

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Departamento de Química Física y Analítica

Programa de Doctorado: Análisis químico, bioquímico y estructural avanzado

(Mención de Calidad)

**Síntesis y evaluación de nanomateriales metálicos  
fluorescentes como marcadores en el desarrollo de  
inmunoensayos**

TESIS DOCTORAL

Laura Trapiella Alfonso

Oviedo, 2013

A decorative graphic consisting of three gray, 3D-rendered circles of varying sizes. The largest circle is at the top right, a medium-sized one is below it, and the smallest one is at the bottom right. Two thin gray lines originate from the top left and extend towards the top and middle circles. A vertical thin gray line is on the right side, extending from the top to the bottom circle.

# INDICES



---

**INDICE DE CONTENIDOS**


---

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>I.1. Nanomateriales</b> .....	3
<i>I.1.1. Introducción: el mundo “Nano”</i> .....	3
<i>I.1.2. Quantum dots</i> .....	10
<i>I.1.3. Nanoclusters metálicos</i> .....	18
<b>I.2. Estrategias de solubilización, funcionalización y bioconjugación de nanomateriales</b> .....	38
<i>I.2.1. Métodos de solubilización y/o funcionalización</i> .....	38
<i>I.2.2. Rutas para el marcaje de biomoléculas con nanomateriales</i> .....	43
<b>I.3. Inmunoensayos</b> .....	47
<i>I.3.1. Introducción a los inmunoensayos</i> .....	47
<i>I.3.2. Características analíticas a través de la curva de inhibición</i> .....	64
<i>I.3.3. Inmunoensayos con nanomateriales como marcadores</i> .....	68
<b>I.4. Bibliografía</b> .....	73
<b>II. OBJETIVOS / OBJECTIVES</b> .....	95
<b>III. EXPERIMENTAL</b> .....	105
<b>III.1. Materiales, reactivos y muestras</b> .....	105
<i>III.1.1. Material empleado en la síntesis de CdSe/ZnS QDs</i> .....	105
<i>III.1.2. Material especial para la síntesis de ligandos PEG funcionalizados</i> .....	105
<i>III.1.3. Material general</i> .....	106
<i>III.1.4. Reactivos y muestras</i> .....	107
<b>III.2. Instrumentación</b> .....	111
<b>III.3. Procedimientos experimentales</b> .....	115
<i>III.3.1. Síntesis de CdSe/ZnS quantum dots</i> .....	115
<i>III.3.2. Estimación de la concentración y tamaño de los QDs</i> .....	118
<i>III.3.3. Síntesis del polímero anfifílico</i> .....	121
<i>III.3.4. Solubilización de CdSe/ZnS quantum dots</i> .....	122
<i>III.3.5. Síntesis de ligandos PEG funcionalizados</i> .....	124

III.3.6. Síntesis de nanoclusters de plata .....	127
III.3.7. Evaluación del rendimiento cuántico.....	127
III.3.8. Conjugación de haptenos a la proteína portadora BSA .....	128
III.3.9. Caracterización de conjugados hapteno-BSA .....	129
III.3.10. Bioconjugación de nanomateriales.....	131
III.3.11. Inmunoensayo espectrofotométrico.....	132
III.3.12. Procedimiento general para el inmunoanálisis .....	133
<b>III.4. Bibliografía.....</b>	<b>134</b>
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>137</b>
<b>IV.1. Inmunoensayos fluorescentes basados en quantum dots .....</b>	<b>137</b>
IV.1.1. Antecedentes y objetivos .....	137
IV.1.2. Determinación de progesterona en leche de ganado bovino.....	139
IV.1.3. Determinación de melamina en leche fórmula para bebés.....	162
IV.1.4. Referencias .....	170
<b>IV.2. Empleo de quantum dots como marcas elementales en inmunoanálisis. ....</b>	<b>174</b>
IV.2.1. Antecedentes y objetivos .....	174
IV.2.2. Resultados y discusión .....	176
IV.2.3. Referencias .....	184
<b>IV.3. Síntesis y caracterización de una nueva generación de fluoróforos nano-estructurados: Nanoclusters metálicos de plata .....</b>	<b>187</b>
IV.3.1. Antecedentes y objetivos .....	187
IV.3.2. Nuevas aproximaciones para la síntesis de nanoclusters de plata .....	188
IV.3.3. Estudio de los cambios nanoestructurales producidos a lo largo de la síntesis y tras la irradiación UV de los AgNCs.....	204
IV.3.4. Referencias .....	214
<b>V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....</b>	<b>219</b>
<b>VI. SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS / SUGGESTIONS FOR FURTHER RESEARCH.....</b>	<b>225</b>
<b>VII. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL.....</b>	<b>231</b>
<b>VII.1. Development of a quantum dot-based fluorescent immunoassay for progesterone determination in bovine milk (<i>Biosensors and Bioelectronics</i>, 2011, 26, 4753-4759).....</b>	<b>233</b>

---

<b>VII.2. Elemental and molecular detection for Quantum Dot-based immunoassays: a critical appraisal</b> ( <i>Biosensors and Bioelectronics</i> , 2012, 33, 165-171).....	241
<b>VII.3. Growth of <i>in-situ</i> functionalized luminescent silver nanoclusters by direct reduction and size focusing</b> ( <i>ACS Nano</i> , 2012, 6, 8950-8961) .....	250
<b>VII.4. Synthesis and characterization of hapten-quantum dots bioconjugates: application to development of a Melamine fluorescent immunoassay</b> ( <i>Talanta</i> , 2013, 106, 243-248) .....	270
<b>VII.5. Nanostructural transformations during the reduction of silver for the synthesis of nanomaterials and UV irradiation</b> ( <i>submitted to Analytical Chemistry</i> , 2013).....	281
<b>VIII. OTRAS PUBLICACIONES RELACIONADAS</b> .....	304
<b>VIII.1. New integrated elemental and molecular strategies as diagnostic tool for the quality of water soluble quantum dots and their bioconjugates</b> ( <i>Nanoscale</i> , 2011, 3, 954-957) .....	305
<b>VIII.2. One-step Aqueous Synthesis of Fluorescent Copper Nanoclusters by Direct Metal Reduction</b> ( <i>submitted to Chemistry of Materials</i> , 2013).....	316



---

## INDICE DE FIGURAS

---

- Figura 1.** Escala métrica donde se muestra el rango que abarca la nanoescala y se contextualizan los tamaños con referencia a estructuras y/o moléculas ya conocidas.....3
- Figura 2.** Cambio de propiedades ópticas en la nanoescala: los casos del oro y del telururo de cadmio.....4
- Figura 3.** La Nanociencia engloba muchas disciplinas científicas que interaccionan entre sí para intentar comprender los fenómenos que ocurren a escala nanométrica...5
- Figura 4.** A) Representación típica de los diagramas de energía para un nanomaterial cero dimensional teniendo como referencia su homólogo en la escala macro.  $E_g$  (Macro) y  $E_g$  (QD) representan los saltos de banda correspondientes para un semiconductor y para un quantum dot respectivamente. B) Esquema representativo de la modulación de la emisión de los quantum dots en función de la composición y tamaño de su núcleo. .... 11
- Figura 5.** Representación esquemática de los distintos tipos de QDs core/shell..... 12
- Figura 6.** Esquema típico del proceso de síntesis de QDs de CdSe/ZnS a alta temperatura realizado a lo largo de la presente Tesis Doctoral. .... 15
- Figura 7.** Esquema resumen de los principales usos de los QDs como marcadores luminiscentes en aplicaciones bioanalíticas. .... 17
- Figura 8.** Efecto del tamaño en las propiedades optoelectrónicas del metal. Como se puede observar mientras que el metal y la nanopartícula metálica presentan bandas continuas de energía, el limitado número de átomos que conforman el clúster metálico hacen que esta banda se rompa en niveles de energía discretos permitiendo la interacción con la luz a través de transiciones electrónicas entre dichos niveles. Figura modificada de la Ref. 39..... 19

- Figura 9.** A) Diagrama de orbitales moleculares Kohn-Sham para un compuesto modelo  $Au_{25}(SH)_{18}$  donde se muestran las posibles transiciones electrónicas intra ( $sp \rightarrow sp$ ) e interbanda ( $d \rightarrow sp$ ) que se pueden dar tras la interacción con la radiación electromagnética. B) Espectro de absorción teórico para la especie  $Au_{25}(SH)_{18}$  en el que podemos ver asociadas las transiciones electrónicas que producirían dichas bandas. Además también se puede observar cómo dicho espectro teórico encaja perfectamente con el obtenido experimentalmente (en rojo). Figura modificada de la referencia 38. .... 21
- Figura 10.** Espectros de excitación (línea punteada) y emisión (línea sólida) de una serie de AuNCs ilustrando la modulación de la emisión fluorescente con respecto al tamaño del NC. Figura adaptada de la Ref. 53. .... 24
- Figura 11.** Efecto solvatocrómico de los PMAA-Ag nanoclusters. A) Espectros de absorción en distintos disolventes. Fotografías de los nanoclusters en diferentes mezclas de agua/metanol yendo de agua pura (izquierda) a metanol puro (derecha) bajo B) luz visible y C) luz UV. D) Espectros de absorción y E) espectros de emisión de las muestras de AgNCs fotografiadas en B). Figura modificada de la Ref. 54. .... 25
- Figura 12.** Escala representativa de la emisión fluorescente de los NCs en función del ligando protector que recubre dicho nanomaterial. Figura obtenida de la Ref. 35. .... 29
- Figura 13.** A la izquierda se muestra una representación esquemática de la síntesis del nanocluster fluorescente HRP-AU y el efecto que provoca en la fluorescencia su interacción con el sustrato de la enzima ( $H_2O_2$ ). En la parte derecha de la imagen se adjuntan los espectros de fluorescencia obtenidos para las distintas concentraciones de sustrato ensayadas donde se observa claramente la relación entre la fluorescencia y la concentración de  $H_2O_2$  (quenching). Imagen reproducida de la Ref. 121. .... 34

<b>Figura 14.</b> Representación esquemática de la síntesis de aptámero-Ag NC y su aplicación para la determinación específica de la Trombina. Figura adaptada de la Ref. 122.....	35
<b>Figura 15.</b> Ejemplos ilustrativos del empleo de NCs fluorescentes como agentes de contraste en bio- <i>imaging</i> . 1) Imágenes de fluorescencia de células NIH 3T3 teñidas <i>in vivo</i> con anti-HS-C <sub>24</sub> -Ag, donde se observa la internalización de los NCs en las células. Las imágenes a-c fueron tomadas tras una incubación de 20 min a 4 °C (a. campo luminoso; b. AgNCs; c. fusión de las imágenes). Las imágenes d-f se recogen tras un periodo de incubación de 6 min a 37 °C (d. campo luminoso; e. AgNCs; f. fusión de las imágenes). La barra de escala para todos los casos es de 25 µm. Figura recogida de la Ref.129. 2) Imágenes fluorescentes del microscopio confocal y foto-estabilidad de C <sub>20</sub> -Ag nanodots (verde) en células NIH 3T3 marcadas con un tinte para células HCS (rojo). Las imágenes se obtuvieron A. bajo la excitación de un fotón (OPE, 458 nm) y B. bajo la excitación de dos fotones (TPE, 720 nm). La foto-estabilidad se representa en las gráficas C (OPE) y D (TPE) observándose que los nanodots tienen una fotoestabilidad similar a HCS para el caso de OPE pero muy superior a estos cuando se emplea la TPE. La barra de escala es de 30 µm. Figura modificada de la Ref.130.....	37
<b>Figura 16.</b> Esquema de las estrategias de solubilización más comunes mediante intercambio de ligandos. ....	41
<b>Figura 17.</b> Esquema de las estrategias de solubilización más comunes mediante encapsulación polimérica.....	42
<b>Figura 18.</b> Principales estrategias de marcaje de biomoléculas con nanomateriales. Figura modificada de la Ref. 142.....	46
<b>Figura 19.</b> Representación esquemática de las dos vías de producción de anticuerpos. ...	49
<b>Figura 20.</b> Diagrama de Jablonski donde se representan los distintos procesos de desactivación del estado excitado tanto radiacionales (Fluorescencia y	

- Fosforescencia) como no radiacionales (Conversión Interna y Externa, Relajación vibracional y Cruce entre Sistemas).  $S_0$  representa al estado fundamental de la molécula,  $S_1$  y  $S_2$  son estados singuletes excitados y  $T_1$  es un estado triplete excitado. .... 54
- Figura 21.** Curvas de calibrado para A) métodos de marcaje de Ab y B) métodos de marcaje de Ag, donde las líneas punteadas muestran la región de la curva con utilidad analítica..... 61
- Figura 22.** Configuraciones de inmunoensayos competitivos. A) Inmovilización del Ab estableciendo la competencia entre el analito y el trazador por el limitado número de sitios de enlace del Ab. B) Empleo de un anticuerpo captura que reconoce al anticuerpo anti-analito. C) Inmovilización del Ag. En este caso la competencia se establece entre el Ag inmovilizado y el Ag libre en disolución por el Ab\*. En todos los casos la señal obtenida es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra..... 62
- Figura 23.** Configuraciones de inmunoensayo no competitivo. A) Inmunoensayo tipo Sandwich. El analito es capturado por el Ab inmovilizado y luego es detectado por el Ab\*. B) Inmunoensayo no competitivo para la detección de Ab. La muestra se incuba en un soporte con el Ag y los Ab enlazados se cuantifican aplicando una anti-inmunoglobulina marcada (anticuerpo secundario). C) Ensayo con inmunoglobulina de captura. La Ig de captura de la clase de interés primero es reconocida por los anticuerpos anti-Ig que se encuentran inmovilizados en el soporte sólido. A continuación se añade el Ag que es enlazado por específicamente por la Ig y la fracción enlazada de Ag se cuantifica empleando otro Ab específico marcado. .... 63
- Figura 24.** Representación gráfica de un inmunoensayo competitivo ajustado con el modelo logarítmico 4P. En él aparecen señalados tanto los parámetros que definen la curva 4P como las características analíticas que se pueden extraer de dicha curva..... 66



- Figura 25.** Curvas de inhibición para un estándar de nuestro analito [S] y para un posible interferente [C]. En la gráfica se representa la obtención de  $[S]_{50}$  y  $[C]_{50}$  necesarios para el cálculo de la reactividad cruzada de dicho interferente. .... 67
- Figura 26.** Ensayo multianalito para la determinación de 4 toxinas. A) Esquema ilustrativo del ensayo ELISA tipo sandwich realizado. B) Datos obtenidos en un experimento en el que se incubaron las 4 toxinas a una concentración de 1000 ng/mL. En el gráfico vemos tanto la señal fluorescente compuesta como la deconvolución de cada contribución individual. Las medidas fueron realizadas con un lector de placas Tecan Safire excitando a 330 nm. Figura recogida de la Ref.181. .... 70
- Figura 27.** Representación esquemática del nanosensor de PDGF y del receptor de PDGF basado en el quenching de la fluorescencia de los AuNCs. Imagen obtenida de la Ref.184. .... 71
- Figura 28.** Esquema del proceso general de síntesis de QDs de CdSe/ZnS a altas temperaturas. .... 117
- Figura 29.** Espectro de absorbancia de CdSe/ZnS QDs en cloroformo anhidro donde aparecen reflejados los datos a extraer necesarios para cálculos posteriores. 120
- Figura 30.** Estructura del polímero anfifílico. a) Columna vertebral hidrofílica está constituida por poli-(anhídrido isobutilen-alt-maleico). Cada unidad monomérica comprende un anillo de anhídrido. La naturaleza hidrofílica se simboliza en color azul. b) La dodecilamina se utiliza para proporcionar las cadenas laterales hidrofóbicas que aparecen representadas en color rojo. c) Tras la reacción del grupo amino de la dodecilamina con los anillos de anhídrido se obtiene el polímero anfifílico que presenta una columna vertebral hidrofílica y unas cadenas laterales hidrofóbicas. La estequiometría de la reacción se escogió de modo que el 75% de los anillos de anhídrido reaccionen con la dodecilamina quedando intactos el 25% restante. .... 122

- Figura 31.** Esquema del proceso de solubilización de QDs en medios acuosos donde se refleja el importante papel que juega el entrecruzador o cross-linker terminando de cerrar la estructura del recubrimiento del QD para asegurar que es soluble completamente. .... 123
- Figura 32.** Representación esquemática del diseño de ligandos modulares hidrofílicos basados en PEG que promueven tanto la solubilización y/o funcionalización de nanomateriales así como su biocompatibilidad. Figura modificada de la Ref. 6..... 124
- Figura 33.** Esquemas de las rutas sintéticas mediante las que se obtienen los principales ligandos PEG funcionalizados. A) Síntesis del ligando TA-PEG-OCH<sub>3</sub>. Reactivos y condiciones: a. (i) MsCl, Et<sub>3</sub>N, THF, (ii) NaN<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O; b. PPh<sub>3</sub>, THF, H<sub>2</sub>O; c. TA, DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. B) Síntesis del ligando TA-PEG-NH<sub>2</sub>. Reactivos y condiciones: a. MsCl, Et<sub>3</sub>N, THF; b. NaN<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O; c. PPh<sub>3</sub>, EtOAc and 1 M HCl; d. ácido lipóico, DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; e. PPh<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, THF. C) Modificaciones del ligando TA-PEG-NH<sub>2</sub> para obtener los ligandos TA-PEG-COOH (encuadrado en azul) y TA-PEG-Biotina. Reactivos y condiciones: f. anhídrido succínico, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and Et<sub>3</sub>N; g. NHS, DCC, DMF; h. biotina NHS ester, Et<sub>3</sub>N, DMF. Esquemas reproducidos de las Referencias 7 y 8. .... 126
- Figura 34.** Bioconjugación de nanomateriales según la vía de la carbodiimida. A) Esquema del proceso de bioconjugación de QDs a anticuerpos. B) Fundamento de la reacción química de formación de un enlace amida a través de la carbodiimida..... 131
- Figura 35.** Evolución de la investigación en QDs. A) Publicaciones versadas sobre QDs en las últimas décadas. El gráfico insertado muestra la investigación realizada por áreas de conocimiento. B) Publicaciones relacionadas con el empleo de QDs como marcas en inmunoensayos. .... 138

- Figura 36.** Estructura química de la progesterona, derivada del núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno del que provienen los esteroides cuya arquitectura molecular es igual a la del colesterol..... 139
- Figura 37.** Variación de los niveles de progesterona durante el ciclo estral del ganado vacuno. A) Esquema de madurez del ciclo menstrual de una vaca. La parte superior de la figura muestra la histología ovárica, mientras que por debajo se observa el cambio relativo en la concentración de progesterona para las diferentes fases. B) Concentraciones de progesterona en leche antes y después del estro (día 0) para las vacas a las que se hizo (línea sólida con cuadrados) o no (línea punteada de círculos abiertos) concebir mediante inseminación en ese celo. Figuras reproducidas de la Ref. 6. .... 142
- Figura 38.** Estudio de las relaciones molares en la bioconjugación Ab-PQDs. En los cromatogramas obtenidos por SEC-Vis-UV (214 nm) se estudiaron tres relaciones molares Ab:PQDs diferentes (1:1; 1:2 y 1:5) y en ellos podemos observar 3 picos: a 5 min (bioconjugado), 7 min (PQDs libres) y 11 min (Ab libre). Así, la relación molar escogida fue 1:2 (rojo) por presentar un mayor rendimiento en la bioconjugación, tener una intensidad de señal mayor y tras haber comprobado que el Ab bioconjugado mantenía su capacidad de reconocimiento..... 144
- Figura 39.** Purificación del bioconjugado Ab-QD por SEC-UV/Vis . En el gráfico se muestran los cromatogramas superpuestos de un patrón de Ab anti-progesterona (azul), un patrón de PQDs (línea roja punteada) y el cromatograma correspondiente a la reacción de bioconjugación (morado)... 146
- Figura 40.** Cromatogramas registrados mediante SEC-ICP-MS. En esta figura podemos ver dos gráficos A y B en los que se muestran los cromatogramas superpuestos de los patrones de Abpro (azul); QDs (rojo) y las muestras de bioconjugado (verde) y mezcla (morado) monitorizando  $^{32}\text{S}$  y  $^{114}\text{Cd}$  respectivamente. .... 148

- Figura 41.** Purificación del bioconjugado via SEC-Fluorescencia. A) Cromatogramas correspondientes a los patrones de QDs (rojo) y Abpro (azul). B) Cromatograma de Ab-QD registrado a las longitudes de onda características de los QDs (600 nm) y el Abpro (342 nm). Con trama punteada aparece representado el patrón de Abpro para que se pueda apreciar bien el desplazamiento del pico del bioconjugado. .... 149
- Figura 42.** Ensayo ELISA espectrofotométrico para la determinación de la concentración del Ab en el bioconjugado. A. Esquema del procedimiento experimental realizado y ecuación de Lambert-Beer para llevar a cabo los cálculos de la concentración. B. Imágenes mostrando el resultado obtenido en uno de los ensayos realizados con el kit de TMB. .... 151
- Figura 43.** Propiedades espectroscópicas de los QDs: espectro de absorbancia (línea punteada) y espectro de emisión fluorescente (línea negra). También se recoge el espectro de emisión fluorescente del bioconjugado ProBSA-QD (línea gris). .... 153
- Figura 44.** Esquema representativo del proceso experimental llevado a cabo para la optimización de las etapas de tapizado y bloqueo. Para cada concentración de AbPro se realizó el ensayo aquí representado. Los pocillos de las filas A y H no se emplearon. .... 155
- Figura 45.** Variaciones en la emisión fluorescente del trazador ProBSA-QD tras haber sido reconocido por el Ab en un inmunoensayo competitivo en el que se ensayaron distintas relaciones muestra:trazador. .... 156
- Figura 46.** Estudio sobre la influencia de la matriz de la leche sobre la emisión fluorescente de los QDs. .... 159
- Figura 47.** Curva de inhibición de un inmunoensayo competitivo fluorescente basado en QDs para la determinación de progesterona en leche de ganado bovino. .... 160

- Figura 48.** Estructura química de la melamina junto con sus aplicaciones más comunes en la industria química y señalando su uso fraudulento en la adulteración de piensos y alimentos. .... 162
- Figura 49.** Espectros de masas superpuestos de un patrón de BSA (línea punteada) y una muestra del conjugado MelBSA (línea negra), donde se puede observar el desplazamiento en masa ( $\Delta M$ ) debido a la incorporación de melamina a la BSA. .... 165
- Figura 50.** Curva de inhibición fluorescente obtenida para el análisis de melamina en leche fórmula para bebés mediante un inmunoensayo competitivo basado en QDs utilizando como trazador MelBSA-QD. Cada punto de la curva es un promedio de tres ensayos independientes, obteniéndose para cada punto una desviación estándar relativa menor del 5%. También se recoge la ecuación de cuarto parámetro según la cual se ajusta la curva de inhibición. .... 166
- Figura 51.** Curvas de inhibición obtenidas para la determinación de progesterona en leche de ganado bovino mediante detección por A) Fluorescencia; B) ICP-MS, al mismo nivel de concentración de progesterona que por fluorescencia (línea gris); a bajos niveles de concentración de progesterona (línea naranja). Cada punto es el promedio de tres medidas independientes. .... 178
- Figura 52.** Estudio de la relación metal:ligando. A) Esquema del proceso sintético realizado. B) Espectros de absorbancia encontrados para los distintos ratios metal:ligando ensayados e imágenes de las disoluciones bajo luz natural y luz UV; 1:0,001 (línea negra, NP<sub>1</sub>), 1:0,01 (línea rosa, NP<sub>2</sub>), 1:0,1 (línea roja, NP<sub>3</sub>), 1:1 (línea verde, NC<sub>1</sub>), y 1:10 (línea azul, NC<sub>2</sub>). C) Espectros de fluorescencia obtenidos para dichas muestras. .... 189
- Figura 53.** Micrografías de TEM obtenidas para distintas relaciones metal:ligando en la síntesis de nanomateriales de plata. A) Relación 1:0,001 (NP<sub>1</sub>). B) Relación 1:0,01 (NP<sub>2</sub>). C) Relación 1:0,1 (NP<sub>3</sub>). D) Relación 1:1 (NC<sub>1</sub>). .... 190

- Figura 54.** Espectros de excitación (rojo) y emisión centrada a 680 nm de los AgNCs azul (excitación a 495 nm), negro (excitación a 428 nm), y verde (excitación a 330 nm). ..... 191
- Figura 55.** Optimización de la relación metal:NaBH<sub>4</sub>. A) Medidas de absorbancia para los distintos ratios Ag:NaBH<sub>4</sub> ensayados; 1:1 (línea negra), 1:10 (línea roja), 1:20 (línea verde), 1:30 (línea azul oscuro), y 1:50 (línea azul claro). B) Intensidades de fluorescencia registradas para las síntesis realizadas con distintas cantidades de NaBH<sub>4</sub>. ..... 192
- Figura 56.** Monitorización de la evolución de las propiedades optoelectrónicas de los AgNCs a lo largo de su síntesis. A) Espectros de absorbancia medidos a distintos tiempos de reacción. B) Intensidades de fluorescencia registradas para las mismas alícuotas extraídas a los tiempos de reacción indicados, empleando como par excitación/emisión 428/670 nm. .... 193
- Figura 57.** Comparación de las propiedades de absorción y emisión fluorescente (gráfico insertado) de los distintos tipos de AgNCs sintetizados. A) DHLA (NC<sub>0</sub>) frente a TA-PEG-OCH<sub>3</sub> (NC<sub>I</sub>). B) Distintos grados y tipos de funcionalización empleando ligandos PEG funcionalizados..... 194
- Figura 58.** Imagen de un gel de agarosa donde se observa la señal luminiscente de los distintos AgNCs funcionalizados a la luz UV de un transiluminador. Se puede ver cómo los NC<sub>I</sub> y NC<sub>II</sub> funcionalizados con grupos COOH migran hacia el polo positivo, mientras que NC<sub>IV</sub> y NC<sub>V</sub> van hacia el polo negativo ya que poseen grupos NH<sub>2</sub>. Del mismo modo NC<sub>III</sub> no sufre ningún tipo de desplazamiento ya que sólo presenta grupos OCH<sub>3</sub> que son inertes. .... 195
- Figura 59.** Espectros de la emisión fluorescente registrados para los AgNCs dispersados en distintos disolventes (1) agua, (2) cloroformo, (3) acetona, (4) acetonitrilo, (5) THF, (6) DMF, (7) acetato de etilo, (8) metanol, y (9) 2-propanol..... 197

- Figura 60.** Test de estabilidad de los AgNCs. A) Estabilidad a distintos pH. B) estabilidad en medios con una alta concentración salina (1M de NaCl). C) Estabilidad en medio de cultivo celular. .... 198
- Figura 61.** Progresión de los espectros de absorción (A) y de la intensidad de fluorescencia registrada (B) para los AgNCs expuestos a la luz del día. Progresión de los espectros de absorción (C) y de la intensidad de fluorescencia registrada (D) para la muestra de AgNCs sometida a irradiación UV. .... 199
- Figura 62.** A) Evolución en el tiempo de las propiedades optoelectrónicas, absorbancia y fluorescencia, de la NP hacia las del NC. Aparecen representados los siguientes tiempos de reacción: 0 h (negro), 1 h (rojo), 2 h (verde), 3 h (azul oscuro), 4 h (azul claro), y 5 h (rosa). Se adjuntan las imágenes correspondientes a las disoluciones de NP (antes del proceso de *size focusing*) y de NC (tras su síntesis). B) y C) Imágenes de TEM de las AgNP y los AgNC, respectivamente. .... 201
- Figura 63.** Espectros de absorción de las NPs (trazo en negro) sintetizadas a diferentes relaciones metal:ligando, NP<sub>1</sub> (1:0,001), NP<sub>2</sub> (1:0,01), NP<sub>3</sub> (1:0,02), NP<sub>5</sub> (1:0,2), NP<sub>6</sub> (1:0,1); combinados con los espectros de absorción de los nanomateriales obtenidos tras el proceso de *size focusing* (trazo en rojo). .... 202
- Figura 64.** A) Espectros de absorción de los NCs funcionalizados obtenidos por *size focusing* comparados con el espectro de absorción de la NP de partida (línea en negro). B) Fotografía de las dispersiones acuosas de las muestras bajo luz UV. C) Imagen de gel de agarosa corrido para demostrar las distintas funcionalizaciones realizadas. .... 203
- Figura 65.** Representación esquemática del principio básico de funcionamiento de la técnica AF4 y los tipos de campos externos que se pueden aplicar para llevar a cabo la separación, destacando el empleado en esta Tesis Doctoral. .... 204

- Figura 66.** Fractogramas de las alícuotas de la síntesis de AgNCs por reducción directa extraídas a distintos tiempos de reacción: 1) rosa, 5 min; 2) verde, 38 min; 3) azul, 70 min; 4) rojo, 105 min; 5) gris, 150 min; y 6) negro, 300 min, monitorizando A) absorbancia y B) emisión fluorescente. .... 207
- Figura 67.** Fractogramas de la alícuota extraída a los 5 min (A) y a los 5 min “evolucionada” (B) detectados por UV-Vis y fluorescencia. .... 208
- Figura 68.** Fractogramas de la alícuota extraída a 150 min detectados por UV-Vis e ICP-MS donde se comprueba que las especies eluidas contienen Ag..... 209
- Figura 69.** Estudio del efecto de la irradiación UV sobre las propiedades ópticas de los AgNCs. A) Fractogramas detectados por UV-Vis de la alícuota sin irradiar (azul claro) y la alícuota irradiada 3 h (azul oscuro). B) Fractogramas detectados por fluorescencia de la alícuota sin irradiar (rojo) y la alícuota irradiada 3 h (rosa). C) Micrográficas de HR-TEM de la alícuota sin irradiar (izquierda) y la alícuota irradiada 3 h (derecha). .... 211
- Figura 70.** Micrografía de HR-TEM de la alícuota irradiada, en ella se puede observar hasta 3 nuevas nanoestructuras formadas por fusión de varios NCs, hechos que se confirman por la presencia de distintos dominios en la nanoestructura (señalados con líneas amarillas) y por la aparición de maclas (zona señalada con la flecha roja)..... 212
- Figura 71.** Efecto de la irradiación UV sobre la emisión fluorescente de los AgNCs con el tiempo en presencia (línea negra) o en ausencia (línea roja) de oxígeno en el medio. .... 213



---

**INDICE DE TABLAS**

---

<b>Tabla 1.</b> Clases de Inmunoglobulinas y características principales.....	48
<b>Tabla 2.</b> Clasificación general de Enzimoinmunoensayos.....	53
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de inmunoensayos fluorescentes. *Este tipo de inmunoensayo se puede realizar tanto en modo homogéneo como heterogéneo.....	57
<b>Tabla 4.</b> Lista de reactivos empleados a lo largo de esta Tesis Doctoral agrupados según la aplicación donde se han utilizado.....	107
<b>Tabla 5.</b> Condiciones experimentales de trabajo optimizadas para el equipo HR-ICP-MS ELEMENT2. (*) El “ <i>Settling time</i> ” varía según el isótopo que se mida.....	147
<b>Tabla 6.</b> Condiciones experimentales optimizadas para un inmunoensayo competitivo fluorescente basado en CdSe/ZnS QDs.....	158
<b>Tabla 7.</b> Resumen de las características analíticas del inmunoensayo competitivo fluorescente basado en QDs propuesto.....	160
<b>Tabla 8.</b> Resultados de los análisis de distintas muestras de leche de ganado bovino...	161
<b>Tabla 9.</b> Características analíticas de un inmunoensayo competitivo fluorescente para la determinación de melamina en leche fórmula para bebés.....	167
<b>Tabla 10.</b> Métodos analíticos propuestos para la determinación de melamina en leche, leche en polvo y leche fórmula.....	167
<b>Tabla 11.</b> Inmunoensayo basado en QDs con detección por ICP-MS.....	177
<b>Tabla 12.</b> Comparación de la detección elemental <i>vs</i> molecular de inmunoensayos basados en QDs a través de las características analíticas.....	178
<b>Tabla 13.</b> Análisis de Progesterona en leche mediante detección elemental y molecular .....	183

## INDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 14.</b> Rendimientos cuánticos de los AgNCs en distintos disolventes y comparación con QDs .....	197
<b>Tabla 15.</b> Condiciones experimentales de trabajo optimizadas para la separación de NPs y NCs en AF4.....	206
<b>Tabla 16.</b> Relación de publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral. Datos obtenidos del Journal Citations Reports® .....	231
<b>Tabla 17.</b> Relación de otras publicaciones relacionadas con la Tesis Doctoral. Datos obtenidos del Journal Citations Reports® .....	304

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

---

Ab	Anticuerpo
AbMel	Anticuerpo anti-melamina
AbPro	Anticuerpo anti-progesterona
AF4	Asymetrical Flow Field Flow Fractionation
Ag	Antígeno
DHLA	Ácido dihidrolipóico
EDC	Hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etil-carbodiimida
HPA	Ácido hexilfosfónico
HRTEM	Microscopía de Transmisión Electrónica de alta resolución
ICP-MS	Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo
LA ó TA	Ácido lipóico
Mel	Melamina
MelBSA	Conjugado de melamina-albumina de suero bovino
NCs	Nanoclústers
NPs	Nanopartículas
PBS	Disolución reguladora de fosfatos
PQDs	Quantum dots poliméricos
Pro	Progesterona
ProBSA	Conjugado de progesterona-albumina de suero bovino
QDs	Quantum dots
QY	Quantum yield / Rendimiento cuántico
RMN	Resonancia magnética nuclear
SBB	Disolución reguladora de boratos
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaños
TEM	Microscopía de transmisión electrónica

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

---

TOP	Trioctilfosfina
TOPO	Óxido de trioctilfosfina
UHF	Ultrafiltración
UV	Ultravioleta



# INTRODUCCIÓN











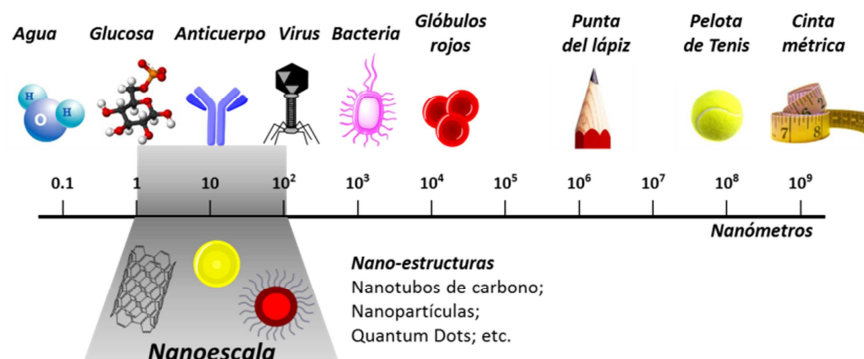
## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. Nanomateriales

#### I.1.1. Introducción: el mundo "Nano"

Desde la célebre y premonitoria conferencia impartida por el físico Richard Feynman en 1959 "*There's plenty of room at the bottom (Hay mucho sitio al fondo)*" [1], considerada como un acontecimiento fundamental en la historia de la nanotecnología y en la que se auguraba un gran campo de investigación inexplorado hasta la fecha, muchos han sido los avances, descubrimientos y desarrollos que se han llevado a cabo avalando dicha afirmación. Así, a día de hoy podemos decir que el mundo "nano" es muy grande, y nos rodea en todos los ámbitos de nuestra vida diaria, provocando lo que muchos analistas de mercado han acuñado como *La revolución industrial del siglo XXI*.

Pero ¿qué son la nanociencia y la nanotecnología y por qué han tenido, tienen y tendrán esta fuerte repercusión en nuestras vidas? El prefijo "nano" hace referencia a las dimensiones de las que estamos hablando en escala métrica. Un nanómetro es la mil millonésima parte de un metro ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ). La nanoescala convencionalmente abarca el rango de tamaños comprendidos entre 1 y 100 nm. En la Figura 1 se muestra una escala métrica con ejemplos de estructuras, materiales, moléculas o seres vivos ya conocidos comparados con los nanomateriales para que podamos hacernos una idea de los tamaños con los que se trabaja en el mundo "nano".



**Figura 1:** Escala métrica donde se muestra el rango que abarca la nanoescala y se contextualizan los tamaños con referencia a estructuras y/o moléculas ya conocidas.

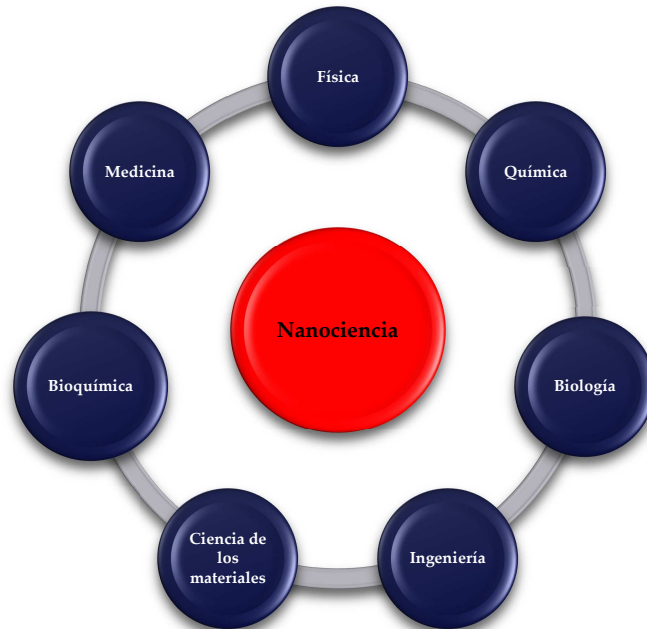
Dar una definición de Nanociencia y Nanotecnología no es una tarea fácil, ya que existen un montón de definiciones muy similares con pequeños matices. A continuación se recogen aquellas que consideramos más acertadas y completas [2-4]. La *Nanociencia* es un área emergente de la ciencia que estudia los fenómenos y la manipulación de materiales a nivel atómico, molecular y macromolecular, donde las propiedades difieren significativamente de aquellas observadas a gran escala. En otras palabras, la *Nanociencia* estudia los materiales que exhiben destacadas propiedades, funcionalidades y fenómenos debido a sus pequeñas dimensiones. De este modo podemos concluir que el tamaño es la clave de esta ciencia. Hay que tener en mente que las propiedades físicas y químicas de la materia cambian a escala nanométrica. En ella ya no rigen las leyes clásicas de la física, sino que las propiedades están gobernadas por las leyes de la mecánica cuántica: la conductividad eléctrica, el color, la resistencia, la elasticidad, la reactividad, entre otras propiedades, se comportan de manera diferente que en los mismos elementos a mayor escala. Es decir, el mismo material en a nivel nano puede exhibir propiedades muy diferentes e incluso opuestas de las conocidas para dicho material en escala macro. Como ejemplos para ilustrar este hecho podemos ver en la Figura 2 el cambio de color que experimenta el oro o el telururo de cadmio cuando estos materiales se confinan en la escala nanométrica.



**Figura 2:** Cambio de propiedades ópticas en la nanoescala: los casos del oro y del telururo de cadmio.

Otros cambios en la propiedades mecánicas y eléctricas pueden ser observados por ejemplo en el caso del grafeno. El grafeno es un material frágil y no conductor (es el componente estructural básico de todas las demás estructuras gráficas como las minas de los lápices). Sin embargo, los nanotubos de carbono que son como láminas de grafeno enrolladas sobre sí mismas presentan propiedades totalmente diferentes. Así, son más duros que el acero pero mucho más ligeros y además son conductores.

Cabe destacar que esta rama de la ciencia es un área substancialmente multidisciplinar y en todos los avances que se hacen en este campo se ven involucrados investigadores pertenecientes a los más diversos campos de conocimiento, (vease Figura 3).



**Figura 3:** La Nanociencia engloba muchas disciplinas científicas que interaccionan entre sí para intentar comprender los fenómenos que ocurren a escala nanométrica.

Por otro lado, la *Nanotecnología* es un conjunto de técnicas multidisciplinarias que se utilizan para el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala, y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a nanoescala [2-4]. La nanotecnología se aplica en diferentes campos entre los que van a destacar los materiales, la electrónica, la biomedicina y la energía. Materiales con una dureza y resistencia mucho mayor, ordenadores mucho más veloces y de mayor capacidad, investigaciones y diagnósticos médicos más eficaces con una capacidad de respuesta más rápida para tratar nuevas enfermedades, energía abundante a bajo coste y respetuosa con el medio ambiente, identificar el estado de la comida a través del color del envase que, gracias a unas nanopartículas, nos ayudarán a desechar alimentos antes de consumirlos, son ejemplos de cómo la nanotecnología podrá revolucionar el potencial de muchos de los campos tal y como los percibimos hoy en día [4].

Se considera que un material es nano cuando al menos una de sus dimensiones se encuentra confinada en la escala nanométrica. De este modo, podemos hacer una clasificación de los nanomateriales en relación al número de dimensiones de la nanoestructura superan el rango de la nanoescala, encontrándose cuatro tipos diferentes [5]:

Nanoestructuras 0D: se trata de materiales que tienen todas sus dimensiones confinadas en la nanoescala y que además su tamaño global también se recoge dentro de la escala nanométrica. En este apartado podemos encontrar a las nanopartículas metálicas, los quantum dots y los nanoclusters metálicos.

Nanoestructuras 1D: en este caso el nanomaterial presenta una de sus dimensiones en la escala micro/macrométrica. Los nanotubos de carbono cuya longitud oscila entre 5 y 15  $\mu\text{m}$ , los nanoalambres (nanowires) y las nanovarillas (nanorods) cumplen con esta definición.

Nanoestructuras 2D: la nanoestructura tiene únicamente una de sus dimensiones en la escala nanométrica mientras que las otras dos pertenecen a la micro/macroescala. Este es el caso de los nanorrecubrimientos superficiales y las películas delgadas de nanocapas moleculares.

Nanoestructuras 3D: el material está formado por un conjunto de las nanoestructuras citadas anteriormente. Se trata de nanopartículas ensambladas formando bloques de tamaño micro/macrométrico.

Otra de las características a destacar de los nanomateriales es que presentan una mayor relación superficie/volumen frente sus materiales homólogos en la macroescala. Esto implica cambios en la actividad catalítica, en la solubilidad, y en la reactividad, entre otros. En general se podría afirmar que a mayor superficie disponible mayor reactividad y por tanto, en principio, mayor potencial de aplicabilidad. De ahí, el gran interés suscitado por estos nuevos materiales y todo lo que les rodea.

Pero, ¿cómo han sido posibles el desarrollo y los avances en esta ciencia y tecnología? Esta pregunta se podría responder brevemente diciendo que esto ha sido posible principalmente gracias al desarrollo y sofisticación del microscopio: los hoy

conocidos como microscopios de sonda (scanning probe microscopes, SPMs) y las técnicas microscópicas relacionadas que permitieron “ver” este nuevo mundo. Así, a día de hoy, contamos con una batería de técnicas microscópicas y/o aparatos como la microscopía de fuerza atómica, la microscopía de transmisión electrónica o la microscopía de electrones secundarios (AFM, TEM y SEM, siglas en inglés respectivamente), el microscopio de efecto túnel (scanning tunneling microscope), que nos permiten conocer tanto el tamaño como la forma u obtener imágenes de gran calidad del nanomaterial en estudio.

Otro de los grandes retos a los que se ha enfrentado y sigue enfrentándose la comunidad científica es la síntesis de estos nanomateriales. En general se distinguen dos tipos de metodologías de creación de nanomateriales diametralmente opuestas que son las denominadas *síntesis de arriba a abajo o técnicas descendentes (top-down)* y *síntesis de abajo a arriba o técnicas ascendentes (bottom-up)* [6]. Brevemente, la síntesis *top-down* consiste en fabricar el nanomaterial a partir de su material homólogo macroscópico por reducción de su tamaño mediante procedimientos técnicos de elevada precisión como son el mecanizado ultrapreciso o las técnicas litográficas. El claro ejemplo de este proceder es la fabricación de chips comerciales como los Pentium Intel o los chips de memoria dinámica de acceso aleatorio. En contraposición tenemos la síntesis *bottom-up* que se basa en el crecimiento del nanomaterial a partir de componentes más pequeños (átomo a átomo, o bien, molécula a molécula). El grado de miniaturización alcanzable mediante este enfoque, es superior al que se puede conseguir con el top-down. Dentro de esta vía de nanofabricación podemos distinguir tres grandes categorías: la síntesis química, el ensamblaje posicional y el autoensamblaje. En la presente Tesis Doctoral las estrategias sintéticas desarrolladas para la fabricación de los nanomateriales empleados se basaron en síntesis químicas *bottom-up*.

Desde el punto de vista químico y más concretamente desde la química analítica la aparición del mundo nano ha supuesto una gran revolución. Las oportunidades que tiene la química de hacer importantes aportaciones al mundo de la nanociencia son numerosas. Entre ellas podemos destacar cinco grandes campos de acción [7]:

1. Desarrollo de nuevas estrategias sintéticas de nanomateriales con propiedades únicas.
2. Producción económica, reproducible, de calidad y en cantidad de nanoestructuras ya conocidas.
3. Mecanismos moleculares en nanobiología. A través de la comprensión de los mecanismos moleculares de las nanoestructuras funcionales biológicas, tales como los anticuerpos, los ribosomas, las enzimas o el ADN, y en última instancia el paquete celular, la química puede hacer interesantes aportaciones gracias a su comprensión singular de dichos mecanismos.
4. Desarrollo de nuevas herramientas y métodos analíticos de caracterización y/o detección de nanomateriales.
5. Evaluación de riesgos y evaluación de seguridad tanto para la salud como para el medio ambiente.

Así, en la presente Tesis Doctoral se tratará de poner de manifiesto todo el potencial que tienen los nanomateriales, más en concreto los quantum dots y los nanoclústers metálicos como marcadores en el desarrollo de inmunoensayos, abarcando desde la síntesis y caracterización de los mismos hasta la detección final de la marca mediante el empleo de distintos detectores. De este modo podríamos decir que esta Tesis Doctoral se engloba dentro e intentará arrojar algo de luz a los puntos 1, 3 y 4 anteriormente citados.

Dentro del marco de la nanociencia, como acabamos de mencionar, uno de los campos de acción de la química es la síntesis de nuevos nanomateriales que vengan a solucionar problemas o mejorar propiedades de los materiales ya existentes. A pesar de que al inicio de la presente Tesis Doctoral existían numerosos marcadores luminiscentes disponibles en el mercado, éstos presentaban una serie de problemas como una baja estabilidad, bajos tiempos de vida media, sensibilidad a la luz ambiente (fotodegradación), poca separación entre la longitud de onda de excitación y emisión, su longitud de onda de emisión no siempre es compatible con la aplicación analítica

requerida, etc. De ahí la necesidad emergente, ya mencionada, del desarrollo de fluoróforos de nueva generación que solventen o mejoren los problemas aquí expuestos y amplíen su rango de aplicabilidad. En efecto, de manera particular, la nanotecnología ha entrado con fuerza tanto en el mundo de las técnicas de análisis luminiscentes como en el mundo del (bio)análisis, campos en los que se centra el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral. Así, un importante avance en el desarrollo de nuevas metodologías fotoluminiscentes para el análisis (bio)químico lo constituye el empleo de nanopartículas conocidas como *Quantum Dots* (QDs) y *Nanoclusters Metálicos* (NCs) como nuevos tipos de marcadores luminiscentes. En los siguientes apartados se describirán en profundidad estos dos tipos de nanomateriales “cero dimensionales”.

### I.1.2. *Quantum dots*

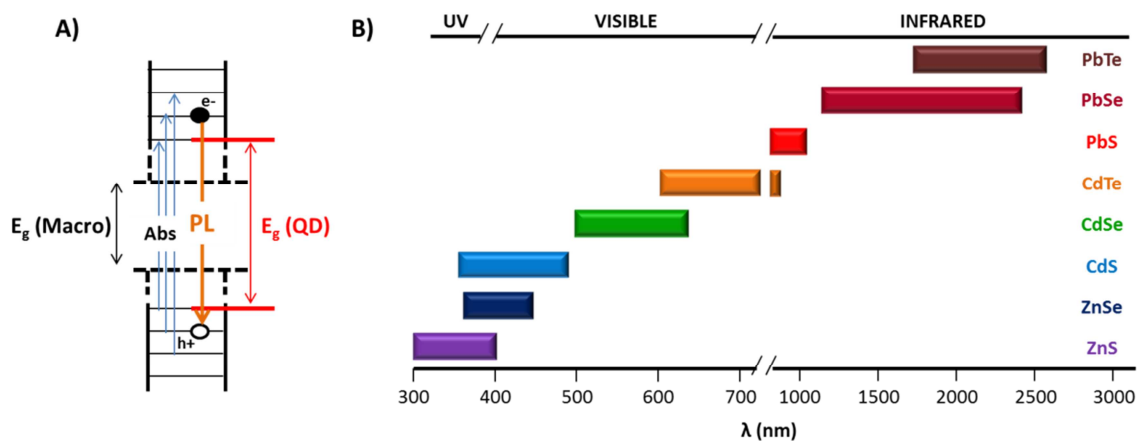
Los QDs también conocidos como “puntos cuánticos”, “nanopartículas inorgánicas semiconductoras” o “átomos artificiales” son nanomateriales cero-dimensionales, es decir, todas sus dimensiones están confinadas en la nanoescala [8]. Típicamente, estos nanocristales presentan un tamaño que oscila entre los 2 y 10 nm y están constituidos por un número de átomos que varía entre los 100 y los 10000 átomos por nanopartícula [9-11]. Debido al fuerte confinamiento cuántico que sufren aparecen unas nuevas propiedades optoelectrónicas muy interesantes entre las que cabe destacar: elevados rendimientos cuánticos de la fluorescencia, coeficientes de extinción molar altos, bandas de absorción anchas junto con espectros de emisión estrechos y simétricos (típicamente con anchos de banda a la semialtura entre 25 y 40 nm), una gran eficacia en el desplazamiento Stokes (gran separación entre la banda de absorción y la de emisión), alta fotoestabilidad y una excepcional resistencia a la degradación química. De este modo, los QDs se convierten en unos buenos candidatos para sustituir, o al menos ser una buena alternativa, a los fluoróforos orgánicos convencionales [12,13].

#### I.1.2.1. Aspectos generales y propiedades de los quantum dots

A continuación se detallan y comentan en mayor profundidad los fenómenos que dan lugar a las características que probablemente se podrían considerar como las más importantes y representativas de estos nanomateriales. El confinamiento cuántico, efecto del que deriva el nombre de este nanomaterial “quantum dot” [14], se manifiesta cuando el tamaño del nanocristal es igual o menor que el radio del excitón de Bohr, haciendo que las bandas de conducción y valencia de un semiconductor clásico pasen a ser niveles de energía discretos, cuantizados y finitos [14,15]. Como bien es sabido, en un semiconductor convencional la distancia entre dichas bandas de conducción y valencia se conoce como “salto de banda” o “*band-gap*” y determina la energía que debe tener un electrón para pasar de una a otra banda, teniendo esta energía un valor fijo para cada semiconductor. Pues bien, cuando se trata de los QDs, en los que tenemos niveles de energía cuantizados, este salto de banda está directamente relacionado con el tamaño de dicho nanocristal. Esta interesante característica hace posible obtener QDs con idéntica



composición química pero con un amplio intervalo de longitudes de onda de emisión, siendo uno de los efectos más estudiados y mejor conocidos de estos nanomateriales [13,15,16]. Así, al disminuir el tamaño del quantum dot aumenta el *band-gap* y por tanto la emisión luminiscente del mismo se producirá a longitudes de onda más bajas, es lo que se conoce como efecto hipsocrómico [17]. Diversos estudios han demostrado que variando tanto el tamaño como la naturaleza del material empleado para la síntesis del QD podemos modular fácilmente su emisión luminiscente desde la región del ultravioleta hasta la región del infrarrojo cercano del espectro electromagnético, tal y como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4:** A) Representación típica de los diagramas de energía para un nanomaterial cero dimensional teniendo como referencia su homólogo en la escala macro.  $E_g(\text{Macro})$  y  $E_g(\text{QD})$  representan los saltos de banda correspondientes para un semiconductor y para un quantum dot respectivamente. B) Esquema representativo de la modulación de la emisión de los quantum dots en función de la composición y tamaño de su núcleo.

Típicamente los materiales empleados para la síntesis de quantum dots son mezclas binarias de átomos de elementos pertenecientes a los grupos 12–16 (ZnS, CdS, CdSe, HgS), 13–15 (GaAs, InP, InAs, GaN) o 14–16 (PbTe, PbSe) de la Tabla periódica [11]. También han sido sintetizados quantum dots con propiedades análogas a partir de mezclas ternarias como CdZnS, CdSSe, InNP o InGaAs [12]. Los quantum dots sintetizados a partir de una de dichas mezclas, generalmente ZnS o ZnSe, junto con la adición de un metal dopante (Mn, Eu, Tb) también han sido estudiados presentando una nueva característica y es que son fosforescentes [18]. No obstante, se ha observado que las propiedades luminiscentes de los QDs mejoran aún más cuando este núcleo se

recubre con una capa de otro semiconductor de distinto *band-gap*. Esto es debido a que esta segunda capa de semiconductor protege al núcleo de fenómenos de oxidación u otras reacciones debido a interacciones de especies presentes en el entorno de la nanopartícula con los átomos de su superficie que pueden provocar defectos superficiales. Los defectos en la superficie de la estructura del nanocrystal actúan como trampas temporales para el electrón o el hueco, de manera que la recombinación radiacional se puede ver desfavorecida. La sucesión de procesos de atrapamiento y desatrapamiento da lugar a una fluorescencia intermitente, conocida como *blinking*, visible a nivel molecular y que se traduce en una disminución del rendimiento cuántico. La capa de este segundo semiconductor puede ser diseñada de modo que el rendimiento cuántico final obtenido sea cercano al 90% [19]. En la actualidad, es más común trabajar con QDs tipo *core/shell* como los CdSe/ZnS que son los empleados en esta Tesis Doctoral. En la Figura 5 quedan reflejados los distintos tipos de QDs *core/shell* que hay atendiendo a la posición del par hueco-electrón dentro de los niveles energéticos del *core* o bien del *shell*.

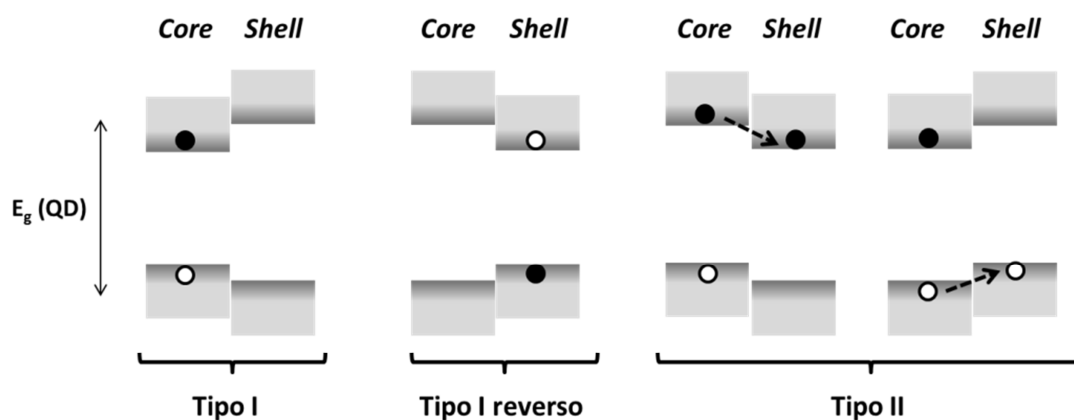


Figura 5. Representación esquemática de los distintos tipos de QDs core/shell.

Así se pueden distinguir claramente tres grupos: Los de **Tipo I** que se caracterizan porque el *band-gap* del *core* es menor que el del *shell* por lo que el par hueco-electrón se confina en el núcleo dando lugar a recombinaciones rápidas. Es la estructura más típica de los QDs (p.e. CdSe/ZnS o CdS/ZnS). En el **Tipo I reverso** el salto de banda del *shell* es menor que el del *core* por lo que el par hueco-electrón se confina parcial o totalmente en el *shell* dependiendo del grosor de éste. A este tipo de estructura responden QDs de CdS/HgS, CdS/CdSe y ZnSe/CdSe. Por último, cuando los niveles

energéticos tanto de la banda de valencia como de la banda de conducción del *core* son más altos o más bajos que los del *shell*, el electrón y el hueco tienden a ser separados en el espacio entre el *core* y el *shell* de los estados de menor energía, resultando en una mayor duración de los excitones antes de la recombinación y dando lugar a una estructura **Tipo II**. Pertenecen a este grupo los QDs de CdTe/CdSe y CdSe/ZnTe [20-22].

La recombinación radiacional del par hueco-electrón en los QDs se caracteriza por tener una larga vida media (10-50 ns) lo que permite hacer uso de “medidas a tiempo resuelto” para separar la señal de emisión procedente de los QDs de otras emisiones con menor vida media (como por ejemplo la fluorescencia de fondo que se observa cuando se llevan a cabo medidas en células), favoreciéndose el aumento de la sensibilidad de la detección [19,23].

Finalmente, otra de las características más reseñables e innovadoras de los quantum dots es que al exhibir bandas de absorción anchas asociadas a espectros de emisión estrechos y simétricos, hace que se pueda excitar con una única longitud de onda a un conjunto de quantum dots con emisiones a diferentes longitudes de onda. Esta gran ventaja sobre los fluoróforos convencionales hace a estos nanomateriales especialmente interesantes para aplicaciones de multianálisis [12, 13].

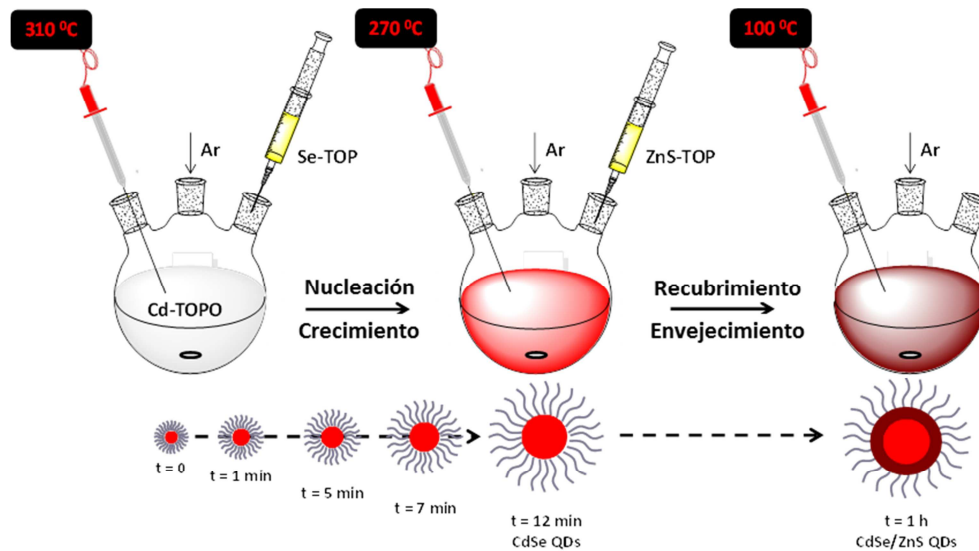
#### I.1.2.2. Síntesis de quantum dots

Desde su descubrimiento se han investigado y desarrollado diferentes técnicas para llevar a cabo la síntesis de QDs. Las rutas sintéticas más popularizadas en el campo (bio)analítico son las conocidas como “*bottom-up*” que se basan en sintetizar los QDs, en suspensión coloidal, mediante la reacción química de moléculas precursoras [24]. Precisamente, esta vía, que se describe a continuación, es la que se ha empleado en la presente Tesis Doctoral para sintetizar QDs de seleniuro de cadmio recubiertos con sulfuro de zinc (CdSe/ZnS).

Los QDs con núcleo de CdSe son el tipo de QD más ampliamente estudiado hasta la fecha. Originalmente, las rutas de síntesis de estos QDs utilizadas generaban

nanocristales de baja calidad y con una amplia distribución de tamaños. No fue hasta 1993 cuando Murray y colaboradores [17] consiguieron desarrollar una ruta sintética en la que se obtenían nanopartículas con un alto grado de monodispersión, con distribuciones de tamaño menores al 5%. Esta ruta se basaba en la reacción a elevada temperatura y en medio orgánico de distintos precursores organometálicos de la nanopartícula, como el dimetilcadmio. Los precursores empleados eran tóxicos, pirofóricos y agresivos para el medio ambiente. Por ello, más recientemente, se han propuesto otras rutas de síntesis de QDs en las que se tratan de emplear reactivos más sencillos de manipular y menos peligrosos para el medio ambiente. En este sentido destaca la sencilla ruta diseñada por Peng y colaboradores [25] basada en el empleo de óxido de cadmio, así como otras rutas en las que se emplean como precursores de los QDs carbonato de cadmio [26] o acetato de cadmio [27]. Además de ser protocolos de síntesis más respetuosos con el medio ambiente, permiten obtener nanopartículas de elevada calidad y con rendimientos cuánticos de la fotoluminiscencia cercanos al 85%.

Las rutas sintéticas en las que se obtienen QDs coloidales de mayor calidad son aquellas que se llevan a cabo a altas temperaturas en un medio orgánico coordinante como el que se obtiene con la trioctilfosfina (TOP), el óxido de trioctilfosfina (TOPO) y la hexadecilamina (HDA). Estos disolventes orgánicos estabilizan la superficie de los QDs previniendo la agregación de los mismos una vez sintetizados. En este proceso de síntesis la nucleación de las nanopartículas tiene lugar rápidamente y va seguida de un crecimiento epitaxial y un envejecimiento de las nanopartículas. El crecimiento del núcleo de estos QDs puede ser monitorizado a través de medidas espectroscópicas de alícuotas extraídas del medio de reacción a distintos tiempos [28]. De este modo, cuando hayamos alcanzado el tamaño deseado de la nanopartícula (longitud de onda de emisión deseada) podemos detener el crecimiento de la misma por simple disminución de la temperatura de la mezcla de reacción. A pesar de que este proceso de síntesis tiene lugar bajo atmósfera inerte debido a la reactividad de los precursores en presencia de oxígeno y humedad, una vez sintetizados, los QDs son estables al aire, lo que facilita su manipulación a posteriori. En la Figura 6 se muestra una representación general de los pasos seguidos en la síntesis de QDs de CdSe recubiertos con ZnS.



**Figura 6:** Esquema típico del proceso de síntesis de QDs de CdSe/ZnS a alta temperatura realizado a lo largo de la presente Tesis Doctoral.

Para que los QDs tengan utilidad analítica deben poseer un elevado rendimiento cuántico de la luminiscencia, alta estabilidad en las condiciones reales de medida y, además, ser solubles en el medio de interés. Para conseguir QDs que cumplan estos requisitos se han desarrollado dos estrategias:

⊙ La primera de ellas, enfocada a darle al QD una mayor estabilidad enalteciendo sus propiedades luminiscentes, consiste en cubrir al núcleo del QD con una capa protectora de otro semiconductor (como ya se ha mencionado con anterioridad). Esta estrategia sintética se comentará a continuación.

⊙ La segunda va orientada a la solubilización del QD en medios acuosos mediante la modificación de su superficie con grupos funcionales que le proporcionen el carácter de hidrosolubilidad. Esta etapa se describirá en profundidad en el epígrafe I.2.1. de esta introducción.

Como ya hemos visto los QDs *core-shell* son aquellos cuyo núcleo está recubierto por una capa protectora de un material semiconductor con distinto salto de energía o band-gap. Para los QDs con emisión en el intervalo del visible, numerosos semiconductores han sido empleados para recubrir el núcleo de la nanopartícula (por ejemplo: ZnS [29], CdS [30], ZnSe [31]), siendo los QDs formados por un núcleo de CdSe

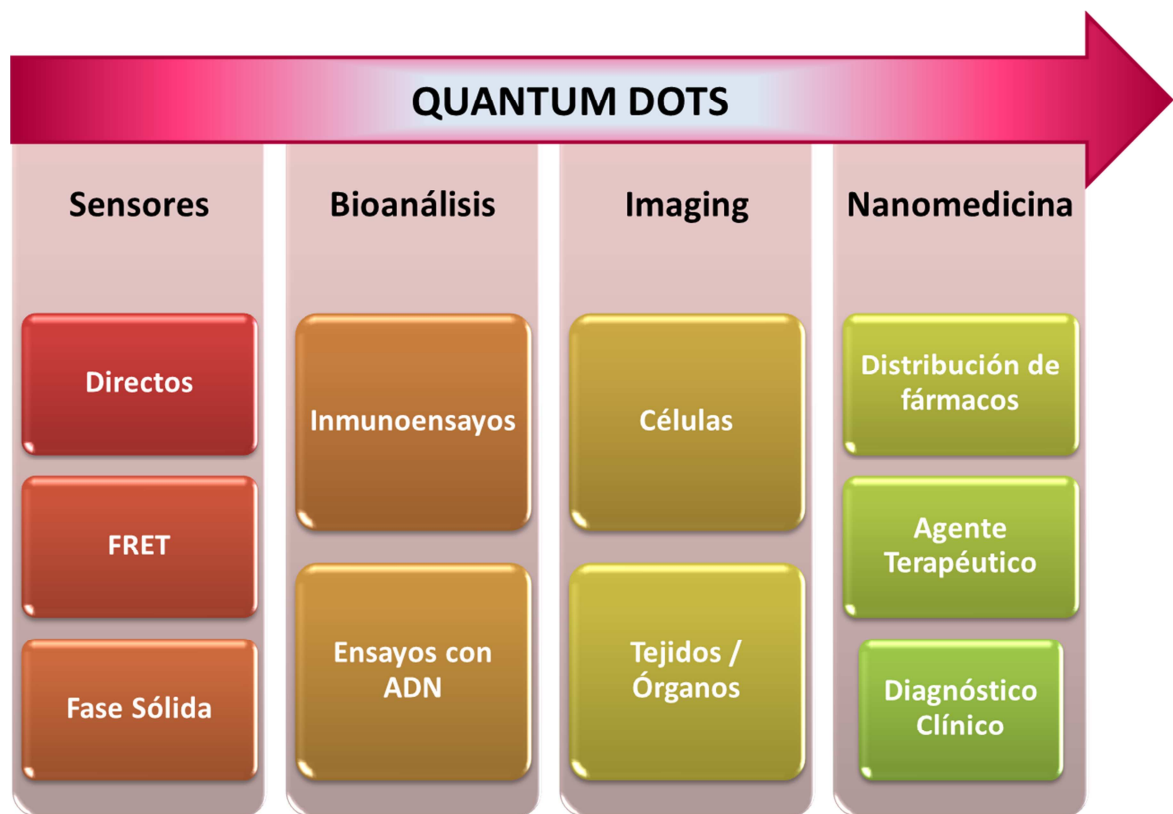
y recubiertos con ZnS los más empleados hasta la fecha tanto en aplicaciones optoelectrónicas como en aplicaciones de carácter biológico y analítico. Otra ventaja de este recubrimiento es que previene la liberación del  $\text{Cd}^{2+}$  (del núcleo del QD) al entorno, reduciéndose así considerablemente su toxicidad. Gracias a ello se ha ampliado su campo de aplicabilidad de estudios *in vitro* a estudios *in vivo* [32].

Actualmente se sabe que el recubrimiento con ZnS no genera una capa homogénea, completa y esférica sobre el núcleo de CdSe, sino que se genera una capa intermedia de CdS entre el núcleo de CdSe y el recubrimiento externo de ZnS que disminuye significativamente la tensión total del sistema [33]. Este recubrimiento mixto, conocido como *core/multi-shell*, se produce porque el fenómeno de crecimiento epitaxial de un material sobre la superficie de otro requiere una pequeña diferencia entre las constantes de red de las estructuras cristalinas implicadas. En este caso, la diferencia entre las constantes de red de CdSe/ZnS es muy elevada (12%) mientras que para el caso de CdSe/CdS es notablemente inferior (3,9%) favoreciéndose la aparición de esta capa intermedia. Como resultado se observa que los QDs con recubrimiento mixto presentan una mayor estabilidad y unas propiedades fotoluminiscentes superiores [34]. Para llevar a cabo el crecimiento de esta capa protectora de semiconductor se gotea lentamente una disolución de "ZnS-TOP" a la mezcla de reacción, una vez alcanzado el tamaño del núcleo deseado, tal y como se refleja en la Figura 6. Tras la adición, se baja la temperatura a 100 °C y se deja reaccionar durante una hora para dar tiempo a que se produzca el pasivado homogéneo del núcleo.

En la presente Tesis Doctoral estos nanomateriales (CdSe/ZnS QDs) se han empleado como marcadores luminiscentes y elementales en el desarrollo de inmunoensayos competitivos para el control agroalimentario tanto de sustancias endógenas (Progesterona) como exógenas (Melamina) de pequeño tamaño.

## I.1.2.3. Aplicaciones (bio)analíticas de los quantum dots

En la actualidad se han publicado una serie de artículos de revisión donde se recogen las principales y más prometedoras aplicaciones de QDs en bioanálisis [35-38]. Como en la presente Introducción se reserva un apartado completo para tratar en profundidad el inmunoanálisis con nanomateriales y en las citadas publicaciones se describen con claridad todas las aplicaciones bioanalíticas de los QDs en este epígrafe (para no alargar en exceso la Introducción) dichas aplicaciones basadas en la medida luminiscente del QD quedarán simplemente resumidas en el esquema de la Figura 7.



**Figura 7.** Esquema resumen de los principales usos de los QDs como marcadores luminiscentes en aplicaciones bioanalíticas.

### *I.1.3. Nanoclusters metálicos*

#### I.1.3.1. Generalidades y características optoelectrónicas

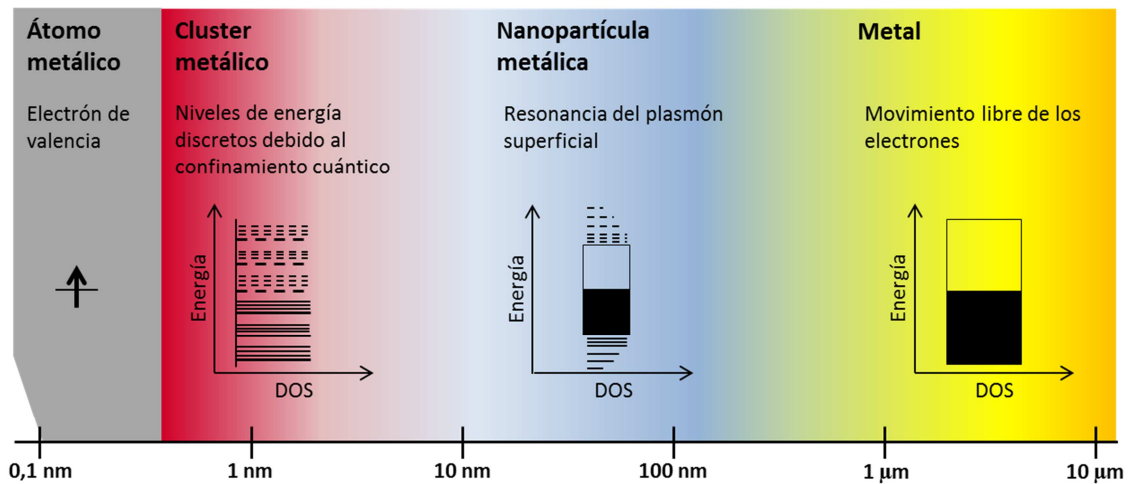
Cuando las dimensiones de un metal se van reduciendo a la nanoescala y van sufriendo las restricciones del confinamiento cuántico se puede observar una evolución en las propiedades que presenta dicho material (véase Figura 8) [39,40].

Así, por todos es sabido que los metales se caracterizan por ser buenos conductores eléctricos y por ser buenos reflectores ópticos (por su lustre), debido al movimiento libre de sus electrones deslocalizados por la banda de conducción. Sin embargo, cuando reducimos las dimensiones del metal a la nanoescala nos podemos encontrar tres regímenes o dominios: las nanopartículas grandes, las nanopartículas pequeñas y los nanoclusters [41]. La diferencia entre las nanopartículas grandes y pequeñas es que las propiedades de estas últimas son más dependientes del tamaño. No obstante en ambos casos la respuesta óptica frente a un campo electromagnético externo depende simplemente de su tamaño, la densidad electrónica y de la función dieléctrica relativa al medio en el que se encuentran las nanopartículas, pudiendo ser todo ello descrito cuantitativamente con la teoría de Mie [42]. En ambos casos las dimensiones del metal son comparables o menores que el recorrido libre medio del electrón, por lo que el movimiento de los electrones comienza a estar limitado por el tamaño de la nanopartícula y se espera que las interacciones con la luz se produzcan principalmente con la superficie del material. Esto da lugar al fenómeno de la Resonancia del Plasmón Superficial, en el cual las propiedades ópticas se determinan por la oscilación colectiva de los electrones de conducción resultante de la interacción con la luz. De este modo, las nanopartículas plasmónicas se caracterizan por ser fuertes absorbentes de la luz y no presentar luminiscencia.

Pero cuando el tamaño de la nanopartícula comienza a ser comparable con la longitud de onda de Fermi de un electrón la estructura en bandas se rompe en niveles discretos de energía porque en este momento no sólo el tamaño sino el número de átomos comienza a ser limitado. El metal reducido a esta escala tan pequeña se conoce como nanocluster metálico y ya no es conductor como consecuencia de la separación de



los niveles de energía. Por otro lado, la oscilación colectiva de los electrones también está impedida por lo que los nanoclusters no presentan la banda de plasmón superficial típica de las nanopartículas: nos encontramos frente a una especie totalmente nueva, en la que las interacciones con la radiación electromagnética todavía son posibles a través de las transiciones electrónicas entre los distintos niveles energéticos dando lugar a su principal característica, su fuerte emisión fluorescente.



**Figura 8.** Efecto del tamaño en las propiedades optoelectrónicas del metal. Como se puede observar mientras que el metal y la nanopartícula metálica presentan bandas continuas de energía, el limitado número de átomos que conforman el clúster metálico hacen que esta banda se rompa en niveles de energía discretos permitiendo la interacción con la luz a través de transiciones electrónicas entre dichos niveles. Figura modificada de la Ref. 39.

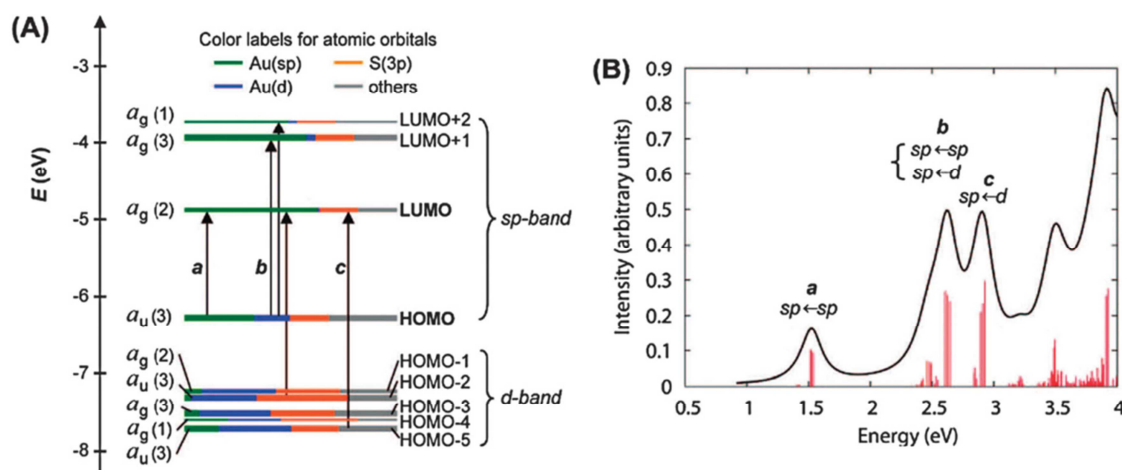
Así, podemos decir que los nanoclusters presentan un comportamiento molecular, exhibiendo una transiciones altamente polarizables que se pueden describir mediante la ecuación desarrollada con el modelo de electrón libre,  $E_{\text{Fermi}}/N^{1/3}$ , donde  $E_{\text{Fermi}}$  es la energía de Fermi del metal macroscópico y  $N$  es el número de átomos que conforma el clúster. Esta simple relación nos indica que la fluorescencia proviene de las transiciones intra-banda ( $sp \leftarrow sp$ ) y/o transiciones inter-banda ( $sp \leftarrow d$ ) de los electrones libres. Por otro lado, se sabe que el número  $N$  de átomos se puede racionalizar fácilmente a través de un modelo de mecánica cuántica sencillo, el modelo de Jellium [41, 43]. Por tanto, el número de átomos que conforman un nanocluster está predeterminado por la estabilidad que va a presentar frente a otros, es decir, en este caso se cumple “la ley del más fuerte”: en una síntesis van a sobrevivir los clusters más

estables termodinámicamente. Este fenómeno ya fue observado en 1984 por Knight y col. [44] para clusters de sodio, viendo por espectrometría de masas que se reproducía un *pattern* en la intensidad de los picos donde  $N = 2, 8, 18, 20, 40, 58$ . Este fenómeno de los “números mágicos” en la formación de nanoclusters ha sido recientemente confirmado para el caso del oro por Dixon y col. en 2004 [45], aunque estos estudios todavía no se han realizado para el caso de otros metales.

Como cabía esperar, el estudio de los nanoclusters metálicos ha despertado un gran interés en los últimos años debido a que presentan unas propiedades ópticas, electrónicas y químicas completamente diferentes a las especies conocidas hasta la fecha y que son puente entre los átomos aislados y las nanopartículas o incluso el metal macroscópico. Entre sus propiedades cabe destacar una fuerte emisión fluorescente modulable en cuanto a naturaleza del metal, tamaño del cluster, ligando y medio en el que se encuentra solubilizado el nanocluster, elevada fotoestabilidad, largos desplazamientos de Stokes, ausencia de intermitencia en la emisión, absorción de dos fotones, rendimientos cuánticos de la fluorescencia aceptables, una relación superficie-volumen elevada y una baja toxicidad [45-48]. Todo ello los convierte en unas prometedoras alternativas a los fluoróforos orgánicos convencionales y a los quantum dots ya que solucionan o intentan mejorar algunas de las limitaciones que presentan dichas marcas como por ejemplo la baja fotoestabilidad de los fluoróforos orgánicos o el estigma de la toxicidad que presentan algunos QDs debido a estar compuestos por átomos de metales pesados como el Cd. Así los nanoclusters metálicos se presentan como unas nuevas plataformas luminiscentes para el desarrollo de aplicaciones en campos como los biosensores, optoelectrónica, catálisis, técnicas de imagen molecular y biológica y nanomedicina (tanto en terapia como en diagnóstico). A continuación se comentarán con mayor detalle algunas de las características de estos nuevos nanomateriales [41,47,48].

Absorbancia y propiedades luminiscentes de los nanoclusters.

Debido a que las propiedades ópticas y electrónicas de los nanoclusters metálicos vienen determinadas por su estructura electrónica, es importante comprender cómo cambia dicha estructura electrónica con el tamaño en el régimen más pequeño de la nanoescala. Como se ha comentado con anterioridad, el limitado número de átomos que conforman el nanocluster así como su pequeño tamaño hacen que la estructura de los estados electrónicos en bandas característica de las nanopartículas se rompa en niveles discretos de energía, por lo que ya no se observa el fenómeno del plasmón superficial. Sin embargo, se espera que la interacción de los nanoclusters metálicos con la luz produzca transiciones electrónicas intra e interbanda, tal y como se muestra en la Figura 9, dando lugar a espectros tanto de absorción como de emisión característicos para cada metal.



**Figura 9.** **A)** Diagrama de orbitales moleculares Kohn-Sham para un compuesto modelo  $\text{Au}_{25}(\text{SH})_{18}$  donde se muestran las posibles transiciones electrónicas intra ( $sp \rightarrow sp$ ) e interbanda ( $d \rightarrow sp$ ) que se pueden dar tras la interacción con la radiación electromagnética. **B)** Espectro de absorción teórico para la especie  $\text{Au}_{25}(\text{SH})_{18}$  en el que podemos ver asociadas las transiciones electrónicas que producirían dichas bandas. Además también se puede observar cómo dicho espectro teórico encaja perfectamente con el obtenido experimentalmente (en rojo). Figura modificada de la referencia 38.

Como se puede ver en la Figura 9, los nanoclusters de  $\text{Au}_{25}$  presentan varias bandas de absorción, debidas a transiciones electrónicas discretas, lo cual es un claro indicativo de que los nanoclusters presentan un comportamiento molecular. Además, en el trabajo de Tsukuda y col. [49] se muestra cómo los picos de absorción debidos a

transiciones electrónicas intrabanda de nanoclusters de Au protegidos con glutatión presentan un desplazamiento hacia longitudes de onda más cortas (*blue-shift*) cuando se reduce el tamaño del núcleo, poniendo de manifiesto la relación estructura electrónica-tamaño-propiedad. Esto es debido a que al reducir el tamaño del núcleo aumenta la separación entre los niveles electrónicos de energía, provocando que dichas transiciones se produzcan a mayores energías, es decir, a menores longitudes de onda. Los espectros de absorción de nanoclusters de Ag también muestran transiciones electrónicas discretas y características del metal [50,51].

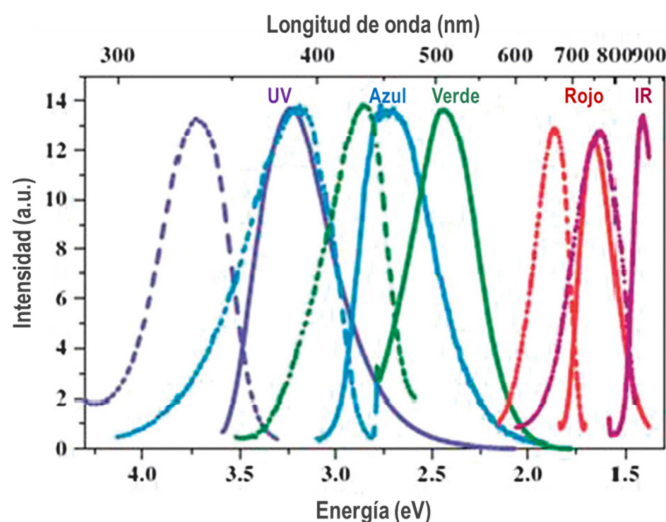
Normalmente la luminiscencia de los metales es extremadamente pequeña debido a la gran eficiencia de los procesos de decaimiento no radiativos y a la inexistencia en su estructura electrónica de un salto de banda (*band gap*). Sin embargo, ésta es una de las principales características de los nanoclusters, su elevada fotoluminiscencia. Esto es debido a que al reducir las dimensiones del metal a la nanoescala dando lugar a los NCs se observa que estos se comportan como “átomos artificiales” mostrando una luminiscencia con un rendimiento cuántico al menos nueve órdenes de magnitud superior al conocido para el metal en la escala macroscópica ( $10^{-10}$ ). Así, las propiedades luminiscentes de estos nuevos nanomateriales han atraído la atención de la comunidad científica ya que comparados con los fluoróforos orgánicos convencionales, los NCs presentan ventajosas propiedades fotofísicas entre las que cabe destacar una buena fotoestabilidad, largos desplazamientos de Stokes (100 nm) y una elevada emisión de la fluorescencia. Sin embargo, los procesos involucrados en la aparición de esta propiedad luminiscente todavía no están estudiados en profundidad.

Actualmente se han propuesto diversos mecanismos que podrían explicar las propiedades luminiscentes de los NCs metálicos. Por un lado, Huang y Murray [52,53] sugieren que la luminiscencia en el rango del visible adscrita a los NCs se debe a transiciones electrónicas interbanda entre la banda d ocupada y la banda sp de conducción. Mientras, Whetten y col. [54] atribuyen la luminiscencia de los nanoclusters Au<sub>25</sub>-glutatión a la relajación radiativa dentro de la banda de conducción sp (transición intrabanda). Por otro lado, Chang y col. [55] proponen que la luminiscencia de sus AuNCs es producida por fenómenos de transferencia de energía ligando-metal e

interacciones metal-metal. Finalmente, Wu y Jin [56] han visto que los ligandos juegan un papel muy importante en la fluorescencia de los NCs. Todos estos estudios sugieren que habría dos fuentes principales responsables de la fluorescencia de los NCs metálicos: (1) el núcleo metálico en sí, con sus efectos intrínsecos de la cuantización y (2) la superficie de la partícula, donde las propiedades están gobernadas por las interacciones metal-ligando.

No obstante y como se puede ver, a diferencia de otras nanopartículas como los QDs, a día de hoy no existe un mecanismo general que explique la emisión fluorescente de los NCs. Más bien parece que el mecanismo de fluorescencia podría ser diferente para cada tipo de NCs dependiendo del tamaño, los ligandos que recubren la superficie del nanomaterial e incluso de la ruta sintética seleccionada para su síntesis [47,48]. Aquí subyace otra de las características más importantes de los NCs metálicos y es la capacidad de modulación de su emisión fluorescente mediante el control de su tamaño, el ligando protector que los recubra o bien el medio en el que se encuentren.

A continuación se citan algunos ejemplos que ilustran esta propiedad. El grupo del profesor Dickson realizó en 2004 un estudio sobre la dependencia de las propiedades fluorescentes de los AuNCs con el tamaño de los mismos [57]. Así, como se puede ver en la Figura 10, se obtuvieron una serie de AuNCs que diferían en el número de átomos que componen el núcleo ( $Au_5$ - $Au_{31}$ ) provocando una emisión a distintas longitudes de onda dependiendo del tamaño (385-866 nm). Igualmente observaron cómo las bandas de excitación y emisión se desplazaban a mayores longitudes de onda (menores energías) al aumentar el tamaño del NC. Además también se fijaron en que el rendimiento cuántico de la fluorescencia aumentaba al disminuir el tamaño del NC, lo que sugiere que la vía de desactivación no radiativa del estado excitado tiene mayor probabilidad de ocurrir cuanto más grande sea el tamaño del NC.



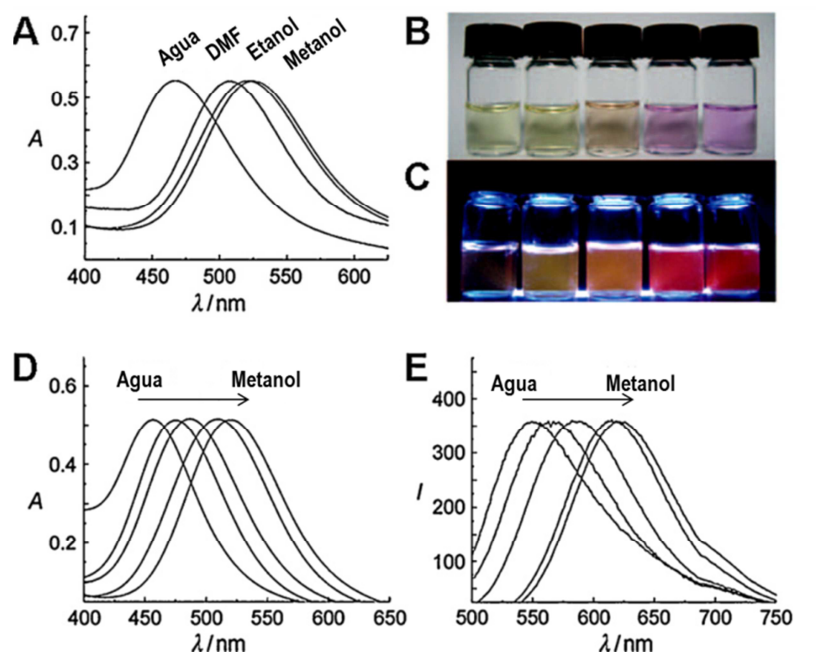
**Figura 10.** Espectros de excitación (línea punteada) y emisión (línea sólida) de una serie de AuNCs ilustrando la modulación de la emisión fluorescente con respecto al tamaño del NC. Figura adaptada de la Ref. 53.

Años más tarde, el grupo del profesor Jin llevó a cabo el estudio del efecto del ligando empleado para recubrir la superficie del NC sobre sus propiedades luminiscentes [56]. Así prepararon una serie de NCs de oro  $[Au_{25}(SR)_{18}]^-$  variando el ligando protector empleado (R:  $C_6H_{13}$ ;  $C_{12}H_{25}$  y  $C_2H_4Ph$ ). Los resultados mostraron que la fluorescencia de los NCs se incrementaba cuanto mayor era la capacidad de donación de carga del ligando ( $C_6H_{13} < C_{12}H_{25} < C_2H_4Ph$ ). A tenor de estos resultados propusieron tres estrategias para poder incrementar la fluorescencia de los NCs según el ligando seleccionado:

- (1) incrementar la capacidad de transferencia de carga del ligando;
- (2) mejorar la electropositividad del metal que forma el núcleo
- (3) usar ligandos protectores que posean átomos o grupos ricos en electrones.

En otro estudio Díez y col. [58] encontraron que las propiedades de absorción y emisión de AgNCs presentaban drásticos cambios en respuesta al entorno químico en el que estuviesen. Así, observaron que al aumentar la relación molar de precursores metal/ligando se producía un desplazamiento hacia el rojo en la emisión de los AgNCs obtenidos. Finalmente, estos autores también realizaron estudios sobre el comportamiento de las propiedades ópticas de los NCs en función del disolvente en el

que se encuentren (véase Figura 11). Este fenómeno es conocido como “Efecto solvatocrómico” y ha sido ampliamente estudiado para las nanopartículas metálicas más grandes [59]. Por lo que, el cambio del entorno químico del NCs podría inducir la división de los niveles de energía de este nanomaterial y la redistribución de los electrones en la superficie del mismo, conduciendo a la variación observada en las propiedades ópticas del NCs.



**Figura 11.** Efecto solvatocrómico de los PMAA-Ag nanoclusters. **A)** Espectros de absorción en distintos disolventes. Fotografías de los nanoclusters en diferentes mezclas de agua/metanol yendo de agua pura (izquierda) a metanol puro (derecha) bajo **B)** luz visible y **C)** luz UV. **D)** Espectros de absorción y **E)** espectros de emisión de las muestras de AgNCs fotografiadas en B). Figura modificada de la Ref. 54.

Absorción de dos fotones: el concepto de este fenómeno (TPA, siglas en inglés) fue introducido en 1931 por Maria Goepfert-Mayer en su Tesis Doctoral. Pero hasta la aparición del láser, treinta años más tarde, no se pudo comprobar experimentalmente este proceso detectando la fluorescencia provocada por la excitación de dos fotones en un cristal dopado con Eu [60] y posteriormente en el vapor de Cs [61]. La absorción de dos fotones es un proceso óptico no lineal de tercer orden en el que se produce la absorción simultánea de dos fotones de igual o diferente frecuencia con el objeto de excitar una molécula desde su estado fundamental a un estado excitado. El fenómeno de la TPA da lugar a la microscopía de excitación de dos fotones que es una técnica de

producción de imágenes fluorescentes que permite obtener imágenes de tejidos con una buena resolución en profundidad (de hasta 1 mm), convirtiéndose en una potente alternativa a otras técnicas de imagen como la microscopía confocal debido a su alta capacidad de penetración en el tejido, a una eficiente detección de la luz y a la disminución de la fototoxicidad [62]. Por todo ello, en comparación con la excitación con un fotón el empleo de dos fotones para excitar a un fluoróforo podría ofrecer una serie de ventajas substanciales, sobre todo en aplicaciones de imágenes *in vivo* o en terapia fotodinámica ya que se mejora la resolución espacial debido a la disminución de la dispersión de la luz (*scattering*) y se minimizan los fenómenos de autofluorescencia [63]. En este contexto, diversos trabajos [64-68] muestran los NCs tienen la capacidad de absorber varios fotones (superior a los fluoróforos orgánicos convencionales e incluso a los QDs), siendo así unas eficientes marcas para aplicaciones de proyección de imágenes fluorescentes como por ejemplo *bio-imaging*.

Propiedades catalíticas: una de las características principales de los NCs es su elevada relación superficie/volumen, lo que les convierte en unos candidatos idóneos para actuar como agentes catalíticos. Así, estudios tanto teóricos [69,70] como experimentales [71] muestran que dichas propiedades catalíticas se incrementan cuanto más pequeño es el tamaño del nanomaterial. En los últimos años se han venido desarrollando diversas aplicaciones en las que se emplea AuNCs como catalizadores para la oxidación del monóxido de carbono y la electro-reducción del oxígeno [72-77]. Esta última aplicación constituye un gran avance en el campo de las pilas de combustible y su comercialización, ya que, hasta la fecha, ésta se había visto obstaculizada debido a que la reacción de electro-reducción del oxígeno es una reacción catódica crítica en las células de combustible con una dinámica de reacción lenta y un alto costo de los electrocatalizadores basados en platino [78,79]. También se han llevado a cabo estudios sobre las propiedades catalíticas de los NCs de Ag y Cu, observándose el mismo comportamiento obtenido para los AuNCs [80,81].



A pesar de que ya existe una buena colección de trabajos que arrojan luz sobre los fundamentos, propiedades y comportamiento de los nanoclusters metálicos, el campo de investigación de estos nuevos nanomateriales es incipiente y todavía quedan numerosos estudios por realizar entre los que nos gustaría resaltar:

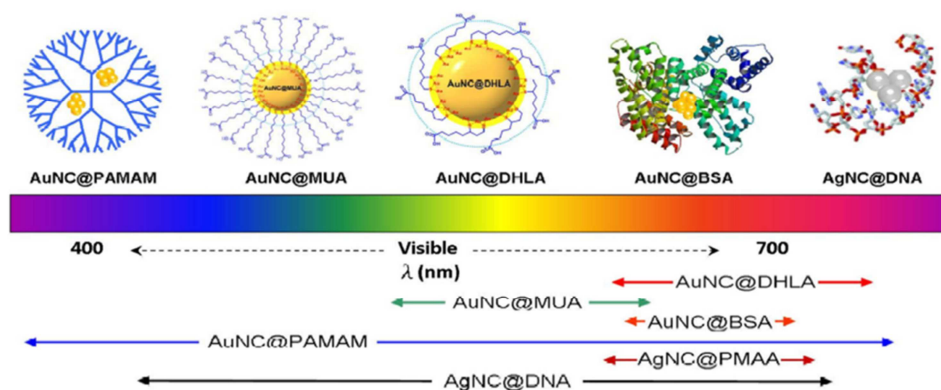
- A pesar de que, como veremos en el siguiente apartado, ya se han descrito numerosas aproximaciones para la síntesis de estos nanomateriales (sobre todo en los casos de Au y Ag) aún se requiere el desarrollo de rutas sintéticas que proporcionen nanoclusters metálicos de alta calidad, con elevados rendimientos cuánticos de la fluorescencia, alta homogeneidad en la distribución de tamaños (NCs monodispersos) y que sea fácilmente extrapolable a la síntesis de NCs de distinto núcleo metálico (Cu, Pt, Pd).
- La determinación de la estructura que adoptan estos nanomateriales así como la relación estructura-propiedades es otro punto de gran interés.
- Estudios en profundidad sobre los fundamentos, estructura y comportamiento de los NCs, ya que aunque como se ha mencionado anteriormente los NCs poseen unas propiedades únicas que los hace muy atractivos para aplicaciones en los más diversos sectores, poco se sabe todavía de los mecanismos que están involucrados en la aparición de dichas propiedades y de cómo pueden responder los NCs en distintos ambientes.
- Otro punto de interés sería el desarrollo de NCs multifuncionales; es decir que, además de presentar fluorescencia pudieran poseer otras características medibles como propiedades magnéticas (muy útil en aplicaciones clínicas o médicas para hacer imágenes *in vivo* detectables simultáneamente óptica y magnéticamente) [82]. También sería interesante el poder combinar la fluorescencia de los NCs con las propiedades de plasmón superficial de las nanopartículas [83]. En este sentido recientes trabajos [84,85], en los que se recubría o encapsulaban NCs de oro en sílice, abren la puerta a la posibilidad de introducir distintas funcionalidades y obtener los ansiados NCs multifuncionales.

- Finalmente no podemos olvidar que una de las más prometedoras aplicaciones en las que podrían contribuir estos nanomateriales es en el análisis *in vivo* y bioimaging. No obstante, a día de hoy existen relativamente pocos estudios sobre la interacción de los NCs con los medios biológicos, ya que como es bien conocido las proteínas y/o biomoléculas pueden adsorberse o asociarse a las nanopartículas pudiendo provocar cambios significativos en el comportamiento biológico. Por ello, es necesario ahondar en la comprensión de las interacciones entre los NCs y las biomoléculas para poder preveer la influencia de los NCs sobre la actividad biológica y así poder hacer un uso seguro y responsable de la nanotecnología. En este sentido también cabe preguntarse cómo afectaría la presencia de estos pequeños nanomateriales al comportamiento y desarrollo normal de una célula viva, como por ejemplo, dónde van o dónde se depositan, si provocan cambios en las propiedades celulares o cómo son procesados y eliminados por la célula.

Así podemos concluir que los nanoclusters metálicos son un campo de investigación incipiente y muy prometedor, con propiedades muy atractivas para su empleo como marcas biocompatibles de muy reducido tamaño. No obstante, aún queda mucho trabajo por hacer para que esta nueva generación de nanomateriales sea utilizada en aplicaciones prácticas de forma habitual como una alternativa real a los fluoróforos convencionales. Como ya hemos destacado, el mayor reto a corto plazo es el diseño y síntesis de nanoclusters de alta calidad, multifuncionales, que permitan su aplicación tanto en nanomedicina (terapia avanzada guiada por imagen, liberación intracelular de fármacos, diagnóstico molecular ultrasensible) así como en aplicaciones (bio)analíticas u optoelectrónicas como nanodispositivos emisores de luz.

### I.1.3.2. Métodos de síntesis de nanoclusters metálicos y técnicas de caracterización estructural

Debido a las prometedoras características y aplicaciones que presentan los NCs actualmente existe un gran interés en el desarrollo de métodos de síntesis de estos nanomateriales que sean fácilmente extensibles a cualquier núcleo metálico y escalables, ya que hasta ahora no hay un procedimiento general para la producción de NCs [43,46]. Esto puede ser debido a varios factores como por ejemplo la dificultad de llevar a cabo una síntesis con un buen control del tamaño del nanomaterial o también debido al hecho de que la selección del ligando que recubrirá el NCs no es trivial ya que no sólo afecta a la estabilización del nanomaterial sino también a sus propiedades ópticas (véase Figura 12) [47,48,56]. En la Figura 12 se puede observar como NCs con el mismo núcleo metálico pero que están recubierto con un ligando protector diferente presentan emisiones a distintas longitudes de onda.



**Figura 12.** Escala representativa de la emisión fluorescente de los NCs en función del ligando protector que recubre dicho nanomaterial. Figura obtenida de la Ref. 35.

A pesar de la gran variedad de rutas sintéticas propuestas en la literatura podemos diferenciar dos estrategias principales para la producción de NCs fluorescentes atendiendo al tipo de recubrimiento/molde/ligando en el que se va a sintetizar el NC, ya que de modo general todas las rutas sintéticas se basan en la reducción del ion metálico en presencia del ligando seleccionado:

(1) **La síntesis asistida por molde**, es decir, en este caso se utiliza una estructura que va a guiar el crecimiento del NCs en su interior. Esta estructura o molde puede ser una biomolécula (ADN [50, 86, 87], proteínas [49, 88 - 91]), dendrímeros como la

poliamidoamina [92-95] o polímeros como el ácido polimetacrílico [96-99]. Por este procedimiento se obtienen NCs estables con elevados rendimientos cuánticos de la fluorescencia (20-60%); no obstante, al estar embebidos dentro de una estructura hace que presenten un volumen hidrodinámico grande que puede limitar su aplicabilidad, por ejemplo en el marcaje de moléculas pequeñas [46]. Además, en el caso de los NCs crecidos en biomoléculas su campo de aplicación está restringido al de dicha biomolécula.

(2) **El empleo de ligandos protectores específicos**, como es el caso de ligandos tiolados [56,100-102] y aminados [103,104] que interaccionan fuertemente con la superficie de los metales formando NCs protegidos por una monocapa de ligando. Los NCs producidos por esta vía presentan unas características muy atractivas como son una gran estabilidad, volúmenes hidrodinámicos muy pequeños y la posibilidad de modificar la funcionalidad de los ligandos y/o llevar a cabo de manera sencilla posteriores modificaciones como por ejemplo la conjugación a biomoléculas, expandiendo de este modo su rango de aplicabilidad [46].

Como se ha comentado con anterioridad el proceso general para la síntesis de NCs metálicos fluorescentes transcurre a través de la reducción del ión metálico en presencia del ligando protector escogido. Sin embargo, para llevar a cabo dicha reducción en la literatura podemos encontrar descritas diferentes metodologías, entre las que cabe destacar la reducción química [50,90,101,102,105,106], fotoquímica [96,97,107], sonoquímica [108] y asistida por microondas [109].

Por otro lado, además de todas estas estrategias de síntesis “*bottom-up*”, es decir, crecer el NCs a partir de los correspondientes iones metálicos, también se han desarrollado estrategias para realizar la síntesis “*top-down*” partiendo de las nanopartículas metálicas plasmónicas mediante la metodología conocida como “*core etching*” o “*size focusing*” [110-115].

El gran reto en la síntesis de NCs es la obtención de una metodología general a partir de la cual se puedan sintetizar NCs de distinto núcleo metálico con un buen control del tamaño, es decir, llevar a cabo una homogeneización en el proceso de síntesis

y así poder investigar con mayor profundidad y establecer la relación composición/estructura/propiedad [46]. Otro reto que se persigue es el de conseguir NCs multifuncionales, es decir que no sólo presenten propiedades luminiscentes sino que también tengan, por ejemplo, propiedades magnéticas [47].

Una vez tenemos los NCs sintetizados y teniendo en cuenta que todas sus propiedades ópticas, electrónicas y catalíticas son estrictamente dependientes de su tamaño, composición y morfología se hace necesaria su exhaustiva caracterización estructural. Además una detallada información estructural permitiría una mayor comprensión de la relación estructura/propiedad, lo que ayudaría a sentar las bases para la realización de una optimización estructural del NC según la aplicación que se quisiera realizar. Para ello, existen diversas técnicas de caracterización estructural que se pueden emplear. No obstante hay que destacar que debido al pequeño tamaño de este nanomaterial en algunas ocasiones las técnicas de caracterización no tienen la resolución necesaria. Entre las técnicas comúnmente empleadas para llevar a cabo la caracterización estructural podemos citar [48]:

- (1) La **Espectroscopía de Rayos-X** (XRD, EDX): con este conjunto de técnicas se obtiene información acerca de la estructura cristalina y el tamaño de la misma (XRD), y la composición elemental (EDX).
- (2) la **Microscopía Electrónica** (TEM, HR-TEM, SEM): estas técnicas aportan información sobre el tamaño, la estructura cristalina y homogeneidad de la muestra, no obstante están bastante limitadas por su resolución. Así se suelen emplear como técnicas complementarias de caracterización.
- (3) La **Espectroscopía de electrones** (XPS): aporta información sobre los estados de oxidación del núcleo metálico junto con la química de superficie del nanomaterial.
- (4) la **Espectrometría de Masas Molecular** (ESI, MALDI): estas técnicas se emplean para realizar estudios estructurales y de composición pudiendo llegar a obtener la fórmula completa del NC sintetizado  $M_xL_y$ .

- (5) la **Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear**: esta poderosa técnica analítica es muy útil para conocer la estructura y el entorno químico de las moléculas. En el campo de los NCs se emplea fundamentalmente para comprobar que los ligandos están efectivamente recubriendo el núcleo metálico y para comprobar la pureza de la síntesis realizada.

### I.1.3.3. Aplicaciones (bio)analíticas

Debido a las propiedades únicas que presentan los NCs, éstos han llamado mucho la atención como prometedores marcadores ópticos dando lugar tanto a estudios fundamentales como a su empleo en un amplio rango de aplicaciones en los más diversos campos como por ejemplo sensores químicos, catalizadores, bioanálisis, nanomedicina y electrónica. En este apartado se pretende dar una visión general de las aplicaciones más relevantes desarrolladas hasta la fecha [47,48].

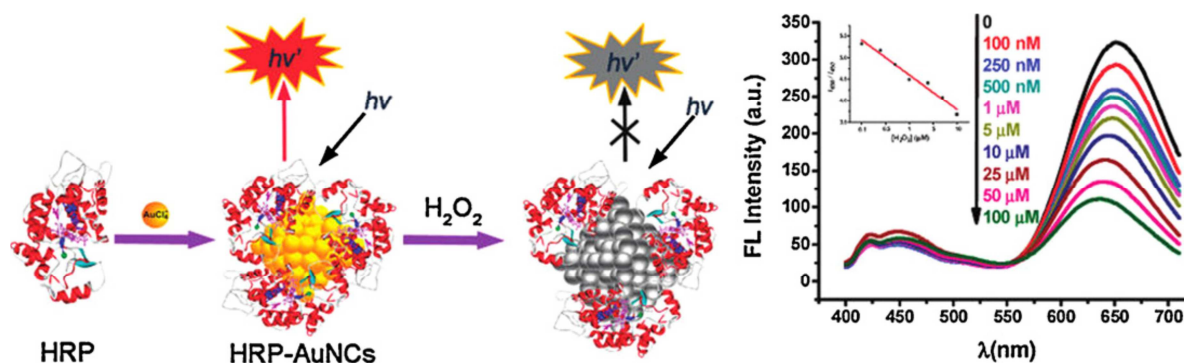
#### **Sensores químicos fluorescentes**

Al igual que ocurre con otros nanomateriales como los QDs o las NPs plásmónicas, los NCs metálicos se han estado utilizando con éxito en los últimos años en la detección tanto de iones (tóxicos para la salud humana o contaminantes para el medio ambiente) como de moléculas pequeñas que juegan un papel crítico en funciones celulares, en el metabolismo o que pueden ser marcadores de distintas enfermedades, debido a que la interacción directa de estas especies con la superficie del NC provoca modificaciones en sus propiedades fluorescentes. Las metodologías desarrolladas se basan fundamentalmente en procesos de quenching o apagado de la fluorescencia del NC bien por formación de complejos con el metal del núcleo o bien por causar la agregación de los NCs. Así para el caso de los iones se han desarrollado ensayos para la determinación de cianuro en agua [116] con nanoclusters de oro por formación del complejo estable  $\text{Au}(\text{CN})_2^-$  que provoca el apagado de la fluorescencia del AuNC. Con esta metodología llegaron a alcanzar límites de detección de  $2 \cdot 10^{-7}$  M, lo que representa un nivel de concentración 10 veces más bajo que el estipulado por la legislación de la Organización Mundial de la Salud para aguas de consumo ( $2 \cdot 10^{-6}$  M).

Los iones de metales pesados como el mercurio, plomo y cadmio son contaminantes tóxicos del medio ambiente y además son contaminantes que se acumulan en el cuerpo humano causando graves enfermedades o trastornos. Así, tanto NCs fluorescentes de Ag como de Au se han empleado para la determinación de los iones de metales pesados [90,102,117,118]. Finalmente, otro de los iones ampliamente estudiados y determinados por ser considerado por un lado un contaminante ambiental y por otro un elemento traza esencial en los sistemas biológicos es el  $\text{Cu}^{2+}$ . De este modo encontramos trabajos como el de Shang y Dong [119] cuya determinación en agua obtuvo unos límites de detección muy bajos (8 nM) teniendo en cuenta que la legislación americana (EPA) establece un límite de 20  $\mu\text{M}$  para aguas de consumo.

Por otro lado, el empleo de NCs como sensores directos en la determinación de moléculas pequeñas de relevancia biológica también ha sido descrito. Nuevamente las estrategias desarrolladas se basan en sistemas de apagado de la fluorescencia del NC por interacción directa de la molécula con la superficie del mismo. Así, cabe destacar trabajos como el desarrollado por Shang y Dong [120] en el que se lleva a cabo la determinación selectiva del aminoácido cisteína frente al resto de aminoácidos con un bajo límite de detección (20 nM) por quenching de la emisión fluorescente de los NCs de plata (PMAA-Ag). Otros trabajos para la determinación de ditiolos (cisteína, homocisteína y glutatión) mediante el empleo de Ag-DNA NCs se han desarrollado con éxito, mostrando además la capacidad de modular la reactividad y especificidad frente a determinado ditiol dependiendo de la secuencia de ADN seleccionada para sintetizar el NC [121,122]. También es de relevante importancia la determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ya que esta molécula está involucrada en numerosos procesos biológicos, químicos, farmacéuticos y medioambientales. De entre todos los trabajos desarrollados hasta la fecha para la determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante el empleo de NCs fluorescentes [123,124], me gustaría destacar la original estrategia desarrollada por Zhang y col. [125] donde sintetizan AuNCs bifuncionales al crecerlos en la enzima peroxidasa de rábano silvestre sin alterar la funcionalidad de ésta. De este modo consiguen de manera simultánea la actividad de la enzima (capaz de reconocer  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y la fluorescencia del NC. Cuando se produce la interacción enzima-sustrato se produce un cambio en la intensidad de fluorescencia

directamente relacionado con la concentración de  $H_2O_2$ , produciéndose así un sensor altamente selectivo y sensible (véase Figura 13).

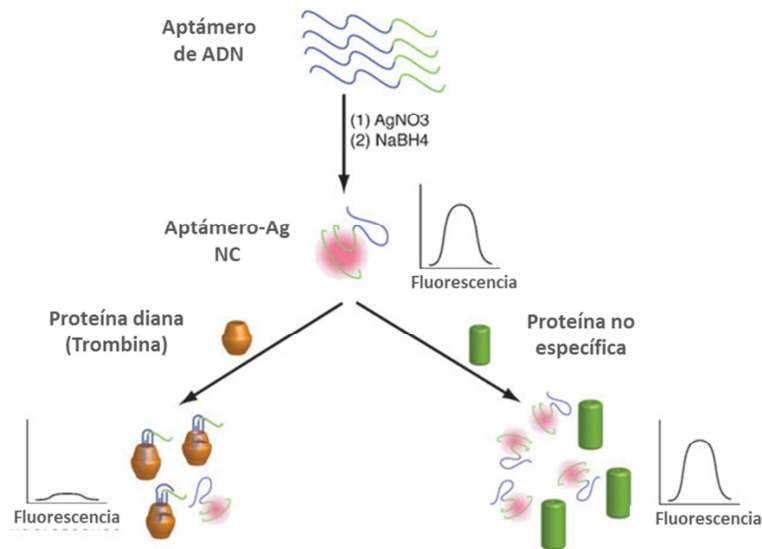


**Figura 13.** A la izquierda se muestra una representación esquemática de la síntesis del nanocluster fluorescente HRP-AU y el efecto que provoca en la fluorescencia su interacción con el sustrato de la enzima ( $H_2O_2$ ). En la parte derecha de la imagen se adjuntan los espectros de fluorescencia obtenidos para las distintas concentraciones de sustrato ensayadas donde se observa claramente la relación entre la fluorescencia y la concentración de  $H_2O_2$  (quenching). Imagen reproducida de la Ref. 121.

### Nanoclusters como marcadores fluorescentes en bioensayos

La conjugación de NCs a moléculas de reconocimiento específicas, como anticuerpos o aptámeros, es el paso de partida para la determinación selectiva de proteínas y/o ácidos nucleicos a través de bioensayos (inmunoensayos y ensayos de ADN) [47]. Como en esta Introducción existe un apartado completo dedicado al desarrollo de inmunoensayos con nanomateriales, en este epígrafe sólo nos centraremos en los bioensayos basados en ADN. En este sentido cabe destacar el trabajo realizado por Martínez y col. [126] en el que desarrollaron una estrategia para la detección específica de proteínas basada en el empleo de la fluorescencia intrínseca de NC de plata crecidos en aptámeros de ADN cuya secuencia reconoce con gran especificidad a la proteína de interés (véase Figura 14).





**Figura 14.** Representación esquemática de la síntesis de aptámero-Ag NC y su aplicación para la determinación específica de la Trombina. Figura adaptada de la Ref. 122.

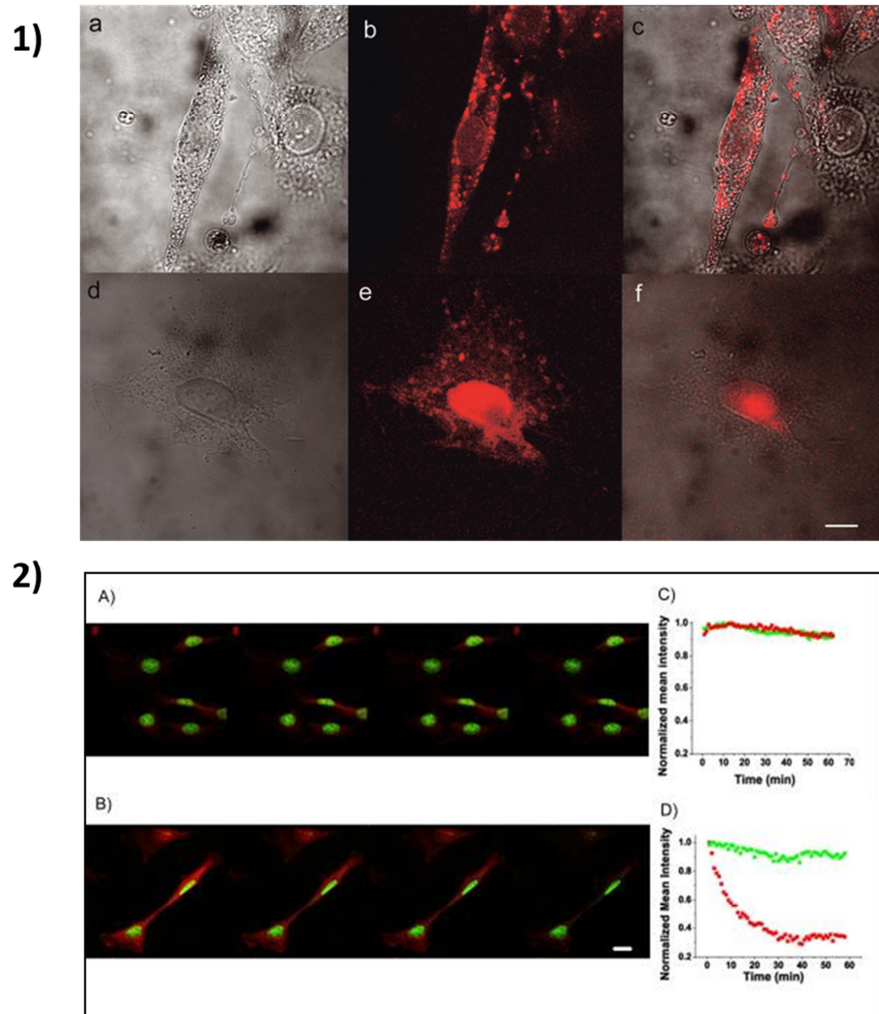
Por otro lado, basándose en el hecho de que las propiedades de los ADN-Ag NCs tienen una gran dependencia del medio local en el que se encuentren así como de la secuencia nucleotídica empleada para su síntesis, Wang y col. [127] han desarrollado recientemente un ensayo basado en ADN-Ag NCs capaz de identificar específicamente modificaciones en la secuencia de ADN de hasta un solo nucleótido. Otros trabajos para detectar el reconocimiento de hebras de ADN complementarias con una sensibilidad muy superior a los métodos realizados hasta la fecha (un factor de 5) [128] o ensayos para la detección de genes a muy bajas concentraciones (14 nM) [129], ya se han llevado a cabo con éxito.

### **Formación de imágenes biológicas (*imaging*)**

El *imaging* fluorescente presenta unas ventajas únicas sobre otras modalidades de formación de imágenes en cuanto a sensibilidad, la capacidad de detección múltiple y el coste del equipo. Este tipo de técnicas de imagen se desarrollan con el objetivo de alcanzar una comprensión más profunda acerca de las redes intracelulares, la transducción de la señal dentro de las células o las interacciones célula-célula. Debido a la autofluorescencia de las células en la región visible del espectro y a los largos periodos de exposición que se requieren para realizar estos análisis de *imaging*, existe una urgente necesidad de desarrollar nuevos marcadores fluorescentes versátiles, sensibles y con una

gran resolución para mejorar las capacidades de las técnicas de *imaging* fluorescentes [130,131]. Este es uno de los campos de aplicación más prometedores de los NCs metálicos fluorescentes, ya que, debido a sus propiedades solventan y/o mejoran algunas de las limitaciones que presentan los marcadores utilizados hasta ahora como los fluoróforos orgánicos convencionales (baja fotoestabilidad) o los QDs (limitación de aplicabilidad *in vivo* debido a su tamaño y toxicidad) [47,48].

Desde el pionero trabajo realizado por Baskakov y col. en 2005 [132] donde se demostró por primera vez la utilidad de los AgNCs como marcas para realizar *imaging* fluorescente, muchos han sido los trabajos desarrollados en este campo aprovechándose tanto de la buena, modulable y estable emisión fluorescente como de otra de las principales características de los NCs como es la absorción de dos fotones. Así, se han llevado a cabo investigaciones para el diseño específico de ADN-Ag NCs capaces de interactuar con la superficie de la célula, permitiendo posteriormente que estos NCs se conjugasen con avidina, sin afectar a la funcionalidad de la biomolécula, para que mediante la simple interacción avidina-biotina los NCs pudiesen teñir la superficie de la célula o incluso ser internalizados en la misma [133]. Este trabajo abrió las puertas a otros estudios donde se evaluaron diferentes estrategias para la internalización de los NCs dando paso al marcaje intracelular y al *imaging* fluorescente biológico. Entre dichas estrategias cabe destacar las siguientes vías: microinyección [134], conjugación del NCs a un péptido capaz de atravesar la membrana celular [134-136], uso de un agente de transfección [137], o por simple endocitosis [138,139]. Algunos ejemplos de los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15. En ellos queda reflejado el elevado potencial que presentan los NCs como agentes de contraste en el campo del *bio-imaging*, mostrando una elevada fotoestabilidad junto con una baja toxicidad y una buena eliminación del cuerpo a través por ejemplo del riñón [140].



**Figura 15.** Ejemplos ilustrativos del empleo de NCs fluorescentes como agentes de contraste en bio-*imaging*. 1) Imágenes de fluorescencia de células NIH 3T3 teñidas *in vivo* con anti-HS-C<sub>24</sub>-Ag, donde se observa la internalización de los NCs en las células. Las imágenes a-c fueron tomadas tras una incubación de 20 min a 4 °C (a. campo luminoso; b. AgNCs; c. fusión de las imágenes). Las imágenes d-f se recogen tras un periodo de incubación de 6 min a 37 °C (d. campo luminoso; e. AgNCs; f. fusión de las imágenes). La barra de escala para todos los casos es de 25  $\mu$ m. Figura recogida de la Ref.129. 2) Imágenes fluorescentes del microscopio confocal y foto-estabilidad de C<sub>20</sub>-Ag nanodots (verde) en células NIH 3T3 marcadas con un tinte para células HCS (rojo). Las imágenes se obtuvieron A. bajo la excitación de un fotón (OPE, 458 nm) y B. bajo la excitación de dos fotones (TPE, 720 nm). La foto-estabilidad se representa en las gráficas C (OPE) y D (TPE) observándose que los nanodots tienen una fotoestabilidad similar a HCS para el caso de OPE pero muy superior a estos cuando se emplea la TPE. La barra de escala es de 30  $\mu$ m. Figura modificada de la Ref.130.

### **I.2. Estrategias de solubilización, funcionalización y bioconjugación de nanomateriales**

Como acabamos de comentar en la sección anterior y debido a que la síntesis de nanomateriales en ocasiones es más eficiente y proporciona nanocristales con mejores propiedades en medios orgánicos se hace necesario aportar y desarrollar estrategias de solubilización y/o funcionalización con el objeto de ampliar el rango de aplicabilidad de estos materiales. Además, una vez que ya tenemos funcionalizados los nanomateriales existen diversas aproximaciones para el marcaje de biomoléculas. Todas estas estrategias y aproximaciones se irán discutiendo en los siguientes apartados.

#### *I.2.1. Métodos de solubilización y/o funcionalización*

Fundamentalmente este apartado se requiere casi exclusivamente para los QDs, ya que, como acabamos de ver, los NCs necesitan ser crecidos en un soporte o ligando protector determinado que ya les confiere tanto la solubilidad en medios acuosos como la funcionalidad.

Los QDs sintetizados mediante las rutas descritas en el epígrafe I.1.2. de la presente Introducción, son sólo solubles en disolventes orgánicos como el tolueno o el cloroformo. Esto es debido a las cadenas carbonadas de los ligandos que se organizan alrededor de la superficie de la nanopartícula hacia el exterior (cadenas de TOP/TOPO). Este hecho limita drásticamente la aplicabilidad de los QDs en estudios bioanalíticos.

En los últimos años se ha llevado a cabo el diseño de recubrimientos de la superficie de estos nanomateriales robustos y versátiles, que además mantengan las propiedades fotofísicas originales de los QDs y sean capaces de hacer que estas nanopartículas sean biocompatibles, solubles y estables en medios acuosos. La introducción de grupos funcionales adecuados que modifican la superficie de los QDs abre, además, las puertas a una posible bioconjugación posterior de estos nanocristales solubilizados con moléculas de interés.

Actualmente las estrategias más empleadas de solubilización de QDs en medios acuosos, son las que se detallan a continuación [38,141,142]:

1. **Intercambio de ligandos:** esta metodología consiste en reemplazar los ligandos hidrofóbicos (TOP, TOPO) que rodean a los nanocristales recién sintetizados por moléculas bifuncionales que suelen poseer un grupo tiol (-SH) en uno de los extremos, el cual se une a la superficie del QD, y un grupo polar en el otro extremo. De este modo, el grupo polar queda orientado hacia la parte exterior de la nanopartícula otorgándole la solubilidad en medios acuosos. Además, si trabajamos a un pH adecuado podemos evitar que las partículas se agreguen ya que generalmente los grupos polares utilizados (carboxílico o sulfónico) se encuentran desprotonados, lo que provoca la repulsión electrostática entre los QDs. En general, las nanopartículas así solubilizadas poseen una baja estabilidad en disoluciones salinas debido a la desorción de los ligandos bifuncionales con el tiempo, lo que resulta en una agregación y precipitación de las nanopartículas.
2. **Silanización:** se basa en la formación de una capa de sílice alrededor de la superficie del nanocristal empleando como precursor mercaptopropil- (trimetoxisilano). Al igual que en el caso anterior también se produce una sustitución de los ligandos hidrofóbicos de la superficie del QD. En general se trata de un método bastante tedioso y que con frecuencia no logra recubrimientos homogéneos, por lo que en la práctica no es muy utilizado.
3. **Interacción hidrofóbica con polímeros anfifílicos:** este procedimiento de solubilización está basado, como su nombre indica, en la interacción hidrofóbica de las cadenas carbonadas de un polímero anfifílico con las que presentan los ligandos que recubren la superficie del nanocristal. Así, la solubilidad en medios polares la aportan los grupos hidrofílicos que se disponen hacia el exterior de los QDs. Esta vía de solubilización proporciona QDs con un mayor rendimiento cuántico de la luminiscencia que se debe a la retención de las moléculas de TOPO, TOP y HDA empleadas inicialmente en la síntesis de estas nanopartículas. En la práctica existen algunos problemas derivados de las desorciones o “pérdidas” del recubrimiento polimérico o bien debido a adsorciones inespecíficas de moléculas como proteínas a la superficie de los QDs así solubilizados. Sin embargo, este tipo de recubrimiento presenta una elevada versatilidad de cara a unir estos QDs a otras especies químicas

como por ejemplo anticuerpos. Esta es la estrategia escogida para la investigación realizada con QDs en la presente Tesis Doctoral.

Actualmente se continúa avanzando en la búsqueda y perfeccionamiento de métodos de solubilización de nanopartículas, intentando solucionar los problemas detectados en los procedimientos anteriores. Sin embargo, podemos afirmar que ya se ha alcanzado un grado de desarrollo suficiente que permite a científicos de distintos campos el empleo de QDs como marcadores fotoluminiscentes en medios acuosos. Cabe destacar que finalmente las dos vías más ampliamente utilizadas y dónde se continúa investigando son el intercambio de ligandos y la encapsulación en polímeros, cuyos esquemas generales junto con las ventajas e inconvenientes que presentan se recogen en las Figuras 16 y 17 (imágenes reproducidas de la Ref.141).

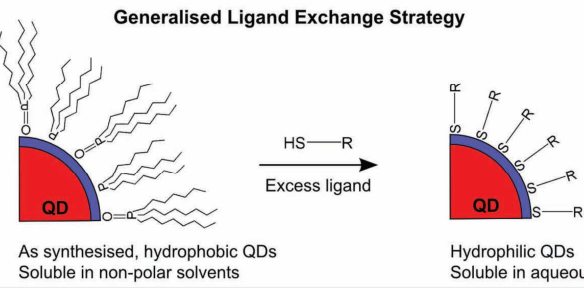
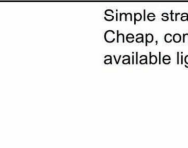
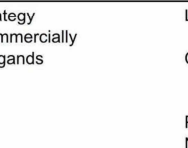
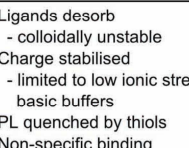
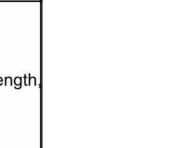

<p><b>A)</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Generalised Ligand Exchange Strategy</b></p>  <p style="text-align: right;">R = hydrophilic functionality</p> <p>As synthesised, hydrophobic QDs Soluble in non-polar solvents</p> <p>Hydrophilic QDs Soluble in aqueous solvents</p>	<p><b>Strategy</b></p>	<p><b>Representative Ligand Capped QDs</b></p>	<p><b>Benefits</b></p>	<p><b>Drawbacks</b></p>
<p><b>B) Monothiol-terminated alkyl carboxylic acids</b></p> <p>MAA, MPA, MUA</p>		<p>Simple strategy Cheap, commercially available ligands</p>	<p>Ligands desorb - colloidally unstable Charge stabilised - limited to low ionic strength basic buffers PL quenched by thiols Non-specific binding</p>	
<p><b>C) Bidentate ligands</b></p> <p>DHLA (DHLA-PEG) Dithiocarbamate derivatives</p>		<p>Increased anchoring sites to QD - minimise ligand desorption - improved colloidal stability</p>	<p>PL quenched by thiols</p>	
<p><b>D) Dendrons</b></p> <p>1st, 2nd, 3rd generation dendrons SH, NH<sub>2</sub>, COOH terminated dendrons Dendrimer bridging - dendron boxes</p>		<p>Compact ligand shell - minimise ligand desorption - improved colloidal stability - improved PL</p>	<p>Custom ligand synthesis</p>	
<p><b>E) PEG derivatives</b></p>		<p>pH &amp; salt stable Improved biocompatibility Reduced non-specific binding</p>	<p>PL quenched by thiols Custom ligand synthesis</p>	
<p><b>F) Peptides</b></p> <p>Hydrophilic domain G-S-E-S-G-S-E-S-G Ch<sub>a</sub>-C-C-Ch<sub>a</sub>-C-C-Ch<sub>a</sub>-C-C-Ch<sub>a</sub> Hydrophobic domain</p>		<p>All-in-one strategy - water solubilisation - biofunctionalisation Multiple anchoring sites to QD - minimise ligand desorption - improved colloidal stability</p>	<p>PL quenched by thiols Custom peptide synthesis</p>	
<p><b>G) Oligomeric phosphines</b></p> <p>Oligomeric phosphines R = COOH Oligomeric phosphine oxides R = PEG</p>		<p>Multiple anchoring sites to QD - minimise ligand desorption - improved colloidal stability Phosphine anchoring groups - improved PL</p>	<p>Custom ligand synthesis</p>	
<p><b>H) Silica shell encapsulation</b></p> <p>MPS, APS, PVP</p>		<p>Highly cross-linked ligand layer - improved colloidal stability - improved PL</p>	<p>Growth of a thin, uniform silica shell is difficult</p>	

Figura 16. Esquema de las estrategias de solubilización más comunes mediante intercambio de ligandos.

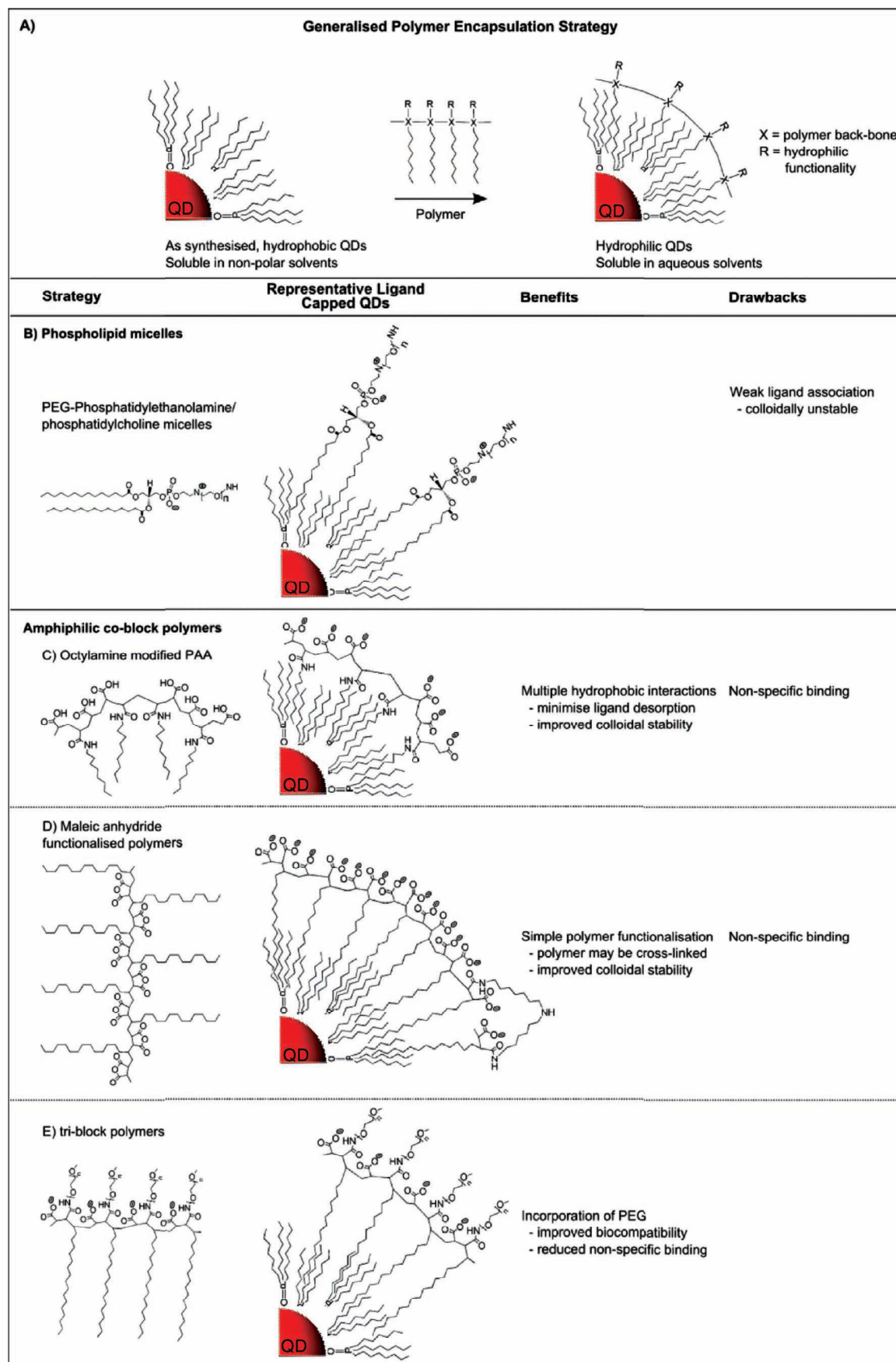


Figura 17. Esquema de las estrategias de solubilización más comunes mediante encapsulación polimérica.



*1.2.2. Rutas para el marcaje de biomoléculas con nanomateriales*

El desarrollo de inmunoensayos con marcas presenta, entre otras, dos grandes ventajas frente a los ensayos sin marcas: su elevada sensibilidad y una muy buena reproducibilidad. Sin embargo, el poder alcanzar y aprovechar todas las ventajas que ofrecen los inmunoensayos con marcadores está limitado por la calidad de la marca escogida así como el buen control del proceso de marcaje de la biomolécula [143]. Así se deben de cumplir una serie de premisas para asegurarnos de realizar un buen marcaje y obtener un trazador (biomolécula marcada) apto para el desarrollo del inmunoensayo. Dichas premisas son:

1. la **detectabilidad** de la marca tras el proceso de conjugación y en las condiciones requeridas para la medida (pH, salinidad, etc). El proceso de conjugación no debe alterar las propiedades de la marca.
2. la **reactividad**, capacidad de enlace o funcionalidad de la molécula marcada (Ab, Ag, hapteno, proteína, etc.) tampoco se debe ver modificada tras su marcaje ya que esto afectaría claramente a la sensibilidad del ensayo y a la posibilidad de realizar el mismo.
3. las **interacciones no específicas** del trazador en inmunoensayos heterogéneos competitivo deben ser minimizadas al máximo ya que esto produciría errores en la determinación final.
4. la **estabilidad** del trazador es crucial para poder llevar a cabo el desarrollo del inmunoensayo. Así se aconseja que el trazador producido en la conjugación al menos sea estable (mantenga sus propiedades y funcionalidades) almacenado a temperatura ambiente, 20-30 °C, durante días-semanas y guardado en nevera o congelador (4 - -20 °C) durante meses o incluso años [143].

A continuación se abordarán las distintas estrategias que se emplean habitualmente en el marcaje de biomoléculas con nanopartículas, intentando resaltar las ventajas que ofrecen unas sobre otras o en qué ocasiones (aplicaciones) es más recomendable el empleo de un tipo de conjugación frente a otro [142]. Muchas de estas

estrategias están basadas en los métodos de marcaje convencional de biomoléculas con los fluoróforos orgánicos convencionales.

Podemos distinguir dos grandes grupos de estrategias: aquellas que se basan en la interacción directa marca-biomolécula “marcaje directo” (1-4) y aquellas que emplean una molécula mediadora/puente para realizar el marcaje “marcaje indirecto” (5). Las estrategias más comúnmente utilizadas en la actualidad junto con sus ventajas y limitaciones aparecen recogidas en la Figura 18.

1. La unión de pequeñas moléculas como oligonucleótidos [144] o ciertas albúminas séricas [145] mediante la **adsorción inespecífica** sobre la superficie del nanomaterial. A pesar de que a través de esta unión inespecífica la obtención de bioconjugados es muy sencilla, desafortunadamente, el estado de la superficie es fácilmente influenciado por el entorno (fuerza iónica, pH y temperatura).
2. La carga negativa superficial que presentan en muchos casos los nanocristales solubilizados (QDs o NCs) posibilita la **unión electrostática** de los mismos a proteínas o biomoléculas que presenten un dominio cargado positivamente [146].
3. Los nanomateriales que han sido modificados con grupos amino o carboxílicos facilitan la formación de una unión específica y estable con la molécula funcional de interés a través de la creación de un **enlace covalente** entre ellos. Esta estrategia se basa en la química de la carbodiimida (EDC) que consiste en el establecimiento de un enlace amida entre el nanomaterial y la molécula funcional de reconocimiento [147,148].
4. Otra posibilidad, para el caso específico de anticuerpos, es la conjugación directa del mismo a la superficie del nanocristal a través de los **grupos tiol** del anticuerpo. Este procedimiento requiere la reducción previa del anticuerpo con DTT (ditiotreitól) para romper los enlaces puente disulfuro que se establecen entre las cadenas pesadas del anticuerpo. También se requiere que el nanomaterial esté funcionalizado con grupos amino, empleándose el ácido ciclohexano-4-(N-maleidometil)carboxílico y el éster N-hidrosuccinimida como agentes entrecruzadores. La gran ventaja de este método es la

orientación espacial del fragmento de anticuerpo, mientras que como contrapunto tenemos el pH neutro al que se debe llevar a cabo la reacción y el gran control sobre la cantidad de DTT añadida para evitar la completa reducción del anticuerpo que llevaría a la pérdida total de su funcionalidad [149,150].

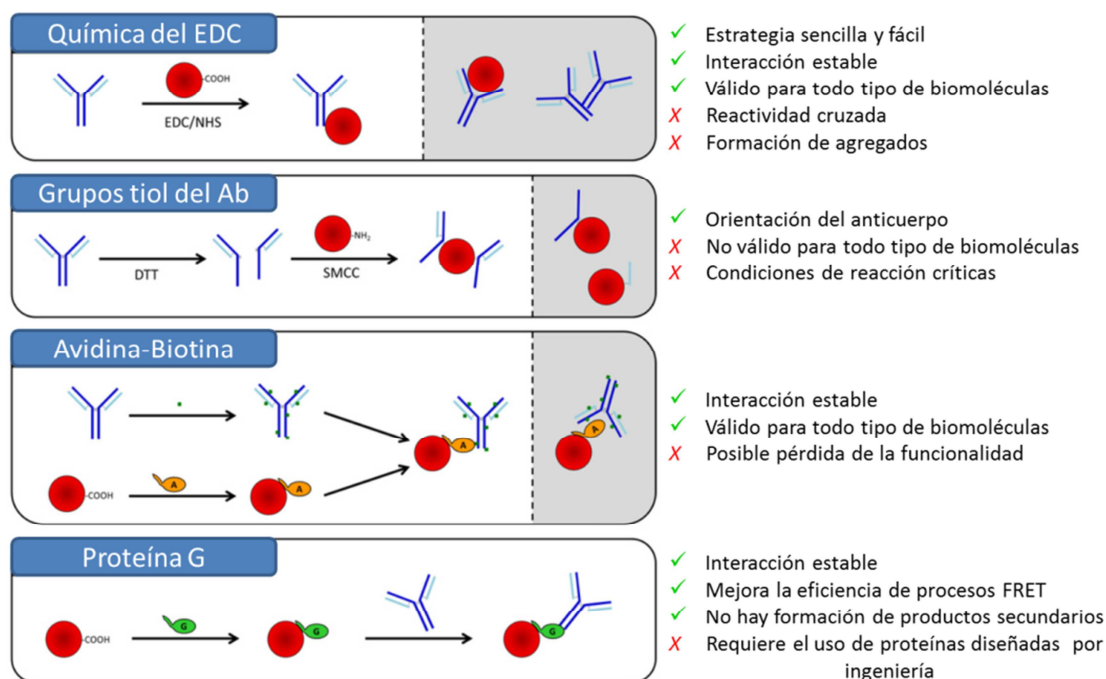
5. El marcaje indirecto de las biomoléculas se realiza a través de dos procedimientos principalmente:

a. Por un lado tenemos la opción de utilizar nanomateriales previamente modificados con (estrept)avidina en combinación con oligonucleótidos, proteínas o anticuerpos biotinilados que en muchos casos son comerciales. De este modo nos valemos de la **interacción específica avidina-biotina** para conseguir la unión estable y orientada de los QDs con la biomolécula de interés [151,152].

b. El marcaje asistido por la **proteína G**. En este caso la proteína G actúa de puente entre el nanomaterial y la biomolécula de interés (ejm: anticuerpo). Esta proteína interactúa con la fracción constante del anticuerpo con lo cual esta metodología asegura totalmente la funcionalidad del anticuerpo tras el marcaje [153,154].

Tras el proceso de marcaje una en la mayoría de los casos se necesita una etapa de purificación del bioconjugado con el fin de eliminar exceso de reactivos y subproductos secundarios de las reacciones de conjugación. Entre las metodologías propuestas a tal fin la más utilizada en general es la cromatografía de exclusión por tamaños [147]. Esta técnica de separación tiene como limitación su baja resolución en ciertos casos, por lo que se buscan métodos de purificación más sencillos, eficaces y rápidos. Otro punto de interés crítico es poder conocer la relación marca:biomolécula tras la bioconjugación (aspecto sumamente importante a la hora de realizar bioensayos cuantitativos). Esta relación depende de la estrategia de conjugación llevada a cabo y su determinación resulta todavía bastante complicada aunque se han intentado distintas aproximaciones [155,156].

Para finalizar este apartado concluir que la elección de la estrategia de marcaje dependerá principalmente de la aplicación posterior que queramos realizar (inmunoensayos, ensayos FRET o inmunosensores), así como de otros aspectos secundarios como la estabilidad del conjugado, la orientación de la biomolécula o la disponibilidad de los reactivos. A lo largo de la presente Tesis Doctoral la estrategia seguida para el marcaje de biomoléculas fue la formación de enlaces covalentes mediante la química del EDC.



**Figura 18.** Principales estrategias de marcaje de biomoléculas con nanomateriales. Figura modificada de la Ref. 142.

### I.3. Inmunoensayos

#### *I.3.1. Introducción a los inmunoensayos*

Los inmunoensayos o técnicas de análisis inmunoquímico se basan en la explotación de la principal característica de los anticuerpos, su capacidad de reconocimiento y enlace selectivo de determinadas biomoléculas conocidas como antígenos o haptenos. Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ab o Ig) son glicoproteínas con un peso molecular promedio de 150 kDa (depende del tipo de Ab, véase Tabla 1) que poseen dos sitios de unión o reconocimiento idénticos por molécula y, por ello, se dice que son bivalentes. Se producen en organismos vivos, a excepción de las plantas, como consecuencia de la respuesta inmune de dicho organismo originada por un inmunógeno (agente capaz de provocar una respuesta inmune).

Los compuestos inmunogénicos se caracterizan por tener elevados pesos moleculares (> 1 kDa), complejidad química y ser sustancias extrañas para el organismo vivo. El contacto con un inmunógeno desencadena una serie de eventos que dan lugar a la síntesis de anticuerpos con la peculiaridad de reconocer y enlazar selectivamente dicho inmunógeno. Los anticuerpos así producidos se conocen como anticuerpos policlonales o antiseros y consisten en una mezcla de anticuerpos que enlazan diferentes zonas (epitopos) del inmunógeno pero también pueden presentar reactividad frente a otros inmunógenos que haya en el organismo. El resultado es un antisuero que posee un amplio rango de selectividades y afinidades, dando lugar a posibles reactividades cruzadas o interferencias cuando se emplean en inmunoensayos.

El estudio en profundidad de los fenómenos involucrados en la producción natural de anticuerpos llevó a los investigadores Milstein y Kohler en la década de 1970 a desarrollar una metodología para la síntesis y producción de anticuerpos monoclonales, trabajo por el cual fueron galardonados con el premio Nobel. Los anticuerpos monoclonales consisten en una población homogénea de la misma molécula de anticuerpo que presenta la misma afinidad por un epitopo en concreto del inmunógeno. Como se puede entender fácilmente estos anticuerpos monoclonales presentan una serie de ventajas frente a los policlonales atendiendo a su aplicabilidad

analítica, ya que en principio debido a su selectividad por un epitopo en concreto del antígeno se tiende a minimizar la reactividad cruzada [157,158]. Un esquema de la producción de anticuerpos se recoge en la Figura 19.

Tabla 1: Clases de Inmunoglobulinas y características principales.

Clases de Ig	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
<b>Peso molecular (kDa)</b>	150	400	900	180	190
<b>Número de subunidades</b>	1	2	5	1	1
<b>Concentración en suero</b>	12 mg/mL	1,8 mg/mL	1,0 mg/mL	30 µg/mL	0,3 µg/mL
<b>Función principal</b>	<p><b>IgG:</b> única Ig capaz de atravesar la placenta. Participa en la respuesta inmune fijando el complemento y enlazando los receptores de la fracción constante sobre los macrófagos.</p> <p><b>IgA:</b> presente en las secreciones mucosas, intestinales o respiratorias (lágrimas, saliva, etc.) donde aparece como la primera línea de defensa frente a microbios que son ingeridos o inhalados.</p> <p><b>IgM:</b> puede provocar el lisado de las bacterias por activación de otros componentes séricos.</p> <p><b>IgD:</b> se encuentra asociada a los linfocitos.</p> <p><b>IgE:</b> principal clase de Ig involucrada en la respuesta alérgica.</p>				

Los antígenos (Ag) son las especies con las que los anticuerpos se enlazan selectivamente. Los antígenos no necesariamente tienen por qué provocar respuesta inmune por sí mismos, así podemos decir que aunque todos los inmunógenos son antígenos no todos los antígenos son inmunógenos. En este sentido los haptenos son un claro ejemplo, ya que son antígenos de bajo peso molecular que no inducen respuesta inmune a no ser que estén enlazados a proteínas portadoras como la BSA. Dependiendo de la valencia de enlace (número de sitios de enlace) y de la determinación (número diferente de sitios de enlace) podemos distinguir cuatro tipos de antígenos [157]:

1. Aquellos que sólo tienen un epitopo disponible en la superficie para poder enlazar un anticuerpo: Antígeno monodeterminado y monovalente. Los Haptenos pertenecen a este grupo.

2. Antígenos con dos o más epitopos del mismo tipo son antígenos monodeterminados y multivalentes.
3. Cuando presentan muchos epitopos de distintos tipos pero sólo uno de cada tipo por molécula de antígeno se dice que son multideterminados y univalentes. La mayoría de las proteínas antigénicas pertenecen a esta categoría.
4. Se dice que son antígenos multideterminados y multivalentes cuando la molécula de antígeno contiene más de un epitopo de distinto tipo. A este grupo pertenecen las proteínas con subunidades idénticas o las células.

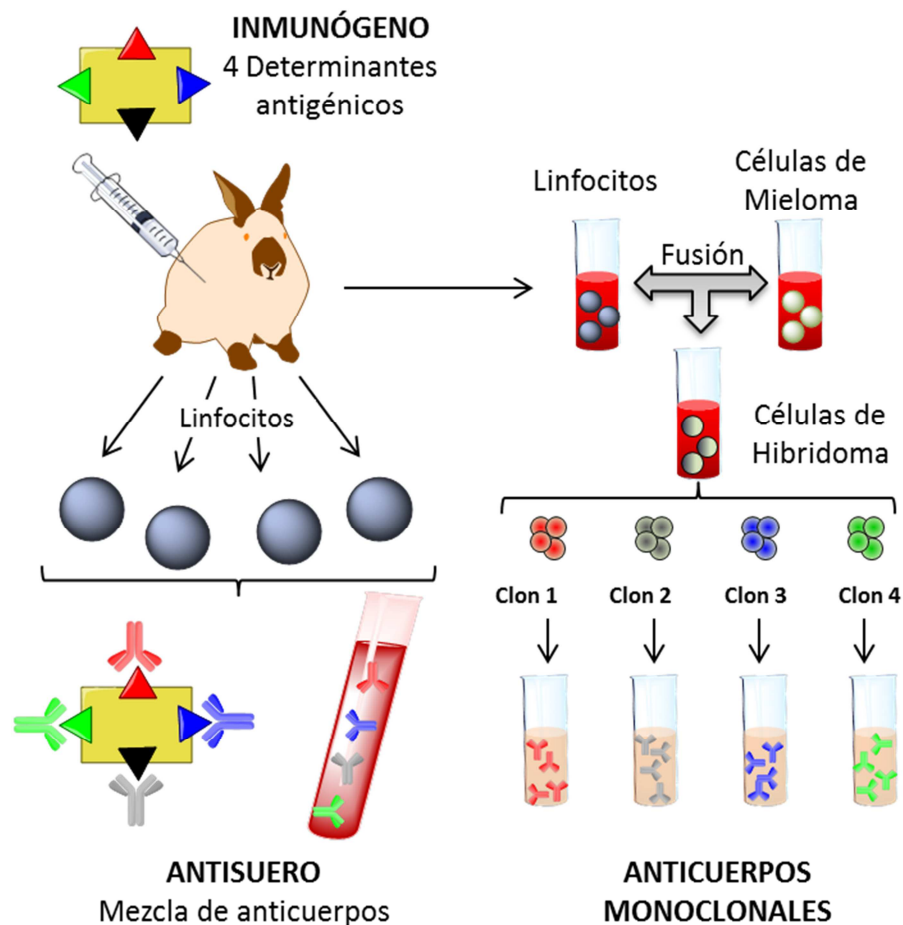


Figura 19. Representación esquemática de las dos vías de producción de anticuerpos.

Así, como se puede intuir, el reconocimiento antígeno-anticuerpo es altamente selectivo, análogo a las interacciones substrato-enzima. Es por ello que los métodos inmunoquímicos de análisis se basan en la explotación de las propiedades de reconocimiento y enlace selectivo del anticuerpo frente a un antígeno dado para su posterior cuantificación. Dicho reconocimiento tiene lugar a través de una interacción reversible en la que están involucrados enlaces no-covalentes (interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas).

En la interacción in vitro de un antígeno (Ag) con su correspondiente anticuerpo (Ab) se distinguen dos etapas, la interacción primaria y la interacción secundaria. En la primera etapa tiene lugar el evento de reconocimiento propiamente dicho; es un proceso muy rápido (en la escala de los milisegundos) y no se puede visualizar directamente. La interacción secundaria se produce tras la primera etapa de reconocimiento y se caracteriza por la aparición de un fenómeno visible como la aglutinación o la precipitación. Por otro lado, no siempre que se produce la interacción primaria Ag-Ab, se produce la interacción secundaria, ya que, para conseguir fenómenos visibles, son indispensables determinadas concentraciones y características tanto del Ag como del Ab. Así, por ejemplo, para que se produzca la interacción secundaria es necesario que el antígeno sea multivalente.

Ambas interacciones se pueden emplear con fines analíticos. Las técnicas inmunológicas que evidencian la interacción Ag-Ab a través de una reacción secundaria son, generalmente, más económicas y sencillas que aquellas que permiten visualizar la interacción primaria, no obstante estas últimas son mucho más sensibles, es decir, permiten detectar concentraciones más bajas del analito (antígeno o hapteno). Pese a la dificultad en la visualización de la interacción primaria, los métodos bioanalíticos cuantitativos emplean con más frecuencia dicha interacción que se caracteriza por su constante de asociación o Afinidad, intrínseca para cada par antígeno-anticuerpo. Además, existen distintos métodos que hacen posible visualizarla. La estrategia consiste en "marcar" al Ab o al Ag mediante la unión covalente (conjugación) de determinadas moléculas, tales como fluorocromos, isótopos radioactivos o enzimas. Esta molécula de



anticuerpo o antígeno marcado se conoce como Trazador. La marca ideal para los métodos de inmunoanálisis se ha de caracterizar por ser barata, segura, fácil de enlazar a la molécula de interés a ser posible por métodos de marcaje ya disponibles, y por supuesto ha de presentar propiedades que permitan diferenciar con facilidad las formas libre y enlazada sin requerir etapas de separación. La especie marcada ha de ser estable y el marcaje no ha de alterar la funcionalidad de la molécula marcada. La marca ha de ser fácil de medir con elevada sensibilidad mediante instrumentación sencilla y de bajo coste y a ser posible automatizable [159]. Obviamente es muy difícil de conseguir una marca que cumpla con todos estos requisitos y este es uno de los campos en los que se continúa trabajando: el desarrollo de nuevas marcas que consigan aunar cuantas más características de las anteriormente citadas mejor, haciendo especial hincapié en la seguridad (efectos en la salud, facilidad de manejo) y en sus propiedades para la mejora de la detección.

Llegados a este punto podríamos realizar una primera clasificación de los inmunoensayos como: Inmunoensayos Directos e Inmunoensayos con Marcadores y dentro de los inmunoensayos con marcadores se pueden realizar distintas clasificaciones según atendamos a:

1. Tipo de marca empleada:
  - Radioisótopos (radioinmunoensayos, RIA) [159,160].

Los radioisótopos fueron las primeras marcas que se emplearon para el marcaje de inmunoreactivos en el desarrollo de inmunoensayos, por lo que existe una gran variedad de RIA. Los radioisótopos se detectan fácilmente a bajos niveles de concentración y los procedimientos de marcaje son simples y ya están bien establecidos. Además dicha marca no tiene ningún efecto sobre el evento de reconocimiento Ag-Ab. Sin embargo, los radioisótopos son caros y peligrosos tanto en su manejo como nocivos para la salud, lo que hace que se estén intentando reemplazar por otras moléculas marcadoras que mejoren estos aspectos como enzimas o fluoróforos.

De entre todas las marcas radioisotópicas el  $^{125}\text{I}$  es la más utilizada para el marcaje de antígenos grandes como proteínas, mientras que el radioisótopo  $^3\text{H}$  es comúnmente empleado en la marca de haptenos (antígenos de bajo peso molecular). También se han desarrollado ensayos en los que se utilizan isótopos de Fe, Co y Se. Las señales analíticas que se obtienen o se pueden medir en este tipo de marca son: el decaimiento o tiempo de vida media del radioisótopo (tiempo requerido para que se produzca el 50% del decaimiento), la emisión de partículas beta ( $\beta$ ) y la emisión de rayos gamma ( $\gamma$ ). Los RIA presentan unos límites de detección para antígenos alrededor de  $10^{-12}$  M (picomoles).

- Enzimas (inmunoensayos enzimáticos) [159,161].

Las enzimas son el tipo de marca más versátil, popular y actualmente más empleado en el desarrollo de inmunoensayos, ya que una única molécula de enzima como marca puede generar múltiples copias de la especie detectable. Esta amplificación catalítica es la principal característica y ventaja que poseen las enzimas frente a otras marcas, junto con la versatilidad en la producción de la señal detectable (colorimétrica, luminiscente, electroquímica). Fue a mediados de los años sesenta cuando se empezaron a utilizar las enzimas como marcas en inmunoensayos. En 1971 se propusieron como una poderosa alternativa al empleo de radioisótopos y actualmente tienen su futuro asegurado ya que la mayoría de los kits comerciales de inmunoensayos emplean este tipo de marca. En la actualidad hay una gran batería de distintos tipos de enzimoimmunoensayos, una clasificación general de los mismos se recogen en la Tabla 2 (en esta Tabla se recogen los nombres del ensayo y siglas en inglés por ser lo habitual y conocido dentro del mundo científico). Cabe destacar que las enzimas más comúnmente utilizadas son la Alcalin fosfatasa, la Peroxidasa de rábano silvestre, la  $\beta$ -D-Galactoxidasa, la Alcohol deshidrogenasa, la Lactato deshidrogenasa y la Glucosa oxidasa.

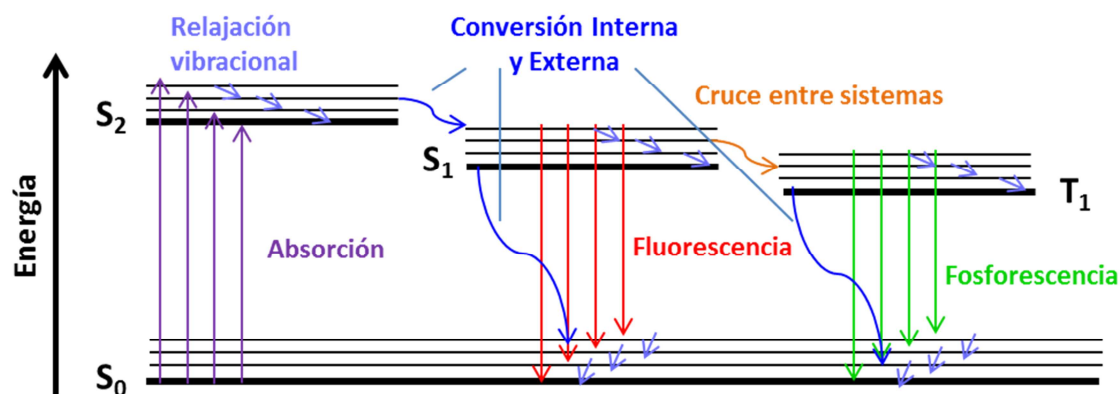
**Tabla 2.** Clasificación general de Enzimoinmunoensayos.

<b>Tipo de Inmunoensayo</b>	<b>Nombre/Name</b>	<b>Sigla</b>
Heterogéneo competitivo y no competitivo	Enzyme-linked immunosorbent assay	ELISA
	Enzyme-multiplied immunoassay technique	EMIT
Homogéneo competitivo	Substrate-labeled fluorescein immunoassay	SLFIA
	Apoenzyme reactivation immunoassay	ARIS
	Cloned enzyme donor immunoassay	CEDIA
Homogéneo no competitivo	Enzyme inhibitory homogeneous immunoassay	EIHIA

- Fluoróforos (fluoroinmunoensayos) [162].

Ya que éste va a ser el tipo de marca empleado a lo largo de la presente Tesis Doctoral, a través de fluoróforos de nueva generación como lo son los nanomateriales (QDs y NCs), se dedica a este apartado especial atención, haciendo también un breve repaso a los principios de la espectroscopía de emisión molecular [163,164]. La espectroscopía de emisión molecular se basa en el fenómeno de la fotoluminiscencia que consiste en la emisión de fotones (radiación luminosa) por parte de una molécula o especie que previamente ha sido excitada con radiación electromagnética. En otras palabras, la fotoluminiscencia es la desactivación radiacional (por emisión de fotones) de un estado excitado al fundamental de una molécula que previamente había sido excitada con radiación electromagnética. Una característica indispensable que debe presentar dicha molécula o especie para ser fotoluminiscente es poseer una estructura adecuada que le permita captar la energía necesaria para excitarse y originar la emisión fotoluminiscente. El comportamiento de la molécula en estado excitado se representa habitualmente mediante el diagrama de Jablonski (véase Figura 20).

Como se puede observar en dicho esquema, la fotoluminiscencia engloba a los procesos de fluorescencia y fosforescencia.



**Figura 20.** Diagrama de Jablonski donde se representan los distintos procesos de desactivación del estado excitado tanto radiacionales (Fluorescencia y Fosforescencia) como no radiacionales (Conversión Interna y Externa, Relajación vibracional y Cruce entre Sistemas). S<sub>0</sub> representa al estado fundamental de la molécula, S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> son estados singuletes excitados y T<sub>1</sub> es un estado triplete excitado.

Las moléculas fotoluminiscentes presentan tres propiedades características:

- **Desplazamiento Stokes** ( $\text{cm}^{-1}$ ), constante física que indica la energía perdida mientras la molécula se encuentra en el estado excitado. Desde el punto de vista práctico es deseable que la molécula tenga un desplazamiento grande (gran separación entre  $\lambda_{\text{exc}}$  y  $\lambda_{\text{em}}$ ) para evitar problemas de autoabsorción y de dispersión de la radiación.
- **Rendimiento cuántico** ( $\Phi$ ), es una medida de la eficiencia del proceso luminiscente. Esta eficiencia viene dada por la relación entre fotones absorbidos frente a los emitidos a través de un proceso luminiscente. Es decir,  $\Phi$  nos da la probabilidad de que el mecanismo de desactivación de un estado excitado sea preferentemente a través de un proceso radiacional frente a otros procesos de desactivación no radiacionales.

- Duración del estado excitado o **tiempo de vida media del estado excitado** ( $\tau$ ). La duración del proceso luminiscente es también característico de la molécula fluorescente o fosforescente. Los valores experimentales de  $\tau$  indican la velocidad global de desactivación del estado excitado debido tanto a procesos radiantes como no radiantes. Los valores de duración de la luminiscencia son muy distintos para la fluorescencia y para la fosforescencia ya que debido al cruce entre sistemas que se tiene que producir para dar lugar a la fosforescencia hace que la duración del estado excitado en este proceso sea mayor que para el caso de la fluorescencia. Así los valores típicos para  $\tau$  en el caso de la fluorescencia son de  $10^{-9} - 10^{-7}$  s mientras que en la fosforescencia se observan valores de  $\tau$  del orden de  $10^{-4} - 10$  s.

La fluorimetría es superior a la espectrofotometría de absorción molecular en términos de sensibilidad y especificidad. La sensibilidad de la fluorescencia es entre 10-1000 veces superior en comparación con las medidas de absorbancia. Además, otra ventaja de los fenómenos fotoluminiscentes es que presentan amplios intervalos lineales de respuesta y una aceptable selectividad. Esta técnica de detección se introdujo en los métodos inmunológicos de análisis precisamente con ese objetivo: mejorar la sensibilidad de los inmunoensayos. Así, límites de detección del orden de  $10^{-10}$  M son fácilmente alcanzables con fluoróforos convencionales como la fluoresceína o las rodaminas. No obstante, es un límite de detección dos órdenes de magnitud peor que el obtenido para RIA (se espera poder mejorarlo con las nuevas generaciones de fluoróforos como QDs y NCs) y esto se debe a que existen una serie de limitaciones en la medida de la fluorescencia como son:

- La **dispersión de la luz de excitación (scattering)**. Este problema es más acusado en fluoróforos que tengan pequeños desplazamientos de Stokes, porque en este caso la luz de excitación no puede ser filtrada de manera efectiva.

- La **fluorescencia endógena** de la muestra que causa la aparición de altos fondos de fluorescencia. Como ejemplo tenemos los fluidos biológicos como las proteínas séricas que con una excitación a 280 nm provocan fondos altos para emisiones registradas entre 320-350 nm o la bilirrubina y el NAD(P)H cuya excitación se produce a 330-360 nm emitiendo en un rango de 430-470 nm. Para solventar el problema se recomienda el empleo de fluoróforos que tengan su par excitación/emisión a longitudes de onda mayores que aquellas donde se produce el fondo de fluorescencia de las especies presentes en la muestra. Para el caso de los inmunoensayos la fluorescencia endógena sólo es un problema para los ensayos homogéneos donde la medida se realiza directamente sobre la muestra sin realizar una separación previa.
- El **apagado o quenching** de la fluorescencia. En las muestras pueden existir moléculas que pueden absorber bien la energía de excitación o la de emisión del fluoróforo que empleamos como marca, provocando el apagado del mismo. El apagado por concentración, también conocido como efecto de filtro interno, se ha observado en el marcaje de anticuerpos con más de una molécula de fluoróforo que tiene pequeños desplazamientos de Stokes (p.e. fluoresceína). Esto se debe probablemente al solapamiento de los espectros de absorción y emisión del fluoróforo. En este tipo de apagado se puede observar un descenso del rendimiento cuántico de la fluorescencia a medida que aumenta el número de fluoróforos por molécula de anticuerpo. El apagado por filtro interno no es un problema cuando se trabaja con fluoróforos que presentan largos desplazamientos de Stokes (p.e. quelatos de lantánidos, QDs o NCs). No obstante, este fenómeno de apagado de la fluorescencia muchas veces se emplea como estrategia de medida en aplicaciones analíticas (como sensores directos o sensores on/off) o incluso si se tienen varios fluoróforos podría darse el caso de que la emisión de uno sea absorbida por otro fluoróforo

adyacente que emita a su longitud de onda característica dando lugar así a procesos de transferencia de energía, muy útiles en el análisis bioanalítico.

- La **foto-degradación** consiste en una reacción química inducida por la luz que provoca el decrecimiento de la emisión fluorescente bajo una excitación continua. Este proceso es altamente dependiente de la longitud de onda de excitación y puede llegar a ser un gran problema cuando se necesitan repetir medidas de la fluorescencia durante intervalos de tiempo muy cortos empleando elevadas intensidades de excitación. La evaluación de la posibilidad de foto-degradación de un fluoróforo nos da información acerca de su foto-estabilidad. Hoy en día se busca la generación de nuevos fluoróforos con elevada foto-estabilidad para su aplicación en bio-imaging y en técnicas de diagnóstico y tratamiento clínico.

Los principales tipos de inmunoensayos fluorescentes desarrollados hasta la fecha se recogen en la Tabla 3 (al igual que en la Tabla 2 sus nombres se recogen en inglés por ser este el idioma en el que habitualmente se denominan).

**Tabla 3.** Clasificación de inmunoensayos fluorescentes. \*Este tipo de inmunoensayo se puede realizar tanto en modo homogéneo como heterogéneo.

Tipo de inmunoensayo	Nombre/Name	Siglas
<b>Heterogéneo</b>	Particle concentration fluorescence immunoassay	PCFIA
	Time-resolved fluorescence immunoassay*	TRFIA
	Enzyme-linked fluorescence immunoassay	ELFIA
<b>Homogéneo</b>	Fluorescence polarization immunoassay	FPIA
	Fluorescence excitation (energy) transfer immunoassay	FETI
	Fluorescence quenching	FQIA

immunoassay	
Substrate labeled fluoroimmunoassay	SLFIA
Liposome-based fluorescence immunoassay*	---

- Marcas elementales (elemental-tagged immunoassays) [165].

Este tipo de marcas (heteroátomos, isótopos estables enriquecidos, nanopartículas, complejos quelato) ha sido el último en incorporarse como sistema de detección de inmunoensayos. Para la detección de dichas marcas se emplea la técnica de plasma de acoplamiento inductivo acoplado a espectrometría de masas a un (ICP-MS) con distintos sistemas de introducción de muestra: la nebulización convencional (análisis total en disolución) y la ablación láser (análisis directo de sólidos) que además aporta información con resolución lateral de la superficie de la muestra como por ejemplo en el análisis directo de tejidos biológicos.

La introducción del ICP-MS como detector de inmunoensayos nace de la posibilidad de solventar las limitaciones que presentan las marcas ya conocidas hasta la fecha (radioisótopos, fluoróforos y enzimas), abriendo las fronteras del análisis multiparamétrico sin necesidad de realizar la deconvolución de espectros. Además también presenta la ventaja de poder evitar las interferencias provenientes de la matriz de la muestra. El empleo de marcas elementales en el desarrollo de inmunoensayos se abordará con mayor profundidad en el Capítulo 2 de la presente Tesis Doctoral, atendiendo a la composición elemental de nuestros nanomateriales.

- Detección indirecta del inmunocomplejo [166].

En este apartado se engloban las metodologías en las que la molécula portadora o generadora de la señal no está directamente enlazada a ninguno de los inmunoreactivos (Ag o Ab) pero se une específicamente y de manera



no covalente al inmunocomplejo (Ag-Ab) una vez que la inmunoreacción ha tenido lugar. La principal ventaja de estos sistemas es que la misma molécula portadora o generadora de la señal puede ser empleada para diversos inmunoensayos. Además, con frecuencia la detección indirecta del inmunocomplejo da lugar a ensayos más sensibles ya que varias moléculas portadoras de la señal se pueden unir al inmunocomplejo provocando una amplificación de la señal. A este grupo pertenecen los siguientes sistemas:

- Detección del inmunocomplejo con una inmunoglobulina marcada.
- Proteína A.
- El sistema biotina-(strept)avidina.
- Ensayos que usan complejos Enzima-Anti-enzima.

2. Si es necesaria o no una etapa de separación [159]:

- Ensayos homogéneos (no es necesaria la etapa de separación).

Los métodos inmunológicos homogéneos han ido apareciendo más lentamente que los heterogéneos. Se basan en un cambio en la señal tras el evento de reconocimiento; así la fracción libre y enlazada se distinguen perfectamente sin necesidad de llevar a cabo una etapa de separación del inmunocomplejo previo a la medida. Las marcas más empleadas para este tipo de ensayo son los fluoróforos y las enzimas.

- Ensayos heterogéneos (previo a la realización de la medida de la marca se requiere una etapa de separación).

Para llevar a cabo la separación del inmunocomplejo de los inmunoreactivos libres se pueden emplear diferentes estrategias, bien por precipitación de la fracción enlazada (Ab:Ag y Ab:Ag\*) mediante la

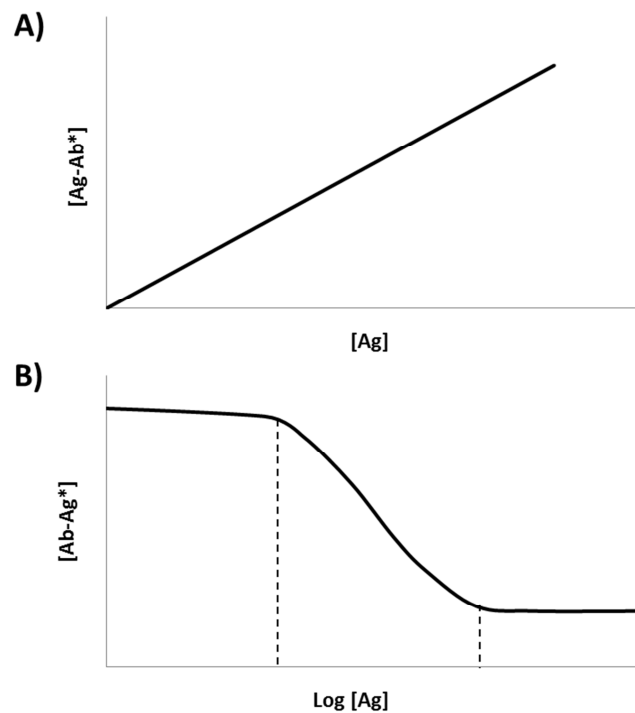
adición de sales o disolventes o bien llevando a cabo el inmunoensayo en un soporte sólido (placas, portas de vidrio, columnas o partículas).

Esta última estrategia es la más empleada actualmente ya que los anticuerpos y/o proteínas se unen fuerte y espontáneamente a vidrios y algunos plásticos. Así, esta inmovilización provoca que las especies enlazadas también queden sujetas al soporte sólido tras el evento de reconocimiento de modo que los inmunoreactivos no enlazados se separan fácilmente por sucesivos ciclos de decantación-aclarado. En este caso podemos distinguir dos grandes grupos de formatos de ensayo heterogéneos: los métodos que realizan el marcaje sobre el Ab y aquellas estrategias que se basan en el marcaje del Ag. En la Figura 21 podemos ver las curvas de calibración que se obtendrían para cada caso.

En las metodologías basadas en el marcaje de anticuerpo ( $Ab^*$ ) se trabaja con grandes excesos de  $Ab^*$ , el cual se incuba con distintas concentraciones del estándar del Ag, llevándose a cabo la determinación del complejo Ag- $Ab^*$ . La curva de calibrado que se obtiene es lineal (véase Figura 21a) y esta linealidad se extiende hasta concentraciones donde  $Ab^*$  ya no está en exceso. En principio con esta estrategia podría llegar a detectarse incluso una única molécula de Ag. Además, con este tipo de marcaje se pueden llevar a cabo ensayos tipo sándwich, en los que se requiere el empleo de dos anticuerpos uno marcado y otro sin marcar.

Por otro lado, los inmunoensayos en los que se marca el antígeno ( $Ag^*$ ) una cantidad conocida y limitada de Ab se hace reaccionar con un exceso de  $Ag^*$  en presencia de diferentes niveles de concentración de analito (Ag). Generalmente la cantidad de Ab empleada es aquella necesaria para enlazar el 50% de  $Ag^*$  en ausencia de analito. La presencia de Ag impide la reacción entre Ab- $Ag^*$  a través del establecimiento de un equilibrio competitivo. Es decir, Ag y  $Ag^*$  compiten por el limitado número de Ab disponibles. Así ensayando diferentes concentraciones de Ag podemos construir la curva de inhibición que se muestra en la Figura 21b y

posteriormente una muestra desconocida de Ag podrá ser determinada por el grado de inhibición provocado en la formación de Ab-Ag\*. Los límites de detección que se alcanzan con esta estrategia dependen de la afinidad que tenga el Ab por el Ag y de la incertidumbre experimental en la cuantificación de la marca. Por ejemplo, para una afinidad de  $10^{12} \text{ M}^{-1}$  se han alcanzado límites de detección de  $10^{-14} \text{ M}$  (estaríamos en la escala de los femtomoles).

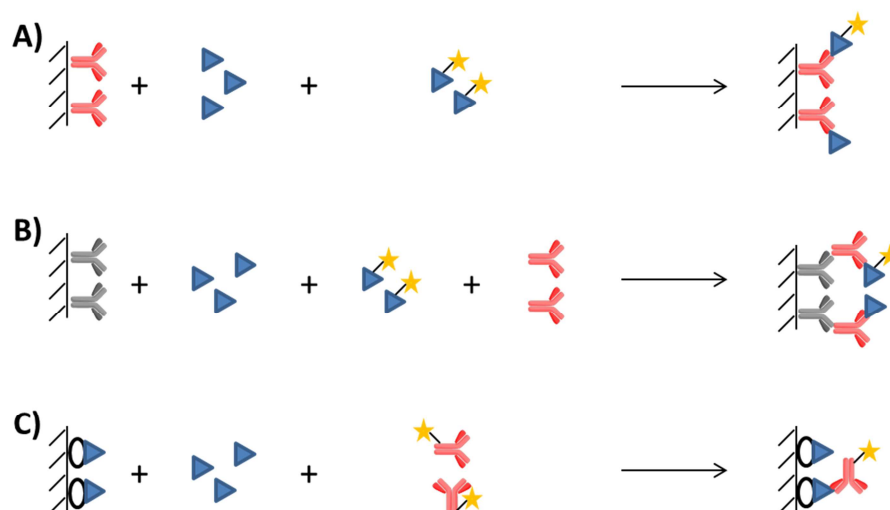


**Figura 21.** Curvas de calibrado para **A)** métodos de marcaje de Ab y **B)** métodos de marcaje de Ag, donde las líneas punteadas muestran la región de la curva con utilidad analítica.

3. Formato de ensayo [166]:
  - Ensayos competitivos.

En esta configuración de inmunoensayo se trabaja con cantidades limitantes de reactivo. En general el analito y el trazador compiten por el limitado número de sitios de enlace disponibles pertenecientes al anticuerpo inmovilizado, aunque también se podría inmovilizar una cantidad fija de antígeno y llevar a cabo la competencia entre el antígeno

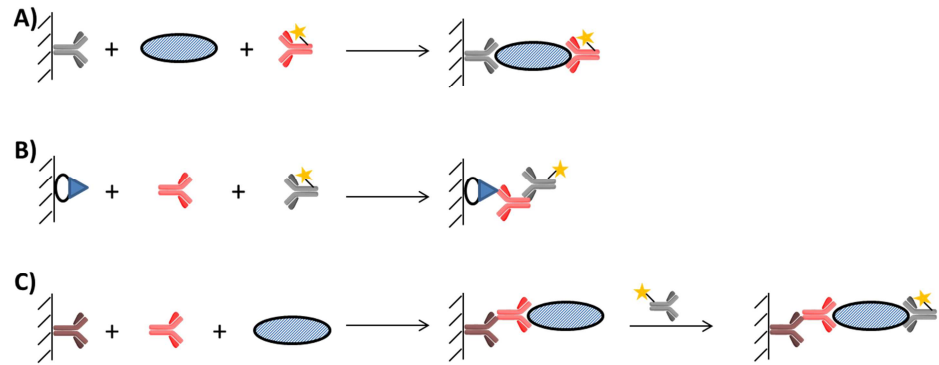
inmovilizado y el presente en disolución. Tras el periodo de incubación se realiza la medida bien de la fracción enlazada o bien de la fracción libre del trazador que se relaciona fácilmente con la concentración de analito en la muestra. Los diferentes formatos de ensayos competitivos se recogen en la Figura 22.



**Figura 22.** Configuraciones de inmunoensayos competitivos. A) Inmovilización del Ab estableciendo la competencia entre el analito y el trazador por el limitado número de sitios de enlace del Ab. B) Empleo de un anticuerpo captura que reconoce al anticuerpo anti-analito. C) Inmovilización del Ag. En este caso la competencia se establece entre el Ag inmovilizado y el Ag libre en disolución por el Ab\*. En todos los casos la señal obtenida es inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra.

- Ensayos no competitivos o tipo sandwich.

En este formato de ensayo se añade un exceso de inmunoreactivo (Ab o Ag), asegurando que prácticamente la totalidad de analito está en la forma enlazada, formando el inmunocomplejo. En este caso, se lleva a cabo la cuantificación directa de dicho inmunocomplejo y posteriormente se relaciona con la concentración de analito en la muestra. En la Figura 23 se pueden observar las distintas configuraciones que adoptan los inmunoensayos no competitivos.



**Figura 23.** Configuraciones de inmunoensayo no competitivo. **A)** Inmunoensayo tipo Sandwich. El analito es capturado por el Ab inmobilizado y luego es detectado por el Ab\*. **B)** Inmunoensayo no competitivo para la detección de Ab. La muestra se incuba en un soporte con el Ag y los Ab enlazados se cuantifican aplicando una anti-inmunoglobulina marcada (anticuerpo secundario). **C)** Ensayo con inmunoglobulina de captura. La Ig de captura de la clase de interés primero es reconocida por los anticuerpos anti-Ig que se encuentran inmobilizados en el soporte sólido. A continuación se añade el Ag que es enlazado por específicamente por la Ig y la fracción enlazada de Ag se cuantifica empleando otro Ab específico marcado.

Los trabajos actuales y futuros en los que los investigadores deben centrar sus esfuerzos dentro del campo de los inmunoensayos han de seguir las siguientes líneas de investigación y desarrollo [167]:

1. Desarrollo de inmunoensayos multianalito donde varias especies de interés puedan ser determinadas simultáneamente. En este punto los nanomateriales como los QDs y los NCs pueden jugar un papel muy importante debido a sus propiedades optoelectrónicas y a su composición elemental [168]. He aquí uno de los motores principales que han motivado la presente Tesis Doctoral, la investigación y desarrollo de estos nanomateriales como marcadores en inmunoanálisis.
2. Diseño de inmunosensores capaces de monitorizar a tiempo real los eventos bajo estudio. En esta idea se trabajará y profundizará más en el Capítulo 1A de la presente Tesis Doctoral.

3. Desarrollo de ensayos con cada vez límites de detección más bajos (inmunoensayos ultrasensibles) para que cada vez más analitos sean accesibles a esta técnica de análisis. En el Capítulo 2 de este manuscrito se abordará este proyecto, observando las posibilidades que ofrecen distintos detectores elementales y moleculares para el desarrollo de nuevos inmunoensayos.
4. Transferir las exitosas tecnologías no isotópicas a los ensayos de hibridación de ADN.
5. Empleo de la tecnología de ADN recombinante en la producción de anticuerpos “artificiales”, diseñados por ingeniería, con nuevas propiedades como por ejemplo los anticuerpos catalíticos.

### *I.3.2. Características analíticas a través de la curva de inhibición*

El objetivo general de un inmunoensayo es, al igual que en cualquier análisis cuantitativo, determinar de manera exacta y precisa la cantidad o concentración de analito en la muestra. También existen algunos casos especiales, como los test de embarazo, los marcadores tumorales o los antígenos producidos por infecciones virales, en los que lo importante no es tanto saber la cantidad sino la detección de si están presentes o no estas sustancias en la muestra. En cualquier caso, se desea establecer un criterio objetivo mediante el cual se pueda discernir si los resultados obtenidos a través de un inmunoensayo son significativos o no. Así, la legislación exige a los laboratorios clínicos la documentación y los datos de validación cuando se introducen nuevos ensayos. El éxito del empleo de un nuevo ensayo depende en primer lugar de la comprensión de los principios analíticos que gobiernan dicho ensayo. En este apartado se va a intentar describir de manera sencilla dicho criterio y/o principios analíticos a través de la definición de los términos de validación y calidad de los inmunoensayos [159,169,170].

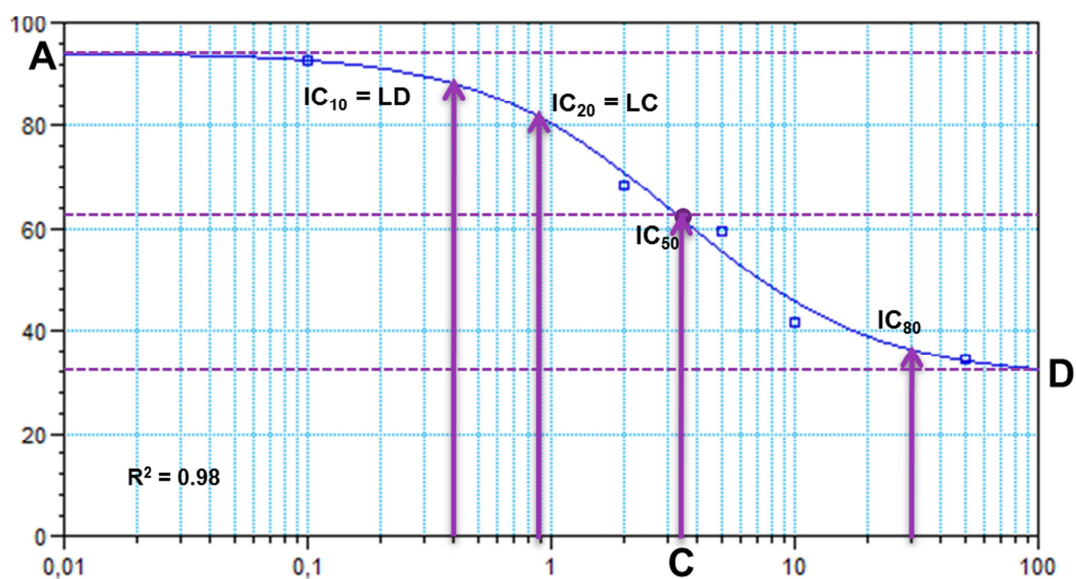
Generalmente, la obtención de los parámetros analíticos que definen al inmunoensayo y su validación ocurre en varias fases. El primer paso típicamente consiste en evaluar la sensibilidad y la especificidad del ensayo. A continuación se lleva a cabo la determinación de la precisión y exactitud por comparación con otros métodos de referencia. También es frecuente estimar la posibilidad de empleo del ensayo en muestras desconocidas con la mínima manipulación de la muestra. En este caso la validación del ensayo también incluye la determinación del efecto que pueda tener la matriz (entendiendo aquí que el término matriz engloba a todos los componentes de la muestra que no sean la especie bajo análisis) sobre el resultado del inmunoensayo. La última fase en la validación del inmunoensayo es ver la aplicabilidad que tiene en base a si aporta información de utilidad para las circunstancias de análisis requeridas.

Existen diferentes métodos de representación de las curvas de inmunoensayo a través de las cuales poder extraer los parámetros analíticos y realizar la validación de dicho ensayo. Así, en general, nos podemos encontrar con el modelo basado en la Ley de Acción de Masas, el modelo Lineal, el modelo Logarítmico y las funciones de Spline [171]. En la presente Tesis Doctoral se optó por el ajuste logarítmico de los datos basado en el modelo de regresión no lineal conocido como Ajuste Logarítmico de 4 Parámetros (Four-parameter Logistic Model, 4P) cuya ecuación se muestra a continuación:

$$Y = \left( \frac{(A-D)}{\left(1 + \frac{x}{C}\right)^B} \right) + D \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde Y es el valor de la señal medida (absorbancia, fluorescencia, etc.); x es la concentración de analito ensayada o a determinar; A representa el valor esperado para Y cuando no hay analito en la muestra (x=0); D es el valor esperado de Y cuando x es infinitamente grande; B es el valor de la pendiente de la curva; y C se corresponde con el punto de inflexión de la curva, es una concentración de analito tal que inhibe al 50% el valor de la señal Y. Es decir, para este caso  $y = (A + D)/2$ .

Una representación teórica de todos los parámetros se muestra en la Figura 24 donde además también se hace referencia a los parámetros analíticos que se pueden extraer de dicha curva de inmunoensayo. De este modo, se definen 4 concentraciones de inhibición (IC) con las que podremos definir los límites de detección (LD = IC<sub>10</sub>) y cuantificación (LC = IC<sub>20</sub>), el rango lineal (IC<sub>20</sub> – IC<sub>80</sub>) y la sensibilidad (C = IC<sub>50</sub>) del sistema. Hay que tener en cuenta que el LD de un inmunoensayo con marcas depende tanto de la afinidad del Ab por su Ag como de la detectabilidad de la marca empleada.



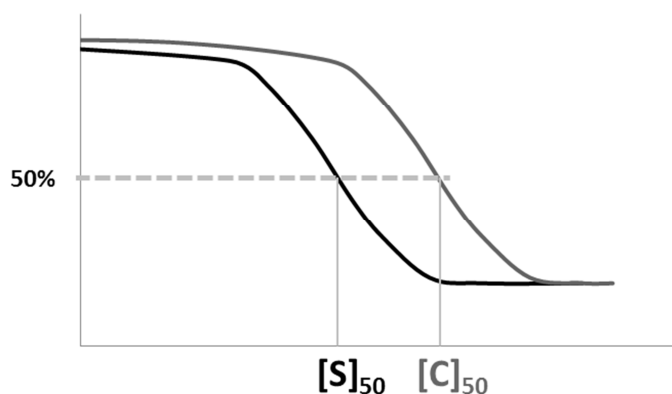
**Figura 24.** Representación gráfica de un inmunoensayo competitivo ajustado con el modelo logarítmico 4P. En él aparecen señalados tanto los parámetros que definen la curva 4P como las características analíticas que se pueden extraer de dicha curva.

La especificidad de un ensayo se define habitualmente a través del estudio de reactividad cruzada (*cross-reactivity*) donde el inmunoensayo desarrollado para el análisis de una especie en concreto se lleva a cabo en presencia de otras especies que pueden estar presentes en la muestra y que poseen estructuras químicas muy similares a la del analito. La reactividad cruzada generalmente se define como la masa o concentración de interferente necesaria para provocar una señal igual a la que causa la inhibición de la señal al 50% cuando se ensaya el analito. La reactividad cruzada se expresa en tanto por ciento como se aprecia en la ecuación 2:

$$\%C = 100 \times \frac{[S]_{50}}{[C]_{50}} \quad (\text{Ecuación 2})$$



donde es la concentración de standard necesaria para provocar una caída de la señal del 50% y  $[C]_{50}$  es la concentración de interferente que provoca la misma señal que  $[S]_{50}$  [159]. Para que quede más claro en la Figura 25 se muestra gráficamente lo que queremos decir.



**Figura 25.** Curvas de inhibición para un estándar de nuestro analito  $[S]$  y para un posible interferente  $[C]$ . En la gráfica se representa la obtención de  $[S]_{50}$  y  $[C]_{50}$  necesarios para el cálculo de la reactividad cruzada de dicho interferente.

En este punto también cabe hacer mención de otro tipo de interferencias en los inmunoensayos: las interferencias inespecíficas que son aquellas que producen un aumento o disminución de la señal sin haber reaccionado específicamente con el Ab o el Ag. Este tipo de interferencias se deben a que la muestra puede contener componentes que pueden quedar adsorbidos o enlazados inespecíficamente bien al soporte sólido donde se realiza el inmunoensayo o bien a la marca que produce la señal en el inmunoensayo. Aquí se pone de manifiesto el papel tan importante que juega la matriz de la muestra a la hora de llevar a cabo el desarrollo de nuevas metodologías de inmunoensayo. Las reacciones inmunológicas son muy sensibles a la presencia de proteínas, de medios con elevada fuerza iónica (alto contenido salino), y a la presencia de lípidos o enzimas que pueden llegar hasta impedir bien el reconocimiento Ag-Ab o bien el registro de la señal analítica. Para evitar este tipo de interacciones inespecíficas, al menos las relacionadas con las adsorciones inespecíficas al soporte, se emplean agentes de bloqueo tras la etapa de inmovilización del reactivo inmunológico (etapa de tapizado). Como agentes bloqueantes se suele usar la albúmina de suero bovino (BSA),

la leche, la caseína, agarosa, etc. que saturan las áreas del soporte que no han sido cubiertas por el Ab o el Ag. Para el caso en el que los interferentes afecten a la detección de la marca se tendrán que llevar a cabo distintos tratamientos de la muestra, de mayor o menor complejidad, para intentar limpiar la muestra de dichos interferentes [159].

Finalmente la validación de una nueva metodología basada en el empleo de inmunoensayos se realiza mediante el análisis de las muestras reales a través de una metodología de referencia marcada por la legislación y comparando los resultados obtenidos por ambas metodologías o bien mediante el análisis de materiales de referencia certificados con el inmunoensayo desarrollado comprobando que los resultados concuerdan con el valor real dado para la muestra certificada.

### *1.3.3. Inmunoensayos con nanomateriales como marcadores*

Las excepcionales características optoelectrónicas de los nanomateriales descritos hasta ahora en la Introducción (QDs y NCs) junto con la posibilidad de solubilizarlos y/o funcionalizarlos, hacen que estén emergiendo como una poderosa “herramienta de visualización” (marcadores fluorescentes) reemplazando el uso de fluoróforos orgánicos convencionales y marcadores radiactivos utilizados hasta el momento, ya que solventan muchos de los problemas y limitaciones que presentaban este tipo de marcas en aplicaciones bioanalíticas.

Por otro lado, la determinación sensible y selectiva de biomoléculas y proteínas es esencial en distintos campos como el diagnóstico clínico, la evaluación medioambiental o el análisis y control de los alimentos [172]. Hoy en día, se presta un especial atención al desarrollo de técnicas inmunológicas para la detección de estos analitos debido a estas técnicas cumplen con los requisitos de alta sensibilidad y especificidad. En efecto, la posibilidad de desarrollar inmunoensayos fluorescentes basados en el empleo de nanomateriales fluorescentes como marcadores es una de las líneas de investigación de estas nanopartículas de mayor interés actual en el ámbito científico. Así numerosos formatos de ensayo han sido investigados entre los que cabe destacar inmunoensayos fluorescentes, ensayos basados en metodologías FRET (*Förster*

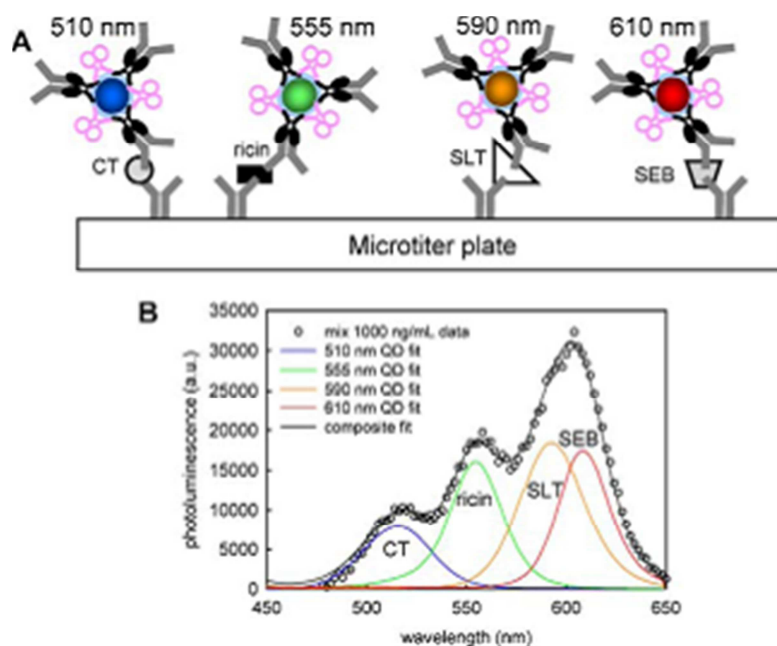
*resonance energy transfer*, transferencia de energía de resonancia de Förster) y ensayos multianalito [173].

La capacidad de los conjugados nanopartícula-anticuerpo de mantener la funcionalidad de la unidad biológica a la que se une el nanomaterial abrió las puertas a su aplicación en el campo del bioanálisis y más concretamente en las técnicas inmunológicas. La primera aplicación basada en una reacción inmunológica de aglutinación fue llevada a cabo por Chan y Nie [174]. En ella, QDs de CdSe/ZnS eran covalentemente unidos a inmunoglobulinas tipo G humana y posteriormente se incubaban con anticuerpos policlonales específicos y con BSA. El resultado observado fue que la presencia de 0,5 µg/mL de anticuerpo daba lugar a la aglutinación de los QDs visible a través de un microscopio invertido. Más tarde se desarrollaron ensayos tipo sandwich para la determinación de diversos analitos como por ejemplo el realizado por Goldman y col. para el análisis de la Enterotoxina B [175].

El campo de aplicaciones inmunológicas de los QDs se expandió gracias a su capacidad de funcionar como donadores en los procesos FRET [176]. Debido a sus excelentes propiedades optoelectrónicas estas nanopartículas se constituyen como unos excelentes donadores de energía a otras moléculas fluorescentes (proteínas), lo cual simplifica enormemente el desarrollo de sistemas de detección basados en fenómenos de FRET. Existen varios ejemplos de aplicación de QDs en inmunoensayos basados en fenómenos de FRET, entre los que se incluyen inmunoensayos directos e indirectos con QDs en microarrays, la detección de marcadores tumorales, *Webstern Blotting* o la detección de patógenos como la *E. coli* [177-180].

Pero, probablemente, la aplicación más prometedora que pueden aportar estos nanomateriales al mundo científico y en particular al de la inmunología es en el desarrollo de ensayos multianalito (*multiplexing assays*). La primera demostración del potencial del empleo de QDs de diferentes tamaños (distintas longitudes de onda de emisión) en el desarrollo de ensayos multianalito fue realizada por el grupo del Prof. Mattoussi [181]. En ella se pusieron de manifiesto las claras ventajas que ofrecían los QDs frente a los fluoróforos orgánicos convencionales para su uso en este tipo de ensayos multianalito. Los autores fueron capaces de detectar 4 toxinas simultáneamente

mediante un ensayo ELISA tipo sandwich, marcando cada anticuerpo con un QD de distinto tamaño (distinta longitud de onda de emisión) y llevando a cabo su detección mediante la excitación simultánea de los QDs con una única fuente a una longitud de onda dada. Además desarrollaron un esquema sencillo de deconvolución de espectros para poder llevar a cabo la cuantificación simultánea del ensayo (véase Figura 26).



**Figura 26.** Ensayo multianalito para la determinación de 4 toxinas. A) Esquema ilustrativo del ensayo ELISA tipo sandwich realizado. B) Datos obtenidos en un experimento en el que se incubaron las 4 toxinas a una concentración de 1000 ng/mL. En el gráfico vemos tanto la señal fluorescente compuesta como la deconvolución de cada contribución individual. Las medidas fueron realizadas con un lector de placas Tecan Safire excitando a 330 nm. Figura recogida de la Ref.181.

Desafortunadamente, existen aún serias limitaciones en el desarrollo de este tipo de ensayos derivadas del restringido número de señales independientes que se pueden conseguir en un ensayo multianalito con QDs. La primera consideración a tener en cuenta es la capacidad para resolver señales de espectros independientes de QDs. Los espectros de emisión están separados por tan sólo 15 nm en el máximo (donde las distribuciones tienen un ancho en la semialtura similar en torno a 25-35 nm), por lo que no se resuelven sin dificultad. Utilizando QDs de CdSe/ZnS los límites de la ventana de emisión se extienden en un rango entre 490-630 nm aproximadamente. Asumiendo que

podríamos resolver poblaciones cuyos máximos de emisión estuvieran separados unos 10 nm, esto sugeriría un límite superior de 15 señales, lo que representa una mejora significativa en la tecnología de hoy en día [182]. Entre otros, actualmente podemos recomendar dos artículos de revisión donde se comentan en profundidad todos los avances hechos hasta la fecha en el campo de inmunoensayos con QDs [142,172].

Si ahora nos fijamos en el empleo de los NCs como marcadores en inmunoensayos, podemos decir que aunque el desarrollo de estos nanomateriales todavía está en sus comienzos ya existen algunos trabajos donde hacen uso de sus poderosas propiedades. La primera aplicación de los NCs metálicos fluorescentes para la determinación de IgG humana mediante un inmunoensayo fue desarrollada por Leblanc y col. en 2006 [183]. Más tarde Chang y col. desarrollaron un ensayo competitivo para el análisis de proteínas de factor de crecimiento derivadas de las plaquetas (PDGF) [184]. El esquema de trabajo desarrollado se puede ver en la Figura 27. El sistema propuesto permitió la detección de PDGF a niveles de concentración de 0,5 nM en presencia de BSA a una concentración 10  $\mu$ M.

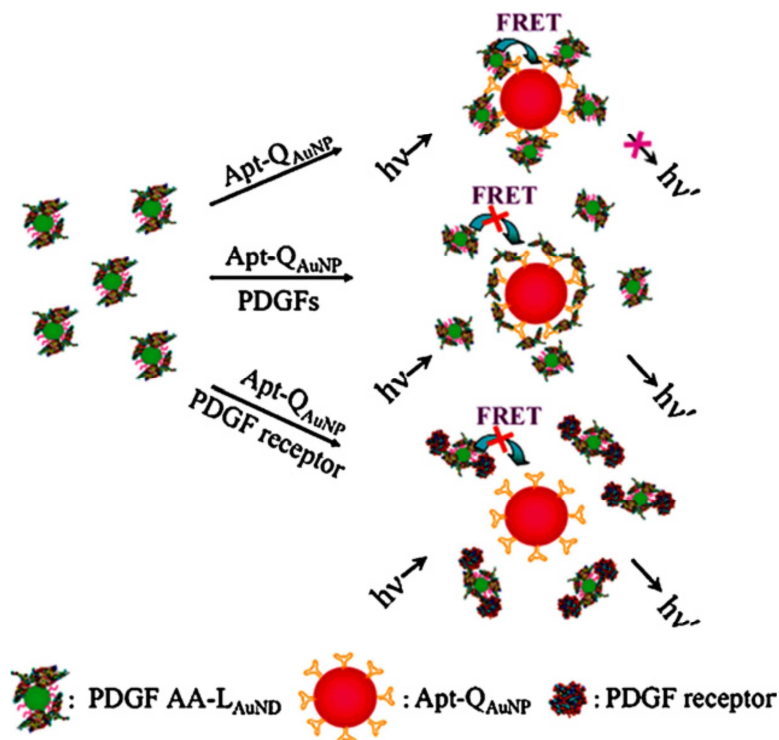


Figura 27. Representación esquemática del nanosensor de PDGF y del receptor de PDGF basado en el quenching de la fluorescencia de los AuNCs. Imagen obtenida de la Ref.184.

Los mismos autores han realizado otros estudios para llevar a cabo la determinación de otras proteínas como la concavalina A [185] o la inmunoglobulina G [186].

Como el desarrollo de los NCs todavía está en sus primeros pasos aún queda mucha investigación básica por realizar en esta línea; además, sus aplicaciones aunque interesantes todavía son escasas en comparación con los QDs. No obstante, con los ejemplos aquí mostrados ya podemos anticipar una prometedora carrera de estos nanomateriales en el campo del inmunoanálisis.

#### I.4. Bibliografía

- [1] R.P. Feynman, **There's plenty of room at the bottom**, Caltech Engineering and Science, 1960, 23 (5), 22.
- [2] NANOYOU Teachers training kit-Module 1-Chapter 1, **Introduction to nanoscience and nanotechnologies: Fundamental concepts in nanoscience and nanotechnologies**, [www.nanoyou.eu](http://www.nanoyou.eu)
- [ 3 ] Euroresidentes. Primer portal sobre nanotecnología y nanociencia en español. <http://www.euroresidentes.com/futuro/nanotecnologia/nanotecnologia.htm> (consulta febrero 2013).
- [4] Universia España. La mayor red de cooperación universitaria de habla hispana y portuguesa. <http://noticias.universia.es/ciencia-nn-tt/noticia/2006/05/18/598810/nanotecnologia-revolucion-industrial-siglo-xxi.html> (consulta febrero 2013).
- [ 5 ] C. Carrillo Carrión, **Contributions of quantum dots to analytical nanoscience and nanotechnology**, Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, 2011.
- [6] T. Sánchez, V. Velasco Rodríguez, J.M. Martínez Duart, **Nanociencia y Nanotecnología: la tecnología fundamental para el siglo XXI**, Física para todos, 2005, 19.
- [7] G.M. Whitesides, **Nanoscience, Nanotechnology and Chemistry**, Small, 2005, 1 (2), 172.
- [8] A.P. Alivisatos, **The use of nanocrystals in biological detection**, Nature Biotechnology, 2004, 22, 47.
- [9] M. Teresa Fernández Fernández-Argüelles, **Estrategias fotoluminiscentes basadas en análisis por inyección en flujo, mecanismos de transferencia de energía o quantum dots para el control (bio)químico**, Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo, 2008.
- [10] H. Mattoussi, G. Palui, H.B. Na, **Luminescent quantum dots as platforms for probing *in vitro* and *in vivo* biological processes**, Advanced Drug Delivery Reviews, 2012, 64, 138.
- [ 11 ] F.A. Esteve-Turillas, A. Abad-Fuentes, **Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-size analytes**, Biosensors and Bioelectronics, 2013, 41, 12.
- [12] I.L. Medintz, H.T. Uyeda, E.R. Goldman, H. Mattoussi, **Quantum dots bioconjugates for imaging, labeling and sensing**, Nature Materials, 2005, 4, 435.
- [13] J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **The use of luminescent quantum dots for optical sensing**, Trends in Analytical Chemistry, 2006, 25, 207.

- [14] A.P. Alivisatos, **Semiconductor clusters, nanocrystals and quantum dots**, *Science*, 1996, 271, 933.
- [15] A.I. Ekimov, A.A. Onushchenko, **Quantum size effect in the optical spectra of semiconductor microcrystals**, *Sov. Phys. Semicond.*, 1982, 16, 775.
- [16] D.J. Norris, M.G. Bawendi, **Measurement and assignment of the size-dependent optical spectrum in CdSe quantum dots**, *Physical Review B*, 1996, 53, 16338.
- [17] C.B. Murray, D.J. Norris, M.G. Bawendi, **Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites**, *J. American Chemical Society*, 1993, 115, 8706.
- [18] H. Yang, S. Santra, P.H. Holloway, **Synthesis and applications of Mn-doped II-IV semiconductor nanocrystals**, *J. Nanoscience and Nanotechnology*, 2005, 5, 1364.
- [19] X. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, S. Weiss, **Quantum dots for live cells, in vivo imaging and diagnostic**, *Science*, 2005, 307, 538.
- [20] L.P. Balet, S.A. Ivanov, A. Piryatinski, M. Achermann, V.I. Klimov, **Inverted Core/Shell Nanocrystals Continuously Tunable between Type-I and Type-II Localization Regimes**, *Nano Letters*, 2004, 4, 1485.
- [21] S. Kim, B. Fisher, H-J Eisler, M. Bawendi, **Type-II Quantum Dots: CdTe/CdSe(Core/Shell) and CdSe/ZnTe(Core/Shell) Heterostructures**, *J. American Chemical Society*, 2003, 125, 11466.
- [22] P. Reiss, M. Protière, L. Li, **Core/shell semiconductor nanocrystals**, *Small*, 2009, 5, 154.
- [23] R.E. Bailey, A.M. Smith, S. Nie, **Quantum dots in biology and medicine**, *Phys. E.*, 2004, 25, 1.
- [24] G. Schmidt, **Nanoparticles: from theory to applications**, Ed. Wiley-VCH, Weinheim, (2004).
- [25] Z.A. Peng, X. Peng, **Formation of high quality CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals using CdO as precursors**, *J. American Chemical Society*, 2001, 123, 183.
- [26] L. Qu, Z.A. Peng, X. Peng, **Alternative routes toward high quality CdSe nanocrystals**, *Nano Lett.*, 2001, 1, 333.
- [27] J. Aldana, Y.A. Wang, X. Peng, **Photochemical instability of CdSe nanocrystals coated by hydrophilic thiols**, *J. American Chemical Society*, 2002, 123, 8844.



- [28] A.R. Montoro Bustos, J. Ruiz Encinar, M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **Elemental mass spectrometry: a powerful tool for an accurate characterization at elemental level of quantum dots**, Chem. Commun., 2009, 3107.
- [29] B.O. Dabboussi, J. Rodriguez-Viejo, F.V. Mikulec, J.R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K.F. Jensen, M. G. Bawendi, **(CdSe) ZnS core-shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites**, J. Phys. Chem. B, 1997, 101, 9463. M.A. Hines, P. Guyot-Sionnest, **Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals**, J. Phys. Chem., 1996, 100, 468.
- [30] I. Mekis, D.V. Talapin, A. Kornowski, H.J. Weller, **One-post synthesis of highly luminescent CdSe/CdS core/shell nanocrystals via organometallic and greener chemical approaches**, J. Phys. Chem. B, 2003, 107, 7454. X. Peng, M.C. Schlamp, A. Kadavanich, A.P. Alivisatos, **Epitaxial growth of highly luminescent CdSe/CdS core/shell nanocrystals with photostability and electronic accessibility**, J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 7019.
- [31] P. Reiss, S. Carayon, J. Bleuse, A. Pron, **Low polydispersity core/shell nanocrystals of CdSe/ZnSe and CdSe/ZnSe/ZnS type: preparation and optical studies**, Syn. Metals, 2003, 139, 649.
- [32] E. Chang, N. Thekkek, W.W. Yu, V.L. Colvin, R. Drezek, **Evaluation of quantum dots cytotoxicity based on intracellular uptake**, Small, 2006, 2, 1412.
- [33] S. Jun, E. Jang, J.E. Lim, **Synthesis of multi-shell nanocrystals by a single step coating process**, Nanotechnology, 2006, 17, 3892.
- [34] Z. Yu, L. Guo, H. Du, T. Krauss, J. Silcox, **Shell distribution on colloidal CdSe/ZnS quantum dots**, Nano Lett., 2005, 5, 565. L. Manna, E.C. Scher, L. Li, A.P. Alivisatos, **Epitaxial growth and photochemical annealing of graded CdS/ZnS shells on colloidal CdSe nanorods**, J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 7136.
- [35] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, **Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics**, Science, 2005, 307, 538.
- [36] I.L. Medintz, H.T. Uyeda, E.R. Goldman, H. Mattoussi, **Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing**, Nature materials, 2005, 4, 435.
- [37] M.F. Frasco, N. Chaniotakis, **Bioconjugated quantum dots as fluorescent probes for bioanalytical applications**, Anal. Bioanal. Chem., 2010, 396, 229.

- [38] H. Mattoussi, G. Palui, H.B. Na, **Luminescent quantum dots as platforms for probing in vitro and in vivo biological processes**, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, 64, 138.
- [39] I. Díez, R.H.A. Ras, **Fluorescent silver nanoclusters**, *Nanoscale*, 2011, 3, 1963.
- [40] I. Díez, R.H.A. Ras, **Few-Atom Silver Clusters as Fluorescent Reporters**, in A.P. Demchenko (ed.) *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology II*, DOI 10.1007/978-3-642-04701-5\_10, Springer Ser Fluoresc, 2010, 9, 307.
- [41] J. Zheng, P.R. Nicovich, R.M. Dickson, **Highly fluorescent noble-metal quantum dots**, *Annual Review of Physical Chemistry*, 2007, 58, 409.
- [42] U. Kreibitz, M. Vollmer, **Optical Properties of Metal Clusters**, Springer, Berlin, 1995
- [43] C-A J. Lin, C-H Lee, J-T Hsieh, H-H Wang, J.K. Li, J-L Shen, W-H Chan, H-I Yeh, W.H. Chang, **Synthesis of Fluorescent Metallic Nanoclusters toward Biomedical Application: Recent Progress and Present Challenges**, *J. Medical and Biological Engineering*, 2009, 29, 276.
- [44] W.D. Knight, K. Clemenger, W.A. de Heer, W.A. Saunders, M.Y. Chou, M.L. Cohen, **Electronic shell structure and abundances of sodium clusters**, *Phys. Rev. Lett.*, 1984, 52, 2141.
- [45] J. Zheng, C. Zhang, R.M. Dickson, **Highly fluorescent, water-soluble, size-tunable gold quantum dots**, *Phys. Rev. Lett.*, 2004, 93, 077402.
- [46] X. Yuan, Z. Luo, Q. Zhang, X. Zhang, Y. Zheng, J.Y. Lee, J. Xie, **Synthesis of Highly Fluorescent Metal (Ag, Au, Pt, and Cu) Nanoclusters by Electrostatically Induced Reversible Phase Transfer**, *ACS Nano*, 2011, 5, 8800
- [47] L. Shang, S. Dong, G.U. Nienhaus, **Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications**, *Nano Today*, 2011, 6, 401.
- [48] Y. Lu, W. Chen, **Sub-nanometre sized metal clusters: from synthetic challenges to the unique property discoveries**, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41, 3594.
- [49] Y. Negishi, K. Nobusada, T. Tsukuda, **Glutathione-Protected Gold Clusters Revisited: Bridging the Gap between Gold(I)-Thiolate Complexes and Thiolate-Protected Gold Nanocrystals**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 5261.
- [50] J.T. Petty, J. Zheng, N.V. Hud, R.M. Dickson, **DNA-Templated Ag Nanocluster Formation**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 5207.
- [51] B. Adhikari, A. Banerjee, **Facile Synthesis of Water-Soluble Fluorescent Silver Nanoclusters and HgII Sensing**, *Chem. Mater.*, 2010, 22, 4364.

- 
- [52] T. Huang, R. Murray, **Visible Luminescence of Water-Soluble Monolayer-Protected Gold Clusters**, *J. Phys. Chem. B*, 2011, 105, 12498.
- [53] T. Huang, R. Murray, **Luminescence of Tiopronin Monolayer-Protected Silver Clusters Changes To That of Gold Clusters upon Galvanic Core Metal Exchange**, *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107, 7434.
- [54] S. Link, A. Beeby, S. FitzGerald, M. El-Sayed, T. Schaaff, R. Whetten, **Visible to Infrared Luminescence from a 28-Atom Gold Cluster**, *J. Phys. Chem. B*, 2002, 106, 3410.
- [55] C-C Huang, Y-L Hung, Y-C Shiang, T-Y Lin, Y-S Lin, C-T Chen, H-T Chang, **Photoassisted Synthesis of Luminescent Mannose–Au Nanodots for the Detection of Thyroglobulin in Serum**, *Chem. Asian J.*, 2010, 5, 334.
- [56] Z. Wu, R. Jin, **On the Ligand's Role in the Fluorescence of Gold Nanoclusters**, *Nano Lett.*, 2010, 10, 2568.
- [57] J. Zheng, C.W. Zhang, R.M. Dickson, **Highly Fluorescent, Water-Soluble, Size-Tunable Gold Quantum Dots**, *Phys. Rev. Lett.*, 2004, 93, 077402.
- [58] I. Diez, M. Pusa, S. Kulmala, H. Jiang, A. Walther, A.S. Goldmann, A.H.E. Muller, O. Ikkala, R.H.A. Ras, **Color Tunability and Electrochemiluminescence of Silver Nanoclusters**, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, 48, 2122.
- [59] H. Chen, X. Kou, Z. Yang, W. Ni, J. Wang, **Shape- and Size-Dependent Refractive Index Sensitivity of Gold Nanoparticles**, *Langmuir*, 2008, 24, 5233.
- [60] W. Kaiser, C.G.B. Garrett, **Two-photon excitation in  $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$** , *Physical Review Letters*, 1961, 7, 229.
- [61] I.D. Abella, **Optical double-quantum absorption in cesium vapor**, *Physical Review Letters*, 1962, 9, 453.
- [62] W. Denk, J. Strickler, W. Webb, **Two-photon laser scanning fluorescence microscopy**, *Science*, 1990, 248, 73.
- [63] P.T.C. So, C.Y. Dong, B.R. Masters, K.M. Berland, **Two-photon excitation fluorescence microscopy**, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2000, 2, 399.
- [64] G. Ramakrishna, O. Varnavski, J. Kim, D. Lee, T. Goodson, **Quantum-Sized Gold Clusters as Efficient Two-Photon Absorbers**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 5032.

- [65] C. Liu, M. Ho, Y. Chen, C. Hsieh, Y. Lin, Y. Wang, M. Yang, H. Duan, B. Chen, J. Lee, **Thiol-Functionalized Gold Nanodots: Two-Photon Absorption Property and Imaging In Vitro**, *J. Phys. Chem. C*, 2009, 113, 21082.
- [66] L. Polavarapu, M. Manna, Q-H Xu, **Biocompatible glutathione capped gold clusters as one- and two-photon excitation fluorescence contrast agents for live cells imaging**, *Nanoscale*, 2011, 3, 429.
- [67] D.R. Larson, W.R. Zipfel, R.M. Williams, S.W. Clark, M.P. Bruchez, F.W. Wise, W.W. Webb, **Water-Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging in Vivo**, *Science*, 2003, 300, 1434.
- [68] S.A. Patel, C.I. Richards, J-C Hsiang, R.M. Dickson, **Water-Soluble Ag Nanoclusters Exhibit Strong Two-Photon-Induced Fluorescence**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 11602.
- [69] B. Hammer, J.K. Norskov, **Why gold is the noblest of all the metals**, *Nature*, 1995, 376, 238.
- [70] J.A. van Bokhoven, J.T. Miller, **d Electron Density and Reactivity of the d Band as a Function of Particle Size in Supported Gold Catalysts**, *J. Phys. Chem. C*, 2007, 111, 9245.
- [71] M. Mavrikakis, P. Stoltze, J.K. Norskov, **Making gold less noble**, *Catal. Lett.*, 2000, 64, 101.
- [72] M. Valden, X. Lai, D.W. Goodman, **Onset of Catalytic Activity of Gold Clusters on Titania with the Appearance of Nonmetallic Properties**, *Science*, 1998, 281, 1647.
- [73] B.E. Hayden, D. Pletcher, M.E. Rendall, J.P. Suchsland, **CO Oxidation on Gold in Acidic Environments: Particle Size and Substrate Effects**, *J. Phys. Chem. C*, 2007, 111, 17044.
- [74] B.E. Hayden, D. Pletcher, J.P. Suchsland, **Enhanced Activity for Electrocatalytic Oxidation of Carbon Monoxide on Titania-Supported Gold Nanoparticles**, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46, 3530.
- [75] I. Yagi, T. Ishida, K. Uosaki, **Electrocatalytic reduction of oxygen to water at Au nanoclusters vacuum-evaporated on boron-doped diamond in acidic solution**, *Electrochem. Commun.*, 2004, 6, 773.
- [76] J. Hernandez, J. Solla-Gullon, E. Herrero, A. Aldaz, J.M. Feliu, **Electrochemistry of Shape-Controlled Catalysts: Oxygen Reduction Reaction on Cubic Gold Nanoparticles**, *J. Phys. Chem. C*, 2007, 111, 14078.
- [77] N. Nikbin, G.M. Pourmpakis, D.G. Vlachos, **A Combined DFT and Statistical Mechanics Study for the CO Oxidation on the Au<sub>10</sub><sup>-1</sup> Cluster**, *J. Phys. Chem. C*, 2011, 115, 20192.

- [78] S. Guerin, B.E. Hayden, D. Pletcher, M.E. Rendall, J.P. Suchsland, **A combinatorial approach to the study of particle size effects on supported electrocatalysts: oxygen reduction on gold**, *J. Comb. Chem.*, 2006, 8, 679.
- [79] W. Tang, H.F. Lin, A. Kleiman-Shwarsstein, G.D. Stucky, E.W. McFarland, **Size-Dependent Activity of Gold Nanoparticles for Oxygen Electroreduction in Alkaline Electrolyte**, *J. Phys. Chem. C*, 2008, 112, 10515.
- [80] W.T. Wei, Y.Z. Lu, W. Chen, S.W. Chen, **One-Pot Synthesis, Photoluminescence, and Electrocatalytic Properties of Subnanometer-Sized Copper Clusters**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 2060.
- [81] Y.Z. Lu, W. Chen, **Size effect of silver nanoclusters on their catalytic activity for oxygen electro-reduction**, *J. Power Sources*, 2012, 197, 107.
- [82] J.H. Lee, Y.W. Jun, S.I. Yeon, J.S. Shin, J. Cheon, **Dual-Mode Nanoparticle Probes for High-Performance Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging of Neuroblastoma**, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 8160.
- [83] Y. Jin, X. Gao, **Plasmonic fluorescent quantum dots**, *Nat. Nanotechnol.*, 2009, 4, 571.
- [84] M.A.H. Muhammed, T. Pradeep, **Au<sub>25</sub>@SiO<sub>2</sub>: Quantum Clusters of Gold Embedded in Silica**, *Small*, 2011, 7, 204.
- [85] X.L. Guevel, B. Hotzer, G. Jung, M. Schneider, **NIR-emitting fluorescent gold nanoclusters doped in silica nanoparticles**, *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 2974.
- [86] C.I. Richards, S. Choi, J.C. Hsiang, Y. Antoku, T. Vosch, A. Bongiorno, Y.L. Tzeng, R.M. Dickson, **Oligonucleotide-Stabilized Ag Nanocluster Fluorophores**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 5038.
- [87] W.W. Guo, J.P. Yuan, Q.Z. Dong, E.K. Wang, **Highly Sequence-Dependent Formation of Fluorescent Silver Nanoclusters in Hybridized DNA Duplexes for Single Nucleotide Mutation Identification**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 932.
- [88] J.P. Xie, Y.G. Zheng, J.Y. Ying, **Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 888.
- [89] C-L Liu, H-T Wu, Y-H Hsiao, C-W Lai, C-W Shih, Y-K Peng, K-C Tang, H-W Chang, Y-C Chien, J-K Hsiao, et al., **Insulin-Directed Synthesis of Fluorescent Gold Nanoclusters:**

**Preservation of Insulin Bioactivity and Versatility in Cell Imaging**, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, 50, 7056.

[90] C.L. Guo, J. Irudayaraj, **Fluorescent Ag Clusters via a Protein-Directed Approach as a Hg(II) Ion Sensor**, *Anal. Chem.*, 2011, 83, 2883.

[91] A. Mathew, P.R. Sajanlal, T.A Pradeep, **Fifteen Atom Silver Cluster Confined in Bovine Serum Albumin**, *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 11205.

[92] J. Zheng, R.M. Dickson, **Individual Water-Soluble Dendrimer-Encapsulated Silver Nanodot Fluorescence**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 13982.

[93] J. Zheng, J.T. Petty, R.M. Dickson, **High Quantum Yield Blue Emission from Water-Soluble Au<sub>8</sub> Nanodots**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 7780.

[94] Y.P. Bao, C. Zhong, D.M. Vu, J.P. Temirov, R.B. Dyer, J.S. Martinez, **Nanoparticle-Free Synthesis of Fluorescent Gold Nanoclusters at Physiological Temperature**, *J. Phys. Chem. C*, 2007, 111, 12194.

[95] Y-C Jao, M-K Chen, S-Y Lin, **Enhanced quantum yield of dendrimer-entrapped gold nanodots by a specific ion-pair association and microwave irradiation for bioimaging**, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 2626.

[96] J.G. Zhang, S.Q. Xu, E. Kumacheva, **Photogeneration of Fluorescent Silver Nanoclusters in Polymer Microgels**, *Adv. Mater.*, 2005, 17, 2336.

[97] L. Shang, S.J. Dong, **Facile Preparation of Water-Soluble Fluorescent Silver Nanoclusters Using a Polyelectrolyte Template**, *Chem. Commun.*, 2008, 9, 1088.

[98] H. Duan, S. Nie, **Etching Colloidal Gold Nanocrystals with Hyperbranched and Multivalent Polymers: A New Route to Fluorescent and Water-Soluble Atomic Clusters**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 2412.

[99] B. Santiago González, M.A.J. Rodríguez, C. Blanco, J. Rivas, M.A. López-Quintela, J.M.G. Martinho, **One Step Synthesis of the Smallest Photoluminescent and Paramagnetic PVP-Protected Gold Atomic Clusters**, *Nano Lett.*, 2010, 10, 4217.

[100] M. Zhu, C.M. Aikens, F.J. Hollander, G.C. Schatz, R. Jin, **Correlating the Crystal Structure of a Thiol-Protected Au<sub>25</sub> Cluster and Optical Properties**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 5883.

[101] Z. Wu, E. Lanni, W. Chen, M.E. Bier, D. Ly, R. Jin, **High Yield, Large Scale Synthesis of Thiolate-Protected Ag<sub>7</sub> Clusters**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 16672.

- 
- [ 102 ] B. Adhikari, A. Banerjee, **Facile Synthesis of Water-Soluble Fluorescent Silver Nanoclusters and Hg(II) Sensing**, Chem. Mater., 2010, 22, 4364.
- [103] T. Udaya B. Rao, T. Pradeep, **Luminescent Ag<sub>7</sub> and Ag<sub>8</sub> Clusters by Interfacial Synthesis**, Angew. Chem., Int. Ed., 2010, 49, 3925.
- [104] N. Nishida, H. Yao, T. Ueda, A. Sasaki, K. Kimura, **Synthesis and Chiroptical Study of D/L-Penicillamine-Capped Silver Nanoclusters**, Chem. Mater., 2007, 19, 2831.
- [105] T.U.B. Rao, B. Nataraju, T. Pradeep, **Ag<sub>9</sub> Quantum Cluster through a Solid-State Route**, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 16304.
- [106] W.W. Guo, J.P. Yuan, Q.Z. Dong, E.K. Wang, **Highly Sequence-Dependent Formation of Fluorescent Silver Nanoclusters in Hybridized DNA Duplexes for Single Nucleotide Mutation Identification**, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 932.
- [107] L.A. Peyser, A.E. Vinson, A.P. Bartko, R.M. Dickson, **Photoactivated Fluorescence from Individual Silver Nanoclusters**, Science, 2001, 291, 103.
- [108] H.X. Xu, K.S. Suslick, **Sonochemical Synthesis of Highly Fluorescent Ag Nanoclusters**, ACS Nano, 2010, 4, 3209.
- [109] S. Liu, F. Lu, J.J. Zhu, **Highly Fluorescent Ag Nanoclusters: Microwave-Assisted Green Synthesis And Cr<sup>3+</sup> Sensing**, Chem. Commun., 2011, 47, 2661.
- [110] R.C. Jin, H.F. Qian, Z.K. Wu, Y. Zhu, M.Z. Zhu, A. Mohanty, N. Garg, **Size Focusing: A Methodology for Synthesizing Atomically Precise Gold Nanoclusters**, J. Phys. Chem. Lett., 2010, 1, 2903.
- [111] H.F. Qian, M.Z. Zhu, E. Lanni, Y. Zhu, M.E. Bier, R.C. Jin, **Conversion of Polydisperse Au Nanoparticles into Monodisperse Au<sub>25</sub> Nanorods and Nanospheres**, J. Phys. Chem. C, 2009, 113, 17599.
- [112] H. Qian, Y. Zhu, R. Jin, **Size-Focusing Synthesis, Optical and Electrochemical Properties of Monodisperse Au<sub>38</sub>-(SC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Ph)<sub>24</sub> Nanoclusters**, ACS Nano, 2009, 3, 3795.
- [113] M.A.H. Muhammed, P.K. Verma, S.K. Pal, R.C.A. Kumar, S. Paul, R.V. Omkumar, T. Pradeep, **Bright, NIR-Emitting Au<sub>23</sub> from Au<sub>25</sub>: Characterization and Applications Including Biolabeling**, Chem.Eur. J., 2009, 15, 10110.

- [114] R.J. Zhou, M.M. Shi, X.Q. Chen, M. Wang, H.Z. Chen, **Atomically Monodispersed and Fluorescent Sub- Nanometer Gold Clusters Created by Biomolecule-Assisted Etching of Nanometer-Sized Gold Particles and Rods**, *Chem.;Eur. J.*, 2009, 15, 4944.
- [115] C.A.J. Lin, T.Y. Yang, C.H. Lee, S.H. Huang, R.A. Sperling, M. Zanella, J.K. Li, J.L. Shen, H.H. Wang, H.I. Yeh, et al., **Synthesis, Characterization, and Bioconjugation of Fluorescent Gold Nanoclusters Toward Biological Labeling Applications**, *ACS Nano*, 2009, 3, 395.
- [116] Y.L. Liu, K.L. Ai, X.L. Cheng, L.H. Huo, L.H. Lu, **Gold-Nanocluster-Based Fluorescent Sensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Cyanide in Water**, *Adv. Funct. Mater.*, 2010, 20, 951.
- [117] M.S. Bootharaju, T. Pradeep, **Investigation into the Reactivity of Unsupported and Supported Ag<sub>7</sub> and Ag<sub>8</sub> Clusters with Toxic Metal Ions**, *Langmuir*, 2011, 27, 8134.
- [118] Y.H. Lin, W.L. Tseng, **Ultrasensitive Sensing of Hg<sup>2+</sup> and CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> Based on the Fluorescence Quenching of Lysozyme Type VI-Stabilized Gold Nanoclusters**, *Anal. Chem.*, 2010, 82, 9194.
- [119] L. Shang, S.J. Dong, **Silver nanocluster-based fluorescent sensors for sensitive detection of Cu(II)**, *J. Mater. Chem.*, 2008, 18, 4636.
- [120] L. Shang, S. Dong, **Sensitive detection of cysteine based on fluorescent silver clusters**, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24, 1569.
- [121] B. Han, E. Wang, **Oligonucleotide-stabilized fluorescent silver nanoclusters for sensitive detection of biothiols in biological fluids**, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, 26, 2585.
- [122] Z. Huang, F. Pu, Y. Lin, J. Ren, X. Qu, **Modulating DNA-templated silver nanoclusters for fluorescence turn-on detection of thiol compounds**, *Chem. Commun.*, 2011, 47, 3487.
- [123] Y-C Shiang, C-C Huang, H-T Chang, **Gold nanodot-based luminescent sensor for the detection of hydrogen peroxide and glucose**, *Chem. Commun.*, 2009, 3437.
- [124] L. Jin, L. Shang, S. Guo, Y. Fang, D. Wen, L. Wang, J. Yin, S. Dong, **Biomolecule-stabilized Au nanoclusters as a fluorescence probe for sensitive detection of glucose**, *Biosens. Bioelectron.*, 2011, 26, 1965.
- [125] F. Wen, Y. Dong, L. Feng, S. Wang, S. Zhang, X. Zhang, **Horseradish peroxidase functionalized fluorescent gold nanoclusters for hydrogen peroxide sensing**, *Anal. Chem.*, 2011, 83, 1193.



- 
- [126] J. Sharma, H-C Yeh, H. Yoo, J.H. Werner, J.S. Martinez, **Silver nanocluster aptamers: *in situ* generation of intrinsically fluorescent recognition ligands for protein detection**, Chem. Commun., 2011, 47, 2294.
- [127] W. Guo, J. Yuan, Q. Dong, E. Wang, **Highly Sequence-Dependent Formation of Fluorescent Silver Nanoclusters in Hybridized DNA Duplexes for Single Nucleotide Mutation Identification**, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 932.
- [128] H-C Yeh, J. Sharma, J.J. Han, J.S. Martinez, J.H. Werner, **A DNA-silver nanocluster probe that fluoresces upon hybridization**, Nano Lett., 2010, 10, 3106.
- [129] G-Y Lan, W-Y Chen, H-T Chang, **One-pot synthesis of fluorescent oligonucleotide Ag nanoclusters for specific and sensitive detection of DNA**, Biosens. Bioelectron., 2011, 26, 2431.
- [130] M. Fernández-Suárez, A. Ting, **Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells**, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2008, 9, 929.
- [131] X. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, S. Weiss, **Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics**, Science, 2005, 307, 538.
- [132] N. Makarava, A. Parfenov, I.V. Baskakov, **Water-Soluble Hybrid Nanoclusters with Extra Bright and Photostable Emissions: A New Tool for Biological Imaging**, Biophys. J., 2005, 89, 572.
- [133] J. Yu, S. Choi, C.I. Richards, Y. Antoku, R.M. Dickson, **Live Cell Surface Labeling with Fluorescent Ag Nanocluster Conjugates**, Photochem. Photobiol., 2008, 84, 1435.
- [134] S. Choi, J. Yu, S.A. Patel, Y-L Tzeng, R.M. Dickson, **Tailoring Silver Nanodots for Intracellular Staining**, Photochem. Photobiol. Sci., 2011, 10, 109.
- [135] S-Y Lin, N-T Chen, S-P Sum, L-W Lo, C-S Yang, **Ligand exchanged photoluminescent gold quantum dots functionalized with leading peptides for nuclear targeting and intracellular imaging**, Chem. Commun., 2008, 4762.
- [136] S-Y Lin, N-T Chen, S-P Sun, J.C. Chang, Y-C Wang, C-S Yang, L-W Lo, **The Protease-Mediated Nucleus Shuttles of Subnanometer Gold Quantum Dots for Real-Time Monitoring of Apoptotic Cell Death**, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 8309.
- [137] Y. Antoku, J-I Hotta, H. Mizuno, R.M. Dickson, J. Hofkens, T. Vosch, **Transfection of living HeLa cells with fluorescent poly-cytosine encapsulated Ag nanoclusters**, Photochem. Photobiol. Sci., 2010, 9, 716.

- [138] Y-C Jao, M-K Chen, S-Y Lin, **Enhanced quantum yield of dendrimer-entrapped gold nanodots by a specific ion-pair association and microwave irradiation for bioimaging**, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 2626.
- [139] L. Shang, R.M. Dörlich, S. Brandholt, R. Schneider, V. Trouillet, M. Bruns, D. Gerthsen, G.U. Nienhaus, **Facile preparation of water-soluble fluorescent gold nanoclusters for cellular imaging applications**, *Nanoscale*, 2011, 3, 2009.
- [140] C. Zhou, M. Long, Y. Qin, X. Sun, J. Zheng, **Luminescent Gold Nanoparticles with Efficient Renal Clearance**, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, 50, 3168.
- [141] F. Zhang, E. Lees, F. Amin, P. Rivera-Gil, F. Yang, P. Mulvaney, W.J. Parak, **Polymer-Coated Nanoparticles: A Universal Tool for Biolabelling Experiments**, *Small*, 2011, 7, 3113.
- [142] F.A. Esteve-Turrillas, A. Abad-Fuentes, **Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes**, *Biosens. Bioelectron.*, 2013, 41, 12.
- [143] E. Ishikawa, **Chapter 8: Labeling of antibodies and antigens**, *Immunoassay* ISBN 0-12-214730-8, Academic Press, Inc., San Diego, California, 1996, 191.
- [144] J.R. Lakowicz, I. Gryczynski, Z. Gryczynski, K. Nowaczyk, C.J. Murphy, **Time-Resolved Spectral Observations of Cadmium Enriched Cadmium Sulfide Nanoparticles and the Effects of DNA Oligomer Binding**, *Anal. Biochem.*, 2000, 280, 128.
- [145] K. Hanaki, A. Momo, T. Oku, A. Komoto, S. Maenosono, Y. Yamaguchi, K. Yamamoto, **Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 302, 496.
- [146] H. Mattoussi, J.M. Mauro, E.R. Goldman, G.P. Anderson, V.C. Sundar, F.V. Mikulec, M.G. Bawendi, **Self-Assembly of CdSe-ZnS Quantum Dot Bioconjugates Using an Engineered Recombinant Protein**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 12142.
- [147] X.F. Hua, T.C. Liu, Y.C. Cao, B. Liu, H.Q. Wang, J.H. Wang, Z.L. Huang, Y.D. Zhao, **Characterization of the coupling of quantum dots and immunoglobulin antibodies**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 386, 1665.
- [148] M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **Simple bio-conjugation of polymer-coated quantum dots with antibodies for fluorescence-based immunoassays**, *Analyst*, 2008, 133, 444.

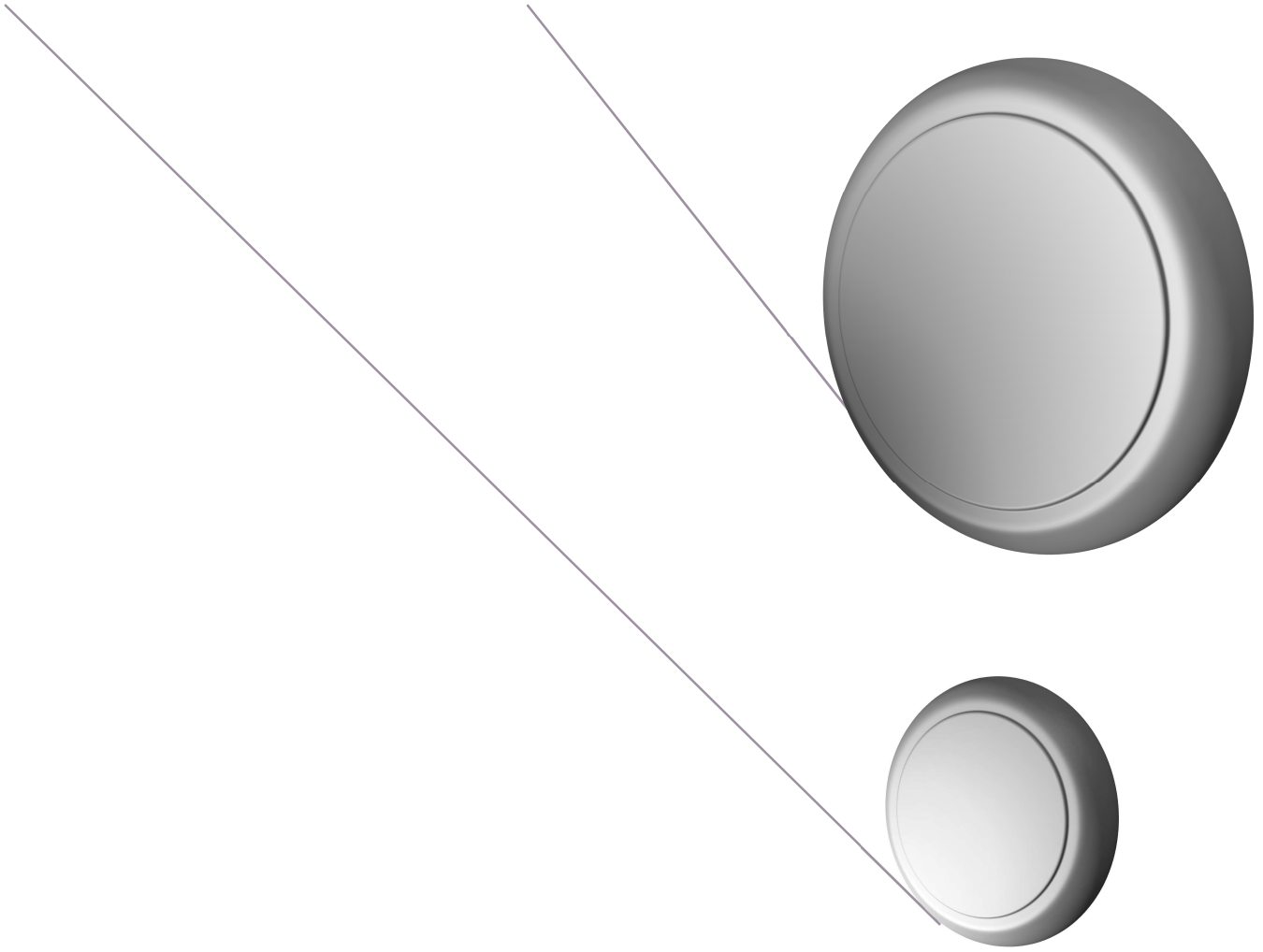
- 
- [149] Y. Xing, Q. Chaudry, C. Shen, K.Y. Kong, H.E. Zhau, L.W. Chung, J.A. Petros, R.M. O'Regan, M.V. Yezhelyev, J.W. Simons, M.D. Wang, S. Nie, **Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry**, *Nature Protocols*, 2007, 2, 1152.
- [150] W. Mahmoud, G. Rousserie, B. Reveil, T. Tabary, J.M. Millot, M. Artemyev, V.A. Oleinikov, J.H.M. Cohen, I. Nabiev, A. Sukhanova, **Advanced procedures for labeling of antibodies with quantum dots**, *Anal. Biochem.*, 2011, 416, 180.
- [151] E.R. Goldman, E.D. Balighian, H. Mattoussi, M.K. Kuno, J.M. Mauro, P.T. Tran, G.P. Anderson, **Avidin: A Natural Bridge for Quantum Dot-Antibody Conjugates**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 6378.
- [152] C.F. Peng, Z.K. Li, Y.Y. Zhu, W. Chen, Y. Yuan, L.Q. Liu, Q.S. Li, D.H. Xu, R.R. Qiao, L.B. Wang, S.F. Zhu, Z.Y. Jin, C.L. Xu, **Simultaneous and sensitive determination of multiplex chemical residues based on multicolor quantum dot probes**, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24, 3657.
- [153] E.R. Goldman, E.D. Balighian, M.K. Kuno, S. Labrenz, P.T. Tran, G.P. Anderson, J.M. Mauro, H. Mattoussi, **Luminescent Quantum Dot-Adaptor Protein-Antibody Conjugates for Use in Fluoroimmunoassays**, *Phys. Stat. Sol. B*, 2002, 229, 407.
- [154] E.R. Goldman, A.R. Clapp, G.P. Anderson, H.T. Uyeda, J.M. Mauro, I.L. Medintz, H. Mattoussi, **Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents**, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 684.
- [155] M.D. Kattke, E.J. Gao, K.E. Sapsford, L.D. Stephenson, A. Kumar, **FRET-Based Quantum Dot Immunoassay for Rapid and Sensitive Detection of *Aspergillus amstelodami***, *Sensors*, 2011, 11, 6396.
- [156] S. Pathak, M.C. Davidson, G.A. Silva, **Characterization of the Functional Binding Properties of Antibody Conjugated Quantum Dots**, *Nano Letters*, 2007, 7, 1839.
- [157] S.R. Mikkelsen, E. Cortón, **Chapter 5: Antibodies**, *Bioanalytical Chemistry* ISBN 0-471-54447-7, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2004, 86.
- [158] C.S. Feldkamp, J.L. Carey, **Chapter 2: Immune function and antibody structure**, *Immunoassay* ISBN 0-12-214730-8, Academic Press, Inc., San Diego, California, 1996, 5.
- [159] S.R. Mikkelsen, E. Cortón, **Chapter 6: Quantitative immunoassays with labels**, *Bioanalytical Chemistry* ISBN 0-471-54447-7, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2004, 99.

- [160] T. Chard, **Chapter 12: Radioimmunoassay**, Immunoassay ISBN 0-12-214730-8, Academic Press, Inc., San Diego, California, 1996, 269.
- [161] J.P. Gosling, **Chapter 13: Enzyme immunoassay**, Immunoassay ISBN 0-12-214730-8, Academic Press, Inc., San Diego, California, 1996, 287.
- [162] T.K. Christopoulos, E.P. Diamandis, **Chapter 14: Fluorescence Immunoassays**, Immunoassay ISBN 0-12-214730-8, Academic Press, Inc., San Diego, California, 1996, 309.
- [163] A. Gómez Hens, **Capítulo 9: Espectroscopía de emisión molecular**, Técnicas espectroscópicas en química analítica, Volumen I: Aspectos básicos y espectrometría molecular, ISBN 978-84-995893-2-9, Editorial Síntesis S.A., Madrid, España, 2012, 369.
- [164] J.R. Lakowicz, **Principles of fluorescence spectroscopy**, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
- [165] C. Giesen, L. Waentig, U. Panne, N. Jakubowski, **History of inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassays**, Spectrochimica Acta Part B, 2012, 76, 27.
- [166] T.K. Christopoulos, E.P. Diamandis, **Chapter 10: Immunoassay configurations**, Immunoassay ISBN 0-12-214730-8, Academic Press, Inc., San Diego, California, 1996, 227.
- [167] T.K. Christopoulos, E.P. Diamandis, **Chapter 1: Past, present and future of immunoassays**, Immunoassay ISBN 0-12-214730-8, Academic Press, Inc., San Diego, California, 1996, 1.
- [168] E.R. Goldman, A.R. Clapp, G.P. Anderson, H.T. Uyeda, J.M. Mauro, I.L. Medintz, H. Mattoussi, **Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents**, Anal. Chem., 2004, 76, 684.
- [169] S.R. Mikkelsen, E. Cortón, **Chapter 16: Validation of new bioanalytical methods**, Bioanalytical Chemistry ISBN 0-471-54447-7, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2004, 322.
- [170] H.E. Grotjan, B.A. Keel, **Chapter 4: Data interpretation and quality control**, Immunoassay ISBN 0-12-214730-8, Academic Press, Inc., San Diego, California, 1996, 51.
- [171] T.K. Christopoulos, E.P. Diamandis, **Chapter 3: Theory of immunoassays**, Immunoassay ISBN 0-12-214730-8, Academic Press, Inc., San Diego, California, 1996, 25.
- [172] X. Pei, B. Zhang, J. Tang, B. Liu, W. Lai, D. Tang, **Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review**, Anal. Chim. Acta, 2013, 758, 1.

- 
- [173] H. Mattoussi, I.L. Medintz, A.R. Clapp, E.R. Goldman, J.K. Jaiswal, S.M. Simon, J.M. Mauro, **Luminescent Quantum Dot-Bioconjugates in Immunoassays, FRET, Biosensing, and Imaging Applications**, *JALA*, 2004, 9, 28.
- [174] W.C.W. Chan, S.M. Nie, **Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection**, *Science*, 1998, 281, 2016.
- [175] E.R. Goldman, G.P. Anderson, P.T. Tran, H. Mattoussi, P.T. Charles, J.M. Mauro, **Conjugation of luminescent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays**, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 4, 841.
- [176] D.M. Willard, **Nanoparticles in bioanalytics**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 376, 284.
- [177] D. Geho, N. Lahar, P. Gurnani, M. Huebschman, P. Herrmann, V. Espina, A. Shi, J. Wulfschuhle, H. Garner, E. Petricoin, L.A. Liotta, K.P. Rosenblatt, **Pegylated, streptavidin-conjugated quantum dots are effective detection elements for reverse-phase protein microarrays**, *Bioconjug. Chem.*, 2005, 16, 559.
- [178] H.Z. Wang, H.Y. Wang, R.Q. Liang, K.C. Ruan, **Detection of Tumor Marker CA125 in Ovarian Carcinoma Using Quantum Dots**, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2004, 36, 681.
- [179] R. Bakalova, Z. Zhelev, H. Ohba, Y. Baba, **Quantum dot-based western blot technology for ultrasensitive detection of tracer proteins**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 9328.
- [180] M.A. Hahn, J.S. Tabb, T.D. Krauss, **Detection of Single Bacterial Pathogens with Semiconductor Quantum Dots**, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 4861.
- [181] E.R. Goldman, A.R. Clapp, G.P. Anderson, H.T. Uyeda, J.M. Mauro, I.L. Medintz, H. Mattoussi, **Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents**, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 684.
- [182] E.R. Goldman, I.L. Medintz, H. Mattoussi, **Luminescent quantum dots in immunoassays**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 384, 560.
- [183] R.C. Triulzi, M. Micic, S. Giordani, M. Serry, W-A Chiou, R.M. Leblanc, **Immunoassay based on the antibody-conjugated PAMAM-dendrimer-gold quantum dot complex**, *Chem. Commun.*, 2006, 5068.
- [184] C-C Huang, C-K Chiang, Z-H Lin, K-H Lee, H-T Chang, **Bioconjugated gold nanodots and nanoparticles for protein assays based on photoluminescence quenching**, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 1497.

[185] C-C Huang, C-T Chen, Y-C Shiang, Z-H Lin, H-T Chang, **Synthesis of Fluorescent Carbohydrate-Protected Au Nanodots for Detection of Concanavalin A and *Escherichia coli***, *Anal. Chem.*, 2009, 81, 875.

[186] Y-C Shiang, C-A Lin, C-C Huang, H-T Chang, **Protein A-conjugated luminescent gold nanodots as a label-free assay for immunoglobulin G in plasma**, *Analyst*, 2011, 136, 1177.



# **OBJETIVOS / OBJECTIVES**







## II. OBJETIVOS / OBJECTIVES

Como se ha puesto de manifiesto en la Introducción de esta Memoria, en la actualidad la Nanociencia, tanto su avance fundamental como su aplicación, está siendo de vital importancia para el desarrollo, crecimiento y mejora de la calidad de los servicios en numerosos y muy variados sectores como la electrónica, la industria textil, energías renovables, medicina, bio-análisis, control medio ambiental, etc. Así, como no podía ser de otra manera, la Química Analítica (ciencia al servicio de los problemas de la sociedad) encuentra una variedad de campos de actuación dentro de la Nanociencia, como son:

- El desarrollo de nuevas metodologías de análisis basadas en el empleo de nanomateriales.
- El desarrollo de estrategias para el control de la síntesis y caracterización de nuevos nanocristales.
- El desarrollo de nuevas vías para el marcaje de analitos de interés y su posterior caracterización y análisis.

También cabe remarcar la emergente y urgente demanda por parte del sector nanotecnológico de:

- El desarrollo de procesos sintéticos sencillos, fáciles de controlar y escalar y extensibles para su aplicación a la síntesis del mismo nanomaterial con distinto núcleo metálico, así como la búsqueda de nuevos nanomateriales multifuncionales.
- El desarrollo y mejora de las técnicas de caracterización de nanomateriales, haciendo que cada vez sean más eficaces y fiables, ya que una buena caracterización estructural y de composición es esencial a la hora de intentar comprender mejor las propiedades que presentan estos materiales y establecer relaciones estructura-propiedad.

Por otro lado, dentro de la Química Analítica, la rama del bioanálisis está experimentando un creciente desarrollo debido a la gran demanda de métodos de

análisis cada vez más sensibles, fiables y rápidos que nos aporten la mayor información posible. Así, una de las técnicas de bioanálisis más empleadas, en la que siempre se intenta innovar y que reúne dichas características, son las metodologías de análisis inmunoquímico. De hecho, en este campo, como ha quedado reflejado en la Introducción, la detección fotoluminiscente ofrece una serie de ventajas que confieren a los inmunoensayos una elevada sensibilidad. Por ello, el desarrollo de nuevas generaciones de fluoróforos (p.e. QDs y NCs) con propiedades que mejoren y/o solventen los problemas que presentan los fluoróforos convencionales (baja fotoestabilidad, cortos desplazamientos de Stokes, tiempos de vida media pequeños) es especialmente apreciado.

En este contexto el **objetivo general** que se plantea en la presente Tesis Doctoral es: **Desarrollo de nuevas estrategias sintéticas, caracterización y aplicación de nanomateriales luminiscentes como marcadores en inmunoensayos cuantitativos.** Metodológicamente este propósito global se persiguió a través de los siguientes objetivos específicos:

1. *Desarrollo de inmunoensayos fluorescentes cuantitativos basados en CdSe/ZnS quantum dots.*

Desde las primeras publicaciones sobre las propiedades y síntesis de QDs, hace ya dos décadas, muchos han sido los avances realizados en este campo tanto en estudios fundamentales como en las posibles aplicaciones de estos nanomateriales. Así, a lo largo de estas décadas han sido propuestos diferentes esquemas de bioensayos en los que se utilizan QDs como marcadores aprovechando las especiales propiedades optoelectrónicas de estos nanocristales. Hasta el comienzo de la presente Tesis Doctoral en la literatura se podían encontrar diversos formatos de bioensayos e inmunoensayos basados en QDs, tales como sensores directos de (bio)moléculas basados en el enaltecimiento/apagado de la fluorescencia del QD; ensayos de transferencia de energía (FRET o BRET); inmunosensores electroquímicos; ensayos de *western blotting*, etc. Sin embargo, existían muy pocos trabajos en los que se empleasen los QDs como marcas directas para el desarrollo de inmunoensayos cuantitativos. Por este motivo en el primer

capítulo de la presente Tesis Doctoral se intentará llevar a cabo el desarrollo de un formato de inmunoensayo fluorescente basado en QDs. Para ello, se escogió como analito modelo la Progesterona, una hormona cuyos niveles en leche de ganado bovino pueden ser empleados para determinar el momento fértil de la vaca y optimizar los tiempos de fecundación de la misma.

Por otro lado, con el fin de demostrar que el formato de inmunoensayo desarrollado es una plataforma general de análisis aplicable a cualquier analito de interés, se aplicará dicho esquema de inmunoensayo a la determinación de Melamina en leche fórmula para bebés. Esta sustancia es un adulterante empleado para incrementar de forma aparente el contenido de proteína de los alimentos. De este modo, quedará puesto de manifiesto la posibilidad de realizar ensayos multiplexados (análisis de varios analitos a la vez) con la plataforma general de inmunoensayo basado en QDs aquí desarrollado.

## *2. Evaluación del empleo de CdSe/ZnS quantum dots como marcas elementales en inmunoanálisis.*

Teniendo en cuenta el carácter metálico de estas nanopartículas junto con la necesidad de desarrollar ensayos cada vez más sensibles y fiables para la determinación de biomoléculas a bajos niveles de concentración, en este segundo objetivo parcial se explorará el uso de los QDs como marcas elementales en inmunoensayos empleando como detector el ICP-MS. Este detector es ampliamente empleado en la identificación y cuantificación de elementos traza (endógenos o exógenos o posibles contaminantes) en una gran variedad de campos de aplicación como el medioambiental, el geológico, el clínico o el industrial. Sin embargo, no ha sido hasta esta última década cuando se ha iniciado la investigación en el empleo del ICP-MS como detector en inmunoensayos en la creencia de obtener unas poderosas ventajas de la unión de estas dos potentes técnicas de análisis.

Así, con este objetivo se pretende poner de manifiesto por un lado el potencial de los QDs como marcas elementales y por otro las ventajas que el ICP-MS puede aportar

como detector de inmunoensayos. Para ello, utilizaremos el inmunoensayo previamente desarrollado para la determinación de progesterona en leche de ganado vacuno.

3. *Síntesis y caracterización de una nueva generación de fluoróforos nanoestructurados: Nanoclusters metálicos de plata.*

Como se ha hecho constar en la Introducción, actualmente existe una gran demanda tanto de nuevas estrategias sintéticas para la producción de nuevos nanomateriales con propiedades únicas como del desarrollo de nuevas marcas que mejoren las características analíticas de los inmunoensayos y/o técnicas de bioanálisis *in vivo* (p.e. *imaging*). De este modo, en un intento de aunar estos retos, en este tercer objetivo nos planteamos la investigación de la síntesis y caracterización de nanoclusters de plata. Los nanoclusters son unos nanomateriales emergidos recientemente y que presentan un futuro muy prometedor como marcadores en diversas técnicas bioanalíticas y en análisis *in vivo*. Sin embargo, dada su incipiente irrupción en el mundo científico todavía se requieren, y son ampliamente demandados, estudios fundamentales que establezcan relaciones estructura-propiedad-aplicación.

According to the facts exposed in the Introduction section of this Ph.D. Thesis, it can be said that nowadays Nanoscience (both its progress and its applicability) has a crucial importance in the development, growth and improvement of the quality of a broad variety of sectors including the electronic field, the renewable energies, the textile industry, the medicine, the bioanalysis or the environmental control, among others. Thus, as it cannot be in other way, the Analytical Chemistry (science that tries to solve or search for solutions of society problems) find in the nanoscience a great and challenging field to satisfy emerging and urgently demands such as:

- The development of new analytical methodologies based on the employment of nanomaterials.
- The development of original strategies for controlling the synthesis and characterization of the nanocrystals.
- The development of novel routes for the labeling of (bio)molecules with this nanostructures and their subsequent analysis.

At the same time, the nanoscience field makes some questions that analytical chemistry can solve. For example:

- The development of simpler, feasible, scalable synthetic processes which can be applied to for the synthesis of the same nanomaterial with different core composition.
- A good structural and compositional characterization to better understanding of the optoelectronic properties of these materials and the relationship between structure-property-function. So, the development and improvement of the nanomaterial characterization techniques, making them more efficient and reliable, are greatly demanded.

On the other hand, inside the Analytical Chemistry field, the bioanalytical area is experiencing an increasing development due to the high demand of more sensitivity, reliability and faster analytical methodologies giving us as much information as possible.

Thus, one of the bioanalytical strategies more used, in which always the researchers are innovating and looking for improvements, are the immunochemistry techniques. As it was deeper revised in the Introduction, these techniques meet all the above mentioned features and this fact makes that those techniques are in continuous growing. Here, the photoluminescence have shown its great potential as detection way offering several advantages to improve the sensitivity of these methodologies. In this context, the development of new generation of fluorophores (e.g. QDs and NCs) with properties that improve and/or overcome some of the limitations that present the conventional ones (low photostability, short Stokes shifts, small life-times) are specially appreciated.

Having in mind all the above facts, the main objective of this Ph.D. Thesis is **the development of new synthetic strategies, characterization and application of luminescent metal nanoparticles as labels for quantitative immunoassays**. This global objective is going to be pursued through the following specific objectives:

1. *Development of quantitative fluorescent immunoassays based on CdSe/ZnS quantum dots.*

From the first publications about the synthesis and properties of QDs two decades ago, many advances have been performed in this field, both fundamental studies and investigation of the possible applications of these nanomaterials. Thus, different bioassay schemes based on QDs have been proposed along these two decades taking advance of the special properties of these nanocrystals. Until the beginning of this Ph.D. Thesis several bioassay formats could be found in the literature based on QDs such as direct sensors for the determination of (bio)molecules exploiting the enhancement/quenching of the QDs luminescence; energy transfer assays (FRET or BRET); electrochemical immunosensors; western blotting assays; etc. However, few works using QDs as labels for the development of quantitative immunoassays had been proposed so far. For this reason, in the first chapter of the present Ph.D. Thesis it will be carried out the development of a fluorescent immunoassay based on QDs. For such purpose, Progesterone was selected as model analyte. Progesterone is a hormone which milk levels could be correlated with the estrus state of the cow optimizing the time of insemination.

On the other hand, with the aim to prove that the format immunoassay developed is a general platform of analysis, it will be applied for the determination of Melamine in infant formula milk. Melamine is an adulterant used for increasing the apparent protein content of food. Therefore, the possibility of carrying out multiplexing assay with the proposed QD-immunoassay will be highlighted.

2. *Evaluation of the use of CdSe/ZnS quantum dots as elemental label in immunoanalysis.*

Taking into account the metallic nature of the QDs along with the need to develop bioassays more sensitive and reliable for the determination of biomolecules at very low concentration levels, in this second partial objective it will be explored the use of QDs as elemental labels in immunoassays using the ICP-MS as detector. This detector is widely commonly used for the identification and quantification of trace elements (endogenous, exogenous or contaminants) in a broad variety of application areas such as environmental, geological, clinical or industrial fields. However, the investigation of the use of ICP-MS as detector for immunoassays has not begun till this last decade. It would be expected that the combination of these two powerful analytical techniques offer very promising advantages in the immunochemical analysis.

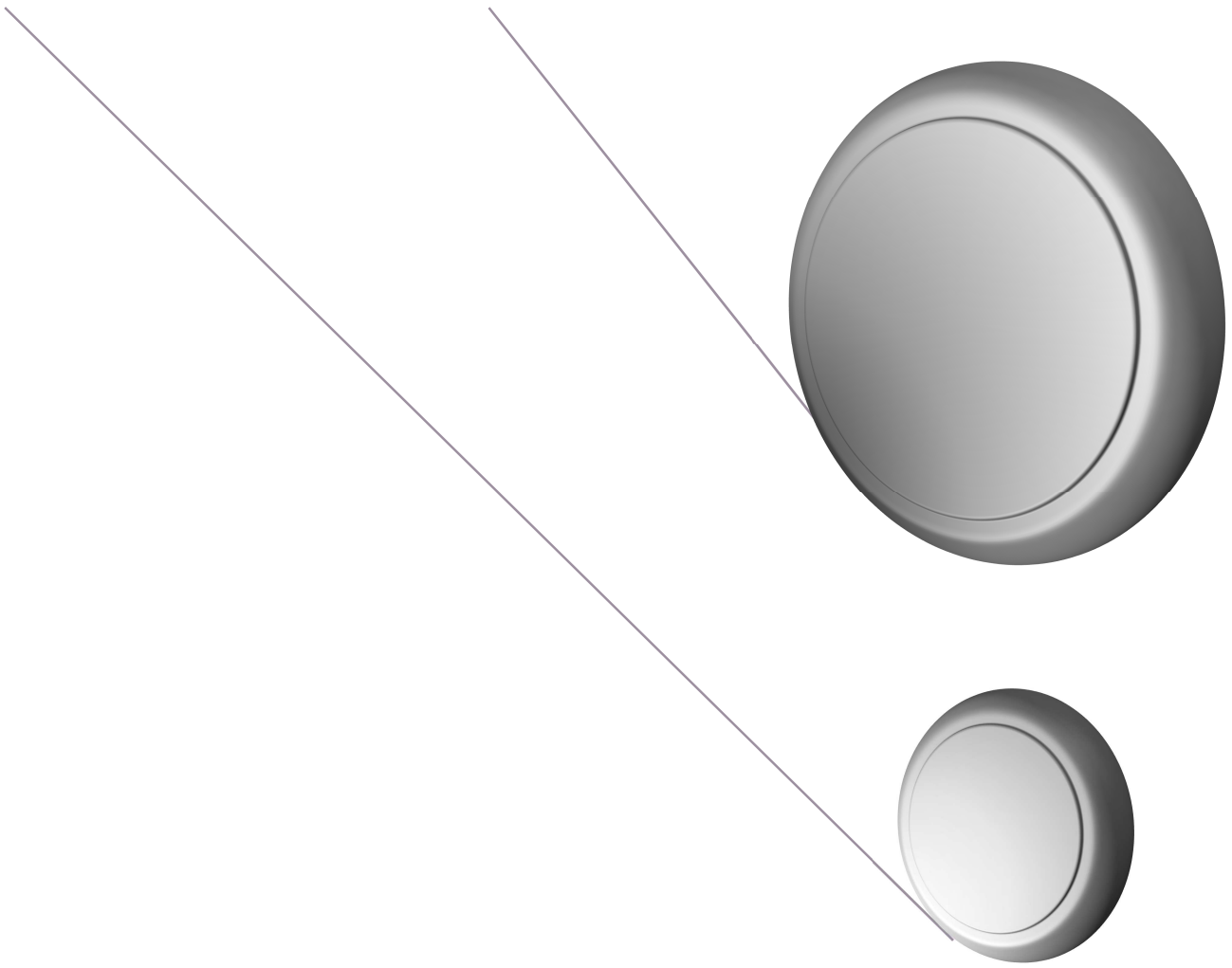
Thus, with this objective, it aims to be highlighted both the potential of QDs as elemental labels and the benefits that the ICP-MS can provide as detector for immunoassays. For such purpose the previous developed immunoassay will be used for the determination of progesterone in whole fresh cow milk.

3. *Synthesis and characterization of a new generation of nanostructured fluorophores: Silver nanoclusters.*

As it was shown in the Introduction, a great demand exists of both new synthetic strategies for the production of novel nanomaterials with unique properties and the development of new labels which improve the analytical characteristics of the immunoassays and/or *in vivo* bioanalytical techniques (e.g. imaging). In this way, in a try

to join both challenges, the investigation of the synthesis and characterization of silver nanoclusters will be addressed in the third partial objective of this Ph.D. Thesis. NCs are nanomaterials recently emerged that have a very promising future as labels for bioassays and *in vivo* analysis. Nevertheless, due to their incipient arrival to the scientific world, fundamental studies to establish relationships between structure-property-application are required and urgently demanded.





# EXPERIMENTAL





### III. EXPERIMENTAL

#### III.1. Materiales, reactivos y muestras

##### *III.1.1. Material empleado en la síntesis de CdSe/ZnS QDs*

- ⊙ Cámara hinchable de polietileno flexible para asegurar una atmósfera controlada y aislada de un gas inerte, en nuestro caso Argón, (Sigma Aldrich).
- ⊙ Manta calefactora modelo Fibroman-N (J.P. Selecta) acoplada a un sistema de control digital de temperatura modelo Electemp (J.P. Selecta).
- ⊙ Rotámetro para controlar el flujo de Argón (Serv`Instrumentation, Irigny, Francia).
- ⊙ Agitador magnético modelo RCT basic (Kika werke).

##### *III.1.2. Material especial para la síntesis de ligandos PEG funcionalizados*

- ⊙ Matraces de 1 y 2 bocas.
- ⊙ Embudos, embudo de adición y embudo de extracción.
- ⊙ Cabezas de destilación.
- ⊙ Tubos refrigerantes.
- ⊙ Placa calefactora con agitación magnética, imanes.
- ⊙ Columna cromatográfica preparativa.
- ⊙ Placas de cromatografía de capa fina (TLC).
- ⊙ Papel de filtro.
- ⊙ Cámara de yodo para teñir las placas TLC.

- ⊙ Línea de vacío y de nitrógeno.
- ⊙ Jeringas y agujas.
- ⊙ Tubos de RMN.

### *III.1.3. Material general*

- ⊙ Celda de cuarzo convencional Hellma, modelo 101-QS, con paso óptico de 10 mm.
- ⊙ Cubeta de fluorescencia de cuarzo SUPRASIL Ultra-micro de Hellma, modelo 105.254-QS, con paso óptico de 3 mm y volumen de cámara de 45  $\mu\text{L}$ .
- ⊙ Celda de flujo de fluorescencia Cary Varian, modelo 583.2.2-F/Q/10/Z20, con paso óptico de 10 mm y un volumen de cámara de 40  $\mu\text{L}$ .
- ⊙ Lámpara UV con longitud de onda de emisión de 365 nm y 6 W de potencia (Vilbert Lourmat).
- ⊙ Filtros de ultrafiltración Amicon Ultra de 100 kDa de tamaño de poro de membrana (Millipore).
- ⊙ Micropipetas de volúmenes ajustables comprendidos entre 0.5  $\mu\text{L}$  y 1 mL (Labmate).
- ⊙ Micropipeta multicanal de volumen ajustable comprendido entre 20-300  $\mu\text{L}$  (Labmate).
- ⊙ Placa blanca de poliestireno para microtitración de 96 pocillos no esterilizada (Varian).
- ⊙ Placa transparente de poliestireno para microtitración de 96 pocillos no esterilizada (Sterilin Limited, U.K.).
- ⊙ Jeringa de inyección de 250  $\mu\text{L}$  (Hamilton).

- ⊗ Tubos estériles de polietileno de baja densidad (LPDE) de 10 mL (Deltalab, Barcelona, España).
- ⊗ Botes de polietileno de baja densidad (LPDE) de 20 mL (Brand, Wertheim, Alemania).
- ⊗ Viales de vidrio de 5, 10 y 50 mL.
- ⊗ Tubos Eppendorf con volúmenes de 0,5 y 1,5 mL.
- ⊗ Material volumétrico de calidad contrastada.

#### III.1.4. Reactivos y muestras

Los reactivos empleados a lo largo de la presente Tesis Doctoral se recogen en la Tabla 4. Cabe mencionar que todos ellos han sido utilizados sin realizar ningún tipo de purificación previa. Las disoluciones acuosas se han preparado disolviendo la cantidad adecuada de reactivo sólido en agua ultrapura desionizada (Milli-Q, cuya resistividad es 18,2 MΩ/cm).

**Tabla 4.** Lista de reactivos empleados a lo largo de esta Tesis Doctoral agrupados según la aplicación donde se han utilizado.

Aplicación	Reactivo	Pureza	Casa comercial	Referencia
<b>Síntesis de QDs</b>				
	Selenio	99,99%	Aldrich	229865
	Oxido de cadmio	99,99%	Aldrich	202894
	Hexametildisilatiano / Bis(trimetilsilil)sulfuro	Grado síntesis	Aldrich	283134
	Dietil zinc 1,0 M en hexano	---	Aldrich	296112
	Trioctilfosfina (TOP)	90%	Aldrich	117854
	Oxido de trioctilfosfina (TOPO)	99%	Aldrich	223301
	Ácido hexilfosfónico (HPA)	---	Alfa Aesar	44121
	Argón	99,9999%	Air Liquid	---

## EXPERIMENTAL

	Metanol	Grado HPLC	VWR Prolabo	20864.320
	Cloroformo anhidro	≥ 99%	Sigma	372978
<b>Polímero anfífilico</b>				
	Anhídrido poli(isobutilen-alt-maleico)	12-200 mesh (85%)	Aldrich	531278
	Dodecilamina	98%	Aldrich	D222208
	Bis-hexametilentriamina	95%	Fluka	14506
	Tetrahidrofurano anhidro	≥ 99,9%	Sigma	401757
<b>Ligandos PEG funcionalizados</b>				
	Polietilenglicol MW: 600	---	Sigma	202401
	Polietilenglicol metil éter MW: 750	---	Sigma	202495
	Trietilamina	≥ 99%	Sigma	T0886
	Cloruro de metanosulfonilo	≥ 99,7%	Sigma	471259
	Trifenilfosfina	≥ 98,5%	Sigma	93090
	Ácido lipoico	≥ 99%	Sigma	T5625
	4-( <i>N,N</i> -dimetilamino) piridina (DMAP)	≥ 99%	Sigma	522805
	<i>N,N</i> -diciclohexilcarbodiimida (DCC)	99%	Sigma	D80002
	Azida de sodio	99%	Alfa Aesar	14314
	Anhídrido succínico	≥ 99%	Sigma	239690
	Bicarbonato de sodio	99,7-100,3%	Sigma	S6014
	Hidróxido de sodio	> 97%	Sigma	221465
	Hidróxido de potasio	≥ 85%	Sigma	221473
	Cloruro de sodio	≥ 99,5%	Sigma	S7653
	Sulfato de sodio	≥ 99%	Sigma	239313
	Sulfato de magnesio	≥ 99,5%	Sigma	M7506

<b>Nanoclústers de Plata</b>				
	Nitrato de plata	99,9+%	Alfa Aesar	11414
	Borohidruro de sodio	99,99%	Sigma	480886
<b>Reactivos inmunológicos</b>				
	Progesterona	>99%	Sigma	P0130
	Melamina	Analytical Standard	Fluka	52549
	Conjugado de progesterona-BSA	---	AbD Serotec	7720-2104
	Imject EDC BSA spin Kit	---	Thermo Scientific	77672
	Anticuerpo monoclonal anti-progesterona de ratón (1 mg/mL)	Purificado por afinidad	AbD Serotec	7720-1430
	Anticuerpo policlonal anti-melamina de conejo	100 µg	Biorbyt	orb11037
	Anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con HRP	---	Sigma	A9044
	Anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con HRP	---	Sigma	A9169
	TMB substrate Kit	---	Thermo Scientific	34021
	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil-carbodiimida hidroclicorada (EDC)	≥ 989%	Fluka	03450
	Albumina de suero bovino (BSA)	---	Merck	12657
	Caseína	---	Sigma	C7078
	Reactivo de Bradford	---	Sigma	B6916
	Tween20	---	Sigma	P9416

## EXPERIMENTAL

<b>Disoluciones reguladoras</b>				
Disolución reguladora de fosfatos (PBS)	Cloruro de sodio	---	Merk	1.06404
	Cloruro de potasio	---	Panreac	141494
	Hidrogeno fosfato de sodio	---	Merck	119753
	Dihidrogeno fosfato de potasio	---	Merck	A215573015
Disolución reguladora de boratos (SBB)	Ácido bórico	---	Merck	A015.4260
	Cloruro de sodio	---	Merk	1.06404
	Hidróxido de sodio	---	Merck	B046639800 4
<b>Disolventes Orgánicos</b>				
	Cloroformo	99,5%	Sigma	C2432
	Diclorometano	99,5%	Sigma	443484
	Tetrahidrofurano	99,9%	Sigma	401757
	Acetato de etilo	99,9%	Sigma	650528
	Éter	99,9%	Sigma	309966
	Metanol	Grado HPLC	VWR Prolabo	20864.320
	Etanol	99,5%	VWR Prolabo	20820.293
	Diclorometano deuterado	99,8%	Merck	S33734
<b>Patrones ICP-MS</b>				
	Cadmio (CdII)	CertiPUR	Merck	170309
	Azufre (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	CertiPUR	Merck	1.70355.010 0
<b>Muestras reales</b>				
Leche de ganado bovino				
Leche fórmula para bebés: MILTE, Nestlé y Nutribén				



### III.2. Instrumentación

**Espectrofotómetro Vis-UV** Perkin Elmer modelo Lambda 20, provisto de ordenador con programa de control y tratamiento de datos bajo entorno Windows (W-Winlab).

**Espectrofotómetro Vis-UV** modelo Genesys 10S UV/Vis Thermo Scientific.

**Espectrómetro de Luminiscencia** Varian Cary Eclipse (Varian Ibérica, Madrid, España) equipado con lámpara de descarga de xenón (potencia de pico equivalente a 75 kW), monocromadores Czerny-Turner y tubo fotomultiplicador modelo R-928. El programa de control y tratamiento de datos opera bajo entorno Windows.

**Espectrómetro de Luminiscencia** Perkin Elmer Modelo LS-50B, provisto de módulo de lector de placas y ordenador con programa de control y tratamiento de datos bajo Windows denominado FL-Winlab.

**Equipo ICP-MS cuadrupolo con celda colisión/reacción** Agilent 7700x. El modelo 7700x salió al mercado en 2011 sustituyendo al modelo anterior 7500ce y mejorándolo en diversos aspectos. Este equipo está compuesto por un nebulizador de tipo concéntrico (Meinhard), una cámara de nebulización de doble paso tipo Scott refrigerada por efecto Peltier a una temperatura constante de 2°C. La antorcha (tipo Fassel) se compone de tres tubos concéntricos de cuarzo, el central para el flujo de Ar portador (o nebulizador), el intermedio para el Ar auxiliar y el exterior para el Ar refrigerante. La interfase está constituida por los conos de extracción (*sampler*) y de muestreo (*skimmer*). Ambos conos son de níquel y tienen un diámetro de 1 mm y 0.4 mm respectivamente. Entre el sistema de lentes y el analizador de masas se encuentra la celda de colisión/reacción. El analizador de masas utilizado es de tipo cuadrupolo con un detector tipo multiplicador de electrones secundarios (SEM), que funciona tanto en modo digital como analógico dependiendo de la intensidad de los iones. Las novedades más importantes que presenta el nuevo modelo 7700x son:

- Es un instrumento más compacto, siendo un 30% más pequeño que el anterior (73cm x 62cm x 59,5cm).
- Equipado de serie con el sistema “*high matrix introduction*” (HMI), que aumenta 10 veces la tolerancia a la matriz y mejora la robustez del plasma eliminando el efecto de supresión de la matriz.
- Nuevo generador de radiofrecuencia que posee un ajuste instantáneo de la frecuencia que aumenta la tolerancia a cambios de matriz; es posible cambiar de agua pura a disolventes orgánicos volátiles sin perturbar el plasma.
- Celda de colisión/reacción de tercera generación que permite eliminar las interferencias espectrales de una manera más eficaz y más fiable, generalmente empleando He como gas de colisión.
- Cuadrupolo hiperbólico lineal como analizador de masas, que consigue una mejor separación de picos y sensibilidad a la abundancia, sin necesidad de personalizar los parámetros del cuadrupolo para picos adyacentes.

**Equipo ICP-MS de doble enfoque o alta resolución** Thermo Electron ELEMENT2 (Thermo Electron, Bremen, Alemania). Este equipo está provisto de un nebulizador tipo cross-flow, una cámara de nebulización de doble paso tipo Scott sin refrigeración y una antorcha de cuarzo tipo Fassel, con un canal central de 1 mm de diámetro interno. Los conos *sampler* y *skimmer* son de níquel, con un diámetro de 1 mm y 0,7 mm, respectivamente. El equipo presenta un sistema analizador de doble enfoque: un sector magnético y uno electrostático dispuestos conforme a una geometría Nier-Johnson inversa (el enfoque magnético se realiza previo al electrostático) y permite trabajar en tres tipos de resolución: baja (>300), media (>4000; la escogida en nuestro caso) y alta (>10000). El detector utilizado por este equipo es un SEM que opera de forma dual (analógico y pulsos). Los parámetros experimentales del ICP-MS se optimizaron diariamente mediante una disolución de 10 µg L<sup>-1</sup> de Li, Y y Tl (Merck, Darmstadt, Alemania), realizándose también diariamente la calibración de masas

a baja, media y alta resolución. Con objeto de obtener la máxima sensibilidad para los elementos analito en nuestros experimentos y realizar una correcta eliminación de las interferencias poliatómicas centrando correctamente la ventana a la masa del isótopo monitorizado, se nebuliza (previo al análisis) una disolución de 10 ng L<sup>-1</sup> de Cd y de Rh, 25 ng L<sup>-1</sup> de Zn y 100 ng L<sup>-1</sup> de S y Se en HNO<sub>3</sub> al 2%.

**Equipo MALDI-TOF-MS.** Espectrómetro de masas de Tiempo de Vuelo con Desorción / Ionización Láser Asistida por la Matriz modelo Voyager-DE™ STR Biospectrometry™ Workstation de Applied Biosystems, (Langen, Alemania), equipado con un analizador de tiempo de vuelo y un láser pulsado de nitrógeno (337 nm). Este equipo ha sido empleado en la caracterización de conjugados hapteno-BSA trabajando en modo lineal positivo.

**Equipo de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).** La espectroscopía de RMN es una técnica ampliamente utilizada para elucidar la estructura de las moléculas químicas, tanto en compuestos orgánicos como inorgánicos o biomoléculas. Está basada en las propiedades magnéticas de ciertos núcleos atómicos presentes en las moléculas objeto de estudio. Los núcleos activos en RMN más sensibles y utilizados son <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P, <sup>19</sup>F, presentes en la mayoría de las moléculas tanto de origen sintético como natural. Cuando estos núcleos se irradian con pulsos de radiofrecuencia dentro de un campo magnético estable emiten una frecuencia como respuesta a la excitación recibida. El análisis de estas frecuencias de resonancia proporciona información sobre los núcleos presentes en la molécula y la relación que existe entre ellos, pudiendo determinarse el número de átomos, el tipo de enlaces que los unen, su disposición espacial, y así poder finalmente extraer su estructura química. El espectrómetro de resonancia magnética nuclear empleado a lo largo de los estudios realizados en esta Tesis Doctoral fue un espectrómetro Bruker SpectroSpin trabajando a 600 MHz.

**Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)** Agilent modelo 1100 series (Agilent Technologies) que consta de una bomba cuaternaria, un

desgasificador, un automuestreador, un sistema de termostización de columnas y un detector diode array.

**Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución** compuesto por dos bombas de alta presión equipadas con una cámara presurizada a baja presión (Shimadzu LC-10AD, Shimadzu corporation, Kioto, Japón) y una válvula de inyección Rheodyne modelo 7725 (Coati, CA, USA), con un bucle de inyección de 50  $\mu$ L de capacidad. Todas las conexiones se realizaron utilizando tubos capilares de peek de 0,25 mm de diámetro interno de la casa comercial Tecknocroma. Este equipo se acopló directamente “on-line” a un ICP-MS de doble enfoque (Element2) y al Espectrómetro de Fluorescencia Cary Eclipse para llevar a cabo el control de la purificación y caracterización de bioconjugados (QD-anticuerpo).

**Equipo de fraccionamiento en flujo con campo de flujo asimétrico** (AF2000 Postnova Analytics, Germany) conectado en línea a cuatro detectores: detector de luz dispersada multiángulo (MALS), UV-Vis, fluorímetro y analizador de masas con fuente de plasma ICP. Se utilizó un canal de separación de dimensiones: 29 cm de largo y 500  $\mu$ m de espesor. La membrana empleada para la separación es de celulosa regenerada con un tamaño de corte de 10 kDa. Todas las disoluciones empleadas como fases móviles en este equipo fueron filtradas previamente con filtros de 0,1  $\mu$ m (Millipore).

**Microscopio de Transmisión Electrónica** MET JEOL-2000 EX-II de 200 kV kilovoltaje máximo. Poder de resolución 3,4 Å entre líneas. Sistema fotográfico: cámara de placas 6,5x9,5 y película 35 mm, e imagen digitalizada con salida a PC (sistema digital micrograph GATAN).

**Microscopio de Transmisión Electrónica** JEOL JEM-2100F que alcanza una resolución de 2,3 Å entre puntos y 1,0 Å entre líneas. Está equipado con una cámara CCD de alta resolución (GATAN), un microanalizador de energía dispersada de rayos-x (EDX) que permite la detección y cuantificación de los elementos presentes en la muestra y una unidad de exploración de microscopía

electrónica de transmisión con detectores de campo brillante (BF) y de campo oscuro (DF) para obtener mapas de composición de las muestras.

**Lector de placas Vis-UV ELx800** Bio-Tek.

**Ultracentrifuga** Biofuge Stratus (Heraeus, Hanau, Alemania).

**Evaporador Rotatorio de Presión Reducida** (Rotavapor) Laborota 4000 (Heidolph) dotado de un controlador de vacío Vacuubrand CVC2 (Brandtech).

**pHmetro** Crison modelo micropH 2000 (Crisol instruments S.A., Barcelona, España).

**Balanza analítica** Precisa 180A con precisión de hasta  $\pm 0,01$  mg (Precisa, Dietikon, Suiza).

**Granatario** SCALTEC con precisión de hasta  $\pm 0,01$  g.

**Estufa de laboratorio** Memmert modelo 100.

**Baño Ultrasonidos** (J.P. Selecta, Barcelona, España).

**Sistema de generación de agua Milli-Q** Advantage A10 (Millipore Co, Bedford, MA, USA) alimentado con agua destilada procedente del equipo ELIX 3 (Millipore).

### III.3. Procedimientos experimentales

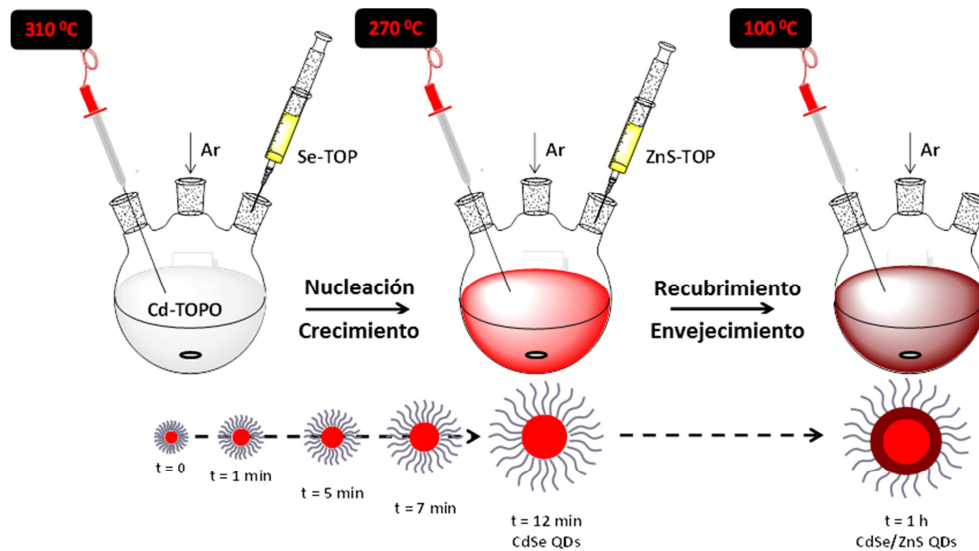
#### III.3.1. Síntesis de CdSe/ZnS quantum dots

Los QDs de CdSe/ZnS, utilizados en el marcaje de biomoléculas para el desarrollo de nuevos inmunoensayos fluorescentes, se sintetizaron siguiendo un procedimiento ya optimizado en nuestro laboratorio [1] basado en una ruta de síntesis organometálica descrita por el grupo del Prof. Peng [2]. A continuación se detalla el procedimiento seguido para llevar a cabo dicha síntesis.

En una campana extractora de humos se coloca la cámara hinchable en la que introducimos el granatario y todos los reactivos y materiales necesarios para pesar y preparar las disoluciones necesarias para la síntesis. Previamente, en esta bolsa se asegura una atmósfera inerte de Ar desalojando varias veces el aire que pudiera contener en su interior haciendo pasar a su través, de manera controlada y continua, un flujo de aproximadamente 100 mL/min de una corriente de argón. Por otro lado, en la balanza analítica se pesan en un matraz de tres bocas donde posteriormente se realizará la síntesis de las nanopartículas 0,1575 g (1,23 mmol) de CdO y en un vial con septum se introducen 0,1275 g (1,63 mmol) de Se en polvo. Tras la pesada tanto el matraz como el vial se introducen en la cámara hinchable tras haber sido purgados con Ar.

A continuación, dentro ya de la cámara, se pesaron en el granatario 0,6 g de HPA y 17,5 g de TOPO directamente en el matraz de tres bocas. En el vial que contiene el Se se añaden 7,5 mL de TOP con jeringa de plástico para generar la disolución de seleniuro de trioctilfosfina (SeTOP), esta disolución se tiene que sonicar para facilitar la disolución del Se en el TOP. En otro vial de 15 mL con septum se prepara la disolución de sulfuro de zinc (Zn/S/TOP), para ello mezclamos 0,26 mL de (TMS)<sub>2</sub>S con micropipeta, 2,25 mL de TOP; 1,75 mL de Et<sub>2</sub>Zn y 8 mL de TOP todos ellos añadidos con jeringa de plástico y siguiendo el orden de adición indicado.

Una vez preparadas todas las disoluciones y hechas las pesadas de los reactivos precursores se comienza la síntesis de las nanopartículas, empleando para ello un montaje experimental que consta de un agitador magnético, una manta calefactora con sonda de control de temperatura y un rotámetro para controlar el flujo de Ar (20 mL/min) que entra de forma continua en el matraz para asegurar la ausencia de oxígeno. Un esquema del proceso de síntesis que se lleva a cabo aparece reflejado en la Figura 28.



**Figura 28.** Esquema del proceso general de síntesis de QDs de CdSe/ZnS a altas temperaturas.

Así, el matraz de tres bocas cerradas con septa de goma, que contiene la mezcla de CdO, HPA y TOPO, se coloca en la manta calefactora. Por la boca central se le inserta (a través del septum) una aguja por la que circula un flujo constante de Ar, por la boca de la izquierda se introduce una sonda de temperatura, mientras que la boca de la derecha se emplea para la adición secuencial de las disoluciones empleadas durante la reacción de formación de las nanopartículas. Inicialmente se calienta el matraz a 310 °C, para conseguir la disolución completa de la mezcla. Cuando se alcanza dicha temperatura y la disolución está incolora se añade lo más rápidamente posible mediante una jeringa de vidrio, 6 mL de la disolución SeTOP. La adición ha de ser rápida para favorecer la nucleación homogénea de las partículas. Al añadir la disolución de SeTOP la temperatura desciende a 270 °C. Posteriormente, durante el proceso de crecimiento de las nanopartículas, la temperatura se baja hasta 250 °C observándose la aparición progresiva de una coloración rojiza en la disolución. Dependiendo del tamaño del núcleo deseado se mantiene la reacción a esta temperatura durante un tiempo variable de 10-15 min observando una evolución de la coloración hacia tonalidades más oscuras, llegando a presentar un tono granate oscuro al cabo de unos 15 min. Para detener la etapa de crecimiento de la nanopartícula se baja la temperatura a 230 °C y en ese momento se añade gota a gota 7,5 mL de la disolución de Zn/S/TOP. Esta disolución se adiciona lentamente sobre la mezcla de reacción para evitar la formación de núcleos de ZnS, favoreciéndose por otro lado el recubrimiento de las nanopartículas de CdSe ya

formadas. Una vez terminada la adición se baja la temperatura a 100 °C manteniéndose durante 1 h (proceso de “envejecimiento” de las nanopartículas). Transcurrido este tiempo se deja enfriar el matraz a temperatura ambiente, finalizando de este modo la síntesis de QDs de CdSe/ZnS.

Tras la síntesis de QDs se requiere una etapa de purificación para eliminar el exceso de reactivos, y ésta se lleva a cabo por un proceso de precipitación con metanol. Cabe destacar que, al enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción solidifica. Por ello es necesario añadir un mínimo volumen de cloroformo anhidro para volver a tener la mezcla de reacción en disolución. A continuación en tubos de centrifuga de 50 mL de volumen se añade, a partes iguales, un volumen de la mezcla de reacción y un volumen de metanol, y se centrifuga a 5000 rpm durante 5 min. Este proceso provoca la formación de un precipitado. Tras decantar el sobrenadante, el sólido se somete a tres lavados con metanol (para minimizar posibles impurezas adsorbidas sobre las nanopartículas), y finalmente se añade el volumen deseado de cloroformo anhidro para redissolver los QDs y almacenarlos en un lugar fresco, seco y oscuro (para evitar la degradación de los QDs).

### *III.3.2. Estimación de la concentración y tamaño de los QDs*

Es preciso caracterizar apropiadamente las nanopartículas recién sintetizadas para conocer su concentración, tamaño, homogeneidad y propiedades ópticas. Dicha caracterización se hace mediante medida de espectros de absorbancia y fluorescencia de la disolución coloidal de las nanopartículas.

En un primer momento se llevan a cabo las medidas de fluorescencia para comprobar que el proceso de síntesis ha resultado adecuado, es decir, se obtienen QDs con una distribución de tamaños homogénea (banda de emisión fluorescente estrecha y simétrica). El ancho de banda a la semi-altura del pico de fluorescencia da idea de la distribución de tamaños. Éste debe estar comprendido entre 20-40 nm para asegurar una baja dispersión de tamaños de los QDs sintetizados. Además, el espectro de fluorescencia nos indica la longitud de onda máxima a la que emiten los QDs. Dicho



espectro se obtiene realizando un barrido de emisión desde 400 nm hasta 650 nm, excitando la muestra a una longitud de onda fija de 350 nm.

Tras haber comprobado que la síntesis es apropiada, se lleva a cabo una medida del espectro de absorbancia para estimar el tamaño de nanopartícula y su concentración, empleando el método desarrollado por Peng y colaboradores [3]. Las ecuaciones propuestas fueron obtenidas empíricamente y hay que tener en cuenta que sólo ofrecen resultados fiables para el intervalo de tamaño de nanopartícula empleado en las medidas experimentales (2-8 nm). Así, para el caso concreto de los QDs con núcleo de CdSe la determinación del tamaño de la nanopartícula se realiza por aplicación de la Ecuación 3. Dicha ecuación relaciona la longitud de onda del primer excitón del espectro de absorbancia ( $\lambda$ ) con el diámetro (D) de la nanopartícula en nanómetros.

$$D = (1,6122 \times 10^{-9})\lambda^4 - (2,6575 \times 10^{-6})\lambda^3 + (1,6242 \times 10^{-3})\lambda^2 - (0,4277)\lambda + 41,57$$

**Ecuación 3**

Una vez conocido el valor del tamaño del núcleo de las nanopartículas D, empleando la Ecuación 4, podemos obtener el valor del coeficiente de extinción molar ( $\varepsilon$ ) por mol de nanocrystal (L/mol cm).

$$\varepsilon = 5857(D)^{2,65} \quad \text{Ecuación 4}$$

Con el valor calculado de  $\varepsilon$  y aplicando la ley de Lambert-Beer (Ecuación 5) podemos conocer la concentración de nanopartículas en la disolución.

$$A = \varepsilon CL \quad \text{Ecuación 5}$$

donde A es el valor de la absorbancia a la longitud de onda del primer excitón para una muestra dada, C es la concentración (mol/L) de los nanocristales en la muestra y L es la longitud de paso óptico utilizada para la medida de absorbancia (normalmente 1 cm).

Las Ecuaciones 4 y 5 son válidas siempre que la alícuota utilizada para la medida tenga una baja concentración de QDs (para evitar problemas de reabsorción), y su espectro de luminiscencia sea estrecho y simétrico. Por eso se recomienda corregir el

valor de la absorbancia  $A_m$ , obtenido a partir de las medidas experimentales, utilizando la semianchura a la mitad del máximo del primer excitón del espectro de absorbancia (hwhm: half width at the half-maximum) en la parte del espectro absorbancia de longitudes de onda largas (véase Ecuación 6).

$$A = \frac{A_m(hwhm)_{UV}}{K} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde  $K$  es el valor medio de hwhm de las muestras estándares utilizadas para el desarrollo de las ecuaciones empíricas y tiene un valor 14 de para los QDs de CdSe. Si utilizamos el espectro de fotoluminiscencia como alternativa para hacer la corrección del valor de absorbancia se puede utilizar la Ecuación 7.

$$A = \frac{A_m(fwhm)_{UV}}{K'} \quad \text{Ecuación 7}$$

En este caso fwhm es la anchura total a mitad del máximo del espectro de luminiscencia (fwhm: full width at the half máximo), y  $K'$  es el valor medio de fwhm de las muestras estándares utilizadas para el desarrollo de las ecuaciones empíricas y tiene un valor 25 de para los QDs de CdSe.

En la Figura 29 podemos ver un ejemplo de cómo se extraerían los datos necesarios para realizar los cálculos del espectro de absorbancia.

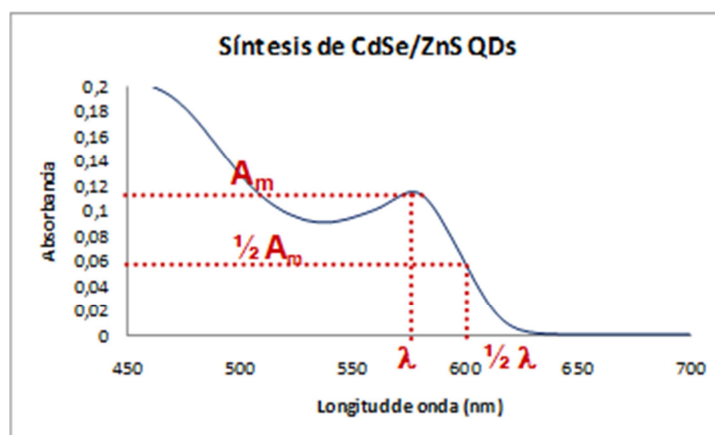
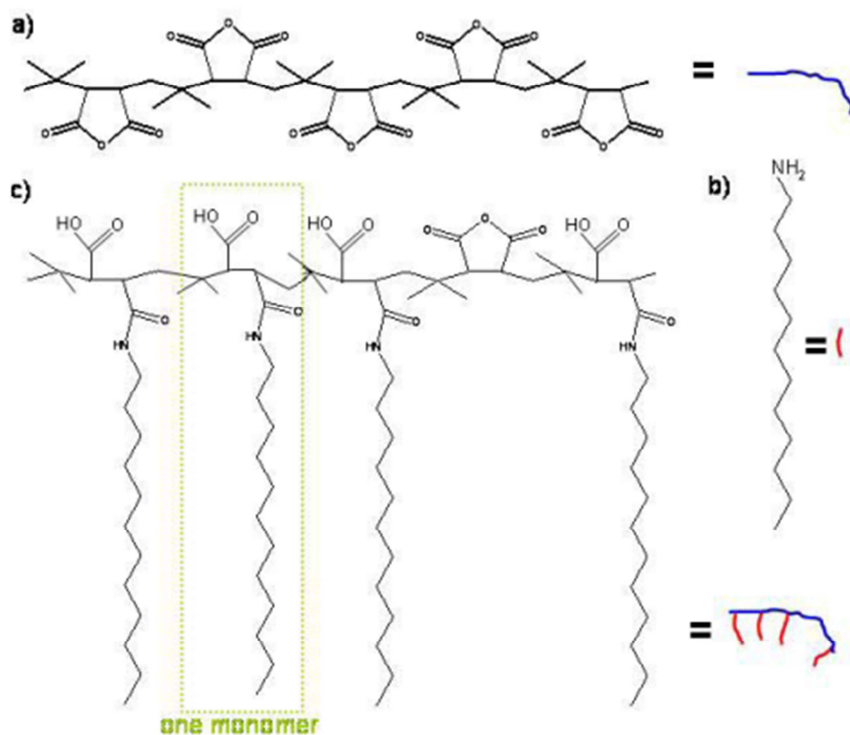


Figura 29. Espectro de absorbancia de CdSe/ZnS QDs en cloroformo anhidro donde aparecen reflejados los datos a extraer necesarios para cálculos posteriores.

Una vez caracterizados los QDs obtenidos se requiere una etapa previa de solubilización en medios acuosos de las nanopartículas para poder realizar su posterior aplicación bioanalítica.

### *III.3.3. Síntesis del polímero anfifílico*

La síntesis del polímero anfifílico, PMA75C12, empleado en la presente Tesis Doctoral para la solubilización de los QDs, se llevó a cabo en el laboratorio siguiendo un procedimiento previamente descrito [4,5]. Para ello, tenemos dos matraces: en el matraz aforado (1) se pesan 3,084 g (20 mmol) de poli-(anhídrido isobutilen-alt-maleico) y en un segundo matraz aforado (2) se pesan 2,70 g (15 mmol) de dodecilamina que se disuelven en 100 mL de tetrahidrofurano (THF) anhidro. Tras verter el contenido del matraz 2 sobre el matraz 1, se somete la mezcla a una sonicación en baño de ultrasonidos durante 20 s, introduciendo el matraz con la mezcla en un baño de agua a una temperatura entre 55-60 °C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se elimina el disolvente en el rotavapor hasta que se reduce el volumen inicial a aproximadamente un tercio. En este momento se introduce un núcleo magnético en el matraz y se deja la mezcla en agitación suave durante 8 horas. Posteriormente se elimina todo el disolvente en el rotavapor, obteniendo un sólido de aspecto viscoso y de color blanco-crudo que se redisuelve en 25 mL de cloroformo anhidro. Esta disolución stock de concentración en polímero 0,8 M se almacena a 4 °C. En la Figura 30 se representan las estructuras moleculares de los monómeros que posteriormente conformarán el mencionado polímero así como la estructura final del mismo.



**Figura 30.** Estructura del polímero anfifílico. a) Columna vertebral hidrofílica está constituida por poli-(anhídrido isobutílen-alt-maleico). Cada unidad monomérica comprende un anillo de anhídrido. La naturaleza hidrofílica se simboliza en color azul. b) La dodecilamina se utiliza para proporcionar las cadenas laterales hidrofóbicas que aparecen representadas en color rojo. c) Tras la reacción del grupo amino de la dodecilamina con los anillos de anhídrido se obtiene el polímero anfifílico que presenta una columna vertebral hidrofílica y unas cadenas laterales hidrofóbicas. La estequiometría de la reacción se escogió de modo que el 75% de los anillos de anhídrido reaccionen con la dodecilamina quedando intactos el 25% restante.

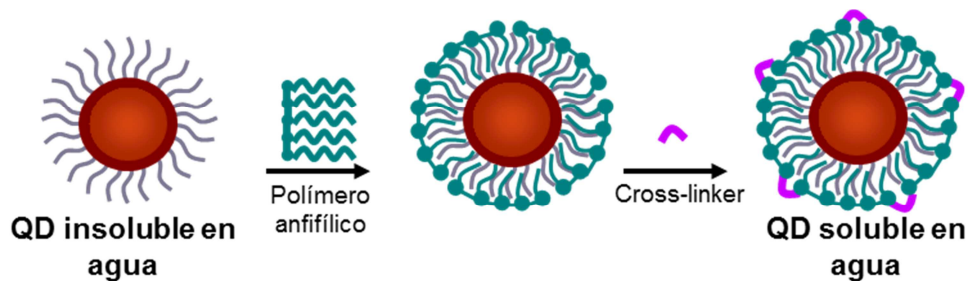
### III.3.4. Solubilización de CdSe/ZnS quantum dots

Una vez caracterizados los QDs en medio orgánico y conocida, por tanto, su concentración se procede a su recubrimiento polimérico para hacerlos solubles en medios acuosos.

Las cantidades de polímero y entrecruzador necesarias se obtienen de una hoja de cálculo que se ha elaborado basándonos en los datos experimentales que se recogen en una publicación del grupo del Prof. Peng [3]. El entrecruzador o crosslinker se utiliza para cerrar la estructura del recubrimiento polimérico; es decir, une las unidades de

polímero que recubren al QD cerrando completamente la estructura, aumentando la solubilidad del recubrimiento, y haciendo que los QDs sean enteramente solubles en medios acuosos. En nuestro caso se utilizó la bis-hexanoetilentriamina como entrecruzador en una disolución 0,02 M de cloroformo anhidro.

El recubrimiento polimérico se realizó siguiendo un procedimiento descrito con anterioridad por el grupo del Prof. Parak [4] y que se basa fundamentalmente en hacer interaccionar las cadenas hidrocarbonadas del polímero con las cadenas TOP/TOPO que recubren al QD tras su síntesis. Dicho proceso se describe a continuación y aparece esquematizado en la Figura 31.



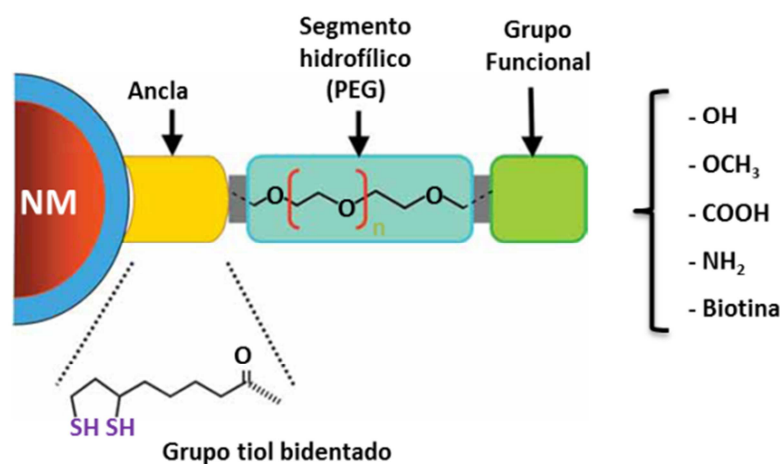
**Figura 31.** Esquema del proceso de solubilización de QDs en medios acuosos donde se refleja el importante papel que juega el entrecruzador o cross-linker terminando de cerrar la estructura del recubrimiento del QD para asegurar que es soluble completamente.

En un matraz aforado añadimos el volumen de la disolución de QDs en cloroformo anhidro que queremos solubilizar y el correspondiente volumen de polímero. Tras homogeneizar la mezcla por agitación durante unos 5-10 min, se somete a calefacción a 55-60 °C durante 1 min para favorecer la apertura y flexibilidad del polímero, permitiendo un mejor recubrimiento. A continuación se elimina el disolvente en el rotavapor lentamente para seguir facilitando las interacciones entre el polímero y el QD. El sólido obtenido se redisuelve en el volumen necesario de entrecruzador (generalmente se añaden 3 mL de cloroformo anhidro para facilitar dicha redisolución). Tras una agitación vigorosa de la mezcla durante 10 min (mezclado homogéneo de reactivos) se vuelve a eliminar el disolvente lentamente en el rotavapor. Una vez que el sólido obtenido esté bien seco, se procede a su dispersión en una disolución reguladora de SBB 50 mM pH 12 (medio acuoso). Los QDs recubiertos con polímero son sumergidos

en dicha disolución reguladora dejando el matraz en reposo y cubierto con papel de aluminio durante 8-10 horas. Después de microfiltrar la disolución de QDs a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro se almacena esta disolución stock de QDs en lugar fresco, seco y oscuro (en SBB a pH 12 por ser el pH en el que son más estables).

### III.3.5. Síntesis de ligandos PEG funcionalizados

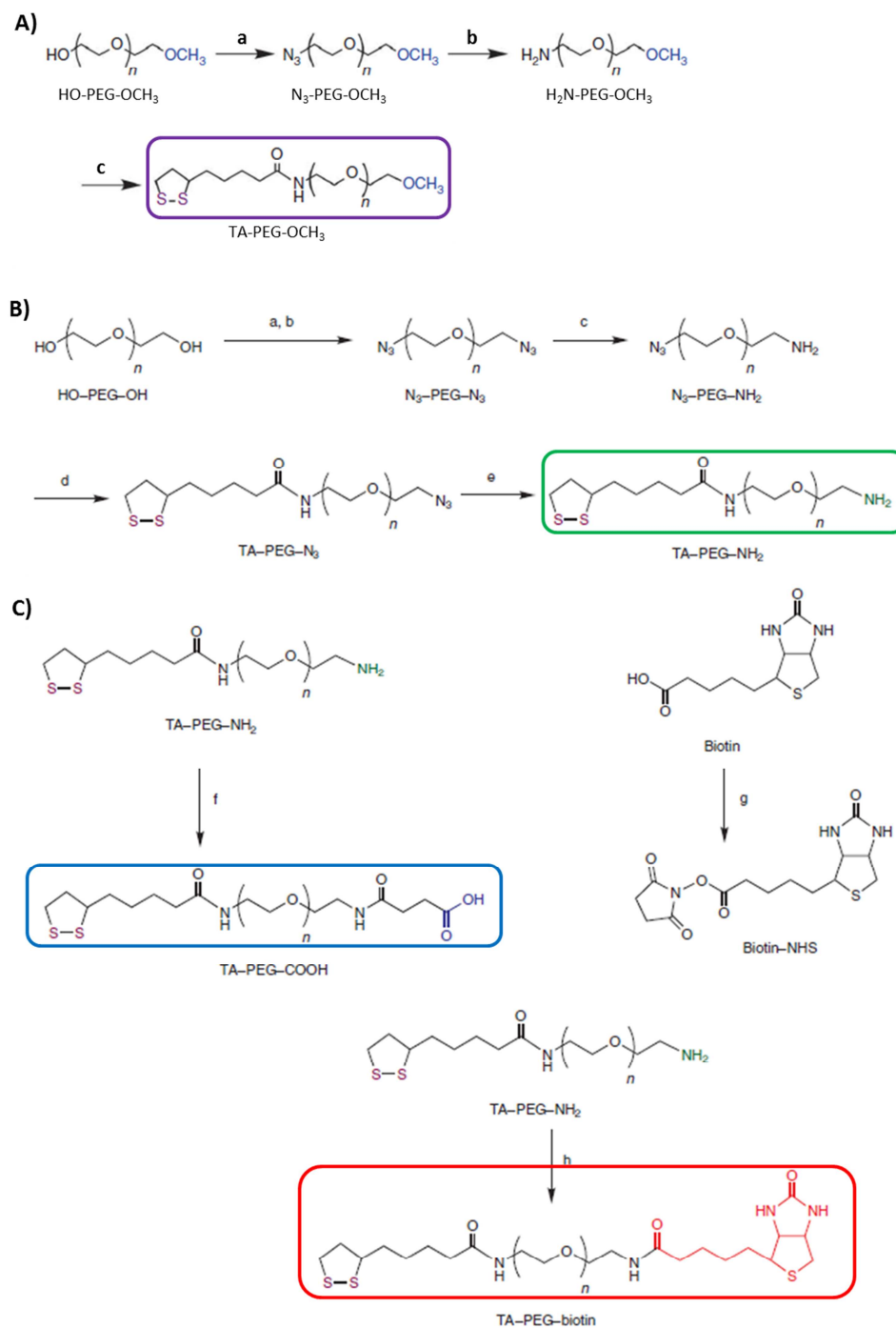
La síntesis de estos ligandos PEG funcionalizados, empleados para la solubilización de diversos tipos de nanomateriales (QDs o AuNPs) y que en esta Tesis se demostrará su uso como ligandos protectores en la síntesis de nanoclusters, se aprendió durante una estancia pre-doctoral en el grupo del Prof. Mattoussi (quien ha trabajado y sigue trabajando activamente en la investigación del diseño de este tipo de ligandos) en la Florida State University (Tallahassee, Florida, USA). Estos ligandos están basados en un núcleo de PEG al cual se ancla un grupo tiol bidentado (ácido lipóico) y un grupo funcional (-OH, -OCH<sub>3</sub>, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -biotina) por cada uno de sus extremos respectivamente, tal y como se muestra en la Figura 32.



**Figura 32.** Representación esquemática del diseño de ligandos modulares hidrofílicos basados en PEG que promueven tanto la solubilización y/o funcionalización de nanomateriales así como su biocompatibilidad. Figura modificada de la Ref. 6.

Esta configuración modular les aporta una serie de características muy ventajosas tanto en la solubilización y/o funcionalización del nanomaterial como en su estabilidad posterior. Por un lado, el PEG aporta la propiedad hidrofílica al ligando y posteriormente al nanomaterial, haciéndolo soluble y estable en un amplio rango de condiciones químicas (pH: 3-12; altas concentraciones salinas 1,5 M de NaCl). Además, hay que destacar que el PEG es uno de los polímeros más biocompatibles que se conoce. Por otro lado, tenemos el ácido lipóico que poseen dos grupos tiol, lo que convierte al ligando final en un ligando bidentado. Este hecho hace que se una más fuertemente (ya que tiene más puntos de unión) a la superficie del nanomaterial, teniendo en cuenta la solidez del enlace por puente disulfuro (en caso de QDs) o la afección del azufre por elementos metálicos como el Au o Ag para el caso de las NPs metálicas. Esto le conferirá al nanomaterial una gran estabilidad, mayor que la ofrecida por ligandos análogos monodentados. Finalmente, existe la posibilidad de unir un grupo funcional al cuerpo de PEG del ligando y haciendo que éste sea compatible con las metodologías más comunes de conjugación a biomoléculas (p.e. química de la carbodiimida o la interacción avidina-biotina).

El procedimiento de síntesis de este tipo de ligandos se detalla ampliamente y de un modo sencillo y fácil de seguir en los protocolos recogidos en diversas publicaciones [6,7,8]. A modo ilustrativo en la Figura 33 se recogen los esquemas de las rutas sintéticas que dan lugar a diferentes tipos de ligandos PEG funcionalizados.



**Figura 33.** Esquemas de las rutas sintéticas mediante las que se obtienen los principales ligandos PEG funcionalizados. **A)** Síntesis del ligando TA-PEG-OCH<sub>3</sub>. Reactivos y condiciones: **a.** (i) MsCl, Et<sub>3</sub>N, THF, (ii) NaN<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O; **b.** PPh<sub>3</sub>, THF, H<sub>2</sub>O; **c.** TA, DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. **B)** Síntesis del ligando TA-PEG-NH<sub>2</sub>. Reactivos y condiciones: **a.** MsCl, Et<sub>3</sub>N, THF; **b.** NaN<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O; **c.** PPh<sub>3</sub>, EtOAc and 1 M HCl; **d.** ácido lipóico, DCC, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; **e.** PPh<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, THF. **C)** Modificaciones del ligando TA-PEG-NH<sub>2</sub> para obtener los ligandos TA-PEG-COOH (encuadrado en azul) y TA-PEG-Biotina. Reactivos y condiciones: **f.** anhídrido succínico, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and Et<sub>3</sub>N; **g.** NHS, DCC, DMF; **h.** biotina NHS ester, Et<sub>3</sub>N, DMF. Esquemas reproducidos de las Referencias 7 y 8.



### III.3.6. Síntesis de nanoclusters de plata

Aunque todo lo relativo a la optimización/evaluación del proceso de síntesis y caracterización de estos nuevos nanomateriales, nanoclusters de plata recubiertos con ligandos PEG funcionalizados, se comentará en el Capítulo 3 del apartado de Resultados y Discusión de la presente Memoria, en este breve epígrafe se describirá cómo se lleva a cabo una síntesis convencional de los mismos.

En un vial, protegido de la luz y provisto de un imán, se introducen 30  $\mu\text{L}$  de una disolución 5 mM de  $\text{AgNO}_3$  y la cantidad necesaria de ligando disuelto en 3 mL de agua destilada, de tal modo que la relación metal:ligando esté comprendida en el rango entre 1:1 y 1:10. Tras 30 min de agitación continua, se añade el agente reductor (30  $\mu\text{L}$  de una disolución 100 mM de  $\text{NaBH}_4$ ) y se deja que la reacción tenga lugar a temperatura ambiente y con agitación constante durante 5 horas. Una vez finalizada la reacción se elimina el exceso de ligando mediante ultrafiltración empleando para ello unos filtros de membrana de 10 kDa. La disolución final purificada se almacena a temperatura ambiente y protegida de la luz.

### III.3.7. Evaluación del rendimiento cuántico

El rendimiento cuántico (quantum yield, QY) es una de las propiedades más importantes de un fluoróforo. El QY representa el número de fotones emitidos por una muestra respecto al número de fotones absorbidos [9]; es decir, nos da la probabilidad de desactivación del estado excitado de la molécula a través de un proceso radiativo como la fluorescencia, en detrimento de otros mecanismos de desactivación no radiativos. Existen numerosos procedimientos para estimar el rendimiento cuántico de un fluoróforo [10], pero sin duda la forma más sencilla es a través de la comparación con estándares de rendimiento cuántico conocido. El valor del QY se obtiene mediante la comparación entre la fluorescencia integrada de la muestra desconocida con la fluorescencia integrada del patrón. Cabe mencionar que la densidad óptica u absorbancia de las muestras debe mantenerse por debajo de las 0,1 unidades (si se emplean cubetas con un paso óptico de 10 mm) para evitar efectos de filtro interno, o

bien la densidad óptica de la muestra y el fluoróforo de referencia debe estar por debajo de este valor a la longitud de onda que se corresponde con la longitud de onda de excitación. Una vez hechas las medidas experimentales de absorbancia y fluorescencia tanto del fluoróforo de referencia como de la muestra desconocida, el QY se calcula aplicando la Ecuación 8.

$$Q = Q_R \frac{I}{I_R} \frac{(OD)_R}{OD} \left( \frac{n}{n_R} \right)^2 \quad \text{Ecuación 8}$$

donde Q es el rendimiento cuántico, I es la intensidad de fluorescencia integrada, OD es la densidad óptica o absorbancia, y n es el índice de refracción del medio. El subíndice R se refiere al fluoróforo de referencia de rendimiento cuántico conocido. En esta expresión se asume que la muestra y el patrón se excitan a la misma longitud de onda.

Un aspecto a tener en cuenta en la elección del fluoróforo de referencia es que éste absorba a la longitud de onda de excitación de elección para la muestra, y si es posible, que emita en una región similar a la región de emisión de la muestra que se pretende caracterizar. Se puede encontrar en la bibliografía [9] una lista de patrones de referencia con sus correspondientes rendimientos cuánticos y sus rangos de emisión característicos que permiten llevar a cabo la selección más adecuada para cada caso concreto.

### III.3.8. Conjugación de haptenos a la proteína portadora BSA

Dado que no había disponible comercialmente el conjugado melanina-BSA necesario para el desarrollo del inmunoensayo fluorescente basado en QDs (ver Capítulo 1B de la presente Memoria) se decidió llevar a cabo en el laboratorio la síntesis y posterior caracterización del mencionado conjugado. Para ello, se empleó un kit comercial (*Imject EDC BSA spin Kit*) basado en la química de la carbodiimida. La relación molar de precursores utilizada fue 525:1:1700 (melanina:BSA:EDC). El uso de un gran exceso de hapteno está motivado por la necesidad de asegurar que todas las moléculas de BSA están conjugadas a la melanina y, por otra razón más importante, que es la de

asegurar que la melanina sólo emplea uno de sus grupos amino en la conjugación, dejando libres los otros dos grupos amino que constituyen el epitopo de la molécula (sitio de unión al anticuerpo).

Brevemente, el protocolo de conjugación del kit es el siguiente: 2 mg de hapteno se disuelven en 450 mL de la disolución reguladora “*Imject EDC conjugation*” proporcionada por el kit. Esta disolución se añade en el recipiente que contiene 200 mL de una disolución 10 mg/mL de BSA y se homogeniza bien la mezcla. Esta mezcla de proteína portadora-hapteno se introduce en otro vial que contiene 10 mg de EDC y tras la disolución del EDC la reacción se incuba durante 2 h con agitación continua a temperatura ambiente. El conjugado final se purifica por “*desalting*” mediante unas columnas de resina de celulosa. Dichas columnas fueron acondicionadas previamente con 1 mL de disolución reguladora de purificación y centrifugando a 1000 g durante 2 min, repitiendo el proceso tres veces. Una vez acondicionada se introduce la muestra y se somete a las mismas condiciones de centrifugación. El líquido recogido se corresponde con el conjugado hapteno-BSA purificado, quedando retenido en la columna el exceso de hapteno y los posibles productos secundarios formados en la reacción. El conjugado purificado se divide en alícuotas y se almacena en el congelador a -18 °C.

### III.3.9. Caracterización de conjugados hapteno-BSA

Una vez sintetizado y purificado el conjugado hapteno-BSA se requiere una buena caracterización en términos de peso molecular, estequiometría y concentración del hapteno en el conjugado para poder ser empleado posteriormente en cualquier tipo de aplicación, en nuestro caso en la bioconjugación al QD. Con este fin se ideó una estrategia de caracterización que aunaba los resultados de dos metodologías: por un lado, la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF-MS y, por otro, un ensayo colorimétrico, el Test de Bradford, para la determinación de la concentración de proteína.

La técnica MALDI-TOF-MS nos proporciona información sobre el peso molecular y la estequiometría. En los experimentos llevados a cabo en el MALDI se utilizó el ácido

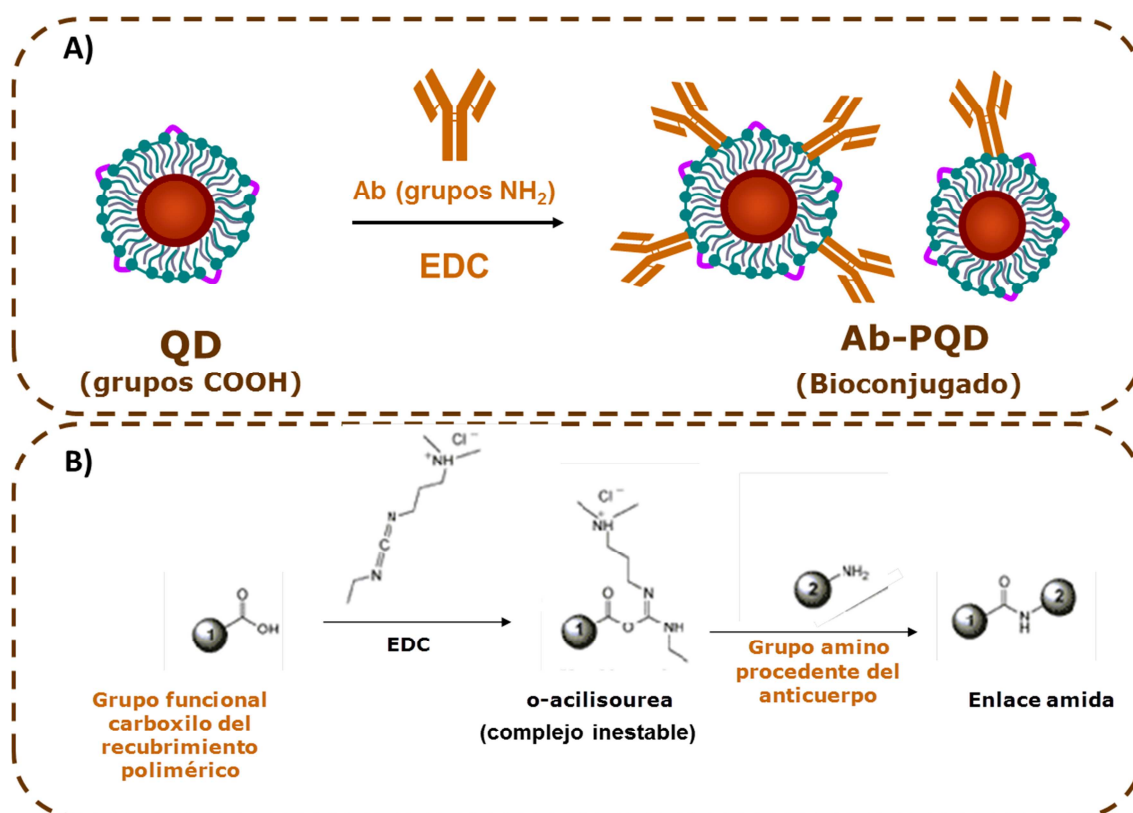
sinapínico como matriz, preparándose una disolución 5 mg/mL de la matriz en 30% de acetonitrilo y conteniendo un 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). En estos análisis se tiene que asegurar una cantidad mínima de proteína comprendida entre 1-10 pmol (en nuestro caso siempre se aseguró una concentración de proteína de 15 nmol/mL). Como estándar de referencia se utilizó una disolución 1 mg/mL de BSA y se trabajó en modo positivo en el equipo MALDI.

Como ya hemos dicho, el Test de Bradford es uno de los ensayos más simples y comúnmente usados para determinar la concentración total de proteína en una muestra y en nuestro caso concreto nos permite hacer una estimación de la concentración de BSA en el conjugado. Se basa en la unión proporcional del tinte Coomassie a las proteínas. Tiene un reducido intervalo lineal de respuesta comprendido entre 2-120  $\mu\text{g/mL}$ , lo que implica la necesaria dilución de la muestra en la mayoría de los casos. El Coomassie absorbe a 595 nm cuando está unido a la proteína pero cuando está libre su longitud de onda de absorción es 465 nm. Dado que gran parte de la no linealidad surge del equilibrio que se forma entre las formas enlazada y no enlazada, para mejorar el rango lineal de este procedimiento analítico, en 1995 Zor y Selinger [11] propusieron realizar la medición de la relación de las absorbancias (595/465) consiguiendo mejorar la sensibilidad diez veces con respecto al método inicial y ampliando el rango lineal hasta 1 mg/mL. Su respuesta es proporcional a la concentración de proteína en el medio, es decir, cuanta más proteína hay más Coomassie se enlaza y, por tanto, se obtiene una mayor señal de absorbancia. De este modo, se preparó un calibrado de BSA en agua (0-1 mg/mL) y se realizó el test siguiendo la aproximación propuesta por Zor y Selinger. Para ello, a las distintas alícuotas de concentración creciente de BSA se les añadió 2,5 mL de Coomassie, se agitó y se midieron las señales de absorbancia realizando el correspondiente calibrado. A continuación, siguiendo un procedimiento similar, se midieron las muestras de conjugado hapteno-BSA.

Y así, de este modo, con todos los datos ofrecidos por ambas metodologías podemos llegar a conocer la concentración de hapteno en el conjugado (dato necesario para el posterior desarrollo del inmunoensayo).

## III.3.10. Bioconjugación de nanomateriales

A lo largo de todo el trabajo que se ha desarrollado en la presente Tesis Doctoral la vía seleccionada para la conjugación de nanomateriales a la biomolécula de interés (anticuerpo, proteína) ha sido la de la química de la carbodiimida. Esta ruta establece una unión covalente entre el nanomaterial y la biomolécula mediante la formación de un enlace amida entre los grupos carboxilo y amino presentes en cada una de las moléculas, respectivamente. Un esquema del proceso de bioconjugación se recoge en la Figura 34.



**Figura 34.** Bioconjugación de nanomateriales según la vía de la carbodiimida. **A)** Esquema del proceso de bioconjugación de QDs a anticuerpos. **B)** Fundamento de la reacción química de formación de un enlace amida a través de la carbodiimida.

Experimentalmente esta reacción se lleva a cabo en un vial, con agitación constante y a temperatura ambiente. Así, en el vial se introducen las cantidades necesarias de QD y biomolécula y se pone la agitación; tras 10 min de mezcla se añade el EDC y se deja reaccionar durante 2 h. Hay que señalar que las relaciones molares de biomolécula y nanomaterial han de ser optimizadas en el intento de obtener la mayor

homogenidad en el bioconjugado (es decir, no tener mezclas de distintas estequiometrías de bioconjugado) manteniendo la funcionalidad de la biomolécula y las propiedades luminiscentes de la nanopartícula. Una vez finalizada la reacción de bioconjugación se requiere una etapa posterior de purificación con el objeto de eliminar el exceso de reactivos y subproductos de la reacción. En esta Tesis Doctoral se evaluaron dos procedimientos de purificación: la cromatografía de exclusión por tamaños y la ultrafiltración, siendo esta última la metodología final empleada.

### *III.3.11. Inmunoensayo espectrofotométrico*

Cuando se realiza la bioconjugación de QD a anticuerpos un aspecto fundamental a tener en cuenta es que la funcionalidad del Ab se mantenga intacta, es decir que, la capacidad de reconocimiento del Ab a su antígeno no se vea alterada. Una de las maneras más sencillas de comprobar esto es mediante un inmunoensayo espectrofotométrico con anticuerpo secundario marcado con peroxidasa. Así en una placa ELISA se inmoviliza el antígeno, a continuación se añade el Ab marcado con QD y tras la etapa de reconocimiento y posterior lavado se añade el Ab secundario marcado con peroxidasa. Una vez transcurrido el tiempo de incubación y eliminado el exceso de reactivo se lleva a cabo la etapa de revelado con el Kit "*TMB substrate*" que contiene los substratos de la enzima peroxidasa: una disolución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) 0,4 g/L y una disolución de peróxido de hidrógeno al 0,02% en una disolución reguladora de ácido cítrico. Tras preparar una mezcla 1:1 de los substratos ésta se añade a los pocillos de la placa ELISA generando una coloración azul allí donde haya Ab secundario, lo que implica que esos pocillos también contenían el Ab primario marcado con QD revelando así que éste mantiene su función. Para detener la reacción enzimática se adicionan 100  $\mu$ L de ácido sulfúrico 2 M por cada pocillo provocando un cambio de color (ahora amarillo). La medida de la señal se realiza en un lector de placas de absorbancia Elix 800 a 490 nm (longitud de onda específica para el color generado).

*III.3.12. Procedimiento general para el inmunoanálisis*

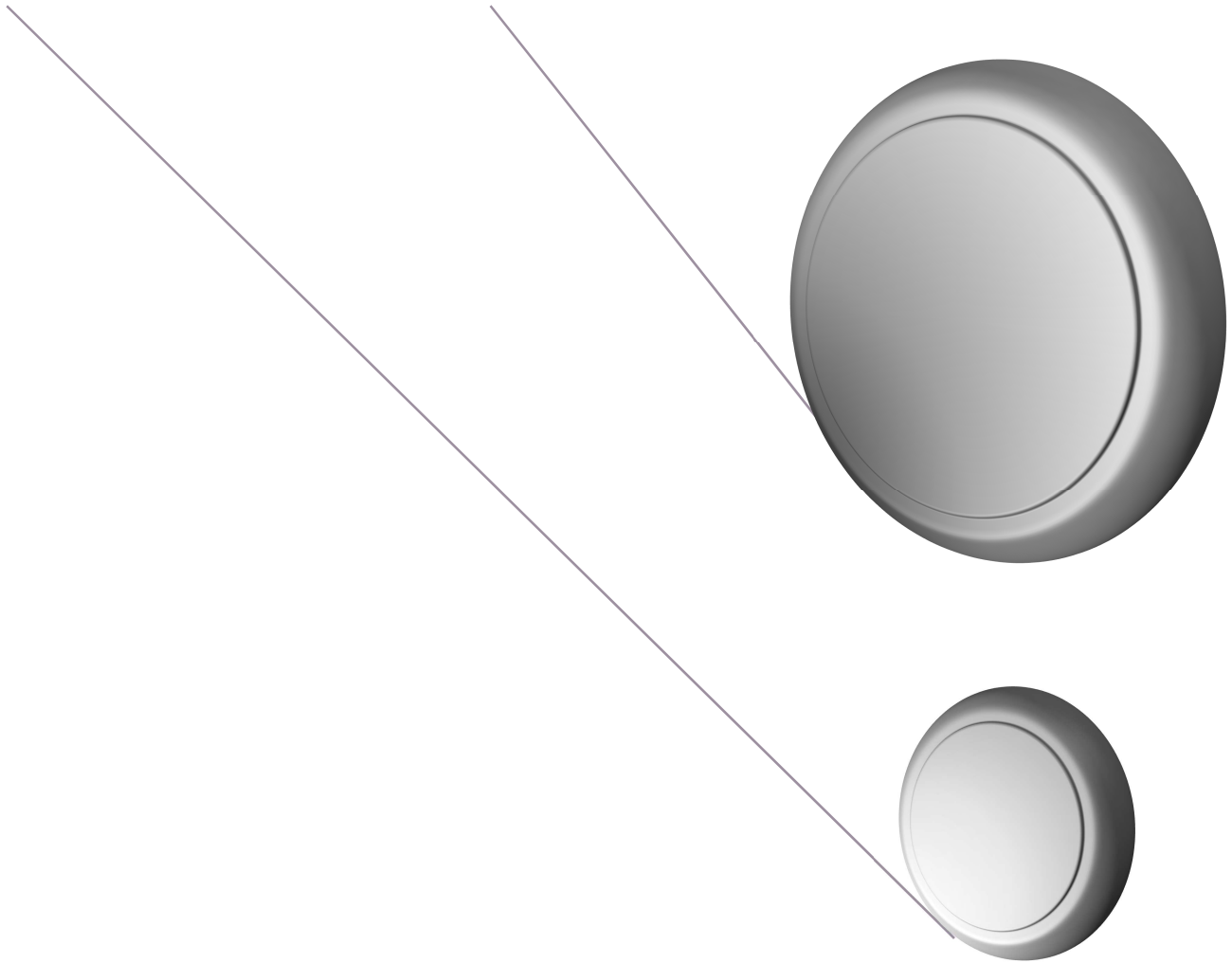
Dado que en la presente Tesis Doctoral se llevará a cabo la determinación de haptenos (moléculas pequeñas con un único sitio de unión al Ab) el formato de inmunoensayo queda restringido al competitivo. Se investigaron las dos posibilidades de ensayo competitivo: inmovilización del Ab e inmovilización del antígeno (hapteno-BSA). De forma general el procedimiento para llevar a cabo un inmunoensayo competitivo se resume en los siguientes puntos:

1. TAPIZADO: se realizó añadiendo 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de la disolución de tapizado (Ab o hapteno-BSA) a la concentración seleccionada. Posteriormente se incubó a 37 °C durante 6 horas.
2. BLOQUEO: se llevó a cabo mediante la adición de 200  $\mu\text{L}$ /pocillo de la disolución de bloqueo. La placa se incubó a 4 °C durante 10-12 horas.
3. PRIMER LAVADO: se realiza añadiendo a cada pocillo 200  $\mu\text{L}$  de una disolución de PBS-Tween20. Esta operación se realiza por triplicado, eliminando el líquido de lavado cada vez.
4. REACCIÓN INMUNOLÓGICA: se añade a cada pocillo 100  $\mu\text{L}$  de una mezcla que contiene la molécula marcada con QD y el Ab o Ag. Posteriormente se incubó la placa a 37 °C durante 2 horas.
5. SEGUNDO LAVADO: se lleva a cabo del mismo modo que el primer lavado.
6. DETECCIÓN: se lleva a cabo la medida de fluorescencia con un lector de placas.

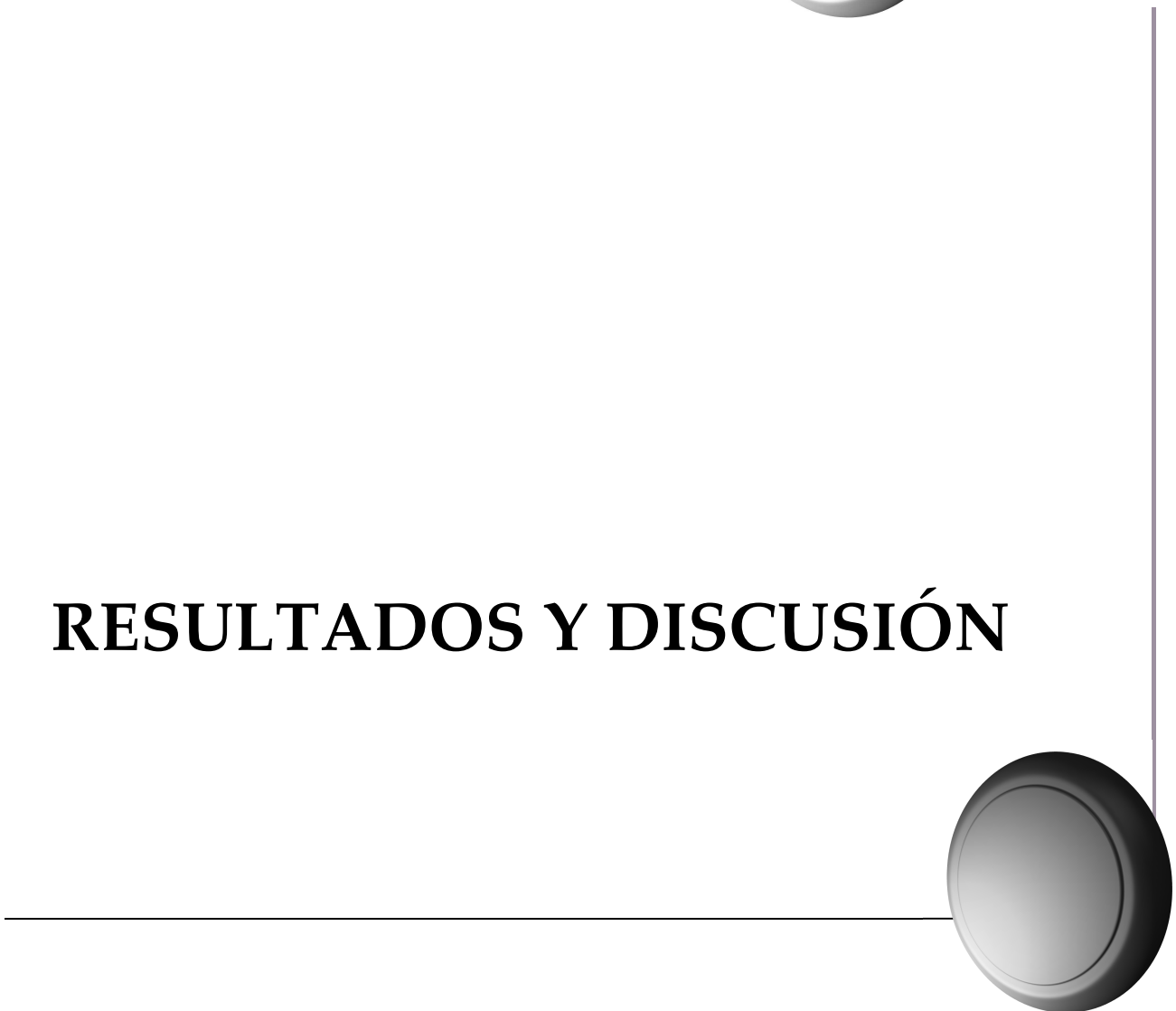
### III.4. Bibliografía

- [1] M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **Simple bioconjugation of polymer-coated quantum dots with antibodies for fluorescence-based immunoassays**, *The Analyst*, 2008, 133, 444.
- [2] A. Peng, X. Peng, **Formation of High-Quality CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals Using CdO as Precursor**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 183.
- [3] W.W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, **Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe and CdS nanocrystals**, *Chem. Mater.*, 2003, 15, 2854.
- [4] M.T. Fernández-Argüelles, A. Yakolev, R.A. Sperling, C. Luccardini, S. Gaillard, A. Sanz-Medel, J. Mallet, J. Brochon, A. Feltz, M. Oheim, W.J. Parak, **Synthesis and characterization of polymer-coated quantum dots with integrated acceptor dyes as FRET-based nanoprobe**s, *Nano Letters*, 2007, 7, 2613.
- [5] C.A.J. Lin, R.A. Sperling, J.K. Li, T-Y Yang, P-Y Li, M. Zanella, W.H. Chang, W.J. Parak, **Design of an amphiphilic polymer for nanoparticle coating and functionalization**, *Small*, 2008, 4 (3), 334.
- [6] K. Susumu, H.T. Uyeda, I.L. Medintz, T. Pons, J.B. Delehanty, H. Mattoussi, **Enhancing the Stability and Biological Functionalities of Quantum Dots via Compact Multifunctional Ligands**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 13987.
- [7] B.C. Mei, K. Susumu, I.L. Medintz, H. Mattoussi, **Polyethylene glycol-based bidentate ligands to enhance quantum dot and gold nanoparticle stability in biological media**, *Nature Protocols*, 2009, 4 (3), 412.
- [8] K. Susumu, B.C. Mei, H. Mattoussi, **Multifunctional ligands based on dihydrolipoic acid and polyethylene glycol to promote biocompatibility of quantum dots**, *Nature Protocols*, 2009, 4 (3), 424.
- [9] J.R. Lakowicz, **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, Third Edition, 2006, Springer, Singapore.
- [10] J.N. Demas, G.A. Crosby, **The measurement of photoluminescence Quantum Yields. A Review**, *J. Phys. Chem.*, 1971, 75 (8), 991.
- [11] T. Zor, Z. Selinger, **Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies**, *Anal. Biochem.*, 1996, 236, 302.





## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





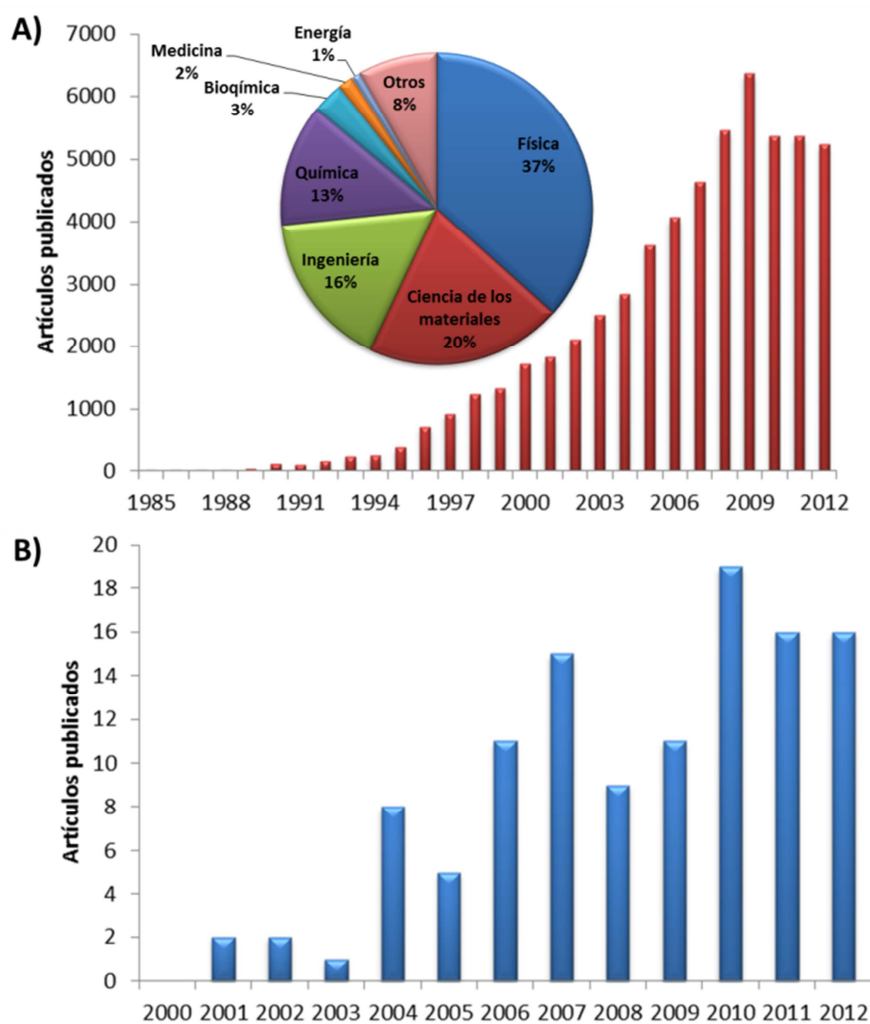
## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.1. Inmunoensayos fluorescentes basados en quantum dots

#### IV.1.1. Antecedentes y objetivos

Las propiedades luminiscentes de los QDs han sido ampliamente empleadas para la detección de analitos mediante diversos tipos de ensayos. Las primeras aplicaciones analíticas de los QDs se basaban en su uso como sensor directo atendiendo a la modificación de sus propiedades fluorescentes (aumento/apagado, *enhancement/quenching*) en presencia de la molécula bajo estudio. Han sido descritos numerosos procedimientos de análisis para la determinación tanto de cationes como aniones inorgánicos así como de moléculas orgánicas sencillas [1,2]. No obstante, este tipo de determinaciones son bastante inespecíficas y dependen mucho tanto del recubrimiento de la nanopartícula como del entrono químico del medio en el que se encuentre. La capacidad para mantener la funcionalidad de las biomoléculas unidas a los QDs abrió las puertas al uso de estos nanomateriales como potentes marcas luminiscentes para el desarrollo de innovadores bioensayos.

En la Figura 35 se puede observar la evolución en la investigación en este campo. La alta productividad en el desarrollo y mejora de nuevas aplicaciones basadas en QDs (véase Figura 35A) resaltan la gran aceptación por parte de la comunidad científica de estas innovadoras nanopartículas fluorescentes. De hecho, se han formado grandes expectativas sobre las ventajas que ofrecen o pueden ofrecer los QDs en el desarrollo de sistemas de inmunoanálisis cada vez más sensibles, simples y robustos. Sin embargo, como se puede apreciar (Figura 35B) el uso de QDs como marcadores en inmunoensayos no se desarrolló hasta el año 2001, una década después del inicio en la investigación de QDs, y es a día de hoy todavía un campo donde investigar para intentar mejorar las prestaciones de estos nanomateriales. Esto pone de manifiesto la dificultad y la relevancia de los trabajos enfocados al desarrollo de formatos de inmunoensayo con este tipo de marcas.



**Figura 35.** Evolución de la investigación en QDs. **A)** Publicaciones versadas sobre QDs en las últimas décadas. El gráfico insertado muestra la investigación realizada por áreas de conocimiento. **B)** Publicaciones relacionadas con el empleo de QDs como marcas en inmunoensayos.

Así, el objetivo que se pretende desarrollar en este Capítulo es el *diseño y aplicación de una plataforma general de análisis para moléculas pequeñas (haptenos) basada en un inmunoensayo fluorescente competitivo empleando QDs como marcadores*. Este objetivo se realizará a través de las siguientes etapas experimentales:

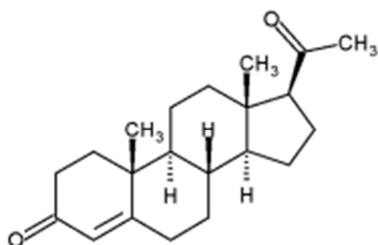
- Diseño y optimización de un inmunoensayo competitivo fluorescente basado en QDs, empleando la progesterona como analito modelo.
- Demostración del desarrollo de una plataforma general de análisis mediante la aplicación del inmunoensayo desarrollado a la determinación de Melamina.

IV.1.2. *Determinación de progesterona en leche de ganado bovino.*IV.1.2.1. Importancia de la progesterona en la industria ganadera

Las hormonas esteroideas son reguladores importantes del estado fisiológico en los vertebrados, participando en el metabolismo homeostático y en la reproducción. Por ello, su monitorización es de relevante importancia tanto en el mundo científico como en el sector ganadero y socio-económico.

La fertilidad de las hembras mamíferas está regulada fundamentalmente por los siguientes tipos de hormonas: la hormona liberadora de Gonadotropina excretada por el hipotálamo, la hormona Luteinizante y la hormona estimulante del Folículo excretada por la glándula pituitaria anterior y las hormonas esteroides Estradiol y Progesterona (P4) principalmente excretadas por los ovarios y el útero [3-6].

La progesterona (Figura 36) es una hormona esteroidea producida por las hembras mamíferas durante la pubertad y en la adolescencia. Está relacionada con el ciclo menstrual femenino, el embarazo (apoya la gestación) y la embriogénesis. Por ello, se convierte en un importante biomarcador en la determinación del estado reproductivo de las hembras mamíferas. La progesterona actúa principalmente durante la segunda parte del ciclo menstrual, deteniendo los cambios endometriales que inducen los estrógenos y estimulando los cambios madurativos, preparando así al endometrio para la implantación del embrión. Esta hormona también se encarga de engrosar y mantener sujeto al endometrio en el útero: al bajar sus niveles, el endometrio se cae, produciendo la menstruación.



**Figura 36.** Estructura química de la progesterona, derivada del núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno del que provienen los esteroides cuya arquitectura molecular es igual a la del colesterol.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

Poder monitorizar la capacidad de reproducción de una vaca lechera es fundamental para optimizar la producción de leche por parte de las granjas (y, en general, para toda la industria láctea). La detección y la correcta interpretación de las señales que indican el estro (tiempo justamente previo a la ovulación, celo) y el diagnóstico temprano del estado de gestación, son aspectos económicos muy importantes dentro de la industria ganadera y láctea, ya que permitiría optimizar el número de inseminaciones y tratamientos veterinarios que actualmente se tienen que realizar para conseguir dejar preñada a una vaca, ahorrando considerables costes al sector lácteo.

El intervalo óptimo entre partos se estima en doce meses desde un punto de vista de rentabilidad económica, asegurando el máximo rendimiento en la producción de leche. Esto significa que la vaca debería concebir en torno a tres meses después del último parto. Si no, esto puede dar lugar a una producción reducida y posteriormente a un aumento del riesgo de sacrificio del animal.

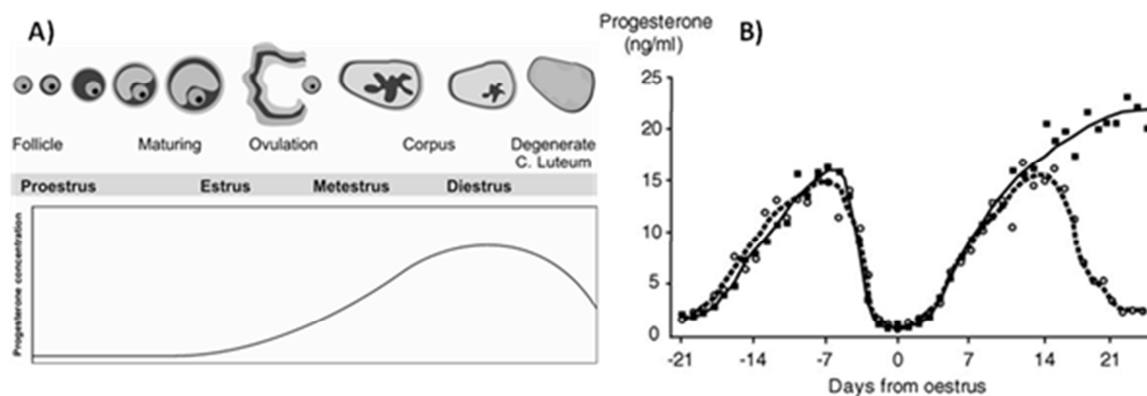
El ciclo estral de una hembra se suele definir como el periodo de tiempo que transcurre entre dos ovulaciones consecutivas que para el caso del ganado vacuno es de 21 días de media. Este periodo se suele subdividir clásicamente en cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. Sin embargo, si nos limitamos a la observación del comportamiento del animal sólo podremos determinar dos etapas: a) Diestro o Fase Luteal, etapa de silencio sexual y b) Estro o Celos, también llamada Fase Folicular, etapa de aceptación del macho.

A pesar de la importancia que tiene el poder monitorizar la función reproductora para que una explotación lechera sea rentable, existen relativamente pocas herramientas disponibles para que el ganadero directamente pueda controlar rápidamente el ciclo hormonal y el estado de fertilidad de sus vacas. La detección del celo normalmente se realiza mediante la observación del comportamiento del animal.

Debido a que el celo de la hembra está asociado temporalmente con la ovulación y es éste el momento clave en el cual se debe practicar la inseminación artificial, es de fundamental importancia en un sistema de producción disponer de métodos eficaces

que minimicen las pérdidas ocasionadas por aquellas hembras que no son detectadas en celo y por lo tanto pierden la ocasión de ser preñadas, con las consecuentes pérdidas económicas que esto trae al sistema productivo. Este problema es de particular importancia en el sector bovino ya que al presentar un celo tan breve, en ocasiones de tan sólo 6 horas, es bastante común encontrar que la eficiencia de detección del celo no supera el 50-60 % por los métodos tradicionales. De ahí deriva la importancia del desarrollo de métodos, dispositivos o técnicas, que permitan realizar dicha detección. En este sentido la medida de la concentración de las hormonas producidas por los ovarios de las hembras mamíferas nos aporta una información mucho más precisa de la actividad cíclica y el estro que los métodos tradicionales utilizados en las explotaciones ganaderas.

Por ello, existe una importante actividad investigadora en el área de la Química Analítica buscando métodos de detección que permitan controlar cambios en el nivel de progesterona tanto en sangre como en leche. Así, los niveles en sangre disminuyen desde la fase luteal, 5 µg/L, a menos de 1 µg/L durante el estro o celo. Dichos cambios se reflejan en la leche pero a concentraciones más elevadas debido a la solubilidad en medios grasos de las hormonas esteroideas. De este modo la progesterona se encuentra presente en mayor concentración en la leche que en el plasma (donde puede aparecer asociada a proteínas). Dentro de la leche, en torno al 80% de la progesterona se encuentra presente en la fracción grasa. Los niveles de progesterona son difíciles de cuantificar debido a la baja concentración en la que se encuentra y a la ausencia de grupos funcionales en su estructura molecular que pudieran facilitar un reconocimiento selectivo del analito. Además, la concentración señalada varía según el periodo del ciclo en el que nos encontremos. Así, esta hormona está presente en leche de vaca a unos niveles de concentración de 5 µg/L antes de la ovulación, aunque superiores a dicha concentración tras la ovulación. Por otro lado, si la hembra se queda preñada, los niveles elevados de progesterona se mantienen (véase Figura 37) [7]. De este modo, la monitorización de esta hormona en la leche de las hembras mamíferas nos serviría tanto para poder determinar el momento fértil del animal como para realizar el diagnóstico de gestación posterior.



**Figura 37.** Variación de los niveles de progesterona durante el ciclo estral del ganado vacuno. **A)** Esquema de madurez del ciclo menstrual de una vaca. La parte superior de la figura muestra la histología ovárica, mientras que por debajo se observa el cambio relativo en la concentración de progesterona para las diferentes fases. **B)** Concentraciones de progesterona en leche antes y después del estro (día 0) para las vacas a las que se hizo (línea sólida con cuadrados) o no (línea punteada de círculos abiertos) concebir mediante inseminación en ese celo. Figuras reproducidas de la Ref. 6.

Debido a la pobre reactividad química de los esteroides (puesto que no presentan grupos funcionales activos en su estructura molecular) no hay mucha variedad de ensayos para la determinación de estas hormonas (y en particular para la progesterona). Entre los métodos existentes para determinación de progesterona cabe destacar las técnicas de separación fisicoquímicas con detección por espectrometría de masas GC-MS y LC-MS [8,9,10] y las técnicas inmunológicas en sus diversos formatos de ensayo [11-14]. Sin embargo, no se han desarrollado muchos ensayos con marcas fluorescentes y resulta interesante estudiar las ventajas que aportarían dichas marcas en este campo, teniendo en cuenta todo lo expuesto en la Introducción.

#### IV.1.2.2. Diseño del formato de inmunoensayo

Dado que el inmunoensayo que se va a desarrollar es para la determinación de moléculas pequeñas (haptenos) el formato de ensayo queda restringido al modo competitivo. Este tipo de inmunoensayo se puede llevar a cabo a través de dos vías:



- a) Inmovilización del Ab: en este ensayo competitivo el antígeno y el antígeno marcado (trazador) compiten por el limitado número de sitios de unión del Ab inmovilizado.
- b) Inmovilización del Ag: en este caso la competencia se establece entre el Ag en disolución y el Ag inmovilizado, añadiendo una cantidad conocida de Ab marcado (que será el trazador en este tipo de ensayo).

En ambos casos obtendremos una curva de inhibición (a mayor concentración de Ag en la muestra menor señal será registrada) de la que obtener los parámetros analíticos. En la presente Tesis Doctoral se investigarán los dos formatos de inmunoensayo competitivo, seleccionando finalmente la vía que mejores resultados dé, o bien, la que aporte algún tipo de beneficio como sencillez de obtención del trazador, cantidad de reactivos necesaria, etc.

#### IV.1.2.3. Bioconjugación y caracterización del bioconjugado

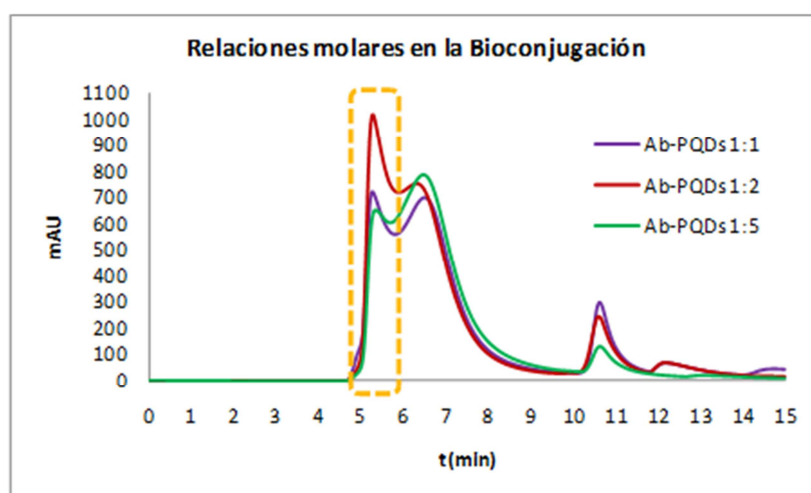
Como se ha comentado en la sección de Experimental, las bioconjugaciones (marcaje de biomoléculas con nanomateriales) realizadas a lo largo del trabajo se basan en la química de la carbodiimida.

Al proponernos evaluar las dos vías de inmunoensayo competitivo se hace necesario sintetizar, purificar y caracterizar dos trazadores: el Ab marcado (Ab-QD) y el Ag marcado (Ag-QD). Así, dependiendo del trazador se desarrollarán diferentes estrategias tanto de purificación (SEC *vs* UHF) como de caracterización (ELISA *vs* Test de Bradford) dada la distinta naturaleza de la biomolécula a marcar. Este estudio es de vital importancia no sólo por la necesidad de obtener nuestro trazador sino porque uno de los retos actuales dentro de la investigación del empleo de QDs como marcadores en el desarrollo de metodologías bioanalíticas es la necesidad de disponer de procedimientos de purificación y caracterización eficaces con el objeto de conseguir una separación entre bioconjugado y proteína libre efectiva, y así, poder llevar a cabo inmunoensayos cuantitativos reproducibles y fiables.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### a) Obtención y caracterización del trazador Ab-QD

En este trabajo se seleccionó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-progesterona (Abpro) y QDs de CdSe/ZnS. A la hora de llevar a cabo su bioconjugación en un vial se añadieron las cantidades necesarias de Abpro, QDs y EDC y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h con agitación constante. Las relaciones molares entre Abpro y QDs utilizadas en la bioconjugación fueron optimizadas, ensayándose distintas relaciones Abpro:QDs (1:1; 1:2 y 1:5) y trabajando siempre con el mismo exceso de EDC (1:1500; Abpro:EDC). Se tiende a trabajar con cantidades equimoleculares o mayores de QDs para intentar asegurar que todo el Ab o la mayor parte queda marcado tras la reacción. El objetivo será obtener aquella relación para la cual tengamos la máxima fluorescencia del QD manteniendo intacta la capacidad de reconocimiento del Abpro. Este estudio se llevó a cabo siguiendo un procedimiento previamente desarrollado en nuestro laboratorio [ 15 ] basado en una separación cromatográfica SEC-Vis/UV (véase Figura 38) donde se pueden distinguir los componentes de la mezcla de la reacción de bioconjugación (bioconjugado, PQDs libres y Ab libre).



**Figura 38.** Estudio de las relaciones molares en la bioconjugación Ab-PQDs. En los cromatogramas obtenidos por SEC-Vis-UV (214 nm) se estudiaron tres relaciones molares Ab:PQDs diferentes (1:1; 1:2 y 1:5) y en ellos podemos observar 3 picos: a 5 min (bioconjugado), 7 min (PQDs libres) y 11 min (Ab libre). Así, la relación molar escogida fue 1:2 (rojo) por presentar un mayor rendimiento en la bioconjugación, tener una intensidad de señal mayor y tras haber comprobado que el Ab bioconjugado mantenía su capacidad de reconocimiento.

Así, se inyectaron en el sistema SEC-Vis/UV tres alícuotas de 50  $\mu$ L de cada una de las mezclas de reacción resultante de la bioconjugación realizada con las diferentes relaciones molares (QDs:Ab:EDC) investigadas. De este modo se observó que la relación óptima era 2:1:1500 ya que es en esta mezcla donde se alcanza un mayor rendimiento en la bioconjugación, consiguiendo la mayor intensidad de señal para el bioconjugado y comprobándose a posteriori que el Ab bioconjugado mantenía su función de reconocimiento de su antígeno mediante un ensayo ELISA espectrofotométrico.

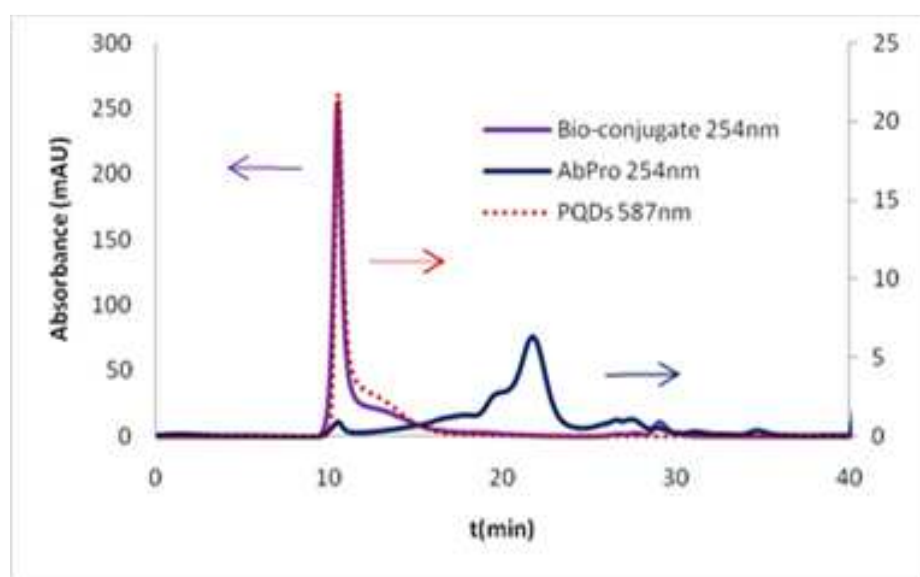
Como podemos comprobar en la Figura 38, la reacción de bioconjugación no se produce al 100%, por lo que tras el marcaje del anticuerpo con los QDs se requiere una etapa de purificación donde se eliminarán los excesos de reactivos y los productos secundarios que se puedan haber formado.

En este caso la purificación del bioconjugado sólo se puede realizar por SEC debido al tamaño (peso molecular) del Abpro (150 kDa); la UHF no sería capaz de separar Abpro de Ab-QD ya que el mayor tamaño de poro de membrana disponible es de 100 kDa.

En la purificación por SEC se empleó una columna Superdex 200 y empleando  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM pH 7,4 como fase móvil. El flujo y tiempo de adquisición del cromatograma fueron optimizados (0,75 mL/min y 40 min, respectivamente) atendiendo a la necesidad de conseguir la máxima resolución de picos en el menor tiempo posible. En un primer momento el detector empleado fue Vis/UV en el que las longitudes de onda monitorizadas fueron 214, 254, 280 nm específicas de proteínas y 587 nm característica del excitón de los QDs empleados en esta bioconjugación. Los resultados obtenidos en este estudio aparecen reflejados en la Figura 39. Como se puede apreciar en dicha Figura la columna Superdex-200 no es capaz de discriminar entre el bioconjugado y los QDs libres. No obstante, esto no es impedimento para seguir utilizando dicha columna ya que por contra separa eficazmente el bioconjugado del Ab libre, que es lo que más nos interesa ya que es el que puede interferir en el posterior inmunoensayo. Los QDs sin conjugar que puedan coeluir con el bioconjugado no interfieren en la reacción inmunológica y además se eliminan durante las etapas de lavado del inmunoensayo. No obstante, al trabajar con esta columna, que no es capaz (en las condiciones de trabajo

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

optimizadas) de separar los QDs libres de los conjugados al anticuerpo, tenemos que asegurarnos de que en ese primer pico hay bioconjugado (comprobando por un lado que hay QDs (fluorescentes) pero que al mismo tiempo también tenemos Ab). Para ello, se necesita acudir a otros detectores más específicos que el Vis/UV como son el ICP-MS y la Fluorescencia molecular. De este modo, conseguiremos información elemental y molecular complementaria que nos dirá inequívocamente si tenemos QDs bioconjugados.



**Figura 39.** Purificación del bioconjugado Ab-QD por SEC-UV/Vis . En el gráfico se muestran los cromatogramas superpuestos de un patrón de Ab anti-progesterona (azul), un patrón de PQDs (línea roja punteada) y el cromatograma correspondiente a la reacción de bioconjugación (morado).

Así pues, en una primera etapa se procedió a realizar un acoplamiento en línea de la cromatografía de exclusión por tamaños a un detector elemental específico (ICP-MS) para monitorizar dos elementos:

- El  $^{32}\text{S}$  que nos indicará la presencia o ausencia de Ab y/o QDs en las diferentes alícuotas.
- El  $^{114}\text{Cd}$  que nos indicará la presencia o ausencia de QDs en las distintas fracciones.

Los estudios con esta técnica fueron realizados en un equipo de ICP-MS de alta resolución Element2 ya que necesitábamos medir el azufre ( $^{32}\text{S}$ ) para monitorizar el anticuerpo, y dicho elemento sólo puede ser monitorizado en un ICP-MS de alta resolución que permita discriminar entre la masa isotópica  $^{32}\text{S}$  y su interferencia isobárica ( $\text{O}_2^+$ ) [16]. Gracias al carácter multielemental de este detector decidimos registrar simultáneamente el cadmio ( $^{114}\text{Cd}$ ) procedente de los QDs. Las condiciones experimentales de trabajo fueron optimizadas y se recogen en la Tabla 5.

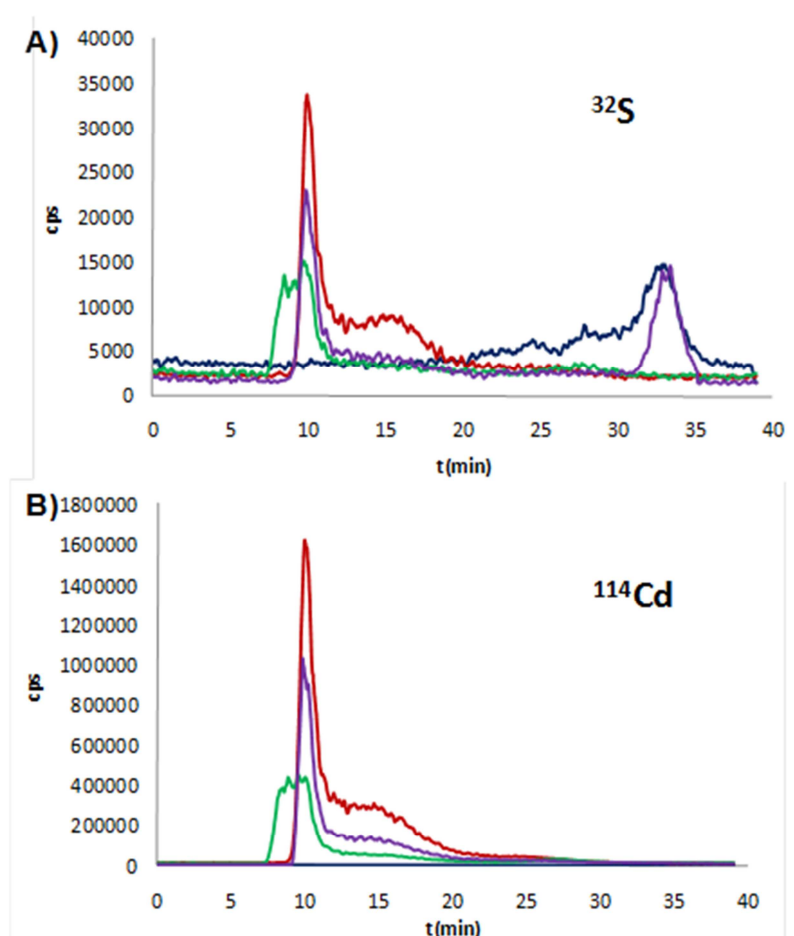
**Tabla 5.** Condiciones experimentales de trabajo optimizadas para el equipo HR-ICP-MS ELEMENT2. (\*) El “*Settling time*” varía según el isótopo que se mida.

<b>Condiciones de operación del equipo</b>	
Potencia aplicada	1350 W
Flujo de gas refrigerante	15,50 L/min
Flujo de gas portador	0,901 L/min
Flujo de gas auxiliar	0,90 L/min
<b>Parámetros de adquisición</b>	
<i>Settling time</i>	0,001-0,300 s *
<i>Mass window</i>	100
Tiempo de integración	0,060 s
Puntos por pico	12
<i>Runs</i>	1200
<i>Passes</i>	1

Hay que mencionar que a la hora de hacer la bioconjugación se prepararon dos viales paralelamente: en uno se realizó el proceso de bioconjugación normal (Ab+QDs+EDC) y en el segundo se llevó a cabo la simple mezcla de Ab y QDs para poder distinguir si se estaba produciendo la bioconjugación (es decir, que estábamos formando el enlace amida) o si los resultados obtenidos se debían simplemente a fenómenos de adsorción inespecífica Ab-QDs. Una vez hechas las reacciones, una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de cada una de las disoluciones de cada vial se inyecta en el sistema SEC-ICP-MS. El resultado obtenido se muestra en la Figura 40. Como se puede observar, el sistema experimental permite una adecuada separación entre el Abpro (línea azul, sólo se detecta  $^{32}\text{S}$  y no  $^{114}\text{Cd}$ ) y el Ab-QD (línea verde, hay señal tanto de  $^{32}\text{S}$  como de  $^{114}\text{Cd}$ ). Además, se observa un comportamiento cromatográfico totalmente diferenciado entre la muestra procedente del vial en el que simplemente se llevó a cabo una mezcla y

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

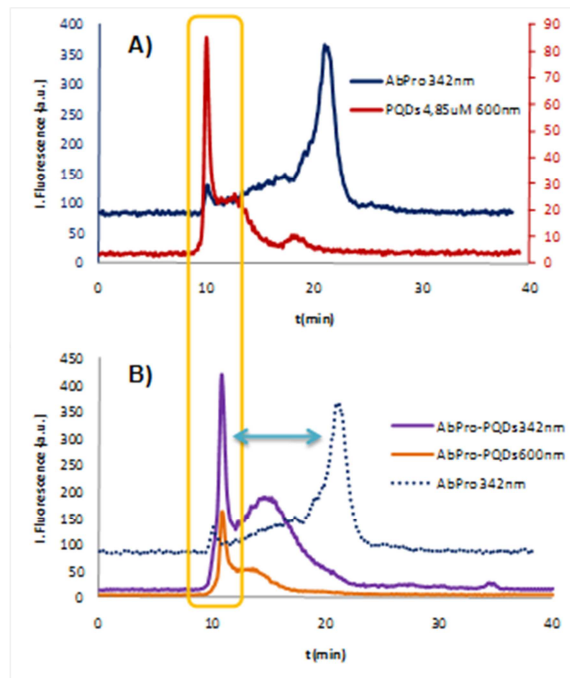
la muestra que contiene el vial en el que se realizó el proceso de bioconjugación. Así, en el primer caso (mezcla, línea morada) se obtiene un cromatograma en el que se observan dos picos, bien diferenciados, al monitorizar  $^{32}\text{S}$  correspondientes a QDs y Abpro. Sin embargo, el cromatograma de la inyección de la muestra resultante del proceso de bioconjugación (línea verde) se obtiene un único pico que parece presentar una doble contribución: una parte de dicho pico parece encajar con el perfil del patrón de los QDs libres; y también aparece una contribución previa, lo que podría indicar que estamos frente a una especie más voluminosa que podría corresponder al bioconjugado formado.



**Figura 40.** Cromatogramas registrados mediante SEC-ICP-MS. En esta figura podemos ver dos gráficos A y B en los que se muestran los cromatogramas superpuestos de los patrones de Abpro (azul); QDs (rojo) y las muestras de bioconjugado (verde) y mezcla (morado) monitorizando  $^{32}\text{S}$  y  $^{114}\text{Cd}$  respectivamente.

El principal inconveniente que presenta la técnica SEC-ICP-MS a la hora de su empleo para llevar a cabo la purificación del bioconjugado, se encuentra en la recolección de fracciones, ya que se tendría que hacer sin poder visualizar el cromatograma (basándonos en caracterizaciones previas) o bien perderíamos parte de la muestra haciendo una división de flujo, dado que el ICP-MS es una técnica destructiva. Por este motivo, en una etapa posterior se decidió recurrir a una detección fluorescente.

Antes de llevar a cabo la monitorización de las distintas fracciones eluidas (ya bien caracterizadas) y asegurar una adecuada recolección de las mismas se realizó la caracterización por fluorescencia de los componentes de la mezcla de reacción para comprobar que podían ser monitorizados. Así, tenemos los siguientes pares de excitación-emisión: 280/332 nm para el polímero que recubre a los QDs; 280/342 nm para la monitorización del Abpro; y 350/600 nm para los QDs. Las condiciones instrumentales de trabajo son: slits 10/10 nm; PMT 800v; Ave time 0.1 s y tiempo total de cromatograma 40 min. Los resultados obtenidos con esta técnica en la purificación del bioconjugado se muestran en la Figura 41.



**Figura 41.** Purificación del bioconjugado via SEC-Fluorescencia. **A)** Cromatogramas correspondientes a los patrones de QDs (rojo) y Abpro (azul). **B)** Cromatograma de Ab-QD registrado a las longitudes de onda características de los QDs (600 nm) y el Abpro (342 nm). Con trama punteada aparece representado el patrón de Abpro para que se pueda apreciar bien el desplazamiento del pico del bioconjugado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En dicha Figura 41, se pueden ver los cromatogramas correspondientes obtenidos tras la inyección en el sistema de los patrones de QDs y Abpro (Figura 41A) y el obtenido durante la purificación del bioconjugado (Figura 41B). En este último aparece solapado con una línea punteada el cromatograma correspondiente al patrón de Abpro para destacar el desplazamiento del pico de la proteína. En base a este resultado podemos concluir que el sistema SEC-Fluorescencia permitirá llevar a cabo la purificación del bioconjugado, eliminando por completo los restos que puedan quedar de Abpro libre, mediante la recolección de la fracción correspondiente al primer pico (zona enmarcada).

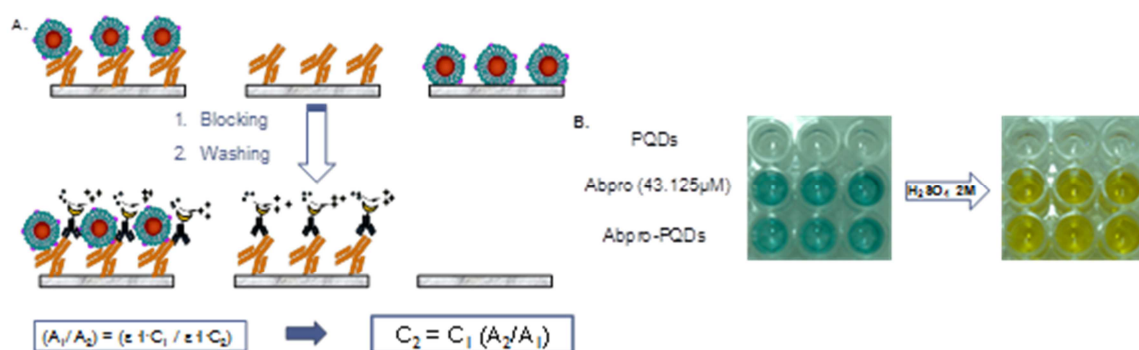
Una vez que tenemos la fracción purificada cabe hacerse preguntas como ¿Qué concentración de Abpro hay en el bioconjugado? o ¿Mantiene el Ab su funcionalidad? Estas cuestiones de relevante importancia para el posterior desarrollo del inmunoensayo se abordan a continuación.

Para estimar la concentración de Ab presente en el bioconjugado purificado se estudiaron distintas metodologías: dos de ellas colorimétricas y comúnmente utilizadas para la determinación de la concentración total de proteína en una muestra dada (Test de Bradford y el método del Nomograma) no ofrecieron resultados satisfactorios al interferir los QDs (absorben a las longitudes de onda de medida) en la determinación. Tras los intentos fallidos con metodologías bien asentadas, se ideó un método alternativo basado en la realización de un ensayo ELISA espectrofotométrico, en el que gracias a la señal de un patrón de anticuerpo de concentración conocida y aplicando la ecuación de Lambert-Beer pudiéramos obtener la concentración del anticuerpo en la solución muestra.

El fundamento o esquema del procedimiento a seguir se puede ver en la Figura 42A. Para llevar a cabo este ensayo se empleó el kit comercial *TMB Substrate Kit*. De este modo, se inmoviliza en los pocillos de una placa ELISA por un lado un patrón de Abpro de concentración de 1 mg/mL y un patrón de los QDs utilizados en la bioconjugación y, por otro lado, la disolución del Ab-QD purificada de concentración desconocida y a determinar (Figura 42B). Tras incubar estas disoluciones a 37 °C durante 6 h, se bloquea la placa con una disolución de BSA 1% en PBS 10 mM pH 7,4, dejándola 8-10 horas a 4 °C. Tras el pertinente lavado de la placa con PBS-Tween20, se adiciona el anticuerpo



secundario marcado con peroxidasa en dilución 1:1000 y se deja incubando a 37 °C, durante 2 h. El anticuerpo que no ha reaccionado se elimina lavando nuevamente la placa. Después de asegurar que la placa está completamente seca se añaden los substratos de la enzima (TMB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dando lugar a la aparición de una coloración azul. Para detener la reacción enzimática se emplea ácido sulfúrico 2 M (provocando además un viraje a amarillo en la coloración). En este momento se hacen las medidas de absorbancia a 490 nm en un lector de placas de absorbancia. Como se observa en la Figura 42B, este ensayo dio un resultado positivo en la evaluación de un patrón de Ab de concentración conocida; además, los QDs no interfieren en el ensayo ya que no dan una señal apreciable. Por tanto, este ensayo se podría emplear para estimar rutinariamente la concentración del Ab en el bioconjugado. En este caso concreto la concentración encontrada para el bioconjugado fue de 36,12 μM.



**Figura 42.** Ensayo ELISA espectrofotométrico para la determinación de la concentración del Ab en el bioconjugado. **A.** Esquema del procedimiento experimental realizado y ecuación de Lambert-Beer para llevar a cabo los cálculos de la concentración. **B.** Imágenes mostrando el resultado obtenido en uno de los ensayos realizados con el kit de TMB.

De forma análoga se puede comprobar que el Ab mantiene su funcionalidad tras el marcaje y posterior purificación, realizando un ensayo ELISA en el que el Ag (progesterona) se inmoviliza en la placa, y procediendo a continuación de la misma manera que se ha explicado para la estimación de la concentración del Ab en el bioconjugado. De este modo, ya tenemos el trazador Ab-QD sintetizado, purificado y caracterizado.

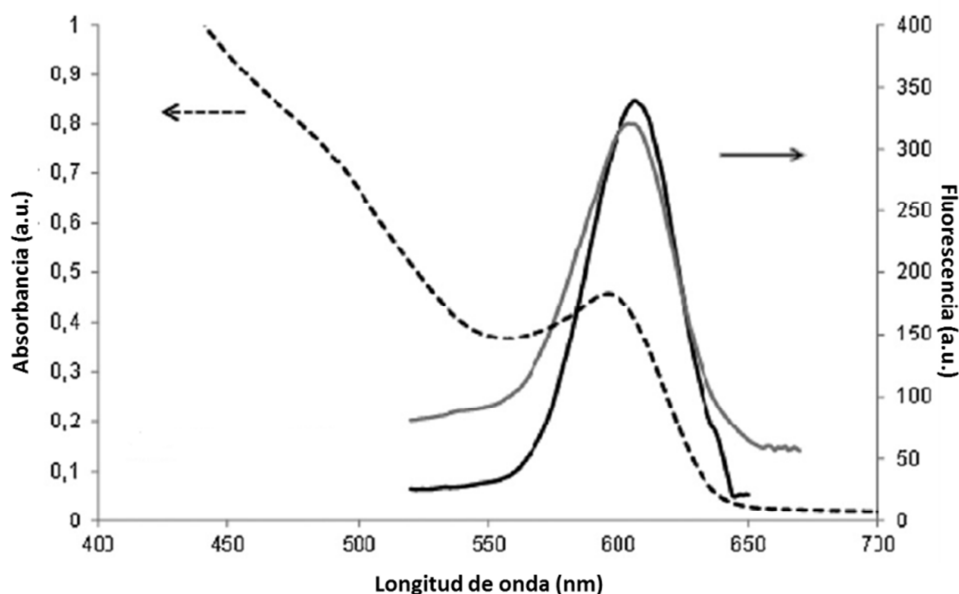
### b) Obtención y caracterización del trazador Ag-QD

Dado que los antígenos con los que se va a trabajar en esta Tesis son haptenos no se puede realizar el marcaje directo con QD ya que habría muchas posibilidades de bloquear el epitopo del hapteno (región por la que interactúa con el Ab) impidiendo así su reconocimiento por parte del Ab. Por ello, se requiere unir el hapteno a una molécula portadora, generalmente una proteína. En este caso concreto existía disponible comercialmente el conjugado progesterona-BSA (ProBSA) que fue el seleccionado para llevar a cabo el marcaje con QDs. De este modo, los QDs interaccionarán con los grupos amino de la proteína dejando libre y disponible para su reconocimiento al hapteno. Nuevamente se optimizaron las relaciones molares ProBSA:QD de la reacción de bioconjugación, ensayándose relaciones comprendidas entre 1:1 y 1:5. Como relación optima de trabajo se seleccionó 2:1:1500 (QD:ProBSA:EDC) ya que ofrecía la mayor señal fluorescente del bioconjugado.

Tras la reacción de bioconjugación se requiere una etapa de purificación para eliminar el exceso de reactivo y subproductos. En este caso y teniendo en cuenta de nuevo los pesos moleculares (ProBSA: 74,7 kDa y ProBSA-QD > 150 kDa) la técnica de UHF fue escogida para tal fin por su mayor simplicidad y rapidez en comparación con la SEC. De este modo se comprobó que mediante el empleo de filtros de membrana de 100 kDa y trabajando con unas condiciones experimentales de 5000 rpm, 5 min y 3 lavados con la disolución reguladora de PBS 10 mM pH 7,4, se lograba la completa purificación del trazador ProBSA-QD. Esto se comprobó realizando el test de Bradford a las fracciones filtradas y preconcentradas tras cada lavado, viéndose que el ensayo resultaba negativo (no hay señal, no hay proteína en el medio) tras el tercer lavado.

Una vez purificado el ProBSA-QD se lleva a cabo la caracterización del bioconjugado. En un primer momento se evalúa el posible efecto de la bioconjugación sobre las propiedades fotoluminiscentes de los QDs mediante el registro de un barrido de fluorescencia de dos alícuotas: el bioconjugado ProBSA-QD y un patrón de referencia de QD. Como se puede observar en la Figura 43 la emisión fluorescente de los QDs no se ve afecta tras la reacción de bioconjugación, ya que el trazador (ProBSA-QD) emite una

señal fluorescente intensa a la misma longitud de onda que el patrón de QD de referencia.



**Figura 43.** Propiedades espectroscópicas de los QDs: espectro de absorción (línea punteada) y espectro de emisión fluorescente (línea negra). También se recoge el espectro de emisión fluorescente del bioconjugado ProBSA-QD (línea gris).

El siguiente paso es conocer la concentración de Pro que tenemos en el trazador. Para ello se desarrolló una estrategia muy sencilla, basada en el Test de Bradford, para estimar de manera indirecta dicha concentración. Como ya se ha comentado con anterioridad (véase sección Experimental) el Test de Bradford es un ensayo colorimétrico para la determinación de la concentración total de proteína presente en una muestra. Como sabemos, los QDs interfieren en la medida de este ensayo por lo que el modo de operar es el recogido en el párrafo siguiente.

Durante la etapa de purificación por UHF se generan dos fracciones: el filtrado (exceso de ProBSA sin conjugar) y el purificado (ProBSA-QD, el trazador). Por tanto, si determinamos la concentración de BSA en el conjugado patrón ProBSA ( $[BSA]_{ST}$ ) y la concentración de BSA en la fracción del filtrado  $[BSA]_{FIL}$  (que se preconcentrará hasta el volumen inicial utilizado en la bioconjugación), por diferencia entre ambas concentraciones obtendremos la concentración de BSA en el trazador  $[BSA]_{Bio}$  (véase

Ecuación 9). Por otro lado, las especificaciones del conjugado ProBSA informan de que la relación hapteno:proteína es de 20:1. Con este dato y conociendo la  $[BSA]_{Bio}$ , aplicando la Ecuación 10 se obtiene finalmente la concentración de Pro en el trazador  $[Pro]_{Bio}$ . Además, una vez conocidos todos estos datos también es posible calcular el rendimiento de la bioconjugación a través de la Ecuación 11. En todos los casos la bioconjugación ProBSA-QD obtuvo un rendimiento en torno al  $95 \pm 2\%$ .

$$[BSA]_{Bio} = [BSA]_{ST} - [BSA]_{FIL} \quad \text{Ecuación 9}$$

$$[Pro]_{Bio} = [BSA]_{Bio} \left( \frac{20M_{Pro}}{M_{BSA}} \right) \quad \text{Ecuación 10}$$

$$Rto (\%) = \left( \frac{mol_{BSA(ST)} - mol_{BSA(FIL)}}{mol_{BSA(ST)}} \right) 100 \quad \text{Ecuación 11}$$

donde  $M_{Pro}$  y  $M_{BSA}$  son las masas moleculares de la progesterona y la BSA respectivamente; y siendo  $mol_{BSA(ST)}$  y  $mol_{BSA(FIL)}$  los moles de BSA que hay en el conjugado ProBSA de referencia y en el filtrado.

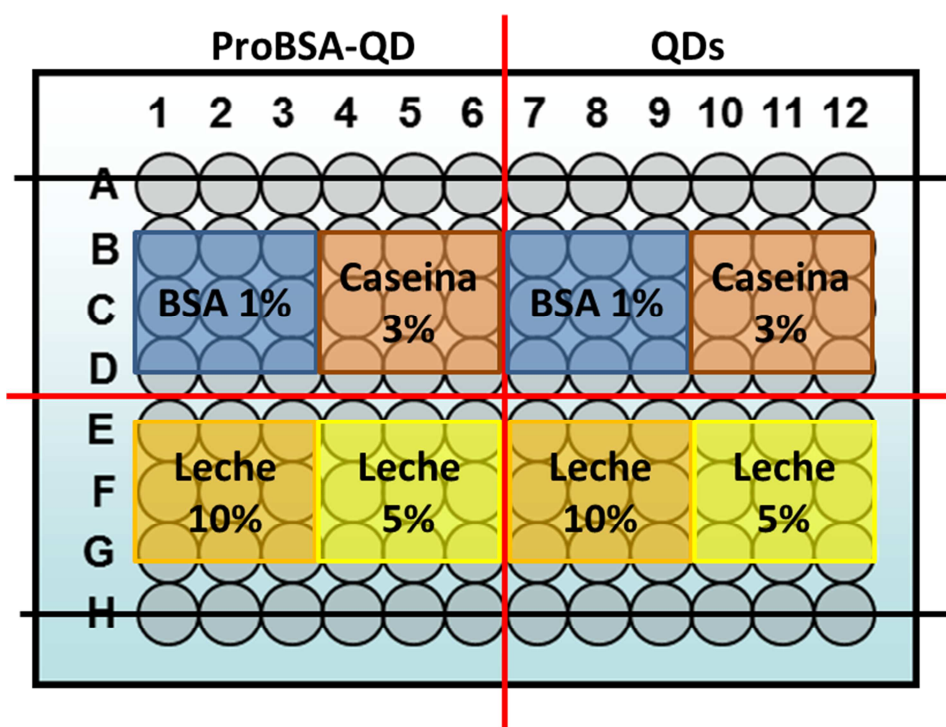
A la vista de los resultados obtenidos queda puesto de manifiesto que la metodología de marcaje del antígeno es mucho más sencilla, rápida y barata (tanto por la etapa de purificación como por la de caracterización) que el marcaje de anticuerpo, por lo que para el futuro desarrollo del inmunoensayo se optó por trabajar con el trazador ProBSA-QD.

#### IV.1.2.4. Desarrollo del inmunoensayo basado en QDs

A la hora de poner a punto un inmunoensayo competitivo fluorescente basado en QDs y teniendo en mente el esquema general del procedimiento de inmunoensayo expuesto en la sección de Experimental, existen varios parámetros y/o condiciones experimentales a optimizar. En este apartado iremos viendo y comentando cada uno de estos puntos.

a) Optimización del tapizado y estudio de adsorciones inespecíficas

En este apartado se realizará la optimización conjunta tanto de la concentración de la disolución de tapizado (AbPro) como la composición y concentración de la disolución de bloqueo que mejor evite las adsorciones inespecíficas. Para ello se prepararán distintas placas ELISA donde se inmovilizarán distintas concentraciones de una disolución de AbPro (0,3; 1; 3; y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y para concentración de tapizado se evaluarán 4 tipos de disolución de bloqueo: BSA al 1%, caseína al 3%, y leche en polvo al 5 y 10%. Finalmente, a la mitad de la placa se añadirá el trazador en exceso y como control de las adsorciones inespecíficas a la otra mitad de la placa se añadirá la misma concentración de QDs. Un esquema del procedimiento experimental se recoge en la Figura 44. Tras las correspondientes medidas de fluorescencia, en un lector de placas, el experimento concluyó que las mejores condiciones de ensayo eran aquellas en las que se trabajaba con una concentración de tapizado de 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y con una disolución de bloqueo de caseína al 3%.



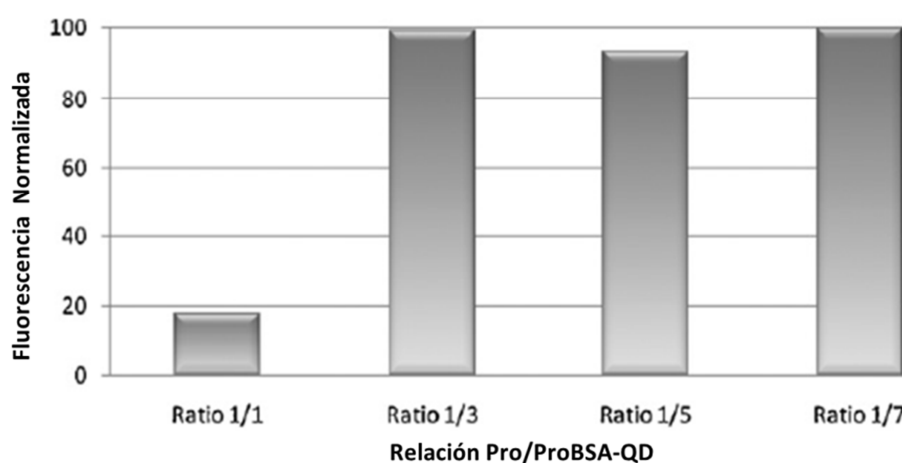
**Figura 44.** Esquema representativo del proceso experimental llevado a cabo para la optimización de las etapas de tapizado y bloqueo. Para cada concentración de AbPro se realizó el ensayo aquí representado. Los pocillos de las filas A y H no se emplearon.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### b) Concentración de trazador y relación muestra:trazador (Ag:Ag\*)

Se evaluaron tres concentraciones de trazador (ProBSA-QD: 0,5; 1; y 5  $\mu\text{g/mL}$ ) con el fin de obtener el mejor límite de detección y rango lineal del inmunoensayo teniendo en cuenta el nivel mínimo de Pro en leche (1-5  $\text{ng/mL}$ ). Así se llevó a cabo un inmunoensayo fluorescente con las concentraciones de tapizado y bloqueo optimizadas y se obtuvo que la concentración óptima de trazador era de 1  $\mu\text{g/mL}$ .

Otro parámetro importante a tener en cuenta en el desarrollo del inmunoensayo basado en QDs es la relación muestra:trazador; es decir, hay que encontrar la mejor relación Ag libre: Ag marcado (Ag:Ag\*) para obtener la máxima señal de fluorescencia con el mínimo gasto posible de trazador. Por tanto distintas relaciones Ag:Ag\* fueron ensayadas en unos valores comprendidos entre 1:1 y 1:7. En la Figura 45 se recogen los resultados obtenidos de este experimento, siendo la relación 1:3 la escogida como óptima.



**Figura 45.** Variaciones en la emisión fluorescente del trazador ProBSA-QD tras haber sido reconocido por el Ab en un inmunoensayo competitivo en el que se ensayaron distintas relaciones muestra:trazador.

### c) Fotoactivación: mejora de la señal de los QDs

El decaimiento en la fluorescencia de los QDs que se puede producir tras ciertas reacciones y/o modificaciones químicas de su superficie (p.e. proceso de solubilización, bioconjugación) y se atribuye generalmente a la formación indeseada de defectos

superficiales durante dichos procesos [17]. También es por todos conocido que la exposición de los QDs a luz UV o visible (fotoactivación) es una potente herramienta para incrementar la fotoluminiscencia de estos nanomateriales tras su síntesis y posteriores funcionalizaciones [18,19]. De hecho, en la literatura se pueden encontrar diversas interpretaciones para este fenómeno [20,21].

De modo general, la esencia de la fotoactivación parece ser la eliminación de los defectos superficiales; esto es, el suavizado o pulido de la superficie del QD a través de procesos de fotocorrosión. Por otro lado, las moléculas de agua que se adsorban a la superficie del nanocrystal pueden actuar como mediadoras de la oxidación de la superficie del QD provocando un desplazamiento de su emisión hacia longitudes de onda más pequeñas e introduciendo nuevos defectos superficiales que provocan un descenso en la intensidad de la señal emitida. La competencia entre estos dos procesos encontrados podría explicar el complejo comportamiento de la fotoactivación de los QDs observado en medios acuosos.

Así, en nuestro caso concreto decidimos realizar un pequeño estudio sobre este fenómeno para ver si realmente afectaba a la fluorescencia de nuestros QDs en el inmunoensayo, lo que supondría una mejora de la señal. Por lo que, introducimos un paso de fotoactivación tras el último lavado de la placa ELISA y previo a la medida fluorescente del inmunoensayo. Se evaluaron distintos tiempos de fotoactivación (30 min, 1-3 h) observándose que a mayor tiempo de exposición mayor incremento de la señal se obtenía. Con el fin de no alargar el tiempo de análisis y viendo que para 2 h de exposición bajo luz UV se obtenía un incremento de la señal fluorescente respecto a placas sin fotoactivar de hasta 3 veces se seleccionó dicho tiempo de fotoactivación.

Cabe mencionar que este paso de fotoactivación podría considerarse opcional y emplearlo en los casos donde sea necesario (mayor sensibilidad). No obstante, para favorecer la medida de la señal fluorescente de los QDs, en un último paso se añade a la placa de inmunoensayo 50  $\mu$ L/pocillo de la disolución reguladora SBB 50 mM, pH 12 que facilita la dispersión de los QDs procedentes del trazador (ProBSA-QD) en un medio en el que son muy estables y mejorando la medida de los mismos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### d) Calibrado en leche

Una vez optimizados todos los parámetros y condiciones experimentales necesarios para el desarrollo del inmunoensayo competitivo fluorescente basado en QDs, el protocolo general de ensayo se recoge en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Condiciones experimentales optimizadas para un inmunoensayo competitivo fluorescente basado en CdSe/ZnS QDs.

<b>Etapas del inmunoensayo</b>	<b>Procedimiento</b>
1. Tapizado	100 $\mu$ L/pocillo Ab incubado a 37 °C, 6 h.
2. Bloqueo	200 $\mu$ L/pocillo Caseína 3% incubado a 4 °C, 10-12 h.
3. Lavado	200 $\mu$ L/pocillo PBS-Tween20 pH 7,4; 3 veces.
4. Reacción inmunológica	200 $\mu$ L/pocillo mezcla: muestra o estándar + trazador.
5. Lavado	200 $\mu$ L/pocillo PBS-Tween20 pH 7,4; 3 veces.
6. Fotoactivación	Lámpara UV (270 nm), 2 h.
7. Redisolución	50 $\mu$ L/pocillo SBB 50 mM, pH 12.
8. Medida de la fluorescencia	Cary Eclipse (Varian-Agilent technologies)

Debido a que en este Capítulo nuestro objetivo final es la determinación de progesterona en leche de ganado bovino, en una primera aproximación realizamos dos calibrados de inmunoensayo en paralelo: uno en medio acuoso (medio en el que se realizaron todas las optimizaciones) y otro en leche (matriz en la que se encuentra nuestro analito) dado que la leche presenta una matriz muy compleja (contiene azúcares, lípidos, proteínas) que puede afectar a la emisión de los QDs. Efectivamente, los resultados mostraron un decaimiento de la fluorescencia muy importante y gracias al inmunoensayo hecho en paralelo en medio acuoso pudimos atribuir este apagado de la fluorescencia del QD a posibles interacciones inespecíficas entre especies procedentes de la leche y la superficie del nanomaterial.

Para intentar eliminar la interferencia de la matriz en la medida y no introducir un tratamiento de muestra complejo decidimos probar a diluir la leche. Así, se llevaron a cabo inmunoensayos análogos ensayando distintas diluciones de la leche (1:1 - 1:15) con agua Milli-Q. Como se puede observar en la Figura 46, la simple dilución de la leche es suficiente para evitar las interacciones inespecíficas de las especies de la matriz con los



QDs, produciéndose una recuperación de la señal fluorescente. Se seleccionó la dilución más baja requerida para minimizar la interferencia de la matriz (1:10).

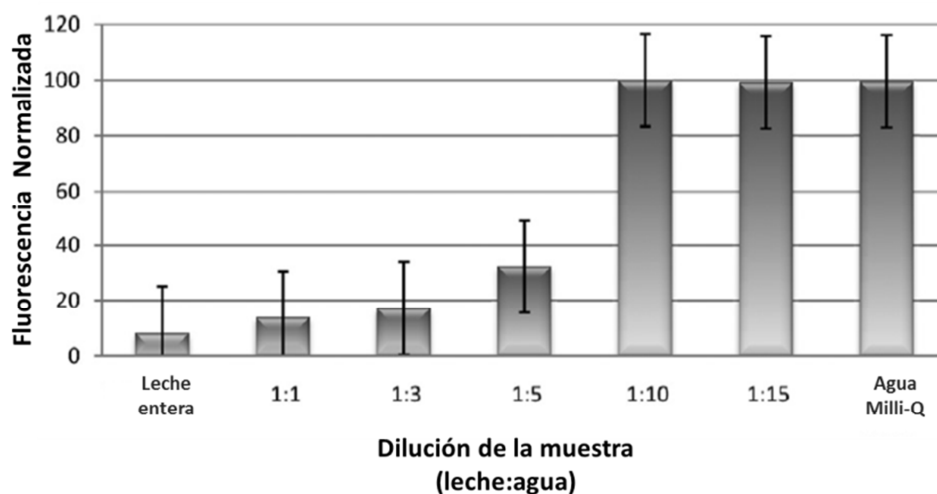


Figura 46. Estudio sobre la influencia de la matriz de la leche sobre la emisión fluorescente de los QDs.

Una vez solventado el problema de la matriz y con el objeto de conocer/evaluar los parámetros analíticos ofrecidos por el bioensayo aquí desarrollado, fueron ensayadas distintas concentraciones de progesterona en leche entera comercial (leche empleada como blanco) siguiendo el protocolo propuesto (Tabla 6) para así obtener la curva de inhibición correspondiente. Dicha curva de inhibición se ajusta a una ecuación de cuarto parámetro (Ecuación 12) y fue representada utilizando el programa SOFmax Pro Software (véase Figura 47).

$$y = \left[ \frac{(A-D)}{(1+(x/c)^B)} \right] + D \quad \text{Ecuación 12}$$

siendo A,B, C y D los parámetros de la curva, x la concentración de la muestra, e y la señal obtenida. A representa la máxima señal obtenida en el ensayo; B es la pendiente de la curva; C es la sensibilidad del ensayo o IC<sub>50</sub>; y D es la señal del fondo.

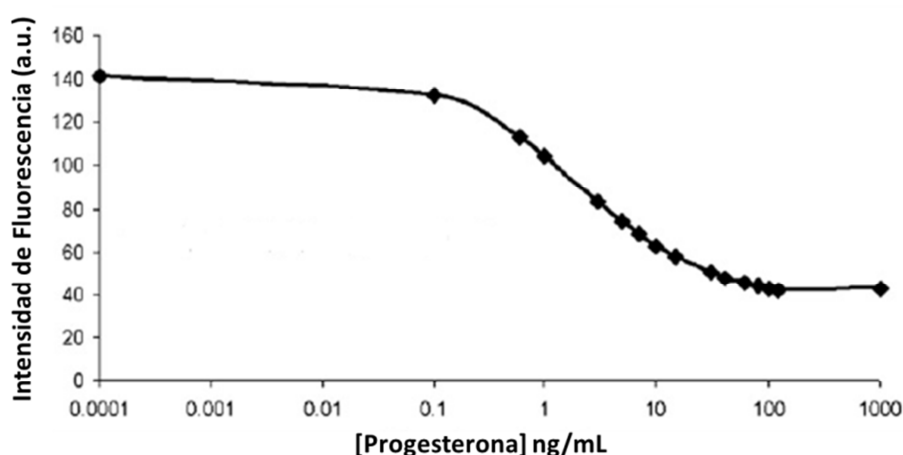
Los parámetros analíticos (recogidos en la Tabla 7) se obtuvieron atendiendo al criterio de las concentraciones de inhibición (IC); es decir concentraciones para las cuales la señal analítica se ve inhibida en un porcentaje concreto. Así, el límite de detección

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

viene dado por  $IC_{10}$  (concentración para la cual se ha inhibido un 10% de la señal), el límite de cuantificación es  $IC_{20}$ , el rango lineal de manera general está definido por el intervalo de concentraciones entre  $IC_{20}$  e  $IC_{80}$ , y finalmente la sensibilidad del ensayo está fijada por  $IC_{50}$ . Por otro lado, la precisión del ensayo se estimó como la desviación estándar relativa (RSD) de las señales obtenidas para un análisis por triplicado de una muestra de leche que contenía 4 ng/mL de progesterona en dos días diferentes. La reproducibilidad (precisión inter-ensayo) y la repetitividad (precisión intra-ensayo) se evaluaron y estimaron como RSD de las señales medidas. Para ello se realizaron tres inmunoensayos independientes (tres curvas de inhibición) en tres días diferentes. Los resultados obtenidos mostraron la robustez del ensayo propuesto.

**Tabla 7.** Resumen de las características analíticas del inmunoensayo competitivo fluorescente basado en QDs propuesto.

Parámetro analítico	Valor encontrado
Límite de detección ( $IC_{10}$ )	0,1 ng/mL
Límite de cuantificación ( $IC_{20}$ )	0,3 ng/mL
Rango lineal ( $IC_{20}$ - $IC_{80}$ )	0,3-14,5 ng/mL
Sensibilidad ( $IC_{50}$ )	2,2 ng/mL
Precisión	3,5%
Reproducibilidad	7%
Repetitividad	6%



**Figura 47.** Curva de inhibición de un inmunoensayo competitivo fluorescente basado en QDs para la determinación de progesterona en leche de ganado bovino.

IV.1.2.5. Aplicación a muestras reales: leche de ganado bovino

La aplicabilidad de la metodología aquí propuesta se comprobó mediante la determinación de progesterona en una serie de muestras de leche suministrada por una granja (leche que no ha sufrido ningún tipo de procesado industrial) y por lo tanto tendrá un contenido de progesterona endógeno y desconocido (acorde con el punto del ciclo estral en el que se encuentre la vaca). Estos resultados junto con los de los ensayos realizados para la validación de la metodología se recogen en la Tabla 8. Dicha validación se llevó a cabo mediante el análisis de dos muestras de leche a las que se les había añadido de forma intencionada distintas concentraciones conocidas de progesterona (0,5; 1; y 5 ng/mL).

**Tabla 8.** Resultados de los análisis de distintas muestras de leche de ganado bovino.

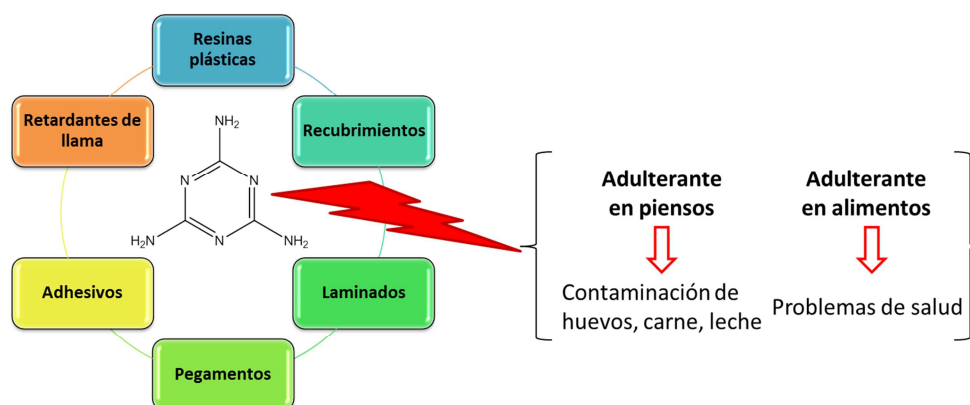
Muestras	[Pro] ng/mL (muestras no fortificadas)	[Pro] ng/mL adicionada	[Pro] ng/mL (muestras fortificadas)	Recuperación (%)
Leche fresca	1,1 ± 0,1	0,5	1,6 ± 0,1	95 ± 1
		1	2,2 ± 0,1	99 ± 1
		5	6,2 ± 0,1	98 ± 1
Leche pasteurizada	8,9 ± 0,2	0,5	9,2 ± 0,3	94 ± 3
		1	9,4 ± 0,3	88 ± 3
		5	13,8 ± 0,3	100 ± 3

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.1.3. Determinación de melamina en leche fórmula para bebés

#### IV.1.3.1. Melamina: de su uso industrial a su empleo como adulterante de alimentos

La melamina es un compuesto orgánico sintético que responde a la fórmula química  $C_3H_6N_6$  (véase estructura en la Figura 48) y cuyo nombre IUPAC es 2,4,6-triamino-1,3,5-triazina. Este trímero de la cianamida es comúnmente empleado en la industria química para la producción de resinas poliméricas de melamina-formaldehído que posteriormente se utilizarán en la fabricación de laminados y recubrimientos industriales, adhesivos, plásticos y retardantes de llama. El ser humano está expuesto a este producto y sus análogos (ácido cianúrico, amelida y amelina) a través de diferentes fuentes como la alimentación o el medio ambiente. Dichas fuentes abarcan desde el uso legal de pesticidas como la ciromazina (compuesto derivado de la melamina), hasta la migración de la melamina desde el material de embalaje al alimento que contiene. A pesar de que la exposición a este producto por debajo de un límite no tiene repercusiones en la salud humana, debido a su alto contenido en nitrógeno (66%) este compuesto se ha utilizado fraudulentamente como sustancia adulterante en alimentos [22].



**Figura 48.** Estructura química de la melamina junto con sus aplicaciones más comunes en la industria química y señalando su uso fraudulento en la adulteración de piensos y alimentos.

La adulteración de alimentos con melamina (una mención especial debe hacerse para el caso de la leche fórmula para bebés) se produce porque actualmente el contenido total de proteína de un alimento se evalúa a través de métodos que analizan únicamente

el contenido en nitrógeno de dicho alimento sin tener en cuenta la especie química que genera o aporta dicho nitrógeno, como el ampliamente aplicado método Kjeldahl. Así, fabricantes con poca conciencia moral añaden intencionadamente melamina a alimentos y productos relacionados (p.e. leche, fórmulas para bebés, yogur, galletas, dulces, alimento para mascotas, etc.) para aumentar el nivel de nitrógeno y reducir costes en la producción [23].

Como ya hemos comentado antes, a pesar de que la melamina tiene una baja toxicidad, cuando se rebasa un límite de ingesta ésta puede llegar a producir la formación de cálculos en los riñones y la vejiga o incluso puede provocar la muerte al formar compuestos insolubles con su análogo el ácido cianúrico. Estos hechos se vieron desgraciadamente confirmados por los distintos acontecimientos que se han ido sucediendo en los últimos años. Así, allá en 2004 se confirmó en Asia la adulteración de piensos para animales con melamina causando fallos renales a perros y gatos, extendiéndose estos hechos a animales de EEUU en 2007 [24]. Los episodios más tristes fueron los vividos en China en el año 2008 donde la contaminación de preparados para bebés provocó la intoxicación de cientos de miles de niños y la muerte de seis de ellos [22,23]. Finalmente, en 2010 se ha vuelto a encontrar melamina en leche fórmula para bebés preparadas por marcas chinas.

Por ello, la Organización mundial de la salud (WHO) junto con la Organización de alimentos y agricultura de Naciones Unidas (FAO) han establecido unos niveles máximos permitidos de melamina en alimentos de 2,5 mg/Kg y de 1 mg/Kg para la leche fórmula [22,25]. Además, ambas Agencias internacionales demandan tanto nuevos métodos específicos, rápidos y rentables para la determinación de proteínas en alimentos como métodos de análisis de alimentos para el control de adulterantes como la melamina, intentando por ambas vías disuadir a los fabricantes en el uso fraudulento de sustancias contaminantes que pueden originar problemas de salud.

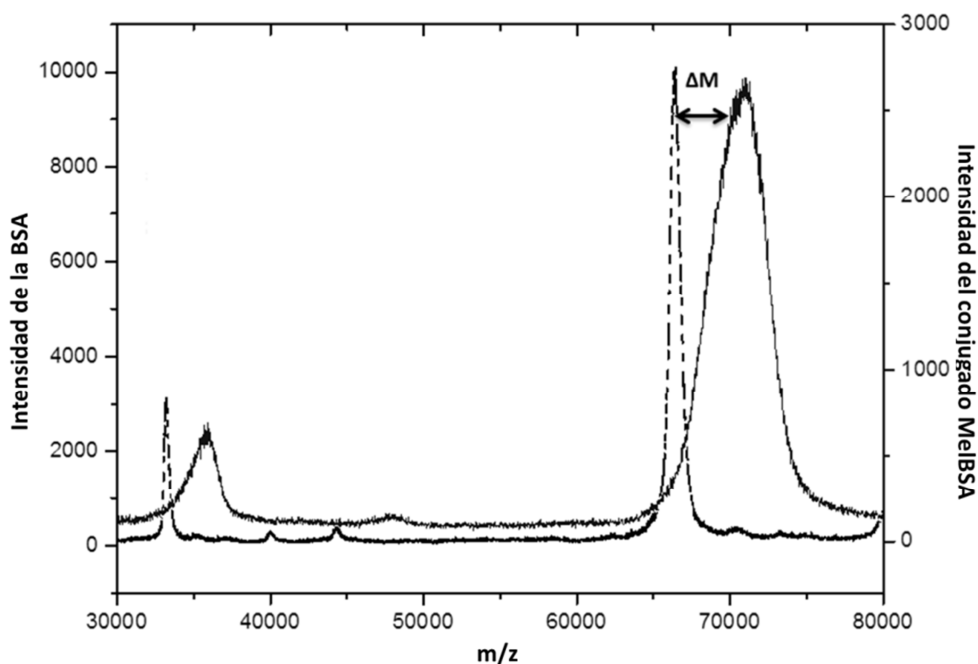
En este contexto, este capítulo va dirigido a la determinación de melamina en leche fórmula para bebés mediante en el empleo de un inmunoensayo competitivo basado en QDs, atendiendo así a la llamada de las Organizaciones internacionales del desarrollo de nuevas metodologías de análisis para este adulterante y sirviéndonos al

mismo tiempo como ejemplo para demostrar que el protocolo de inmunoensayo desarrollado en el apartado anterior tiene un carácter general constituyendo una plataforma genérica para el análisis de moléculas pequeñas (haptenos).

### IV.1.3.2. Preparación y caracterización de conjugados hapteno-BSA

A diferencia del caso de la progesterona, para la melamina no había disponible comercialmente su conjugado a una proteína portadora que nos facilitase su bioconjugación a los QDs. Por ello se recurrió a un kit comercial (Imject EDC BSA spin Kit) para formar el conjugado MelBSA. Un resumen de cómo llevar a cabo la conjugación de la melamina a la proteína BSA se recoge en la sección Experimental de la presente Memoria. Así, una vez que tenemos el conjugado MelBSA necesitamos llevar a cabo una caracterización del mismo (peso molecular, relación Mel:BSA, concentración de Mel y de BSA en el conjugado) para poder emplearlo posteriormente. Para dicha caracterización se siguió una estrategia que combina el uso de una técnica de espectrometría molecular (MALDI-TOF-MS) y el Test de Bradford. De los experimentos realizados en MALDI (n=8), cuyos resultados se muestran en la Figura 49, se obtuvo la siguiente información:

- Peso molecular promedio estimado del conjugado: 71 kDa
- La relación Mel:BSA encontrada fue de 37:1. Este dato se obtiene teniendo en cuenta dos premisas; una conocer el peso molecular de la melamina (126,12 g/mol), y dos, que el incremento en masa observado en el espectro de masas de la Figura 49, únicamente se debe a la incorporación de melamina.



**Figura 49.** Espectros de masas superpuestos de un patrón de BSA (línea punteada) y una muestra del conjugado MelBSA (línea negra), donde se puede observar el desplazamiento en masa ( $\Delta M$ ) debido a la incorporación de melamina a la BSA.

Con el dato de la relación Mel:BSA y tras haber aplicado el Test de Bradford para conocer la concentración de BSA en el conjugado podemos estimar la concentración de melamina en el mismo aplicando la Ecuación 13 que es análoga a la Ecuación 10, únicamente utilizando en este caso los datos correspondientes para el conjugado MelBSA. Con esto finalizamos la caracterización del conjugado que ya está listo para ser marcado con los QDs.

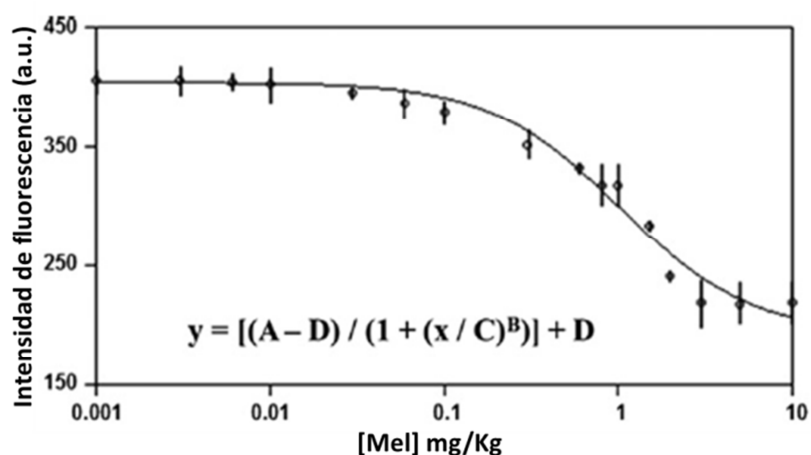
$$[Mel]_{Bio} = [BSA]_{Bio} \left( \frac{37M_{Mel}}{M_{BSA}} \right) \quad \text{Ecuación 13}$$

La obtención, purificación y caracterización del trazador MelBSA-QD se llevó a cabo de forma idéntica que para el caso del ProBSA-QD, comprobándose que la emisión del QD no se veía afectada tras el proceso de bioconjugación y realizándose un inmunoensayo espectrofotométrico con anticuerpo secundario marcado con HRP para probar que el Abmel era capaz de reconocer al trazador.

### IV.1.3.4. Aplicación del inmunoensayo basado en QDs a la determinación de melamina

A la hora de aplicar el inmunoensayo basado en QDs desarrollado en el apartado anterior a la determinación de melamina, únicamente se tuvieron que hacer unas pequeñas optimizaciones en cuanto a concentración de tapizado y trazador para ajustar el ensayo a los niveles de concentración requeridos por la legislación. Esto se realizó, al igual que para el caso de la progesterona, ensayando distintas concentraciones de tapizado y trazador, hasta obtener aquellas que mejor características analíticas aportaban. Así, las condiciones experimentales seleccionadas para llevar a cabo la determinación de melamina en leche fórmula para bebés fueron: 3  $\mu\text{g/mL}$  de Abmel; caseína 3%; 10  $\mu\text{g/mL}$  de MelBSA-QD en relación 3:1 respecto a la muestra.

Para evaluar las características analíticas ofrecidas por el inmunoensayo fueron preparadas una serie de disoluciones de la Mel patrón a distintas concentraciones en leche diluida 1:10 y posteriormente analizadas según el protocolo propuesto. De este modo se pudo ajustar la curva de inhibición que se muestra en la Figura 50 de la cual se extrajeron las características analíticas que se recogen en la Tabla 9.



**Figura 50.** Curva de inhibición fluorescente obtenida para el análisis de melamina en leche fórmula para bebés mediante un inmunoensayo competitivo basado en QDs utilizando como trazador MelBSA-QD. Cada punto de la curva es un promedio de tres ensayos independientes, obteniéndose para cada punto una desviación estándar relativa menor del 5%. También se recoge la ecuación de cuarto parámetro según la cual se ajusta la curva de inhibición.



**Tabla 9.** Características analíticas de un inmunoensayo competitivo fluorescente para la determinación de melamina en leche fórmula para bebés.

Parámetro analítico	Valor encontrado
Límite de detección (IC <sub>10</sub> )	0,15 mg/Kg
Límite de cuantificación (IC <sub>20</sub> )	0,30 mg/Kg
Rango lineal (IC <sub>20</sub> -IC <sub>80</sub> )	0,30-3,50 mg/Kg
Sensibilidad (IC <sub>50</sub> )	1,04 mg/Kg
Precisión	5%
Reproducibilidad	5%

Cabe destacar que el límite de detección de la metodología propuesta es un orden de magnitud más bajo que el nivel máximo permitido por la legislación para esta sustancia en preparados para lactantes (1 mg/Kg). Comparado con otras metodologías propuestas en la literatura para el análisis de Melamina en leche si bien el inmunoensayo aquí propuesto no mejora el límite de detección, sí que aporta una gran ventaja y es que no necesita ningún tipo de pretratamiento de la muestra, punto débil de muchas de las estrategias encontradas en la bibliografía. En la Tabla 10 a modo de resumen y comparación se recogen las propuestas más relevantes [26-37].

**Tabla 10.** Métodos analíticos propuestos para la determinación de melamina en leche, leche en polvo y leche fórmula.

Método	Muestra	Extracción	Purificación	LD	Ref.
CZE	Leche	ACN-H <sub>2</sub> O-dietilamina	Filtración	53 µg/Kg	[26]
HPLC-UV	Leche polvo	Centrifugación	Filtración	0,1 µg/mL	[27]
	Leche fórmula	TCA-ACN	SCX SPE	0,06 mg/Kg	[28]
LC-MS <sup>2</sup>	Leche fórmula	HCl-DCM	MCX SPE	4 µg/Kg	[29]
	Leche fórmula	ACN-H <sub>2</sub> O	---	50 µg/Kg	[28]
GC-MS	Leche	3%TCA	MCX SPE	5 µg/Kg	[30]
	Leche fórmula	ACN	SCX SPE	9 µg/Kg	[28]
ELISA	Leche fórmula	Carrez I y II	---	0,56 mg/Kg	[28]
	Leche	---	---	9 µg/L	[31]
FPIA	Leche	MeOH-H <sub>2</sub> O	---	9 µg/L	[32]
CL	Leche	1% TCA	Filtración	3 ng/L	[33]
NPs sensor	Leche fórmula	TCA-ACN	SPE	2,5 µg/L	[34]
	Leche fórmula	1% TCA	Filtración	0,1 mg/L	[35]
QDs	Leche	TCA-ACN	Filtración	130 ng/L	[36]
	Leche	TCA	Filtración	670 ng/L	[37]
Nuestro sistema	Leche fórmula	---	---	150 µg/Kg	

CZE electroforesis capilar zonal; HPLC cromatografía líquida de alta resolución; LC-MS<sup>2</sup> cromatografía líquida tandem espectrometría de masa; GC-MS cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas; ELISA ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas; FPIA inmunoensayo de fluorescencia polarizada; CL quimioluminiscencia; NPs nanopartículas; QDs quantum dots

### IV.1.3.5. Determinación de melamina en leche fórmula para bebés

Para evaluar la aplicabilidad del inmunoensayo competitivo fluorescente basado en QDs propuesto se llevó a cabo el análisis de tres muestras de leche fórmula para lactantes procedentes de tres casas comerciales diferentes. Además como validación interna una de esas muestras (M1) fue fortificada con 0,3 y 1 mg/Kg de melamina. Los resultados de los correspondientes análisis por triplicado encontrados fueron:

- Análisis directo:

$$M1 = 0,16 \pm 0,06 \text{ mg/Kg};$$

$$M2 = 0,21 \pm 0,03 \text{ mg/Kg};$$

$$M3 = 0,29 \pm 0,04 \text{ mg/Kg}$$

- Muestra fortificada:

$$M1 + 0,3 \text{ mg/Kg} = 0,42 \pm 0,09 \text{ mg/Kg (98\% de recuperación)}$$

$$M1 + 1 \text{ mg/Kg} = 1,11 \pm 0,07 \text{ mg/Kg (97\% de recuperación)}$$

Mostrando, de este modo, una buena concordancia entre los valores encontrados para la muestra sin fortificar y fortificada. Además, con el fin de certificar que el inmunoensayo fluorescente desarrollado es eficaz en la determinación de melamina en leche fórmula para lactantes, la misma muestra (M1) se analizó por HPLC-UV siguiendo el procedimiento desarrollado por Venkatasami *et al.* [27].

Brevemente, el método propuesto se basa en una cromatografía en fase reversa, empleando una columna C18, con detección UV (240 nm). Como fase móvil se emplea una disolución 0,1% TFA/MeOH en proporciones 90:10, bombeada a un flujo de 0,3 mL/min. Esta metodología requiere una preparación de muestra previa al análisis y realizar una curva de calibrado con patrones estándar de melamina. Las disoluciones estándar de melamina se prepararon en un rango de concentraciones abarcando desde 0-40  $\mu\text{g/mL}$ , mediante la dilución de una disolución madre de melamina de 1000  $\mu\text{g/mL}$

que se preparó disolviendo 100 mg de melamina en una mezcla al 50% (v/v) agua:MeOH (todas las diluciones posteriores se realizaron con esta mezcla de disolventes).

En cuanto a la muestra de leche fórmula, decidimos preparar la muestra y unas adiciones estándar (0,5;1; 2; 5; y 10 mg/Kg). Así, 1g de leche en polvo se disolvió en 50 mL de la mezcla H<sub>2</sub>O:MeOH y se sonicó durante 30 min. Esta disolución se centrifugó a 3200 rpm, tomándose 5 mL del sobrenadante a los cuales en los casos que fue necesario se añadió el volumen correspondiente de una disolución de melamina para tener las concentraciones finales requeridas por las adiciones estándar. Tras la homogenización las muestras se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm y 50 µL de las mismas se inyectaron en el sistema HPLC. Las áreas de los picos cromatográficos obtenidos fueron integradas representándose frente a la concentración de melamina añadida. De ahí, haciendo  $y=0$  obtenemos la concentración de melamina en la alícuota inyectada en el sistema HPLC y tras deshacer las pertinentes diluciones se llega al valor de la concentración de melamina en la muestra inicial de leche fórmula (M1). Para este caso el valor finalmente encontrado fue de  $0,14 \pm 0,03$  mg/Kg. De este modo, se validó el inmunoensayo basado en QDs para la determinación de melamina en leche fórmula para bebés.

### IV.1.4. Referencias

- [1] C.A.J. Lin, T. Liedl, R.A. Sperling, M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, W.H. Chang, W.J. Parak, **Bioanalytics and biolabeling with semiconductor nanoparticles (quantum dots)**, *J. Mater. Chem.*, 2007, 17, 1343.
- [2] R.E. Galian, M. de la Guardia, **The use of quantum dots in organic chemistry**, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2009, 28, 279.
- [3] M.J. Martínez-Alesón Sanz, **Repercusiones del implante de anabolizantes androgénicos sobre los perfiles hormonales del ganado vacuno**, Tesis Doctoral, 1993, Universidad Complutense de Madrid (España).
- [4] R. Graham Orchard, **A flow-through enzyme-linked immunoassay for progesterone**, Ph.D. Thesis, 2007, University of Waikato (Nueva Zelanda).
- [5] K-J Petersson, **Milk Progesterone as a Tool to Improve Fertility in Dairy Cows**, Ph.D. Thesis, 2007, Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala (Suecia).
- [6] G.A. Posthuma-Trumpie, **Toward a dry reagent immunoassay of progesterone in bovine milk**, Ph.D. Thesis, 2008, Rijksuniversiteit Groningen (Holanda).
- [7] N.C. Friggens, M.G.G. Chagunda, **Prediction of the reproductive status of cattle on the basis of milk progesterone measures: model description**, *Theriogenology*, 2005, 64, 155.
- [8] B.G. Wolthers, G.P.B. Kraan, **Clinical applications of gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry of steroids**, *J. Chromatogr. A*, 1999, 843, 247.
- [9] K. Shimada, K. Mitamura, T. Higashi, **Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids**, *J. Chromatogr. A*, 2001, 935, 141.
- [10] S.S.C. Tai, B. Xu, M.J. Welch, **Development and evaluation of a candidate reference measurement procedure for the determination of progesterone in human serum using isotope-dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry**, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 6628.
- [11] Y.F. Xu, M. Velasco-García, T.T. Mottram, **Quantitative analysis of the response of an electrochemical biosensor for progesterone in milk**, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 20, 2061.
- [12] N.D. Käppel, F. Pröll, G. Gauglitz, **Development of a TIRF-based biosensor for sensitive detection of progesterone in bovine milk**, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22, 2295.
- [13] R. Simersky, J. Swaczynova, D.A. Morris, M. Franek, M. Strnad, **Development of an ELISA-based kit for the on-farm determination of progesterone in milk**, *Vet. Med-Czech.*, 2007, 52, 19.

- [14] M. Colazo, D. Ambrose, J. Kastelic, J. Small, **Comparison of 2 enzyme immunoassays and a radioimmunoassay for measurement of progesterone concentrations in bovine plasma, skim milk, and whole milk**, *Can. J. Vet. Res.*, 2008, 72, 32.
- [15] M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **Simple bio-conjugation of polymer-coated quantum dots with antibodies for fluorescence based immunoassays**, *Analyst*, 2008, 133, 444.
- [16] C. Rappel, D. Schaumlöffel, **The role of sulfur and sulfur isotope dilution analysis in quantitative protein analysis**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 390 (2), 605.
- [17] S. Dembski, C. Graf, T. Krüger, U. Gbureck, A. Ewald, A. Bock, *et al.*, **Photoactivation of CdSe/ZnS Quantum Dots Embedded in Silica Colloids**, *Small*, 2008, 9, 1516.
- [18] M. Manna, E. Scher, L-S Li, A. Alivisatos, **Epitaxial Growth and Photochemical Annealing of Graded CdS/ZnS Shells on Colloidal CdSe Nanorods**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 7136.
- [19] Z. Zhelev, R. Jose, T. Nagase, H. Ohba, R. Bakalova, M. Ishikawa, Y. Baba, **Enhancement of the photoluminescence of CdSe quantum dots during long-term UV-irradiation: privilege or fault in life science research?** *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 2004, 75, 99.
- [20] C. Carrillo-Carrion, S. Cardenas, B.M. Simonet, M. Valcarcel, **Quantum dots luminescence enhancement due to illumination with UV/Vis light**, *Chem. Commun.*, 2009, 35, 5214.
- [21] A.M. Coto-García, M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, **The Influence of surface coating on the properties of water-soluble CdSe and CdSe/ZnS Quantum Dots**, *J. Nanopart. Res.*, 2013, 15, 1330.
- [ 22 ] World Health Organization, 1–4 December 2008, Executive Summary (Accessed at: [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/Exec\\_Summary\\_melamine.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/Exec_Summary_melamine.pdf)). Última consulta 05-2013.
- [23] E.Y. Chan, S.M. Griffiths, C.W. Chan, **Public-health risks of melamine in milk products**, *Lancet*, 2008, 372, 1444.
- [24] C.A. Brown, K.S. Jeong, R.H. Poppenga, B. Puschner, D.M. Miller, A.E. Ellis, K.I. Kang, S. Sum, A.M. Cistola, S.A. Brown, **Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007**, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2007, 19, 525.
- [25] Comisión del Codex Alimentarius, **Anteproyecto de niveles máximos para la Melamina en los alimentos y piensos**, (N13-2009), CX/CF10/4/5Add.1, Abril 2010.

- [26] J.G. Xia, N.Y. Zhou, Y.J. Liu, B. Chen, Y.N. Wuc, S.Z. Yao, **Simultaneous determination of melamine and related compounds by capillary zone electrophoresis**, *FoodControl*, 2010, 21, 912.
- [27] G. Venkatasami, J.R. Sowa Jr., **A rapid acetonitrile-free HPLC method for determination of melamine in infant formula**, *Anal. Chim. Acta*, 2010, 665, 227.
- [28] P. Lutter, M.C. Savoy-Perroud, E. Campos-Gimenez, L. Meyer, T. Goldmann, M.C. Bertholet, P. Mottier, A. Desmarchelier, F. Monard, C. Perrin, F. Robert, T. Delatour, **Screening and confirmatory methods for the determination of melamine in cow milk and milk based powdered infant formula, validation and proficiency-tests**, *Food Control*, 2011, 22, 903.
- [29] S.A. Tittlemier, B.P.Y. Lau, C. Menard, C. Corrigan, M. Sparling, D. Gaertner, K. Pepper, M. Feeley, **Melamine in infant formula sold in Canada occurrence and risk assessment**, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 5340.
- [30] X.L. Zhu, S.H. Wang, Q. Liu, Q. Xu, S.X. Xu, H.L. Chen, **Determination of residues of cyromazine and its metabolite melamine in animal-derived food by gas chromatography-mass spectrometry with derivatization**, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 11075.
- [31] E.A.E. Garber, **Detection of melamine using commercial enzyme-linked immunosorbent assay technology**, *J. Food Prot.*, 2008, 71, 590.
- [32] Q. Wang, S.A. Haughey, Y.M. Sun, S.A. Eremin, Z.F. Li, H. Liu, Z.L. Xu, Y.D. Shen, H.T. Lei, **Development of fluorescence polarization immunoassay for the detection of melamine in milk and milk powder**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 399, 2275.
- [33] Z.M. Wang, D.H. Chen, X. Gao, Z.H. Song, **Subpicogram determination of melamine in milk products using a Luminol-Myoglobin chemiluminescence system**, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 3464.
- [34] K. Ai, Y.L. Liu, L.H. Lu, **Hydrogen bonding recognition induced color change of Gold Nanoparticles for Visual Detection of Melamine in Raw Milk and Infant Formula**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 9496.
- [35] C.P. Han, H.B. Li, **Visual detection of melamine in infant formula at 0.1 ppm level based on silver nanoparticles**, *Analyst*, 2010, 135, 583.
- [36] G.L. Wang, H.J. Jiao, X.Y. Zhu, Y.M. Dong, Z.J. Li, **Enhanced fluorescence sensing of melamine based on thioglycolic acid capped CdS quantum dots**, *Talanta*, 2012, 93, 398.

- [37] F. Gao, Q. Ye, P. Cui, L. Zhang, **Efficient Fluorescence Energy Transfer System between CdTe-Doped Silica Nanoparticles and Gold Nanoparticles for Turn-On Fluorescence Detection of Melamine**, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, 4550.

### **IV.2. Empleo de quantum dots como marcas elementales en inmunoanálisis.**

#### *IV.2.1. Antecedentes y objetivos*

El análisis de biomoléculas requiere de métodos altamente sensibles y selectivos capaces de tolerar matrices biológicas complejas. Como hemos venido describiendo a lo largo de la presente Memoria, los inmunoensayos constituyen una de las metodologías más apropiadas para tal fin. Sin embargo, en este campo aún se buscan técnicas de detección que mejoren la detectabilidad de las bajas concentraciones a las que algunas biomoléculas se presentan en su medio fisiológico.

En este sentido, el ICP-MS está emergiendo en los últimos años como un sistema de detección que podría aportar grandes ventajas a la detección de inmunoensayos. Si bien es cierto que esta técnica elemental de espectrometría de masas es ampliamente conocida por su capacidad para la identificación y cuantificación de elementos a niveles de ultra-traza en campos tan diversos como el medioambiental [1], geológico [2], clínico [3] o industrial [4], esta herramienta de detección y diagnóstico ofrece una serie de características que podrían resultar muy interesantes en el campo del bioanálisis como son una alta sensibilidad independiente de la estructura de la molécula analizada, un amplio rango dinámico lineal y una capacidad de análisis multielemental. Además, los métodos de cuantificación por ICP-MS se basan en conceptos muy simples, están poco afectados por efectos de matriz en comparación con las técnicas convencionales cuantitativas de análisis y puede alcanzar límites de detección de relevancia biológica del orden de pg/g [5].

A pesar de que las primeras aplicaciones del ICP-MS en la detección de biomoléculas estuvo fundamentada en el uso de heteroelementos presentes en la propia biomolécula o el marcaje elemental de dichas muestras para su cuantificación, actualmente, se cree que la combinación de las técnicas de inmunoanálisis y la detección por ICP-MS forma un potente y prometedor tándem para el análisis multiparamétrico, convirtiéndose en una poderosa alternativa a los métodos bioanalíticos convencionales.



Esta estrategia podría expandir la detección de biomarcadores en el diagnóstico clínico incluso pudiendo llegar a detectar enfermedades en los primeros estadios. Por otro lado, el *screening* de biomarcadores así como información cuantitativa acerca de los niveles de expresión de dichos biomarcadores requiere de técnicas de análisis multiparamétricas y altamente sensibles, características que cubre ampliamente el tándem inmunoensayo más ICP-MS [6]. Finalmente, la detección por ICP-MS solventaría algunas de las limitaciones que presentan ciertos inmunoensayos con marcas, como es el caso de los riesgos para la salud que implica el uso de isótopos radiactivos, los problemas de superposición de señales en los análisis multiparamétricos tanto enzimáticos como fluorescentes y el problema de la autofluorescencia.

Cabe destacar que en la detección de inmunoensayos por ICP-MS se pueden distinguir dos vías de trabajo alternativas [6]: (1) la detección por nebulización de la disolución (los trabajos en este campo comenzaron en 2001); y (2) la detección directa desde un soporte sólido donde se ha llevado a cabo el inmunoensayo por ablación láser acoplada al ICP-MS (el inicio de los trabajos en esta área data del año 2005). En el primero de los casos el inmunoensayo se lleva a cabo en disolución sobre la superficie de una célula o en una placa de microtitración (placa ELISA). Esta es la vía de ensayo que se estudiará en el presente Capítulo de la Tesis Doctoral. La segunda de las vías realiza el inmunoensayo en soportes como microarrays o membranas de *Western Blot*.

Centrándonos en los inmunoensayos en disolución por ICP-MS, hasta la fecha de inicio de la presente Tesis Doctoral pocos eran los trabajos realizados en este campo, y en su mayoría empleaban como marcas elementos de las tierras raras como el Eu, Tb o Sm [7-10] o ligandos que contenían complejos quelantes de dichos metales (DTTA, DOTA) [11-13]. Muy pocos trabajos se encontraban en la literatura en los que se empleasen nanomateriales como marcadores y éstos ejemplos se basaban todos en el uso de nanopartículas de Au [14-16].

Así, viendo el gran potencial y las ventajas que esta técnica ofrece para la detección de inmunoensayos en este segundo Capítulo de la presente Memoria se decidió llevar a cabo el *estudio del empleo del ICP-MS como detector de inmunoensayos*

*basados en QDs*. Estrategia novedosa, ya que nunca se habían empleado estas nanopartículas como marcadores elementales. Para ello, se aprovechó el inmunoensayo basado en QDs ya desarrollado para la determinación de progesterona en leche de ganado bovino (dada la importancia de la determinación de este biomarcador del estado de fertilidad de las hembras), y la experiencia previa de nuestro grupo en el análisis de estos nanomateriales por ICP-MS realizada para la caracterización de la síntesis y bioconjugación de los QDs [17,18]. Por otro lado, este análisis también nos sirvió para evaluar la independencia de este detector de la matriz de la muestra ensayada, ya que, si se tiene en cuenta la complejidad de la matriz de la leche ésta representa un buen ejemplo para dicha demostración.

### *IV.2.2. Resultados y discusión*

#### IV.2.2.1. Adaptación del protocolo de inmunoensayo para la detección por ICP-MS

El protocolo de inmunoensayo basado en QDs realizado es igual al desarrollado para la determinación de progesterona por fluorescencia, salvo la etapa final. Es decir, tras el último lavado de la placa una vez ya hecha la reacción inmunológica, se lleva a cabo la redisolución de los QDs que han quedado fijados mediante la adición de 150  $\mu\text{L}$ /pocillo de SBB (50 mM, pH 12). Tras 30 min la disolución de cada pocillo se recoge y se pesa en su correspondiente vial y se procede a realizar una digestión ácida en la que se eliminará toda materia orgánica presente en la muestra y se liberará el contenido metálico (Cd) procedente de nuestra marca (QD) el cual será inversamente proporcional a la concentración de progesterona ensayada en cada pocillo (recordar que es un inmunoensayo competitivo en el que se obtiene una curva de inhibición). Para llevar a cabo dicha digestión ácida se evaluaron distintos protocolos de ataque, en los que se añadió a cada muestra 200  $\mu\text{L}$  de:

- Mezcla 1:4 (v/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% y  $\text{HNO}_3$  subboiling
- $\text{HNO}_3$  subboiling

A continuación se sometió a un baño ultrasonidos durante 30 min a 45 °C. Debido a que se comprobó, mediante la realización de los correspondientes blancos de puesta en disolución, que en los ataques con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observaban unos fondos muy altos de Cd (no es un reactivo puro contiene trazas de diferentes metales), la correspondiente digestión ácida se realizó utilizando únicamente ácido nítrico subboiling. Finalmente, las muestras digeridas se llevaron a un volumen final de 3 mL con una disolución de HNO<sub>3</sub> subboiling al 1% (v/v) que contenía 1,8 ng/g de In (elemento que fue empleado como patrón interno) y tras ello se procedió a realizar su medida en ICP-MS por infusión directa. En la Tabla 11 se recoge un resumen del protocolo de inmunoensayo basado en QDs con detección por ICP-MS.

**Tabla 11.** Inmunoensayo basado en QDs con detección por ICP-MS

<b>Etapa del inmunoensayo</b>	<b>Procedimiento</b>
1. Tapizado	100 µL/pocillo Ab incubado a 37 °C, 6 h.
2. Bloqueo	200 µL/pocillo Caseína 3% incubado a 4 °C, 10-12 h.
3. Lavado	200 µL/pocillo PBS-Tween20 pH 7,4; 3 veces.
4. Reacción inmunológica	200 µL/pocillo mezcla: muestra o estándar + trazador.
5. Lavado	200 µL/pocillo PBS-Tween20 pH 7,4; 3 veces.
6. Redisolución	150 µL/pocillo SBB 50 mM, pH 12.
7. Ataque ácido	200 µL/vial HNO <sub>3</sub> subboiling
8. Redisolución	Cada muestra se lleva a 3 mL (HNO <sub>3</sub> 1%; 1,8 ng/g In)
9. Medida ICP-MS	Monitorización <sup>112</sup> Cd, <sup>114</sup> Cd y <sup>115</sup> In (patrón interno)

#### IV.2.2.2. Comparación de la detección elemental vs molecular a través de las características analíticas

Para llevar a cabo la comparación entre ambas formas de detección de inmunoensayos basados en QDs, elemental (ICP-MS) vs molecular (fluorescencia), se procedió a realizar de forma paralela dos inmunoensayos siguiendo en cada uno de ellos el protocolo correspondiente para cada tipo de detección. Así, se prepararon una serie de disoluciones patrón de progesterona en un rango de concentración comprendido entre 0-120 ng/mL en leche UHT diluída 1:10, ensayándose un triplicado de cada concentración. Tras las medidas pertinentes por ambos detectores se pudieron trazar las curvas de inhibición que se muestran en la Figura 51 (A. Fluorescencia y B. línea gris para ICP-MS).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

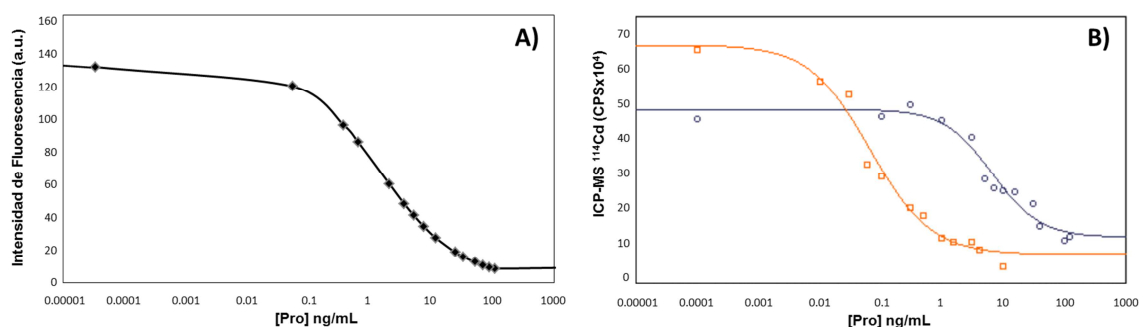
Los parámetros analíticos de dichas curvas se obtuvieron aplicando la ecuación del cuarto parámetro a la que responden (véase Ecuación 12) y se recogen en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Comparación de la detección elemental *vs* molecular de inmunoensayos basados en QDs a través de las características analíticas.

Parámetro	Fluorescencia	ICP-MS (I)	ICP-MS (II)
LD (ng/mL)	0,11	0,32	0,028
Rango lineal (ng/mL)	0,3-15	1,7-31	0,07-1,43
IC <sub>50</sub> (ng/mL)	2,2	6,7	0,32
Repetitividad (RSD %)	6	15	38
R <sup>2</sup>	0,98	0,98	0,99

ICP-MS (I): curva de inhibición al mismo nivel de concentración de progesterona que la fluorescencia  
ICP-MS (II): curva de inhibición para una concentración de progesterona 10 veces menor que la fluorescencia

Uno de los factores críticos que claramente limita la obtención de bajos límites de detección en el caso del ICP-MS, calculado en términos de precisión y exactitud, es el blanco de Cd (blanco del bioensayo). Para determinar este punto de una forma adecuada, en primer lugar se evaluó el contenido de Cd de forma independiente para cada reactivo empleado a lo largo de todo el proceso de inmunoensayo. En este sentido uno de los puntos clave fueron los reactivos empleados para la digestión ácida, como ya se había apuntado con anterioridad.



**Figura 51.** Curvas de inhibición obtenidas para la determinación de progesterona en leche de ganado bovino mediante detección por **A)** Fluorescencia; **B)** ICP-MS, al mismo nivel de concentración de progesterona que por fluorescencia (línea gris); a bajos niveles de concentración de progesterona (línea naranja). Cada punto es el promedio de tres medidas independientes.

De este modo se observó que tanto con el tratamiento de las muestras con una mezcla 4:1 ( $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ ) como con  $\text{HNO}_3$  subboiling se conseguía la digestión completa de la muestra; sin embargo, la introducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  provocaba un aumento del fondo de Cd, por lo que se eliminó el uso de dicho reactivo.

Por otro lado, hay que remarcar que para el análisis por ICP-MS es imprescindible la realización de un blanco de inmunoensayo para la determinación apropiada del blanco de Cd que se sustraerá debidamente de las muestras del ensayo. Por ello, en todos los inmunoensayos medidos por ICP-MS siempre se reservaron 3 pocillos de la placa de microtitración para hacer un triplicado del blanco del inmunoensayo. Dichos pocillos fueron tapizados con Ab y bloqueados con caseína del mismo modo que para el resto de la placa, pero en estos pocillos no se añadió ningún estándar de progesterona ni bioconjugado (ProBSA-QD). Tras la redisolución en SBB y la digestión ácida el Cd elemental procedente de estos pocillos se midió por ICP-MS obteniéndose un valor para el blanco de Cd que posteriormente se sustraerá de los valores hallados para las muestras.

Otro aspecto llamativo dentro de la comparación entre ambas técnicas de detección es la repetitividad medida como la desviación estándar relativa (RSD %), que sorprendentemente fue peor para el ICP-MS (15%) que para la fluorescencia (6%). En un primer momento se pensó que los 50  $\mu\text{L}$  de SBB empleados para la redisolución de los QDs no era volumen suficiente para conseguir que todos los QDs se dispersasen, hecho que afectaría gravemente a la detección por ICP-MS (ya que estaríamos perdiendo masa de Cd) y no repercutiría tanto a las medidas de fluorescencia. Por ello, se evaluó para el caso del ICP-MS la redisolución en un volumen mayor (150  $\mu\text{L}$ ) con el fin de asegurar que todos los QDs se encontrasen dispersos. Sin embargo, los datos cuantitativos obtenidos no mostraron diferencias significativas que pudieran apoyar este hecho. No obstante, se decidió continuar trabajando con este volumen de redisolución para el ICP-MS por ser más fácil de manejar (se inducen menos errores) en el tratamiento de muestra posterior.

Nuevamente parece que el factor que limita la precisión de las medidas por ICP-MS es el blanco de Cd para el bioensayo. Esta hipótesis se corrobora por el hecho de que

los triplicados correspondientes a altas concentraciones de progesterona mostraron una peor precisión, contribuyendo en el incremento de la precisión global del inmunoensayo. Obviamente, es a estas altas concentraciones de progesterona donde se registran las señales más bajas de Cd (debido al formato de ensayo) y que lógicamente están más afectadas por la corrección del blanco (siendo hasta el 30% de la señal de Cd para esos puntos). Sin embargo, para los triplicados de los puntos intermedios de la curva (donde la corrección por el blanco es casi despreciable) los valores de repetitividad encontrados se asemejan más a los de la fluorescencia siendo entre el 3-4 % de RSD. De este modo, el blanco de Cd resulta ser uno de los puntos débiles de la detección por ICP-MS ya que afecta tanto al límite de detección como a la precisión del inmunoensayo.

### IV.2.2.3. Evaluación del potencial del ICP-MS como técnica de cuantificación de inmunoensayos

Quizás, como ya se ha comentado en los antecedentes de este Capítulo, una de las características más valoradas del ICP-MS como detector es su gran sensibilidad y especificidad en la determinación de un elemento dado. Por esta razón el ICP-MS es una técnica de análisis ampliamente reconocida para la determinación elemental a niveles de traza y ultra-traza. Así, una vez que ya tenemos establecido el procedimiento de realización de inmunoensayos detectados por ICP-MS, el siguiente paso consistió en evaluar la capacidad de dicho detector para determinar niveles de Cd mucho más bajos.

Con este fin, las condiciones del inmunoensayo para la determinación de progesterona fueron modificadas en algunos de sus puntos. Las etapas de tapizado y bloqueo se mantuvieron, pero para la reacción inmunológica se estableció la competencia entre Pro y ProBSA-QD a unos niveles de concentración 10 veces más bajos que los empleados inicialmente; por lo que se empleó una disolución de ProBSA-QD de 0,1 µg/mL (en lugar de la de 1 µg/mL) y las concentraciones de Pro ensayadas estuvieron en un rango comprendido entre 0-10 ng/mL. La curva de inhibición obtenida en estas nuevas condiciones se muestra en la Figura 51B (línea naranja) y las características analíticas de la misma se recogen en la Tabla 12 (columna ICP-MS II).

Cabe destacar que, a pesar de las bajas concentraciones ensayadas, la curva de inmunoensayo obtenida es de buena calidad atendiendo a los parámetros analíticos encontrados, lo que pone de manifiesto el potencial del ICP-MS como detector de bajas concentraciones de elementos. También hay que mencionar que trabajando a la concentración de bioconjugado de 0,1 µg/mL no fue posible realizar la detección correspondiente por fluorescencia. El único punto negativo es que debido a los bajos niveles de concentración ensayados es de esperar que de nuevo la precisión del ensayo se vea afectada por el blanco de Cd que como ya vimos afectaba en mayor grado a las señales más bajas de Cd. En este caso la repetitividad encontrada (precisión intra-ensayo) fue de un 38%, observándose que el blanco de Cd llegaba a ser hasta el 50% de la señal de los puntos de la zona más baja de la curva.

Desde un punto de vista de la importancia de la determinación de progesterona en leche con el objetivo de identificar el momento fértil de las hembras, este nuevo inmunoensayo a bajas concentraciones ofrece una muy buena alternativa ya que su rango lineal está comprendido entre 0,07-1,43 ng/mL y el momento de celo de las hembras se caracteriza por una caída de los niveles de progesterona en leche por debajo de los 2 ng/mL siendo muy cercanos a 1 ng/mL [19].

Otro punto a favor y muy positivo es que una vez que ya hemos establecido el protocolo de actuación y cuantificación del inmunoensayo basado en QDs y detectado por ICP-MS, éste se convierte en una plataforma general de análisis aplicable a la determinación de otros compuestos de interés en cualquier tipo de muestra; simplemente habría que ajustar las condiciones experimentales a los requerimientos del nuevo analito.

Finalmente, una de las herramientas que el ICP-MS como técnica de análisis ofrece para la realización de una validación interna de cualquier experimento llevado a cabo es el Balance de Masas (BM). Dado el carácter cuantitativo de dicha técnica éste le capacita para poder evaluar el contenido de Cd elemental procedente de los QDs en los diferentes pasos realizados en la reacción inmunológica. Así, para llevar a cabo una validación interna de los resultados cuantitativos obtenidos en el inmunoensayo se decidió llevar a cabo un BM determinando el contenido de Cd tanto en la disolución

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

original de ProBSA-QD añadida como trazador, como en las disoluciones obtenidas tras los lavados de la placa tras el inmunoensayo (se realizan 3 lavados, ver protocolo) a tres niveles de concentración representativos de la curva de inhibición (0,1; 3; y 100 ng/mL), cada análisis se realizó por triplicado. El mismo procedimiento se aplicó para el inmunoensayo a bajas concentraciones, para el cual los niveles de concentración escogidos fueron 0,01; 0,3; y 10 ng/mL. El contenido de Cd en la disolución de bioconjugado ProBSA-QD se tomó como el 100% para realizar los cálculos del BM.

Experimentalmente se recogieron y pesaron todos los lavados para cada nivel de concentración en viales independientes y debidamente etiquetados, junto con 200  $\mu$ L de ProBSA-QD (por triplicado). A continuación se realizó el ataque ácido y se llevó al volumen final de 3 mL, tal como está establecido en el protocolo del inmunoensayo, para posteriormente realizar las medidas por ICP-MS. Los resultados del BM mostraron unas recuperaciones de Cd cuantitativas, siendo del  $99 \pm 8\%$  para la curva de ICP-MS (I) y del  $108 \pm 7\%$  para la curva de ICP-MS (II), quedando validados internamente los resultados obtenidos para los inmunoensayos, mostrando la robustez del ICP-MS como detector de inmunoensayos, ya que se puede llevar a cabo la monitorización cuantitativa de cada paso y de forma global del inmunoensayo.

#### IV.2.2.4. Aplicación a la determinación de progesterona en leche y evaluación de los efectos de matriz

Finalmente la metodología desarrollada se aplicó al análisis de muestras reales (leche fresca de vaca y leche pasteurizada A y B). Con el fin de comparar y dado que el inmunoensayo detectado por fluorescencia ya ha sido validado, el análisis de dichas muestras también se realizó con detección fluorescente. Los resultados obtenidos del análisis se muestran en la Tabla 13, donde se puede apreciar que los valores obtenidos por fluorescencia e ICP-MS muestran una buena concordancia.



**Tabla 13.** Análisis de Progesterona en leche mediante detección elemental y molecular

Muestra	ICP-MS (I)	Fluorescencia
Leche fresca de vaca	1,8 ± 0,3 ng/ml	1,1 ± 0,1 ng/mL
Leche pasteurizada A	7,9 ± 0,3 ng/mL	8,9 ± 0,2 ng/mL
Leche pasteurizada B	4,3 ± 0,5 ng/mL	4,4 ± 0,4 ng/mL
Leche B sin diluir	4,2 ± 0,5 ng/mL	---

Una gran ventaja a destacar aportada por la medida en ICP-MS frente a la detección por fluorescencia es, en principio, que la medida de la señal es virtualmente independiente de la matriz de la muestra [20]. Por eso, un estudio sobre los efectos de matriz podría arrojar nueva luz sobre la causa del hecho observado en el desarrollo del inmunoensayo basado en QDs con detección fluorescente; en el que se vió la necesidad de realizar una dilución 1:10 de la leche para poder llevar a cabo la medida fluorescente del QD (ya que, dicha señal fluorescente se veía gravemente afectada en presencia de la matriz de la muestra). Sobre la causa del decaimiento o pérdida de la señal fluorescente del QD en presencia de la matriz se apuntó que podría ser debida a: (1) interacciones inespecíficas entre las especies presentes en la leche y la superficie del QD; o bien a (2) una reducción significativa de la capacidad de reconocimiento del Ab inmovilizado en presencia de esa matriz tan compleja.

Con la intención de elucidar cuál de las dos posibles causas es la que provoca la pérdida de señal del QD, se decidió volver a analizar por ICP-MS la muestra de leche pasteurizada B, esta vez sin dilución previa. Como se puede ver en la Tabla 13 los resultados obtenidos concuerdan perfectamente tanto con el análisis por ICP-MS con dilución previa de la muestra así como con el análisis con detección por fluorescencia. Estos resultados ponen de manifiesto dos hechos:

(1) el carácter independiente de la medida de la señal por ICP-MS de la matriz de la muestra de la que provenga.

(2) la causa de la pérdida de la señal del QD en presencia de la leche es debida a las interacciones inespecíficas entre especies presentes en la matriz y la superficie del QD (se produce un *quenching*), ya que si fuese debido a un efecto sobre la capacidad de

reconocimiento del Ab se tendría que haber obtenido una fuerte discrepancia entre los resultados obtenidos por ICP-MS en la muestra diluída y sin diluir.

### *IV.2.3. Referencias*

- [1] M. Moldovan, E.M. Krupp, A.E. Holliday, O.F.X. Donard, **High resolution sector field ICP-MS and multicollector ICP-MS as tools for trace metal speciation in environmental studies: a review**, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 815.
- [2] R.R. Barefoot, **Determination of platinum group elements and gold in geological materials: a review of recent magnetic sector and laser ablation applications**, *Anal. Chim. Acta*, 2004, 509, 119.
- [3] A. Taylor, S. Branch, M.P. Day, M. Patriarca, M. White, **Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages**, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, 26, 653.
- [4] B. Lange, S. Recknagel, M. Czerwensky, R. Matschat, M. Michaelis, B. Peplinski, U. Panne, **Analysis of pure copper – a comparison of analytical methods**, *Microchim. Acta*, 2008, 160, 97.
- [5] M.W. Linscheid, **Quantitative proteomics**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 381, 64.
- [6] C. Giesen, L. Waentig, U. Panne, N. Jakubowski, **History of inductively coupled plasma mass spectrometry-based immunoassays**, *Spectrochim. Acta B*, 2012, 76, 27.
- [7] C. Zhang, F.B. Wu, Y.Y. Zhang, X. Wang, X.R. Zhang, **A novel combination of immunoreaction and ICP-MS as a hyphenated technique for the determination of thyroid-stimulating hormone (TSH) in human serum**, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, 16, 1393.
- [8] Z.A. Quinn, V.I. Baranov, S.D. Tanner, J.L. Wrana, **Simultaneous determination of proteins using an element-tagged immunoassay coupled with ICP-MS detection**, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, 17, 892.
- [9] V.I. Baranov, Z. Quinn, D.R. Bandura, S.D. Tanner, **A sensitive and quantitative element-tagged immunoassay with ICPMS detection**, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 1629.
- [10] M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, C. Mucchino, **ICP-MS as a novel detection system for quantitative element-tagged immunoassay of hidden peanut allergens in foods**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 387, 1851.

- 
- [11] C. Zhang, F.B. Wu, X.R. Zhang, **ICP-MS-based competitive immunoassay for the determination of total thyroxin in human serum**, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, 17, 1304.
- [12] S.C. Zhang, C. Zhang, Z. Xing, X.R. Zhang, **Simultaneous determination of alphafetoprotein and free beta-human chorionic gonadotropin by element-tagged immunoassay with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry**, *Clin. Chem.*, 2004, 50, 1214.
- [13] M. Terenghi, L. Elviri, M. Careri, A. Mangia, R. Lobinski, **Multiplexed determination of protein biomarkers using metal-tagged antibodies and size exclusion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry**, *Anal. Chem.*, 2009, 81, 9440.
- [14] C. Zhang, Z.Y. Zhang, B.B. Yu, J.J. Shi, X.R. Zhang, **Application of the biological conjugate between antibody and colloid Au nanoparticles as analyte to inductively coupled plasma mass spectrometry**, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 96.
- [15] F. Li, Q. Zhao, C.A. Wang, X.F. Lu, X.F. Li, X.C. Le, **Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using gold nanoparticle labeling and inductively coupled plasma mass spectrometry**, *Anal. Chem.*, 2010, 82, 3399.
- [16] R. Liu, X. Liu, Y.R. Tang, L. Wu, X.D. Hou, Y. Lv, **Highly sensitive immunoassay based on immunogold-silver amplification and inductively coupled plasma mass spectrometric detection**, *Anal. Chem.*, 2011, 83, 2330.
- [17] A.R. Montoro-Bustos, J. Ruiz Encinar, M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, **Elemental mass spectrometry: A powerful tool for an accurate characterisation at elemental level of quantum dots**, *Chem. Commun.*, 2009, 3107.
- [18] L. Trapiella-Alfonso, A.R. Montoro-Bustos, J. Ruiz Encinar, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, **New integrated elemental and molecular strategies as diagnostic tool for the quality of water soluble quantum dots and their bioconjugates**, *Nanoscale*, 2011, 3, 954.
- [19] R. Pemberton, J. Hart, T. Mottram, **An electrochemical immunosensor for milk progesterone using a continuous flow system**, *Biosens. Bioelectron.*, 2001, 16, 715.
- [20] A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón, M.R. Fernández de la Campa, J. Ruiz Encinar, J. Bettmer, **Elemental mass spectrometry for quantitative proteomics**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 390, 3.



### IV.3. Síntesis y caracterización de una nueva generación de fluoróforos nano-estructurados: Nanoclusters metálicos de plata

#### IV.3.1. Antecedentes y objetivos

Como hemos visto en la Introducción de la presente Tesis Doctoral, en el incipiente campo de los Nanoclusters existe una gran demanda del desarrollo de nuevas estrategias sintéticas sencillas, baratas, fácilmente escalables y extensibles a la síntesis de estos nanomateriales con diferentes núcleos metálicos. Además, también se hace necesario la realización de estudios fundamentales que permitan profundizar en el conocimiento de sus propiedades y las relaciones que éstas tienen con su estructura, para poder diseñar futuras aplicaciones. Hasta la fecha de inicio de nuestra investigación en este campo, habían sido desarrolladas diversas aproximaciones para la síntesis de AgNCs a través de diferentes métodos de reducción (radiolítica, fotoquímica, sonoquímica y química) y empleando distintos ligandos o soportes para su crecimiento como ADN [1,2], péptidos y proteínas [3], polímeros [4,5] y moléculas funcionalizadas con grupos tiol [6,7].

Sin embargo, no se habían llevado a cabo estudios en los que se empleasen ligandos PEG funcionalizados, a pesar de su éxito en la solubilización y/o funcionalización de otros nanomateriales como QDs y AuNPs [8,9]. Respecto a los ligandos ya utilizados en las síntesis de AgNCs los ligandos PEG *a priori* presentan una serie de ventajas como son una mayor biocompatibilidad con medios biológicos que otros polímeros, una mayor estabilidad en un amplio rango de condiciones químicas (pH y concentraciones salinas) mejorando las características de los ligandos/soportes biológicos (ADN y proteínas), una gran versatilidad de funcionalización (COOH, NH<sub>2</sub>, OH, biotina) como se ha mostrado en la sección de Experimental pudiendo realizar la funcionalización *in situ* del nanomaterial y haciéndolo compatible con todo tipo de modificaciones superficiales, y finalmente, solubiliza al nanomaterial tanto en medios orgánicos como acuosos. Con todas estas características los nanomateriales funcionalizados con este tipo de ligando presentan un gran potencial para el desarrollo de cualquier tipo de aplicación (biológica, medioambiental, industrial, etc.). De este

modo, resulta interesante comprobar la aplicabilidad de los ligandos PEG funcionalizados a la síntesis de NCs, evaluando las propiedades que les confiere.

Por todo ello, en este último Capítulo de la presente Tesis Doctoral se pretende investigar el desarrollo de una nueva ruta sintética de AgNCs utilizando como ligandos protectores los ligandos bidentados PEG funcionalizados que les aportarán a los nuevos nanomateriales una gran biocompatibilidad y, esperamos, una buena estabilidad. Además, se llevarán a cabo diversos estudios para intentar arrojar algo de luz sobre el mecanismo involucrado en el crecimiento de los NCs, la estabilidad de estas nanoestructuras, y los efectos que tiene sobre las propiedades ópticas de estos nanocristales la irradiación UV.

### *IV.3.2. Nuevas aproximaciones para la síntesis de nanoclusters de plata*

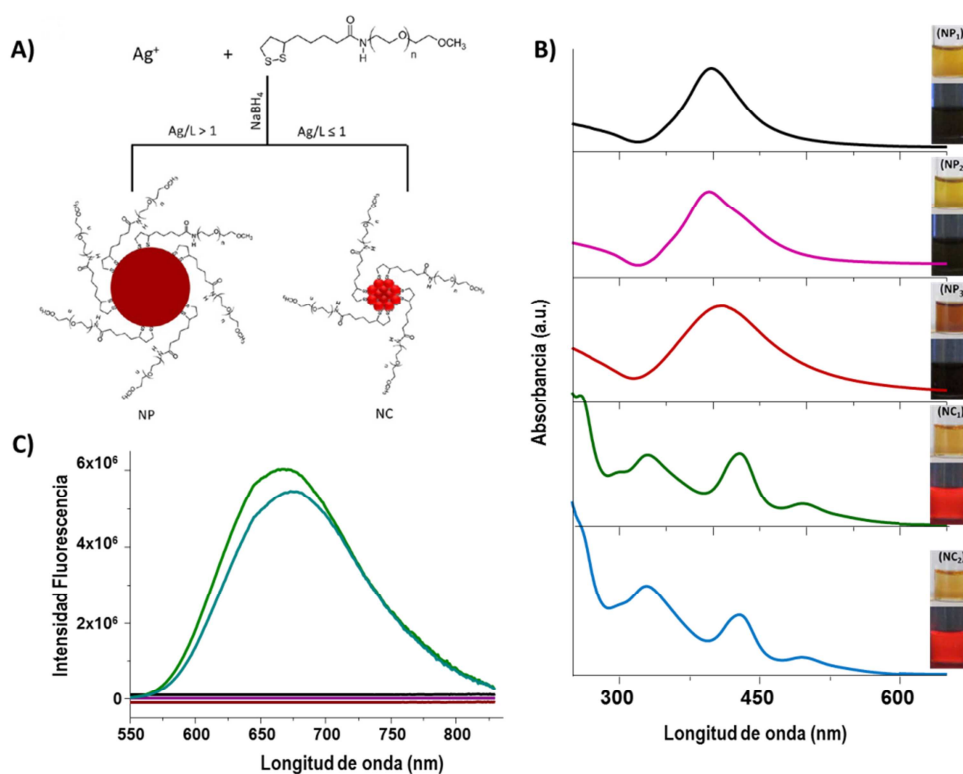
#### IV.3.2.1. Síntesis por reducción directa del metal

Esta investigación surge en la búsqueda de nuevos fluoróforos como marcadores en bioensayos, y como punto de partida toma el proceso de síntesis diseñado para la obtención de nanopartículas de oro [9], previamente desarrollado en el laboratorio del Prof. Mattoussi donde realicé mi estancia pre-doctoral. Este procedimiento se basa en la reducción directa tanto del metal como del enlace disulfuro del ligando que dejará libre el azufre para que se enlace a dicho metal. Para el crecimiento de los nanoclusters de plata se empleó el  $\text{AgNO}_3$  como precursor del metal; una serie de ligandos PEG funcionalizados (TA-PEG-OCH<sub>3</sub>; TA-PEG-COOH; TA-PEG-NH<sub>2</sub>) como ligandos protectores para la estabilización, solubilización en medios acuosos y funcionalización del nuevo nanomaterial; y NaBH<sub>4</sub> como agente reductor, tal y como se recoge en la sección Experimental de la presente Memoria.

En el diseño del proceso sintético se realizaron una serie de optimizaciones atendiendo a: (1) relación molar de los reactivos precursores (metal:ligando:NaBH<sub>4</sub>); (2) tiempo y condiciones de reacción; (3) propiedades optoelectrónicas encontradas. Para ello, las distintas síntesis realizadas en dichas optimizaciones fueron monitorizadas tanto

por UV-Vis como por fluorescencia, mediante la medida de alícuotas extraídas a distintos tiempos de reacción.

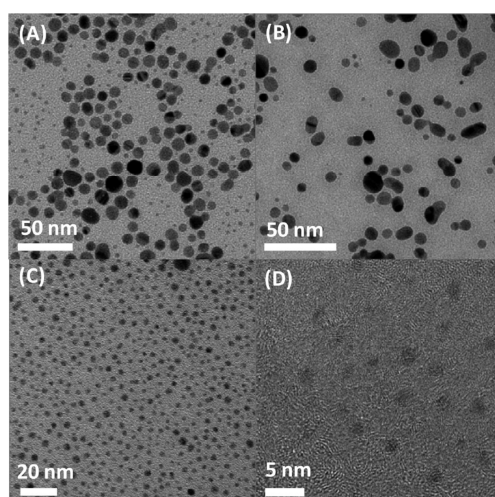
En primer lugar se llevó a cabo el estudio de la relación metal:ligando trabajando con una cantidad constante y en exceso de  $\text{NaBH}_4$  (20:1 con respecto al metal). Un amplio rango de relaciones metal:ligando fueron ensayadas desde 1:0,001 hasta 1:10. Encontrándose que a través de esta ruta sintética podíamos obtener tanto nanopartículas como nanoclusters dependiendo de la relación de precursores ensayada. Más concretamente la tendencia observada fue que para relaciones metal:ligando mayores de uno (trabajando en defecto de ligando) se obtenían las NPs mientras que para una relación equimolecular o cuando se trabaja en exceso de ligando se obtienen los NCs, tal y como se refleja en la Figura 52.



**Figura 52.** Estudio de la relación metal:ligando. **A)** Esquema del proceso sintético realizado. **B)** Espectros de absorbancia encontrados para los distintos ratios metal:ligando ensayados e imágenes de las disoluciones bajo luz natural y luz UV; 1:0,001 (línea negra, NP<sub>1</sub>), 1:0,01 (línea rosa, NP<sub>2</sub>), 1:0,1 (línea roja, NP<sub>3</sub>), 1:1 (línea verde, NC<sub>1</sub>) y 1:10 (línea azul, NC<sub>2</sub>). **C)** Espectros de fluorescencia obtenidos para dichas muestras.

Ambos tipos de nanomateriales pueden ser fácilmente identificados y diferenciados por sus propiedades optoelectrónicas. Mientras que las NPs presentan su característica banda de absorción del plasmón superficial centrada en torno a 390 nm y no son luminescentes, los NCs tienen un espectro de absorción con bandas más estrechas típicas de las transiciones electrónicas moleculares (con los máximos a 330, 428, y 495 nm) y además poseen una fuerte emisión fluorescente centrada a 670 nm (véase Figura 52). Otra evidencia de la formación de ambos tipos de nanomateriales lo constituyen las fotografías tomadas a las dispersiones de cada síntesis realizada, que se muestran en la Figura 52. Así, mientras que las muestras correspondientes a las NPs permanecen oscuras (sin ningún tipo de emisión) bajo la irradiación con luz UV, en el caso de los NCs se puede apreciar cómo la disolución se vuelve de un intenso color anaranjado brillante.

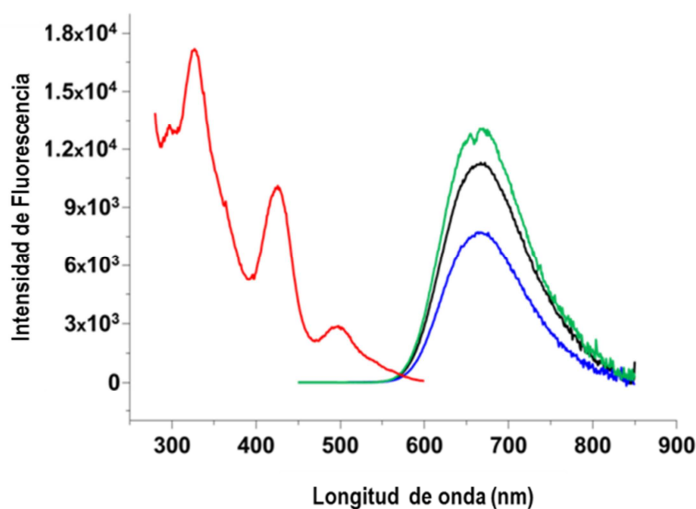
Para completar este estudio y confirmar que dependiendo de la relación metal:ligando ensayada se pueden obtener distintos tamaños y tipos de nanomateriales se acudió a la microscopía electrónica (TEM) para analizar las diferentes muestras obtenidas. En la Figura 53 se recogen las imágenes obtenidas para 4 de las muestras analizadas, observándose cómo a medida que se incrementa la cantidad de ligando utilizada en la reacción se producen nanomateriales de menor tamaño, pasando de las NPs (tamaño promedio de 10 nm) a los NCs (diámetro medio en torno a 2 nm).



**Figura 53.** Micrográficas de TEM obtenidas para distintas relaciones metal:ligando en la síntesis de nanomateriales de plata. A) Relación 1:0,001 (NP<sub>1</sub>). B) Relación 1:0,01 (NP<sub>2</sub>). C) Relación 1:0,1 (NP<sub>3</sub>). D) Relación 1:1 (NC<sub>1</sub>).

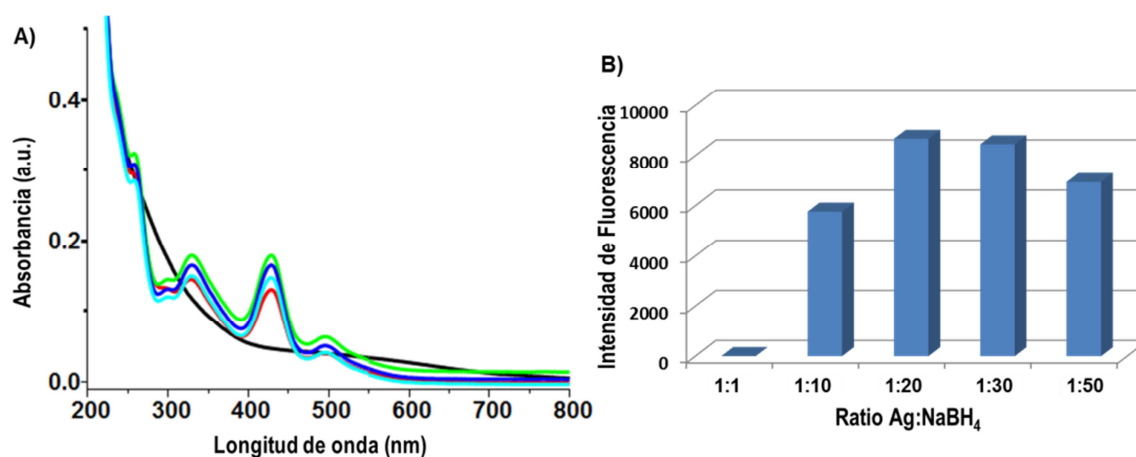


Al encontrar, como ya se ha apuntado, tres bandas de absorción características de los AgNCs (330, 428 y 495 nm), se comprobó si la excitación a dichas longitudes de onda tenía algún efecto sobre la emisión fluorescente de los NCs (p.e. distintas longitudes de onda de emisión). Los resultados mostraron que la longitud de onda de emisión de los AgNCs es independiente de la excitación, es decir, no cambia de posición si bien su intensidad sí se ve afectada, obteniéndose mayores intensidades de emisión cuanto más baja es la longitud de onda de excitación tal y como se muestra en la Figura 54.



**Figura 54.** Espectros de excitación (rojo) y emisión centrada a 680 nm de los AgNCs azul (excitación a 495 nm), negro (excitación a 428 nm), y verde (excitación a 330 nm).

A pesar de que de antemano ya sabemos que se ha de trabajar en un exceso de agente reductor, el siguiente paso que se dio en esta optimización fue evaluar la relación metal:agente reductor con el objetivo de conseguir las mejores propiedades optoelectrónicas de los AgNCs. De este modo se llevaron en paralelo distintas síntesis en las que se mantuvo constante la relación metal:ligando (1:1) y se fue variando la cantidad de agente reductor desde 1:1 hasta 1:50. Como se puede observar en la Figura 55, efectivamente es necesario un exceso de  $\text{NaBH}_4$  para que tenga lugar la formación del nanomaterial, estando la relación óptima metal: $\text{NaBH}_4$  comprendida entre 1:20 y 1:30, por lo que a partir de este momento se trabajó con una relación intermedia de 1:25.

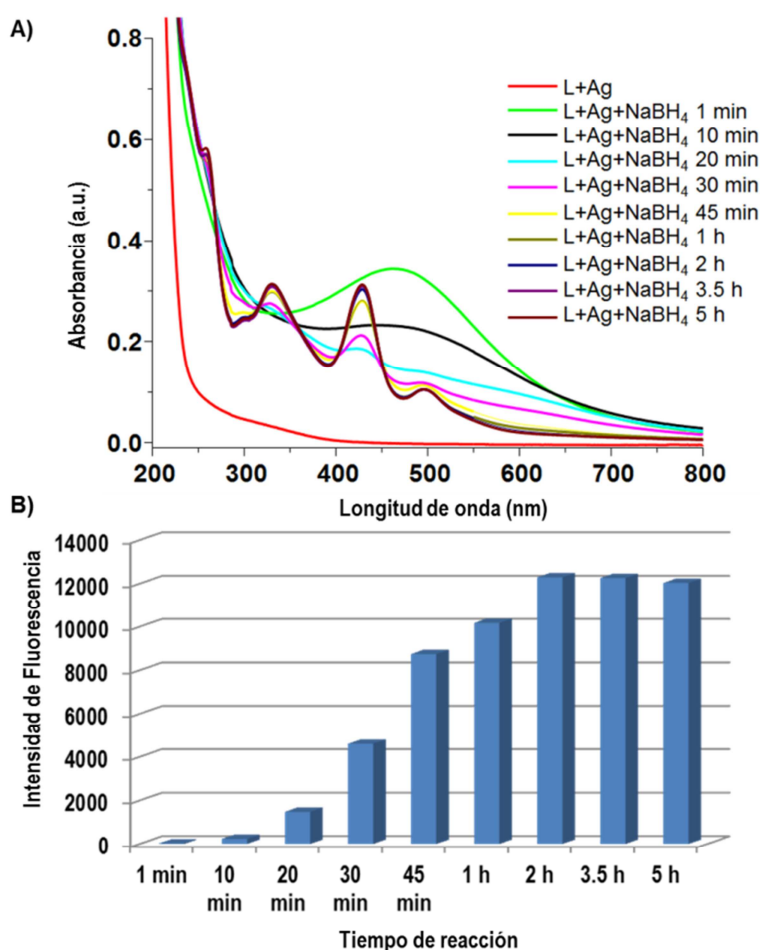


**Figura 55.** Optimización de la relación metal:NaBH<sub>4</sub>. **A)** Medidas de absorbancia para los distintos ratios Ag:NaBH<sub>4</sub> ensayados; 1:1 (línea negra), 1:10 (línea roja), 1:20 (línea verde), 1:30 (línea azul oscuro), y 1:50 (línea azul claro). **B)** Intensidades de fluorescencia registradas para las síntesis realizadas con distintas cantidades de NaBH<sub>4</sub>.

Hasta ahora todas las síntesis realizadas en las optimizaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación constante, protegidas de la luz y empleando un tiempo de reacción de 2 horas. Sin embargo, cuando se pone a punto una ruta sintética uno de los puntos a tener en cuenta es dicho tiempo de reacción que debe ser tal que se obtengan los NCs con las mejores características. Para ello se puso en marcha una síntesis a lo largo de la cual se fueron extrayendo alícuotas a distintos tiempos de reacción tras la adición del agente reductor (1; 10; 20; 30; y 45 min y 1; 2; 3,5; y 5 h). Dichas alícuotas fueron medidas tanto por absorbancia como por fluorescencia. Los espectros obtenidos aparecen reflejados en la Figura 56, donde se puede ver claramente que a partir de un tiempo de reacción de 2 horas se ha completado la reacción de formación de los AgNCs ya que a partir de dicho tiempo no se observan mejoras apreciables en las propiedades optoelectrónicas del nanomaterial, alcanzándose una meseta.

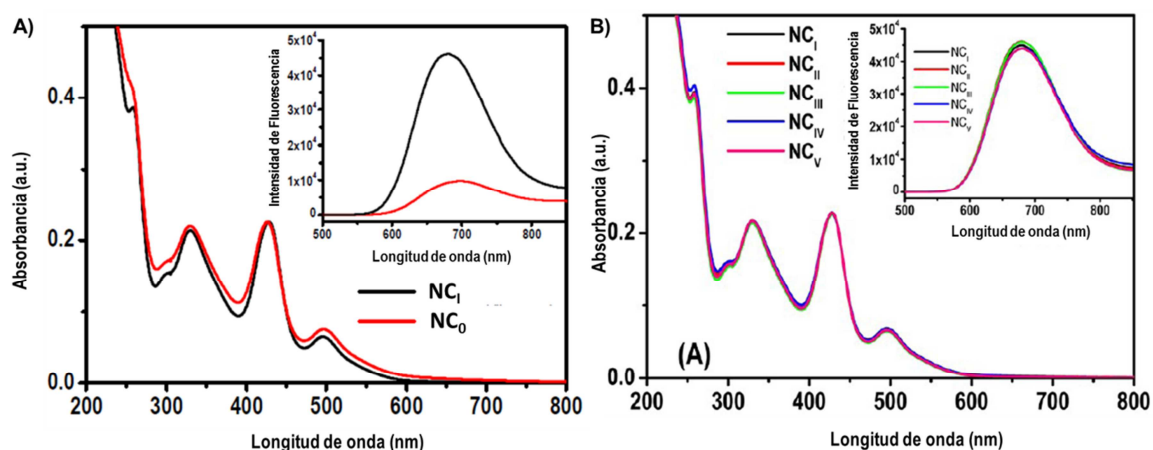
Sorprendentemente, otro hecho que captó nuestra atención tras la realización de este estudio fue la evolución de los espectros de absorbancia a lo largo de la síntesis. A través de la cual se podría sugerir un posible mecanismo de síntesis de los AgNCs. Como se puede apreciar en la Figura 56A en los primeros minutos de reacción (1-10 min) se observa una única banda de absorción que con el tiempo desaparece (20 min) dando

lugar a la posterior aparición de las tres bandas características de los NCs (30 min) las cuales irán creciendo en intensidad hasta el final de la reacción. Este proceso parece sugerir la formación en un primer momento de una nanoestructura con propiedades de absorción del plasmón superficial (una NP) que a continuación evoluciona hacia especies más estables con propiedades diferentes (lo que indica que son especies distintas) que son las que perduran al finalizar la reacción. Este mecanismo también tendría sentido para otras condiciones de reacción en las que la formación de la NP se viese favorecida. Por lo que, para asegurar que el mecanismo de formación del NC se produce a través de la previa formación de la NP, esta hipótesis se intentará comprobar aplicando la metodología de "size focusing" la cual se tratará en el siguiente apartado de este Capítulo.



**Figura 56.** Monitorización de la evolución de las propiedades optoelectrónicas de los AgNCs a lo largo de su síntesis. **A)** Espectros de absorbancia medidos a distintos tiempos de reacción. **B)** Intensidades de fluorescencia registradas para las mismas alícuotas extraídas a los tiempos de reacción indicados, empleando como par excitación/emisión 428/670 nm.

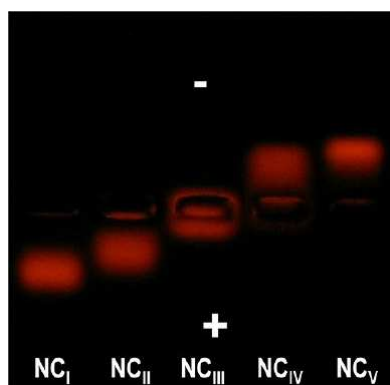
Por otro lado, a modo de comparación y dado que durante el tiempo en el que se realizaba esta investigación el grupo del Prof. Banerjee publicó una síntesis análoga utilizando DHLA como ligando protector [7], se decidió llevar a cabo en paralelo la síntesis de AgNCs utilizando en un caso DHLA y en otro nuestros ligandos PEG funcionalizados para evaluar los efectos que la introducción de la cadena de PEG provocaban en la síntesis de AgNCs. Al mismo tiempo en este estudio se investigaron las posibles funcionalizaciones *in situ* del AgNC empleando para ello los ligandos TA-PEG-COOH y TA-PEG-NH<sub>2</sub>. Así, en primer lugar se llevó a cabo la síntesis de los distintos AgNCs: Ag@DHLA (NC<sub>0</sub>); Ag@TA-PEG-COOH (NC<sub>I</sub>); Ag@TA-PEG-COOH/OCH<sub>3</sub> mezcla 1:1 de ligandos (NC<sub>II</sub>); Ag@TA-PEG-OCH<sub>3</sub> (NC<sub>III</sub>); Ag@TA-PEG-NH<sub>2</sub>/OCH<sub>3</sub> mezcla 1:1 de ligandos (NC<sub>IV</sub>); y Ag@TA-PEG-NH<sub>2</sub> (NC<sub>V</sub>). Posteriormente mediante medidas de absorbancia y fluorescencia se evaluaron los efectos causados por las distintas modificaciones, observándose por un lado que el empleo de diferentes ligandos no altera las propiedades ópticas de los NCs obteniéndose las tres bandas de absorción y el pico de emisión a las longitudes de onda característicos de estos NCs. Sin embargo, para el caso de los NCs en los que se utilizó DHLA como ligando protector se observó un descenso acusado en la intensidad de la emisión fluorescente (véase Figura 57).



**Figura 57.** Comparación de las propiedades de absorción y emisión fluorescente (gráfico insertado) de los distintos tipos de AgNCs sintetizados. **A)** DHLA (NC<sub>0</sub>) frente a TA-PEG-OCH<sub>3</sub> (NC<sub>I</sub>). **B)** Distintos grados y tipos de funcionalización empleando ligandos PEG funcionalizados.

Para tener otro dato más comparativo se llevaron a cabo las medidas de rendimiento cuántico para ambos tipos de NCs (Ag@DHLA y Ag@TA-PEG-OCH<sub>3</sub>) empleando como fluoróforo de referencia DCTB (*trans*-2-[3-(4-*tert*-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]malononitrile), obteniéndose unos valores de QYs de 3,3 y 12% respectivamente. Estos datos ponen de manifiesto que la introducción de la cadena de PEG mejora las propiedades ópticas de los NCs.

Para comprobar que realmente la funcionalización *in situ* de los NCs había funcionado correctamente en un gel de agarosa se corrieron los distintos AgNCs funcionalizados con los ligandos PEG. Como se puede ver en la imagen de la Figura 58, la migración de los AgNCs se corresponde tanto con el tipo (COOH *vs* NH<sub>2</sub>) como con el grado de funcionalización (50 ó 100%). Además, como referencia se corrieron unos AgNCs funcionalizados con un ligando inerte, sin carga (Ag@TAPEG-OCH<sub>3</sub>) que como se observa no sufrieron ningún tipo de desplazamiento en el gel.



**Figura 58.** Imagen de un gel de agarosa donde se observa la señal luminiscente de los distintos AgNCs funcionalizados a la luz UV de un transiluminador. Se puede ver cómo los NC<sub>I</sub> y NC<sub>II</sub> funcionalizados con grupos COOH migran hacia el polo positivo, mientras que NC<sub>IV</sub> y NC<sub>V</sub> van hacia el polo negativo ya que poseen grupos NH<sub>2</sub>. Del mismo modo NC<sub>III</sub> no sufre ningún tipo de desplazamiento ya que sólo presenta grupos OCH<sub>3</sub> que son inertes.

El empleo de los ligandos PEG funcionalizados no sólo aporta una mejora evidente de las propiedades optoelectrónicas de los nanomateriales, sino que presenta otra serie de ventajas, como la solubilización de los NCs en distintos medios tanto acuosos como orgánicos, o una gran estabilidad en un amplio rango de condiciones químicas como pH o medios salinos concentrados, que se comentarán a continuación.

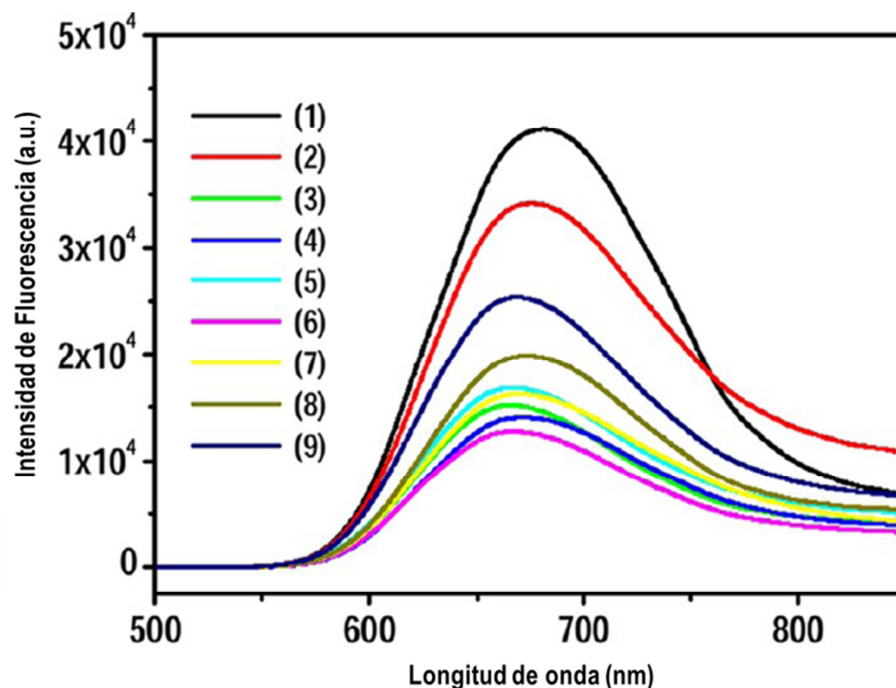
La capacidad de poder transferir los nanomateriales de un medio a otro es un claro indicador del potencial que tendrían estos nanomateriales en el desarrollo de distintas aplicaciones en medios con propiedades muy diferentes. Además, como bien es sabido, el medio que rodea a un fluoróforo (p.e. el disolvente) juega un papel muy

importante en la intensidad final de la emisión luminiscente e incluso algunas veces en la longitud de onda de emisión (efecto solvatocrómico).

Para comprobar la solubilidad de los AgNCs en diversos disolventes, la dispersión acuosa inicial que tenemos tras la síntesis de este nanomaterial se liofilizó obteniéndose una especie de pasta que fue dispersada en cloroformo. De esta disolución de cloroformo se hicieron alícuotas del mismo volumen y los viales se dejaron al aire para que el disolvente se evaporara. Este proceso se realiza con el fin de asegurar una concentración final igual en todas las alícuotas y así poder llevar a cabo la comparación. Tras la completa eliminación del disolvente, volúmenes iguales de agua, cloroformo, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, dimetilformamida, acetato de etilo, metanol y 2-propanol fueron añadidos al vial correspondiente y se realizaron las medidas de las propiedades ópticas.

Así, mientras que para la absorbancia no se encontró ninguna diferencia significativa observándose para todos los casos las correspondientes bandas de absorción, en el caso de la emisión fluorescente se observó un descenso de la intensidad y un ligero desplazamiento de la longitud de onda de emisión hacia el azul pasando de 680 nm para los AgNCs dispersados en agua a 660 nm para aquellos que se encuentran en acetona (véase Figura 59).

Asimismo, para poder compararlos mejor se realizaron las medidas correspondientes para calcular el QY de las distintas disoluciones de AgNCs. En la Tabla 14 se recogen los resultados comparándolos con los QYs de los QDs empleados en esta Tesis a modo de referencia. Como se puede observar, los QYs obtenidos para los AgNCs son del orden de los que tenemos para los QDs, sirviéndonos esto de referencia para tener una idea del potencial uso de los AgNCs como marcadores luminiscentes.



**Figura 59.** Espectros de la emisión fluorescente registrados para los AgNCs dispersados en distintos disolventes (1) agua, (2) cloroformo, (3) acetona, (4) acetonitrilo, (5) THF, (6) DMF, (7) acetato de etilo, (8) metanol, y (9) 2-propanol.

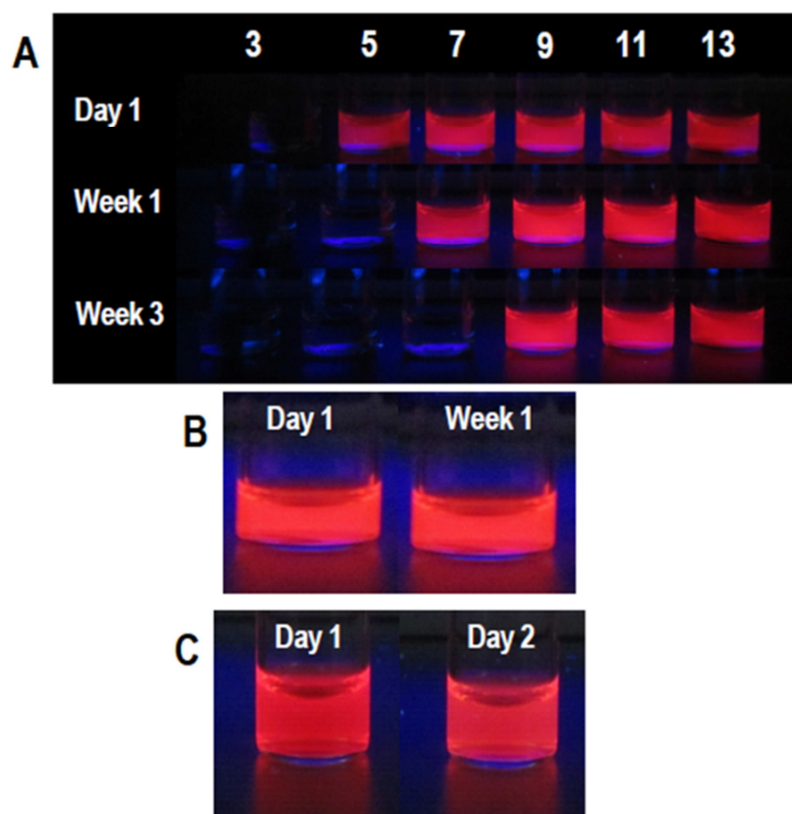
**Tabla 14.** Rendimientos cuánticos de los AgNCs en distintos disolventes y comparación con QDs

AgNCs	QYs (%)	QDs*	QYs (%)
Agua	12	Cloroformo	11
Cloroformo	10,7	Polímero pH 12	19
Acetona	4,8	Polímero pH 7,4	3
Acetonitrilo	4,5	MAA pH 12	6
THF	5,9	MAA pH 7,4	4
DMF	4,6	MES pH 12	8
Acetato de etilo	5,3	MES pH 7,4	5
Metanol	6,2		
2-propanol	8,2		

\*Valores extraídos de la Ref. [10]. MAA ácido mercaptoacético; MES 2-mercaptoetanosulfonato de sodio

Además es interesante resaltar que tras 2 semanas de almacenamiento sólo los NCs dispersados en agua, 2-propanol, acetonitrilo y DMF mantenían intactas sus propiedades ópticas.

A continuación se realizaron unos test de estabilidad de los AgNCs en una amplia gama de condiciones químicas, lo que nos aportará una idea sobre el manejo y almacenamiento así como de las posibles aplicaciones que se puedan desarrollar con este tipo de nanomateriales. Para ello, se siguió el mismo procedimiento de liofilización, redispersión en cloroformo, distribución en alícuotas y evaporación del disolvente explicado anteriormente. Tras la completa eliminación del disolvente, en los distintos viales se añadió el volumen correspondiente de PBS a distintos pHs (3, 5, 7, 9, 11, y 13), una disolución 1 M de NaCl y una disolución de un medio de cultivo celular. La estabilidad de dichas disoluciones se comprobó periódicamente exponiendo las disoluciones bajo la luz de una lámpara UV. Los resultados se pueden ver en las fotografías presentadas en la Figura 60.

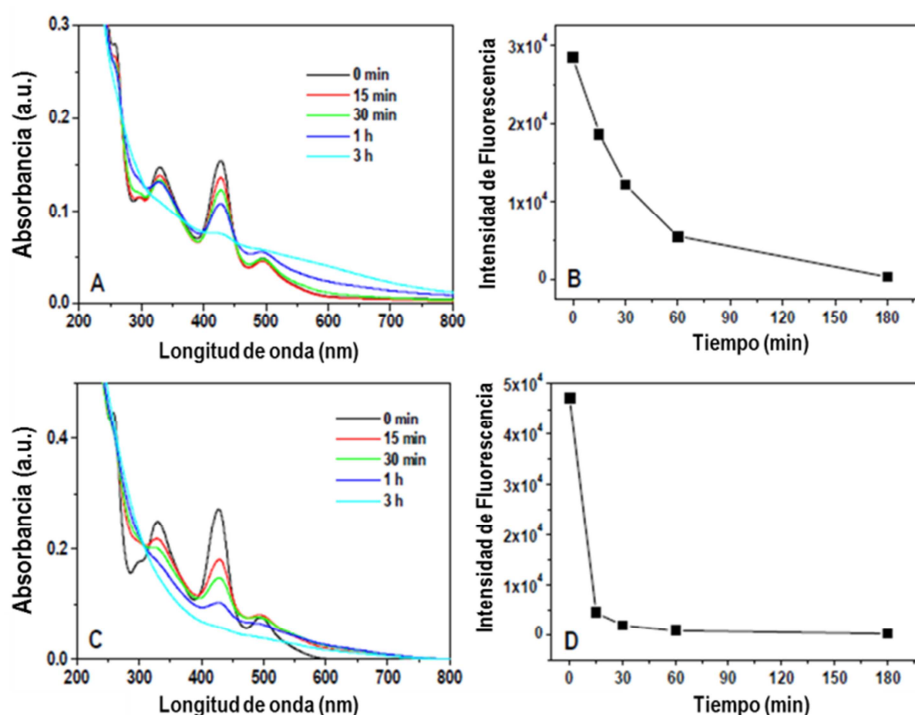


**Figura 60.** Test de estabilidad de los AgNCs. **A)** Estabilidad a distintos pH. **B)** estabilidad en medios con una alta concentración salina (1M de NaCl). **C)** Estabilidad en medio de cultivo celular.



A la vista de estas imágenes podemos concluir que los AgNCs son estables en medios de pH neutro-básico al menos durante 3 semanas, sus propiedades luminiscentes no se ven afectadas por concentraciones salinas elevadas en un periodo de tiempo aceptable (1 semana) y tampoco sufren alteración al estar dispersos en un medio de cultivo; Lo cual augura una muy buena disposición para futuras aplicaciones bioanalíticas.

Quizás el punto débil de los AgNCs aquí sintetizados sea su baja fotoestabilidad. Si bien es cierto que como acabamos de ver los NCs preservan sus propiedades de emisión largo tiempo estando almacenados en la oscuridad, cuando estos se dejan expuestos a la luz del día o se les irradia de forma continuada con luz UV pierden su fluorescencia en un periodo de tiempo relativamente corto, tal y como se puede ver en las gráficas de la Figura 61, lo cual podría limitar sus futuras aplicaciones. Así, en el caso de la exposición a luz natural las propiedades fotoluminiscentes de los AgNCs resultan completamente perdidas tras 3 horas, siendo este hecho más acusado para el caso de la irradiación UV donde dichas propiedades se pierden totalmente tan sólo en 30 min.



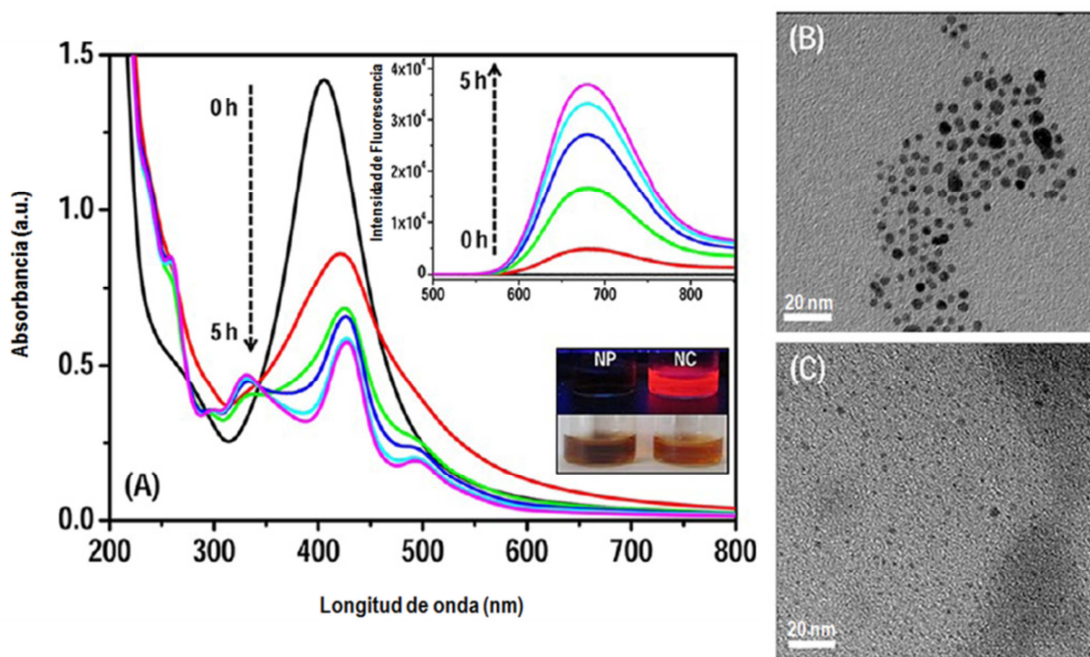
**Figura 61.** Progresión de los espectros de absorción (A) y de la intensidad de fluorescencia registrada (B) para los AgNCs expuestos a la luz del día. Progresión de los espectros de absorción (C) y de la intensidad de fluorescencia registrada (D) para la muestra de AgNCs sometida a irradiación UV.

Es por ello que se aconsejan futuras investigaciones para profundizar en la comprensión de este fenómeno con el objetivo de intentar resolver dicha limitación. Esta temática de trabajo se abordará en el segundo epígrafe (IV.3.3.) del presente Capítulo.

### IV.3.2.2. Síntesis basada en la metodología “Size focusing”

En esta segunda ruta sintética se parte de la nanopartícula metálica correspondiente para realizar la síntesis del nanocluster, así la podríamos clasificar como una metodología de síntesis “top-down”. Para ello, se tomaron unas AgNPs que habían sido sintetizadas con una relación de precursores 1:0,04:25, y se les añadió la cantidad de ligando y agente reductor necesarias para alcanzar las relaciones de producción de nanoclusters, poniéndose la reacción en las mismas condiciones ya optimizadas (temperatura ambiente, agitación continua y protegiendo el vial de la luz). De este modo se fueron extrayendo alícuotas del medio de reacción a lo largo del tiempo, y llevando a cabo su caracterización óptica mediante medidas de absorbancia y fluorescencia. Los resultados encontrados se recogen en la Figura 62, donde se puede ver que efectivamente la transformación NP→NC tiene lugar. Como se puede observar, la disolución inicial de AgNPs presenta la banda de absorción del plasmón superficial característica de este tipo de nanomaterial y no tiene emisión fluorescente (línea negra en los gráficos de absorbancia y fluorescencia de la Figura 62). A medida que transcurre el tiempo de reacción se observa cómo dicha banda de absorción evoluciona, dividiéndose finalmente en las tres bandas características de los nanoclústers.

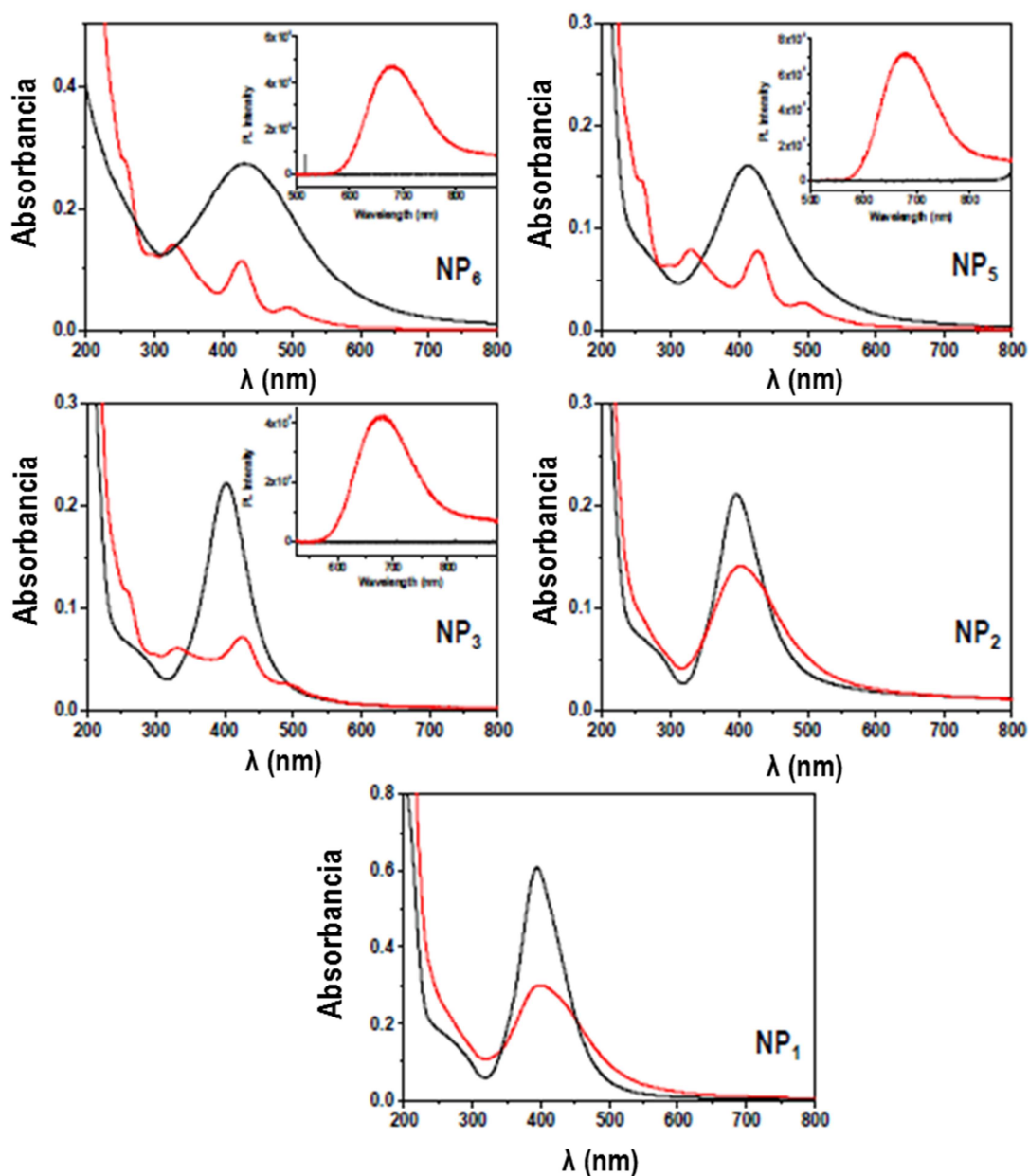
Paralelamente, si nos fijamos en la fluorescencia vemos que a mayor tiempo de reacción mayor intensidad se registra a la longitud de onda típica de estos AgNCs en medios acuosos (670 nm). Todo esto hace pensar que con este procedimiento se también se consiguen sintetizar los AgNCs. Finalmente, para corroborar que estábamos obteniendo los AgNCs, dos alícuotas (una de NP y otra de NC) se analizaron por TEM obteniéndose las micrografías que se adjuntan en la Figura 62 B y C; en las que se confirma el paso de un tamaño en torno a 10 nm de las NP a un diámetro medio de 2 nm para los NCs.



**Figura 62.** A) Evolución en el tiempo de las propiedades optoelectrónicas, absorbancia y fluorescencia, de la NP hacia las del NC. Aparecen representados los siguientes tiempos de reacción: 0 h (negro), 1 h (rojo), 2 h (verde), 3 h (azul oscuro), 4 h (azul claro), y 5 h (rosa). Se adjuntan las imágenes correspondientes a las disoluciones de NP (antes del proceso de *size focusing*) y de NC (tras su síntesis). B) y C) Imágenes de TEM de las AgNP y los AgNC, respectivamente.

También se comprobó que esta transformación de NP a NC sólo tenía lugar cuando se adicionaba tanto el ligando como el  $\text{NaBH}_4$  necesarios; en ausencia de cualquiera de estos dos reactivos la reacción no ocurre, manteniéndose intacta la NP.

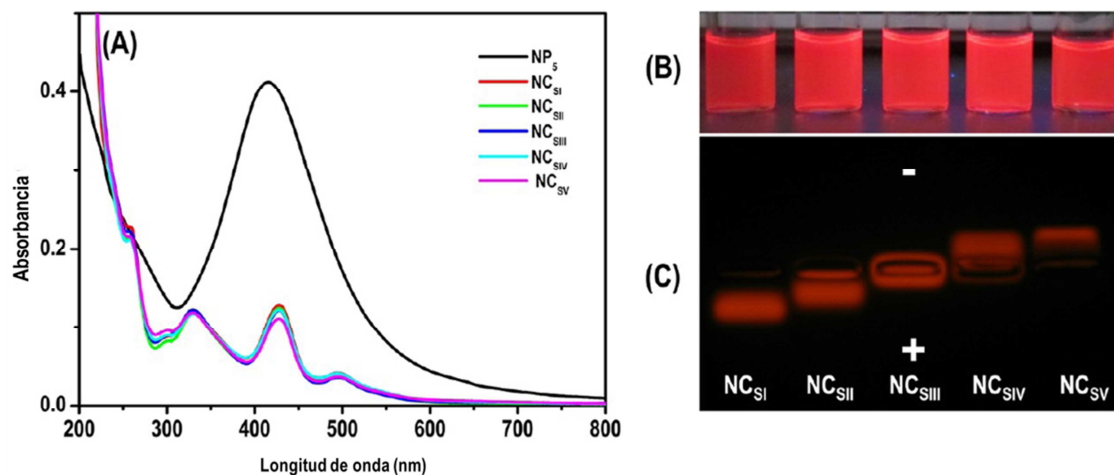
Asimismo, se observó que el proceso de *size focusing* sólo se producía para las NPs más pequeñas (aquellas cuyas relaciones metal:ligando empleados para su síntesis oscilaban entre 1:0,02 y 1:0,2) mientras que para las NPs más grandes (relaciones entre 1:0,001 y 1:0,01) no se producía este fenómeno (véase Figura 63). En este último caso sólo se produjo un decrecimiento en la intensidad de la banda de absorción del plasmón superficial.



**Figura 63.** Espectros de absorción de las NPs (trazo en negro) sintetizadas a diferentes relaciones metal:ligando, NP<sub>1</sub> (1:0,001), NP<sub>2</sub> (1:0,01), NP<sub>3</sub> (1:0,02), NP<sub>5</sub> (1:0,2), NP<sub>6</sub> (1:0,1); combinados con los espectros de absorción de los nanomateriales obtenidos tras el proceso de *size focusing* (trazo en rojo).

Finalmente también se evaluó la posibilidad de llevar a cabo la funcionalización *in situ* de los NCs a través de este procedimiento sintético. Para ello se llevaron a cabo 5 síntesis independientes partiendo de las mismas NPs y añadiendo distintas mezclas de ligandos: NC<sub>SI</sub> (100% TA-PEG-COOH), NC<sub>SII</sub> (mezcla al 50% TA-PEG-COOH/OCH<sub>3</sub>), NC<sub>SIII</sub> (100% TA-PEG-OCH<sub>3</sub>), NC<sub>SIV</sub> (mezcla al 50% TA-PEG-NH<sub>2</sub>/OCH<sub>3</sub>), NC<sub>SV</sub> (100% TA-PEG-NH<sub>2</sub>). Tras el proceso de *size focusing* todas las dispersiones de los nuevos AgNCs

sintetizados mostraron las propiedades ópticas esperadas, tal y como se observa en la Figura 64. Además se adjunta la imagen del correspondiente análisis por gel electroforesis donde se comprueba que la funcionalización había tenido lugar.



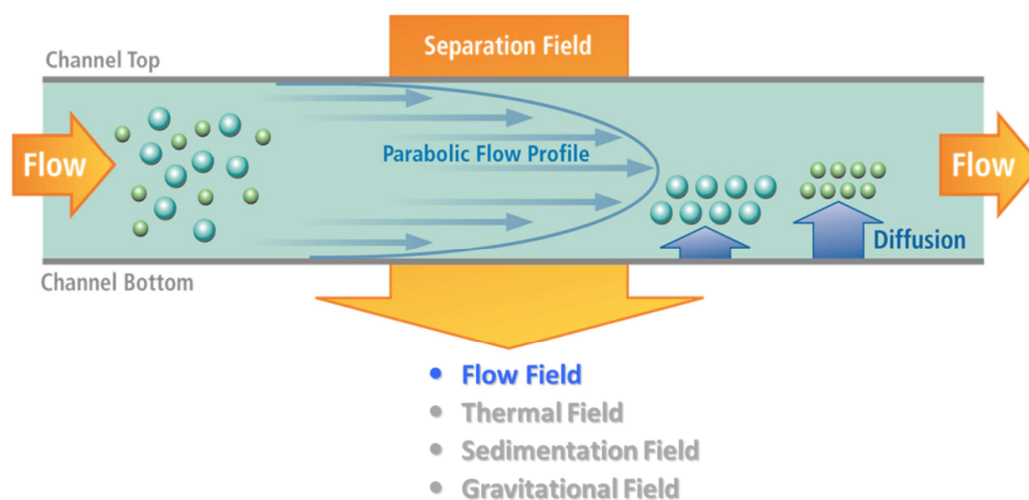
**Figura 64.** A) Espectros de absorción de los NCs funcionalizados obtenidos por *size focusing* comparados con el espectro de absorción de la NP de partida (línea en negro). B) Fotografía de las dispersiones acuosas de las muestras bajo luz UV. C) Imagen de gel de agarosa corrido para demostrar las distintas funcionalizaciones realizadas.

Esta metodología del *size focusing* aporta otro punto muy interesante y es que a parte de poner de manifiesto que se puede realizar la síntesis “top-down” de NCs, también evidencia que la hipótesis planteada anteriormente sobre el mecanismo de síntesis de los NCs por reducción directa se produce a través de la previa formación de la correspondiente NP podría estar acertada. Este hecho, como ya hemos avanzado, se estudiará en mayor profundidad en el siguiente epígrafe.

### IV.3.3. Estudio de los cambios nanoestructurales producidos a lo largo de la síntesis y tras la irradiación UV de los AgNCs.

#### IV.3.3.1. AF4 como herramienta de caracterización de nanomateriales

El AF4 es un modo particular de trabajo de la técnica de separación hidrodinámica conocida como *Field-Flow Fractionation* (FFF), que se utiliza para la separación física de pequeñas cantidades (masas en el intervalo de ng- $\mu$ g) de macromoléculas o partículas, por aplicación de un campo o fuerza externo. De este modo, dependiendo del tipo de fuerza aplicada tendremos las diferentes modalidades de trabajo de la técnica FFF, como se muestra en la Figura 65.



**Figura 65.** Representación esquemática del principio básico de funcionamiento de la técnica AF4 y los tipos de campos externos que se pueden aplicar para llevar a cabo la separación, destacando el empleado en esta Tesis Doctoral.

En concreto, para el caso particular del AF4 (técnica empleada en esta Tesis), se aplica un flujo secundario perpendicular al flujo conductor, por lo que la separación tendrá lugar en función de los coeficientes de difusión de las NPs. De manera resumida podemos decir que la separación de las NPs se consigue a lo largo del canal central debido a una retención diferencial de las mismas. Este proceso de retención tiene lugar como consecuencia del proceso de difusión de las partículas en el canal y de la propia

acción de un flujo externo aplicado perpendicularmente al flujo conductor a través del canal de FFF (véase Figura 65). El flujo externo enfoca a las partículas hacia la pared de acumulación, desde donde difunden de nuevo hacia el canal. Estas partículas forman “nubes” en el canal cuyo espesor depende del coeficiente de difusión de las partículas y de la fuerza de interacción aplicada de forma perpendicular al flujo principal. Cuando el flujo externo aplicado es constante y las partículas son esferas compactas homogéneas, el tamaño de las “nubes” formadas se puede relacionar con el coeficiente de difusión y con el radio hidrodinámico de la nanopartícula estudiada.

La detección tras el proceso de separación en el canal del FFF se puede llevar a cabo con detectores acoplados *on-line* como UV-Vis, fluorescencia, ICP-OES y/o ICP-MS, y también se pueden utilizar otros detectores *off-line* como SEM o TEM tras la recogida de la correspondiente fracción.

Como acabamos de ver, en esta técnica de flujo la separación se produce en función del tamaño de las partículas presentes en una muestra, y a diferencia de la conocida SEC, el rango ideal de tamaños para el cual es efectiva encaja muy bien con el requerido para el estudio de nanomateriales. De este modo, el AF4 ha llamado la atención a los investigadores de este campo como técnica complementaria para la caracterización de nanopartículas [11-13].

Por todo ello, en este epígrafe se decidió llevar a cabo estudios sobre los cambios nanoestructurales que se pueden producir a lo largo del proceso sintético de los NCs y tras la irradiación continuada con luz UV, para arrojar algo de luz sobre los mecanismos involucrados en dichos procesos, mediante el empleo de la técnica de AF4 acoplada a diversos detectores tanto moleculares (UV-Vis y fluorescencia) como elemental (ICP-MS).

IV.3.3.2. Elucidación del mecanismo de síntesis de AgNCs

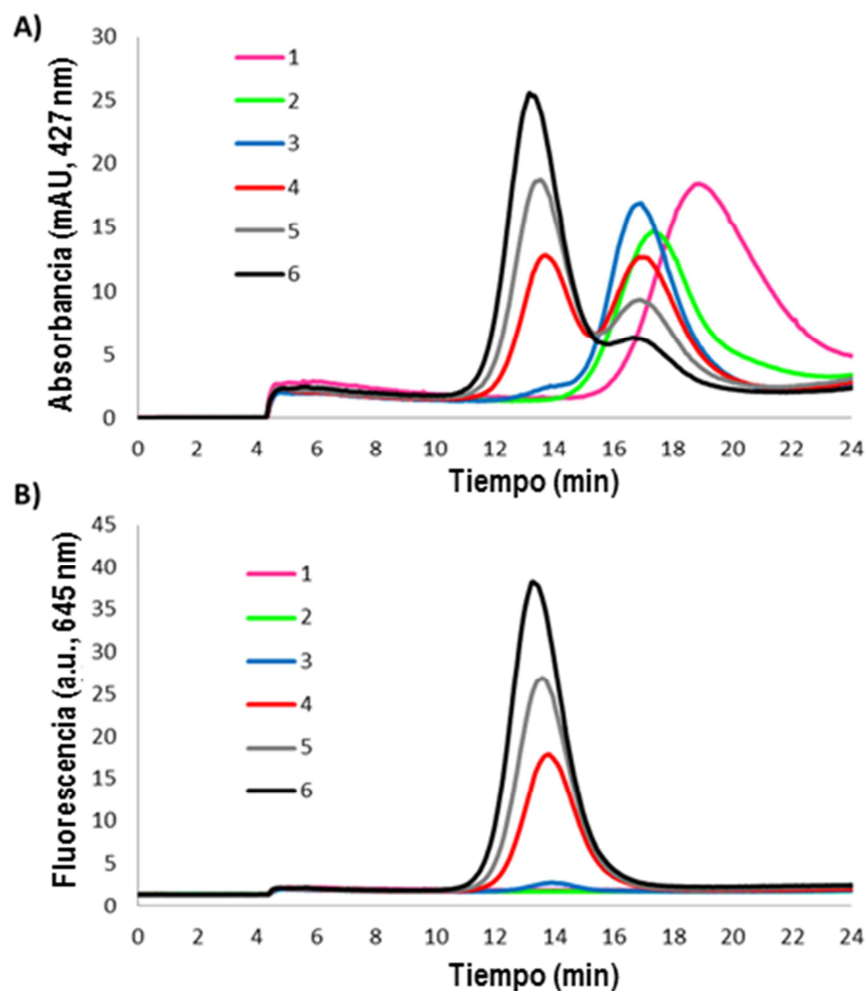
Como se apuntó en el epígrafe anterior de este Capítulo, se encontraron claras evidencias (monitorización de la síntesis por reducción directa a través de las propiedades ópticas y la metodología del *size focusing*) de que el mecanismo por el cual transcurría la síntesis de los AgNCs era vía previa formación de la correspondiente NP. Para corroborar estos hechos y dadas las excelentes características de separación del AF4, el cual sería capaz de separar NPs de NCs, se llevó a cabo la monitorización de una síntesis convencional de AgNCs extrayéndose alícuotas de la misma a distintos tiempos de reacción. En primer lugar y basándonos en publicaciones relacionadas con esta temática se realizaron las optimizaciones de las condiciones de trabajo en el equipo de AF4 acoplado *on-line* a los detectores de UV-Vis y fluorescencia y empleando una muestra de AgNCs ya sintetizados como referencia para ajustar los parámetros involucrados en la separación como son el tiempo de inyección (evaluándose un rango de tiempos entre 2-4 min), la velocidad del flujo cruzado (los flujos ensayados estuvieron comprendidos entre 2-4 mL/min) y la fase móvil (se probaron H<sub>2</sub>O Milli-Q, NaCl 0,9% y NH<sub>4</sub>Ac 0,1%). Las condiciones finales seleccionadas por obtener los mejores resultados y compatibilidad de todos los detectores, aparecen recogidas en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Condiciones experimentales de trabajo optimizadas para la separación de NPs y NCs en AF4.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor optimizado</b>
Tiempo de inyección	3 min
Tiempo de transición	1 min
Velocidad de flujo del TIP	0,2 mL/min
Velocidad de flujo cruzado	2,5 mL/min
Velocidad de flujo en el detector	0,5 mL/min
Fase móvil	NH <sub>4</sub> Ac 0,1%
Membrana de separación	Celulosa regenerada con un cut-off de 10 kDa
Dimensiones del canal	29 cm (largo) x 500 μm (grosor)
Detectores	UV-Vis: 427 nm
	Fluorímetro: 427/645 nm
	ICP-MS: <sup>107</sup> Ag, <sup>109</sup> Ag, <sup>103</sup> Rh (patron interno)



En estas condiciones fueron analizadas las alícuotas extraídas de una síntesis convencional (por reducción directa) de AgNCs a distintos tiempos de reacción tras la adición del agente reductor (5; 38; 70; 105; 150; y 300 min). Los fractogramas registrados se muestran en la Figura 66.

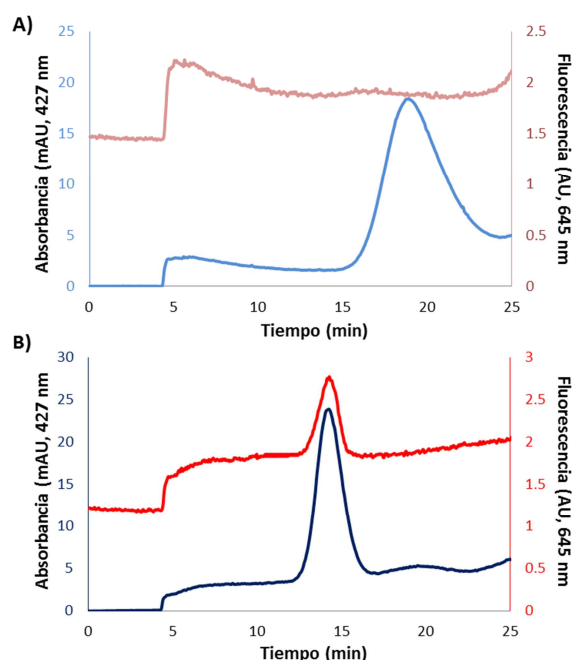


**Figura 66.** Fractogramas de las alícuotas de la síntesis de AgNCs por reducción directa extraídas a distintos tiempos de reacción: 1) rosa, 5 min; 2) verde, 38 min; 3) azul, 70 min; 4) rojo, 105 min; 5) gris, 150 min; y 6) negro, 300 min, monitorizando **A)** absorbancia y **B)** emisión fluorescente.

Como se puede apreciar en los fractogramas de la Figura 66, al comienzo de la reacción, durante los primeros 40 min, sólo se observa un pico de absorbancia a tiempos de retención largos (entre los 17-20 min), lo que teniendo en cuenta el mecanismo de separación del AF4 (las especies salen en orden según su tamaño de menor a mayor), sugiere que se trata de una especie de tamaño grande. A medida que transcurre la

reacción, vemos cómo este pico va sufriendo un desplazamiento a tiempos de retención menores (17 min) y que además se desdobra mostrando un pico alrededor de los 13 min que a medida que pasa el tiempo va adquiriendo mayor peso respecto al primero y que además presenta fluorescencia. Tras los 300 min de reacción la especie predominante es la que aparece a los 13 min y presenta absorbancia y fluorescencia, lo que nos hace pensar en que se trata de una especie más pequeña en tamaño que la que se formó inicialmente y que podrían ser nuestros AgNCs dadas las propiedades ópticas observadas. Así parece ser que este estudio también pone de relieve que el mecanismo de formación de los NCs transcurre vía previa formación de la correspondiente NP. Además, cabe decir que la especie que sale a los 13 min es la especie termodinámicamente favorecida en las condiciones de reacción que se llevaron a cabo.

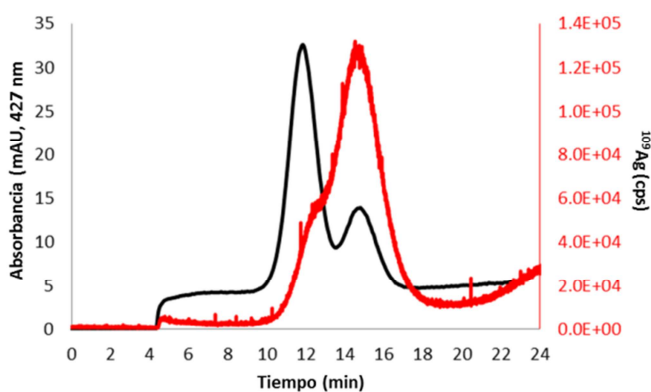
Esta afirmación se constató mediante un pequeño experimento en el cual una alícuota extraída a los 5 min de reacción no fue inyectada en el sistema AF4 hasta pasadas 2 horas. Si comparamos los fractogramas obtenidos para dicha alícuota y una extraída a los 5 min e inyectada directamente, se puede ver cómo dichos gráficos son completamente diferentes (véase Figura 67).



**Figura 67.** Fractogramas de la alícuota extraída a los 5 min (A) y a los 5 min “evolucionada” (B) detectados por UV-Vis y fluorescencia.

Como se puede observar en la Figura 67, mientras que el fractograma correspondiente a la alícuota inyectada directamente tras su extracción nos muestra que sólo tenemos la especie de mayor tamaño ( $t_R=19$  min), en la alícuota de 5 min inyectada tras 2 h se pueden observar dos picos correspondiendo a un perfil de una alícuota más evolucionada. Esto refleja que la especie que eluye a 13 min es la termodinámicamente favorecida de la reacción.

Además, para corroborar que ambas especies observadas en los fractogramas son nanoestructuras y no por ejemplo agregados de ligando (sobre todo la especie de mayor tamaño) la alícuota extraída a los 150 min también fue analizada por ICP-MS. El fractograma obtenido (véase Figura 68) revela que ambas especies contienen plata por lo que se puede decir que son nanoestructuras de plata de distintos tamaños. Hay que señalar que el hecho de que todos los detectores estuvieran acoplados en línea (*on-line*), y la conexión para el ICP-MS tenía un radio interno un poco más ancho, causó la pérdida de resolución entre los picos de ambas especies provocando que se solaparan un poco más. Por otro lado, también puede llamar nuestra atención que el segundo pico a pesar de que por absorbancia no sea el predominante sea el que proporcionalmente mayor contenido en Ag registre. Esto es debido a que, si efectivamente tomamos por válido que dicho pico corresponde a las NPs, éstas se componen de un mayor número de átomos (varios cientos) frente a los NCs que están constituidos por decenas de átomos, de ahí la inversión en la abundancia de picos al comparar la absorbancia con las medidas de ICP-MS.



**Figura 68.** Fractogramas de la alícuota extraída a 150 min detectados por UV-Vis e ICP-MS donde se comprueba que las especies eluidas contienen Ag.

Con todos estos datos podemos concluir que efectivamente la hipótesis planteada en el epígrafe anterior sobre el mecanismo de formación de los NCs es correcta. A través del proceso de síntesis planteado en un primer paso se forma la NP que evoluciona hacia la especie termodinámicamente favorecida, los NCs, mientras que la agitación juega un papel importante ya que acelera la cinética de dicha transformación.

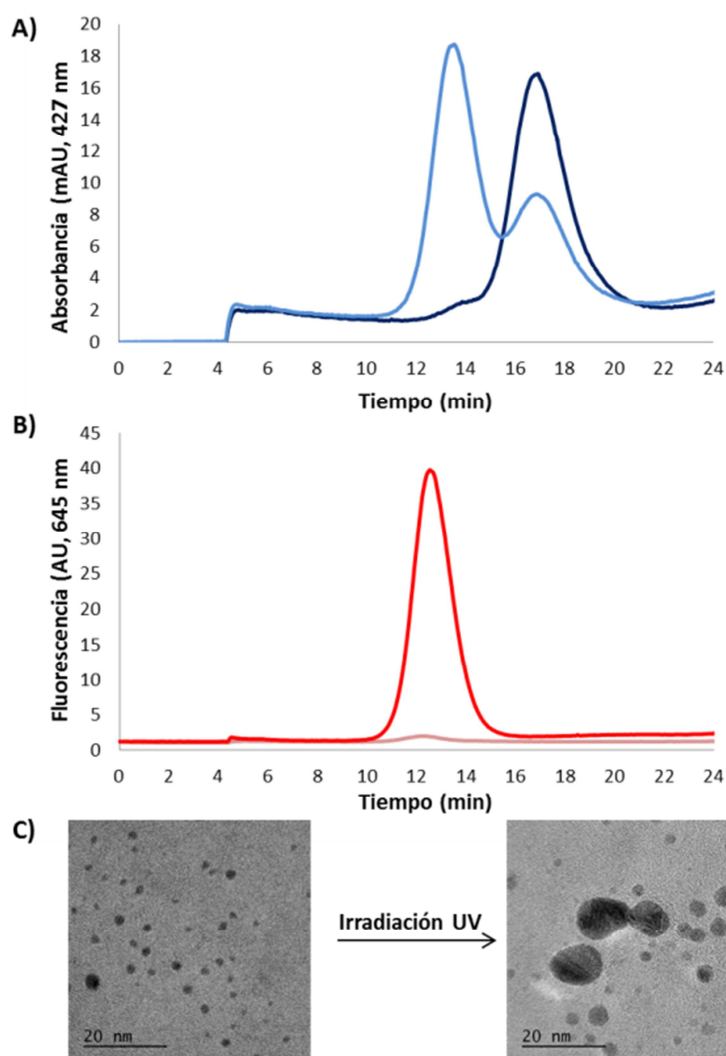
### IV.3.3.3. Evaluación de los cambios nanoestructurales ocurridos tras la irradiación UV de los AgNCs

Como ya hemos comentado con anterioridad, el punto débil de los AgNCs aquí sintetizados es su baja fotoestabilidad. En este apartado y ayudándonos tanto del AF4 como del TEM se intentó profundizar en la comprensión de este fenómeno para poder buscar alguna solución.

La degradación de las propiedades ópticas de los AgNCs tras una exposición prologada bajo luz UV se puede deber principalmente a: (1) la liberación de átomos de plata desde el núcleo del NCs, lo cual implicaría la destrucción del nanomaterial; (2) la agregación de los NCs catalizada por la luz UV; (3) la formación de una nanoestructura de mayor tamaño inducida por una fotoreacción. De este modo, para intentar averiguar cuál es el proceso o procesos involucrados en este fenómeno, una alícuota de AgNCs fue irradiada con luz UV durante 3 horas y después fue analizada por la técnica de separación AF4 acoplada a los detectores moleculares (UV-Vis y fluorímetro).

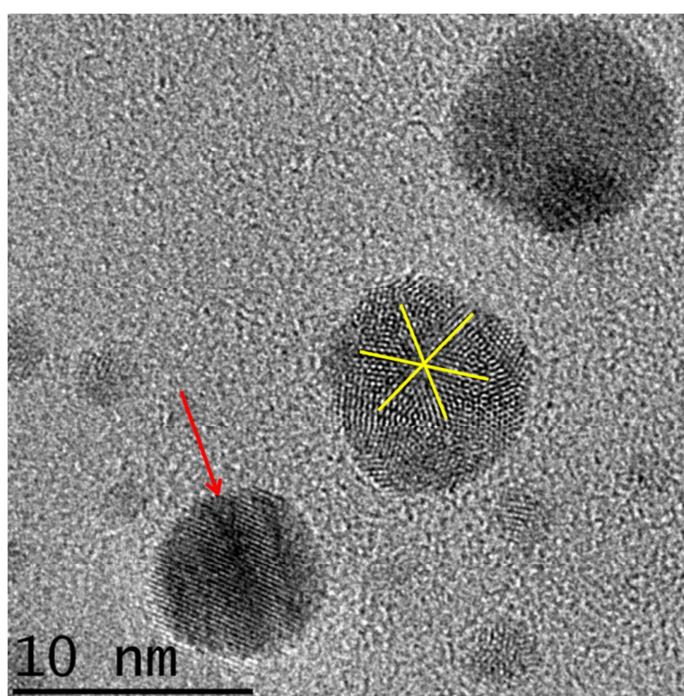
Como se muestra en la Figura 69, en los fractogramas recogidos se aprecia la formación de una especie de mayor tamaño que los NCs (debido a que eluye a tiempos de retención mayores, 17 min, que los registrados para dicha especie) por lo que se puede descartar el mecanismo (1) como vía principal de la pérdida de la emisión fluorescente de los NCs. La aparición de esta única banda que no presenta fluorescencia hace pensar en la formación de una especie de mayor tamaño, pero además curiosamente su tiempo de elución coincide con el observado para la NP en el estudio del mecanismo de formación de NCs.

Con el objeto de confirmar si realmente se está formando una nanoestructura de Ag de mayor tamaño o simplemente la pérdida de la fluorescencia se debe a la agregación de los NCs, dos alícuotas (una irradiada y otra sin irradiar) fueron analizadas por HR-TEM (véase Figura 69 C). Como se puede ver en las micrografías, tras la irradiación UV se produce un fuerte cambio en el tamaño del nanomaterial pasando de un tamaño promedio de 1,5 nm (alícuota no irradiada) a un tamaño de 10 nm para la muestra irradiada.



**Figura 69.** Estudio del efecto de la irradiación UV sobre las propiedades ópticas de los AgNCs. **A)** Fractogramas detectados por UV-Vis de la alícuota sin irradiar (azul claro) y la alícuota irradiada 3 h (azul oscuro). **B)** Fractogramas detectados por fluorescencia de la alícuota sin irradiar (rojo) y la alícuota irradiada 3 h (rosa). **C)** Micrografías de HR-TEM de la alícuota sin irradiar (izquierda) y la alícuota irradiada 3 h (derecha).

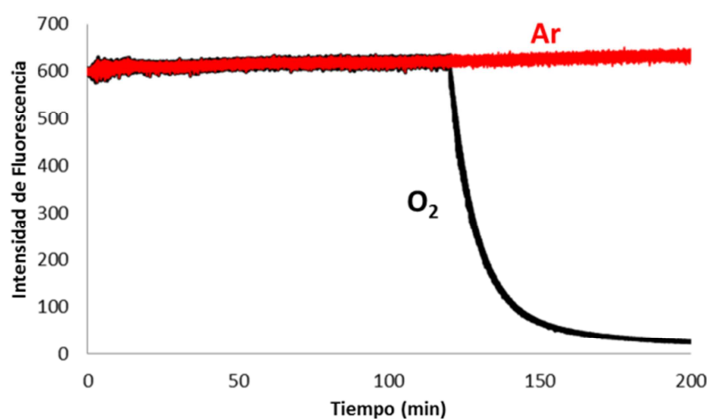
Además en la imagen de la alícuota irradiada también se puede observar que parece que la exposición a la luz UV induce un proceso de fusión de los NCs para dar lugar a la especie nanoestructurada de mayor tamaño. Decimos que esta nueva especie está nanoestructurada porque analizando las imágenes de HR-TEM de dicha especie se observan los dominios de planos pertenecientes al mismo grupo cristalino que el encontrado para los NCs (grupo espacial FM3M, parámetros de celda  $a=b=c= 4.085$ ,  $\alpha= 90^\circ$ , y una distancia entre planos de 2.359, característico de los átomos de Ag). Si nos fijamos en la Figura 70, entre dichos dominios se puede ver la formación de maclas (zonas no cristalinas que se producen por la unión de distintas unidades individuales de tamaño más pequeño para dar una estructura mayor) lo cual refuerza la teoría de que el proceso de irradiación provoca la formación de una especie de mayor tamaño frente a la posibilidad de que se induzca la agregación de los NCs en la que se tendrían que observar las unidades discretas de los NCs dentro de una estructura superior.



**Figura 70.** Micrografía de HR-TEM de la alícuota irradiada, en ella se puede observar hasta 3 nuevas nanoestructuras formadas por fusión de varios NCs, hechos que se confirman por la presencia de distintos dominios en la nanoestructura (señalados con líneas amarillas) y por la aparición de maclas (zona señalada con la flecha roja).

Por otro lado, también hay que hacer notar que esta nueva nanoestructura no presenta ninguna propiedad óptica típica de los NCs (no tiene emisión fluorescente) ni de las NPs (absorción del plasmón superficial).

En un intento de comprender mejor el porqué de esta transformación nanoestructural inducida por la radiación UV y considerando que el oxígeno podría tener un papel importante en este proceso teniendo en cuenta que en la bibliografía se encuentran descritos procesos de foto-oxidación para otros nanomateriales como los QDs [10], se decidió llevar a cabo un estudio en el cual dos alícuotas de AgNCs se someterían de forma paralela a irradiación UV evitando en uno de los casos la presencia de oxígeno en la disolución mediante el borboteo constante de un gas inerte como el Ar y realizándose la medida de fluorescencia de continuo a lo largo de toda la experiencia. Los resultados encontrados, que se recogen en la Figura 71, muestran que efectivamente el proceso que provoca la transformación es una foto-oxidación, no observando ningún cambio en la intensidad de la emisión fluorescente para el caso de la alícuota irradiada bajo atmósfera inerte de Ar.



**Figura 71.** Efecto de la irradiación UV sobre la emisión fluorescente de los AgNCs con el tiempo en presencia (línea negra) o en ausencia (línea roja) de oxígeno en el medio.

Estos resultados apuntan a que una de las vías para solventar la limitación de la baja fotoestabilidad de los AgNCs podría ser el almacenamiento y uso de los mismos bajo una atmósfera inerte. Está claro que esta solución y/o propuesta continúa limitando su aplicabilidad aunque de algún modo abre un poco su campo de trabajo. No obstante,

somos conscientes de que se han de introducir mejoras que realmente eliminen por completo este problema, siendo quizás una primera propuesta la búsqueda de ligandos que protejan en mayor medida el núcleo metálico de los efectos de la foto-oxidación.

### IV.3.4. Referencias

- [1] C.I. Richards, S. Choi, J.C. Hsiang, Y. Antoku, T. Vosch, A. Bongiorno, Y.L. Tzeng, R.M. Dickson, **Oligonucleotide-Stabilized Ag Nanocluster Fluorophores**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 5038.
- [2] J.T. Petty, J. Zheng, N.V. Hud, R.M. Dickson, **DNATemplated Ag Nanocluster Formation**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 5207.
- [3] C.L. Guo, J. Irudayaraj, **Fluorescent Ag Clusters via a Protein-Directed Approach as a Hg(II) Ion Sensor**, *Anal. Chem.*, 2011, 83, 2883.
- [4] J. Zheng, R.M. Dickson, **Individual Water-Soluble Dendrimer-Encapsulated Silver Nanodot Fluorescence**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 13982.
- [5] J.G. Zhang, S.Q. Xu, E. Kumacheva, **Photogeneration of Fluorescent Silver Nanoclusters in Polymer Microgels**, *Adv. Mater.*, 2005, 17, 2336.
- [6] Z. Wu, E. Lanni, W. Chen, M.E. Bier, D. Ly, R. Jin, **High Yield, Large Scale Synthesis of Thiolate-Protected Ag<sub>7</sub> Clusters**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 16672.
- [7] B. Adhikari, A. Banerjee, **Facile Synthesis of Water-Soluble Fluorescent Silver Nanoclusters and Hg(II) Sensing**, *Chem. Mater.*, 2010, 22, 4364.
- [8] K. Susumu, H.T. Uyeda, I.L. Medintz, T. Pons, J.B. Delehanty, H. Mattoussi, **Enhancing the Stability and Biological Functionalities of Quantum Dots via Compact Multifunctional Ligands**, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 13987.
- [9] E. Oh, K. Susumu, R. Goswami, H. Mattoussi, **One-Phase Synthesis of Water-Soluble Gold Nanoparticles with Control over Size and Surface Functionalities**, *Langmuir*, 2010, 26, 7604.
- [10] A.M. Coto-García, M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, **The Influence of surface coating on the properties of water-soluble CdSe and CdSe/ZnS Quantum Dots**, *J. Nanopart. Res.*, 2013, 15, 1330.



- [11] L. Calzolari, D. Gilliland, C.P. García, F. Rossi, **Separation and characterization of gold nanoparticle mixtures by flow-field-flow fractionation**, *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 4234.
- [12] A. Zattoni, D.C. Rambaldi, P. Reschiglian, M. Melucci, S. Krol, A.M. Coto Garcia, A. Sanz-Medel, D. Roessner, C. Johann, **Asymmetrical flow field-flow fractionation with multi-angle light scattering detection for the analysis of structured nanoparticles**, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 9106.
- [13] M. Bouby, H. Geckeis, F.W. Geyer, **Application of asymmetric flow field-flow fractionation (AsFIFFF) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) to the quantitative characterization of natural colloids and synthetic nanoparticles**, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 392, 1447.





**CONCLUSIONES / CONCLUSIONS**





## V. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

Las principales conclusiones derivadas de la presente Tesis Doctoral se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Se ha realizado la síntesis, solubilización y bioconjugación de QDs a distintas biomoléculas de interés como anticuerpos y conjugados de hapteno-BSA; proponiendo y evaluando dos metodologías de purificación de bioconjugados adaptadas a los requerimientos exigidos por cada tipo de bioconjugado obtenido (SEC *vs* UHF). Asimismo, se han desarrollado sendas metodologías de caracterización de bioconjugados: ELISA espectrofotométrico (Ab-QD) y Test de Bradford para el caso (haptenoBSA-QD); obteniéndose en ambos casos información cuantitativa necesaria para la posterior realización de un inmunoensayo cuantitativo.
2. Al no disponer comercialmente del conjugado MelBSA, se acudió a realizar su síntesis mediante un kit comercial de conjugación de haptenos a la molécula portadora (BSA). Posteriormente, para la caracterización de dicho conjugado, se ideó una metodología sencilla y barata basada en el empleo de MALDI + Test de Bradford que permitió conocer el peso molecular del conjugado, la relación hapteno:BSA, y la concentración de cada especie en el conjugado final (datos todos ellos indispensables para la posterior bioconjugación a los QDs).
3. Se ha llevado a cabo el diseño y completo desarrollo de una plataforma general de análisis que consiste en un inmunoensayo competitivo fluorescente basado en QDs. El carácter general de esta metodología ha sido demostrado mediante la aplicación de dicho inmunoensayo a la determinación cuantitativa de dos compuestos de interés como son la progesterona en leche de ganado bovino (importante para el sector ganadero) y la melamina en leche fórmula para bebés (importante para el sector de la alimentación y la salud).
4. Además, dado el carácter metálico de los QDs se investigó la posibilidad de emplearlos como marcas elementales en inmunoanálisis. De este modo, se adaptó

con éxito el formato de inmunoensayo previamente desarrollado, demostrándose su aplicabilidad en la determinación de progesterona. Este hecho nos permitió evaluar las posibles ventajas que ofrece el ICP-MS como detector de inmunoensayos como son la mejora de los límites de detección o la independencia de la señal respecto de la matriz de la muestra. Esto abre un nuevo campo de aplicación para el ICP-MS en el que cada vez se requieren bioensayos más sensibles dado que se intentan determinar biomoléculas a muy bajos niveles de concentración.

5. En respuesta a la demanda de nuevos marcadores que mejoren o solventen las limitaciones de las marcas ya existentes y/o mejoren la sensibilidad de los inmunoensayos, se ha desarrollado un nuevo protocolo de síntesis de unos nuevos nanomateriales conocidos como nanoclusters. Estos nanomateriales tienen propiedades optoelectrónicas muy interesantes (sobre todo su luminiscencia y la capacidad de absorber dos fotones) que los hace especialmente interesantes como marcadores tanto en inmunoensayos como en bioensayos *in vivo* guiados por imagen (*bioimaging*). Además dado que están compuestos por átomos metálicos, también podrían ser empleados como marcadores elementales para ICP-MS.
6. Se realizó una completa caracterización tanto de la síntesis y propiedades ópticas de los AgNCs así como de los cambios nano-estructurales provocados por procesos de irradiación UV, en un intento por ofrecer una mayor comprensión sobre la relación estructura-propiedad de estos nuevos nanomateriales. De este modo y gracias al empleo de la técnica de separación AF4 pudimos elucidar el mecanismo a través del cual se forman los NCs así como las transformaciones producidas por su exposición a la luz UV. Estos estudios revelaron que el mecanismo de síntesis de los NCs transurre a través de la previa formación de la NP correspondiente (hecho corroborado por la metodología *size focusing*) y que la baja fotoestabilidad de los NCs es debida a que son sensibles a la foto-oxidación.

The main conclusions that can be extracted from the present Ph.D. Thesis could be summarized through the following stages:

1. Synthesis, solubilization and bioconjugation of QDs to several biomolecules (antibodies and hapten-BSA conjugates) have been successfully carried out. Moreover, two methodologies of bioconjugate purification adapted to the each type of trazer requirements (SEC *vs* UHF) have been proposed and evaluated. Finally, it has been developed two bioconjugate characterization strategies taking into account the trazer under study: spectrophotometric ELISA bioassay for Ab-QD, and Bradford Test for haptenBSA-QD, obtaining in both cases quantitative information essential for the further development of the immunoassays.
2. Due to the fact that the conjugate MeI<sub>2</sub>BSA is not commercially available, its synthesis was performed using a comercial kit for conjugations of haptens to carrier proteins (BSA). A simple and cheap characterization system was designed based on the use of a combination of MALDI + Bradford Test, allowing us to know the molecular weight of the conjugate, the molar ratio hapten:BSA and the concentration of both especies in the conjugate. All these informations are indispensable for carrying out the subsequent attachment to QDs.
3. The design and complete development of a general analysis platform consisting on a fluoresecent competitive immunoassay based on QDs has been carried out. The general character of this methodology has been demonstrated by applying it to the determination of two analytes: progesterone in bovine milk (important for the livestock sector) and melamine in infant milk formula (important for the food and health fields).
4. In addition, due to the metallic carácter of QDs the possibility of being used as elemental labels for immunoanalysis was investigated. Therefore, the previous developed format of immunoassay was successfully adapted, proving its applicability for the determination of progesterone as “model

analyte". This fact allows the evaluation of the benefits that the ICP-MS can offer as detector for immunoassays including the improvement of the detection limits and the signal independence from the simple matrix. This study opens a new application field for the ICP-MS in these area where more sensitive bioassays are demanded.

5. In response to the great demand of new labels to improve or solve the limitations of the labels already developed and/or improve the immunoassay sensitivity, a new synthesis protocol to produce an emerging kind of nanomaterials named nanoclusters was developed. These nanomaterials have remarkable optoelectronic properties (e.g. luminescence and the two-photon absorption features) that make them especially interesting as labels for immunoassays and for *in vivo* imaging bioassays. Furthermore, due to the fact that the NCs are composed by metal atoms they also can be used as elemental labels for ICP-MS.
6. An exhaustive and complete characterization of the synthesis, optical properties and nanostructural transformations produced by UV irradiation of AgNCs has been accomplished, trying to understanding the relationship structure-property of these new nanomaterials. In this way, and due to the use of a separation technique known as AF4, it was elucidated the mechanism involved in the formation of the AgNCs along with the transformations caused by their UV exposition. These experiments reveal that the synthetic mechanism of AgNCs goes through the previous formations of the corresponding NP (fact that was observed with the synthetic methodology of "size focusing"). Also, it was proved that the low photostability of AgNCs is because of they are sensible to the photo-oxidation processes.



A decorative graphic consisting of three 3D-rendered spheres of varying sizes and positions. The largest sphere is in the upper right, a medium-sized one is in the middle right, and the smallest one is in the lower right. Two thin lines originate from the top left and extend towards the two upper spheres. A vertical line runs along the right edge of the page, ending near the bottom sphere.

**SUGERENCIAS PARA  
TRABAJOS FUTUROS /  
SUGESTIONS FOR FURTHER  
RESEARCH**



**VI. SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS / SUGGESTIONS FOR FURTHER RESEARCH**

A partir de los resultados obtenidos a lo largo de la presente Tesis Doctoral y considerando las conclusiones expuestas en el apartado anterior, es posible sugerir algunas líneas de investigación futura, entre las que destacan las siguientes:

- Extensión de la ruta sintética de NCs por reducción directa del metal en presencia de ligandos PEG funcionalizados a otros núcleos metálicos como Cu, Pd ó Pt.
- Evaluación de la toxicidad, citotoxicidad de los NCs, así como su metabolismo en el cuerpo humano.
- Desarrollo de inmunoensayos multiparamétricos basados en QDs y/o NCs con detección fluorescente.
- Desarrollo de inmunoensayos multiparamétricos empleando nanomateriales con distintos núcleos metálicos para llevar a cabo una detección elemental por ICP-MS.
- Evaluación del empleo de nanomateriales como marcadores elementales para el desarrollo de inmunoensayos basados en LA-ICP-MS.
- Investigar el uso de NCs como marcadores para bioensayos *in vivo* (*bioimaging*).

From the results obtained during this Ph.D. Thesis, and considering the conclusions previously presented, some future appealing research lines can be envisaged to continue this research work:

- Expansion of the synthetic route of NCs by direct metal reduction in the presence of PEGylated ligands to other metal cores such as Cu, Pd, or Pt.
- Evaluation of the toxicity, cytotoxicity of the NCs and their metabolism in the human body.
- Development of multiplexing assays based on QDs and/or NCs fluorescent detection.
- Development of multiplexing assays with elemental detection by ICP-MS using nanomaterials with different metal cores.
- Evaluation of nanomaterials as elemental labels for the development of immunoassays based on LA-ICP-MS detection.
- Investigation on the use of NCs as labels for *in vivo* imaging.







**PUBLICACIONES DERIVADAS  
DE LA TESIS DOCTORAL**







## VII. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

En la Tabla 16 se presenta una relación de las publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral junto con un detalle informativo sobre la calidad de las mismas basado en el índice de impacto y la posición que ocupa la revista científica dentro de una determinada categoría. Destacar que todos los trabajos han sido publicados en revistas científicas internacionales de relevante prestigio y además se encuentran situadas dentro del primer cuartil de su campo.

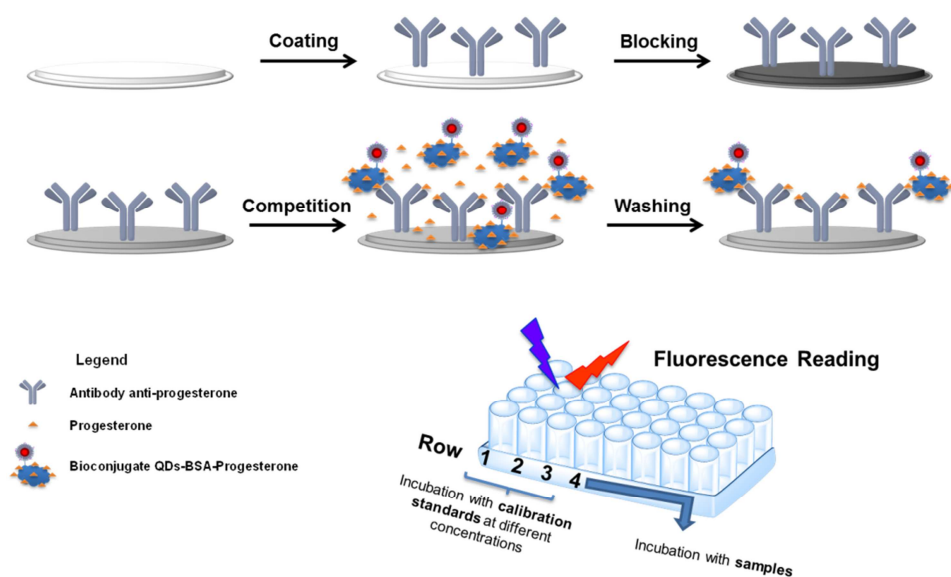
**Tabla 16.** Relación de publicaciones derivadas de la presente Tesis Doctoral. Datos obtenidos del Journal Citations Reports®

Referencia	Índice de impacto	Posición
Biosensors & Bioelectronics, 2011, 26, 4753-4759	5.602 (JCR 2011)	Nanociencia y Nanotecnología (14/66) Química Analítica (4/73)
Biosensors & Bioelectronics, 2012, 33, 165-171	5.602 (JCR 2011)	Nanociencia y Nanotecnología (14/66) Química Analítica (4/73)
ACS Nano, 2012, 6, 8950-8961	11.421 (JCR 2011)	Nanociencia y Nanotecnología (5/66) Química multidisciplinar (9/154)
Talanta, 2013, 106, 243-248	3.794 (JCR 2011)	Química Analítica (12/73)
Submitted to Analytical Chemistry, 2013	5.914 (JCR 2011)	Química Analítica (3/73)



## VII.1. Development of a quantum dot-based fluorescent immunoassay for progesterone determination in bovine milk (*Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26, 4753-4759)

Laura Trapiella-Alfonso, José M. Costa-Fernández, Rosario Pereiro, Alfredo Sanz-Medel





Contents lists available at ScienceDirect

## Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bios](http://www.elsevier.com/locate/bios)

## Development of a quantum dot-based fluorescent immunoassay for progesterone determination in bovine milk

Laura Trapiella-Alfonso, Jose M. Costa-Fernández, Rosario Pereiro, Alfredo Sanz-Medel\*

Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julian Clavería, 8, 33006 Oviedo, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 March 2011

Received in revised form 16 May 2011

Accepted 25 May 2011

Available online 1 June 2011

## Keywords:

Progesterone

Fluorescent immunoassay

Quantum dots

Progesterone-BSA conjugate

Bioconjugates

## ABSTRACT

The use of semiconductor quantum dots (QDs) as fluorescent labels to develop a competitive immunoassay for sensitive detection and quantification of progesterone in cow's milk is described. Colloidal water-soluble CdSe/ZnS QDs are conjugated to an antigen derivative (progesterone-BSA conjugate) and a simple methodology is optimised to determine the antigen concentration in the final bioconjugate. The obtained QD-linked antigens were then employed together with unlabelled anti-progesterone monoclonal antibodies, as the biological recognition elements, in the development of the quantitative QDs-based fluorescent immunoassay for progesterone in bovine milk.

After optimization, the developed immunoassay proved to cover a progesterone concentration range from 0.3 to 14.5 ng/mL in cow milk. Milk samples were just diluted 10-fold with deionised water and directly analysed with the proposed immunoassay, without additional sample pre-treatment or analyte extraction. The minimum detectable level ( $IC_{10}$ ) of the developed immunoassay turned out to be 0.1 ng/mL of progesterone in bovine milk. The sensitivity ( $IC_{50}$ ) achieved was 2.2 ng/mL with a reproducibility of 3.5% RSD as obtained from the results of the analysis of the triplicate of same samples but in three different days. Applicability of the proposed methodology was evaluated by analyzing cow's milk samples enriched with known concentrations of progesterone and recoveries better than 90% were achieved.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Accurate oestrus detection is crucial for timed and successful artificial insemination and early detection of the pregnancy. An early detection of a failed insemination is critical for maximising reproductive efficiency, as it could allow a meaningful elapsed time delay before a new repeated insemination. Furthermore, the poor ability to detect female animals in heat results in longer calving intervals and lower milk production (Pennington et al., 1976). Due to those reasons, reliable analytical methods to detect timely and accurately the occurrence of oestrus cycle and other reproductive states are needed (Fruggens and Chagunda, 2005; Gillis et al., 2002). Several methods, including measurement of milk temperature, radiotelemetric measurement of vaginal temperature or pedometric technologies, have been used for oestrus prediction. It goes without saying that the most effective and reliable method for the purpose is the direct determination of the level of progesterone in plasma or milk (Simersky et al., 2007).

Progesterone, a steroid hormone that is secreted in milk by the female mammals, is responsible of several activities related

to reproductive cycle such as breast glandular development or the preparation of the uterus for the pregnancy. Its concentration in milk has a characteristic variation along the oestrus cycle and so progesterone is accepted as an ideal biomarker to control the reproductive cow's state, to detect the animal heat and to diagnose cow's pregnancy (Käppel et al., 2007; Posthuma-Trumpie et al., 2009). It is well known that the onset of the heat is indicated by a rapid fall in the concentration of progesterone in milk to below 2–5 ng/mL. Furthermore, once the cow is pregnant the progesterone concentration remains high and constant (Carralero et al., 2007).

Different methods have been developed for accurate determination of progesterone in milk, including strategies based on thin layer, gas or liquid chromatography coupled to mass spectrometry detection (Darling et al., 1974; Díaz-Cruz et al., 2003). However, such techniques are limited by several drawbacks including substantial equipment costs and/or extensive and time-consuming sample pre-treatments, rendering progesterone routine determination an expensive analysis. Alternatively, immunochemical assays are the most popular approach nowadays for the determination of progesterone (Gillis et al., 2006). A wide variety of labels have been used in the development of progesterone immunoassays including radioisotopes, enzymes or fluorescent dyes (Byszewska and Markiewicz, 2006; Colazo et al., 2008; Käppel et al., 2007) pro-

\* Corresponding author. Fax: +34 985103474.  
E-mail address: [asm@uniovi.es](mailto:asm@uniovi.es) (A. Sanz-Medel).

ducing optical or electrical signals that can be correlated with the concentration of the analyte.

In this vein, inorganic semiconductor fluorescent nanocrystals, also known as quantum dots (QDs), have emerged in the last decade as materials with great potential in bioanalysis (Bruchez et al., 1998; Coto-García et al., 2011). Due to their innovative and highly valuable optoelectronic properties, QDs are becoming an excellent alternative to the more conventional fluorophore dyes in luminescent methodologies (Mattoussi et al., 2004). The ability to keep the functionality of biomolecules attached to QDs allowed the use of these nanomaterials as powerful luminescent labels to develop innovative fluorescent immunoassays. Since the pioneer developments in 1998 (Bruchez et al., 1998; Chan and Nie, 1998), QDs have been used to develop useful immunoassays in different formats, such as microarrays (Geho et al., 2005) or Western blotting (Bakalova et al., 2005). However, very few direct quantitative immunoassays using QDs have been developed so far.

In this article the development and analytical evaluation of a QDs-based fluorescent immunoassay for progesterone, detection and quantification in milk is discussed. The synthesis and characterization of the water soluble colloidal nanoparticles of CdSe/ZnS was carried out first. Then the QDs were bioconjugated to a derivative of the antigen, the progesterone-BSA (Pro-BSA) conjugate, following the chemistry of the carbodiimide. Considering that the antigen (progesterone) is a hapten (small molecule that only has one site of binding with the antibody), the immunoassay design was restricted to a competitive format. Thus, free antigen present in the sample and constant (and known) amounts of labelled antigen were incubated in a microtiter plate coated with a limited amount of antibody. So, the competition for the antibody binding sites is established. After that, the fluorescence signal measurement of the QD label takes place and the inhibition curve characteristic of the immunoassay is plotted.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and materials

All experiments were carried out using analytical grade reagents (see below) used as received without any further purification. Deionised ultrapure water (resistivity 18.2 M $\Omega$ /cm) was used throughout the work.

#### 2.1.1. Reagents used for the synthesis of the fluorescent nanoparticles

The CdSe/ZnS QDs, used as fluorescent labels, were synthesized in our laboratory. The precursors used for the synthesis of the nanoparticles were selenium powder (100 mesh, 99.99%), cadmium oxide (99.99%), hexamethyldisilathiane, 1.0 M diethyl zinc solution in hexane, trioctylphosphine (TOP, 90%) and trioctylphosphine oxide (TOPO, 99%), all of them purchased from Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA) and hexylphosphonic acid (HPA) obtained from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). The methanol HPLC gradient grade and chloroform anhydrous ( $\geq 99\%$ ), used to purify the synthesized QDs, were from Prolabo (Leuven, Belgium) and Sigma Aldrich, respectively.

A selenium stock solution was prepared in an Ar-filled dry-box by dissolving 1.63 mmol of selenium powder in 7.5 mL of TOP, to produce a solution of trioctylphosphine selenide (SeTOP). A zinc sulphide (ZnS/TOP) stock solution was also prepared in Ar atmosphere by mixing 1.18 mmol of hexamethyldisilathiane, 8.34 mmol of diethyl zinc and 10.25 mL of TOP.

Water-solubilisation of QDs was achieved by coating them with an amphiphilic polymer synthesized in our laboratory (Fernández-Argüelles et al., 2007). For such purpose, poly(isobutylene-alt-

maleic anhydride), dodecyl amine and tetrahydrofuran anhydrous were purchased from Fluka (Basel, Switzerland) and Sigma Aldrich, respectively. The cross linker bis(6-aminohexyl)amine (Fluka) employed for the stabilization of the polymeric layer was stored at 4 °C.

#### 2.1.2. Immunological reagents and solutions

The antigen, 98% progesterone, was obtained from Sigma-Aldrich. The progesterone bovine serum albumin conjugate (Pro-BSA), employed in the bioconjugation to the QDs, was obtained from AbD Serotec (Dusseldorf, Germany). The mouse monoclonal anti-progesterone antibody (1 mg/mL) was purchased from AbD Serotec. The ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) was purchased from Fluka and was stored at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  in the freezer. For the QDs bioconjugation a solution 0.01 M of EDC was prepared in 100 mM phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 and used immediately.

Bovine serum albumin (BSA), casein and powder milk obtained from Merck and Sigma Aldrich were compared as blocking solutions. A 0.05% Tween 20 solution (Sigma-Aldrich) in PBS pH 7.4 buffer was used as washing solution.

A 50 mM borate buffer solution (SBB) at pH 12 was prepared to break the immunological interactions to allow dissolution of the QDs from the immunoassay well plate before fluorescence measurement.

Amicon Ultra-4 100 KDa centrifugal filters from Millipore (Madrid, Spain) were used to purify the Pro-BSA-QD bioconjugates after synthesis. A Bradford reagent from Sigma was employed in the indirect estimation of progesterone concentration in the bioconjugate based on Bradford Test.

### 2.2. Instrumentation

White microtiter plates (96 wells) were obtained from Varian (Madrid, Spain) and used in all immunoassays. The spectrophotometric measurements were carried out in a UV/Vis/NIR spectrophotometer (Perkin Elmer Lambda 900). The fluorescent measurements were performed in a spectrofluorimeter Cary Eclipse (Varian) equipped with a microplate reader module. A SUPRASIL quartz cuvette (model 105.254-QS of Hellma, Müllheim, Germany) with 45  $\mu\text{L}$  volume was employed for spectrophotometric measurements. To process the data obtained and fit the inhibition curves a SOFTmax Pro software from Molecular Devices (Ismaning, Germany) was used.

Photoactivation of our synthesised CdSe/ZnS QDs was performed using a 365 nm UV lamp (6 W, Viltbert Lourmat, Torcy, France).

A heating mantle with energy heater control (JP Selecta, Barcelona, Spain) with simultaneous stirring was employed to carry out the nanoparticle synthesis. To keep a constant argon atmosphere inside the flask, a needle with argon flow was used. This flow was set to 25 mL/min by means of a rotameter (Serv' Instrumentation, Irigny, France).

### 2.3. Protocols

#### 2.3.1. Synthesis of CdSe/ZnS quantum dots

CdSe/ZnS QDs were synthesized using CdO as precursor via the organometallic route described by Peng's group (Peng and Peng, 2001) with slight modifications. Briefly, 1.23 mmol of CdO, 0.6 g of HPA and 17.5 g of TOPO were loaded into a 250 mL glass three-necked flask. The mixture was heated up to 300–320 °C under argon flow for 15–20 min to allow the complete dissolution of CdO in HPA and TOPO. After cooling the temperature of the solution down to 270 °C, 6 mL of the SeTOP solution was swiftly injected. After injection, nanocrystals were left to grow for about 11 min at 250 °C. Once

the growth process has reached the desirable core size, 7.5 mL of ZnS/TOP solution was added slowly at 230 °C in order to allow the generation of the shell, and then it was cooled down to 100 °C for an hour. A schematic illustration is available in [Supplementary Information Scheme S1](#). Once the synthesis was finished, to isolate the QDs from the excess of the reaction media, a purification step was implemented based on nanoparticles precipitation with MeOH. The solid, containing the QDs, was washed with three cycles of 10 mL MeOH (and after each cycle it was centrifuged to remove excess of reagents) and then redispersed in anhydrous chloroform. Finally, this colloidal solution was characterised spectroscopically by UV/VIS and by fluorescence. In this way the size of nanoparticles, their concentration in the solution, the maximum emission wavelength and the size distribution could be assessed.

The final stock solution was stored at room temperature in the dark.

### 2.3.2. Water solubilisation of QDs

The fluorescent QDs used in our experiments were synthesized from organometallic precursors and are inherently hydrophobic. In order to make the nanoparticles hydrophilic to render them compatible (water soluble) with bioanalytical applications, as well as to achieve their bioconjugation in our laboratory with appropriate biomolecules, the QDs were coated with an amphiphilic polymer (based on poly-maleic anhydride functional groups), following a procedure recently described ([Fernández-Argüelles et al., 2007](#)). The process consists on a series of consecutive steps of addition and evaporation of polymer and crosslinker solutions. The obtained water-solubilised QDs were stored before use in 50 mM SBB at pH 12.

### 2.4. Milk samples

A commercial bovine whole milk (ultra-high temperature, UHT, processed) was employed for the immunoassay optimization and to obtain the progesterone calibration curves. Such commercial cow milk was selected due to the high similitude of its matrix to the real bovine milk and the absence of detectable amounts of progesterone.

The applicability of the developed immunoassay to real sample analysis was investigated by analysing two types of milk: a bovine fresh milk (M1) and a pasteurized whole cow milk (M2). It should be noted that it was not necessary to perform any sample pre-treatment to the milk samples, except for a 10-fold milk dilution with Milli-Q water, prior to the progesterone determinations.

## 3. Results and discussion

Two different assay schemes were compared for the development of a competitive fluorescent immunoassay allowing sensitive detection and quantification of progesterone in cow's milk. One scheme was based on a direct immunoassay, in which anti-progesterone monoclonal antibodies were labelled with the fluorescent nanoparticles. The wells of the microtiter plates were coated with the antigen (progesterone) and a competitive assay (incubation of the sample with labelled antibodies) was investigated. Unfortunately, after optimization of this bioconjugation protocol and the immunoassay experimental parameters, sensitivity achieved was not enough (observed detection limits (DLs) were too high for the desired application).

Alternatively, an indirect immunoassay scheme, based on the conjugation of colloidal water-soluble CdSe/ZnS QDs to a derivative of the antigen (progesterone-BSA conjugate) was investigated. In this approach, the wells of the microtiter plates were coated with the anti-progesterone monoclonal antibodies and the competitive assay was based on an incubation of such microtiter plates with

standards or samples containing progesterone and labelled antigen. Therefore, a bioconjugation of the antigen with the luminescent QDs, as labels, was needed.

### 3.1. Bioconjugation of the labelling QDs to progesterone and its purification

Perhaps the largest obstacle to a wider implementation of QDs as fluorescent labels for immunoassays has been the absence so far of "one bioconjugation reaction fits all" whereby one can attach a variety of biomolecules to QDs by a simple and reproducible scheme.

As QDs are synthesised from organometallic precursors and are inherently hydrophobic, appropriate bioconjugation and application of the nanoparticles in the development of immunoassays requires to water-solubilize the synthesised QDs. In our case (see procedures) we encapsulate the native hydrophobic QDs within a "bifunctional hydrophobic-hydrophilic" polymeric shell ([Fernández-Argüelles et al., 2007](#)). The hydrophilic functions of the polymer shell not only mediate water-compatibility but can be also used for further bioconjugations.

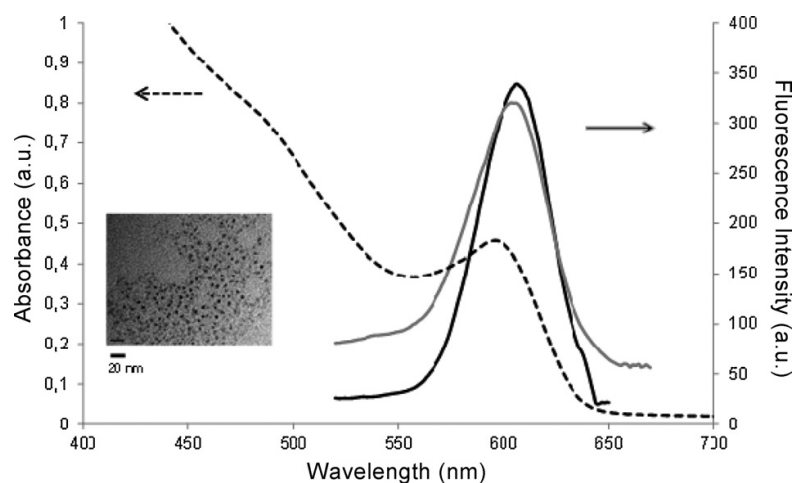
The assayed strategy for creating QD bioconjugates was based on a chemical coupling procedure, based on modifying the COOH groups of the outer polymeric layer with EDC chemistry for subsequent attachment of amine groups ([Sun et al., 2001](#)). Thus, a derivative of the progesterone (the commercially available Pro-BSA conjugate) was used here to facilitate the bioconjugation of the fluorescent water-soluble QDs to the analyte using EDC as a catalyst (please do note that, after the bioconjugation, the progesterone from the Pro-BSA remained able to interact with the antibody). This reaction is performed at room temperature with constant stirring for 2 h (See [Supplementary Information Scheme S2](#)). The molar ratios used to carry out the bioconjugation reaction were optimized by varying the ratios QDs:Pro-BSA between 1:1 up to 5:1 (in order to ensure a success in the bioconjugation, an excess of EDC was added in a ratio of 1500 mol of EDC per mol of biomolecule). Optimum molar ratio values obtained (resulting in higher fluorescence intensity emission signals from the bioconjugates) were of 2:1:1500 (QDs:Pro-BSA:EDC).

A purification step was needed to separate the bioconjugates from the excess of reagents and lateral products after the conjugation. Considering the differences on the molecular weight of the Pro-BSA conjugate (74.7 KDa) and of the Pro-BSA-QD bioconjugate (>150 KDa), purification of the QD-bioconjugate was carried out by ultrafiltration (UHF) using a 100 KDa membrane filter. Experimental conditions used for UHF were 5000 rpm, 5 min × 6 cycles (3 washes) and 4 °C.

The bioconjugate, after appropriate purification, was characterised to evaluate the possible effect of the bioconjugation process on the luminescent emission of the QDs labelling to the Pro-BSA. As can be seen in [Fig. 1](#), it was observed that the purified bioconjugated Pro-BSA-QDs emits an intense fluorescence at the same wavelength maximum characterizing free colloidal CdSe/ZnS QDs. Moreover in [Fig. 1](#) it is collected the absorbance spectra and TEM image of the QDs used in the immunoassay showing their complete spectroscopic characterization and the homogeneous size distribution. Next, the efficiency of the bioconjugation reaction used was studied.

### 3.2. Estimation of the concentration of progesterone in the bioconjugate

To optimize the final quantitative fluorescent immunoassay the concentration of the labelled progesterone in the bioconjugated fraction should be known. A simple indirect methodology, based on the Bradford test ([Bradford, 1976](#)), was used which



**Fig. 1.** Spectroscopic properties of QDs: fluorescence emission spectra (line in black) and Absorbance spectra (dotted line in black). The fluorescence spectra of QDs after their bioconjugation to anti-progesterone antibody is also included (line in grey). The inset of the graph shows a TEM image of the QDs.

allowed us to evaluate the reaction/purification yield. The filtrated fraction (where the excess of non-labelled Pro-BSA is expected) was collected, along with the purified bioconjugate (Pro-BSA-QD) during the purification step. The filtrated fraction was then pre-concentrated, by using a 30 KDa filter, reducing the solvent up to a volume equal to the initial volume used in the bioconjugation reaction (this step is required to determine the Pro-BSA which is not bind to QDs). The filtrated and pre-concentrated fraction and an aliquot of the Pro-BSA standard are then analysed as individual samples by a conventional Bradford test. BSA was used as a standard for such purpose and a range of concentrations between 0–1 µg/mL were tested.

The test correlates the ratio between absorbance of the samples measured at 465 and 595 nm (595/465) with the BSA (protein) concentration. Considering the concentration of BSA obtained for the sample, along with the molar ratio Pro-BSA (20:1) provided by the commercial specifications of the Pro-BSA standard, and using the Eqs. (1) and (2), the progesterone (Pro) concentration in the bioconjugate was estimated as follows:

$$[BSA]_{Bioc} = [BSA]_{Standard} - [BSA]_{UHF} \quad (1)$$

$$[Pro]_{Bioc} = [BSA]_{Bioc} \left( \frac{20M_{Pro}}{M_{BSA}} \right) \quad (2)$$

Being  $[BSA]_{Bioc}$  the concentration of the BSA in the purified bioconjugate  $[BSA]_{UHF}$ , is the concentration of BSA in the conjugate not labelled to QDs (present in the filtrated fraction)  $[Pro]_{Bioc}$ , is the concentration of progesterone in the purified bioconjugate,  $M_{Pro}$  is the molecular weight of progesterone and  $M_{BSA}$  is the molecular weight of BSA.

Furthermore, the yield of the bioconjugation reaction can be calculated now using the expression (3).

$$Yield = \left( \frac{mol_{BSA_0} - mol_{BSA_{UHF}}}{mol_{BSA_0}} \right) 100 \quad (3)$$

where  $mol_{BSA}$  is the BSA initial mols existing in the Pro-BSA conjugate added and  $mol_{BSA_{UHF}}$  are the BSA mols of the Pro-BSA conjugate not bioconjugated to QDs.

Using such methodology, the concentration of the progesterone bioconjugate and the yield of the bioconjugation procedure were estimated, obtaining in all the cases a progesterone conjugation yield above 95 ± 2%.

### 3.3. Development of the competitive fluorescent immunoassay

As mentioned above, the wells of the microtiter plates were coated with the anti-progesterone monoclonal antibodies in the assay developed. After a necessary blocking step, the competitive assay was based on an incubation of the microtiter plates with standards or samples containing progesterone and with a known amount of labelled antigen. After competitive binding between progesterone from the sample and the Pro-BSA-QDs bioconjugate with the immobilised antibody sites and the necessary washing step, the fluorescence emission from the QDs of the Pro-BSA-QDs (recognised by the anti-progesterone monoclonal antibodies coating the wells of the microtiter plates) will constitute the analytical signal of this assay.

Thus, the concentration of the microtiter plate coating solution and the nature and concentration of the blocking solutions were optimised using progesterone as analyte dissolved in an aqueous buffered media at pH 7.4. Different concentrations of anti-progesterone antibody (Ab) (0.3, 1, 3 and 5 µg/mL) were tested as coating solutions, looking forward to obtain the maximum sensitivity for progesterone determination. The blocking solutions under study were 1% BSA, 3% casein and powder milk at 1% and 5% (trying to minimize as much as possible the unspecific adsorptions). The best results of the assay were obtained using 3 and 5 µg/mL of Ab as coating solution and 3% of casein for the blocking step, being 3 µg/mL of Ab selected for further studies.

Additionally, the concentration of the bioconjugate, also added during the immunoassay, was also optimized. Three concentrations (0.5, 1 and 5 µg/mL) were evaluated. It was found that a solution containing 1 µg/mL Pro-BSA-QDs resulted in lower DLs and wider linear range, approaching the requirements for the determination of basal progesterone in milk samples.

Finally, the ratio between free and labelled antigen added in the immunoassay was also investigated, aiming at obtaining the maximum luminescent signal with the minimal amount of bioconjugate. Following such experimental criteria a 1:3 sample:bioconjugate molar ratio was finally selected (see Fig. 2). Some other experimental conditions such as the composition of the blocking solutions or the volume of sample used for the immunoassay were also optimized and all final experimental conditions selected are summarised in Table 1.



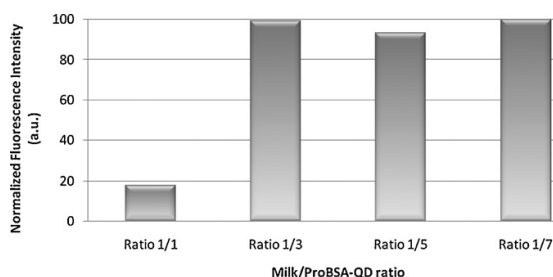


Fig. 2. Variations on the fluorescence emission of Pro-BSA-QDs recognized by the immobilized Ab after incubation of the microtiter plate with different diluted milk:bioconjugate ratios.

Table 1  
Optimized experimental conditions of the immunoassay.

Step	Procedure
1. Coating	100 $\mu$ L/well Ab incubated at 37 °C, 6 h.
2. Blocking	200 $\mu$ L/well 3% Casein incubated at 4 °C, overnight.
3. Washing	200 $\mu$ L/well PBS-Tween 20 pH 7.4
4. Immunoassay	200 $\mu$ L/well standard or sample + bioconjugate mixture
5. Washing	200 $\mu$ L/well PBS-Tween 20 pH 7.4
6. Photoactivation	UV lamp (270 nm) during 2h
7. Redissolution	50 $\mu$ L/well 50mM SBB buffer pH 12
8. Measurements	Cary Eclipse (Varian)

Photoluminescence decay of the QDs can be observed after bioconjugation or chemical reactions (e.g. QDs water solubilisation) generally assigned to undesirable defects generation on the semiconductor surface (Dembski et al., 2008). Also, it has been shown that exposure of colloidal QDs to UV or visible light (photoactivation) is a powerful tool for increasing their photoluminescence after their synthesis or further functionalization (Manna et al., 2002; Zhelev et al., 2004). So far, different interpretations for the QDs photoenhancement process can be found in the literature (Carrillo-Carrion et al., 2009). In general, the essence of the photoactivation seems to be elimination of topological surface defects, that is, the smoothing of the nanoparticle surface during photocorrosion. On the other side, adsorbed water molecules may act helping to oxidize the surface of the QDs resulting in a blue shift of the exciton emission and this introduces eventually new surface defects decreasing luminescence. The competition between those two processes should explain the complex behavior of the observed photoenhancement of QDs in aqueous media. Thus, we investigated here the effect of a photoactivation step of the QDs

(before measuring the photoluminescent emission at the end of the immunoassay protocol). We found that to obtain the maximum sensitivity a photoactivation of the QDs before final measurement was needed: after illuminating the QDs from the bioconjugate (Pro-BSA-QD) attached to Ab immobilized in the microtiter plate with a UV-light continuously for at least 2 h (once the immunoassay has been finished) we obtain an enhanced and constant fluorescence emission signal.

Finally, the capability of this optimized fluorescent immunoassay for direct determination of progesterone in milk was evaluated. Unfortunately, bioconjugated QDs emission was severely quenched in a whole milk matrix (without any pretreatment). Immunoassays carried out with bioconjugated QDs comparing milk and water incubation media have demonstrated that such quenching can be attributed to nonspecific interactions between species from the whole milk matrix and the polymeric coating of the QDs. However, a simple milk dilution with Milli-Q water enhanced the analytical signal to the point of enabling the dissolved progesterone determination aimed at. Different milk dilutions were investigated and the lowest dilution required to minimize matrix interference on the fluorescence of the bioconjugated QDs was 1:10 (see Fig. 3).

### 3.4. Analytical performance characteristics

To assess the analytical performance of the proposed bioassay, a series of standard solutions with different progesterone concentrations were prepared in diluted UHT milk and the proposed immunoassay was performed under the optimized experimental conditions (Table 1). The inhibition curve obtained is shown in Fig. 4. The analytical parameters were obtained from this inhibition curve (that was fitted using a four-parameter equation with SOFmax Pro software).

A linear relationship in the concentration, defined by the inhibitory concentration (IC) values  $IC_{20}$  and  $IC_{80}$ , ranging from 0.3 to 14.5 ng/mL, was achieved enabling progesterone traces determinations in milk. The detection limit, calculated as  $IC_{10}$  in the inhibition curve, was 0.1 ng/mL of progesterone, referred to a whole milk matrix. The sensitivity of the assay, determined by the concentration of the analyte which inhibits the measured analytical signal by a factor of 50% ( $IC_{50}$ ), was of 2.2 ng/mL of progesterone in milk. Precision of the assay, estimated as the RSD of the signals obtained for the analysis of a triplicate of milk samples containing 4 ng/mL progesterone in two different days turned out to be 3.5%. Furthermore, the reproducibility (precision interassay) and the repeatability (precision intraassay) were also evaluated and estimated as the RSD of the signals. So, three independent immunoassays (inhibitions curves) were done in three different

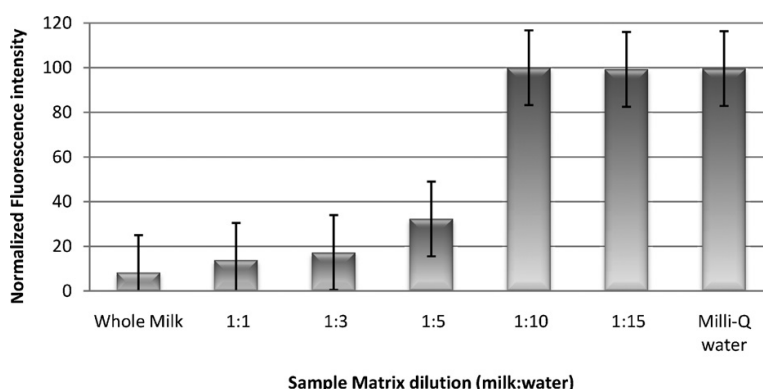
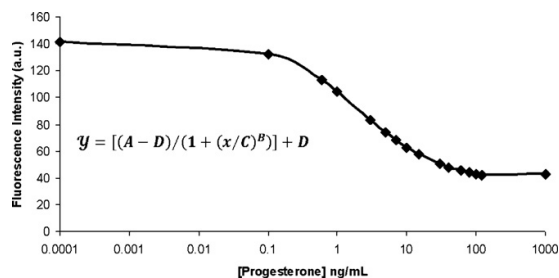


Fig. 3. Fluorescence intensities of the Pro-BSA-QDs in the presence of whole milk, milk diluted with Milli-Q water at different ratios and in pure Milli-Q water.



**Table 2**  
Analysis of cow's milk and recovery study of progesterone in the spiked milk samples using the proposed immunoassay.

Sample	Progesterone found in non-spiked samples (ng/mL)	Spiked progesterone (ng/mL)	Progesterone obtained in the spiked samples (ng/mL)	Recovery (%)
Fresh milk	1.1 ± 0.1	0.5	1.6 ± 0.1	95 ± 1
		1	2.2 ± 0.1	99 ± 1
		5	6.2 ± 0.1	98 ± 1
Pasteurized milk	8.9 ± 0.2	0.5	9.2 ± 0.3	94 ± 3
		5	9.4 ± 0.3	88 ± 3
		13.8 ± 0.3	100 ± 3	



**Fig. 4.** Inhibition curve obtained for progesterone determination in bovine milk. Each point of the curve is the average of three independent measurements. The RSD in all points is <3%. The inhibition curve responds to the four-parameter equation inset in the graph, where  $A=141.6$  a.u. is the maximum signal obtained;  $B=0.74$  is the slope of the curve;  $C=2.2$  ng/mL is the sensitivity of the assay, the  $IC_{50}$ ;  $D=36.9$  a.u. is the background of the signal.

days, obtaining a reproducibility of 7% and a repeatability of 6%. These results show the robustness of the methodology.

### 3.5. Application to real sample analysis

Finally, the applicability of the proposed QD-based fluorescent immunoassay to the determination of progesterone in real samples of bovine milk was assessed by analysing a series of cow milk samples, containing endogenous (natural) progesterone. Then, in order to validate the methodology, the two samples under scrutiny were further spiked with 0.5, 1 and 5 ng/mL of progesterone standards and analysed following the optimized assay. Table 2 collects the progesterone recoveries results obtained from such analysis of bovine milk (the values given in the table correspond to triplicate measurements). As can be seen, good recoveries were obtained for the determination of progesterone, at least in the concentration range investigated, indicating the validity and potential of the proposed QD-based immunoassay for the determination of progesterone in cow milk.

## 4. Conclusions

A competitive fluorescent immunoassay for sensitive detection and quantification of progesterone in cow's milk has been developed based on the use of QDs as fluorescent labels. The bioassay scheme, based on the conjugation of colloidal water-soluble CdSe/ZnS QDs to a derivative of the antigen (progesterone-BSA conjugate), was successfully developed and exhibited good analytical features. Encapsulation of the native hydrophobic QDs within a "bifunctional hydrophobic-hydrophilic" polymeric shell allowed to carry out a simple and successful bioconjugation of the QDs to the selected derivative of the antigen. In addition, a novel and general methodology (based on the well-known Bradford Test) for the indirect estimation of the bioconjugation efficiency and the progesterone concentration in the bioconjugate is described, facilitating the assessment of the performance of the quantitative

immunoassay developed. Moreover, the protocol immunoassay here described can be considered as a general procedure to develop QD-based competitive fluorescent immunoassays.

Compared with the conventional spectrophotometric ELISA kits or the electrochemical immunoassays available to determine progesterone in milk (Carralero et al., 2007; Colazo et al., 2008; Pemberton et al., 2001; Simersky et al., 2007), the fluorescent QD-based competitive immunoassay here proposed offers more selective signal detection (as expected from the narrow, intense and stable fluorescence spectra characterising QDs emission). The immunoassay developed is sensitive enough to avoid problems related to overestimation or loss of signal due to the milk complex matrix (Colazo et al., 2008; Pemberton et al., 2001) by a simple dilution with Milli-Q water. Thus, the method does not require complex sample pre-treatments or a second step for the generation of the species measurable with the consequent reagents and time cost (conversely to the conventional spectrophotometric ELISA assay).

Furthermore, the broad excitation spectra of QDs combined with their characteristic narrow tuneable fluorescence emission peaks would further allow single-line excitation of multiple colour nanocrystals, with facile signal deconvolution to extract individual contributions from each population (e.g. size) of QDs (Goldman et al., 2004). This approach can be used as a basis in future development of creative multiplexed bioassays for protein concentration and protease activities determinations (Kim et al., 2008; Xia et al., 2008).

## Acknowledgements

This work was supported by project CTQ2006-02309 of the Spanish Ministry of Education and Science (MEC) and FEDER program co-financing funds. The authors thank Ana M. Coto for bovine milk sumistration, Marta E. Diaz for allowing us to measure with the fluorescence well plate reader and Fransec A. Esteve for his assistance with data treatment. Also, we show our gratitude to "The Biotechnology Preparative" and "The Molecular Spectroscopy and XPS" units of the Scientific-Technical Services of the University of Oviedo for services done. L.T.A. acknowledges the MEC (Spain) for the FPU program.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bios.2011.05.044.

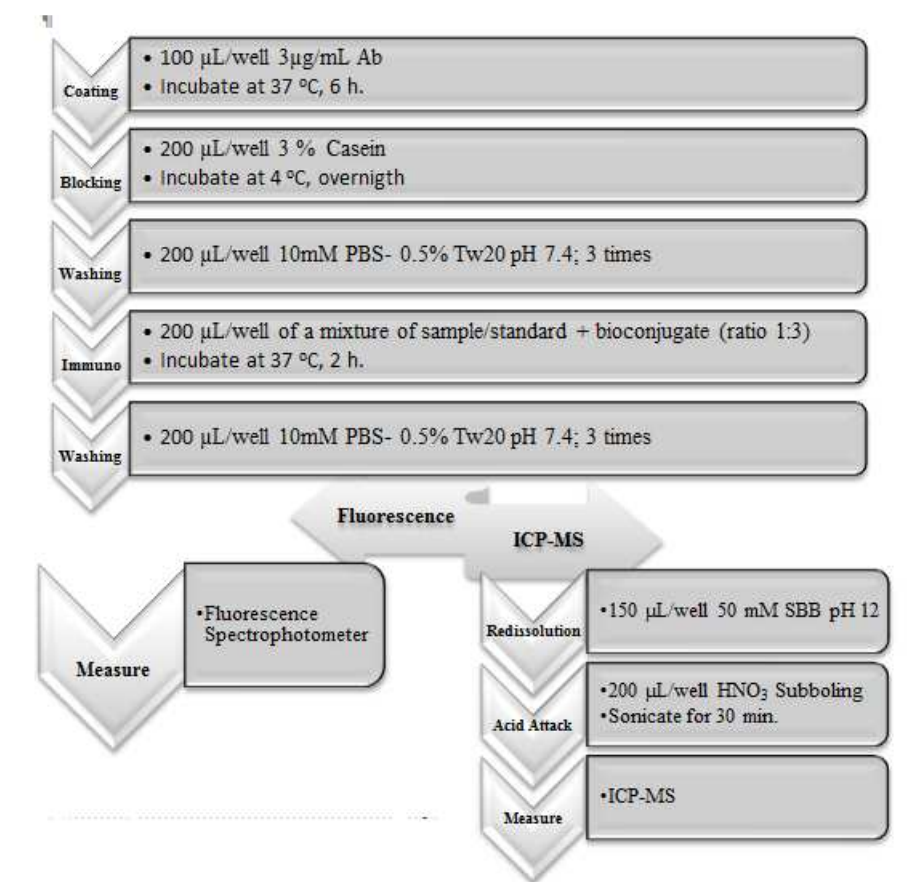
## References

- Bakalova, R., Zhelev, Z., Ohba, H., Baba, Y., 2005. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 9328–9329.
- Bradford, M., 1976. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., Alivisatos, A., 1998. *Science* 281, 2013–2016.
- Byszewska, S., Markiewicz, A., 2006. *J. Immunoass. Immunochem.* 27, 279–288.
- Carralero, V., González-Cortés, A., Yáñez-Sedeño, P., Pingarrón, J., 2007. *Anal. Chim. Acta* 596, 86–91.
- Carrillo-Carrion, C., Cardenas, S., Simonet, B.M., Valcarcel, M., 2009. *Chem. Commun.* 35, 5214–5226.
- Chan, W., Nie, S., 1998. *Science* 281, 2016–2018.

- Colazo, M., Ambrose, D., Kastelic, J., Small, J., 2008. *Can. J. Vet. Res.* 72, 32–36.
- Coto-García, A., Sotelo-González, E., Fernández-Argüelles, M., Pereiro, R., Costa-Fernández, J., Sanz-Medel, A., 2011. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 29–42.
- Darling, J., Laing, A., Harkness, R., 1974. *J. Endocrinol.* 62, 291–297.
- Dembski, S., Graf, C., Krüger, T., Gbureck, U., Ewald, A., Bock, A., et al., 2008. *Small* 9, 1516–1526.
- Díaz-Cruz, M., López de Alda, M., López, R., Barceló, D., 2003. *J. Mass Spectrom.* 38, 917–923.
- Fernández-Argüelles, M., Yakovlev, A., Sperling, R., Luccardini, C., Gaillard, S., Sanz-Medel, A., et al., 2007. *Nano Lett.* 7, 2613–2617.
- Friggens, N., Chagunda, M., 2005. *Theriogenology* 64, 155–190.
- Geho, D., Lahar, N., Gurnani, P., Huebschman, M., Herrman, P., Espina, V., et al., 2005. *Bioconjugate Chem.* 16, 559–566.
- Gillis, E., Traynor, I., Gosling, J., Kane, M., 2006. *J. AOAC Int.* 89, 838–842.
- Gillis, E., Gosling, J., Sreenan, J., Kane, M., 2002. *JIM* 267, 131–138.
- Goldman, E., Clapp, A., Anderson, G., Uyeda, H., Mauro, J., Medintz, I., et al., 2004. *Anal. Chem.* 76, 684–688.
- Käppel, N., Pröll, F., Gauglitz, G., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 22, 2295–2300.
- Kim, Y.-P., Oh, Y.-H., Oh, E., Ko, S., Han, M.-K., Kim, H.-S., 2008. *Anal. Chem.* 80, 4634–4641.
- Manna, M., Scher, E., Li, L.-S., Alivisatos, A., 2002. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 7136–7145.
- Mattoussi, H., Mendintz, I., Clapp, A., Goldman, E., Jaiswal, J., Simon, S., et al., 2004. *JALA* 9, 28–32.
- Pemberton, R., Hart, J., Mottram, T., 2001. *Biosens. Bioelectron.* 16, 715–723.
- Peng, A., Peng, X., 2001. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 183–184.
- Pennington, J., Spahr, S., Lodge, J., 1976. *J. Dairy Sci.* 59, 1528–1531.
- Posthuma-Trumpie, G., van Amerongen, A., Korff, J., van Berkel, W., 2009. *Trends Biotechnol.* 27, 652–660.
- Simersky, R., Swaczynova, J., Morris, D., Franek, M., Strnad, M., 2007. *Vet. Med.* 52, 19–28.
- Sun, B., Xie, W., Yi, G., Chen, D., Zhou, Y., Cheng, J., 2001. *J. Immunol. Methods* 249, 85–89.
- Xia, Z., Xing, Y., So, M.-K., Koh, A., Sinclair, R., Rao, J., 2008. *Anal. Chem.* 80, 8649–8655.
- Zhelev, Z., Jose, R., Nagase, T., Ohba, H., Bakalova, R., Ishikawa, M., et al., 2004. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 75, 99–105.

## VII.2. Elemental and molecular detection for Quantum Dot-based immunoassays: a critical appraisal (*Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 33, 165-171)

Antonio R. Montoro-Bustos, Laura Trapiella-Alfonso, Jorge Ruiz Encinar, José M. Costa-Fernández, Rosario Pereiro, Alfredo Sanz-Medel





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bios](http://www.elsevier.com/locate/bios)

## Elemental and molecular detection for Quantum Dots-based immunoassays: A critical appraisal

Antonio R. Montoro Bustos<sup>1</sup>, Laura Trapiella-Alfonso<sup>1</sup>, Jorge Ruiz Encinar, Jose M. Costa-Fernández, Rosario Pereiro, Alfredo Sanz-Medel\*

Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julian Clavería, 8, 33006 Oviedo, Spain

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 4 November 2011  
Received in revised form  
22 December 2011  
Accepted 25 December 2011  
Available online 31 December 2011

**Keywords:**  
ICP-MS  
Molecular fluorescence  
Quantum Dots  
Immunoassay  
Progesterone

### ABSTRACT

A critical comparison between Elemental Mass Spectrometry (ICP-MS) and molecular fluorescence, as detection techniques for CdSe/ZnS Quantum Dots (QDs)-based immunoassays is presented here. Using a QDs-based progesterone immunoassay as “model” analytical system the features of both detection modes has been investigated. Minimal changes, compared to the previously developed fluorescent approach, were necessary to build the corresponding inhibition curve for the progesterone immunoassay using ICP-MS detection of cadmium (contained in the QDs core). Adequate agreement between results obtained using both elemental and molecular techniques for the determination of progesterone in cow milk has been obtained. Moreover, results from the comparison showed that fluorescence detection of the QDs is simpler, less time consuming and less expensive, but ICP-MS detection affords alternative and useful information unattainable using luminescence detection. First of all, ICP-MS allowed mass balances to be carried out (all along the sample preparation) providing an internal validation of the immunoassay procedure. Secondly, matrix-independent quantification as provided by ICP-MS enabled a direct determination of progesterone in raw milk without any further sample preparation (dilution) step. As a matter of fact, ICP-MS results showed that the quenching matrix effect suffered on bioconjugated QDs fluorescence emission (e.g. when the immunoassay was carried out directly in whole milk without any dilution) could be unequivocally attributed to nonspecific interactions between the matrix of the whole milk and the QDs surface. Finally, better sensitivity could be obtained with ICP-MS detection,  $IC_{10} = 0.028$  ng/mL, versus 0.11 ng/mL using conventional fluorimetric detection, just by using lower reagents concentrations.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Nanoscience and nanotechnology recent advances have resulted in the introduction of new classes of fluorescent probes for protein detection and imaging. Amongst them, photoluminescent semiconductor nanocrystals known as Quantum Dots (QDs), stand out as novel materials holding a particularly great potential for bioanalysis (Bruchez et al., 1998; Coto-García et al., 2011).

The innovative and outstanding optoelectronic properties exhibited by QDs (Bruchez et al., 1998; Parak et al., 2005; Chan and Nie, 1998) together with their ability of bioconjugation to analyte-specific biomolecules (e.g. DNA, aptamers, enzymes or antibodies), whilst retaining biological functions, have rendered QDs as appealing and high-value fluorescent labels for a wide variety of bioanalytical investigations, including particularly to

immunoassays and immunosensors (Goldman et al., 2006). Surprisingly, only a few direct quantitative QDs-based immunoassays have been reported so far, mainly due to the present lack of effective procedures for QDs bioconjugation, purification and characterization (Huang et al., 2006; Huo, 2007; Fernandez-Argüelles et al., 2008). Recently the judicious use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and molecular fluorescence as complementary detectors of size exclusion chromatography has turned out to be critical for the complete characterization of water soluble QDs (quality of polymer coating), their bioconjugation reaction to proteins and their final correct purification (Trapiella-Alfonso et al., 2011b). Moreover, it is expected that the outstanding capabilities of ICP-MS could be exploited in the metal nanoparticles-based immunoassay context: excellent sensitivity, large dynamic range, independence of the sample matrix and simultaneous multi-elemental isotope detection (Huo, 2007; Quinn et al., 2002; Baranov et al., 2002; Sanz-Medel, 2010; Zhang et al., 2002; Chen et al., 2010).

However, it should be noted that, in quantitative bioassays based on detection of metal nanoparticles as labels, the

\* Corresponding author. Fax: +34 985103474.

E-mail address: [asm@uniovi.es](mailto:asm@uniovi.es) (A. Sanz-Medel).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

reproducibility attainable is highly dependent on the quality control of QDs synthesis (narrow disperse nanoparticles) and the eventual determination of the QD-biomolecule stoichiometry (Quinn et al., 2002). In this context, previous research carried out in our laboratory demonstrated that elemental content computation by ICP-MS could play a pivotal role in the monitoring of CdSe QDs synthesis processes, helping to control the conditions to obtain well-defined and reproducible nanoparticles and providing reliable information on the number of atoms (Cd and Se) and the elemental stoichiometry in the nanoparticles (Montoro Bustos et al., 2009).

Very recently, a promising immunoassay, developed for human IgG determination in human serum, by coupling immunoaffinity monolithic capillary microextraction (CME) to ICP-MS using CdSe QDs-labelled secondary antibody, constituted the first QDs labelled immunoassay ICP-MS quantitative approach (Chen et al., 2010). Unfortunately, such experimental procedure required a proper preparation of porous aminopropyltriethoxysilane silica-based hybrid monolith combined with CME using a micro-concentric nebulizer for the elemental measurement, which is quite far from being a standard methodology. It is expected that more ICP-MS applications in QDs-based immunoassays field will be boosted after making the approach more simple and straightforward. Moreover, there is still a real need to assess what ICP-MS detection can provide in comparison to fluorescence detection in such nanoparticles-based immunoassays.

Herein, the first critical appraisal of using fluorescence and ICP-MS detection for nanoparticles-based immunoassay quantifications is presented. Strong and weak points for each technique are discussed and, what is more important, unique complementary information provided by the novel ICP-MS approach is highlighted. A straightforward competitive QDs-based fluorescent immunoassay recently developed in our laboratory, for the sensitive quantification of progesterone in cow milk (Trapiella-Alfonso et al., 2011a) was selected as “model” assay in the comparison.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and materials

All experiments were carried out using analytical grade chemical reagents used as received without further purification. Deionised ultrapure water (resistivity 18.2 M $\Omega$ /cm) was used throughout the work.

The antigen, 98% progesterone, was purchased from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). The progesterone bovine serum albumin conjugate (Pro-BSA) and the mouse monoclonal anti-progesterone antibody (1 mg/mL) were obtained from AbD Serotec (Dusseldorf, Germany) and the ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), used as pseudocatalyst in the reaction from Fluka (Basel, Switzerland). A 0.01 M solution in 10 mM PBS pH 7.4, was prepared and used immediately to bioconjugate the QDs to the Pro-BSA (Pro-BSA-QDs).

A solution of 3% casein in water, obtained from Sigma Aldrich was used as blocking solution. A 0.05% Tween 20 solution (Sigma-Aldrich) in PBS pH 7.4 buffer was used as washing solution. A 50 mM borate buffer solution (SBB) at pH 12 was prepared to dissociate the immunological interactions, releasing the QDs from the immunoassay well plate before measurements.

Amicon Ultra-4 100 kDa centrifugal filters from Millipore (Madrid, Spain) were used to purify the Pro-BSA-QD bioconjugates after the bioconjugation reaction.

Nitric acid (65% v/v, Merck, Darmstadt, Germany) was additionally purified by subboiling distillation to operate with the minimum background levels of metallic impurities. This subboiled nitric acid was further used to carry out the complete digestion of the

bioconjugated QDs solution, which had been previously released from the immunoassay well plate. Hydrogen peroxide (30% v/v) was purchased from Merck.

All the polystyrene plastic tubes, used along the elemental analysis required an extra precleaning treatment with 1% v/v subboiled nitric acid overnight, following by rinsing with ultrapure water.

Cadmium concentrations in the digested solutions were determined by external calibration using Merck certified 1000 mg/L standards of Cd and In, as an internal standard. ICP-MS operation conditions were daily optimised using a tuning solution.

### 2.2. Instrumentation

QDs nanoparticle synthesis was carried out using a heating mantle with energy heater control (JP Selecta, Barcelona, Spain) and simultaneous stirring. A needle with argon flow was used to keep a constant argon atmosphere inside the flask. This flow was set to 25 mL/min by means of a rotameter (Serv' Instrumentation, Irigny, France).

The spectrophotometric measurements used to characterize the nanoparticles were carried out in a UV/Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). For the immunoassays, white microtiter plates (96 wells) were obtained from Agilent Technologies (Tokyo, Japan) and used in all immunoassays. Photoactivation of the labelled CdSe/ZnS QDs before fluorescent detection was performed using a 365 nm UV lamp (6 W, Vilbert Lourmat, Torcy, France) for 10 min. The fluorescent measurements were carried out with a Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter. Data processing and inhibition curves representation were developed using SOFTmax Pro software from Molecular Devices (Ismaning, Germany).

An ultrasonic bath (Ultrasons, 9 L, JP Selecta) was used to help the acid digestion of the samples in order to destroy most organic matter present before elemental analysis.

Elemental measurements were carried out on a quadrupole ICP-MS Agilent model 7500ce. The instrument consists of an ICP source with plasma-shield torch, an enclosed octapole ion guide operating in the RF mode (collision/reaction cell) and a quadrupole mass analyser.

### 2.3. Protocols

#### 2.3.1. Synthesis and water solubilization of CdSe/ZnS QDs

The CdSe/ZnS QDs, used as fluorescent and elemental labels, were synthesized and water-solubilized after coating them with an amphiphilic polymer as described elsewhere (Peng and Peng, 2001; Fernandez-Argüelles et al., 2007, 2008; Trapiella-Alfonso et al., 2011a).

#### 2.3.2. QDs bioconjugation to progesterone

Briefly, the QDs bioconjugation to progesterone was achieved by bonding the external carboxylic groups coming from the polymer coating of the QDs, to the amino groups of the BSA available in the commercial derivative of the progesterone (Pro-BSA) via EDC chemistry (Sun et al., 2001). Note that the bound progesterone remained able to interact with the antibody. This bioconjugation reaction is performed at room temperature with constant magnetic stirring for 2 h using the previously optimised (Trapiella-Alfonso et al., 2011a) molar ratio values of 2:1:1500 (QDs:Pro-BSA:EDC).

After the conjugation, a purification step was needed to separate the bioconjugates from the excess of reagents and by products. The significant difference on the molecular weight between Pro-BSA-QD (>150 kDa) and Pro-BSA conjugate (75 kDa) enabled to remove the unconjugated Pro-BSA by ultrafiltration using a 100 kDa

cut off membrane filter, at 5000 rpm (5 min  $\times$  6 cycles, including 3 washes with PBS) at 4 °C.

### 2.3.3. Indirect competitive QDs-based fluorescent immunoassay

The successfully developed fluorescent QDs-based immunoassay for progesterone determination (Trapiella-Alfonso et al., 2011a), consisted of a competitive format, because progesterone is a hapten with just a single binding site with the antibody. A derivative of the antigen (Pro-BSA) was required to bioconjugate it to the QD. The competition was established via the binding between analyte (i.e. progesterone from the sample) and the Pro-BSA-QDs bioconjugate for the limited binding sites of the anti-progesterone monoclonal antibody previously immobilised in the microtiter plate.

For the fluorescence detection, the microtiter plate was coated with 100  $\mu$ L/well of 3  $\mu$ g/mL of anti-progesterone antibody (Ab) and incubated 6 h at 37 °C. Afterwards, 200  $\mu$ L of 3% casein solution was added as blocking agent to every well and left overnight at 4 °C in order to minimize the unspecific adsorptions as much as possible. The next step consisted of the first washing with 200  $\mu$ L/well of a PBS-Tween 20, pH 7.4, buffered solution. Then, a solution was prepared mixing 600  $\mu$ L of 1  $\mu$ g/mL Pro-BSA-QDs and the corresponding amount of progesterone-containing sample. The mixture was finally brought to a final volume of 800  $\mu$ L using ultrapure water. The triplicate analysis for each point was performed after addition of 200  $\mu$ L of such mixture to each well, which was incubated for 2 h at 37 °C. After washing and drying the microtiter plates, the photoactivation step was carried out during 10 min in a UV lamp. Finally, after the redissolution process with 50  $\mu$ L of SBB, the fluorescent measurements were developed using an excitation wavelength at 270 nm and collecting the emission at 560–650 nm (slit fixed at 10/10 nm).

### 2.3.4. Indirect competitive QDs-based ICP-MS immunoassay

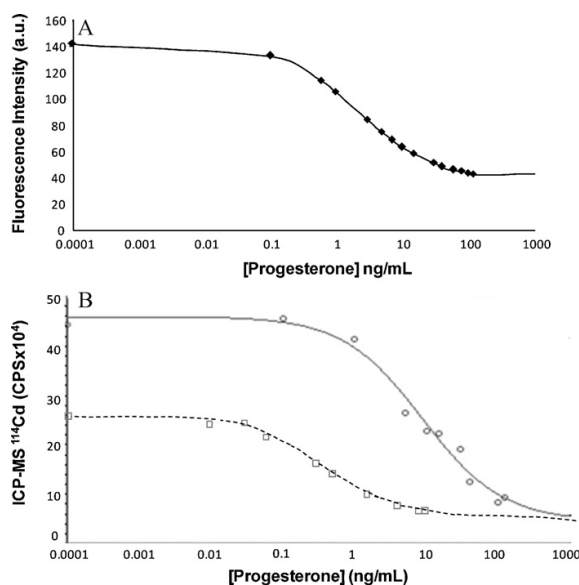
Redissolution of the already washed plate wells was carried out using 150  $\mu$ L of SBB (50 mM, pH 12). Complete acidic digestion of such redissolved solutions was performed with 200  $\mu$ L of subboiled nitric acid in an ultrasonic bath working at constant temperature of 45 °C during 30 min. After digestion, samples were diluted to 3 mL with a In (1.8 ng/g) solution in 1% v/v subboiled nitric acid for their final measurement by ICP-MS.

## 2.4. Milk samples

In order to obtain the progesterone calibration curves, an ultra-high temperature processed commercial cow whole milk (UHT) was employed because its matrix was very similar to that of the real cow milk and the absence of detectable levels of progesterone. Two different types of milk were investigated: cow fresh milk and pasteurized whole cow milks, with and without 10-fold water dilution.

## 3. Results and discussion

The indirect immunoassay selected as the model system (Trapiella-Alfonso et al., 2011a) for comparison required a previous bioconjugation of a derivative of the antigen (Pro-BSA) to the colloidal water-soluble CdSe/ZnS for the subsequent fluorescence detection. It consisted of an incubation of the anti-progesterone monoclonal antibody, immobilised into the microtiter plates, with the target progesterone, coming from standards or samples and the Pro-BSA-QDs previously prepared.



**Fig. 1.** Inhibition curves obtained for progesterone determination in bovine milk using Fluorescence detection (A), ICP-MS at same progesterone concentration levels as (A) (solid line in B) and ICP-MS at lower concentration levels (dotted line in B). Each point of the curve is the average of three independent measurements. The inhibition curve responds to the four-parameter equation:  $y = [(A - D)/(1 + (x/C)^B)] + D$ , where  $A$  is the maximum signal obtained;  $B$  is the slope of the curve;  $C$  is the sensitivity of the assay, the  $IC_{50}$ ;  $D$  is the background of the signal.

### 3.1. Specific modifications of the fluorescent competitive immunoassay to allow elemental detection

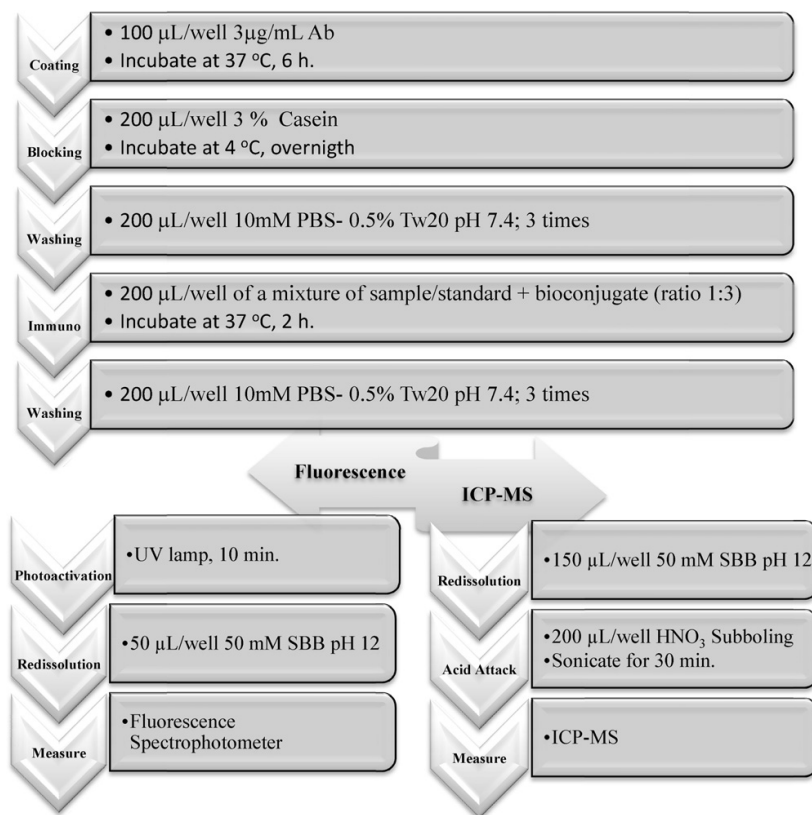
The proper comparison between molecular and elemental detection in QDs-based immunoassays required only some slight modifications on the previously described fluoroimmunoassay approach in order to adapt the used bioassay experimental conditions to ICP-MS final detection as shown in Scheme 1.

First, as demanded by elemental analysis, all the solutions involved were accurately weighed. Once the redissolution happened, the bioconjugated QDs containing samples were subjected to complete acidic digestion. In order to speed up the digestion process and to help destroying the organic matter present, it was developed under an ultrasonic bath. After digestion, samples were diluted and spiked with In as internal standard. The final acidic content was reduced down to around 5%, easily compatible with the further ICP-MS measurements. Finally, elemental cadmium content of the diluted samples was determined by ICP-MS and external calibration using In as internal standard. The final experimental conditions selected for the ICP-MS detection technique are summarised in Table S1 available in Supplementary Information.

### 3.2. Elemental and molecular detection comparison: analytical performance characteristics

A series of standard solutions with different progesterone concentrations, ranging from 0 to 120 ng/mL (carried out in a triplicate), were prepared in a 10-fold diluted UHT milk, following the procedure previously described (see Scheme 1). After molecular and elemental measurements, the obtained inhibition curves were plotted (see inhibition curves in Fig. 1A and B). From such inhibition curves, the analytical parameters were obtained using a four-parameter equation fitting with SOFmax Pro software. Molecular





**Scheme 1.** Quantum Dot-based immunoassay protocol.

fluorescence and ICP-MS analytical performance characteristics achieved are presented in a comparative manner in Table 1.

One critical parameter, clearly limiting ICP-MS detection limit, accuracy and precision attainable, is the Cd blank (blank of the bioassay for ICP-MS). In order to assess this issue properly, Cd content was independently investigated in any reagent used along the procedure. First, digestion reagents were evaluated for Cd. For this purpose, two digestion media were compared: one using subboiled nitric acid exclusively and the other consisting of a mixture of sub-boiled nitric acid and hydrogen peroxide 4:1. Quantitative results obtained for the immunoassay using exclusively nitric acid or using it plus hydrogen peroxide matched pretty well, demonstrating that nitric acid alone was enough to digest the immune-samples. On the other hand, a negligible amount of Cd was found in the nitric acid in comparison to that found in the mixture of subboiled nitric acid

and hydrogen peroxide. Thus, nitric acid alone was used to dissolve QDs in the subsequent analyses (see Scheme 1). In any case, it must be stressed that an accurate cadmium immunoassay blank determination is always required for appropriate blank subtraction. For such purpose, three wells of the used microtiter plates were always coated with Ab, blocked and washed, as for the rest of the wells analysed, but no progesterone standard or Pro-BSA-QDs bioconjugate addition in this case. After the SBB redissolution, following the procedures details, elemental Cd was measured by ICP-MS and an average Cd blank value could be computed.

Please note that each immunoassay calibration point, blank and unknown samples were carried out in triplicate. Interestingly, average relative standard deviation (% RSD) obtained along the calibration curve, corresponding to the intraassay repeatability, was higher using ICP-MS than using fluorescence detection (15% and 6%, respectively). No significant differences were obtained when increasing the SBB redissolution volume (used to release the QD-labelled and unlabelled progesterone from the well) from 50 µL to 150 µL so this parameter was not critical for the ICP-MS precision obtained. It seems likely that the parameter limiting precision for ICP-MS determinations is the Cd blank. This could explain the slightly better precision obtained using fluorescence where procedural blanks were negligible. This assumption is corroborated by the fact that the triplicate points corresponding to higher progesterone concentrations showed the worst precision, contributing to rise the overall intraassay repeatability of the immunoassay to 15%. Obviously, these are the points of the inhibition curve where ICP-MS signal was lower and therefore blank correction had much more

**Table 1**  
Analytical characteristics of the inhibition curves.

Parameter	Fluorescence	ICP-MS (solid)	ICP-MS (dotted)
LOD (ng/mL)	0.11	0.32	0.028
Linear range (ng/mL)	0.3–15	1.7–31	0.07–1.43
IC <sub>50</sub> (ng/mL)	2.2	6.7	0.32
Repeatability RSD (%)	6	15	38
R <sup>2</sup>	0.98	0.98	0.99
Mass balance (%)	–	99 ± 8	108 ± 7

Solid, inhibition curve for ICP-MS under the same progesterone concentration levels than in fluorescence. Dotted, inhibition curve for ICP-MS with a one magnitude order lower concentration level than in fluorescence.

impact in the quantitative results (up to 30% of the Cd ICP-MS signal for such points). As a matter of fact, the ICP-MS precision observed for the triplicate points in the mid-higher region of the curve (where the blank correction was negligible) was typically 3–4% RSD, very close to the value obtained for fluorescence, 3–4% as well.

Detection limits obtained, evaluated as the concentration of the analyte which inhibits by a factor of 10% the measured analytical signal ( $IC_{10}$ ), were found to be nearly independent of the detection technique used in the immunoassay (0.11 ng/mL obtained using fluorescence versus 0.32 ng/mL provided by ICP-MS). Similarly, as shown in Table 1, obtained sensitivity of the immunoassay, defined as  $IC_{50}$ , and linear response range, defined as the concentration interval between the  $IC_{20}$  and  $IC_{80}$ , were very similar for both detection techniques.

### 3.3. Evaluation of the ICP-MS quantification potential for Quantum Dots-based immunoassays at very low concentration levels

Perhaps, the most valuable features of ICP-MS as a detector are its great sensitivity and specificity for the detection of a given heteroatom/isotope (element). For this reason, ICP-MS is widely recognised as the method of choice for elemental determinations at trace and ultratrace levels. Thus, once the QDs-based immunoassay with ICP-MS detection had been properly assessed in the same experimental conditions than using molecular fluorescence detection, the exceptional sensitivity of ICP-MS for ultratraces of the elements was tested at much lower Cd levels. For this purpose, the progesterone immunoassay reaction conditions were maintained during the coating, blocking and washing steps. However, a solution containing 10 times less of Pro-BSA-QDs (0.1 µg/mL instead of 1 µg/mL) bioconjugate was added during the immunological reaction whilst the corresponding binding competitive assay was established with a series of lower progesterone concentrations, from 0 to 10 ng/mL (10 times less than the levels previously assayed as well). The new inhibition curve plotted from the elemental signals obtained is shown in Fig. 1B (dotted curve).

As expected this new ICP-MS curve was shifted down by one order of magnitude along the X-axis (progesterone concentration). ICP-MS Cd signals measured were significantly lower as well. Interestingly, spite of the much lower concentrations measured, quality of the curve was still very good. In fact, most of the analytical characteristics obtained (see Table 1) were excellent ( $R^2$ , linear range).

Regarding, the new detection limit ( $IC_{10}$ ) observed with ICP-MS detection under such experimental conditions, it was as low as 0.028 ng/mL of progesterone (Table 1, solid curve in Fig. 1B), that is one order of magnitude lower than the previous detection limit value obtained when using higher Pro-BSA-QDs bioconjugate concentration levels (Table 1, dotted curve in Fig. 1B). Conversely, working at such low bioconjugate concentration levels it was not feasible to perform the immunoassay using fluorescence detection since no coherent signals were obtained. Probably, the inherent lower sensitivity of the fluorescence detection of the QDs, as compared to the higher sensitivity of ICP-MS for Cd detection, could explain such significant improvement on DLs with Elemental Mass Spectrometry detection.

Additionally, the sensitivity ( $IC_{50}$ ) of the assay improved to 0.32 ng/mL of progesterone in milk, a value 7 times better than that previously obtained using fluorescence detection (Table 1).

It should be noted that, under the new immunoassay experimental conditions, the obtained relationship intensity-analyte concentration using ICP-MS detection (ranging from 0.07 to 1.43 ng/mL) turned out to be much lower than the required sensitivity for progesterone determinations in cow milk. In fact, it is well known that the onset of the heat is indicated by a rapid fall in the concentration of progesterone in milk to below 2–5 ng/mL

**Table 2**  
Progesterone found in milk samples analysed by both detection techniques.

Sample	Fluorescence	ICP-MS (1)
Cow fresh milk	1.1 ± 0.1 ng/mL	1.8 ± 0.3 ng/mL
Pasteurized milk A	8.9 ± 0.2 ng/mL	7.9 ± 0.3 ng/mL
Pasteurized milk B	4.4 ± 0.4 ng/mL	4.3 ± 0.5 ng/mL
Undiluted pasteurized milk B	–	4.2 ± 0.5 ng/mL

(1) Inhibition curve for ICP-MS under the same progesterone concentration levels than in fluorescence.

Uncertainty corresponds to 1 SD,  $n=3$ .

(Pemberton et al., 2001). Interestingly, it is worth stressing that this excellent ICP-MS sensitivity to QDs detection could be applied to any other target biomolecule after modifications of the immunoassay conditions.

Unfortunately, due to the decrease in the progesterone concentration level analysed, an expected logical decline of the precision (intraassay repeatability rise up to 38% RSD) in the ICP-MS measurement of the analytical signal was observed. Again, precision was limited by blank correction, which amounted in this case up to 50% of the Cd ICP-MS signal for the points in the lower region of the inhibition curve.

### 3.4. ICP-MS internal validation: mass balance

The quantitative elemental character of the ICP-MS enabled to evaluate the distribution of Cd elemental content from the QDs used throughout the different immunological reaction steps, an important aspect not feasible if using only fluorescence detection. Therefore, in order to internally validate the quantitative results obtained for the immunoassay, mass balances were performed by determining the Cd content both in the original Pro-BSA-QDs solution used and in the washed solutions for some representative aliquots at the high, medium and low progesterone levels analysed (triplicates at 0.1, 3 and 100 ng/mL). The same was applied to the immunoassay performed at 10-fold lower concentration (0.01, 0.3, and 10 ng/mL). It should be noted that the original Pro-BSA-QDs bioconjugate solutions independently prepared for each aliquot, were considered as the reference value (100% Cd), for the mass balance computation.

As can be observed in the last row in Table 1, Cd recovery results obtained were quantitative (close to 100% in any case) for the two distinct ICP-MS immunoassays tested at the two concentration levels, internally validating the immunoassay performed. The values given in the table correspond to triplicate measurements of each independent concentration ( $n=9$ ). These excellent results at too very different analyte and immunoreagent levels demonstrate the expected capabilities of the ICP-MS to provide robust determinations of antigens by QD-based immunoassays, as the global process can be monitored and controlled quantitatively.

### 3.5. Application to real milk samples analysis

This comparison between Fluorescence and ICP-MS as detection techniques for QD-based immunoassays was finally extended to real-life (cow milk) analysis. It should be first mentioned that the QDs-based immunoassay using fluorescence has already been validated for progesterone determination in fortified cow milk samples (Trapiella-Alfonso et al., 2011a). Three different milks (cow fresh milk and two different pasteurized milk A and B), were analysed. As can be seen in the corresponding set of results (Table 2) an acceptable agreement was obtained both for the two pasteurized milks A and B analysed, where the progesterone concentration level was high enough. Even in the case of the fresh milk where concentration was very low (below 2 ng/mL) the agreement between the results



obtained by both methods (at the 95% confidence interval, 2 SD) was acceptable.

The comparison of the precision obtained by both techniques followed the same trend observed in Table 1. In the case of the pasteurized milks with higher progesterone concentration levels, the influence of the blank correction for the ICP-MS results obtained was not so important. Therefore, the uncertainty associated with the pasteurized milk A with the higher concentration level, was very similar, 3.8% RSD and 2.2% RSD for the ICP-MS and fluorescence, respectively. For the results obtained for the second pasteurized milk B, where progesterone concentration was not so high but still enough, uncertainty observed were a little bit higher for both instruments and again similar, 10% and 12%, respectively.

However, whilst uncertainty associated with fluorescence detection maintained for the cow fresh milk (still 10% RSD, see Table 2) where progesterone concentration level was significantly lower, it increased significantly in the case of ICP-MS detection. Again, the blank correction performed limited uncertainty attainable (17% RSD) at such low concentration level.

### 3.6. Evaluation of the matrix effects in milk samples

A remarkable advantage of ICP-MS over molecular fluorescence measurements is its virtual signal independence from the sample matrix (Sanz-Medel, 2008). Matrix effects study could shed new light on the cause of the previously observed fact that unpretreated whole milk matrix produces a severe decrease of bioconjugated QDs fluorescence emission (Trapiella-Alfonso et al., 2011a). Two possible phenomena of decreasing the fluorescence intensity in raw samples could be thought of: unspecific interactions amongst species of the whole milk matrix with the QDs surface causing spectroscopic quenching or a significant reduction of the recognition capability of the immobilised antibody in the presence of milk raw matrix.

In order to investigate this issue, the pasteurized cow milk B (see Table 2), previously investigated, was directly analysed avoiding this time the customary 10-fold water dilution. Results are shown in the final row in Table 2. As can be seen, an excellent agreement for the progesterone determination was found with the value previously obtained for the 10-fold water diluted sample using ICP-MS detection (as fluorescence, as well). In contrast, fluorescence detection could not be successfully applied to such undiluted sample, due to a significant decrease of the fluorescence intensity observed. This excellent matching between analytical results from diluted and undiluted milk samples by ICP-MS detection demonstrates that the observed fluorescence decreased due to the matrix could be safely attributed to spectroscopic quenching by QDs (i.e. a nonspecific-electrostatic interaction between some species present in the whole milk matrix and the superficial polymeric layer of the QDs). Obviously, the possible reduction in the recognition efficiency of the immobilised antibody to progesterone in raw samples could be completely ruled out because that phenomenon should also brought about a significant discrepancy between the ICP-MS determinations with and without dilution of the pasteurized cow milk B (see Table 2).

## 4. Conclusions

Molecular fluorescence spectroscopy and elemental ICP-MS are compared here as detection techniques for QDs-based quantitative immunoassays. Results obtained confirm the validity of both types of detectors for quantitative immunoassays based on CdSe/ZnS QDs. Fluorescence detection of the QDs is simpler (the acidic digestion of the final samples, that should be done prior to the ICP-MS measurements, is not needed) and cheaper as original investment

and operational costs are higher for ICP-MS analysis. Moreover, precision obtained using ICP-MS detection is strongly limited by procedural blanks (Cd present in the reagents and material used throughout the method), whilst such blank limitation is negligible using fluorescence measurements.

On the other hand, ICP-MS proved to exhibit better limits of detection for progesterone. This better sensitivity observed is even higher in real sample applications as ICP-MS independence from matrix effects allows for the direct analysis of progesterone in raw milk samples. Moreover, although in the present study progesterone was used as a model analyte, such demonstrated important improvement on the detection limits using ICP-MS detection and QDs labelling is a considerable benefit for future development of immunoassays for targeted analysis of biomolecules (i.e. biomarkers) that should be monitored at very low concentration levels, in real samples.

It should be noted that the approach here developed constitutes one of the most sensitive QDs-based ICP-MS immunoassay published until now. In addition, ICP-MS became invaluable to assess the mass balance of the Cd from the QDs throughout the immunological reaction steps, internally validating the progesterone quantification performed. Finally, a straightforward validation of the quantitiveness of the elemental methodology developed is possible due to the ICP-MS exceptional robustness. In fact, as already mentioned, ICP-MS allowed a more direct quantitative analysis of real samples shedding light on the decreasing of fluorescence due to the raw milk matrix (spectroscopic quenching).

ICP-MS advantages, as demonstrated in this work for the progesterone determination, could open up new avenues to ultrasensitive QDs-based immunoassay approaches. It can be envisaged that such avenues could be of great value in the field of multiplexed protein analysis, particularly their absolute quantification at very low levels.

## Acknowledgements

This work was supported by project CTQ2006-02309 of the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN), the European FEDER program co-financing, and Agilent Technologies Foundation (FUO-EM-162-10). Also, A.R.M.B. and L.T.A. thank the MICINN for the funding through the FPU program.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bios.2011.12.046.

## References

- Baranov, V., Quinn, Z., Bandura, D., Tanner, S., 2002. *Anal. Chem.* 74, 1629–1636.
- Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., Alivisatos, A., 1998. *Science*, 2013–2016.
- Chan, W., Nie, S., 1998. *Science*, 2016–2018.
- Chen, B., Peng, P., Zheng, F., Hu, B., He, M., Zhao, W., Pang, D., 2010. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 25, 1674–1681.
- Coto-García, A., Sotelo-González, E., Fernández-Argüelles, M., Pereiro, R., Costa-Fernández, J., Sanz-Medel, A., 2011. *Anal. Bioanal. Chem.* 29, 42.
- Fernández-Argüelles, M., Costa-Fernández, J., Pereiro, R., Sanz-Medel, A., 2008. *Analyst* 133, 444–447.
- Fernández-Argüelles, M., Yakovlev, A., Sperling, R., Luccardini, C., Gaillard, S., Sanz-Medel, A., 2007. *Nano Lett.* 2613–2617.
- Goldman, E., Medintz, I., Mattoussi, H., 2006. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 560–563.
- Huang, X., Weng, J., Sang, F., Song, X., Cao, C., Ren, J., 2006. *J. Chromatogr. A* 1113, 251–254.
- Huo, Q., 2007. *Colloids Surf. B* 59, 1–10.
- Montoro Bustos, A., Fernández-Argüelles, M., Ruiz Encinar, J., Costa-Fernández, J., Sanz-Medel, A., 2009. *Chem. Commun.*, 3107–3109.
- Parak, W., Pellegrino, T., Plank, C., 2005. *Nanotechnology* 16, R9–R25.
- Pemberton, R., Hart, J., Mottram, T., 2001. *Biosens. Bioelectron.* 16, 715–723.
- Peng, A., Peng, X., 2001. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 183–184.

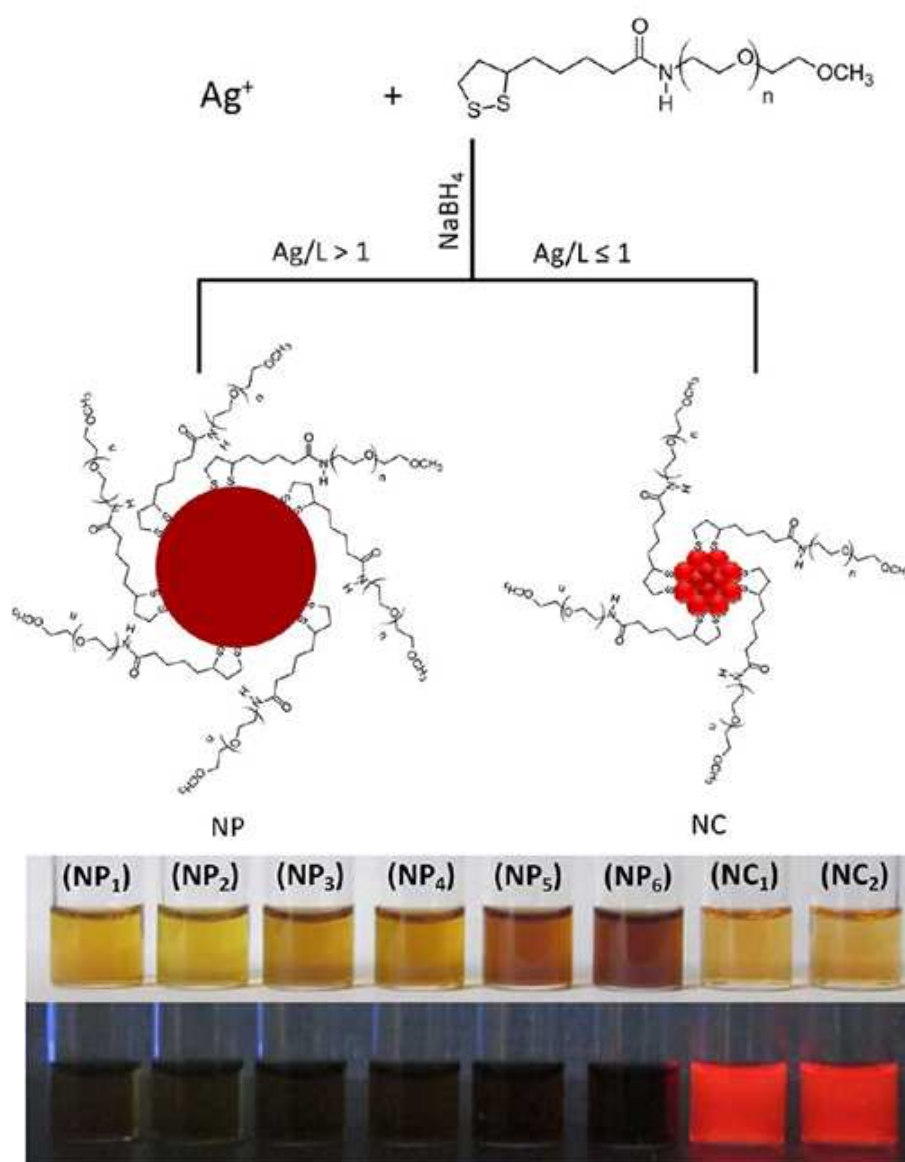
- Quinn, Z., Baranov, V., Tanner, S., Wrana, J., 2002. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 17, 892–896.
- Sanz-Medel, A., 2008. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 3–16.
- Sanz-Medel, A., 2010. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 1853–1859.
- Sun, B., Xie, W., Yi, G., Chen, D., Zhou, Y., Cheng, J., 2001. *J. Immunol. Methods* 249, 85–89.
- Trapiella-Alfonso, L., Costa-Fernández, J., Pereiro, R., Sanz-Medel, A., 2011a. *Biosens. Bioelectron.* 26, 4753–4759.
- Trapiella-Alfonso, L., Montoro Bustos, A., Ruiz Encinar, J., Costa-Fernández, J., Pereiro, R., Sanz-Medel, A., 2011b. *Nanoscale* 3, 954–957.
- Zhang, C., Zhang, Z., Yu, B., Shi, J., Zhang, X., 2002. *Anal. Chem.* 74, 96–99.



### VII.3. Growth of *in-situ* functionalized luminescent silver nanoclusters by direct reduction and size focusing (ACS

*Nano*, 2012, 6, 8950-8961)

Madathumpady Abubaker Habeeb Muhammed, Fadi Aldeek, Goutam Palui, Laura Trapiella-Alfonso, Hedi Mattoussi



# Growth of *In Situ* Functionalized Luminescent Silver Nanoclusters by Direct Reduction and Size Focusing

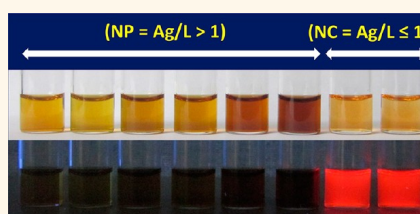
Madathumpady Abubaker Habeeb Muhammed,<sup>†</sup> Fadi Aldeek, Goutam Palui, Laura Trapiella-Alfonso,<sup>‡</sup> and Hedi Mattoussi<sup>\*</sup>

Department of Chemistry and Biochemistry, Florida State University, 95 Chieftan Way, Tallahassee, Florida 32306, United States. <sup>†</sup>Present address: Department für Physik und CeNS, Ludwig-Maximilians-Universität München, Amalienstr. 54, D-80799 München, Germany. <sup>‡</sup>Present address: Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julian Claveria 8, 33006 Oviedo, Spain.

Inorganic nanoclusters (NCs), especially those made of gold and silver, are rather a new class of nanomaterials consisting of only tens of atoms. They provide a bridge between the larger metal nanoparticles (NPs) and the molecular scale characteristics.<sup>1</sup> Owing to their unique optical, spectroscopic, and chemical properties, a great interest has been generated in these systems over the past few years.<sup>1–5</sup> For NCs, due to their very small size, the density of states is not high enough to endow them with surface plasmon resonance (SPR) features as in the case of NPs. Instead, they have discrete electronic energy levels and display “molecule-like” distinct, optical absorption and emission characteristics. NCs that exhibit size-tunable photoluminescence (PL) from the near-infrared (NIR) to the ultraviolet (UV) have been synthesized.<sup>1,6</sup> These materials also display two-photon absorption,<sup>7,8</sup> photon antibunching,<sup>1,9</sup> and electroluminescence.<sup>10,11</sup> Several applications of these NCs in areas such as nanophotonics, sensing, catalysis, and bioimaging have been demonstrated.<sup>3,12–31</sup> They offer a potentially new luminescent platform (or alternative) to be added to the arsenal of biological tags including organic dyes and quantum dots; they are very small, exhibit high quantum yield (QY), are photostable, and more importantly they are less affected by the “sometimes irrational” stigma of toxicity often faced by luminescent quantum dots.<sup>32–34</sup>

A number of methods have been reported for the synthesis of AgNCs, and the common route used reduction of Ag<sup>+</sup> ion precursors in the presence of suitable ligands. Various reduction techniques such as radiolytical,<sup>35</sup> photochemical,<sup>36–39</sup> sonochemical,<sup>40</sup> and chemical<sup>6,41–46</sup> have been employed. The

## ABSTRACT



We have used one phase growth reaction to prepare a series of silver nanoparticles (NPs) and luminescent nanoclusters (NCs) using sodium borohydride (NaBH<sub>4</sub>) reduction of silver nitrate in the presence of molecular scale ligands made of polyethylene glycol (PEG) appended with lipoic acid (LA) groups at one end and reactive (–COOH/–NH<sub>2</sub>) or inert (–OCH<sub>3</sub>) functional groups at the other end. The PEG segment in the ligand promotes solubility in a variety of solvents including water, while LAs provide multidentate coordinating groups that promote Ag–ligand complex formation and strong anchoring onto the NP/NC surface. The particle size and properties were primarily controlled by varying the Ag-to-ligand (Ag:L) molar ratios and the molar amount of NaBH<sub>4</sub> used. We found that while higher Ag:L ratios produced NPs, luminescent NCs were formed at lower ratios. We also found that nonluminescent NPs can be converted into luminescent clusters, *via* a process referred to as “size focusing”, in the presence of added excess ligands and reducing agent. The nanoclusters emit in the far red region of the optical spectrum with a quantum yield of ~12%. They can be redispersed in a number of solvents with varying polarity while maintaining their optical and spectroscopic properties. Our synthetic protocol also allowed control over the number and type of reactive functional groups per nanocluster.

**KEYWORDS:** nanocluster · nanoparticle · luminescence · ligand · reduction · size focusing

frequently used ligands are DNA,<sup>6,9,26,41,45,47–49</sup> polymer microgels,<sup>38</sup> polyelectrolytes,<sup>39</sup> peptides,<sup>50,51</sup> proteins,<sup>46,52</sup> and thiol- or amine-appended molecules.<sup>42–44,53–56</sup> Few indiscriminately selected synthetic reports are given below. A decade ago, Dickson and co-workers prepared AgNCs by the photochemical reduction of an aqueous solution containing Ag<sup>+</sup> ions and a poly(amidoamine)

<sup>\*</sup> Address correspondence to mattoussi@chem.fsu.edu.

Received for review July 2, 2012 and accepted September 9, 2012.

Published online September 09, 2012  
10.1021/nn302954n

© 2012 American Chemical Society

dendrimer, where the dendrimer acted as a cage to stabilize and solubilize the NCs, and this method produced NCs ranging from 2 to 8 silver atoms.<sup>37</sup> In another report, DNA templates were utilized as scaffolds for growing AgNCs, utilizing the strong affinity exhibited by  $\text{Ag}^+$  to DNA; the addition of the reducing agent resulted in the formation of NCs with 1–4 Ag atoms bound to the 12-base oligonucleotide,<sup>41</sup> and the resulting NC–DNA complexes exhibited base-specific interactions. Jin and co-workers synthesized  $\text{Ag}_7$  NCs in high yield by the reduction of  $\text{AgNO}_3$  in the presence of *meso*-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) ligands.<sup>42</sup> A solid-state route (solvent-free) was developed to grow  $\text{Ag}_9$  clusters starting from dry  $\text{AgNO}_3$  and mercaptosuccinic acid (MSA) which were mixed and ground prior to addition of  $\text{NaBH}_4$  in the solid form.<sup>44</sup> In addition to the direct reduction method, NCs have also been prepared from large metallic AgNPs by core etching.<sup>53,54,57</sup> For instance, Pradeep and co-workers synthesized two water-soluble NCs, namely,  $\text{Ag}_7$  and  $\text{Ag}_8$ , from silver NPs by an interfacial etching reaction performed at an aqueous/organic interface.<sup>54</sup> Finally, Xie and co-workers reported the growth of nonluminescent NCs in water; they found that if phase transferred to toluene and incubated for 2 h the NCs become luminescent and could subsequently be transferred back to the aqueous layer.<sup>58</sup>

Numerous applications of AgNCs have been reported, including the sensing of biomolecules and metal ions and cellular imaging.<sup>15,43,46,59–62</sup> In one example, a DNA–AgNC system was developed as a substrate for the detection of a target DNA from changes in the NC luminescence; for example, a 500-fold enhancement in the NC luminescence (from a very weakly emitting starting material) was observed after hybridization with the target.<sup>49</sup> This technique is low cost, and the probe can attain high signal-to-background ratios upon target binding. In a second example, AgNCs synthesized *via* G-quadruplex as template were used to image cancerous HeLa cells by utilizing the ability of G-quadruplex to bind to the nucleolin, a membrane protein overexpressed in these cells.<sup>31</sup> It was also found that binding of G-quadruplex-capped AgNCs to nucleolin greatly enhances their luminescence properties. Another area where AgNCs found application is catalysis. For example,  $\text{Ag}_7$  and  $\text{Ag}_8$  NCs loaded on inorganic supports such as alumina were shown to act as catalyst for the reduction of various nitro aromatic compounds, and the supported NCs stayed active and were recycled several times after separation.<sup>20</sup>

Albeit the optical features are core-derived, surface ligands play a vital role in shaping the electronic properties of the NCs as most of their atoms are located at the surface. For example, glutathione-capped  $\text{Au}_{25}$  NCs and BSA-encapsulated  $\text{Au}_{25}$  NCs exhibit totally different absorption features and quantum yields even though they have the same core.<sup>63,64</sup> Ligands also

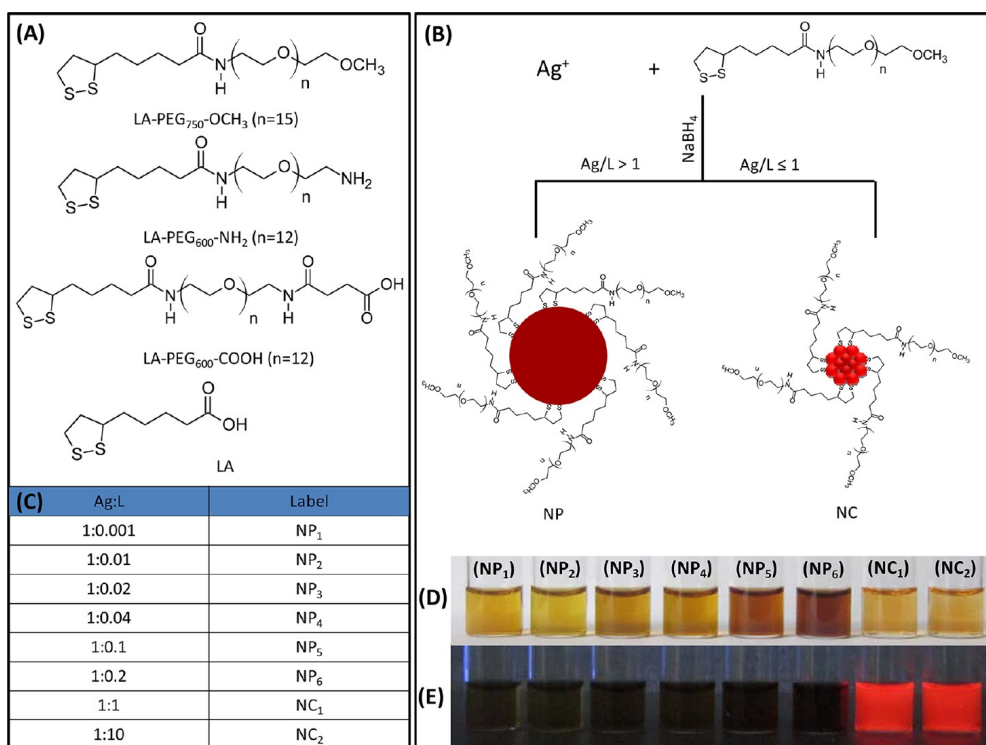
block agglomeration, stabilize the NCs, and influence the selection of a certain thermodynamically most stable size. The colloidal stability of the nanocrystals depends on the ligand coordination onto the inorganic surface and its affinity to the surrounding solvent. For example, thiol groups are known to exhibit strong affinity to metal and semiconductor NP surfaces.

Our group has developed a number of modular ligands made of a tunable length polyethylene glycol (PEG) segment appended with lipoic acid (LA) or dihydrolipoic acid (DHLLA) at one end and a potentially reactive or inert group at the other end.<sup>65–68</sup> These ligands were initially developed to promote the phase transfer of quantum dots (QDs) to buffer media and couple them to target biomolecules, where they provided aggregation-free, homogeneous, and reactive QD dispersions.<sup>65,66,68</sup> We have more recently used them to synthesize an array of gold NPs that exhibit great colloidal stability over pH ranging from strong acidic to alkaline and in the presence of excess electrolytes (up to 2 M NaCl) and dithiothreitol (DTT).<sup>67</sup>

Here we extend the above design and use borohydride reduction of  $\text{AgNO}_3$  in the presence of LA-PEG ligands to grow both nonluminescent metal NPs and luminescent “nonmetallic” NCs of silver. Though DHLLA has been previously used to synthesize AgNCs,<sup>43</sup> substituting LA-PEG ligands with potentially reactive terminal groups allows one to carry out the growth reaction, or redisperse already prepared NPs/NCs, in a wide range of solvents, including water. The PL of the NCs protected with LA-PEG ligands was enhanced 5-fold when compared with the NCs protected with LA alone. Furthermore, the presence of reactive end groups provides one the ability to further conjugate the NPs/NCs to various biomolecules. This will be greatly beneficial if combined with future enhancement of the long-term colloidal stability of these materials. In addition to the growth of NCs by direct reduction, we also show that polydisperse NPs can be converted to nearly monodisperse AgNCs by “size focusing” in the presence of excess ligands and reducing agent.

## RESULTS AND DISCUSSION

The present design builds on our previous work where we had combined the use of LA-PEG-based ligands and one phase growth to prepare a set of AuNPs with sizes ranging from 1.5 to 20 nm in diameter.<sup>67</sup> Here, we wanted to extend that design to the synthesis of silver nanoparticles over a wide size range. Overall, the present study was motivated by the following objectives: (1) synthesis of an array of hydrophilic AgNPs with clearly defined size-dependent SPR bands, (2) direct growth of homogeneous and hydrophilic AgNCs with promising luminescence properties, (3) controlling the number of reactive groups per NC for subsequent functionalization, and (4) test the feasibility of transforming polydisperse nonluminescent



**Figure 1.** (A) Chemical structures of the ligands, (B) synthetic strategy of NPs/NCs of various core sizes. (C) Table showing the Ag:L ratios used for the synthesis. (D,E) Photographs of aqueous dispersions of the particles synthesized at various Ag:L ratios under room light and UV light irradiation, respectively. Images were collected from a set of freshly prepared dispersions, without filtration or adjustment of the nanoparticle or cluster concentrations.

NPs into homogeneous luminescent NCs with low size distribution and high quantum yield. Three LA-PEG-based ligands, LA-PEG<sub>750</sub>-OCH<sub>3</sub>, LA-PEG<sub>600</sub>-NH<sub>2</sub>, and LA-PEG<sub>600</sub>-COOH, were prepared and used for the synthesis of NPs/NCs along with commercially available LA (see Figure 1A for their chemical structures). LA-PEG<sub>750</sub>-OCH<sub>3</sub> was used throughout the study unless mentioned otherwise. The synthesis of NPs/NCs was carried out in two steps. First, silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) and LA-PEG<sub>750</sub>-OCH<sub>3</sub> were mixed in water to promote the formation of Ag-LA-PEG<sub>750</sub>-OCH<sub>3</sub> metal–ligand complex (as a precursor), followed by the addition of NaBH<sub>4</sub> reducing agent to initiate the growth of the nanoparticles (as schematically depicted in Figure 1B). Control over the size of the resulting metal nanocrystals (NPs or NCs) was achieved by varying the Ag:L molar ratio from 1:0.001 to 1:10, while keeping the concentration of Ag ions in the reaction fixed (see the table, Figure 1C). NPs resulted for Ag:L ratios between 1:0.001 and 1:0.2, while NCs exclusively resulted for Ag:L ratios between 1:1 and 1:10 (Figure 1D,E).

Figure 2A,B shows the optical absorption spectra collected at the end of the reaction from the samples prepared with various Ag-to-L ratios. When observed under white light, the dispersions show a clear color change from yellow to dark brown to reddish brown

when the Ag:L ratio decreased (see Figure 1D). The materials synthesized at Ag:L ratios ranging from 1:0.001 to 1:0.2 are NPs as indicated by the clear characteristic SPR band observed in all of the absorption spectra, which gradually red shifts with decreasing Ag-to-L ratio. For example, we measured absorption maxima at 388 for NP<sub>1</sub>, 396 for NP<sub>2</sub>, 398 for NP<sub>3</sub>, 406 for NP<sub>4</sub>, 416 for NP<sub>5</sub>, and 434 nm for NP<sub>6</sub> with a gradual decrease in the absorbance value at lower Ag-to-L ratio (Figure 2A). In contrast, reactions carried out using lower ratios, namely, Ag:L = 1:1 and 1:10, produced dispersions that exhibit drastically different absorption spectra. The spectra show three prominent and well-defined absorption peaks at 330, 428, and 495 nm, along with much weaker features measured at 239, 258, and 300 nm (see Figure 2B). The well-resolved “molecule-like” absorption features are attributed to the presence of very small nanocrystals (nanoclusters, NCs) in the samples.

The two sets of dispersions, corresponding to the spectra shown in Figures 2A,B, exhibit drastically different luminescence properties as shown in Figure 2C. While NPs did not show any luminescence under any excitation wavelength, NCs exhibited pronounced luminescence with a peak centered at 680 nm. Additional proof is provided in the photograph collected



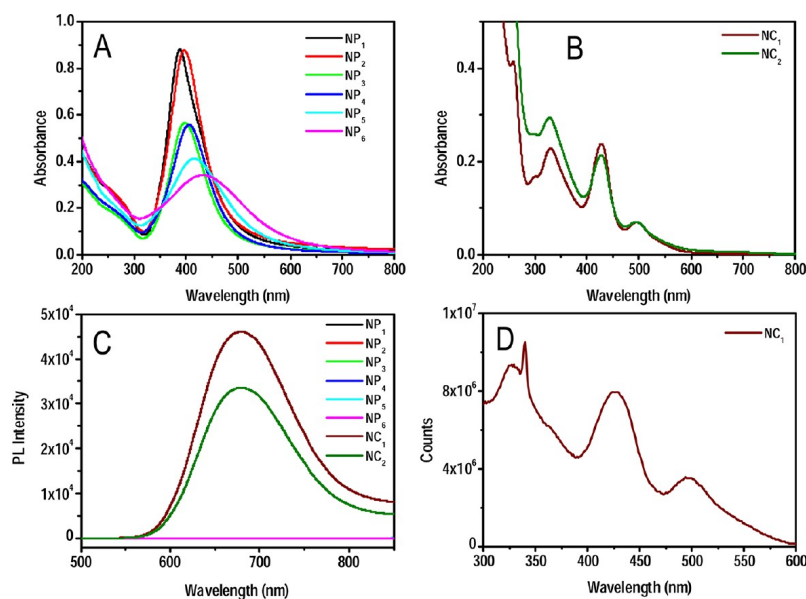


Figure 2. (A) Optical absorption spectra of NPs; (B) optical absorption spectra of NCs; (C) photoluminescence spectra of NPs and NCs at 450 nm excitation; and (D) excitation spectrum (or excitation scan) of NC<sub>1</sub> using detection at 680 nm. The small peak at 340 nm results from the contribution of the second overtone of the grating in the monochromator due to signal collection at 680 nm (peak of the PL spectrum).

from all of the dispersions under UV light irradiation (see Figure 1E); indeed, NP dispersions are dark, whereas the NC dispersions exhibit bright red emission. When excited at different wavelengths, the emission from NCs did not change position, albeit a change in the PL intensity, with the highest and lowest intensities measured for  $\lambda_{exc} = 330$  and 495 nm, respectively (see Supporting Information, Figure S1). We should also note that the PL emission collected from dried (solid paste) NCs matched that of the dispersions. Excitation scan collected from NC<sub>1</sub>, matched its absorption spectrum, with all three prominent absorptions featuring on both spectra (see Figure 2D). The quantum yield of the NCs in water was calculated using 4-(dicyanomethylene)-2-methyl-6-(4-dimethylaminostyryl)-4H-pyran (DCM) dye as reference and is found to be  $\sim 12\%$ .

To complement the above optical and spectroscopic characterization and assign core sizes to the above dispersions, we carried out transmission electron microscopy (TEM) measurements on the following samples: NP<sub>2</sub>, NP<sub>3</sub>, NP<sub>4</sub>, NP<sub>5</sub>, and NC<sub>1</sub> (see Figure 3 and 7B for NP<sub>4</sub>). The TEM images collected from NP<sub>2</sub>, NP<sub>3</sub>, and NP<sub>4</sub> showed that the particles exhibit large size dispersion, while the image of NP<sub>5</sub> showed nanoparticles with substantially lower size distribution. As for NC<sub>1</sub>, the image shows more homogeneous nanocrystals with a core size of  $\sim 1.3$  nm. Overall, on the basis of the absorption properties combined with the TEM data, we conclude that larger metallic NPs which exhibit clearly defined SPR are formed at high Ag-to-ligand ratios (Ag:L = 1:0.001

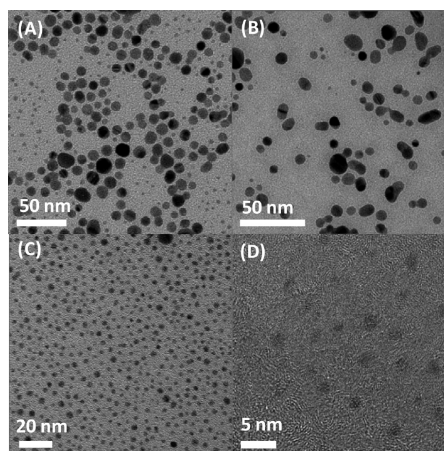


Figure 3. Transmission electron microscopic images of (A) NP<sub>2</sub>, (B) NP<sub>3</sub>, (C) NP<sub>5</sub>, and (D) NC<sub>1</sub>. Images clearly show the size progression with changes in the Ag-to-ligand ratios used.

to 1:0.2) while smaller nonmetallic and luminescent NCs are formed at low ratios (Ag:L = 1:1 to 1:10). Similar correlations between metal-to-L ratio and nanocrystal size were also observed for the growth of AuNPs using this same growth reaction and the same ligands.<sup>67</sup>

We also synthesized NCs protected with lipoic acid. For this, a sodium salt of LA is made first by adding the base NaOH since LA is insoluble in water. LA-protected NCs showed all of the absorption features and similar absorbance values, albeit a slight wavelength shift for



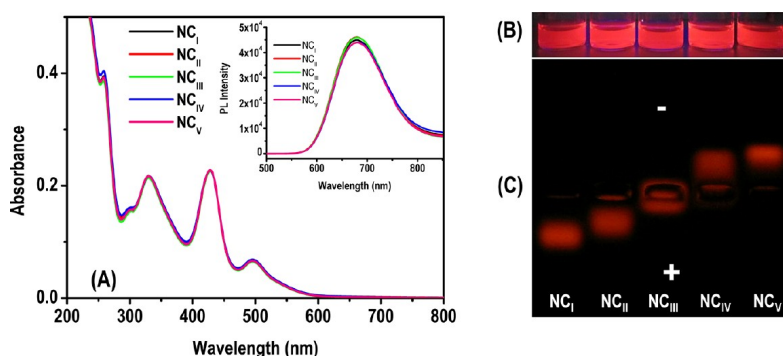


Figure 4. (A) Optical absorption spectra of NCs capped with ligands of different functionalities, namely, 100% LA-PEG-COOH (NC<sub>I</sub>), 50% LA-PEG-COOH and 50% LA-PEG-OCH<sub>3</sub> (NC<sub>II</sub>), 100% LA-PEG-OCH<sub>3</sub> (NC<sub>III</sub>), a mixture of 50% LA-PEG-NH<sub>2</sub> and 50% LA-PEG-OCH<sub>3</sub> (NC<sub>IV</sub>), and 100% LA-PEG-NH<sub>2</sub> (NC<sub>V</sub>). Inset shows the corresponding photoluminescence upon 450 nm excitation. (B) Photograph of the aqueous dispersions of the NCs upon UV excitation using a hand-held UV lamp. (C) Gel electrophoresis image of the above dispersions under UV light irradiation; the red color results from the NC emission.

the main absorption features (330, 426, 496 nm), when compared with NCs synthesized using PEGylated ligands. However, these NCs exhibited a slightly red-shifted (~17 nm) luminescence, and the measured intensity was ~5 times smaller than LA-PEG-protected NCs (QY ~3.3%; see Supporting Information, Figure S2). This suggests that equal numbers of NCs are formed, but the larger ligand structure of the LA-PEG enhances the luminescence from these materials. When compared with our data, DHLA-capped AgNCs synthesized by Banerjee and co-workers exhibited absorption features at 335, 435, and 500 nm and emission at 652 nm.<sup>43</sup>

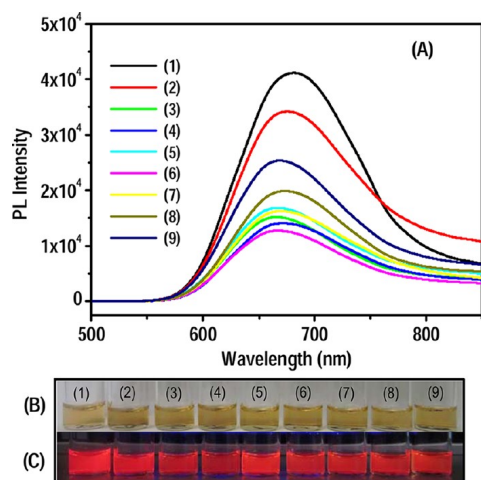
**Remark:** We have attempted mass spectrometry characterization using both electrospray ionization (ESI) and matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) techniques in order to possibly assign a chemical composition to these NCs. No reliable information was obtained. We observed only peaks corresponding to the ligand in both cases (see Supporting Information, Figure S3). This may be due to the inadequacy of the commonly used matrices and the limited stability of the AgNCs even under the soft ionization conditions.<sup>57</sup>

Our one phase growth route affords the ability to control the surface functionalities of the NCs *in situ*. This can be achieved by mixing inert LA-PEG-OCH<sub>3</sub> ligands with reactive LA-PEG-COOH and/or LA-PEG-NH<sub>2</sub> ligands during the growth reaction.<sup>66,69</sup> We have synthesized five batches of NCs by mixing AgNO<sub>3</sub> precursor with the following ligand combinations (Ag:L = 1:1): 100% LA-PEG-COOH (NC<sub>I</sub>), 50% LA-PEG-COOH and 50% LA-PEG-OCH<sub>3</sub> (NC<sub>II</sub>), 100% LA-PEG-OCH<sub>3</sub> (NC<sub>III</sub>), 50% LA-PEG-NH<sub>2</sub> and 50% LA-PEG-OCH<sub>3</sub> (NC<sub>IV</sub>), 100% LA-PEG-NH<sub>2</sub> (NC<sub>V</sub>). In all cases, the formed NCs exhibited identical absorbance values and similar luminescence intensities to those shown above (see Figure 4A and inset of 4A); the photograph of the NC dispersions under UV excitation, as shown in Figure 4B,

further confirms that comparable luminescence is generated from all of the samples. The NCs capped with different functional groups exhibited a QY of ~12%. This result suggests that the growth of NCs is not affected by the ligand end functionality, a property directly attributable to the fact that all of these ligands have a similar PEG structure and exhibit the same affinity toward the nanocrystal surfaces.

The gel image shown in Figure 4C demonstrates that while NC<sub>III</sub> (grown with 100% LA-PEG-OCH<sub>3</sub>) did not exhibit any mobility shift, NC<sub>I</sub>, NC<sub>II</sub>, NC<sub>IV</sub>, and NC<sub>V</sub> (grown with -COOH, OCH<sub>3</sub>/COOH, OCH<sub>3</sub>/NH<sub>2</sub>, and -NH<sub>2</sub>) experienced a ratio-dependent mobility shift; NC<sub>I</sub> (100% LA-PEG-COOH) and NC<sub>V</sub> (100% LA-PEG-NH<sub>2</sub>) experienced the largest mobility shift. Furthermore, the sign of the displacement varied with the nature of the functional groups, confirming the presence of negative charges for carboxyl-terminated ligands (migration toward the anode) and positive charges for aminated ligands since the NCs migrated toward the cathode. The achieved control over NC functionality is of great importance, as this would help one to tune the reactivity of the NP/NC and allow further functionalization with target molecules such as proteins, peptides, and DNAs. This procedure can be extended to NPs to prepare surface-functionalized AgNPs.<sup>67</sup>

Our long-term colloidal stability tests indicate that the integrity of the NCs (as prepared in aqueous dispersion, pH ~10) is preserved for several months when protected from light. However, the clusters progressively lose their characteristic absorption and emission features when exposed to direct sun light or UV irradiation (see Supporting Information, Figure S4). The reason for the photosensitivity is unknown as of now. We also checked the stability of the NC dispersions over a broad range of pH values in the presence of excess NaCl or growth media (see Supporting Information, Figure S5). Data indicate that the NCs



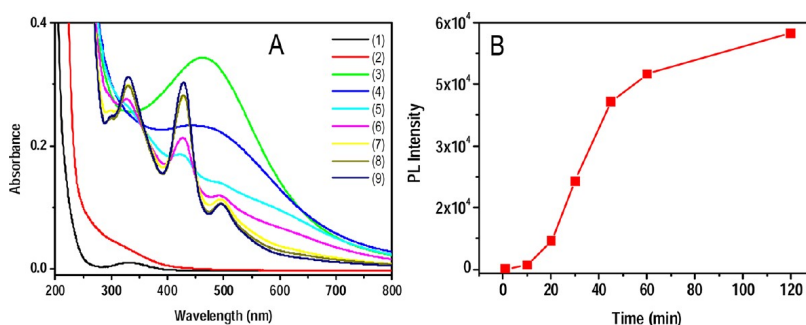
**Figure 5.** (A) PL spectra of AgNCs redispersed in different solvents: (1) water, (2) chloroform, (3) acetone, (4) acetonitrile, (5) THF, (6) DMF, (7) ethyl acetate, (8) methanol, and (9) 2-propanol. Images (B) and (C) show photographs of the dispersions in various solvents under room light and UV light irradiation using a hand-held UV lamp, respectively.

exhibit long-term stability only in basic buffers. Conversely, the NCs are stable in the presence of 1 M NaCl for at least one week, but emission is essentially lost after one day of storage in cell culture media (Dulbecco's modified Eagle media, DMEM).

Transfer of the NPs and NCs from one medium to another is very important as it can indicate one's ability to process these materials from various solution conditions and potentially develop tailor-designed applications requiring the availability of the materials in solvents with drastically different properties. In addition, the environment surrounding a fluorophore (e.g., solvent) often plays an important role in determining the luminescence intensities and sometimes the emission wavelength.<sup>22,70</sup> To check the solubility of the NCs in different solvents, the native aqueous dispersion was first lyophilized and the resulting paste was dissolved in chloroform; then aliquots of this dispersion were transferred to open vials, and the solvent was allowed to evaporate in the dark. After the complete solvent removal, water, chloroform, acetone, acetonitrile, THF, DMF, ethyl acetate, methanol, and 2-propanol were added in equal amounts to each vial, then absorption and PL spectra were collected. The measured absorption spectra exhibited all of the prominent absorption features of the NCs; absorption spectra in some selected solvents are provided in the Supporting Information (Figure S6). There was, however, a partial loss in the PL emission and a slight change in the peak location in certain solvents (Figure 5A). For instance, the peak emission measured in acetone was slightly blue-shifted compared to water (peak at 663 nm compared to 680 nm in water). The QY values of the NCs in these solvents are provided in the

Supporting Information, Table S1. Figure 5B,C shows a photograph of the NC dispersions in different solvents under white light and UV light irradiation, respectively. The solubility of the NCs in different solvents can primarily be attributed to the affinity of the ligands to those media. We should note that after two weeks of storage, only dispersions in water, 2-propanol, acetonitrile, and DMF retained their emission; substantial losses were measured in other solvents.

The absorption spectra collected from samples NP<sub>1</sub> to NP<sub>6</sub> (prepared using excess molar of Ag) consistently showed well-defined broad single absorption peaks located at 390–430 nm. We attribute this peak to surface plasmon resonance (SPR, ascribed to the coherent oscillations of electrons near the NP surfaces), as widely reported for Ag nanoparticles prepared via other growth routes.<sup>71</sup> However, the multiple absorption features in the spectra collected from the clusters (NC<sub>1</sub> and NC<sub>2</sub>, synthesized using equal or higher molar concentration of LA-PEG ligands) cannot be attributed to SPR. These samples are made of much smaller size nanocrystals, as evident from the TEM image, and they do not have enough electron densities to support SPR characteristics, as their larger size NP counterparts do. Instead, they contain much smaller numbers of atoms and display discreet *molecule-like* absorption peaks. In general, NCs of gold and silver exhibit multiple absorption features throughout the UV–vis region, though those features are not as well-defined and understood as those measured for semiconductor QDs. Preceding reports about the time-dependent density functional theory (TDDFT) calculations of the electronic structures and optical spectra of the NCs indicate that the absorption features result from the electronic transitions between the molecular orbitals (MOs) of the clusters.<sup>72,73</sup> TDDFT calculations of NCs help us to understand how the nature of electronic and optical properties vary with size, geometry, and chemical environment such as nature of the ligand coordination onto the NC surface. Aikens and co-workers conducted TDDFT calculations to determine the optical absorption spectra for a series of silver clusters (Ag<sub>n</sub>, n = 6–85) with various charge states.<sup>74</sup> Those clusters exhibit octahedral, truncated octahedral, and icosahedral structures. In the absence of a structural model (crystal structure or geometry) at the moment for our NCs, we cannot assign each absorption feature to a particular electronic transition, as was done in refs 72 and 73. However, we can propose a general qualitative explanation for the origins of the absorption features measured for our luminescent NCs. For AgNCs, the MOs are mainly made up of Ag (5sp), Ag (4d) atomic orbitals of the core and sulfur (S), 3p atomic orbital of the ligand.<sup>73</sup> MOs made up of sp orbitals constitute the sp band, whereas those made up of d orbitals constitute the d band. All of the MOs have contribution from the sulfur 3p orbital of the ligand, indicating that the optical absorption



**Figure 6.** (A) Time-dependent optical absorption spectra during AgNC synthesis. Absorption spectra of ligand alone (1), after the addition of Ag precursor (2), then 5 min (3), 10 min (4), 20 min (5), 30 min (6), 45 min (7), 1 h (8), and 2 h (9) after the addition of NaBH<sub>4</sub> to the mixture. (B) Plot of PL intensity vs time during the NC synthesis.

spectrum is a combination of core and ligand contributions.<sup>75</sup> Ligand contribution may play a larger role here since the absorption features measured for the clusters prepared in the presence of lipoic-based ligands are different from what has been reported for monothiol-alkyl ligands. It is believed that low-energy/high-wavelength optical features are due to intraband sp to sp transitions, and high-energy/low-wavelength features result from interband d to sp transitions.

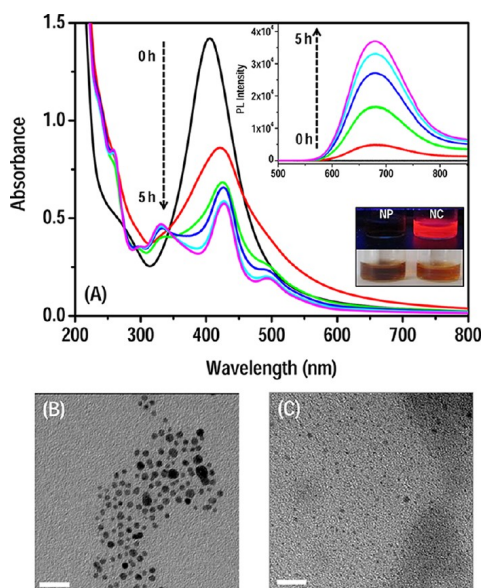
The luminescence measured for our NCs results from the relaxation of the excited electron back into the ground state (HOMO) across the energy barrier (gap). The single color emission may be attributed to a combination of single average size NCs afforded by our reaction scheme and band edge emission. Electrons excited to higher energy states always rapidly relax nonradiatively to the band edge before recombining with the hole in the HOMO, emitting red photons. This process is similar to the PL generated from semiconductor nanocrystals.<sup>76</sup>

We now focus on elucidating the mechanism of NC growth *via* either of the routes described in the Experimental Section, namely, direct reduction of Ag precursor or size focusing of nonluminescent nanoparticles. For the direct reduction route, we first monitored the absorption spectrum of the ligand mixed with AgNO<sub>3</sub> in the absence of borohydride. We found that a weak peak is measured at ~330 nm for the free ligand, which rapidly disappeared when AgNO<sub>3</sub> was added (see Figure 6A). The resulting solution became colorless and exhibited no photoluminescence. Five minutes after the addition of NaBH<sub>4</sub>, the solution turned dark brown and a broad peak centered at 463 nm appeared. After 10 min, the peak broadens and its absorbance decreases and then gradually resolves into three prominent absorption features with time. The above transformation of the absorption spectrum after the addition of borohydride was accompanied by a gradual build up in red fluorescence (see Figure 6B), and the reaction was complete within ~2 h when both absorption and emission spectra reached saturation.

The weak absorption peak of the free ligand at ~330 nm is due to the strained five-membered cyclic disulfide structure of lipoic acid.<sup>77</sup> When silver nitrate is added, the Ag<sup>+</sup> ions progressively complex with the disulfide group (due to the affinity exhibited by this group to several metals, including Au and Ag) to form the Ag-LA-PEG metal–ligand complex, referred to as the precursor.<sup>67</sup> During this procedure, the disulfide bond is weakened, leading to the disappearance of the peak at 330 nm; no NCs are formed at this time. After the addition of NaBH<sub>4</sub>, reduction of Ag-LA-PEG complex to Ag(0) initiates the growth of Ag cores, likely over broad size range;<sup>63,78–80</sup> these Ag cores have different stabilities, and they slowly convert with time into a single average and thermodynamically stable NC. Since the molar concentration of Ag is fixed during the reaction, equilibrium favoring smaller size NCs requires much higher concentration of stabilizing ligands in order to accommodate their higher surface-to-volume ratio and larger number. In comparison, at lower ligand concentration, equilibrium favors the growth of larger size NPs where the overall area to be passivated is smaller. Growth of NCs also depends on the amount of reducing agent. A minimum of 5-fold excess of reducing agent (in terms of Ag<sup>+</sup> precursor concentration) is required to form clusters. Maximum luminescence is observed when 20-fold excess of NaBH<sub>4</sub> is used.

Finally, we confirmed that the absorption and emission features of the NCs are core-derived by carrying out an etching experiment using CN<sup>-</sup> ions. Cyanide ions are known to convert Ag(0) to AgCN by the core etching of NPs.<sup>54,81</sup> An aqueous dispersion of NCs was mixed with a molar excess of sodium cyanide and left to stir overnight. We found that such treatment leads to the disappearance of all of the absorption features as well as the PL signal, while the solution turned colorless, suggesting that cyanide ions dissolved the core silver, resulting in the collapse of the NCs.

In the second synthesis route, referred to as size focusing, polydisperse larger size NPs are converted into homogeneous smaller size NCs; this process is also



**Figure 7.** (A) Time-dependent evolution of optical absorption features of NCs during the size focusing of NP<sub>4</sub> (initially synthesized using 1:0.04 Ag:L molar ratio). Inset shows the corresponding emission spectra. The photograph of the NP before and after size focusing under bright light and UV light is also shown. TEM images of AgNPs (B) before and (C) after size focusing. The scale bar designates 20 nm.

known as “core etching” in the literature. To follow the synthesis using this method, we tracked the time progression of the optical characteristics (absorption and emission) of a NP dispersion (prepared using Ag:L = 1:0.04, NP<sub>4</sub>) after mixing with excess ligands and NaBH<sub>4</sub>. Aliquots from the reaction mixture were retrieved, and spectra were collected at regular intervals. Figure 7A shows that the initial NP dispersion exhibits an SPR band located at 406 nm and no luminescence. After addition of the ligand and NaBH<sub>4</sub>, the band progressively decreased and red-shifted with time; for example, the SPR peak shifted to 418 nm, and the solution showed a very weak emission at 680 nm after 15 min. As time progressed, these changes continued to develop until the complete disappearance of the SPR peak was replaced with the characteristic absorption features of the NCs; these changes were accompanied with an enhancement in the measured luminescence (see Figure 7A). The color of the NP dispersion changed from dark brown with no luminescence (before) to reddish brown with bright luminescence after size focusing (Figure 7A, inset). Saturation of the absorption and emission spectra was reached after 3–5 h from the addition of ligand and reducing agent. This change in optical features and the evolution of emission indicate the formation of NCs.

We further confirmed the complete conversion of a rather polydisperse NP population into homogeneous NCs using TEM. The TEM image of as-grown NPs

showed nanoparticles with a rather broad size range (~7–2 nm, Figure 7B). Following size focusing, the larger particles progressively disappeared, replaced with a homogeneous population of nanocrystals having an average diameter of ~1.3 nm (see Figure 7C).

Size focusing required the addition of a large amount of the ligands (comparable to the amounts used for NC growth by direct reduction). In the absence of NaBH<sub>4</sub>, no characteristic absorption features or emission of NCs was observed after several hours even in the presence of ligands. Similarly, in the absence of ligands, no visible change in the SPR band of the NP was observed. We also found that while the smaller size NPs (synthesized at 1:0.02 to 1:0.2 Ag:L ratios) exhibited size focusing, NPs synthesized at 1:0.001 and 1:0.01 ratios (larger size NPs) did not (see Supporting Information, Figure S7). They only showed a slight red shift and a decrease in absorbance of the SPR band at all times. Overall, we found that at least 5-fold molar excess of NaBH<sub>4</sub> and a final Ag:L = 1:1 or higher are required to achieve complete transformation of NPs into luminescent clusters.

We would like to emphasize that size focusing can be carried out using a mixture of inert and end-functionalized ligands, which indicates that surface-functionalized NCs can also be prepared using this route (NP growth and size focusing). For instance, we performed this procedure on NPs previously synthesized at 1:0.1 Ag:L ratio with ligands made of 100% –COOH (NC<sub>S1</sub>), 50–50 mixture of –OCH<sub>3</sub> and –COOH (NC<sub>S11</sub>), 100% –OCH<sub>3</sub> (NC<sub>S111</sub>), 50–50 mixture of –OCH<sub>3</sub> and –NH<sub>2</sub> (NC<sub>S1V</sub>), and 100% of NH<sub>2</sub> (NC<sub>S1V</sub>) separately. The reaction was allowed to continue for equal time for the five batches. All of the resulting dispersions exhibited characteristic absorption features of NCs with the same absorbance values and PL intensities (see Figure 8A,B). This suggests that ligands of any functionality can be used, and the populations of the NCs formed at the end of the reaction are essentially identical. Additionally, gel electrophoresis experiments showed that while NC<sub>S111</sub> (obtained with 100% LA-PEG-OCH<sub>3</sub>) did not exhibit any mobility shift under applied voltage, all of the other NCs showed shifts with the expected sign and magnitude, due to the presence of either –COOH or –NH<sub>2</sub> (see Figure 8C).

Even though the mechanism that drives the conversion of NPs to NCs is not clearly understood, a tentative explanation can be provided. The initial growth step provides NPs with a broad size range, and their surface-to-volume ratio and thermodynamic stability vastly differ. For NP synthesis, the ratio of Ag-to-L is high, which means that the number of ligands on their surface is low and hence can be less stable. When excess ligands are provided (to a final Ag:L ratio of 1:1, identical to those used in the direct reduction method), the free thiols can progressively “etch” the NPs, leading to reduction in size and polydispersity,



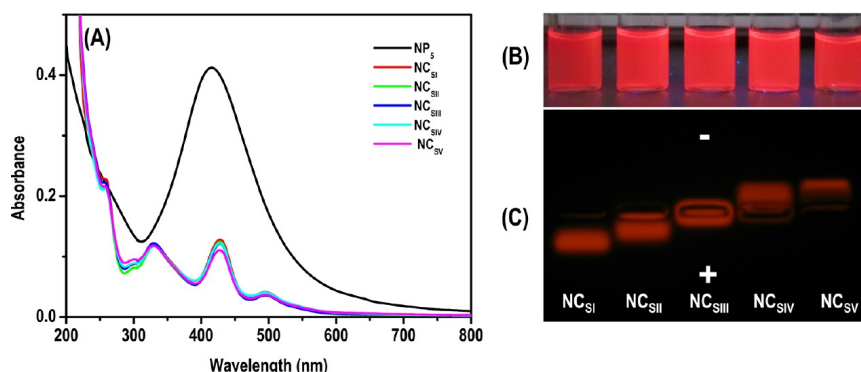


Figure 8. (A) Optical absorption spectra of the NCs formed after size focusing with ligands of different end functionalities: 100% LA-PEG-COOH (NC<sub>S1</sub>), 50% LA-PEG-COOH and 50% LA-PEG-OCH<sub>3</sub> (NC<sub>S2</sub>), 100% LA-PEG-OCH<sub>3</sub> (NC<sub>S3</sub>), a mixture of 50% LA-PEG-NH<sub>2</sub> and 50% LA-PEG-OCH<sub>3</sub> (NC<sub>S4</sub>), 100% TA-PEG-NH<sub>2</sub> (NC<sub>S5</sub>), and the parent NP<sub>5</sub> (synthesized at 1:0.1 Ag-to-L ratio). (B) Photograph of the aqueous dispersion of the samples upon UV light irradiation and (C) gel electrophoresis image.

providing a homogeneous dispersion of smaller size clusters.<sup>53,54,57,78,82</sup>

## CONCLUSION

We have synthesized an array of NPs and NCs of silver using ligands made of a tunable length polyethylene glycol segment appended with lipoic acid at one end and a potentially reactive (–COOH/–NH<sub>2</sub>) or inert group (–OCH<sub>3</sub>) at the other end. The particle size was controlled by varying the Ag-to-ligand ratio. While higher Ag-to-ligand ratio promoted the formation of NPs, lower ratios favored the formation of NCs. We also showed that the as-synthesized polydisperse nonluminescent NPs can be “size focused” to a homogeneous population of luminescent nanoclusters. This implies that the NCs can be synthesized by two routes: a one-step direct reduction of Ag<sup>+</sup> ions (bottom-up) or a two-step size focusing (top-down) starting from nonluminescent nanoparticles.

Our tailor-made ligands offer manifold advantages. The presence of PEG segments considerably enhances

the photophysical properties such as quantum yield of NCs in addition to solubility in a wide range of solvents. The resulting NPs and NCs can be easily transferred from aqueous to organic solutions, without requiring cap exchange as is done with most other materials (*e.g.*, those prepared *via* a citrate reduction). This broad solubility may help in expanding the utility of these clusters in other areas such as catalysis. Lipoic acid offered multidentate coordination and helped in the Ag–ligand precursor formation. Our synthetic route affords the ability to control the number of functional groups on the NC surface by mixing inert and functional ligands during the growth. This opens up new opportunities for these NCs in biological applications such as imaging and sensing; nonetheless, this potential still hinges on the ability to improve the long-term stability of the PL emission of these materials. Finally, our synthetic design should be easily extended to other nanoclusters such as gold, copper, and palladium.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Materials.** Poly(ethylene glycol) (molecular weight average of 600), poly(ethylene glycol) methyl ether (molecular weight average of 750), methanesulfonyl chloride, triphenylphosphine, lipoic acid (thioctic acid), DMAP (4-(*N,N*-dimethylamino)pyridine), DCC (*N,N*-dicyclohexylcarbodiimide), triethylamine, sodium borohydride, succinic anhydride, NaOH, KOH, NaHCO<sub>3</sub>, organic solvents, PBS buffer, and salts (such as NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). Sodium azide and silver nitrate were purchased from Alfa Aesar (Ward Hill, MA). The chemicals and solvents were used as purchased unless otherwise mentioned. Deuterated solvents were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). Column purification chromatography was performed using silica gel (60 Å, 230–400 mesh, from Bodman Industries, Aston, PA).

**Instrumentation.** <sup>1</sup>H NMR spectra of all compounds were recorded using a Bruker SpectroSpin 600 MHz spectrometer. The optical absorption measurements were carried out using a Shimadzu UV–vis absorption spectrophotometer (UV 2450 model),

while the luminescence spectra were collected on a Fluorolog-3 spectrometer (Jobin Yvon Inc., Edison, NJ) equipped with PMT and air-cooled CCD detectors. The emission spectra were collected using the CCD detector, whereas the excitation spectra were collected using the PMT. Transmission electron microscopy (TEM) images were taken using a 200 kV JEOL-2010 instrument or a Philips FEI CM-120 operating at an acceleration voltage of 120 kV. Samples for TEM were prepared by drop casting the NP/NC dispersion onto the holey carbon film on a fine mesh Cu grid (400 mesh) and letting it dry. Gel electrophoresis experiments were run on a 1% agarose gel. The NC dispersions were first diluted in a 10% glycerol 1× TBE Tris borate EDTA (100 mM Tris, 83 mM boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.3) loading buffer. Aliquots of these dispersions were loaded into 1% agarose gel, and mobility shift experiments were conducted using an applied voltage of 7–8 V/cm for 15 min. The gel was imaged using a UVP transilluminator equipped with a digital camera.

**Synthesis of LA-PEG Series.** Three ligands made of a polyethylene glycol segment appended with lipoic acid at one end and

potentially reactive (–COOH/–NH<sub>2</sub>) or inert (–OCH<sub>3</sub>) groups at the other end were synthesized, purified, and characterized according to our previous synthetic protocols.<sup>66,69,83</sup> They are LA-PEG<sub>750</sub>-OCH<sub>3</sub> (PEG MW = 750), LA-PEG<sub>600</sub>-COOH (PEG MW = 600), and LA-PEG<sub>600</sub>-NH<sub>2</sub> (PEG MW = 600).

**Growth of Silver Nanoparticles (AgNPs).** Nanoparticles were typically grown when borohydride reduction of AgNO<sub>3</sub> precursor was carried out using rather large silver-to-ligand molar ratios (Ag:L ranging from 1:0.001 to 1:0.2). This was achieved by varying the molar concentration of the ligand while maintaining that of AgNO<sub>3</sub> fixed. In a typical synthesis, 30 μL of 5 mM AgNO<sub>3</sub> and the desired molar concentration of LA-PEG<sub>750</sub>-OCH<sub>3</sub> were dissolved in 3 mL of deionized water. The mixture was stirred at room temperature for 15–30 min to promote precursor formation, then 30 μL of 50 mM NaBH<sub>4</sub> was added, followed by stirring for another 1 h. Once the reaction was complete (*i.e.*, when no change in the absorption features could be measured), excess free ligands were removed by centrifugation using a 10 kDa membrane filter, and the dispersion was used for further characterization. Different combinations of ligands such as LA-PEG<sub>750</sub>-OCH<sub>3</sub> (inert), end-functionalized (namely, LA-PEG<sub>600</sub>-NH<sub>2</sub> or LA-PEG<sub>600</sub>-COOH), or mixtures of the two or three can be used to synthesize surface-functionalized NPs.

**Growth of Silver Nanoclusters (AgNCs) via Direct Borohydride Reduction.** As done above for growing NPs, we maintain the amount of Ag precursor fixed (30 μL of 5 mM AgNO<sub>3</sub>) and vary the molar concentration of LA-PEG<sub>750</sub>-OCH<sub>3</sub> in 3 mL of deionized water; typically, the range of Ag-to-LA-PEG ratio could be varied between 1:1 and 1:10. Following precursor formation, 30 μL of 100 mM NaBH<sub>4</sub> was added with stirring, and the mixture was then left stirring for 2 h. Excess free ligands were removed by centrifugation using a 10 kDa membrane filter. The reaction was carried out under dark or was protected from light. Here also, the ligand LA-PEG<sub>750</sub>-OCH<sub>3</sub> can be replaced with LA-PEG<sub>600</sub>-NH<sub>2</sub> or LA-PEG<sub>600</sub>-COOH or a mixture of the two to synthesize functionalized NCs. Growth of AgNCs was also carried out in various organic solvents including methanol, ethanol, chloroform, 2-propanol, and THF.

**Preparation of Silver Nanoclusters via Size Focusing Starting from AgNPs.** This procedure involves the progressive transformation of larger size (naturally polydisperse) NPs into a set of smaller size NCs (nearly monodisperse).<sup>78,80,82,84</sup> This process is also referred to as core etching in the literature. For this, aqueous dispersions of freshly synthesized NPs were further treated with additional (excess) ligands and NaBH<sub>4</sub>. The amount of ligands added was such that the final Ag:L ratio (initial and added) in the sample was 1:1, while the concentration of NaBH<sub>4</sub> was 5-fold that of the ligand added for size focusing. The solution was left stirring at room temperature, and the reaction was monitored by retrieving aliquots at regular intervals and collecting the optical absorption and emission spectra. The reaction was stopped after 3–5 h when there was no further change in the optical absorption and emission spectra. The solution was centrifuged (at 20 000 rpm) for 30 min followed by filtration with a 50 kDa membrane filter. Excess ligands were removed by the subsequent filtration with a 10 kDa membrane filter.

**Quantum Yield Measurement.** Quantum yield (QY) values of NCs with different ligands and in different solvents were calculated using 4-(dicyanomethylene)-2-methyl-6-(4-dimethylaminostyryl)-4H-pyran (DCM) dye as the standard (ST). We have used the following equation,  $QY_{NC} = QY_{ST} \frac{(I_{NC}/A_{NC})(A_{ST}/I_{ST})}{(I_{ST}/A_{ST})}$ , where *I*, *A*, and *n* are the integrated emission intensity, absorbance at excitation wavelength, and refractive index of the solvent, respectively. Optical densities of the NC dispersion and DCM solution were adjusted below 0.1 at the excitation wavelength of 450 nm. DCM was dissolved in methanol, and its QY is reported to be 43%.

**Conflict of Interest:** The authors declare no competing financial interest.

**Acknowledgment.** The authors thank FSU, the National Science Foundation (NSF-CHE, Grant No. 1058957), and Pfizer for financial support. We also thank Xin Ji, Naiqian Zhan, and Dr. Lei Bruschweiler for the helpful discussions and assistance with the gel experiments.

**Supporting Information Available:** Additional experimental details on the cluster growth using lipoic acid, a MALDI-MS spectrum, UV–vis Abs and/or fluorescence emission from dispersions following exposure to UV and white light, progression of the Abs and emission spectra during size focusing experiments, quantum yield values, and colloidal stability tests. This material is available free of charge *via* the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## REFERENCES AND NOTES

- Zheng, J.; Nicovich, P. R.; Dickson, R. M. Highly Fluorescent Noble-Metal Quantum Dots. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 409–431.
- Jin, R. C. Quantum Sized, Thiolate-Protected Gold Nanoclusters. *Nanoscale* **2010**, *2*, 343–362.
- Lin, C. A. J.; Lee, C. H.; Hsieh, J. T.; Wang, H. H.; Li, J. K.; Shen, J. L.; Chan, W. H.; Yeh, H. I.; Chang, W. H. Synthesis of Fluorescent Metallic Nanoclusters toward Biomedical Application: Recent Progress and Present Challenges. *J. Med. Biol. Eng.* **2009**, *29*, 276–283.
- Xu, H.; Suslick, K. S. Water-Soluble Fluorescent Silver Nanoclusters. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 1078–1082.
- Diez, I.; Ras, R. H. A. Fluorescent Silver Nanoclusters. *Nanoscale* **2011**, *3*, 1963–1970.
- Richards, C. I.; Choi, S.; Hsiang, J. C.; Antoku, Y.; Vosch, T.; Bongiorno, A.; Tzeng, Y. L.; Dickson, R. M. Oligonucleotide-Stabilized Ag Nanocluster Fluorophores. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5038–5039.
- Ramakrishna, G.; Varnavski, O.; Kim, J.; Lee, D.; Goodson, T. Quantum-Sized Gold Clusters as Efficient Two-Photon Absorbers. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5032–5033.
- Patel, S. A.; Richards, C. I.; Hsiang, J. C.; Dickson, R. M. Water-Soluble Ag Nanoclusters Exhibit Strong Two-Photon-Induced Fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11602–11603.
- Vosch, T.; Antoku, Y.; Hsiang, J. C.; Richards, C. I.; Gonzalez, J. I.; Dickson, R. M. Strongly Emissive Individual DNA-Encapsulated Ag Nanoclusters as Single-Molecule Fluorophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 12616–12621.
- Gonzalez, J. I.; Vosch, T.; Dickson, R. M. Charge Injection into Discrete States of Individual Electroluminescent Au Nanoclusters. *Phys. Rev. B* **2006**, *74*, 064305.
- Lee, T. H.; Gonzalez, J. I.; Dickson, R. M. Strongly Enhanced Field-Dependent Single-Molecule Electroluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 10272–10275.
- Haynes, C. L.; McFarland, A. D.; Zhao, L. L.; Van Duyne, R. P.; Schatz, G. C.; Gunnarsson, L.; Prikulis, J.; Kasemo, B.; Kall, M. Nanoparticle Optics: The Importance of Radiative Dipole Coupling in Two-Dimensional Nanoparticle Arrays. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 7337–7342.
- Kawasaki, H.; Yoshimura, K.; Hamaguchi, K.; Arakawa, R. Trypsin-Stabilized Fluorescent Gold Nanocluster for Sensitive and Selective Hg<sup>2+</sup> Detection. *Anal. Sci.* **2011**, *27*, 591–596.
- Durgadas, C. V.; Sharma, C. P.; Sreenivasan, K. Fluorescent Gold Clusters as Nanosensors for Copper Ions in Live Cells. *Analyst* **2011**, *136*, 933–940.
- Lan, G. Y.; Huang, C. C.; Chang, H. T. Silver Nanoclusters as Fluorescent Probes for Selective and Sensitive Detection of Copper Ions. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1257–1259.
- Wang, M.; Mei, Q. S.; Zhang, K.; Zhang, Z. P. Protein-Gold Nanoclusters for Identification of Amino Acids by Metal Ions Modulated Ratiometric Fluorescence. *Analyst* **2012**, *137*, 1618–1623.
- Haruta, M. Catalysis: Gold Rush. *Nature* **2005**, *437*, 1098–1099.
- Zhu, Y.; Qian, H.; Drake, B. A.; Jin, R. Atomically Precise Au<sub>25</sub>(SR)<sub>18</sub> Nanoparticles as Catalysts for the Selective Hydrogenation of α,β-Unsaturated Ketones and Aldehydes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 1295–1298.
- Liu, Y. M.; Tsunoyama, H.; Akita, T.; Tsukuda, T. Efficient and Selective Epoxidation of Styrene with TBHP Catalyzed by Au<sub>25</sub> Clusters on Hydroxyapatite. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 550–552.

20. Leelavathi, A.; Rao, T. U. B.; Pradeep, T. Supported Quantum Clusters of Silver as Enhanced Catalysts for Reduction. *Nanoscale Res. Lett.* **2011**, *6*, 1–9.
21. Lin, C. A.; Yang, T. Y.; Lee, C. H.; Huang, S. H.; Sperling, R. A.; Zanella, M.; Li, J. K.; Shen, J. L.; Wang, H. H.; Yeh, H. C.; *et al.* Synthesis, Characterization, and Bioconjugation of Fluorescent Gold Nanoclusters toward Biological Labeling Applications. *ACS Nano* **2009**, *3*, 395–401.
22. Muhammed, M. A. H.; Verma, P. K.; Pal, S. K.; Kumar, R. C. A.; Paul, S.; Omkumar, R. V.; Pradeep, T. Bright, NIR-Emitting Au<sub>23</sub> from Au<sub>25</sub>: Characterization and Applications Including Biolabeling. *Chem.—Eur. J.* **2009**, *15*, 10110–10120.
23. Muhammed, M. A. H.; Verma, P. K.; Pal, S. K.; Retnakumari, A.; Koyakutty, M.; Nair, S.; Pradeep, T. Luminescent Quantum Clusters of Gold in Bulk by Albumin-Induced Core Etching of Nanoparticles: Metal Ion Sensing, Metal-Enhanced Luminescence, and Biolabeling. *Chem.—Eur. J.* **2010**, *16*, 10103–10112.
24. Retnakumari, A.; Setua, S.; Menon, D.; Ravindran, P.; Muhammed, H.; Pradeep, T.; Nair, S.; Koyakutty, M. Molecular-Receptor-Specific, Non-toxic, Near-Infrared-Emitting Au Cluster-Protein Nanoconjugates for Targeted Cancer Imaging. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 055103.
25. Retnakumari, A.; Jayasimhan, J.; Chandran, P.; Menon, D.; Nair, S.; Mony, U.; Koyakutty, M. CD33 Monoclonal Antibody Conjugated Au Cluster Nano-Bioprobes for Targeted Flow-Cytometric Detection of Acute Myeloid Leukaemia. *Nanotechnology* **2011**, *22*, 285102(1–11).
26. Yu, J. H.; Choi, S.; Dickson, R. M. Shuttle-Based Fluorogenic Silver-Cluster Biolabels. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 318–320.
27. Wu, X.; He, X. X.; Wang, K. M.; Xie, C.; Zhou, B.; Qing, Z. H. Ultrasmall Near-Infrared Gold Nanoclusters for Tumor Fluorescence Imaging *In Vivo*. *Nanoscale* **2010**, *2*, 2244–2249.
28. Wang, Y. L.; Chen, J. J.; Irudayaraj, J. Nuclear Targeting Dynamics of Gold Nanoclusters for Enhanced Therapy of HER2<sup>+</sup> Breast Cancer. *ACS Nano* **2011**, *5*, 9718–9725.
29. Wang, C. S.; Li, J. Y.; Amatore, C.; Chen, Y.; Jiang, H.; Wang, X. M. Gold Nanoclusters and Graphene Nanocomposites for Drug Delivery and Imaging of Cancer Cells. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 11644–11648.
30. Wang, Y.; Zhang, J.; Huang, L.; He, D.; Ma, L.; Ouyang, J.; Jiang, F. Novel Application of Ag Nanoclusters in Fluorescent Imaging of Human Serum Proteins after Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE). *Chemistry* **2012**, *18*, 1432–1437.
31. Ai, J.; Guo, W.; Li, B.; Li, T.; Li, D.; Wang, E. DNA G-Quadruplex-Templated Formation of the Fluorescent Silver Nanocluster and Its Application to Bioimaging. *Talanta* **2012**, *88*, 450–455.
32. Pelley, J. L.; Daar, A. S.; Saner, M. A. State of Academic Knowledge on Toxicity and Biological Fate of Quantum Dots. *Toxicol. Sci.* **2009**, *112*, 276–296.
33. Mattoussi, H.; Palui, G.; Na, H. B. Luminescent Quantum Dots as Platforms for Probing *In Vitro* and *In Vivo* Biological Processes. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 138–166.
34. Ye, L.; Yong, K.-T.; Liu, L.; Roy, I.; Hu, R.; Zhu, J.; Cai, H.; Law, W.-C.; Liu, J.; Wang, K.; *et al.* A Pilot Study in Non-Human Primates Shows No Adverse Response to Intravenous Injection of Quantum Dots. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 453–458.
35. Linnert, T.; Mulvaney, P.; Henglein, A.; Weller, H. Long-Lived Nonmetallic Silver Clusters in Aqueous-Solution—Preparation and Photolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4657–4664.
36. Peyser, L. A.; Vinson, A. E.; Bartko, A. P.; Dickson, R. M. Photoactivated Fluorescence from Individual Silver Nanoclusters. *Science* **2001**, *291*, 103–106.
37. Zheng, J.; Dickson, R. M. Individual Water-Soluble Dendrimer-Encapsulated Silver Nanodot Fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13982–13983.
38. Zhang, J. G.; Xu, S. Q.; Kumacheva, E. Photogeneration of Fluorescent Silver Nanoclusters in Polymer Microgels. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2336–2340.
39. Shang, L.; Dong, S. J. Facile Preparation of Water-Soluble Fluorescent Silver Nanoclusters Using a Polyelectrolyte Template. *Chem. Commun.* **2008**, 1088–1090.
40. Xu, H. X.; Suslick, K. S. Sonochemical Synthesis of Highly Fluorescent Ag Nanoclusters. *ACS Nano* **2010**, *4*, 3209–3214.
41. Petty, J. T.; Zheng, J.; Hud, N. V.; Dickson, R. M. DNA-Templated Ag Nanocluster Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5207–5212.
42. Wu, Z.; Lanni, E.; Chen, W.; Bier, M. E.; Ly, D.; Jin, R. High Yield, Large Scale Synthesis of Thiolate-Protected Ag<sub>7</sub> Clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16672–16674.
43. Adhikari, B.; Banerjee, A. Facile Synthesis of Water-Soluble Fluorescent Silver Nanoclusters and Hg(II) Sensing. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 4364–4371.
44. Rao, T. U. B.; Nataraju, B.; Pradeep, T. Ag<sub>9</sub> Quantum Cluster through a Solid-State Route. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16304–16307.
45. Guo, W. W.; Yuan, J. P.; Dong, Q. Z.; Wang, E. K. Highly Sequence-Dependent Formation of Fluorescent Silver Nanoclusters in Hybridized DNA Duplexes for Single Nucleotide Mutation Identification. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 932–934.
46. Guo, C. L.; Irudayaraj, J. Fluorescent Ag Clusters via a Protein-Directed Approach as a Hg(II) Ion Sensor. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 2883–2889.
47. Gwinn, E. G.; O'Neill, P.; Guerrero, A. J.; Bouwmeester, D.; Fyngenson, D. K. Sequence-Dependent Fluorescence of DNA-Hosted Silver Nanoclusters. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 279–283.
48. Sengupta, B.; Ritchie, C. M.; Buckman, J. G.; Johnsen, K. R.; Goodwin, P. M.; Petty, J. T. Base-Directed Formation of Fluorescent Silver Clusters. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 18776–18782.
49. Yeh, H. C.; Sharma, J.; Han, J. J.; Martinez, J. S.; Werner, J. H. A DNA-Silver Nanocluster Probe That Fluoresces upon Hybridization. *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3106–3110.
50. Yu, J.; Patel, S. A.; Dickson, R. M. *In Vitro* and Intracellular Production of Peptide-Encapsulated Fluorescent Silver Nanoclusters. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 2028–2030.
51. Cui, Y. Y.; Wang, Y. L.; Liu, R.; Sun, Z. P.; Wei, Y. T.; Zhao, Y. L.; Gao, X. Y. Serial Silver Clusters Biomineralized by One Peptide. *ACS Nano* **2011**, *5*, 8684–8689.
52. Mathew, A.; Sajanlal, P. R.; Pradeep, T. A Fifteen Atom Silver Cluster Confined in Bovine Serum Albumin. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 11205–11212.
53. Mrudula, K. V.; Rao, T. U. B.; Pradeep, T. Interfacial Synthesis of Luminescent 7 kDa Silver Clusters. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 4335–4342.
54. Udaya Bhaskara Rao, T.; Pradeep, T. Luminescent Ag<sub>7</sub> and Ag<sub>8</sub> Clusters by Interfacial Synthesis. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 3925–3929.
55. Cathcart, N.; Mistry, P.; Makra, C.; Pietrobon, B.; Coombs, N.; Jelokhani-Niaraki, M.; Kitaev, V. Chiral Thiol-Stabilized Silver Nanoclusters with Well-Resolved Optical Transitions Synthesized by a Facile Etching Procedure in Aqueous Solutions. *Langmuir* **2009**, *25*, 5840–5846.
56. Nishida, N.; Yao, H.; Ueda, T.; Sasaki, A.; Kimura, K. Synthesis and Chiroptical Study of *D,L*-Penicillamine-Capped Silver Nanoclusters. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 2831–2841.
57. Dhanalakshmi, L.; Udayabhaskararao, T.; Pradeep, T. Conversion of Double Layer Charge-Stabilized Ag@Citrate Colloids to Thiol Passivated Luminescent Quantum Clusters. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 859–861.
58. Yuan, X.; Luo, Z. T.; Zhang, Q. B.; Zhang, X. H.; Zheng, Y. G.; Lee, J. Y.; Xie, J. P. Synthesis of Highly Fluorescent Metal (Ag, Au, Pt, and Cu) Nanoclusters by Electrostatically Induced Reversible Phase Transfer. *ACS Nano* **2011**, *5*, 8800–8808.
59. Huang, Z.; Pu, F.; Lin, Y.; Ren, J.; Qu, X. Modulating DNA-Templated Silver Nanoclusters for Fluorescence Turn-On Detection of Thiol Compounds. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3487–3489.
60. Liu, S.; Lu, F.; Zhu, J. J. Highly Fluorescent Ag Nanoclusters: Microwave-Assisted Green Synthesis And Cr<sup>3+</sup> Sensing. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2661–2663.

61. Su, Y. T.; Lan, G. Y.; Chen, W. Y.; Chang, H. T. Detection of Copper Ions through Recovery of the Fluorescence of DNA-Templated Copper/Silver Nanoclusters in the Presence of Mercaptopropionic Acid. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8566–8572.
62. Sharma, J.; Yeh, H. C.; Yoo, H.; Werner, J. H.; Martinez, J. S. Silver Nanocluster Aptamers: *In Situ* Generation of Intrinsically Fluorescent Recognition Ligands for Protein Detection. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2294–2296.
63. Negishi, Y.; Nobusada, K.; Tsukuda, T. Glutathione-Protected Gold Clusters Revisited: Bridging the Gap between Gold(I)–Thiolate Complexes and Thiolate-Protected Gold Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5261–5270.
64. Xie, J. P.; Zheng, Y. G.; Ying, J. Y. Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 888–889.
65. Uyeda, H. T.; Medintz, I. L.; Jaiswal, J. K.; Simon, S. M.; Mattoussi, H. Synthesis of Compact Multidentate Ligands To Prepare Stable Hydrophilic Quantum Dot Fluorophores. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3870–3878.
66. Susumu, K.; Uyeda, H. T.; Medintz, I. L.; Pons, T.; Delehanty, J. B.; Mattoussi, H. Enhancing the Stability and Biological Functionalities of Quantum Dots via Compact Multifunctional Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13987–13996.
67. Oh, E.; Susumu, K.; Goswami, R.; Mattoussi, H. One-Phase Synthesis of Water-Soluble Gold Nanoparticles with Control over Size and Surface Functionalities. *Langmuir* **2010**, *26*, 7604–7613.
68. Stewart, M. H.; Susumu, K.; Mei, B. C.; Medintz, I. L.; Delehanty, J. B.; Blanco-Canosa, J. B.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. Multidentate Poly(ethylene glycol) Ligands Provide Colloidal Stability to Semiconductor and Metallic Nanocrystals in Extreme Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9804–9813.
69. Susumu, K.; Mei, B. C.; Mattoussi, H. Multifunctional Ligands Based on Dihydrolipoic Acid and Polyethylene Glycol To Promote Biocompatibility of Quantum Dots. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 424–436.
70. Dougherty, R. C. Temperature and Pressure Dependence of Hydrogen Bond Strength: A Perturbation Molecular Orbital Approach. *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 7372–7378.
71. Peng, S.; McMahon, J. M.; Schatz, G. C.; Gray, S. K.; Sun, Y. G. Reversing the Size-Dependence of Surface Plasmon Resonances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 14530–14534.
72. Zhu, M.; Aikens, C. M.; Hollander, F. J.; Schatz, G. C.; Jin, R. Correlating the Crystal Structure of a Thiol-Protected Au<sub>25</sub> Cluster and Optical Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5883–5885.
73. Bakr, O. M.; Amendola, V.; Aikens, C. M.; Wenseleers, W.; Li, R.; Dal Negro, L.; Schatz, G. C.; Stellacci, F. Silver Nanoparticles with Broad Multiband Linear Optical Absorption. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 5921–5926.
74. Bae, G. T.; Aikens, C. M. Time-Dependent Density Functional Theory Studies of Optical Properties of Ag Nanoparticles: Octahedra, Truncated Octahedra, and Icosahedra. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 10356–10367.
75. Aikens, C. M. Origin of Discrete Optical Absorption Spectra of M<sub>25</sub>(SH)<sub>18</sub><sup>−</sup> Nanoparticles (M = Au, Ag). *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 19797–19800.
76. Chestnoy, N.; Harris, T. D.; Hull, R.; Brus, L. E. Luminescence and Photophysics of Cadmium Sulfide Semiconductor Clusters: The Nature of the Emitting Electronic State. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 3393–3399.
77. (a) Bucher, G.; Lu, C. Y.; Sander, W. The Photochemistry of Lipoic Acid: Photoionization and Observation of a Triplet Excited State of a Disulfide. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 2607–2618. (b) Palui, G.; Avellini, T.; Zhan, N.; Feng, P.; Gray, D. L.; Alabugin, I.; Mattoussi, H. Photo-induced Ligand Exchange and Phase Transfer of Luminescent Quantum Dots to Aqueous Media. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, DOI: 10.1021/ja306621n.
78. Shichibu, Y.; Negishi, Y.; Tsunoyama, H.; Kanehara, M.; Teranishi, T.; Tsukuda, T. Extremely High Stability of Glutathione-Protected Au<sub>25</sub> Clusters Against Core Etching. *Small* **2007**, *3*, 835–839.
79. Wu, Z.; MacDonald, M. A.; Chen, J.; Zhang, P.; Jin, R. Kinetic Control and Thermodynamic Selection in the Synthesis of Atomically Precise Gold Nanoclusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9670–9673.
80. Jin, R. C.; Qian, H. F.; Wu, Z. K.; Zhu, Y.; Zhu, M. Z.; Mohanty, A.; Garg, N. Size Focusing: A Methodology for Synthesizing Atomically Precise Gold Nanoclusters. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2903–2910.
81. Aslan, K.; Wu, M.; Lakowicz, J. R.; Geddes, C. D. Fluorescent Core–Shell Ag@SiO<sub>2</sub> Nanocomposites for Metal-Enhanced Fluorescence and Single Nanoparticle Sensing Platforms. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1524–1525.
82. Qian, H. F.; Zhu, M. Z.; Lanni, E.; Zhu, Y.; Bier, M. E.; Jin, R. C. Conversion of Polydisperse Au Nanoparticles into Monodisperse Au<sub>25</sub> Nanorods and Nanospheres. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 17599–17603.
83. Mei, B. C.; Susumu, K.; Medintz, I. L.; Delehanty, J. B.; Mountziaris, T. J.; Mattoussi, H. Modular Poly(ethylene glycol) Ligands for Biocompatible Semiconductor and Gold Nanocrystals with Extended pH and Ionic Stability. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 4949–4958.
84. Qian, H.; Zhu, Y.; Jin, R. Size-Focusing Synthesis, Optical and Electrochemical Properties of Monodisperse Au<sub>38</sub><sup>−</sup>(SC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Ph)<sub>24</sub> Nanoclusters. *ACS Nano* **2009**, *3*, 3795–3803.



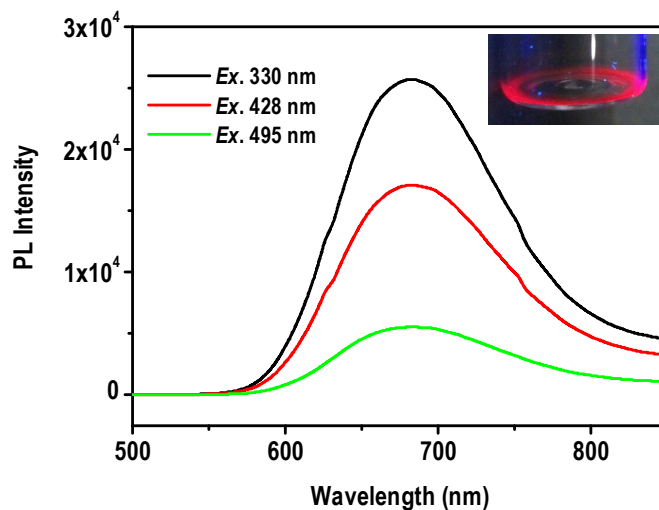
**Supporting Information****Growth of *In-situ* Functionalized Luminescent Silver Nanoclusters by Direct Reduction and Size Focusing**

Madathumpady Abubaker Habeeb Muhammed, Fadi Aldeek, Goutam Palui, Laura Trapiella-Alfonso and Hedi Mattoussi

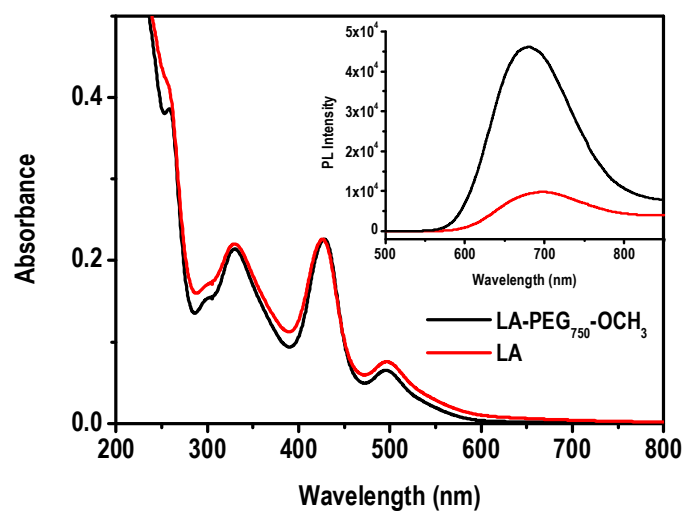
Department of Chemistry and Biochemistry, Florida State University, 95 Chieftan Way, Tallahassee, Florida 32306, USA

<sup>†</sup>*Present address:* Department für Physik und CeNS; Ludwig-Maximilians-Universität München, Amalienstr. 54; D-80799 München, Germany

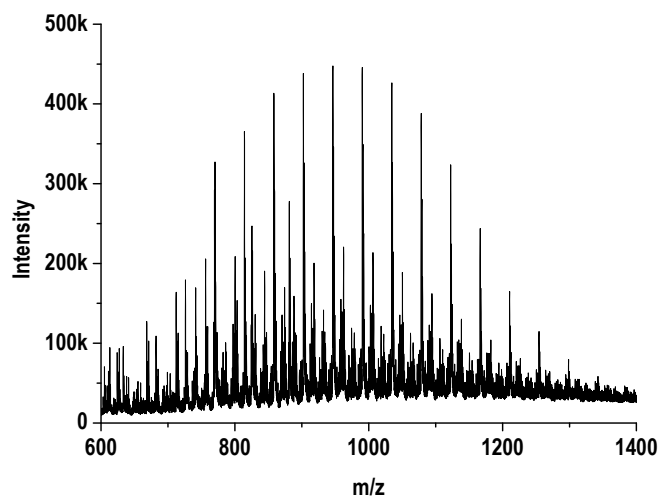
<sup>#</sup>*Present address:* Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julian Claveria, 8, 33006 Oviedo, Spain



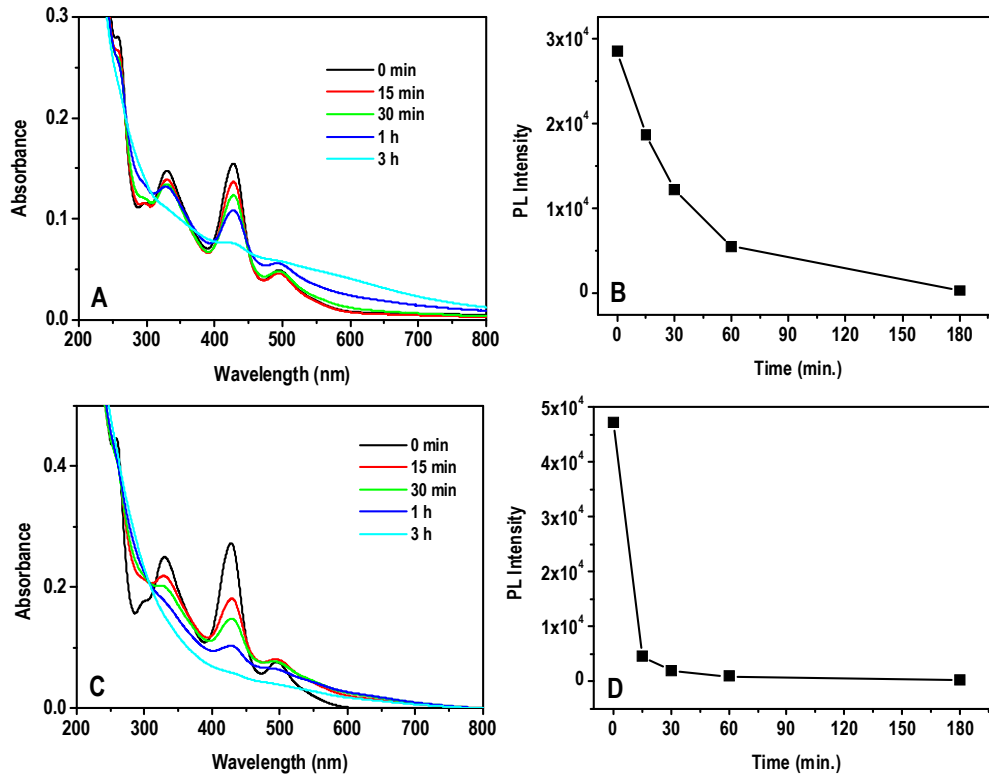
**Figure S1:** Emission spectra of AgNCs at different excitation wavelengths. The inset shows a photograph of dry NCs (after solvent evaporation) under UV light irradiation. The clusters show sustained luminescence in the solid state.



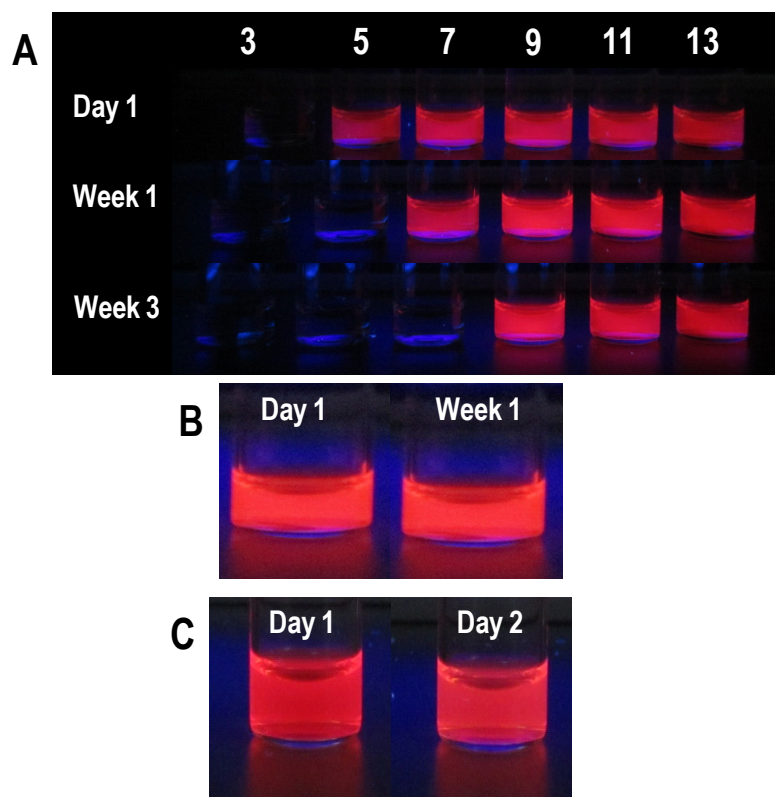
**Figure S2:** Comparison of the absorption and emission (inset) features of AgNCs synthesized using LA-PEG<sub>750</sub>-OCH<sub>3</sub> and LA ligands.



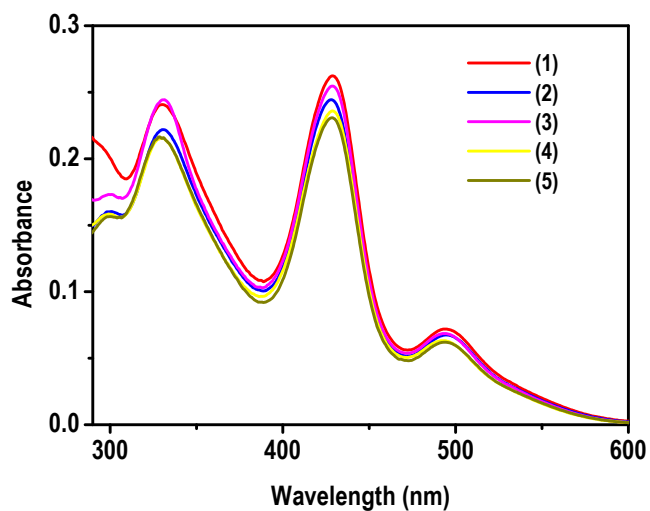
**Figure S3:** MALDI-MS of AgNC using DCTB matrix. Only features from the ligands are observed. No peaks were observed at high  $m/z$  values.



**Figure S4:** Progression of the absorption spectra (A) and PL intensity (B) of AgNC aqueous dispersions when exposed to white light. Time progression of the absorption spectra (C) and PL intensity (D) of AgNCs dispersed in water when exposed to UV light.



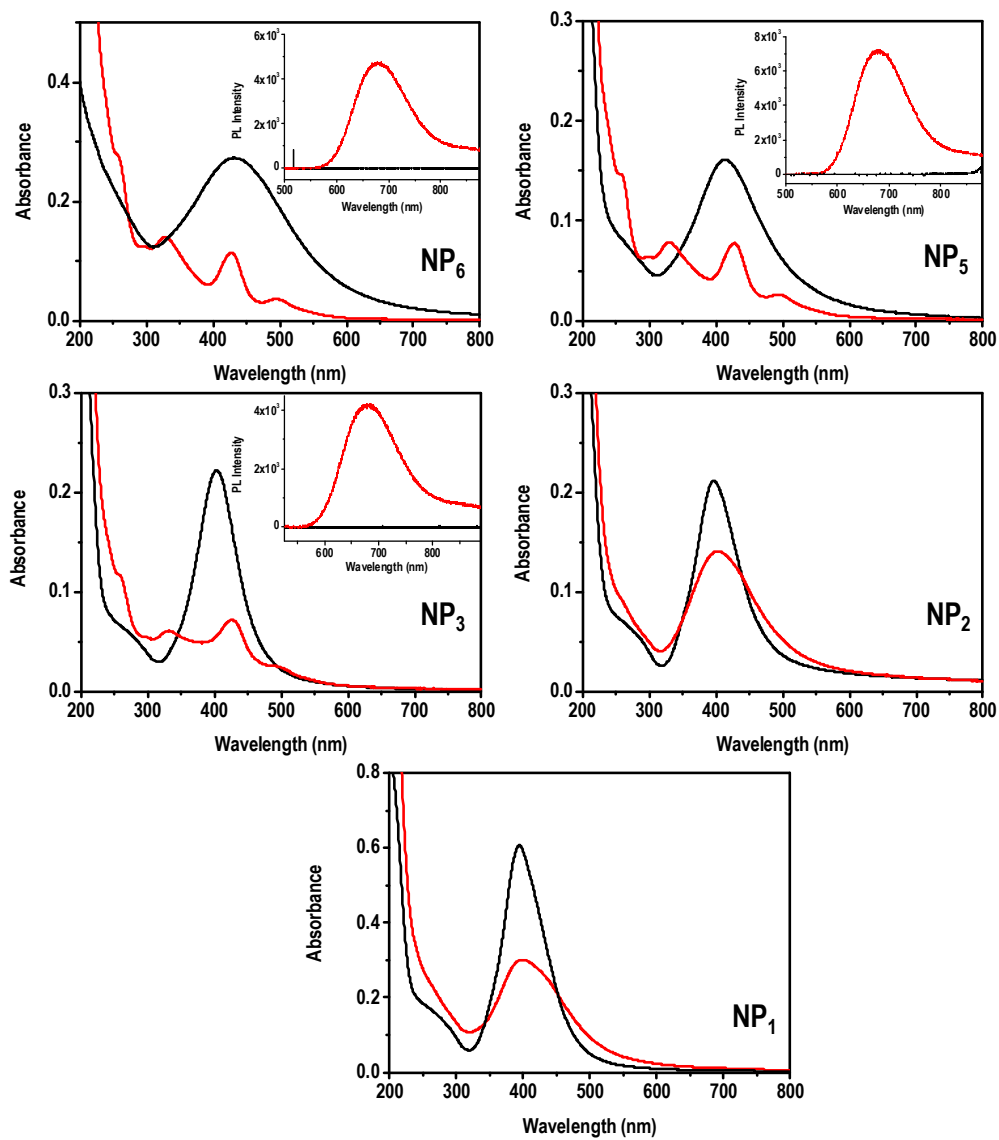
**Figure S5:** Stability tests of the AgNCs: in phosphate buffers at different pH (A), in the presence of 1M NaCl (B) and in the presence of DMEM growth media (C). In growth media, the NCs lose most of their emission after 1 day of storage. For the pH stability test, several batches of NCs were prepared by dissolving aliquotes of the NCs in phosphate buffers of varying pH from 3-13 and photographs were taken at different time intervals (up to three weeks). For the stability test in the presence of added NaCl, an aliquot of the as prepared NCs was dispersed in an aqueous solution containing 1M NaCl, stored in dark, then routinely checked; the dispersion was found to be stable for at least one week.



**Figure S6:** Absorption spectra (selected traces) of AgNCs redispersed in different solvents: (1) chloroform, (2) acetonitrile, (3) DMF, (4) ethyl acetate and (5) methanol.

Solvent	QY (%)
Chloroform	10.7
Acetone	4.8
Acetonitrile	4.5
THF	5.9
DMF	4.6
Ethyl acetate	5.3
Methanol	6.2
2-Propanol	8.2

**Table S1:** Quantum yield measured for the AgNCs in different solvents.

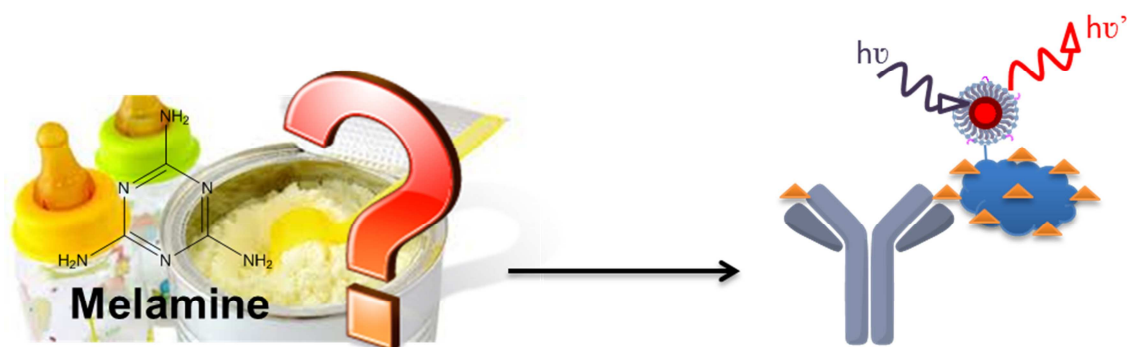


**Figure S7:** Optical absorption spectra of NPs synthesized at various Ag-to-L ratios before (black trace) and after (red trace) "size focusing." Inset shows the corresponding photoluminescence spectra.



**VII.4. Synthesis and characterization of hapten-quantum dots bioconjugates: application to development of a Melamine fluorescent immunoassay (*Talanta*, 2013, 106, 243-248)**

*Laura Trapiella-Alfonso, José M. Costa-Fernández, Rosario Pereiro, Alfredo Sanz-Medel*







Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Talanta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/talanta](http://www.elsevier.com/locate/talanta)

## Synthesis and characterization of hapten–quantum dots bioconjugates: Application to development of a melamine fluorescent immunoassay

Laura Trapiella-Alfonso, José M. Costa-Fernandez, Rosario Pereiro, Alfredo Sanz-Medel\*

Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julian Clavería, 8, 33006 Oviedo, Spain

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 19 November 2012  
Received in revised form  
9 January 2013  
Accepted 12 January 2013  
Available online 21 January 2013

**Keywords:**  
Melamine  
Hapten–BSA conjugates  
Quantum dots conjugates  
MALDI  
Fluorescent immunoassay

### ABSTRACT

A general and universal analytical strategy for characterization of hapten–BSA conjugates based on complementary optical spectroscopy and molecular mass spectrometry techniques is here described. The proposed procedure provides highly-valuable information about the molecular weight of the conjugate, its stoichiometry and the concentration of the precursors (hapten and BSA) in the conjugate; such information is of great analytical interest for further development of novel quantitative immunoassays.

Further, due to great demand of new, simple and robust methodologies for the melamine analysis in milk infant formula, a new immunoprobe melamine-bovine serum albumin-quantum dot was synthesized, characterized and successfully applied in a competitive fluorescent quantum dot-based immunoassay. It should be highlighted that the limit of detection achieved without any sample pretreatment,  $0.15 \text{ mg kg}^{-1}$  for melamine in milk infant formula, is one order of magnitude lower than the maximum concentration level allowed by international legislation in such type of samples. Finally, this simple approach was validated by the use of an alternative technique (HPLC–UV) for the analysis of melamine in contaminated milk infant formula, showing a good agreement between the results obtained by using both analytical methodologies.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In 2008 dramatic events that occurred in China, related to the contamination of infant formula milk with melamine, along with the knowledge of other episodes of these adulterations in some other countries have given rise to a clear food-safety alarm activation. As a result, a strong demand on research and development of new methodologies for the detection, screening and determination of melamine at trace levels in food and particularly in infant formula milks [1–3] has arisen nowadays. Melamine structure (MEL, IUPAC name: 1,3,5-triazine–2,4,6-triamine) has a high nitrogen content (around 66%), favouring its fraudulent use as food adulterant to increase the apparent protein content [1]. Furthermore, toxicological studies show that ingestion of melamine in large quantities may lead to reproductive damage or even bladder cancer, due to the formation of bladder/kidney stones [4]. Such evidences explain that maximum levels of melamine in dairy products are regulated by many International Agencies ( $2.5 \text{ mg mL}^{-1}$  for food and feed in general and  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  in infant formula milk) [5,6].

Current analytical methods for melamine detection in different matrixes (milk, infant formula, eggs, fish, urine, serum, kidney

tissue, muscle, soil, etc.) involve typically the use of separation techniques, including capillary electrophoresis [7], high-performance liquid chromatography (HPLC) with spectrophotometric detectors [3,8], and liquid or gas chromatography–mass spectrometry [9,10]. Most of such already described methods offer low detection limits in the order of  $\mu\text{g kg}^{-1}$  but often present some important disadvantages, including complex and time-consuming sample pretreatment, expensive instrumentation, long analysis times, etc. Thus, research aimed to develop simpler, faster and lower cost analysis methods suitable for daily routine screening of melamine in food is required.

Up to now, some commercial ELISA test kits for melamine routine control in food samples [3,11,12] are already available. A sensitive fluorescence polarization immunoassay for the analysis of melamine in milk and milk powder samples was recently developed by Wang et al. [13] with a promising detection limit around  $9 \text{ ng mL}^{-1}$ . Additionally, quite recently, different analytical methods for melamine control have been proposed based on direct measurement of chemiluminescence [14,15], on changes on the VIS–UV spectra employing gold and silver nanoparticles as probes [16–18], or on the quenching of photoluminescent from water-soluble quantum dots (QDs) [19,20].

In this context, QDs-based methodologies developed up to date for melamine detection consist on the direct interaction of the analyte with the QD surface producing a quenching or

\* Corresponding author. Fax: +34 985103474.  
E-mail address: [asm@uniovi.es](mailto:asm@uniovi.es) (A. Sanz-Medel).

enhancement of the QD signal. This strategy is rather unspecific because many other molecules or ions present in the sample can interact with the QDs in the same way. Thus, a previous rigorous step for analyte isolation is mandatory. In the present work, we get around this problem by combining the specific capability of an appropriate antibody (Ab) as selective recognition element and the QDs only as the sensitive fluorescent label of the sensor system, due to QDs exhibit interesting properties as lumino-phores, such as high quantum yields, narrow emission spectra with a great separation from the excitation one, and high resistance to photo degradation processes.

Thus, the synthesis, characterization and application of melamine-BSA-QDs conjugates to the determination of melamine in infant formula milk are here described. A special effort has been done first in proposing a rather simple, universal and comprehensive methodology to characterize in depth both conjugates, the melamine-BSA and the fluorescent immunoprobe melamine-BSA-QD as well as the luminescent immunoassay. The advantages of an ELISA immunoassay (simple sample preparation and high throughput) are combined in this way with the unique properties of fluorescent QDs to develop a convenient quantitative analysis of melamine in infant formula milk.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents, materials and instrumentation

All reagents were of analytical grade and used as received without further purification. Deionised ultrapure water (resistivity  $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) was used throughout the work. A description of the reagents used, as well as the different instruments employed, can be found in the Supplementary information.

## 3. Protocols

### 3.1. Preparation of melamine-BSA conjugates

A commercial kit was used for conjugation of melamine to BSA based on a covalent amide binding between the amino groups from melamine and the carboxylic groups from BSA, following the carbodiimide chemistry [21]. The ratio of the precursors Mel:BSA:EDC used was 525:1:1700. A great excess of hapten is used to ensure that all binding sites from BSA are covered and to be sure that the melamine only uses one of its  $\text{NH}_2$  terminal groups in the conjugation, leaving free the other two  $\text{NH}_2$  terminal groups that conform the epitope (i.e., that part of an antigen that is recognized by the immune system, typically the antibody). Briefly, the protocol for the conjugation kit is as follows: 2 mg of hapten (melamine) were dissolved in 450  $\mu\text{L}$  of Imject<sup>®</sup> EDC conjugation buffer. This solution is added to 200  $\mu\text{L}$  of 10  $\text{mg mL}^{-1}$  carrier protein (BSA) solution and, after well mixing, this carrier-hapten mixture was poured into a vial that contents 10 mg of EDC and dissolve by gentle mixing. The reaction is incubated for 2 h at room temperature with stirring. The conjugate is purified by desalting. The columns were first conditioned with 1 mL of purification buffer and centrifuged at 1000g for 2 min three times. Then, the sample is slowly applied to the center of the compact resin bed and again is centrifuged at same conditions. The liquid collected corresponds to the Mel-BSA conjugate, being retained in the column the excess of hapten and other by-products of the reaction. The purified conjugate is split in aliquots and stored in the freezer at  $-18^\circ\text{C}$ .

### 3.2. Synthesis and solubilization of CdSe/ZnS quantum dots

The CdSe/ZnS QDs used as fluorescent labels in the immunoassay were synthesized in our laboratory via organometallic route and water-solubilized by coating them with an amphiphilic polymer as previously described [22]. The stock solution of water-solubilized QDs in 50 mM SBB pH 12 solution buffer was stored at room temperature (in darkness).

### 3.3. Synthesis and characterization of the immunoprobe: Mel-BSA-QDs

The carbodiimide chemistry was used to synthesize the immunoprobe Mel-BSA-QD forming a chemical bond between the carboxylic groups from the polymeric coating of the QDs and the amino groups from the BSA. The optimized molar ratios used for the bioconjugation reaction were 2:1:1500 (QDs:Mel-BSA:EDC). The reaction was performed at room temperature for 2 h with constant stirring. A purification step is required in order to isolate the immunoprobe from the excess of reagents and the by-products. For such purpose and considering the differences in the molecular weights of the compounds to separate (Mel-BSA 71 kDa, Mel-BSA-QD  $> 150$  kDa), ultrafiltration (UHF) was the technique selected. Experimental conditions used for UHF were 5000 rpm, 5 min  $\times$  6 cycles (three washes) and  $4^\circ\text{C}$  using a 100 kDa membrane filter. The concentration of the melamine in the immunoprobe was estimated following the previously reported methodology of Trapiella-Alfonso et al. [22].

### 3.4. Matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry

To characterize the synthesized Mel-BSA conjugate, MALDI-MS was selected to obtain molecular weight and stoichiometry information, using sinapinic acid as the matrix. A solution of 5  $\text{mg mL}^{-1}$  of the matrix in 30% of acetonitrile and containing 0.1% of TFA was prepared. An amount of 1–10 pmol of protein in the sample was needed (in our experiments we have ensured a concentration of protein of 15  $\text{nmol mL}^{-1}$ ). As the sample has to be ideally clean of salts and the Mel-BSA conjugate was stored in a 28 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl and 33 mM sorbitol buffer, a previous clean-up step was carried out (sample desalting by an Amicon membrane filter of 10 kDa, where the sample was washed with Milli-Q water three times and centrifuged at 14,000g during 3 min each time). A solution of 1  $\text{mg mL}^{-1}$  of BSA standard in water was used as reference. The MALDI plate was loaded with standards, matrix and/or samples, and when the spots are dried (at least after 30 min) the MALDI-MS analysis was performed.

### 3.5. Fluorescent competitive immunoassay format

Most of the immunoassays developed using nanoparticles as tags make use of nanoparticle-labelled antibodies. However, during the process of labelling, recognition capabilities of the antibody are many often altered. Alternatively, in this paper QDs were conjugated to the antigen and a competitive immunoassay format was selected for determination of melamine, where the hapten and the immunoprobe (Mel-BSA-QD) compete for the limited binding sites of the immobilized antibody. An immunoassay scheme rather similar to that described in a previous paper from our research group for progesterone sensing [22] is here proposed, after concentrations and ratios of the reagents were optimized trying to obtain the maximum sensitivity on the detection into the concentration range required for the particular analysis of melamine.

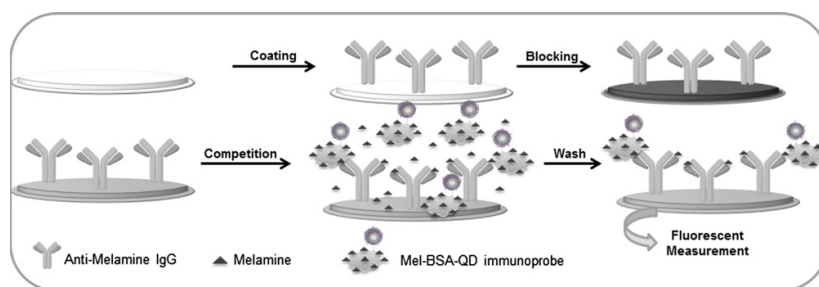


Fig. 1. Schematic representation of the QD-based fluorescent competitive immunoassay.

The procedure for the immunoassay is schematically represented in Fig. 1. First, the microtiter plate is coated with the solution of the antibody and is incubated for 2 h at 37 °C. After that, the solution of antibody is removed and the blocking step is done by adding the 3% casein solution in water in order to avoid further unspecific binding. The plate is incubated overnight at 4 °C. The next step consists on washing the plate three times with the washing solution (10 mM PBS pH 7.4+0.05% Tween 20) to remove the excess of reagents. Then, the competition is established by the addition of a mixture of the standard (or sample) and a known amount of the immunoprobe (Mel-BSA-QD). The reaction is incubated at 37 °C for 2 h. After the necessary washing step, the fluorescence emission of the photoactivated QDs from the Mel-BSA-QD recognised by the antibody is measured as the analytical signal of this competitive immunoassay.

### 3.5.1. Milk analysis

Fresh bovine whole milk was used to carry out the optimization of the immunoassay and to perform the calibration curves. This milk was selected because is free of melamine, constituting a perfect blank of the matrix where the analysis will be done.

Three different brands of powdered milk infant formula (named M1, M2 and M3) were selected as samples under study in order to assess the applicability of the developed immunoassay. Two of them were milk for newborns (M1 and M3) and the other one was milk for infants over 6 months (M2). It should be noted that it was not necessary to perform any sample pretreatment of the milk samples, except for a 10-fold milk dilution with Milli-Q water, prior to the melamine determination.

## 4. Results and discussion

### 4.1. Characterization of Mel-BSA conjugates

Mel-BSA conjugates, used as precursors to label further the melamine with water-soluble QDs, are not commercially available. Thus, first of all, here we had performed their synthesis, purification and characterization. The molecular weight and the stoichiometry of the synthesized conjugate were investigated by MALDI-MS analysis (see procedures in Section 2). Results from MALDI experiments (see Fig. 2) were used to calculate the molecular weight of the conjugate, being  $71.0 \pm 0.3$  kDa ( $n=8$ ). As can be seen in Fig. 2, comparing the mass spectra of the BSA standard with the Mel-BSA conjugate mass spectra, there is a mass shift that can be attributed to the incorporation of the melamine in the BSA structure. This increase in the mass ( $\Delta M$ ) can be used for the estimation of the stoichiometry of the precursors in the conjugate, taking into account that the molecular weight of the melamine is  $126.12 \text{ g mol}^{-1}$ . Thus, dividing the  $\Delta M$  observed by the molecular weight of melamine the

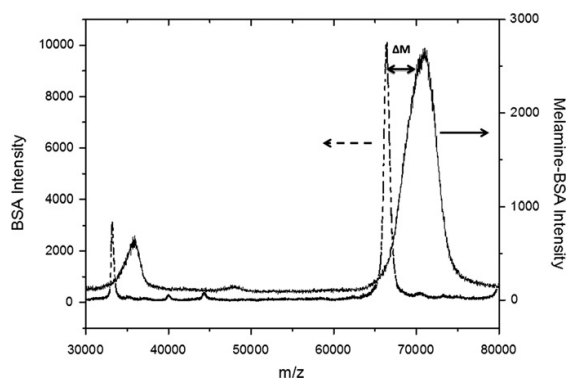


Fig. 2. MALDI-MS characterization of the synthesized Melamine-BSA conjugate. The mass spectra were obtained using sinapic acid as matrix. Mass spectra of BSA standard (dash line) and of the Mel-BSA conjugate (black line) are represented, showing clearly the mass shift between them.

number of Mel per BSA can be obtained. In our case the found value was  $37 \pm 2$  ( $n=8$ ) Mel per BSA, leading to a ratio of Mel:BSA of 37:1.

Once the melamine:BSA ratio was obtained, a Bradford test was used to estimate the BSA concentration and the concentration of such species in the final conjugate, using Eq.(1):

$$C_{\text{Mel}} = 37C_{\text{BSA}}(MW_{\text{Mel}}/MW_{\text{BSA}}) \quad (1)$$

where  $C_{\text{Mel}}$  is the concentration of melamine in the conjugate, 37 is the ratio Mel:BSA,  $C_{\text{BSA}}$  is the BSA concentration in the conjugate obtained by the Bradford test,  $MW_{\text{Mel}}$  is the molecular weight of the melamine and  $MW_{\text{BSA}}$  is the molecular weight of the BSA.

Results obtained in this way showed that the concentrations of BSA and melamine in the final conjugate were  $2.1 \pm 0.1$  and  $0.147 \pm 0.008 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $n=3$ ), respectively. Such information is of great value to further optimize the conjugation Mel-BSA to the QDs.

### 4.2. Synthesis and characterization of Mel-BSA-QD immunoprobe

The strategy selected to synthesize the proposed fluorescent immunoprobe has been described above (Section 2.2.3) and corresponds to the activation of the carboxylic groups present in the amphiphilic polymer coated QDs via the EDC chemistry and the subsequent attachment to the amino groups of the BSA from Mel-BSA conjugate.

After appropriate purification, mandatory characterization of the QD-based immunoprobe was performed. In this context, it was first investigated the possible effect of both the melamine

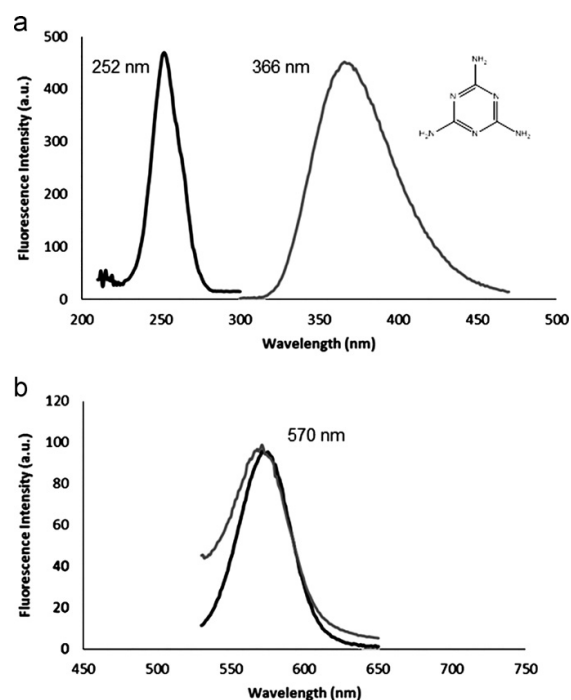


Fig. 3. (a) Excitation–Emission luminescence spectra of melamine. Inset in the graph is the chemical structure of Melamine showing its high nitrogen content. (b) Fluorescent emission spectra of QDs (Black), and the emission from the immunoprobe Mel-BSA-QDs (Grey).

itself and the bioconjugation process on the luminescent emission of the QDs labelled to the Mel-BSA. Fig. 3a shows the excitation–emission luminescent spectra of the melamine. As can be seen the luminescence emission from melamine appears in a spectral region well separated from the QDs emission. Therefore, there is not a risk of overlapping between the fluorescence emission from the immunoprobe and from free melamine that could interfere the final analyte quantification. Moreover, in Fig. 3b it was observed that the bioconjugation process does not affect the emission from the QDs used as labels and purified Mel-BSA-QD bioconjugate still emits an intense fluorescence at the same wavelength maximum characterizing free colloidal CdSe/ZnS QDs.

Next, the efficiency of the bioconjugation reaction and the concentration of melamine in the final conjugate were evaluated, following a previously described procedure [22]. Such procedure is based on a modified Bradford test that correlates absorbance measurements with the concentration of the hapten in the immunoprobe, using the following equations:

$$[BSA]_{BIOC} = [BSA]_{STANDARD} - [BSA]_{UHF} \quad (2)$$

$$[Mel]_{BIOC} = [BSA]_{BIOC} (37 M_{Mel} / M_{BSA}) \quad (3)$$

$$Yield = ((mol_{BSA^0} - mol_{BSA^{UHF}}) / mol_{BSA^0}) 100 \quad (4)$$

where  $[BSA]_{BIOC}$  is the concentration of the BSA in the purified immunoprobe,  $[BSA]_{UHF}$  is the concentration of BSA in the conjugate not labelled to QD (present in the filtered fraction),  $[Mel]_{BIOC}$  is the concentration of progesterone in the purified immunoprobe,  $M_{Mel}$  is the molecular weight of melamine and  $M_{BSA}$  is the molecular weight of BSA. Finally,  $mol_{BSA^0}$  is the BSA initial moles existing in the Mel-BSA conjugate and  $mol_{BSA^{UHF}}$  are

the BSA moles of the Mel-BSA conjugate not bioconjugated to QDs.

Using these equations the concentration of the melamine in the immunoprobe could be estimated as  $0.139 \pm 0.007 \text{ mg mL}^{-1}$ . The yield obtained for the bioconjugation reaction turned out to be  $95 \pm 3\%$ .

Finally, a spectrophotometric immunoassay with a secondary Ab tagged with horseradish peroxidase (HRP) was performed in order to evaluate the capability of the anti-melamine Ab to recognize both the antigen and the labelled antigen (immunoprobe). Thus, the same range of concentrations of the free and labelled antigen were assayed in the ELISA plate and after the two steps of immunoreaction (one with anti-melamine Ab and the other one with the secondary Ab-HRP) the plate was measured. Not significant differences in the signal were found, showing that the Ab is able to recognize the immunoprobe with almost the same sensitivity than the antigen.

#### 4.2.1. Fluorescent competitive immunoassay of melamine

The concentration of antibody used for coating and immunoprobe concentration added in the competition step were optimised for the development of the immunoassay. Best results (searching for a low detection limit) were obtained with a  $3 \mu\text{g mL}^{-1}$  of Ab solution and  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  of the immunoprobe (Mel-BSA-QDs) solution (keeping the ratio in volume 1:3 between the sample and the immunoprobe added to establish the competition).

To assess the analytical performance of the proposed fluorescent immunoassay, a series of standard solutions with different melamine concentrations were prepared in diluted fresh bovine milk and the analysis was performed under the optimized experimental conditions. The inhibition curve obtained is shown in Fig. 4. This inhibition curve was fitted using a four-parameter equation with “SOFmax Pro software” and the analytical parameters were obtained from this mathematical application. It should be noted that the points that better fit the curve are obtained from the average of three replicates, and all of them present a precision better than 5% (estimated as the RSD of the signals obtained). A linear relationship in the concentration, ranging from  $0.30$  to  $3.50 \text{ mg kg}^{-1}$  (covering the limits established by the legislation), was achieved enabling melamine trace determinations in milk. These linearity limits are defined by the inhibitory concentration (IC) values  $IC_{20}$  and  $IC_{80}$ . The sensitivity of the assay, determined by the concentration of the analyte which inhibits the measured analytical signal by a factor of 50% ( $IC_{50}$ ), was  $1.04 \text{ mg kg}^{-1}$  of melamine in milk. The detection limit (DL), calculated as  $IC_{10}$  in the inhibition curve, was  $0.15 \text{ mg kg}^{-1}$  of melamine, referred to a non-diluted whole milk matrix. It is

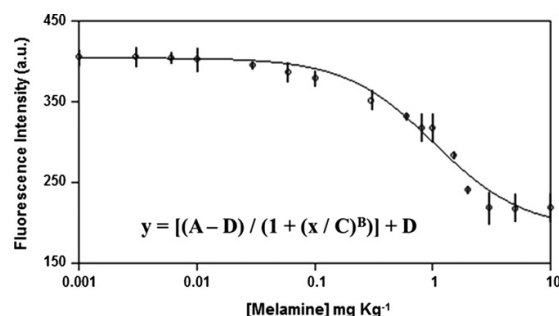


Fig. 4. Fluorescent inhibition curve obtained for the analysis of Melamine in milk infant formula using melamine labelled with QDs as tracer in the competitive immunoassay. Each point of the curve is the average of three independent measurements and the standard deviation is represented for each point being in all cases less than 5%. Inset the graph is the four-parameter equation.

**Table 1**  
Analysis of three milk infant formula brands.

Sample	Melamine in non-spiked sample (mg kg <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Internal validation <sup>a</sup>			External validation <sup>b</sup> (mg kg <sup>-1</sup> ) Melamine in non-spiked sample
		Spiked melamine (mg kg <sup>-1</sup> )	Melamine in the spiked sample (mg kg <sup>-1</sup> )	Recovery (%)	
M1	0.16 ± 0.06	0.3	0.42 ± 0.09	98 ± 9	0.14 ± 0.03
M2	0.21 ± 0.03	1	1.11 ± 0.07	97 ± 4	
M3	0.29 ± 0.04				

<sup>a</sup> Sample analysis by competitive fluorescent immunoassay.

<sup>b</sup> Sample analysis by HPLC–UV (Anal. Chim. Acta 665, 2010, 227–230).

important to highlight that this detection limit is about one order of magnitude lower than the maximum level of melamine allowed in infant formula (1 mg kg<sup>-1</sup>) by the legislation [6]. The inter-assay reproducibility of the proposed immunoassay for melamine determination in milk was evaluated and estimated as the RSD of the signals obtained for three independent immunoassays done in three different days. The inter-assay reproducibility achieved was 5 ± 2%, showing the robustness of the methodology. In addition, what is very interesting, the here proposed methodology has the benefit of avoiding any sample pretreatment except for 10-fold dilution with Milli-Q water.

#### 4.2.2. Analysis of milk infant formula samples and validation of the methodology

The applicability of the proposed competitive fluorescent immunoassay based on QDs for the determination of melamine in milk infant formula was assessed by analysing three infant formula brands.

In order to perform an internal validation of the proposed methodology one of the samples under scrutiny, M1, was further spiked with 0.3 and 1 mg kg<sup>-1</sup> of melamine standards and analysed following the optimized assay. As can be seen in Table 1, the results obtained fully agree with those achieved by direct analysis (sample without fortification) showing good recoveries (> 95%). Besides the internal validation and in order to certify that the developed fluorescent immunoassay is effective in the determination of melamine in milk infant formula, the same sample M1 was analysed by HPLC–UV following the procedure developed in a previous work by Venkatasami et al. [8]. In this case a simple sample pretreatment was done consisting of sample dissolution in 50% methanol aqueous solution by sonication and centrifugation in order to separate the extract from the residual milk. This extract was further purified by filtration through a 0.45 µm membrane filter. Finally, the filtrate was injected in the chromatographic system and its analysis was carried out. The results obtained are collected in Table 1 and again show a complete agreement with those found by the immunoassay here proposed. Once the proposed methodology was validated, two more samples, M2 and M3, were analysed obtaining in all cases melamine concentrations lower than 1 mg kg<sup>-1</sup>, which is the maximum limit allowed by the legislation.

## 5. Conclusions

A simple and general approach for complete characterization of hapten-BSA conjugates is here proposed based on the combination of optical spectroscopy and molecular mass spectrometry techniques (Bradford test+MALDI-MS). Combination of such complementary techniques offers highly valuable information in terms of molecular weights, stoichiometry of the conjugate and

concentration of the precursors in the conjugate. This is fundamental information to develop novel quantitative bioassays.

Further, synthesis and characterization of an immunoprobe (Mel-BSA-QD) was performed following a general strategy recently developed in our group [22]. The applicability of this new immunoprobe was tested by developing a competitive fluorescent QD-based immunoassay for the determination of melamine in infant formula milk. The proposed new methodology for the direct analysis of this adulterant gives rise, without any cumbersome sample pre-treatment step, to a detection limit one order lower than the limit established by the legislation. Finally, this methodology was internally (spiking the sample) and externally (using a chromatographic technique for the analysis) validated, showing in both cases a full agreement with the results obtained with the fluorescent immunoassay.

Finally, it should be stated that the carboxylic functionalization of the nanoparticles makes the process of protein labelling easy and universal. In fact, once we have proven that the system is valid for milk samples analysis, the methodology here proposed could be simply extended for further bioconjugations to different molecules of interest using QDs of different sizes (different emissions) allowing further developments of multiplexing assays.

## Acknowledgements

This work was supported by project MICINN-10-CTQ2010-16636 (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain). The authors thank Tobias Konz for his assistance in the analysis by MALDI-MS and Ana M. Coto García for fresh bovine milk sumistration. L.T.A. acknowledges the MEC for the FPU program (ref: AP2008-01504).

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.027>.

## References

- [1] F. Sun, W. Ma, L. Xu, Y. Zhu, L. Liu, C. Peng, L. Wang, H. Kuang, C. Xu, TrAC, Trends Anal. Chem. 29 (2010) 1239–1249.
- [2] R. Kraska, A. Becalski, E. Braekvelt, T. Koerner, X.L. Cao, R. Dabeka, S. Godefroy, B. Lau, J. Moisey, D.F.K. Rawn, P.M. Scott, Z. Wang, D. Forsyth, Anal. Bioanal. Chem. 402 (2012) 139–162.
- [3] P. Lutter, M.C. Savoy-Perroud, E. Campos-Gimenez, L. Meyer, T. Goldmann, M.C. Bertholet, P. Mottier, A. Desmarchelier, F. Monard, C. Perrin, F. Robert, T. Delatour, Food Control 22 (2011) 903–913.
- [4] A. Escobar, R. Faure, D. Sosa, P. Ponce, S. Vega, Rev. Salud Anim. 32 (2010) 22–31.
- [5] World Health Organization, September–October 2008 (Last visit July 2012. Accessed at: <[http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/infosan\\_](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/infosan_)> events/en/index.html).

- [6] Comisión del Codex Alimentarius, Anteproyecto de niveles máximos para la Melamina en los alimentos y piensos (N13-2009), CX/CF 10/4/5 Add.1, April 2010.
- [7] J.G. Xia, N.Y. Zhou, Y.J. Liu, B. Chen, Y.N. Wuc, S.Z. Yao, *Food Control* 21 (2010) 912–918.
- [8] G. Venkatasami, J.R. Sowa Jr., *Anal. Chim. Acta* 665 (2010) 227–230.
- [9] S.A. Tittlemier, B.P.Y. Lau, C. Menard, C. Corrigan, M. Sparling, D. Gaertner, K. Pepper, M. Feeley, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 5340–5344.
- [10] X.L. Zhu, S.H. Wang, Q. Liu, Q. Xu, S.X. Xu, H.L. Chen, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 11075–11080.
- [11] E.A.E. Garber, *J. Food Prot.* 71 (2008) 590–594.
- [12] Z.Y. Wang, X. Ma, L.Y. Zhang, W.J. Yang, L.M. Gong, P.L. He, Z. Li, *Anal. Chim. Acta* 662 (2010) 69–75.
- [13] Q. Wang, S.A. Haughey, Y.M. Sun, S.A. Eremin, Z.F. Li, H. Liu, Z.L. Xu, Y.D. Shen, H.T. Lei, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 2275–2284.
- [14] Z.M. Wang, D.H. Chen, X. Gao, Z.H. Song, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 3464–3469.
- [15] J.L. Manzoori, M. Amjadi, J. Hassanzadeh, *Microchim. Acta* 175 (2011) 47–54.
- [16] K. Ai, Y.L. Liu, L.H. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 9496–9497.
- [17] C.P. Han, H.B. Li, *Analyst* 135 (2010) 583–588.
- [18] H. Ping, M. Zhang, H. Li, S. Li, Q. Chen, C. Sun, T. Zhang, *Food Control* 23 (2012) 191–197.
- [19] G.L. Wang, H.J. Jiao, X.Y. Zhu, Y.M. Dong, Z.J. Li, *Talanta* 93 (2012) 398–403.
- [20] F. Gao, Q. Ye, P. Cui, L. Zhang, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 4550–4558.
- [21] B. Sun, W. Xie, G. Yi, D. Chen, Y. Zhou, J. Cheng, *J. Immunol. Methods* 249 (2001) 85–89.
- [22] L. Trapiella-Alfonso, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4753–4759.

**Supplementary information for:**  
**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF HAPTEN-QUANTUM DOTS**  
**BIOCONJUGATES: APPLICATION TO DEVELOPMENT OF A MELAMINE**  
**FLUORESCENT IMMUNOASSAY**

Laura Trapiella-Alfonso, José M. Costa-Fernandez, Rosario Pereiro, Alfredo Sanz-Medel\*

*Department of Physical and Analytical Chemistry. Faculty of Chemistry.*

*University of Oviedo, Julian Clavería, 8, 33006 Oviedo. SPAIN.*

**Experimental Section:**

**Chemicals, materials and instrumentation**

*Chemical and materials*

The antigen, Melamine (Mel), was obtained from Sigma Aldrich. The rabbit polyclonal anti-melamine antibody was purchased from Biorbyt (Cambridge, UK). The ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) was purchased from Fluka (Basel, Switzerland) and was stored at -18 °C in the freezer. For the QDs bioconjugation a solution 0.01 M of EDC was prepared in 100 mM phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 and used immediately.

A 3% Casein (Sigma Aldrich, Milwaukee, WIS, USA) solution in water was used as blocking solution. A 0.05% Tween 20 solution (Sigma Aldrich) in PBS pH 7.4 buffer was used as washing solution. A 50 mM sodium borate buffer solution (SBB) at pH 12 was prepared to break the immunological interactions and so dissolve the separated QDs from the immunoassay well plate, before QDs fluorescence measurement.

The precursors used for the synthesis of the CdSe/ZnS nanoparticles were selenium powder (100 mesh, 99.99%), cadmium oxide (99.99%), hexamethyldisilathiane, 1.0 M diethyl zinc solution in hexane, trioctylphosphine (TOP, 90%) and trioctylphosphine oxide (TOPO, 99%), all of them purchased from Sigma Aldrich and hexylphosphonic acid (HPA) obtained from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). The methanol HPLC gradient grade and chloroform anhydrous ( $\geq 99\%$ ), used to purify the synthesized QDs,



were from Prolabo (Leuven, Belgium) and Sigma Aldrich, respectively. Water-solubilization of QDs was achieved by coating them with an amphiphilic polymer synthesized in our laboratory [1]. For such purpose, poly(isobutylene-alt-maleic anhydride), dodecyl amine and tetrahydrofuran anhydrous were purchased from Fluka and Sigma Aldrich, respectively. The cross linker bis(6-aminohexyl)amine (Fluka) employed for the stabilization of the polymeric layer was stored at 4 °C.

Inject® EDC BSA Spin Kit from Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA) was used in the synthesis and purification of the Melamine-Bovine Serum Albumin conjugate (Mel-BSA). Sinapinic acid (Sigma Aldrich) was used as matrix for matrix assisted laser desorption / ionization (MALDI) in the characterization of Mel-BSA conjugate.

Amicon Ultra-4 100 KDa centrifugal filters from Millipore (Madrid, Spain) were used to purify the Mel-BSA-QD tracer or immunoprobe after its synthesis. A Bradford reagent from Sigma was employed in the indirect estimation of melamine concentration in both, Mel-BSA conjugate and in the immunoprobe, based on Bradford Test.

#### *Instrumentation*

A heating mantle with energy heater control (JP Selecta, Barcelona, Spain) with simultaneous stirring was employed to carry out the nanoparticle synthesis. To keep a constant argon atmosphere inside the flask, a needle with argon flow was used. This flow was set to 25 mL min<sup>-1</sup> by means of a rotameter (Serv' Instrumentation, Irigny, France). Required photoactivation [2] of the synthesised CdSe/ZnS QDs was performed using a 365 nm UV lamp (6 W, Vilbert Lourmat, Torcy, France).

Biofuge Stratos centrifuge from Kendro laboratory products (Osterode, Germany) was use in the purification steps involved in the synthesis of QDs, the synthesis of Mel-BSA conjugate and the synthesis of the immunoprobe Mel-BSA-QD.

A matrix assisted laser desorption / ionization-time of flight mass spectrometer (MALDI-MS), the Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation from Applied Biosystems (Madrid, Spain), was used in the characterization of the Mel-BSA conjugate giving information about the molecular weight of the conjugate and the precursors ratio.



White microtiter plates (96 wells) were obtained from Varian (Madrid, Spain) and used in all immunoassays. The spectrophotometric measurements were carried out in a Genesys 10S UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA). A spectroluminometer equipped with a well plate reader (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) was used to perform the measurements of the fluorescent immunoassays. A SOFTmax Pro software from Molecular Devices (Ismaning, Germany) was used to process the data obtained and fit the inhibition curves.

To carry out the validation of the fluorescent immunoassay a LC system consisted of an Agilent 1100 series (Agilent Technologies) equipped with a quaternary pump, a degasser, an autosampler and a UV/Vis diode array detector was used. The chromatographic separation was accomplished on a ZORBAX Eclipse XDB-C18 analytical column (150 mm x 4.6 mm I.D.; 5  $\mu$ m particle size). The mobile phase employed in the study was 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)/methanol (90:10) working in isocratic mode at a flow of 0.3 mL min<sup>-1</sup> with an injection volume of 50  $\mu$ L. The detection wavelength was set at 240 nm following the indications of the reference work [3].

---

[1] M. Fernández-Argüelles, A. Yakovlev, R. Sperling, C. Luccardini, S. Gaillard, A. Sanz-Medel, *et al.*, *Nano Lett.* 7 (2007) 2613-2617.

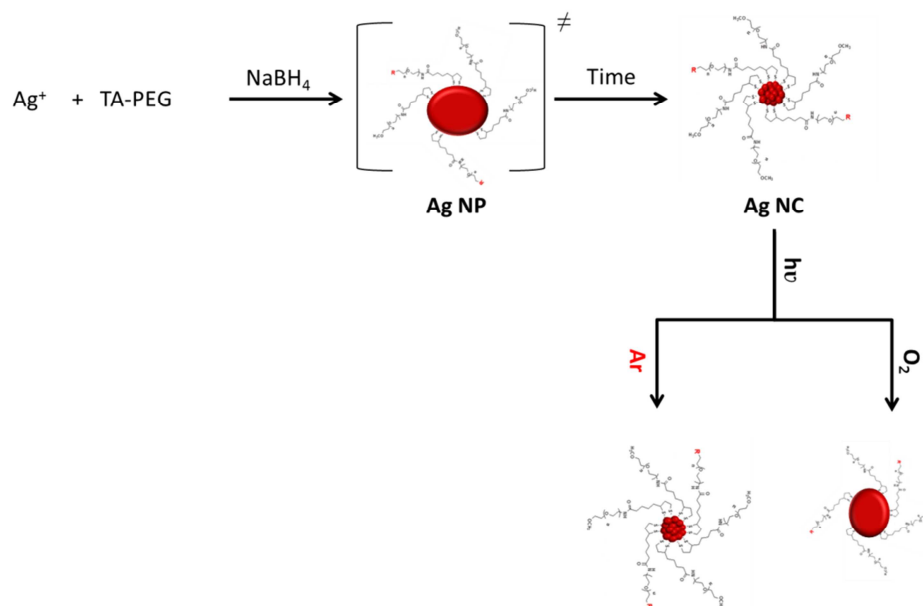
[2] M. Valledor Llopis, J.C. Campo Rodríguez, F.J. Ferrero Martín, A.M. Coto, M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, *Nanotechnology* 22 (2011) 385703 (9 pp).

[3] G. Venkatasami, J.R. Sowa Jr., *Anal.Chim. Acta* 665 (2010) 227-230.



## VII.5. Nanostructural transformations during the reduction of silver for the synthesis of nanomaterials and UV irradiation *(submitted to Analytical Chemistry, 2013)*

*Laura Trapiella-Alfonso, Mario Menéndez-Miranda, José M. Costa-Fernández, Rosario Pereiro, Alfredo Sanz-Medel*



**NANOSTRUCTURAL TRANSFORMATIONS OF FLUORESCENT  
SILVER NANOCCLUSERS OCCURRING DURING THEIR  
SYNTHESIS AND AFTER CONTINUOUS INTERACTION WITH  
UV-LIGHT**

Laura Trapiella-Alfonso<sup>‡</sup>, Mario Menéndez-Miranda<sup>‡</sup>, José M. Costa-Fernandez,  
Rosario Pereiro, Alfredo Sanz-Medel\*

*Department of Physical and Analytical Chemistry. Faculty of Chemistry.  
University of Oviedo, Julian Clavería, 8, 33006 Oviedo. SPAIN.*

<sup>‡</sup> Both authors contributed equally to this work.

\* Corresponding author to whom correspondence should be addressed.

*FAX: 34-985103474*

*e-mail address : asm@uniovi.es*

**ABSTRACT**

Information obtained from the use of a gentle separation technique, asymmetric flow field-flow fractionation, coupled on-line to molecular and elemental spectroscopic detectors, allowed to provide new insights in structural transformations during the growth of highly fluorescent silver nanoclusters (AgNCs) and after their continuous irradiation with UV-light.

**KEYWORDS**

Silver nanoclusters, Asymmetric flow field-flow fractionation, HRTEM

## Introduction

Advances in nanomaterial research have produced a new class of fluorescent nanoproboscopes known as metal nanoclusters (NCs). They contain from few to roughly a hundred atoms with a size between an isolated atom and the better known metal nanoparticles, referred to here as “plasmonic NPs”<sup>1,2</sup>. Due to their reduced size NCs present discrete electronic energy levels conferring them molecule-like behaviour leading to dramatically different optical, electrical and chemical properties as compared to plasmonic NPs.<sup>2</sup> NCs salient features include, strong photoluminescence combined with large Stokes shifts, tuneable emission, two-photon absorption, lack of intermittency, low photobleaching, huge surface-to-volume ratio and low toxicity. Therefore, these new nanomaterials offer novel luminescent platforms, alternative to conventional organic dyes or other nanostructures such as quantum dots (QDs), to be applied in many important and growing research areas such as biosensors, molecular imaging, optoelectronics, catalysis and nanomedicine<sup>2-4</sup>.

Although several synthetic routes<sup>1,3</sup> and bioapplications of NCs<sup>4-8</sup> have been already developed, there is a lack of fundamental studies focused on understanding the mechanisms of growth of these nanomaterials and their optical properties<sup>3,9</sup>.

One of the most studied NCs is based on silver metal core and a novel synthetic route has been proposed using thiolated bidentate polyethylene glycol ligand (TA-PEG) as key scaffold reagent<sup>10</sup>. Even if good quality fluorescent AgNCs have been obtained, some mechanisms involved in their synthesis and photostability are not yet well understood. In this context, the studies developed here are intended to clarify some aspects related to the nanostructural transformations taking place during the synthesis of AgNCs and after UV irradiation of the synthesized AgNCs. In the Muhammed *et al.*<sup>10</sup>

approach, it was proposed a mechanism for the synthesis of AgNCs *via* previous formation of the corresponding plasmonic NPs. This was based on two facts: (1) the time-dependent observed optical properties during AgNCs synthesis (they showed that in the first stages of the synthesis an absorption plasmonic band was observed while no fluorescence was registered); (2) they were able to synthesize AgNCs from AgNPs by a size focusing methodology.

Herein we tried to demonstrate and corroborate this hypothesis based on the use of a gentle separation technique (Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation, AF4) coupled to molecular and elemental detectors such as spectrophotometry, fluorimetry and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The use of complementary elemental and molecular detectors is essential in this type of studies to ensure the nature of each species present in the reaction media.<sup>11</sup>

## **Experimental**

The experimental optimized parameters of the AF4 instrument (AF2000 Postnova Analytics, Germany) are collected in Table 1. The selected operation conditions agreed with those of previous literature works that used the AF4 to separate different sizes of nanomaterials (e.g. AuNPs or QDs)<sup>12-14</sup>.

The synthesis of the silver NCs under study is rather simple and was carried out directly in Milli-Q water<sup>10</sup>. Briefly, it consists on the direct reduction of silver metal ions (from AgNO<sub>3</sub>) with sodium borohydride in the presence of an appropriate scaffold. Functionalized polyethylene glycol ligands (TA-PEG-X, where X is a functional group such as carboxylic, amine, biotin or methoxy group) have been used as scaffold. The molar ratio between silver precursor, reducing agent and ligand is critical to obtain the nanoclusters. The ratio used here was 1:1:25 (AgNO<sub>3</sub>:TA-PEG-X:NaBH<sub>4</sub>). The

reduction reaction takes place at room temperature in a vial protected from the light with aluminium paper and ensuring a continuous stirring.

## **Results and Discussion**

### *Elucidating the synthetic mechanism of silver nanoclusters*

First of all, we have investigated the evolution of the reaction mixture all along the synthesis. For such purpose, aliquots from the reaction vial were taken at different reaction times and analysed by AF4-coupled to UV-Vis and Fluorescence detectors. As shown in Figure 1A, we can observe that, at some reaction times, two nanostructures with different sizes coexist in the reaction mixture; moreover, relative concentrations of both species change with reaction time. One is formed at the beginning of the reaction, showing absorption properties but no fluorescence emission (Figure 1B) and eluting at longer retention times which implies larger size (e.g. plasmonic NP). It is remarkable that during the synthesis the maximum of elution band of such structure is shifting to lower times (from 19 to 17 min) e.g. to lower particle sizes. The second nanostructure is fluorescent and smaller, and should be the final product of the synthesis eluting at 13.5 min. Both absorption and fluorescence features are shown in Figure 1. It appears after 60 min of reaction and is clearly the dominant nanomaterial after 150 min; therefore, it could be expected that it corresponds to the AgNCs. At this point, it should be noted that at the reaction conditions used, the formation of the AgNCs is thermodynamically favoured (i.e. the reaction is spontaneous). Stirring accelerates its kinetics, obtaining the final product (AgNCs) earlier. Thereby, after extracting the aliquots at different reaction times it is important to measure the optical properties immediately after to avoid aliquot evolution towards NCs, the thermodynamically stable species (see Fig. S1†).



Additionally, it should be noted that the fluorescence emission, inherent to the AgNCs, was detected only for reaction times longer than 60 min. Furthermore, the analysis by ICP-MS of aliquots showed that both species, eluting during the AF4 separation, contain silver (see Fig.S2†). All those experimental results confirm that the mechanism of synthesis of AgNCs goes through the previous formation of the corresponding plasmonic NP. Finally, after 300 min we stopped the reaction and checked the optical properties of the final product, observing that good quality fluorescent AgNCs were obtained (see Fig. 2).

#### *Effect of UV irradiation on the structural and optical properties of AgNCs*

We investigated also the effect of UV irradiation on the stability of the AgNCs. It has been reported that after 30 min of UV irradiation optical properties of nanoclusters disappear, evidencing a poor photostability for this nanomaterial<sup>10</sup>. This weak point should be improved in order to expand their applications. AgNCs optical properties degradation could be due mainly to three reasons: (1) the release of free silver atoms from the core (that implies the destruction of the NC); (2) the aggregation of the NCs catalyzed by UV light, or (3) the formation of a higher-size nanostructure driven by a photoreaction. As can be seen in Figure 3, after UV irradiation of the AgNCs the formation of higher-size species occurred. The high signals observed rules out the mechanism (1) as a dominant NCs degradation process.

In this experiment, one aliquot of the AgNCs grown during 300 min was exposed under UV light for 3 hours and analysed in the AF4 separation system. Other aliquot of the same AgNCs sample (but not irradiated) was similarly evaluated, as control. As it is shown in the fractograms of Figure 3A, a new band appears in the fractogram at the retention time of the metal plasmonic NP. Additionally, the fluorescence of the AgNCs

fall down after the UV exposition (see Figure 3B). Also, it was observed that the colour of the solution after irradiation was different, changing from yellow to brown.

To elucidate if this higher-size species results from an aggregation of NCs or is the result of the growth of a new nanostructure, the sample was investigated using high resolution electron transmission microscopy (HR-TEM). HR-TEM was already successfully employed to elucidate and illustrate nanostructural changes observed during the synthesis of nanowires or nanoparticles<sup>15,16</sup>. When these two samples (irradiated and no irradiated) are examined by HR-TEM (Figure 3C) we found that there is a strong change in the size of the nanostructure going from 3 nm of the non irradiated sample (AgNCs) up to 10 nm of the irradiated one. Moreover, applying the Fourier Transform it can be obtained information about the cell parameters of the crystalline structure. Thus, it was found that AgNCs presented a cubic crystalline structure in the space group FM3M, cell parameters  $a=b=c= 4.085$ ,  $\alpha= 90^\circ$ , and a distance between planes of 2.359 that it is characteristic of silver atoms. It seems that the UV irradiation gives rise to a fusion of the AgNCs to form a bigger polycrystalline nanostructure as it is shown in Figure 3C. In this new nanostructure different domains of the same crystalline structure are distinguished, (i.e. planes with different orientations due to the fusion of several NCs are observed, see Fig. S3†). So, loss of optical properties of the AgNCs after UV irradiation can be attributed to a formation of a new silver nanostructure. Simple AgNCs aggregation in the new nanostructure is not likely as no distinguishable independent units of NCs are seen, whereas a continuous nanostructure is occurring. On the other hand, it is worth to stress that the new higher-size nanostructure does not exhibit any optical property characteristic of metal nanoclusters (fluorescent emission) nor of metal nanoparticles (plasmonic band absorption) as it is shown in Figure 4.

*Implication of the oxygen in the effects of UV irradiation process*

Finally, a deeper study about the photostability of AgNCs was carried out. We consider of interest to evaluate if oxygen has any role in the observed effects produced by UV irradiation as it has been already reported that AgNCs tend to oxidize<sup>17</sup>. Also this process of photo-oxidation has been observed in other kind of nanomaterials including QDs<sup>18</sup>. For such purpose two aliquots of AgNCs (one in presence and one in the absence of dissolved oxygen) were continuously UV irradiated monitoring the fluorescence emission during more than 3 hours. To secure the absence of oxygen in one of the aliquots, a constant flow of an inert gas (Ar) was bubbled into that sample solution. As it is shown in Figure 5A, different behaviours were observed. In presence of dissolved oxygen, after 2 hours of UV exposition the fluorescence starts to fall down being completely lost after 3 hours. However, when this experiment is carried out in the absence of oxygen no distinguishable loss of emission fluorescence was observed. Thus, we can conclude that the process involved in the UV irradiation of AgNCs involves a photo-oxidation reaction that provokes the fusion of the AgNCs into a higher-size nanostructure. It should be mentioned that the fusion of metal nanostructures resulting in higher weight nanostructures is a mechanism-type that have been already described from HR-TEM measurements<sup>15,16</sup>. The loss of fluorescence could be also explained by the appearance of a higher-size nanostructure due to at this size-scale optical properties are strongly size-dependent. According to such experimental results a schematic representation of the observed nanostructural changes is proposed (Figure 5B).

## **Conclusions**

In summary, the use of AF4 separation technique coupled to several detectors provided invaluable information that allowed us to have novel insights about the mechanism of growth of Ag@TA-PEG nanoclusters and about the effects that UV irradiation process causes to these nanoclusters. First, the findings obtained confirm the hypothesis of

Muhammed *et al.*<sup>10</sup> related to the mechanism of AgNCs synthesis from an intermediate formation of AgNPs. Moreover, it was possible to elucidate the mechanism responsible for optical properties loss of the AgNCs after UV irradiation: a photoreaction was induced and AgNCs tend to fusion each other giving as a result a new bigger nanostructure. This process only takes place in the presence of oxygen (in absence of oxygen fluorescence properties remain intact after 3 hours of UV irradiation). So we can conclude that the formation of the new higher-size nanostructure is due to a photo-oxidation reaction. Owing to HR-TEM information it can be said that Ag@TA-PEG nanocluster presents a cubic crystalline structure and that the new nanomaterial retains the same structure. Also, HR-TEM images reveal that the loss of optical properties from AgNCs is due to the formation of a new higher-size nanostructure rather than to aggregation of AgNCs. It can be envisaged that all those findings are an important piece of knowledge to develop novel synthesis routes and applications of AgNCs.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful for financial support by the Spanish Ministry of Education and Science, MEC (CTQ2010-16636 and MAT2010-20921). Also we express our gratitude to both the Hedi Mattoussi's Research Group at Florida State University (USA) for the supply of the functionalized ligand (TA-PEG-COOH) and the Organic Synthesis Research Group of the University of Oviedo for providing the equipment for the TA-PEG-OMe ligand synthesis. L.T.A and M.M.M. acknowledge the FPU program (Ref: AP2008-01504) from the Spanish Education Ministry and Severo Ochoa program (Ref: BP12046) from the Ministry of Education of the Principado de Asturias, for their pre-doctoral fellowships, respectively.

### **References**

<sup>1</sup> I. Díez and R. H. A. Ras, *Nanoscale*, 2011, **3**, 1963.

- <sup>2</sup> J. Zheng, P. R. Nicovich and R. M. Dickson, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 2007, **58**, 409.
- <sup>3</sup> L. Shang, S. Dong and G. U. Nienhaus, *Nano Today*, 2011, **6**, 401.
- <sup>4</sup> C. A. J. Lin, C. H. Lee, J. T. Hsieh, H. H. Wang, J. K. Li, J. L. Shen, W. H. Chan, H. I. Yeh and W. H. Chang, *J. Med. Biol. Eng.*, 2009, **29**, 276.
- <sup>5</sup> M. Wang, Q. S. Mei, K. Zhang and Z. P. Zhang, *Analyst*, 2012, **137**, 1618.
- <sup>6</sup> Y. Zhu, H. Qian, B. A. Drake and R. Jin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 1295.
- <sup>7</sup> Y. L. Wang, J. J. Chen and J. Irudayaraj, *ACS Nano*, 2011, **5**, 9718.
- <sup>8</sup> Y. Wang, J. Zhang, L. Huang, D. He, L. Ma, J. Ouyang and F. Jiang, *Chem.-Eur. J.*, 2012, **18**, 1432.
- <sup>9</sup> C-A J. Lin, T-Y Yang, C-H Lee, S. H. Huang, R. A. Sperling, M. Zanella, J. K. Li, J-L Shen, H-H Wang, H-I Yeh, W. J. Parak and W. H. Chang, *ACS Nano*, 2009, **3**, 395.
- <sup>10</sup> M. A. H. Muhammed, F. Aldeek, G. Palui, L. Trapiella-Alfonso and H. Mattoussi, *ACS Nano*, 2012, **6**, 8950.
- <sup>11</sup> L. Trapiella-Alfonso, A. R. Montoro-Bustos, J. Ruiz-Encinar, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro and A. Sanz-Medel, *Nanoscale*, 2011, **3**, 954.
- <sup>12</sup> L. Calzolari, D. Gilliland, C. P. García and F. Rossi, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 4234.
- <sup>13</sup> A. Zattoni, D. C. Rambaldi, P. Reschiglian, M. Melucci, S. Krol, A. M. Coto Garcia, A. Sanz-Medel, D. Roessner and C. Johann, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 9106.
- <sup>14</sup> M. Bouby, H. Geckeis and F. W. Geyer, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **392**, 1447.
- <sup>15</sup> J. Xie, Q. Zhang, J. Y. Lee and D. I. C. Wang, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 17158.
- <sup>16</sup> Q. Zhang, Y. N. Tan, J. Xie and J. Y. Lee, *Plasmonics*, 2009, **4**, 9.
- <sup>17</sup> Y. Lu and W. Chen, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 3594.
- <sup>18</sup> A. Coto-García, M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa-Fernández and A. Sanz-Medel, *J. Nanopart. Res.*, 2013, **15**, 1330.

**Table 1.** AF4 Operating Conditions

---

Injection time (min)	3
Transition time (min)	1
Tip flow (mL/min)	0.2
Cross flow (mL/min)	2.5
Detector flow (mL/min)	0.5
Eluent	0.1% Ammonium acetate in water
Membrane type	Regenerated cellulose with 10 kDa cut-off
Channel dimensions	29 cm length and 500 $\mu$ m thickness

---

### FIGURE CAPTIONS

**Figure 1:** Fractograms of the AgNCs synthesis at different times after the addition of NaBH<sub>4</sub> 1) 5 min; 2) 38 min; 3) 70 min; 4) 105 min; 5) 150 min and 6) 300 min. Monitoring the absorbance (A) and the fluorescence emission (B).

**Figure 2:** Excitation and emission spectra of AgNCs. They show their characteristic optical features: three absorption bands at 330, 427 and 495 nm and only one emission wavelength at 645 nm.

**Figure 3:** Investigation of the photodegradation process. A) Absorption fractograms of freshly prepared AgNCs (light blue line) and an aliquot photodegraded (dark blue line). B) Fluorescence emission fractograms of AgNCs and photodegraded ones, red and pink lines respectively. C) HR-TEM images show how after UV irradiation a nanostructure transformation from AgNCs to a bigger silver nanostructure is produced.

**Figure 4:** Optical characteristics of the new nanostructure (dark blue and pink lines) compared to that exhibited by AgNCs (light blue and red lines). A) Absorption spectra. B) Fluorescence scans. The optical properties of AgNCs almost disappeared and no evidence of plasmonic absorption band typical of AgNPs is registered.

**Figure 5:** UV irradiation effect over AgNCs fluorescent emission with the time. A) Experimental data collected in the presence (black line) and in the absence (red line) of oxygen. B) A schematic representation of the observed nanostructural transformations.

**FIGURE 1**

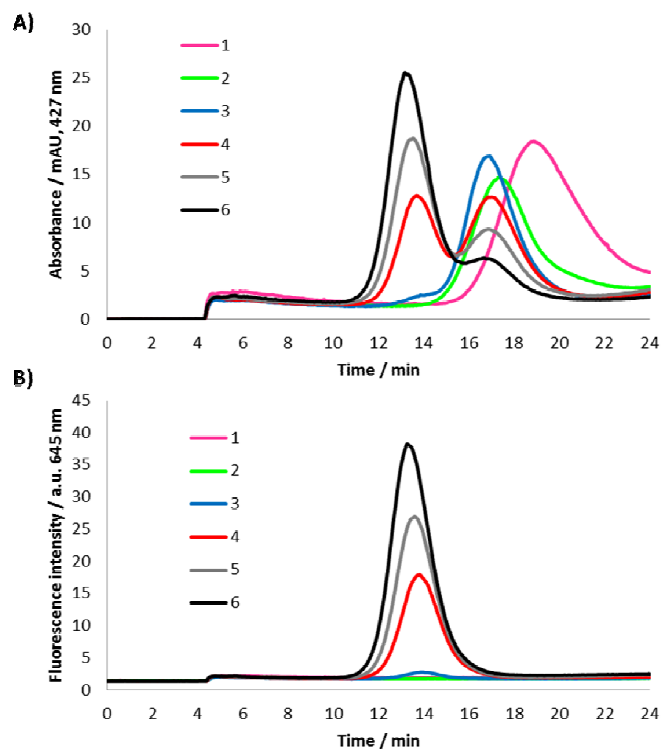
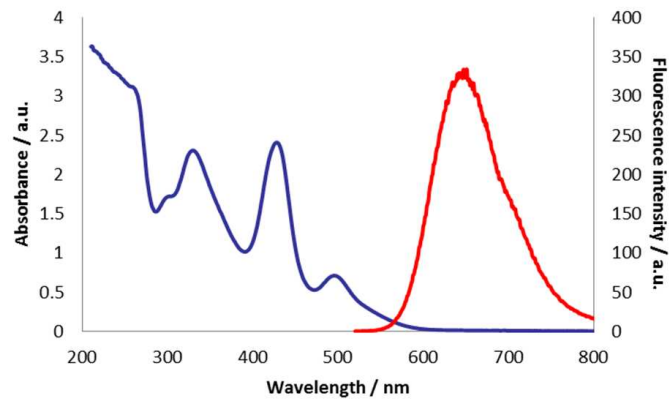




FIGURE 2



**FIGURE 3**

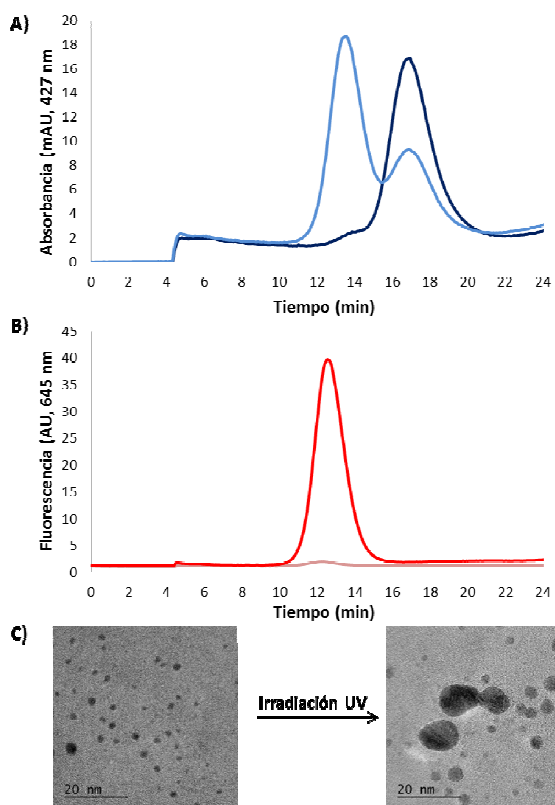


FIGURE 4

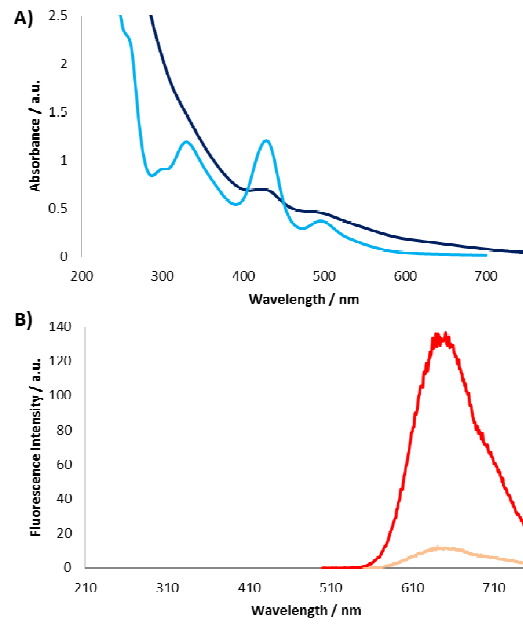
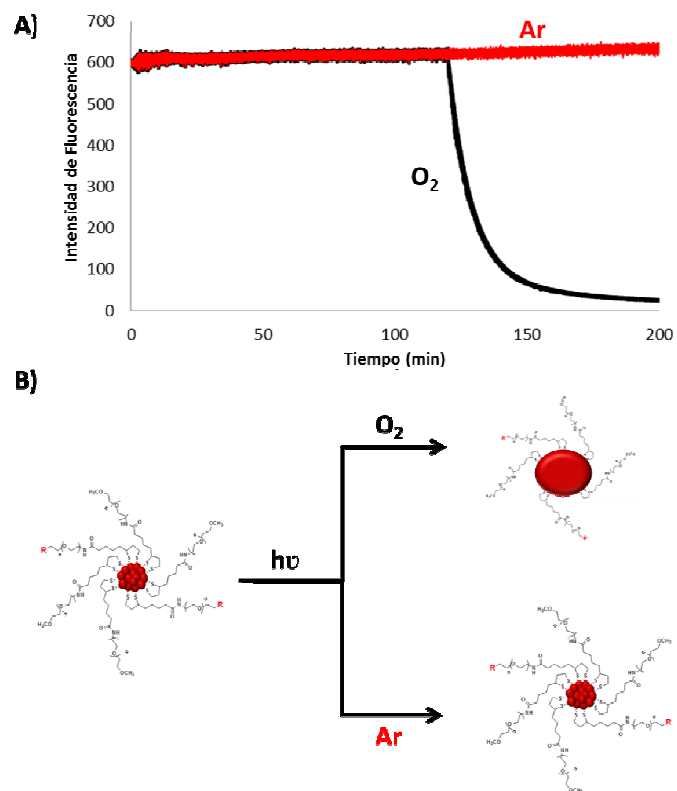


FIGURE 5



**Electronic Supporting Information for:**  
**Nanostructural transformations of fluorescent silver nanoclusters occurring during their synthesis and after continuous interaction with UV-light**

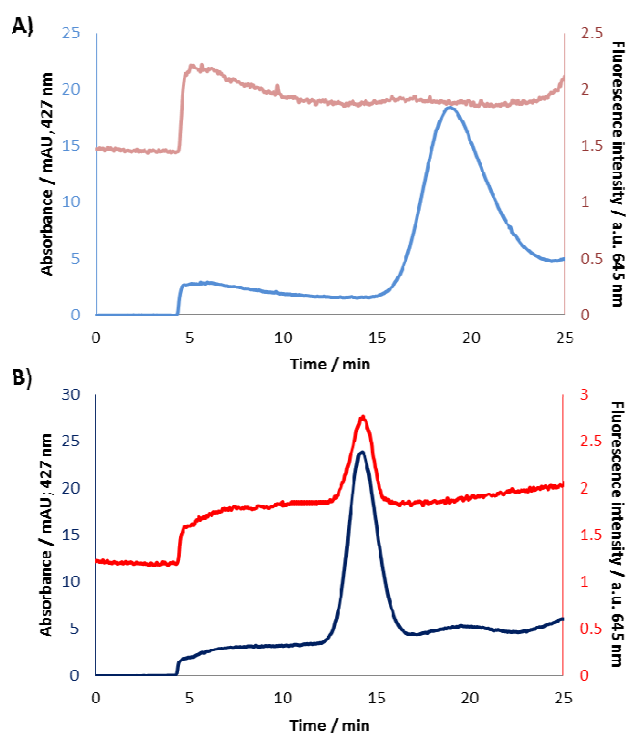
Laura Trapiella-Alfonso<sup>‡</sup>, Mario Menéndez Miranda<sup>‡</sup>, José M. Costa-Fernández, Rosario Pereiro and Alfredo Sanz-Medel\*

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería, 8, 33006, Oviedo, Spain; Tel: +34 985103474; E-mail: [asm@uniovi.es](mailto:asm@uniovi.es).

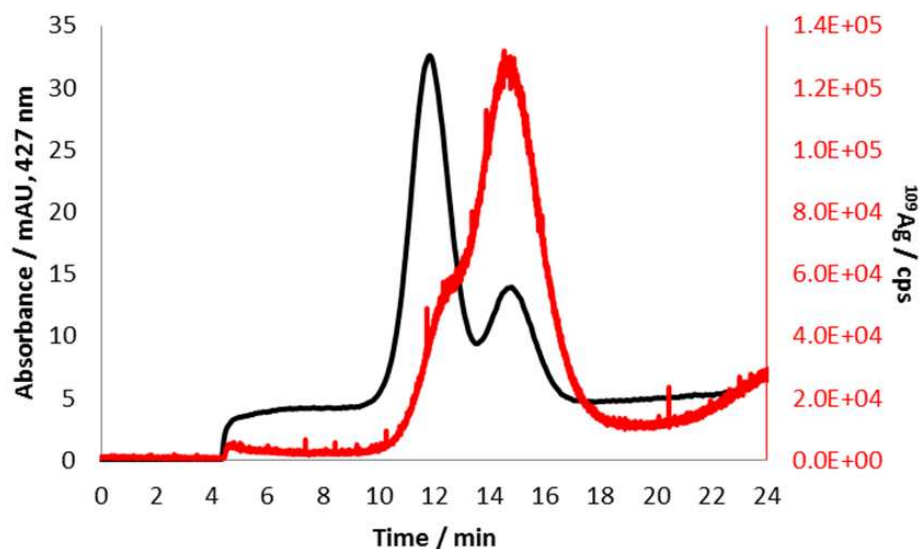
\*Both authors contributed equally to this work.

\* Corresponding author: [asm@uniovi.es](mailto:asm@uniovi.es)

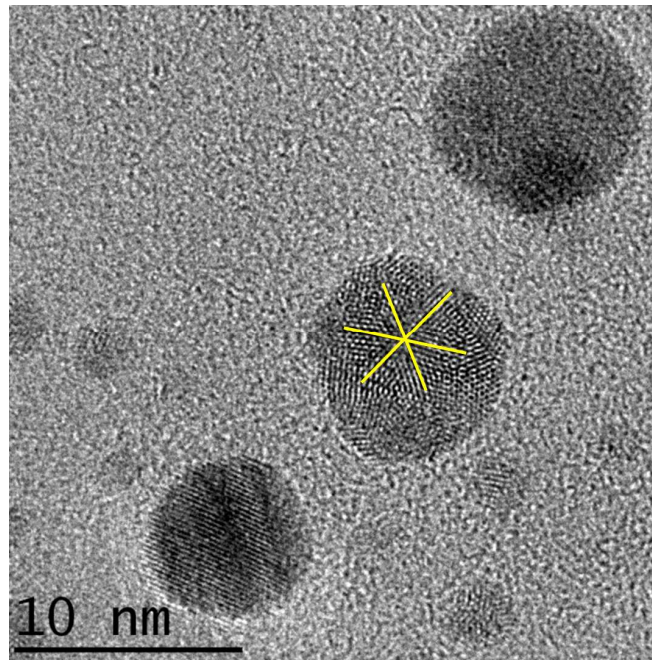
**Supplementary Figures**



**Figure S1.** Optical properties, absorbance and fluorescence emission, of the extracted aliquot at 5 min of reaction. A) measured immediately after the extraction, B) measured 2 hours after the extraction. The results clearly show how an evolution in the nanostructure has occurred and also how the formation of AgNCs is thermodynamically favoured under the reaction conditions.



**Figure S2.** AF4-ICP-MS fractogram (red line) of the AgNCs after 300 min of reaction compared with the fractogram from the same sample measured with the UV-Vis detector (black line). It can be concluded that both species (NC and plasmonic NP) contain Ag. The loss of resolution is due to the configuration used to couple the AF4 to the ICP-MS detector (its internal radii is wider than the others, enlarging the bands that overlap). The larger amount of Ag from the second band *versus* the first one could be attributed to the fact that the content of atoms in NPs is higher than in NCs.



**Figure S3.** HR-TEM image of Ag nanostructures after 3 h of UV irradiation. Here it can be observed different orientations of the crystalline planes (see lines marked in yellow) due to the fusion of several AgNCs.



**OTRAS PUBLICACIONES  
RELACIONADAS**







### VIII. OTRAS PUBLICACIONES RELACIONADAS

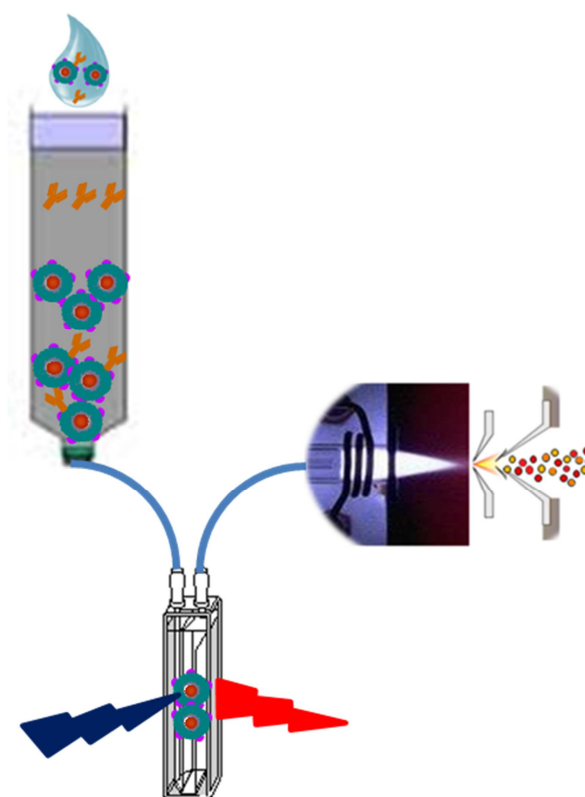
Al igual que se hizo en el apartado anterior a continuación se presenta una Tabla resumen que contiene una relación de otras publicaciones relacionadas con la presente Tesis Doctoral así como el índice de impacto y posición de la revista científica internacional donde se recogen los trabajos. Nuevamente mencionar que dichos trabajos han sido publicados en revistas que se encuentran situadas en el primer cuartil de su categoría mostrando así la calidad e importancia de dichas publicaciones.

**Tabla 17.** Relación de otras publicaciones relacionadas con la Tesis Doctoral. Datos obtenidos del Journal Citations Reports®

<b>Referencia</b>	<b>Índice de impacto</b>	<b>Posición</b>
Nanoscale, 2011, 3, 954-957	5.914 (JCR 2011)	Nanociencia y Nanotecnología (11/66) Química multidisciplinar (21/154)
Submitted to Chemistry of Materials, 2013	7.286 (JCR 2011)	Ciencia de los materiales, multidisciplinar (13/232)

**VIII.1. New integrated elemental and molecular strategies as diagnostic tool for the quality of water soluble quantum dots and their bioconjugates (*Nanoscale*, 2011, 3, 954-957)**

*Laura Trapiella-Alfonso, Antonio R. Montoro-Bustos, Jorge Ruiz Encinar, José M. Costa-Fernández, Rosario Pereiro, Alfredo Sanz-Medel*



Cite this: *Nanoscale*, 2011, **3**, 954

www.rsc.org/nanoscale

## COMMUNICATION

## New integrated elemental and molecular strategies as a diagnostic tool for the quality of water soluble quantum dots and their bioconjugates†

Laura Trapiella-Alfonso,‡ Antonio R. Montoro Bustos,‡ Jorge Ruiz Encinar, Jose M. Costa-Fernández, Rosario Pereiro and Alfredo Sanz-Medel\*

Received 2nd November 2010, Accepted 15th December 2010

DOI: 10.1039/c0nr00822b

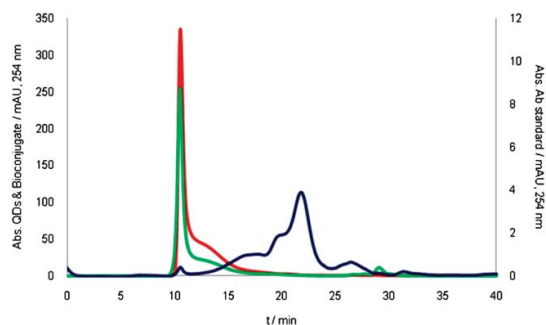
Herein, we demonstrate that both qualitative molecular and quantitative elemental data obtained from size exclusion chromatography coupled online for the first time to both molecular fluorescence and elemental mass spectrometry, respectively, turned out to be critical to evaluate the quality of coatings of quantum dots. Moreover, such an instrumental approach also allowed us to study quantitatively the appropriated bioconjugation of quantum dots to antibodies, a critical step for QDs future use in quantitative fluorescence immunoassays.

One of the fastest moving research fields in nanoscience is the use of quantum dots (QDs) for bioanalytical applications. The unique optical properties of those nanoparticles and the ability to bioconjugate them to specific biomolecules, such as DNA, aptamers, enzymes or antibodies, make QDs appealing as high-value fluorescent labels in a wide variety of bioanalytical investigations, where traditional organic fluorophores fall short of providing long-term stability as simultaneous detection of multiple signals. Despite recent progress, there is still an urgent need for effective procedures for QD bioconjugates purification and characterization, in order to further facilitate reliable quantitative bioassays.<sup>1–3</sup>

Spectroscopy, such as photoluminescence<sup>4</sup> and transmission electron microscopy (TEM),<sup>5</sup> is a commonly used technique for such pursued purposes. Alternative strategies for purification and characterization of the QD bioconjugates including repeated centrifugation, analytical ultracentrifugation, re-dispersion and ultrafiltration have been proposed.<sup>6,7</sup> However, such methodologies lack quantitative capabilities, their separation resolution is poor and available membrane porous sizes are limited. Size exclusion chromatography (SEC) coupled with UV/Vis detection<sup>3</sup> and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection (CE-LIF) have been used also for bioconjugates purification and characterization.<sup>8–10</sup> However, CE-LIF requires previous steps to purify bioconjugated QDs from the reagents in excess, e.g. ultrafiltration or SEC. In such cases the

separation resolution showed a strong dependence on the  $pI$  and  $M_w$  of the biomolecule attached to the QD. In addition, due to the sample loading limitation associated to CE, this technique cannot be efficiently used for collecting purified fractions.

In this communication, a novel concept based on the combination of SEC separation coupled online with elemental (inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS) and molecular (fluorescence) detection is proposed as a diagnostic tool. In this way, a deeper understanding of the QDs status after their solubilization in aqueous media (e.g. with an amphiphilic polymer coating) and the effectiveness of QD bioconjugation to a typical functional biomolecule (monoclonal mouse anti-progesterone antibody, selected as a “model” antibody) were proved using this general platform. Of course, both steps are crucial for future development of QD based bioassays. The procedure, to carry out QDs bioconjugation *via* ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) chemistry, is available in the ESI†. Of course, the purification and characterization steps are crucial to assure that any free antibodies (and even QDs) are absent in the purified bioconjugate reagent and in order to carry out a proper optimization of the derivatization reaction. Following previous work carried out in our lab,<sup>3</sup> SEC coupled with UV/Vis detection was first evaluated as purification/separation technique. Unfortunately, the observed QD-antibody (bioconjugated QDs) could not be distinguished from the individual QDs with such detection (see Fig. 1).



**Fig. 1** SEC-UV/Vis chromatograms using  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM pH 7.4 as the mobile phase. Chromatograms corresponding to the anti-progesterone antibody (2.1  $\mu\text{M}$ ), the standard of QDs (3  $\mu\text{M}$ ), and the mixture of species after bioconjugation are shown in blue, red and green, respectively.

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería, 8, 33006 Oviedo, Spain. E-mail: asm@uniovi.es; Tel: +34 985103474

† Electronic supplementary information (ESI) available: Description of experimental section and Fig. S1 and S2. See DOI: 10.1039/c0nr00822b  
‡ Both authors contributed equally to this work.

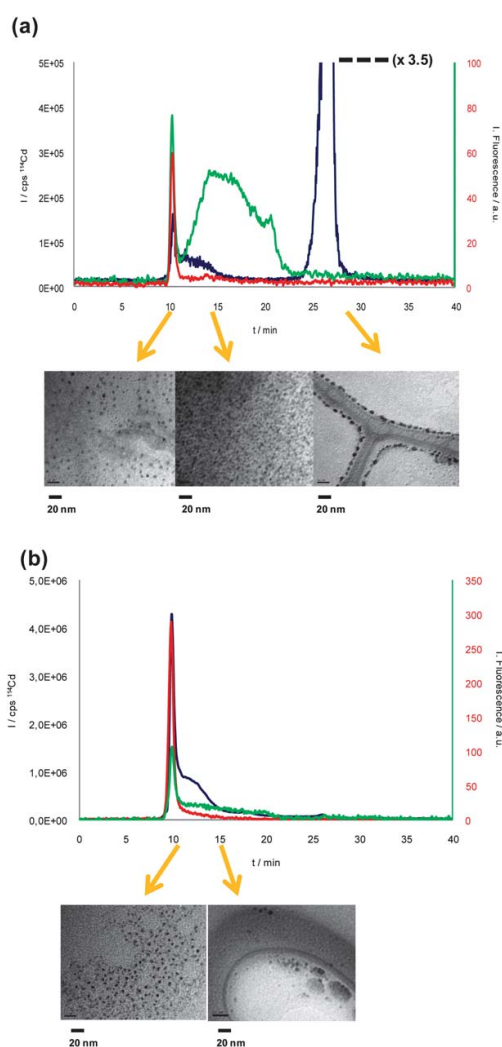
A more selective detector should be desirable. In this vein, the molecular native fluorescence emission from QD cores and from the polymer coating measured at 600 and 332 nm, respectively (see Fig. S1†) can be combined to the quantitative and high specific multi-elemental information (e.g.  $^{114}\text{Cd}$ ) from the nanocrystals, *via* ICP-MS.<sup>5</sup> To check such integrated approach, water soluble CdSe and CdSe/ZnS QDs were obtained and studied first. Although bio-conjugation of the nanoparticles is carried out at pH = 7.4, QDs are much more stable in basic media. Thus, two different pHs of the mobile phase were studied, 7.4 and 10.5, while maintaining the same ionic strength. Along the chromatographic separation, ion signals from  $^{114}\text{Cd}$  (QDs core) and  $^{32}\text{S}$  (QDs shell and proteins) and fluorescence emission both at 600 and 332 nm were collected. Additionally, flow injection analysis (FIA) was used to evaluate column recoveries.

No difference was found at pH 7.4 between the chromatographic profiles obtained for both core and core-shell types of QDs under scrutiny (see Fig. S2†). However, column recoveries obtained by ICP-MS were low (ranging from 46 to 54% and from 73 to 78% for CdSe and CdSe/ZnS QDs, respectively). Bringing the pH to 10.5 led to higher recoveries in both cases (92–97% and 99–108%), while chromatographic profiles differed significantly, as can be clearly seen in Fig. 2. Interestingly, information given by fluorescence at both wavelengths (600 and 332 nm) allows an assessment of the quality of the QDs eluting from the SEC column (since a likely degradation on their surface would result in a lower emission quantum yield). In the case of complete loss of fluorescence, QDs could only be detected using the  $^{114}\text{Cd}$  signal (obtained by ICP-MS). In addition, integration of such ICP-MS elemental profile would provide the precious quantitative column recovery information. Following such reasoning, the fluorescence peaks observed at 10 min in Fig. 2a seem to indicate that such CdSe QDs were of high quality. Unfortunately, such good quality QDs amounted to just 3–5% of the total QDs injected (as demonstrated by the huge peak eluting at 26 min showing only  $^{114}\text{Cd}$  signal without any fluorescence associated). It is worth stressing that both peaks partially match the second polymer broad peak centred at 15 min (332 nm) and the tail of the CdSe QD peak from 10 to 15 min ( $^{114}\text{Cd}$ ) might be a clear indicator of degradation of QDs after loosing of polymer chains from the surface (which could result on final aggregation). Following such reasoning, only the fluorescence peaks observed at 10 min (Fig. 2a) seem to indicate high quality CdSe QDs.

In this way, the degradation of the polymer coating could take place completely, thus releasing uncoated CdSe nanoparticles of much smaller hydrodynamic volume (therefore eluting, along with eventual released elements, much later in the SEC column, *i.e.* 26 min). To corroborate this hypothesis three elution fractions were collected at different time periods (8–11, 11–16, 24–27 min) of the SEC chromatogram. These fractions were pre-concentrated and analyzed by TEM after drying. The TEM results are shown at the bottom images of Fig. 2a and demonstrate the presence of nanoparticles at the three elution times. As expected, QDs of the last fraction tend to aggregate, which eventually migrate to the edge of the copper grid (hydrophobic part) used to deposit the sample. This eventual degradation of the QDs is also confirmed by the complete absence of fluorescence at 26 min.

In a similar set of experiments, Fig. 2b shows the results obtained for the shell-protected CdSe/ZnS QDs. In this case the largest proportion of  $^{114}\text{Cd}$  eluted from the column at 10 min (following the

same behaviour observed at pH 7.4, see Fig. S2†). Again, the eluted species at 10 min corresponds to high quality QDs as indicated by the intense fluorescence peak observed (600 nm) and the TEM image. It is worth stressing that, in this case, high quality QDs amounted to 55–58% of the total QDs injected. Loss of the polymer coating still occurs here, but to fewer extent (shoulder at 13 min on the  $^{114}\text{Cd}$  signal) resulting again in a loss of fluorescence and a slight decrease of the hydrodynamic volume, as demonstrated by the longer retention in the SEC column. However, in agreement with the TEM image obtained for the 26 min fraction in Fig. 2a, Cd detected seems to be still as nanoparticles, but already very hydrophobic. Such partially degraded QDs amounted to 42–46%. Therefore it seems that polymer coating is much better attached to shell protected CdSe/ZnS QDs

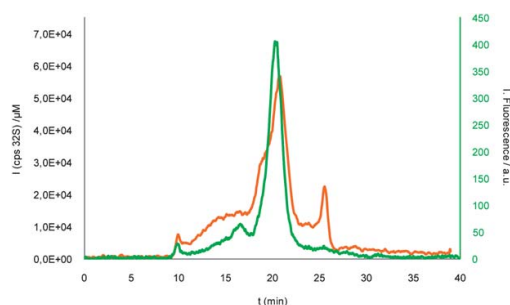


**Fig. 2** SEC chromatogram obtained for CdSe (a) and CdSe/ZnS (b) QDs obtained at pH 10.5. The  $^{114}\text{Cd}$  profile and the fluorescence with emission of 600 nm (core) and 332 nm (polymer coating) are shown in blue, red and green, respectively.

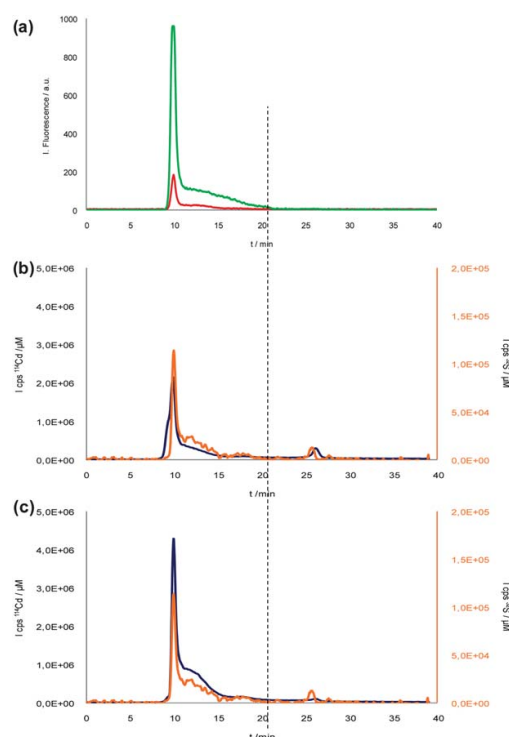
resulting in more stable nanoparticles in water media (*i.e.* more appropriate for further bioconjugation to antibodies).

In our bioconjugation studies anti-progesterone antibodies were characterised first by the here proposed instrumental approach. Obtained chromatograms are shown in Fig. 3 (fluorescence and ICPMS detection). As can be seen, the vast majority of the antibody eluted at a single peak at 20 min (note that the free antibody can be detected by fluorescent measurements using the same conditions employed for the fluorescence detection of the polymer coating of QDs, see Fig. S1†).

Under the same chromatographic conditions the bioconjugation reaction mixture was injected and results measuring fluorescence at 600 nm and 332 nm are shown in Fig. 4a. Again, as in Fig. 1, the excess of free antibodies (20 min vertical line) could be separated from the bioconjugates (10 min), but the QD-bioconjugated antibody could not be distinguished from the individual QDs as the peak profile is identical to that obtained for the individual QDs (see Fig. 2b). However, having a closer look at the fluorescence signals it is possible to observe a differential behaviour occurring when the QDs are bioconjugated just by looking at the peak area ratio of the fluorescent signals 332 (polymer)/600 (QDs core). In fact, such ratio increased up to 15 times when bioconjugate exits. This increase is due to the high emission intensity observed at 332 nm, likely caused by the incorporation of Ab (maximum emission wavelength 342 nm as shown in Fig. 3). In fact, no signal corresponding to the free antibody at 20 min (see Fig. 3a) was observed. Interestingly, the decrease suffered at the 600 nm fluorescence emission, that other authors have rationalised as a result of an inner filter effect when the biomolecule is bound to the QD,<sup>10</sup> also contributes to the peak area ratio change computed. To the best of our knowledge this is the first time that a fluorescence signal ratio is used as diagnostic tool for bioconjugation success assessment. Unfortunately, the inner filter effect observed hinders its final use in a deep quantitative evaluation (*e.g.* establishment for bioconjugates stoichiometry). In this situation the complementary ICP-MS information (given in Fig. 4b and c) proved to be critical. In fact, the <sup>32</sup>S and <sup>114</sup>Cd profiles obtained provided the final demonstration of the effectiveness of the bioconjugation process: the poorly resolved peak at an elution time of 10 min showed a dramatic increase of its S/Cd ratio in the supposed bioconjugated species (even an inversion was noticed in the ratio mentioned in Fig. 4b and c), indicating the much higher amount of S present here, most likely due to the contribution from the high sulfur content of the



**Fig. 3** Ab anti-progesterone characterization chromatograms by SEC-fluorescence, using 332 nm as the emission signal (green line) and by SEC-ICP-MS, monitoring the <sup>32</sup>S isotope (orange line).



**Fig. 4** SEC-Fluorescence (a) and SEC-ICP-MS (b) chromatograms of Ab-QDs bioconjugation reaction mixture. CdSe/ZnS SEC-ICP-MS chromatogram (c). Red and green lines represent 600 nm core fluorescent emission from bioconjugated QDs and 332 nm polymer and Ab fluorescent emission, respectively. Blue and orange lines correspond to <sup>114</sup>Cd and <sup>32</sup>S from QDs and bioconjugate, respectively. Vertical line would show the elution time of the antibody.

anti-progesterone antibody containing cysteines and methionines bioconjugated to the CdSe/ZnS QDs. Also, no <sup>32</sup>S peak was observed at the retention time of the free antibody (20 min, Fig. 3c). This increase in the S/Cd ratio in the bioconjugates ( $0.118 \pm 0.002$ ) is very significant compared to the value for CdSe/ZnS QDs ( $0.070 \pm 0.001$ ). Note that these data could be considered as a first attempt to obtain an approximate bioconjugate stoichiometry (biomolecule/QD), information highly demanded today in order to use such bioconjugated QD complexes as reagents for reliable quantitative immunoassays.

As demonstrated by the complementary detection techniques, a satisfactory isolation of high-quality QDs labelled antibodies from free antibodies can be achieved by the SE-chromatography. However, it would be desirable to demonstrate that the bioconjugated antibody maintains its functionality after their conjugation to the quantum dots and its subsequent purification. For such purpose, the first fraction (from 8 to 11 minutes) eluted from the SEC was collected. Further, a conventional ELISA-type spectrophotometric immunoassay was carried out in order to compare the activity of labelled (fraction collected from the SEC) with standard non-labelled antibodies. The conventional ELISA spectrophotometric assay was performed using an anti-mouse IgG peroxidase as

a secondary antibody and 3,3',5,5' tetramethyl benzidine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for colour development. Results from those studies clearly showed that the isolated anti-progesterone antibody labelled with QDs kept its functionality, specifically recognizing the presence of the antigen in the ELISA plate. Moreover, no significant differences were observed in the colour development obtained in the ELISA wells incubated with the standard antibodies and the antibodies bioconjugated to the QDs.

In summary, both elemental and molecular detection are required to interpret correctly the SEC chromatograms obtained and, therefore, to appropriately characterize water-soluble QDs, their bio-conjugation reaction to proteins and their final correct purification.

Elemental information provides stoichiometry (elemental ratios) and recovery, but fluorescence is still required to assure that QDs are not degraded (*i.e.* they show an intense emission at 600 nm (core), accompanied by some at 332 nm (polymer coating)).

In fact, the information given by the integrated techniques reveals the great importance of the ZnS shell in the stable attachment of a polymer coating over the QD surface. Effectiveness of the bio-conjugation of the water-soluble QDs to a given antibody can be assessed by the combination of the information given by the fluorescence and by elemental mass spectrometry techniques. For appropriate characterization of tailored bio-conjugated QDs, evaluation of the bio-conjugate stoichiometry is needed and information from the ICP-MS could again play a pivotal role in those studies. The approach and results provided in this work open the door to get such goals in a much more efficient way than non-conclusive approaches currently applied (such as slight blue shifts at the maximum emission wavelength).<sup>4</sup>

## Acknowledgements

The authors are grateful for financial support of the Spanish Ministry of Education and Science, MEC (CTQ2006-02309), and FEDER program co-financing funds. L. T. A. and A. R. M. B. acknowledge the FPU program scholarship of the Spanish Education Ministry.

## Notes and references

- 1 X. Huang, J. Weng, F. Sang, X. Song, C. Cao and J. Ren, *J. Chromatogr., A*, 2006, **1113**, 251.
- 2 Q. Huo, *Colloids Surf., B*, 2007, **59**, 1.
- 3 M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro and A. Sanz-Medel, *Analyst*, 2008, **133**, 444.
- 4 M. Dybiec, G. Chornokur, S. Ostapenko, A. Wolcott, Z. Zhang, A. Zajac, C. Phelan, T. Sellers and D. Gerion, *Appl. Phys. Lett.*, 2007, **90**, 263112; G. Chornokur, S. Ostapenko, E. Oleynik, C. Phelan, N. Korsunskaya, T. Kryshchak, J. Zhang, A. Wolcott and T. Sellers, *Superlattices Microstruct.*, 2009, **45**, 240.
- 5 A. R. Montoro Bustos, J. Ruiz Encinar, M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro and A. Sanz-Medel, *Chem. Commun.*, 2009, 3107.
- 6 B. Zhang, X. Liang, L. Hao, J. Cheng, X. Gong, X. Liu, G. Ma and J. Chang, *J. Photochem. Photobiol., B*, 2009, **94**, 45.
- 7 E. E. Lees, M. J. Gunzburg, T.-L. Nguyen, G. J. Howlett, J. Rothacker, E. C. Nice, A. H. A. Clayton and P. Mulvaney, *Nano Lett.*, 2008, **8**, 2883.
- 8 G. Vicente and L. A. Colón, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 1988.
- 9 M. Pereira and E. P. C. Lai, *J. Nanobiotechnol.*, 2008, **6**, 10.
- 10 H. Feng, W. S. Law, L. J. Yu and S. F. Y. Li, *J. Chromatogr., A*, 2007, **1156**, 75.

Supplementary Material (ESI) for Nanoscale  
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

**Supporting information for:**

**New integrated elemental and molecular strategies as  
diagnostic tool for the quality of water soluble  
quantum dots and their bioconjugates**

*Laura Trapiella Alfonso, Antonio R. Montoro Bustos, Jorge Ruiz Encinar, José M. Costa-Fernández, Rosario Pereiro and Alfredo Sanz-Medel.\**

Department of Physical and Analytical Chemistry. Julián Clavería 8, 33006, Oviedo, Spain.

\* E-mail: asm@uniovi.es

**Experimental Section:**

**Chemicals and Materials:**

All reagents were analytical grade and used as received without further purification.

*Synthesis of QDs*

The CdSe and CdSe/ZnS Quantum Dots (QDs) conjugated to bio-molecules are synthesized in our lab *via* the organometallic route described by Peng's group.<sup>1</sup> Selenium (powder, 100 mesh, 99.99%), cadmium oxide (99.99%), hexamethyldisilathiane, diethylzinc solution 1.0M in hexane, trioctylphosphine (TOP, 90%) and trioctylphosphine oxide (TOPO, 99%) were purchased from Sigma Aldrich (Milwaukee, WIS, USA) and hexylphosphonic acid (HPA) was obtained from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). The methanol HPLC gradient grade and chloroform anhydrous ( $\geq 99\%$ ) used to purify the synthesized QDs were from Prolabo (Leuven, Belgium) and Sigma Aldrich respectively. Finally, we stored the QDs in chloroform anhydrous solution at room temperature in the dark.

*QDs solubilisation*

To perform the solubilisation of QDs we coated them with an amphiphilic polymer that was also synthesized in our lab. The precursors used poly(isobutylene-alt-maleic anhydride),



Supplementary Material (ESI) for Nanoscale  
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

dodecyl amine and tetrahydrofuran anhydrous (THF) were purchased from Fluka and Sigma Aldrich respectively. The crosslinker bis(6-aminohexyl)amine (Fluka) used to close the polymer coated had to be stored at 4 °C. The solubilised QDs were stored in a borate buffer solution (SBB) at pH 12.

#### *Bio-conjugation*

To carry out the bio-conjugation the pH of QDs has to be changed. For such purpose, a 100KDa Amicon Ultra filter purchased in Millipore (Billerica, MA, USA) was loaded with an appropriate volume of the QDs stock solution (pH=12), and centrifuged at 5000 rpm (for most of the solvent removal). Then, the remaining solution was diluted with a 10mM phosphate buffer (PBS) at pH 7.4. The protein attached to the QDs was mouse anti-progesterone monoclonal antibody 1mg/mL in PBS pH 7.4 from AbD-Serotec. The ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) 191.70 g/mol purchased in Fluka, used as pseudo-catalyst in the reaction, have to be stored at -18°C in the freezer. We prepare a solution 0.01M in PBS pH 7.4 and add to the mixture of protein and QDs to be conjugated.

#### **Instrumentation:**

A heating mantle with energy heater control (JP Selecta, Barcelona, Spain), with simultaneous stirring was employed to carry out the QDs synthesis. To keep a constant argon atmosphere inside the flask, a needle with a 20 mL/min argon flow was used.

To purify the bio-conjugates size exclusion chromatography (SEC) was selected to achieve the separation of the bio-conjugate from free protein and QDs. A column Superdex 200 10/300 GL from GE Healthcare Bio-Sciences AB (Sweden) was used. This column was coupled to three different detectors in order to get as much information as possible to characterize the reaction, purify the bio-conjugate, and finally to evaluate the chromatographic behaviour of both types of QDs. The mobile phase used in SEC was an ammonium bicarbonate solution 100mM at pHs 10.5 and 7.4. The detectors used are described below.

UV/VIS detection was performed using Agilent 1100 series HPLC equipment (Agilent Technologies, Waldbrom, Germany) The experimental conditions optimized to achieve the best possible separation are collected in the Table S1.

Supplementary Material (ESI) for Nanoscale  
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

<b>HPLC Agilent 1100 series – Superdex 200 SEC column</b>	
Flow (mL/min)	0.750
Pressure (bar)	18
Injection Volume (μL)	50
Chromatogram time (min)	50
Monitored Wavelengths (nm)	214; 254; 280; 587
Mobile Phase	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 100mM pH 7.4

**Table S1:** Experimental conditions for the SEC-UV/VIS set-up.

More specific detection was achieved with the Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrometer (Varian Iberica, Madrid, Spain) equipped with xenon discharge lamp (peak power equivalent to 75 KW), Czerny-Turner monochromators and photomultiplier tube detector with Model R-298. The control program and data processing, Cary Eclipse, operates under Windows. This detector was coupled to HPLC equipment composed of a high pressure pump equipped with a pressurized chamber at low pressure (Shimadzu LC-10AD, Shimadzu corporation, Kioto, Japan) and a Rheodyne injection valve model 7725 (Coati, CA, USA) with an injection loop of 50μL. A Hamilton syringe of 250 μL were use to inject the samples. The optimal conditions to monitoring the purification are exposed in Table S2.

<b>Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrometer</b>	
Flow (mL/min)	0.750
Pressure (bar)	8
Injection Volume (μL)	50
Excitation wavelengths (nm)	280 (proteins); 350 (QDs)
Emission wavelengths (nm)	
Slits	10/20
PMT (v)	800
Ave time (s)	0.1
Chromatogram time (min)	40
Mobile phase	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> 100mM pH 10.5; 7.4

**Table S2:** Experimental conditions for the SEC-Fluorescence set-up.

Elemental measurements were carried out on a high resolution double focussing ICP-MS Thermo Finnigan Element2 (Thermo Electron, Bremen, Germany). The sample introduction system consisted of a concentric Meinhard nebuliser with double-pass glass spray chamber Scott type which works at room temperature. The experimental conditions are collected in Table S3.

Supplementary Material (ESI) for Nanoscale  
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

Experimental conditions of ICP-MS	
Power applied	1350W
Cooling gas flow	15.50L/min
Sample gas flow	0.901L/min
Auxiliary gas flow	0.90L/min
Data acquisition in the ICP-MS	
“Settling Time”	0.001-0.300s*
“Mass Window”	100
Integration time	0.060s
Points per peak	12
“Runs”	1200
“Passes”	1

**Table S3:** Experimental conditions for the SEC-ICP-MS set-up.

#### Procedures:

##### *Bio-conjugation of quantum dots to proteins*

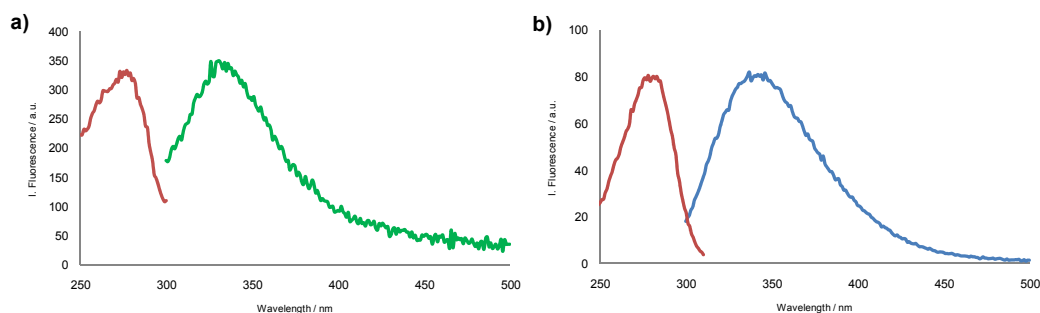
The CdSe/ZnS QDs were synthesised and water-solubilised (by coating the nanoparticles with an amphiphilic polymer synthesized in our laboratory), following a procedure previously described.<sup>2,3</sup> Then, the water-soluble QDs were bioconjugated to mouse anti-progesterone antibodies. The protocol used to attach QDs to bio-molecules is based on EDC chemistry.<sup>4</sup> Briefly, the conjugation of QDs to the desired bio-molecule is achieved by bonding the carboxylic groups from the polymer coating of the nanoparticles to the amino groups of the antibodies using EDC as a catalyst. This reaction is performed at room temperature with constant stirring for 2 hours. After the conjugation, a purification step is needed to separate the bio-conjugates from the excess of reagents and lateral products.

##### *Transmission Electron Microscopy (TEM).*

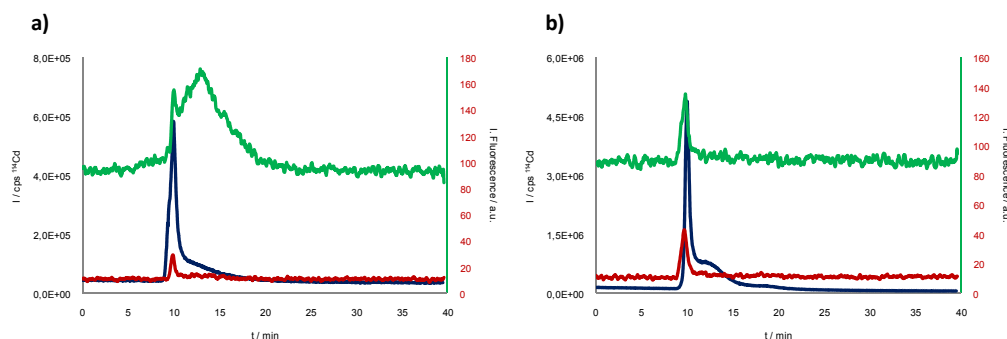
Samples for TEM characterization were deposited onto copper TEM grids (3 mm of diameter) coated with thin carbon films. 10  $\mu$ L of each fraction collected by SEC and dissolved

Supplementary Material (ESI) for Nanoscale  
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

in  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 10.4 buffer solution were placed on a grid followed by vacuum solvent evaporation. The grids were examined in a JEOL 2000 EXII high-resolution electron microscope operating at 160 kV.

**Supplementary Figures**

**Figure S1.** Fluorescent spectra of the amphiphilic polymer used for solubilization of QDs (a) and antibody anti-progesterone (b), both in aqueous media. Scans were collected using the following conditions: slit 10/10 nm and PMT 600 V. As it can be see the fluorescent emission of both species overlap.



**Figure S2.** Chromatographic behaviour of CdSe (a) and CdSe/ZnS PQDs (b) in a  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100mM buffer solution at pH 7.4. The  $^{114}\text{Cd}$  signal from ELEMENT ICP-MS is represented in blue; Red lines correspond to the characteristic fluorescence emission of QDs (600nm) while in green the fluorescence emission of polymer at 332nm is collected. It can be observed that at this pH all elemental cadmium appears in a single peak (10min). Furthermore, in both cases the three signals are correlated, indicating that the nanoparticles detected are well coated and not degraded. Unfortunately, recovery from the SEC column is low, thus it appears that the eventually degraded QDs are not eluting under such experimental conditions.

Supplementary Material (ESI) for *Nanoscale*  
This journal is © The Royal Society of Chemistry 2011

---

1 A. Peng and X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 183.

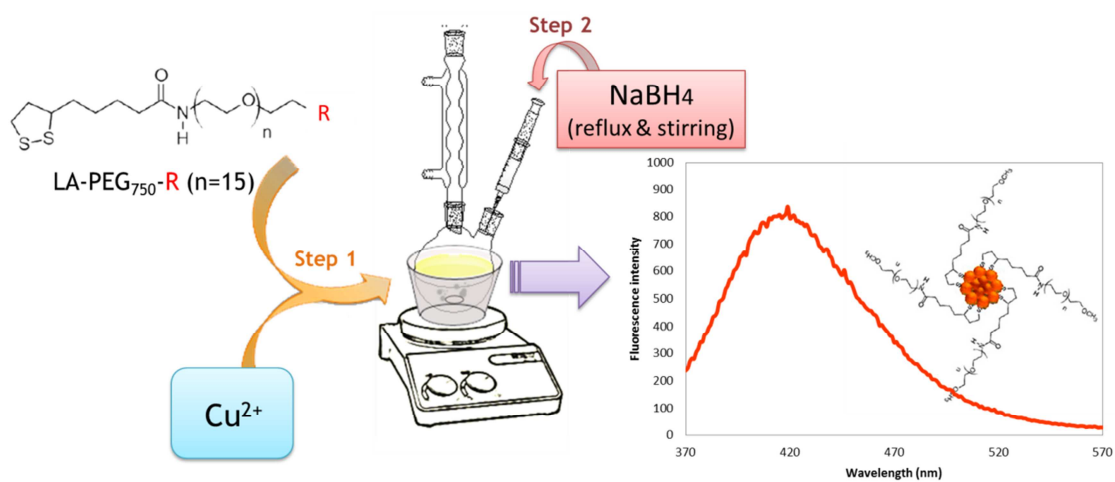
2 A.R. Montoro Bustos, J. Ruiz Encinar, M.T. Fernández-Argüelles, J.M. Costa-Fernández and A. Sanz-Medel, *Chem. Commun.*, 2009, 3107

3 M.T. Fernández-Argüelles, A. Yakovlev, R.A. Sperling, C. Luccardini, S. Gaillard, A. Sanz Medel, J.M. Mallet, J.C. Brochon, A. Feltz, M. Oheim and W. Parak, *Nano Lett.*, 2007, **7**, 2613.

4 B. Sun, W. Xie, G. Yi, D. Chen, Y. Zhou and J. Cheng, *J. Immunol. Methods*, 2001, **249**, 85.

## VIII.2. One-step Aqueous Synthesis of Fluorescent Copper Nanoclusters by Direct Metal Reduction (*submitted to Chemistry of Materials, 2013*)

Mónica Fernández-Ujados, Laura Trapiella-Alfonso, José M. Costa-Fernández, Rosario Pereiro, Alfredo Sanz-Medel



# **One-Step Aqueous Synthesis of Fluorescent Copper Nanoclusters by Direct Metal Reduction**

Mónica Fernández-Ujados, Laura Trapiella-Alfonso (✉), José M. Costa, Rosario Pereiro, Alfredo Sanz-Medel (✉).

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julian Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

(✉) [asm@uniovi.es](mailto:asm@uniovi.es)

(✉) [trapiellalaura@uniovi.es](mailto:trapiellalaura@uniovi.es)

## **Abstract**

A one-step aqueous synthesis of highly fluorescent water soluble copper nanoclusters (CuNCs) is here described, based on direct reduction of the metal precursor with  $\text{NaBH}_4$  in the presence of bidentate ligands (made of lipoic acid anchoring groups, appended with a poly(ethylene glycol) short chain). A complete optical and structural characterization was carried out: the optical emission was centered at 416 nm, with a luminescence quantum yield in water of 3.6% (the highest one reported in water for this kind of nanoclusters). The structural characterization reveals a homogeneous size distribution (4 nm of diameter) with spherical shape. The obtained CuNCs offer long-term stability (luminescence emission remained unaltered after more than 2 months) in a wide broad range of chemical conditions (e.g. stored at pH 3-12 or even at a high ionic strength media as 1 M NaCl) and high photostability, keeping their fluorescence emission intact after more than 2 hours of daylight and UV-light exposition. All those advantageous features warrant the synthesized CuNCs as promising fluorescent nanoprobe for further developments including bioanalytical applications.

## **Keywords**

Copper nanoclusters, fluorescence, synthesis, direct metal reduction, PEG ligands, HRTEM



## 1. Introduction

Inorganic nanoclusters (NCs) have attracted great attention in recent years because of their singular spectroscopic and chemical properties [1] which allow several interesting applications (e.g. sensing [2-7], biolabelling [8-10], bioimaging [11,12]). Being NCs formed by tens of atoms, their states densities are low enough to be exempt from Surface Plasmon Resonance features which bigger nanoparticles exhibit. NCs display discrete energy electronic levels and a molecular optical absorption and emission resemblance. Depending on the size of the NC, photoluminescence can be tuned from near-infrared (NIR) to ultraviolet (UV) exhibiting relatively high quantum yields (QYs) [13-15]. Other advantages include their less toxicity compared with other metal nanoparticles such as typical quantum dots [16] and high photostability.

Gold and silver nanoclusters (AuNCs, AgNCs) are the most widely studied nanoclusters so far and, therefore, their synthesis from different routes has been reported and compared in various recent reviews [17,18]. More recently, a significant research activity has been carried out on synthesis and applications of copper nanoclusters because, in principle, it is expected they present low toxicity as compared to other most studied metal nanoparticles. However, very few reports on copper nanoclusters have been published up to date mainly due to their susceptibility to oxidation and the difficulty in preparing very small Cu-based particles. The very first review on CuNCs synthesis dates from 2012 [19] and summarizes several methods that have already been successfully developed to synthesize copper nanoclusters. The first report on CuNCs dated from 1998. Authors make use of polyamidoamine dendrimer templates to control the CuNCs size distribution and the core diameter, encapsulating the copper atoms [20,21]. Years later, in 2009, a water-in-oil microemulsion was used as means for CuNCs synthesis where NC size can be controlled by the amount of employed reducing

agent, without using stabilizers [22]. In 2010, an electrochemical synthesis of CuNCs was developed using a Cu sheet in the presence of a surfactant [14]. In 2011, several CuNCs syntheses were reported. Beginning with a modified Brust-Schiffin one-pot wet chemical reduction method, CuNCs are synthesized using an UV lamp and 2-mercapto-5-n-propylpyrimidine as protector ligand [23]. Later on, a microwave-assisted polyol synthesis was performed under N<sub>2</sub> atmosphere using neither protection ligands nor reducing agents [24]. Also in 2011, a strategy based on an electrostatically induced reversible phase transfer method with the ligand glutathione in organic phase was published [25]. In 2012 the use of a mixture of polymers, poly(methacrylic acid) and pentaerythritol tetrakis(3-mercaptopropionate), as capping agent in a photoreductive method was reported [26]. In the literature two more CuNCs synthesis methodologies are described: one uses BSA as capping agent to develop a sensor of Pb<sup>2+</sup> in water [6]; the second work deals with CuNCs and CdNCs synthesis using an artificial peptide with CCCYYY amino acid sequence and those NCs are proposed as molecular tags for multiplexed stripping voltammetry of marine toxins in seafood. That peptide was intended as a self-oxidant protective ligand in alkaline conditions [27].

In all the above methods, a tendency to producing non-polar CuNCs is observed, and this constitutes a drawback for aqueous biological applications. The only exception could be the electrochemical synthesis: CuNCs made following this route might be soluble in polar and non-polar solvents, but sensitivity is higher in non-aqueous ones and a patented special set-up is required [28]. Furthermore, in spite of the fact that polar and non-polar dendrimers and surfactants might be used for producing CuNCs, the experiments have been developed only with non-polars. On the other hand, synthetic methods including the electrostatically induced reversible phase transfer [25,28], the self-oxidant peptide [27] and the photoreduction [26], which offer the possibility of

producing aqueous CuNCs, involve rather uncommon and expensive reagents, along with more complicated synthetic routes or instrumentation. Finally, using the synthetic approaches mentioned above the quantum yields (QYs) achieved were ranging from 0.15 to 3.5 in organic solvents and systematically lower than that in aqueous media.

Modular ligands made of lipoic acid (LA) and a functional group (i.e. -OCH<sub>3</sub>, -COOH, -NH<sub>2</sub>), each one attached to an end of a tunable length of polyethylene glycol (PEG) segment, have been already used for water-monodisperse AgNCs synthesis based on direct metal reduction in the presence of a proper ligand [29]. The main advantage afforded by modular ligands is the NC stability in a wide range of pH, providing the possibility of accomplishing goals in a vast extent of samples. However, unfortunately AgNCs present poor photostability [29].

In this context, it is clear that, nowadays, a general, versatile and simple route for NCs synthesis of different metal core identity is demanded. Moreover, in order to allow further bioanalytical applications water-solubility and biocompatibility of the synthesized nanoclusters is desired. Therefore, in this report we investigate the possibility of carrying out the synthesis of fluorescent CuNCs based on direct reduction of the metal ions in aqueous media containing PEG ligands.

## **2. Experimental**

### *2.1 Reagents and materials*

All reagents were used as received without further purification except for LA-PEG<sub>750</sub>-OCH<sub>3</sub> ligand that was synthesized in our lab according to Mattoussi *et al.* [30]. Deionised ultrapure water (resistivity 18.2 MΩ/cm) was used throughout the work.

For the synthesis of copper nanoclusters 50 mM solution of CuCl<sub>2</sub> (Acros Organics-Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium) or CuSO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) were

tested as metal precursors and 625 mM solution of sodium boron hydride (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WIS, USA) was used as reducing agent. The necessary materials to carry out the synthesis of CuNCs were two-necked bottomed round flask equipped with a reflux system and a magnetic stirrer.

To make the pH stability tests a phosphate solution at different pH was used. Those pHs were adjusted with NaOH or HCl according to the required pH. NaCl from Prolabo (Leuven, Belgium) was used for the study of CuNCs stability in high saline media.

### *2.2 Instrumentation*

Luminescent measurements were carried out using a Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Varian, U.S.) and optical absorption spectra was accomplished with a Genesys 10S UV-VIS Spectrophotometer (Thermo Scientific, U.S.). High-Resolution Transmission of Electron Microscopy (HRTEM) images were taken with a JEOL JEM-2100F (Tokio, Japan) that reaches resolutions of 2.3 Å between points and 1.0 Å between lines. It is equipped, among others, with a CCD camera of high resolution (Gatan), a microanalyzer by Energy Dispersive X-ray (EDX) that allows the detection and quantification of the elements present in the sample and a unit of Scanning Transmission Electron Microscope (STEM) with detectors of bright field (BF) and dark field (DF) which provides composition maps from the samples. The Dispersion Light Scattering (DLS) results were obtained with a Zetasizer NanoZS instrument (Malvern Instruments LTD, Worcestershire, UK).

### 2.3 Protocols

#### 2.3.1 Synthesis of CuNCs

In a typical synthesis of CuNCs 250  $\mu\text{L}$  of 5 mM  $\text{CuCl}_2$  (aq), 150  $\mu\text{L}$  of 50 mM LA-PEG<sub>750</sub>-OCH<sub>3</sub> and 3 mL of ultrapure milli-Q water were put into a two-necked bottomed round flask equipped with a reflux system. After 10 minutes of reflux with magnetic stirring, 50  $\mu\text{L}$  of 625 mM  $\text{NaBH}_4$  (aq) is incorporated. So, the final molar ratio between the precursors Cu:ligand:reducing agent is 1:6:25. The reaction was left under these conditions during 48 hours till obtain good quality CuNCs.

#### 2.3.2 Measurement of quantum yield

The QY of CuNCs in water was measured using quinine sulfate dissolved in 0.1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  as the standard (ST). The following equation was used to calculate the final value

$$\text{QY}_{\text{CuNC}} = \text{QY}_{\text{ST}} \left( \frac{I_{\text{CuNC}}}{I_{\text{ST}}} \right) \left( \frac{A_{\text{ST}}}{A_{\text{CuNC}}} \right) \left( \frac{\eta_{\text{CuNC}}}{\eta_{\text{ST}}} \right)^2 \quad (\text{equation 1})$$

where I, A and  $\eta$  are the integrated emission intensity, absorbance at excitation wavelength, and refractive index of the solvent, respectively. The QY reported for the quinine sulfate is 58% and, as the solutions are in aqueous media,  $\eta$  is 1. So, with the absorbance and fluorescence measurements of the CuNCs and the ST it can be obtained the QY of our CuNCs by applying equation 1.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Optimization of the synthetic route for CuNCs

Several protocols were carried out before finding a successful synthetic route. The first one was based on Muhammed *et al.* synthesis [29], where AgNCs were synthesized at room temperature. As the studied CuNCs were not formed under such experimental

conditions, some modifications of that synthesis were tested: (1) use of an ice bath, (2) soft heating (warming at 25°C and 50°C); (3) reaction at 100 °C under reflux. In the three cases basic and acidic media and different concentrations of reducing agent, were assayed. A successful synthesis approach turned out to be a reaction under reflux in Milli-Q water with magnetic stirring where small CuNCs (around 4 nm of diameter size average) were obtained. A scheme of the proposed synthetic route is shown in Figure 1. It should be stressed the importance of the temperature and the reaction time in the successful CuNCs synthesis (see Figure 2). Signals corresponding to 60 hours were registered, being 48 hours selected as optimal reaction time for this synthesis of CuNCs, because at longer reaction times no appreciable increase in the fluorescence intensity was registered. As it is shown in Figure 2 a blank of the reaction (emission signals in light grey) was carried out in parallel to ensure that the fluorescence of the final product comes from the Cu-nanostructure.

In this modified synthesis by direct reduction in aqueous media under reflux, two metal precursors were checked, CuCl<sub>2</sub> and CuSO<sub>4</sub>. The best results were achieved with CuCl<sub>2</sub> (see Figure S1 in Electronic Supporting Material, ESM). Muhammed *et al.* found AgNCs formation from 1:1 to 1:10 metal:ligand ratio [29]. Therefore, three different ratios were assayed here (1:2, 1:6 and 1:10) and the highest fluorescence emission was observed at 1:6 Cu:ligand ratio with a maximum emission wavelength centered at 416 nm (see Figure S2).

### 3.2. Optical and structural characterization of the synthesized CuNCs

Once all the experimental parameters involved in the synthesis had been optimized the optical and structural characterization of the synthesized CuNCs was performed. For optical characterization, absorbance and fluorescence spectra were collected and

measurements of QYs were performed using a solution of quinine sulfate (dissolved in 0.1 M of  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) as standard of reference. No characteristic absorbance was found in the Vis region, while a continuous absorption was observed from 400 nm to lower wavelengths, with absorbance increasing the lower the wavelength (see Figure 3A, line in black). On the other hand, using different excitation wavelengths, it was possible to register three fluorescent emission peaks centered at 300, 416 and 590 nm (see Figure S3). The main fluorescent peak is the one centered at 416 nm as it is shown in Figure 3B, line in black. Although, in principle, we could excite at any lower wavelength (different wavelengths were tried ranging from 220-350 nm) the best wavelength for excitation is 320 nm in order to avoid Rayleigh dispersion. So, the principal excitation/emission pair for CuNCs turned out to be 320/416 nm. The other two emission wavelengths, 300 and 590 nm, should not be taken into account as analytical signal from the CuNCs because they come from the ligand. This fact was corroborated by performing “a blank of the synthesis” where all reagents were introduced except the metal precursor. As it is shown in Figure S3 (line in light grey), the blank of reaction exhibited two emission peaks at 300 and 590 nm that correspond to emission from the ligand. Finally, the QY of the CuNCs in water was evaluated by following the steps described in the Experimental section. The obtained value was 3.6% (a QY higher than the average values found in the literature for such kind of NCs).

Structural/composition information about those synthesized CuNCs was gathered with different common used characterization techniques including HRTEM, DF-STEM, EDX and DLS. Such experiments indicated that comparatively bright CuNCs were obtained having a homogeneous size distribution (diameter size of 4 nm), as shown in Figure 4 from HR-TEM and DF-STEM images. Furthermore, from the EDX analysis (that provides the local composition of the marked regions in the image of DF-STEM in

Figure 4B) the elemental constituents of the NCs were confirmed: Cu is the core metal and C, O and S are present in the ligand structure, in agreement with the expected theoretical composition (see Figure S4). Finally, DLS analysis of some aliquots taken out of the synthesis beaker at different reaction times (7 and 24 h) was carried out to evaluate the homogeneity and evolution of the formed nanostructure. As shown by Figure S5 of the ESM, the size of the nanostructure decreases with reaction time. This observation provides an important piece of information in relation with the mechanism of the CuNCs synthesis: first, a bigger nanostructure (possibly the metal nanoparticle) is formed which then breaks down to smaller but thermodynamically stable species, the nanocluster. This result agrees with similar findings previously found for AgNCs [29]. Other evidence to be remarked is that in both aliquots we registered only one DLS band, suggesting that there is eventually only one size-population, that is, we obtain a considerable homogeneity of the CuNCs by the here modified synthetic route.

### 3.3. *Stability tests studies of CuNCs*

To conclude the characterization, photostability, long-term storage and stability in a wide range of chemical conditions (pH and ionic strength) of the new synthesized fluorescent nanoclusters were investigated. In this way, valuable information on manipulation protocols and possible analytical applications can be gathered.

Different experiments were carried out to assess the photostability. Thus, two different aliquots were exposed (1) to daylight and (2) to UV-light. As shown in Figure 5A, no significant variation on the fluorescent emission was registered after more than 2 hours of continuous exposition of the nanomaterials to the light, proving the high photostability of the CuNCs. Furthermore, in a parallel experiment the aliquots exposed to light were stored and periodically measured, showing that the photoirradiation did not



cause any noticeable effect in the fluorescent emission (see Figure 5B). Therefore, we can conclude that synthesized CuNCs present a high photostability. On the other hand, once the synthesis was finished another aliquot was stored in the dark and measurements of its optical properties were periodically carried out. The CuNCs showed a good long-term stability, being stable for more than 2 months without appreciable loss of emission fluorescence (see Figure 5B).

Another two more stability tests were investigated: different aliquots were stored at different pH ranging from 3 to 12 using a phosphate saline buffer and other aliquot was stored in a high saline concentration (1 M NaCl). The results found are collected in Figure 5C. It can be seen that CuNCs were stable under all pHs assayed (highest fluorescence intensities in basic media, pH 7-12). Ionic strength was not so influential and high values of NaCl concentrations secured constant emission for at least 2 months.

#### **4. Conclusions**

A new simple approach for the synthesis of water-soluble, high fluorescent CuNCs is here proposed based on direct metal reduction under reflux in the presence of the PEGylated ligand. Experimental synthesis parameters including temperature, molar ratios of precursors and reaction times were optimized. The CuNCs here synthesized exhibit a long-term stability in a wide range of experimental conditions, they are photostable and they offer the highest QY (3.6%) reported so far for this kind of NCs in aqueous media. Moreover, the structural characterization results observed reveals a high homogeneity in size distribution of such CuNCs.

After this exhaustive and methodic characterization of the produced CuNCs indicate that their homogeneity, good photostability and high fluorescent emission, could be of great value as nanoproboscopes to be applied in varied fields (e.g. bioanalysis). Thus, the

simplicity of the methodology and the high valuable properties obtained, in comparison with other strategies proposed in the literature, should be stressed. In addition, the selection of a proper PEG-derivative ligand (e.g. providing a carboxylic group) will allow the *in situ* functionalization of the NCs, so making them compatible with the common coupling strategies to biomolecules (e.g. carbodiimide chemistry). In brief, CuNCs obtained as proposed here hold an unexplored but promising potential for bioanalytical applications (e.g. protein sensing, bio-imaging, multiplexing, etc.).

### Acknowledgments

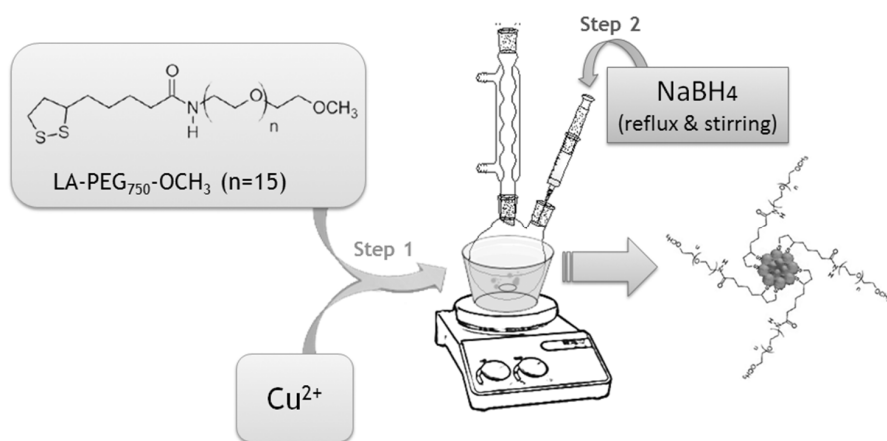
The authors are grateful for financial support by the Spanish Ministry of Education and Science (CTQ2010-16636 and MAT2010-20921-C02-01) and the European FEDER program. Also we express our gratitude to both the Hedi Mattoussi's Research Group at Florida State University (USA) for the supply of the functionalized ligand (TA-PEG-COOH) and the Organic Synthesis Research Group of the University of Oviedo for providing the equipment for the TA-PEG-OMe ligand synthesis. L.T.A. acknowledges the FPU program (Ref: AP2008-01504) from the Spanish Education Ministry for the pre-doctoral fellowship.

### References

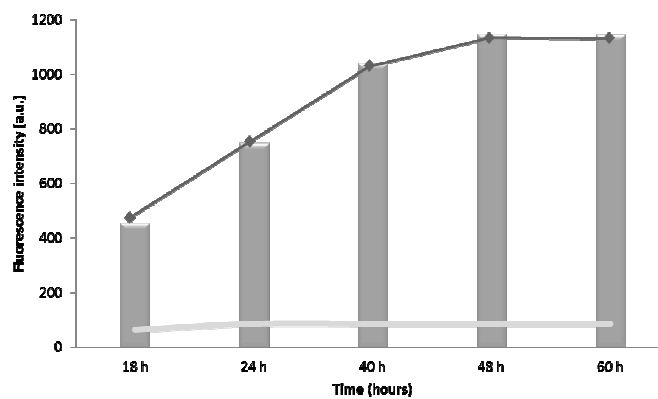
- [1] Lu, Y.; Chen, W. Sub-nanometre sized metal clusters: from synthetic challenges to the unique property discoveries. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 3594–3623.
- [2] Shiang, Y. C.; Huang, C. C.; Chang, H. T. Gold nanodot-based luminescent sensor for the detection of hydrogen peroxide and glucose. *Chem. Commun.*, **2009**, 3437–3439.
- [3] Wei, H.; Wang, Z. D.; Yang, L. M.; Tian, S. L.; Hou, C. J.; Lu, Y. Lysozyme-stabilized gold fluorescent cluster: Synthesis and application as Hg<sup>2+</sup> sensor. *Analyst*, **2010**, *135*, 1406–1410.
- [4] Shang, L.; Dong, S. J. Sensitive detection of cysteine based on fluorescent silver clusters. *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *24*, 1569–1573.

- [5] Huang, C. C.; Chen, C. T.; Shiang, Y. C.; Lin, Z. H.; Chang, H. T. Synthesis of fluorescent carbohydrate-protected Au nanodots for detection of concanavalin A and escherichia coli. *Anal. Chem.*, **2009**, *81*, 875–882.
- [6] Goswami, N.; Giri, A.; Bootharaju, M. S.; Xavier, P. L.; Pradeep, T.; Pal, S. K. Copper quantum clusters in protein matrix: potential sensor of Pb<sup>2+</sup> ion. *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, 9676–9680.
- [7] Durgadas, C. V.; Sharma, C. P.; Sreenivasan, K. Fluorescent gold clusters as nanosensors for copper ions in live cells. *Analyst*, **2011**, *136*, 933–940.
- [8] Richards, C. I.; Choi, S.; Hsiang, J. C.; Antoku, Y.; Vosch, T.; Bongiorno, A.; Tzeng, Y. L.; Dickson, R. M. Oligonucleotide-stabilized Ag nanocluster fluorophores. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 5038–5039.
- [9] Yu, J. H.; Choi, S.; Dickson, R. M. Shuttle-based fluorogenic silver-cluster biolabels. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, *48*, 318–320.
- [10] Lin, C. A. J.; Yang, T. Y.; Lee, C. H.; Huang, S. H.; Sperling, R. A.; Zanella, M.; Li, J. K.; Shen, J. L.; Wang, H. H.; Yeh, H. I.; Parak, W. J.; Chang, W. H. Synthesis, characterization, and bioconjugation of fluorescent gold nanoclusters toward biological labeling applications. *ACS Nano*, **2009**, *3*, 395–401.
- [11] Yu, J.; Patel, S. A.; Dickson, R. M. In vitro and intracellular production of peptide-encapsulated fluorescent silver nanoclusters. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2007**, *46*, 2028–2030.
- [12] Retnakumari, A.; Setua, S.; Menon, D.; Ravindran, P.; Muhammed, H.; Pradeep, T.; Nair, S.; Koyakutty, M. Molecular-receptor-specific, non-toxic, near-infrared-emitting Au cluster-protein nanoconjugates for targeted cancer imaging. *Nanotechnology*, **2010**, *21*, 055103 (12pp).
- [13] Le Guevel, X.; Hötzer, B.; Jung, G.; Hollemeyer, K.; Trouillet, V. Formation of fluorescent metal (Au, Ag) nanoclusters capped in bovine serum albumin followed by fluorescence and spectroscopy. *J. Phys. Chem. C*, **2011**, *115*, 10955–10963.
- [14] Vilar-Vidal, N.; Blanco M. C.; López-Quintela, M. A.; Rivas, J.; Serra, C. Electrochemical synthesis of very stable photoluminescent copper clusters. *J. Phys. Chem. C*, **2010**, *114*, 15924–15930.
- [15] Sharma, J.; Yeh, H.-C.; Yoo, H.; J. Werner, H.; Martinez, J. S. A complementary palette of fluorescent silver nanoclusters. *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 3280–3282.
- [16] Zhang, X.-D.; Wu, D.; Shen, X.; Liu, P.-X.; Fan, F.-Y.; Fan, S.-J. In vivo renal clearance, biodistribution, toxicity of gold nanoclusters. *Biomaterials*, **2012**, *33*, 4628–4638.
- [17] Shang, L.; Dong, S.; Nienhaus G. U. Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications. *Nano Today*, **2011**, *6*, 401–418.
- [18] Díez, I.; Ras, R. H. A. Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale*, **2011**, *3*, 1963–1970.
- [19] Lu Y. Z.; Wei W. T.; Chen W. Copper nanoclusters: synthesis, characterization and properties. *Chin. Sci. Bull.*, **2012**, *57*, 41–47.
- [20] Zhao, M.; Sun, L.; Crooks, R. M. Preparation of Cu manoclusters within dendrimer templates. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 4877–4878.
- [21] Balogh, L.; Tomalia, D. A. Poly(amidoamine) dendrimer-templated nanocomposites. 1. Synthesis of zerovalent copper nanoclusters. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 7355–7356.
- [22] Vázquez-Vázquez, C.; Bañobre-López, M.; Mitra, A.; López-Quintela, M. A.; Rivas, J. Synthesis of small atomic copper clusters in microemulsions. *Langmuir*, **2009**, *25*, 8208–8216.

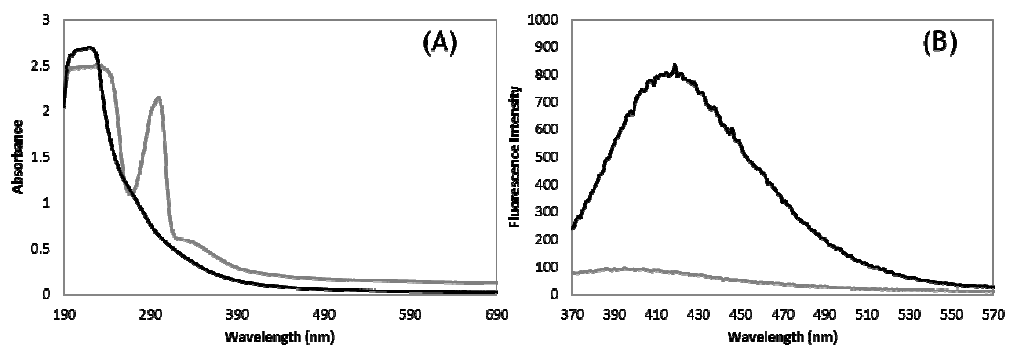
- [23] Wei, W.; Lu, Y.; Chen, W.; Chen, S. One-pot synthesis, photoluminescence, and electrocatalytic properties of subnanometer-sized copper Custers. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 2060–2063.
- [24] Kawasaki, H.; Kosaka, Y.; Myoujin, Y.; Narushima, T.; Yonezawa, T.; Arakawa, R. Microwave-assisted polyol synthesis of copper nanocrystals without using additional protective agents. *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 7740-7742.
- [25] Yuan, X.; Luo, Z.; Zhang, Q.; Zhang, X.; Zheng, Y.; Lee, J. Y.; Xie, J. Synthesis of highly fluorescent metal (Ag, Au, Pt, and Cu) nanoclusters by electrostatically induced reversible phase transfer. *ACS Nano*, **2011**, *5*, 8800–8808.
- [26] Zhang, H.; Huang, X.; Li, L.; Zhang, G.; Hussain, I.; Li, Z.; Tan, B. Photoreductive synthesis of water-soluble fluorescent metal nanoclusters. *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 567–569.
- [27] Zhang, B.; Hou, L.; Tang, D.; Liu, B.; Li, J.; Chen, G. Simultaneous multiplexed stripping voltammetric monitoring of marine toxins in seafood based on distinguishable metal nanocluster-labeled molecular tags. *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, *60*, 8974–8982.
- [28] (A) López-Quintela, M. A.; Rivas, J. Procedure for the synthesis of atomic quantum clusters. *Spanish Patent P200502041*, **2005**. (B) López-Quintela, M. A.; Rivas, J. Stable atomic quantum clusters, production method thereof and use of same. *Patent applications PCT/ES2006/070121*, **2006**, WO2007017550A1, **2007**.
- [29] Muhammed, M. A. H.; Aldeek, F.; Palui, G.; Trapiella-Alfonso, L.; Mattoussi, H. Growth of in situ functionalized luminescent silver nanoclusters by direct reduction and size focusing. *ACS Nano*, **2012**, *6*, 8950–8961.
- [30] Mei, B. C.; Susumu, K.; Medintz, I. L.; Mattoussi, H. Polyethylene glycol-based bidentate ligands to enhance quantum dot and gold nanoparticle stability in biological media. *Nature Protocols*, **2009**, *4*, 412–423.



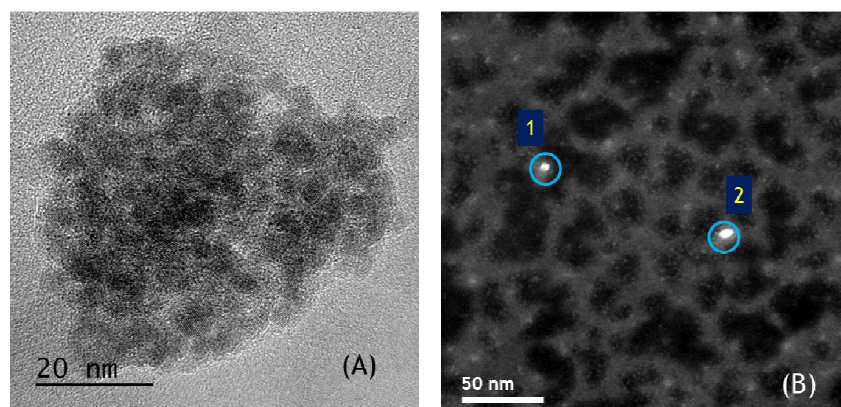
**Figure 1.** Schematic representation of the synthetic route of CuNCs in aqueous media by direct reduction of the metal ions under reflux.



**Figure 2.** Fluorescence emission (320/416 nm) time-dependent monitoring of the synthesis process of CuNCs (dark grey line and bars) and a blank of reaction (light grey line).

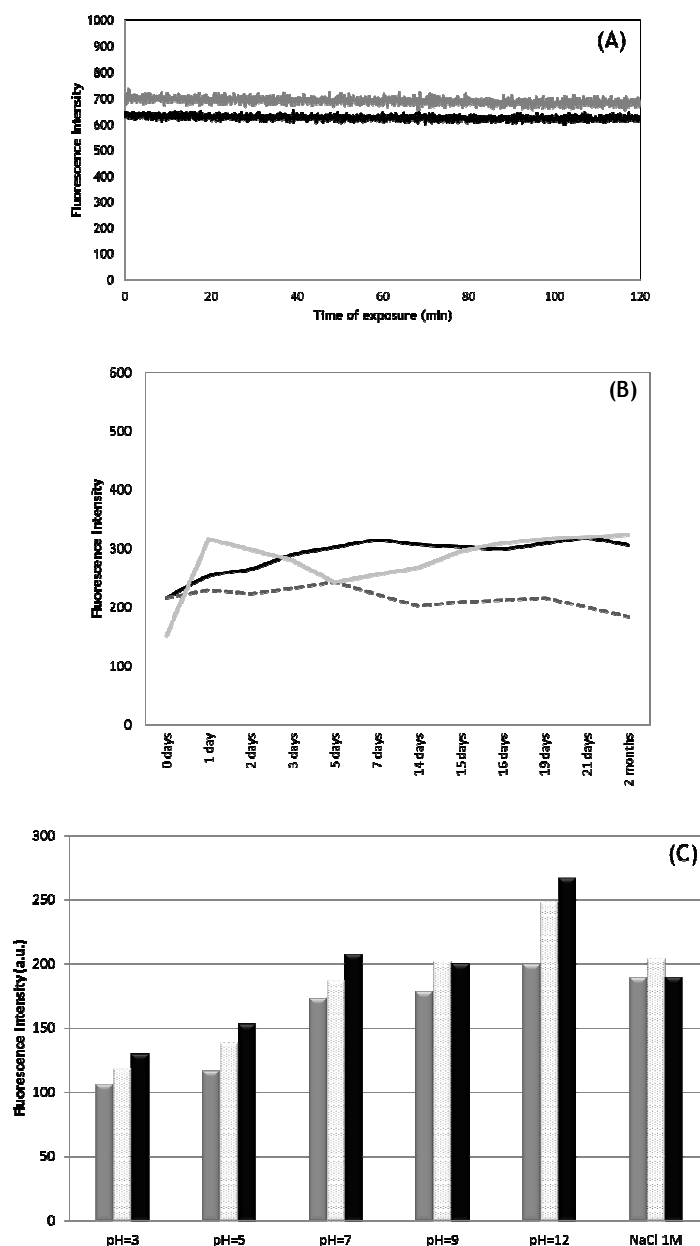


**Figure 3.** Optical features of synthesized CuNCs. A) Absorbance spectra of CuNCs (black line) and blank of reaction (grey line). B) Fluorescence emission spectra of CuNCs (black line) and blank of reaction (grey line) using 320 nm as excitation wavelength.

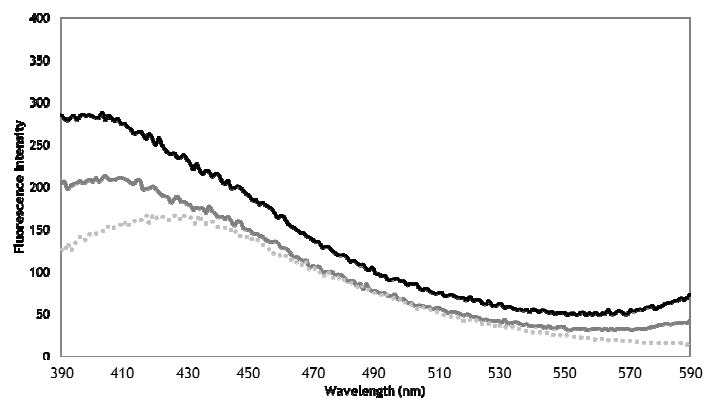


**Figure 4.** Structural characterization of CuNCs. A) HR-TEM image of CuNCs obtained after 48 hours of reaction; an average value of 4 nm were obtained as diameter size after the image analysis. B) DF-STEM image: CuNCs are represented as bright dots embedded into a light grey structure that represent the ligand coating. The two dots of CuNCs marked with “1” and “2” were further analyzed by EDX and the spectrum of the elemental analysis is collected in Figure S4 of the Supporting Information.

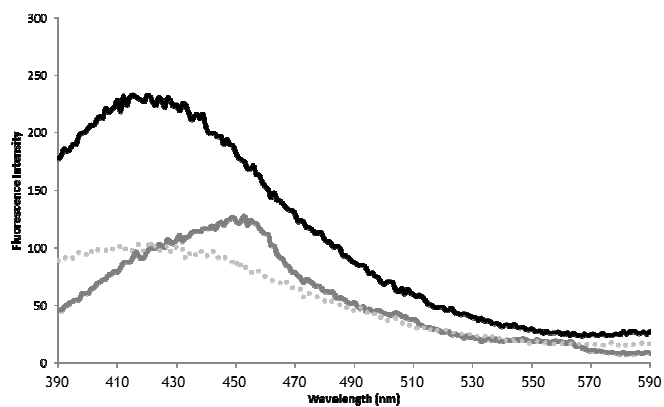




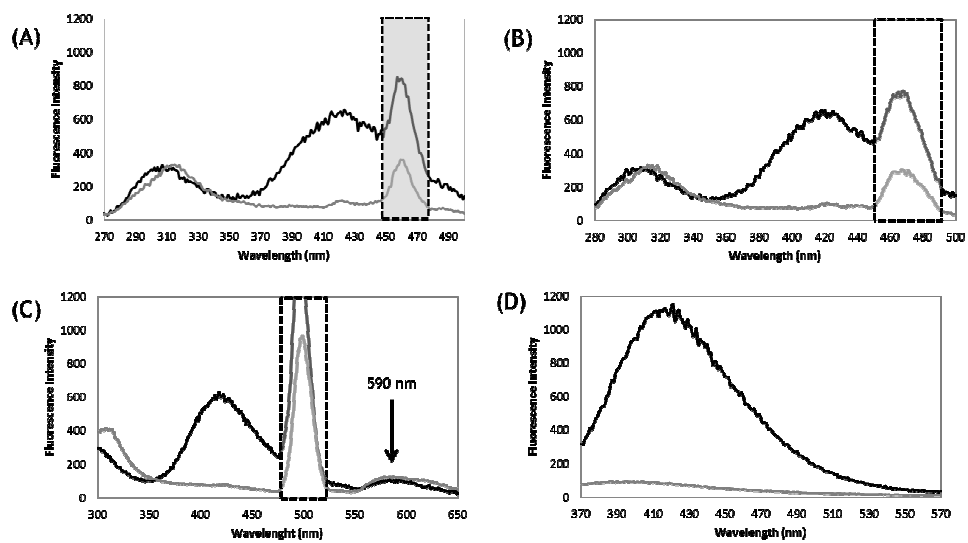
**Figure 5.** Stability tests. A) Fluorescence intensity of the CuNCs measured during continuous UV irradiation at 250 and 320 nm excitation wavelengths in grey and black respectively. B) Long-term stability of the CuNCs. This test was applied to an aliquot stored in the dark (black line), an aliquot UV irradiated for 2 h and stored in the dark (dotted line) and an aliquot exposed to natural light during 2 h and stored in the dark (grey line). C) pH stability and high ionic strength media test, newly synthesized (grey bars), after 16 days in the studied media (white bars) and after 2 months in the same media (black bars).



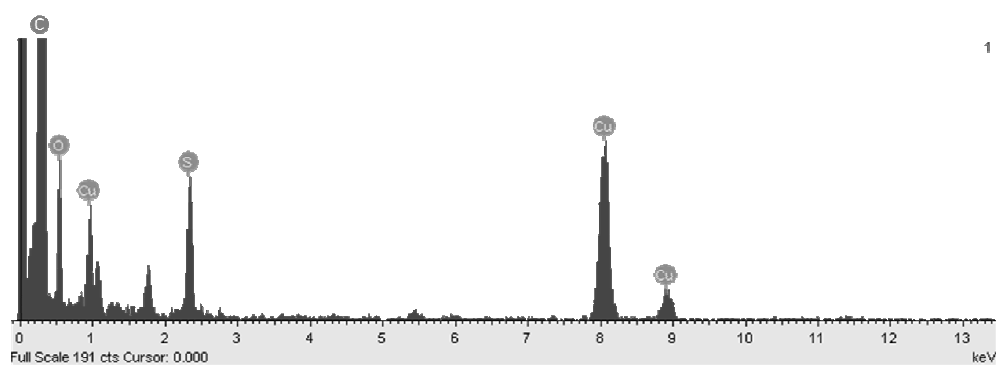
**Figure S1.** Evaluation of different copper precursors for the synthesis of CuNCs. Fluorescence spectra registered: dotted line for blank of reaction; grey line for CuSO<sub>4</sub>; and black line for CuCl<sub>2</sub>.



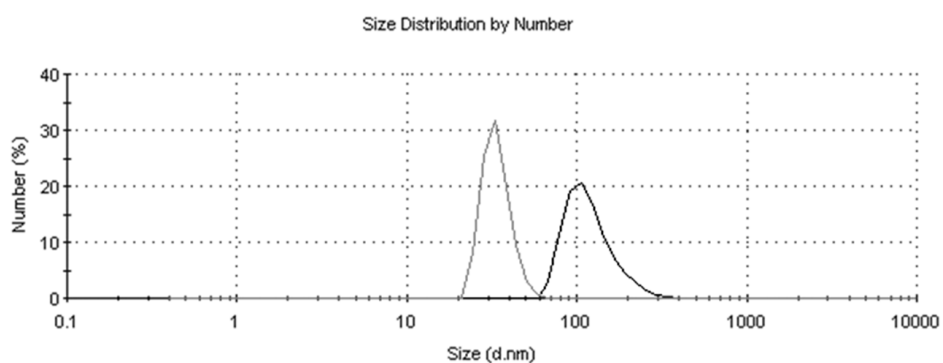
**Figure S2.** Metal:ligand molar ratio selection. The fluorescence spectra correspond to the samples obtained using the three different molar ratios assayed 1:2 (dotted line), 1:6 (black line), and 1:10 (grey line). Ratio 1:6 metal:ligand was selected as optimum.



**Figure S3.** Fluorescence emission spectra of the synthesized CuNCs (black line) along with a reaction blank (grey line) at different excitation wavelengths: 229 nm (A), 234 nm (B), 250 nm (C), and 320 nm (D). The emission band marked with a grey rectangle is the Rayleigh dispersion.



**Figure S4.** EDX spectrum of the CuNCs selected in the DF-STEM image from Fig. 4B. Here we can see the elemental composition, which agrees well with the expected one: Cu from metal core and C, O and S from the PEG ligand.



**Figure S5.** DLS analysis showing the homogeneity of the synthesis and size distribution at different reaction times 7 h (black line) and 24 h (grey line). These analyses also show how the synthesis of the CuNCs (grey line) goes through the previous formation of the corresponding metal nanoparticle (black line).