sólido un material UC a escala nanométrica y en el 2003 Güdel *et al.*¹⁰ sintetizaron las primeras UCNP coloidales. La aplicación de métodos sintéticos de otros nanomateriales y el desarrollo, a su vez, de nuevos métodos permitió que en los años siguientes comenzase el estudio y optimización de las propiedades ópticas de estos materiales singulares. Si bien, el fenómeno UC se conocía desde la década de los 60 en materiales macroscópicos y microscópicos. Este fenómeno se remonta a una idea

original de Bloembergen en 1959 para el desarrollo de detectores IR basados en la absorción consecutiva de fotones,¹¹ que fue demostrada en $\text{LaCl}_3:\text{Pr}^{3+}(1\%)$ por Porter en 1961.¹² Sin embargo, el esquema anterior implica excitar simultáneamente a dos longitudes de onda: una en el NIR y otra en el visible para generar una emisión en el visible menos energética que la de excitación ($\lambda_{\text{exc}}^{\text{vis}} < \lambda_{\text{em}}^{\text{vis}}$). El fenómeno UC propiamente dicho, mediante el cual una excitación menos energética produce emisiones más energéticas, lo descubrieron simultánea, pero independientemente, F. Auzel¹³ y V. V. Ovsyankin y P. P. Feofilov¹⁴ en 1966. Al igual que la propuesta de detectores IR, es un fenómeno que tiene como principal protagonista a los iones lantánidos, aunque actualmente también se han desarrollado sistemas UC con metales de transición 5d, uránidos 5f y especies orgánicas basadas en la aniquilación triplete-triplete.^{15,16}

1.2. Lantánidos

Los lantánidos son 15 elementos del sexto periodo de la tabla periódica que se caracterizan por contener electrones en los orbitales atómicos de valencia 4f y también se les conoce como lantanoides o tierras raras, denominación que suele englobar también al itrio (Y) y al escandio (Sc). El primer lantánido lo descubrió el Prof. Johan Gadolin en 1894 en un mineral obtenido en la localidad sueca de Ytterby, y lo denominó itrio.¹⁷ El resto de elementos que componen la serie de los lantánidos fueron descubiertos entre principios del siglo XIX y mediados del siglo XX.¹⁷ La dificultad de su obtención radica en que suelen encontrarse varios lantánidos mezclados en los minerales y su separación es compleja debido a la similitud de sus propiedades químicas.^{17,18} La abundancia de los mismos en la corteza terrestre es relativamente alta (el menos abundante es más abundante en la corteza terrestre que la Ag o el Pt) y se estima que los recursos mundiales están localizados en China (25-30 %), Rusia (20-25 %) y EEUU, Canadá y Australia (juntas suman otro 20-25 %), mientras que el resto se encuentra distribuido de forma variable en varios países.¹⁷ Si bien, el principal productor es China con el 96% de la producción mundial.¹⁷ Su

Capítulo 1. Introducción

importancia y presencia en productos tecnológicos cotidianos ha impulsado proyectos desde la UE, como *EuRare*, para asegurar un suministro viable a la industria europea (automoción, electrónica, maquinaria y química) que no dependa tan drásticamente de importaciones.¹⁹

Hoy en día los podemos encontrar en multitud de aparatos que utilizamos comúnmente, como en coches, teléfonos móviles, televisiones, dispositivos electrónicos, lámparas fluorescentes, LED, fibras ópticas, billetes, mecheros o escáneres médicos, pero también podemos encontrarlos en catalizadores de craqueo, sistemas de visión nocturna, lentes o láseres.^{17,20}

Las configuraciones electrónicas de estos elementos son $[\text{Xe}] 6s^2 4f^n 5d^0$, a excepción del La ($[\text{Xe}] 6s^2 5d^1$) y Ce ($[\text{Xe}] 6s^2 4f^1 5d^1$), donde los orbitales 4f no se han contraído lo suficiente para disminuir su energía frente a los electrones 5d; el Gd ($[\text{Xe}] 6s^2 4f^7 5d^1$), estabilizado por la capa medio llena; y el Lu ($[\text{Xe}] 6s^2 4f^{14} 5d^1$), que tiene la capa 4f llena. Su estado de oxidación más estable es el +3 (con una configuración electrónica de $[\text{Xe}] 4f^n$), aunque también presentan un estado de oxidación +2.²⁰ Sus propiedades electrónicas y fotofísicas vienen determinadas por un hecho fundamental: el carácter interno de los orbitales 4f.²¹ En los iones lantánidos (Ln^{3+}), los electrones de valencia se encuentran protegidos o apantallados por las subcapas $5s^2 5p^6$, que presentan funciones radiales más extensas (figura 1.2). De tal manera que, a diferencia de los metales de transición, los orbitales 4f apenas participarán en el enlace y la presencia de un campo de ligandos o campo cristalino prácticamente no afectará a las propiedades electrónicas y magnéticas de estos iones. Este hecho define algunas de sus características:²²

1. Presentan un rango amplio de números de coordinación (generalmente entre 6-12, pero también se conocen coordinaciones de 2, 3 o 4).
2. Las geometrías de coordinación vienen determinadas por los factores estéricos de los ligandos en vez de por efectos del campo cristalino.

3. Desde el La al Lu, existe una reducción del radio atómico y del radio iónico (Ln^{3+}), conocida como contracción lantánida.
4. Sus propiedades espectroscópicas y magnéticas no están en gran medida influidas por los ligandos.
5. Presentan afinidad por ligandos aniónicos con átomos dadores de electrones y con alta electronegatividad, como el O y el F, en vez de bases débiles con ligandos con átomos dadores P o S.
6. Con la excepción del La^{3+} y el Lu^{3+} (y el Y^{3+}), todos los iones Ln^{3+} contienen electrones desapareados y son paramagnéticos.

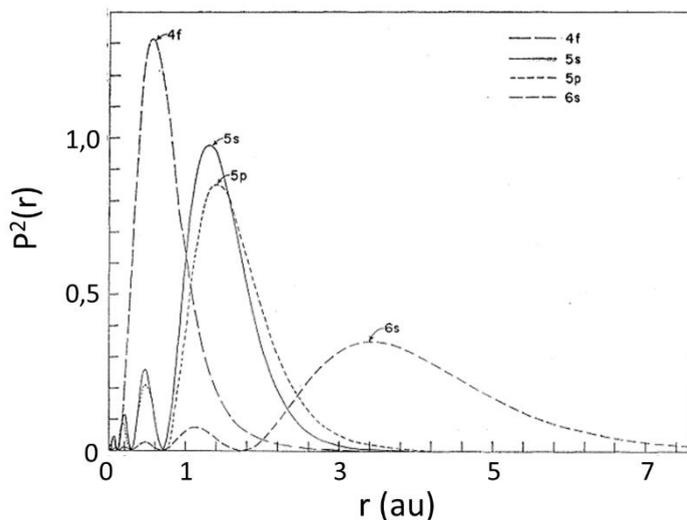


Figura 1.2. Densidad de probabilidad de las funciones de onda radiales para los niveles de energía 4f, 5s, 5d y 6s para el Gd^+ . Reproducido con permiso de ²³ Copyright 1962 the American Physical Society.

1.2.1. Estructura electrónica y campo cristalino en lantánidos

La estructura electrónica de los lantánidos viene determinada también por el carácter interno de los orbitales 4f. De tal manera que la configuración electrónica del estado fundamental $[\text{Xe}] 4f^n$ ($n = 0-14$) está bastante separada energéticamente de la configuración $[\text{Xe}] 4f^n 5d^1$ ($\Delta E > 50000 \text{ cm}^{-1}$, $\lambda < 200 \text{ nm}$).²⁴

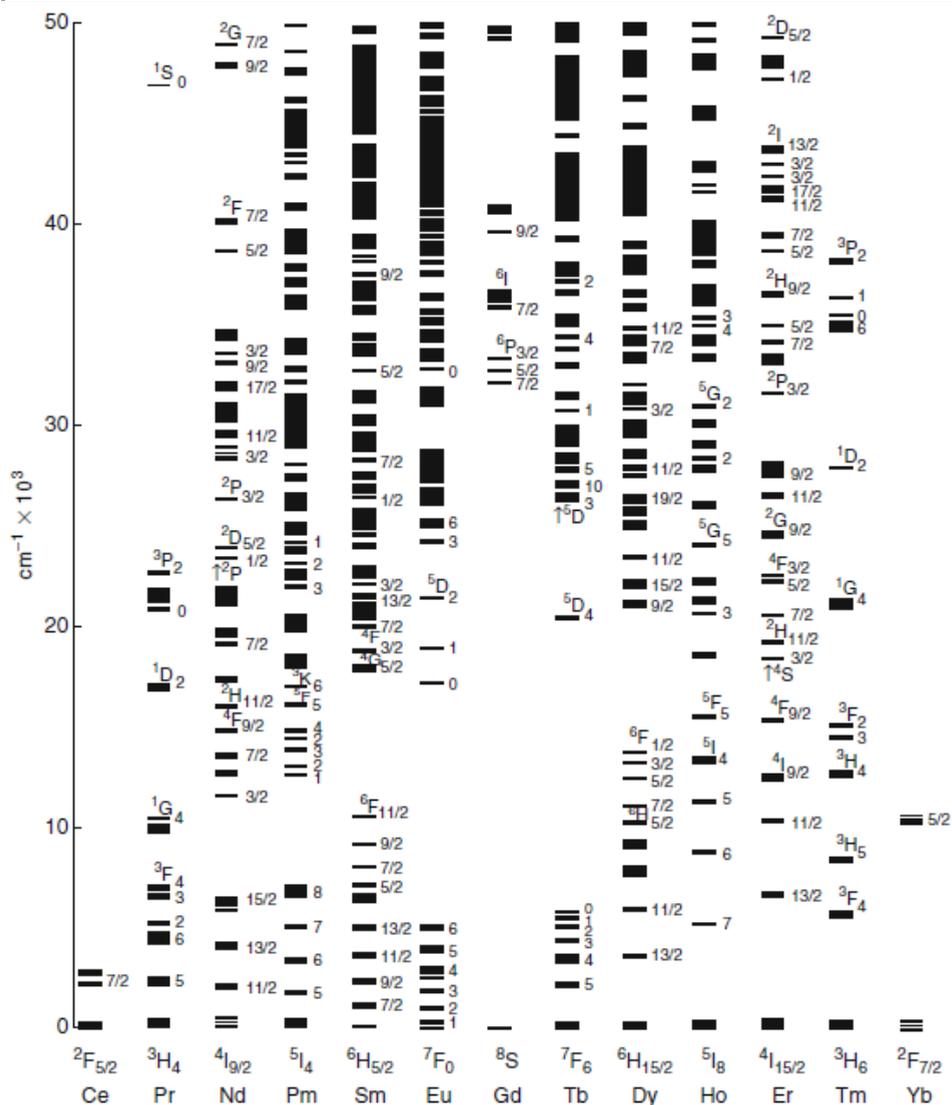


Figura 1.3. Diagrama de niveles de energía o de Dieke para iones lantánidos Ln^{3+} dopantes de una matriz con baja simetría, LaF_3 , de 0 a 50000 cm^{-1} . Reproducido con permiso de Springer Nature: Springer eBook *Physics of Light Emission from Rare-Earth Doped Phosphors* de R. Withnall, J. Silver Copyright 2012.²⁵

Los niveles energéticos de la configuración electrónica $[\text{Xe}] 4f^n$ ($n = 0-14$) de los iones lantánidos, también conocidos como diagramas de Dieke, se basan en predicciones teóricas simplificadas combinadas con resultados experimentales y

Capítulo 1. Introducción

pueden extenderse en energía hasta los 190000 cm^{-1} (para $n = 6, 7$ y 8).^{21,26} La figura 1.3 muestra los subniveles energéticos o niveles de Stark para los iones lantánidos trivalentes dopantes de una matriz inorgánica hasta los 50000 cm^{-1} (200 nm). Como se observa, todos presentan una estructura electrónica única, que se caracteriza por múltiples niveles energéticos en la región del ultravioleta (UV, $> 26000 \text{ cm}^{-1}$), visible (vis, ca. $13000 - 26000 \text{ cm}^{-1}$) e infrarrojo (IR, ca. $10 - 13000 \text{ cm}^{-1}$).

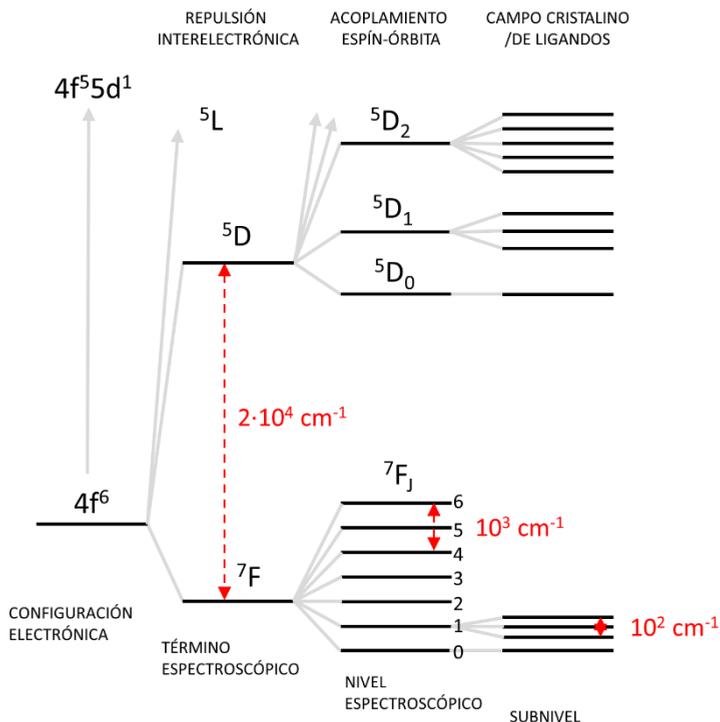


Figura 1.4. Diagrama de energía parcial para Eu^{3+} ($[Xe] 4f^6$) que muestra la magnitud de la repulsión interelectrónica, el acoplamiento espín-órbita, el efecto del campo de ligandos y el de campo magnético. Adaptado de ^{27,28}.

La figura 1.4 muestra un ejemplo de los efectos cuánticos que produce el desdoblamiento de los niveles energéticos para dos términos espectroscópicos del Eu^{3+} y que aplican también para el resto de cationes lantánidos. Se observa que la magnitud del desdoblamiento provocado por la repulsión interelectrónica, que da lugar a los términos espectroscópicos ($^{2S+1}\Gamma$, donde S es el número cuántico de espín

Capítulo 1. Introducción

y Γ es S, P, D, F, G, H, I, K si el número cuántico de momento angular orbital total, L , es 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente), es similar al desdoblamiento provocado por el acoplamiento espín-órbita, de acuerdo con la aproximación de Russell-Saunders ($^{2S+1}L_J$, siendo J el momento angular total) y del orden de 10^4 - 10^3 cm^{-1} . La presencia de un campo cristalino o campo de ligandos rompe la degeneración del nivel $^{2S+1}L_J$ y el desdoblamiento en subniveles (o niveles de Stark) que produce es de un orden inferior en energía respecto a los anteriores efectos (ca. 100 cm^{-1}), debido precisamente al apantallamiento que ejercen los orbitales llenos más externos $5s$ y $5p$, y su extensión depende de la simetría del campo de ligandos.²¹ De tal manera que las perturbaciones del campo cristalino afectan de manera muy débil a los términos espectroscópicos y, por tanto, los compuestos de lantánidos reflejan prácticamente las mismas propiedades magnéticas y espectrales que los iones libres.^{21,22,26} Si bien, el campo cristalino no elimina por completo la degeneración de los niveles espectroscópicos.²¹

1.2.2. Absorción de los lantánidos

La luz presenta tanto propiedades corpusculares (fotones) como ondulatorias, estando estas últimas formadas por dos campos oscilatorios: uno eléctrico y uno magnético. Al interactuar con la materia, y en este caso con iones lantánidos, los fotones pueden transferir su energía a los electrones, llevándolos a un estado u orbital excitado. La absorción viene determinada por operadores ligados a la naturaleza de la luz: (i) el dipolo eléctrico (DE), (ii) el dipolo magnético (DM) y (iii) el cuadrupolo eléctrico (QE).²¹ De tal manera que no todas las transiciones están permitidas, ya que obedecen las reglas de selección.

Los lantánidos pueden dar lugar a tres tipos de transiciones: transiciones intraconfiguracionales $4f$ - $4f$ que dan lugar a bandas estrechas, transiciones $4f$ - $5d$ que dan lugar a bandas anchas y transiciones de transferencia de carga (de metal a ligando y viceversa), que también dan lugar a bandas anchas.

Capítulo 1. Introducción

Las transiciones 4f-5d ($4f^n \rightarrow 4f^{n-1}5d^1$) están permitidas por paridad (Laporte), por tanto, presentan intensidades relativamente grandes ($\epsilon = 200\text{-}1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Son transiciones fácilmente reconocibles: ocurren en longitudes de onda del UV ($< 250 \text{ nm}$, figura 1.5) y son bandas de absorción anchas cuya localización en el espectro es muy sensible al ambiente de los iones activadores ya que los orbitales 5d son mucho más externos^{21,24,29}. Se dan en lantánidos fácilmente oxidables como Sm^{2+} , Eu^{2+} e Yb^{2+} , y en Ce^{3+} , Pr^{3+} y Tb^{3+} .

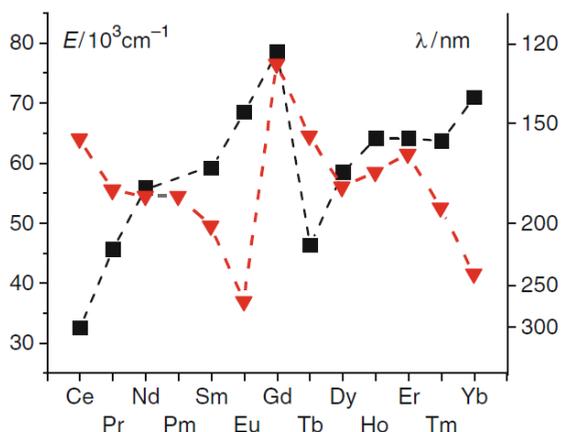


Figura 1.5. Energía de las transiciones 4f-5d en $\text{CaF}_2:\text{Ln}^{3+}$ (negro) y de las transiciones de transferencia de carga de ligando a metal ($2p(\text{O})\text{-}4f$, rojo). Reproducido con permiso de Springer Nature: Springer eBook Basics of Lanthanide Photophysics por J.-C. G. Bünzli, S. V. Eliseeva Copyright 2010. ²¹

Las transiciones por transferencia de carga interconfiguracionales están permitidas por paridad y dan lugar a bandas de absorción anchas. Al igual que las transiciones 4f-5d, ocurren a energías elevadas ($< 200 \text{ nm}$, figura 1.5). Generalmente se tratan de transferencias electrónicas entre los cationes lantánidos y O^{2-} . La presentan los lantánidos fácilmente reducibles como Ce^{4+} , Pr^{4+} , Tb^{4+} , Sm^{3+} , Eu^{3+} e Yb^{3+} .^{21,25,29,30}

A diferencia de las anteriores, las transiciones intraconfiguracionales 4f-4f, responsables de las emisiones UC, no están permitidas, ya que la regla de paridad de Laporte no permite que estados con la misma paridad estén conectados por

Capítulo 1. Introducción

transiciones de dipolo eléctrico ($\Delta l = \pm 1$). Sin embargo, cuando un ión Ln^{3+} se encuentra bajo la influencia de un campo cristalino las interacciones nocentrosimétricas permiten el mezclado parcial de las funciones de onda 4f con estados electrónicos de paridad opuesta (5d), relajando las reglas de selección y las transiciones de dipolo eléctrico pasan a ser parcialmente permitidas. Estas transiciones parcialmente permitidas se las conoce como transiciones de dipolo eléctrico inducido (DEI), si bien son mucho menos intensas que las permitidas por DE (ϵ entre $0.1\text{-}10 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; véase intensidad relativa en la tabla 1.1). Por ello, algunos autores recomiendan sustituir la terminología transición permitida/prohibida por transición con alta/baja probabilidad.²¹ Las transiciones de dipolo magnético y cuadrupolares están permitidas por paridad, sin embargo, son mucho menos intensas que las DEI (tabla 1.1). La teoría Judd-Ofelt permite entender y predecir las intensidades espectrales mediante la formulación de otras reglas de selección que afectan a ΔS , ΔL y ΔJ (tabla 1.1).^{21,26,28,30}

Tabla 1.1. Reglas de selección para absorción y emisión de Ln^{3+} e intensidad relativa para las transiciones 4f-5d y 4f-4f.³⁰

| Transición | Paridad | ΔS | ΔL | ΔJ | Intensidad relativa |
|------------|---------|------------|---|---|------------------------------|
| DE, 4f-5d | Opuesta | 0 | $\leq 1^a$ | $\leq 1^c$ | 0.01-1 |
| DEI, f-f | Igual | 0 | $\leq 6^a$ (2, 4, 6 si L o $L' = 0$) | $\leq 6^c$ (2, 4, 6 si L o $L' = 0$) | 10^{-4} |
| DM, f-f | Igual | 0 | 0 | $\leq 1^c$ | 10^{-6} |
| QE | Igual | 0 | $\leq 2^b$ | $\leq 2^d$ | 10^{-10} |

^a $L=0 \leftrightarrow L'=0$ prohibida

^b $L=0 \leftrightarrow L'=0,1$ prohibida

^c $J=0 \leftrightarrow J'=0$ prohibida

^d $J=0 \leftrightarrow J'=0,1$ prohibida

1.2.3. Luminiscencia directa (*downshifting*) en los lantánidos

Con las excepciones de La^{3+} y Lu^{3+} , todos los iones Ln^{3+} son luminiscentes y sus emisiones 4f-4f ocurren desde la región espectral del UV al infrarrojo cercano (NIR), pasando por el visible (vis).²¹ En algunos casos el estudio de la intensidad y del patrón de desdoblamiento de ciertas transiciones en el espectro de emisión de

Capítulo 1. Introducción

compuestos de lantánidos (en especial de Eu^{3+} y Tb^{3+}) puede dar información sobre el entorno de los iones lantánidos. Algunos iones son fluorescentes ($\Delta S=0$), otros fosforescentes ($\Delta S \neq 0$) y otros son ambos.²¹

Las emisiones f-f son estrechas porque la excitación de electrones a orbitales 4f de mayor energía no perturba el patrón de enlace del Ln^{3+} con su entorno, ya que los orbitales 4f no participan en gran medida en el enlace. Por ello, presentan un desplazamiento de Stokes muy pequeño, en contraposición a transiciones 4f-5d o a transiciones en moléculas orgánicas convencionales, para las cuales la excitación produce frecuentemente alargamiento de los enlaces químicos, que resultan en bandas de emisión anchas con un desplazamiento de Stokes largo porque el acoplamiento con las vibraciones es fuerte (figura 1.6).^{21,24}

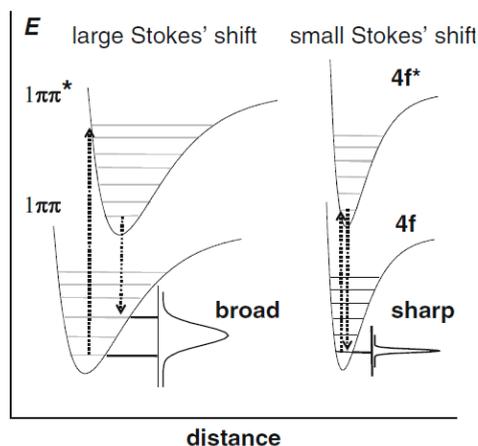


Figura 1.6. Diagrama de coordenadas de configuración para la emisión de un fluoróforo orgánico (izquierda) y un ión lantánido (derecha). Reproducido con permiso de Springer Nature: Springer eBook Basics of Lanthanide Photophysics por J.-C. G. Bünzli, S. V. Eliseeva Copyright 2010.²¹

Además del espectro de emisión, otros parámetros fundamentales para caracterizar experimentalmente la emisión son el tiempo de vida de emisión (τ_{obs}) y el rendimiento cuántico (Φ). El tiempo de vida de emisión se define como la inversa

Capítulo 1. Introducción

de la velocidad de desactivación de un estado excitado, que a su vez se compone de los procesos de desactivación radiativos (k^{rad}) y no radiativos (k^{nr}):

$$\tau_{obs} = \frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{k^{rad} + \sum_n k_n^{nr}} \quad (1.1)$$

Las transiciones 4f-4f en los iones lantánidos presentan tiempos de vida generalmente largos, en la escala de microsegundos y nanosegundos.²¹

El rendimiento cuántico es una medida de la eficiencia emisiva del ión (o especie) y se define como la proporción de fotones emitidos (f_{em}) y fotones absorbidos (f_{abs}), por tanto, también refleja la extensión de la desactivación no radiativa. Por ello, está íntimamente relacionado con k^{rad} y k^{nr} :

$$\Phi = \frac{f_{em}}{f_{abs}} = \frac{k^{rad}}{k_{obs}} \quad (1.2)$$

De tal manera que, en ausencia de fenómenos de desactivación no radiativa, $k_{obs}=k^{rad}$ y, por tanto, $\Phi = 1$, lo que es poco frecuente. El rendimiento cuántico depende fundamentalmente de la diferencia de energía (ΔE) entre el estado emisor y del nivel fundamental (*energy gap*).^{21,27} De tal manera que cuanto más pequeño es ΔE más fácil es que se produzca un proceso de desactivación no radiativa (nótese la pequeña ΔE entre los subniveles de algunos cationes lantánidos de la figura 1.3). En particular las vibraciones de alta energía como O-H, N-H, C-H o vibraciones energéticas de la red cristalina pueden facilitar la desactivación no radiativa. Una regla de oro es que la desactivación no radiativa competirá eficientemente con la desactivación radiativa si la energía del modo de vibración (fonón) más energético de la especie desactivadora (disolvente, ligando o red cristalina) es $<1/6 \Delta E$.²¹ De tal manera que cuantos más fonones se necesiten para desactivar una ΔE será menos probable un fenómeno de desactivación. Por ello, la desactivación por moléculas de agua ($\bar{\nu}(\text{OH}) = 3600 \text{ cm}^{-1}$) es más fuerte que por agua deuterada ($\bar{\nu}(\text{OD}) = 2200 \text{ cm}^{-1}$). Dada la heterogeneidad de la distribución de niveles electrónicos, el rendimiento cuántico de los iones lantánidos es variable, depende de la temperatura, la presencia

Capítulo 1. Introducción

de vibraciones que desactiven la emisión y la cercanía a otros lantánidos. Si bien, se han descrito sistemas con rendimiento cuánticos cercanos a la unidad.³¹

Por tanto, las transiciones intraconfiguraciones 4f-4f de los iones lantánidos se presentan como bandas de absorción muy similares a las de los iones libres, con bajos coeficientes de absorción (normalmente entre $0,1-1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)²¹ y emisiones estrechas, poco intensas y de tiempo de vida largo (microsegundos). Sin embargo, estas propiedades emisivas pueden modificarse mediante procesos de transferencia de energía.

1.2.4. Transferencias de energía entre iones lantánidos

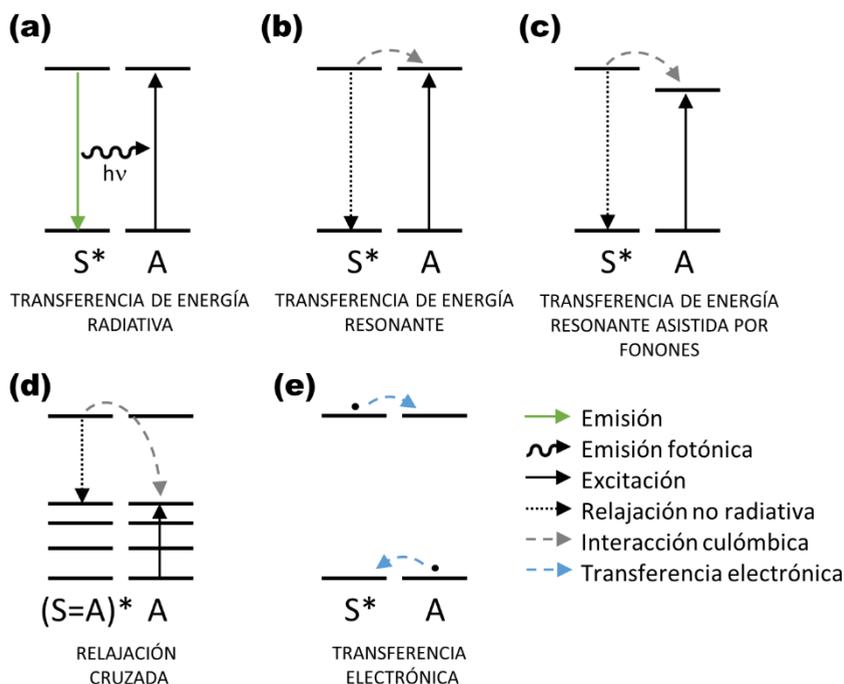


Figura 1.7. Procesos básicos de transferencia de energía entre iones. S^* es el ión sensibilizador en estado excitado y A es el ión activador. Adaptado con permiso de ¹⁵. Copyright 2004 American Chemical Society.

Capítulo 1. Introducción

La interacción más sencilla de transferencia de energía se da entre dos especies, en este caso lantánidos, y requiere identificarlas en función del papel que juegan en el proceso. Así, distinguimos al sensibilizador (S) y al activador (A), que en ambos casos son iones lantánidos y que no tienen por qué ser necesariamente idénticos. El S es el ión que en estado excitado puede transferir su energía a A, el cual es el responsable de la emisión fotónica consiguiente. Nótese que, a diferencia de los procesos de transferencia de energía en moléculas orgánicas, la notación utilizada no es dador/aceptor de energía porque puede inducir a error, ya que, los iones lantánidos también pueden usarse para dopar semiconductores (para evitar la ambigüedad: aceptor/dador de electrones).¹⁵

Entre los iones lantánidos pueden darse tres diferentes procesos de transferencia de energía (figura 1.7): (i) transferencia de energía radiativa resonante, (ii) transferencia de energía no radiativa resonante, (iii) transferencia de energía asistida por multifonones y (iv) relajación cruzada (*cross relaxation*).¹⁵

La transferencia de energía radiativa resonante (figura 1.7.a) implica la emisión de fotones por S y la absorción por cualquier especie A que se encuentre en el recorrido de los fotones. Está definida por la expresión:¹⁵

$$P_{SA}(r) = \frac{\sigma_A J(\lambda)}{4\pi \tau_S} \cdot \frac{1}{r^2} \quad (1.3)$$

donde σ_A es el coeficiente de absorción de A, $J(\lambda)$ es la integral de solapamiento, τ_S es el tiempo de vida del S y r es la distancia entre S y A. Es un mecanismo, por tanto, que depende directamente de la absorción de A, de la superposición entre el espectro de emisión de S y el de absorción de A ($J(\lambda)$), del tiempo de vida de emisión de S y del cuadrado de la distancia entre S y A (r^2). Esto último explica que sea un mecanismo de largo alcance. Además, este proceso de transferencia de energía no afecta al tiempo de vida de luminiscencia de S, ya que no afecta a su estado excitado (desactivación estática).^{32,33} Este proceso permite la difusión de energía de largo

Capítulo 1. Introducción

alcance cuando $S=A$ y permite efectos de captura fotónica (*photon-trapping effects*).¹⁵

La transferencia de energía entre S excitado (S^*) y A también puede realizarse de manera no radiativa si se produce una interacción culómbica de tipo van der Waals (figura 1.7.b) o un intercambio electrónico entre los dos iones (figura 1.7.e). La interacción culómbica fue introducida por Förster en 1948 para interacciones dipolo-dipolo y extendida por Dexter en 1953 para interacciones multipolares.^{34,35} Esta transferencia de energía vendrá definida por:¹⁵

$$P_{SA}(r) = \frac{1}{\tau_S} \left(\frac{R_0}{r} \right)^s \quad (1.4)$$

donde R_0 es la distancia de Förster, que se define como la distancia a la cual la transferencia de la excitación y la desactivación espontánea del S^* presentan la misma probabilidad y depende del índice de refracción del medio, el Φ del sensibilizador (Φ_S) y $J(\lambda)$.^{33,36} A diferencia de la energía radiativa, la eficiencia depende de una distancia crítica R_0 y, como está implicado el estado S^* , afectará a su tiempo de vida de luminiscencia (desactivación dinámica).^{32,33} Además, únicamente ocurre a distancias muy pequeñas, debido a su dependencia inversa con r^{-s} , donde s es 6, 8 y 10 para interacciones dipolo-dipolo, dipolo-cuadrupolo y cuadrupolo-cuadrupolo, respectivamente. En el caso particular que S y A sean iones idénticos, este fenómeno se conoce como difusión o migración de energía.

El intercambio electrónico es otro mecanismo de transferencia de energía no radiativo, que implica transferencia de electrones entre S^* y A . Fue introducido por Dexter y viene definido por:

$$P_{SA}(r) = \frac{2\pi}{h} D \cdot J(\lambda) \cdot e^{-2r/L} \quad (1.5)$$

donde D es el parámetro de Dexter y L es la suma del radio de van der Waals del sensibilizador y el activador. Al igual que el mecanismo de Förster depende

Capítulo 1. Introducción

directamente de $J(\lambda)$, pero este mecanismo presenta una dependencia aún más drástica (exponencial) con la r y, por tanto, se limita a distancias especialmente cortas.

Las interacciones dipolo-dipolo suelen ser las dominantes en matrices cristalinas dopadas con cationes lantánidos, ya que ocurren normalmente a distancias interiónicas de 6-30 Å.³⁶⁻³⁸ Sin embargo, si el dopaje o la matriz cristalina permite la cercanía o la formación de clústeres químicos en los que $r < 5$ Å no se puede descartar la ocurrencia de fenómenos multipolares o de intercambio electrónico.^{15,39}

Por otro lado, las transferencias de energía también pueden ocurrir aunque la superposición del espectro de absorción y el de emisión no sea elevada ($J(\lambda)$ pequeño), siempre que la conservación de energía se mantenga mediante el acoplamiento electrón-fonón (vibrónico) entre los Ln^{3+} y su entorno (figura 1.7.c).^{15,36}

Por último, pueden producirse fenómenos de relajación cruzada (figura 1.7.d) que generalmente designan a los procesos de transferencia de energía no radiativa *downshifting* que ocurren entre iones idénticos (autodesactivación, *self-quenching*).¹⁵ En el caso particular de que A en estado excitado (A^*), que ha sido sensibilizada por S, en vez de emitir radiación devuelva su energía a S de manera no radiativa, se habla de una retrotransferencia de energía (*back energy transfer*).⁴⁰

1.2.5. Procesos *upconversion*

El desarrollo de los láseres y la teoría para tratar emisiones en el siglo pasado ha permitido el descubrimiento de diferentes mecanismos de emisión UC basados en UCNP. La estructura escalonada de los niveles electrónicos de los lantánidos, junto con la presencia de estados intermedios con tiempo de vida largo permite que los procesos de transferencias de energía no sólo se den desde el nivel fundamental al primer estado excitado, sino entre iones en estados excitados, tal y como descubrieron F. Auzel¹³ y Ovsyankin y Feofilov¹⁴.

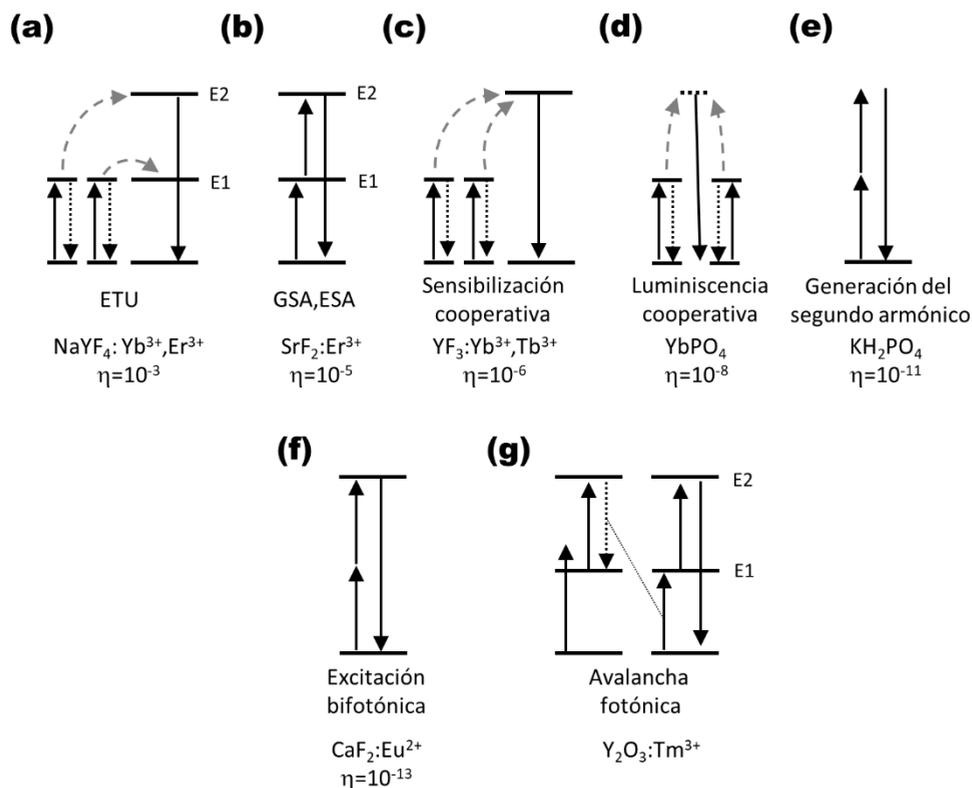


Figura 1.8. Mecanismos de emisión upconversion, junto con un ejemplo representativo y la eficiencia del proceso (η). Las líneas continuas indican absorción o emisión, las punteadas indican desactivación no radiativa o relajación cruzada y las líneas discontinuas procesos de transferencia de energía no radiativa. Adaptado con permiso de ¹⁵. Copyright 2004 American Chemical Society.

Los fenómenos que implican una interacción de más de un fotón para alcanzar emisiones más energéticas presentan una dependencia no lineal con la potencia de excitación, por lo que se les conoce como procesos no lineales (figura 1.8).¹⁵ Por ejemplo, la absorción bifotónica (2PE) o la generación del segundo armónico (SHG) son procesos de este tipo. En el caso de los iones lantánidos existen hasta 5 mecanismos diferentes (sin tener en cuenta la 2PE) por los cuales son capaces de transformar radiación electromagnética de baja energía en radiación de mayor energía: la absorción de estado excitado (ESA), la transferencia de energía

Capítulo 1. Introducción

upconversion (ETU), la avalancha fotónica (PA), la sensibilización cooperativa (CS) y la luminiscencia cooperativa (LC).^{15,29}

El fenómeno ESA consiste en una absorción secuencial de fotones, primero desde el estado fundamental al primer estado excitado (GSA: *ground state absorption*) y de ese primer estado excitado a otros superiores en energía mediante ESA (*excited state absorption*, figura 1.8.b). Requiere, por tanto, iones lantánidos con una estructura electrónica escalonada y con ΔE entre los niveles electrónicos similares para poder ser excitados a la misma longitud de onda (λ). Por ello, es un fenómeno que tiene lugar en materiales dopados con un único ión lantánido, como Er^{3+} , Tm^{3+} , Ho^{3+} o Nd^{3+} .⁴¹⁻⁴³

La PA requiere de dos iones idénticos y se caracteriza por producir el fenómeno UC por encima de un límite de potencia de excitación (*threshold*). Es un proceso en bucle (*loop*) que involucra ESA y una eficiente relajación cruzada (figura 1.8.g). El proceso comienza con la excitación no resonante del estado fundamental E1, seguida de un fenómeno ESA resonante entre E1 y E2, y finaliza con una relajación cruzada a un ión vecino en estado fundamental y puebla el estado intermedio de ambos iones. La repetición de este proceso puebla exponencialmente este nivel intermedio y favorece la emisión desde el nivel superior cuando se utilizan potencias superiores al *threshold*.²⁹

La CS requiere de tres centros, de los cuales dos actúan como sensibilizadores y son idénticos (figura 1.8.c). Es un fenómeno similar a ETU pero en este caso el activador no tiene un nivel energético intermedio real. Para excitar al activador los dos sensibilizadores excitados interactúan transfiriendo su energía simultánea y cooperativamente. Tiene lugar en materiales que presentan al Yb^{3+} como sensibilizador y a Tb^{3+} , Eu^{3+} o Pr^{3+} como activadores.⁴¹ El mecanismo LC actúa de manera similar pero no requiere de un ión activador, ya que la emisión tiene lugar desde un estado electrónico virtual (figura 1.8.d).⁴⁴

Capítulo 1. Introducción

El fenómeno ETU, originalmente llamado APTE,¹³ involucra, al menos, dos iones. En este caso, un ión sensibilizador absorbe fotones para transferírseles secuencialmente de manera no radiativa a los niveles electrónicos excitados del ión activador (figura 1.8.a).

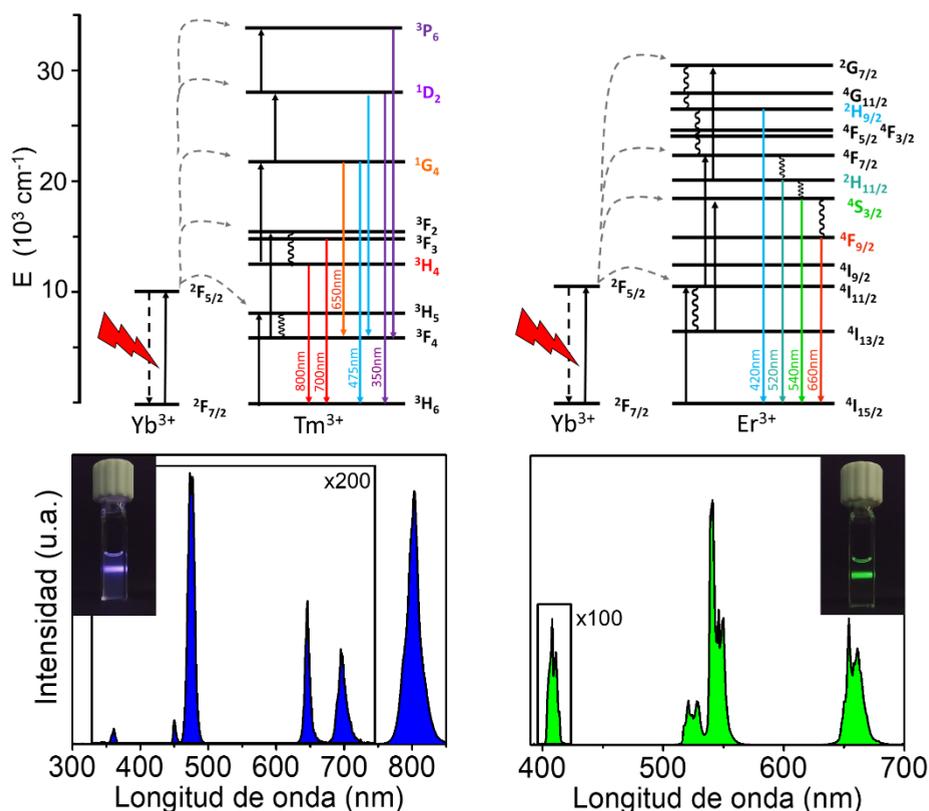


Figura 1.9. Diagrama de energía con los procesos de transferencia de energía y espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$) para nanopartículas de $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ (columna izquierda) y $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ (columna derecha). Las fotografías muestran la emisión de la dispersión correspondiente de UCNP.^{45,46}

ETU es el proceso más eficiente para producir una emisión UC^{21,41} y requiere que el sensibilizador sea un lantánido con buenas propiedades de absorción y cuya ΔE sea resonante con otras ΔE de niveles excitados del activador. Por ello, se utiliza el Yb^{3+} , que presenta un único nivel excitado (^2F) y que tiene una sección transversal

Capítulo 1. Introducción

de absorción elevada a 980 nm ($9,11 \cdot 10^{21} \text{ cm}^{-2}$, que en coeficiente de extinción molar equivale a *ca.* $2,5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$),⁴¹ que es resonante con ΔE de niveles de Er^{3+} , Tm^{3+} u Ho^{3+} . Se trata del proceso más estudiado y utilizado para diseñar UCNP ya que posibilita el fenómeno UC a potencias relativamente bajas ($1\text{-}10^3 \text{ W/cm}^2$) frente a procesos de excitación bifotónica (2PE; $10^6\text{-}10^9 \text{ W/cm}^2$) de colorantes y otras nanopartículas.⁴⁷ Durante la presente tesis nos centraremos en este mecanismo aplicado a nanopartículas dopadas con los pares $\text{Yb}^{3+}\text{-Er}^{3+}$ e $\text{Yb}^{3+}\text{-Tm}^{3+}$, que mediante excitación a 980 nm producen emisiones eficientes UC en el UV cercano, visible y NIR. La figura 1.9 muestra el diagrama de energía de los iones lantánidos implicados en ETU con los procesos de transferencia de energía y el espectro de emisión para ambos sistemas.

El proceso inverso a UC por el cual, se emiten dos o más fotones de baja energía a partir de la excitación con un fotón de alta energía (UV-vis) se conoce como corte cuántico (*quantum cutting*) o *downconversion* y presenta gran interés para incrementar la eficiencia de los paneles fotovoltaicos.^{41,48}

1.3. *Upconversion* en la escala nanométrica

La escala nanométrica permite aumentar en gran medida el área superficial de los materiales, que a su vez permite un mayor anclaje de especies de interés en la superficie. Además, la escala nanométrica del material permite su difusión en el organismo e incorporación en diferentes compartimentos celulares.²⁰ Cuando la matriz en la que se encuentran los dopantes Ln^{3+} presenta una escala inferior a 100 nm hablamos de UCNP, y se utiliza la notación «*Matriz:dopantes(proporción%)@recubrimiento/ligando superficial@...*» para nombrarlas. La eficiencia de la emisión UC, de forma análoga a fluoróforos o fenómenos *downshifting* convencionales, suele expresarse en rendimiento cuántico UC absoluto (UCQY),^{49,50} sin embargo, al tratarse de un proceso no lineal, inducido con láser depende de múltiples factores, como la densidad de potencia de excitación, el perfil del haz, la dispersión del haz de excitación, la autoabsorción de la emisión,

Capítulo 1. Introducción

efectos térmicos inducidos por la excitación, emisión cercana a la longitud de onda de excitación y absorción de la excitación por el disolvente/medio.⁵¹⁻⁵³ Dada la complejidad de esta medida, no es posible determinar el UCQY de manera relativa^{54,55} y requiere de, al menos, (i) determinar de forma precisa la potencia de excitación en la muestra (y con ello caracterizar de forma exhaustiva el perfil del láser)⁵⁰ y (ii) conocer la dependencia del UCQY con la potencia de excitación o bien expresar el resultado para UCQY a la potencia medida junto con el valor UCQY en el que se produce la saturación de la eficiencia.⁵⁵ Si bien, para definir la eficiencia del sistema algunos autores utilizan el flujo radiante total, que es la cantidad de energía de excitación convertida en emisión, de forma análoga al UCQY.⁵⁶

A diferencia de otros sistemas nanométricos en los que el confinamiento cuántico mejora las propiedades emisivas del material (p. ej. los QD), en las UCNP la eficiencia de emisión UC es de un orden inferior al material macroscópico e incluso disminuye si las UCNP se encuentran dispersadas en un medio, ya que las propiedades ópticas de las UCNP vienen determinadas por los fenómenos superficiales.^{40,55} De hecho, los máximos UCQY para UCNP coloidales que emiten en el visible ($\lambda_{exc}=980$ nm) reportados hasta la actualidad son de un 5 y 7,6 % para $\text{LiLuF}_4:\text{Yb}^{3+}(20\%),\text{Er}^{3+}(1\%)@ \text{LiLuF}_4$ y $\text{LiLuF}_4:\text{Yb}^{3+}(20\%),\text{Tm}^{3+}(1\%)@ \text{LiLuF}_4$ (UCNP de 50 nm; 127 W/cm²)⁵⁷ y de un 8,4 % para $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}(20\%),\text{Tm}^{3+}(1,2\%)$ (UCNP de 35 nm, 140 W/cm²),⁵⁸ pero normalmente es inferior al 1 % para UCNP sin recubrimientos inorgánicos o tipo *core*,⁵⁵ especialmente para tamaños < 10 nm.⁵⁹

Las UCNP presentan una relación superficie/volumen muy superior a la que puede darse en un material macroscópico y, por tanto, tendremos una cantidad importante de iones Ln^{3+} en la superficie expuestos a ser desactivados de manera no radiativa, bien por el medio, por defectos superficiales o por los ligandos.⁴⁰ Adicionalmente, no pueden despreciarse los fenómenos de migración de energía en Ln^{3+} idénticos que puedan darse en el interior de la red cristalina y que pueden cortocircuitarse en la superficie del material.⁶⁰ De hecho, Gargas *et al.*⁶¹ sugirieron que para UCNP < 8 nm más del 80 % de UCNP es sensible a efectos superficiales

Capítulo 1. Introducción

de manera directa. En definitiva, cuanto menor sea el tamaño de la UCNP menos eficiente será el fenómeno de emisión UC.

En este sentido, T. Soukka *et al.*⁶² han demostrado que las vibraciones OH del agua son las responsables de la desactivación de la luminiscencia UC en $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ y $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Tm}^{3+}$ y que el principal mecanismo de desactivación es la desactivación multifonónica del Yb^{3+} . Si bien, también se ha demostrado que los fonones superficiales de las vibraciones entre los átomos Yb^{3+} y O⁻ del ligando, lejos de desactivar la emisión UC, favorecen la eficiencia del fenómeno UC a altas temperaturas (*ca.* 150 °C) para UCNP de 10 nm de $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}(49\%),\text{Tm}^{3+}(1\%)$.⁶³

Sin embargo, las propiedades ópticas de coloides de UCNP, además del tamaño, dependen de muchos factores, como los dopantes de la matriz, la potencia de excitación, la fase cristalina de la matriz, la simetría local de la matriz, el disolvente, la concentración de los dopantes, la ausencia/presencia de un recubrimiento orgánico/inorgánico o la presencia de especies fotoactivas en su cercanía.^{40,42,64,65}

1.3.1. Propiedades luminiscentes a medida

Con el fin de mejorar o modificar las propiedades ópticas de las UCNP, se han propuesto diferentes estrategias. A continuación, se mencionan algunas de ellas con algún ejemplo ilustrativo. Para ampliar la información se recomienda acudir a revisiones de referencia^{40,42,43,60,64,66-68}.

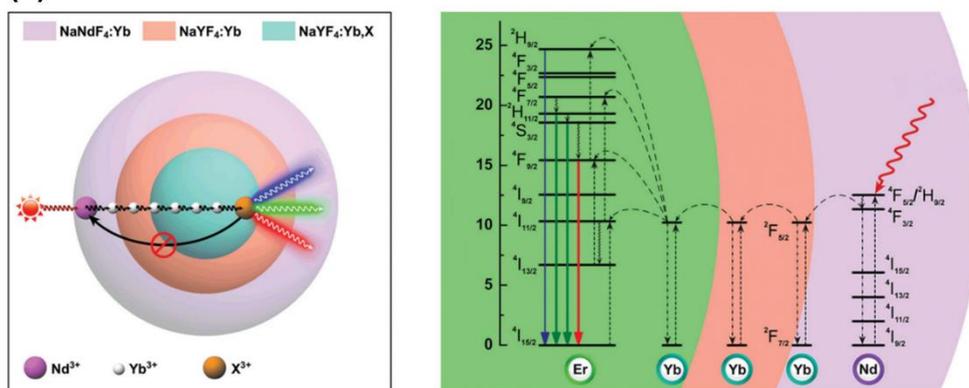
- Adición de recubrimiento inorgánico (*shell*). La adición de un *shell* inactivo puede beneficiar el fenómeno UC, ya que suprime en gran medida los efectos superficiales de desactivación no radiativa. Para diferenciar la UCNP sin un recubrimiento inorgánico adicional se la denomina núcleo (*core*). Por ejemplo, Utte *et al.*⁶⁹ mejoraron el rendimiento cuántico UC de $\beta\text{-NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+}(20\%),\text{Er}(2\%)$ de *ca.* 4 nm de $4 \cdot 10^{-5}$ a 1,7 % (420 W/cm^2) con la adición de un *shell* de NaYF_4 de 10 nm. Además, la adición *shell* aumentó el

Capítulo 1. Introducción

tiempo de vida directo y UC de las emisiones verde (540 nm) y roja (655 nm) del Er^{3+} .

Por otro lado, la adición de *shell* activos permite sensibilizaciones a otras longitudes de onda^{70,71} y la construcción de nanoarquitecturas que permitan nuevas capacidades, tales como emisión multicolor,⁷² diferente emisión en función de la longitud de onda de excitación⁷³ o sensibilizar otras especies.⁷⁴ Por ejemplo, Yao *et al.*⁷⁰ construyeron la nanoarquitectura multicapa, $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}(20\%),\text{X}^{3+}@\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}(10\%)@\text{NaNdF}_4:\text{Yb}^{3+}(10\%)$,

(a)



(b)

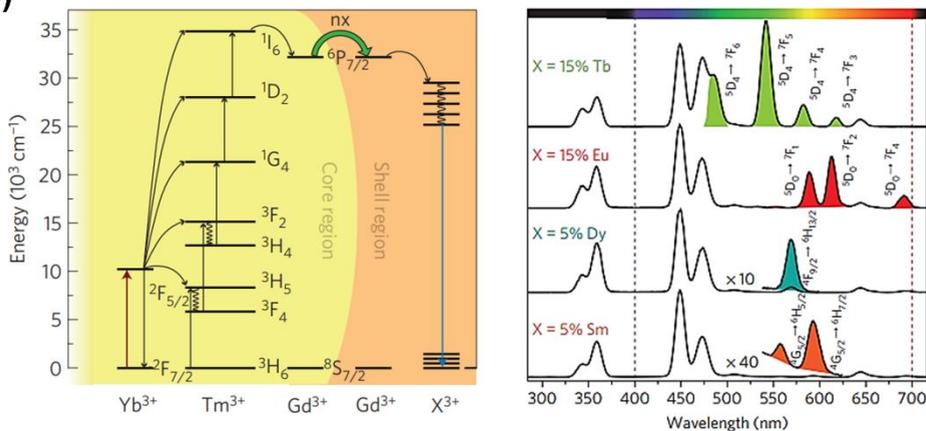


Figura 1.10. (a) Mecanismo de sensibilización a 800 nm de UCNP mediante la estrategia de shell activos. Reproducido de ⁷⁰. (b) Sensibilización de activadores sin estados intermedios de energía mediante la migración de energía ($\text{X}^{3+} = \text{Tb}^{3+}, \text{Eu}^{3+}$,

Dy^{3+} , Sm^{3+}). Reproducido con permiso de Springer Nature: *Nature Materials* ⁷⁴, Copyright 2011.

siendo X^{3+} : Er^{3+} (2%) o Tm^{3+} (0,5%), que permite el fenómeno UC excitando a 800 nm al Nd^{3+} presente en la capa más exterior del sistema (figura 1.10.a). La excitación convencional de las UCNP a 980 nm (excitando al Yb^{3+}) presenta la desventaja de que a esa longitud de onda el H_2O tiene una importante absorción, que afectaría negativamente a las potenciales aplicaciones biológicas de las UCNP.⁷⁵ Por ello, la búsqueda de nuevas longitudes de onda de sensibilización presenta gran interés. De forma similar, Liu *et al.*⁷⁴ construyeron una estructura *core-shell* de $NaGdF_4:Yb^{3+}(49\%),Tm^{3+}(1\%)@NaGdF_4:X^{3+}$, siendo X^{3+} : Tb^{3+} (15%), Eu^{3+} (15%), Dy^{3+} (5%) o Sm^{3+} (5%), que permitió sensibilizar activadores Ln^{3+} mediante la migración de energía, esto es, sin requerir de estados intermedios de tiempo de vida largo (figura 1.10.b).

- Concentración de dopantes. Generalmente la concentración de los dopantes debe ser muy baja para evitar fenómenos de relajación cruzada que desactiven los niveles más energéticos de los iones activadores. Así, con el fin de potenciar la eficiencia del fenómeno UC, el dopaje de Yb^{3+} suele estar en torno al 20-30% y el de los activadores se mantiene a niveles muy bajos. Por ejemplo, en el caso del Er^{3+} se intenta mantener en torno al 1-3 % y con el Tm^{3+} a $< 1\%$.⁷⁶ Esta proporción de dopantes aseguran en gran medida el aislamiento entre dos átomos activadores y una proporción de Yb^{3+} que aumenta la probabilidad de que ocurra ETU y limita la migración de energía entre sensibilizadores ($Yb^{3+}-Yb^{3+}$).⁷⁷ Sin embargo, en función de las necesidades/aplicaciones del sistema, el dopaje puede modificarse. Por ejemplo, mediante el ajuste adecuado en la proporción de una mezcla de activadores pueden conseguirse UCNP con diferentes propiedades emisivas multicolor^{78,79} o emisiones puras.^{80,81}

Recientemente, con el desarrollo de métodos de microscopía de superresolución, que emplea láseres de alta potencia, se ha observado que la proporción de

Capítulo 1. Introducción

dopantes, en especial del activador, debe aumentarse para conseguir emisiones UC eficientes que permitan la obtención de imágenes de una sola nanopartícula.^{82,83}

- Matriz cristalina. La matriz cristalina presenta una gran influencia en el proceso UC. Afecta de dos maneras: (i) en la dinámica de fonones y (ii) en el campo cristalino local.⁴⁰ Con el fin de evitar desactivaciones de la emisión UC por fonones, debe minimizarse al máximo posible la energía fonónica de la matriz. En este sentido las matrices de haluros pesados (Cl⁻, Br⁻, I⁻) presentan energías fonónicas adecuadas ($< 300 \text{ cm}^{-1}$), sin embargo, son muy higroscópicas. Los óxidos son más estables, pero tienen una energía fonónica elevada ($> 500 \text{ cm}^{-1}$), por ello, las matrices más utilizadas son las de F⁻ que presentan alta estabilidad química junto con bajas energías fonónicas (ca. 350 cm^{-1}).⁴⁰ Por otro lado, la matriz junto con la proporción del dopaje determina la distancia ión-ión y la simetría del campo cristalino de aniones alrededor de los dopantes lantánidos. Así, por ejemplo, la fase cristalina hexagonal (β) de NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ presenta una eficiencia de UC un orden superior respecto al mismo material en la fase cúbica (α).⁷⁶ Ello se debe a que matrices o fases cristalinas de baja simetría alrededor de los Ln³⁺ mejoran el acoplamiento de los niveles energéticos 4f con configuraciones electrónicas superiores (5d) y, por tanto, aumentan la probabilidad (absorción) de las transiciones 4f-4f. Si bien, la introducción de la asimetría en el sistema también puede conseguirse con el dopaje con cationes de menor tamaño, como el Li⁺ que mejora la eficiencia UC.^{42,84}

- Modificación de sus propiedades mediante otras especies fotoactivas:
 - *Efecto antena*. El fenómeno UC se encuentra limitado por la baja absorción de los lantánidos. Con el fin de mejorar sus propiedades emisivas se pueden utilizar especies con elevado coeficiente de absorción para que transfieran su energía al ión lantánido sensibilizador. Esta estrategia se conoce como efecto antena y fue descubierto por Weisman ya en 1942.⁸⁵

Prasad *et al.*⁸⁶ construyeron un nanohíbrido upconversion (UCNH) con un colorante orgánico con absorción en el NIR, NaYbF₄:Tm³⁺(0.5%)@NaYF₄:Nd³⁺(30%)@IR-808, que mejoró el rendimiento cuántico de la UCNP original (figura 1.11).

▫ *Sensibilización a otras especies activas.* Las múltiples bandas emisivas pueden utilizarse para excitar a especies capaces de absorber esos fotones, tales como fluoróforos convencionales y nanopartículas fotoactivas, abriendo un abanico enorme de posibilidades y aplicaciones. Por ejemplo, Zhang *et al.*⁸⁷ construyeron un UCNH, compuesto por NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ y dos sondas orgánicas que absorben dos bandas diferentes de Er³⁺ y que permite la detección sincrona *in vivo* de glutatión y H₂O₂.

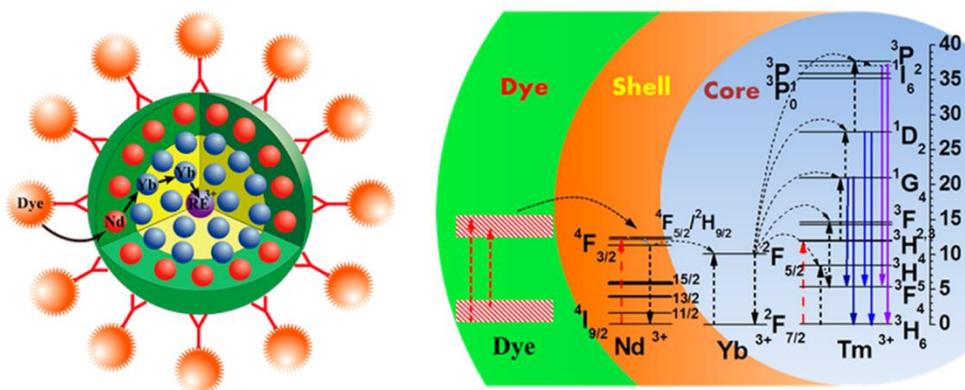


Figura 1.11. Esquema de UCNH y del efecto antena del UCNH NaYbF₄:Tm³⁺(0.5%)@NaYF₄:Nd³⁺(30%)@IR-808. Reproducido con permiso de ⁸⁶. Copyright 2015 American Chemical Society.

▫ *Mejora plasmónica.* La cercanía de la UCNP a NP plasmónicas puede mejorar o desactivar la emisión UC en función de la distancia a la UCNP. El plasmón es la oscilación colectiva de los electrones en estructuras metálicas producidas por la interacción electromagnética. El campo eléctrico y magnético generado por las estructuras metálicas puede

alterar el campo local mejorando la absorción y/o incrementando la velocidad de la excitación y emisión de los iones lantánidos.^{55,66} Así, Kagan *et al.*⁸⁸ mejoraron la luminiscencia UC de $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ al acercarlo a una nanobarra (*nanorod*) de oro cuya resonancia superficial del plasmón longitudinal ocurría a 977 nm, donde absorbe el Yb^{3+} de la UCNP.

1.3.2. Síntesis

La síntesis de la UCNP es un aspecto fundamental que controlar con el fin de obtener nanomateriales con las propiedades deseadas. Debe producir nanopartículas monodispersas en tamaño para, así, descartar que determinados comportamientos sean fruto de la heterogeneidad de tamaños de la muestra.⁶⁴ La repetibilidad y reproducibilidad son problemas comunes en la síntesis de materiales, ya que pequeños cambios en el pesaje de los reactivos o en las condiciones de reacción tienen efectos significativos en el nanomaterial resultante. En el caso de la UCNP, los métodos sintéticos son reproducibles y aunque la repetibilidad es bastante buena entre síntesis, difícilmente dos reacciones distintas consiguen UCNP con exactamente el mismo dopaje y tamaño. Por ello, para fines comparativos se prefiere trabajar con NP sintetizadas en el mismo lote (*batch*) de reacción.

El mecanismo de síntesis debe seguir el modelo de crecimiento propuesto por LaMer, también conocido como nucleación explosiva (*burst nucleation*, figura 1.12).⁶⁴ Es fundamental que la nucleación ocurra rápidamente en un evento único en una disolución sobresaturada para conseguir nanomateriales monodispersos. El procedimiento de formación de coloides nanométricos puede resumirse en 4 pasos: (i) aumento rápido en la concentración de monómeros, que es la subunidad mínima de los cristales volumétricos, (ii) cuando se consigue una disolución sobresaturada de monómeros: la formación simultánea de núcleos o nucleación, (iii) adición de monómeros a los núcleos estables, y (iv) cuando la concentración de monómeros es lo suficientemente baja: crecimiento de las NP por maduración de Ostwald (*Ostwald*

Capítulo 1. Introducción

ripening), en el cual las NP más grandes crecen a expensas de las NP más pequeñas ya que por su tamaño son energéticamente menos favorables.⁶⁴

Se han propuesto diferentes métodos de síntesis para reproducir el fenómeno de nucleación explosiva y, también, para construir un *shell* sobre las UCNP, procesos que han sido detalladamente documentados en diferentes revisiones.^{40,42,43,64,89,90} Los métodos sintéticos quedan fuera del propósito de la presente tesis, sin embargo sí comentaremos brevemente los métodos más ampliamente utilizados.

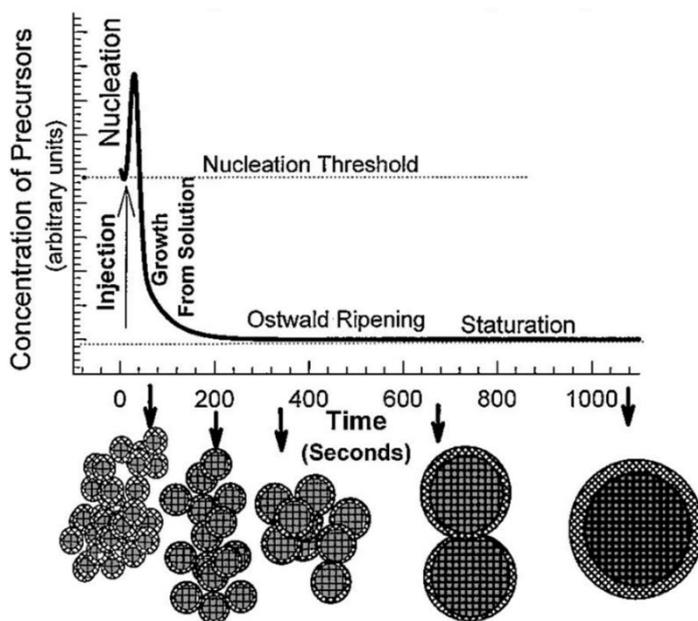


Figura 1.12. Modelo de nucleación y crecimiento homogéneo propuesto por LaMer. Usado con permiso de Annual Reviews, Inc.,⁹¹ permiso transmitido a través de Copyright Clearance Center, Inc.

- Descomposición térmica. El primero en reportar este protocolo para producir UCNP monodispersas fue Zhang *et al.*⁹² en el 2005. Actualmente, es uno de los protocolos más eficaces y más ampliamente utilizados para obtener UCNP de alta cristalinidad. Se basa en la disolución de precursores organometálicos de lantánidos en disolventes orgánicos de elevado punto de ebullición (1-octadeceno) seguido de una descomposición a elevada temperatura (200-350°C).

Capítulo 1. Introducción

Los precursores organometálicos suelen ser sales de lantánidos como trifluoracetatos, oleatos o acetatos. Además, la síntesis se realiza en atmósfera inerte, restringiendo la presencia de agua al máximo posible, y utiliza ligandos de coordinación como el ácido oleico (OA) o la oleilamina (OLA) con el fin de evitar la agregación de las UCNP. En consecuencia, las UCNP obtenidas estarán recubierta de ligandos orgánicos y, por tanto, son hidrofóbicas.⁴⁰

Este método también ha permitido desarrollar otros para construir un *shell* sobre las UCNP. Se distinguen tres métodos: reactor único (*one-pot*, OP),⁹³ capa por capa (*layer-by-layer*, SLBL)⁹⁴ y maduración de Ostwald.⁹⁵ En el procedimiento OP se disuelven los Ln^{3+} y los precursores del *shell* y se calienta toda la mezcla a elevada temperatura para repetir el fenómeno de crecimiento cristalino. Sin embargo, este método produce recubrimientos poco homogéneos, tal y como reportaron van Veggel *et al.*⁹⁶ El procedimiento SLBL y de maduración de Ostwald son muy similares y se diferencian en que la disolución precursora del *shell* está formada por compuestos organometálicos de lantánidos o bien UCNP muy pequeñas (< 10 nm), respectivamente. Ambos métodos implican el calentamiento rápido de las UCNP de partida hasta *ca.* 300 °C para, a continuación, realizar pequeñas adiciones espaciadas temporalmente de alícuotas de la disolución/dispersión precursora correspondiente.⁶⁴

- Coprecipitación. Este método implica la precipitación de los productos de una disolución precursora. Aunque implica condiciones suaves de reacción, generalmente requiere un proceso de recocido (*annealing*) para aumentar la cristalinidad y calidad de las UCNP.^{42,65}

- Combustión. Consiste en producir explosiones controladas para generar el calor necesario en una mezcla de sales de lantánidos para formar UCNP. Las explosiones se inician mediante una fuente de calor. Así, se inician reacciones exotérmicas con temperaturas entre los 500-3000 °C que se propagan por el material y que permiten conseguir UCNP de óxidos y oxisulfuros rápidamente.^{42,65}

Capítulo 1. Introducción

▪ Síntesis hidro(solvo)termal. Esta estrategia consiste en el crecimiento de NP en una disolución acuosa en un recipiente cerrado (autoclave) a alta temperatura y presión. Aprovecha, por tanto, la alta solubilidad y reactividad de los reactivos (sales de lantánidos y HF o NH_4F) a condiciones de temperatura y presión elevada. Además, permite modificar múltiples parámetros para sintetizar (proporción $\text{Ln}^{3+}/\text{F}^-$, pH, precursores, tiempo, ligandos o $[\text{OH}^-]$).⁶⁴ Aunque utiliza temperaturas inferiores a las utilizadas por descomposición térmica, esta técnica no permite observar el crecimiento de la UCNP. Mediante este procedimiento Li *et al.*⁹⁷ desarrollaron una estrategia simple para construir diferentes nanomateriales, denominada líquido-sólido-disolución (LSS). Además, permite la construcción posterior de *shell* mediante un procedimiento de maduración de Ostwald.⁹⁸

Existen otros métodos sintéticos menos utilizados como síntesis sol-gel,⁹⁹ síntesis de llama,¹⁰⁰ síntesis en líquidos iónicos¹⁰¹ o síntesis asistida por microondas,¹⁰²⁻¹⁰⁴ así como nuevas técnicas que permiten desarrollar UCNP heteroestructuradas.^{105,106}

1.3.3. Modificación de la superficie

La dispersabilidad y funcionalidad de las UCNP sintetizadas con cualquiera de las metodologías anteriores puede modificarse mediante una química de superficie apropiada. La descomposición térmica, la estrategia más usada para la síntesis de UCNP, produce UCNP hidrofóbicas recubiertas de ligandos oleato superficiales. Sin embargo, para una potencial aplicación biológica de estos materiales es necesario transformar esa afinidad para hacerlas dispersables en medios acuosos. La química de superficie permite muchas más funcionalidades, tales como la coordinación de otras especies de interés, construir recubrimientos orgánicos o inorgánicos y pasivar la superficie de la UCNP para reducir desactivaciones no radiativas con las moléculas del disolvente, entre otras (figura 1.13). Existen diferentes estrategias para modificar la superficie de las UCNP.^{40,42,107-109}

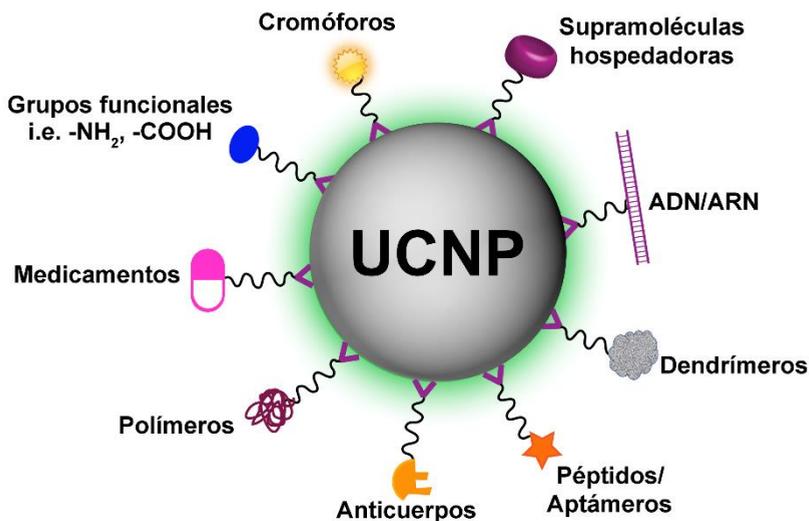


Figura 1.13. Posibilidades de modificación superficial de UCNP con ligandos orgánicos.

- Intercambio de ligandos. Esta estrategia de sustitución de los ligandos superficiales se basa en la exposición de la UCNP con su ligando original (en el caso del oleato RCOO^-) en un medio con un exceso del ligando de sustitución, que además debe presentar una afinidad superior por la superficie de la UCNP (como los grupos fosfato, RPO_4^- , sulfonato, RSO_3^- , o quelatos).¹⁰⁷
- Eliminación de ligandos oleato superficiales. Los ligandos oleato superficiales de la síntesis pueden eliminarse mediante dos estrategias ampliamente utilizadas: el tratamiento ácido¹¹⁰ y el tratamiento con NOBF_4 .¹¹¹ La primera estrategia se basa en la protonación de los ligandos oleato y su descoordinación de la superficie de la UCNP, seguida de un procedimiento de extracción para eliminar el ácido oleico del medio. En la segunda se produce un desplazamiento rápido del ligando oleato por aniones BF_4^- , que estabilizan a la UCNP en un medio polar. Verdaderamente este segundo método se trata de un desplazamiento de ligandos pero, dada la débil interacción de los aniones BF_4^- con la superficie de las UCNP, suele considerarse de eliminación de ligandos.

Capítulo 1. Introducción

Este último procedimiento suele utilizarse cuando se desea sustituir un ligando por otro que presenta el mismo grupo anclante.⁴²

- Interacciones hidrofóbicas. Consiste en convertir una UCNP hidrofóbica en hidrofílica mediante el tratamiento con tensioactivos o polímeros anfipáticos, que establecen interacciones hidrofóbicas con el ligando superficial, dejando hacia el exterior un extremo polar hidrofílico.¹⁰⁹

- Atracciones electrostáticas. Las atracciones electrostáticas también permiten anclar especies cargadas opuestamente al ligando superficial de la UCNP.⁴³

- Interacciones hospedador-huésped (*host-guest*). Las interacciones entre macrociclos con cavidades hidrofóbicas y especies hidrofóbicas o anfipáticas que permiten modificar la dispersabilidad y anclar especies de interés.¹¹²⁻¹¹⁴

- Reacciones químicas. También se pueden realizar reacciones químicas con los ligandos superficiales de las UCNP. Por ejemplo, las UCNP recubiertas de oleato pueden reaccionar con el reactivo Lemieux-von Rudloff para oxidar la insaturación de la cadena a grupos carboxilato, que permiten la dispersabilidad de la UCNP en medios acuosos.¹¹⁵ Tan *et al.*¹¹⁶ anclaron polímeros, proteínas y aptámeros (ácidos nucleicos de cadena sencilla) a la superficie de la UCNP mediante química click tiol-eno. Además, también se ha reportado la formación de amidas, puentes disulfuro o iminas.⁴²

- Recubrimiento con sílice. El recubrimiento con sílice produce UCNP estables, transparentes, hidrofílicas y biocompatibles.¹¹⁴ Existen dos metodologías ampliamente utilizadas: el método Stöber para recubrir UCNP hidrofílicas¹¹⁷ y el método de microemulsión inversa para UCNP hidrofóbicas.¹¹⁸

Existen, por tanto, diferentes metodologías para modificar la superficie de la UCNP. Sin embargo, aún existen grandes desafíos en este aspecto. Por un lado, como ya hemos tratado anteriormente, el agua, concretamente las vibraciones OH, desactiva eficazmente el fenómeno UC en cationes lantánidos y, por ello, limita en gran medida las posibilidades biomédicas.^{62,119,120} Por otro lado, a pesar de presentar baja toxicidad,^{121,122} se ha observado que las UCNP pueden disolverse en medios acuosos diluidos,¹²³ liberando iones potencialmente peligrosos en el interior celular.

Capítulo 1. Introducción

Además, como ocurre en muchos nanomateriales, al introducirlos en un medio biológico se crea una corona proteica en la superficie del UCNH que afecta a la función con la que han sido diseñados.^{122,124} Por ello, debe mejorarse el pasivado superficial de las UCNP/UCNH para que permita su dispersabilidad en medios biológicos e impida su disolución¹²⁵ y desactivación de la emisión por las moléculas de H₂O, a la vez que asegure que la corona proteica no afecta a su funcionalidad en aplicaciones biológicas. En este sentido, se han propuesto recubrimientos prometedores basados en ligandos con grupos sulfonato¹²⁶ y bicapas lipídicas¹²⁷.

1.3.4. Caracterización

La caracterización de nanomateriales requiere utilizar una gran variedad de técnicas para obtener una información completa de sus características, así como del recubrimiento superficial.¹²⁸ En función de la información que se desee obtener se utilizan diferentes técnicas:

- **Tamaño y morfología:** se utilizan técnicas de microscopía electrónica, bien de transmisión o de barrido, pues permite obtener imágenes de las UCNP y determinar su tamaño. Asimismo, también puede ser útil la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). Para UCNP de tipo *core-shell* con distinto dopaje en el *core* y en el *shell* la técnica de microscopía electrónica de campo oscuro anular de gran ángulo permite su resolución y diferenciación.⁹⁶
- **Fase cristalina:** difracción de polvo de rayos X. La difracción de polvo de rayos X permite determinar la fase cristalina por comparación con patrones de difracción de los materiales volumétricos.
- **Composición:** puede analizarse una alícuota mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente o bien mediante el análisis de dispersión de rayos de X en muestras de microscopía electrónica.
- **Propiedades fotofísicas:** se realiza mediante técnicas convencionales como espectroscopía de absorción UV-vis y espectroscopía de emisión en estado estacionario y resuelta en el tiempo. Si bien, la absorción puede registrarse con

Capítulo 1. Introducción

equipos convencionales, las técnicas de caracterización de la emisión y el rendimiento cuántico UC requieren de instrumentación específica (láseres NIR, continuos y pulsados, acoplados a espectrómetros), lo que ha dificultado en gran medida la caracterización fotofísica de estos materiales.

- Ligandos/especies superficiales: las especies superficiales pueden caracterizarse con diferentes técnicas como potencial zeta, resonancia magnética nuclear y espectroscopía infrarrojo de transformada de Fourier. Con fines cuantitativos el análisis termogravimétrico puede ser útil y si el compuesto es fotoactivo puede estudiarse por técnicas de espectroscopía óptica. Asimismo, mecanismos de transferencia de energía entre UCNP y especies orgánicas pueden estudiarse por espectroscopía de absorción de especies transitorias.

1.3.5. Aplicaciones

Mediante un diseño adecuado se pueden conseguir UCNP con propiedades adecuadas para diversas aplicaciones, que van desde el desarrollo de celdas solares,¹²⁹ tintas antifalsificación^{130,131} a aplicaciones biológicas.^{42,65,89} A continuación se nombran algunas de las aplicaciones biológicas más relevantes, que son de interés para la presente tesis:

- Sensores. Las UCNP pueden actuar como sensores ópticos de gases, iones metálicos, moléculas, ADN, temperatura y pH.^{42,43} La detección de la temperatura es una propiedad intrínseca de ciertos Ln^{3+} , ya que su origen se debe a la dependencia significativa de la intensidad de emisión con la temperatura desde un nivel excitado compuesto por al menos dos subniveles cercanos en energía y en equilibrio térmico.¹³² En cambio, el resto de propiedades de detección se realiza mediante la interacción (radiativa o no radiativa) de la UCNP y una especie sensible al analito de interés.¹³³
- Bioimagen. Las UCNP presentan ventajas importantes frente a fluoróforos convencionales, ya que permiten el registro de imágenes de microscopía óptica con alto contraste, con elevada relación señal-ruido y libre de interferencia por

Capítulo 1. Introducción

autofluorescencia.⁸⁹ Además, al ser excitadas en el NIR, las UCNP permiten obtener imágenes a mayor profundidad. Por ello se han propuesto múltiples nanomateriales basados en UCNP para esta aplicación, que han sido extensamente revisados.^{42,43,89,134}

Más allá de la microscopía óptica, las UCNP se han constituido como una plataforma versátil que puede ser utilizada en otras técnicas de imagen, como resonancia magnética nuclear (MRI), tomografía computarizada (CT), ultrasonido, tomografía de emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada de emisión de fotones únicos (SPECT), o como plataforma de imagen multimodal que combina varias de estas técnicas ofreciendo ventajas sinérgicas.^{89,135} Por ejemplo, He *et al.*¹³⁶ reportaron un nanomaterial de UCNP y nanoclústeres de oro para terapia multifuncional contra el cáncer que permite realizar imagen simultánea con técnicas fototérmicas, fotoacústicas, óptica de emisión, de resonancia magnética y tomografía computarizada.

- Aplicaciones terapéuticas. Las UCNP presentan propiedades únicas que permiten el desarrollo de numerosas aplicaciones basadas en estos materiales, en lo que se conocen como nanohíbridos de UC (UCNH). Algunas de las aplicaciones son:

- Terapia fotodinámica. Terapia para tratar el cáncer que utiliza fotosensibilizadores que tras su excitación por la luz generan especies reactivas de oxígeno (ROS) para causar daño oxidativo a las células cancerosas.⁸⁹ Para ello se utilizan UCNH que combinan UCNP con fotosensibilizadores comunes, tales como el rosa de bengala, la merocianina 540 o la ftalocianina de Zn^{2+} .¹³⁷

- Terapia fototérmica. Técnica para tratar el cáncer que consiste en fotoinducir calor para causar la ablación térmica de las células cancerosas. Así se han utilizado las UCNP combinadas con agentes fototérmicos, tales como complejos de Pd^{2+} , AuNP o AgNP.¹³⁷

- Quimioterapia. Técnica terapéutica que utiliza especies químicas para tratar células cancerosas. Las UCNP pueden servir como plataformas de liberación controlada de fármacos mediante la funcionalización adecuada de su superficie para permitir la liberación a través una respuesta endógena (pH, [enzima], presencia de determinadas especies, ...) o exógena (T, luz, campo magnético, ...).⁸⁹
- Radioterapia. Tratamiento clínico no invasivo que utiliza radiación de alta energía (rayos X, gamma o beta) para dañar las células cancerosas y disminuir el crecimiento tumoral y la metástasis. Las UCNP pueden mejorar tratamientos basados en radioterapia, ya que los elementos con número atómico elevado, como los lantánidos, pueden incrementar la dosis radiativa sobre el tejido canceroso.¹³⁶ Por ejemplo, Shi *et al.*¹³⁸ desarrollaron un UCNH para este fin que, además, permitía terapia fotodinámica y quimioterapia simultáneamente.
- Reacción química. Se han reportado pocas reacciones fotoquímicas mediadas por UCNP; entre ellas, encontramos las reacciones de fotoisomerización de azobenceno,^{139,140} espiropirano¹⁴¹ o diariletanos (figura 1.14),¹⁴² fotopolimerización,¹⁴³ fotólisis¹⁴⁴ y fotocatalisis.¹⁴⁵⁻¹⁴⁹

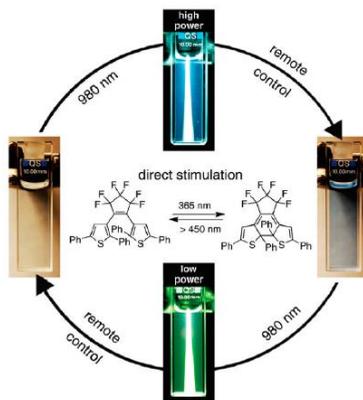


Figura 1.14. Fotoisomerización reversible de arilenos con UCNP, $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+} @ \text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+} @ \text{NaYF}_4$, a través de la regulación de la potencia de excitación del láser de 980 nm. Reproducido con permiso de ¹⁴². Copyright 2010 American Chemical Society.

1.4. Referencias

- (1) Brus, L. Zero-Dimensional “Excitons” in Semiconductor Clusters. *IEEE J. Quantum Electron.* **1986**, 22 (9), 1909–1914. <https://doi.org/10.1109/jqe.1986.1073184>.
- (2) Kreuter, J. Nanoparticle-Based Dmg Delivery Systems. *J. Control. Release* **1991**, 16 (1–2), 169–176. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(91\)90040-k](https://doi.org/10.1016/0168-3659(91)90040-k).
- (3) Bawendi, M. G.; Steigerwald, M. L.; Brus, L. E. The Quantum Mechanics of Larger Semiconductor Clusters (“Quantum Dots”). *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1990**, 41, 477–496. <https://doi.org/10.1146/annurev.pc.41.100190.002401>.
- (4) Yin, M.; Zhang, W.; Xia, S.; Krupa, J. C. Luminescence of Nanometric Scale $\text{Y}_2\text{SiO}_5:\text{Eu}^{3+}$. *J. Lumin.* **1996**, 68 (6), 335–339. [https://doi.org/10.1016/0022-2313\(96\)00032-4](https://doi.org/10.1016/0022-2313(96)00032-4).
- (5) Soo, Y. L.; Huang, S. W.; Ming, Z. H.; Kao, Y. H.; Smith, G. C.; Goldburt, E.; Hodel, R.; Kulkarni, B.; Veliadis, J. V.D.; Bhargava, R. N. X-Ray Excited Luminescence and Local Structures in Tb-Doped Y_2O_3 Nanocrystals. *J. Appl. Phys.* **1998**, 83 (10), 5404–5409. <https://doi.org/10.1063/1.367996>.
- (6) Riwozki, K.; Meyssamy, H.; Kornowski, A.; Haase, M. Liquid-Phase Synthesis of Doped Nanoparticles: Colloids of Luminescing $\text{LaPO}_4:\text{Eu}$ and $\text{CePO}_4:\text{Tb}$ Particles with a Narrow Particle Size Distribution. *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104 (13), 2824–2828. <https://doi.org/10.1021/jp993581r>.
- (7) Matsuura, D. Red, Green, and Blue Upconversion Luminescence of Trivalent-Rare-Earth Ion-Doped Y_2O_3 Nanocrystals. *Appl. Phys. Lett.* **2002**, 81 (24), 4526–4528. <https://doi.org/10.1063/1.1527976>.
- (8) Bhargava, R. N.; Gallagher, D.; Hong, X.; Nurmikko, A. Optical Properties of Manganese-Doped Nanocrystals of ZnS . *Phys. Rev. Lett.* **1994**, 72 (3), 416–419. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.72.416>.
- (9) Zhang, H. X.; Kam, C. H.; Zhou, Y.; Han, X. Q.; Buddhudu, S.; Lam, Y. L. Visible Up-Conversion Luminescence in $\text{Er}^{3+}:\text{BaTiO}_3$ Nanocrystals. *Opt. Mater.* **2000**, 15 (1), 47–50. [https://doi.org/10.1016/s0925-3467\(99\)00124-x](https://doi.org/10.1016/s0925-3467(99)00124-x).
- (10) Heer, S.; Lehmann, O.; Haase, M.; Güdel, H.-U.; Güdel, H.-U.; Heer, S.; Lehmann, O.; Haase, M. Blue, Green, and Red Upconversion Emission from Lanthanide-Doped LuPO_4 and YbPO_4 Nanocrystals in a Transparent Colloidal Solution. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, 42 (27), 3179–3182. <https://doi.org/10.1002/anie.200351091>.
- (11) Bloembergen, N. Solid State Infrared Quantum Counters. *Phys. Rev. Lett.* **1959**, 2 (3), 84. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.2.84>.
- (12) Porter, J. F. Fluorescence Excitation by the Absorption of Two Consecutive Photons. *Phys. Rev. Lett.* **1961**, 7 (11), 414–415. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.7.414>.
- (13) Auzel; F. Compteur Quantique Par Transfert d’énergie Entre Deux Ions de Terres Rares Dans Un Tungstate Mixte et Dans Un Verre. *C. R. Acad. Sci. Paris* **1966**, 262, 1016–1019.
- (14) Ovsyankin, V. V.; Feofilov, P. P. Cooperative Sensitization of Luminescence in Crystals Activated with Rare Earth Ions. *Sov. Phys. JETP Lett.* **1966**, 4, 317.
- (15) Auzel, F. Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids. *Chem. Rev.* **2004**, 104 (1), 139–173. <https://doi.org/10.1021/cr020357g>.
- (16) Bharmoria, P.; Bildirir, H.; Moth-Poulsen, K. Triplet-Triplet Annihilation Based

- near Infrared to Visible Molecular Photon Upconversion. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (18), 6529–6554. <https://doi.org/10.1039/d0cs00257g>.
- (17) Eliseeva, S. V.; Bünzli, J. C. G. Rare Earths: Jewels for Functional Materials of the Future. *New J. Chem.* **2011**, *35* (6), 1165–1176. <https://doi.org/10.1039/c0nj00969e>.
- (18) Cotton, S. *Lanthanide and Actinide Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 2006. <https://doi.org/10.1002/0470010088>.
- (19) CORDIS European Commission. EURARE - Development of a sustainable exploitation scheme for Europe's Rare Earth ore deposits <https://cordis.europa.eu/project/id/309373/reporting/es> (accessed Jan 18, 2022).
- (20) Bünzli, J. C. G. Lanthanide Photonics: Shaping the Nanoworld. *Trends Chem.* **2019**, *1* (8), 751–762. <https://doi.org/10.1016/j.trechm.2019.05.012>.
- (21) Bünzli, J.-C. G.; Eliseeva, S. V. Basics of Lanthanide Photophysics. In *Lanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and Biological Aspects*; Hänninen, P., Härmä, H., Eds.; Springer Berlin Heidelberg, 2011; pp 1–46.
- (22) Cotton, S. Introduction to Lanthanides. In *Lanthanide and Actinide Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 2006; pp 1–8.
- (23) Freeman, A. J.; Watson, R. E. Theoretical Investigation of Some Magnetic and Spectroscopic Properties of Rare-Earth Ions. *Phys. Rev.* **1962**, *127* (6), 2058–2075. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.127.2058>.
- (24) Eliseeva, S. V.; Bünzli, J.-C. G. Lanthanide Luminescence for Functional Materials and Bio-Sciences. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *39* (1), 189–227. <https://doi.org/10.1039/b905604c>.
- (25) Withnall, R.; Silver, J. Physics of Light Emission from Rare-Earth Doped Phosphors. In *Handbook of Visual Display Technology*; Chen, J., Cranton, W., Fihn, M., Eds.; Springer, Berlin, Heidelberg, 2012; pp 1019–1028. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79567-4_68.
- (26) Cotton, S. Electronic and Magnetic Properties of the Lanthanides. In *Lanthanide and Actinide Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 2006; pp 61–88. <https://doi.org/10.1002/0470010088>.
- (27) Bünzli, J.-C. G. Luminescent Probes. In *Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences*; Bünzli, J.-C. G., Choppin, G. R., Eds.; Elsevier, 1989; pp 219–293.
- (28) Reisfeld, R. Optical Properties of Lanthanides in Condensed Phase, Theory and Applications. *AIMS Mater. Sci.* **2015**, *2* (2), 37–60. <https://doi.org/10.3934/matersci.2015.2.37>.
- (29) Tanner, P. A. Lanthanide Luminescence in Solids. In *Lanthanide Luminescence: Photophysical, Analytical and Biological Aspects*; Hänninen, P., Härmä, H., Eds.; Springer Berlin Heidelberg, 2011; pp 185–233.
- (30) Bünzli, J. C. G. On the Design of Highly Luminescent Lanthanide Complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *293–294*, 19–47. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.10.013>.
- (31) Brunet, E.; Juanes, O.; Sedano, R.; Rodríguez-Ubis, J. C. Lanthanide Complexes of Polycarboxylate-Bearing Dipyrzolylypyridine Ligands with near-Unity Luminescence Quantum Yields: The Effect of Pyridine Substitution. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1* (8), 613–618. <https://doi.org/10.1039/b204544c>.
- (32) Lakowicz, J. R. Quenching of Fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer Science+Business Media: New York, 2006; pp 278–330.
- (33) Lakowicz, J. R. Energy Transfer. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer Science+Business Media: New York, 2006; pp 443–476.

- (34) Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **1948**, 437 (1–2), 55–75. <https://doi.org/10.1002/andp.19484370105>.
- (35) Dexter, D. L. A Theory of Sensitized Luminescence in Solids. *J. Chem. Phys.* **2004**, 21 (5), 836. <https://doi.org/10.1063/1.1699044>.
- (36) Wang, X.; Valiev, R. R.; Ohulchanskyy, T. Y.; Ågren, H.; Yang, C.; Chen, G. Dye-Sensitized Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, 46 (14), 4150–4167. <https://doi.org/10.1039/c7cs00053g>.
- (37) Pawlik, G.; Niczyj, J.; Nocolak, A.; Radosz, W.; Podhorodecki, A. Multiband Monte Carlo Modeling of Upconversion Emission in Sub 10 Nm β -NaGdF₄:Yb³⁺, Er³⁺ Nanocrystals—Effect of Yb³⁺ Content. *J. Chem. Phys.* **2017**, 146 (24), 244111. <https://doi.org/10.1063/1.4989473>.
- (38) Dong, H.; Sun, L.-D.; Yan, C.-H. Energy Transfer in Lanthanide Upconversion Studies for Extended Optical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44 (6), 1608–1634. <https://doi.org/10.1039/c4cs00188e>.
- (39) Auzel, F.; Goldner, P. Towards Rare-Earth Clustering Control in Doped Glasses. *Opt. Mater. (Amst.)* **2001**, 16 (1–2), 93–103. [https://doi.org/10.1016/S0925-3467\(00\)00064-1](https://doi.org/10.1016/S0925-3467(00)00064-1).
- (40) Wang, F.; Liu, X. Recent Advances in the Chemistry of Lanthanide-Doped Upconversion Nanocrystals. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (4), 976–989. <https://doi.org/10.1039/b809132n>.
- (41) Dong, H.; Sun, L. D.; Yan, C. H. Energy Transfer in Lanthanide Upconversion Studies for Extended Optical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44 (6), 1608–1634. <https://doi.org/10.1039/c4cs00188e>.
- (42) Chen, G.; Qiu, H.; Prasad, P. N.; Chen, X. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (10), 5161–5214.
- (43) Zhou, J.; Liu, Q.; Feng, W.; Sun, Y.; Li, F. Upconversion Luminescent Materials: Advances and Applications. *Chem. Rev.* **2015**, 115 (1), 395–465. <https://doi.org/10.1021/cr400478f>.
- (44) Nakazawa, E.; Shionoya, S. Cooperative Luminescence in YbPO₄. *Phys. Rev. Lett.* **1970**, 25 (25), 1710–1712. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.25.1710>.
- (45) Anderson, R. B.; Smith, S. J.; May, P. S.; Berry, M. T. Revisiting the NIR-to-Visible Upconversion Mechanism in β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, 5 (1), 36–42. <https://doi.org/10.1021/jz402366r>.
- (46) Wang, F.; Wang, J.; Liu, X.; Wang, F.; Wang, J.; Liu, X. Direct Evidence of a Surface Quenching Effect on Size-Dependent Luminescence of Upconversion Nanoparticles. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, 49 (41), 7456–7460. <https://doi.org/10.1002/anie.201003959>.
- (47) Himmelstoß, S. F.; Hirsch, T. A Critical Comparison of Lanthanide Based Upconversion Nanoparticles to Fluorescent Proteins, Semiconductor Quantum Dots, and Carbon Dots for Use in Optical Sensing and Imaging. *Methods Appl. Fluoresc.* **2019**, 7 (2), 022002. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab0bfa>.
- (48) Zhang, Q. Y.; Huang, X. Y. Recent Progress in Quantum Cutting Phosphors. *Prog. Mater. Sci.* **2010**, 55 (5), 353–427. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2009.10.001>.
- (49) Boyer, J.-C.; van Veggel, F. C. J. M. Absolute Quantum Yield Measurements of Colloidal NaYF₄: Er³⁺, Yb³⁺ Upconverting Nanoparticles. *Nanoscale* **2010**, 2 (8), 1417–1419. <https://doi.org/10.1039/c0nr00253d>.

- (50) Kaiser, M.; Würth, C.; Kraft, M.; Hyppänen, I.; Soukka, T.; Resch-Genger, U. Power-Dependent Upconversion Quantum Yield of NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ Nano- and Micrometer-Sized Particles-Measurements and Simulations. *Nanoscale* **2017**, *9* (28), 10051–10058. <https://doi.org/10.1039/c7nr02449e>.
- (51) Pollnau, M.; Gamelin, D. R.; Lüthi, S. R.; Güdel, H. U.; Hehlen, M. P. Power Dependence of Upconversion Luminescence in Lanthanide and Transition-Metal-Ion Systems. *Phys. Rev. B* **2000**, *61* (5), 3337–3346.
- (52) Jones, C. M. S.; Gakamsky, A.; Marques-Hueso, J. The Upconversion Quantum Yield (UCQY): A Review to Standardize the Measurement Methodology, Improve Comparability, and Define Efficiency Standards. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2021**, *22* (1), 810–848. <https://doi.org/10.1080/14686996.2021.1967698>.
- (53) Jones, C. M. S.; Biner, D.; Misopoulos, S.; Krämer, K. W.; Marques-Hueso, J. Optimized Photoluminescence Quantum Yield in Upconversion Composites Considering the Scattering, Inner-Filter Effects, Thickness, Self-Absorption, and Temperature. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 13910. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93400-8>.
- (54) Zheng, W.; Huang, P.; Tu, D.; Ma, E.; Zhu, H.; Chen, X. Lanthanide-Doped Upconversion Nano-Bioprobes: Electronic Structures, Optical Properties, and Biodetection. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (6), 1379–1415. <https://doi.org/10.1039/c4cs00178h>.
- (55) Resch-Genger, U.; Gorris, H. H. Perspectives and Challenges of Photon-Upconversion Nanoparticles - Part I: Routes to Brighter Particles and Quantitative Spectroscopic Studies. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (25), 5855–5874. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0499-z>.
- (56) Stanton, I. N.; Ayres, J. A.; Stecher, J. T.; Fischer, M. C.; Scharpf, D.; Scheuch, J. D.; Therien, M. J. Power-Dependent Radiant Flux and Absolute Quantum Yields of Upconversion Nanocrystals under Continuous and Pulsed Excitation. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122* (1), 252–259. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b11929>.
- (57) Huang, P.; Zheng, W.; Zhou, S.; Tu, D.; Chen, Z.; Zhu, H.; Li, R.; Ma, E.; Huang, M.; Chen, X. Lanthanide-Doped LiLuF₄ Upconversion Nanoprobes for the Detection of Disease Biomarkers. *Angew. Chemie* **2014**, *126* (5), 1276–1281. <https://doi.org/10.1002/ange.201309503>.
- (58) Kraft, M.; Würth, C.; Palo, E.; Soukka, T.; Resch-Genger, U. Colour-Optimized Quantum Yields of Yb, Tm Co-Doped Upconversion Nanocrystals. *Methods Appl. Fluoresc.* **2019**, *7* (2), 024001. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab023b>.
- (59) Würth, C.; Fischer, S.; Grauel, B.; Alivisatos, A. P.; Resch-Genger, U. Quantum Yields, Surface Quenching, and Passivation Efficiency for Ultrasmall Core/Shell Upconverting Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (14), 4922–4928. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b01458>.
- (60) Wen, S.; Zhou, J.; Zheng, K.; Bednarkiewicz, A.; Liu, X.; Jin, D. Advances in Highly Doped Upconversion Nanoparticles. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04813-5>.
- (61) Gargas, D. J.; Chan, E. M.; Ostrowski, A. D.; Aloni, S.; Altoe, M. V. P.; Barnard, E. S.; Sanii, B.; Urban, J. J.; Milliron, D. J.; Cohen, B. E.; et al. Engineering Bright Sub-10-Nm Upconverting Nanocrystals for Single-Molecule Imaging. *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *9* (4), 300–305. <https://doi.org/10.1038/nnano.2014.29>.
- (62) Arppe, R.; Hyppänen, I.; Perälä, N.; Peltomaa, R.; Kaiser, M.; Würth, C.; Christ, S.;

- Resch-Genger, U.; Schäferling, M.; Soukka, T. Quenching of the Upconversion Luminescence of NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ and NaYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺ Nanophosphors by Water: The Role of the Sensitizer Yb³⁺ in Non-Radiative Relaxation. *Nanoscale* **2015**, *7* (27), 11746–11757. <https://doi.org/10.1039/c5nr02100f>.
- (63) Zhou, J.; Wen, S.; Liao, J.; Clarke, C.; Tawfik, S. A.; Ren, W.; Mi, C.; Wang, F.; Jin, D. Activation of the Surface Dark-Layer to Enhance Upconversion in a Thermal Field. *Nat. Photonics* **2018**, *12*, 154–158. <https://doi.org/10.1038/s41566-018-0108-5>.
- (64) Li, X.; Zhang, F.; Zhao, D. Lab on Upconversion Nanoparticles: Optical Properties and Applications Engineering via Designed Nanostructure. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (6), 1346–1378. <https://doi.org/10.1039/c4cs00163j>.
- (65) Zhou, J.; Liu, Q.; Feng, W.; Sun, Y.; Li, F. Upconversion Luminescent Materials: Advances and Applications. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (1), 395–465. <https://doi.org/10.1021/cr400478f>.
- (66) Zhang, Y.; Yang, N.; Zhao, G.; John Capobianco, S. A.; Tessitore, G.; Mandl, G. A.; Brik, M. G.; Park, W.; Capobianco, J. A. Recent Insights into Upconverting Nanoparticles: Spectroscopy, Modeling, and Routes to Improved Luminescence. *Nanoscale* **2019**, *11* (25), 12015–12029. <https://doi.org/10.1039/c9nr02291k>.
- (67) Wilhelm, S. Perspectives for Upconverting Nanoparticles. *ACS Nano* **2017**, *11* (11), 10644–10653. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07120>.
- (68) Zhang, Z.; Han, Q.; Lau, J. W.; Xing, B. Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles Meet the Needs for Cutting-Edge Bioapplications: Recent Progress and Perspectives. *ACS Mater. Lett.* **2020**, *2* (11), 1516–1531. <https://doi.org/10.1021/acsmaterialslett.0c00377>.
- (69) Würth, C.; Fischer, S.; Grauel, B.; Alivisatos, A. P.; Resch-Genger, U. Quantum Yields, Surface Quenching, and Passivation Efficiency for Ultrasmall Core/Shell Upconverting Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (14), 4922–4928. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b01458>.
- (70) Zhan, Q.; Wang, B.; Wen, X.; He, S. Controlling the Excitation of Upconverting Luminescence for Biomedical Theranostics: Neodymium Sensitizing. *Opt. Mater. Express* **2016**, *6* (4), 1011–1023. <https://doi.org/10.1364/ome.6.001011>.
- (71) Zhong, Y.; Tian, G.; Gu, Z.; Yang, Y.; Gu, L.; Zhao, Y.; Ma, Y.; Yao, J. Elimination of Photon Quenching by a Transition Layer to Fabricate a Quenching-Shield Sandwich Structure for 800 Nm Excited Upconversion Luminescence of Nd³⁺-Sensitized Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2014**, *26* (18), 2831–2837. <https://doi.org/10.1002/adma.201304903>.
- (72) Shao, Q.; Zhang, G.; Ouyang, L.; Hu, Y.; Dong, Y.; Jiang, J. Emission Color Tuning of Core/Shell Upconversion Nanoparticles through Modulation of Laser Power or Temperature. *Nanoscale* **2017**, *9* (33), 12132–12141. <https://doi.org/10.1039/C7NR03682E>.
- (73) Li, X.; Guo, Z.; Zhao, T.; Lu, Y.; Zhou, L.; Zhao, D.; Zhang, F. Filtration Shell Mediated Power Density Independent Orthogonal Excitations-Emissions Upconversion Luminescence. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (7), 2464–2469. <https://doi.org/10.1002/anie.201510609>.
- (74) Wang, F.; Deng, R.; Wang, J.; Wang, Q.; Han, Y.; Zhu, H.; Chen, X.; Liu, X. Tuning Upconversion through Energy Migration in Core–Shell Nanoparticles. *Nat. Mater.* **2011**, *10* (12), 968–973. <https://doi.org/10.1038/nmat3149>.

- (75) Wang, Y. F.; Liu, G. Y.; Sun, L. D.; Xiao, J. W.; Zhou, J. C.; Yan, C. H. Nd³⁺-Sensitized Upconversion Nanophosphors: Efficient in Vivo Bioimaging Probes with Minimized Heating Effect. *ACS Nano* **2013**, *7* (8), 7200–7206. <https://doi.org/10.1021/nn402601d>.
- (76) Krämer, K. W.; Biner, D.; Frei, G.; Güdel, H. U.; Hehlen, M. P.; Lüthi, S. R. Hexagonal Sodium Yttrium Fluoride Based Green and Blue Emitting Upconversion Phosphors. *Chem. Mater.* **2004**, *16* (7), 1244–1251. <https://doi.org/10.1021/cm031124o>.
- (77) Noculak, A.; Podhorodecki, A.; Pawlik, G.; Banski, M.; Misiewicz, J. Ion–Ion Interactions in β -NaGdF₄:Yb³⁺,Er³⁺ Nanocrystals – the Effect of Ion Concentration and Their Clustering. *Nanoscale* **2015**, *7* (32), 13784–13792. <https://doi.org/10.1039/c5nr03385c>.
- (78) Stephan Heer, B.; Kömpe, K.; Güdel, H.-U.; Haase, M.; Haase, M.; Kömpe, K.; Heer, S.; Güdel, H. Highly Efficient Multicolour Upconversion Emission in Transparent Colloids of Lanthanide-Doped NaYF₄ Nanocrystals. *Adv. Mater.* **2004**, *16* (23–24), 2102–2105. <https://doi.org/10.1002/adma.200400772>.
- (79) Wang, F.; Liu, X. Upconversion Multicolor Fine-Tuning: Visible to near-Infrared Emission from Lanthanide-Doped NaYF₄ Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (17), 5642–5643. <https://doi.org/10.1021/ja800868a>.
- (80) Chan, E. M.; Han, G.; Goldberg, J. D.; Gargas, D. J.; Ostrowski, A. D.; Schuck, P. J.; Cohen, B. E.; Milliron, D. J. Combinatorial Discovery of Lanthanide-Doped Nanocrystals with Spectrally Pure Upconverted Emission. *Nano Lett.* **2012**, *12* (7), 3839–3845. <https://doi.org/10.1021/nl3017994>.
- (81) Wang, Z.; Feng, J.; Song, S.; Sun, Z.; Yao, S.; Ge, X.; Pang, M.; Zhang, H. Pure and Intense Orange Upconversion Luminescence of Eu³⁺ from the Sensitization of Yb³⁺-Mn²⁺ Dimer in NaY(Lu)F₄ Nanocrystals. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2* (42), 9004–9011. <https://doi.org/10.1039/c4tc01778a>.
- (82) Zhao, J.; Jin, D.; Schartner, E. P.; Lu, Y.; Liu, Y.; Zvyagin, A. V.; Zhang, L.; Dawes, J. M.; Xi, P.; Piper, J. A.; et al. Single-Nanocrystal Sensitivity Achieved by Enhanced Upconversion Luminescence. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 729–734. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.171>.
- (83) Liu, Y.; Lu, Y.; Yang, X.; Zheng, X.; Wen, S.; Wang, F.; Vidal, X.; Zhao, J.; Liu, D.; Zhou, Z.; et al. Amplified Stimulated Emission in Upconversion Nanoparticles for Super-Resolution Nanoscopy. *Nature* **2017**, *543*, 229–233. <https://doi.org/10.1038/nature21366>.
- (84) Chen, G.; Liu, H.; Liang, H.; Somesfalean, G.; Zhang, Z. Upconversion Emission Enhancement in Yb³⁺/Er³⁺-Codoped Y₂O₃ Nanocrystals by Tridoping with Li⁺ Ions. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112* (31), 12030–12036. <https://doi.org/10.1021/jp804064g>.
- (85) Weissman, S. I. Intramolecular Energy Transfer The Fluorescence of Complexes of Europium. *J. Chem. Phys.* **2004**, *10* (4), 214. <https://doi.org/10.1063/1.1723709>.
- (86) Chen, G.; Damasco, J.; Qiu, H.; Shao, W.; Ohulchanskyy, T. Y.; Valiev, R. R.; Wu, X.; Han, G.; Wang, Y.; Yang, C.; et al. Energy-Cascaded Upconversion in an Organic Dye-Sensitized Core/Shell Fluoride Nanocrystal. *Nano Lett.* **2015**, *15* (11), 7400–7407. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b02830>.
- (87) Zheng, J.; Wu, Y.; Xing, D.; Zhang, T. Synchronous Detection of Glutathione/Hydrogen Peroxide for Monitoring Redox Status in Vivo with a Ratiometric Upconverting Nanoprobe. *Nano Res.* **2019**, *12* (4), 931–938.

- <https://doi.org/10.1007/s12274-019-2327-6>.
- (88) Greybush, N. J.; Saboktakin, M.; Ye, X.; Della Giovampaola, C.; Oh, S. J.; Berry, N. E.; Engheta, N.; Murray, C. B.; Kagan, C. R. Plasmon-Enhanced Upconversion Luminescence in Single Nanophosphor-Nanorod Heterodimers Formed through Template-Assisted Self-Assembly. *ACS Nano* **2014**, *8* (9), 9482–9491. <https://doi.org/10.1021/nn503675a>.
- (89) Zhu, X.; Zhang, J.; Liu, J.; Zhang, Y.; Zhu, X.; Zhang, J.; Liu, J.; Zhang, Y. Recent Progress of Rare-Earth Doped Upconversion Nanoparticles: Synthesis, Optimization, and Applications. *Adv. Sci.* **2019**, *6* (22), 1901358. <https://doi.org/10.1002/advs.201901358>.
- (90) Reddy, K. L.; Balaji, R.; Kumar, A.; Krishnan, V. Lanthanide Doped Near Infrared Active Upconversion Nanophosphors: Fundamental Concepts, Synthesis Strategies, and Technological Applications. *Small* **2018**, *14* (37), 1801304. <https://doi.org/10.1002/sml.201801304>.
- (91) Murray, C. B.; Kagan, C. R.; Bawendi, M. G. Synthesis and Characterization Monodisperse Nanocrystals and Close-Packed Nanocrystal Assemblies. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **2000**, *30* (1), 545–610. <https://doi.org/10.1146/annurev.matsci.30.1.545>.
- (92) Zhang, Y. W.; Sun, X.; Si, R.; You, L. P.; Yan, C. H. Single-Crystalline and Monodisperse LaF₃ Triangular Nanoplates from a Single-Source Precursor. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (10), 3260–3261. <https://doi.org/10.1021/ja042801y>.
- (93) Liu, L.; Qin, F.; Zhao, H.; Lv, T.; Zhang, Z.; Cao, W. Facile Synthesis and Upconversion Luminescence of β-NaYF₄:Yb, Tm Nanocrystals with Highly Tunable and Uniform β-NaYF₄ Shells. *J. Alloys Compd.* **2016**, *684*, 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.04.302>.
- (94) Li, X.; Shen, D.; Yang, J.; Yao, C.; Che, R.; Zhang, F.; Zhao, D. Successive Layer-by-Layer Strategy for Multi-Shell Epitaxial Growth: Shell Thickness and Doping Position Dependence in Upconverting Optical Properties. *Chem. Mater.* **2013**, *25* (1), 106–112. <https://doi.org/10.1021/cm3033498>.
- (95) Johnson, N. J. J.; Korinek, A.; Dong, C.; Van Veggel, F. C. J. M. Self-Focusing by Ostwald Ripening: A Strategy for Layer-by-Layer Epitaxial Growth on Upconverting Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (27), 11068–11071. <https://doi.org/10.1021/ja302717u>.
- (96) Abel, K. A.; Boyer, J. C.; Andrei, C. M.; Van Veggel, F. C. J. M. Analysis of the Shell Thickness Distribution on NaYF₄/NaGdF₄ Core/Shell Nanocrystals by EELS and EDS. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2* (3), 185–189. <https://doi.org/10.1021/jz101593g>.
- (97) Wang, X.; Zhuang, J.; Peng, Q.; Li, Y. A General Strategy for Nanocrystal Synthesis. *Nat.* **2005**, *437* (7055), 121–124. <https://doi.org/10.1038/nature03968>.
- (98) Zhang, Y.; Zhang, L.; Deng, R.; Tian, J.; Zong, Y.; Jin, D.; Liu, X. Multicolor Barcoding in a Single Upconversion Crystal. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (13), 4893–4896. <https://doi.org/10.1021/ja5013646>.
- (99) Patra, A.; Friend, C. S.; Kapoor, R.; Prasad, P. N. Upconversion in Er³⁺:ZrO₂ Nanocrystals. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106* (8), 1909–1912. <https://doi.org/10.1021/jp013576z>.
- (100) Qin, X.; Yokomori, T.; Ju, Y. Flame Synthesis and Characterization of Rare-Earth (Er³⁺, Ho³⁺, and Tm³⁺) Doped Upconversion Nanophosphors. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *90* (7), 073104. <https://doi.org/10.1063/1.2561079>.

- (101) Liu, X.; Zhao, J.; Sun, Y.; Song, K.; Yu, Y.; Du, C.; Kong, X.; Zhang, H. Ionothermal Synthesis of Hexagonal-Phase NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺/Tm³⁺ Upconversion Nanophosphors. *Chem. Commun.* **2009**, 0 (43), 6628–6630. <https://doi.org/10.1039/b915517a>.
- (102) Mi, C.; Tian, Z.; Cao, C.; Wang, Z.; Mao, C.; Xu, S. Novel Microwave-Assisted Solvothermal Synthesis of NaYF₄:Yb,Er Upconversion Nanoparticles and Their Application in Cancer Cell Imaging. *Langmuir* **2011**, 27 (23), 14632–14637. <https://doi.org/10.1021/la204015m>.
- (103) Reddy, K. L.; Prabhakar, N.; Arppe, R.; Rosenholm, J. M.; Krishnan, V. Microwave-Assisted One-Step Synthesis of Acetate-Capped NaYF₄:Yb/Er Upconversion Nanocrystals and Their Application in Bioimaging. *J. Mater. Sci.* **2017**, 52 (10), 5738–5750. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-0809-z>.
- (104) Panov, N.; Marin, R.; Hemmer, E. Microwave-Assisted Solvothermal Synthesis of Upconverting and Downshifting Rare-Earth-Doped LiYF₄ Microparticles. *Inorg. Chem.* **2018**, 57 (23), 14920–14929. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b02697>.
- (105) Zhang, Y.; Zhu, X.; Zhang, Y. Exploring Heterostructured Upconversion Nanoparticles: From Rational Engineering to Diverse Applications. *ACS Nano* **2021**, 15 (3), 3709–3735. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c09231>.
- (106) Dou, Q. Q.; Rengaramchandran, A.; Selvan, S. T.; Paulmurugan, R.; Zhang, Y. Core – Shell Upconversion Nanoparticle – Semiconductor Heterostructures for Photodynamic Therapy. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 8252. <https://doi.org/10.1038/srep08252>.
- (107) Andresen, E.; Resch-Genger, U.; Schäferling, M. Surface Modifications for Photon-Upconversion-Based Energy-Transfer Nanoprobes. *Langmuir* **2019**, 35 (15), 5093–5113. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00238>.
- (108) Sedlmeier, A.; Gorris, H. H. Surface Modification and Characterization of Photon-Upconverting Nanoparticles for Bioanalytical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44 (6), 1526–1560. <https://doi.org/10.1039/c4cs00186a>.
- (109) Muhr, V.; Wilhelm, S.; Hirsch, T.; Wolfbeis, O. S. Upconversion Nanoparticles: From Hydrophobic to Hydrophilic Surfaces. *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47 (12), 3481–3493. <https://doi.org/10.1021/ar500253g>.
- (110) Bogdan, N.; Vetrone, F.; Ozin, G. A.; Capobianco, J. A. Synthesis of Ligand-Free Colloidally Stable Water Dispersible Brightly Luminescent Lanthanide-Doped Upconverting Nanoparticles. *Nano Lett.* **2011**, 11 (2), 835–840. <https://doi.org/10.1021/nl1041929>.
- (111) Dong, A.; Ye, X.; Chen, J.; Kang, Y.; Gordon, T.; Kikkawa, J. M.; Murray, C. B. A Generalized Ligand-Exchange Strategy Enabling Sequential Surface Functionalization of Colloidal Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (4), 998–1006. <https://doi.org/10.1021/jal08948z>.
- (112) Sun, Y.; Zhang, W.; Wang, B.; Xu, X.; Chou, J.; Shimoni, O.; Ung, A. T.; Jin, D. A Supramolecular Self-Assembly Strategy for Upconversion Nanoparticle Bioconjugation. *Chem. Commun.* **2018**, 54 (31), 3851–3854. <https://doi.org/10.1039/c8cc00708j>.
- (113) Tian, G.; Ren, W.; Yan, L.; Jian, S.; Gu, Z.; Zhou, L.; Jin, S.; Yin, W.; Li, S.; Zhao, Y. Red-Emitting Upconverting Nanoparticles for Photodynamic Therapy in Cancer Cells under near-Infrared Excitation. *Small* **2013**, 9 (11), 1929–1938. <https://doi.org/10.1002/sml.201201437>.
- (114) Wang, A.; Jin, W.; Chen, E.; Zhou, J.; Zhou, L.; Wei, S. Drug Delivery Function

- of Carboxymethyl- β -Cyclodextrin Modified Upconversion Nanoparticles for Adamantine Phthalocyanine and Their NIR-Triggered Cancer Treatment. *Dalt. Trans.* **2016**, 45 (9), 3853–3862. <https://doi.org/10.1039/c5dt04900h>.
- (115) Chen, Z.; Chen, H.; Hu, H.; Yu, M.; Li, F.; Zhang, Q.; Zhou, Z.; Yi, T.; Huang, C. Versatile Synthesis Strategy for Carboxylic Acid-Functionalized Upconverting Nanophosphors as Biological Labels. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (10), 3023–3029. <https://doi.org/10.1021/ja076151k>.
- (116) Liu, Y.; Hou, W.; Sun, H.; Cui, C.; Zhang, L.; Jiang, Y.; Wu, Y.; Wang, Y.; Li, J.; Sumerlin, B. S.; et al. Thiol–Ene Click Chemistry: A Biocompatible Way for Orthogonal Bioconjugation of Colloidal Nanoparticles. *Chem. Sci.* **2017**, 8 (9), 6182–6187. <https://doi.org/10.1039/c7sc01447c>.
- (117) Sivakumar, S.; Diamente, P. R.; Van Veggel, F. C. J. M. Silica-Coated Ln³⁺-Doped LaF₃ Nanoparticles as Robust Down- and Upconverting Biolabels. *Chem. – A Eur. J.* **2006**, 12 (22), 5878–5884. <https://doi.org/10.1002/chem.200600224>.
- (118) Abdul Jalil, R.; Zhang, Y. Biocompatibility of Silica Coated NaYF₄ Upconversion Fluorescent Nanocrystals. *Biomaterials* **2008**, 29 (30), 4122–4128. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.07.012>.
- (119) Wurth, C.; Kaiser, M.; Wilhelm, S.; Grauel, B.; Hirsch, T.; Resch-Genger, U. Excitation Power Dependent Population Pathways and Absolute Quantum Yields of Upconversion Nanoparticles in Different Solvents. *Nanoscale* **2017**, 9 (12), 4283–4294. <https://doi.org/10.1039/c7nr00092h>.
- (120) Wilhelm, S.; Kaiser, M.; Würth, C.; Heiland, J.; Carrillo-Carrion, C.; Muhr, V.; Wolfbeis, O. S.; Parak, W. J.; Resch-Genger, U.; Hirsch, T. Water Dispersible Upconverting Nanoparticles: Effects of Surface Modification on Their Luminescence and Colloidal Stability. *Nanoscale* **2015**, 7 (4), 1403–1410. <https://doi.org/10.1039/c4nr05954a>.
- (121) Gnach, A.; Lipinski, T.; Bednarkiewicz, A.; Rybka, J.; Capobianco, J. A. Upconverting Nanoparticles: Assessing the Toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44 (6), 1561–1584.
- (122) Oliveira, H.; Bednarkiewicz, A.; Falk, A.; Fröhlich, E.; Lisjak, D.; Prina-Mello, A.; Resch, S.; Schimpel, C.; Vrček, I. V.; Wysokińska, E.; et al. Critical Considerations on the Clinical Translation of Upconversion Nanoparticles (UCNPs): Recommendations from the European Upconversion Network (COST Action CM1403). *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, 8 (1). <https://doi.org/10.1002/adhm.201801233>.
- (123) Lisjak, D.; Plohl, O.; Ponikvar-Svet, M.; Majaron, B. Dissolution of Upconverting Fluoride Nanoparticles in Aqueous Suspensions. *RSC Adv.* **2015**, 5 (35), 27393–27397. <https://doi.org/10.1039/c5ra00902b>.
- (124) Monopoli, M. P.; Åberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K. A. Biomolecular Coronas Provide the Biological Identity of Nanosized Materials. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, 7 (12), 779–786. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.207>.
- (125) Lahtinen, S.; Lyytikä, A.; Pä, H.; Hö, E.; Perä, N.; Lastusaari, M.; Soukka, T. Disintegration of Hexagonal NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ Upconverting Nanoparticles in Aqueous Media: The Role of Fluoride in Solubility Equilibrium. **2016**. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b09301>.
- (126) Estebanez, N.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Polysulfonate Cappings on Upconversion Nanoparticles Prevent Their Disintegration in Water and Provide

- Superior Stability in a Highly Acidic Medium. *ACS Omega* **2019**, *4* (2), 3012–3019. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03015>.
- (127) Märkl, S.; Schroter, A.; Hirsch, T. Small and Bright Water-Protected Upconversion Nanoparticles with Long-Time Stability in Complex, Aqueous Media by Phospholipid Membrane Coating. *Nano Lett.* **2020**, *20* (12), 8620–8625. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c03327>.
- (128) Rabanel, J. M.; Adibnia, V.; Tehrani, S. F.; Sanche, S.; Hildgen, P.; Banquy, X.; Ramassamy, C. Nanoparticle Heterogeneity: An Emerging Structural Parameter Influencing Particle Fate in Biological Media? *Nanoscale* **2019**, *11* (2), 383–406. <https://doi.org/10.1039/c8nr04916e>.
- (129) Goldschmidt, J. C.; Fischer, S. Upconversion for Photovoltaics - a Review of Materials, Devices and Concepts for Performance Enhancement. *Adv. Opt. Mater.* **2015**, *3* (4), 510–535. <https://doi.org/10.1002/adom.201500024>.
- (130) Liu, Y.; Liang, S.; Yuan, C.; Best, A.; Kappl, M.; Koynov, K.; Butt, H.-J.; Wu, S.; Liu, Y.; Liang, S.; et al. Fabrication of Anticounterfeiting Nanocomposites with Multiple Security Features via Integration of a Photoresponsive Polymer and Upconverting Nanoparticles. *Adv. Funct. Mater.* **2021**, *31* (37), 2103908. <https://doi.org/10.1002/adfm.202103908>.
- (131) Ren, W.; Lin, G.; Clarke, C.; Zhou, J.; Jin, D.; Ren, W.; Lin, G.; Clarke, C.; Zhou, J.; Jin, D. Optical Nanomaterials and Enabling Technologies for High-Security-Level Anticounterfeiting. *Adv. Mater.* **2020**, *32* (18), 1901430. <https://doi.org/10.1002/adma.201901430>.
- (132) Brites, C. D. S.; Balabhadra, S.; Carlos, L. D. Lanthanide-Based Thermometers: At the Cutting-Edge of Luminescence Thermometry. *Adv. Opt. Mater.* **2019**, *7* (5), 1–30. <https://doi.org/10.1002/adom.201801239>.
- (133) Ferrera-González, J.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Functional Nanohybrids Based on Dyes and Upconversion Nanoparticles. In *Dyes and Photoactive Molecules in Microporous Systems. Structure and Bonding.*; López Arbeloa, F., Ed.; Springer: Cham, 2020; pp 371–396. https://doi.org/10.1007/430_2020_60.
- (134) Tan, G. R.; Wang, M.; Hsu, C. Y.; Chen, N.; Zhang, Y. Small Upconverting Fluorescent Nanoparticles for Biosensing and Bioimaging. *Adv. Opt. Mater.* **2016**, *4* (7), 984–997. <https://doi.org/10.1002/adom.201600141>.
- (135) González-Béjar, M.; Francés-Soriano, L.; Pérez-Prieto, J. Upconversion Nanoparticles for Bioimaging and Regenerative Medicine. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2016**, *4*, 47. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00047>.
- (136) He, F.; Yang, G.; Yang, P.; Yu, Y.; Lv, R.; Li, C.; Dai, Y.; Gai, S.; Lin, J. A New Single 808 Nm NIR Light-Induced Imaging-Guided Multifunctional Cancer Therapy Platform. *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25* (25), 3966–3976. <https://doi.org/10.1002/adfm.201500464>.
- (137) Lin, M.; Zhao, Y.; Wang, S. Q.; Liu, M.; Duan, Z. F.; Chen, Y. M.; Li, F.; Xu, F.; Lu, T. J. Recent Advances in Synthesis and Surface Modification of Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30* (6), 1551–1561. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.04.009>.
- (138) Fan, W.; Shen, B.; Bu, W.; Chen, F.; He, Q.; Zhao, K.; Zhang, S.; Zhou, L.; Peng, W.; Xiao, Q.; et al. A Smart Upconversion-Based Mesoporous Silica Nanotheranostic System for Synergetic Chemo-/Radio-/Photodynamic Therapy and Simultaneous MR/UCL Imaging. *Biomaterials* **2014**, *35* (32), 8992–9002.

- <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.024>.
- (139) Wu, W.; Yao, L.; Yang, T.; Yin, R.; Li, F.; Yu, Y. NIR-Light-Induced Deformation of Cross-Linked Liquid-Crystal Polymers Using Upconversion Nanophosphors. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (40), 15810–15813. <https://doi.org/10.1021/JA2043276>.
- (140) Wang, L.; Dong, H.; Li, Y.; Xue, C.; Sun, L. D.; Yan, C. H.; Li, Q. Reversible Near-Infrared Light Directed Reflection in a Self-Organized Helical Superstructure Loaded with Upconversion Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (12), 4480–4483. <https://doi.org/10.1021/JA500933H>.
- (141) Lai, J.; Zhang, Y.; Pasquale, N.; Lee, K.-B.; Lai, J J; Zhang, Y.; Pasquale, J N; Lee, K.-B. An Upconversion Nanoparticle with Orthogonal Emissions Using Dual NIR Excitations for Controlled Two-Way Photoswitching. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53* (52), 14419–14423. <https://doi.org/10.1002/anie.201408219>.
- (142) Boyer, J. C.; Carling, C. J.; Gates, B. D.; Branda, N. R. Two-Way Photoswitching Using One Type of near-Infrared Light, Upconverting Nanoparticles, and Changing Only the Light Intensity. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (44), 15766–15772. <https://doi.org/10.1021/ja107184z>.
- (143) Wang, K.; Peña, J.; Xing, J. Upconversion Nanoparticle-Assisted Photopolymerization. *Photochem. Photobiol.* **2020**, *96* (4), 741–749. <https://doi.org/10.1111/php.13249>.
- (144) Yang, Y.; Shao, Q.; Deng, R.; Wang, C.; Teng, X.; Cheng, K.; Cheng, Z.; Huang, L.; Liu, Z.; Liu, X.; et al. In Vitro and In Vivo Uncaging and Bioluminescence Imaging by Using Photocaged Upconversion Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (13), 3125–3129. <https://doi.org/10.1002/anie.201107919>.
- (145) Wu, S.; Lv, J.; Wang, F.; Duan, N.; Li, Q.; Wang, Z. Photocatalytic Degradation of Microcystin-LR with a Nanostructured Photocatalyst Based on Upconversion Nanoparticles@TiO₂ Composite under Simulated Solar Lights. *Sci. Rep. 2017 71* **2017**, *7* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14746-6>.
- (146) Jiang, J.; Ren, H.; Huang, F.; Wang, L.; Zhang, J. Refine the Crystallinity of Upconversion Nanoparticles for NIR-Enhanced Photocatalysis. *CrystEngComm* **2021**, *23* (35), 6117–6127. <https://doi.org/10.1039/d1ce00550b>.
- (147) Lee, S. Y.; Lee, G.; Jun, Y. S.; Park, Y. II. Visible/near-Infrared Driven Highly Efficient Photocatalyst Based on Upconversion Nanoparticles/g-C₃N₄ Nanocomposite. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *508*, 144839. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144839>.
- (148) Xu, J.; Liu, N.; Wu, D.; Gao, Z.; Song, Y. Y.; Schmuki, P. Upconversion Nanoparticle-Assisted Payload Delivery from TiO₂ under Near-Infrared Light Irradiation for Bacterial Inactivation. *ACS Nano* **2020**, *14* (1), 337–346. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b05386>.
- (149) Freitag, M.; Möller, N.; Rühling, A.; Strassert, C. A.; Ravoo, B. J.; Glorius, F. Photocatalysis in the Dark: Near-Infrared Light Driven Photoredox Catalysis by an Upconversion Nanoparticle/Photocatalyst System. *ChemPhotoChem* **2019**, *3* (1), 24–27. <https://doi.org/10.1002/cptc.201800212>.

Objetivos

Capítulo 2

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Caracterizar y visualizar UCNH compuestos de UCNP y especies fotoactivas con funcionalidad biológica.

2.2. Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar UCNP.
 - 1.1. Control sintético en el desarrollo de nanomateriales *core* y *core-shell* de matriz β -NaYF₄ dopados con lantánidos fotoactivos (Yb³⁺ y Er³⁺/Tm³⁺) mediante la metodología de descomposición térmica.
2. Funcionalizar las UCNP con especies fotoactivas.
 - 2.1. Control en la modificación y funcionalización superficial de las UCNP para dar lugar a UCNH.
 - 2.2. Construir UCNH mediante una metodología tipo rompecabezas (puzzle) usando moléculas macrocíclicas de cucurbiturilo.
3. Aplicar el microscopio multifotón de barrido láser para la caracterización fotofísica de las UCNP y UCNH.

- 3.1. Adaptar una técnica de microscopía para caracterizar el tiempo de vida de luminiscencia de las UCNP y UCNH.
- 3.2. Evaluar la homogeneidad de una muestra en la escala microscópica en base a su respuesta temporal.
- 3.3. Evaluar la homogeneidad de la funcionalización en la escala microscópica de UCNH formados por UCNP y colorantes.
- 3.4. Detectar fenómenos de transferencia de energía en UCNH.
- 3.5. Caracterizar el tiempo de vida de luminiscencia de UCNP y UCNH en el interior celular.
4. Caracterizar fotofísicamente los UCNH.
 - 4.1. Determinar los tiempos de vida de desactivación de las emisiones UC de UCNP y UCNH.
 - 4.2. Detectar alargamientos en tiempos de vida de colorantes por transferencia de energía resonante desde una emisión UC de la UCNP.
 - 4.3. Demostrar que una sonda química no pierde sus propiedades de detección en un UCNH formado por ella y una UCNP.
 - 4.4. Determinar el estado de agregación de un colorante en la superficie de la UCNP.
 - 4.5. Comparar el comportamiento fotofísico de un colorante libre y un colorante funcionalizado en la superficie de un UCNP.
 - 4.6. Estudiar los procesos de transferencia de energía entre los lantánidos de la UCNP y el colorante.
5. Estudiar la citotoxicidad de una UCNP sin ligandos superficiales y otra UCNP funcionalizada con cucurbiturilos.
 - 5.1. Demostrar la internalización celular.
 - 5.2. Estudiar la viabilidad celular y el mecanismo de citotoxicidad.

Microscopía de barrido de láser NIR: una técnica de caracterización fotofísica para UCNP/UCNH

Capítulo 3

3. Microscopía de barrido de láser NIR

Una técnica de caracterización fotofísica para UCNP/UCNH

3.1. Introducción y antecedentes

La microscopía óptica engloba al conjunto de técnicas que mediante la luz y un sistema de lentes tratan de magnificar estructuras o sistemas que no pueden ser vistos a simple vista por el ojo humano. Los inicios de la microscopía se remontan al siglo XVII y en la actualidad existe una amplísima variedad de técnicas que se basan en distintas interacciones de la luz con la materia, como por ejemplo, microscopía de fluorescencia, multifotónica, de campo ancho, de correlación de fluorescencia, de campo oscuro, de campo claro, de transferencia de energía tipo Föster, de fluorescencia de luz laminada, de fluorescencia de reflexión interna total, de fosforescencia, de tiempo de vida de fluorescencia/fosforescencia y de contraste de interferencia diferencial, entre otros.¹⁻³

De forma general los microscopios constan de una fuente de excitación, un sistema de magnificación de la imagen mediante lentes (objetivos) y un sistema

de detección. La separación de la excitación y emisión la realiza un espejo dicróico, mientras que la selección de la longitud de excitación y de detección se suele realizar mediante un juego de filtros, aunque hay sistemas con redes de difracción y capacidades espectrales. Las tres técnicas de microscopía más comunes por su uso y comercialización son:⁴

- Microscopía de campo ancho (*widefield microscopy*, WM). Utiliza una fuente de excitación continua, generalmente con una lámpara de Xe, que excita simultáneamente toda la muestra y la detección se realiza mediante una cámara de dispositivo de carga acoplado (CCD).
- Microscopía confocal (MC). En este caso, no se realiza la excitación simultánea de toda la muestra, sino un barrido del área de detección. Como fuente de excitación se utiliza un láser que permite focalizar la luz en un área muy pequeña, limitada por el límite de difracción. Mediante un sistema de barrido en un patrón determinado y a una velocidad determinada el láser recorre el área a digitalizar como imagen a la vez que un fotomultiplicador (PMT) registra la intensidad de la señal píxel a píxel. Por ello, requiere de un agujero (*pinhole*) antes del PMT para evitar la luz fuera de foco. Es una técnica que ofrece diferentes ventajas frente a WM, como la mejora del contraste y resolución, permite obtener imágenes en las tres dimensiones (3D), reduce el fotoblanqueo (*photobleaching*, pérdida de las propiedades emisivas de un colorante) de los fluoróforos, la fototoxicidad (toxicidad por exposición a la luz) y la autofluorescencia (interferencia de fluorescencia inherente a ciertas moléculas de tejidos biológicos).⁴
- Microscopía multifotónica (MM). Presenta un funcionamiento idéntico a la MC pero en vez de utilizar láser de UV-vis requiere el uso de láseres NIR pulsados de alta potencia y no necesita *pinhole*. Esta técnica consiste en excitar bifotónicamente (*2-photon excitation*, 2PE) a los fluoróforos de interés. Como la densidad fotónica para que un proceso 2PE tenga

lugar debe ser extremadamente alta, la excitación de los fluoróforos se verá restringida a un volumen extremadamente pequeño (del orden de femtolitros) en el foco de la muestra, evitándose así la luz fuera de foco y mejorándose el contraste frente MC.^{5,6}

Sin embargo, ninguna de estas técnicas de microscopía óptica es capaz de resolver estructuras nanométricas, pues están limitadas por el límite de difracción. La resolución lateral (eje x-y) máxima posible de microscopios ópticos, en función del criterio de Abbe o de Rayleigh,^{7,8} estará limitada teóricamente a aproximadamente la mitad de la longitud de onda de excitación, mientras que la axial (eje z) estará limitada a la longitud de onda de excitación. Así, excitando en el UV-vis a 400 nm, por ejemplo, tendríamos una resolución lateral máxima en torno a los 200 nm, mientras que, si excitamos en el NIR, como ocurre en MM, la resolución sería incluso peor (resolución \approx 490 nm para 975 nm de excitación). De tal manera que, como muestra la figura 3.1, los sistemas nanométricos no pueden resolverse por técnicas de microscopía óptica convencionales (MW, MC o MM). Para ello, deberíamos recurrir a técnicas de microscopía óptica de superresolución, como microscopía de iluminación estructurada (SIM), microscopía de reflexión interna total de fluorescencia (TIRF), microscopía de depleción de luz estimulada (*stimulated emission depletion*, STED) o microscopía de barrido de campo cercano, entre otras.

En principio, las técnicas de microscopía electrónica (ME) tienen una resolución más que suficiente para sistemas nanométricos, sin embargo, las dosis de electrones necesaria para ME imposibilitaría estudios celulares *in vivo* o en tejidos biológicos porque está muy por encima de la dosis letal celular.⁹ Aun así, esta técnica ha demostrado ser de gran utilidad en forma de microscopía crioelectrónica¹⁰⁻¹² y como microscopía correlativa de luz y electrónica (CLEM).¹³⁻¹⁵

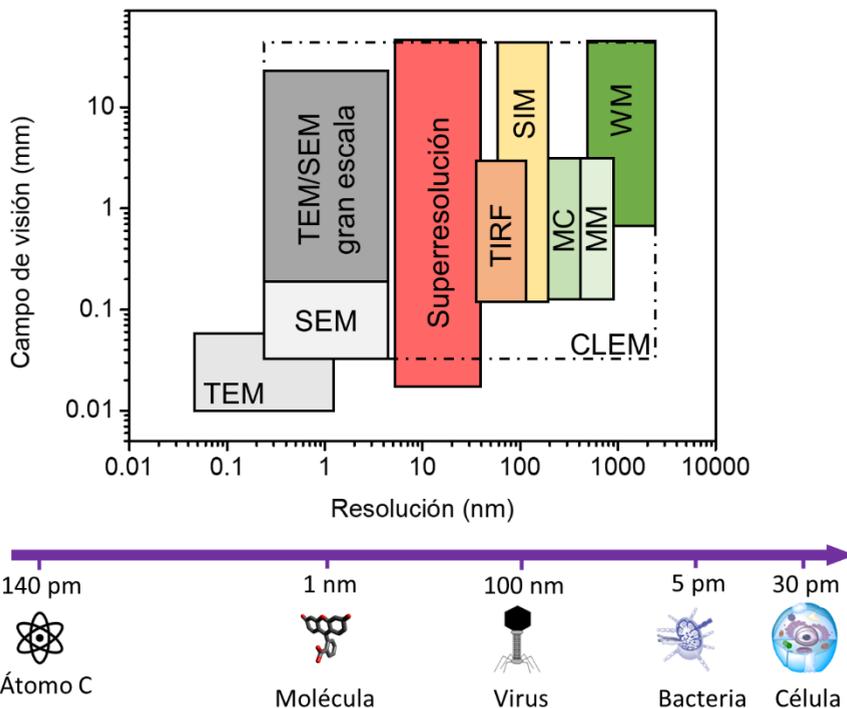


Figura 3.1. Gráfico de campo de visión frente a resolución de algunas técnicas de microscopía^{16,17} y detalle con tamaños promedio de estructuras de referencia.

Por otro lado, la resolución temporal en microscopía óptica permite la obtención de imágenes a la vez que sirve para caracterizar materiales. La microscopía basada en la detección de intensidad está limitada por la estabilidad de la fuente de excitación, el ruido de fondo de autofluorescencia (*autofluorescence background*) y del solapamiento de emisiones. Sin embargo, las técnicas de imagen de microscopía basadas en tiempo de vida son menos sensibles a interferencias, ya que el contraste de la imagen viene dado por los tiempos de vida.¹⁸ Así se han propuesto diferentes técnicas como microscopía de imagen de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM, por sus siglas en inglés), microscopía de imagen de tiempo de vida de fosforescencia/fotoluminiscencia (PLIM, por sus siglas en inglés) y microscopía limitada por intervalos temporales (*time-gated emission imaging microscopy*, TGI), entre otras, que registran la

desactivación de la emisión en cada píxel durante el tiempo de permanencia (*dwell time*).¹⁸⁻²¹ Los sistemas de detección de técnicas de microscopía resuelta en el tiempo se basan en dos tipos de métodos:

- Métodos basados en dominio de la frecuencia: miden el desplazamiento de la fase y la desmodulación de la emisión respecto de la excitación, que se relaciona con el tiempo de vida del emisor.¹⁸
- Métodos basados en el dominio temporal: miden el desfase temporal entre la excitación y la detección de un fotón.^{18,22} Se destacan dos técnicas:
 - Recuento de fotones individuales correlacionados en el tiempo (*time-correlated single photon counting*, TCSPC). Mide el desfase temporal entre una señal inicio, START (excitación del láser), y una señal de parada, STOP (llegada de un fotón al detector), de múltiples fotones (millones) para crear un histograma de la desactivación de la emisión.
 - Detección limitada por intervalos temporales (*time-gated detection*). Utiliza como sistema de detección la técnica TCSPC, pero en vez de barrer toda la ventana temporal, utiliza uno o más intervalos temporales (*time gates*) con diferentes retardos respecto a la excitación.

Desde su desarrollo, las UCNPs han suscitado un gran interés para técnicas de microscopía de imagen. Sus propiedades emisivas las hacen excelentes emisores para microscopía óptica, pues presentan luminiscencia continua (no parpadean, *no photoblinking*), son fotoestables a tiempos prolongados de excitación y fuentes de alta potencia de excitación (no presentan fotoblanqueo),^{23,24} y presentan baja toxicidad.²⁵ Además, el fenómeno UC es más eficiente que el de 2PE de los colorantes²⁶ y, al ser excitadas con luz NIR, permiten estudios a mayor profundidad dentro de muestras biológicas, con menor fototoxicidad (frente a fuentes UV-vis) y sin interferencias de autofluorescencia²⁷⁻²⁹.

Capítulo 3. Microscopía de barrido de láser NIR

En principio, dado que la excitación de las UCNP es en el NIR, la técnica de microscopía más adecuada para utilizarla parece ser la MM, ya que utiliza un láser NIR. Sin embargo, la obtención de imágenes de intensidad de UCNP mediante MM supone un serio desafío debido al tiempo de vida largo de las emisiones UC. Los MM convencionales están diseñados para 2PE de fluoróforos y, por tanto, no incorporan un *pinhole* en la detección, ya que no ocurre emisión fuera de foco.⁶ Sin embargo, si se utilizan para excitar al Yb³⁺ (excitación monofotónica) de la UCNP, sí ocurrirá emisión fuera de foco, que además presenta tiempo de vida largo, y puede contaminar píxeles adyacentes (emisión fuera de eje) en la dirección del barrido y, por tanto, afectar a la resolución y contraste de la imagen. Para evitarlo se han seguido distintas estrategias: (i) utilizar velocidades de barrido lentas, (ii) añadir un *pinhole* antes de la detección igual que el que presentan los MC,³⁰ (iii) no utilizar una técnica de microscopía de barrido sino WM equipado con un láser NIR,³¹ (iv) aumentar el dopaje de sensibilizadores, activadores o ambos en la UCNP para reducir los tiempos de vida de la emisión UC³²⁻³⁵ o (v) utilizar técnicas de microscopía de tiempo de vida²¹.

Más recientemente diferentes estudios han demostrado el potencial en bioimagen de la combinación de UCNP con la microscopía óptica. Por un lado, se han obtenido imágenes de una sola nanopartícula (*single particle*),^{36,37} incluso UCNP de 10 nm con un microscopio multifotón convencional³⁴. Por otro lado, se ha demostrado que se puede realizar microscopía de imagen de subdifracción con UCNP y técnicas de superresolución, como STED^{32,38,39} o nanoscopía de saturación de emisión NIR (*NIR emisión saturation nanoscopy*, NIRES)⁴⁰. Incluso, se ha desarrollado una técnica de subdifracción en un MC basada puramente en la superlinealidad de las emisiones UCNP, uSEE (*upconversion super-linear excitation-emission*)³⁶.

En este sentido e impulsados por dos razones principales: la necesidad de obtener cinéticas de la desactivación de la emisión *upconversion* (UC) de los

lantánidos de UCNP y la falta del instrumental adecuado para obtenerlas, llevó al grupo de investigación a adaptar una técnica de microscopía que nos permitiera obtener tiempos de vida empíricos UC: convertir un técnica de imagen en una técnica de caracterización temporal de UCNP/UCNH que, además, permite evaluar la homogeneidad de la muestra en la escala micro/nanométrica y de la funcionalización de los UCNH.⁴¹ La técnica, aunque se ha desarrollado en un microscopio comercial multifotón, a partir de ahora se la denominará microscopía de barrido láser de infrarrojo cercano (NIR-LSM, por sus siglas en inglés), ya que no implica una 2PE, pues el láser NIR del microscopio se utiliza para excitar al Yb^{3+} de la UCNP.

3.2. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo son:

- Adaptar una técnica de imagen de microscopía para que nos permita caracterizar el tiempo de vida de las UCNP.
- Evaluar la homogeneidad de una muestra en función de la desactivación temporal de luminiscencia.
- Evaluar la homogeneidad en la funcionalización de las UCNP con fluoróforos orgánicos.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Microscopio multifotón FV100MPE

La técnica NIR-LSM se ha implementado en un microscopio multifotón comercial (FV1000MPE, Olympus) compuesto por un microscopio vertical BX61WI y un láser de femtosegundos de Ti-zafiro (Mai-Tai HP Deep See, Spectra Physics). Con el fin de hacer la exposición de resultados más accesible, introduciremos brevemente los componentes del presente microscopio y los parámetros que podemos modificar desde el software del equipo (FV10-ASW).

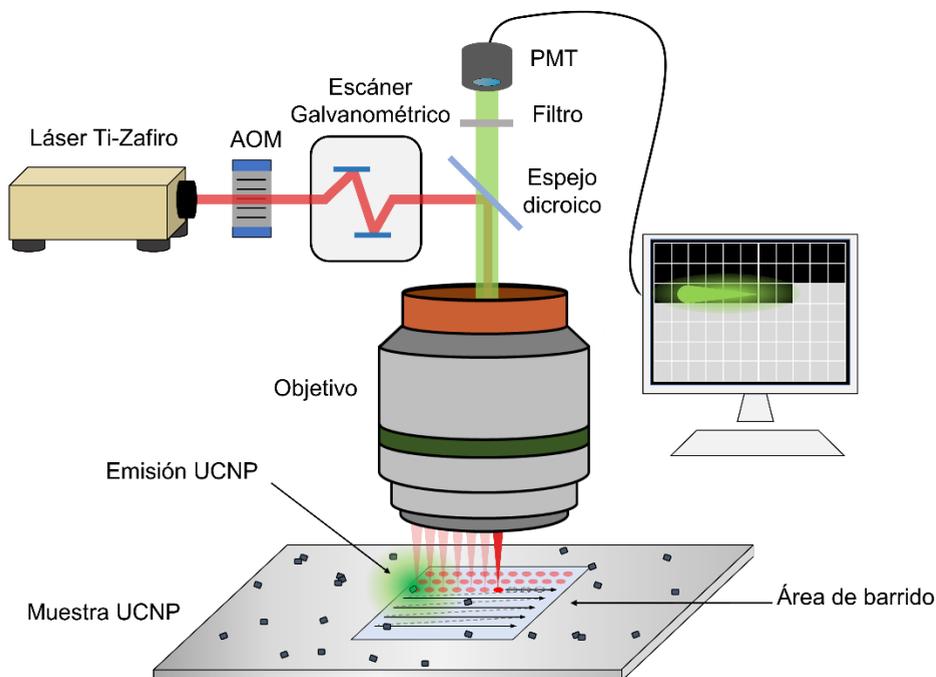


Figura 3.2. Esquema del microscopio multifotón FV1000MPE y fundamento del NIR-LSM. Reproducido de ⁴¹ con permiso de Royal Society of Chemistry.

En la figura 3.2 se representa un esquema del equipo. Como fuente de excitación utiliza un láser de Ti-zafiro que permite sintonizar la longitud de onda

Capítulo 3. Microscopía de barrido de láser NIR

de excitación entre 690 – 1040 nm. Además, presenta una potencia promedio de 2,0 W, anchura de pulso de 100-150 fs y una frecuencia de 80 MHz (12,5 ns entre pulsos). La potencia del láser puede ser modificada mediante un modulador óptico-acústico (AOM, por sus siglas en inglés), que consiste en un cristal transparente en contacto con un transductor piezoeléctrico que genera ondas sonoras capaces de modificar el índice de refracción del cristal (efecto acusto-óptico).⁴² El AOM está calibrado para seleccionar en el software la transmisión del AOM (en porcentaje). A continuación, el haz de láser pulsado llega hasta la unidad de barrido galvanométrica (escáner galvanométrico), que utiliza dos espejos motorizados para realizar el barrido en las coordenadas x e y (2D). El patrón de barrido podrá definirse por el usuario en el software y puede ser continuo o discontinuo, aunque generalmente se utiliza el barrido discontinuo por líneas, y la velocidad a la que se realiza el barrido se controla mediante el tiempo de permanencia por píxel o *dwell time* (2, 4, 8, 10, 12.5, 20, 40, 100 y 200 μ s/píxel). Posteriormente, el haz láser llega a un espejo dicróico que refleja la excitación hacia el objetivo y transmite la emisión visible a los detectores. En este caso el objetivo es de x25 y de inmersión en agua (Olympus XLPLN25x WMP 1.05NA), con una distancia de trabajo de 2 mm. La altura del objetivo sobre la muestra debe manipularse hasta enfocar el plano en el que se encuentran las NP (trabajamos con muestras 2D discontinuas). La emisión de la muestra se recoge a través del mismo microscopio y se detecta directamente mediante un sistema de filtros y dicróicos utilizando como detectores fotomultiplicadores (PMT). En la imagen solo se representa un PMT, aunque realmente el equipo presenta 4 PMT que permiten la detección simultánea de la emisión en 4 canales: 420-500 nm (canal 1, C1), 515-580 nm (canal 2, C2), 590-650 nm (canal 3, C3) y 660-740 nm (canal 4, C4). En función de la cantidad de fotones que lleguen al PMT, éste generará una intensidad de corriente que será digitalizada en el ordenador asignándole un valor de intensidad entre 0-4095 unidades (12 bits) al píxel. La imagen final se obtendrá por la detección de intensidades de emisión píxel a píxel. Así, se obtiene una matriz que contiene las intensidades de cada píxel en función

de las coordenadas de los ejes x e y, que se digitaliza en forma de una imagen en escala de grises.⁴³ Posteriormente, la escala de grises puede ser sustituida artificialmente por otros colores.

Además, el software permite controlar la sensibilidad de cada PMT individualmente mediante el ajuste individual del voltaje aplicado, la definición manual del nivel de ruido de fondo (*offset*) o amplificar señales mediante el ajuste de la ganancia. El área de barrido puede modificarse, desplazando manualmente la muestra bajo el microscopio con un soporte XY de microscopía. También puede hacerse una ampliación de una sección de la imagen (zoom: x1 - x50). El tamaño de píxel puede modificarse en función de la resolución de píxeles seleccionada (64x64, 128x128, 256x256, 320x320, 512x512, 640x640, 800x800, 1024x1024, 1600x1600, 2048x2048 o 4096x4096 píxeles²) y el zoom.

En definitiva, se trata de un microscopio vertical multifotón convencional con detección directa. En este tipo de equipos, los parámetros que podemos modificar son: la potencia de excitación, la longitud de onda de excitación, el patrón de barrido, el *dwell time*, el área de barrido, el ajuste del plano de foco, la sensibilidad de los detectores y el tamaño de píxel.

3.3.2. Resolución temporal con NIR-LSM

Generalmente, la resolución espectral y temporal de las emisiones UC se registra en equipos diseñados específicamente para estos procesos (por ejemplo, el FLS1000, FluoTime300®, Picoquant o Fluorolog-3) o bien se adaptan fluorímetros convencionales con fuentes de excitación de diodo láser continuos (*continuous wave*, CW) de NIR acoplados a un sistema de activación (*triggering system*; como una hélice giratoria o *chopper*), que pulsan el láser para obtener cinéticas.⁴⁴ En ambos sistemas, la resolución espectral se consigue mediante un monocromador y la resolución temporal vendrá definida por la frecuencia de repetición y la anchura de pulso del láser. Estos equipos permiten registrar

medidas macroscópicas en muestras sólidas, líquidas y de capa delgada (*film*). Por tanto, aunque la respuesta de la muestra es estable y robusta, es un promedio macroscópico de toda la muestra excitada. En el caso de muestras convencionales, como fluoróforos purificados, esta respuesta promedio no es relevante, sin embargo, no ocurre lo mismo para las NP. Pequeños cambios en tamaño o de distribución de los dopantes en las UCNP de una muestra o lote (*batch*) de UCNP, generan propiedades fotofísicas diferentes.^{45,46} Por ello, las medidas macroscópicas registradas en fluorímetros no pueden ser atribuidas a cada UCNP, hasta que otras técnicas de caracterización (como TEM, HRTEM, EDX, DLS, ICP, ...) demuestren la homogeneidad de la muestra en tamaño y dopaje.

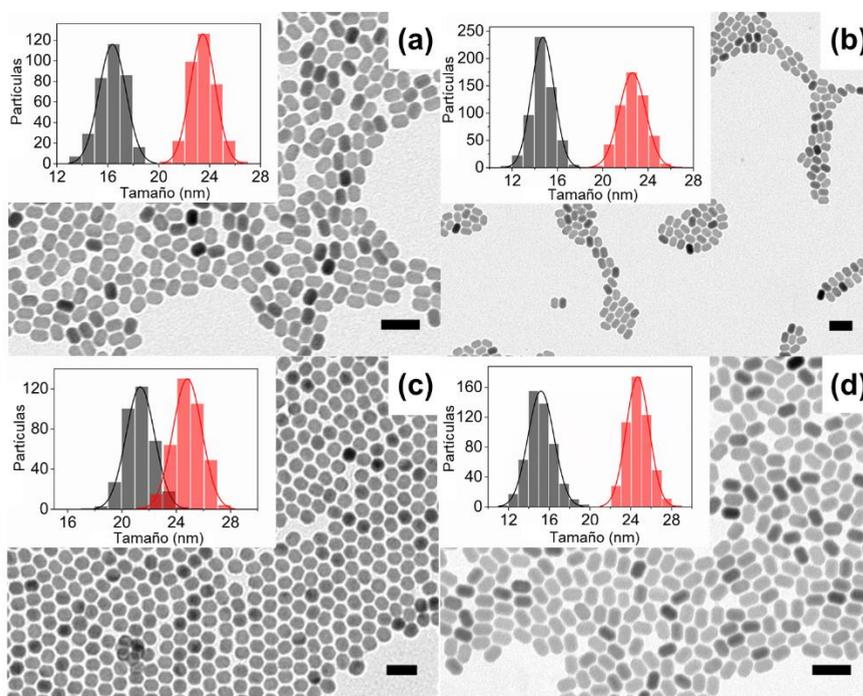


Figura 3.3. Imágenes TEM e histogramas de tamaño en largo (rojo) y ancho (gris) de (a) UC_{Er,2}, (b) UC_{Er,20}, (c) UC_{Ho} y (d) UC_{Tm}. Barra de escala: 50 nm. Reproducido de ⁴¹ con permiso de Royal Society of Chemistry.

Al contrario que las técnicas espectroscópicas convencionales, NIR-LSM es una técnica de microscopía que nos permite obtener los tiempos de vida empíricos de muestras de UCNP y UCNH, así como evaluar su homogeneidad en la escala nano/micrométrica.⁴¹ Para demostrar la resolución temporal de la técnica NIR-LSM, se sintetizan cuatro muestras monodispersas diferentes de UCNP con tamaños similares (≈ 24 nm; figura 3.3) pero con propiedades emisivas diferentes (figura 3.4.a-c):

- UC_{Er,2}: β -NaYF₄:Yb³⁺(20%),Er³⁺(2%)
- UC_{Er,20}: β -NaYF₄:Yb³⁺(20%),Er³⁺(20%)
- UC_{Ho}: β -NaYF₄:Yb³⁺(20%),Ho³⁺(1%)
- UC_{Tm}: β -NaYF₄:Yb³⁺(20%),Tm³⁺(0,1%)

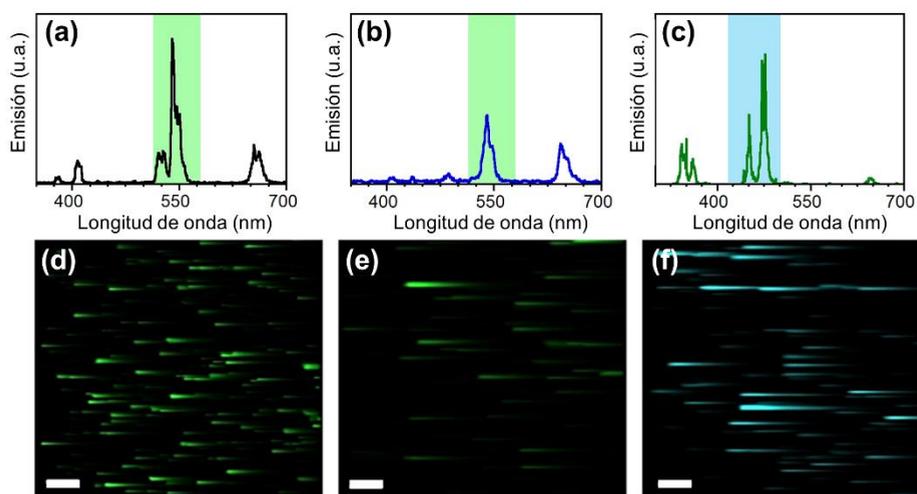


Figura 3.4. Espectros de emisión de dispersiones de 1 mg/mL en tolueno de (a) UC_{Er,2}, (b) UC_{Ho} y (c) UC_{Tm} ($\lambda_{exc} = 975$ nm; $I = 93$ W/cm²). Los cuadros coloreados indican los canales de detección (C1 en azul y C2 en verde) donde se registran las imágenes NIR-LSM de (d) UC_{Er,2}, (e) UC_{Ho} y (f) UC_{Tm} ($\lambda_{exc} = 975$ nm; $F_d = 0,2$ J/cm²). Escala: 50 μ m. Reproducido de ⁴¹ con permiso de Royal Society of Chemistry.

En la figura 3.4 se muestran las imágenes obtenidas con NIR-LSM para muestras 2D discontinuas de grupos de UCNP cercanas y aglomerados en los canales de detección donde se registra la banda más intensa de cada nanopartícula: (i) C2 y *dwell time* de 2 $\mu\text{s}/\text{píxel}$ para $\text{UC}_{\text{Er},2}$, $\text{UC}_{\text{Er},20}$ y UC_{Ho} , y (ii) C1 y *dwell time* de 4 $\mu\text{s}/\text{píxel}$ para UC_{Tm} .

Las colas que aparecen en la dirección de barrido –similares a estrellas fugaces– ocurren por la detección de la emisión fuera de eje, una vez el láser ha pasado sobre un aglomerado en la dirección del eje x. Esta aparente desventaja que impide la obtención de imágenes definidas^{30,47,48} es, de hecho, una ventaja para obtener información sobre la evolución temporal de la emisión de la UCNP tal y como ha descrito el grupo de investigación.^{41,49–51}

El fundamento de NIR-LSM resuelta en el tiempo se explica visualmente en la figura 3.5, en la que se observa la imagen de la emisión de un aglomerado de $\text{UC}_{\text{Tm}}@Rod110$, esto es, un UCNH donde se ha funcionalizado la UC_{Tm} con un colorante: la rodamina 110 (Rod110). La figura 3.5.a es una imagen compuesta donde se han fusionado dos imágenes simultáneas de la misma área de dos canales de emisión diferentes excitando a 975 nm (4 $\mu\text{s}/\text{píxel}$). Las bandas emisivas de la UCNP centradas en 450 y 475 nm se registran en el C1 y han sido artificialmente coloreadas en azul, mientras que la emisión de la Rod110 anclada a la superficie de la NP y excitada vía 2PE se registra en el C2 y ha sido coloreada en verde. La emisión del colorante revela información sobre la localización espacial del aglomerado e indica además dónde tiene lugar la excitación de la UCNP del UCNH (perfil rojo en figuras 3.5.b-c). En consecuencia, la excitación de la UCNP consiste en un tren de pulsos láser (*train of pulses/bursts*) determinados por la frecuencia del láser, la energía del láser por pulso, la velocidad de escaneo (*dwell time*), la longitud de onda del láser (spot del láser limitado por el límite de difracción) y el tamaño del aglomerado (si es superior al tamaño de píxel).

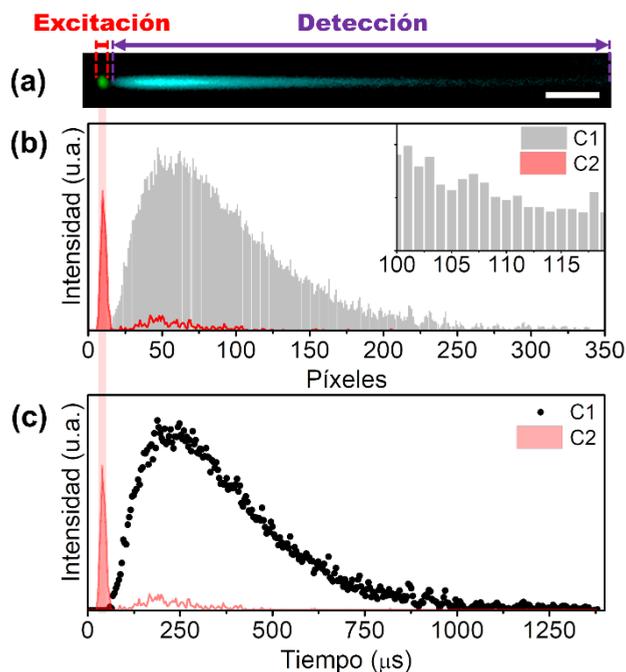


Figura 3.5. (a) Imagen de NIR-LSM del UCNH compuesta de la emisión de UC_{Tm} en el C1 (azul) y de la emisión por 2PE de Rod110 en el C2 (verde) ($\lambda_{exc}= 975$ nm; dwell time: 4 μ s/píxel). (b) Perfil de intensidad y (c) perfil cinético de la imagen (a). Reproducido de ⁴¹ con permiso de Royal Society of Chemistry.

Así, una vez el láser haya barrido en el eje x el aglomerado/grupo de NP cercanas, la sección inmediatamente posterior al aglomerado en la dirección de barrido constituye una ventana de detección en la que observar la emisión retardada de la UCNP (figura 3.5.a), siempre que no interfiera otro aglomerado, ya que la emisión fuera de eje está llegando al detector. Así, se observa la activación retardada y desactivación lenta de la emisión UC del Tm^{3+} en el C1 (perfil gris figura 3.5.b). De tal manera que los píxeles justo después del aglomerado/grupo de NP cercanas están actuando como intervalos temporales (*time gates*) consecutivos de duración temporal igual al *dwell time*. Por tanto, pueden obtenerse cinéticas de desactivación de la luminiscencia de los perfiles de

intensidad de las colas en la dirección del barrido transformando la escala espacial (μm) a escala temporal (μs) utilizando para ello el *dwell time* ($\mu\text{s}/\text{píxel}$) y el tamaño de píxel ($\mu\text{m}/\text{píxel}$) (figura 3.5.c).

En fluorímetros convencionales, la resolución temporal generalmente se consigue mediante la combinación de una fuente de excitación pulsada y un método de detección temporal, que para fluoróforos de tiempo de vida entre ps- μs suele ser TCSPC y para fluoróforos, como la UCNP, de tiempos de vida entre μs -s suele ser escalado multicanal (*multi-channel scaling*, MCS). El método MCS funciona de forma similar a como lo hace un osciloscopio: divide la ventana temporal en pequeños intervalos temporales (*time gates/bins*) y hace un barrido intervalo a intervalo consecutivamente detectando los fotones que llegan en cada uno hasta construir un histograma de la desactivación. De manera similar al método MCS, NIR-LSM actúa como un sistema de detección en intervalos temporales consecutivos en el que la cantidad de fotones se guarda en forma de intensidad de emisión en cada píxel (recuadro de la figura 3.5.b). Además, NIR-LSM también presenta un rango de resolución de tiempos de vida similar: estimamos que de 2 μs - 80 ms (véase sección 3.5.4. *Estimación de la resolución de tiempo de vida de NIR-LSM*), que solamente está limitado por el *dwell time* del escáner galvanométrico del microscopio. En nuestro caso estamos limitados a tiempos de permanencia entre 2 y 200 $\mu\text{s}/\text{píxel}$.

Debe tenerse en cuenta que las medidas realizadas en fluorímetros convencionales nos dan una respuesta macroscópica promedio y, por tanto, pueden reflejar o despreciar el tiempo de vida de las especies de vida con tiempos más largos, o bien revelar la heterogeneidad de la muestra en forma de desactivaciones multiexponenciales. Por ello, estas medidas sólo pueden atribuirse al nanomaterial si otras técnicas de caracterización demuestran su homogeneidad en la escala nanométrica. Por el contrario, la técnica NIR-LSM registra la luminiscencia de un espacio micrométrico de la muestra, que refleja la

respuesta nano/micrométrica de la muestra de UCNP o UCNH de manera más precisa que un fluorímetro.

En este sentido, también se han descrito técnicas de microscopía capaces de medir tiempos de vida largos en microscopios de campo ancho, confocales o multifotónicos, usando técnicas de detección en el dominio de la frecuencia o en el dominio temporal y que han sido descritas detalladamente por Zhang *et al.*²¹ y Baggaley *et al.*⁵². Con fines comparativos, nos centraremos únicamente en técnicas que utilicen MC y MM y métodos de detección en el dominio temporal. De forma general, para registrar cinéticas largas se requiere una fuente de excitación de baja frecuencia y un sistema de detección sensible con una ventana temporal amplia que permita observar la desactivación de la emisión entre los pulsos de excitación. La técnica por excelencia es PLIM, que utiliza un microscopio confocal y una fuente de excitación láser pulsada en el UV-vis. En cada píxel, se excita utilizando un pulso o tren de pulsos durante un periodo de tiempo breve, seguido de un tiempo largo de detección, pues pretende registrar la desactivación completa de la emisión en cada píxel. Posteriormente, mediante un ajuste de las cinéticas de cada píxel, nos representa una imagen en la que el contraste viene dado por el tiempo de vida del emisor.²⁰ Por ello, los tiempos de adquisición de imágenes son largos, pues los *dwell time* están limitados al menos a diez veces el tiempo de vida del emisor (ventana temporal óptima para observar la desactivación de la emisión). NIR-LSM, por el contrario, requiere unos pocos segundos en el registro de los tiempos de vida (de 2 s a 2 μ s/píxel y de 20 s a 200 μ s/píxel para una imagen de 1024x1024 píxeles).

En el caso de MM se han utilizado dos estrategias para salvar la incompatibilidad de los láseres de alta frecuencia (80 MHz) y los emisores de tiempos de vida largos, bien reducir la frecuencia del láser, o excitar con un tren de pulsos láser (*bursts*) seguido de un tiempo de detección sin excitación durante el *dwell time*.⁵² La primera estrategia puede llevarse a cabo trabajando con el láser en modo de vaciado de cavidad (*cavity dumped mode*), que reduce la

frecuencia pero incrementa la energía por pulso.⁵² La segunda necesita una hélice giratoria (*chopper*)⁵³ o un modulador óptico (electrónico, EOM, o acústico, AOM)^{54,55} y la detección puede realizarse mediante TCSPC multiparada o MCS. La segunda aproximación parece ser mucho más interesante pues evita la aparición de patrones de interferencia (patrones Moiré) en la imagen²⁰, así como efectos térmicos o de saturación por la elevada energía del pulso láser⁵². De hecho, esta técnica ha permitido obtener imágenes detectando simultáneamente fluorescencia y fosforescencia,⁵⁶ e imágenes del flujo del oxígeno y la sangre.⁵⁵ Destacan dos trabajos complementarios que permiten adaptar MC y MM para conseguir resoluciones temporales: imagen de tiempo de vida por desplazamiento del *pinhole* (PSLIM: *pinhole shifting lifetime imaging*)⁵⁷ e imagen de tiempo de vida por muestreo temporal (TSLIM: *temporal sampling lifetime imaging*).⁵⁸ En PSLIM se registran diferentes tiempos de emisión mediante un desplazamiento del *pinhole* que permite detectar emisiones más largas que *dwell time*. Sin embargo, esta estrategia imposibilita una adquisición continua de la desactivación de la emisión y limita el número de puntos experimentales, lo que se traduce en una cinética de desactivación poco precisa. En TSLIM, en cambio, se excita utilizando la función de blanqueamiento en un solo punto (*single spot bleaching*) del microscopio para, posteriormente, registrar la desactivación de la emisión en cada píxel. La principal desventaja del TSLIM es la lenta adquisición de la imagen. Aunque este problema puede ser parcialmente resuelto utilizando un sistema confocal de barrido de detección en línea, que permite analizar una línea (eje x de la imagen al completo) simultáneamente.

De manera similar a la estrategia PSLIM, NIR-LSM también está basada en la detección de la emisión fuera de eje. Sin embargo, en nuestro caso queremos reflejar esa emisión en la imagen en forma de colas. Así, las imágenes obtenidas no deben ser entendidas como imágenes convencionales de microscopía de fluorescencia sino como información de la evolución temporal de la emisión en la dirección de escaneo, eje x. Como era de esperar, al disminuir la velocidad de

barrido (aumentar el *dwell time*) las colas de luminiscencia UC se acortan (figura 3.6.a) y el máximo de emisión se desplaza a valores más pequeños en el eje x (figura 3.6.b). La figura 3.6.d muestra las cinéticas obtenidas de las colas registradas a diferentes tiempos de permanencia. Como se observa, todas las cinéticas presentan un comportamiento similar independientemente del *dwell time*, lo que corrobora que las colas de emisión observadas en la imagen se deben inequívocamente al tiempo de vida de desactivación de luminiscencia UC de la UCNP.

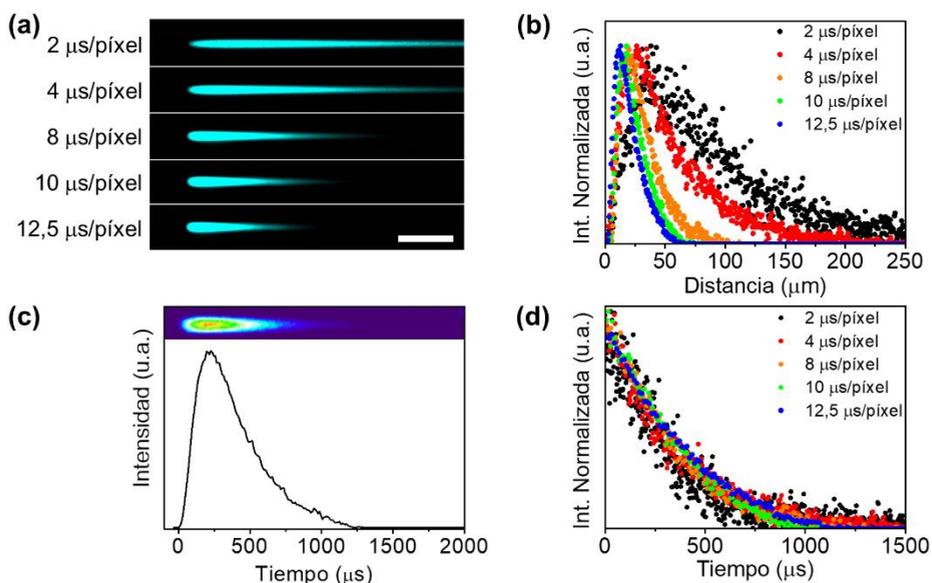


Figura 3.6. (a) Imagen de NIR-LSM y (b) perfiles de intensidad del mismo aglomerado de UC_{Tm} a distintos *dwell time* en C1 ($\lambda_{exc}= 975 \text{ nm}$; $F_d = 5,2\text{-}32,6 \text{ J/cm}^2$). Escala $50 \mu\text{m}$. (c) Imagen del aglomerado de UC_{Tm} a $10 \mu\text{s/pixel}$ ($\lambda_{exc}= 975 \text{ nm}$; $F_d = 26,0 \text{ J/cm}^2$) y su correspondiente perfil cinético. (d) Perfiles de desactivación de las imágenes de (a). Reproducido de ⁴¹ con permiso de Royal Society of Chemistry.

Sin embargo, se observó que mientras los tiempos de activación son muy sensibles a la posición del foco y cambios pequeños en el enfoque se traducen en una gran divergencia de resultados, los tiempos de desactivación son bastante

estables. Por ello, la técnica NIR-LSM sirve para obtener el tiempo de vida empírico de desactivación de emisiones UC. Nótese que el tiempo de vida empírico es diferente del tiempo de vida intrínseco del nivel del activador que produce la emisión UC, dado que la manera en que se alimenta un estado emisor puede influenciar enormemente su tiempo de vida.⁵⁹ La técnica también permite realizar comparaciones de las cinéticas de desactivación de diferentes muestras UCNP o UCNH, o diferentes tratamientos de muestra siempre que se exciten con la misma energía, lo que implica utilizar el mismo tamaño de píxel y *dwell time* (véase sección 3.5.5. *Estimación de la energía de excitación*). Posteriormente, en el caso de distintos tratamientos de una misma muestra (como recubrimientos inorgánicos o intercambio de ligandos en superficie), puede recurrirse a pruebas de significación estadística, como la t de Student, para demostrar la diferencia o igualdad estadística de los resultados.

Así, las cinéticas de desactivación de $UC_{Er,2}$, $UC_{Er,20}$, UC_{Ho} y UC_{Tm} muestran la activación lenta y desactivación larga característica de las UCNP tras ser excitadas en el NIR (figura 3.7). Los tiempos de vida de desactivación se obtuvieron ajustando las cinéticas a una ecuación monoxponencial. Como cabía esperar, el tiempo de vida de la $UC_{Er,20}$ presentó un tiempo de vida más corto que $UC_{Er,2}$ (22 μ s vs. 68 μ s), pues una concentración tan elevada de Er^{3+} favorece relajaciones cruzadas (*cross-relaxations*) entre átomos de Er^{3+} adyacentes, causando la desactivación (*quenching*) de la emisión UC.⁶⁰

Los tiempos de vida más largos se obtuvieron en las nanopartículas dopadas con Tm^{3+} , seguidas por las dopadas con Ho^{3+} y las de Er^{3+} , registrándose tiempos de vida similares a los reportados en estudios previos.⁶¹⁻⁶⁶ Además, NIR-LSM permite el análisis de varios aglomerados/grupos de UCNP cercanas e inferir la homogeneidad del dopaje a través de la homogeneidad en el tiempo de vida de los aglomerados/grupos de UCNP cercanas que componen la muestra. La figura 3.8 muestra el análisis de las cinéticas de emisión de distintas colas dentro de una misma imagen del C1 de la muestra $UC_{Tm}@Rod110$ (figura 3.8.a). Mientras que

las diferencias en las intensidades de las colas se asocian a un mayor o menor tamaño de los aglomerados o a mayor o menor concentración de UCNP adyacentes cercanas, la homogeneidad en la cinética de desactivación se hace patente al normalizar su respuesta, indicándonos un dopaje homogéneo dentro de cada UCNP (figura 3.8.b).

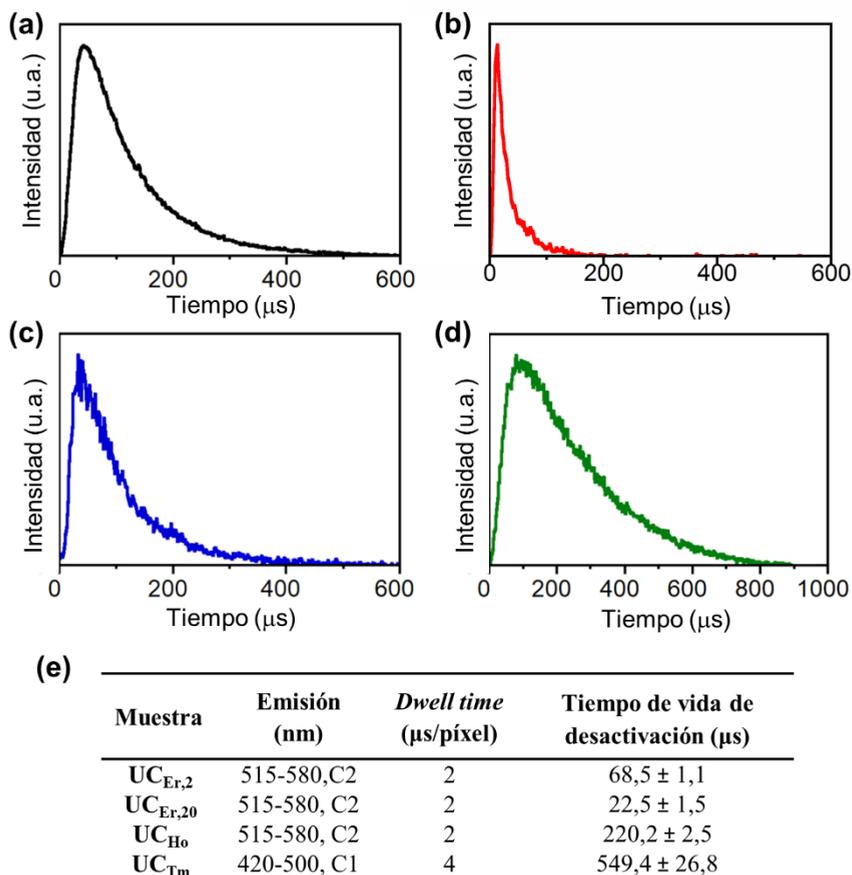


Figura 3.7. Perfiles cinéticos en el C2 de (a) UC_{Er,2}, (b) UC_{Er,20}, (c) UC_{Ho} y en el C1 (d) de UC_{Tm} ($\lambda_{exc} = 975 \text{ nm}$; $F_d = 0,2 \text{ J/cm}^2$). (e) Tiempos de vida de desactivación de luminiscencia obtenidos mediante un ajuste monoexponencial. Reproducido de ⁴¹ con permiso de Royal Society of Chemistry.

Por ello, frente a las técnicas espectroscópicas convencionales (fluorímetro), la NIR-LSM resuelta en el tiempo aporta información en la escala micrométrica

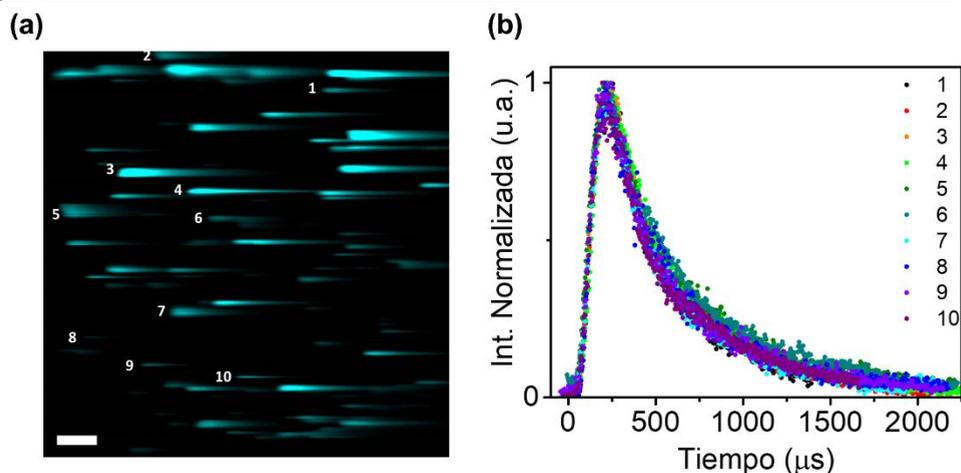


Figura 3.8. (a) Imagen de NIR-LSM del C1 de UC_{Tm}@Rod110 ($\lambda_{exc} = 975 \text{ nm}$; $F_d = 0,9 \text{ J/cm}^2$) y (b) perfiles cinéticos normalizados de los aglomerados numerados en (a). Escala $50 \mu\text{m}$. Reproducido de ⁴¹ con permiso de Royal Society of Chemistry.

(área de barrido de las imágenes mostradas: $508,4 \times 508,4 \mu\text{m}^2$; tamaño de píxel: $497 \times 497 \text{ nm}^2$), de tal manera que la señal observada podrá deberse a aglomerados de UCNP o un grupo de UCNP adyacentes cercanas y, por tanto, reflejará de manera más precisa la homogeneidad de la respuesta temporal de una muestra de UCNP. Debe tenerse en cuenta que la formación de aglomerados es, generalmente, inevitable cuando una gota de coloide se deposita en un sustrato y se deja secar, aunque originalmente sea una dispersión no aglomerada.⁶⁷ Por otro lado, frente a las técnicas de microscopía de imagen, NIR-LSM es una técnica de caracterización espectroscópica en la que la resolución temporal no se logra mediante una metodología de detección en el dominio temporal o en el dominio de la frecuencia, sino mediante el barrido de un área microscópica a una velocidad mayor que el tiempo de vida de emisión del emisor. Por tanto, la resolución espacial y los tiempos de adquisición de imagen no son factores limitantes para NIR-LSM, sino que la emisión fuera de eje del emisor encaje en la línea de barrido. Además, frente a técnicas como PSLIM o TSLIM, la espectroscopía

NIR-LSM puede implementarse en un MM convencional sin tener que realizar ninguna modificación y sin conocimiento técnico en electrónica y modulación de láseres.

Sin embargo, la técnica no está exenta de desventajas. La principal radica en la representatividad de la medida. La muestra observada por NIR-LSM se prepara mediante centrifugación (*spin-coating*) de una alícuota (microlitros) de una dilución de la muestra original sobre un portaobjetos de microscopio. Así que, surge la siguiente duda: ¿la imagen micrométrica observada en el microscopio es realmente representativa de mi muestra de UCNP/UCNH? La representatividad es un problema común en todas las técnicas de microscopía y sólo puede ser abordada en términos de repetibilidad y en combinación con otras técnicas. De tal manera, que las medidas registradas mediante NIR-LSM dependen de otras técnicas de caracterización, de la misma manera que las medidas macroscópicas obtenidas en fluorímetros. Además, las medidas únicamente pueden implementarse en muestras 2D sólidas discontinuas, por lo que se ignora el efecto del disolvente. También, aunque la preparación de las muestras no es complicada y solo requiere unos pasos previos de optimización, requiere más tiempo que la medida de tiempo resuelta en un fluorímetro, así como la evaluación de los datos (si bien, es muy probable que este último aspecto pueda ser automatizado con un software de análisis de imagen).

3.3.3. Evaluación de la homogeneidad de la funcionalización: colocalización en UCNH

La homogeneidad en la funcionalización de los nanomateriales es de suma importancia, ya que afectará a la dispersabilidad, la citotoxicidad y las interacciones fisicoquímicas con su entorno, especialmente de cara a potenciales aplicaciones biológicas.⁶⁸ Sin embargo, es muy difícil de evaluar. La dificultad radica en que, por un lado, existen técnicas de microscopía de alta resolución capaces de aportar información morfológica de los nanomateriales (como TEM,

microscopía de fuerza atómica (AFM) o microscopía de efecto túnel (STM)), y, por otro lado, existen técnicas de espectroscópicas que caracterizan la composición del recubrimiento de materiales volumétricos (RMN, FTIR, MS).⁶⁹ De tal manera, que la homogeneidad del recubrimiento se infiere a partir de valores promedios macroscópicos, que pueden no reflejar el recubrimiento real (distribución de ligandos) en la escala nanométrica. Por ello, se están realizando grandes esfuerzos para tratar de analizar directamente la homogeneidad del recubrimiento mediante técnicas de dispersión de luz (DLS), métodos electroforéticos, espectroscopía electroacústica, dispersión de neutrones de ángulo pequeño (SANS) o AFM.⁶⁸ Sin embargo, la manera más efectiva de evaluar el recubrimiento de ligandos parece ser la combinación de métodos de microscopía con técnicas de caracterización convencionales.^{68,69} De hecho, ya se han propuesto algunas combinaciones, como AFM-AFS, AFM-SCEM o AFM-IR.⁶⁸

En este sentido, queríamos aportar otra técnica complementaria que permitiera inferir la homogeneidad del recubrimiento en la escala micro/nanométrica, basándonos en el análisis de colocalización de imágenes obtenidas con NIR-LSM. La colocalización es el análisis de la distribución de señales en microscopía de fluorescencia y engloba dos componentes: la coocurrencia, que es la superposición espacial de dos señales, y la correlación, que es la proporcionalidad entre la codistribución de las intensidades de las dos señales.^{70,71} Impulsados por el desarrollo del análisis de imagen de microscopía durante los últimos 20 años,^{70,72,73} nos interesamos en aplicar este conocimiento para evaluar la homogeneidad de las muestras de UCNH. Se han descrito múltiples coeficientes o parámetros para cuantificar la colocalización, así como pruebas (*test*) de significancia estadística. Los parámetros más usados son el coeficiente de correlación Pearson (PCC), que cuantifica exclusivamente la correlación de dos señales, y los coeficientes de colocalización de Mander (MCC), que miden fundamentalmente la coocurrencia independientemente de la proporcionalidad de

las señales (emisiones).⁷⁰ Alternativamente, se han propuesto otros coeficientes y enfoques (Li, Van Steensel, Spearman, Lachmanovich, Boutté, Jaskolski).⁷² También existen diferentes pruebas para evaluar la significancia estadística de los resultados para un único grupo experimental. Los métodos más apropiados son el método aleatorio de Costes (*scrambling of Costes' approach*) y el método de traslación del fotograma (*frame-translation approach*), ya que ambos se basan en la comparación de los coeficientes obtenidos para las imágenes de estudio con los obtenidos para un gran número de reordenaciones aleatorias de las imágenes.^{70,74,75} Sin embargo, se ha descrito que el método de traslación del fotograma genera distribuciones de probabilidad aleatorias más precisas.⁷⁵ Por tanto, calcularemos los coeficientes PCC y MCC para evaluar la homogeneidad de las muestras y utilizaremos el método de traslación del fotograma para comprobar la significancia estadística de los resultados.

La técnica NIR-LSM puede ser útil para estudios de colocalización aprovechando la modulación de longitudes de onda, de 690 a 1040 nm del láser NIR de excitación, y los distintos canales de detección. La banda de absorción del Yb^{3+} de la UCNP es estrecha y presenta un máximo a 975 nm, por lo que podemos excitar a la UCNP en un rango pequeño de longitudes de onda cercanas al máximo. Por el contrario, los colorantes pueden ser excitados bifotónicamente en un rango más amplio, que nos permite excitarlos a una longitud de onda diferente a la utilizada para excitar a la UCNP. Por lo tanto, concebimos que la homogeneidad de las muestras podría ser evaluada comparando dos imágenes de la misma área: una excitando a la UCNP y otra excitando al fluoróforo o especie fotoactiva anclada a la superficie de la UCNP. Para demostrar la versatilidad de la técnica, el estudio se realizó con dos UCNH ($\text{UC}_{\text{Tm}}@Rod101$ y $\text{UC}_{\text{Tm}}@Rod110$) compuestos de UC_{Tm} y dos rodaminas diferentes, específicamente se utilizaron la rodamina 101 (Rod101) y la rodamina 110 (Rod110), las cuales presentan diferentes propiedades fotofísicas (figuras 3.9.a-b). El UCNH se depositó en portaobjetos de microscopía y se registraron

imágenes de la misma área excitando al colorante y a la UCNP. En este caso la imagen excitando a la UCNP debe realizarse con *dwell time* muy elevados (100-200 $\mu\text{s}/\text{píxel}$) de tal manera que no se aprecien las colas con el fin de favorecer la definición de los aglomerados (figuras 3.9.c-d), ya que, de otra manera, la correlación y coocurrencia podrían sobreestimarse. Aun así, es inevitable que la imagen de UCNP presente cierta borrosidad (*blur*) que incrementa su área de emisión en comparación con la del colorante (figura 3.10), puesto que no tenemos un *pinhole* que elimine la luz fuera de foco. Las imágenes obtenidas excitando vía 2PE a los colorantes (a 1030 y 1020 nm para Rod101 y Rod110, respectivamente) presentan formaciones puntuales bien definidas independientemente del *dwell time* utilizado (figuras 3.9.e-f). Esto es consistente con el tiempo de vida de fluorescencia de los colorantes (de nanosegundos) y, por tanto, irresoluble mediante NIR-LSM (véase sección 3.5.4. *Estimación de la resolución de tiempo de vida de NIR-LSM*). La superposición de las imágenes para cada UCNH ya indica cierto grado de colocación espacial (en las figuras 3.9.g-h el color amarillo indica la superposición de señales).

Para cuantificar la colocación se calculó el PCC y MCC, para cada muestra. Por un lado, los valores obtenidos de PCC mostraron una correlación razonablemente buena y significativa estadísticamente (0,517 y 0,651 para $\text{UC}_{\text{Tm}}@Rod101$ y $\text{UC}_{\text{Tm}}@Rod110$, respectivamente). En análisis de imagen de fluorescencia normalmente es posible calcular la ratio o estequiometría entre las distintas señales, sin embargo, no es tan trivial cuando comparamos la emisión de una NP y un colorante, dada su diferente naturaleza. Además, aunque la correlación indica una importante proporcionalidad entre ambas señales, no es tan intuitiva como como la coocurrencia, que indica el grado de superposición entre las señales y que se mide con el índice MCC. Debe tenerse en cuenta que los MCC son dos valores: por un lado, el grado de superposición de la emisión de la UCNP con el colorante (M1) y, por otro, el grado de superposición de la

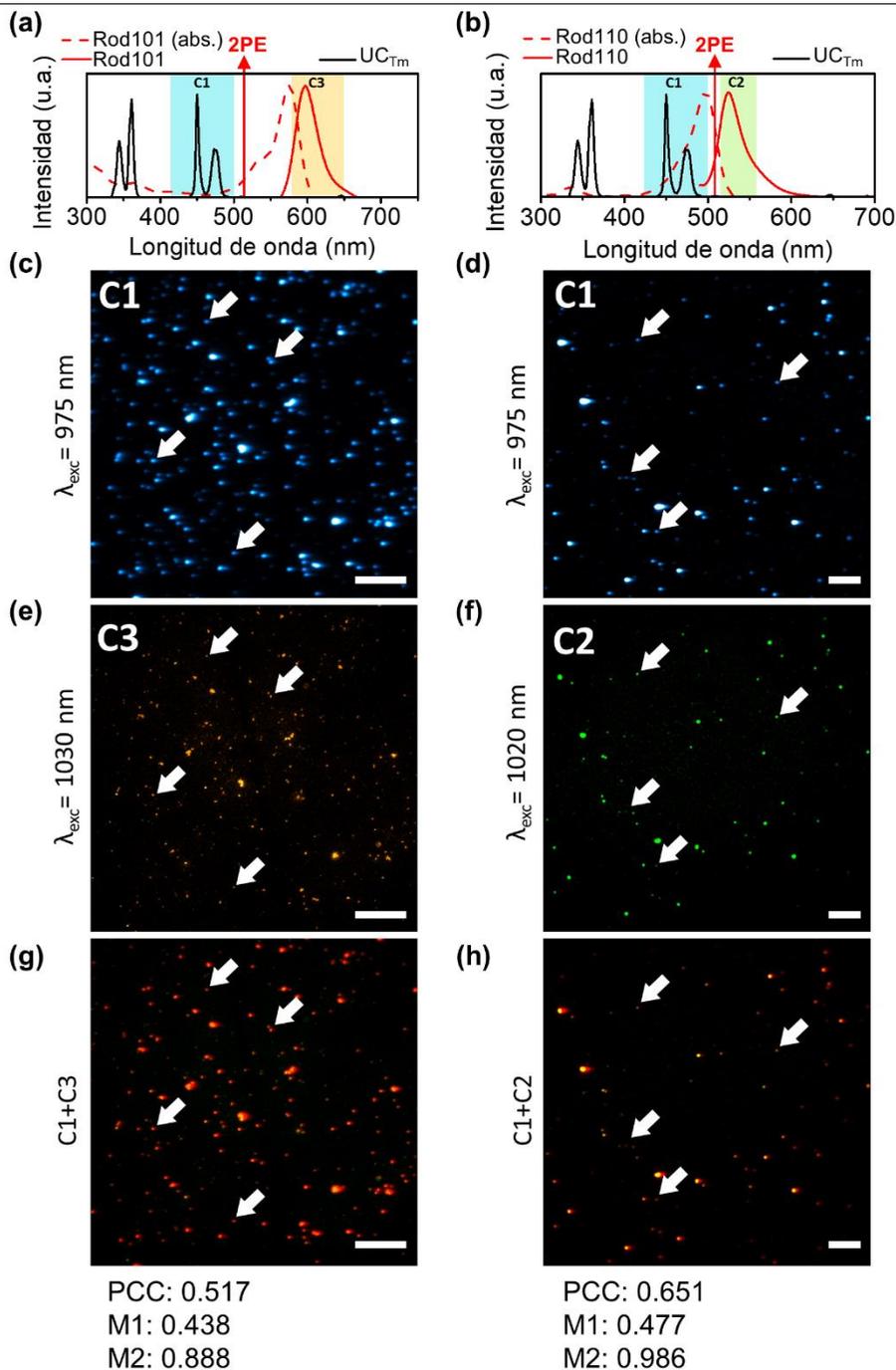


Figura 3.9. Propiedades espectrales de los UCNH: (a) $UC_{Tm}@Rod101$ y (b) $UC_{Tm}@Rod110$, se muestra la absorción (línea roja discontinua) y emisión (línea

Capítulo 3. Microscopía de barrido de láser NIR

continua roja) de una disolución acuosa del colorante, así como la emisión de una dispersión acuosa de 2 mg/mL de UC_{Tm} (línea negra), la longitud de onda usada para la 2PE del colorante (flecha roja) y los canales de detección (cuadros coloreados). Imágenes de NIR-LSM de UC_{Tm}@Rh101 excitando a (c) 975 nm (dwell time: 100 μs/píxel; F_d = 218,5 J/cm²), (e) 1030 nm (dwell time: 12,5 μs/píxel; F_d = 27,5 J/cm²) y (g) la combinación de ambas imágenes. Imágenes de NIR-LSM de UC_{Tm}@Rod110 excitando a (d) 975 nm (dwell time: 100 μs/píxel; F_d = 260,5 J/cm²), (f) 1020 nm (dwell time: 2 μs/píxel; F_d = 4,4 J/cm²) y (h) la combinación de ambas imágenes. Escala 50 μm. Reproducido de ⁴¹ con permiso de Royal Society of Chemistry.

emisión del colorante con la de la UCNP (M2). De esta manera, se obtienen para M2 valores significativos estadísticamente entre 0,9-1,0 (0,888 y 0,986 para UC_{Tm}@Rod101 y UC_{Tm}@Rod110, respectivamente), lo que indica que ≈ 90 % de la señal del colorante coocurre o solapa con la señal de la UCNP. Se trata, por tanto, de un resultado relevante que claramente demuestra que la distribución del colorante en el portaobjetos del microscopio se debe a una interacción real con la UCNP y no a una distribución aleatoria. De otra manera, el colorante se habría distribuido aleatoriamente sobre el portaobjetos. Por el contrario, los valores significativos estadísticamente obtenidos para M1 estuvieron ambos entre 0,4-0,5 (0,438 y 0,477 para UC_{Tm}@Rod101 y UC_{Tm}@Rod110 respectivamente), ya que M1 refleja el hecho de que el área de cada aglomerado de UCNP en la imagen sea mayor que el área del colorante (figura 3.10). Por tanto, el parámetro M1 parece ser inadecuado para describir el grado de homogeneidad en la funcionalización de los UCNP, a menos que utilice una técnica confocal que elimine la luz fuera de foco de la emisión UC (añadiendo un *pinhole* antes de la detección).³⁰

En resumen, se ha demostrado que los coeficientes PCC y MCC pueden ser una fuente de información adicional sobre la colocalización y coocurrencia de especies fotoactivas funcionalizadas sobre UCNP. Si bien, es cierto que no nos permite evaluar el grado o la densidad de funcionalización por nanopartícula.⁶⁸

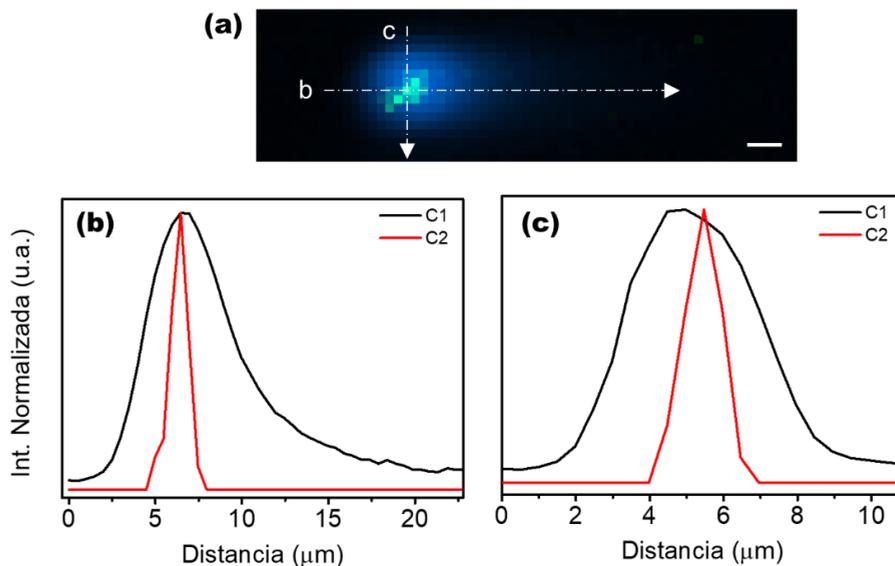


Figura 3.10. (a) Detalle de la imagen de NIR-LSM compuesta del C1 excitando a 975 nm (dwell time: 100 $\mu\text{s}/\text{p\xi\text{e}l}$; $F_d = 260,5 \text{ J}/\text{cm}^2$), en azul, y del C2 excitando a 1020 nm (dwell time: 2 $\mu\text{s}/\text{p\xi\text{e}l}$; $F_d = 4,4 \text{ J}/\text{cm}^2$), en verde, de un aglomerado aleatorio de UC_{Tm}@Rod110. Perfiles de intensidad en (b) la direcci3n del barrido y (c) transversal a la direcci3n de barrido en cada canal. Reproducido de ⁴¹ con permiso de Royal Society of Chemistry.

3.4. Conclusión

La técnica NIR-LSM resuelta en el tiempo permite:

- caracterizar en la escala micrométrica los tiempos de vida de NP adyacentes/aglomerados de UCNP/UCNH. Si bien, si se pretenden realizar estudios comparativos de diferentes muestras de UCNP, debe utilizarse la misma energía de excitación.
- evaluar la homogeneidad del dopaje en base a la homogeneidad de los tiempos de vida de desactivación de luminiscencia.
- evaluar la homogeneidad en la funcionalización de UCNH con especies fotoactivas.

La técnica NIR-LSM podría ser incluso más útil si se realizasen modificaciones en el equipo que permitieran la resolución espectral de cada banda de UC, se utilizase un *pinhole* antes de la detección (mejoraría los estudios de colocalización), mayor versatilidad de *dwell time* (ampliaría la resolución de tiempos de vida de la técnica), detección *downconversion* en el NIR (permitiría ver los tiempos de vida del Yb^{3+} y realizar estudios cinéticos completos) y que se pudiera combinar con otras fuentes de excitación (láseres UV-vis o lámparas de Xe).

3.5. Procedimiento experimental

3.5.1. Métodos

Procesado de imágenes y análisis estadístico de colocalización. El procesado de las imágenes se realizó utilizando el software de dominio público ImageJ/FIJI.⁷⁶ Los niveles de ruido de fondo se equilibraron en toda la imagen restando la imagen filtrada por la mediana.⁷⁰ Los coeficientes de colocalización y las pruebas de significancia estadística se calcularon con el plugin GDSC, que aplica el algoritmo de desplazamiento confinado.^{75,77} El área de interés (ROI) de cada imagen se obtuvo aplicando el umbral de Otsu y el compartimento confinado es la imagen completa (figuras 3.11-12). Las señales cortadas (emisiones saturadas) se descartaron para el análisis. Para facilitar la visualización, el brillo de las imágenes ha sido aumentado manualmente.

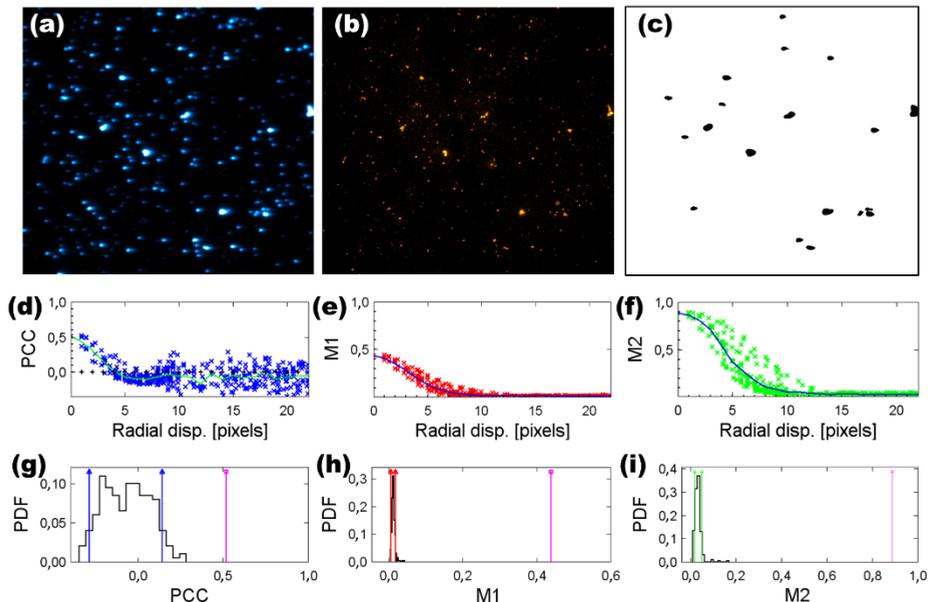


Figura 3.11. Análisis de colocalización de $UC_{Tm}@Rod101$. (a) Imagen NIR-LSM obtenida en C1 excitando a 975 nm (dwell time: 100 μ s/píxel; $F_d = 218,5$ J/cm²). (b) Imagen NIR-LSM obtenida en C3 excitando a 1030 nm (dwell time: 12,5

$\mu\text{s}/\text{píxel}$; $F_d = 27,5 \text{ J}/\text{cm}^2$). (c) Región confinada (blanco) utilizada para la prueba de significancia estadística. Los aglomerados que saturaban en intensidad se descartaron para el análisis (regiones negras). Comportamiento de los coeficientes (d) PCC, (e) M1 y (f) M2 frente al desplazamiento radial (traslación del fotograma) realizada por el algoritmo de desplazamiento confinado. Función de densidad de probabilidad (PDF, por sus siglas en inglés) de los coeficientes (g) PCC, (h) M1 y (i) M2 de 10 a 22 píxeles de desplazamiento radial. El intervalo de confianza del 95% se muestra entre flechas coloreadas (azules, rojas y verdes para PCC, M1 y M2 respectivamente) mientras que el valor original aparece como una línea rosa. Los valores obtenidos son significativos estadísticamente. Reproducido de ⁴¹ con permiso de Royal Society of Chemistry.

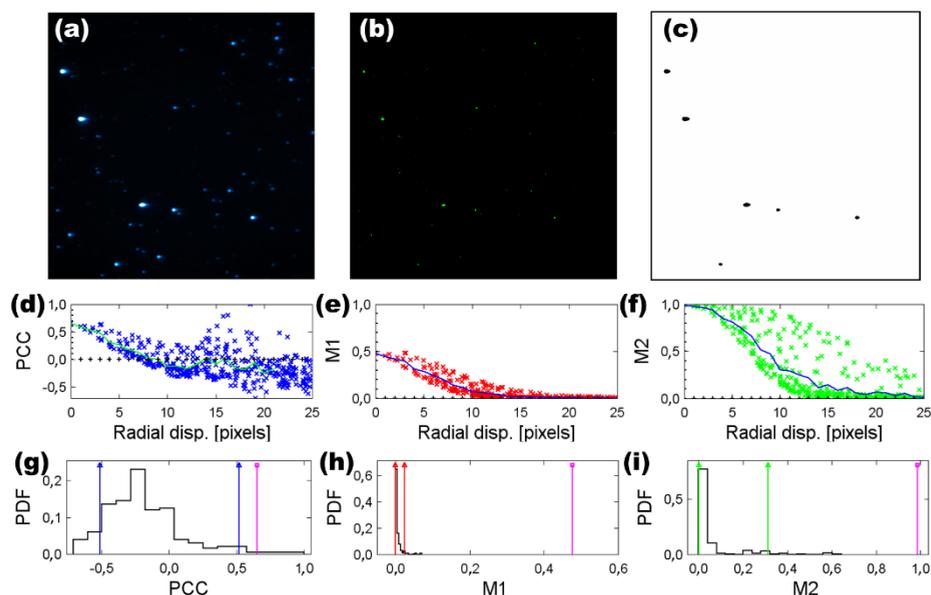


Figura 3.12. Análisis de colocación de $UC_{7M}@Rod110$. (a) Imagen NIR-LSM obtenida en C1 excitando a 975 nm (dwell time: $100 \mu\text{s}/\text{píxel}$; $F_d = 260,5 \text{ J}/\text{cm}^2$). (b) Imagen NIR-LSM obtenida en C2 excitando a 1020 nm (dwell time: $2 \mu\text{s}/\text{píxel}$; $F_d = 4,4 \text{ J}/\text{cm}^2$). (c) Región confinada (blanco) utilizada para la prueba de significancia estadística. Los aglomerados que saturaban en intensidad se descartaron para el análisis (regiones negras). Comportamiento de los coeficientes (d) PCC, (e) M1 y (f) M2 frente al desplazamiento radial (traslación del fotograma) realizada por el algoritmo de desplazamiento confinado. Función de densidad de probabilidad (PDF, por sus siglas en inglés) de los coeficientes

(g) PCC, (h) M1 y (i) M2 de 15 a 25 píxeles de desplazamiento radial. El intervalo de confianza del 95% se muestra en flechas coloreadas (azules, rojas y verdes para PCC, M1 y M2 respectivamente) mientras que el valor original aparece como una línea rosa. Los valores obtenidos son significativos estadísticamente. Reproducido de ⁴¹ con permiso de Royal Society of Chemistry.

3.5.2. Materiales

Los materiales utilizados para la síntesis de las NP fueron: los cloruros hidratados de los lantánidos ($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{TmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{HoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, todos al 99,9%), 1-octadeceno (95%), ácido oleico (70%), NaOH y NH_4F (99,99%). Todos los reactivos se compraron a Sigma-Aldrich (Merck) y se utilizaron sin purificar.

3.5.3. Protocolos sintéticos y preparativos

Síntesis de $\text{UC}_{\text{Er},2}$, $\text{UC}_{\text{Er},20}$, UC_{Ho} y UC_{Tm} recubiertas con oleato

Las UCNP se sintetizaron siguiendo un protocolo previo⁷⁸ con algunas modificaciones. En un matraz de fondo redondo se añaden 15 mL de 1-octadeceno y 8 mL de ácido oleico. A continuación, se añade una disolución de 2 mL de metanol (MeOH) que contiene 1 mmol de lantánidos. Los lantánidos se añaden en la proporción adecuada (en moles) para dar lugar al dopaje (%) predefinido. A partir de ese momento se mantiene una agitación constante y atmósfera inerte (N_2) hasta el final de la síntesis. La mezcla se calienta hasta 160 °C y se mantiene a esa temperatura hasta que las sales se hayan disueltas. Posteriormente, la disolución se enfría hasta 60 °C y se añade una disolución de MeOH que contiene NaOH (2,5 mmol) y NH_4F (4 mmol). La disolución se calienta gradualmente hasta 125 °C para eliminar el MeOH. Por último, se sube rápidamente la temperatura hasta 305 °C y se mantiene durante 1,5 horas. Pasado ese tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente. La purificación de las UCNP se realiza mediante precipitación por centrifugación y lavados. En primer lugar, se centrifuga la mezcla de reacción a 9000 rpm 15 minutos. El precipitado se lava

Capítulo 3. Microscopía de barrido de láser NIR

mediante tres ciclos de redispersión-centrifugación utilizando una mezcla de n-hexano:acetona:MeOH (87:81:32) y una vez con etanol. Finalmente, se redispersan en tolueno. Como ocurre generalmente la proporción de los lantánidos en las UCNP finales, obtenido por EDX, difiere ligeramente del pesado para la síntesis.

Preparación del UCNH UC_{Tm}@Rod110

En primer lugar, se eliminan los ligandos oleato de la superficie de la UC_{Tm} mediante el tratamiento con tetrafluoroborato de nitrosonio (NOBF₄), siguiendo un protocolo previamente descrito.⁷⁹ A continuación, las UC_{Tm} libres de oleato (UC_{Tm} desnuda o UC_{Tm}-des) se redispersan en *N,N*-dimetilformamida (DMF). Posteriormente, la funcionalización con el colorante se lleva a cabo agitando durante 24 horas una disolución acuosa con exceso de colorante frente a UC_{Tm}-des ($m_{\text{colorante}} > 5x m_{\text{UC}_{Tm}}$). Luego, la mezcla se centrifuga (12 000 g, 15 minutos), el precipitado se redispersa en agua y se realizan 5 ciclos de lavado de centrifugación-redispersión con 10 mL de agua hasta que el sobrenadante no presenta absorción. Por último, el UCNH se redispersa en DMF.

Preparación de muestras para NIR-LSM

Las muestras se prepararon por recubrimiento por centrifugación (*spin coater* KW-4A, Chemat technology). El procedimiento se optimizó para formar una monocapa discontinua de NP sobre un portaobjetos de microscopía de vidrio (25 x 25 mm) apropiada para NIR-LSM. La muestra está compuesta por aglomerados y UCNP libres (figura 3.13). Para ello, 100 µL de una dispersión de 4 mg/mL UCNP en tolueno o 100 µL de una dispersión acuosa 1 mg/mL de UCNH se depositan sobre el portaobjetos en el *spin coater*. A continuación, se enciende el *spin coater*, que está programado en dos etapas: una primera a 400 rpm durante 3 s y una segunda a 1500 rpm durante 40 s. A continuación, se deja secar, se cubre con un vidrio cubreobjetos (< 170 µm grosor, 22 x 22 mm) y, por último, se sellan las juntas con esmalte de uñas o cinta adhesiva.

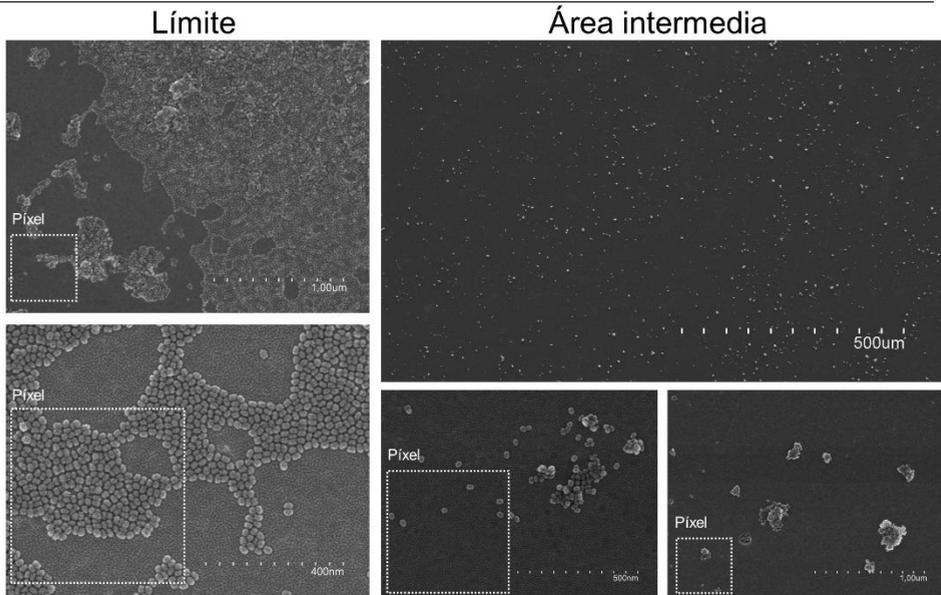


Figura 3.13. Imagen de SEM de $UC_{Er,2}$ que muestra diferentes aglomerados y UCNP individuales en la superficie del portaobjetos de vidrio. Los extremos del portaobjetos de microscopía presentan una concentración superior de UCNP mientras que en las áreas intermedias las NP se encuentran más repartidas y fueron las elegidas para obtener imágenes NIR-LSM. Con fines comparativos se incluye en cada imagen el tamaño de píxel ($0,5 \times 0,5 \mu m^2$). Reproducido de ⁴¹ con permiso de Royal Society of Chemistry.

3.5.4. Estimación de la resolución de tiempo de vida de NIR-LSM

El tiempo de vida mínimo y máximo que NIR-LSM puede determinar se puede estimar asumiendo una desactivación monoexponencial mediante las siguientes ecuaciones:

$$\tau_{\min} (\mu s) = \frac{d_{\min} \cdot Px}{v_{opt}} \quad (3.1)$$

$$\tau_{\max} (\mu s) = \frac{d_{\max} \cdot Px_{\max}}{v_{opt}} \quad (3.2)$$

donde d_{\min} y d_{\max} son el mínimo y el máximo *dwell time* del equipo, P_x es el mínimo número de puntos (píxeles) necesarios para describir una desactivación monoexponencial (asumimos 10), $P_{x_{\max}}$ es el número máximo de píxeles por línea (4096) y v_{opt} es la ventana temporal óptima que se necesita para describir la desactivación de un emisor ($v_{opt}= 10$, ya que, generalmente, se considera que es necesaria una ventana 10 veces mayor que el tiempo de vida del emisor).

3.5.5. Estimación de la energía de excitación

La energía de excitación se expresa como la densidad de energía total liberada durante el *dwell time* (F_d) y depende de la potencia promedio de salida del láser, de la longitud de onda de excitación (que define el tamaño del spot del láser en el límite de difracción), de la transmisión del AOM, de la transmisión del objetivo, de la apertura numérica, del tamaño de partícula (si es mayor al tamaño de píxel) y del *dwell time*.

La F_d se estimó midiendo la potencia promedio del láser (E) en la posición del objetivo (sin el objetivo) con un sensor térmico (3A-PF-12 Ophir; medimos una potencia de 220,6 y 482,5 mW a 975 y 800 nm, respectivamente) y considerando la transmitancia del objetivo ($\approx 80\%$ a 975 nm), la transmisión del AOM y el *dwell time*. La transmisión del AOM puede modificarse en el software del microscopio entre 0,1-100%, en incrementos de 0,1.

El área del spot del láser (S) se obtuvo asumiendo un perfil gaussiano, que está perfectamente colimado y enfocado en un spot limitado por difracción y que las lentes del objetivo están libres de aberraciones. De tal manera, podemos aproximar el tamaño del spot al disco de Airy corregido por un factor M^2 de 1,1.

Finalmente, la densidad de energía (J/cm^2) se calculó dividiendo E (J) por S (cm^2):

$$F_d = \frac{E}{S} = \frac{P \cdot \frac{LT}{100} \cdot \frac{OT}{100} \cdot d}{\pi \cdot \left(\frac{0.61 \cdot \lambda_{exc} \cdot 1.1}{NA} \right)^2} \quad (3.3)$$

Donde:

P: potencia promedio del láser a cierta longitud de onda (W)

LT: transmisión del AOM (%)

OT: transmisión del objetivo (%)

d: *dwell time* (s/píxel)

λ_{exc} : longitud de onda de excitación (cm)

NA: apertura numérica del objetivo

3.5.6. Resolución espacial y tamaño del spot del láser

La resolución espacial lateral se puede determinar de acuerdo con criterio de Rayleigh para microscopios confocales y resultó ser 473,6 nm.

En la configuración utilizada en NIR-LSM estamos excitando con un *spot* del láser (diámetro del *spot* en el límite de difracción: 1,13 μm) que ocupa dos píxeles (0,497 μm /píxel) en la dirección del eje x (1 y dos mitades). La figura 3.14 muestra a escala el tamaño de los píxeles, del spot del láser y una imagen de SEM de las muestras. Por tanto, la resolución espacial lateral (eje x) estará limitada por el tamaño del spot del láser. De hecho, como se demostró en la figura 3.10, tenemos hasta tres resoluciones diferentes en una misma muestra: la resolución de la excitación bifotónica del colorante, la resolución de la emisión de la UCNP en la dirección del barrido y la resolución de la emisión de la UCNP en la dirección transversal al barrido.

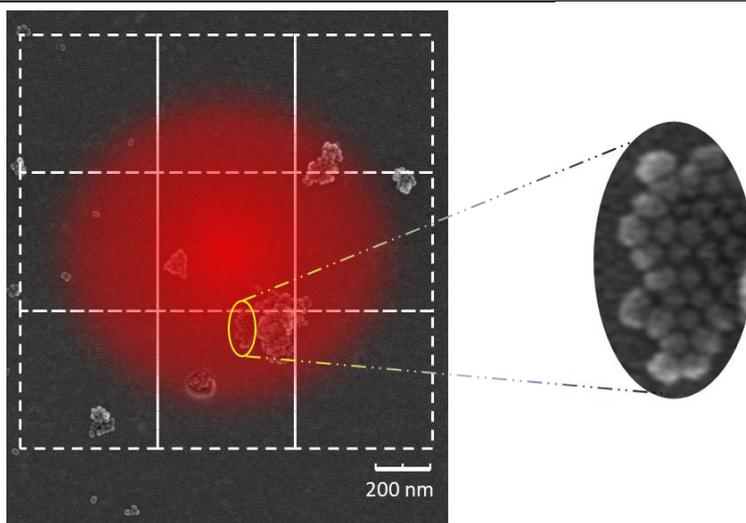


Figura 3.14. Representación esquemática a escala del tamaño de píxel (cuadros blancos discontinuos, $0,5 \times 0,5 \mu\text{m}^2$) y del tamaño del spot en el límite de difracción de un láser de 975 nm sobre una imagen SEM de las muestras de UCNP. La elipse amarilla ha sido magnificada para mostrar un grupo de UCNP adyacentes. Reproducido de ⁴¹ con permiso de Royal Society of Chemistry.

3.5.7. Caracterización adicional

Tabla 3.1. Composición de las muestras por EDX (20 kV).

| | Composición atómica (%) | | | | |
|-------------------------------------|-------------------------|------------|------------|-----------|-----------|
| | Itorio | Iterbio | Erbio | Tulio | Holmio |
| NaYF ₄ :Yb(20%),Er(2%) | 83,3 ± 1,1 | 15,2 ± 0,2 | 1,5 ± 0,1 | - | - |
| NaYF ₄ :Yb(20%),Er(20%) | 66,6 ± 2,3 | 15,7 ± 1,2 | 17,7 ± 1,3 | - | - |
| NaYF ₄ :Yb(20%),Tm(0.1%) | 82,7 ± 0,9 | 17,0 ± 0,6 | - | <LOD (<1) | - |
| NaYF ₄ :Yb(20%),Ho(1%) | 79,8 ± 2,1 | 19,1 ± 0,5 | - | - | 1,1 ± 0,2 |

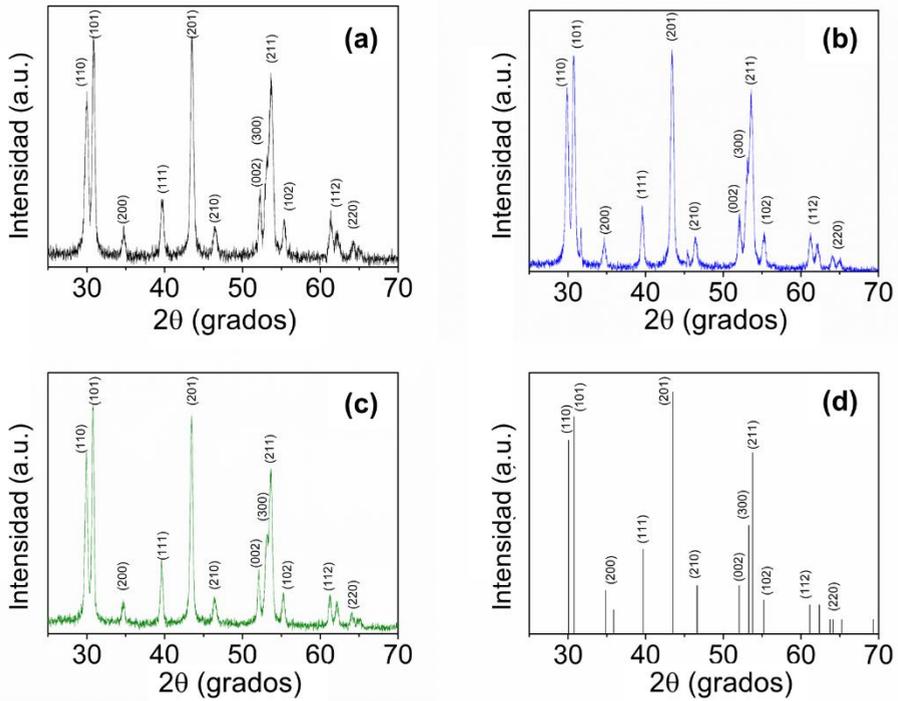


Figura 3.15. Difractogramas de XRD de (a) $UC_{Er,2}$, (b) UC_{Ho} , (c) UC_{Tm} y (d) referencia de $NaYF_4$ en fase hexagonal (JCPDS PDF número 16-0334).

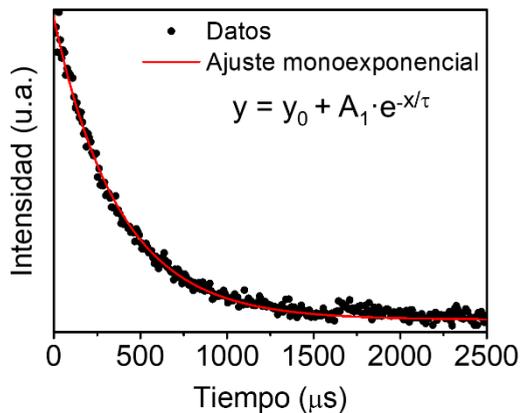


Figura 3.16. Ajuste monoexponencial de una cinética obtenida en el NIR-LSM.

3.6. Referencias

- (1) Olympus LS. Olympus Microscopy Resource Center <https://www.olympus-lifescience.com/es/microscope-resource/> (accessed Oct 6, 2021).
- (2) Davidson, M. W. Nikon MicroscopyU <https://www.microscopyu.com/> (accessed Oct 6, 2021).
- (3) Zeiss. Zeiss Education in Microscopy and Digital Imaging <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/index.html> (accessed Oct 6, 2021).
- (4) Inoué, S. Foundations of Confocal Scanned Imaging in Light Microscopy. In *Handbook of Biological Confocal Microscopy*; Pawley, J. B., Ed.; Springer: New York, 2006; pp 1–20.
- (5) Piston, D. W.; Fellers, T. J.; Davidson, M. W. Multiphoton Microscopy <https://www.microscopyu.com/techniques/multi-photon/multiphoton-microscopy> (accessed Apr 24, 2020).
- (6) Denk, W.; Piston, D. W.; Webb, W. W. Multi-Photon Molecular Excitation in Laser-Scanning Microscopy. In *Handbook of Biological Confocal Microscopy*; Pawley, J. B., Ed.; Springer: New York, 2006; pp 535–549.
- (7) Silfies, J. S.; Schwartz, S. A.; Davidson, M. W. The Diffraction Barrier in Optical Microscopy <https://www.microscopyu.com/techniques/super-resolution/the-diffraction-barrier-in-optical-microscopy> (accessed Oct 6, 2021).
- (8) Rottenfusser, R.; Wilson, E. E.; Davidson, M. W. Numerical Aperture and resolution <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/resolution.html> (accessed Oct 6, 2021).
- (9) De Jonge, N.; Peckys, D. B. Live Cell Electron Microscopy Is Probably Impossible. *ACS Nano* **2016**, *10* (10), 9061–9063. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b02809>.
- (10) Murata, K.; Wolf, M. Cryo-Electron Microscopy for Structural Analysis of Dynamic Biological Macromolecules. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2018**, *1862* (2), 324–334. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.07.020>.
- (11) Milne, J. L. S.; Borgnia, M. J.; Bartesaghi, A.; Tran, E. E. H.; Earl, L. A.; Schauder, D. M.; Lengyel, J.; Pierson, J.; Patwardhan, A.; Subramaniam, S. Cryo-Electron Microscopy - A Primer for the Non-Microscopist. *FEBS J.* **2013**, *280* (1), 28–45. <https://doi.org/10.1111/febs.12078>.
- (12) Thiberge, S.; Nechushtan, A.; Sprinzak, D.; Gileadi, O.; Behar, V.; Zik, O.; Chowes, Y.; Michaeli, S.; Schlessinger, J.; Moses, E. Scanning Electron Microscopy of Cells and Tissues under Fully Hydrated Conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (10), 3346–3351. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400088101>.
- (13) Caplan, J.; Niethammer, M.; Taylor, R. M.; Czymmek, K. J. The Power of Correlative Microscopy: Multi-Modal, Multi-Scale, Multi-Dimensional. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2011**, *21* (5), 686–693. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.06.010>.
- (14) Sartori, A.; Gatz, R.; Beck, F.; Rigort, A.; Baumeister, W.; Plitzko, J. M. Correlative Microscopy: Bridging the Gap between Fluorescence Light Microscopy and Cryo-Electron Tomography. *J. Struct. Biol.* **2007**, *160* (2), 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.07.011>.
- (15) Ando, T.; Bhamidimarri, S. P.; Brending, N.; Colin-York, H.; Collinson, L.; De Jonge, N.; De Pablo, P. J.; Debroye, E.; Eggeling, C.; Franck, C.; et al. The 2018

- Correlative Microscopy Techniques Roadmap. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2018**, *51* (44). <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aad055>.
- (16) De Boer, P.; Hoogenboom, J. P.; Giepmans, B. N. G. Correlated Light and Electron Microscopy: Ultrastructure Lights Up! *Nat. Methods* **2015**, *12* (6), 503–513. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3400>.
- (17) Most Popular Microscopy Techniques <https://andor.oxinst.com/learning/view/article/most-popular-microscopy-techniques> (accessed Oct 6, 2021).
- (18) Gerritsen, H. C.; Draaijer, A.; van den Heuvel, D. J.; Agronskaia, A. V. Fluorescence Lifetime Imaging in Scanning Microscopy. In *Handbook of Biological Confocal Microscopy*; Pawley, J. B., Ed.; Springer Science+Business Media: New York, 2006; pp 516–534.
- (19) Lakowicz, J. R. Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer Science+Business Media: New York, 2006; pp 743–758.
- (20) Buschmann, V.; Orthaus, S.; Devaux, A.; Erdmann, R. Phosphorescence Lifetime Imaging Microscopy (PLIM) Measurements : Practical Aspects. *PicoQuant Tech. Note* **2016**, No. 1c, 1–10.
- (21) Zhang, K. Y.; Yu, Q.; Wei, H.; Liu, S.; Zhao, Q.; Huang, W. Long-Lived Emissive Probes for Time-Resolved Photoluminescence Bioimaging and Biosensing. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (4), 1770–1839. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00425>.
- (22) Lakowicz, J. R. Time-Domain Lifetime Measurements. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer Science+Business Media: New York, 2006; pp 98–157.
- (23) Wu, S.; Han, G.; Milliron, D. J.; Aloni, S.; Altoe, V.; Talapin, D. V; Cohen, B. E.; Schuck, P. J. Non-Blinking and Photostable Upconverted Luminescence from Single Lanthanide-Doped Nanocrystals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (27), 10917–10921. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904792106>.
- (24) Park, Y. Il; Kim, J. H.; Lee, K. T.; Jeon, K. S.; Na, H. Bin; Yu, J. H.; Kim, H. M.; Lee, N.; Choi, S. H.; Baik, S. Il; et al. Nonblinking and Nonbleaching Upconverting Nanoparticles as an Optical Imaging Nanoprobe and T1 Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (44), 4467–4471. <https://doi.org/10.1002/adma.200901356>.
- (25) Gnach, A.; Lipinski, T.; Bednarkiewicz, A.; Rybka, J.; Capobianco, J. A. Upconverting Nanoparticles: Assessing the Toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (6), 1561–1584. <https://doi.org/10.1039/c4cs00177j>.
- (26) Himmelstoß, S. F.; Hirsch, T. A Critical Comparison of Lanthanide Based Upconversion Nanoparticles to Fluorescent Proteins, Semiconductor Quantum Dots, and Carbon Dots for Use in Optical Sensing and Imaging. *Methods Appl. Fluoresc.* **2019**, *7* (2). <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab0bfa>.
- (27) Hemmer, E.; Benayas, A.; Légaré, F.; Vetrone, F. Exploiting the Biological Windows: Current Perspectives on Fluorescent Bioprobes Emitting above 1000 Nm. *Nanoscale Horizons* **2016**, *1* (3), 168–184. <https://doi.org/10.1039/c5nh00073d>.
- (28) Smith, A. M.; Mancini, M. C.; Nie, S. Bioimaging: Second Window for in Vivo Imaging. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4* (11), 710–711. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.326>.
- (29) He, S.; Song, J.; Qu, J.; Cheng, Z. Crucial Breakthrough of Second Near-Infrared

- Biological Window Fluorophores: Design and Synthesis toward Multimodal Imaging and Theranostics. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (12), 4258–4278. <https://doi.org/10.1039/c8cs00234g>.
- (30) Yu, M.; Li, F.; Chen, Z.; Hu, H.; Zhan, C.; Yang, H.; Huang, C. Laser Scanning Up-Conversion Luminescence Microscopy for Imaging Cells Labeled with Rare-Earth Nanophosphors. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (3), 930–935. <https://doi.org/10.1021/ac802072d>.
- (31) Park, Y. Il; Lee, K. T.; Suh, Y. D.; Hyeon, T. Upconverting Nanoparticles: A Versatile Platform for Wide-Field Two-Photon Microscopy and Multi-Modal in Vivo Imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (6), 1302–1317. <https://doi.org/10.1039/c4cs00173g>.
- (32) Peng, X.; Huang, B.; Pu, R.; Liu, H.; Zhang, T.; Widengren, J.; Zhan, Q.; Ågren, H. Fast Upconversion Super-Resolution Microscopy with 10 Ms per Pixel Dwell Times. *Nanoscale* **2019**, *11* (4), 1563–1569. <https://doi.org/10.1039/c8nr08986h>.
- (33) Tian, B.; Fernandez-Bravo, A.; Najafiaghdam, H.; Torquato, N. A.; Altoe, M. V. P.; Teitelboim, A.; Tajon, C. A.; Tian, Y.; Borys, N. J.; Barnard, E. S.; et al. Low Irradiance Multiphoton Imaging with Alloyed Lanthanide Nanocrystals. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 4–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05577-8>.
- (34) Gargas, D. J.; Chan, E. M.; Ostrowski, A. D.; Aloni, S.; Altoe, M. V. P.; Barnard, E. S.; Sanii, B.; Urban, J. J.; Milliron, D. J.; Cohen, B. E.; et al. Engineering Bright Sub-10-Nm Upconverting Nanocrystals for Single-Molecule Imaging. *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *9* (4), 300–305. <https://doi.org/10.1038/nnano.2014.29>.
- (35) Zhao, J.; Jin, D.; Schartner, E. P.; Lu, Y.; Liu, Y.; Zvyagin, A. V.; Zhang, L.; Dawes, J. M.; Xi, P.; Piper, J. A.; et al. Single-Nanocrystal Sensitivity Achieved by Enhanced Upconversion Luminescence. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 729–734. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.171>.
- (36) Denkova, D.; Ploschner, M.; Das, M.; Parker, L. M.; Zheng, X.; Lu, Y.; Orth, A.; Packer, N. H.; Piper, J. A. 3D Sub-Diffraction Imaging in a Conventional Confocal Configuration by Exploiting Super-Linear Emitters. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11603-0>.
- (37) Ostrowski, A. D.; Chan, E. M.; Gargas, D. J.; Katz, E. M.; Han, G.; Schuck, P. J.; Milliron, D. J.; Cohen, B. E. Controlled Synthesis and Single-Particle Imaging of Bright, Sub-10 Nm Lanthanide-Doped Upconverting Nanocrystals. *ACS Nano* **2012**, *6* (3), 2686–2692. <https://doi.org/10.1021/nn3000737>.
- (38) Liu, Y.; Lu, Y.; Yang, X.; Zheng, X.; Wen, S.; Wang, F.; Vidal, X.; Zhao, J.; Liu, D.; Zhou, Z.; et al. Amplified Stimulated Emission in Upconversion Nanoparticles for Super-Resolution Nanoscopy. *Nature* **2017**, *543* (7644), 229–233. <https://doi.org/10.1038/nature21366>.
- (39) Zhan, Q.; Liu, H.; Wang, B.; Wu, Q.; Pu, R.; Zhou, C.; Huang, B.; Peng, X.; Ågren, H.; He, S. Achieving High-Efficiency Emission Depletion Nanoscopy by Employing Cross Relaxation in Upconversion Nanoparticles. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01141-y>.
- (40) Chen, C.; Wang, F.; Wen, S.; Su, Q. P.; Wu, M. C. L.; Liu, Y.; Wang, B.; Li, D.; Shan, X.; Kianinia, M.; et al. Multi-Photon near-Infrared Emission Saturation Nanoscopy Using Upconversion Nanoparticles. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 4–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05842-w>.
- (41) Ferrera-González, J.; Francés-Soriano, L.; Estébanez, N.; Navarro-Raga, E.;

- González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. NIR Laser Scanning Microscopy for Photophysical Characterization of Upconversion Nanoparticles and Nanohybrids. *Nanoscale* **2021**, *13* (22), 10067–10080. <https://doi.org/10.1039/d1nr00389e>.
- (42) Paschotta, R. Optical Modulators https://www.rp-photonics.com/optical_modulators.html (accessed Oct 5, 2021).
- (43) Spring, K. R.; Russ, J. C.; Davidson, M. W. Basic Properties of Digital Images <https://www.olympus-lifescience.com/es/microscope-resource/primer/digitalimaging/digitalimagebasics/> (accessed Oct 5, 2021).
- (44) Liu, X.; Deng, R.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Chang, H.; Huang, L.; Liu, X. Probing the Nature of Upconversion Nanocrystals: Instrumentation Matters. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (6), 1479–1508. <https://doi.org/10.1039/c4cs00356j>.
- (45) Li, X.; Zhang, F.; Zhao, D. Lab on Upconversion Nanoparticles: Optical Properties and Applications Engineering via Designed Nanostructure. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (6), 1346–1378. <https://doi.org/10.1039/c4cs00163j>.
- (46) Wang, F.; Liu, X. Recent Advances in the Chemistry of Lanthanide-Doped Upconversion Nanocrystals. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (4), 976–989. <https://doi.org/10.1039/b809132n>.
- (47) Gainer, C. F.; Utzinger, U.; Romanowski, M. Scanning Two-Photon Microscopy with Upconverting Lanthanide Nanoparticles via Richardson-Lucy Deconvolution. *J. Biomed. Opt.* **2012**, *17* (7), 760031–760037. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.17.7.076003>.
- (48) Pichaandi, J.; Boyer, J.-C.; Delaney, K. R.; van Veggel, F. C. J. M. Two-Photon Upconversion Laser (Scanning and Wide-Field) Microscopy Using Ln³⁺-Doped NaYF₄ Upconverting Nanocrystals: A Critical Evaluation of Their Performance and Potential in Bioimaging. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115* (39), 19054–19064. <https://doi.org/10.1021/jp206345j>.
- (49) Francés-Soriano, L.; Gonzalez-Carrero, S.; Navarro-Raga, E.; Galian, R. E.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Efficient Cementing of CH₃NH₃PbBr₃ Nanoparticles to Upconversion Nanoparticles Visualized by Confocal Microscopy. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26* (28), 5131–5138. <https://doi.org/10.1002/adfm.201600786>.
- (50) Estebanez, N.; Ferrera-González, J.; Cortez-Cevallos, I. A.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Lengthening the Lifetime of Common Emissive Probes to Microseconds by a Jigsaw-Like Construction of NIR-Responsive Nanohybrids. *Adv. Opt. Mater.* **2020**, *8* (8), 1902030. <https://doi.org/10.1002/adom.201902030>.
- (51) Estebanez, N.; Ferrera-González, J.; Francés-Soriano, L.; Arenal, R.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Breaking the Nd³⁺-Sensitized Upconversion Nanoparticles Myth about the Need of Onion-Layered Structures. *Nanoscale* **2018**, *10* (26), 12297–12301. <https://doi.org/10.1039/c8nr00871j>.
- (52) Baggaley, E.; Weinstein, J. A.; Williams, J. A. G. Time-Resolved Emission Imaging Microscopy Using Phosphorescent Metal Complexes: Taking FLIM and PLIM to New Lengths. In *Luminescent and Photoactive Transition Metal Complexes as Biomolecular Probes and Cellular Reagents*; Kam-Wing Lo, K., Ed.; Springer Berlin Heidelberg, 2015; pp 205–256. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-46718-3>.
- (53) Marriott, G.; Clegg, R. M.; Arndt-Jovin, D. J.; Jovin, T. M. Time Resolved Imaging Microscopy. Phosphorescence and Delayed Fluorescence Imaging. *Biophys. J.* **1991**, *60* (6), 1374–1387. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82175-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82175-0).

- (54) Becker, W.; Su, B.; Bergmann, A.; Weisshart, K.; Holub, O. Simultaneous Fluorescence and Phosphorescence Lifetime Imaging. In *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences XI*; Periasamy, A., König, K., So, P. T. C., Eds.; SPIE, 2011; Vol. 7903, p 790320. <https://doi.org/10.1117/12.875204>.
- (55) Lecoq, J.; Parpaleix, A.; Roussakis, E.; Ducros, M.; Houssen, Y. G.; Vinogradov, S. A.; Charpak, S. Simultaneous Two-Photon Imaging of Oxygen and Blood Flow in Deep Cerebral Vessels. *Nat. Med.* **2011**, *17* (7), 893–898. <https://doi.org/10.1038/nm.2394>.
- (56) Jahn, K.; Buschmann, V.; Hille, C. Simultaneous Fluorescence and Phosphorescence Lifetime Imaging Microscopy in Living Cells. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep14334>.
- (57) Ramshesh, V. K.; Lemasters, J. J. Pinhole Shifting Lifetime Imaging Microscopy. *J. Biomed. Opt.* **2008**, *13* (6), 064001. <https://doi.org/10.1117/1.3027503>.
- (58) Grichine, A.; Haefele, A.; Pascal, S.; Duperray, A.; Michel, R.; Andraud, C.; Maury, O. Millisecond Lifetime Imaging with a Europium Complex Using a Commercial Confocal Microscope under One or Two-Photon Excitation. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (9), 3475–3485. <https://doi.org/10.1039/c4sc00473f>.
- (59) May, P. S.; Berry, M. Tutorial on the Acquisition, Analysis, and Interpretation of Upconversion Luminescence Data. *Methods Appl. Fluoresc.* **2019**, *7* (023001), 1–14. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab02c6>.
- (60) Krämer, K. W.; Biner, D.; Frei, G.; Güdel, H. U.; Hehlen, M. P.; Lüthi, S. R. Hexagonal Sodium Yttrium Fluoride Based Green and Blue Emitting Upconversion Phosphors. *Chem. Mater.* **2004**, *16* (7), 1244–1251. <https://doi.org/10.1021/cm031124o>.
- (61) Gao, W.; Kong, X.; Han, Q.; Chen, Y.; Zhang, J.; Zhao, X.; Yan, X.; Liu, J.; Shi, J.; Dong, J. Enhanced Red Upconversion Emission of Ho³⁺ in NaYF₄ Nanocrystals. *J. Lumin.* **2018**, *202* (June), 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.06.009>.
- (62) Chen, X. P.; Zhang, W. J.; Zhang, Q. Y. Towards Efficient Upconversion and Downconversion of NaYF₄:Ho³⁺,Yb³⁺ Phosphors. *Phys. B Condens. Matter* **2011**, *406* (6–7), 1248–1252. <https://doi.org/10.1016/j.physb.2011.01.008>.
- (63) Lu, Y.; Zhao, J.; Zhang, R.; Liu, Y.; Liu, D.; Goldys, E. M.; Yang, X.; Xi, P.; Sunna, A.; Lu, J.; et al. Tunable Lifetime Multiplexing Using Luminescent Nanocrystals. *Nat. Photonics* **2014**, *8* (1), 32–36. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2013.322>.
- (64) Arppe, R.; Hyppänen, I.; Perälä, N.; Peltomaa, R.; Kaiser, M.; Würth, C.; Christ, S.; Resch-Genger, U.; Schäferling, M.; Soukka, T. Quenching of the Upconversion Luminescence of NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ and NaYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺ Nanophosphors by Water: The Role of the Sensitizer Yb³⁺ in Non-Radiative Relaxation. *Nanoscale* **2015**, *7* (27), 11746–11757. <https://doi.org/10.1039/c5nr02100f>.
- (65) Kaiser, M.; Würth, C.; Kraft, M.; Hyppänen, I.; Soukka, T.; Resch-Genger, U. Power-Dependent Upconversion Quantum Yield of NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ Nano- and Micrometer-Sized Particles-Measurements and Simulations. *Nanoscale* **2017**, *9* (28), 10051–10058. <https://doi.org/10.1039/c7nr02449e>.
- (66) Wang, Y.; Tu, L.; Zhao, J.; Sun, Y.; Kong, X.; Zhang, H. Upconversion Luminescence of β-NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺@β-NaYF₄ Core/Shell Nanoparticles: Excitation Power Density and Surface Dependence. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (17), 7164–7169. <https://doi.org/10.1021/jp9003399>.
- (67) Delvallée, A.; Feltin, N.; Ducourtieux, S.; Trabelsi, M.; Hochepped, J. F. Direct

- Comparison of AFM and SEM Measurements on the Same Set of Nanoparticles. *Meas. Sci. Technol.* **2015**, *26* (8), 085601. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/26/8/085601>.
- (68) Rabanel, J. M.; Adibnia, V.; Tehrani, S. F.; Sanche, S.; Hildgen, P.; Banquy, X.; Ramassamy, C. Nanoparticle Heterogeneity: An Emerging Structural Parameter Influencing Particle Fate in Biological Media? *Nanoscale* **2019**, *11* (2), 383–406. <https://doi.org/10.1039/c8nr04916e>.
- (69) Ong, Q.; Luo, Z.; Stellacci, F. Characterization of Ligand Shell for Mixed-Ligand Coated Gold Nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (8), 1911–1919. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00165>.
- (70) Dunn, K. W.; Kamocka, M. M.; McDonald, J. H. A Practical Guide to Evaluating Colocalization in Biological Microscopy. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2011**, *300* (4), 723–742. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00462.2010>.
- (71) Aaron, J. S.; Taylor, A. B.; Chew, T. L. Image Co-Localization - Co-Occurrence versus Correlation. *J. Cell Sci.* **2018**, *131* (3), 1–10. <https://doi.org/10.1242/jcs.211847>.
- (72) Bolte, S.; Cordelières, F. P. A Guided Tour into Subcellular Colocalization Analysis in Light Microscopy. *J. Microsc.* **2006**, *224* (3), 213–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>.
- (73) Comeau, J. W. D.; Costantino, S.; Wiseman, P. W. A Guide to Accurate Fluorescence Microscopy Colocalization Measurements. *Biophys. J.* **2006**, *91* (12), 4611–4622. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.089441>.
- (74) Costes, S. V.; Daelemans, D.; Cho, E. H.; Dobbin, Z.; Pavlakakis, G.; Lockett, S. Automatic and Quantitative Measurement of Protein-Protein Colocalization in Live Cells. *Biophys. J.* **2004**, *86* (6), 3993–4003. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.038422>.
- (75) Ramírez, O.; García, A.; Rojas, R.; Couve, A.; Härtel, S. Confined Displacement Algorithm Determines True and Random Colocalization in Fluorescence Microscopy. *J. Microsc.* **2010**, *239* (3), 173–183. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2010.03369.x>.
- (76) Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9* (7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- (77) Herbert, A. Colocalisation
<http://www.sussex.ac.uk/gdsc/intranet/microscopy/UserSupport/AnalysisProtocol/imagej/colocalisation> (accessed Oct 5, 2021).
- (78) Li, Z.; Zhang, Y. An Efficient and User-Friendly Method for the Synthesis of Hexagonal-Phase NaYF₄:Yb, Er/Tm Nanocrystals with Controllable Shape and Upconversion Fluorescence. *Nanotechnology* **2008**, *19* (34), 16–21. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/34/345606>.
- (79) Muhr, V.; Wilhelm, S.; Hirsch, T.; Wolfbeis, O. S. Upconversion Nanoparticles: From Hydrophobic to Hydrophilic Surfaces. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (12), 3481–3493. <https://doi.org/10.1021/ar500253g>.

Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

Capítulo 4

4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

4.1. Introducción y antecedentes

Como se ha visto en el capítulo anterior, la microscopía óptica engloba a una amplia variedad de técnicas que tratan de observar de manera no invasiva el interior de organismos, tejidos o células. En muchos casos esas técnicas de microscopía utilizan agentes reveladores luminiscentes, denominados sondas, que al introducirlos en el organismo e iluminarlos, emiten fotones con alta eficiencia. Dichos fotones pueden ser detectados y convertidos a imágenes que, a su vez, pueden usarse para diferentes propósitos como localización (*targeting*), detección y/o cuantificación de analitos (*chemical sensing*) y, por tanto, de gran importancia por sus potenciales aplicaciones en medicina e investigación biomédica.

Las sondas más ampliamente utilizadas tradicionalmente son sondas orgánicas, es decir, moléculas orgánicas fluorescentes que suelen usarse con técnicas de microscopía basadas en la intensidad de emisión. Por un lado, este tipo de sondas presentan una elevada selectividad al analito a detectar o a fijarse a un orgánulo en concreto y, también, un elevado rendimiento cuántico de emisión. Sin embargo, (i) presentan baja fotoestabilidad, esto es que al irradiarlas durante tiempos prolongados o fuentes de excitación muy potentes pueden sufrir reacciones que suprimen sus propiedades emisivas, (ii) absorben

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

mayoritariamente en la región UV-vis, región del espectro que limita la penetración de la luz en tejidos y favorece la interferencia de la autofluorescencia (señal de fluorescencia de moléculas naturalmente presentes en organismos, células o tejidos, tales como flavinas, nucleótidos, proteínas o pigmentos), y (iii) al usarse con técnicas basadas en la intensidad, la señal de la sonda puede afectarse por la inestabilidad de la fuente de excitación y su concentración en la muestra. Además, su aplicación en técnicas de microscopía de resolución temporal es limitada, pues en la mayoría de los casos el tiempo de vida de la emisión es corto (en el orden de nanosegundos) y similar a la propia señal de autofluorescencia.¹

Con el fin de superar estas limitaciones, se han propuesto dos estrategias diferentes: (i) utilizar sensores ratiométricos en técnicas de microscopía basada en intensidad o (ii) utilizar sondas de tiempo de vida largo en técnicas de microscopía basada en el tiempo de vida. La primera estrategia evita la inestabilidad de la emisión de las sondas y de la fuente de excitación midiendo, en vez de la intensidad de fluorescencia, la proporción entre la fluorescencia de la sonda y la emisión de una referencia estable. Por otro lado, la segunda estrategia evita los problemas asociados a la autofluorescencia seleccionando adecuadamente la ventana temporal de detección. Asimismo, la segunda estrategia es menos propensa a verse afectada por la concentración de la sonda en la muestra y a interferencia.¹

Por todo ello, la UCNP es una plataforma única para usarse como sensor químico, ya que, presenta: (i) absorción en el NIR, que penetra a mayor profundidad en los tejidos; (ii) diferentes bandas de emisión estrechas, que permiten la detección ratiométrica sin referencias adicionales externas; y (iii) tiempos de vida emisión largos (cientos de microsegundos), que permiten su uso como sondas de tiempo de vida largo en técnicas de microscopía resuelta en el tiempo. Estas propiedades, de por sí interesantes, pueden incluso modularse y mejorarse mediante el diseño racional de UCNH en los que interactúen UCNP y

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

otras especies fotoactivas mediante transferencia de energía.² La transferencia de energía puede ser trivial, dando lugar a sensores basados en el fenómeno de filtro interno, o transferencia de energía resonante de luminiscencia (LRET, por sus siglas en inglés, también conocida como transferencia de energía basada en lantánidos), mucho más interesantes porque son capaces de modular las propiedades fotofísicas de la especie fotoactiva que funcionaliza a la UCNP. Las LRET son interacciones, de tipo coulombicas, que tienen lugar a distancias cortas entre el dador excitado y el aceptor de energía en estado fundamental e implican la transferencia virtual de un fotón. A diferencia de la transferencia de energía trivial, en este caso el dador no emite fotones, sino que los transfiere de manera no radiativa al aceptor. Sigue, por tanto, un mecanismo de desactivación (*quenching*) dinámico que afecta al estado excitado del dador y, por tanto, influye en su tiempo de vida de emisión, al igual que en el del aceptor.³ Este tipo de transferencia de energía fue descrito por Theodor Förster y por ello también se conoce como transferencia de energía resonante de fluorescencia o tipo Förster (FRET). La siguiente ecuación describe la eficiencia de la FRET (η_{FRET}) entre un dador y un aceptor moleculares separados una distancia r :^{4,5}

$$\eta_{FRET} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (4.1)$$

donde R_0 es:

$$R_0 = \frac{9(\ln 10)\kappa^2\phi_D J}{128\pi^5 n^4 N_A} \quad (4.2)$$

siendo η_{FRET} la eficiencia de la FRET en tantos por uno, τ_{DA} el tiempo de vida del dador en presencia del aceptor, τ_D el tiempo de vida del dador, κ^2 es un factor que describe la orientación relativa en el espacio de los dipolos de transición del dador y del aceptor, ϕ_D es el rendimiento cuántico del dador, J es la integral de solapamiento de la emisión del dador y absorción del aceptor, n es el índice de refracción del medio y N_A el número de Avogadro. El parámetro R_0 también se

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

conoce como distancia de Förster y es la distancia a la cual la FRET presenta una eficiencia del 50%, es decir, la distancia en la que el tiempo de vida del dador se ha reducido a la mitad, que normalmente suele estar entre los 2-6 nm. La ecuación 4.1 demuestra que la eficiencia de la FRET depende drásticamente de la distancia entre el dador y el aceptor (r^{-6} ; figura 4.1.), de tal manera que aumenta si $r < R_0$ y disminuye rápidamente si $r > R_0$. La ecuación 4.2 demuestra que para que exista transferencia de energía resonante deben considerarse cuatro factores: (i) solapamiento entre el espectro de emisión del dador y de absorción del aceptor, (ii) la distancia entre el dador y el aceptor, (iii) el rendimiento cuántico del dador y (iv) el coeficiente de absorción molar/sección transversal de absorción del aceptor.

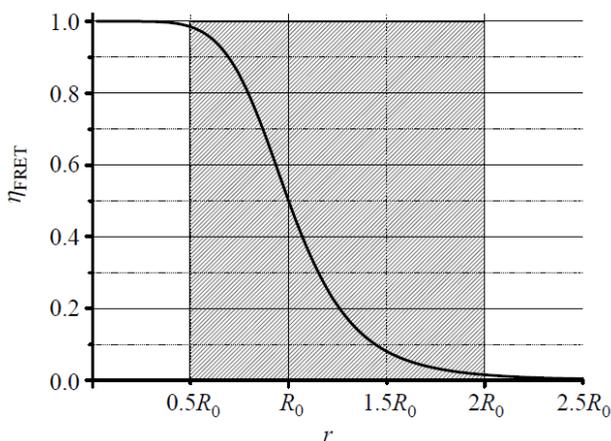


Figura 4.1. Eficiencia de la FRET (η_{FRET}) en función de la distancia entre el dador y el aceptor (r), expresada como distancia de Förster (R_0). Reproducido con permiso de ⁶. Copyright 2013 John Wiley and Sons.

La teoría FRET fue desarrollada para fluoróforos orgánicos, sin embargo, como la emisión de los lantánidos no es fluorescencia (transición singlete-singlete), a la transferencia de energía resonante se la denomina LRET. Además, con las UCNPs tenemos la dificultad añadida de que, incluso el UCNH más sencillo compuesto por una UCNP de tipo *core* funcionalizada con un tipo de

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

colorante en su superficie, van a existir múltiples distancias entre los activadores (dadores) y el colorante superficial (aceptor).⁷⁻¹³ Dentro del *core* habrá una distribución homogénea del activador, así, algunos estarán en el interior de la NP y otros en la superficie, que son más sensibles a procesos de desactivación superficiales (por moléculas de disolvente o defectos cristalinos),¹⁴⁻¹⁷ a distancias variables del acepto. Así, para UCNH es de esperar que ocurra tanto LRET, desde los iones activadores superficiales, como transferencia de energía trivial (filtro interno), de los iones activadores más internos. Se han descrito diferentes artículos de UCNH compuestos por UCNP y especiesceptoras de energía, como colorantes^{8,9,11,18,19} o *quantum dots*,^{10,13,20} que estudian el fenómeno LRET. De forma general, se ha determinado que el R_0 para sistemas basados en UCNP está entre 3-5 nm^{8,10,18}, que la LRET más eficiente para UCNP tipo *core* se da en NP de 16-30 nm de tamaño^{8,9} y que la adición de recubrimientos inorgánicos inactivos pequeños (1-6 nm) puede mejorar la LRET para UCNP < 21 nm, mientras que la adición de recubrimientos mayores la dificultaría.⁸ Las tendencias actuales, parecen ir más enfocadas al diseño de arquitecturas que favorezcan la LRET junto con la reducción del tamaño de NP, mediante construcciones tipo *core* inactivo-*shell* activo¹⁸ o construcciones de migración energética dirigidas a la superficie.²¹

Bien sea por LRET, filtro interno o ambos, las UCNP son una plataforma inmejorable para construir sensores. Las diferentes emisiones de la UCNP, en función también de si están dopadas con Tm^{3+} , Er^{3+} u Ho^{3+} , permiten la utilización de una amplia variedad de fluoróforos orgánicos con propiedades fotofísicas y químicas diferentes (figura 4.2). Así, se han descrito diferentes sensores de UCNH basados en un mecanismo de filtro interno, LRET o ambos. En función de sus propiedades como sensor, podemos definir tres tipos de sensores: (i) los basados en el fenómeno de filtro interno, (ii) los basados en LRET y que utilizan la emisión resonante como parte del sensor, (iii) los basados en LRET y utilizan

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

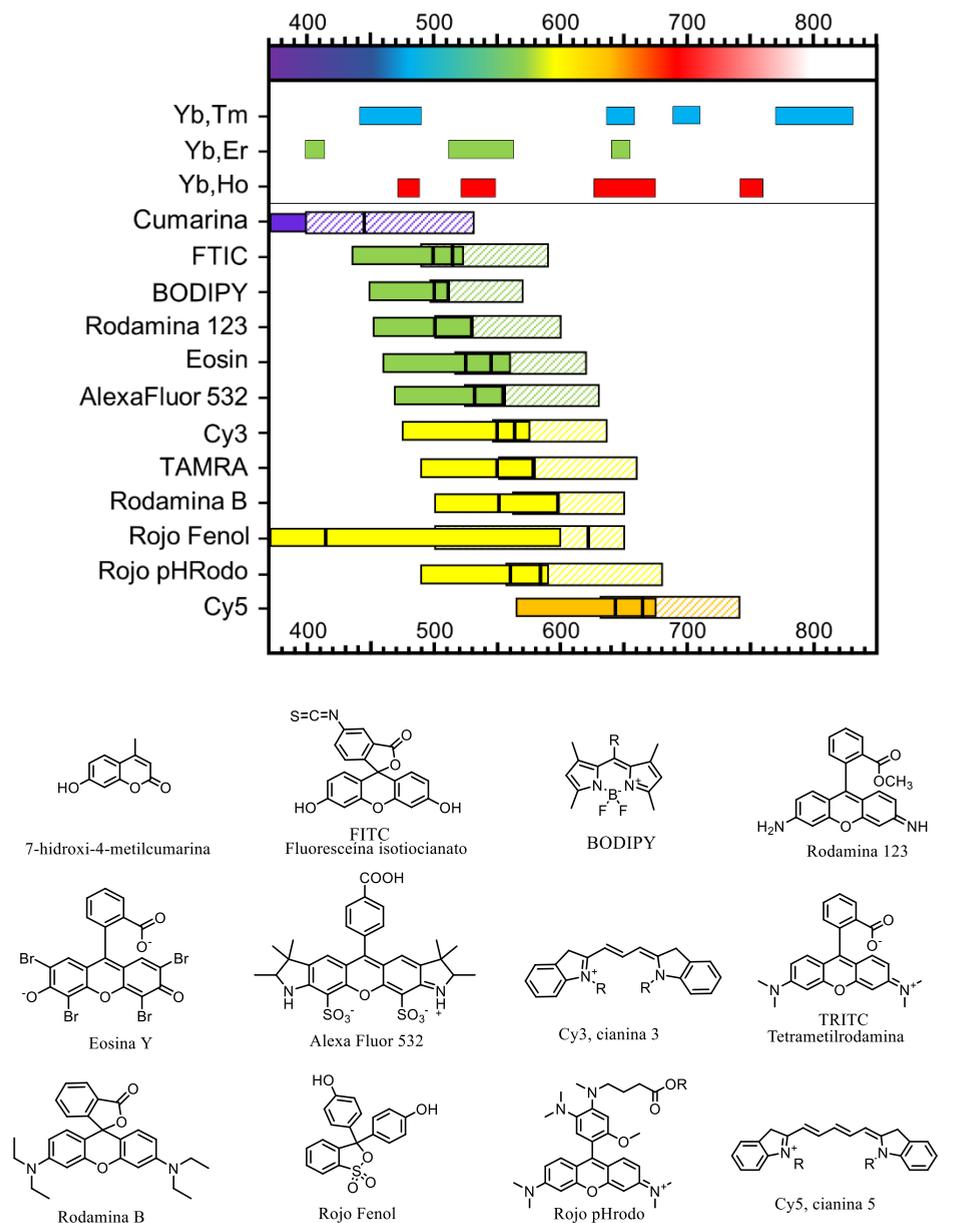


Figura 4.2. Intervalos de emisión en el espectro electromagnético de $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{X}^{3+}$ ($\text{X} = \text{Er}, \text{Tm}$ u Ho), junto con los de absorción (rectángulos coloreados lisos) y de emisión (rectángulos rayados) de algunos cromóforos utilizados para UCNH, cuyas estructuras se muestran en la parte inferior. Las líneas negras verticales indican máximos de absorción o emisión. Reproducido con permiso de

únicamente emisiones de la UCNP y (iv) los basados en LRET y filtro interno (tabla 4.1).²

En este sentido hemos construido un UCNH que aprovecha las excelentes propiedades fotofísicas de las UCNP, la selectividad de un sensor orgánico convencional de fluorescencia (fluoresceína, F) y la experiencia del grupo en funcionalización de nanomateriales mediante una familia de ligandos macrocíclicos muy interesantes: los cucurbiturilos (CB).²² Además, hemos demostrado que la técnica NIR-LSM, desarrollada en el anterior capítulo, permite visualizar y analizar fenómenos LRET.²³ En la siguiente sección se demuestran las capacidades de NIR-LSM aplicadas a un UCNH sencillo: UC_{Tm}@Rod110 (es un UCNH del capítulo anterior), para luego demostrar la fácil construcción de un UCNH (UC_{Tm}@CB@Y@F) que permite la LRET y que conserva las propiedades de detección de la sonda orgánica utilizada.

Tabla 4.1. Sensores de pH basados en UCNH.

| n. | Especie cooperativa | UCNP | UCNH tamaño (nm) | Respuesta lineal | Señal de detección | Año | Ref. |
|--|---|---|------------------|------------------|---|------|------|
| | | | | pH | | | |
| Caso i. Mecanismo de filtro interno | | | | | | | |
| 1. | Azul de Bromotimol | NaYF ₄ :Yb,Er | 50x950 | 6-10 | I ₆₅₈ (Er) | 2009 | 24 |
| 2. | Rojo Fenol | NaYF ₄ :Yb,Er | 60-90 | 6-8 | I ₅₄₁ (Er)/I ₆₅₅ (Er) | 2010 | 25 |
| 3. | Dendrímeros porfirina poliglutámica | β-NaYF ₄ :Yb,Er | 23 | 6-9 | I ₅₂₀₋₅₄₀ (Er)/I ₆₆₀ (Er) | 2012 | 26 |
| 4. | ETH 5418 | β-NaYF ₄ :Yb,Er | 200x1000 | 6-11 | I ₆₅₆ (Er)/I ₅₄₂ (Er) | 2012 | 27 |
| 5. | Verde de Bromocresol | Y ₂ O ₃ :Yb,Er | 200-300 | 5-10 | I ₆₇₁ (Er)/I ₆₆₁ (Er) | 2014 | 28 |
| 6. | Rojo Neutro | Gd ₂ O ₃ :Yb,Er | 1500 | 6-8 | I ₅₂₀₋₅₄₀ (Er)/I ₆₅₀ (Er) | 2014 | 29 |
| 7. | Azul de Bromotimol | NaGdF ₄ :Yb,Er | 200x1200 | 6-8 | I ₆₅₀₋₇₀₀ (Er) | 2014 | 30 |
| 8. | Verde de Bromocresol + Azul de Bromotimol | α-NaYF ₄ :Yb,Mn,Eu @α-NaYF ₄ @PEG | 24 | 3-8 | I ₅₉₂₋₆₀₈ (Er)/I ₇₀₀ (Eu) | 2014 | 31 |
| 9. | Aza-BODIPY dimetilamino | NaCaY _{0.2} Yb _{0.7} Tm _{0.02} Ho _{0.08} (MoO ₄) ₃ | Bulk | 7-10 | I ₇₉₇ (Tm)/I ₆₄₅ (Ho) | 2016 | 32 |
| 10. | Azul de Bromotimol Rodamina B | β-NaYF ₄ :Yb,Er@SiO ₂ @BSA | 240 | 6-8 | I ₅₄₀ (Er)/I ₆₅₅ (Er) | 2017 | 33 |
| 11. | Derivados de Bromofenol-BODIPY | β-NaYF ₄ :Yb,Tm@PEI | 27 | 5-7 7-9 | I ₅₅₀ (Er)/I ₆₅₅ (Er) A ₅₃₀₋₆₀₀ (dye)/A ₆₃₀₋₆₇₅ (Tm) | 2019 | 34 |
| Caso ii. LRET y emisión sensibilizada del colorante participa en señal del sensor | | | | | | | |
| 12. | pHrodo Red™ | β-NaYF ₄ :Yb,Er@SiO ₂ | 28x36 | 3-6,7 | I ₅₉₀ (dye)/I ₅₅₀ (Er) | 2014 | 35 |
| 13. | pHrodo Red™ | β-NaYF ₄ :Yb,Er@PEI | 23x27 | 3-7 | I ₅₉₀ (dye)/I ₅₅₀ (Er) | 2016 | 36 |
| 14. | Isotiocianato Fluoresceína | β-NaYF ₄ :Yb,Tm@SiO ₂ | 23 | 4-10 | I ₅₁₉ (dye)/I ₄₆₅ (Tm) | 2016 | 37 |
| 15. | Fluoresceína | β-NaGdF ₄ :Yb,Tm | 22 | 5-8 | I ₅₁₅ (dye)/I ₆₄₅ (Tm) | 2017 | 38 |
| 16. | Derivado hemicianina | @β-NaGdF ₄ :Nd,Yb@β-NaYF ₄ :Yb,Tm | 30 | 6,8-9 | I ₆₅₀ (Tm)/I ₅₁₅ (dye) | 2017 | 39 |
| 17. | nanodots GM-A ₂ S | @β-NaYF ₄ @PAA | 70 | 4-9 | I ₇₉₅ (GM-A ₂ S)/I ₅₄₀ (Er) | 2019 | 40 |

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

| n. | Especie cooperativa | UCNP | UCNH tamaño (nm) | Respuesta lineal pH | Señal de detección | Año | Ref. |
|---|--------------------------------|--|------------------|---------------------|---------------------------|------|------|
| Caso iii. LRET pero la señal de detección sensor está basada en emisiones de la UCNP | | | | | | | |
| 18. | Naranja de Xylenol | β -NaYF ₄ :Yb,Tm@SiO ₂ | 50 | 4-8 | $I_{450}(Tm)/I_{646}(Tm)$ | 2015 | 41 |
| 19. | Isoftiocianato de Fluoresceína | β -NaYF ₄ :Yb,Tm@PEI | 22 | 3-7 | $I_{475}(Tm)/I_{645}(Tm)$ | 2016 | 42 |
| 20. | Dopamina | β -NaYF ₄ :Yb,Tm@NaYbF ₄ @SiO ₂ | 50 | 5-8 | $I_{450}(Tm)$ | 2019 | 43 |
| Casos ii y iii. | | | | | | | |
| 21. | Rojo Calcio | β -NaYF ₄ :Yb,Er@ β -NaYF ₄ @PEI/PMA | 25-30 | 4,6-5,2 4,4-6,4 | $I_{540}(Er)/I_{650}(Er)$ | 2019 | 44 |

PEG: polietilenglicol, PEI: polietiliminina, BSA: albúmina de Suero bovino, PAA: ácido poliacrílico, GM: Glutación y ácido mercaptopropiónico, PMA: poliisobutileno de anhídrido maleico.

4.2. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo son:

- detectar el alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de un fluoróforo orgánico en un UCNH producido por LRET mediante NIR-LSM.
- construir UCNH compuestos de UC_{Tm} y colorantes mediante un método tipo rompecabezas (puzle) que aprovecha la alta afinidad de la molécula macrocíclica de cucurbit[7]urilo por los lantánidos.
- producir LRET entre bandas de emisión UC del Tm^{3+} y el fluoróforo orgánico de los UCNH, mediante la excitación en 980 nm, para alargar el tiempo de vida del fluoróforo orgánico.
- demostrar que los UCNH conservan las propiedades de detección química de la sonda que lo compone.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. UC@Rod110 en NIR-LSM

En primer lugar, se decidió poner a prueba la técnica NIR-LSM recientemente desarrollada para comprobar su potencial de aplicación en la visualización de la LRET en UCNH. Para ello, se construyó el UCNH más sencillo posible compuesto por una UCNP (UC_{Tm}) funcionalizada en su superficie con un colorante (rodamina 110, Rod110): $UC_{Tm}@Rod110$. La presencia del colorante en el UCNH se confirmó por absorción UV-vis y mediante colocalización en NIR-LSM. La absorción de Rod110 solapa con la banda de emisión de 475 nm del Tm^{3+} de UC_{Tm} (figura 4.3.a). Por tanto, es de esperar que la LRET tenga lugar tras la excitación a 980 nm (figura 4.3.d). Además, también cabe esperar que la Rod110 pueda ser excitada mediante excitación bifotónica (2PE, figura 4.3.c). Así, al irradiar a 975 nm una muestra de $UC_{Tm}@Rod110$ 2D discontinua sobre un portaobjetos de vidrio y utilizando la técnica NIR-LSM esperaríamos observar un comportamiento dual: en primer lugar, una rápida desactivación de la emisión del colorante excitado por 2PE, y a continuación, una emisión de tiempo de vida largo que reflejaría el tiempo de vida de la transición dadora de LRET de la UC_{Tm} . Este comportamiento se confirma siguiendo la emisión de $UC_{Tm}@Rod110$ en el C2 de detección (515-580 nm) de NIR-LSM. La figura 4.3.b muestra la imagen NIR-LSM y la figura 4.3.e el perfil de intensidad de un aglomerado de $UC_{Tm}@Rod110$. Tal y como se esperaba, hay una emisión instantánea fruto de la emisión de fluorescencia por la 2PE, que se observa como un punto bien definido (imagen C2 de la figura 4.3.b), seguido de un alargamiento del tiempo de vida debido a la LRET desde el Tm^{3+} , que se visualiza como una cola de emisión similar a las observadas para las transiciones de UCNP. Experimentos control demostraron que dicha emisión alargada en el C2 únicamente podía deberse a un alargamiento del tiempo de vida de la Rod110. El ajuste cinético de la

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

desactivación determinó un tiempo de vida de Rod110 de $214 \pm 10 \mu\text{s}$, varios órdenes de magnitud mayor respecto a su tiempo de vida de fluorescencia convencional (en la escala de nanosegundos), y similar al tiempo de vida de emisión de la UC_{Tm} en el C1 ($403,1 \pm 12,4 \mu\text{s}$).

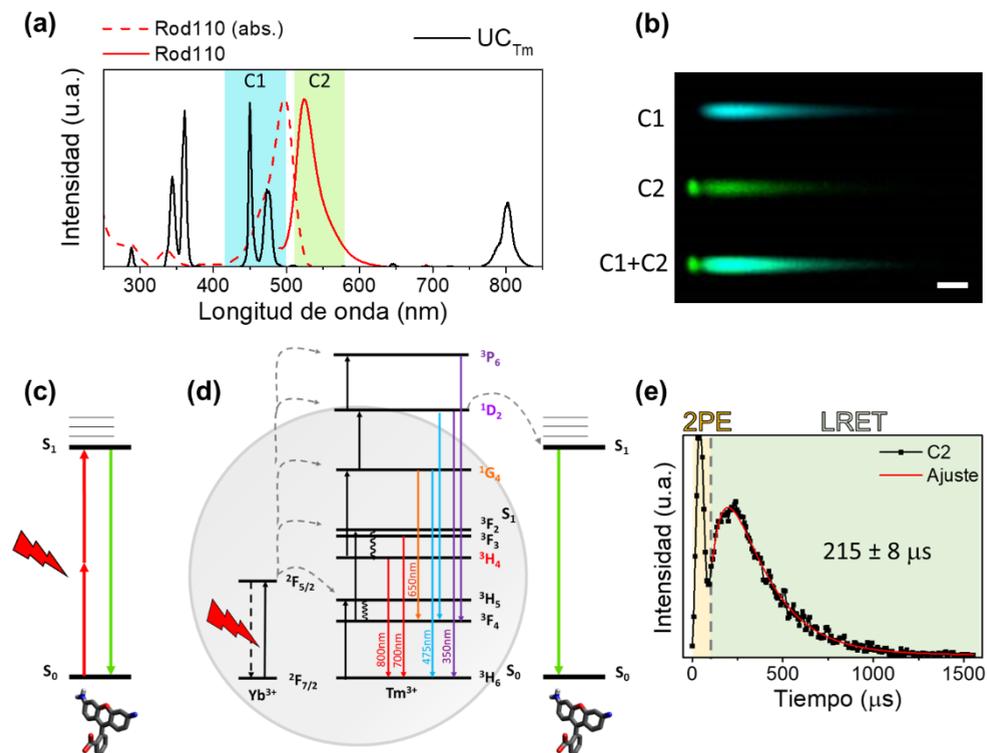


Figura 4.3. (a) Propiedades espectrales de UC_{Tm}@Rod110: absorción (línea roja discontinua) y emisión (línea roja, $\lambda_{exc}= 475 \text{ nm}$) de Rod110 en disolución acuosa, emisión no corregida de dispersión acuosa de 2,0 mg/mL de UC_{Tm} (línea negra; $\lambda_{exc}= 980 \text{ nm}$; $I= 890 \text{ W/cm}^2$) y canales de detección del microscopio NIR-LSM (cuadros coloreados). (b) Imagen NIR-LSM de un aglomerado de UC_{Tm}@Rod110 excitando a 975 nm (dwell time: 8 μs /píxel; $F_d = 20,8 \text{ J/cm}^2$) en C1, C2 y la imagen compuesta de ambos canales. Escala 50 μm . Reproducido de ²³ con permiso de the Royal Society of Chemistry. Esquema de la (c) 2PE y (d) de la excitación sensibilizada por la UCNP. (d) Perfiles de intensidad en C1 y C2 del aglomerado mostrado en el apartado (b).

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

Tabla 4.2. Tiempos de vida de desactivación obtenidos mediante un ajuste monoexponencial para UC_{Tm} y $UC_{Tm}@Rod110$ ($\lambda_{exc} = 975 \text{ nm}$; $F = 18 \cdot 10^6 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$).

| Tiempos de vida de desactivación, $\tau \pm \text{DS}$ | | |
|--|-----------|------------------|
| Canal de detección | UC_{Tm} | $UC_{Tm}@Rod110$ |
| | C1 | $403,1 \pm 12,4$ |
| C2 | | $213,7 \pm 10,0$ |

DS: desviación estándar.

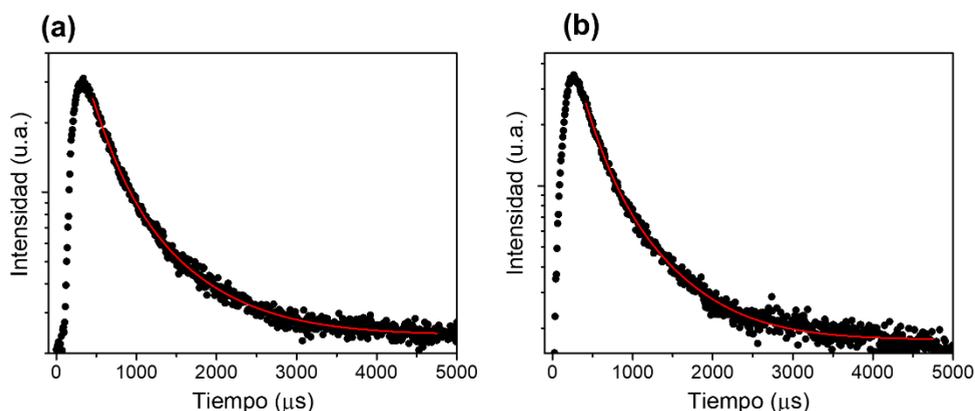


Figura 4.4. Perfiles cinéticos y ajuste del C1 de NIR-LSM de un aglomerado representativo de (a) UC_{Tm} y (b) $UC_{Tm}@Rod110$ ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$; dwell time: $8 \mu\text{s}/\text{píxel}$; $F_d = 17 \text{ J}/\text{cm}^2$).

Si bien es cierto que en C1 detectamos la respuesta mezcla de dos transiciones diferentes del Tm^{3+} (emisión 450 y 475 nm), se observa una reducción en el tiempo de vida de la emisión del Tm^{3+} en presencia de la Rod110 (tabla 4.2 y figura 4.4), indicativo de un entorno químico diferente. Debe tenerse en cuenta que esta aparente reducción del tiempo de vida del dador, por sí misma, no implica que el mecanismo sea LRET ya que en los sistemas en los que el tiempo de vida del estado excitado del dador es más largo que su tiempo de vida intrínseco, como las UCNP, aun ocurriendo LRET a un aceptor, no habría necesariamente un cambio en su perfil cinético. Este hecho se explica fácilmente

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

con el caso extremo de la emisión azul (410 nm) de la UCNP β -NaYF₄: Yb³⁺,Er³⁺.

El perfil temporal de esta emisión UC encaja bastante bien con el producto del perfil temporal de los procesos que lo alimentan: la emisión verde de Er³⁺ (540 nm) y la emisión del Yb³⁺ (980 nm).⁴⁵ Esto ocurre porque el tiempo de vida intrínseco de la emisión azul es rápido comparado con el proceso de alimentación y, por tanto, la emisión UC sigue las cinéticas de la transferencia de energía de los estados excitados la alimentan.⁴⁶ Como el tiempo de vida de esta emisión azul no refleja su tiempo de vida intrínseco, una transferencia de energía desde este estado no tendría ningún efecto en su perfil temporal UC. Así que, la emisión azul del Er³⁺ se desactivaría en cierto grado (*quenching*) pero su perfil temporal permanecería inalterado. Por ello, no sería correcto utilizar la ecuación 4.1 para estimar la eficiencia de la LRET (aunque así han hecho bastantes autores), pues necesitaríamos disponer de los tiempos de vida intrínsecos de la/s emisión/es dadora/s en presencia y ausencia del colorante. No obstante, aunque la reducción temporal observada en C1 no sea prueba concluyente de que el mecanismo de transferencia energía sea LRET, el alargamiento del tiempo de vida intrínseco del aceptor (tiempo de vida corto) es una evidencia válida de LRET.

Todo ello demuestra nuevamente el potencial de la técnica NIR-LSM para resolver temporalmente las emisiones UC de UCNH. En este caso se revela como una técnica que permite evaluar temporalmente en la escala micrométrica las transferencias de energía resonantes entre una UCNP y un fluoróforo orgánico, y, por tanto, capaz de evaluar la homogeneidad en la LRET, mediante el análisis de múltiples aglomerados/UCNH adyacentes.

2.3.2. UC@CB@Y@F

Existen diferentes estrategias químicas para funcionalizar UCNP con especies fotoactivas, como por ejemplo interdigitación de moléculas anfifílicas, enlace covalente, intercambio de ligandos, oxidación de ligandos o interacciones electrostáticas.⁴⁷⁻⁴⁹ En los últimos años, el grupo ha utilizado algunas de estas

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

estrategias para diseñar nanohíbridos con diferentes finalidades, como mejorar las propiedades emisivas,⁵⁰⁻⁵³ o su dispersión en el medio,⁵⁴⁻⁵⁷ utilizarlas en fotocatalisis,^{58,59} o como sensores⁶⁰⁻⁶². Entre ellas, destaca la utilización de un ligando macrocíclico: el cucurbit[7]urilo (CB).^{22,53,63} Este ligando consta de una cavidad hidrofóbica y dos extremos con 7 grupos carbonilos con una elevada densidad electrónica (figura 4.5.a), que lo hacen ideal para actuar como puente entre la superficie de la UCNP y especies fotoactivas. Además, la obtención de UCNP recubiertas con CB es extremadamente sencillo, lo que facilita la preparación del UCNH. De hecho, esta macromolécula nos ha permitido funcionalizar UCNP con colorantes orgánicos,⁵³ nanopartículas de perovskita⁶⁴ o cationes lantánidos.⁶³ Destaca este último caso porque permite construir de forma sencilla un UCNH en el que el catión Nd^{3+} queda anclado al portal libre de las moléculas de CB a una distancia fija de ≈ 1 nm (altura de la molécula de CB) sobre la superficie de la UCNP, que, a su vez, es capaz de generar emisión UC tanto si lo excitamos a 980 nm (excitar al Yb^{3+} de la UCNP) como a 800 nm (excitar al Nd^{3+} superficial). Por tanto, las moléculas de CB permiten el pasivado homogéneo de la superficie, impidiendo fenómenos de desactivación por interacción con moléculas de disolvente, a la vez que permite el anclaje de especies fotoactivas a una distancia muy pequeña de la superficie de la UCNP, inferior a la distancia de Förster ($R_0 \approx 3-5$ nm), por lo que no impediría fenómenos LRET. Nótese, que el anclaje directo del colorante a la superficie celular podría provocar fenómenos de agregación de moléculas del colorante y favorecer su auto-desactivación (*self-quenching*) no radiativa.^{60,65-67}

Por ello, desarrollamos un UCNH ($\text{UC}_{\text{Tm}}@CB@Y@F$) de construcción sencilla y modular, que consta de un catión lantánido inactivo fotofísicamente, Y^{3+} , coordinado a una sonda convencional de fluoresceína (F) y también al portal libre de los CB anclados a la superficie de una nanopartícula de tipo *core* β - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}(23\%),\text{Tm}^{3+}(0,3\%)$ (UC_{Tm}). Se trata de un UCNH en el que la función conjunta del CB y del catión es actuar como un pasivado orgánico de la NP y un

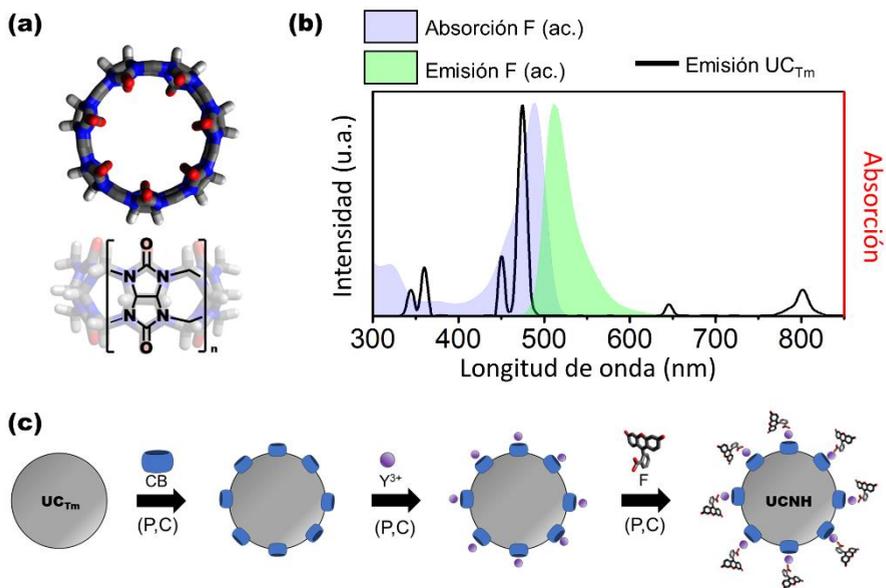


Figura 4.5. (a) Molécula macrocíclica de cucurbit[7]urilo. (b) Propiedades espectrales de absorción (área azul) y emisión (área verde) de F libre en medio acuoso (pH=7), junto con la emisión UC de la UC_{Tm}. (c) Esquema del procedimiento sintético de obtención del UCNH, donde se indican las etapas de purificación (P) y caracterización (C) en cada etapa.

andamio para el fluoróforo que eventualmente permite LRET. La sonda fluorescente elegida como prueba de concepto fue F por tres razones: (i) es un sensor de pH bien conocido y cuyo espectro de absorción depende la polaridad y pH del medio, (ii) tiene un grupo carboxilato que permite su coordinación al catión Y^{3+} y (iii) la absorción de F solapa con la emisión de UC_{Tm} (figura 4.5.b), requisito indispensable para LRET.

En primer lugar, mediante el protocolo de descomposición térmica, se sintetizó la UC_{Tm} recubierta de oleato en fase cristalina hexagonal, con el dopaje adecuado y tamaño de $29 \pm 1 \times 24 \pm 1$ nm. Posteriormente, mediante un tratamiento ácido, los ligandos oleato fueron eliminados para obtener así la UC_{Tm} desnuda o sin ligandos, dispersable en medio acuoso, para la construcción del

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

UCNH. A continuación, el procedimiento seguido para formar el UCNH consistió en pasos sucesivos de exposición de la NP a los componentes del sistema (CB, Y^{3+} y F) en agitación constante, seguido de un proceso de purificación (ciclos de centrifugación-redispersión) y caracterización de la NP en cada etapa (figura 4.5.c). Se preparó $UC_{Tm}@CB$ exponiendo la UC_{Tm} desnuda con el CB en medio acuoso. La purificación se realizó mediante ciclos de centrifugación-redispersión con agua para, posteriormente, caracterizar el UCNH. Luego, se repitió el mismo procedimiento para añadir Y^{3+} y F. Por tanto, cabe destacarse que se trata de un procedimiento sencillo, a temperatura ambiente, cómodo para el usuario y versátil, que permite la construcción de infinidad de UCNH. Además, $UC_{Tm}@CB$ permitiría aprovechar la cavidad del CB para encapsular moléculas orgánicas.⁶⁸⁻⁷⁰

La eficiente eliminación de los ligandos oleato se confirmó mediante espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR), que muestra la reducción de las bandas de estiramiento de enlaces C-H a *ca.* 2900 cm^{-1} (figura 4.6.a), ya que la UC_{Tm} libre de oleatos únicamente presenta bandas de estiramientos (3100 cm^{-1}) y flexión de grupos OH (1640 cm^{-1}), inevitables en la superficie de las UCNP basadas en matrices de fluoruro.⁷¹ La presencia de CB se confirmó mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM), que muestra UC_{Tm} recubiertas por un material amorfo no cristalino que se va quemando por la irradiación de electrones, atribuido al CB.⁶³ Además, el espectro muestra la aparición de las bandas de estiramiento de grupos carbonilos del CB ligeramente desplazados (1737 cm^{-1}) (figura 4.6.b). La adición de Y^{3+} al sistema provoca el desdoblamiento de la banda de carbonilos del CB (1735 y 1712 cm^{-1} , figura 4.7.a) debido a los entornos químicos de los portales carbonilo de la molécula. Por último, la presencia de F aumenta las señales en la región de huella dactilar ensanchando los picos y complicando la identificación de señales (figura 4.7.a), ya que se mezclan las señales del CB y las de la F en

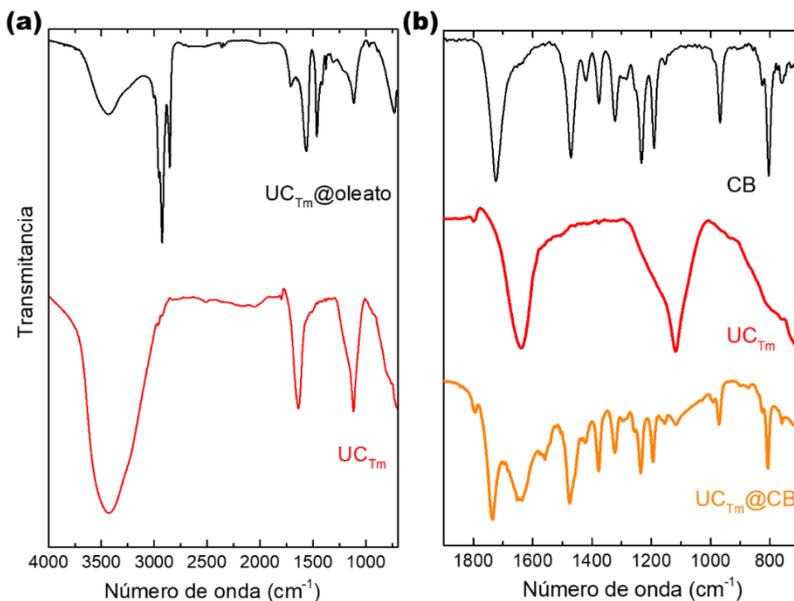


Figura 4.6. Espectros FTIR que muestran (a) la eliminación de los ligandos oleato superficiales de UC_{Tm} y (b) la adición de CB a $UC_{Tm}@CB$.

dos intervalos: en $1100-1460\text{ cm}^{-1}$, donde estarían las señales del grupo éter aromático (1252 y 1117 cm^{-1}) y el carboxilato de la F (1400 cm^{-1}), junto otras del carbonilo (1190 cm^{-1}) y enlaces sencillos C-N (ca. 1200 cm^{-1}) de CB; y entre $1550-1800\text{ cm}^{-1}$, donde se ubicaría la señal del grupo carboxilato de F desplazada (1650 cm^{-1}), junto con la flexión de los grupos OH (1640 cm^{-1}) superficiales y de los portales de grupos carbonilos del CB (1737 y 1712 cm^{-1}).

Además, la presencia de F se confirmó por microscopía electrónica y espectroscopía de absorción y emisión. Por un lado, las imágenes de HRTEM de $UC_{Tm}@CB@Y@F$ muestran que la forma y el tamaño de las UC_{Tm} de partida permanecen inalteradas tras las adiciones de los distintos componentes y que el recubrimiento amorfo permanece y recubre completamente las UC_{Tm} (figuras 4.7.b-c). Por otro lado, el espectro de atenuación de $UC_{Tm}@CB@Y@F$ muestra la dispersión (*scattering*) característica de los nanomateriales junto con la

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

absorción de la fluoresceína que continúa, pese a estar anclada en el UCNH, siendo sensible a cambios en la polaridad del medio (agua vs. DMF; figura 4.8).

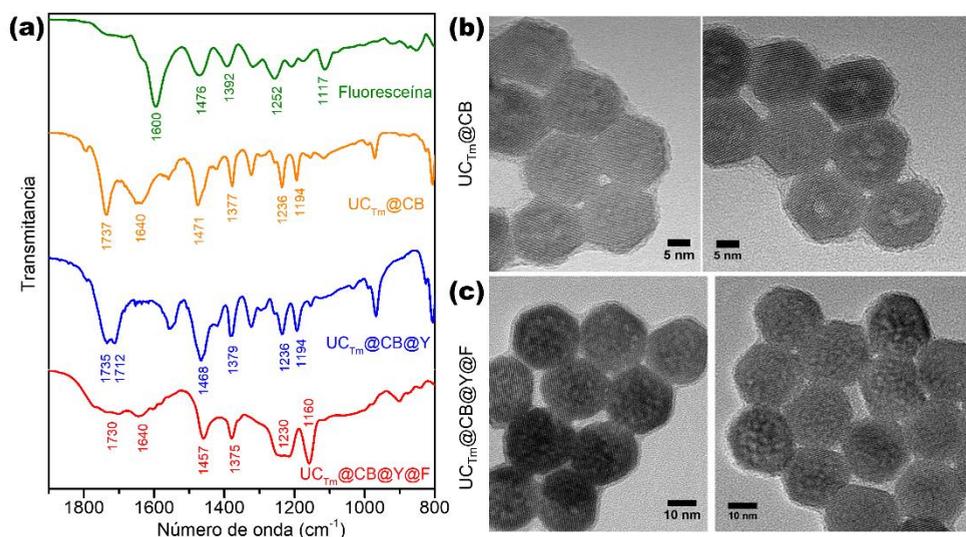


Figura 4.7. (a) Espectro FTIR de F (verde), UC_{Tm}@CB (naranja), UC_{Tm}@CB@Y (azul) y UC_{Tm}@CB@Y@F (rojo). Imágenes de HRTEM de (b) UC_{Tm}@CB y (c) UC_{Tm}@CB@Y@F. Adaptado con permiso de ²² Copyright 2020 John Wiley and Sons.

El espectro de absorción permitió determinar una concentración de $4 \cdot 10^{-9}$ M de F/mg UCNH (véase sección 4.5.4. *Estimación de F en UC_{Tm}@CB@Y@F*). El espectro de emisión del UCNH excitando a 980 nm muestra una reducción relativa de la intensidad de emisión en las bandas de emisión del Tm³⁺ a 345, 368, 450 y 475 nm afectadas por la absorción de F (figura 4.9.a). Esta reducción junto con una nueva banda de emisión de F sensibilizada por la UCNP, centrada en 512 nm en medio acuoso y 540 nm en DMF (figura 4.8), es consistente con un proceso de transferencia de energía.

Cuando excitamos las muestras a 980 nm, la técnica NIR-LSM, permite demostrar un comportamiento muy similar al de UC_{Tm}@Rod110. En el C2, donde se detectaría la emisión de F, el UC_{Tm}@CB@Y UCNH no presentó ninguna

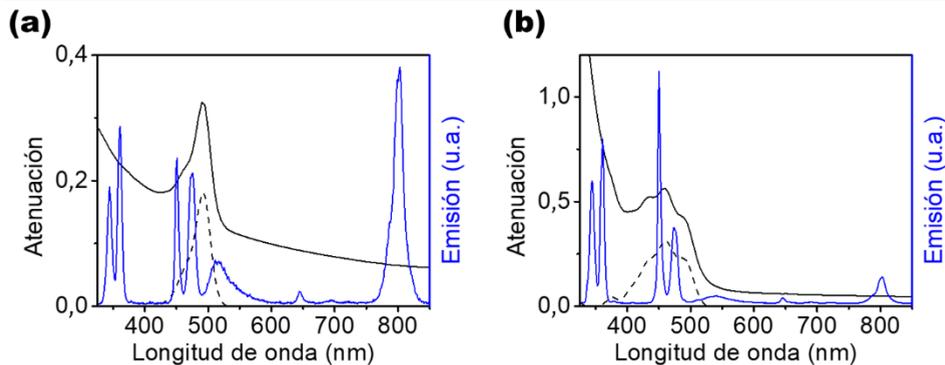


Figura 4.8. Espectros de atenuación (línea negra), absorción (línea negra discontinua) y de emisión no corregido ($\lambda_{exc} = 980$ nm, línea azul) de UC_{Tm}@CB@Y@F en (a) medio acuoso a 0,5 mg/mL y en (b) DMF a 2,5 mg/mL.

señal (figura 4.9.c), mientras que UC_{Tm}@CB@Y@F sí (figura 4.9.e y figura 4.10.a). Nuevamente, se observa que el colorante vuelve a presentar un comportamiento dual: una emisión corta debida a la excitación bifotónica de F, que aparece como un punto bien definido, y una emisión sensibilizada y de larga duración debido a la LRET entre la UC_{Tm} y F (figura 4.10.b). La emisión sensibilizada presentó un tiempo de vida elevado (202 μ s) similar al tiempo de vida empírico de la transición de Tm³⁺ dadora de energía (295 μ s) y muy diferente al tiempo de vida de la F libre (en la escala de nanosegundos), indicativa de un proceso LRET entre el Tm³⁺ y la F (figura 4.10.c). La colocalización visual de la emisión del Tm³⁺ y de F se hace patente al superponer imágenes NIR-LSM obtenidas excitando a 980 nm y 900 nm (2PE de F, figura 4.9.g). Además, se observa una reducción en los tiempos de vida de la emisión detectada en C1 para el UCNH funcionalizado con F (tabla 4.3). Por tanto, se confirma que el sistema de construcción sencillo, tipo puzzle, basado en la utilización de CB como andamio que finalmente permite el anclaje de F y da lugar a procesos LRET entre UC_{Tm} y sondas orgánicas.

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

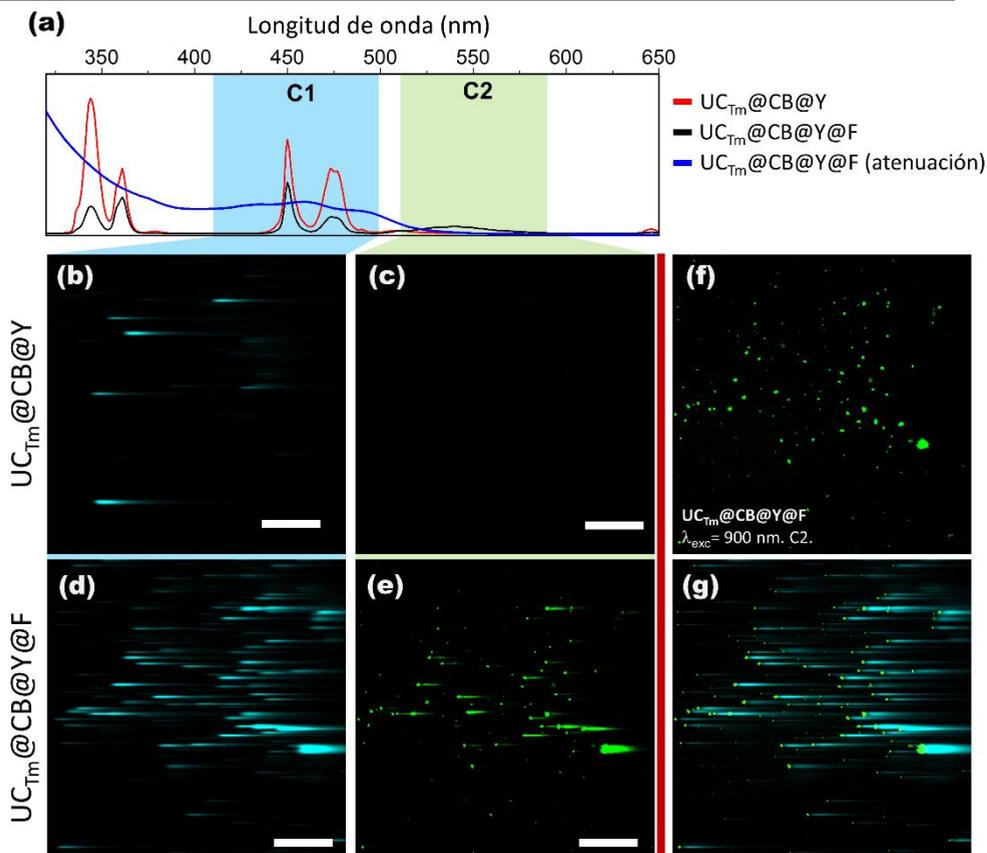


Figura 4.9. (a) Espectro de emisión no corregido de $UC_{Tm}@CB@Y$ y $UC_{Tm}@CB@Y@F$ en DMF ($\lambda_{exc}=980\text{ nm}$; $2,5\text{ mg/mL}$) en el cual la emisión centrada en 540 nm ha sido aumentada para $UC_{Tm}@CB@Y@F$ ($\times 5$, $500\text{-}600\text{ nm}$), junto con el espectro de atenuación de $UC_{Tm}@CB@Y@F$ en DMF ($2,5\text{ mg/mL}$) y los canales de detección de NIR-LSM (áreas coloreadas). Imágenes NIR-LSM del (b) C1 y (c) C2 de $UC_{Tm}@CB@Y$ ($\lambda_{exc}=980\text{ nm}$; $F_d=10,6\text{ J/cm}^2$), del (d) C1 y (e) C2 de $UC_{Tm}@CB@Y@F$ ($\lambda_{exc}=980\text{ nm}$; $F_d=10,6\text{ J/cm}^2$) y del (f) C2 de $UC_{Tm}@CB@Y@F$ excitando vía 2PE a la F ($\lambda_{exc}=900\text{ nm}$; $F_d=4,4\text{ J/cm}^2$). (g) Imagen NIR-LSM compuesta de (d) y (f) que muestra la colocación visual, pues a cada emisión definida de F (verde) le corresponde una cola de emisión UC de Tm^{3+} (azul). Adaptado con permiso de ²² Copyright 2020 John Wiley and Sons.

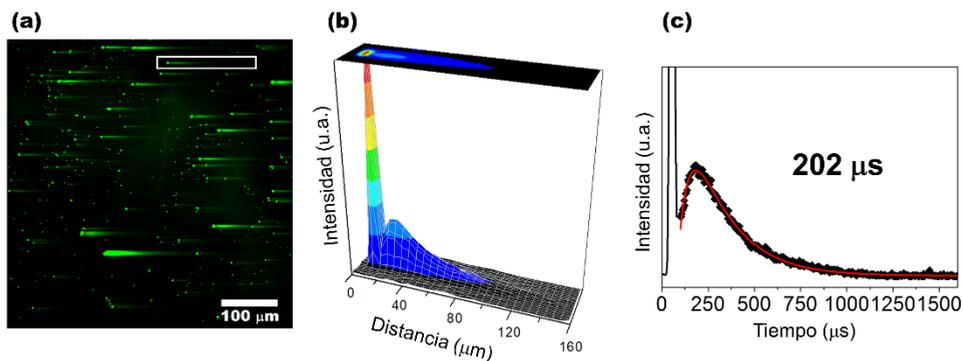


Figura 4.10. (a) Imagen NIR-LSM obtenida en el C2 excitando a 980 nm (*dwell time*: 4 $\mu\text{s}/\text{píxel}$; $F_d = 10,6 \text{ J}/\text{cm}^2$) el $\text{UC}_{\text{Tm}}@\text{CB}@\text{Y}@\text{F}$. (b) Representación 3D de la emisión espacial y (c) perfil cinético y ajuste del aglomerado destacado en (a). Adaptado con permiso de ²² Copyright 2020 John Wiley and Sons.

Tabla 4.3. Tiempos de vida de desactivación obtenidos por el ajuste monoexponencial de colas de imágenes NIR-LSM de $\text{UC}_{\text{Tm}}@\text{CB}@\text{Y}$ y $\text{UC}_{\text{Tm}}@\text{CB}@\text{Y}@\text{F}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 975 \text{ nm}$; $F_d = 10,6 \text{ J}/\text{cm}^2$).

| Tiempos de vida de desactivación, $\tau \pm \text{DS}$ | | |
|--|--|---|
| Canal de detección | $\text{UC}_{\text{Tm}}@\text{CB}@\text{Y}$ | $\text{UC}_{\text{Tm}}@\text{CB}@\text{Y}@\text{F}$ |
| C1 | 295 ± 2 | 238 ± 9 |
| C2 | | 202 ± 10 |

DS: desviación estándar.

El espectro de emisión de F depende del pH del medio. Por tanto, la variación de la desactivación de las bandas de emisión de UCNPs, especialmente en el caso de $\text{UC}_{\text{Tm}}@\text{CB}@\text{Y}@\text{F}$ donde existe un solapamiento adecuado entre la emisión de UC_{Tm} y la absorción de F, permitiría su uso como sensor ratiométrico de pH.

La evolución de la absorción de F en el $\text{UC}_{\text{Tm}}@\text{CB}@\text{Y}@\text{F}$ demuestra que, como era de esperar, la F se comporta de forma análoga a un éster de fluoresceína, y no como el ácido carboxílico de F, ya que el extremo carboxilato una vez se coordina al Y^{3+} no permite la formación intramolecular de la especie lactona. Por tanto, el equilibrio de ionización se produce entre tres especies: la forma

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales
 catiónica, el quinoide neutro y la forma aniónica, frente a las cinco especies que
 da lugar la F libre (véase sección 4.5.3. *La fluoresceína como sonda de pH en*
UC_{Tm}@CB@Y@F).

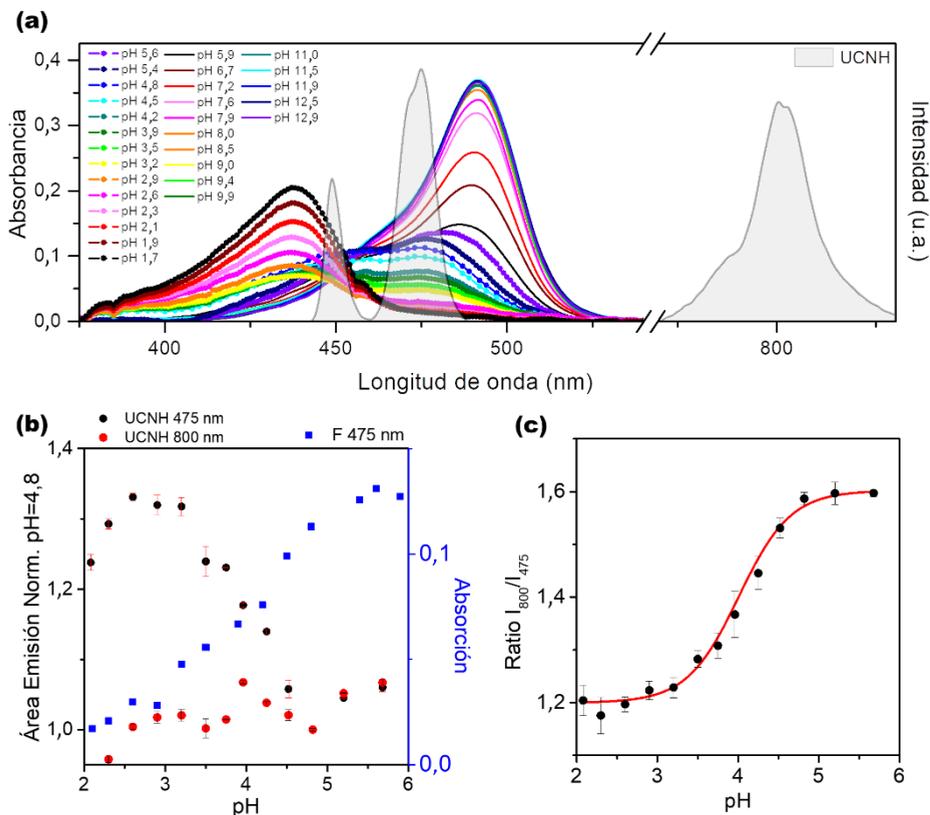


Figura 4.11. (a) Espectros de absorción de F en UC_{Tm}@CB@Y@F a distintos pH y espectro no corregido de emisión de una dispersión acuosa 1 mg/mL de UC_{Tm}@CB@Y@F ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$; $I = 890 \text{ W/cm}^2$). Adaptado con permiso de ²² Copyright 2020 John Wiley and Sons. (b) Evolución de la absorción de F en UC_{Tm}@CB@Y@F (cuadros azules) y de la emisión UC no corregida a 475 nm (puntos negros) y 800 nm (puntos rojos) en el intervalo de pH mostrado (normalizadas a la medida de pH= 4,8 para que ambas tendencias cupieran en la misma ventana). (c) Respuesta lineal de la proporción de la emisión UC de 475 nm y de 800 nm en función del pH y ajuste sigmoidal.

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

La variación del espectro de absorción de F afecta especialmente a las bandas de 450 y 475 nm de emisión UC_{Tm} en UC_{Tm}@CB@Y@F (figura 4.11.a). Así, partiendo de pH ácidos se observa una reducción de la emisión a 475 nm conforme aumenta la absorción de F en esa longitud de onda, mientras que la emisión a 800 nm de UC_{Tm}@CB@Y@F no se ve afectada en todo el rango de pH (figura 4.11.b). De tal manera que, la F anclada al UCNH conserva sus propiedades como sensor de pH, aunque en forma de éster, y el UCNH resultante presenta buenas propiedades como sensor ratiométrico en el rango de 3-5 unidades de pH (figura 4.11.c).

Es cierto que, frente a otros sensores mostrados en la tabla 4.1, también basados en UCNH compuestos de UCNP y colorantes orgánicos, no es el que presenta una respuesta lineal al pH más amplia, sin embargo, presenta la ventaja de que utiliza las dos emisiones más intensas de la UC_{Tm} para la determinación de la ratio de bandas de emisión, frente a sensores ratiométricos que usan una emisión poco intensa de UC_{Tm} (650 nm) o bien la emisión sensibilizada del colorante (515 nm), que es también poco intensa. Así que, de cara a una posible aplicación en muestras biológicas, el presente UCNH sería mucho más fácil de detectar mediante técnicas de microscopía, lo que, en principio, permitiría reducir

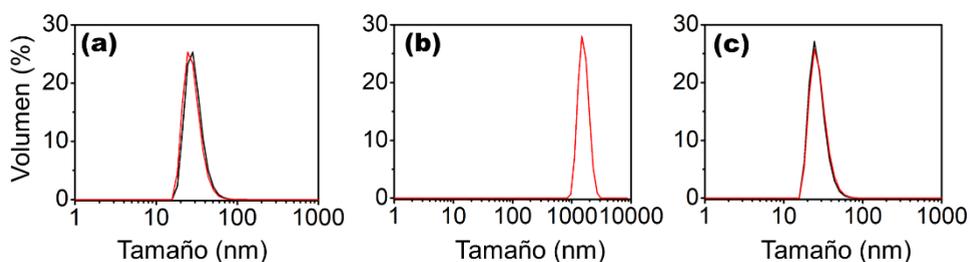


Figura 4.12. Representaciones de volumen frente a tamaño de dispersión de dispersión de luz dinámica (DLS) de 0,5 mg/mL de UC_{Tm}@CB@Y@F en (a) agua MilliQ (pH= 6, en negro inicial y en rojo después de 4 h), (b) PBS (pH= 7,4) y (c) en 0,1 M NaCl (pH=6, en negro inicial y en rojo después de 4 h). Adaptado con permiso de ²² Copyright 2020 John Wiley and Sons.

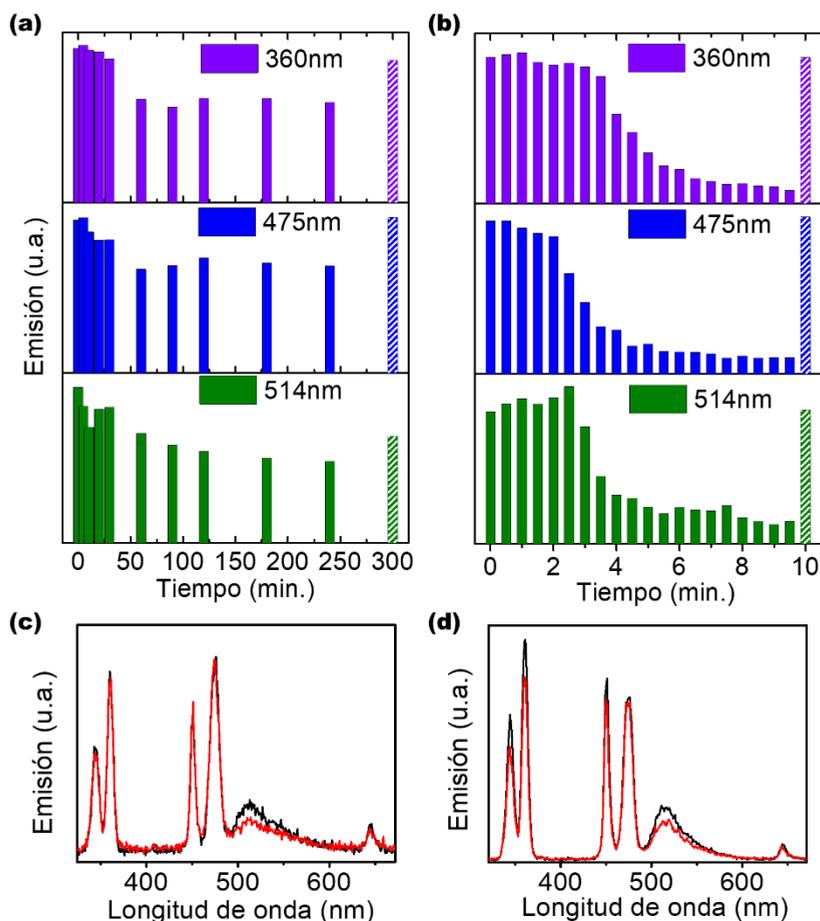


Figura 4.13. Evolución de la emisión de $UC_{7m}@CB@Y@F$ ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$; $0,5 \text{ mg/mL}$) en (a) medio acuoso ($\text{pH} = 6$) y (b) medio fisiológico (tampón PBS, $\text{pH} = 7,4$) sin agitación. A las 4 horas la dispersión se agita manualmente y se registra el espectro de emisión (barra rayada). Comparativa entre el espectro de emisión ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$; $0,5 \text{ mg/mL}$) original (negro) y agitado a las 4 horas (rojo) en medio (c) acuoso ($\text{pH} = 6$) y (d) PBS ($\text{pH} = 7,4$). Adaptado con permiso de ²² Copyright 2020 John Wiley and Sons.

los límites de detección en comparación al resto de estudios. Además, los sensores de pH ácidos pueden ser interesantes para la localización de ciertos

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

compartimentos celulares, como endosomas y lisosomas, o la detección de una disfunción, como la apoptosis o cáncer.^{35,36,42}

Por último, en lo que respecta a la estabilidad coloidal y química del UCNH, se concluyó que el UCNH permanece estable coloidal y químicamente (figuras 4.12.a y 4.13.a) durante 4 horas en agua MilliQ; sin embargo, en condiciones fisiológicas (tampón fosfato salino, PBS, pH=7,4) a los 10 minutos tiende a agregarse y sedimentar (figura 4.12.b), aunque son fácilmente redispersables y recuperan sus propiedades emisivas (figura 4.13.b). A las 4 horas se observa una reducción del 20% de la emisión sensibilizada de F, indicativo de la descoordinación de una parte de F (figura 4.13.c y 4.13.d). La influencia de la fuerza iónica es despreciable en la estabilidad coloidal de UCNH (figura 4.12.c) y en las propiedades como sensor: la variación de la proporción de intensidades de las bandas UC de emisión de Tm^{3+} del UCNH (figura 4.14) expresado como desviación estándar relativa es del 3,4 %.

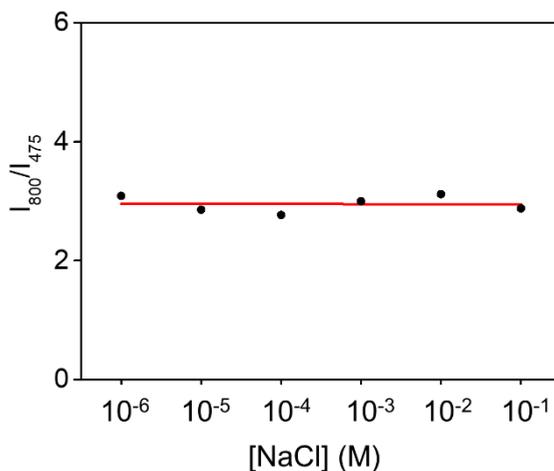


Figura 4.14. Influencia de la fuerza iónica en concentración de NaCl en la respuesta del sensor ratiométrico de $UC_{Tm@CB@Y@F}$ ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$; 0,5 mg/mL UCNH en medio acuoso pH= 6).

4.4. Conclusión

Finalmente se concluye lo siguiente:

- La técnica NIR-LSM permite evaluar el alargamiento del tiempo de vida de especies fotoactivas sensibilizadas por UCNP. Concretamente, se observa el alargamiento del tiempo de vida de colorantes orgánicos (Rod110 y F) por transferencia de energía desde UC_{Tm}. NIR-LSM, en principio, también permitiría evaluar la eficiencia en la transferencia de energía, pero para ello requeriríamos de un sistema de detección capaz de discriminar entre las bandas de 450 y 475 nm de UC_{Tm}, y fuentes de excitación en el UV-vis.
- Se ha realizado una síntesis sencilla, tipo rompecabezas (puzle), de UCNH (UC_{Tm}@CB@Y@F) compuestos por UCNP y fluoróforos orgánicos espaciados a una distancia fija, lo que permite, mediante excitación en el NIR, alargar el tiempo de vida de fluoróforos orgánicos (de nanosegundos a microsegundos) a través de LRET.
- La F en UC_{Tm}@CB@Y@F mantiene sus propiedades de sensor de pH, y además permite la detección ratiométrica de pH entre 3 y 5, utilizando la relación de intensidad entre dos bandas de emisión de T_m: una afectada por la absorción dependiente del pH de F (475 nm) y otra invariable (800 nm). De tal manera que el UCNH resultante reúne de forma sinérgica las propiedades emisivas de UCNP y las propiedades fotofísicas y de detección de moléculas orgánicas.

4.5. Procedimiento experimental

4.5.1. Materiales

Los materiales utilizados para la síntesis de NP fueron: los cloruros hidratados de los lantánidos ($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{TmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{HoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, todos al 99,9%), 1-octadeceno (95%), ácido oleico (70%), NaOH y NH_4F (99,99%). Todos los reactivos se compraron a Sigma-Aldrich (Merck) y se utilizaron sin purificar.

4.5.2. Protocolos sintéticos y preparativos

Síntesis de $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}(23\%),\text{Tm}^{3+}(0,3\%)$ recubiertas de oleato

Las UCNP se sintetizaron según un protocolo previo⁷² con algunas modificaciones. En un matraz de fondo redondo se añaden 15 mL de 1-octadeceno y 8 mL de ácido oleico. A continuación, se añade una disolución de 2 mL de metanol (MeOH) que contiene 1 mmol de lantánidos (0,80 mmol $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,20 mmol $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0,002 mmol $\text{TmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). La mezcla se mantiene una agitación constante y atmósfera inerte (N_2) hasta el final de la síntesis, se calienta hasta 160 °C y se mantiene a esa temperatura hasta que las sales se hayan disuelto. Posteriormente, la disolución se enfría hasta 60°C y se añade una disolución de MeOH que contiene NaOH (2,5 mmol) y NH_4F (4 mmol). La disolución se calienta hasta 125 °C para eliminar el MeOH. Por último, se sube rápidamente la temperatura hasta 305 °C y se mantiene a esa temperatura durante 1,5 hora. Pasado ese tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente. La purificación de las UCNP se realiza mediante precipitación y lavados. En primer lugar, se centrifuga la mezcla de reacción a 9000 rpm 15 minutos. El precipitado se lava mediante ciclos de redispersión-centrifugación tres veces utilizando una mezcla de n-hexano:acetona:MeOH (87:81:32) y una vez con etanol. Finalmente,

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

las UCNP se redispersan en tolueno. Como ocurre generalmente, la proporción de los lantánidos obtenido por EDX difiere ligeramente del experimental. Debe tenerse en cuenta que se sintetizaron dos lotes distintos de UC_{Tm}: uno para el UCNH con Rod110 y otro para construir UC_{Tm}@CB@Y@F. Por ello, aunque en el capítulo, por simplificar, ambos son llamados indistintamente UC_{Tm} es de esperar que tengan pequeños cambios en el dopaje y, por tanto, propiedades fotofísicas ligeramente diferentes, que se hacen patentes sobre todo en los tiempos de vida de las emisiones UC de Tm³⁺. La concentración de UCNP (mg/mL) se obtiene secando una alícuota (100-200 µL) de la dispersión final de UCNP.

Eliminación de ligandos oleato superficiales de β-NaYF₄·Yb³⁺ (23%), Tm³⁺ (0,3%) (UC_{Tm})

Los ligandos oleato de la superficie de la UCNP se eliminaron mediante un tratamiento ácido previamente descrito.⁷³ 100 mg de UC_{Tm} sólidas recubiertas de oleato se redispersaron en 10 mL de una disolución acuosa de HCl a pH 3 y se mantuvieron en agitación vigorosa durante 3 horas. Después, se realizaron tres extracciones con dietiléter (10 mL) para eliminar el ácido oleico en la fase orgánica. La fase orgánica se lava con 10 mL de agua, para recuperar toda la UCNP posible. Las fases acuosas se juntaron, se añadieron 10 mL de acetona y la UC_{Tm} libre de oleato se recuperó mediante precipitación por centrifugación a 9000 rpm durante 15 minutos a 25 °C. Finalmente, la UC_{Tm} se redispersa en agua Milli-Q. La concentración de UC_{Tm} (mg/mL) se obtiene secando una alícuota (100-200 µL) de la dispersión final de UCNP.

Preparación de UC_{Tm}@CB

La UC_{Tm}@CB se prepararon utilizando un protocolo previamente descrito por el grupo.⁵³ Para ello, se añadieron 0,01 mmol CB a una dispersión acuosa de 30 mg de UC_{Tm} en 15 mL de agua. La dispersión se mantuvo en oscuridad con agitación constante a 350 rpm en un agitador orbital durante 48 horas. El exceso

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

de CB se eliminó con lavados (2x 15 mL de agua y 1x 15 mL acetonitrilo) mediante ciclos de centrifugación (10000 rpm, 10 minutos, 20 °C)-redispersión. Finalmente, UC_{Tm}@CB se redispersa en agua Milli-Q. La concentración de UCNP (mg/mL) se obtiene secando una alícuota (100-200 µL) de la dispersión final de UCNP.

Preparación de UC_{Tm}@CB@Y

Para preparar UC_{Tm}@CB se añade un exceso de YCl₃·6H₂O (2,2 mol Y³⁺/mol de CB en UC_{Tm}@CB) a 15 mL una dispersión acuosa 2 mg/mL de UC_{Tm}@CB.⁶³ La mezcla se agitó en oscuridad en un agitador orbital a 400 rpm durante 24 horas. El UCNH resultante se separó por centrifugación (10000 rpm, 10 minutos, 20 °C) y se lavó dos veces con 10 mL de agua Milli-Q mediante ciclos de centrifugación (10000 rpm, 10 minutos, 20 °C)-redispersión. Finalmente, UC_{Tm}@CB@Y se redispersa en agua Milli-Q. La concentración de UCNP (mg/mL) se obtiene secando una alícuota (100-200 µL) de la dispersión final de UCNP.

Preparación de UC_{Tm}@CB@Y@F

Para preparar UC_{Tm}@CB@Y@F se añade una alícuota de 200 µL de una disolución 0,01 M de F en acetona a 10 mL de una dispersión acuosa 1 mg/mL de UC_{Tm}@CB@Y en agitación (imán) vigorosa. El UCNH resultante se separó por centrifugación (10000 rpm, 10 minutos, 20 °C) y se lavó (2x 10 mL de acetona y 2x 10 mL acetonitrilo) mediante ciclos de centrifugación (10000 rpm, 10 minutos, 20 °C)-redispersión hasta que el sobrenadante no presentaba absorción de F. La concentración de UCNH (mg/mL) se obtiene secando una alícuota (100-200 µL) de la dispersión final de UCNH.

Estudio de pH de UC_{Tm}@CB@Y@F

Las medidas de pH se realizaron con un pHmetro (GLP 21+, CRISON Instruments) con un electrodo 50 21 apto para suspensiones (CRISON Instruments). El estudio de pH en medio ácido se realizó acidificando

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

progresivamente, mediante la adición de alícuotas de disoluciones de HCl (0,05, 0,1 y 0,2 M) a 5 mL de una dispersión 1 mg/mL de UC_{Tm}@CB@Y. El volumen total adicionado de disolución ácida no superó el 5 % del volumen de muestra original (5 mL), con el fin de evitar un efecto de dilución que afectaría a la intensidad de las señales UC. La medida de pH en medio básico (no mostrada en el capítulo) también se realizó añadiendo alícuotas de disoluciones concentradas de NaOH (0,5, 0,25, 0,125 y 0,05 M) a 5 mL de una dispersión 1 mg/mL de UC_{Tm}@CB@Y.

Preparación de muestras para NIR-LSM

Las muestras se prepararon por recubrimiento por centrifugación (*spin coater* KW-4A, Chemat technology). El procedimiento se optimizó para formar una monocapa discontinua de NP sobre un portaobjetos de microscopía de vidrio (25 x 25 mm) apropiada para NIR-LSM. Para ello, 100 µL de una dispersión acuosa 1 mg/mL de una dispersión acuosa 1 mg/mL de UC_{Tm}, UC_{Tm}@Rod110, UC_{Tm}@CB@Y o UC_{Tm}@CB@Y@F se depositan sobre el portaobjetos en el *spin coater*. A continuación, se enciende el equipo, que está programado en dos etapas: una primera a 500 rpm durante 12 s y una segunda a 4500 rpm durante 30 s. A continuación, se deja secar la muestra, se cubre con un vidrio cubreobjetos (< 170 µm grosor, 22 x 22 mm) y, por último, se sellan las juntas con esmalte de uñas o cinta adhesiva.

4.5.3. La fluoresceína como sonda de pH en UC_{Tm}@CB@Y@F

La estructura de la fluoresceína comprende un anillo xanteno acoplado a un benceno y exhibe múltiples equilibrios iónicos dependientes del pH, lo que la hacen útil como sonda de fluorescencia de pH. En disolución acuosa presenta diferentes especies: catiónica, neutra, quinoide, aniónica y dianiónica (figura 4.15) con diferente absorción y fluorescencia en función del pH.⁷⁴

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

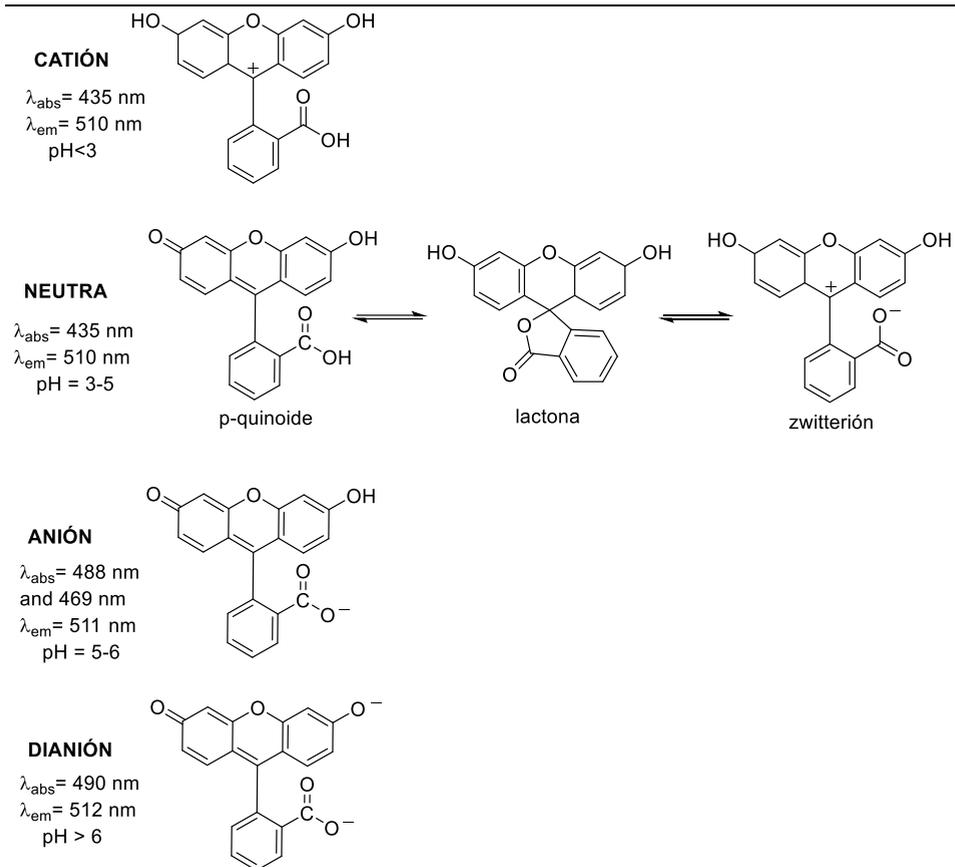


Figura 4.15. Especies de la F en función del pH del medio. Adaptado con permiso de ²² Copyright 2020 John Wiley and Sons.

Sin embargo, el comportamiento de los espectros de absorción del sistema UC_{Tm}@CB@Y@F nos hace suponer que, cuando el grupo carboxilato se encuentra coordinado al ión de Y³⁺, la F se comporta de forma similar a un éster de F. Por tanto, en función del pH únicamente tendremos tres especies diferentes (figura 4.16).

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

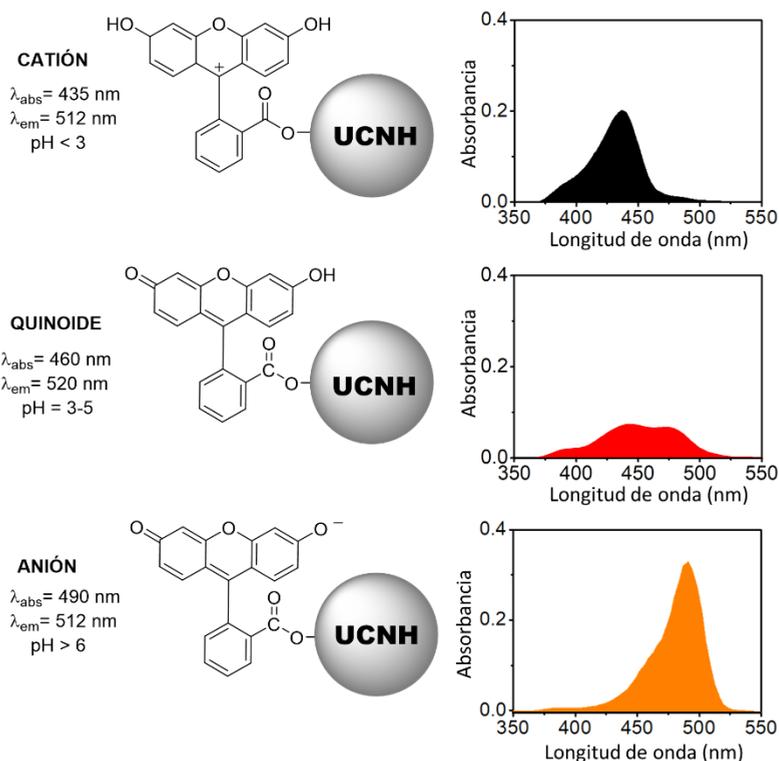


Figura 4.16. Representación esquemática de las especies que da lugar la F en función del pH en UC_{Tm}@CB@Y@F, acompañadas por el espectro de absorción correspondiente. Adaptado con permiso de ²² Copyright 2020 John Wiley and Sons.

4.5.4. Estimación de F en UC_{Tm}@CB@Y@F

La concentración de F se estimó a partir de la absorción medida a pH= 1,7 de una dispersión 1 mg/mL de UC_{Tm}@CB@Y@F (catión de F, 0,212 A) y del coeficiente de absorción molar de la especie catiónica de la F ($\epsilon_{437\text{nm}} = 53000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ de acuerdo con ⁷⁴), pues es de esperar que para la especie catiónica la presencia de un éster o un ácido carboxílico en el benceno sea insignificante en su coeficiente de absorción molar. Así, se obtuvo una concentración de $4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ de F que equivale a $4 \cdot 10^{-9} \text{ mol F/mg UCNH}$, es decir, aproximadamente 72

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

moléculas de F por UCNH. A continuación, se detalla el cálculo con las aproximaciones necesarias para estimar el número de moléculas por NP.

1) Cálculo del número de celdas unidad (CU) por UCNP

Las UC_{Tm} de partida medían aproximadamente 23 nm x 30 nm y tenían forma de prisma hexagonal. De tal manera que el volumen de cada UCNP (V_{UCNP}) definido en función del largo (L) y del ancho (A) es:

$$V_{UCNP} = A_{\circ} \cdot h = \frac{3 \cdot A^2 \sqrt{3}}{8} \cdot L \approx 10300 \text{ nm}^3$$

Donde A_{\circ} es el área de la cara hexagonal del prisma y h la altura. presente en Sabiendo que el volumen de una CU es $107,44 \text{ \AA}^3$.⁷⁵ La cantidad de CU por cada UCNP (CU_{UCNP}) es:

$$CU_{UCNP} = \frac{V_{UCNP}}{V_{CU}} \approx 96000 \text{ CU/UCNP}$$

2) Cálculo de UCNP en 1 mg de UCNH

Para estimar la cantidad de UCNP que hay en 1 mg de UCNH, dividiremos las CU que hay en dicha masa por las CU que componen una UCNP.

El cálculo de CU en 1 mg de UCNH requiere dos aproximaciones. Para empezar, comenzamos suponiendo que 1 mg de UCNH es prácticamente 1 mg de la UC_{Tm} de partida. Es cierto que el UCNH contiene otros elementos, como CB, Y³⁺ y F, pero la mayor parte de la masa del sistema viene definida por la UCNP. Además, suponemos que el peso de una CU UC_{Tm} es el peso de una celda unidad de NaYF₄ ($PCU_{NaYF_4} = 187,84 \text{ u}$), es decir, suponemos despreciable el efecto de los dopantes en la matriz. De tal manera que el número de CU/mg UCNH será:

$$CU_{mg} = \frac{1 \cdot 10^{-3}}{PCU_{NaYF_4}} \cdot N_A \approx 3,2 \cdot 10^{18} \text{ CU/mg UCNP}$$

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

Donde N_A es el número de Avogadro. De tal manera que el número de UCNP en 1 mg es:

$$N_{UCNP} = \frac{CU_{mg}}{CU_{UCNP}} \approx 3,34 \cdot 10^{13} \text{ UCNP}$$

3) Cálculo de moléculas de F en 1 mg de UCNH

Las moléculas de F en 1 mL (V) de dispersión 1mg/mL de UCNH son:

$$N_F = [F] \cdot V \cdot N_A \approx 2,41 \cdot 10^{15} \text{ moléculas F}$$

4) Moléculas de F por cada UCNP

El promedio de moléculas de F por UCNP (F_{UCNP}) se aproximaría a:

$$F_{UCNP} = \frac{N_F}{N_{UCNP}} \approx 72 \text{ moléculas F/UCNP}$$

Se trata de una proporción bastante baja de moléculas de F en cada UCNP, teniendo en cuenta que podrían anclarse teóricamente hasta 1560 moléculas de F (resultado obtenido suponiendo que F es una esfera de 1,5 nm de diámetro y calculando el área superficial de cada UCNP). Sin embargo, merece la pena recalcar que pese a ser una proporción tan baja, es posible observar la LRET desde la UC_{Tm} a la F.

4.5.5. Procedimiento eliminación de la dispersión (*scattering*) de los espectros de atenuación.

La resta del *scattering* de los espectros de atenuación se realizó mediante la aplicación *Peak analyzer* del software Origin (v. 9). Este procedimiento había sido previamente validado mediante un experimento control con sílica coloidal (ludox) y rosa de bengala (RB). Brevemente, se realizaron espectros de absorción a 7 muestras a concentraciones crecientes de RB en agua (figura 4.17.a) y en una dispersión acuosa de ludox (0,1 A a 400 nm, figura 4.17.b). Posteriormente con

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

el Origin se resta una línea base definida por el usuario (línea gris discontinua de figura 4.17.a) que simula la tendencia exponencial (λ^{-4}) del *scattering*. El resultado (figura 4.17.c) es similar a la medida sin ludox, al menos en la banda de absorción centrada en el visible (450-600 nm), donde el error relativo y la desviación entre las diferentes medidas se minimiza (error relativo < 5%, figura 4.17.d). El método falla a longitudes de onda < 300 nm porque manualmente no es posible definir de forma correcta la línea base del *scattering* y por la absorción del ludox (línea negra figura 4.17.a). En longitudes de onda donde la absorbancia de RB es muy pequeña ($A < 0,05$; 320-450 y 590-600 nm), pequeños cambios en el ajuste de la línea base se traducen en errores elevados. Sin embargo, estos errores son insignificantes para nuestra aproximación y, además, pueden minimizarse mediante la optimización del ajuste de la línea base.

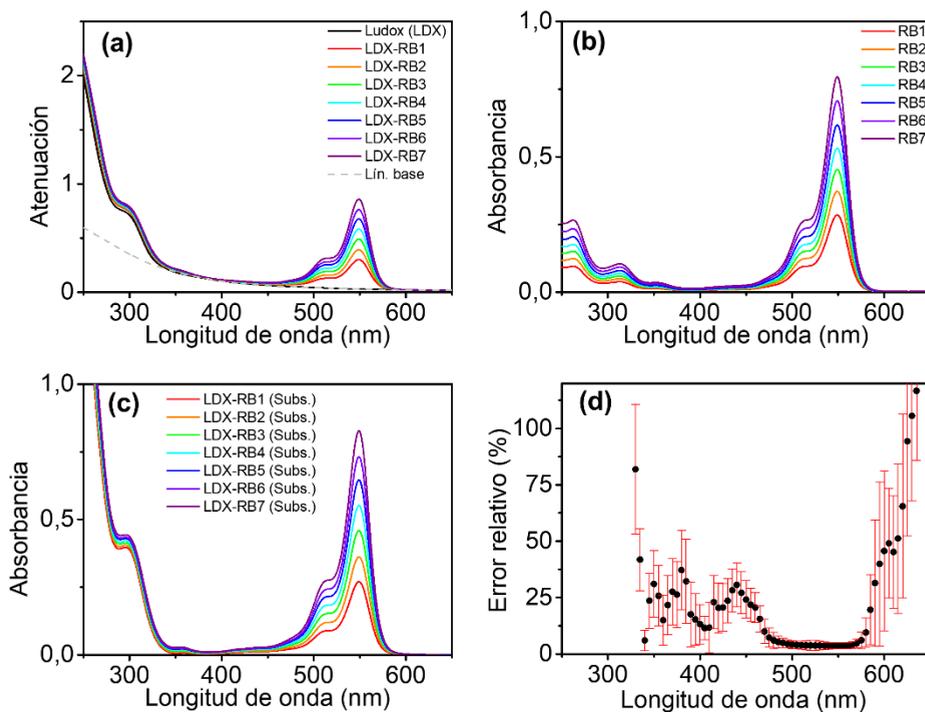


Figura 4.17. Espectros de atenuación y absorción de muestras con concentraciones de RB crecientes en (a) una dispersión acuosa de ludox (0,1 A

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

en 400 nm) y (b) en medio acuoso. (c) Espectro de absorción restado del scattering de las muestras mostradas en (a). (d) Error relativo (%) del valor real (b) frente al aproximado (c) en función de la longitud de onda. Las barras de error muestran la desviación estándar de las 7 medidas.

4.6. Caracterización adicional

4.6.1. UC_{Tm}@Rod110

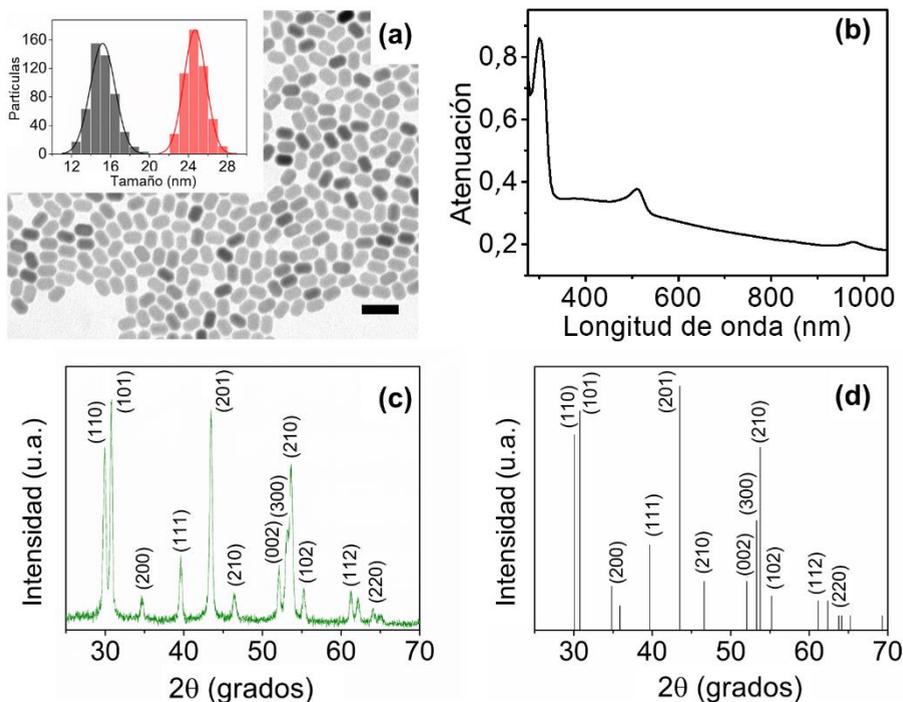


Figura 4.18. (a) Imagen TEM e histograma de la UC_{Tm}@oleato utilizada para obtener UC_{Tm}@Rod110. (b) Espectro de atenuación de una dispersión 1 mg/mL de UC_{Tm}@Rod110 en DMF. (c) Difractograma de XRD de la muestra UC_{Tm} utilizada para construir por UC_{Tm}@Rod110 y (d) referencia de NaYF₄ en fase hexagonal (JCPDS PDF número 16-0334).

Tabla 4.4. Composición de la muestra UC_{Tm} utilizada para construir por UC_{Tm}@Rod110 EDX (20 kV).

| | Composición atómica (%) | | |
|------------------|-------------------------|------------|----------|
| | Itrio | Iterbio | Tulio |
| UC _{Tm} | 82,7 ± 0,9 | 17,0 ± 0,6 | <LOD(<1) |

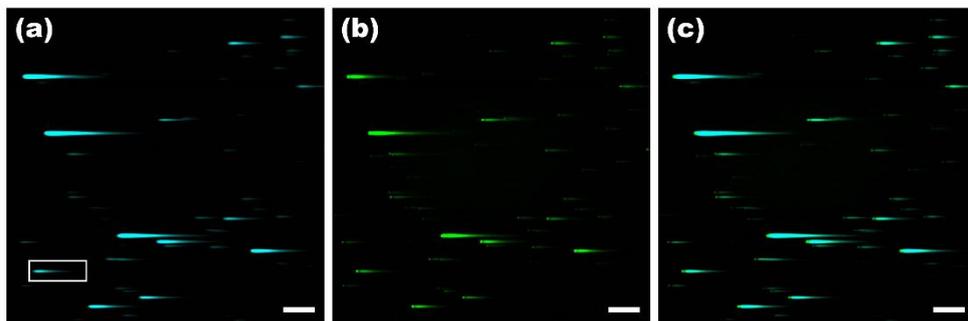


Figura 4.19. Imágenes NIR-LSM de $UC_{Tm}@Rod110$ excitando a 975 nm en (a) C1, (b) C2 e imagen compuesta (a) y (b) (dwell time: $8 \mu\text{s}/\text{píxel}$; $F_d = 20,8 \text{ J}/\text{cm}^2$). El rectángulo blanco en (a) indica el aglomerado utilizado para la figura 4.3. Escala: $50 \mu\text{m}$. Reproducido de ²³ con permiso de the Royal Society of Chemistry.

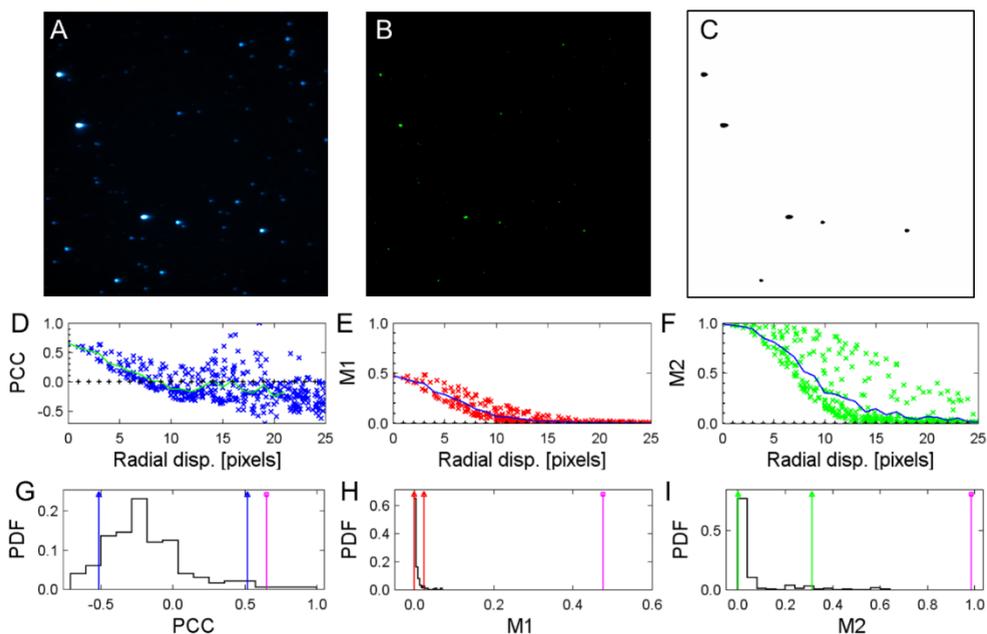


Figura 4.20. Análisis de colocalización de $UC_{Tm}@Rod110$. (a) Imagen NIR-LSM obtenida en C1 excitando a 975 nm (dwell time: $100 \mu\text{s}/\text{píxel}$; $F_d = 260,5 \text{ J}/\text{cm}^2$).

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

(b) Imagen NIR-LSM obtenida en C2 excitando a 1020 nm (dwell time: 2 μ s/píxel; $F_d = 4,4$ J/cm²). (c) Región confinada (blanco) utilizada para la prueba de significancia estadística. Los aglomerados que saturaban en intensidad se descartaron para el análisis (regiones negras). Comportamiento de los coeficientes (d) PCC, (e) M1 y (f) M2 frente al desplazamiento radial (traslación del fotograma) realizada por el algoritmo de desplazamiento confinado. Función de densidad de probabilidad (PDF, por sus siglas en inglés) de los coeficientes (g) PCC, (h) M1 y (i) M2 de 15 a 25 píxeles de desplazamiento radial. El intervalo de confianza del 95% se muestra en flechas coloreadas (azules, rojas y verdes para PCC, M1 y M2 respectivamente) mientras que el valor obtenido (0,651, 0,477 y 0,986 para PCC, M1 y M2, respectivamente) aparece como una línea rosa. Los valores obtenidos son significativos estadísticamente. Reproducido de ²³ con permiso de the Royal Society of Chemistry.

4.6.2. UC_{Tm}@CB@Y@F

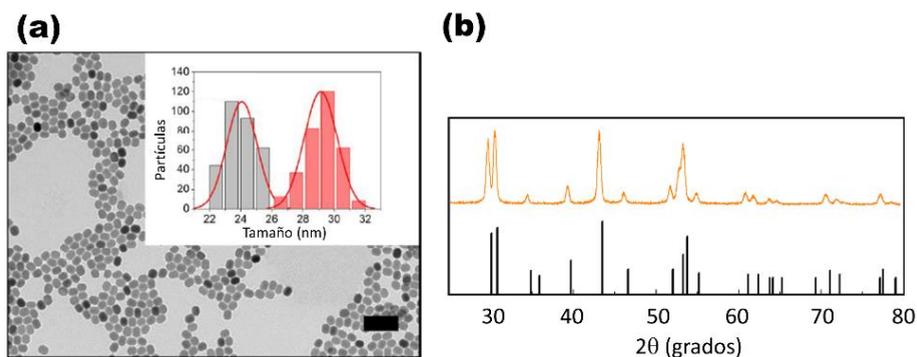


Figura 4.21. (a) Imagen TEM e histograma del largo y ancho de la UC_{Tm}@oleato utilizada para construir UC_{Tm}@CB@Y@F. (b) Difractograma de XRD de UC_{Tm}@oleato (naranja) y referencia de NaYF₄ en fase hexagonal (barras negras) (JCPDS PDF número 16-0334).

Tabla 4.5. Contenido de lantánidos de la muestra UC_{Tm}@oleato determinado por ICP-MS.

| | Composición atómica (%) | | |
|--------------------------|-------------------------|------------|-------------|
| | Itrio | Iterbio | Tulio |
| UC _{Tm} @oleato | 76,2 ± 2,0 | 23,4 ± 1,9 | 0,30 ± 0,03 |

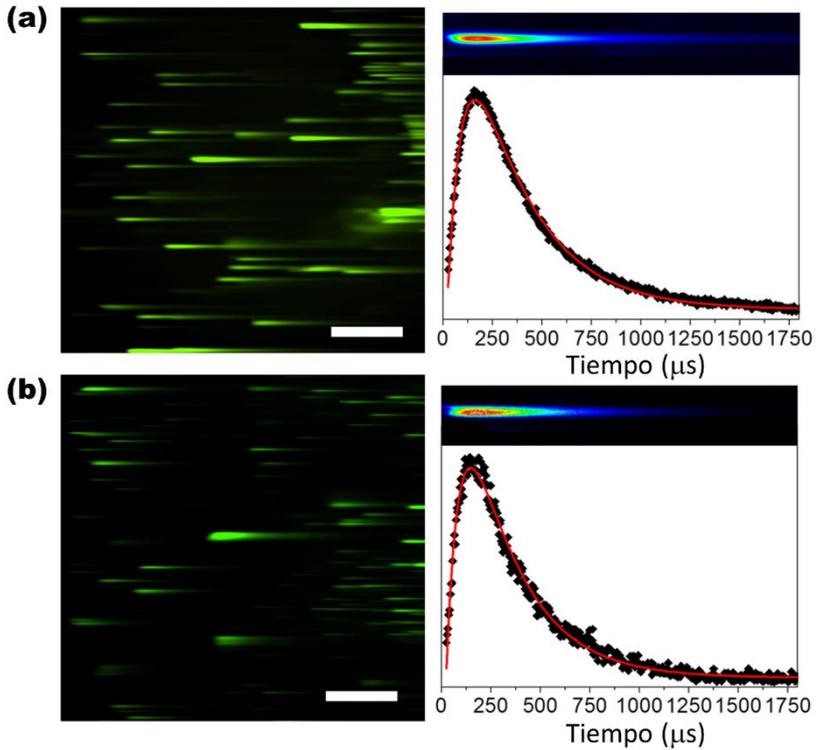


Figura 4.22. Imágenes NIR-LSM y ajuste cinético de un aglomerado/conjunto de UCNH adyacentes representativo de (a) $UC_{Tm}@CB@Y$ y (b) $UC_{Tm}@CB@Y@F$ ($\lambda_{exc} = 975 \text{ nm}$; $4 \mu\text{s}/\text{píxel}$; $F_d = 10,6 \text{ J}/\text{cm}^2$). Escala: $100 \mu\text{m}$. Adaptado con permiso de ²² Copyright 2020 John Wiley and Sons.

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

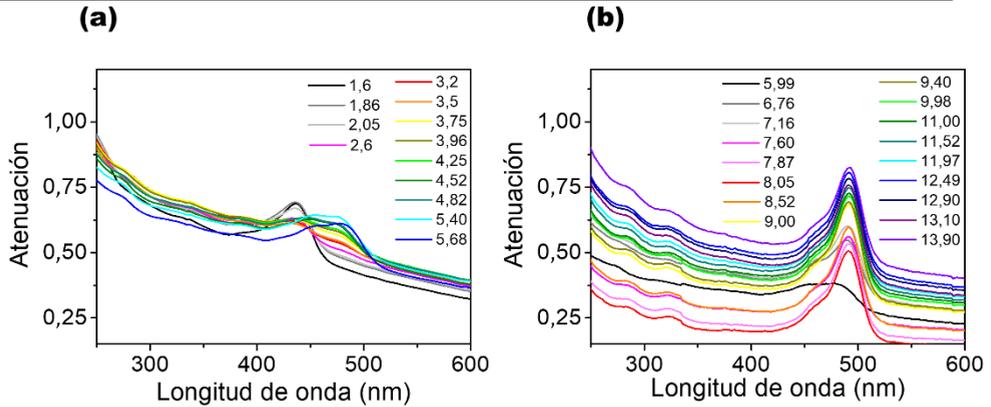


Figura 4.23. Espectros de atenuación de $UC_{Tm}@CB@Y@F$ en pH (a) ácidos y (b) básicos.

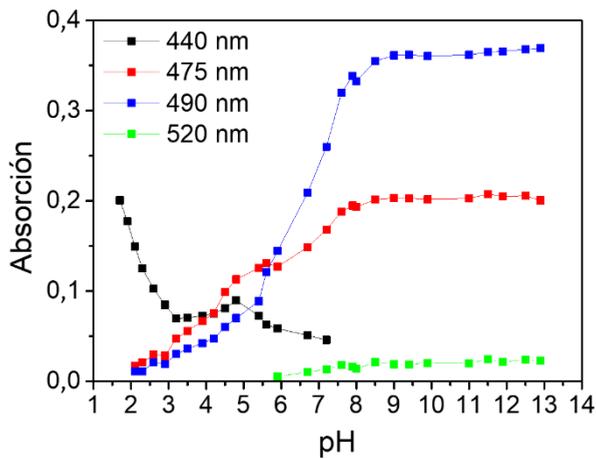


Figura 4.24. Evolución de la absorción de $UC_{Tm}@CB@Y@F$ con el pH registrado a diferentes longitudes de onda.

4.7. Referencias

- (1) Zhang, K. Y.; Yu, Q.; Wei, H.; Liu, S.; Zhao, Q.; Huang, W. Long-Lived Emissive Probes for Time-Resolved Photoluminescence Bioimaging and Biosensing. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (4), 1770–1839. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00425>.
- (2) Ferrera-González, J.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Functional Nanohybrids Based on Dyes and Upconversion Nanoparticles. In *Dyes and Photoactive Molecules in Microporous Systems. Structure and Bonding.*; López Arbeloa, F., Ed.; Springer: Cham, 2020; pp 371–396. https://doi.org/10.1007/430_2020_60.
- (3) Lakowicz, J. R. Quenching of Fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer Science+Business Media: New York, 2006; pp 278–330.
- (4) Lakowicz, J. R. Energy Transfer. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer Science+Business Media: New York, 2006; pp 443–476.
- (5) van der Meer, B. W. Förster Theory. In *FRET - Förster Resonance Energy Transfer: From theory to applications*; Medintz, I., Hildebrandt, N., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2014; pp 23–62. <https://doi.org/10.1002/9783527656028>.
- (6) Hildebrandt, N. How to Apply FRET: From Experimental Design to Data Analysis. In *FRET - Förster Resonance Energy Transfer: From theory to applications*; Medintz, I., Hildebrandt, N., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2014; pp 105–164. <https://doi.org/10.1002/9783527656028>.
- (7) Gnach, A.; Lipinski, T.; Bednarkiewicz, A.; Rybka, J.; Capobianco, J. A. Upconverting Nanoparticles: Assessing the Toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (6), 1561–1584.
- (8) Muhr, V.; Würth, C.; Kraft, M.; Buchner, M.; Baeumner, A. J.; Resch-Genger, U.; Hirsch, T. Particle-Size-Dependent Förster Resonance Energy Transfer from Upconversion Nanoparticles to Organic Dyes. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (9), 4868–4874. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04662>.
- (9) Dukhno, O.; Przybilla, F.; Collot, M.; Klymchenko, A.; Pivovarenko, V.; Buchner, M.; Muhr, V.; Hirsch, T.; Mély, Y. Quantitative Assessment of Energy Transfer in Upconverting Nanoparticles Grafted with Organic Dyes. *Nanoscale* **2017**, *9* (33), 11994–12004. <https://doi.org/10.1039/c6nr09706e>.
- (10) Melle, S.; Calderón, O. G.; Laurenti, M.; Mendez-Gonzalez, D.; Egatz-Gómez, A.; López-Cabarcos, E.; Cabrera-Granado, E.; Díaz, E.; Rubio-Retama, J. Förster Resonance Energy Transfer Distance Dependence from Upconverting Nanoparticles to Quantum Dots. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122* (32), 18751–18758. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b04908>.
- (11) Wang, Y.; Liu, K.; Liu, X.; Dohnalová, K.; Gregorkiewicz, T.; Kong, X.; Aalders, M. C. G.; Buma, W. J.; Zhang, H. Critical Shell Thickness of Core/Shell Upconversion Luminescence Nanoplatform for Fret Application. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2* (17), 2083–2088. <https://doi.org/10.1021/jz200922f>.
- (12) Pilch, A.; Würth, C.; Kaiser, M.; Wawrzyńczyk, D.; Kurnatowska, M.; Arabasz, S.; Prorok, K.; Samoć, M.; Strek, W.; Resch-Genger, U.; et al. Shaping Luminescent Properties of Yb³⁺ and Ho³⁺ Co-Doped Upconverting Core–Shell β-NaYF₄ Nanoparticles by Dopant Distribution and Spacing. *Small* **2017**, *13* (47), 54–66.

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

<https://doi.org/10.1002/sml.201701635>.

- (13) Marin, R.; Labrador-Paéz, L.; Skripka, A.; Haro-González, P.; Benayas, A.; Canton, P.; Jaque, D.; Vetrone, F. Upconverting Nanoparticle to Quantum Dot Förster Resonance Energy Transfer: Increasing the Efficiency through Donor Design. *ACS Photonics* **2018**, *5* (6), 2261–2270. <https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.8b00112>.
- (14) Arppe, R.; Hyppänen, I.; Perälä, N.; Peltomaa, R.; Kaiser, M.; Würth, C.; Christ, S.; Resch-Genger, U.; Schäferling, M.; Soukka, T. Quenching of the Upconversion Luminescence of NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ and NaYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺ Nanophosphors by Water: The Role of the Sensitizer Yb³⁺ in Non-Radiative Relaxation. *Nanoscale* **2015**, *7* (27), 11746–11757. <https://doi.org/10.1039/c5nr02100f>.
- (15) Würth, C.; Fischer, S.; Grauel, B.; Alivisatos, A. P.; Resch-Genger, U. Quantum Yields, Surface Quenching, and Passivation Efficiency for Ultrasmall Core/Shell Upconverting Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (14), 4922–4928. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b01458>.
- (16) Kraft, M.; Würth, C.; Muhr, V.; Hirsch, T.; Resch-Genger, U. Particle-Size-Dependent Upconversion Luminescence of NaYF₄: Yb, Er Nanoparticles in Organic Solvents and Water at Different Excitation Power Densities. *Nano Res.* **2018**, *11* (12), 6360–6374. <https://doi.org/10.1007/s12274-018-2159-9>.
- (17) Hossan, M. Y.; Hor, A.; Luu, Q.; Smith, S. J.; May, P. S.; Berry, M. T. Explaining the Nanoscale Effect in the Upconversion Dynamics of β-NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ Core and Core–Shell Nanocrystals. *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121* (30), 16592–16606. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b04567>.
- (18) Zhang, X.; Chen, W.; Xie, X.; Li, Y.; Chen, D.; Chao, Z.; Liu, C.; Ma, H.; Liu, Y.; Ju, H. Boosting Luminance Energy Transfer Efficiency in Upconversion Nanoparticles with an Energy-Concentrating Zone. *Angew. Chemie* **2019**, *131* (35), 12245–12250. <https://doi.org/10.1002/ange.201906380>.
- (19) Bhuckory, S.; Hemmer, E.; Wu, Y.-T.; Yahia-Ammar, A.; Vetrone, F.; Hildebrandt, N. Core or Shell? Er³⁺ FRET Donors in Upconversion Nanoparticles. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017* (44), 5186–5195. <https://doi.org/10.1002/ejic.201700904>.
- (20) Bednarkiewicz, A.; Nyk, M.; Samoc, M.; Strek, W. Up-Conversion FRET from Er³⁺/Yb³⁺:NaYF₄ Nanophosphor to CdSe Quantum Dots. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (41), 17535–17541. <https://doi.org/10.1021/jp106120d>.
- (21) Deng, R.; Wang, J.; Chen, R.; Huang, W.; Liu, X. Enabling Förster Resonance Energy Transfer from Large Nanocrystals through Energy Migration. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (49), 15972–15979. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b09349>.
- (22) Estebanez, N.; Ferrera-González, J.; Cortez-Cevallos, I. A.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Lengthening the Lifetime of Common Emissive Probes to Microseconds by a Jigsaw-Like Construction of NIR-Responsive Nanohybrids. *Adv. Opt. Mater.* **2020**, *8* (8), 1902030. <https://doi.org/10.1002/adom.201902030>.
- (23) Ferrera-González, J.; Francés-Soriano, L.; Estébanez, N.; Navarro-Raga, E.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. NIR Laser Scanning Microscopy for Photophysical Characterization of Upconversion Nanoparticles and Nanohybrids. *Nanoscale* **2021**, *13* (22), 10067–10080. <https://doi.org/10.1039/d1nr00389e>.
- (24) Sun, L.-N.; Peng, H.; Stich, M. I. J.; Achatz, D.; Wolfbeis, O. S. PH Sensor Based on Upconverting Luminescent Lanthanide Nanorods. *Chem. Commun.* **2009**, *0* (33), 5000–5002. <https://doi.org/10.1039/b907822c>.

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

- (25) Mader, H. S.; Wolfbeis, O. S. Optical Ammonia Sensor Based on Upconverting Luminescent Nanoparticles. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, *12*, 5002–5004. <https://doi.org/10.1021/ac1007283>.
- (26) Esipova, T. V.; Ye, X.; Collins, J. E.; Sakad Zi C D, S.; Mandeville, E. T.; Murray, C. B.; Vinogradov, S. A. Dendritic Upconverting Nanoparticles Enable in Vivo Multiphoton Microscopy with Low-Power Continuous Wave Sources. *PNAS* **2012**, *109* (51), 20826–20831. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213291110>.
- (27) Xie, L.; Qin, Y.; Chen, H.-Y. Polymeric Optodes Based on Upconverting Nanorods for Fluorescent Measurements of PH and Metal Ions in Blood Samples. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (4), 1969–1974. <https://doi.org/10.1021/ac203003w>.
- (28) Wang, F.; Raval, Y.; Chen, H.; Tzeng, T.-R. J.; DesJardins, J. D.; Anker, J. N. Development of Luminescent PH Sensor Films for Monitoring Bacterial Growth Through Tissue. *Adv. Heal. Mater.* **2014**, *3* (2), 197–204. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300101>.
- (29) Meier, R. J.; Simbürger, J. M. B.; Soukka, T.; Schä, M. Background-Free Referenced Luminescence Sensing and Imaging of PH Using Upconverting Phosphors and Color Camera Read-Out. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (11), 5535–5540. <https://doi.org/10.1021/ac5009207>.
- (30) Wang, S.; Feng, J.; Song, S.; Zhang, H. A Long-Wave Optical PH Sensor Based on Red Upconversion Luminescence of NaGdF₄ Nanotubes. *RSC Adv.* **2014**, *4* (99), 55897–55899. <https://doi.org/10.1039/c4ra09686j>.
- (31) Wang, Z.; Feng, J.; Song, S.; Sun, Z.; Yao, S.; Ge, X.; Pang, M.; Zhang, H. Pure and Intense Orange Upconversion Luminescence of Eu³⁺ from the Sensitization of Yb³⁺-Mn²⁺ Dimer in NaY(Lu)F₄ Nanocrystals. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2* (42), 9004–9011. <https://doi.org/10.1039/c4tc01778a>.
- (32) Strobl, M.; Mayr, T.; Klimant, I.; Borisov, S. M. Photostable Upconverting and Downconverting PH Sensors Based on Combination of a Colorimetric NIR Indicator and Stable Inorganic Phosphors as Secondary Emitters. *Sensors Actuators, B Chem.* **2017**, *245*, 972–979. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.01.189>.
- (33) Liu, X.; Zhang, S.-Q.; Wei, X.; Yang, T.; Chen, M.-L.; Wang, J.-H. A Novel “Modularized” Optical Sensor for PH Monitoring in Biological Matrixes. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *109*, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.052>.
- (34) Radunz, S.; Andresen, E.; Wü, C.; Koerd, A.; Tschiche, H. R.; Resch-Genger, U. Simple Self-Referenced Luminescent PH Sensors Based on Upconversion Nanocrystals and PH-Sensitive Fluorescent BODIPY Dyes. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (12), 7756–7764. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01174>.
- (35) Arppe, R.; Näreoja, T.; Nylund, S.; Mattsson, L.; Koho, S.; Rosenholm, J. M.; Soukka, T.; Schäferling, M. Photon Upconversion Sensitized Nanoprobes for Sensing and Imaging of PH. *Nanoscale* **2014**, *6* (12), 6837–6843. <https://doi.org/10.1039/c4nr00461b>.
- (36) Nä, T.; Deguchi, T.; Christ, S.; Peltomaa, R.; Prabhakar, N.; Fazeli, E.; Perä, N.; Rosenholm, J. M.; Arppe, R.; Soukka, T.; et al. Ratiometric Sensing and Imaging of Intracellular PH Using Polyethylenimine-Coated Photon Upconversion Nanoprobes. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (3), 1501–1508. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03223>.
- (37) Wu, Y. X.; Zhang, X. B.; Zhang, D. L.; Zhang, C. C.; Li, J. Bin; Wu, Y.; Song, Z.

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

- L.; Yu, R. Q.; Tan, W. Quench-Shield Ratiometric Upconversion Luminescence Nanoplatfrom for Biosensing. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (3), 1639–1646. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03573>.
- (38) Du, S.; Hernández-Gil, J.; Dong, H.; Zheng, X.; Lyu, G.; Bañobre-López, M.; Gallo, J.; Sun, L.; Yan, C.; Long, N. J. Design and Validation of a New Ratiometric Intracellular PH Imaging Probe Using Lanthanide-Doped Upconverting Nanoparticles. *Dalt. Trans.* **2017**, *46* (40), 13957–13965. <https://doi.org/10.1039/c7dt02418e>.
- (39) Li, H.; Dong, H.; Yu, M.; Liu, C.; Li, Z.; Wei, L.; Sun, L.-D. D.; Zhang, H. NIR Ratiometric Luminescence Detection of PH Fluctuation in Living Cells with Hemicyanine Derivative-Assembled Upconversion Nanophosphors. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (17), 8863–8869. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01324>.
- (40) Ding, C.; Cheng, S.; Zhang, C.; Xiong, Y.; Ye, M.; Xian, Y. Ratiometric Upconversion Luminescence Nanoprobe with Near-Infrared Ag₂S Nanodots as the Energy Acceptor for Sensing and Imaging of pH in Vivo. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (11), 7181–7188. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00404>.
- (41) Ma, T.; Ma, Y.; Liu, S.; Zhang, L.; Yang, T.; Yang, H.-R.; Lv, W.; Yu, Q.; Xu, W.; Zhao, Q.; et al. Dye-Conjugated Upconversion Nanoparticles for Ratiometric Imaging of Intracellular PH Values. *J. Mater. Chem. C* **2015**, *3* (26), 6616–6620. <https://doi.org/10.1039/c5tc00849b>.
- (42) Li, C.; Zuo, J.; Zhang, L.; Chang, Y.; Zhang, Y.; Tu, L.; Liu, X.; Xue, B.; Li, Q.; Zhao, H.; et al. Accurate Quantitative Sensing of Intracellular PH Based on Self-Ratiometric Upconversion Luminescent Nanoprobe. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 38617. <https://doi.org/10.1038/srep38617>.
- (43) Kumar, B.; Murali, A.; Giri, S. Upconversion Nanoplatfrom for FRET-Based Sensing of Dopamine and PH. *ChemistrySelect* **2019**, *4* (19), 5407–5414. <https://doi.org/10.1002/slct.201803966>.
- (44) Tsai, E. S.; Himmelstoß, S. F.; Wiesholler, L. M.; Hirsch, T.; Hall, E. A. H. Upconversion Nanoparticles for Sensing PH. *Analyst* **2019**, *144* (18), 5547–5557. <https://doi.org/10.1039/c9an00236g>.
- (45) Anderson, R. B.; Smith, S. J.; May, P. S.; Berry, M. T. Revisiting the NIR-to-Visible Upconversion Mechanism in β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5* (1), 36–42. <https://doi.org/10.1021/jz402366r>.
- (46) May, P. S.; Berry, M. Tutorial on the Acquisition, Analysis, and Interpretation of Upconversion Luminescence Data. *Methods Appl. Fluoresc.* **2019**, *7* (023001), 1–14. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab02c6>.
- (47) Chen, G.; Qiu, H.; Prasad, P. N.; Chen, X. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (10), 5161–5214.
- (48) Sedlmeier, A.; Gorris, H. H. Surface Modification and Characterization of Photon-Upconverting Nanoparticles for Bioanalytical Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (6), 1526–1560. <https://doi.org/10.1039/c4cs00186a>.
- (49) Francés-Soriano, L.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. 5 Synergistic Effects in Organic-Coated Upconversion Nanoparticles. In *Upconverting Nanomaterials*; CRC Press, 2016; pp 101–138. <https://doi.org/doi:10.1201/9781315371535-610.1201/9781315371535-6>.

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

- (50) Estebanez, N.; Cortés-Villena, A.; Ferrera-González, J.; González-Béjar, M.; Galian, R. E.; González-Carrero, S.; Pérez-Prieto, J. Linear Coassembly of Upconversion and Perovskite Nanoparticles: Sensitized Upconversion Emission of Perovskites by Lanthanide-Doped Nanoparticles. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30* (46), 1–9. <https://doi.org/10.1002/adfm.202003766>.
- (51) Jordi Aguilera-Sigalat; Simon Rocton; F. Sánchez-Royo, J.; E. Galian, R.; Julia Pérez-Prieto. Highly Fluorescent and Photostable Organic- and Water-Soluble CdSe/ZnS Core-Shell Quantum Dots Capped with Thiols. *RSC Adv.* **2012**, *2* (4), 1632–1638. <https://doi.org/10.1039/c1ra01005k>.
- (52) Ignacio Rosa-Pardo; Salvador Pocoví-Martínez; Raul Arenal; E. Galian, R.; Julia Pérez-Prieto. Ultrathin Lead Bromide Perovskite Platelets Spotted with Europium (II) Bromide Dots. *Nanoscale* **2019**, *11* (39), 18065–18070. <https://doi.org/10.1039/c9nr06631d>.
- (53) Francés-Soriano, L.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Cucurbit[n]Urils-Capped Upconversion Nanoparticles as Highly Emissive Scaffolds for Energy Acceptors. *Nanoscale* **2015**, *7* (12), 5140–5146. <https://doi.org/10.1039/c5nr00295h>.
- (54) Liras, M.; González-Béjar, M.; Peinado, E.; Francés-Soriano, L.; Pérez-Prieto, J.; Quijada-Garrido, I.; García, O. Thin Amphiphilic Polymer-Capped Upconversion Nanoparticles: Enhanced Emission and Thermoresponsive Properties. *Chem. Mater.* **2014**, *26* (13), 4014–4022. <https://doi.org/10.1021/cm501663n>.
- (55) Voliani, V.; Gonzalez-Bejar, M.; Herranz-Perez, V.; Duran-Moreno, M.; Signore, G.; Garcia-Verdugo, J. M.; Perez-Prieto, J. Orthogonal Functionalisation of Upconverting NaYF₄ Nanocrystals. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (40), 13538–13546. <https://doi.org/10.1002/chem.201301353>.
- (56) Estebanez, N.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Polysulfonate Cappings on Upconversion Nanoparticles Prevent Their Disintegration in Water and Provide Superior Stability in a Highly Acidic Medium. *ACS Omega* **2019**, *4* (2), 3012–3019. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03015>.
- (57) Recalde, I.; Estebanez, N.; Francés-Soriano, L.; Liras, M.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Upconversion Nanoparticles with a Strong Acid-Resistant Capping. *Nanoscale* **2016**, *8* (14), 7588–7594. <https://doi.org/10.1039/c5nr06653k>.
- (58) Ignacio Rosa-Pardo; Carla Casadevall; Luciana Schmidt; Miguel Claros; E. Galian, R.; Julio Lloret-Fillol; Julia Pérez-Prieto. The Synergy between the CsPbBr₃ Nanoparticle Surface and the Organic Ligand Becomes Manifest in a Demanding Carbon–Carbon Coupling Reaction. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (37), 5026–5029. <https://doi.org/10.1039/d0cc01339k>.
- (59) Francés-Soriano, L.; Liras, M.; Kowalczyk, A.; Bednarkiewicz, A.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Energy Transfer in DiiodoBodipy-Grafted Upconversion Nanohybrids. *Nanoscale* **2016**, *8* (1), 204–208. <https://doi.org/10.1039/c5nr07229h>.
- (60) Agudelo-Morales, C. E.; Galian, R. E.; Pérez-Prieto, J. Pyrene-Functionalized Nanoparticles: Two Independent Sensors, the Excimer and the Monomer. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (18), 8083–8087. <https://doi.org/10.1021/ac302276j>.
- (61) Jordi Aguilera-Sigalat; M. Casas-Solvas, J.; C. Morant-Miñana, M.; Antonio Vargas-Berenguel; E. Galian, R.; Julia Pérez-Prieto. Quantum Dot / Cyclodextrin Supramolecular Systems Based on Efficient Molecular Recognition and Their Use for Sensing. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (20), 2573–2575.

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

<https://doi.org/10.1039/c1cc15312a>.

- (62) Adele Bonanno; Irene Pérez-Herráez; Elena Zaballos-García; Julia Pérez-Prieto. Gold Nanoclusters for Ratiometric Sensing of PH in Extremely Acidic Media. *Chem. Commun.* **2020**, 56 (4), 587–590. <https://doi.org/10.1039/c9cc08539d>.
- (63) Estebanez, N.; Ferrera-González, J.; Francés-Soriano, L.; Arenal, R.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Breaking the Nd³⁺-Sensitized Upconversion Nanoparticles Myth about the Need of Onion-Layered Structures. *Nanoscale* **2018**, 10 (26), 12297–12301. <https://doi.org/10.1039/c8nr00871j>.
- (64) Francés-Soriano, L.; Gonzalez-Carrero, S.; Navarro-Raga, E.; Galian, R. E.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Efficient Cementing of CH₃NH₃PbBr₃ Nanoparticles to Upconversion Nanoparticles Visualized by Confocal Microscopy. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, 26 (28), 5131–5138. <https://doi.org/10.1002/adfm.201600786>.
- (65) Sun, S.; Ning, X.; Zhang, G.; Wang, Y.-C.; Peng, C.; Zheng, J. Dimerization of Organic Dyes on Luminescent Gold Nanoparticles for Ratiometric pH Sensing. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, 55 (7), 2421–2424. <https://doi.org/10.1002/anie.201509515>.
- (66) Lim, I.-M. S.; Goroleski, F.; Mott, D.; Kariuki, N.; Ip, W.; Luo, J.; Zhong, C.-J. Adsorption of Cyanine Dyes on Gold Nanoparticles and Formation of J-Aggregates in the Nanoparticle Assembly. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110 (13), 6673–6682. <https://doi.org/10.1021/jp057584h>.
- (67) Laban, B.; Vodnik, V.; Dramićanin, M.; Novaković, M.; Bibić, N.; Sovilj, S. P.; Vasić, V. M. Mechanism and Kinetics of J-Aggregation of Thiocyanine Dye in the Presence of Silver Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2014**, 118 (40), 23393–23401. <https://doi.org/10.1021/jp507086g>.
- (68) Li, Z.; Yang, Y.-W. Photoactive Nanoparticles Capped with Macrocycles as Platforms and Hosts. In *Micro and Nano Technologies. Photoactive Inorganic Nanoparticles*; Pérez-Prieto, J., González-Béjar, M., Eds.; Elsevier, 2019; pp 139–167. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814531-9.00006-3>.
- (69) Huang, Z.; Liu, Y.; Chen, Y.; Xiong, Q.; Wang, Y.; Duan, H.; Lai, W. Improving the Performance of Upconversion Nanoprobe-Based Lateral Flow Immunoassays by Supramolecular Self-Assembly Core/Shell Strategies. *Sensors Actuators B Chem.* **2020**, 318, 128233. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128233>.
- (70) Yulong Sun; Wenjing Zhang; Baoming Wang; Xiaoxue Xu; Joshua Chou; Olga Shimoni; T. Ung, A.; Dayong Jin. A Supramolecular Self-Assembly Strategy for Upconversion Nanoparticle Bioconjugation. *Chem. Commun.* **2018**, 54 (31), 3851–3854. <https://doi.org/10.1039/c8cc00708j>.
- (71) Yuan, D.; Tan, M. C.; Riman, R. E.; Chow, G. M. Comprehensive Study on the Size Effects of the Optical Properties of NaYF₄:Yb,Er Nanocrystals. *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117 (25), 13297–13304. <https://doi.org/10.1021/jp403061h>.
- (72) Li, Z.; Zhang, Y. An Efficient and User-Friendly Method for the Synthesis of Hexagonal-Phase NaYF₄:Yb, Er/Tm Nanocrystals with Controllable Shape and Upconversion Fluorescence. *Nanotechnology* **2008**, 19 (34), 16–21. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/34/345606>.
- (73) Bogdan, N.; Vetrone, F.; Ozin, G. A.; Capobianco, J. A. Synthesis of Ligand-Free Colloidally Stable Water Dispersible Brightly Luminescent Lanthanide-Doped

Capítulo 4. Alargamiento del tiempo de vida de fluorescencia de fluoróforos convencionales

- Upconverting Nanoparticles. *Nano Lett.* **2011**, *11* (2), 835–840. <https://doi.org/10.1021/nl1041929>.
- (74) Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M. Absorption and Fluorescence Properties of Fluorescein. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1995**, *51* (6), L7–L21. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(95\)01421-P](https://doi.org/10.1016/0584-8539(95)01421-P).
- (75) Wilhelm, S.; Kaiser, M.; Würth, C.; Heiland, J.; Carrillo-Carrion, C.; Muhr, V.; Wolfbeis, O. S.; Parak, W. J.; Resch-Genger, U.; Hirsch, T. Water Dispersible Upconverting Nanoparticles: Effects of Surface Modification on Their Luminescence and Colloidal Stability. *Nanoscale* **2015**, *7* (4), 1403–1410. <https://doi.org/10.1039/c4nr05954a>.

Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

Capítulo 5

5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

5.1. Introducción y antecedentes

En la actualidad se han desarrollado múltiples tipos de nanomateriales: desde nanopartículas (NP) inorgánicas, a orgánicas, pasando por semiconductores, perovskitas, *quantum dots*, *carbon dots*, NP metálicas, óxidos o poliméricas, entre otras. Algunos de ellos los podemos encontrar en productos de uso cotidiano que están disponibles en el mercado europeo, como por ejemplo en baterías, pinturas, textiles, comida, cosméticos o medicina.¹ Por ello, es fundamental conocer los riesgos que puedan tener para la salud de las personas y el medioambiente.

Las propiedades toxicológicas de los nanomateriales, al igual que ocurre con las propiedades fisicoquímicas y fotofísicas, son diferentes del material volumétrico. De hecho, la dimensionalidad y la superficie en la escala nanométrica son las características que posibilitan nuevos mecanismos de

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

toxicidad, precisamente los aspectos que modifican las propiedades fisicoquímicas del material volumétrico. La presencia de una mayor área superficial, donde los átomos se encuentran con coordinaciones incompletas favorece la adsorción y reacción de especies, que de cara a procesos catalíticos puede ser beneficiosa pero podría ser perjudicial en el interior celular. De nada sirve conocer la toxicidad del material volumétrico, ni de los iones o especies por sí mismas, ya que la dimensionalidad y superficie permiten nuevas interacciones difíciles de predecir. Por tanto, la toxicidad de cada nanomaterial debe estudiarse en profundidad para poder obtener conclusiones razonables.²

Desde el punto de vista toxicológico, el paradigma propuesto por Paracelso en el siglo XVI permanece vigente aún hoy: «la dosis hace el veneno».³ En general, la toxicidad de una especie suele analizarse en 4 niveles consecutivos de complejidad: (i) nivel celular o citotoxicidad, donde se distinguen dos subniveles: el molecular (inactivación enzimática, inducción de especies reactivas de oxígeno, bloqueo de la comunicación celular, ...) y el subcelular (disrupción membrana, desregulación de la homeostasis intracelular, perturbaciones de la actividad mitocondrial,...); (ii) nivel orgánico, afección del tóxico en órganos vitales; (iii) organismo y (iv) medioambiental.²

Si bien, el caso de los nanomateriales presenta especial dificultad pues su toxicidad depende de múltiples aspectos, como por ejemplo: composición química, forma, dopaje, tamaño, tamaño hidrodinámico, morfología, polidispersidad, propiedades redox, agregación, recubrimiento, modificaciones superficiales, estabilidad coloidal, solubilidad, biodegradabilidad, concentración, exposición o comportamiento bajo campos electromagnéticos. Todo ello, hace muy difícil la comparación entre NP de naturaleza distinta. Además, tal y como apuntan varias revisiones, pese a que existe una cantidad abrumadora de estudios de toxicidad de NP es imposible sacar conclusiones por la incompleta caracterización de los nanomateriales de estudio y/o por la falta de ensayos de

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

control adecuados, que incluso dan lugar a resultados contradictorios. De hecho, algunas revisiones, según el criterio de valoración, llegan a descartar el 90 % de los estudios realizados.²⁻⁵

Sin embargo, se han obtenido algunas observaciones generales importantes. Todo apunta a que, en general, las NP son capaces de atravesar pulmones y tracto intestinal, aunque parece que no la barrera dérmica.³ Si bien, solo una pequeña fracción llega al sistema circulatorio y se distribuye en el organismo, pues la mayoría se excretan en heces o se eliminan de los pulmones mediante los macrófagos.³ En las vías respiratorias parecen producir efectos inespecíficos similares a los causados por polvo fino.³ Si se inyectan por vía intravenosa, su retención en la sangre y órganos depende de las propiedades superficiales.² Las NP pueden atravesar la membrana celular por transporte pasivo y endocitosis.² Asimismo, parece que las NP cargadas positivamente presentan una mayor admisión celular (*uptake*), aunque también son más propensas a causar daño en la membrana celular.^{4,6} Aun así, son resultados muy generales y hay excepciones en función del nanomaterial. De hecho, algunos materiales utilizados por su aparente biocompatibilidad, como las NP de sílice, parecen estar involucradas en reumatoides artrítica, esclerosis o lupus.²

Por ello, la toxicidad de los nanomateriales es impredecible, debe evaluarse individualmente para cada caso y requiere un enfoque amplio de estudios de toxicidad (*multiple endpoints*).^{3,7} Además, debe tenerse en cuenta que para evaluar correctamente la toxicidad de las NP es fundamental: (i) caracterizar las propiedades del material, (ii) asegurar la ausencia de contaminación bacteriana que dé lugar a un falso positivo, (iii) evitar la sobredosis de NP en estudios *in vitro*, pues podrían cubrir las células impidiendo el transporte de nutrientes y oxígeno; y (iv) realizar controles de interferencia en estudios *in vitro* colorimétricos/fluorométricos y controles solo con NP para asegurar que la

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

respuesta del ensayo es debida a la interacción de la NP con el nivel toxicológico de estudio.²⁻⁴

En el caso de las UCNP, pese a que se han propuesto múltiples aplicaciones biomédicas por sus extraordinarias propiedades fotofísicas, hay muchos menos estudios que evalúen su toxicidad.⁷ Sin embargo, los ensayos *in vitro* e *in vivo* parecen indicar que la toxicidad de las UCNP es relativamente baja para células,² ratones⁸ y plantas.⁹

Su comportamiento en el medio biológico está determinado por dos procesos: la formación de la corona proteica y la disolución de la UCNP en medio acuoso.^{2,7} En el medio biológico existen múltiples especies, como moléculas, proteínas, células, ADN o ARN, con grupos funcionales que interactúan con la superficie de las NP formando una corona proteica fuerte y una corona débil.^{10,11} De hecho, esta corona parece ser la causante de la buena estabilidad de las UCNP en los medios biológicos y de su internalización en el medio celular, mediante el efecto «caballo de Troya».⁷ Sin embargo, la corona también puede afectar a la absorción, distribución, biotransformaciones, metabolismo, excreción y toxicidad de las UCNP.^{7,12}

Por otro lado, las matrices inorgánicas de UCNP, basadas generalmente en fluoruros, se disuelven en medios acuosos liberando iones lantánidos e iones de la matriz.¹³⁻¹⁶ En este sentido, los iones lantánidos administrados parenteralmente son relativamente muy poco tóxicos (dosis letal para el 50 % de ratones, LD₅₀ vía intravenosa > 10 mg/Kg)¹⁷, sin embargo, causan una serie de disfunciones, como cambios bioquímicos en hígado, contenido sanguíneo, disminución actividad enzimática, y necrosis en hígado y bazo.² Además, presentan efectos tóxicos en mitocondrias.¹⁸ Por otro lado, los iones F⁻, presentes en la matriz, también presentan efectos citotóxicos generando especies reactivas de oxígeno (ROS) y potenciando la peroxidación lipídica, daño en el ADN y la apoptosis.¹⁹ Destaca el estudio de Kałas *et al.*²⁰ que identifica el tratamiento ácido que sufren las

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

UCNP en los lisosomas como mecanismo clave de liberación de los iones que F^- y Ln^{3+} en el medio celular e inducción de la citotoxicidad.

Desde la acción COST CM1403 «*The European Upconversion Network – From the Design of Photon-Upconverting Nanomaterials to Biomedical Applications*» se recomienda una estrategia multimetódica en tres niveles para desarrollar aplicaciones basadas en UCNP desde las primeras fases de investigación hasta el producto final que aseguren la eficiencia, calidad y seguridad del producto (figura 5.1.a), y proponen un diagrama de flujo para desarrollar aplicaciones biomédicas (figura 5.1.b). Asimismo, las recomendaciones hechas para nanomateriales, como ensayos control de interferencia y caracterización adecuada, continúan siendo válidas.⁷

En este sentido, queríamos estudiar el efecto citotóxico de UCNP recubiertas con CB frente a las UCNP de partida. Como se ha visto en el capítulo previo, las UC@CB son una plataforma prometedora para construir sensores químicos.^{21–24} Nuestra hipótesis es que la presencia de CB sobre la superficie de la UCNP pasiva la superficie y mejora su estabilidad en medios acuosos, lo que se traduciría en una mejora de la citotoxicidad intrínseca de la UCNP. Diferentes estudios han demostrado que el CB no tiene citotoxicidad en células humanas (concentración de 50 % inhibición de crecimiento, $IC_{50} > 100 \text{ mM}$),^{25,26} pero no se ha hecho ningún estudio relativo a la citotoxicidad de UC@CB. Por ello, hemos realizado un estudio preliminar comparativo de UC_{Er} vs. $UC_{Er}@CB$, con el fin de comprobar la internalización mediante NIR-LSM y la viabilidad celular, mediante el ensayo de actividad metabólica celular (MTS o MTT), así como el mecanismo de actuación de citotoxicidad, utilizando el ensayo de actividad deshidrogenasa y de tinción de células vivas/muertas.²⁷

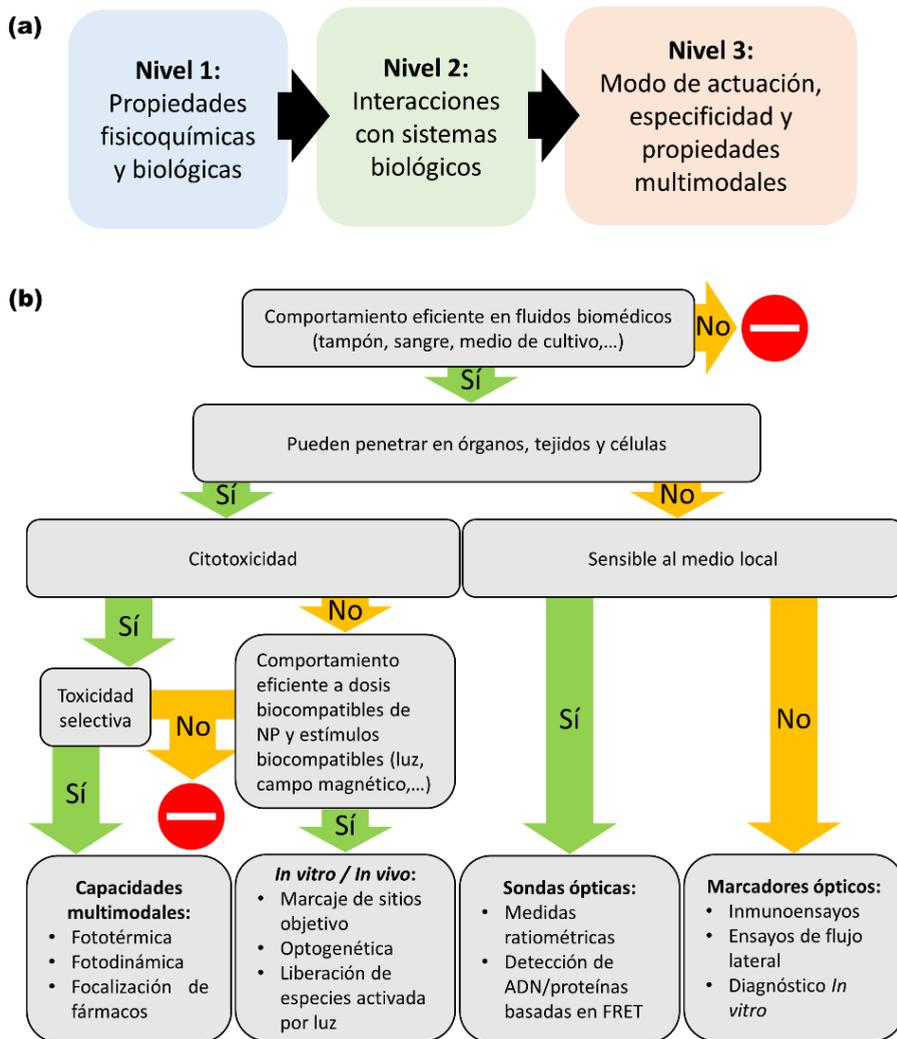


Figura 5.1. (a) Niveles de evaluación de la eficacia, calidad y seguridad de nanomateriales basados en UCNP y (b) diagrama de decisión para desarrollar aplicaciones biomédicas, de acuerdo con la acción COST 1403.⁷

5.2. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo son:

- demostrar la internalización celular de UC_{Er} y UC_{Er}@CB mediante NIR-LSM,
- obtener tiempos de vida de UCNP en el medio celular,
- estudiar la viabilidad celular y mecanismo de citotoxicidad de UC_{Er} y UC_{Er}@CB.

5.3. Resultados y discusión

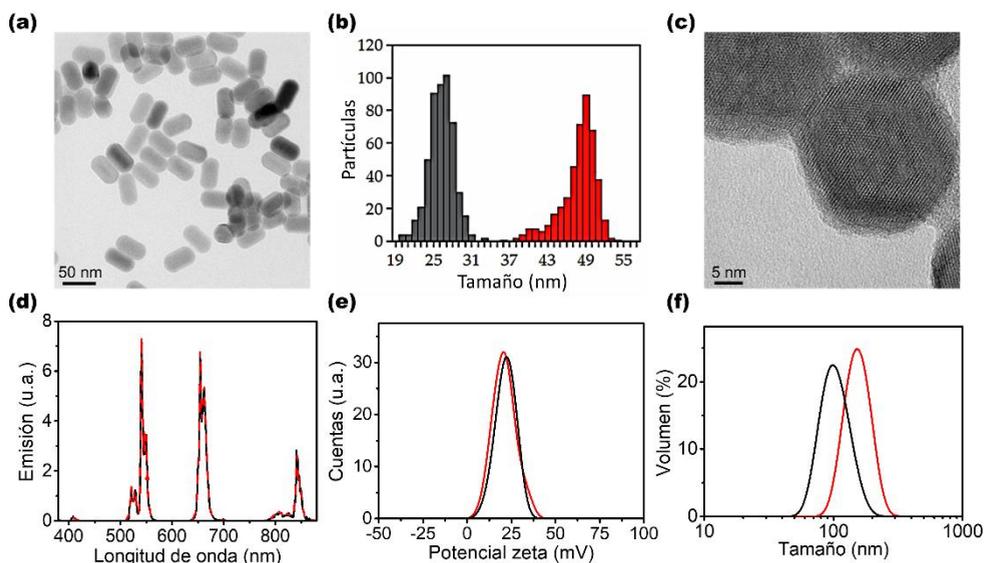


Figura 5.2. (a) Imagen TEM e (b) histograma de la UC_{Er} utilizada para el estudio. (c) Imagen HRTEM que muestra un recubrimiento amorfo alrededor de las UCNP. (d) Espectro de emisión corregido de dispersiones de 10 mg/mL UC_{Er} (línea negra) y $UC_{Er}@CB$ (línea roja discontinua) en DMSO ($\lambda_{exc}=975$ nm). (e) Potencial zeta de dispersiones acuosas de 1 mg/mL de UC_{Er} (negro) y $UC_{Er}@CB$ (rojo). (f) DLS de las dispersiones de 10 mg/mL UC_{Er} (negro) y $UC_{Er}@CB$ (rojo) en DMSO. Reproducido de ²⁷.

Las nanopartículas β - $NaYF_4:Yb^{3+}(20\%),Er^{3+}(2\%)$ recubiertas de ligandos oleato se sintetizan mediante un protocolo de descomposición térmica (figura 5.2.a-b; véase sección 5.5.3. *Protocolos sintéticos y preparativos*). La sustitución de los ligandos oleato por las moléculas del macrociclo CB se realiza en un procedimiento en dos etapas. Primero, se eliminan los ligandos oleato mediante su protonación en medio ácido y se realizan extracciones para eliminarlo. Las β - $NaYF_4:Yb^{3+}(20\%),Er^{3+}(2\%)$ libres de ligandos oleato (UC_{Er}) obtenidas son dispersables en medio acuoso, estables y no sufren corrosión, hidrólisis o agregación, ya que estos efectos adversos se observan con muestras en medios

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

muy ácidos o en condiciones de alta dilución.^{13,15,28} En segundo lugar, la funcionalización con CB (UC_{Er}@CB) se realiza mediante la exposición de UC_{Er} en un medio acuoso con exceso de CB. Finalmente, tras unos lavados, se obtienen UC_{Er}@CB monodispersas con forma de prisma hexagonal (26 ± 2 nm x 48 ± 2 nm) y en fase cristalina hexagonal. Las imágenes de HRTEM demuestran la presencia de un material amorfo de grosor $\approx 1,5$ nm que recubre a las UCNP, atribuido a una monocapa de moléculas de CB (altura CB $\sim 0,91$ nm; figura 5.2.c).^{21,29} La presencia del CB no modifica el espectro de emisión del *core* de UC_{Er} (figura 5.2.d) ni la carga superficial (potencial zeta: 20 ± 2 mV vs. 21 ± 1 mV para UC_{Er} y UC_{Er}@CB, respectivamente; figura 5.2.e). El valor de potencial zeta obtenido para UC_{Er}@CB es similar a los obtenidos con otras nanopartículas recubiertas de CB.^{30,31} Si bien, el diámetro hidrodinámico aumenta ligeramente por la presencia de CB (figura 5.2.f).

Para evaluar efectos citotóxicos, se utilizaron líneas celulares relevantes de cara a una potencial administración por vía intravenosa. Así, se usaron células EAhy 926, que son células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos; células RAW 264.7, que son modelos de fagocitos (monocito/macrófago) cuya función es rodear los microorganismos y destruirlos, extraer células muertas y estimular la acción de otras células del sistema inmunitario;³² y células HeLa, que son células epiteliales, componentes principales del tejido funcional de los órganos de animales (parénquima animal). Se utilizaron líneas celulares en lugar de células primarias, porque se pretendía evaluar la citotoxicidad basal y no la función celular específica. Para este tipo de pruebas, la reproducibilidad de las líneas celulares es una gran ventaja.³³

La contaminación bacteriana de las muestras es una fuente de interferencia importante que podría llevar a una interpretación errónea de resultados. Esta puede deberse a la presencia de bacterias en las muestras de UCNP o bien por alguna contaminación en el procedimiento de sembrado y crecimiento celular.

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

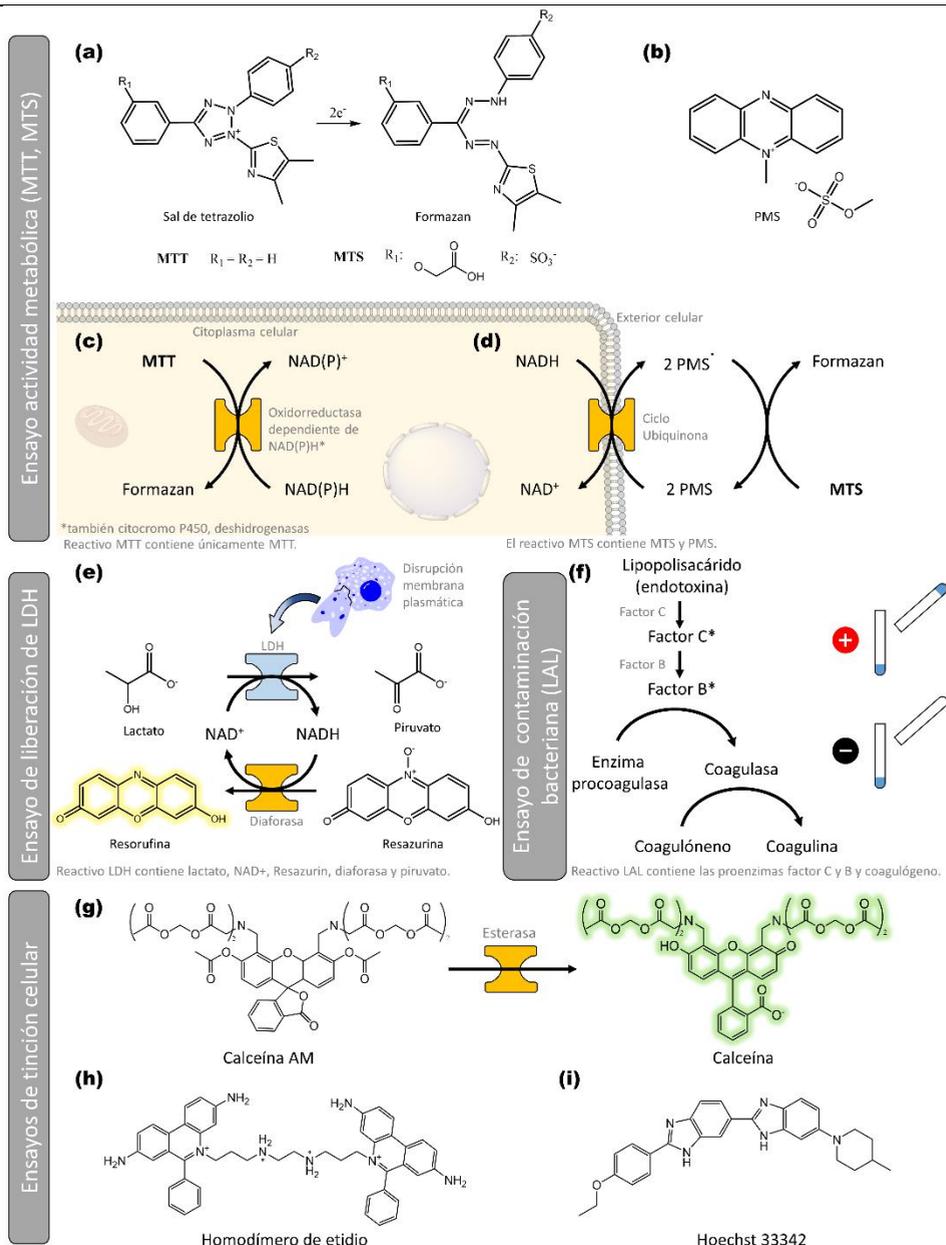


Figura 5.3. (a) Reacción de reducción de las sales de tetrazolio del ensayo de actividad metabólica. (b) Estructura del metosulfato de fenazina (PMS). Mecanismo de reducción de (c) MTT y (d) MTS.^{34,35} Fundamento del ensayo de (e) liberación de LDH y (d) contaminación bacteriana o lisado de amebocitos de *Limulus*.³⁶ (g) Fundamento de la detección de células vitales de la sonda calceína

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

AM. Estructuras químicas de los colorantes de tinción nuclear (h) homodímero de etidio y (i) Hoechst 33342.

Por suerte, es fácil de identificar esta contaminación, ya que induce rápidamente la muerte celular independientemente de la dosis administrada y, también, puede detectarse mediante microscopía. En este caso, la interferencia por contaminación bacteriana se descarta pues los medios de cultivo utilizados presentan un 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomicina). Además, los estudios realizados con células EAhy 926 se sometieron al ensayo con lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), que asegura que el producto está exento de bacterias. El ensayo LAL detecta la presencia de la endotoxina, el lipopolisacárido asociado a la membrana externa de los patógenos Gram negativos, de manera visual mediante un reactivo compuesto por una proenzima y una proteína de coagulación (coagulina). La presencia de la endotoxina cataliza la activación de la proenzima convirtiéndola en una enzima activada (coagulasa) que hidroliza enlaces específicos de la coagulina que, a su vez, provoca su entrecruzamiento y la formación de coágulos gelatinosos (figura 5.3.f). El ensayo demuestra que todas las muestras de células EAhy 926 tratadas a diferente concentración (2, 5, 20, y 200 $\mu\text{g/mL}$) de UC_{Er} y UC_{Er}@CB se comportan de forma similar al control (células no tratadas con UCNP), lo que indica que las muestras no presentan endotoxina ni, por tanto, contaminación bacteriana.

La morfología celular se evaluó a través de microscopía óptica de campo claro para células HeLa y RAW 264.7 expuestas a 50 $\mu\text{g/mL}$ de UC_{Er} y UC_{Er}@CB durante 24 horas. Las imágenes demuestran que la presencia de UCNP no produce cambios en la forma (figura 5.4). Además, no se observa la separación de las células del medio de crecimiento, a excepción del control positivo, lo que ya nos indica una baja o nula citotoxicidad.³⁷

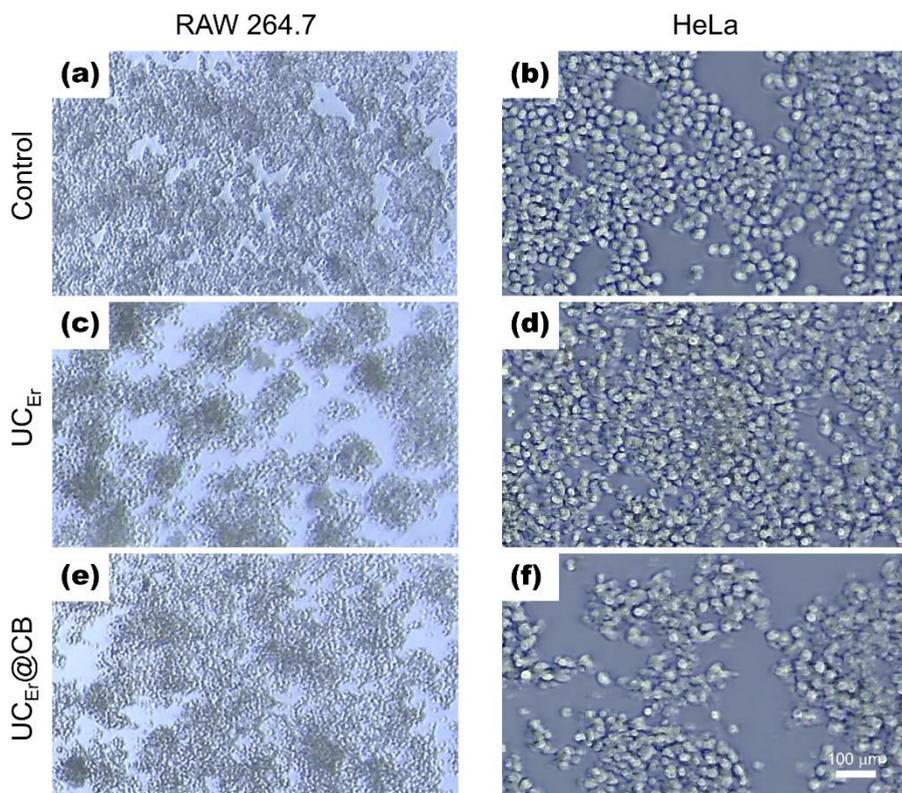


Figura 5.4. Morfología de las células HeLa y RAW 264.7 expuestas a 50 $\mu\text{g/mL}$ UC_{Er} y $\text{UC}_{\text{Er}}@CB$ después de 24 h de cultivo. La imagen completa se muestra en la sección 5.6. Caracterización adicional. Reproducido de ²⁷.

La internalización de UC_{Er} y $\text{UC}_{\text{Er}}@CB$ se evaluó en términos de colocalización mediante NIR-LSM en células vivas y fijas HeLa y RAW 264.7 expuestas a 50 $\mu\text{g/mL}$ de UC_{Er} y $\text{UC}_{\text{Er}}@CB$ (figura 5.5). Las UCNP se excitaron a 975 nm usando *dwell times* largos. Para visualizar el núcleo celular, las células se tiñeron con Hoechst 33342 (figura 5.3.i) y se excitó bifotónicamente (2PE) a 750 nm. Las imágenes obtenidas de la misma área excitando a las anteriores longitudes de onda demuestran la cercanía y superposición de la emisión de la UCNP y el núcleo celular (figuras 5.5.d,g,j,m), indicando que tanto UC_{Er} y $\text{UC}_{\text{Er}}@CB$ son capaces de atravesar la membrana celular. Debe tenerse en cuenta

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

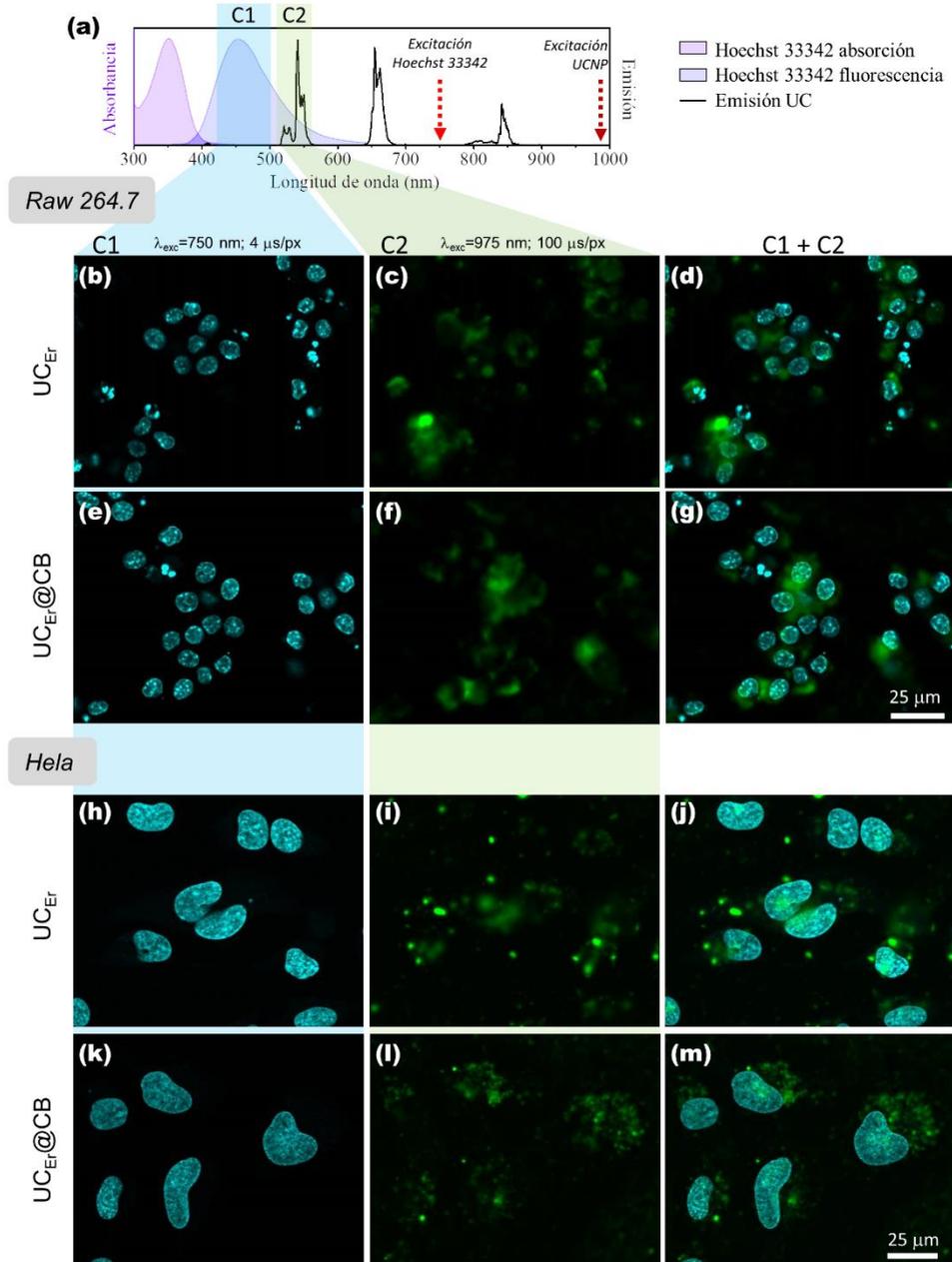


Figura 5.5. (a) Absorción (rosa) y emisión (violeta) de Hoechst 33342, emisión corregida de una dispersión de UC_{Er} en DMSO junto con la longitud de onda de excitación del colorante y la UCNP y los canales de detección (rectángulos coloreados) del microscopio NIR-LSM. (b-g) Imágenes NIR-LSM de células RAW 264.7 expuestas a UC_{Er} y UC_{Er}@CB. (h-m) Imágenes NIR-LSM de células HeLa

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

expuestas a UC_{Er} y UC_{Er}@CB. La columna izquierda muestra la señal de fluorescencia de Hoechst 33342 (λ_{exc} = 750 nm, dwell time: 4 μ s/píxel, canal de detección C1), la columna central muestra la emisión upconversion de Er³⁺ de 520/540 nm (λ_{exc} = 975 nm, dwell time: 100 μ s/píxel, canal de detección C2) y la columna derecha es la imagen compuesta (C1 + C2) de las dos anteriores. La escala de 50 μ m aplica para todas las imágenes. Reproducido de ²⁷.

que, antes de realizar el experimento de microscopía, las muestras celulares fueron lavadas varias veces con PBS, por tanto, la emisión de la UCNP observada debe proceder de la internalizada en el medio citoplasmático celular o la anclada a la superficie celular, y no debida a una distribución aleatoria de la UCNP en el medio de cultivo de la muestra. También se realizaron imágenes de UCNP aparentemente internalizadas excitando a 975 nm con *dwell time* pequeños para obtener su tiempo de vida en el interior celular (figura 5.6). Si bien, aunque la presencia de UCNP muy cercanas entre sí dificulta la obtención de una cinética limpia, se pudieron registrar algunas cinéticas de emisión UC que demuestran entornos químicos diferentes entre cada línea celular, pero no entre UC_{Er} y UC_{Er}@CB.

Una vez demostrada la internalización UC_{Er} y UC_{Er}@CB, se procedió a evaluar la citotoxicidad de UC_{Er} y UC_{Er}@CB a diferentes concentraciones (12,5, 25, 50, 100 y 200 μ g/mL) en las tres líneas celulares de estudio. Las dosis administradas permiten la comparación con estudios previos.³⁸⁻⁴⁰ Una primera indicación de posible citotoxicidad en células EAhy 926 es su desprendimiento del sustrato de crecimiento, que puede observarse con microscopía. Sin embargo, ninguna de las muestras presentó este comportamiento a excepción del control positivo con partículas de poliestireno.

Para un análisis más cuantitativo de los efectos adversos celulares, se utiliza la determinación colorimétrica de la actividad metabólica celular usando sales de tetrazolio, como por ejemplo MTT o MTS. El MTT es capaz de atravesar la membrana celular y ser reducido por diferentes sitios celulares, como oxidorre-

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

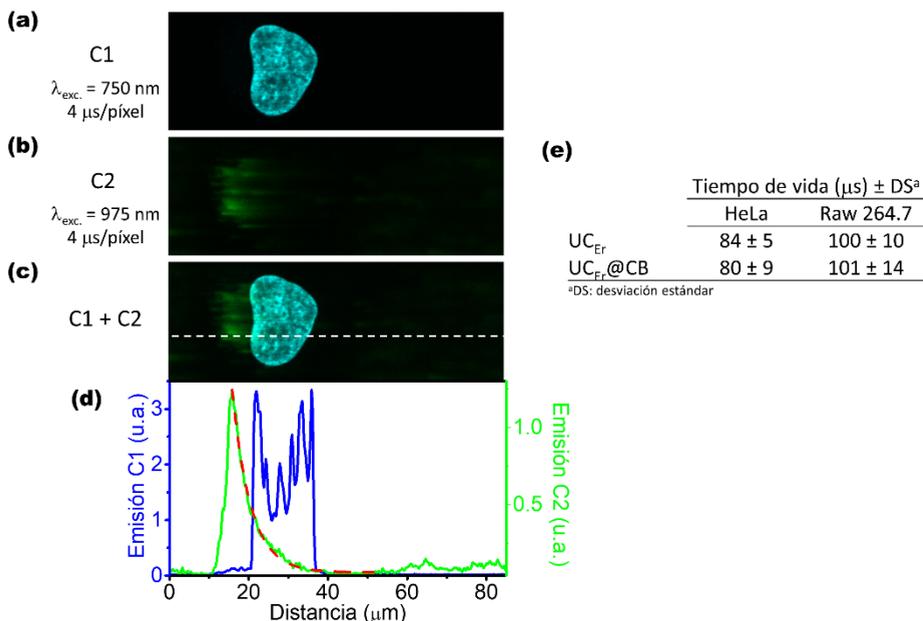


Figura 5.6. Detalle de imagen NIR-LSM excitando al (a) Hoechst 33342 (λ_{exc} = 750 nm, dwell time: 4 $\mu\text{s}/\text{píxel}$, canal de detección C1), (b) a UC_{Er}@CB (λ_{exc} = 975 nm, dwell time: 4 $\mu\text{s}/\text{píxel}$, canal de detección C2) y (c) la imagen compuesta de las dos anteriores. (d) Perfil de intensidad obtenido en la imagen (c; línea blanca discontinua) en C1 y C2. Además, se muestra el ajuste monoexponencial de la desactivación de la emisión upconversion (línea roja discontinua). (e) Tiempos de vida obtenidos para UC_{Er} y UC_{Er}@CB internalizadas en células HeLa y RAW 264.7.

ductasas dependientes de NAD(P)H, citocromo P450 y deshidrogenasas, dando lugar a formazanos con un elevado coeficiente de absorción molar a 490 nm (figura 5.3.c).^{34,41} El MTS, en cambio, requiere un aceptor de electrones intermediario (metosulfato de fenazina, PMS), no penetra tan fácilmente en el medio celular y se estima que su reducción tiene lugar por el transporte de electrones a través de la membrana plasmática (figura 5.3.d).³⁴ Si bien, su protocolo experimental es más sencillo ya que, a diferencia del MTT, genera formazanos solubles. En ambos casos, la cantidad de formazán formado medido como absorbancia a 490 nm es directamente proporcional al número de células

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

vivas (metabólicamente activas). El resultado se presenta como viabilidad (en porcentaje) respecto a un control negativo sin el agente tóxico. De acuerdo con la norma ISO-10993-5 para la evaluación biológica de productos sanitarios, una viabilidad inferior al 70 % se considera citotóxica.³³ Así, UC_{Er} demostró no ser citotóxica para células EAhy 926 (figura 5.7.a) ni para dosis < 100 µg/mL en células HeLa (figura 5.7.b), mientras que es citotóxica en todas las dosis de estudio para RAW 264.7 (figura 5.7.c). Por otro lado, UC_{Er}@CB demostró no ser citotóxica para células EAhy 926 ni HeLa en todas las dosis (viabilidad > 90 %), mientras que es citotóxica para dosis > 50 µg/mL en células RAW 264.7. Estos resultados evidencian que el recubrimiento con CB mejora la biocompatibilidad de las UCNP en las líneas celulares estudiadas. Además, demuestran que la dosis utilizada en los estudios anteriores de morfología e internalización (50 µg/mL) permite la viabilidad de las células.

La mayor respuesta citotóxica observada en células RAW 264.7 es similar a la reportada en otros estudios⁴² y podría estar provocada por la mayor eficiencia de admisión de agente tóxico (*uptake*) y por su alto contenido en lisosomas, cuyo medio ácido interno puede disolver las UCNP y liberar iones potencialmente tóxicos como el F⁻ y Ln³⁺ (Ln= Y, Yb, Er) en el medio celular.²⁰ Por tanto, el recubrimiento de CB podría estar protegiendo la superficie de la UCNP y retrasando fenómenos de disolución superficial de la UCNP. Además, el ligando no presenta, aparentemente, una actividad citotóxica que potencie las propiedades citotóxicas de las UCNP, como sí ocurre en UCNP recubiertas con PEG-oleato.⁴³ Merece la pena destacar que, tal y como se recomienda para estudios de citotoxicidad de nanomateriales^{3,4,7,40,44} y, en particular, de las UCNP, los ensayos de actividad metabólica incluyeron 4 tipos de ensayos control: (i) el negativo, sin UCNP; (ii) de interferencia, con las UCNP y sin células para verificar que la presencia de los nanomateriales no afecta a la lectura de la absorción a 490 nm; (iii) un positivo con partículas de poliestireno (20 nm) no funcionalizadas, que no mata a todas las células y que sirve para confirmar que responden correctamente

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

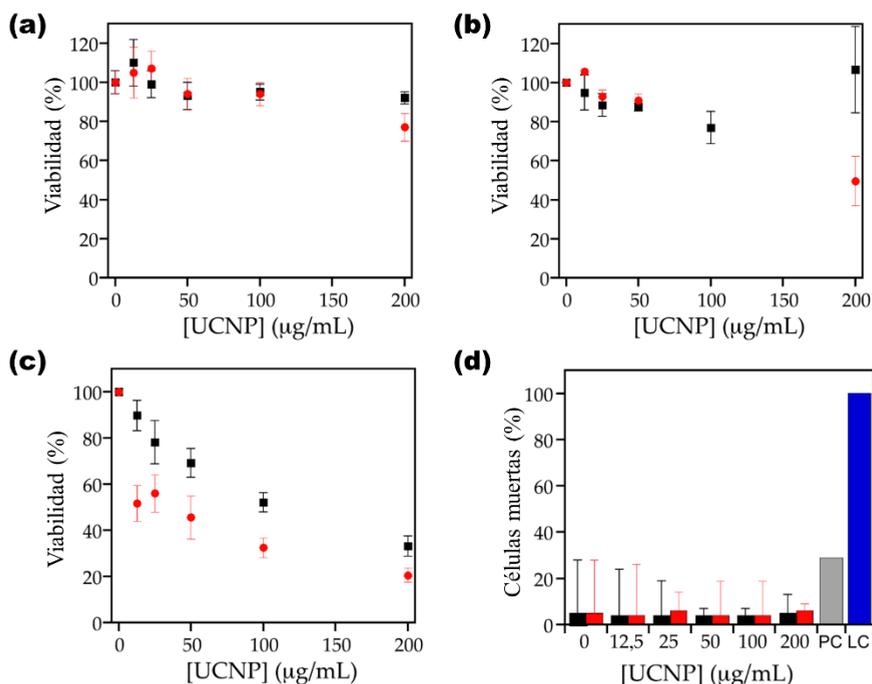


Figura 5.7. Viabilidad celular (%) en células (a) EAhy 926, (b) HeLa y (c) RAW 264.7 a diferentes dosis de UC_{Er} (círculos rojos) y $UC_{Er}@CB$ (cuadros negros) determinada por el ensayo de actividad deshidrogenasa. (d) Gráfico de columnas del ensayo de liberación de LDH en células EAhy 926 expuestas a diferentes dosis de (columnas rojas) UC_{Er} y (columnas negras) $UC_{Er}@CB$. También se presentan el control de positivo (PC, columna gris) y el control de lisis (LC, columna azul). Lo valores se presentan como promedio \pm desviación estándar. Reproducido de ²⁷.

frente a un estímulo tóxico; y (iv) un control positivo de lisis o ruptura celular, que trata de inducir la muerte celular en todas las células. En este sentido, las UCNP no interfirieron en la lectura de absorción y las células respondieron adecuadamente al control positivo de partículas demostrando una viabilidad del 4 % (no mostrado), similar a la descrita para estos materiales (2-6 %).⁴⁵

Pese a la nula o baja citotoxicidad mostrada por UC_{Er} y $UC_{Er}@CB$, se investiga su mecanismo de daño celular mediante el ensayo de liberación de

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

lactato deshidrogenasa (LDH) en células EAhy 926 y el ensayo de tinción con calceína AM y homodímero de etidio (calceína AM/EthD-1) en HeLa y RAW 264.7.

El ensayo de liberación LDH es un ensayo fluorométrico que evalúa la integridad de la membrana plasmática. Si se produce la disrupción de la membrana plasmática, se liberan las enzimas intracelulares, como la LDH, que en presencia de lactato (presente en el reactivo LDH) cataliza su oxidación a piruvato con la consiguiente reducción de NAD^+ (también presente en el reactivo) a NADH. El NADH generado puede asociarse a diferentes enzimas celulares liberadas, como oxidorreductasas, deshidrogenasas o el citocromo, para volver a oxidarse catalizando la reducción de un fluoróforo inocuo: la resazurina (fluorescencia débil) en resorufina (muy fluorescente, figura 5.3.e).⁴⁶⁻⁴⁹ Los resultados del ensayo se presentan como cantidad (porcentaje) de células muertas respecto a un control de lisis celular (define el 100 % de células muertas). La disrupción de la membrana plasmática es un mecanismo común de citotoxicidad de los nanomateriales por su elevada área superficial.^{2,6} La liberación LDH se investiga en el sobrenadante de las células EAhy 926 expuestas a UC_{Er} y $\text{UC}_{\text{Er}}@\text{CB}$. Así, mientras el control positivo (con NP de poliestireno) produjo un 29 % de células muertas, los ensayos con UC_{Er} y $\text{UC}_{\text{Er}}@\text{CB}$ mostraron una mortalidad muy baja (4-8 %; figura 5.7.d), similar a las células no tratadas. Esto sugiere que el mecanismo de actuación muy probablemente no se deba a su interacción con la membrana celular.

Por otro lado, se realizó también el ensayo de tinción calceína AM/EthD-1, esta vez con células HeLa y RAW 264.7, con el objetivo de obtener más información sobre el modo dominante de inducción de muerte celular de las UCNP. El ensayo permite diferenciar fluorimétricamente las células vivas de las células muertas, mediante el uso de dos colorantes. La calceína AM es un derivado diacetato de la fluoresceína no fluorescente capaz de internalizarse en

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

el interior celular. Allí, las esterases citoplasmáticas de las células vivas rompen los grupos acetato de la molécula, dando lugar al fluoróforo calceína conjugada ($\lambda_{em}= 517$ nm, figura 5.3.g).⁵⁰ En cambio, el EthD-1 es un compuesto fluorescente ($\lambda_{em}= 617$ nm) derivado del bromuro de etidio con una elevada afinidad por el núcleo celular, pero que no puede atravesar la membrana celular (figura 5.3.h).⁵⁰ Por tanto, de manera simplificada se puede decir que las células que emiten fluorescencia en el verde se consideran células vivas, mientras que las que emiten en el rojo se consideran células muertas. Específicamente, los criterios de evaluación utilizados, de acuerdo con Palma *et al.*⁵¹, son los siguientes: se consideran muertas las células positivas en EthD-1 y ligeramente negativas en calceína AM, se consideran vivas las células negativas en EthD-1 y positivas en calceína AM, y se consideran células apoptóticas aquellas con intensidad débil o fuerte de EthD-1 y calceína AM. Los resultados demuestran que la inducción de la apoptosis es el mecanismo principal de muerte celular con un 18-29 % en células HeLa (figuras 5.8.a-b) y un 21-45 % en células RAW 264.7 (figuras 5.8.c-d). La proporción de apoptosis fue mayor para células RAW 264.7 que para HeLa y UC_{Er} indujo más apoptosis que UC_{Er}@CB. El porcentaje de células muertas es similar en células RAW 264.7 y HeLa (4-10 %), no difiere entre UC_{Er} y UC_{Er}@CB, y reprodujo valores similares a la liberación de LDH en células EAhy 926. Se trata de un resultado en línea con otros estudios con UCNP y confirma la inducción de la apoptosis como el mecanismo de acción citotóxica frente a la disrupción de la membrana celular. Por ejemplo, Kałas *et al.*²⁰ estudiando el efecto citotóxico de UCNP de NaGdF₄:Yb³⁺,Er³⁺ recubiertas con BF₄⁻ en células RAW 264.7 demuestran que la muerte celular apoptótica viene provocada por la disrupción de la homeostasis mitocondrial.

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

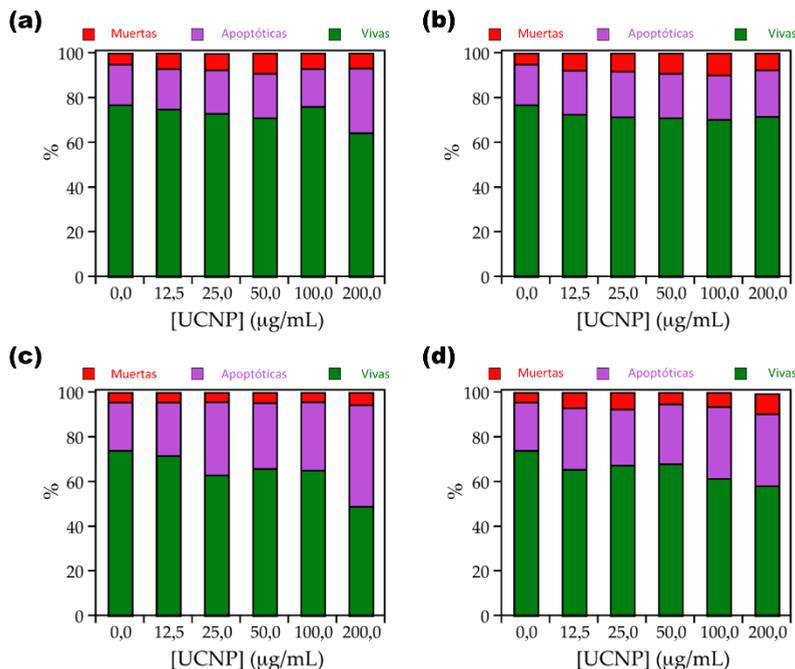


Figura 5.8. Gráfico de columnas con los porcentajes de células vivas (verdes), muertas (rojas) y apoptóticas (moradas) de células (a-b) HeLa y (c-d) RAW 264.7 expuestas a diferentes dosis de (a, c) UC_{Er} y (b, d) UC_{Er}@CB. Los diagramas de contorno de citometría de flujo se muestran en la sección 5.6. Caracterización adicional. Reproducido de ²⁷.

Para evaluar la citotoxicidad de nanomateriales adecuadamente se requiere un enfoque abierto, controlado y multimetódico, junto con una caracterización en profundidad del nanomaterial. En este caso, mediante NIR-LSM demostramos que tanto UC_{Er} y UC_{Er}@CB son capaces de internalizarse en el medio celular. Los ensayos de viabilidad, basados en ensayos MTT o MTS, demuestran que UC_{Er}@CB produce menos efectos nocivos que UC_{Er} ya que presenta baja citotoxicidad y una viabilidad mayor al 90% incluso para concentraciones de 200 µg/mL en células HeLa y EAhy 926. Sin embargo, no se puede descartar que algunos componentes del medio de cultivo, como fenilalanina, glucosa, y lisina, se hayan adsorbido a la superficie y estabilizado las UCNP, contribuyendo a la

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

ausencia de citotoxicidad.^{7,40} El ensayo de liberación LDH demuestra que el daño de la membrana plasmática no es el mecanismo principal de citotoxicidad, sino la inducción de apoptosis, como demuestra el ensayo calceína AM/EthD-1. Además, podemos descartar la interferencia de contaminación bacteriana en los resultados obtenidos. Todo ello, aporta información preliminar sobre la citotoxicidad y su mecanismo de acción en células modelo para una potencial aplicación intravascular. Aún quedan otros factores por evaluar, tales como hemotoxicidad, genotoxicidad, inmunogeneidad y estudios de toxicidad para células específicas (primarias), así como estudios complementarios con luz que descarten la fototoxicidad o el calentamiento de las muestras al excitar en el NIR. Aun así, la plataforma UC_{Er}@CB presenta unas características muy prometedoras, desde el punto de vista toxicológico, para su potencial aplicación biológica.

5.4. Conclusiones

- La técnica NIR-LSM permite evaluar la internalización celular de UC_{Er} y UC_{Er}@CB en células HeLa y RAW 264.7 y obtener tiempos de vida de desactivación de luminiscencia en el interior celular.
- UC_{Er} y UC_{Er}@CB se internalizan en células HeLa y RAW 264.7.
- La presencia de CB superficial en la superficie de la UCNP reduce su citotoxicidad, como lo demuestra que:
 - UC_{Er} y UC_{Er}@CB presentan citotoxicidad muy baja en células HeLa y Eahy 926. En todos los casos la viabilidad es ligeramente superior para UC_{Er}@CB que para UC_{Er}.
 - En células RAW 264.7, UC_{Er} es citotóxica en todas las concentraciones estudiadas, mientras que UC_{Er}@CB presenta citotoxicidad únicamente a concentraciones > 50 µg/mL.
- El mecanismo de inducción de citotoxicidad por UC_{Er} y UC_{Er}@CB se produce vía apoptosis celular, ya que:
 - El ensayo de liberación de LDH produjo valores similares al control sin UCNP para todas las concentraciones de UC_{Er} y UC_{Er}@CB en células Eahy 926.
 - El ensayo de tinción con calceína AM/EthD-1 también demuestra que la apoptosis es el mecanismo principal de muerte celular con un 21-45% en células RAW 264.7 y un 18-29% en células HeLa.

5.5. Procedimiento experimental

5.5.1. Métodos

Contaminación con bacterias. Para determinar la contaminación bacteriana se detecta la endotoxina mediante el ensayo con lisado de amebocitos de *Limulus* PYROGENT Ultra (sensibilidad= 0,06 UE/mL, Szabo-Scandic HandelsgmbH). El ensayo se realiza de acuerdo con las instrucciones del manual. Cada dilución de la muestra se estudió por duplicado, y los patrones de endotoxina con cepa *E.coli* 055:B5 por triplicado. El ensayo consiste primero en una prueba sí/no y, posteriormente, se cuantifica la endotoxina libre de las pruebas con detección positiva de endotoxina.

Exposiciones celulares. Las células endoteliales macrovasculares humanas EAhy 926 fueron amablemente proporcionadas por el Dr. C.J. Edgell. Las células expresaban las características propias de células endoteliales, como el antígeno relacionado con factor humano VIII.⁵² Las células se cultivaron en el medio con alto contenido de glucosa Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) con 10 % de suero fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina y 1 % penicilina/estreptomicina (GE Healthcare) en atmósfera humidificada (37 °C, 5 % CO₂, 95 % HR). El número de células se midió con un contador celular y un sistema analizador (CASY®TT, Innovatis). Para los experimentos, se sembraron las células (1,4·10⁵ /pocillo) en placas de 96 pocillos 24 horas previas a la exposición para crear cultivos subconfluentes (80 % confluencia) como recomienda el ISO 10993-5 para pruebas de viabilidad. Las NP se estudiaron a las siguientes concentraciones: 12,5; 25; 50; 100 y 200 µg/mL. Para identificar una potencial interferencia con los ensayos, las NP también se probaron solas. Como control positivo se utilizaron NP planas de poliestireno de 20 nm (Thermofisher Scientific) a una concentración de 400 mg/mL. A esta concentración, cuando se añadan al medio con SFB, se espera que la viabilidad de las células EAhy 926 sea de 4-6 %.⁵³

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

Las células de cáncer cervical HeLa y los macrófagos de leucemia murina RAW 264.7 del Servicio Central de apoyo a la investigación de la Universidad de Valencia (SCSIE) se cultivaron en el medio con alto contenido de glucosa Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) libre de rojo fenol con 10% SFB, 1% penicilina/estreptomicina y 0,01% de fungizona en atmósfera humidificada (37 °C, 5 % CO₂, 95 % HR). Las células se mantuvieron continuamente en confluencia antes de dividir las dos veces por semana y se excluyó la posibilidad de contaminación mediante la realización de una prueba de micoplasma regular.

Imagen celular. La morfología celular se estudia con un microscopio óptico convencional. Las imágenes de microscopía óptica han sido aumentadas y artificialmente se ha aumentado el brillo, con el fin de hacer la visualización más clara. Para la internalización celular, las células HeLa y macrófagos RAW 264.7 se sembraron en placas de cultivo ($\approx 5 \cdot 10^5$, 10 mL, 10 cm²) durante 24 h, luego se reemplazó el medio con medio fresco que contenía UCNP (50 µg/ml, 10 mL) durante 24 h. Antes de la obtención de imágenes, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y se coincubaron con medio de crecimiento fresco sin rojo fenol que contenía Hoechst 33342 (2 µM, 10 ml, 15 min). Posteriormente, para la fijación de las células, se incubaron con paraformaldehído al 4% durante 30 min, se lavaron con PBS y se sumergieron en PBS fresco. Para registrar las células se utiliza la técnica NIR-LSM en un microscopio multifotón comercial (FV1000MPE, Olympus). Las UCNP se excitaron a 975 nm y su emisión se recogió en el C2 (515–580 nm) a 100 µs/píxel de *dwell time* (densidad de energía por *dwell time*, F_d : 220 J/cm²), mientras que el Hoechst 33342 se excitó bifotónicamente a 750 nm y su fluorescencia se registró en el C1 (420-500 nm) a 4 µs/píxel.⁵⁴

Ensayo de la actividad deshidrogenasa (MTS). El ensayo colorimétrico de proliferación celular no radiactivo CellTiter96®AQueous (Promega) se realizó según las instrucciones del fabricante. Brevemente, 20 µL de la disolución

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

compuesta por MTS (*3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio*) y PMS (*metosulfato de fenazina*) se añade a cada pocillo que contiene 100 μ L de células en medio de cultivo. A continuación, las placas se incuban 2 h a 37 °C en un incubador celular y, por último, se lee la absorbancia a 490 nm en un lector de placas (SPECTRA MAX plus 384, Molecular Devices). Los pocillos con NP suspendidas en el medio y sin células se usaron como controles (blancos). Para determinar si las UCNP interfieren en el ensayo, se realiza un control de interferencia con las UCNP a la concentración máxima y sin células. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Ensayo de viabilidad celular MTT. Los efectos citotóxicos de las UCNP hacia HeLA y RAW 264.7 se evaluaron mediante ensayos colorimétricos MTT de viabilidad celular. Las células se sembraron a una densidad de $5 \cdot 10^4$ células/mL (si consideramos 5000 células en 100 μ L de medio de cultivo por pocillo en placas de 96 pocillos). El medio se eliminó después de que las células se adhirieran a la pared, y se trataron con UCNP a diferentes concentraciones (12,5, 25, 50, 100 y 200 μ g/mL) durante 24 horas. A continuación, se retira el medio, se lavan las células con PBS y se añaden 90 μ L de medio de cultivo libre de suero y rojo fenol y 10 μ L de una disolución 5 mg/mL de MTT (*bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio*) a cada pocillo. Posteriormente, se incubó durante 4 horas, se elimina el sobrenadante y se añaden 100 μ L de DMSO a cada pocillo. Por último, se agitan vigorosamente las placas para solubilizar el producto de la reducción del MTT (formazán) y, posteriormente, se registra y analiza la absorbancia a 490 nm en un lector de placas Microplate Reader Multiskan EX (MTX LabSystems). Todos los ensayos MTT se realizan tres veces en duplicado. El control negativo consiste en la exposición de las células únicamente al medio de cultivo y el control positivo se realiza usando 0,1 % Triton X-100.

Ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH). El ensayo fluorimétrico de integridad homogénea de membrana (CytoTox-ONE™,

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

Promega) se realizó según las instrucciones del fabricante. Brevemente, 2 μL de la disolución de lisis (9 % Triton X-100) se añadió a cada pocillo control. A esa concentración de tensioactivo se produce la disrupción de la membrana plasmática pero la actividad LDH se mantiene. Todos los pocillos reciben un volumen de reactivo CytoTox-ONE igual al volumen del medio de cultivo celular presente en cada pocillo. La mezcla se agita durante 30 segundos, se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos y se para la reacción añadiendo 50 μL de la disolución de parada/100 μL de reactivo CytoTox-ONE añadido. Por último, la placa se agita 10 segundos y se registra la fluorescencia a 590 nm excitando a 560 nm (FLUOstar Optima. servoLAB GmbH). Después de sustraer el valor del blanco, la fluorescencia promedio de las muestras se normaliza a la liberación máxima de LDH (control de lisis). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Ensayo de tinción con calceína-AM y el Homodímero-1 de etidio. La citotoxicidad se evaluó, adicionalmente, a través del ensayo de calceína AM y homodímero de etidio (EthD-1; Kit de viabilidad/citotoxicidad para células de mamíferos LIVE/DEAD®, Molecular Probes Inc.). Brevemente, se cultivaron células HeLa y RAW 264.7 en placas de 6 pocillos y se las expuso a UCNP a diferentes concentraciones durante 24 horas. Posteriormente, las células se separaron con tripsina 0,2 5% y las suspensiones se centrifugaron. Los precipitados se redispersaron con 500 μL de PBS y se tiñeron con 50 nM calceína AM ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$: 494/517 nm) y 16 μM EthD-1 ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$: 528/617 nm) durante 30 minutos a 25 °C. Las muestras se analizaron por citometría de flujo (BD FACS-Verse, BD Biosciences) en el SCSIE. El número relativamente bajo de células vivas en los controles probablemente sea debido al tratamiento de separación de células del medio de cultivo para que fueran medidas por citometría celular.

5.5.2. Materiales

Los materiales utilizados para la síntesis de UCNP/UCNH fueron: los cloruros hidratados de los lantánidos ($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, y $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, todos al 99,9%), 1-octadeceno (95%), ácido oleico (70%), NaOH, NH_4F (99,99%) e hidrato de cucurbit[7]uril (99%; Strem Chemicals). Todos los reactivos se compraron a Sigma-Aldrich (Merck) y se utilizaron sin purificar.

5.5.3. Protocolos sintéticos y preparativos

Síntesis de $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Yb}^{3+}$ (20%), Er^{3+} (2%) recubiertas de oleato

Las UCNP se sintetizaron según un protocolo previo⁵⁵ con algunas modificaciones. En un matraz de fondo redondo se añaden 15 mL de 1-octadeceno y 12 mL de ácido oleico. A continuación, se añade una disolución de 2 mL de metanol (MeOH) que contiene 1,02 mmol de lantánidos (0,80 mmol $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,20 mmol $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0,02 mmol $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). A partir de ese momento se mantiene una agitación constante y atmósfera inerte (N_2) hasta el final de la síntesis. La mezcla se calienta hasta 160 °C y se mantiene a esa temperatura hasta que las sales se hayan disuelto. Posteriormente, la disolución se enfría hasta 60°C y se añade una disolución de MeOH que contiene NaOH (2,5 mmol) y NH_4F (4 mmol). La disolución se calienta hasta 125 °C para eliminar el MeOH. Por último, se sube rápidamente la temperatura hasta 305 °C y se mantiene durante 1,5 horas. Pasado ese tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente. La purificación de las UCNP se realiza mediante precipitación y lavados. En primer lugar, se centrifuga la mezcla de reacción a 10000 rpm durante 15 minutos. El precipitado se lava mediante ciclos de redispersión-centrifugación tres veces con una mezcla de n-hexano:acetona:MeOH (87:81:32) y una vez con etanol. Finalmente, se redispersan en tolueno. Como ocurre generalmente la proporción de los lantánidos en las UCNP finales, obtenido por EDX, difiere ligeramente del usado para la síntesis.

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

Eliminación de ligandos oleato superficiales de β -NaYF₄:Yb³⁺(20%), Er³⁺(2%) (UC_{Er})

Los ligandos oleato de la superficie de la UCNP se eliminaron mediante un tratamiento ácido previamente descrito.⁵⁶ 100 mg de UC_{Tm} sólidas recubiertas de oleato se redispersaron en 10 mL de una disolución acuosa de HCl a pH 3 y se mantuvieron en agitación vigorosa durante 3 horas. Después, se realizaron tres extracciones con dietiléter (10 mL) para eliminar el ácido oleico en la fase orgánica. La fase orgánica se lava con 10 mL de agua, con el fin de recuperar toda la UCNP posible. El conjunto de las fases acuosas se trataron 10 mL de acetona, recuperándose así la UC_{Tm} libre de oleato tras su precipitación por centrifugación a 9000 rpm durante 15 minutos a 25 °C. Finalmente, la UC_{Tm} se redispersa en agua Milli-Q.

Funcionalización de UC_{Er} con CB (UC_{Er}@CB)

La UC_{Tm}@CB se prepararon utilizando protocolo previamente descrito por el grupo.²² Para ello, se añaden 0,01 mmol CB se añadieron, a una dispersión acuosa de 30 mg de UC_{Tm} en 15 mL de agua. La dispersión se mantuvo en oscuridad con agitación constante a 350 rpm en un agitador orbital (*orbital shaker*) durante 24 horas. El exceso de CB se eliminó con lavados (2x 15 mL de agua y 3x 15 mL acetonitrilo) mediante ciclos de centrifugación (10000 rpm, 10 minutos, 20 °C)-redispersión. Finalmente, UC_{Tm}@CB se redispersa en agua Milli-Q. La concentración de UCNH (mg/mL) se obtiene secando una alícuota (100-200 μ L) de la dispersión final de UCNH.

5.6. Caracterización adicional

Tabla 5.1. Composición de la muestra UC_{Er} determinada por EDX (20 kV).

| | Composición atómica (%) | | |
|------------------|-------------------------|------------|-----------|
| | Itrio | Iterbio | Erbio |
| UC _{Er} | 77,9 ± 0,5 | 20,0 ± 3,0 | 2,1 ± 0,9 |

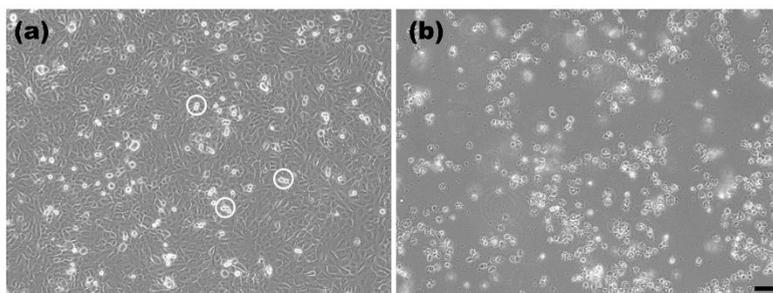


Figura 5.9. Morfología de células endoteliales EAhy 926 (a) no tratadas y (b) expuestas a un control positivo de partículas de poliestireno de 20 nm después de 24 h de cultivo. Los cultivos de células EAhy 926 formaron una monocapa confluyente donde se observan algunas células dividiéndose (señaladas con círculos). Las células expuestas al control positivo no forman una monocapa, se han redondeado y desprendido del medio de sustrato y flotan en el medio de cultivo. Escala: 50 μm .

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

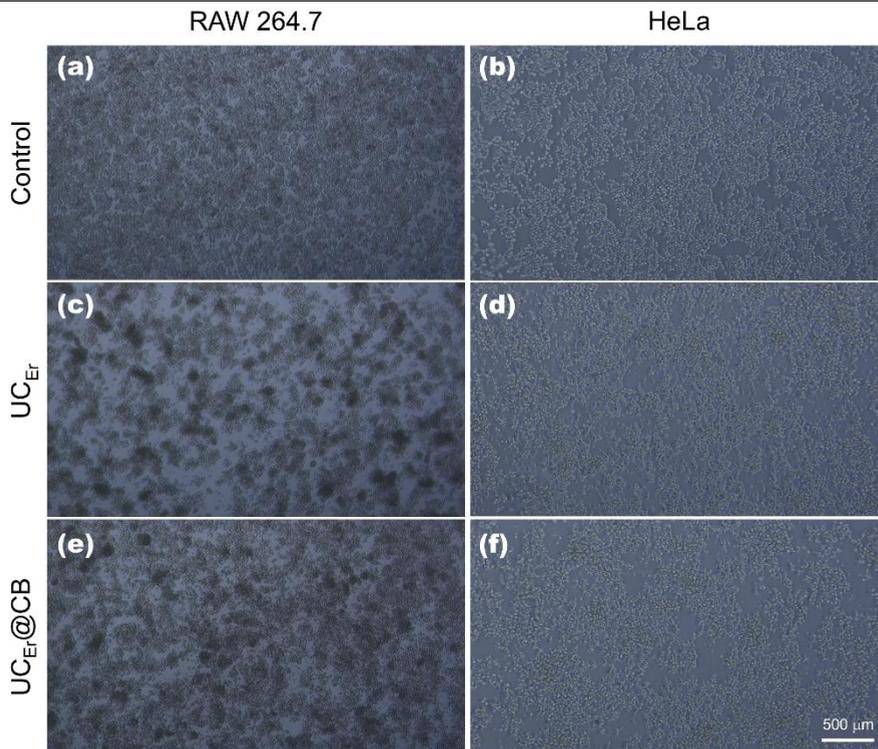


Figura 5.10. Morfología de las células HeLa y RAW 264.7 expuestas a 50 $\mu\text{g/mL}$ UC_{Er} y UC_{Er}@CB después de 24 h de cultivo.

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

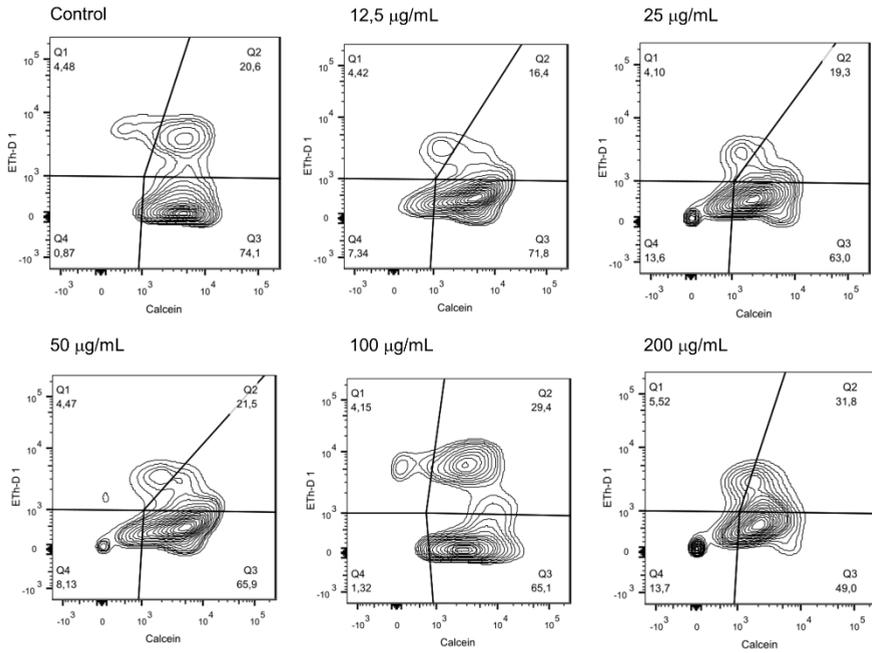


Figura 5. 11. Diagramas de contorno de citometría de flujo del ensayo de tinción con calceína-AM y homodímero-1 de etidio en células RAW 264.7 con UC_{Er} a distintas dosis.

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

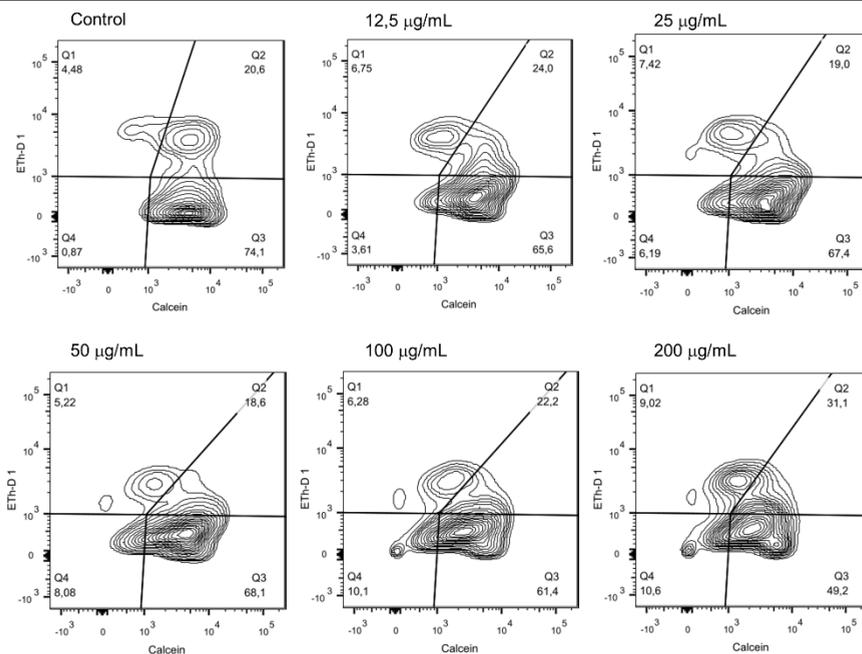


Figura 5.12. Diagramas de contorno de citometría de flujo del ensayo de tinción con calceína-AM y homodímero-1 de etidio en células RAW 264.7 con $UC_{Er}@CB$ a distintas dosis.

5.7. Referencias

- (1) European Union Observatory for Nanomaterials <https://euon.echa.europa.eu/uses> (accessed Nov 19, 2021).
- (2) Gnach, A.; Lipinski, T.; Bednarkiewicz, A.; Rybka, J.; Capobianco, J. A. Upconverting Nanoparticles: Assessing the Toxicity. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (6), 1561–1584.
- (3) Krug, H. F. Nanosafety Research-Are We on the Right Track? *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (46), 12304–12319. <https://doi.org/10.1002/anie.201403367>.
- (4) Soenen, S. J. H.; De Cuyper, M. Assessing Cytotoxicity of (Iron Oxide-Based) Nanoparticles: An Overview of Different Methods Exemplified with Cationic Magnetoliposomes. *Contrast Media Mol. Imaging* **2009**, *4* (5), 207–219. <https://doi.org/10.1002/cmml.282>.
- (5) Soenen, S. J.; Rivera-Gil, P.; Montenegro, J. M.; Parak, W. J.; De Smedt, S. C.; Braeckmans, K. Cellular Toxicity of Inorganic Nanoparticles: Common Aspects and Guidelines for Improved Nanotoxicity Evaluation. *Nano Today* **2011**, *6* (5), 446–465. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2011.08.001>.
- (6) Fröhlich, E. The Role of Surface Charge in Cellular Uptake and Cytotoxicity of Medical Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 5577–5591. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>.
- (7) Oliveira, H.; Bednarkiewicz, A.; Falk, A.; Fröhlich, E.; Lisjak, D.; Prina-Mello, A.; Resch, S.; Schimpel, C.; Vrček, I. V.; Wysokińska, E.; et al. Critical Considerations on the Clinical Translation of Upconversion Nanoparticles (UCNPs): Recommendations from the European Upconversion Network (COST Action CM1403). *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, *8* (1). <https://doi.org/10.1002/adhm.201801233>.
- (8) Yu, J.; Yin, W.; Peng, T.; Chang, Y. nan; Zu, Y.; Li, J.; He, X.; Ma, X.; Gu, Z.; Zhao, Y. Biodistribution, Excretion, and Toxicity of Polyethyleneimine Modified NaYF₄:Yb,Er Upconversion Nanoparticles in Mice via Different Administration Routes. *Nanoscale* **2017**, *9* (13), 4497–4507. <https://doi.org/10.1039/c7nr00078b>.
- (9) Peng, J.; Sun, Y.; Liu, Q.; Yang, Y.; Zhou, J.; Feng, W.; Zhang, X.; Li, F. Upconversion Nanoparticles Dramatically Promote Plant Growth without Toxicity. *Nano Res.* **2012**, *5* (11), 770–782. <https://doi.org/10.1007/s12274-012-0261-y>.
- (10) Monopoli, M. P.; Åberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K. A. Biomolecular Coronas Provide the Biological Identity of Nanosized Materials. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7* (12), 779–786. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.207>.
- (11) Ke, P. C.; Lin, S.; Parak, W. J.; Davis, T. P.; Caruso, F. A Decade of the Protein Corona. *ACS Nano* **2017**, *11* (12), 11773–11776. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08008>.
- (12) Horie, M.; Kato, H.; Fujita, K.; Endoh, S.; Iwahashi, H. In Vitro Evaluation of Cellular Response Induced by Manufactured Nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25* (3), 605–619. <https://doi.org/10.1021/tx200470e>.
- (13) Lisjak, D.; Plohl, O.; Ponikvar-Svet, M.; Majaron, B. Dissolution of Upconverting Fluoride Nanoparticles in Aqueous Suspensions. *RSC Adv.* **2015**, *5* (35), 27393–27397. <https://doi.org/10.1039/c5ra00902b>.

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

- (14) Lisjak, D.; Plohl, O.; Vidmar, J.; Majaron, B.; Ponikvar-Svet, M. Dissolution Mechanism of Upconverting $\text{AYF}_4\text{:Yb,Tm}$ ($A = \text{Na}$ or K) Nanoparticles in Aqueous Media. *Langmuir* **2016**, *32* (32), 8222–8229. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b02675>.
- (15) Lahtinen, S.; Lyytikäinen, A.; Päckilä, H.; Hömppi, E.; Perälä, N.; Lastusaari, M.; Soukka, T. Disintegration of Hexagonal $\text{NaYF}_4\text{:Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ Upconverting Nanoparticles in Aqueous Media: The Role of Fluoride in Solubility Equilibrium. *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121* (1), 656–665. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b09301>.
- (16) Plohl, O.; Kraft, M.; Kovač, J.; Belec, B.; Ponikvar-Svet, M.; Würth, C.; Lisjak, D.; Resch-Genger, U. Optically Detected Degradation of $\text{NaYF}_4\text{:Yb,Tm}$ -Based Upconversion Nanoparticles in Phosphate Buffered Saline Solution. *Langmuir* **2017**, *33* (2), 553–560. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03907>.
- (17) Hirano, S.; Suzuki, K. T. Exposure, Metabolism, and Toxicity of Rare Earths and Related Compounds. *Environ. Health Perspect.* **1996**, *104* (SUPPL. 1), 85–95. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s185>.
- (18) Liu, H.; Yuan, L.; Yang, X.; Wang, K. La^{3+} , Gd^{3+} and Yb^{3+} Induced Changes in Mitochondrial Structure, Membrane Permeability, Cytochrome c Release and Intracellular ROS Level. *Chem. Biol. Interact.* **2003**, *146* (1), 27–37. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(03\)00072-3](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(03)00072-3).
- (19) Verma, A.; Ali, D.; Pathak, A. K. Fluoride Induces DNA Damage and Cytotoxicity in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Toxicol. Environ. Chem.*, **2016**, *99* (1), 148–159. <https://doi.org/10.1080/02772248.2016.1155380>.
- (20) Wysokińska, E.; Cichos, J.; Kowalczyk, A.; Karbowski, M.; Strzadala, L.; Bednarkiewicz, A.; Kałas, W. Toxicity Mechanism of Low Doses of $\text{NaGdF}_4\text{:Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ Upconverting Nanoparticles in Activated Macrophage Cell Lines. *Biomolecules* **2019**, *9* (1), 14. <https://doi.org/10.3390/biom9010014>.
- (21) Estebanez, N.; Ferrera-González, J.; Francés-Soriano, L.; Arenal, R.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Breaking the Nd^{3+} -Sensitized Upconversion Nanoparticles Myth about the Need of Onion-Layered Structures. *Nanoscale* **2018**, *10* (26), 12297–12301. <https://doi.org/10.1039/c8nr00871j>.
- (22) Francés-Soriano, L.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Cucurbit[n]Urils-Capped Upconversion Nanoparticles as Highly Emissive Scaffolds for Energy Acceptors. *Nanoscale* **2015**, *7* (12), 5140–5146. <https://doi.org/10.1039/c5nr00295h>.
- (23) Estebanez, N.; Ferrera-González, J.; Cortez-Cevallos, I. A.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Lengthening the Lifetime of Common Emissive Probes to Microseconds by a Jigsaw-Like Construction of NIR-Responsive Nanohybrids. *Adv. Opt. Mater.* **2020**, *8* (8), 1902030. <https://doi.org/10.1002/adom.201902030>.
- (24) Yulong Sun; Wenjing Zhang; Baoming Wang; Xiaoxue Xu; Joshua Chou; Olga Shimoni; T. Ung, A.; Dayong Jin. A Supramolecular Self-Assembly Strategy for Upconversion Nanoparticle Bioconjugation. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (31), 3851–3854. <https://doi.org/10.1039/c8cc00708j>.
- (25) Jeon, Y. J.; Kim, S. Y.; Ko, Y. H.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, K. Novel Molecular Drug Carrier: Encapsulation of Oxaliplatin in Cucurbit[7]Urils and Its Effects on Stability and Reactivity of the Drug. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (11), 2122–2125. <https://doi.org/10.1039/b504487a>.
- (26) Wheate, N. J. Improving Platinum(II)-Based Anticancer Drug Delivery Using

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

- Cucurbit[n]Urils. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102* (12), 2060–2066. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.06.005>.
- (27) Ferrera-González, J.; Francés-Soriano, L.; Galiana-Roselló, C.; González-García, J.; González-Béjar, M.; Fröhlich, E.; Pérez-Prieto, J. Initial Biological Assessment of Upconversion Nanohybrids. *Biomed.* **2021**, *9* (10), 1419. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101419>.
- (28) Estebanez, N.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Polysulfonate Cappings on Upconversion Nanoparticles Prevent Their Disintegration in Water and Provide Superior Stability in a Highly Acidic Medium. *ACS Omega* **2019**, *4* (2), 3012–3019. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03015>.
- (29) Isaacs, L. Cucurbit[n]Urils: From Mechanism to Structure and Function. *Chem. Commun.* **2009**, *0* (6), 619–629. <https://doi.org/10.1039/b814897j>.
- (30) Pennakalathil, J.; Jahja, E.; Özdemir, E. S.; Konu, Ö.; Tuncel, D. Red Emitting, Cucurbituril-Capped, PH-Responsive Conjugated Oligomer-Based Nanoparticles for Drug Delivery and Cellular Imaging. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (9), 3366–3374. <https://doi.org/10.1021/bm500839j>.
- (31) Özkan, M.; Hadi, S. E.; Tunç, İ.; Midilli, Y.; Ortaç, B.; Tuncel, D. Cucurbit[7]Urils-Capped Hybrid Conjugated Oligomer-Gold Nanoparticles for Combined Photodynamic-Photothermal Therapy and Cellular Imaging. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2020**, *2* (9), 3840–3849. <https://doi.org/10.1021/acsapm.0c00540>.
- (32) Instituto Nacional del Cáncer. Monocito <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/monocito> (accessed Dec 2, 2021).
- (33) International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity <https://www.iso.org/standard/36406.html> (accessed Dec 2, 2021).
- (34) Berridge, M. V.; Herst, P. M.; Tan, A. S. Tetrazolium Dyes as Tools in Cell Biology: New Insights into Their Cellular Reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2005**, *11*, 127–152. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7).
- (35) Osaki, T.; Kawabata, S. Structure and Function of Coagulogen, a Clottable Protein in Horseshoe Crabs. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61* (11), 1257–1265. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-3396-5>.
- (36) Novitsky, T. J. Biomedical Applications of Limulus Amebocyte Lysate. In *Biology and Conservation of Horseshoe Crabs*; Tanacredi, J. T., Botton, M. L., Smith, D. R., Eds.; Springer Science+Business Media: New York, 2009; pp 315–330. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-89959-6>.
- (37) Kung, A. L.; Zetterberg, A.; Sherwood, S. W.; Schimke, R. T. Cytotoxic Effects of Cell Cycle Phase Specific Agents: Result of Cell Cycle Perturbation. *Cancer Res.* **1990**, *50* (22).
- (38) Hussain, S. M.; Hess, K. L.; Gearhart, J. M.; Geiss, K. T.; Schlager, J. J. In Vitro Toxicity of Nanoparticles in BRL 3A Rat Liver Cells. *Toxicol. Vitro.* **2005**, *19* (7), 975–983. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.034>.
- (39) Karlsson, H. L.; Cronholm, P.; Gustafsson, J.; Möller, L. Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21* (9), 1726–1732. <https://doi.org/10.1021/tx800064j>.

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

- (40) Pem, B.; González-Mancebo, D.; Moros, M.; Ocaña, M.; Becerro, A. I.; Pavičić, I.; Selmani, A.; Babić, M.; Horák, D.; Vinković Vrček, I. Biocompatibility Assessment of Up-and down-Converting Nanoparticles: Implications of Interferences with in Vitro Assays. *Methods Appl. Fluoresc.* **2019**, *7* (1). <https://doi.org/10.1088/2050-6120/aae9c8>.
- (41) Seidler, E. *The Tetrazolium-Formazan System: Design and Histochemistry*; 1991; Vol. 24. [https://doi.org/10.1016/s0079-6336\(11\)80060-4](https://doi.org/10.1016/s0079-6336(11)80060-4).
- (42) Günther, J.; Seyfert, H. M. The First Line of Defence: Insights into Mechanisms and Relevance of Phagocytosis in Epithelial Cells. *Semin. Immunopathol.* **2018**, *40* (6), 555–565. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0701-1>.
- (43) Das, G. K.; Stark, D. T.; Kennedy, I. M. Potential Toxicity of Up-Converting Nanoparticles Encapsulated with a Bilayer Formed by Ligand Attraction. *Langmuir* **2014**, *30* (27), 8167–8176. <https://doi.org/10.1021/la501595f>.
- (44) Fröhlich, E.; Meindl, C.; Pieber, T. R. Important Issues in the Cytotoxicity Screening of Nano-Sized Materials. *EURO-NanoTox-Letters* **2015**, *2* (1), 1–5. <https://doi.org/10.1515/entl-2015-0002>.
- (45) Bexiga, M. G.; Varela, J. A.; Wang, F.; Fenaroli, F.; Salvati, A.; Lynch, I.; Simpson, J. C.; Dawson, K. A. Cationic Nanoparticles Induce Caspase 3-, 7-and 9-Mediated Cytotoxicity in a Human Astrocytoma Cell Line. *Nanotoxicology* **2011**, *5* (4), 557–567. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.539713>.
- (46) O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (Resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267* (17), 5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>.
- (47) Gonzalez, R. J.; Tarloff, J. B. Evaluation of Hepatic Subcellular Fractions for Alamar Blue and MTT Reductase Activity. *Toxicol. Vitro.* **2001**, *15* (3), 257–259. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(01\)00014-5](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(01)00014-5).
- (48) De Fries, R.; Mitsuhashi, M. Quantification of Mitogen Induced Human Lymphocyte Proliferation: Comparison of Alamarbluetm Assay to 3h-thymidine Incorporation Assay. *J. Clin. Lab. Anal.* **1995**, *9* (2), 89–95. <https://doi.org/10.1002/jcla.1860090203>.
- (49) Korzeniewski, C.; Callewaert, D. M. An Enzyme-Release Assay for Natural Cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* **1983**, *64* (3), 313–320. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90438-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90438-6).
- (50) Poole, C. A.; Brookes, N. H.; Clover, G. M. Keratocyte Networks Visualised in the Living Cornea Using Vital Dyes. *J. Cell Sci.* **1993**, *106* (2), 685–691. <https://doi.org/10.1242/jcs.106.2.685>.
- (51) Palma, P. F. R.; Baggio, G. L.; Spada, C.; da Silva, R.; Ferreira, S. I. A. C. P.; Treitinger, A. Evaluation of Annexin V and Calcein-AM as Markers of Mononuclear Cell Apoptosis during Human Immunodeficiency Virus Infection. *Brazilian J. Infect. Dis.* **2008**, *12* (2), 108–114. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702008000200003>.
- (52) Edgell, C. J. S.; McDonald, C. C.; Graham, J. B. Permanent Cell Line Expressing Human Factor VIII-Related Antigen Established by Hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1983**, *80* (12), 3734–3737. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.12.3734>.
- (53) Fröhlich, E.; Meindl, C.; Wagner, K.; Leitinger, G.; Roblegg, E. Use of Whole Genome Expression Analysis in the Toxicity Screening of Nanoparticles. *Toxicol.*

Capítulo 5. Estudio preliminar de citotoxicidad de UCNP recubiertas con cucurbiturilo

- Appl. Pharmacol.* **2014**, *280* (2), 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.07.017>.
- (54) Ferrera-González, J.; Francés-Soriano, L.; Estébanez, N.; Navarro-Raga, E.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. NIR Laser Scanning Microscopy for Photophysical Characterization of Upconversion Nanoparticles and Nanohybrids. *Nanoscale* **2021**, *13* (22), 10067–10080. <https://doi.org/10.1039/d1nr00389e>.
- (55) Li, Z.; Zhang, Y. An Efficient and User-Friendly Method for the Synthesis of Hexagonal-Phase NaYF₄:Yb, Er/Tm Nanocrystals with Controllable Shape and Upconversion Fluorescence. *Nanotechnology* **2008**, *19* (34), 16–21. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/34/345606>.
- (56) Bogdan, N.; Vetrone, F.; Ozin, G. A.; Capobianco, J. A. Synthesis of Ligand-Free Colloidally Stable Water Dispersible Brightly Luminescent Lanthanide-Doped Upconverting Nanoparticles. *Nano Lett.* **2011**, *11* (2), 835–840. <https://doi.org/10.1021/nl1041929>.

Estudio de la fotofísica del nanohíbrido UC_{Er}@RB

Capítulo 6

6. Estudio de la fotofísica del nanohíbrido UC_{Er}@RB

6.1. Introducción y antecedentes

La terapia fotodinámica (PDT) es una terapia prometedora en el tratamiento del cáncer que se basa en utilizar luz y una especie generadora de especies reactivas de oxígeno (ROS), llamada fotosensibilizador (PS).¹ De hecho, en la actualidad existen diversos tratamientos clínicos basados en PDT aprobados para tumores endoscópicamente accesibles (en pulmones, en vejiga, gastrointestinales y neoplasias ginecológicas) y cánceres de piel (no melanoma).²

La PDT se descubre fortuitamente en 1900.³ Es un mecanismo mínimamente invasivo que requiere de tres factores/componentes: el PS, la luz y O₂, para inducir la muerte celular dirigida. El tratamiento consiste en aplicar un PS, que selectivamente se acumula en el tejido tumoral, seguido de una exposición a luz de longitud de onda apropiada, que excita al PS y genera ROS.² Las principales ventajas de la PDT frente a otros tratamientos de cáncer convencionales son: (i) su baja toxicidad sistémica, (ii) su habilidad para destruir selectivamente el tumor y (iii) que permite la combinación de otras modalidades terapéuticas.²

La absorción de un fotón por el PS lo excita a su estado excitado singlete (^1PS) de tiempo de vida corto. El PS presenta una eficiencia elevada de cruce intersistema, por lo que gran parte de ^1PS se relajará de manera no radiativa al estado excitado triplete (^3PS), de tiempo de vida largo, que permite reacciones fotoquímicas con el O_2 presente en el ambiente (figura 6.1). Por tanto, la luz actúa como un desencadenante que permite el control espacial y temporal de la PDT.¹

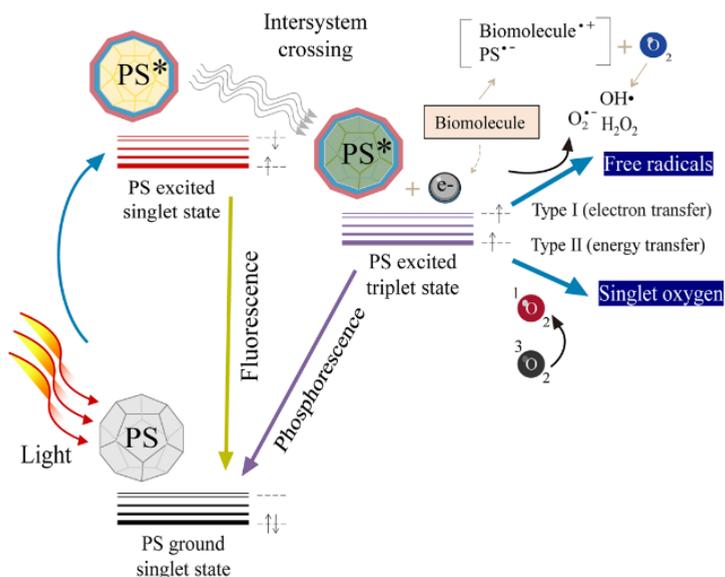


Figura 6.1. Esquema con el diagrama de Jablonski de un PS orgánico, los tipos de reacciones generadoras de ROS y algunos mecanismos de citotoxicidad. Reproducido de⁷.

En función del tipo de reacciones que dé lugar, se distinguen dos tipos de PDT:^{2,3}

- Tipo I. El PS transfiere un protón o un electrón a biomoléculas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos,...) y generan radicales que interactúan con O_2 para formar ROS, como el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), H_2O_2 o radical hidroxilo (OH^\bullet).
- Tipo II. El ^3PS colisiona con una molécula de O_2 , a la que transfiere su energía generando el estado excitado oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$).⁴

Por tanto, el mecanismo de tipo (i) se caracteriza por una dependencia con la especie que recibe el protón/electrón, mientras que el tipo (ii) depende de la concentración de O_2 .³ Ambos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente y el balance entre ellos depende del PS, la localización subcelular y la presencia de O_2 . En cualquier caso, todas las ROS formadas son muy oxidantes y tienden a reaccionar con las biomoléculas próximas. De hecho, su distancia de difusión es <100 nm, lo que implica una acción local muy restringida.^{5,6}

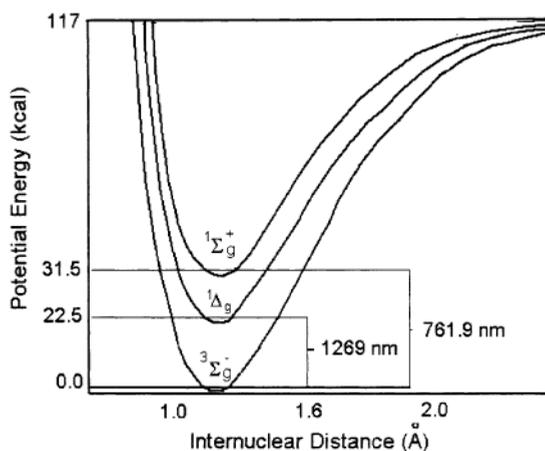


Figura 6.2. Curva de energía potencial para los tres estados electrónicos menos energéticos del O_2 . Reproducido de ¹⁰, Copyright (2002), con permiso de Elsevier.

A diferencia de muchas moléculas, el estado fundamental del O_2 es un triplete ($^3\Sigma_g^-$), ya que cuenta dos electrones desapareados en orbitales moleculares π antienlazantes degenerados, constituyendo un dirradical en estado fundamental. Los dos estados excitados de menor energía son singletes ($^1\Delta_g$ y $^1\Sigma_g^+$, figura 6.2); en consecuencia, de acuerdo con las reglas de selección, las transiciones del estado fundamental a estos no están permitidas.⁶ Sin embargo, en presencia de un sensibilizador en estado triplete excitado (3PS) y mediante mecanismos fotoquímicos complejos pueden generarse los estados excitados singlete del oxígeno ($^1\Delta_g$ y $^1\Sigma_g^+$).^{4,8,9} Si bien, en disolución el estado $^1\Sigma_g^+$ se desactiva rápidamente en un proceso

permitido por el espín a $^1\Delta_g$, más comúnmente conocido como oxígeno singlete o 1O_2 , que es muy reactivo.^{6,8}

Con el fin de determinar qué mecanismo de PDT tiene lugar predominantemente, se pueden realizar diferentes ensayos:^{6,11}

- Detección directa del 1O_2 . El 1O_2 emite una señal muy débil y estrecha (110 cm^{-1} FWHM) de fosforescencia a *ca.* 1275 nm, cuya desactivación depende drásticamente del disolvente y/o desactivadores (*quenchers*).
- Sondas químicas. Especies fototactivas que reaccionan específicamente con 1O_2 o una determinada ROS, y que dan lugar a productos con fotoactividad diferenciada (absorción, emisión, quimioluminiscencia, tiempo de vida, ...)
- Sondas físicas. Especies que modifican las propiedades fotofísicas de 1O_2 o determinadas ROS, sin dar lugar a reacción química.

El interés por la PDT reside en que puede ser utilizada para tratar o eliminar células cancerosas, ya que las ROS generadas pueden causar daño oxidativo en el ADN, romper cadenas y producir entrecruzamientos. Sin embargo, los mecanismos más comunes de muerte celular son apoptosis (proceso programado por la transcripción de genes específicos) y necrosis (muerte accidental y rápida).¹

Se distinguen tres tipos de escenarios de acción antitumoral: (i) daño celular directo, (ii) daño celular indirecto, mediante el daño a la vasculatura tumoral,¹ y (iii) activación del sistema inmune.^{2,5} La contribución relativa de cada uno de ellos depende de la naturaleza del PS, de su localización en el tumor durante la irradiación, de la exposición de luz y del tipo de tumor y su vasculatura. La acción directa conduce a la muerte celular programada (necrosis, apoptosis y autofagia) y parece estar relacionada con la localización del PS. La vasculatura tumoral es una ruta común de diseminación de células cancerosas a distintos órganos, así como de suministro de nutrientes y de O_2 . Algunos PS inducen la constricción vascular y la formación de trombos, limitando el aporte de nutrientes y O_2 a las células tumorales, inhibiendo o retrasando así su crecimiento.²

En lo que respecta a los PS, las características ideales que deben presentar son: elevada absorción en longitudes de onda largas (600-800 nm), para facilitar la penetración de luz a través del tejido; bajo rendimiento cuántico de fluorescencia y alta eficiencia de cruce intersistema, para propiciar la generación de ^3PS ; apropiada energía de triplete ($> E(^1\text{O}_2)$), tiempo de vida de triplete largo y elevada sensibilización de oxígeno singlete,¹² para generar de manera eficiente $^1\text{O}_2$; especificidad hacia el tejido tumoral, toxicidad mínima en ausencia de luz y citotoxicidad al ser fotoactivado, para que la PDT sea selectiva y se genere $^1\text{O}_2$ bajo demanda.^{1,2,12,13}

Desde los inicios de la PDT, se han desarrollado una infinidad de PS de distinta naturaleza. Así, se han propuesto compuestos orgánicos (rosa de bengala, xantona, porfirinas, ftalocianinas,...), complejos de metales de transición o semiconductores inorgánicos (TiO_2 , ZnO). Sin embargo, los aprobados clínicamente se limitan a porfirinas y clorinas,² ya que, en general presentan inconvenientes importantes como fotoblanqueo, baja absorción a longitudes de onda largas (rojo 600-800 nm), absorción en longitudes de onda que limitan la penetración de luz en los tejidos, hidrofobicidad, especificidad reducida al tejido tumoral, efectos secundarios duraderos y dependencia drástica con la concentración de O_2 .^{1,2,12,13}

Con el fin de superar las limitaciones de los PS, se han propuesto diferentes nanomateriales híbridos, compuestos por PS y nanopartículas (NP) de sílice,¹⁴ NP magnéticas,¹⁵ QD¹⁶, NP metálicas¹⁷⁻¹⁹ y UCNP.²⁰ El interés por estudiar nanohíbridos de upconversion (UCNH) funcionalizados con PS radica en que permitirían ampliar las prestaciones de los PS para su aplicación en PDT. La mayoría de los PS son hidrófobos y se excitan en el UV-vis. En cambio, la excitación de las UCNP, generalmente en 800 o 980 nm, tiene lugar en la ventana biológica NIR-I (700-1300) donde la atenuación de la luz por las biomoléculas es mínima y, por tanto, permite una mayor penetración en tejidos vivos en comparación con el UV-vis.²¹ En la figura 6.3 se muestran, esquematizados en forma de barras, las emisiones de las UCNP más convencionales y las absorciones de algunos PS.

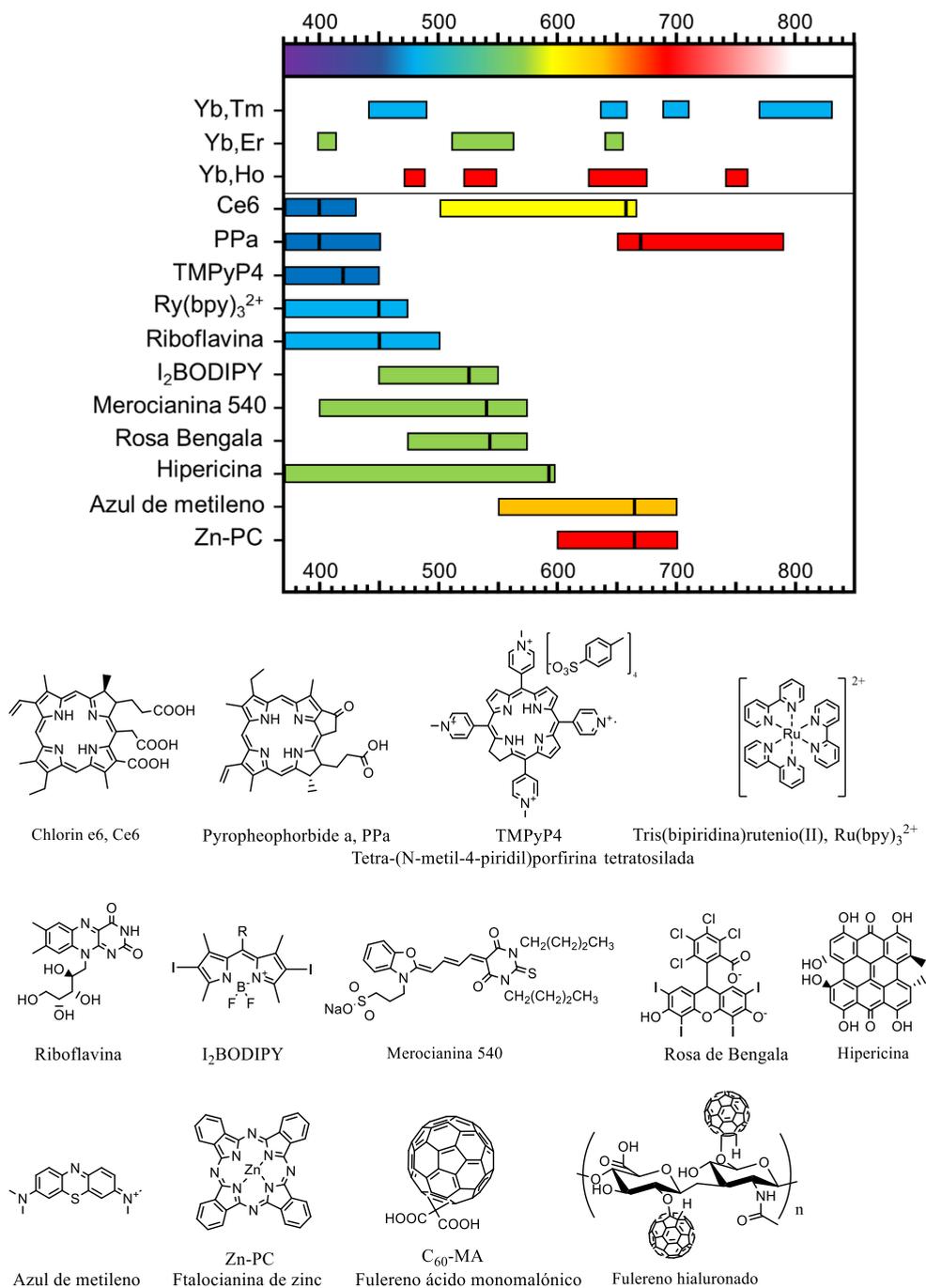


Figura 6.3. Intervalos de emisión en el espectro electromagnético de NaYF₄: Yb³⁺, X³⁺ (X= Er, Tm o Ho), junto con los de absorción (rectángulos coloreados lisos) de

algunos PS utilizados para UCNH, cuyas estructuras se muestran en la parte inferior. Las líneas negras verticales dentro de los cuadros coloreados indican máximos de absorción. Reproducido con permiso de Springer Nature: Springer ebook Dyes and Photoactive Molecules in Microporous Systems. Structure and Bonding por ¹², Copyright 2020.

Como muestra la tabla 6.1, se han construido múltiples UCNH combinando UCNP con PS gracias a las múltiples bandas de emisión UC en el espectro del UV-vis de las UCNP. Se han descrito UCNH con PS de naturaleza orgánica y organometálica, como la pirofEOFórbida a (*pyropheophorbide a*, PPa),⁵⁰ porfirina catiónica TMPyP4,⁵¹ diyodo-BODIPY (I₂BODIPY),³⁴ rosa de bengala (RB),³⁰ azul de metileno,⁵² ftalocianina de zinc (ZnPc),^{27,53-56} derivados de fulereno,⁵⁷ Ru(bpy)₃²⁺,⁵⁸ hipericina,⁵⁹ clorina e6 (Ce6)⁶⁰ y merocianina 540 (MC540),⁶¹ pero también con PS de naturaleza inorgánica, como fulerenos,⁵⁷ NP de TiO₂⁶² o *carbon dots*.⁶³ Incluso se han descrito sistemas duales que utilizan dos PS que aprovechan dos bandas UC diferentes de la UCNP.⁵ Por ejemplo, Idris *et al.*²⁹ construyeron un UCNH de UCNP, NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺, y dos PS (MC540 y ZnPc) encapsulados sobre un recubrimiento de sílice mesoporosa, en el que los PS absorbían dos bandas de emisión UC diferentes del Er³⁺ y mejoraba la generación de ROS, respecto al material monofuncionalizado (figura 6.4). Se determinó un mecanismo de PDT de tipo II (generación de ¹O₂) excitando a 980 nm (2,5 W/cm²) mediante una sonda de fluorescencia de ¹O₂, el ABDA (9,10-antracendiil-bis(metileno)dimalonato), en dispersión acuosa y atmósfera de aire.

No obstante, aunque existe una amplia bibliografía que demuestra las posibles aplicaciones de conjugar UCNP con PS (tabla 6.1),^{5,65,66} aún existe una importante falta de conocimiento fotofísico básico de los procesos de transferencia de energía que tienen lugar en este tipo de UCNH, debido a la necesidad de utilizar instrumentación específica para este fin. Una prueba de ello es que únicamente una publicación reporta la emisión de fosforescencia de ¹O₂ sensibilizado por un PS sensibilizado, a su vez, por una UCNP,³⁰ mientras que el resto de bibliografía se basa en sondas químicas, ya que es difícil encontrar sistemas de fotoluminiscencia que

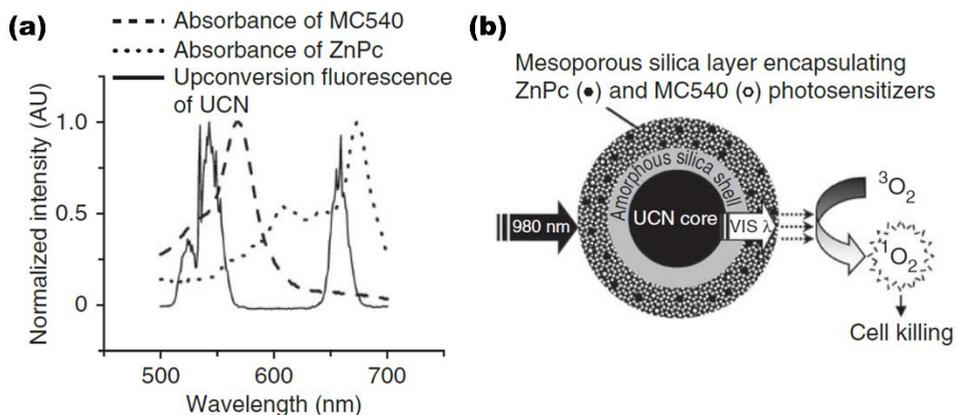


Figura 6.4. (a) Espectro de emisión de UC de $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ superpuesto con la absorción de los dos PS (MC540 y ZnPc) que funcionalizan al UCNH. (b) Representación esquemática del UCNH. Reproducido con permiso de Springer Nature GmbH: *Nature Medicine* ²⁹, Copyright 2012.

cuenten con láseres NIR de alta potencia y, a la vez, detectores NIR lo suficientemente sensibles como para detectar la emisión del $^1\text{O}_2$ a 1275 nm. Asimismo, en los trabajos reportados suele ignorarse otros fenómenos de emisión, como las cinéticas de emisión y el *downshifting* de los lantánidos. Existe, por tanto, una limitación instrumental que únicamente puede ser resuelta mediante la construcción de equipos a medida y la utilización de diferentes técnicas instrumentales. Además, la cercanía del PS o especie fotoactiva a los iones lantánidos y la restricción del movimiento de moléculas orgánicas ancladas a la superficie plantea serias dudas de si su comportamiento es igual a cuando está libre en disolución. Todo ello lleva a preguntarse, ¿presenta la misma fotofísica un colorante/PS libre que cuando funcionaliza una NP? ¿Se agregan los colorantes/PS en la superficie de la NP? ¿La agregación produce desactivación? ¿La UCNP sensibiliza al singlete, al triplete o a los dos? ¿La sensibilización del colorante a la UCNP ocurre a través del singlete o del triplete? ¿Existen artefactos que afecten a las medidas? ¿La dispersión (*scattering*) afecta a las medidas?

La funcionalización de las UCNP con PS se realiza de tres maneras: (i) adsorción física, (ii) encapsulación o (iii) conjugación covalente.²¹ La adsorción física limita la funcionalización con PS (*loading*) y podría liberar/desanclar el PS antes de llegar al tumor, pero mantiene al PS cerca de los activadores, lo que asegura una transferencia de energía resonante (RET) eficiente. La conjugación covalente evita eficazmente la descoordinación (*leakage*) del PS.²¹ La encapsulación permite aumentar la funcionalización del PS, sin embargo, no necesariamente aumenta la eficiencia de la PDT ya que también aleja al PS de los activadores de la UCNP y dificulta la RET.²¹

Además, la UCNP con PS permite terapia combinada con otras funcionalidades. La emisión de la UCNP por sí misma permite la obtención de imágenes de microscopía (bioimagen) a la vez que actúa como agente de PDT. Asimismo, la cofuncionalización con otras especies abre nuevas puertas como reconocimiento de receptores o antígenos sobreexpresados en los tumores, quimioterapia, radioterapia, terapia fototérmica o terapia génica.^{1,5} Por ejemplo, Zhang *et al.*²¹ construyeron un UCNH combinando una UCNP tipo *core-shell*, NaYF₄:Yb,Er@NaYF₄, con fulereno C₆₀ como PS, recubiertas a su vez con polietilenglicol (PEG) funcionalizado con ácido fólico, lo que ha permitido simultáneamente la imagen y PDT *in vitro* e *in vivo*, mediante la producción de ¹O₂, además de selectividad tumoral.

El grupo de investigación tiene dos publicaciones importantes a este respecto (entradas 13 y 21 de la tabla 6.1). Por un lado, se ha demostrado que en un UCNH, compuesto de NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ funcionalizado con I₂BODIPY y PEG, la excitación a 980 nm de la UCNP sensibiliza al PS mediante transferencia de energía e induce la muerte celular *in vitro*.^{34,64} Asimismo, también se diseñó un UCNH constituido por una UCNP tridopada, NaYF₄: Yb³⁺(19%),Er³⁺(2%),Tm³⁺(1%), funcionalizada por una porfirina (PP) y 1,8-naftalimida (NI), que permite el seguimiento de la UCNH mediante excitación en el visible y PDT mediante excitación NIR.⁴²

Tabla 6.1. Características relevantes de los UCNH desarrollados para PDT basados en UCNP, junto con información de la metodología empleada para confirmar la generación ROS y, por tanto, el tipo de mecanismo PDT.

| n. | Año | PS* | UCNP* | Tamaño UCNH (nm) | Tamaño UCNP (nm) | Tamaño UCNH (nm) | Func. PS** | Mec. PDT | Detección ROS* | Ref. |
|----|------|-------|--|------------------|------------------|------------------|------------|----------|---|------|
| 1 | 2007 | MC540 | NaYF ₄ :Yb ³⁺ ,Er ³⁺ @SiO ₂ | 50-100 | | | E | II | Dispersión: sonda de fluorescencia (ADPA), tampón PBS, irradiación: láser diodo 974 nm, 60 mW | 22 |
| 2 | 2008 | Zn-PC | NaYF ₄ :Yb ³⁺ ,Er ³⁺ @SiO ₂ @anti-MUC1/episialin | 50 | | | AF | II | In vitro: Células de cáncer de mama MCF-7/AZ, ensayo de viabilidad de Trypan Blue, irradiación: láser 974 nm, 36-43 min Dispersión: sonda de absorción (ADPA), acetónitrilo, irradiación: láser 980 nm laser, 71 kW/cm ² | 23 |
| 3 | 2009 | Zn-PC | NaYF ₄ :Yb ³⁺ ,Er ³⁺ @PEI/FA | 35 x 60 | 45 x 70 | | AF | II | In vitro: células HT29, ensayo MTT, irradiación: láser 980 nm, 5 min Dispersión: sonda de fluorescencia (ABDA), PBS, irradiación: láser 980 nm, 10 min | 24 |
| 4 | 2011 | Ce6 | NaYF ₄ :Yb ³⁺ (20%),Er ³⁺ (2%)@PEG | 30 | | | AF | II | In vitro: células MB49-PSA, ensayo MTT, irradiación: láser 980 nm, 5 min Dispersión: ensayo sonda de absorción (RNO) e imidazol, PBS, irradiación: láser 980 nm, 0,5 W/cm ² | 25 |
| 5 | 2011 | TPP | β-NaYF ₄ :Yb ³⁺ ,Er ³⁺ @PEG- <i>b</i> -PLA | 100 | | | AF | II | In vitro: células 4T1, irradiación: láser 980 nm, 10 min - intervalos de 1 minuto, 0,5 W/cm ² In vivo: ratones BALB/c con células 4T1, inyección intratumoral, irradiación: láser 980 nm, 30 min, 0,5 W/cm ² | 26 |
| 6 | 2012 | Zn-PC | NaYF ₄ :Yb ³⁺ (20%),Er ³⁺ (2%)@SOC | 35 | 45 | | AF | II | In vitro: células HeLa, irradiación: 980 nm, 134 W/cm ² , 45 min, 22°C Dispersión: sonda de absorción (DPBF), etanol, irradiación: láser 980 nm, 60 min In vitro: células MCF-7, ensayo MTT, irradiación: 980 nm, 10 min In vivo: ratón hembra Kummung con S180, inyección intratumoral, irradiación: láser 980 nm, 0,4 W/cm ² , 15 min - 1 min. irradiación/2 min | 27 |

| | | | | | | | | | |
|----|------|-----------------------|---|---------|----------|----|----|----|---|
| 7 | 2012 | MB | β -NaYF ₄ :Yb ³⁺ (18%),Er ³⁺ (2%),Gd ³⁺ (15%)@SiO ₂ | 18 | 32 | E | II | 28 | <u>Dispersión</u> : sonda de absorción (DPBF), acetónitrilo, irradiación: láser 980 nm, 71 kW/cm ² . Generación on/off: acetónitrilo, láser 980 nm, 24 kW/cm ² . |
| 8 | 2012 | MC540/ Zn-PC | NaYF ₄ :Yb ³⁺ (18%),Er ³⁺ (2%)@mSiO ₂ | 60 x 30 | 110 x 80 | E | II | 29 | <u>Dispersión</u> : sonda de fluorescencia (ABDA), H ₂ O, irradiación: láser 975 nm, 2,5 W/cm ² , 80 min In vitro: células B16-F0, sonda de fluorescencia (carboxi-H ₂ DCFDA), irradiación: láser 980 nm, 40 min In vivo: ratones C57BL/6 con células B16-F0, UCNH coinyectado con células cancerosas, irradiación: láser 980 nm, 415 mW/cm ² , 2 h |
| 9 | 2012 | RB | β -NaYF ₄ :Yb ³⁺ ,Er ³⁺ @AEP-HA-RB | 20 | | C | | 30 | <u>Dispersión</u> : <ul style="list-style-type: none"> • sonda de absorción (DPBF), irradiación: láser 980 nm, 2,5 W/cm², 16 min • emisión 1275 nm, D₂O, atmósfera O₂, irradiación: láser 980 nm, 10 min In vitro: células JAR, ensayo MITT, irradiación: láser 980 nm, 1,5 W/cm ² , 10 min |
| 10 | 2012 | HP SPDC | β -NaYF ₄ :Yb ³⁺ ,Er ³⁺ @AEP-HA-RB/FA α -NaGdF ₄ :Yb ³⁺ (20%),Er ³⁺ (2%)@CaF ₂ @mSiO ₂ | 10 | 40 | C | II | 31 | <u>Dispersión</u> : sonda de fluorescencia (ABMD), agua, irradiación: láser 980 nm, 20-50 min In vitro: células HeLa, ensayo calceína acetoximetiléster/yoduro de propidio, irradiación: láser 980 nm, 0-2,5 W/cm ² , 5 min |
| 11 | 2012 | Ce6 Zn-PC MB | NaYF ₄ :Yb ³⁺ (18%),Er ³⁺ (2%),Mn ²⁺ (30%)@oleato@ α -CD | 20-30 | | AF | II | 32 | <u>Dispersión</u> : sonda de absorción (DPBF), acetónitrilo, irradiación: láser de 980 nm, 1 W/cm ² In vitro: células A-549, irradiación: láser de 980 nm, 1 W/cm ² , 5 min |
| 12 | 2013 | Ce6 | NaYF ₄ :Yb ³⁺ (18%),Er ³⁺ (2%),Mn ²⁺ (30%)@PAA@2xPAH/PAH-Ce6-SA NaYF ₄ :Yb ³⁺ (18%),Er ³⁺ (2%),Mn ²⁺ (30%)@PAA@2xPAH/PAH-Ce6-SA @PAH-DMMA-PEG | 20 | 80 | C | II | 33 | <u>Dispersión</u> : sonda de absorción (RNO), irradiación: láser 980 nm In vitro: células HeLa, ensayo calceína AM/yoduro de propidio In vivo: ratones BALB/c con células 4T1, inyección intratumoral, irradiación: láser 980 nm, 30 min, 0,5 W/cm ² - 1 min irradiac. /2 min. |
| 13 | 2014 | I ₂ BODIPY | β -NaYF ₄ :Yb ³⁺ (16%),Er ³⁺ (3%)@IBDP/PEG | 26 x 18 | | AF | II | 34 | <u>Dispersión</u> : sonda de fluorescencia (ABDA), tampón fosfato en D ₂ O, irradiación: 975 nm, |

| | | | | | | | | |
|----|------|-----------|---|---------|----|----|---|----|
| 14 | 2014 | Zn-PC | β -NaYF ₄ :Yb ³⁺ (25%),Er ³⁺ (2%)@PAAm@ZnPc | 30 | C | II | 138,5 mW, 3 h In vitro: células SH-SY5Y, irradiación: láser 975 nm, 239 mW, 45 min Dispersión: sonda de absorción (DPBF), etanol, irradiación: láser 980 nm, 4 min In vitro: células HeLa, ensayo MTT, irradiación: láser 980 nm, 0,39 W/cm ² , 10 min In vivo: ratón C57/6J con células Hepal-6, inyección intratumoral, irradiación: láser 980 nm, 0,39 W/cm ² , 15 min | 35 |
| 15 | 2015 | SPCD/PpIX | NaYF ₄ :Yb ³⁺ (18%),Gd ³⁺ (15%),Er ³⁺ (2%),Tm ³⁺ (1%)@SiO ₂ | 20 | C | II | Dispersión: sonda de absorción, (DPBF), irradiación: láser 980 nm, 2,5 W/cm ² , 40 min In vitro: células HT-1080, ensayo con DCFH-DA, irradiación: láser 980 nm, 1,5W/cm ² , 5 min, 0,5 min irradiac./min | 36 |
| 16 | 2016 | Ce6 | β -NaYF ₄ :Yb ³⁺ (18%),Er ³⁺ (2%)@NaYF ₄ @mSiO ₂ | 25 | E | II | Dispersión: sonda de absorción (DPBF), láser 980 nm, 0,5 W/cm ² , 4 min In vitro: células HeLa, ensayo MTT, irradiación: láser 980 nm, 1,5 W/cm ² , 15 min | 37 |
| 17 | 2016 | ZnO | NaYF ₄ :Yb ³⁺ (20%),Tm ³⁺ (0,5%)@SiO ₂ @ZnO | 30 | CS | | Dispersión: degradación de RhB, irradiación: 980 nm, 50 mW/cm ² , 7h In vitro: bacterias <i>B. subtilis</i> , irradiación: NIR (Xe Lamp), 45 min | 38 |
| 18 | 2016 | Zn-PC | β -NaGdF ₄ :Yb ³⁺ (18%),Er ³⁺ (2%),Mn ²⁺ (40%)@NaGdF ₄ :Yb@gel | 55 | NC | II | Dispersión: sonda de absorción (DPBF), etanol, irradiación: láser 980 nm, 1,44 W/cm ² , 20 min In vitro: células HeLa, ensayo vivas/muertas, irradiación: láser 980 nm, 0,5 W/cm ² , 3 min | 39 |
| 19 | 2017 | Ce6 | β -NaYF ₄ :Yb ³⁺ (20%),Er ³⁺ (2%)@PEG/R837/Ce6 | 80 | AF | II | Dispersión: sonda de fluorescencia (SOSG), irradiación: láser 980 nm, 0,5 W/cm ² , 60 min In vitro: células CT26, ensayo MTT, irradiación: láser 980 nm, 0,5 W/cm ² , 10 min In vivo: ratones BALB/c con células CT26, inyección intratumoral, láser 980 nm, 30 min, 0,5 W/cm ² - intervalos 1 min irradiac./2 min | 40 |
| 20 | 2018 | CPZ | LiYF ₄ :Yb ³⁺ (20%),Er ³⁺ (2%)@PVP | 57 x 40 | AF | II | Dispersión: sonda de absorción (DPBF), irradiación: láser 980 nm, 1,5 W/cm ² , 5 min In vitro: • bacteria <i>MRSA</i> , irradiación: láser 980 nm, 0,5 W/cm ² , 10 min | 41 |

| | | | | | | | | |
|----|------|------------------|--|---------|----|--------|---|----|
| 21 | 2018 | PP | NaYF ₄ :Yb ³⁺ (19%), Er ³⁺ (2%), Tm ³⁺ (1%)@PP/Ni | 18 x 23 | AF | II | <ul style="list-style-type: none"> hongo <i>Candida albicans</i>, ensayo MITT, irradiación: láser 980 nm, 0,5 W/cm², 20 min <p>In vivo: ratón Kunming con MRSA, irradiación: láser 980 nm, 0,5 W/cm², 10 min</p> <p>Dispersión: sonda de fluorescencia (ABDA), acetomitrilo, irradiación: láser 975 nm, 90 min</p> <p>In vitro: células SH-SY5Y, ensayo vivas/muertas, irradiación: 975 nm, 20,75 mW/cm²</p> | 42 |
| 22 | 2020 | RB | LiYF ₄ :Yb ³⁺ (20%),Er ³⁺ (2%)@PVP | 50 x 35 | AF | I y II | <p>Dispersión: sondas de fluorescencia. (DCFH-DA para 'O₂ y DHE para O₂'), irradiación: láser 980 nm, 1 W/cm², 10 min</p> <p>In vitro: bacterias <i>Acinetobacter baumannii</i>, irradiación: láser 980 nm, 1 W/cm², 10 min</p> <p>In vivo: ratón Kunming con AB + 5 mm tejido de cerdo, irradiación: 980 nm, 1 W/cm², 10 min</p> <p>Dispersión:</p> <ul style="list-style-type: none"> Para 'O₂ y O₂': sonda de absorción (DPBF), agua, irradiación: láser 980 nm, 18,4 W/cm², 45 min Para OH': sonda de fluorescencia (ácido tereftálico), agua, irradiación: láser 980 nm, 18,4 W/cm², 30 min | 43 |
| 23 | 2021 | TiO ₂ | SrF ₂ :Yb ³⁺ (20%),Tm ³⁺ (0,2%)@CaF ₂ :Yb ³⁺ (20%)@TiO ₂ | 11,5 | CS | I y II | <p>In vitro: <i>S. aureus</i> WCH-SK2, sonda de fluorescencia (APF), irradiación: láser 970 nm, 12 mW/cm², 3h</p> <p>Dispersión: sonda de fluorescencia (DPBF), irradiación: láser 980 nm, 15 min</p> <p>In vitro: células 4T1, sonda fluorescente (DCFH-DA), irradiación: láser 980 nm, 8 min</p> <p>In vivo: hembras BALB con células 4T1, inyección intravenosa, irradiación: láser 980 nm, 0,5W/cm², 10 min</p> <p>Dispersión: sonda de fluorescencia (SOSG), agua, 980 nm</p> <p>In vitro: esteroides celulares MCF-7, ensayo vivas/muertas, irradiación: 980 nm, 1 W/cm², 6 min</p> | 44 |
| 24 | 2021 | ZnO | NaYF ₄ :Yb ³⁺ (18%),Tm ³⁺ (5%)@ZnO | 30 | CS | | | 45 |
| 25 | 2021 | RB | β-NaYF ₄ :Yb ³⁺ (20%),Er ³⁺ (2%)@APTE@RB/PEG-TK-DOX | 42-44 | C | II | <p>In vitro: células 4T1, sonda fluorescente (DCFH-DA), irradiación: láser 980 nm, 8 min</p> <p>In vivo: hembras BALB con células 4T1, inyección intravenosa, irradiación: láser 980 nm, 0,5W/cm², 10 min</p> <p>Dispersión: sonda de fluorescencia (SOSG), agua, 980 nm</p> <p>In vitro: esteroides celulares MCF-7, ensayo vivas/muertas, irradiación: 980 nm, 1 W/cm², 6 min</p> | 46 |
| 26 | 2021 | RB | β-NaYF ₄ :Yb ³⁺ (20%),Er ³⁺ (2%)@mSiO ₂ -NH ₂ | 19 | AF | II | | 47 |

| | | | | | | | | |
|----|------|-----------------|---|-------|-----|------|---|----|
| 27 | 2021 | MC540/ Zn-PC | β -NaYF ₄ :Yb ³⁺ (30%),Er ³⁺ (3%)@mSiO ₂ @Au | 40 | 100 | E | Dispersión: sonda de absorción (DPBF), etanol, irradiación: láser 980 nm, 1 W/cm ² , 5 min In vitro: células PC-3, ensayo MTT, irradiación: láser 980 nm, 1 W/cm ² , 5 min | 48 |
| 28 | 2022 | Ce6 | β -NaYF ₄ :Yb ³⁺ (20%),Er ³⁺ (2%)@PEI @anti-EpCAM/Ce6 | 25-32 | | C II | Dispersión: sonda de absorción (DPBF), etanol, irradiación: láser 980 nm, 1 W/cm ² , 35 min In vitro: células Bel-7404, test CCK-8, irradiación: láser 980 nm, 320 mW/cm ² | 49 |

*ABDA: ácido 9,10-antracendiol-bis(metileno)dimalónico; ABMD: ácido 9,10-antracendiol-bis(metileno)dimalónico; AEP: 2-aminoetil dihidrógeno fosfato; anti-MUC1/episialin: anticuerpo monoclonal de ratón; APF: 3'-p-(aminoetil) fluoresceína; APTe: dihidrógenofosfato de aminoetil; α -CD: α -ciclodextrina; carboxi-H₂DCFDA: diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína; Ce6: Clorina e6; CPZ: β -carboxifalocianina de zinc; DCFH-DA: diacetato de 2,7-diclorofluoresceína; DHE: dihidroetidio; DPBF: 1,3-difenilisobenzofurano; FA: ácido fólico; HP: hematoporfirina; IBDP: diiodobodipy; MB: azul de metileno; MC540: merocianina 540; mSiO₂: sílice mesoporosa; Ni: 1,8-naftalimida; PAAM: poli(alilamina); PEI: poli(etilamina); PEG: polietilenglicol; PEG-b-PLA: copolímero de poli(etilenglicol-block-(di)ácido láctico); PEG-TK-DOX: polietilenglicol-tiocetal-doxorrubicina; PP: N-aminobacterio-purpurinimida; PpIX: protoporfirina IX; PVP: polivinilpirrolidona; RB-HA: éster del ácido hexanoico y rosa de bengala; RhB; rodamina B; RNO: p-nitroso-dimetilamina; R837: receptor tipo Toll-7; SiO₂: sílice; SOC: quitosano; SOSG: sensor verde de oxígeno singlete; SPDC: dihidróxido de ftalocinina de silicio; TPP: meso-tetrafenilporfirina; 4T1m: membranas de células cancerosas 4T1; Zn-PC: ftalocianina de zinc.

**Funcionalización: E: encapsulación, AF: adsorción física, C: crecimiento superficial, NC: nanocomposite.

Recientemente, se han descrito importantes publicaciones al respecto de la fotofísica de las UCNP y PS/colorantes. Por ejemplo, Schuck *et al.*⁶⁷ estudiaron el mecanismo de efecto antena de ciertos UCNH compuestos por un colorante que absorbe en el NIR (IR-806) y diferentes UCNP, y demostraron que la presencia de lantánidos pesados (Gd^{3+}) en la UCNP favorece el cruce intersistema y, por tanto, la formación de triplete en los colorantes anclados a la superficie de la UCNP. Anteriormente, van Veggel *et al.*⁶⁸ ya habían descrito un hecho similar para complejos de lantánidos funcionalizados covalentemente con colorantes xanténicos (fluoresceína, eosina y eritrosina). De forma similar Liu *et al.*⁶⁹ consiguieron sensibilizar la emisión de un lantánido sin niveles de energía intermedios (Tb^{3+} y Eu^{3+}) en un UCNH tipo *core-shell-shell* mediante el acoplamiento superficial de colorantes orgánicos. En este ensayo, mediante espectroscopía ultrarrápida de absorción de especies transitorias, concluyen que la presencia de los lantánidos superficiales aumenta el rendimiento de cruce intersistema y que el mecanismo de sensibilización del Tb^{3+}/Eu^{3+} ocurre desde el triplete del colorante. Además, reportan que este mecanismo es más eficiente que sistemas de migración de energía. Por otro lado, Wisser *et al.*⁷⁰ demostraron que la presencia de colorantes con elevado rendimiento cuántico de fluorescencia (ATTO 542) mejoraban el rendimiento cuántico UC (UCQY) del UCNH frente a la UCNP de partida, debido a que la presencia del colorante disminuye el tiempo de vida de las emisiones UC y, por tanto, reduce la extensión de los fenómenos de desactivación superficial.

Por tanto, el propósito del presente capítulo consiste en construir un UCNH sencillo en forma coloidal y caracterizar todos los fenómenos y procesos fotofísicos implicados en el mismo. Como prueba de concepto, se ha seleccionado un UCNH sencillo compuesto por una UCNP de tipo *core* β - $NaYF_4:Yb(20\%),Er(2\%)$ de *ca.* 20 nm y un PS, el RB (UC_{Er}@RB), adsorbido en la superficie basándonos en un trabajo previamente publicado.⁷¹ Se escoge este sistema ya que, por un lado, la β -UCNP dopada con erbio es el sistema UC más

eficiente y, por otro lado, porque el rosa de bengala (RB) presenta elevada solubilidad en disolventes polares, su absorción solapa eficientemente la emisión UC principal del Er^{3+} (520-540 nm) y presenta elevado rendimiento cuántico de cruce intersistema ($> 90\%$)⁷² y de generación de $^1\text{O}_2$ (68-80 %).¹⁰ Asimismo, como demuestran Hirsch *et al.*⁷¹, la síntesis del UCNH es muy sencilla y el tamaño de *ca.* 20 nm de la UCNP asegura la máxima transferencia de energía resonante del Er^{3+} hacia el RB.

Existen varias publicaciones sobre UCNH constituidos por una UCNP y el RB (entradas 9, 22, 25 y 26 tabla 6.1). Por ejemplo, Zhang *et al.*⁷³ estudiaron la dependencia de la transferencia de energía con la distancia entre una UCNP, $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}(20\%),\text{Er}^{3+}(2\%)$, y el rosa de bengala. La distancia se controló mediante la adición de un recubrimiento con sílice alrededor de la UCNP. El grosor del *shell* de sílice ejercía una influencia opuesta entre la luminiscencia UC (reduciendo los efectos superficiales y la desactivación por el disolvente) y la eficiencia de la transferencia de energía. De hecho, observaron que la mejor transferencia de energía ocurría con un recubrimiento de 6 nm. Además, detectaron la formación de $^1\text{O}_2$ mediante una sonda de absorción, el DPBF (1,3-difenilisobenzofurano), en etanol (figura 6.5) y reportaron un tiempo de vida de emisión del RB sensibilizado por la UCNP de microsegundos. Otros estudios también utilizaron sondas para detectar la generación de $^1\text{O}_2$ por UCNH similares, si bien, Zhang *et al.*³⁰ aportaron la prueba más evidente a este respecto, ya que son capaces de detectar la emisión de fosforescencia del $^1\text{O}_2$ del RB sensibilizado en una dispersión de un UCNH compuesto por $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ y RB (D_2O , atmósfera saturada de O_2 , $\lambda_{\text{exc}}= 980$ nm).

Por tanto, todas las publicaciones de UCNH compuestos por RB respaldan el mecanismo II de PDT. Sin embargo, aún existe una importante falta de conocimiento fotofísico entre la interacción del PS superficial y los lantánidos de la UCNP en dispersión. Por ello, el presente capítulo se centrará en obtener la visión más completa posible de todos los procesos fotofísicos que tienen lugar en

el UCNH en N,N-dimetilformamida (DMF), un medio que permite dispersiones concentradas.

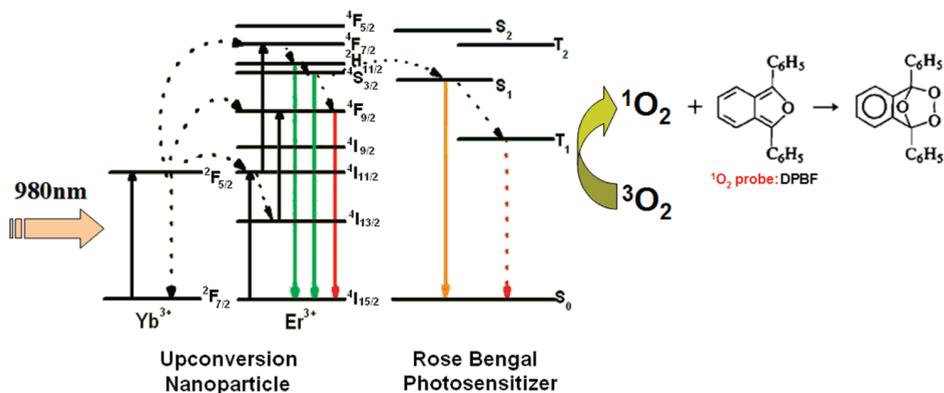


Figura 6.5. Esquema de un proceso de generación de $^1\text{O}_2$ mediante la sensibilización del RB a través de la emisión UC del Er^{3+} . Reproducido con permiso de ⁷³. Copyright 2011 American Chemical Society.

6.2. Objetivos

Los objetivos del presente capítulo son:

- Construir un UCNH prueba de concepto compuesto por β -NaYF₄:Yb³⁺(20%),Er³⁺(2%) y RB.
- Determinar el estado de agregación del RB en la superficie de la UCNP.
- Caracterizar fotofísicamente al RB funcionalizado en la superficie de la UCNP.
- Estudiar los procesos de transferencia de energía del RB a la UCNP.
- Estudiar los procesos de transferencia de energía UC de la UCNP al RB.

6.3. Resultados y discusión

Este apartado está dividido en secciones para organizar los resultados obtenidos. Empieza con la síntesis del UCNH, continúa con el estudio de agregación del RB en la superficie de la UCNP y el estudio de la fotofísica del RB en la superficie de la UCNP (excitando directamente al RB); y finalmente se estudia el efecto del RB en la emisión UC (excitando al Yb³⁺):

6.3.1. Síntesis del UC_{Er}@RB

Un lote de UCNP de tipo β -NaYF₄:Yb³⁺(28%),Er³⁺(3%) (tabla 6.4) con forma de prisma hexagonal pequeño de $21,0 \pm 0,8 \times 20,3 \pm 0,9$ nm (figura 6.6) se sintetiza mediante el procedimiento de descomposición térmica (véase la sección 6.5. *Procedimiento experimental*). Posteriormente, las UCNP se someten a un tratamiento con NOBF₄ para eliminar los ligandos oleato superficiales, dando lugar a las UC_{Er}. Por último, se exponen las UC_{Er} a un exceso de RB en DMF en agitación durante 24 horas y, a continuación, se realizan lavados con DMF hasta que el sobrenadante deja de presentar absorción. Finalmente, las UC_{Er}@RB resultantes se redispersan en DMF, donde se realizan todas las medidas.

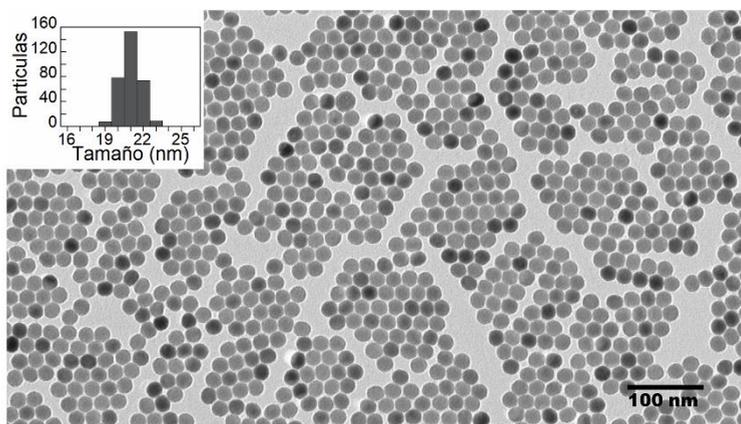


Figura 6.6. Imagen TEM de UC_{Er} e histograma de los tamaños medidos para 300 UCNP.

6.3.2. Agregación del RB en la superficie de la UCNP

Los colorantes en determinadas condiciones de elevada concentración, o elevada concentración local, pueden agregarse para dar lugar a dos tipos de agregados: H o J, que se diferencian en la geometría del apilamiento por interacción π - π entre las moléculas. Así, si los agregados se apilan en capas (*side-by-side* o *face-to-face*) se les denomina de tipo-H y si se apilan ligeramente desplazados (*head-to-tail*) se les denomina de tipo-J (figura 6.7). La disposición de las moléculas determinará a su vez la extensión de la interacción entre los momentos dipolares de las transiciones, la superposición de las funciones de onda y la transferencia de carga intermolecular.⁷⁴ Estos factores determinarán las características fotofísicas de los agregados. Para una descripción formal de los agregados moleculares se recomienda la lectura de revisiones de referencia, como la de F. C. Spano y N.J. Hestand.⁷⁴ Sin embargo, de forma simplificada, se puede afirmar que estos factores se traducen en los siguientes cambios fotofísicos de los agregados frente a las moléculas individuales de colorante:^{74,75}

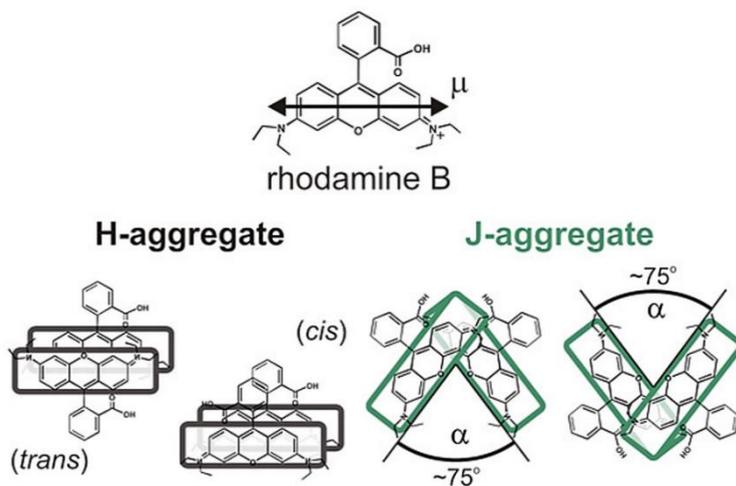


Figura 6.7. Momento de transición dipolar de la rodamina B, un colorante xanténico, y representación de los agregados tipo H y tipo J que puede formar. Reproducido con permiso⁷⁶, Copyright 2020 John Wiley and Sons.

- Agregados H: desplazamientos hipsocrómico del espectro de absorción, supresión de la fluorescencia y promoción del cruce intersistema y fosforescencia.
- Agregados J: desplazamiento batocrómico del espectro de absorción, no supresión de fluorescencia, estrechamiento de la emisión y reducción del desplazamiento de Stokes.

Además, en función de las propias características estructurales del colorante se han descrito dos fenómenos relacionados con la agregación de colorantes con potenciales aplicaciones como sensores: desactivación de la emisión producida por agregación y, la contraria, emisión inducida por agregación.⁷⁵ De hecho, se han desarrollado UCNH que hacen uso del efecto de emisión inducida por agregación de los colorantes funcionalizados en la superficie de la UCNP para generar ROS mediante excitación NIR.⁷⁷

En particular, se ha descrito que los colorantes xanténicos forman agregados de tipo H. Por ejemplo, García *et al.*^{78,79} observaron el efecto de agregación en xantenos en medio acuoso (figura 6.8) y encapsulados en macrociclos de cucurbit[8]urilo. En ambos casos, la agregación producía un incremento de la absorción de los agregados frente a la absorción de los monómeros, que se reflejaba con un aumento de absorción relativo del hombro frente al máximo de absorción del monómero.

En lo que respecta al RB, se ha descrito que pese a ser un colorante xanténico dianiónico muy soluble en disolventes polares, puede llegar a formar agregados tipo H^{80,81} en disolventes polares próticos,⁸⁰ en presencia de iones de metales alcalinos^{82,83} o por interacción con superficies cargadas positivamente.^{81,84-88} En este sentido, se ha reportado que la formación de agregados de RB reduce drásticamente el rendimiento cuántico de emisión, pero también el rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete.⁸⁵ La determinación de la agregación

del RB se basa en cambios del espectro de absorción y en medidas de dispersión de luz dinámica (DLS).^{80,81,84,85,89}

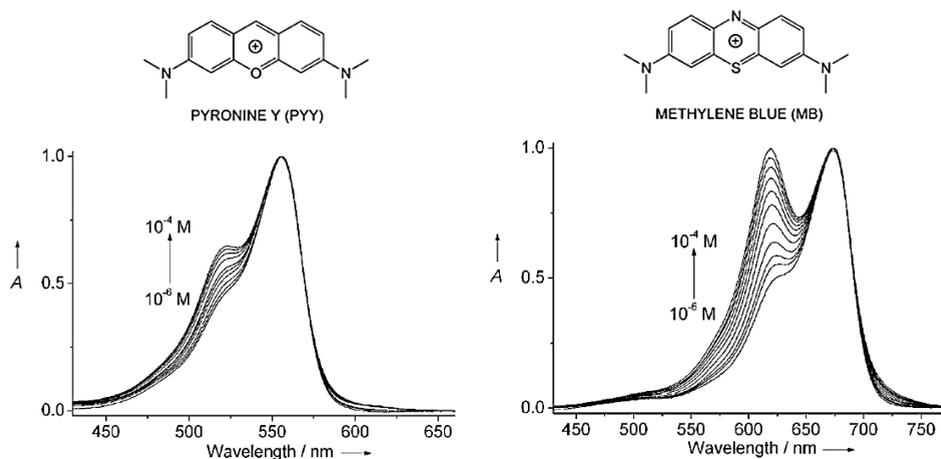


Figura 6.8. Efecto de la formación de agregados en dispersiones acuosas de colorantes xanténicos: (a) pironina Y y (b) azul de metileno. Reproducido con permiso de ⁷⁸, Copyright 2008 John Wiley and Sons.

Los espectros de absorción y emisión del RB en UC_{Er}@RB frente al RB libre se muestran en la figura 6.9. El máximo del espectro de absorción experimenta un ligero desplazamiento hipsocrómico ($\lambda_{\text{máx}}$: 560 y 563 nm para UC_{Er}@RB y RB, respectivamente), la banda es más ancha y cambia la proporción entre el máximo (560 nm) y el hombro (522 nm) de la absorción (A_{560}/A_{522} : 2,5 y 3,8 para UC_{Er}@RB y RB, respectivamente) respecto al RB libre. Asimismo, la emisión se desplaza ligeramente hacia el rojo ($\lambda_{\text{máx}}$: 583 y 578 nm para UC_{Er}@RB y RB, respectivamente). El aumento de la proporción A_{563}/A_{522} es similar al observado previamente por García et al.^{78,79} (figura 6.8), por tanto, el crecimiento relativo de la absorción del hombro parece evidenciar la formación de agregados. Este comportamiento se observa únicamente en el UCNH, ya que experimentos control han demostrado que el RB no se agrega en DMF, ni siquiera añadiendo proporciones elevadas de disolventes en el que es poco soluble (véase sección 6.5.4. Estudio de agregación del RB en DMF).

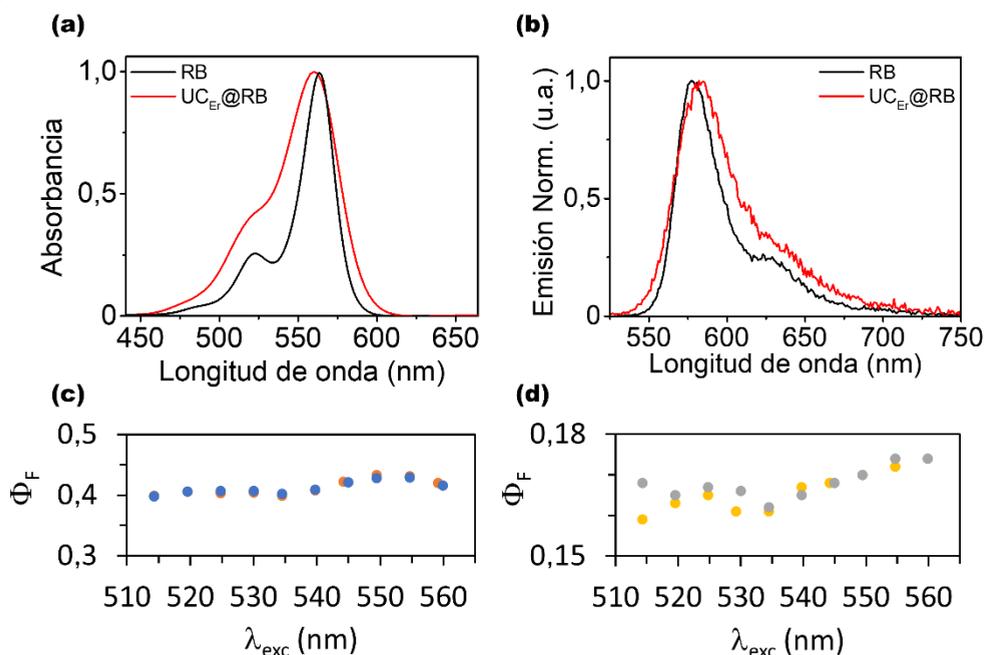


Figura 6.9. (a) Absorción y (b) emisión ($\lambda_{exc} = 522$ nm) del RB libre y del RB en UC_{Er}@RB en DMF normalizadas al máximo para destacar las diferencias espectrales. Los datos originales están representados en la sección 6.6. Caracterización adicional. Rendimiento cuántico de fluorescencia del (c) RB y (d) UC_{Er}@RB en función de la longitud de onda de excitación (λ_{exc}).

A partir del espectro de absorción del UCNH es posible aproximar la cantidad de RB anclado en la superficie de la UCNP. Suponiendo que el coeficiente de absorción molar del RB no varía al estar anclado a la superficie, podemos estimar una concentración de RB de *ca.* $3 \cdot 10^{-6}$ M/mg de UCNH (*ca.* 25 moléculas/UCNP), lo que supone que apenas el *ca.* 3 % de la superficie estaría recubierta por RB. Incluso suponiendo que el coeficiente de absorción molar del RB se redujera a la mitad por efecto de la agregación, como han reportado algunos autores,⁸⁴ el recubrimiento superficial únicamente llegaría al 5 %.⁸⁹ No obstante, ha sido reportado que la energía enlazante de grupos carboxilato es superior en las caras rectangulares (laterales) del prisma hexagonal que en las hexagonales. Por ejemplo, aprovechando la diferente energía enlazante Jin *et al.*⁹⁰

funcionalizaron anisotrópicamente UCNP con ADN con el fin de construir autoensamblajes de UCNP. Para ello, consiguieron desplazar selectivamente las moléculas de ácido oleico/oleato, bien de las caras hexagonales, bien de las rectangulares, con grupos funcionales que presentaban mayor afinidad hacia cada tipo de caras. Asimismo, otros estudios relacionados con control sintético de UCNP⁹¹ o los mecanismos de disolución de las de UCNP en medio acuoso,⁹² han destacado la diferente afinidad de los grupos anclantes por las distintas caras de la UCNP. Así, la funcionalización preferente del RB ocurriría en las caras laterales. Sin embargo, los cálculos de grado de funcionalización, suponiendo que únicamente pueda anclarse en las caras laterales, no producen un aumento sustancial del recubrimiento (apenas unas décimas de diferencia). No obstante, una baja funcionalización no excluye la presencia de agregados de colorante en superficie. Kamat y Ford demostraron que en superficies cargadas positivamente la formación de dímeros ocurría incluso cuando únicamente el 1 % de los sitios activos estaban ocupados.⁹³

Por otro lado, la figura 6.9. también muestra que el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) del RB cuando está anclado a la superficie disminuye drásticamente (de 0,42 a 0,17), aunque no llega a suprimirse, y que es independiente de la longitud de onda de excitación (figura 6.9.c-d). García *et al.*⁷⁸ reportan una reducción drástica, similar a la aquí observada, que atribuyen al efecto de autodesactivación por las interacciones π - π debida a la agregación.

Por último, la aceptable monodispersidad de la muestra en la medida de DLS (índice de polidispersidad promedio de tres medidas de $0,238 \pm 0,015$ y de $0,344 \pm 0,006$, para UC_{Er} y UC_{Er}@RB, respectivamente; figura 6.10) indicaría que el grado de funcionalización es bastante homogéneo entre las UCNP.

En definitiva, estos resultados parecen indicar que el RB se agrega en la superficie de la UCNP. El aumento de la proporción A_{563}/A_{522} del espectro de absorción junto con el ligero desplazamiento batocrómico de la emisión del

UCNH (figura 6.9) parece indicar cierta formación de agregados tipo H cuando el RB funcionaliza a la UCNP. Sin embargo, su comportamiento no parece ser el de un agregado tipo H puro, ya que no se suprime completamente la fluorescencia., sino de una situación intermedia probablemente debida a efectos superficiales del colorante en las caras laterales de la UCNP. Asimismo, se demuestra que los agregados absorben en todo el espectro de absorción del RB, ya que el Φ_F del RB en el UCNH no se aproxima al del RB libre ni en las longitudes de onda de absorción características del monómero (el máximo de absorción, $\lambda_{exc} \approx 560$ nm). Finalmente, pese a la baja funcionalización (3-5 %) se observa una distribución bastante homogénea de los agregados entre todas las UCNP.

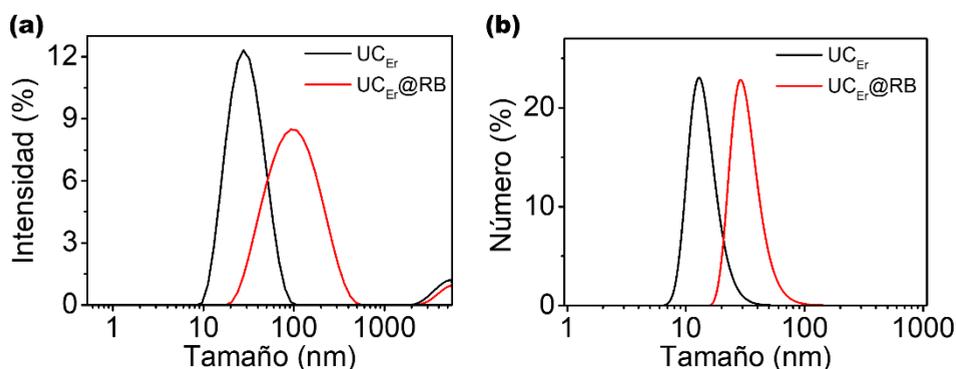


Figura 6.10. Distribución de tamaño en (a) intensidad y (b) número para UC_{Er} (DMF, 5 mg/mL) y UC_{Er}@RB (DMF, 5 mg/mL). El diámetro hidrodinámico promedio de tres medidas para UC_{Er} es de $27,9 \pm 0,3$ nm y para UC_{Er}@RB de $86,3 \pm 0,8$ nm. Medidas a concentraciones más bajas resultan en valores idénticos.

6.3.3. Fotofísica del RB en la superficie de la UCNP

El estudio de la fotofísica del RB en el UCNH se realizó utilizando diferentes técnicas (espectroscopía de absorción, espectroscopía de emisión en estado estacionario y resuelta en el tiempo, rendimiento cuántico de fluorescencia, espectroscopía de absorción de especies transitorias de nano/microsegundos y

Capítulo 6. Estudio de la fotofísica del nanohíbrido UC_{Er}@RB

emisión inducida por láser) con el fin de destacar las diferencias en el comportamiento fotofísico del RB en el UCNH frente al RB libre, cuando se excita directamente al colorante. A continuación, se irán presentando los resultados obtenidos más relevantes.

El comportamiento del estado excitado singlete del RB (¹RB) vendrá determinado por los fenómenos de desactivación que desde él tengan lugar, es decir, la emisión de fluorescencia, el cruce intersistema y/o posibles transferencias de energía. Anteriormente, ya se ha demostrado que el espectro de emisión presenta un muy ligero desplazamiento hacia longitudes de onda mayores, aunque mantiene la misma forma y que el Φ_F del RB en la UCNH se reduce drásticamente (de un 0,40 para el RB libre a un 0,16 en la UCNH, tabla 6.2). Además, el tiempo de vida de fluorescencia (τ_F) del RB se ve reducido un *ca.* 30 %: de 2,2 a 1,5 ns (figura 6.11 y tabla 6.2). Estos resultados indican la presencia de fenómenos que desactivan eficazmente el estado excitado singlete, que podrían ser debidos a diferentes factores, tales como (i) una mejora de la eficiencia de cruce intersistema cuando el RB está anclado a la superficie, que podría deberse al efecto de átomo pesado de los lantánidos presentes en la superficie de la UCNP^{67,68} o a la formación de agregados en la superficie de la UCNP, o bien (ii) a un proceso de transferencia de energía desde el ¹RB a los lantánidos, pese a su bajo coeficiente de absorción, que reduce su fluorescencia.

Tabla 6.2. Propiedades fotofísicas en atmósfera de N₂ y DMF ($\lambda_{exc}=560$ nm). Los parámetros de los ajustes cinéticos se muestran en la tabla 6.6.

| | $\Phi_F \pm$ DS* (%) | $\tau_F \pm$ DS* (ns) | $\tau_T \pm$ DS* (μ s) | $\tau_{BI} \pm$ DS* (μ s) | I _P (u.a.) | $\tau_P \pm$ DS* (μ s) | I _{DF} (u.a.) |
|----------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---|--------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| RB | 0,420 ± 0,003 | 2,2 ± 0,1 | 241 ± 7 | 244 ± 2 | 5,15 | 250 ± 2 | 15,5 |
| UC _{Er} @RB | 0,174 ± 0,002 | 1,5 ± 0,1 | 258 ± 3 | 46 ± 2 (8 %) 265 ± 3 (92 %) ⟨ τ ⟩* = 247 ± 4 | 3,73 | 165 ± 2 | 6,1 |
| Ratio | 0,32 | | | | 0,72 | | 0,39 |

*DS: desviación estándar, *: tiempo de vida promedio.

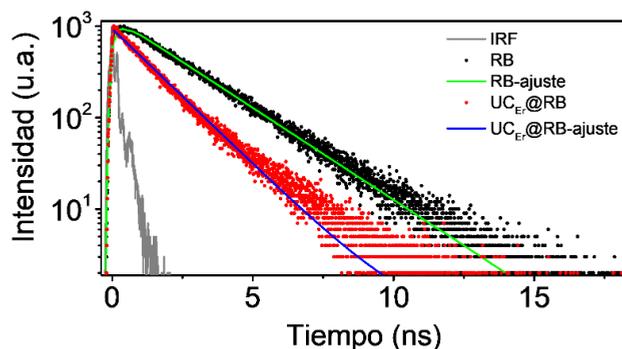


Figura 6.11. Tiempo de vida de fluorescencia y ajustes a 580 nm de una disolución de RB libre ($2,7 \cdot 10^{-7}$ M) y de una dispersión UC_{Er}@RB (< 1 mg/mL) en DMF y atmósfera de N₂ ($\lambda_{exc} = 560$ nm, láser NKT 5,5 MHz; cubeta en configuración front-face).

El RB es conocido por ser un buen fotosensibilizador y presentar un elevado rendimiento de cruce intersistema, superior al 90% en disolventes polares próticos. Sin embargo, el Φ_F medido en DMF limita al rendimiento de cruce intersistema (Φ_{ISC}), como máximo a ser de 0,6, de acuerdo con la ecuación 6.1 válida para moléculas no reactivas.⁹⁴

$$\Phi_F + \Phi_{ISC} + \Phi_{IC} = 1 \quad (6.1)$$

donde Φ_{IC} es el rendimiento cuántico de conversión interna.

Si bien, se han obtenido resultados similares al indicado cuando se utilizan disolventes polares apróticos como el ACN, en el cual el $\Phi_F = 0,36$ y el $\Phi_{ISC} = 0,4$.⁷²

Por tanto, a priori el DMF no será un buen disolvente para observar fenómenos relacionados con el estado excitado triplete (3RB). Sin embargo, se continúa el estudio con este medio, ya que nos asegura una elevada estabilidad coloidal para dispersiones relativamente concentradas que, por otro lado, facilitan la detección de señales débiles.

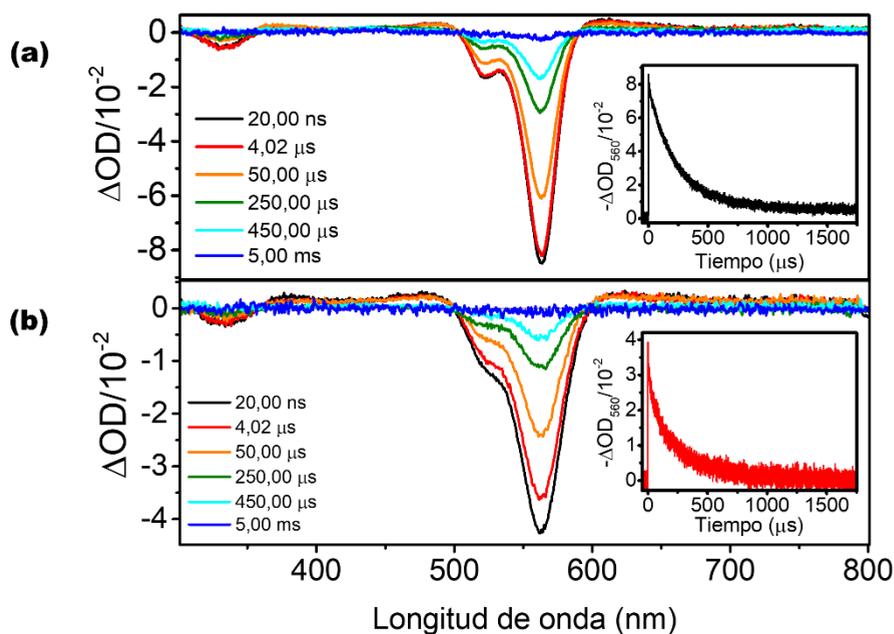


Figura 6.12. Espectro de absorción de especies transitorias de (a) RB y (b) UC_{Er}@RB en atmósfera de N₂ ($\lambda_{exc,probe} = 560$ nm) en DMF. Los recuadros muestran la cinética del bleaching a 560 nm.

Los experimentos de absorción de especies transitorias de nano/microsegundos (figura 6.12) demuestran que comportamiento fotofísico del RB en DMF es similar a su comportamiento descrito en ACN.⁷² Así, en un primer momento se genera el ³RB, que absorbe en *ca.* 380, 470 y 610 nm pocos nanosegundos después del pulso del láser, que posteriormente evoluciona a radicales, como el radical anión (RB^{•-}) que absorbe a *ca.* 440 nm 450 μ s después del pulso del láser (figuras 6.13.a-d). De forma similar, al excitar al RB en UC_{Er}@RB se genera primero el ³RB, pero la formación de radicales está claramente impedida. Resultados similares ya han sido observados para agregados de colorantes y agregados de colorantes adsorbidos sobre coloides, por ejemplo, Baptista *et al.*⁹⁵ observaron que, al excitar agregados de azul de metileno en la interfase de micelas, se disociaban y formaban un triplete idéntico al del monómero. Asimismo, Kamat *et al.*⁹⁶ observaron que los agregados de

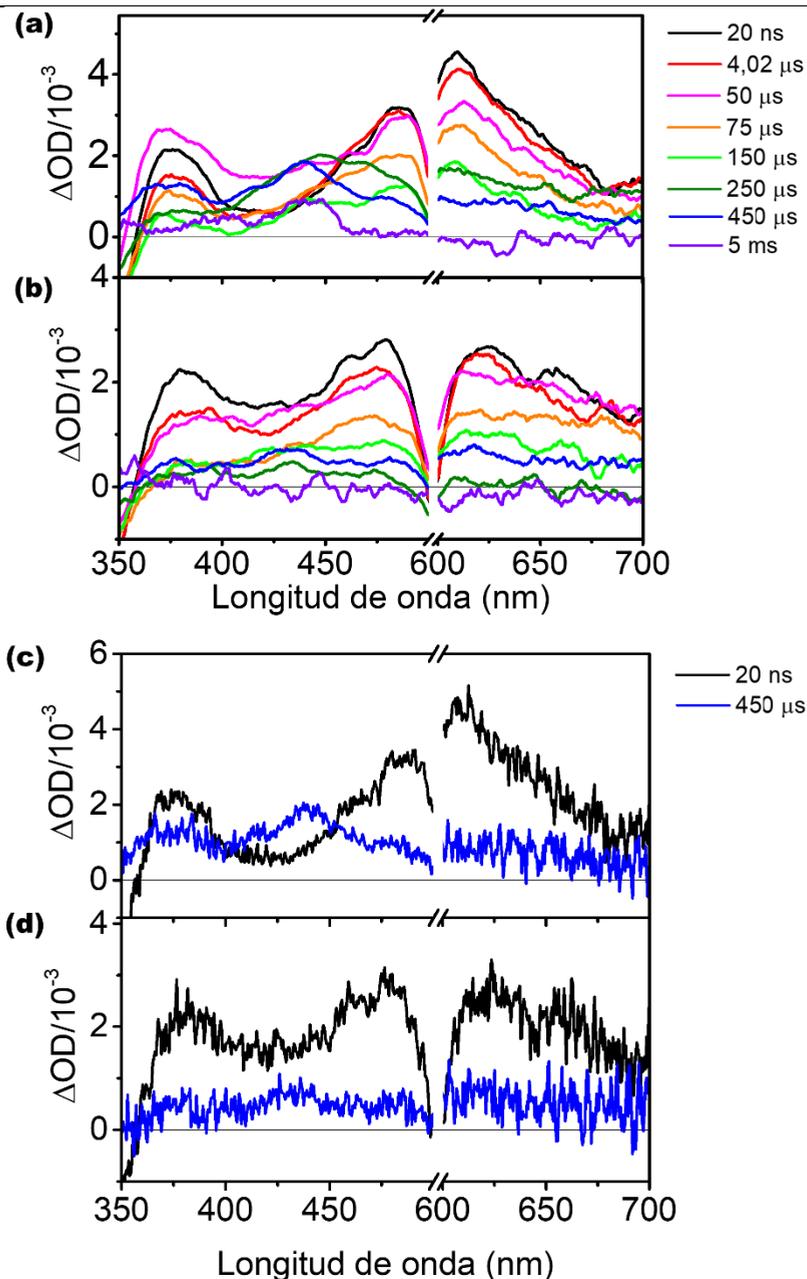


Figura 6.13. Espectro de absorción de especies transitorias (suavizado con un promedio adyacente de 20 puntos) a distintos tiempos respecto al pulso láser de (a) RB y (b) UC_{Er}@RB en atmósfera de N₂ ($\lambda_{exc,probe} = 560$ nm). Espectro de absorción de especies transitorias 20 ns (negro) y 450 μs (azul) después del pulso láser de (c) RB y (d) UC_{Er}@RB en atmósfera de N₂ ($\lambda_{exc,probe} = 560$ nm).

rodamina 6G en la superficie de NP de SiO₂ formaban únicamente el triplete del colorante.

Las cinéticas del *bleaching* del singlete a 560 nm coinciden con la absorción del triplete a 610 nm ($\tau_T = 240\text{-}260 \mu\text{s}$) y son muy similares para RB libre y RB en UCNH (figura 6.14 y tabla 6.3). Sin embargo, el *bleaching* del RB en UC_{Er}@RB es bastante menos intenso debido a la dispersión (*scattering*) y se ajusta a una ecuación biexponencial, que indica diferentes disposiciones de RB sobre la UCNP.

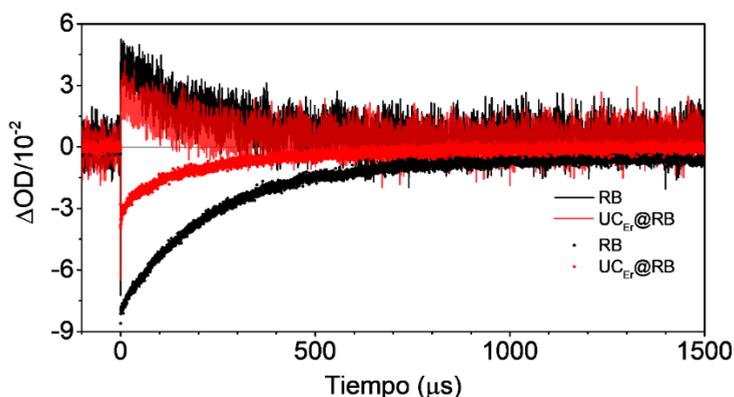


Figura 6. 14. Cinéticas de absorción del ³RB a 610 nm (líneas) escaladas $\times 10$ y cinéticas del bleaching del ¹RB a 560 nm (puntos) de RB y UC_{Er}@RB ($\lambda_{exc,probe} = 560 \text{ nm}$). El espectro normalizado se muestra en la sección 6.6. Caracterización adicional..

De acuerdo con el ΔOD de la absorción del ³RB, tanto la RB libre como la RB en el UCNH parecen generar una cantidad similar de ³RB (figura 6.15). Esto indicaría que la reducción de Φ_F no viene acompañada de un aumento de la eficiencia de cruce intersistema, lo que descartaría la hipótesis (i) de la mejora de la eficiencia de cruce intersistema por efecto del átomo pesado de la UCNP o por agregación del colorante. Así que, la desactivación tan importante que ocurre desde el estado singlete debe provenir de una transferencia de energía desde el ¹RB a los lantánidos de la UCNP.

Tabla 6.3. Muestras y resultados de los ajustes exponenciales para las cinéticas de absorción de una disolución de RB y una dispersión de UC_{Er}@RB de 0,28 A a 560 nm.

| $\lambda_{exc,probe}/nm$ (Potencia) | λ_{abs}/nm | Muestra | Atmósfera | $t/\mu s$ | DS* | χ^2 | |
|--|--------------------|----------------------|----------------|------------|------|----------|--|
| 560 (3 mJ) | 560 | RB | N ₂ | 244 | 2 | 0,778 | |
| | | | aire | 0,92 | 0,01 | 1,802 | |
| | | UC _{Er} @RB | N ₂ | 46 (8 %) | 2 | | |
| | | | N ₂ | 265 (92 %) | 3 | 0,744 | |
| | | | aire | 2,409 | 0,05 | 3,211 | |
| | | | aire | 2,409 | 0,05 | 3,211 | |
| 610 | 610 | RB | N ₂ | 241 | 7 | 0,695 | |
| | | | aire | 1,06 | 0,01 | 5,241 | |
| | | UC _{Er} @RB | N ₂ | 258 | 16 | 0,727 | |
| | | | N ₂ | 258 | 16 | 0,727 | |
| | | | aire | 2,96 | 0,03 | 3,728 | |
| | | | aire | 2,96 | 0,03 | 3,728 | |

*DS: desviación estándar del ajuste.

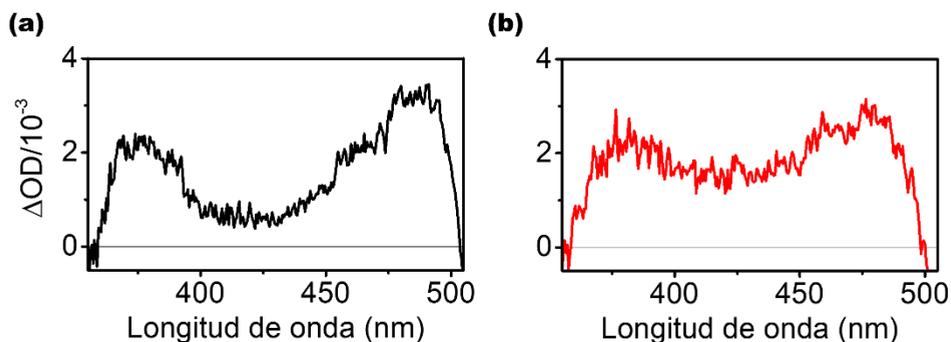


Figura 6.15. Detalle del espectro de absorción del (a) RB y (b) del UC_{Er}@RB 20 ns después del pulso láser en atmósfera de N₂ ($\lambda_{exc,probe} = 560 nm$).

Por otra parte, una ventaja de utilizar RB como PS es que permite detectar su emisión de fosforescencia a temperatura ambiente. De hecho, el espectro de fosforescencia puede incluso medirse en un fluorímetro convencional restando la emisión en atmósfera inerte y en atmósfera de aire/O₂ (figura 6.16), o bien a través de cinéticas de fluorescencia con una lámpara de Xenón pulsada de microsegundos. En cualquier caso, la fosforescencia del RB en DMF comienza en ca. 670 nm y se extiende hasta los ca. 1300 nm (*vide infra*) con un máximo a ca. 750 nm. La técnica de fluorescencia inducida por láser con un retraso de 100

ns respecto al pulso del láser permite también registrar la emisión de fosforescencia junto con la fluorescencia retardada (*delayed fluorescence*, figura 6.17). Al igual que otros derivados xanténicos, como la eosina,⁹⁷ el RB activado térmicamente es capaz de producir cruce intersistema inverso desde el ³RB al ¹RB, produciendo una fluorescencia con un tiempo de vida superior a la fluorescencia inmediata o instantánea.^{98,99}

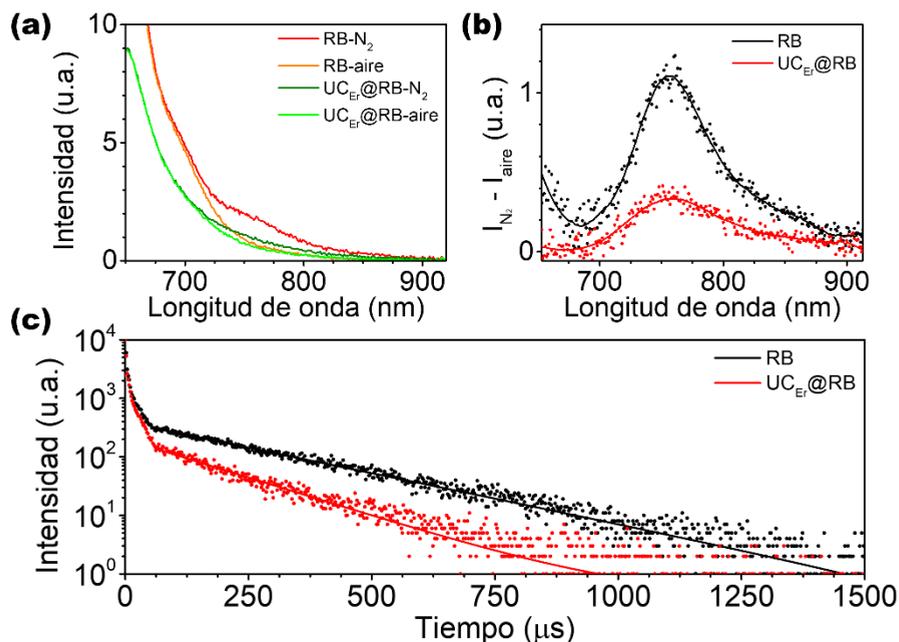


Figura 6.16. (a) Cola del espectro de emisión de una disolución de RB ($1,6 \cdot 10^{-5}$ M DMF) y de una dispersión de UC_{Er}@RB (5 mg/mL en DMF) en atmósfera de aire y de N₂ ($\lambda_{exc} = 560$ nm). (b) Espectro diferencia obtenido al restar el de emisión en atmósfera de aire al de N₂. (c) Cinética y ajuste a 750 nm para una disolución de RB ($1,6 \cdot 10^{-5}$ M DMF) y una dispersión de UC_{Er}@RB (5 mg/mL en DMF) en atmósfera de N₂ ($\lambda_{exc} = 560$ nm, lámpara μ F2). La primera sección de la cinética no se ajusta ya que es parte del IRF. Las emisiones se realizan en una disposición front-face para muestras con 1,34 A a 560 nm.

En las medidas realizadas se observa que el máximo de fosforescencia apenas varía (755 y 753 nm para RB libre y UC_{Er}@RB, respectivamente), pero sí se aprecia una reducción en la intensidad de fosforescencia del RB cuando está en

el UCNH (figura 6.17). A su vez, el tiempo de vida de fosforescencia (τ_p) del RB también se reduce cuando forma parte del UCNH (de 250 a 165 μ s, tabla 6.2). Estos resultados indican que cuando el RB está en el UCNH también existen mecanismos de transferencia de energía desde el ^3RB a los lantánidos, que lo desactivan y, por tanto, reducen la emisión de fosforescencia y su tiempo de vida frente a la RB libre. Asimismo, la reducción de intensidad de la fluorescencia retardada en el UCNH recalca nuevamente la existencia de un proceso de transferencia de energía que desactiva eficazmente el ^1RB .

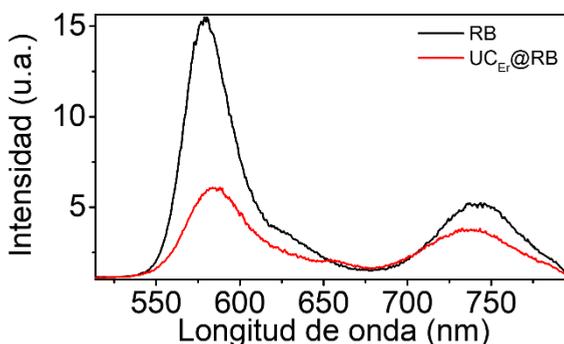


Figura 6.17. Espectro de emisión de fosforescencia y fluorescencia retardada obtenido 100 ns después del pulso láser ($\lambda_{exc,probe} = 560$ nm) para una disolución de RB (negro) y una dispersión de UC_{Er}@RB (rojo) en DMF. La absorción a 560 nm de RB en la disolución de RB libre y en la dispersión de UC_{Er}@RB es de 0,28 A.

El espectro de emisión registrado en el NIR del RB (figura 6.18) muestra que en atmósfera inerte la cola de la fosforescencia se alarga hasta los *ca.* 1300 nm y en atmósfera de aire se desactiva casi completamente y aparece una banda de emisión centrada en 1275 nm atribuida a la fosforescencia del $^1\text{O}_2$ (figura 6.19). En cambio, en el UCNH además de la fosforescencia del RB aparecen dos bandas: una centrada en 975 nm, del Yb³⁺, y otra en 1550 nm, del Er³⁺ (figura 6.18), que proceden de un efecto antena eficiente desde el RB a los lantánidos (figura 6.20). Nótese que excitando a UC_{Er} (sin RB) a 560 nm no se observan

estas bandas y a 655 nm, donde el Er³⁺ presenta una banda de absorción (⁴F_{9/2} ← ⁴I_{15/2}), esas bandas de emisión presentan una intensidad mínima (tabla 6.4).

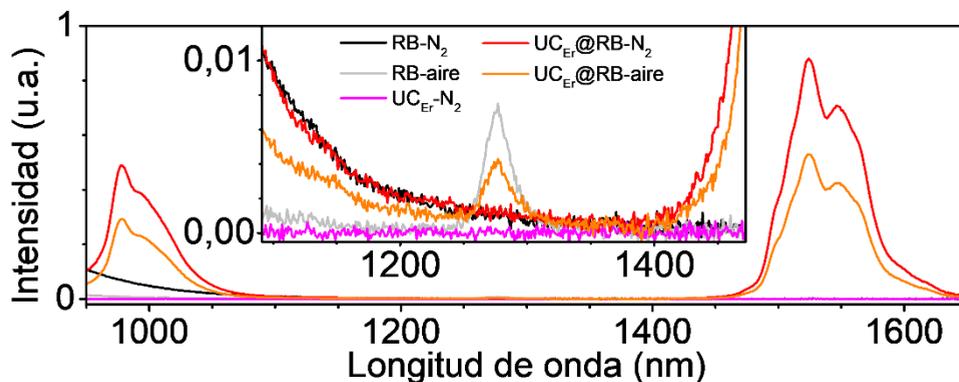


Figura 6.18. Espectro de emisión NIR de RB ($1,6 \cdot 10^{-5}$ M DMF), UC_{Er} (5 mg/mL en DMF) y UC_{Er}@RB (5 mg/mL en DMF) en N₂ y aire ($\lambda_{exc} = 560$ nm). La absorción del RB en la disolución de RB libre y en la dispersión de UC_{Er}@RB es de 1,34 A a 560 nm.

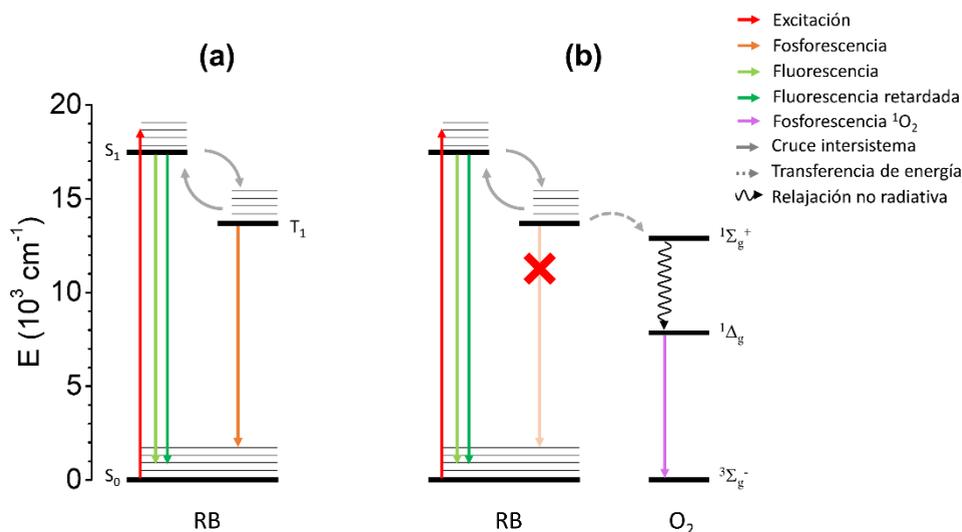


Figura 6.19. Diagrama de energía de procesos fotofísicos del RB en atmósfera de (a) N₂ y de (b) aire ($\lambda_{exc} = 560$ nm).

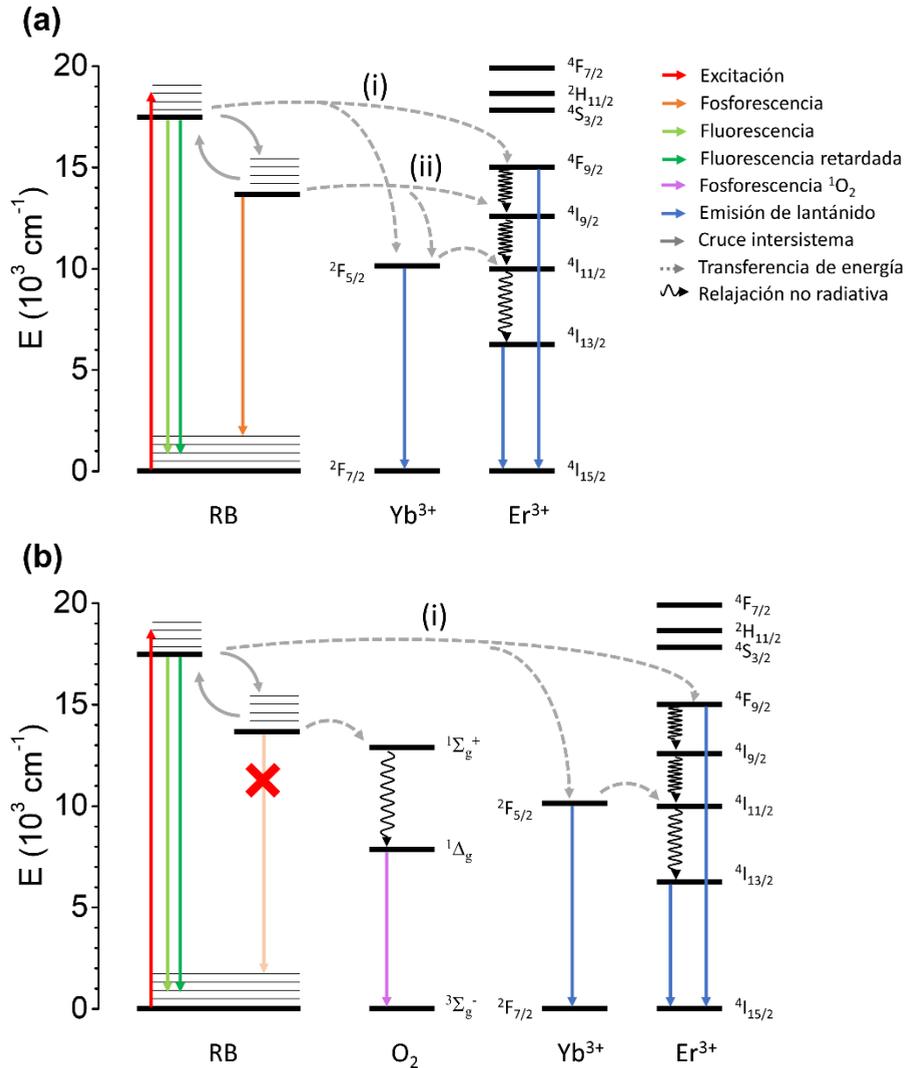


Figura 6.20. Diagrama de energía de procesos fotofísicos de UC_{Er}@RB en atmósfera de (a) N₂ y de (b) aire ($\lambda_{exc}=560$ nm).

Tabla 6.4. Intensidad de las emisiones NIR a la longitud de onda de excitación especificada, para dispersiones de 1 mg/mL de UC_{Er} y 1 mg/mL de UC_{Er}@RB.

| | Muestra (atmósfera) | Intensidad de bandas de emisión (u.a.) | |
|------------------------------|--|--|-------------------|
| | | 980 nm | 1525 nm |
| $\lambda_{exc}= 655$ nm (Xe) | UC _{Er} (N ₂) | 389 | 642 |
| | UC _{Er} (O ₂) | 366 | 604 |
| $\lambda_{exc}= 560$ nm (Xe) | UC _{Er} @RB (N ₂) | $2,66 \cdot 10^4$ | $3,90 \cdot 10^4$ |
| | UC _{Er} @RB (O ₂) | $1,22 \cdot 10^4$ | $1,79 \cdot 10^4$ |

Además, la atmósfera (inerte/aire) modifica en gran medida la intensidad de emisión de las bandas NIR de los iones lantánidos del UCNH. De hecho, no solo se ve afectada la banda de 980 nm, donde se solapan la emisión de fosforescencia del ^3RB con la emisión del Yb^{3+} , sino también la emisión de 1550 nm de Er^{3+} , que no está contaminada por la emisión de fosforescencia del ^3RB . Así, se puede aproximar que la emisión en atmósfera inerte se debe a la transferencia de energía cooperativa desde el ^1RB y el ^3RB (procesos i y ii, respectivamente, de la figura 6.20.a), mientras que la emisión en atmósfera de aire se debería únicamente a la transferencia de energía desde el ^1RB (proceso i de la figura 6.20.b), ya que el ^3RB está casi completamente desactivado (en atmósfera de O_2 el ^3RB estaría completamente desactivado y la intensidad relativa de las bandas puede consultarse en la tabla 6.4). Así, se puede calcular que la contribución del ^1RB en atmósfera inerte (N_2) a las emisiones NIR constituye un 46 % de la señal observada y, por consiguiente, la contribución de ^3RB debe ser un 54 %. Por tanto, esto indica que la transferencia de energía del RB al Er^{3+} ocurre tanto desde el ^1RB como del ^3RB y que no puede descartarse/despreciarse de ninguna manera la participación del ^1RB en el proceso de transferencia de energía.

En lo que respecta a las cinéticas de tiempo de vida de emisión, se observa que la banda de 975 nm en atmósfera de N_2 presenta dos componentes: una corta de 52 μs (65%) y una larga de 171 μs (35%), mientras que en aire solamente presente la componente corta (48 μs ; figura 6.21 y tabla 6.5). La componente larga observada en atmósfera de N_2 cuadra con el tiempo de vida de fosforescencia. La presencia de los dos componentes se debe, como ya se comentó anteriormente, a la codetección de dos especies: el Yb^{3+} y la fosforescencia del ^3RB . De forma similar la cinética de 1550 nm de Er^{3+} se ajusta a una biexponencial, que en atmósfera de aire reduce ligeramente la componente más corta (209 μs frente a 305 μs ; figura 6.21 y tabla 6.5), destacando nuevamente la participación del triplete en el proceso.

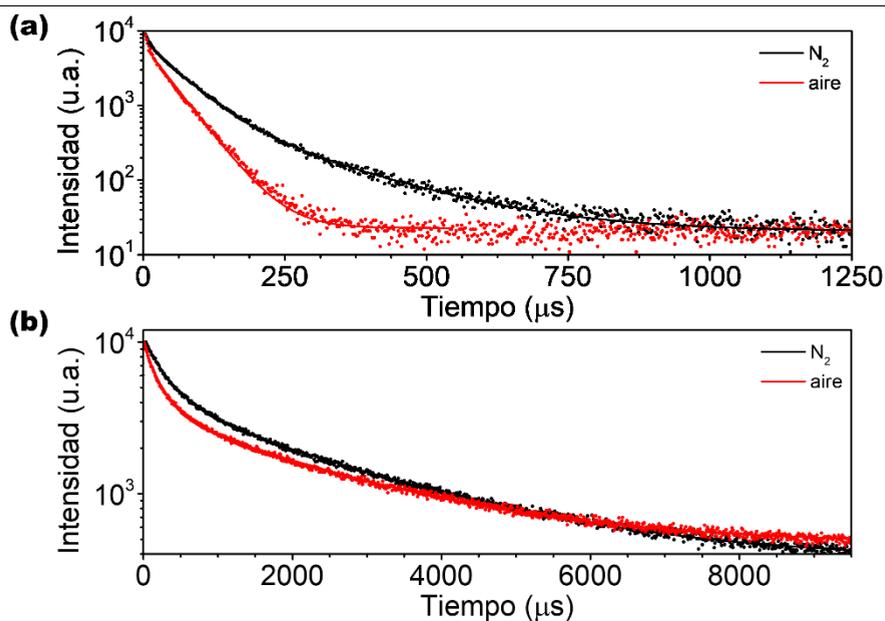


Figura 6.21. Desactivación de la emisión a 975 nm y 1550 nm de UC_{Er}@RB (5 mg/mL DMF) en N₂ y aire ($\lambda_{exc} = 560$ nm, lámpara μ F2).

Tabla 6.5. Condiciones de medida y resultados de los ajustes exponenciales para las disoluciones/dispersiones indicadas ($\lambda_{exc} = 560$ nm).

| $\lambda_{em}/$ nm | Muestra | Concentración | Atmósfera | τ/μ s (%) | DS* | $\langle\tau\rangle^{**}$ / μ s | DS* | χ^2 |
|-----------------------|----------------------|--------------------------|----------------|---------------------|-----|--|-----|----------|
| 975 | UC _{Er} @RB | 5 mg/mL | N ₂ | 52,3 (65 %) | 0,5 | 94 | 2 | 1,476 |
| | | | | 171 (35 %) | 3 | | | |
| | | | aire | 47,6 | 0,2 | 1,238 | | |
| 1550 | UC _{Er} @RB | 5 mg/mL | N ₂ | 305 (17 %) | 3 | 1956 | 13 | 1,104 |
| | | | | 2284 (83 %) | 13 | | | |
| | | | aire | 209 (17 %) | 2 | 1799 | 12 | 1,387 |
| 1275 | RB | 1,6 · 10 ⁻⁵ M | aire | 23,4 | 0,2 | | | 1,002 |
| | UC _{Er} @RB | 5 mg/mL | aire | 18,8 | 0,2 | | | 1,166 |

*DS: desviación estándar; ** $\langle\tau\rangle$: tiempo de vida promedio

Por otro lado, en presencia de aire se observa una emisión poco intensa en 1275 nm que presenta la cinética característica (*rise* y *decay*) de la fosforescencia

del ¹O₂ (19-23 μs; figura 6.22). En atmósfera de aire la intensidad relativa de esta emisión es menor para UC_{Er}@RB ($7,5 \cdot 10^{-2}$ u.a. en RB vs. $4,3 \cdot 10^{-2}$ u.a. en UC_{Er}@RB; figura 6.18). Esto indicaría que la generación de oxígeno singlete en la superficie de la UCNP es ligeramente menos eficiente que para el RB libre.

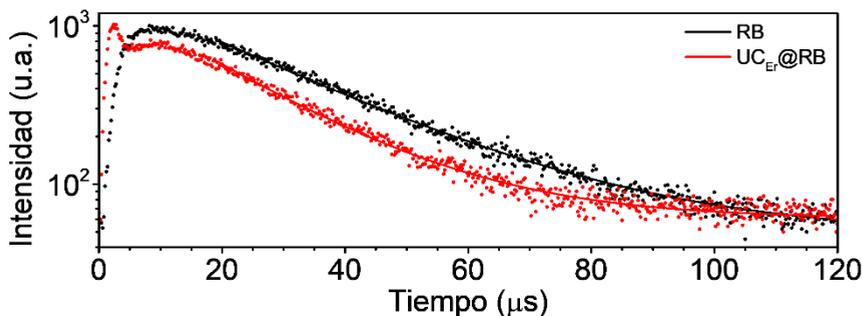


Figura 6.22. Desactivación de la emisión de ¹O₂ a 1275 nm del RB ($1,6 \cdot 10^{-5}$ M DMF) y UC_{Er}@RB (5 mg/mL en DMF) en atmósfera de aire ($\lambda_{exc} = 560$ nm, lámpara $\mu F2$).

6.3.4. Estudio de las emisiones UC

En lo que respecta a la emisión UC mediante excitación láser a 980 nm se observa que, cuando se excita al UCNH, debe tenerse en cuenta que elevadas absorciones (pese a bajas concentraciones de UCNP) pueden producir fenómenos de filtro interno que modifiquen la forma del espectro de emisión, en cuyo caso conviene preparar dispersiones diluidas de la misma manera que ocurriría para un colorante convencional. En la figura 6.23 se recoge el espectro de emisión de UC_{Er} y UC_{Er}@RB a 1 mg/mL y a otras concentraciones en las que puede apreciarse el fenómeno de filtro interno (5 mg/mL) para UC_{Er}@RB.

La intensidad y los tiempos de vida UC no se ven afectados por el tipo de atmósfera (inerte o aire). Eso sí, en el UCNH disminuye ligeramente la intensidad relativa de las bandas de emisión del UCNH afectadas por la absorción del RB (520-540 nm) frente a la emisión de UC_{Er} y aparece una nueva emisión centrada

en 584 nm que coincide con la banda de emisión de fluorescencia del RB y que contamina la banda de 655 nm del Er³⁺ (figura 6.23). Esta banda se atribuye a la emisión del RB sensibilizada mediante una transferencia de energía resonante desde el Er³⁺ de la UCNP, ya que presenta un tiempo de vida del orden de las emisiones UC del Er³⁺ (51 μs; tabla 6.6), frente a la fluorescencia convencional del RB por excitación directa (1,5 ns). Asimismo, la presencia del RB en el UCNH produce una ligera reducción del tiempo de vida de las bandas afectadas por la absorción del RB respecto a UC_{Er} (tabla 6.6 y figura 6.24).

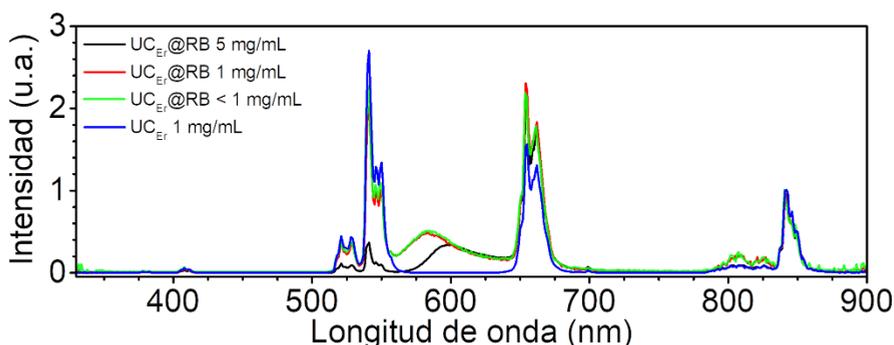


Figura 6.23. Espectro de emisión UC normalizado a 841 nm de dispersiones de UC_{Er} y UC_{Er}@RB a distintas concentraciones ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$; $I = 2,1 \text{ W/cm}^2$).

Tabla 6.6. Propiedades de emisión UC en atmósfera inerte. Los ajustes de las curvas y los parámetros asociados pueden observarse en la figura 6.30 y tabla 6.7.

| | $\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$ | | | | UCQY _{sat} ± DS* (%)** |
|----------------------|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| | $\tau_{525} \pm DS^*$ (μs) | $\tau_{540} \pm DS^*$ (μs) | $\tau_{600} \pm DS^*$ (μs) | $\tau_{655} \pm DS^*$ (μs) | |
| UC _{Er} | 85,9 ± 0,1 | 85,7 ± 0,1 | - | 205 ± 9 | 0,29 ± 0,1 |
| UC _{Er} @RB | 59,5 ± 0,1 | 59,3 ± 0,1 | 51,3 ± 0,1 | 202 ± 5 | 0,14 ± 0,1 |

*DS: desviación estándar; **: 2,24 kW/cm², dispersiones 5 mg/mL

Si bien la presencia del colorante en la superficie de la UCNP no parece afectar en gran medida a las intensidades relativas de las emisiones UC del Er³⁺, sí afecta al rendimiento global del proceso UC. La presencia del colorante reduce al *ca.* 50% el rendimiento cuántico UC (UCQY) del UCNH respecto del UC_{Er} (tabla

6.6 y figura 6.25). No obstante, se trata de un resultado esperable, ya que al añadir más estados electrónicos al sistema (con el RB) es de esperar que también aumenten los fenómenos de desactivación no radiativa.

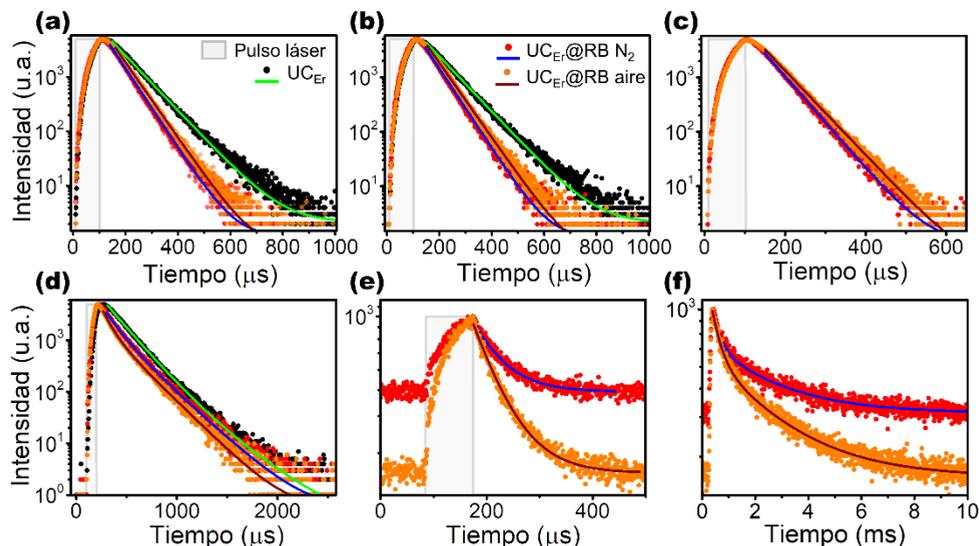


Figura 6.24. Cinéticas de desactivación de la emisión y ajustes a (a) 520, (b) 540, (c) 600, (d) 655, (e) 1050 y (f) 1550 nm ($\lambda_{exc} = 980$ nm; láser CNI) de una dispersión UC_{Er} (5 mg/mL en DMF) y UC_{Er}@RB (5 mg/mL en DMF) en N₂ y aire. El rectángulo gris representa la duración del pulso láser.

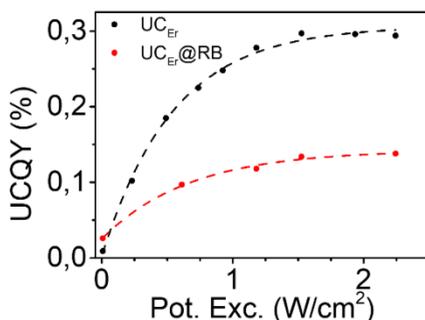


Figura 6.25. Rendimiento cuántico absoluto upconversion excitando con un láser de CW a 980 nm a distintas potencias de excitación para dispersiones de UC_{Er} (5 mg/mL DMF) y de UC_{Er}@RB (5 mg/mL DMF).

Se realizaron medidas de absorción de especies transitorias excitando a 980 nm (5 mJ); sin embargo, no se observó la absorción del triplete sensibilizado por las emisiones UC. Asimismo, se intentó registrar la emisión del $^1\text{O}_2$ en una dispersión de UCNH burbujeada con O_2 y tampoco se detecta nada. No obstante, está ampliamente reportado que las UCNP funcionalizadas con PS son capaces de generar ROS,^{1,14,29,100-102} lo que significa que la formación sensibilizada del ^3RB y del $^1\text{O}_2$ no se observa porque no se dispone de la sensibilidad instrumental adecuada para su medida.

6.4. Conclusiones

- Existe transferencia de energía tanto desde el triplete como del singlete del RB hacia los lantánidos de la UCNP.
- La fotofísica del RB en la superficie del UCNH parece evidenciar la presencia de agregados de RB repartidos homogéneamente entre las UCNP.
- Las medidas fotofísicas del RB en la superficie de la UCNP indican que:
 - El RB, pese a su bajo recubrimiento superficial, se agrega en la superficie de la UCNP.
 - Se reduce drásticamente el Φ_F y el τ_F del RB pero no se mejora el Φ_{ISC} .
 - Se genera la misma cantidad de 3RB que en el caso del RB libre, pero emite menos fosforescencia y genera menos 1O_2 .
 - La formación de especies radicalarias de RB está claramente impedida, a diferencia del RB libre.
 - Tanto el 1RB y el 3RB hacen efecto antena a las emisiones NIR de Yb^{3+} (975 nm) y Er^{3+} (1550 nm).
- La presencia del RB en UC_{Er}@RB produce diferentes efectos en las emisiones UC:
 - Reducción del Φ_{UC} se reduce a la mitad en UC_{Er}@RB en comparación al de UC_{Er}.
 - Reducción relativa de las intensidades y del tiempo de vida de emisión de las bandas de emisión afectadas por la absorción del colorante. Además, deben tomarse precauciones para evitar el efecto de filtro interno en la intensidad relativa de las bandas, en especial con especies con elevada absorción.
 - Las emisiones UC no se ven afectadas por la atmósfera (N_2 /aire).

6.5. Procedimiento experimental

6.5.1. Materiales

Los materiales utilizados para la síntesis de UCNP/UCNH fueron: los cloruros hidratados de los lantánidos: $YCl_3 \cdot xH_2O$ (REacton AlfaAesar, 99,99 %), $YbCl_3 \cdot 6H_2O$ (Acros Organics, 99,99 %), y $ErCl_3 \cdot 6H_2O$ (Sigma Aldrich, 99,9 %), 1-octadeceno (Alfa Aesar, 90 %), ácido oleico (Alfa Aesar, 90%), NaOH granulado (Scharlau), NH_4F (Sigma Aldrich, 99,99%) y sal sódica de rosa de bengala (Sigma Aldrich).

6.5.2. Protocolos sintéticos y preparativos

Síntesis de $\beta-NaYF_4:Yb^{3+}(20\%),Er^{3+}(2\%)$ recubiertas de oleato

Las UCNP se sintetizaron según un protocolo previo¹⁰³ con algunas modificaciones. En un matraz de fondo redondo se añaden 15 mL de 1-octadeceno y 8 mL de ácido oleico. A continuación, se añade una disolución de 2 mL de metanol (MeOH) que contiene 1 mmol de lantánidos (0,78 mmol $YCl_3 \cdot 6H_2O$, 0,20 mmol $YbCl_3 \cdot 6H_2O$ y 0,02 mmol $ErCl_3 \cdot 6H_2O$). A partir de ese momento se mantiene una agitación constante y atmósfera inerte (N_2) hasta el final de la síntesis. La mezcla se calienta hasta 160 °C y se mantiene a esa temperatura 30 minutos, de los cuales los 10 últimos minutos se sustituye la atmósfera de N_2 por vacío. Posteriormente, se recupera la atmósfera de N_2 , se deja enfriar la disolución hasta 60 °C y se añade una disolución de metanol (MeOH) que contiene NaOH (2,5 mmol) y NH_4F (4 mmol). Luego, la disolución se calienta a 65 °C durante 30 minutos y, a continuación, se sube la temperatura gradualmente hasta los 120 °C para eliminar el MeOH. Por último, se sube rápidamente la temperatura hasta 305 °C y se mantiene durante 1,5 horas. Pasado ese tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente. La purificación de las UCNP

se realiza mediante precipitación por centrifugación y redispersión con mezclas de disolventes. En primer lugar, al crudo de reacción se le añade exceso de etanol y se centrifuga a 7000 g 7 minutos. El precipitado se lava mediante ciclos de redispersión-centrifugación (7000 g 7 minutos): tres veces con una mezcla cloroformo:etanol (1:3) y tres veces con ciclohexano:acetona (1:3). Finalmente, se redispersan con 3 mL de ciclohexano y se centrifugan a 1000 g durante 2 minutos. Así, se descartan los agregados de UCNP que han precipitado. La concentración de UCNP de la dispersión final se calcula por diferencia de pesada dejando secar en estufa 100 μ L de la dispersión y suele estar en torno a 60 mg/mL. Como ocurre generalmente la proporción de los lantánidos en las UCNP finales, obtenido por EDX, difiere ligeramente del material pesado para la síntesis.

Eliminación de ligandos oleato superficiales de β -NaYF₄:Yb³⁺(20%), Er³⁺(2%) (UC_{Er})

Los ligandos oleato de la superficie de la UCNP se eliminaron mediante un tratamiento con NOBF₄ previamente descrito.¹⁰⁴ A la cantidad deseada de la dispersión de las UCNP funcionalizadas con oleato se le añade la misma cantidad DMF. A continuación, se agitan vigorosamente las fases, se añade una cantidad ligeramente superior de NOBF₄ sólido que de UCNP había en la dispersión de partida de ciclohexano y se mantiene en agitación 2 horas a *ca.* 40 °C. Posteriormente se coge la fase de DMF, se añade exceso de cloroformo y se centrifuga a 7000 g 7 minutos. Luego se realizan dos lavados, que consisten en redispersar el precipitado con poca cantidad de DMF, después añadir exceso de cloroformo (1:2 DMF:CHCl₃) y centrifugar a 10000 g 10 minutos. Por último, se redispersa el precipitado transparente en 5 mL de DMF y se centrifuga a 1000g durante 2 minutos para eliminar agregados. La concentración de UCNP de la dispersión final se calcula por diferencia de pesada dejando secar en estufa 100 μ L de la dispersión.

La funcionalización con RB se realiza siguiendo un protocolo previamente descrito.⁷¹ En primer lugar, la dispersión de UC_{Er} se expone a un exceso de RB (2x masa UC_{Er} en dispersión) durante 24 horas. Posteriormente, se realizan lavados que consisten en ciclos de centrifugación (10000 g 10 minutos)-redispersión (94x 10 mL) con DMF, hasta que el sobrenadante no presenta absorción del RB. La concentración de UC_{Er}@RB de la dispersión final se calcula por diferencia de pesada dejando secar en estufa 100 µL de la dispersión.

6.5.3. Determinación de la cantidad de moléculas de RB en UCNH

El procedimiento para calcular la cantidad de moléculas de RB en UCNH se basa en calcular la cantidad de moléculas de RB y el número de UCNP que hay en 1 mg de UCNH y dividirlo. Para el cálculo se realizan varias aproximaciones y se detalla a continuación:

1) Cálculo de celdas unidad (CU) por UCNP

Las imágenes del TEM muestran una población monodispersa de UCNP con forma de prisma hexagonal de 21 nm de diámetro. Con el volumen de una UCNP y conociendo que el volumen de una celda unidad es $107,44 \text{ \AA}^3$,¹⁰⁵ se calcula la cantidad de CU por cada UCNP (CU_{UCNP}). Se encuentra que hay 45132,6 CU/UCNP.

2) Cálculo de UCNP en 1 mg de UCNH

En primer lugar, se calcula la cantidad de CU que hay en 1 mg de UCNH. Para ello se aproxima que 1 mg de UCNH es equivalente a 1 mg de UCNP, por tanto, mediante el peso de una celda unidad ($PCU_{NaYF_4} = 187,84 \text{ u}$) y el número de Avogadro se calcula este dato. Posteriormente, este dato se divide entre CU_{UCNP}

y así se obtiene la cantidad de UCNP en 1 mg (UCNP_{UCNH}). Se obtiene que hay $7,10 \cdot 10^{13}$ UCNP/mg UCNH.

3) Moléculas de RB en 1 mg de UCNH

Las moléculas de RB se calculan aplicando la ley de Lambert-Beer. Para ello, se aproxima que el coeficiente de absorción molar ($\epsilon(\lambda)$) de la RB libre es igual que para el RB funcionalizado en la superficie de la UCNP. El $\epsilon(560)$ calculado experimentalmente resulta ser de $(9,1 \pm 0,7) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y la absorción a 560 nm de una dispersión de 1 mL de 1 mg/mL de UC_{Er}@RB es de 0,22. Con estos datos es posible calcular la cantidad de moléculas de RB por mg de UCNH (RB_{UCNH}). Así, se obtiene que de promedio hay $1,44 \cdot 10^{15}$ moléculas de RB/mg UCNH.

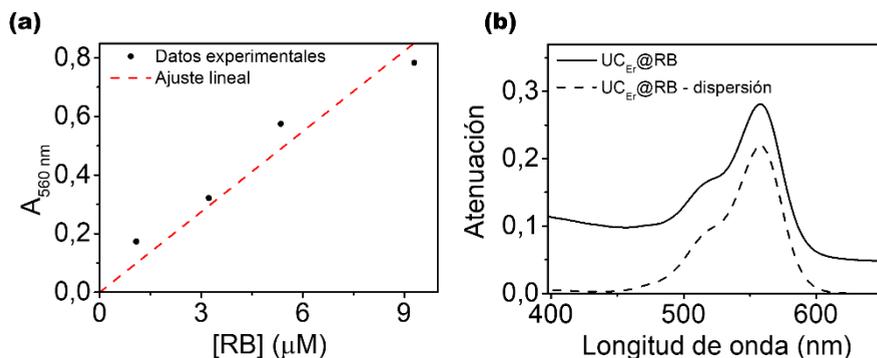


Figura 6.26. (a) Curva de calibrado y ajuste lineal para disoluciones de concentración creciente de RB. (b) Espectro de atenuación de una dispersión de 1 mg/mL de UC_{Er}@RB (línea lisa) y de absorción del RB en UCNH (línea discontinua), una vez restada la dispersión (scattering) de forma manual.

4) Moléculas de RB por UCNP

La cantidad de moléculas de RB promedio por UCNP se obtiene dividiendo RB_{UCNH} entre UCNP_{UCNH} y resulta en ca. 20 moléculas de RB/UCNP. Aproximando el volumen de una molécula de RB al ocupado por una esfera de 1,5 nm de diámetro y calculando la superficie de una UCNP esférica, se puede

calcular la cantidad de moléculas de RB que podrían anclarse a la superficie de la UCN_P que resulta ser 784. Por tanto, un *ca.* 3 % de la superficie de la UC_{Er} estaría recubierta por RB. Incluso suponiendo que el coeficiente de absorción molar de RB es la mitad, como ha sido descrito para agregados de RB en la superficie de coloides de SiO₂@Al₂O₃,⁸⁴ el recubrimiento superficial llegaría al *ca.* 5 %.

6.5.4. Estudio de agregación RB en DMF

El rosa de bengala no se agrega en DMF. Se prepararon disoluciones de 10⁻⁷ a 10⁻⁴ M y no se observan cambios en absorción, fluorescencia o espectros de excitación debido a la agregación. Únicamente se observaron cambios debidos a autoabsorción (*self-quenching*). Además, el DLS también descarta la presencia de agregados (no hay dispersión de luz). El rosa de bengala tampoco se agrega en una mezcla de DMF (donde es soluble) y cloroformo (CHCl₃, donde es insoluble). Se prepararon disoluciones de 1,35·10⁻⁵ M en mezclas de DMF y CHCl₃ (de 0 a 95% v/v de CHCl₃) y no se produjo ningún cambio en absorción, ni en la dispersión de luz.

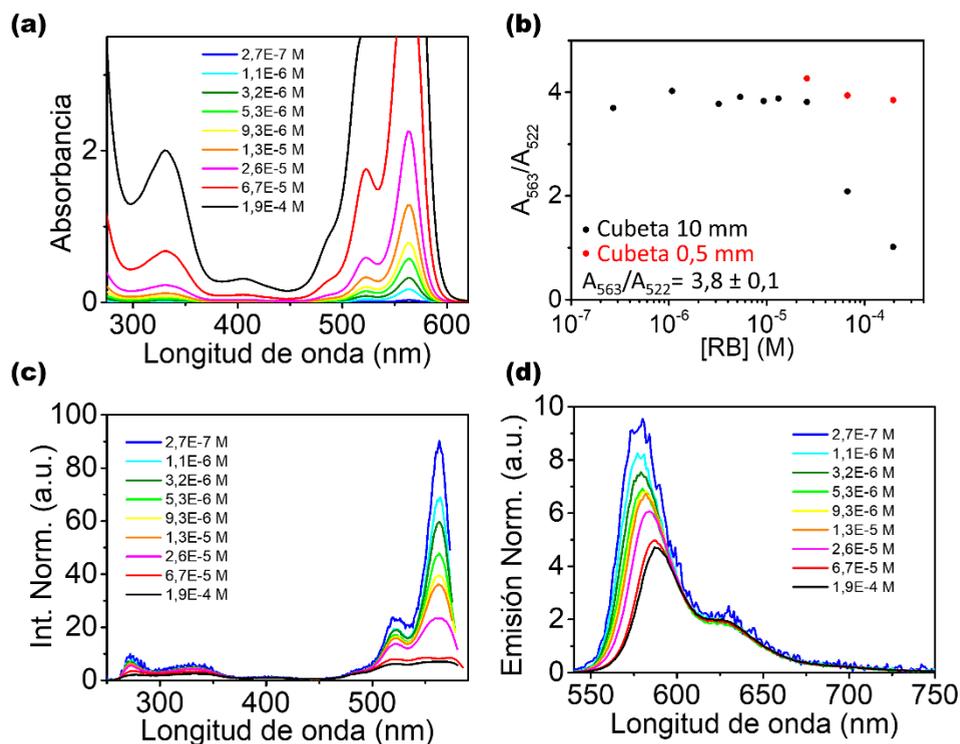


Figura 6.27. (a) Espectro de absorción a concentraciones crecientes de RB en DMF. (b) Evolución de la proporción entre la absorción del máximo y el primer hombro. Para disoluciones muy concentradas se registra la absorción en cubetas de paso óptico menor. (c) Espectros de excitación registrados en el máximo de emisión y normalizados a 400 nm (cubeta en configuración front-face). (d) Espectros de emisión normalizados a 650 nm ($\lambda_{exc} = 522$ nm; cubeta en configuración front-face).

6.6. Caracterización adicional

Tabla 6.7. Resultados del análisis ICP-MS para UC_{Er}.

| | Composición elemental (%) | | |
|------------------|---------------------------|------------------|------------------|
| | Y ³⁺ | Yb ³⁺ | Er ³⁺ |
| UC _{Er} | 68.8 | 28.2 | 3.0 |

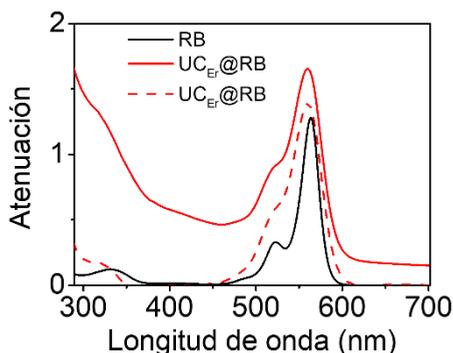


Figura 6.28. Espectro de absorción de una disolución de RB ($1,3 \cdot 10^{-5}$ M; línea negra) y de atenuación de una dispersión de 5 mg/mL de UC_{Er}@RB (línea roja) en DMF. En línea discontinua se presenta el espectro de absorción obtenido restando la dispersión (scattering) de forma manual del espectro de atenuación de UC_{Er}@RB.

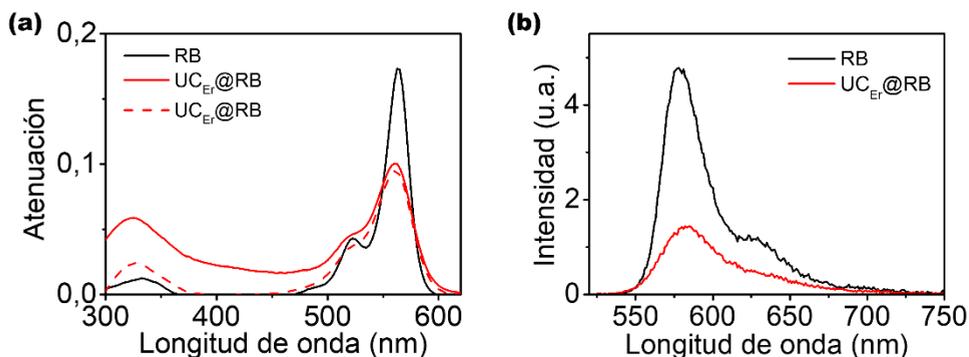


Figura 6.29. (a) Espectros de absorción de una disolución de RB ($1,08 \cdot 10^{-6}$ M), de atenuación y absorción de una dispersión de UC_{Er}@RB (< 1 mg/mL) en DMF.

(b) Espectro de emisión de la disolución de RB ($1,08 \cdot 10^{-6}$ M) y de la dispersión de UC_{Er}@RB ($\lambda_{exc} = 522$ nm).

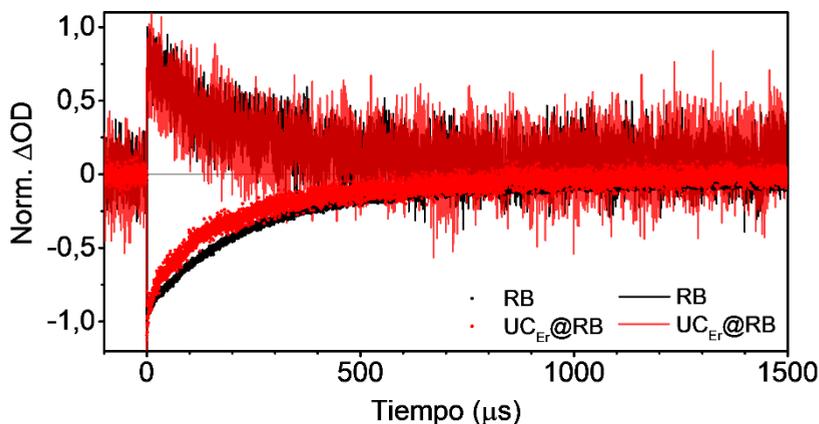


Figura 6.30. Cinéticas de absorción del ³RB a 610 nm (líneas) y del bleaching del ¹RB a 560 nm (puntos) normalizadas de RB y UC_{Er}@RB ($\lambda_{exc,probe} = 560$ nm) en atmósfera de N₂.

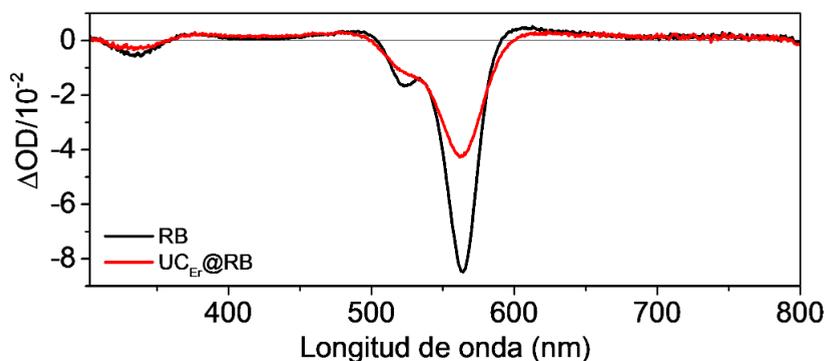


Figura 6.31. Espectro de absorción de especies transitorias del RB (negro) y del UC_{Er}@RB (rojo) 20,00 ns después del pulso láser en atmósfera de N₂ ($\lambda_{exc,probe} = 560$ nm).

Tabla 6.8. Condiciones de medida y resultados de los ajustes exponenciales para las disoluciones/dispersiones indicadas.

| λ_{exc}/nm (Fuente) | λ_{em}/nm | Muestra | Conc. | Atm. | $\tau/\mu s$ (%) | DS* | $\langle \tau \rangle^{**}$ / μs | DS* | χ^2 |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------|---------------------|---------------------|--|-------|----------|
| 560 (NKT láser 5,5 MHz) | 589 | RB | $2,7 \cdot 10^{-7}$ M | N ₂ | $2,2 \cdot 10^{-3}$ | $0,1 \cdot 10^{-3}$ | | | 1,107 |
| | | UC _{Er} @RB | <1 mg/mL | N ₂ | $1,5 \cdot 10^{-3}$ | $0,1 \cdot 10^{-3}$ | | | 1,244 |
| 560 ($\mu F2$) | 750 | RB | $1,6 \cdot 10^{-5}$ M | N ₂ | 250 | 2 | | | 1,014 |
| | | | | aire | < 8 | | | | |
| | | UC _{Er} @RB | 5 mg/mL | N ₂ | 165 | 2 | | | 0,977 |
| | | | | aire | < 8 | | | | |
| | 975 | UC _{Er} @RB | 5 mg/mL | N ₂ | 52,3 (65 %) | 0,5 | 94 | 2 | 1,476 |
| | | | | aire | 171 (35 %) | 3 | | | |
| | 1550 | UC _{Er} @RB | 5 mg/mL | N ₂ | 305 (17 %) | 3 | 1956 | 13 | 1,104 |
| | | | | aire | 2284 (83 %) | 13 | | | |
| | | | | aire | 209 (17 %) | 2 | 1799 | 12 | 1,387 |
| | | | | | 2115 (83%) | 12 | | | |
| 1275 | RB | $1,6 \cdot 10^{-5}$ M | aire | 23,4 | 0,2 | | | 1,002 | |
| | UC _{Er} @RB | 5 mg/mL | aire | 18,8 | 0,2 | | | 1,166 | |
| 525 | UC _{Er} | 5 mg/mL | N ₂ | 85,9 | 0,2 | | | 1,698 | |
| | UC _{Er} @RB | 5 mg/mL | N ₂ | 59,5 | 0,1 | | | 1,298 | |
| | | | aire | 62,9 | 0,1 | | | 1,078 | |
| | UC _{Er} | 5 mg/mL | N ₂ | 85,7 | 0,1 | | | 1,504 | |
| 540 | UC _{Er} @RB | 5 mg/mL | N ₂ | 59,3 | 0,1 | | | 1,310 | |
| | | | aire | 63,3 | 0,1 | | | 1,234 | |
| 975 (CNI láser CW) | 600 | UC _{Er} @RB | 5 mg/mL | N ₂ | 51,3 | 0,1 | | | 1,019 |
| | | | | aire | 56,0 | 0,1 | | | 1,056 |
| 655 | UC _{Er} | 5 mg/mL | N ₂ | 185 (87 %) | 3 | 205 | 9 | 1,108 | |
| | | | | 339 (13%) | 32 | | | | |
| | UC _{Er} @RB | 5 mg/mL | N ₂ | 127 (39 %) | 5 | 202 | 5 | 1,025 | |
| | | | aire | 251 (61 %) | 5 | | | | |
| | | aire | 79 (31 %) | 2 | 182 | 2 | 1,003 | | |
| | | | 228 (69 %) | 2 | | | | | |
| 1050 | UC _{Er} @RB | 1 mg/mL | N ₂ | 51 | 1 | | | 1,108 | |
| | | | aire | 52,1 | 0,7 | | | 1,134 | |

Capítulo 6. Estudio de la fotofísica del nanohíbrido UC_{Er}@RB

| | | | | | | | | |
|------|----------------------|---------|----------------|-------------|----|------|----|-------|
| 1550 | UC _{Er} @RB | 1 mg/mL | N ₂ | 286 (10 %) | 25 | 2170 | 92 | 1,004 |
| | | | | 2368 (90 %) | 92 | | | |
| | | | aire | 317 (11 %) | 19 | 2154 | 62 | 0,961 |
| | | | | 2381 (89 %) | 62 | | | |

*DS: desviación estándar; **τ: tiempo de vida promedio.

6.7. Referencias

- (1) Liu, Y.; Meng, X.; Bu, W. Upconversion-Based Photodynamic Cancer Therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *379*, 82–98. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.09.006>.
- (2) Juarranz, Á.; Jaén, P.; Sanz-Rodríguez, F.; Cuevas, J.; González, S. Photodynamic Therapy of Cancer. Basic Principles and Applications. *Clin. Transl. Oncol.* **2008**, *10* (3), 148–154. <https://doi.org/10.1007/s12094-008-0172-2>.
- (3) MacDonald, I. J.; Dougherty, T. J. Basic Principles of Photodynamic Therapy. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2001**, *5*, 105–129. <https://doi.org/10.1002/jpp.328>.
- (4) Schweitzer, C.; Mehrdad, Z.; Noll, A.; Grabner, E. W.; Schmidt, R. Mechanism of Photosensitized Generation of Singlet Oxygen during Oxygen Quenching of Triplet States and the General Dependence of the Rate Constants and Efficiencies of $O_2(^1\Sigma^+)$, $O_2(^1\Delta_g)$, and $O_2(^3\Sigma_g^-)$ Formation on Sensitizer Triplet State Energy and Oxidation Potential. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107* (13), 2192–2198. <https://doi.org/10.1021/jp026189d>.
- (5) Hamblin, M. R. Upconversion in Photodynamic Therapy: Plumbing the Depths. *Dalt. Trans.* **2018**, *47* (26), 8571–8580. <https://doi.org/10.1039/c8dt00087e>.
- (6) Ogilby, P. R. Singlet Oxygen: There Is Indeed Something New under the Sun. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (8), 3181–3209. <https://doi.org/10.1039/b926014p>.
- (7) Sai, D. L.; Lee, J.; Nguyen, D. L.; Kim, Y. P. Tailoring Photosensitive ROS for Advanced Photodynamic Therapy. *Exp. Mol. Med.* **2021**, *53* (4), 495–504. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00599-7>.
- (8) Ochsner, M. Photophysical and Photobiological Processes in the Photodynamic Therapy of Tumours. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1997**, *39* (1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(96\)07428-3](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(96)07428-3).
- (9) Nonell, S.; Braslavsky, S. E. Time-Resolved Singlet Oxygen Detection. *Methods Enzymol.* **2000**, *319*, 37–49. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)19006-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)19006-8).
- (10) DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J. Photosensitized Singlet Oxygen and Its Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *233–234*, 351–371. [https://doi.org/10.1016/s0010-8545\(02\)00034-6](https://doi.org/10.1016/s0010-8545(02)00034-6).
- (11) Soh, N. Recent Advances in Fluorescent Probes for the Detection of Reactive Oxygen Species. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386* (3), 532–543. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0366-9>.
- (12) Ferrera-González, J.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Functional Nanohybrids Based on Dyes and Upconversion Nanoparticles. In *Dyes and Photoactive Molecules in Microporous Systems. Structure and Bonding.*; López Arbeloa, F., Ed.; Springer: Cham, 2020; pp 371–396. https://doi.org/10.1007/430_2020_60.
- (13) Ideta, R.; Tasaka, F.; Jang, W.-D.; Nishiyama, N.; Zhang, G.-D.; Harada, A.; Yanagi, Y.; Tamaki, Y.; Aida, T.; Kataoka, K. Nanotechnology-Based Photodynamic Therapy for Neovascular Disease Using a Supramolecular Nanocarrier Loaded with a Dendritic Photosensitizer. *Nano Lett.* **2005**, *5* (12), 2426–2431. <https://doi.org/10.1021/nl051679d>.
- (14) Wang, C.; Cheng, L.; Liu, Z. Upconversion Nanoparticles for Photodynamic Therapy and Other Cancer Therapeutics. *Theranostics* **2013**, *3* (5), 317–330. <https://doi.org/10.7150/thno.5284>.

- (15) Dichtel, W. R.; Serin, J. M.; Edder, C.; Fréchet, J. M. J.; Matuszewski, M.; Tan, L. S.; Ohulchanskyy, T. Y.; Prasad, P. N. Singlet Oxygen Generation via Two-Photon Excited FRET. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (17), 5380–5381. <https://doi.org/10.1021/ja031647x>.
- (16) Samia, A. C. S.; Chen, X.; Burda, C. Semiconductor Quantum Dots for Photodynamic Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (51), 15736–15737. <https://doi.org/10.1021/ja0386905>.
- (17) Voliani, V.; Signore, G.; Vittorio, O.; Faraci, P.; Luin, S.; Pérez-Prieto, J.; Beltram, F. Cancer Phototherapy in Living Cells by Multiphoton Release of Doxorubicin from Gold Nanospheres. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (34), 4225–4230. <https://doi.org/10.1039/c3tb20798f>.
- (18) García Calavia, P.; Bruce, G.; Pérez-García, L.; Russell, D. A. Photosensitizer-Gold Nanoparticle Conjugates for Photodynamic Therapy of Cancer. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2018**, *17* (11), 1534–1552. <https://doi.org/10.1039/c8pp00271a>.
- (19) Planas, O.; Macia, N.; Agut, M.; Nonell, S.; Heyne, B. Distance-Dependent Plasmon-Enhanced Singlet Oxygen Production and Emission for Bacterial Inactivation. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (8), 2762–2768. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b12704>.
- (20) Wang, C.; Cheng, L.; Liu, Z. Upconversion Nanoparticles for Photodynamic Therapy and Other Cancer Therapeutics. *Theranostics* **2013**, *3* (5), 317–330. <https://doi.org/10.7150/thno.5284>.
- (21) Liu, X.; Que, I.; Kong, X.; Zhang, Y.; Tu, L.; Chang, Y.; Wang, T. T.; Chan, A.; Löwik, C. W. G. M.; Zhang, H. In Vivo 808 Nm Image-Guided Photodynamic Therapy Based on an Upconversion Theranostic Nanoplatform. *Nanoscale* **2015**, *7* (36), 14914–14923. <https://doi.org/10.1039/c5nr03690a>.
- (22) Zhang, P.; Steelant, W.; Kumar, M.; Scholfield, M. Versatile Photosensitizers for Photodynamic Therapy at Infrared Excitation. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (15), 4526–4527. <https://doi.org/10.1021/ja0700707>.
- (23) Chatterjee, D. K.; Yong, Z. Upconverting Nanoparticles as Nanotransducers for Photodynamic Therapy in Cancer Cells. *Nanomedicine*, **2008**, *3* (1), 73–82. <https://doi.org/10.2217/17435889.3.1.73>.
- (24) Qian, H. S.; Guo, H. C.; Ho, P. C. L.; Mahendran, R.; Zhang, Y. Mesoporous-Silica-Coated Up-Conversion Fluorescent Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Small* **2009**, *5* (20), 2285–2290. <https://doi.org/10.1002/sml.200900692>.
- (25) Wang, C.; Tao, H.; Cheng, L.; Liu, Z. Near-Infrared Light Induced in Vivo Photodynamic Therapy of Cancer Based on Upconversion Nanoparticles. *Biomaterials* **2011**, *32* (26), 6145–6154. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.007>.
- (26) Shan, J.; Budijono, S. J.; Hu, G.; Yao, N.; Kang, Y.; Ju, Y.; Prud'Homme, R. K. Pegylated Composite Nanoparticles Containing Upconverting Phosphors and Meso-Tetraphenyl Porphine (TPP) for Photodynamic Therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21* (13), 2488–2495. <https://doi.org/10.1002/adfm.201002516>.
- (27) Cui, S.; Chen, H.; Zhu, H.; Tian, J.; Chi, X.; Qian, Z.; Achilefu, S.; Gu, Y. Amphiphilic Chitosan Modified Upconversion Nanoparticles for in Vivo Photodynamic Therapy Induced by Near-Infrared Light. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22* (11), 4861–4873. <https://doi.org/10.1039/c2jm16112e>.
- (28) Chen, F.; Zhang, S.; Bu, W.; Chen, Y.; Xiao, Q.; Liu, J.; Xing, H.; Zhou, L.; Peng,

- W.; Shi, J. A Uniform Sub-50 nm-Sized Magnetic/Upconversion Fluorescent Bimodal Imaging Agent Capable of Generating Singlet Oxygen by Using a 980 nm Laser. *Chem. – A Eur. J.* **2012**, *18* (23), 7082–7090. <https://doi.org/10.1002/chem.201103611>.
- (29) Idris, N. M.; Gnanasammandhan, M. K.; Zhang, J.; Ho, P. C.; Mahendran, R.; Zhang, Y. In Vivo Photodynamic Therapy Using Upconversion Nanoparticles as Remote-Controlled Nanotransducers. *Nat. Med.* **2012**, *18* (10), 1580–1585. <https://doi.org/10.1038/nm.2933>.
- (30) Liu, K.; Liu, X.; Zeng, Q.; Zhang, Y.; Tu, L.; Liu, T.; Kong, X.; Wang, Y.; Cao, F.; Lambrechts, S. A. G. G.; et al. Covalently Assembled NIR Nanoplatform for Simultaneous Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy of Cancer Cells. *ACS Nano* **2012**, *6* (5), 4054–4062. <https://doi.org/10.1021/nn300436b>.
- (31) Qiao, X. F.; Zhou, J. C.; Xiao, J. W.; Wang, Y. F.; Sun, L. D.; Yan, C. H. Triple-Functional Core–Shell Structured Upconversion Luminescent Nanoparticles Covalently Grafted with Photosensitizer for Luminescent, Magnetic Resonance Imaging and Photodynamic Therapy in Vitro. *Nanoscale* **2012**, *4* (15), 4611–4623. <https://doi.org/10.1039/c2nr30938f>.
- (32) Tian, G.; Ren, W.; Yan, L.; Jian, S.; Gu, Z.; Zhou, L.; Jin, S.; Yin, W.; Li, S.; Zhao, Y. Red-Emitting Upconverting Nanoparticles for Photodynamic Therapy in Cancer Cells under near-Infrared Excitation. *Small* **2013**, *9* (11), 1929–1938. <https://doi.org/10.1002/sml.201201437>.
- (33) Wang, C.; Cheng, L.; Liu, Y.; Wang, X.; Ma, X.; Deng, Z.; Li, Y.; Liu, Z. Imaging-Guided PH-Sensitive Photodynamic Therapy Using Charge Reversible Upconversion Nanoparticles under Near-Infrared Light. *Adv. Funct. Mater.* **2013**, *23* (24), 3077–3086. <https://doi.org/10.1002/adfm.201202992>.
- (34) González-Béjar, M.; Liras, M.; Francés-Soriano, L.; Voliani, V.; Herranz-Pérez, V.; Duran-Moreno, M.; Garcia-Verdugo, J. M.; Alarcon, E. I.; Scaiano, J. C.; Pérez-Prieto, J. NIR Excitation of Upconversion Nanohybrids Containing a Surface Grafted Bodipy Induces Oxygen-Mediated Cancer Cell Death. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (28), 4554–4563. <https://doi.org/10.1039/c4tb00340c>.
- (35) Xia, L.; Kong, X.; Liu, X.; Tu, L.; Zhang, Y.; Chang, Y.; Liu, K.; Shen, D.; Zhao, H.; Zhang, H. An Upconversion Nanoparticle – Zinc Phthalocyanine Based Nanophotosensitizer for Photodynamic Therapy. *Biomaterials* **2014**, *35* (13), 4146–4156. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.01.068>.
- (36) Fan, W.; Shen, B.; Bu, W.; Zheng, X.; He, Q.; Cui, Z.; Ni, D.; Zhao, K.; Zhang, S.; Shi, J. Intranuclear Biophotonics by Smart Design of Nuclear-Targeting Photo-/Radio-Sensitizers Co-Loaded Upconversion Nanoparticles. *Biomaterials* **2015**, *69*, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.017>.
- (37) Zhang, T.; Lin, H.; Cui, L.; An, N.; Tong, R.; Chen, Y.; Yang, C.; Li, X.; Liu, J.; Qu, F. Near Infrared Light Triggered Reactive Oxygen Species Responsive Upconversion Nanoplatform for Drug Delivery and Photodynamic Therapy. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, *2016* (8), 1206–1213. <https://doi.org/10.1002/ejic.201501320>.
- (38) Tou, M.; Luo, Z.; Bai, S.; Liu, F.; Chai, Q.; Li, S.; Li, Z. Sequential Coating Upconversion NaYF₄:Yb,Tm Nanocrystals with SiO₂ and ZnO Layers for NIR-Driven Photocatalytic and Antibacterial Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *70*, 1141–1148. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.038>.
- (39) Xu, J.; Lv, R.; Du, S.; Gai, S.; He, F.; Yang, D.; Yang, P. UCNPs@gelatin–ZnPc

- Nanocomposite: Synthesis, Imaging and Anticancer Properties. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4* (23), 4138–4146. <https://doi.org/10.1039/c6tb00714g>.
- (40) Xu, J.; Xu, L.; Wang, C.; Yang, R.; Zhuang, Q.; Han, X.; Dong, Z.; Zhu, W.; Peng, R.; Liu, Z. Near-Infrared-Triggered Photodynamic Therapy with Multitasking Upconversion Nanoparticles in Combination with Checkpoint Blockade for Immunotherapy of Colorectal Cancer. *ACS Nano* **2017**, *11* (5), 4463–4474. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00715>.
- (41) Zhang, Y.; Huang, P.; Wang, D.; Chen, J.; Liu, W.; Hu, P.; Huang, M.; Chen, X.; Chen, Z. Near-Infrared-Triggered Antibacterial and Antifungal Photodynamic Therapy Based on Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles. *Nanoscale* **2018**, *10* (33), 15485–15495. <https://doi.org/10.1039/c8nr01967c>.
- (42) Francés-Soriano, L.; Zakharko, M. A.; González-Béjar, M. M.; Panchenko, P. A.; Herranz-Pérez, V.; Pritmov, D. A.; Grin, M. A. M. A.; Mironov, A. F.; García-Verdugo, J. M.; Fedorova, O. A.; et al. Nanohybrid for Photodynamic Therapy and Fluorescence Imaging Tracking without Therapy. *Chem. Mater.* **2018**, *30* (11), 3677–3682. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.8b00276>.
- (43) Liu, W.; Zhang, Y.; You, W.; Su, J.; Yu, S.; Dai, T.; Huang, Y.; Chen, X.; Song, X.; Chen, Z. Near-Infrared-Excited Upconversion Photodynamic Therapy of Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter Baumannii* Based on Lanthanide Nanoparticles. *Nanoscale* **2020**, *12* (26), 13948–13957. <https://doi.org/10.1039/d0nr01073a>.
- (44) Ghorashi, M. S.; Madaah Hosseini, H. R.; Mohajerani, E.; Pedroni, M.; Taheri Ghahrizjani, R. Enhanced TiO₂Broadband Photocatalytic Activity Based on Very Small Upconversion Nanosystems. *J. Phys. Chem. C* **2021**, *125* (25), 13788–13801. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c01403>.
- (45) Karami, A.; Farivar, F.; De Prinse, T. J.; Rabiee, H.; Kidd, S.; Sumby, C. J.; Bi, J. Facile Multistep Synthesis of ZnO-Coated β -NaYF₄:Yb/Tm Upconversion Nanoparticles as an Antimicrobial Photodynamic Therapy for Persistent *Staphylococcus Aureus* Small Colony Variants. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4* (8), 6125–6136. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00473>.
- (46) Jin, F.; Qi, J.; Liu, D.; You, Y.; Shu, G.; Du, Y.; Wang, J.; Xu, X.; Ying, X.; Ji, J.; et al. Cancer-Cell-Biomimetic Upconversion Nanoparticles Combining Chemo-Photodynamic Therapy and CD73 Blockade for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *J. Control. Release* **2021**, *337*, 90–104. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.07.021>.
- (47) Chen, X.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Zhang, Z.; Zhang, Y. Rationally Designed Upconversion Nanoparticles for NIR Light-Controlled Lysosomal Escape and Nucleus-Based Photodynamic Therapy. *Microchim. Acta* **2021**, *188* (10), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04915-w>.
- (48) Gülerüyüz, B.; Ünal, U.; Gülsoy, M. Near Infrared Light Activated Upconversion Nanoparticles (UCNP) Based Photodynamic Therapy of Prostate Cancers: An in Vitro Study. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2021**, *36*, 102616. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102616>.
- (49) Ding, J.; Jin, Y.; Zhu, F.; Zhu, C.; Peng, J.; Su, T.; Cai, J. Facile Synthesis of NaYF₄:Yb Up-Conversion Nanoparticles Modified with Photosensitizer and Targeting Antibody for In Vitro Photodynamic Therapy of Hepatocellular Carcinoma. *J. Healthc. Eng.* **2022**, *2022*, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2022/4470510>.
- (50) Zhou, A.; Wei, Y.; Wu, B.; Chen, Q.; Xing, D. Pyropheophorbide A and c(RGDyK)

- Comodified Chitosan-Wrapped Upconversion Nanoparticle for Targeted Near-Infrared Photodynamic Therapy. *Mol. Pharm.* **2012**, *9* (6), 1580–1589. <https://doi.org/10.1021/mp200590y>.
- (51) Yuan, Q.; Wu, Y.; Wang, J.; Lu, D.; Zhao, Z.; Liu, T.; Zhang, X.; Tan, W. Targeted Bioimaging and Photodynamic Therapy Nanoplatform Using an Aptamer-Guided G-Quadruplex DNA Carrier and Near-Infrared Light. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52* (52), 13965–13969. <https://doi.org/10.1002/anie.201305707>.
- (52) Chen, F.; Zhang, S.; Bu, W.; Chen, Y.; Xiao, Q.; Liu, J.; Xing, H.; Zhou, L.; Peng, W.; Shi, J. A Uniform Sub-50 Nm-Sized Magnetic/Upconversion Fluorescent Bimodal Imaging Agent Capable of Generating Singlet Oxygen by Using a 980 Nm Laser. *Chem. – A Eur. J.* **2012**, *18* (23), 7082–7090. <https://doi.org/10.1002/chem.201103611>.
- (53) Qian, H. S.; Guo, H. C.; Ho, P. C.-L.; Mahendran, R.; Zhang, Y. Mesoporous-Silica-Coated Up-Conversion Fluorescent Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Small* **2009**, *5* (20), 2285–2290. <https://doi.org/10.1002/smll.200900692>.
- (54) Cui, S.; Yin, D.; Chen, Y.; Di, Y.; Chen, H.; Ma, Y.; Achilefu, S.; Gu, Y. In Vivo Targeted Deep-Tissue Photodynamic Therapy Based on Near-Infrared Light Triggered Upconversion Nanoconstruct. *ACS Nano* **2013**, *7* (1), 676–688. <https://doi.org/10.1021/nn304872n>.
- (55) Xiao, Q.; Ji, Y.; Xiao, Z.; Zhang, Y.; Lin, H.; Wang, Q. Novel Multifunctional NaYF₄:Er³⁺,Yb³⁺/PEGDA Hybrid Microspheres: NIR-Light-Activated Photopolymerization and Drug Delivery. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (15), 1527–1529. <https://doi.org/10.1039/c2cc37620b>.
- (56) Guo, H.; Qian, H.; Idris, N. M.; Zhang, Y. Singlet Oxygen-Induced Apoptosis of Cancer Cells Using Upconversion Fluorescent Nanoparticles as a Carrier of Photosensitizer. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2010**, *6* (3), 486–495. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.11.004>.
- (57) Wang, X.; Yang, C. X.; Chen, J. T.; Yan, X. P. A Dual-Targeting Upconversion Nanoplatform for Two-Color Fluorescence Imaging-Guided Photodynamic Therapy. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (7), 3263–3267. <https://doi.org/10.1021/ac500060c>.
- (58) Guo, Y.; Kumar, M.; Zhang, P. Nanoparticle-Based Photosensitizers under CW Infrared Excitation. *Chem. Mater.* **2007**, *19* (25), 6071–6072. <https://doi.org/10.1021/cm7028454>.
- (59) Yang, X.; Xiao, Q.; Niu, C.; Jin, N.; Ouyang, J.; Xiao, X.; He, D. Multifunctional Core-Shell Upconversion Nanoparticles for Targeted Tumor Cells Induced by near-Infrared Light. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (21), 2757–2763. <https://doi.org/10.1039/c3tb00575e>.
- (60) Park, Y. Il; Kim, H. M.; Kim, J. H.; Moon, K. C.; Yoo, B.; Lee, K. T.; Lee, N.; Choi, Y.; Park, W.; Ling, D.; et al. Theranostic Probe Based on Lanthanide-Doped Nanoparticles for Simultaneous In Vivo Dual-Modal Imaging and Photodynamic Therapy. *Adv. Mater.* **2012**, *24* (42), 5755–5761. <https://doi.org/10.1002/adma.201202433>.
- (61) Zhang, P.; Steelant, W.; Kumar, M.; Scholfield, M. Versatile Photosensitizers for Photodynamic Therapy at Infrared Excitation. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (15), 4526–4527. <https://doi.org/10.1021/ja0700707>.
- (62) Hou, Z.; Deng, K.; Li, C.; Deng, X.; Lian, H.; Cheng, Z.; Jin, D.; Lin, J. 808 Nm Light-Triggered and Hyaluronic Acid-Targeted Dual-Photosensitizers Nanoplatform

- by Fully Utilizing Nd³⁺-Sensitized Upconversion Emission with Enhanced Anti-Tumor Efficacy. *Biomaterials* **2016**, *101*, 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.05.024>.
- (63) Shamsipur, M.; Barati, A.; Nematifar, Z. Fluorescent PH Nanosensors: Design Strategies and Applications. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2019**, *39*, 76–141. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2019.03.001>.
- (64) Francés-Soriano, L.; Liras, M.; Kowalczyk, A.; Bednarkiewicz, A.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Energy Transfer in DiiodoBodipy-Grafted Upconversion Nanohybrids. *Nanoscale* **2016**, *8* (1), 204–208. <https://doi.org/10.1039/c5nr07229h>.
- (65) Liu, Y.; Meng, X.; Bu, W. Upconversion-Based Photodynamic Cancer Therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *379*, 82–98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.09.006>.
- (66) Andresen, E.; Resch-Genger, U.; Schäferling, M. Surface Modifications for Photon-Upconversion-Based Energy-Transfer Nanoprobes. *Langmuir* **2019**, *35* (15), 5093–5113. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00238>.
- (67) Garfield, D. J.; Borys, N. J.; Hamed, S. M.; Torquato, N. A.; Tajon, C. A.; Tian, B.; Shevitski, B.; Barnard, E. S.; Suh, Y. D.; Aloni, S.; et al. Enrichment of Molecular Antenna Triplets Amplifies Upconverting Nanoparticle Emission. *Nat. Photonics* **2018**, *12* (7), 402–407. <https://doi.org/10.1038/s41566-018-0156-x>.
- (68) Hebbink, G. A.; Grave, L.; Woldering, L. A.; Reinhoudt, D. N.; Van Veggel, F. C. J. M. Unexpected Sensitization Efficiency of the Near-Infrared Nd³⁺, Er³⁺, and Yb³⁺ Emission by Fluorescein Compared to Eosin and Erythrosin. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107* (14), 2483–2491. <https://doi.org/10.1021/jp0260090>.
- (69) Han, S.; Yi, Z.; Zhang, J.; Gu, Q.; Liang, L.; Qin, X.; Xu, J.; Wu, Y.; Xu, H.; Rao, A.; et al. Photon Upconversion through Triplet Exciton-Mediated Energy Relay. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3704, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23967-3>.
- (70) Wisser, M. D.; Fischer, S.; Siefe, C.; Alivisatos, A. P.; Salleo, A.; Dionne, J. A. Improving Quantum Yield of Upconverting Nanoparticles in Aqueous Media via Emission Sensitization. *Nano Lett.* **2018**, *18* (4), 2689–2695. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b00634>.
- (71) Muhr, V.; Würth, C.; Kraft, M.; Buchner, M.; Baeumner, A. J.; Resch-Genger, U.; Hirsch, T. Particle-Size-Dependent Förster Resonance Energy Transfer from Upconversion Nanoparticles to Organic Dyes. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (9), 4868–4874. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04662>.
- (72) Ludvíková, L.; Friš, P.; Heger, D.; Šebej, P.; Wirz, J.; Klán, P. Photochemistry of Rose Bengal in Water and Acetonitrile: A Comprehensive Kinetic Analysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (24), 16266–16273. <https://doi.org/10.1039/c6cp01710j>.
- (73) Wang, Y.; Liu, K.; Liu, X.; Dohnalová, K.; Gregorkiewicz, T.; Kong, X.; Aalders, M. C. G.; Buma, W. J.; Zhang, H. Critical Shell Thickness of Core/Shell Upconversion Luminescence Nanoplatforam for FRET Application. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2* (17), 2083–2088. <https://doi.org/10.1021/jz200922f>.
- (74) Hestand, N. J.; Spano, F. C. Expanded Theory of H- and J-Molecular Aggregates: The Effects of Vibronic Coupling and Intermolecular Charge Transfer. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (15), 7069–7163. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00581>.
- (75) Ji, C.; Lai, L.; Li, P.; Wu, Z.; Cheng, W.; Yin, M. Organic Dye Assemblies with Aggregation-induced Photophysical Changes and Their Bio-applications. *Aggregate* **2021**, *2* (e39), 1–15. <https://doi.org/10.1002/agt2.39>.

- (76) Fazylova, V.; Shevtsev, N.; Mikhailov, S.; Kim, G.; Ostroushko, A.; Grzhegorzhevskii, K. Fundamental Aspects of Xanthene Dye Aggregation on the Surfaces of Nanocluster Polyoxometalates: H- to J-Aggregate Switching. *Chem. – A Eur. J.* **2020**, *26* (25), 5685–5693. <https://doi.org/10.1002/chem.201905781>.
- (77) Mao, D.; Hu, F.; Yi, Z.; Kenry, K.; Xu, S.; Yan, S.; Luo, Z.; Wu, W.; Wang, Z.; Kong, D.; et al. AIEgen-Coupled Upconversion Nanoparticles Eradicate Solid Tumors through Dual-Mode ROS Activation. *Sci. Adv.* **2020**, *6* (26). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb2712>.
- (78) Montes-Navajas, P.; Corma, A.; García, H. Complexation and Fluorescence of Tricyclic Basic Dyes Encapsulated in Cucurbiturils. *ChemPhysChem* **2008**, *9* (5), 713–720. <https://doi.org/10.1002/cphc.200700735>.
- (79) Montes-Navajas, P.; González-Béjar, M.; Scaiano, J. C.; García, H. Cucurbituril Complexes Cross the Cell Membrane. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8* (12), 1743–1747. <https://doi.org/10.1039/b9pp00041k>.
- (80) Xu, D.; Neckers, D. C. Aggregation of Rose Bengal Molecules in Solution. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1987**, *40*, 361–370.
- (81) Rodríguez, H. B.; Lagorio, M. G.; Román, E. S. Rose Bengal Adsorbed on Microgranular Cellulose: Evidence on Fluorescent Dimers. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3* (7), 674–680. <https://doi.org/10.1039/b402484b>.
- (82) Valdes-Aguilera, O.; Neckers, D. C. Aggregation of Rose Bengal Ethyl Ester Induced by Alkali Metal Cations in Aqueous Solution. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **1989**, *47* (2), 213–222. [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(89\)87067-4](https://doi.org/10.1016/1010-6030(89)87067-4).
- (83) Valdes-Aguilera, O.; Neckers, D. C. Rose Bengal Ethyl Ester Aggregation in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem.* **2002**, *92* (15), 4286–4289. <https://doi.org/10.1021/j100326a010>.
- (84) Daraio, M. E.; San, E.; Ân, R. Aggregation and Photophysics of Rose Bengal in Alumina-Coated Colloidal Suspensions. <https://doi.org/10.1002/1522-2675>.
- (85) Alarcón, E.; Edwards, A. M.; Aspée, A.; Borsarelli, C. D.; Lissi, E. A. Photophysics and Photochemistry of Rose Bengal Bound to Human Serum Albumin. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8* (7), 933–943. <https://doi.org/10.1039/b901056d>.
- (86) Turbay, M. B. E.; Rey, V.; Argañaraz, N. M.; Morán Vieyra, F. E.; Aspée, A.; Lissi, E. A.; Borsarelli, C. D. Effect of Dye Localization and Self-Interactions on the Photosensitized Generation of Singlet Oxygen by Rose Bengal Bound to Bovine Serum Albumin. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2014**, *141*, 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.09.014>.
- (87) Litman, Y.; Voss, M. G.; Rodríguez, H. B.; Román, E. S. Effect of Concentration on the Formation of Rose Bengal Triplet State on Microcrystalline Cellulose: A Combined Laser-Induced Optoacoustic Spectroscopy, Diffuse Reflectance Flash Photolysis, and Luminescence Study. *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118* (45), 10531–10537. <https://doi.org/10.1021/jp5045095>.
- (88) Kamat, P. V.; Ford, W. E. Photochemistry on Surfaces: Triplet-Triplet Energy Transfer on Colloidal TiO₂ Particles. *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *135* (4–5), 421–426. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(87\)85182-5](https://doi.org/10.1016/0009-2614(87)85182-5).
- (89) Mendes, B.; Kassumeh, S.; Aguirre-Soto, A.; Pei, Q.; Heyne, B.; Kochevar, I. E. Influence of Rose Bengal Dimerization on Photosensitization. *Photochem. Photobiol.* **2021**, *97* (4), 718–726. <https://doi.org/10.1111/php.13379>.
- (90) Ren, W.; Wen, S.; Tawfik, S. A.; Su, Q. P.; Lin, G.; Ju, L. A.; Ford, M. J.; Ghodke,

- H.; Van Oijen, A. M.; Jin, D. Anisotropic Functionalization of Upconversion Nanoparticles. *Chem. Sci.* **2018**, *9* (18), 4352–4358. <https://doi.org/10.1039/c8sc01023d>.
- (91) Na, H.; Woo, K.; Lim, K.; Jang, H. S. Rational Morphology Control of β -NaYF₄:Yb,Er/Tm Upconversion Nanophosphors Using a Ligand, an Additive, and Lanthanide Doping. *Nanoscale* **2013**, *5* (10), 4242–4251. <https://doi.org/10.1039/c3nr00080j>.
- (92) Lahtinen, S.; Lyytikäinen, A.; Päckilä, H.; Hömppi, E.; Perälä, N.; Lastusaari, M.; Soukka, T. Disintegration of Hexagonal NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ Upconverting Nanoparticles in Aqueous Media: The Role of Fluoride in Solubility Equilibrium. *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121* (1), 656–665. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b09301>.
- (93) Ford, W. E.; Kamat, P. V. Photochemistry on Surfaces. 3. Spectral and Photophysical Properties of Monomeric and Dimeric Anthracenesulfonates Adsorbed to Colloidal Alumina-Coated Silica Particles. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 6423–6428.
- (94) Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. Photophysics of Organic Molecules in Solution. In *Handbook of Photochemistry*; Marcel Dekker, INC.: New York, 1993; pp 1–53.
- (95) Severino, D.; Junqueira, H.C.; Gugliotti, M.; Gabrielli, D.S.; Baptista, M.S. Influence of Negatively Charged Interfaces on the Ground and Excited State Properties of Methylene Blue. *Photochem. Photobiol.* **2003**, *77*, 459–468. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0770459ioncio2.0.co2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0770459ioncio2.0.co2).
- (96) Nasr, C.; Liu, D.; Hotchandani, S.; Kamat, P. V. Dye-Capped Semiconductor Nanoclusters. Excited State and Photosensitization Aspects of Rhodamine 6G H-Aggregates Bound to SiO₂ and SnO₂ Colloids. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (26), 11054–11061. <https://doi.org/10.1021/jp9537724>.
- (97) Parker, C. A.; Hatchard, C. G. Triplet-Singlet Emission in Fluid Solutions: Phosphorescence of Eosin. *Trans. Faraday Soc.* **1961**, *57*, 1894–1904.
- (98) Yang, Z.; Mao, Z.; Xie, Z.; Zhang, Y.; Liu, S.; Zhao, J.; Xu, J.; Chi, Z.; Aldred, M. P. Recent Advances in Organic Thermally Activated Delayed Fluorescence Materials. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (3), 915–1016. <https://doi.org/10.1039/c6cs00368k>.
- (99) Scholz, M.; Dëdic, R.; Breitenbach, T.; Hála, J. Singlet Oxygen-Sensitized Delayed Fluorescence of Common Water-Soluble Photosensitizers. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12* (10), 1873–1884. <https://doi.org/10.1039/c3pp50170a>.
- (100) Wang, C.; Tao, H.; Cheng, L.; Liu, Z. Near-Infrared Light Induced in Vivo Photodynamic Therapy of Cancer Based on Upconversion Nanoparticles. *Biomaterials* **2011**, *32* (26), 6145–6154. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.007>.
- (101) Zhang, D.; Wen, L.; Huang, R.; Wang, H.; Hu, X.; Xing, D. Mitochondrial Specific Photodynamic Therapy by Rare-Earth Nanoparticles Mediated near-Infrared Graphene Quantum Dots. *Biomaterials* **2018**, *153*, 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.034>.
- (102) Chen, X.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Zhang, Z.; Zhang, Y. Rationally Designed Upconversion Nanoparticles for NIR Light-Controlled Lysosomal Escape and Nucleus-Based Photodynamic Therapy. *Microchim. Acta* **2021**, *188* (10), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00604-021-04915-W>.
- (103) Li, Z.; Zhang, Y. An Efficient and User-Friendly Method for the Synthesis of Hexagonal-Phase NaYF₄:Yb, Er/Tm Nanocrystals with Controllable Shape and

- Upconversion Fluorescence. *Nanotechnology* **2008**, *19* (34), 16–21. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/34/345606>.
- (104) Dong, A.; Ye, X.; Chen, J.; Kang, Y.; Gordon, T.; Kikkawa, J. M.; Murray, C. B. A Generalized Ligand-Exchange Strategy Enabling Sequential Surface Functionalization of Colloidal Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (4), 998–1006. <https://doi.org/10.1021/jal08948z>.
- (105) Wilhelm, S.; Kaiser, M.; Würth, C.; Heiland, J.; Carrillo-Carrion, C.; Muhr, V.; Wolfbeis, O. S.; Parak, W. J.; Resch-Genger, U.; Hirsch, T. Water Dispersible Upconverting Nanoparticles: Effects of Surface Modification on Their Luminescence and Colloidal Stability. *Nanoscale* **2015**, *7* (4), 1403–1410. <https://doi.org/10.1039/c4nr05954a>.

Conclusiones

Capítulo 7

7. Conclusiones

Las conclusiones de esta tesis centrada en la caracterización fotofísica y visualización de las UCNP y UCNH pueden resumirse en:

- Se ha desarrollado una técnica (NIR-LSM) que permite medir el tiempo de vida empírico de emisión UC de UCNP y UCNH, evaluar la homogeneidad en el dopaje de las UCNP y la homogeneidad en la funcionalización de UCNH compuestos de UCNP y colorantes.
- Se ha desarrollado un UCNH ($UC_{Tm}@CB@Y@F$) sensor ratiométrico de pH que reúne de forma sinérgica mediante una transferencia de energía resonante las propiedades de la UCNP (excitación en el NIR y emisión en el vis) y la sonda química (sonda de pH) que lo componen. Además, destaca que el procedimiento de síntesis sigue una metodología tipo puzle sencilla aprovechando las propiedades coordinantes de un ligando macrocíclico: el cucurbit[7]urilo.
- Tanto las UCNP sin ligandos superficiales (UC_{Er}) como las recubiertas con cucurbit[7]urilo ($UC_{Er}@CB$) se internalizan en el medio celular (HeLa y RAW 264.7), y ambas son poco citotóxicas. Si bien, el recubrimiento con el macrociclo reduce la citotoxicidad de las UCNP. En ambos casos el mecanismo de inducción de citotoxicidad es a través de la inducción de la apoptosis.

- Para un UCNH ($UC_{Er}@RB$) prueba de concepto compuesto por una UCNP (UC_{Er}) y un fotosensibilizador orgánico (RB) se encuentra que el fotosensibilizador se agrega en la superficie de la UCNP y que se producen transferencias de energía desde el estado excitado singlete y el estado excitado triplete del fotosensibilizador a los lantánidos de la UCNP. También se observa que se modifican las propiedades fotofísicas del colorante cuando está funcionalizado en la UCNP: disminuye su fluorescencia, disminuye su fosforescencia, se genera la misma cantidad de triplete pero la formación de especies radicalarias se ve impedida, en comparación con el RB libre. Asimismo, la presencia del colorante orgánico disminuye el rendimiento cuántico UC de la UCNP y la intensidad y tiempo de vida de las emisiones UC de la UCNP afectadas por la absorción del fotosensibilizador.

Técnicas Instrumentales

Capítulo 8

8. Técnicas Instrumentales

Microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes de TEM se registraron operando a 100 kV en un microscopio Jeol 1010 del servicio central de apoyo a la investigación (SCSIE) de la Universidad de Valencia equipado con una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) de 8 Mpx (AMT RX80). La preparación de las muestras de UCNP se realizó dejando secar una alícuota de 10 μL de dispersiones de 0,5-2 mg/mL de UCNP a temperatura ambiente sobre una película de formvar/carbono soportado en una rejilla de cobre de malla de 300. Las imágenes de microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM) se registraron en el microscopio TECNAI G2 F20 operando a 200kV (resolución puntual: 0,24 nm) equipado con una cámara CCD de 1 Mpx (Gatan Multiscan 794).

Microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM). Las imágenes de TEM de alta resolución (HRTEM) se registraron en un microscopio TECNAI G2 F20 del SCSIE operando a 200 kV (resolución puntual 0,24 nm) y equipado con una cámara CCD GATAN. Las muestras se prepararon dejando secar a temperatura ambiente 10 μL de una dispersión 0,5-2 mg/mL de UCNP sobre una rejilla de cobre de malla 300 con una película de formvar/carbono.

Microscopía electrónica de barrido (SEM). Las imágenes SEM se registraron en el microscopio de campo de emisión HITACHI S-4800 del SCSIE trabajando a 20 kV. Las muestras de UCNP se depositaron sobre portaobjetos de vidrio por recubrimiento por centrifugación.

Análisis de energía de dispersión de rayos X (EDX). El análisis EDX se realizó en el microscopio electrónico de barrido HITACHI S-4800 del SCSIE equipado con el detector Bruker XFlash 5030 y con el software QUANTAX 400. Las muestras de UCNP se depositaron sobre cinta de carbono adhesiva para su análisis.

Difracción de rayos X (XRD). Los difractogramas de XRD se registraron en el difractómetro Bruker D8 Advance A25 con detector LynxEye del SCSIE, usando radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1,54060 \text{ \AA}$) a 40 kV y 30 mA. El patrón de difracción de polvo se obtuvo realizando un barrido de $2\text{-}80^\circ$ (2θ) a intervalos de $0,020^\circ$ a temperatura ambiente.

Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Los análisis ICP se encargaron al SCSIE, que usa un equipo ICP-MS Agilent 7900.

Centrifugación. La centrifugación se realiza en una centrífuga 5804 R (Eppendorf) y en una centrífuga Sorvall Legend X1R (Thermo Scientific).

Microscopía de barrido láser de infrarrojo cercano (NIR-LSM). La técnica NIR-LSM se utilizó para obtener la fotoluminiscencia resuelta en el tiempo para los UCNH y la colocalización visual. NIR-LSM se realizó en un microscopio multifotón comercial (FV1000MPE, Olympus) compuesto por un microscopio vertical BX61WI con un objetivo de inmersión en agua de 25 aumentos (Olympus XLPLN25x WMP 1.05NA) y un láser de femtosegundos de Ti-zafiro (Mai-Tai HP Deep See, Spectra Physics) como fuente de excitación sintonizable entre 690 - 1040 nm (potencia promedio: 2,0 W; anchura de pulso: 100-150 fs; frecuencia:

80 MHz). Presenta un sistema de detección con filtros y diodos utilizando 4 fotomultiplicadores que permiten la detección simultánea de la emisión en 4 canales: 420-500 nm (canal 1, C1), 515-580 nm (canal 2, C2), 590-650 nm (canal 3, C3) y 660-740 nm (canal 4, C4). Para registrar las imágenes se excitó la muestra a 900 y 980 nm, se utilizaron *dwell time* de 4 y 8 $\mu\text{s}/\text{píxel}$ y una resolución de 1024×1024 píxeles² sin aumentos. La potencia de excitación se expresa como densidad de energía por *dwell time* (F_d).

Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial zeta. El diámetro hidrodinámico y potencial zeta se midieron en un Zetasizer Ultra (Malvern, UK). Las medidas de diámetro hidrodinámico se realizaron en cubeta de cuarzo (1 cm de paso óptico) y las medidas de potencial zeta en cubetas capilares desechables (DTS1070, Malvern UK).

Espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FTIR). Los espectros FTIR se realizaron en el espectrofotómetro FTIR Thermo Nicolet Nexus a temperatura ambiente con 64 barridos y una resolución de 4 cm^{-1} entre $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$. La preparación de la muestra para el análisis FTIR consiste en fabricar una pastilla, mediante una prensa hidráulica, con una mezcla, previamente triturada en un mortero de ágata, de una pequeña cantidad de muestra (sólida) y KBr (seco).

Espectroscopía UV-vis. Los espectros de absorción/atenuación UV-vis-NIR de coloides de UCNH se han registrado en cubetas de cuarzo (1 cm de paso óptico) en dos equipos:

- Espectrofotómetro UV-vis-NIR Lambda 1050 (Perkin Elmer) provisto con el software UV WinLab (capítulos 3, 4 –UC_{Tm}@Rod110– y 6).
- Espectrómetro SECOMAN Uvi LightXT-5 provisto con el software Lab power junior v.3.05 (capítulo 4 –UC_{Tm}@CB@Y@F–).

Fotoluminiscencia en estado estacionario. La fotoluminiscencia en estado estacionario se registra en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico en dos equipos:

➤ Fluorímetro SLM Amingo Bowman series 2 (AB2) acoplado con un diodo láser onda continua de 980 nm (MDL-H-980-5W-17111142, CNI Optoelectronics Tech. Co.) como fuente de excitación (capítulos 3 y 4). Los espectros se registraron a temperatura ambiente, en cubetas de cuarzo (1 cm de paso óptico), en atmósfera de aire, a una irradiancia (I) $\approx 890 \text{ W/cm}^2$, de acuerdo con la potencia especificada por el fabricante y el tamaño del *spot del láser*, que ha sido aproximado al *spot* del diodo láser de 1W, Thorlabs L975P1WJ controlado por ITC4005, medido con una cámara CCD (SP920s Ophir) con la misma configuración (*spot* elíptico; $D4\sigma_M = 800 \pm 6 \mu\text{m}$ y $D4\sigma_m = 410 \pm 4 \mu\text{m}$). Los espectros se registran con una apertura (*bandwith*) de 2 nm en la detección y a una velocidad de 5 nm/s. Debe tenerse en cuenta que se trata de un equipo que no permite aplicar una corrección adecuada del espectro de emisión cuando se excita a 980 nm. Además, la intensidad de la señal de emisión UC a 800 nm puede variar, lo que explica las diferencias observadas en la emisión a lo largo del capítulo con la misma muestra. En días distintos la señal detectada a 800 nm varía, pero en un mismo día la respuesta es consistente. Por tanto, para hacer medidas comparativas deben realizarse en la misma jornada sin apagar el equipo.

➤ Espectrómetro de fotoluminiscencia FLS1000 (Edinburgh Instruments): se utilizan dos fuentes de excitación: la lámpara de arco de Xe de 150 W (capítulo 6) y un láser de onda continua de 980 nm (2W, PSU-III-LED, CNI Optoelectronics Technology Co. Ltd.) para medidas UC (capítulos 5 y 6). La irradiancia del láser (I) de excitación se estima $\approx 2,1 \text{ W/cm}^2$, de acuerdo con la potencia de salida del láser, medida con un sensor térmico (S470C con lector PM100D, Thorlabs Inc.), y con el tamaño del *spot* del láser, medido con una cámara CCD LT665 (Ophir Optronics Solutions

Ltd.; perfil rectangular: $D4\sigma_x = 3,19$ mm y $D4\sigma_y = 6,02$ mm). Para detectar emisiones en el visible se utiliza un fotomultiplicador visible (PMT-980, Edinburgh Instruments), mientras que para el NIR se utiliza un fotomultiplicador sensible en el NIR (PMT 1700 H10330C-75, Hamamatsu Photonics, K. K.). Las medidas de fosforescencia (capítulo 6) en el visible y de detección en el NIR excitando con la lámpara de Xe se realizan en la disposición *front-face* y utilizan un filtro *longpass* estándar de 645 nm en el camino de la detección.

Fotoluminiscencia en tiempo resuelto. Los espectros de emisión resueltos en el tiempo (capítulo 6) se realizan en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico en el espectrómetro de fotoluminiscencia FLS1000 (Edinburgh Instruments). Se utilizan tres fuentes de excitación diferentes (indicadas en cada caso): láser pulsado de supercontinuo de nanosegundos (SuperK Extreme EXU-6, NKT Photonics), lámpara flash de 60 W Xe de microsegundos (μ F2, Edinburgh Instruments) y láser de onda continua de 980 nm acoplado con un controlador electrónico variable de pulsado láser (anchura de pulso: 100 μ s; PM2 box, Edinburgh Instruments). Para detectar emisiones en el visible se utiliza el fotomultiplicador visible (PMT-980, Edinburgh Instruments) excepto para detectar la fluorescencia instantánea, en cuyo caso se utiliza el fotomultiplicador visible (MCP-900, Edinburgh Instruments). Para emisiones en el NIR se utiliza un fotomultiplicador sensible en el NIR (PMT 1700 – H10330C-75, Hamamatsu Photonics, K. K.). Las cinéticas registradas en el visible y en el NIR excitando a 560 nm con la lámpara μ F2 se realizan en la disposición *front-face* con un filtro *longpass* estándar de 645 nm en el camino de la detección. El ajuste de las cinéticas se realiza mediante el software Fluoracle. El tiempo de vida promedio para ajustes biexponenciales ($f(x) = y_0 + A_1e^{-x/\tau_1} + A_2e^{-x/\tau_2}$) se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^2 A_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^2 A_i \tau_i} \quad (8.1)$$

Espectroscopía de absorción de especies transitorias. Las medidas de absorción de especies transitorias espectrales y resueltas en el tiempo (capítulo 6) se realizaron en cubetas de cuarzo 1 cm con tapón con septum (geometría estándar de haz transversal) en un espectrómetro de fotólisis de destello láser (LP980-KS, Edinburgh Instruments) equipado con un láser Nd:YAG INDI Quanta-Ray (Spectra Physics) con un oscilador óptico paramétrico (primoScan BB, Spectra Physics). La potencia de salida del láser era de 3 y 5 mJ para 560 y 975 nm, respectivamente. Las medidas espectrales se realizaron mediante una cámara ICCD (Andor DH320T) que integra durante 500 ns (*gate width*) respecto al retraso indicado del pulso láser (*probe*) y con una lámpara pulsada de Xe de 150W. Las cinéticas se obtuvieron con un detector fotomultiplicador y la lámpara de Xe pulsada. El software utilizado para realizar las medidas y los ajustes cinéticos es L900 (Edinburgh Instruments). Las disoluciones/dispersiones utilizadas de RB y UC_{Er}@RB presentaban la misma absorbancia (0,28 A) a 560 nm.

Fluorescencia inducida por láser. Las medidas de absorción de especies transitorias espectrales y resueltas en el tiempo (capítulo 6) se realizaron en cubetas de cuarzo de 1 cm con tapón con septum (portamuestras estándar) en el espectrómetro anterior de fotólisis de destello láser (LP980-KS, Edinburgh Instruments) con un láser Nd:YAG INDI Quanta-Ray (Spectra Physics) y un oscilador óptico paramétrico (primoScan BB, Spectra Physics) pero con la lámpara de Xe apagada. Como detector se utiliza la cámara ICCD (Andor DH320T) que integra durante 100 μs (*gate width*) respecto al retraso indicado del pulso láser.

Rendimiento cuántico y rendimiento cuántico upconversion. Las medidas de rendimiento cuántico absoluto (capítulo 6) se realizaron en cubetas de cuarzo con tubo de sellado (paso óptico 1 cm) en un Quantaurus QY Plus (C13534-11,

Hamamatsu Photonics K. K.) acoplado a una unidad de medida de fotoluminiscencia NIR (C13684-01, Hamamatsu Photonics K. K.). Se utilizan dos fuentes de excitación: la lámpara de Xe incorporada y un láser de onda continua de 980 nm de 2,5 W (MDL-III-980, CNI Optoelectronics Technology Co. Ltd.). La potencia del láser se varía para caracterizar el rendimiento cuántico *upconversion* mediante un disco de densidad neutra variable. La irradiancia de excitación reportada se obtiene a partir del tamaño del *spot* láser facilitada por el fabricante y de la potencia del láser medida con un medidor de potencia (PD300-3W, Ophir Optronics Solutions Ltd.) dentro de la esfera de integración. Se utiliza el disolvente puro como referencia en todas muestras (Φ_F y UCQY). La absortividad de las muestras de rendimiento cuántico convencional se encuentra entre 15-30 %, mientras que para UCQY se encuentra entre 4-10%.

Publicaciones

Publicaciones

Artículos

Nestor Estebanez; **Juan Ferrera-González**; Ian Alberto Cortez-Cevallos; María González-Béjar; Julia Pérez Prieto. Lengthening the lifetime of common emissive probes to microseconds by a jigsaw-like construction of NIR-responsive nanohybrids. *Advanced Optical Materials* **2020**, 8, 1902030. <https://doi.org/10.1002/adom.201902030>.

Juan Ferrera-González; Laura Francés-Soriano; Nestor Estébanez; Enrique Navarro-Raga; María González-Béjar; Julia Pérez-Prieto. NIR laser scanning microscopy for photophysical characterization of upconversion nanoparticles and nanohybrids. *Nanoscale* **2021**, 13, 10067-10080. <https://doi.org/10.1039/d1nr00389e>.

Juan Ferrera-González; Laura Francés-Soriano; Cristina Galiana-Roselló; Jorge González-García; María González-Béjar; Eleonore Fröhlich; Julia Pérez-Prieto. Initial Biological Assessment of Upconversion Nanohybrids. *Biomedicines* **2021**, 9(10), 1419. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101419>.

Nestor Estebanez; Alejandro Cortés-Villena; **Juan Ferrera-González**; María González-Béjar; Raquel E. Galian; Soranyel González-Carrero; Julia Pérez-Prieto. Linear Coassembly of upconversion and Perovskite nanoparticles: Sensitized upconversion Emission of perovskita by Lanthanide-Doped nanoparticles. *Advanced Functional Materials* **2020**, 30, 2003766. <https://doi.org/10.1002/adfm.202003766>.

Nestor Estebanez; **Juan Ferrera-González**; Laura Francés-Soriano; Raúl Arenal; María González-Béjar; Julia Pérez-Prieto. Breaking the Nd³⁺-sensitized

upconversion nanoparticles myth about the need of onion-layered structures. *Nanoscale* **2018**, 10, 12297-12301. <https://doi.org/10.1039/c8nr00871j>.

Laura Francés-Soriano; **Juan Ferrera-González**; María González-Béjar; Julia Pérez-Prieto. Near-infrared excitation/emission microscopy with lanthanide-based nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2022**, 414, 4291-4310. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-03999-4>.

Capítulos de libro

Juan Ferrera-González; María González-Béjar; Julia Pérez-Prieto. (2020). Functional nanohybrids based on dyes and upconversion nanoparticles. In: Virginia Martínez-Martínez, Fernando López Arbeloa (eds.) Dyes and photoactives molecules in microporous systems. Structure and Bonding. Vol. 183, 371-396. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/430_2020_60.