

ACTUALIDAD ANALÍTICA



BOLETÍN

de la

Sociedad Española de Química Analítica



2444-8818

Número 56, DICIEMBRE 2016

Nanopartículas semiconductoras fotoluminiscentes en el desarrollo de metodologías bioanalíticas y sensores

José M. Costa-Fernández, Diego Bouzas-Ramos

Departamento de Química Física y Analítica, Facultad de Química, Universidad de Oviedo, Avda. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, España

En 1999, con motivo de una visita del Prof. Sanz-Medel a la Universidad de Indiana (USA), en donde José M. Costa se encontraba de estancia postdoctoral, tuvo la oportunidad de conocer al Prof. Shuming Nie, quien por aquel entonces se encontraba trabajando en el Departamento de Química de dicha Universidad. El profesor Nie acababa de publicar en la revista Science uno de los trabajos pioneros en el campo de las bioaplicaciones de los Quantum Dots. Este tipo de nanopartículas presentaban un elevado potencial para el desarrollo de sensores fotoluminiscentes (una de las líneas de investigación del Grupo del Prof. Sanz Medel). Así, se inició en Oviedo una línea de trabajo orientada hacia la síntesis, caracterización y empleo de los Quantum Dots en el desarrollo de nuevas metodologías fotoluminiscentes de análisis y sensores. Hoy, 15 años más tarde, sigue siendo una de las líneas de trabajo del Grupo de Espectrometría Analítica de la Universidad de Oviedo.

1. Quantum Dots: nuevas marcas fotoluminiscentes

El desarrollo de metodologías bioanalíticas luminiscentes requiere frecuentemente del marcaje de los analitos previamente a la posterior detección de los mismos [1]. Una marca fotoluminiscente “ideal” sería aquella con elevada estabilidad, capacidad de absorber radiación en un amplio intervalo de longitudes de onda y poseer elevados rendimientos cuánticos de emisión. Desafortunadamente, las moléculas orgánicas típicamente empleadas como marcas fluorescentes sufren a menudo de problemas como fotodescomposición o bajas intensidades de emisión luminiscente. Una de las líneas de investigación más relevantes actualmente en la búsqueda de nuevos marcadores fotoluminiscentes con prestaciones superiores a los luminóforos convencionales es la síntesis y el empleo de nanopartículas (NPs) luminiscentes. Particularmente, los “Quantum Dots” (QDs), poseen unas propiedades optoelectrónicas especialmente atractivas [2], por lo que han sido ampliamente estudiados y aplicados en las últimas décadas en bioanálisis y para la construcción de una nueva generación de sondas ópticas.

Los Quantum Dots son nanocristales semiconductores fotoluminiscentes, generalmente constituidos por elementos pertenecientes a los grupos 12-16, 13-15 ó 14-16 de la Tabla Periódica, aproximadamente esféricos y con diámetros de partícula comprendidos en el intervalo entre 1–12 nm [2,3]. Debido a su pequeño tamaño (igual o inferior a las dimensiones del radio de Bohr del excitón del material), las propiedades de los QDs están gobernadas por efectos de confinamiento cuántico, presentando por ello un comportamiento optoelectrónico muy diferente al de los materiales macroscópicos correspondientes [3]. De

hecho, estos compuestos presentan una intensa emisión luminiscente con espectros de emisión estrechos y simétricos (anchuras de pico a la mitad del máximo de entre 15-40 nm). En comparación con los fluoróforos convencionales, los QDs tienen típicamente altos rendimientos cuánticos de fluorescencia y una mayor estabilidad frente a la pérdida de luminiscencia con el tiempo de exposición (*photobleaching*). Además, la longitud de onda de máxima emisión luminiscente que presentan los QDs puede ser sintonizada simplemente controlando adecuadamente el tamaño (diámetro de NP) y la naturaleza del nanocristal. La frecuencia de la luz emitida por un QD específico está relacionada directamente con su tamaño (**Figura 1**); las NPs más pequeñas tienden a emitir radiación más energética (menores longitudes de onda). Así, es posible sintetizar QDs que poseen una emisión luminiscente en un amplio intervalo espectral, desde el ultravioleta hasta el infrarrojo.

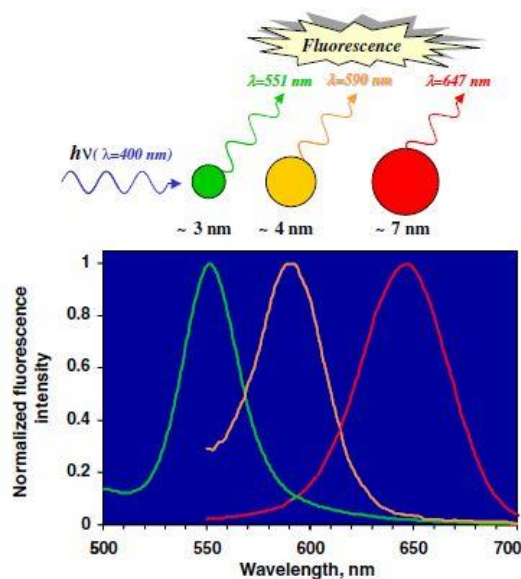


Figura 1. Espectros de fluorescencia de QDs de CdSe con distinto tamaño de partícula. El diámetro de las nanopartículas está sobre cada espectro de fluorescencia. Reproducida de la Ref. [12], con el permiso de Elsevier.

En 1998 los grupos de investigación de Alivisatos [4] y Nie [5] demostraron simultáneamente que es posible sintetizar QDs solubles en agua y biocompatibles a través de una apropiada modificación superficial de los nanocristales. También demostraron el gran potencial que tienen estas nanopartículas semiconductoras para ser usadas como biomarcadores fluorescentes. Desde entonces, se han desarrollado estrategias de síntesis capaces de generar QDs fluorescentes de alta calidad [6], siendo posible modificar su superficie mediante la bioconjugación de los

QDs con moléculas funcionalizadas apropiadas [7], asegurando su estabilidad en medios acuosos y posibilitando su uso en una amplia variedad de aplicaciones.

En esta línea, durante los últimos años, numerosos trabajos se han dirigido hacia la síntesis, funcionalización y uso de QDs fotoluminiscentes para aplicaciones bioanalíticas (p.ej. como marcas en bioanálisis y diagnóstico médico, como etiquetas fluorescentes en inmunoensayos, o como marcadores biocompatibles para estudios de imagen, *in-vitro* e *in-vivo*) [8]. Además, las extraordinarias propiedades luminiscentes que poseen los QDs hacen que estos hayan sido también empleados como “fluoróforos de nueva generación” en el desarrollo de sensores ópticos [9]. En este breve artículo se resumen algunos de los desarrollos y tendencias publicados hasta la fecha en el campo de las aplicaciones analíticas de los QDs.

2. Inmunoensayos basados en el empleo de QDs

Los QDs han sido extensivamente investigados como marcas en el desarrollo de inmunoensayos fluorescentes. En general, un inmunoensayo luminiscente se basa en la interacción específica de una molécula diana (*i.e.* un analito) con un anticuerpo de reconocimiento durante un tiempo de incubación apropiado. Dependiendo del formato de inmunoensayo, el anticuerpo de reconocimiento (anticuerpo primario) o un anticuerpo secundario (que se une al anticuerpo primario o de reconocimiento) debe marcarse con un marcador fluorescente (*p.ej.* un QD). La medida de la intensidad de luminiscencia del marcador fluorescente permite una cuantificación indirecta de la concentración del analito [10].

Empleando QDs como marcas se han desarrollado inmunoensayos fluorescentes de elevada sensibilidad para la cuantificación de diversas especies químicas como patógenos, proteínas y toxinas. Por ejemplo, en uno de los estudios iniciales, se ha desarrollado un inmunoensayo en un chip de vidrio para la detección de IgG humana [11]. El empleo de QDs como marcas fluorescentes permite conseguir una elevada sensibilidad y bajos límites de detección. En efecto, para la detección de la señal fluorescente de los QDs se empleó un microscopio confocal láser de barrido, logrando un límite de detección de 10^{-9} M. En esta línea particular, en el grupo de investigación de Espectrometría Analítica se ha llevado a cabo el diseño y completo desarrollo de una plataforma general de análisis consistente en un inmunoensayo competitivo fluorescente basado en el empleo de QDs como marcas luminiscentes. 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) [12,13]. 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 mediante medidas por ICP-MS del contenido metálico de los QDs empleados como marcas en el inmunoensayo. 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 [14]. 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 [15].

Pero, probablemente, la aplicación más prometedora que pueden aportar los QDs al campo de la inmunología es en el desarrollo de inmunoensayos multiplexados o multianalito (*multiplexing*). En este sentido, Mattoussi y *col.* [16] desarrollaron el primer ensayo multianalito empleando QDs de CdSe/ZnS para la detección simultánea de cuatro toxinas, marcando cada anticuerpo con un QD de distinto tamaño (*i.e.* distinta longitud de onda de emisión) y llevando a cabo su detección mediante la excitación simultánea de todos los QDs (**Figura 2**). Para dicho propósito, se desarrolló un esquema sencillo de deconvolución de espectros para poder llevar a cabo la cuantificación simultánea de las 4 toxinas determinadas en el ensayo.

Quizás, los QDs nunca reemplazarán totalmente a los fluoróforos orgánicos convencionales en general, pero sí que podrían convertirse en los marcadores fluorescentes dominantes para ciertos tipos de inmunoensayos.

3. Sensores ópticos basados en el empleo de QDs

3.1. Sensores ópticos basados en la interacción con la superficie de los QDs

Estudios básicos sobre la caracterización de las propiedades optoelectrónicas de los QDs han revelado que la luminiscencia de los mismos es muy sensible a sus estados superficiales. Por ello, es razonable esperar que eventuales interacciones químicas y físicas entre una especie química dada con la superficie de las NPs resultaría en cambios de las cargas superficiales de los QDs, pudiendo afectar significativamente a la emisión fotoluminiscente de los mismos [17,18]. Así, la medida de los cambios de la fluorescencia que ocurren tras la interacción del analito con la superficie del QD ha sido la base de muchos de los sensores ópticos basados en QDs.

Siguiendo esta estrategia, el aumento de la luminiscencia de QDs de CdS modificados con L-cisteína fue propuesto para la determinación óptica de plata iónica [18]. En dicho trabajo, los autores proponen la formación de un complejo entre los iones plata y los grupos RS- adsorbidos en la superficie de los QDs dando lugar a nuevos centros radiativos, resultando en el observado aumento de la fluorescencia.

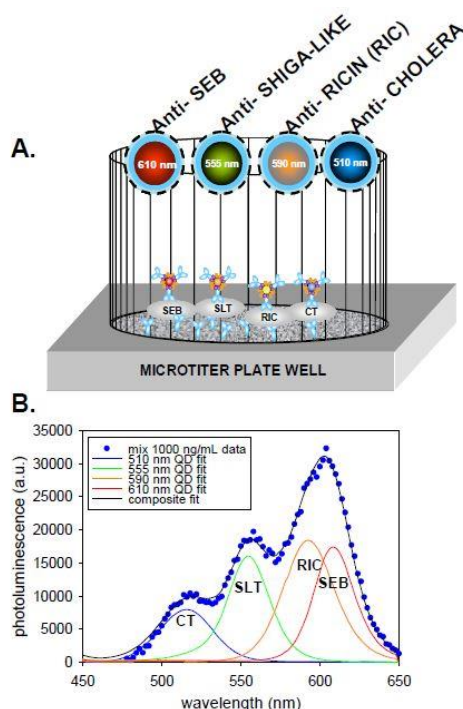


Figura 2. A. Esquema ilustrativo del ensayo multianálito realizado para la determinación de 4 toxinas empleando QDs. B. Datos obtenidos en un experimento en el que se incubaron las cuatro toxinas a una concentración de 1000 ng/mL. En la figura se observa tanto la señal fluorescente de la mezcla de QDs como la deconvolución de cada contribución individual. Imagen reproducida de la Ref. [16], con permiso de ACS.

Además del efecto de activación, otra estrategia estudiada consiste en el uso del efecto de apagado o *quenching* de la fluorescencia de una nanopartícula tras su interacción con el analito. Este mecanismo ha sido empleado en el Grupo de Espectrometría Analítica para llevar a cabo el desarrollo de metodologías analíticas basadas en QDs de CdSe para la monitorización sensible de algunos cationes, como el Cu(II) [17], y de algunos aniones tóxicos, como por ejemplo el cianuro [19]. Distintos mecanismos (incluyendo efectos de filtro interno o mecanismos de recombinación no-radiativos, entre otros) han sido propuestos para explicar el efecto del *quenching*.

El desarrollo de fases sensoras basadas en QDs ha sido también explorado en el Grupo de Investigación. Así, se ha llevado a cabo la inmovilización de QDs de CdSe/ZnS en una matriz inorgánica sol-gel para desarrollar una nueva fase sensora luminiscente muy útil para la identificación y detección de vapores de compuestos orgánicos [20]. En el trabajo desarrollado se proponen dos fases sensoras distintas con una selectividad parcial hacia los diversos compuestos volátiles. Sin embargo, recurriendo a la Quimiometría (para el procesamiento y análisis de las señales de emisión fluorescente de las dos fases sensoras distintas tras su exposición a mezclas gaseosas contaminadas con vapores orgánicos) ha sido posible conseguir una metodología sencilla para la identificación individual y la discriminación de distintas especies orgánicas volátiles en muestras complejas.

Los métodos publicados basados en la detección de los cambios en la luminiscencia que ocurren tras la interacción de un analito con la superficie del QD son muy simples y fáciles de desarrollar. Además, algunos de estos métodos tienen una elevada sensibilidad. Sin embargo, estos métodos parecen estar restringidos a la detección exclusiva de moléculas reactivas pequeñas o de iones (aquellos capaces de interactuar con la superficie de los QDs).

3.2. QDs en el desarrollo de metodologías analíticas basadas en procesos FRET

El campo de aplicaciones bioanalíticas de los QDs se expandió gracias a su capacidad de funcionar como donadores en los procesos FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster). La capacidad de los QDs de adaptar de manera sencilla (a través de modificaciones en el tamaño de la partícula) sus propiedades de fotoemisión permitiría una transferencia eficiente de energía con un gran número de colorantes orgánicos convencionales. Además, los altos rendimientos cuánticos de los QDs hacen que la transferencia de energía sea muy eficiente, permitiendo también la donación efectiva de energía a otras biomoléculas fluorescentes (p.ej. proteínas), lo cual simplifica enormemente el desarrollo de sistemas de detección basados en fenómenos de FRET. Por otro lado, el espectro de emisión de los QDs, significativamente más estrecho y simétrico que el espectro de emisión de los fluoróforos orgánicos convencionales, hace mucho más sencillo distinguir la emisión del donador de la emisión del aceptor.

Existen muchos estudios que han confirmado que los QDs son unos excelentes donadores en ensayos basados en FRET. La mayoría de las estrategias se basan en los cambios de distancia mediados por el analito entre el donador y el aceptor, donde el analito cambia la conformación de la unión entre el donador y el aceptor. Como ejemplo, la unión específica de diferentes proteínas ha sido observada mediante FRET entre un QD de CdSe/ZnS donador, unido a una de las proteínas, y un colorante orgánico aceptor unido a la otra proteína bajo estudio; resultando en un fuerte aumento de la fluorescencia del colorante orgánico [21].

Las aplicaciones bioanalíticas de los QDs en fenómenos de FRET pueden estar basadas en la hibridación de ácidos nucleicos [22], procesos enzimáticos e inmunoensayos [23], o incluso en cambios debidos a moléculas pequeñas y metales pesados [24]. En este último caso, la co-inmovilización en una matriz sol-gel de un colorante (indicador sensible al pH) que actúa como aceptor conjuntamente con QDs de CdSe/ZnS "donadores" ha demostrado la viabilidad de un proceso de transferencia de energía (FRET) sencillo para el desarrollo de (bio)sensores novedosos basados en QDs [25].

Considerando lo mencionado anteriormente, los QDs pueden llegar a ser NPs clave para el desarrollo de nuevos sistemas FRET capaces de monitorizar continuamente

especies bio(químicas) en una gran variedad de campos de aplicación (p.ej. salud, monitorización ambiental y biodefensa).

4. QDs como marcas fluorescentes para *imaging in-vitro* e *in-vivo*

El *imaging* de muestras biológicas, tanto *in-vitro* como *in-vivo*, surge como una herramienta de diagnóstico médico particularmente importante. En este sentido, el diseño y uso de QDs multifuncionales ha permitido el desarrollo de nuevas y mejoras metodologías de bioimagen. Una de las ventajas de los QDs reside en la versátil funcionalización de su superficie para dirigirse específicamente a células, tumores u órganos de interés. Tras la bioconjugación apropiada de los QDs al elemento de reconocimiento seleccionado (p.ej. proteínas, aptámeros y anticuerpos), estos nanocristales bioconjugados son empleados como marcas fluorescentes de *imaging* para el estudio de las interacciones intracelulares proteína-proteína, la detección de enfermedades en tejidos, la detección de células tumorales basada en la unión selectiva de QDs bioconjugados a biomarcadores de cáncer conocidos, entre otras aplicaciones descritas en la bibliografía [26]. Por lo tanto, la alta calidad y la fácil funcionalización de los QDs ha permitido que estos nanocristales semiconductores se hayan convertido en sondas fluorescentes de gran importancia en *imaging* (Figura 3) tanto para aplicaciones *in-vitro* como *in-vivo* [26, 27].

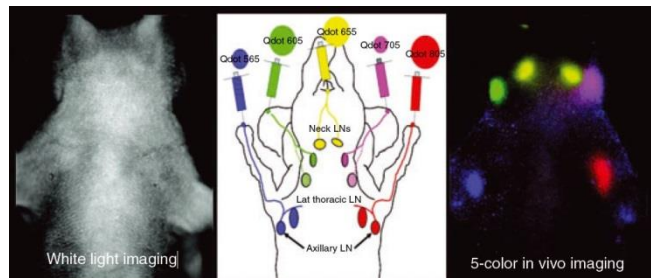


Figura 3. Linfografía de fluorescencia *in-vivo* empleando cinco QDs con diferentes espectros de emisión. Imagen reproducida de la Ref. [27] con permiso de Wiley.

El avance de las tecnologías de bioimagen y las propiedades fisicoquímicas y de biocompatibilidad, junto con una comprensión más profunda de las interacciones biológicas de los QDs, allanará el camino para un impacto aún mayor de los QDs bioconjugados en las aplicaciones de “*bioimaging*”.

5. Agradecimientos

D. Bouzas-Ramos agradece la beca predoctoral “Severo Ochoa” (BP14-137) del Principado de Asturias (España).

6. Referencias

[1] G. Orellana, *Anal. Bioanal. Chem.*, **379** (2004) 344-346.
 [2] C. J. Murphy, J. L. Coffey, *Appl. Spectrosc.*, **56** (2002) 16A-27A.
 [3] A. P. Alivisatos, *Science*, **271** (1996) 933-937.

[4] M. Bruchez Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science*, **281** (1998) 2013-2016.
 [5] W. C. W. Chan, S. Nie, *Science*, **281** (1998) 2016-2018.
 [6] Z. A. Peng, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, **123** (2001) 183-184.
 [7] I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, H. Mattoussi, *Nat. Mater.*, **4** (2005) 435-446.
 [8] L. Shao, Y. Gao, F. Yan, *Sensors*, **11** (2011) 11736-11751.
 [9] J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Trends Anal. Chem.*, **25** (2006) 207-218.
 [10] R. E. Bailey, A. M. Smith, S. Nie, *Physica E*, **25** (2004) 1-12.
 [11] B. Sun, W. Xie, G. Yi, D. Chen, Y. Zhou, J. Cheng, *J. Immunol. Methods*, **249** (2001) 85-89.
 [12] L. Trapiella-Alfonso, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Biosens. Bioelect.*, **26** (2011) 4753-4759.
 [13] L. Trapiella-Alfonso, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Talanta*, **106** (2013) 243-248.
 [14] A. R. Montoro-Bustos, L. Trapiella-Alfonso, J. Ruiz Encinar, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Biosens. Bioelect.*, **33** (2012) 165-171.
 [15] M. Garcia-Cortes, J. Ruiz-Encinar, J.M. Costa-Fernandez, A. Sanz-Medel, *Biosens. Bioelect.*, (2016) DOI: 10.1016/j.bios.2016.04.090.
 [16] E. R. Goldman, A. R. Clapp, G. P. Anderson, H. T. Uyeda, J. M. Mauro, I. L. Medintz, H. Mattoussi, *Anal. Chem.*, **76** (2004) 684-688.
 [17] M. T. Fernández-Argüelles, W. J. Jin, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta*, **549** (2005) 20-25.
 [18] J. Chen, C. Zhu, *Anal. Chim. Acta*, **546** (2005) 147-153.
 [19] W. J. Jin, M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Chem. Comm.* (2005) 883-885.
 [20] M. Hasani, A. M. Coto-García, J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, *Sensors and Actuators B*, **144** (2010) 198-202.
 [21] D. M. Willard, L. L. Carillo, J. Jung, A. V. Orden, *Nano Lett.*, **1** (2001) 469-474.
 [22] X. Qiu, N. Hildebrandt, *ACS Nano*, **9** (2015) 8449-8457.
 [23] E. R. Goldman, I. L. Medintz, J. L. Whitley, A. Hayhurst, A. R. Clapp, H. T. Uyeda, J. R. Deschamps, M. E. Lassman, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.*, **127** (2005) 6744-6751.
 [24] M. Stanisavljevic, S. Krizkova, M. Vaculovicova, R. Kizek, V. Adam, *Biosens. Bioelectron.*, **74** (2015) 562-574.
 [25] A. M. Coto-García, M. T. Fernández-Argüelles, J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, *Chem. Commun.*, **36** (2009) 5454-5456.
 [26] K. D. Wegner, N. Hildebrandt, *Chem. Soc. Rev.*, **44** (2015) 4792-4834.
 [27] J. M. Costa-Fernández, M. T. Fernández-Argüelles, A. Sanz-Medel, *Semiconductor Quantum Dots in Bioanalysis, Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2016.