

Universitat de València
Institut de Ciència Molecular
Departament de Química Orgànica

Doctorado en Química



**Nanopartículas de upconversion:
síntesis y aplicaciones**

TESIS DOCTORAL

Laura Francés Soriano

Dirigida por:

Prof. Dra. Julia Pérez Prieto

Dra. María González Béjar

Valencia, mayo de 2017

Julia Pérez Prieto, Catedrática de Química Orgánica, y
María González Béjar, Doctora en Química.

CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral, titulada:
*NANOPARTÍCULAS DE UPCONVERSION: SÍNTESIS Y
APLICACIONES*, se ha realizado bajo su dirección en el Instituto de
Ciencia Molecular (ICMol) de la Universitat de València por la
Licenciada en Química Sra. Laura Francés Soriano, y autorizan su
presentación para ser calificada como tesis doctoral internacional.

Valencia a diecisiete de mayo de dos mil diecisiete.

Fdo. Julia Pérez Prieto

Fdo. María González Béjar

*“When you make the finding yourself—
even if you’re the last person
on Earth to see the light—
you’ll never forget it.”*

Carl Sagan

Agradecimientos

En estas líneas pretendo expresar mi agradecimiento a todas las personas que a lo largo de estos años me han brindado su apoyo y ayuda en la elaboración de este proyecto.

En primer lugar, a la Prof. Julia Pérez por ofrecerme la oportunidad de desarrollar este proyecto en su laboratorio, por su infinita paciencia, apoyo y comprensión y, sobre todo, por transmitirme su pasión por la investigación y la ciencia.

A la Dra. María González por su ilimitada capacidad de trabajo, por su paciencia y sus consejos y por compartir conmigo gran parte de su experiencia a lo largo de estos años.

Al resto de compañeros del laboratorio que siempre han estado ahí para tenderme una mano cuando la he necesitado: Raquel, Sora, Néstor y Nacho. A los que han pasado y han dejado huella, especialmente a Anabel, Diego, Daniel, Julie, Salva, Lorena, Flor e Ismael. Gracias por los buenos momentos vividos.

A la Dra. Marta Liras por su disponibilidad y su contribución. Al Prof. José Manuel García por abrirnos las puertas de su laboratorio y al Dr. Vicente Herranz por su disponibilidad y ayuda.

Al Prof. Artur Bednarkiewicz por acogerme en su laboratorio y por su hospitalidad durante mi estancia en Polonia. A Malgorzata y Lukasz por su ayuda y amabilidad.

En el plano personal, primero agradecer a Joan estar ahí cada día, ser mi apoyo incondicional y saber sacarme la sonrisa, incluso en los momentos más difíciles. Especialmente, por haber empezado juntos el proyecto más importante de todos, nuestra hija Joana. Ella es mi inspiración y la que con su sonrisa me da la fuerza que necesito cada día.

A toda mi familia, sobre todo a mis padres y mi hermano, por creer en mí siempre. Su apoyo durante toda mi formación ha sido fundamental para llegar hasta aquí.

A mis amigas y amigos. Ellos son mi momento de desconexión favorito. A Alejandro, por haber sacado mi vena artística.

Al ministerio de educación, cultura y deporte por su financiación a través de la FPU.

A todos ellos...MUCHAS GRACIAS!

Abreviaturas y símbolos

A	Área
AABD	Ácido 9,10-antracenediil-bis(metilen) dimalónico
AcSEMA	Metacrilato de 2-(acetiltio)-etilo
α-CD	α -ciclodextrina
ADABr	Bromuro de adamantilamonio
AgNc	Nanoclústeres de plata
AIBN	Azobisisobutironitrilo
AM	Azul de metileno
AMPS	ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfonsulfónico
AO	Ácido oleico
APA	Ácido poliacrílico
ATMM	Anchura total a mitad del máximo
ATRP	Polimerización radicalaria de transferencia atómica
AuNc	Nanoclústeres de oro
AuNPs	Nanopartículas de oro
CB[n]	Cucurbiturilo
CD	Carbon Dots
CW	Onda continua
d	Diámetro
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindole
D_h	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión dinámica de la luz
E1(o 2)	Estado excitado 1 (o 2)
EBrIB	Etil-2-bromoisobutirato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDX	Dispersión de la energía de rayos X
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ESA	Absorción del estado excitado
EthD1	Etidio homodímero-1
ETU	Transferencia de energía upconversion
Φ_{Δ}	Rendimientos cuánticos de formación de $^1\text{O}_2$
Φ_{F}	Rendimientos cuánticos de fluorescencia
F	Estado fundamental
FFT	Transformada de Fourier rápida
FI	Imagen por fluorescencia
FO	Fluoróforos orgánicos

FS	Fotosensibilizador
FTIR	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier
FTIR-ATR	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada
HEMA	2-hidroxietilmetacrilato
HRTEM	Microscopia de transmisión electrónica de alta resolución
IBDP	Ácido 3-(2',6'-diyodo-1',3',5',7'-tetrametil-4',4'-difluoro-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacen-8'-ilo) propanoico
IF	Intensidad de fluorescencia
λ	Longitud de onda
LCST	Temperatura crítica de disolución
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
Ln	Lantánido
MABr	Bromuro de metilamonio
MAM	Metacrilato de metilo
MEO₂MA	2-(2-metoxietoxi)etilo
MRI	Imagen por resonancia magnética
NcM	Nanoclústeres metálicos
NC	Nanotubos de carbono
ND	Nanodiamantes
NDF	Nanodiamantes fluorescentes
NIR	Infrarrojo cercano
NP	Nanopartícula
OA	Oleato
OCABr	Bromuro de octilamonio
ODE	1-Octadeceno
OG	Óxido de grafeno
OM	Oleilamina
P	Potencia
PA	Avalancha de fotones
PAA	Poli(alilamina)
PAMAM	Poli(amidoamina)
PBS	Tampón fosfato salino
PEG	Polietilenglicol

PEI	Polietilenimina
PhZn	Ftalocianina de zinc
PK	Nanopartículas de perovskita
PK_{CB}	NP de CH ₃ NH ₃ PbBr ₃ estabilizadas con CB[7]
PK_{OCA}	NP de CH ₃ NH ₃ PbBr ₃ estabilizadas con octilamonio
P(MEO₂MA-co-AcSEMA)	Copolímero de MEO ₂ MA y AcSEMA
P(MEO₂MA-co-SEMA)	Copolímero de MEO ₂ MA y SEMA
PMDETA	Pentametildietilentriamina
PVP	Polivinilpirrolidona
PY	Pironina Y
QD	Quantum Dots
RMN	Resonancia magnética nuclear
S/V	Relación superficie/volumen
SEC	Cromatografía de exclusión de tamaños
τ	Tiempo de vida de fluorescencia
t	Tiempo
T_{amb}	Temperatura ambiente
TE	Transferencia de energía
TEA	Trietilenamina
TEM	Microscopia de transmisión electrónica
TER	Transferencia de energía resonante
TFD	Terapia fotodinámica
TFT	Terapia fototérmica
TGA	Análisis termo-gravimétrico
TOP	Trioctilfosfina
TPRA	Análisis de reconocimiento de fase y textura
u.a.	Unidades arbitrarias
UC	Upconversion
UC_n	NP de NaYF ₄ :Yb,Tm desnudas
UC_{OA}	NP de NaYF ₄ :Yb,Tm recubiertas con OA
UC_n@PK_{CB}	UC _n decoradas con PK _{CB}
UC_{OA}@PK_{OCA}	UC _{OA} decoradas con PK _{OCA}
UCNP	Nanopartículas de upconversion
UCNP@OA	NP de NaYF ₄ :Yb,Er recubiertas con OA

UCNP@CB[n]	NP de NaYF ₄ :Yb,Er recubiertas con CB[n]
UCNP-IBDP@PEG	NP de NaYF ₄ :Yb,Er recubiertas con IBDP y PEG
UCNP-IBDP@OA	NP de NaYF ₄ :Yb,Er recubiertas con IBDP y OA
UCNP@PEG	NP de NaYF ₄ :Yb,Er recubiertas con PEG
UCNP_d	NP de NaYF ₄ :Yb,Er desnudas
UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)	NP de NaYF ₄ :Yb,Er recubiertas con el P(MEO ₂ MA-co-SEMA)
UV	Ultravioleta
VIS	Visible
XRD	Difracción de rayos X

Índice

Agradecimientos.....	7
Abreviaturas y símbolos.....	9
Capítulo 1- Introducción.....	19
1.1- La química a nivel nanométrico.....	20
1.2- Nanopartículas luminiscentes.....	21
1.3- Nanopartículas de upconversion.....	26
1.4- Procesos de upconversion.....	27
1.5- Composición de las UCNP.....	32
1.6- Síntesis de nanopartículas de upconversion.....	34
1.6.1- Coprecipitación.....	35
1.6.2- Descomposición térmica.....	36
1.6.3- Hidro(solvo)térmica.....	38
1.6.4- Coprecipitación a alta temperatura, método Ostwald ripening.....	39
1.6.4- Líquidos iónicos.....	40
1.6.5- Síntesis con microondas.....	41
1.7- Modificación de la superficie de las UCNP.....	41
1.7.1- Intercambio de ligando.....	43
1.7.2- Modificación del ligando.....	46
1.7.3- Interacciones entre ligandos.....	46
1.7.4- Silanización.....	49
1.8- Aplicaciones.....	50
1.8.1- Seguridad.....	50
1.8.2- Sensores.....	50
1.8.3- Bioimagen.....	51
1.8.4- Terapia.....	52
1.8.5- Otras aplicaciones.....	52
1.9- Bibliografía.....	53
Capítulo 2- Objetivos.....	59
Capítulo 3- Técnicas instrumentales.....	63
3.1- Espectroscopía de absorción UV-Vis.....	64
3.2- Espectroscopía de emisión de up-conversion.....	64
3.3- Microscopía de transmisión electrónica.....	64
3.4- Análisis de reconocimiento de fase y textura.....	65
3.5- Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier.....	65
3.6- Centrifugación.....	66
3.7- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	66
3.8- Análisis termo-gravimétrico.....	66

3.9- Difracción de rayos X.....	67
3.10- Cálculo del rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete (Φ_{Δ})	68
3.11- Espectroscopía de emisión de tiempo resuelto.....	68
3.11.1- Luminiscencia de tiempo resuelto de las UC	68
3.11.2- Luminiscencia de tiempo resuelto de las perovskitas	69
3.12- Rendimientos cuánticos absolutos	69
3.13- Temperatura crítica más baja de la disolución	70
3.14- Dispersión dinámica de la luz.....	70
Capítulo 4- Síntesis y caracterización de β -NaYF ₄	73
4.1- Introducción.....	74
4.2- Resultados y discusión.....	76
4.2.1- Síntesis de UCNP recubiertas de oleato: UCNP@OA.....	76
4.3- Conclusiones	83
4.4- Procedimiento experimental	83
4.4.1- Material	83
4.4.2- Síntesis de nanopartículas de UCNP@OA.....	83
4.4.3- ARTF.....	84
4.5- Bibliografía.....	85
Capítulo 5- Modificación de UCNP con un derivado de Bodipy para su aplicación en terapia fotodinámica	87
5.1- Introducción.....	88
5.2- Resultados y discusión.....	90
5.2.1- Síntesis y caracterización de los nanohíbridos.....	90
5.2.3- Estudio de la transferencia de energía en los nanohíbridos. 97	
5.2.4- Capacidad del nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG para la generación de oxígeno singlete.	104
5.2.5- Estudios de fototoxicidad in vitro del nanohíbrido UCNP- IBDP@PEG	107
5.3- Conclusiones	112
5.4- Procedimiento experimental	113
5.4.1- Materiales	113
5.4.2- Síntesis de UCNP@OA	113
5.4.3- Síntesis de UCNP desnudas.....	114
5.4.4- Síntesis de UCNP@PEG.....	114
5.4.5- Síntesis y caracterización de IBDP	115
5.4.6- Síntesis de PM567	117
5.4.7- Síntesis de UCNP-IBDP@PEG	117
5.4.8- Síntesis de UCNP-IBDP@OA.....	117
5.4.9- Cálculo de las integrales de solapamiento espectral (J)	118

5.4.10- Síntesis de los complejos Yb-IBDP.....	118
5.4.11- Cálculos del rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete (Φ_{Δ}).....	118
5.4.12- Determinación de la generación de oxígeno singlete con una sonda química.....	119
5.4.13- Ensayos de citotoxicidad.....	120
5.4.14- Estudios de la aplicabilidad de las UCNP-IBDP@PEG en terapia fotodinámica.....	121
5.5- Bibliografía.....	122
Capítulo 6- Síntesis de UCNP recubiertas con cucurbit[n]uril como dadores de energía	129
6.1- Introducción.....	130
6.2- Resultados y discusión.....	132
6.2.1- Preparación de los nanohíbridos de UC@CB[n].....	132
6.2.2- Nanohíbridos UC@CB[n] como dadores de energía	136
6.2.3- Recuperación de los nanohíbridos UC@CB[n].....	143
6.2.4-Capacidad de los nanohíbridos UCNP@CB[n]@AM para generar oxígeno singlete	145
6.3- Conclusiones	147
6.4- Procedimiento experimental	148
6.4.1- Material	148
6.4.2- Síntesis de nanopartículas de NaYF ₄ : Yb ³⁺ , Er ³⁺ recubiertas con oleato	148
6.4.3- Síntesis de nanopartículas de NaYF ₄ : Yb ³⁺ , Er ³⁺ desnudas ..	148
6.4.4- Síntesis de nanopartículas de NaYF ₄ : Yb ³⁺ , Er ³⁺ derivatizadas con CB[n]	148
6.4.5- Modelos moleculares	149
6.5- Bibliografía.....	149
Capítulo 7- Síntesis de UCNP decoradas con nanopartículas de CH ₃ NH ₃ PbBr ₃	151
7.1- Introducción.....	152
7.2- Resultados y discusión.....	153
7.2.1- Preparación y caracterización de los nanohíbridos Upconversion-Perovskita.....	153
7.2.2- Estudio comparativo de la eficacia de las estrategias	164
7.2.3- Microscopía confocal como herramienta para la visualización del ensamblaje	166
7.2.4- Evaluación de la fotoestabilidad de los nanohíbridos	170
7.3- Conclusiones	171
7.4- Procedimiento experimental	171

7.4.1- Material	171
7.4.2- Síntesis de nanopartículas de NaYF ₄ : Yb ³⁺ (22%), Tm ³⁺ (1,2%) recubiertas con oleato.....	172
7.4.3- Síntesis de nanopartículas de NaYF ₄ : Yb ³⁺ (22%), Tm ³⁺ (1,2%) desnudas.....	172
7.4.4- Síntesis de UC _n @PK _{CB1}	172
7.4.5- Síntesis de UC _n @PK _{CB2}	173
7.4.6- Síntesis de PK _{OCA}	173
7.4.7- Síntesis de nanohíbridos UC _{OA} @PK _{OCA}	174
7.4.8- Ensayos de fotoestabilidad	174
7.5- Bibliografía.....	174
Capítulo 8- Funcionalización de UCNP con polímeros termosensibles.	177
8.1- Introducción.....	178
8.2- Resultados y discusiones	180
8.2.1- Síntesis y caracterización de las UCNP recubiertas con oleato	180
8.2.2- Síntesis y caracterización de las UCNP recubiertas con los polímeros termosensibles	181
8.2.3- Propiedades emisivas de los nanohíbridos UCNP@P(MEO ₂ MA-co-SEMA)-x	188
8.2.4- Propiedades termosensibles de los nanohíbridos UCNP@P(MEO ₂ MA-co-SEMA)-x	191
8.2.5- Dependencia de la emisión con el pH y la temperatura.....	196
8.3- Conclusiones	199
8.4- Procedimiento experimental	199
8.4.1- Materiales	199
8.4.2- Síntesis de las UCNP recubiertas con oleato.....	200
8.4.3- Síntesis de UCNP@P(MEO ₂ MA-co-SEMA)-x	200
8.4.4- Medidas de la emisión UC con el pH y la temperatura	200
8.5- Bibliografía.....	201
Conclusiones.....	203
Resúmenes	213
Publicaciones.....	227

Capítulo 1- Introducción

1.1- La química a nivel nanométrico.

El término nanotecnología se emplea para describir el diseño, fabricación y aplicación de aquellos materiales que tienen al menos una de sus dimensiones en la escala nanométrica ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) así como su integración en sistemas más grandes.¹

La importancia de la nanotecnología fue señalada en 1959 por Feynman, en su célebre discurso "There's plenty of room at the bottom".² En él, dio una visión del futuro de la ciencia en la que predecía que los equipos y herramientas serían cada vez más y más pequeños hasta que se pudieran manipular átomos y moléculas como si fueran ladrillos de construcción.³ Se espera un gran impacto de la nanotecnología a lo largo del siglo XXI en la economía y la sociedad. Es muy prometedora en áreas como la medicina, biotecnología, seguridad, comunicación o la electrónica.^{1,4}

La nanotecnología ha experimentado un gran crecimiento en los últimos años, principalmente por la disponibilidad de nuevos equipos para la caracterización y manipulación de los nanomateriales.⁵

Dentro de los diferentes nanomateriales definimos las nanopartículas (NP) como aquellas partículas en las que todas sus dimensiones se encuentran en la escala nanométrica, es decir, entre 1 y 100 nm.⁴ Así pues, son materiales intermedios entre los átomos o moléculas y los materiales de gran tamaño o *bulk*.

Las NP tienen propiedades físicas y químicas excepcionales que difieren de su correspondiente material *bulk* debido a que tienen una elevada relación superficie/volumen.⁶ Otra característica importante de las NP es que tienen una gran fracción de átomos en su superficie, siendo dicha fracción mayor cuanto menor es el diámetro de la NP. Como consecuencia, en aquellas NP con un tamaño menor que su radio del excitón de Bohr, se produce un confinamiento electrónico que hace que sus propiedades sean dependientes del tamaño o forma de la nanopartícula.⁷⁻¹⁰

De una manera general, las NP están formadas por un núcleo metálico, inorgánico u orgánico estabilizado por una capa de un ligando orgánico o surfactante.¹¹ El papel del ligando se discutirá en apartados posteriores, pero determinará tanto sus propiedades física, químicas u ópticas como su dispersabilidad en diferentes medios.¹¹

Definimos el término nanoquímica como la química a nivel nanométrico, es decir, todos aquellos procesos químicos que llevan a la síntesis de nanomateriales en general, y de NP en particular.^{4,12} Por tanto, la nanoquímica juega un papel muy importante en el diseño de un nanosistema para una aplicación determinada.⁵ Por un lado, permite la creación de rutas sintéticas con el objetivo de seleccionar las propiedades fisicoquímicas de las NP a través del control de la composición, tamaño y forma de las NP. Y, por otro lado, la minuciosa modificación de la periferia de la nanopartícula permite controlar aspectos como la dispersabilidad de éstas, la reactividad química así como sus propiedades físicas (resistencia al pH, temperatura...),¹³

1.2- Nanopartículas luminiscentes

En las últimas décadas las nanopartículas luminiscentes han sido objeto de estudio debido a su amplio rango de aplicaciones, desde aplicaciones biomédicas como bioimagen o liberación controlada de fármacos a fotocátalisis o su uso como sensores químicos y físicos, entre otras.¹⁴⁻¹⁶

Las nanopartículas que presentan fluorescencia pueden dividirse en cuatro grupos i) NP semiconductoras, ii) nanoclústeres metálicos, iii) NP basadas en carbono y iv) NP dopadas con metales. En este último grupo se incluyen las nanopartículas de upconversion (UCNP, por sus siglas en inglés) de las que se hablará en apartados posteriores. La Tabla 1.1 muestra una comparación de las propiedades ópticas de las principales NP luminiscentes.^{17,18}

Dentro de las NP semiconductoras, las más estudiadas son los *quantum dots* (QD). Los QD están formados por la combinación

de dos elementos metálicos como CdSe, PbS o ZnS y tienen tamaños entre 1 y 10 nm.¹⁹

Los QD absorben los fotones que exceden la energía de su *band gap*, y los electrones promocionan desde la banda de valencia a la banda de conducción.⁹ La recombinación del par electrón-hueco (interacciones Coulomb) da lugar a la emisión de luz, conocida como fluorescencia excitónica.²⁰ Presentan confinamiento electrónico y, por tanto, la longitud de onda de emisión varía en el rango de 400-800 nm en función del diámetro del QD.^{6,9,21} Las propiedades ópticas de los QD se pueden variar a través del control de los parámetros sintéticos tales como la temperatura, composición o el tiempo.¹⁷

En comparación con los fluoróforos orgánicos (FO), los QD tienen coeficientes de extinción molar muy elevados, bandas de emisión estrechas (la anchura total a mitad del máximo, ATMM ~ 30 nm), tiempos de vida de luminiscencia más largos (>10 ns) y mayor fotoestabilidad.^{16,22-24} Aun así, los QD presentan disminución de la emisión con el tiempo de excitación (fotoblanqueo), parpadeo de la emisión (fotoparpadeo) y citotoxicidad debido a la presencia de metales pesados en su composición. Además, sus rendimientos cuánticos de emisión (Φ_F) son bajos debido a los defectos presentes en su superficie que se pueden mejorar recubriéndolos con una capa inorgánica (pasivación). Los QD pasivados pueden llegar a tener Φ_F del 90%.²²

Otro tipo de NP semiconductoras que han alcanzado gran interés en los últimos años son las nanopartículas de perovskita (PK). Las PK híbridas son materiales orgánico-inorgánicos, cuya fórmula general es AMX_3 , donde M es un catión metálico divalente (Pb^{2+} , Sn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} ...), X es un halógeno y A es un catión de amonio orgánico (metilamonio, etilamonio...).²⁵

Sus excepcionales propiedades ópticas y electrónicas son fácilmente modulables por cambios en su composición o tamaño.^{26,27}

	FO	QD	PK	NcM	CD	NDF	OG	NC	UCNP
Tamaño (nm)	< 1	1-10	1-10	< 3	< 10	5-20	< 30	< 20	< 50
Absorción	Variable	~350	~350	NIR	350-500	~500	Variable	Variable	NIR
Emisión (nm)	Variable	VIS-NIR	500-650	VIS-NIR	450-700	~700	400-700	500-800	VIS-NIR
ATMM (nm)	Anchas	25-35	10-30	> 60	> 60	> 60	> 80	> 60	< 15
Φ_F (%)	Variable	10-90	20-100	< 20	5-60	~100	<10	< 25	< 3
τ (ns)	< 10	> 10	10-100	> 100	< 10	10-20	< 10	< 5	> 100
Fotoestabilidad	+	++	+	+++	++	+++	++	+++	+++

Tabla 1.1. Comparación de las propiedades ópticas de diferentes NP luminiscentes.¹⁷ FO: Fluoróforo orgánico, QD: Quantum dots; PK: NP de perovskita; NcM: Nanoclústeres metálicos; CD: Carbon dots; NDF: Nanodiamantes fluorescentes; OG: Óxido de grafeno; NC: nanotubos de carbono; UCNP: NP de upconversion; ATMM: Anchura total a mitad del máximo de emisión; Φ_F : rendimiento cuántico de fluorescencia; τ : tiempo de vida de fluorescencia.

Normalmente, tienen tamaños entre 2 y 10 nm aunque se han sintetizado PK de tamaños mayores (20 o 50 nm) y presentan emisión en el visible (VIS) tras la excitación a 350 nm, con rendimientos cuánticos elevados.^{28,29} No obstante, son muy sensibles al entorno, especialmente a la humedad, y en general no tienen la fotoestabilidad adecuada para su aplicabilidad en dispositivos electrónicos y celdas fotovoltaicas.²⁸⁻³¹

En cuanto a las NP luminiscentes metálicas, destacan los *nanoclústeres* metálicos (NcM). Están compuestos por menos de 100 átomos (generalmente oro (NcAu) y plata (NcAg)) y exhiben propiedades moleculares.³² Tienen tamaños menores de 3 nm y no presentan absorción plasmónica pero sí fluorescencia desde el VIS hasta el infrarrojo cercano (NIR, por sus siglas en inglés).^{33,34} Esta emisión es dependiente del tamaño y del entorno, con tiempos de vida largos, buenos rendimientos cuánticos y con grandes desplazamientos de Stokes (> 100 nm).³⁵ Además, son fotoestables y fácilmente funcionalizables con compuestos biocompatibles.³⁵

Por otro lado, las NP luminiscentes basadas en carbono son muy interesantes por su alta biocompatibilidad y su fácil funcionalización, siendo de gran utilidad en aplicaciones terapéuticas y, sobretodo, en bioimagen.³⁶ Destacan los carbon dots (CD), nanodiamantes (ND), óxido de grafeno (OG) y nanotubos de carbono (NC).

Los CD se descubrieron de manera accidental durante la purificación por electroforesis de nanotubos de carbono en 2004³⁷ y desde entonces se han estudiado exhaustivamente sus propiedades luminiscentes.³⁸ Son nanopartículas casi-esféricas de diámetros inferiores a los 10 nm, con buena dispersabilidad en agua, inertes químicamente, alta fotoestabilidad, ausencia de fotoparpageo y resistencia al fotoblanqueo.^{39-41,35,36}

Su luminiscencia depende tanto del tamaño como de la longitud de onda de excitación.⁴⁰ Al igual que los QD de tipo “core”, presentan rendimientos cuánticos muy bajos debido a los defectos en la superficie, los cuales mejoran tras su pasivación.^{38,42}

Los nanodiamantes son partículas cristalinas de diamante de tamaños entre 1 y 100 nm.⁴³ En un diamante perfecto todos los carbonos presentan una hibridación tetraédrica sp^3 , pero los diamantes naturales presentan defectos.¹⁴ Si su estructura contiene un defecto conocido como centros *nitrógeno-vacante*, los ND pasan a ser luminiscentes (NDF) con emisión sobre 700 nm tras la absorción sobre 550 nm y con Φ_F cercano al 100%.⁴⁴ Los NDF no presentan fotoblanqueo ni fotoparpadeo, tienen un rango ancho de emisión en el VIS y el NIR y tiempos de vida largos comparados con los de los FO.^{24,45,46} Desafortunadamente, la emisión de los NDF sólo se puede modular usando campos magnéticos y su síntesis presenta problemas de polidispersidad de tamaños y agregación.^{47,48}

Las nanopartículas OG son la forma oxidada del grafeno a tamaño nanométrico (<30 nm)^{49,50} y son muy dispersables en agua debido a la presencia de grupos funcionales hidrofílicos como carboxilos o hidroxilos.⁵¹ Además pueden emitir en el visible tras la absorción de dos fotones de baja energía (emisión *upconversion*).⁴⁹ Sus principales desventajas son los bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia y la dificultad en modular la emisión.^{52,53}

En cuanto a los NC son cilindros de una o más capas de grafeno y pueden tener los extremos abiertos o cerrados.⁵⁴ Los diámetros más comunes varían entre 0,8 y 2 nm y la longitud entre 5 y 20 nm.⁵⁴ Los NC presentan bandas anchas de emisión de intensidad muy débil, siendo útiles en la construcción de celdas fotovoltaicas.⁵⁵⁻⁵⁷

En definitiva, existe un amplio número de nanopartículas luminiscentes útiles en una gran variedad de áreas (comunicación, electrónica, biomedicina...). Su aplicabilidad vendrá determinada por sus propiedades físicoquímicas tales como composición, forma, tamaño o recubrimiento orgánico, las cuales pueden modificarse seleccionando previa y minuciosamente los parámetros sintéticos.

1.3- Nanopartículas de upconversion

Las nanopartículas luminiscentes de upconversion (UCNP) están compuestas generalmente por una matriz inorgánica que contiene lantánidos o lantanoides ópticamente inertes dopada con cationes metálicos de lantánidos luminiscentes (Ln^{3+}) que reemplazan cationes de la matriz durante la formación del nanocristal.⁵⁸ Normalmente, las UCNP suelen estar codopadas con un Ln^{3+} que actúa como sensibilizador, el cual absorbe luz y la transmite a otro Ln^{3+} (activador) que la emite (Figura 1.1).⁵⁹

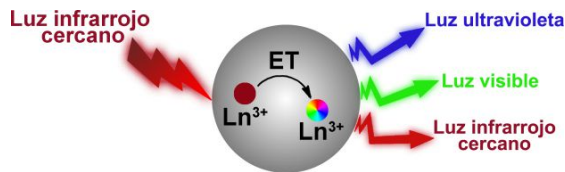


Figura 1.1. Representación esquemática del proceso de upconversion en una UCNP.

Su principal propiedad y a la cual deben su nombre es su luminiscencia upconversion, esto es la emisión de fotones de alta energía (luz VIS) tras la absorción de varios fotones de baja energía (luz NIR).⁶⁰ Básicamente, el sensibilizador absorbe los fotones de baja energía, promocionando a su estado excitado el cual transfiere la energía a un estado excitado de mayor energía del activador.⁶¹ La posterior relajación desde ese estado excitado da lugar a una luminiscencia anti-Stokes, normalmente entre 350 y 800 nm.⁶² Este proceso es el resultante de transiciones intra-configuracionales 4f-4f,⁶³ que difiere de la absorción simultánea de dos o más fotones que se da en FO o QD, el cual involucra estados virtuales.⁶⁴

La emisión de las UCNP exhibe bandas de emisión estrechas e intensas tras la excitación con un láser de longitud de onda continua de baja energía ($1\text{-}10^3 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$).^{58,65,66} Se ha demostrado que las propiedades luminiscentes de las UCNP no se ven alteradas tras horas de excitación continua en el NIR o en el ultravioleta (UV).⁶⁷⁻⁷⁰ Por tanto, las nanopartículas son estables frente a la degradación fotoquímica y al fotoblanqueo, además no sufren fotoparadeo.^{67,71}

Su emisión presenta grandes desplazamientos anti-Stokes, con tiempos de vida del orden de 10^{-3} - 10^{-6} segundos (debido a que las transiciones 4f están prohibidas) y rendimientos cuánticos entre 10^{-5} y 3%.^{60,61,72-77} De especial relevancia para aplicaciones biomédicas son la alta relación señal/ruido en la emisión, baja citotoxicidad y la gran profundidad de penetración en tejidos de la luz NIR utilizada para su excitación.^{39,76,78-80}

Gracias a sus excepcionales propiedades ópticas, las UCNP son muy útiles en el diseño de láseres,⁸¹ sensores^{82,83} marcadores biológicos⁸⁴ o celdas solares⁸⁵ así como en su aplicación en diferentes áreas⁸⁶ como nanotermometría,⁸⁷ terapia fotodinámica,⁸⁸ seguridad,⁸⁹ liberación controlada de fármacos⁷⁷ o bioimagen.¹⁸

1.4- Procesos de upconversion

Los procesos de upconversion son un buen método para la generación de luz visible tras la excitación en el NIR.^{59,63} Se originan debido a las propiedades particulares de los iones trivalentes de lantánidos (Ln^{3+}), que tienen sus orbitales electrónicos 4f parcialmente llenos ($4f^n 5s^2 5p^6$, $n=0-14$).⁹⁰ El acoplamiento de los electrones de los orbitales $4f^n$ con los electrones de los orbitales completos $5s^2$ y $5p^6$ da lugar a transiciones 4f-4f. Estas transiciones están prohibidas por la regla de paridad y pueden alterarse cuando los iones se localizan en redes cristalinas estáticas, que pasan a ser transiciones parcialmente permitidas.⁹¹ Por ello, el tipo y composición del material afectará a la eficiencia de la emisión UC, tal y como se comentará más adelante.

El gran número de niveles energéticos de los lantánidos (Figura 1.2) hace que existan diversos caminos posibles para la emisión UC tras la absorción secuencial de dos o más fotones en el NIR.^{63,92} Los tres mecanismos competitivos posibles se muestran en la Figura 1.3 y son: absorción del estado excitado (ESA, de sus siglas del inglés), transferencia de energía upconversion (ETU, por sus siglas del inglés) y avalancha de fotones (PA, de sus siglas del inglés).^{63,90,93} Su principal diferencia se encuentra en el modo en que ocurre la absorción multifotónica.

desde E1 a un estado excitado más energético (E2). La emisión UC ocurre tras la relajación desde el E2 al F. Para facilitar los procesos ESA se necesita una densidad de fotones de excitación elevada, una sección eficaz de absorción grande y una concentración baja del ión para evitar la disminución de la eficacia UC debido a la relajación cruzada entre los diferentes iones.⁵⁸

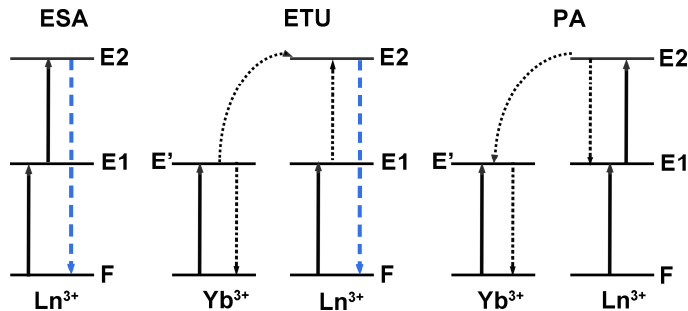


Figura 1.3. Principales procesos de emisión UC para cristales dopados con lantánidos: absorción del estado excitado (ESA), transferencia de energía upconversion (ETU) y avalancha de fotones (PA). Yb^{3+} sensibilizador y Ln^{3+} activador. Excitación (línea continua), transferencia de energía (línea punteada) y emisión (línea discontinua).

El mecanismo ETU es mucho más eficiente. En este caso la emisión UC es inducida por la transferencia de energía entre dos tipos diferentes de Ln^{3+} , llamados sensibilizador y activador. La sección eficaz de absorción del sensibilizador tiene que ser mucho mayor que la del activador. Tanto el sensibilizador como el activador pueden absorber un fotón promocionando a sus respectivos estados excitados (E' y E1). A continuación, el sensibilizador puede transferir la energía de manera no radiativa al activador vía una interacción resonante dipolo-dipolo, relajándose a F.⁶³ De esta manera, el activador promociona al estado excitado E2 desde el cual se produce la emisión debido a la transición $\text{E2} \rightarrow \text{F}$. El mecanismo ETU está considerado como el más eficiente, además de ser el más observado en las UCNP. Este proceso, y por tanto la eficiencia de la emisión UC, depende de la distancia media entre los iones, la cual está determinada por la concentración de éstos.⁹⁰

En el proceso de PA se produce la excitación no resonante a un estado de mayor energía (superexcitado). A continuación, se produce la relajación cruzada entre este estado superexcitado y F' , produciendo la población de los estados intermedios $E1$ y E' tras varios ciclos de excitación. Seguidamente, los dos iones pueblan el estado $E2$ aumentando exponencialmente la población del nivel $E2$, y como consecuencia de esta avalancha de fotones se produce la emisión UC. El mecanismo PA es mucho menos eficiente debido a su dependencia de la potencia de excitación y a su lenta respuesta a la excitación.⁶³ Este proceso es muy difícil de observar y normalmente ocurre en sistemas con concentraciones de dopantes altas y potencias de excitación elevadas.⁹⁵

A día de hoy, las UCNP basadas en el mecanismo ETU son las más estudiadas, en concreto las formadas por Yb^{3+} como sensibilizador y Er^{3+} o Tm^{3+} como activador.⁵⁸

En una matriz dopada con Yb y Er , se observa emisión en el violeta (415 nm), en el verde (525 y 542 nm) y en el rojo (655 nm) tras la excitación a 975 nm. La Figura 1.4 muestra como un electrón del Yb^{3+} es excitado al estado $^2F_{5/2}$ desde el nivel fundamental $^2F_{7/2}$ y transfiere la energía al nivel excitado $^4I_{11/2}$ del Er^{3+} , volviendo el Yb^{3+} a su estado $^2F_{7/2}$.⁵⁸

Durante la población del estado excitado $^4I_{11/2}$ del Er^{3+} , un segundo estado excitado del Yb^{3+} puede poblar, a través de transferencia de energía resonante, los estados excitados del Er^{3+} más energéticos (transiciones $^4I_{11/2} \rightarrow ^4F_{7/2}$ o $^4I_{13/2} \rightarrow ^4F_{9/2}$). Los estados excitados superiores del Er^{3+} se relajan no radiativamente a los estados excitados $^2H_{11/2}$ y $^4S_{3/2}$. La relajación de estos estados al estado fundamental produce las emisiones en el verde a 525 y 542 nm. Alternativamente, los electrones del estado excitado $^4F_{9/2}$ pueden relajarse al estado fundamental, produciendo la emisión en el rojo (655 nm). Estos dos procesos son bifotónicos pero podrían ser trifotónicos usando potencias de excitación elevadas.⁵⁸ Mientras que la emisión débil en el violeta (máximo en 415 nm), que no se observa siempre, se atribuye a un proceso trifotónico.

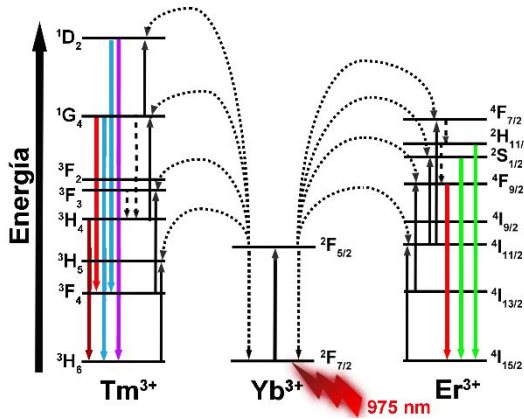


Figura 1.4. Esquema de los mecanismos ETU que se dan en una matriz dopada con Yb/Tm o Yb/Er. Las flechas punteadas, discontinuas y continuas y las continuas coloreadas representan los procesos de transferencia de energía, relajación, excitación y emisión, respectivamente.

Las UCNP formadas por una matriz co-dopada con Yb^{3+} y Tm^{3+} tras la excitación a 975 nm muestran la emisión simultánea en el UV (362 nm), en el visible (450, 475 y 644 nm) y en el NIR (800 nm). Si comparamos los diagramas de niveles energéticos del Yb^{3+} - Er^{3+} y del Yb^{3+} - Tm^{3+} , llama la atención que la emisión UC en el caso de Yb^{3+} - Tm^{3+} envuelve más de dos fotones. Esto se explica teniendo en cuenta la separación entre los diferentes niveles energéticos, así los niveles superiores están mucho más próximos en el caso del Er^{3+} .⁵⁸

El Yb^{3+} absorbe la energía de 975 nm produciéndose la transición $2F_{7/2} \rightarrow 2F_{5/2}$ seguido de la transferencia de energía al estado excitado $3H_5$ de un ión Tm^{3+} adyacente, que se relaja no radiativamente al estado $3F_4$. La posterior transferencia resonante de energía desde otro Yb^{3+} produce la transición $3F_4 \rightarrow 3F_3$, seguida de la relajación no radiativa al $3H_4$. Finalmente, se produce la emisión UC en el NIR debido a la transición $3H_4 \rightarrow 3H_6$ (800 nm).⁵⁸

Con una densidad de fotones de excitación mayor, los electrones del estado excitado $3H_4$ pueden promocionar a niveles más energéticos a través de las siguientes transiciones: $3H_4 \rightarrow 1G_4$ y $1G_4 \rightarrow 1D_2$. Desde estos niveles tienen lugar la emisión UC debido

a su relajación radiativa: $^1G_4 \rightarrow ^3F_4$ (644 nm), $^1G_4 \rightarrow ^3H_6$ (475 nm), $^1D_2 \rightarrow ^3F_4$ (450 nm) y $^1D_2 \rightarrow ^3H_6$ (362 nm).⁵⁸

Por tanto, las emisiones en 362 y 450 nm resultan de un proceso en el que hay cuatro fotones involucrados, las de 475 y 632 nm son procesos tri-fotónicos y la de 800 nm bi-fotónicos.⁵⁸

1.5- Composición de las UCNP

A diferencia de los QD o de las NP metálicas, en las UCNP no existe confinamiento cuántico, y las bandas de emisión no se desplazan en función del tamaño de la nanopartícula.⁹⁴ No obstante, la emisión es fácilmente modulable cambiando la composición de las nanopartículas ya sea de la matriz o de los dopantes (Figura 1.5 y Tabla 1.2).^{96,97}

Como se ha comentado anteriormente, las transiciones 4f-4f están parcialmente permitidas cuando los lantánidos se encuentran en una red cristalina.⁹¹ Por lo tanto, diferentes matrices tendrán diferentes números de coordinación así como diferentes distancias entre los Ln^{3+} y, por ello, diferentes eficiencias en la transferencia de energía.⁵⁸

Consecuentemente, la matriz inorgánica se debe elegir según las propiedades ópticas que se deseen obtener teniendo en cuenta que tiene que i) presentar alta tolerancia a los Ln^{3+} luminiscentes, ii) tener una baja energía de fonón (movimiento de vibración generado por la oscilación de la red cristalina) para minimizar la relajación no radiativa de los centros Ln^{3+} luminiscentes, iii) alta transparencia en el rango óptico de interés y iv) excelente estabilidad química y térmica.⁵⁸

Las matrices más comunes son Ln_2O_3 ,⁹⁸ LnPO_4 ,⁹⁹ NaLnF_4 ,¹⁰⁰ CaF_2 ,¹⁰¹ LnAlO_3 ,¹⁰² Ln_2O_3 ,¹⁰³ y LnVO_4 .¹⁰⁴ Entre ellas, las compuestas por NaLnF_4 son las más eficientes debido a su baja energía de fonón (sobre 350 cm^{-1}) y su alta estabilidad química.^{105,106} Esta matriz tiene dos fases cristalinas diferentes, la fase hexagonal de la matriz NaYF_4 ($\beta\text{-NaYF}_4$) es más estable termodinámicamente que la cúbica, $\alpha\text{-NaYF}_4$ y, por ello, la emisión de la $\beta\text{-NaYF}_4$ es 10 veces mayor que la de la $\alpha\text{-NaYF}_4$.^{95,107}

Por otro lado, la composición y naturaleza de los dopantes también pueden modificar la emisión UC (Figura 1.5)^{108,109} Los dopantes típicos se muestran en la Tabla 1.2^{58,62,110} Las UCNP suelen estar codopadas con dos cationes lantánidos, el sensibilizador (excitado directamente por la luz) y el activador (emite luz).



Figura 1.5. Modificación de la emisión UC a través del control de las cantidades de los dopantes en UCNP de composición $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Tm}$. Reimpreso con permiso de la referencia 108, Copyright del 2008 de la American Chemical Society.

Teniendo en cuenta el mecanismo ETU, el Yb^{3+} es un excelente sensibilizador ya que tiene una sección eficaz de absorción relativamente alta en la región NIR¹¹¹ y solo tiene un estado excitado cuya energía es similar a los Ln^{3+} activadores, lo que permite la transferencia de energía entre los distintos niveles energéticos.⁵⁸

Como se puede ver en la Tabla 1.2, la elección del activador cambiará las longitudes de onda de emisión. Un activador adecuado tiene estados excitados con tiempos de vida largos y próximos entre sí de manera análoga a los peldaños en una escalera. La concentración del activador debe ser menor del 2% para minimizar las interacciones activador-activador.⁵⁸ Los activadores más usados para obtener luminiscencia en el visible a través de procesos upconversion son Er^{3+} , Tm^{3+} y Ho^{3+} .

Act.	Emisión UC (nm)	Transiciones 4f
Pr ³⁺	485, 520, 538, 605, 635, 645, 670, 690, 720	$^3P_0 \rightarrow ^3H_4$, $^3P_1 \rightarrow ^3H_5$, $^3P_0 \rightarrow ^3H_5$, $^1D_2 \rightarrow ^3H_4$, $^3P_0 \rightarrow ^3F_2$, $^3P_0 \rightarrow ^3H_6$, $^3P_1 \rightarrow ^3F_3$, $^3P_0 \rightarrow ^3F_3$, $^3P_0 \rightarrow ^3F_4$
Nd ³⁺	430, 482, 525, 535, 580, 600, 664, 766	$^2P_{1/2} \rightarrow ^4I_{9/2}$, $^2P_{1/2} \rightarrow ^4I_{11/2}$, $^2P_{1/2} \rightarrow ^4I_{13/2}$, $^4G_{7/2}$ $\rightarrow ^4I_{9/2}$, $^2P_{1/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$, $^4G_{7/2} \rightarrow ^4I_{11/2}$, $^4G_{5/2} + ^2$ $G_{7/2} \rightarrow ^4I_{9/2}$, $^4G_{7/2} \rightarrow ^4I_{13/2}$, $^4G_{7/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$
Sm ³⁺	520, 541, 555, 590, 646, 657, 700, 799–873	$^4G_{7/2} \rightarrow ^6H_{5/2}$, $^4F_{3/2} \rightarrow ^6H_{5/2}$, $^4G_{5/2} \rightarrow ^6H_{5/2}$, 4 $G_{5/2} \rightarrow ^6H_{7/2}$, $^4G_{7/2} \rightarrow ^6H_{9/2}$, $^4G_{5/2} \rightarrow ^6H_{9/2}$, 4G $5/2 \rightarrow ^6H_{11/2}$, $^6F_{11/2} \rightarrow ^6H_{5/2}$
Eu ³⁺	416, 429, 490, 510, 535, 554, 590, 613	$^5D_3 \rightarrow ^7F_1$, $^5D_3 \rightarrow ^7F_2$, $^5D_2 \rightarrow ^7F_2$, $^5D_2 \rightarrow ^7F_3$, $^5D_1 \rightarrow ^7F_1$, $^5D_1 \rightarrow ^7F_2$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$
Gd ³⁺	278, 305, 312	$^6I_{7/2} \rightarrow ^8S_{7/2}$, $^6P_{5/2} \rightarrow ^8S_{7/2}$, $^6P_{7/2} \rightarrow ^8S_{7/2}$
Tb ³⁺	381, 415, 438, 489, 541, 584, 619	$^5D_3 \rightarrow ^7F_6$, $^5D_3 \rightarrow ^7F_5$, $^5D_3 \rightarrow ^7F_4$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_4$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_3$
Dy ³⁺	378, 408, 487, 543, 569, 570, 610, 655, 663	$^4G_{11/2} \rightarrow ^6H_{13/2}$, $^4G_{9/2} \rightarrow ^6H_{13/2}$, $^4G_{9/2} \rightarrow ^6H_{11/2}$, $^4I_{15/2} \rightarrow ^6H_{13/2}$, $^4G_{11/2} \rightarrow ^6H_{11/2}$, $^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{13/2}$ $^4G_{11/2} \rightarrow ^6H_{9/2}$, $^4G_{11/2} \rightarrow ^6H_{7/2}$, $^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{11/2}$
Ho ³⁺	542, 655	5F_4 , $^5S_2 \rightarrow ^5I_8$, $^5F_5 \rightarrow ^5I_8$
Er ³⁺	415, 525, 542, 655	$^2H_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$, $^2H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$, $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$, 4F $9/2 \rightarrow ^4I_{15/2}$
Tm ³⁺	290, 345, 362, 450, 475, 644, 694, 800	$^1I_6 \rightarrow ^3H_6$, $^1I_6 \rightarrow ^3F_4$, $^1D_2 \rightarrow ^3H_6$, $^1D_2 \rightarrow ^3F_4$, 1 $G_4 \rightarrow ^3H_6$, $^1G_4 \rightarrow ^3F_4$, $^3F_3 \rightarrow ^3H_6$, $^3H_4 \rightarrow ^3H_6$
Yb ³⁺	450–500	$2 \times ^2F_{5/2} \rightarrow ^2F_{7/2}$ (emisión cooperativa)

Tabla 1.2. Activadores (Act.) lantánidos típicos y sus correspondientes emisiones y transiciones. Adaptado de la referencia 58 con permiso de la Royal Society of Chemistry.

1.6- Síntesis de nanopartículas de upconversion

El control del tamaño, forma, composición y fase cristalina de las UCNP es crucial en la modificación de sus propiedades ópticas y químicas para su explotación en diferentes áreas. Por ello, es importante el desarrollo de rutas sintéticas para la obtención de UCNP cristalinas con alta eficiencia de emisión upconversion.^{112,113}

De forma global, existen dos aproximaciones diferentes para la síntesis de UCNP, conocidas en inglés como *top-down* y

bottom-up. La primera utiliza métodos físicos para la obtención de NP, lo cual permite la producción de nanocristales a gran escala, pero carece de control sobre las características de las NP. Con estos métodos se obtienen UCNP grandes y con una distribución grande de tamaños (polidispersas).⁶¹ Las estrategias *bottom-up* han sido desarrolladas posteriormente para obtener UCNP con una distribución pequeña de tamaños (monodispersas) y uniformes. Estas estrategias utilizan disoluciones coloidales para la síntesis, lo que permite el control del tamaño y forma de las NP, pero dan lugar a cantidades menores de producto en cada síntesis.¹¹³

Existe una gran variedad de métodos establecidos para la síntesis de UCNP: coprecipitación, descomposición térmica, hidro(solvo)térmica, *Ostwald-Ripening*, sol-gel, combustión, líquidos iónicos, microondas o ablación láser, siendo las cuatro primeras las más utilizadas.^{73,75,95,112-115}

La elección de la temperatura y tiempo de reacción, la composición de la mezcla de reacción, así como la cantidad y el tipo de ligando determinará la morfología, tamaño y fase de las UCNP.^{78,88,90,107,110,111}

Debido al gran número de UCNP existentes, nos vamos a centrar en los procedimientos de síntesis de aquellas compuestas por la matriz NaYF₄.

1.6.1- Coprecipitación

El método de coprecipitación es de los más fáciles para la obtención de UCNP monodispersas. Es un método simple que requiere tiempos cortos de reacción, condiciones suaves y no necesita de equipamientos costosos.⁷⁵

Yi y col.⁹⁷ fueron los primeros en utilizar el método de coprecipitación para la síntesis de UCNP de NaYF₄:Yb,Er recubiertas con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).⁹⁷ El procedimiento parte una disolución de complejos Ln-EDTA formados a partir de la mezcla de los LnCl₃ con EDTA. La disolución Ln-EDTA se inyecta rápidamente en una disolución de NaF bajo agitación, produciéndose una nucleación homogénea. El diámetro

de las UCNP se puede controlar en el rango de 37 a 166 nm modificando la relación inicial de EDTA/Ln. Las UCNP obtenidas por este método son poco luminiscentes y requieren de un posterior recalentamiento entre 400-600°C durante 5 horas, lo que provoca la transición de fase $\alpha \rightarrow \beta$, aumentando su emisión UC en 40 veces.⁹⁷

No obstante, el recalentamiento de las UCNP conlleva la carbonización de los ligandos como el EDTA a altas temperaturas, lo cual incrementa el tamaño de las UCNP. Esto requiere de etapas posteriores para la modificación de la superficie de las UCNP.⁹⁵

Por otro lado, existe un gran número de ligandos comerciales como la polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenimina (PEI) que se pueden usar para controlar el crecimiento de las nanopartículas ofreciendo en un solo paso buena dispersabilidad de las UCNP en medios acuosos y funcionalidad en su superficie.¹¹²

1.6.2- Descomposición térmica

El método de descomposición térmica se usó por primera vez para sintetizar UCNP de LaF_3 .¹¹⁶ Poco después se sintetizaron por este método UCNP de $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er/Tm}$.¹¹⁷ Se obtienen UCNP de alta cristalinidad, monodispersas, con mucha fotoluminiscencia y de tamaño modulable.⁷⁵

El procedimiento consiste en el calentamiento a altas temperaturas ($\sim 300^\circ\text{C}$) de una disolución de los precursores de lantánidos, normalmente, compuestos organometálicos como sales de acetato o trifluoroacetato. Habitualmente, la síntesis utiliza 1-octadeceno (ODE) como disolvente orgánico no coordinante y elevado punto de ebullición y el ácido oleico (AO) como ligando orgánico coordinante.¹¹⁷

Cuando la mezcla alcanza los 250°C , los trifluoroacetatos se descomponen y empieza la nucleación. Entonces las nanopartículas empiezan a crecer y cuando los precursores se han consumido, las nanopartículas pequeñas son más estables que las grandes (disolviéndose estas últimas). Las partículas disueltas se agregan para formar partículas más grandes. Finalmente, a altas

temperaturas ($\sim 300^\circ\text{C}$) se produce la transición $\alpha \rightarrow \beta$, obteniéndose nanopartículas $\beta\text{-NaYF}_4$ con un alto grado de cristalinidad (Figura 1.6)

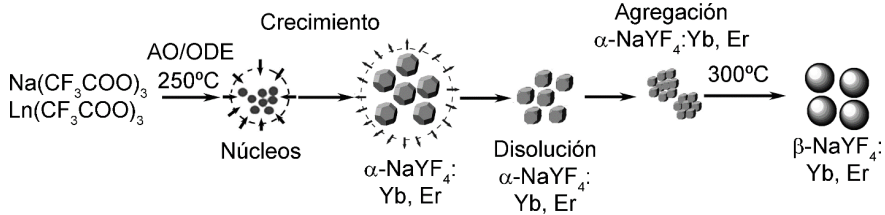


Figura 1.6. Formación y crecimiento de nanopartículas de $\alpha\text{-NaYF}_4:\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$. Adaptado con permiso de la referencia 118, Copyright 2007, American Chemical Society.

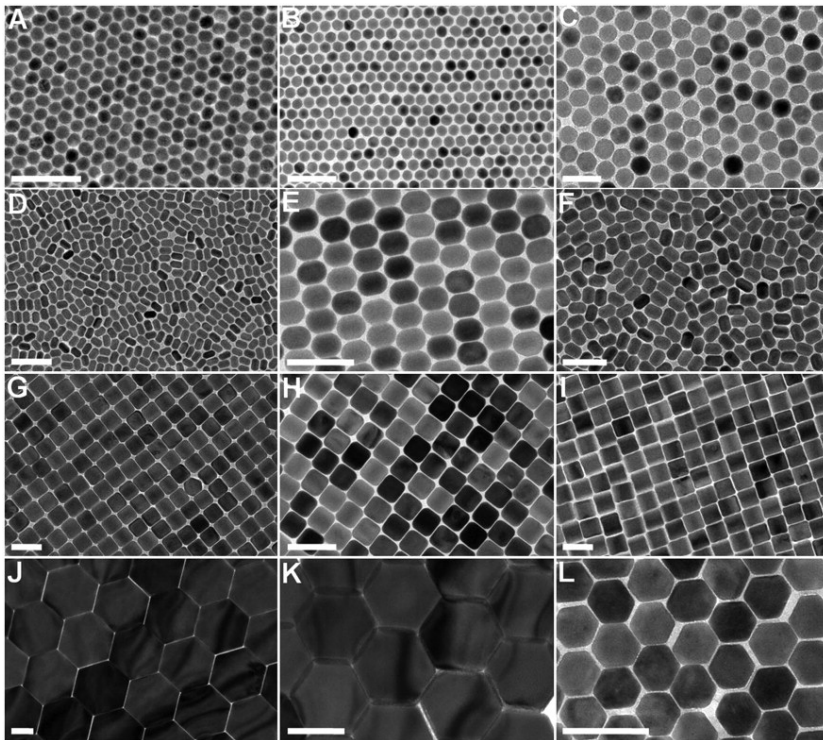


Figura 1.7. Imágenes TEM de UCNP $\beta\text{-NaYF}_4$. UCNP $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}$ (20/2 mol%) (A, D, G, J). UCNP $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Tm}$ (22/0.2 mol%) (B, E, H, K). UCNP $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Ho}$ (20/2 mol%) (F, I). UCNP $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Ce/Ho}$ (20/11/2 mol%) (C, L). Escala: 100 nm. Reimpreso con permiso de 120.

El tamaño de las UCNP se puede controlar modificando el tipo y cantidad de ligando coordinante.¹¹⁷ Además, el tipo de ligando

puede disminuir la barrera de transición $\alpha \rightarrow \beta$, por ejemplo el uso de trioctilfosfina (TOP) hace que se obtengan nanopartículas β -NaYF₄ a menores temperaturas.¹¹⁹

La forma de las β -NaYF₄ se puede cambiar a través de variaciones en el tiempo de reacción así como con la relación de los trifluoroacetatos de lantánidos, obteniendo esferas, elipses, prismas hexagonales o cubos (Figura 1.7).¹²⁰

Por lo tanto, este método permite obtener UCNP monodispersas con unas propiedades predeterminadas a través del control de los parámetros experimentales. Sin embargo, se forman subproductos fluorados muy tóxicos y el procedimiento experimental es relativamente caro, debido al precio de los materiales de partida, las altas temperaturas y necesidad de atmósfera protectora.¹¹²

1.6.3- Hidro(solvo)térmica

La síntesis hidro(solvo)térmica precisa de altas presiones y temperaturas más bajas (< 250°C), normalmente por encima del punto crítico del disolvente. La reacción se mantiene sellada con el uso de una autoclave. El método utiliza disolventes orgánicos como alcoholes o aminas en presencia de surfactantes como AO, EDTA, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) o polietilenimina (PEI).¹¹² Una de las principales ventajas de este método es que no genera subproductos tóxicos.

El primer intento exitoso de síntesis hidrotermal lo llevaron a cabo Heer y col.¹⁰⁰ que obtuvieron nanopartículas de NaYF₄: Er³⁺(2%), Yb³⁺ (20%) y NaYF₄: Tm³⁺(2%), Yb³⁺(20%) en fase cúbica. Más tarde, se logró sintetizar la fase hexagonal de nanopartículas NaYF₄.¹²¹ Básicamente, el método parte de los Ln(NO₃)₃ como precursores lantánidos disueltos en disolventes polares (agua, etanol...). A continuación, se añade NH₄F₂ como fuente de F⁻ junto con los surfactantes. La mezcla de reacción se calienta en el autoclave a temperaturas entre 140-200°C durante 12-24h.¹²¹ Se obtienen UCNP muy luminiscentes cuyo tamaño y

forma se pueden controlar cambiando el surfactante o el disolvente (Figura 1.8).¹²²

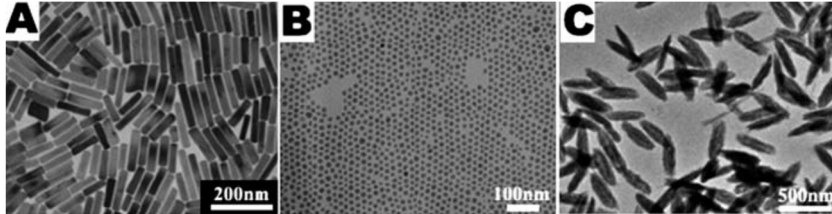


Figura 1.8. Imágenes de las UCNP obtenidas en la estrategia sintética hidro(solvo)térmica. Imágenes TEM de nanorods de β -NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ (A), α -NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ esféricas (B) y con forma de grano de arroz (C). Adaptado con permiso de la referencia 123. Copyright 2010, The Royal Society of Chemistry.

Esta estrategia permite la obtención de UCNP con buena cristalinidad en condiciones suaves de reacción, así como permite el control de la forma y tamaño adecuando la temperatura, tiempo de reacción, naturaleza del disolvente y surfactante, así como su relación molar.¹¹²

1.6.4- Coprecipitación a alta temperatura, método Ostwald ripening.

La síntesis parte de los LnCl₃ en una mezcla de AO como ligando y ODE como disolvente.¹²⁴ La adición controlada a temperatura ambiente de una disolución que contiene cantidades estequiométricas (relativas a Ln³⁺) de NaOH y NH₄F, como fuente de fluoruro, forma pequeños núcleos amorfos de NaYF₄ estabilizados por el oleato. Posteriormente, se eleva la temperatura (~300°C) provocando el crecimiento uniforme de nanopartículas cristalinas (Figura 1.9).¹²⁵

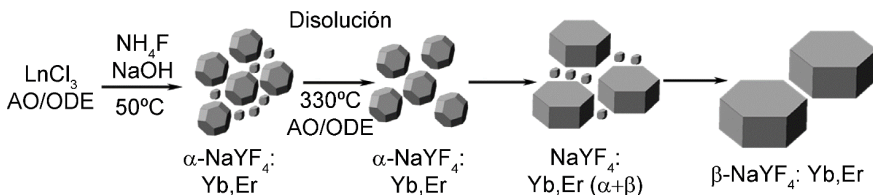


Figura 1.9. Etapas de crecimiento de las nanopartículas β -NaYF₄:Er³⁺/Yb³⁺. Adaptado con permiso de la referencia 118, Copyright 2007, American Chemical Society.

En este método las UCNP crecen siguiendo el proceso de *Ostwald ripening* (maduramiento de Ostwald) en el que las partículas con menor relación S/V, es decir, las más grandes, están energéticamente favorecidas respecto las más pequeñas (menos estables). Como consecuencia, se obtienen UCNP más grandes.¹²⁶

La estrategia se basa en la separación temporal de la nucleación del crecimiento del cristal por la lenta adición de la disolución de precursores y la posterior manipulación de la temperatura.¹¹³ Se obtienen nanopartículas β -NaYF₄ cristalinas y monodispersas con diferentes formas y tamaños a través del control de la temperatura y el tiempo de reacción, así como variando la relación AO/ODE.¹²⁴

Este método se considera fácil, ya que utiliza condiciones más suaves, no produce subproductos tóxicos y requiere un menor tiempo de reacción.⁷³ Además, el método está considerado como el mejor procedimiento para obtener UCNP monodispersas, uniformes en tamaño y una sola fase cristalina.⁶¹

1.6.4- Líquidos iónicos

Actualmente, los líquidos iónicos son una alternativa “verde” a los disolventes convencionales.¹²⁷ Pueden actuar como ligandos o surfactantes en la síntesis de materiales inorgánicos y tienen una gran estabilidad química y térmica.¹¹²

Se ha logrado sintetizar nanopartículas β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺/Tm³⁺ esféricas utilizando el líquido iónico tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio ([Bmim][BF₄]) con carácter hidrofílico. El [Bmim][BF₄] tiene el papel de disolvente, reactivo y plantilla para facilitar la formación de los núcleos de UCNP.¹²⁸

Por un lado, los cationes imidazolio actúan como ligando, lo que controla el crecimiento de los núcleos de NaYF₄, mientras que los aniones tetrafluoroborato son una fuente de flúor tras su hidrólisis parcial. Las UCNP se sintetizaron a partir de los Ln(NO₃)₃ en presencia de NaCl y el [Bmim][BF₄] como disolvente en una autoclave a 160°C durante 18 horas. Las UCNP así obtenidas eran

dispersables en agua y mostraban una gran luminiscencia UC.¹²⁸ Aunque el método es muy útil, uno de los principales inconvenientes es que produce aglomerados de UCNP.¹²⁸

1.6.5- Síntesis con microondas

La síntesis con microondas es una versión adaptada de las anteriores, en las que se usa un microondas para calentar la reacción. Su principal ventaja es que necesita tiempos de reacción muy cortos (~ 10 minutos).¹²⁹

Por ejemplo, se han obtenido nanocristales de NaYF₄:Yb, Er calentando una mezcla de AO/ODE y los trifluoroacetatos de lantánidos a 290°C en un reactor de microondas durante 10 minutos.^{115,129,130}

También se ha descrito la síntesis hidrotérmica de NPs de NaYF₄:Yb, Er recubiertas con ácido 3,5-dinitrobenzoico, donde se obtienen UCNP dispersables en agua tras 10 minutos de irradiación con microondas y una temperatura de reacción de 150°C.¹³¹

No obstante, el principal inconveniente del uso de microondas es la falta de control sobre el tamaño y forma de las UCNP.

1.7- Modificación de la superficie de las UCNP

Tal y como se ha visto en la sección anterior, el ligando orgánico o surfactante estabiliza las UCNP durante su síntesis, controlando el crecimiento y evitando la aglomeración de las UCNP.¹³² Pero, además existe un efecto sinérgico entre el ligando orgánico y las UCNP, donde el ligando determina la dispersabilidad de las UCNP en los diferentes medios, puede modificar las propiedades ópticas y/o proporcionar funcionalidad extra.⁸⁶ Por tanto, la aplicabilidad en una área u otra de las UCNP va a depender en gran medida del ligando que las recubra.

De manera general, un ligando está formado por un grupo anclante, una cadena espaciadora y un grupo funcional (Figura 1.10). El grupo anclante es el encargado de la coordinación del ligando con los Ln³⁺ en la superficie de las UCNP. Los grupos

anclantes más habituales son NH_2 (p. ej. oleilamina, OM), SH (p. ej. polietilenglicol con grupos tiol, PEG-SH), COO^- (p. ej. OA), y PO_3^- (p. ej. PEG- PO_3^-).⁸⁶

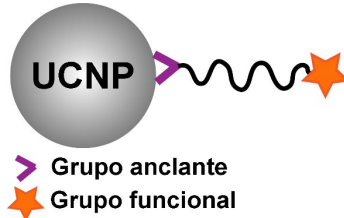


Figura 1.10. Esquema general del recubrimiento con ligandos de una UCNP.

También se pueden usar ligandos multiquelantes como polímeros¹³³ o dendrímeros¹³⁴ que evitan la desorción del ligando que no está unido covalentemente. No obstante, el grupo anclante más usado es el carboxilato, ya que presenta gran afinidad por la superficie de las UCNP y no se observa la desorción gradual de la superficie, excepto a pH ácidos, donde el carboxilato se protona formando el ácido, lo que facilita su descoordinación de la superficie.⁸⁶

El otro extremo del ligando, conocido como grupo funcional, quedaría en contacto con el medio, siendo el responsable de la dispersabilidad en los diferentes medios o pudiendo ser utilizado para dotar a las UCNP de funcionalidad adicional (Figura 1.11), por ejemplo, para reconocimiento molecular, o bien servir como punto de unión a una molécula de interés como un medicamento.⁸⁶

Por tanto, las UCNP sintetizadas por los métodos convencionales suelen ser dispersables en medios orgánicos debido a la naturaleza hidrofóbicas del ligando (OA, OM...). En este punto, la nanoquímica también tiene un papel muy importante, ya que la correcta modificación de la superficie de las UCNP va a permitir mejorar la dispersabilidad de éstas en medios acuosos (p.ej. para aplicaciones biomédicas) o bien añadir una determinada funcionalidad para aplicar las UCNP en un área determinada (p. ej. una molécula orgánica sensible al pH).⁶¹

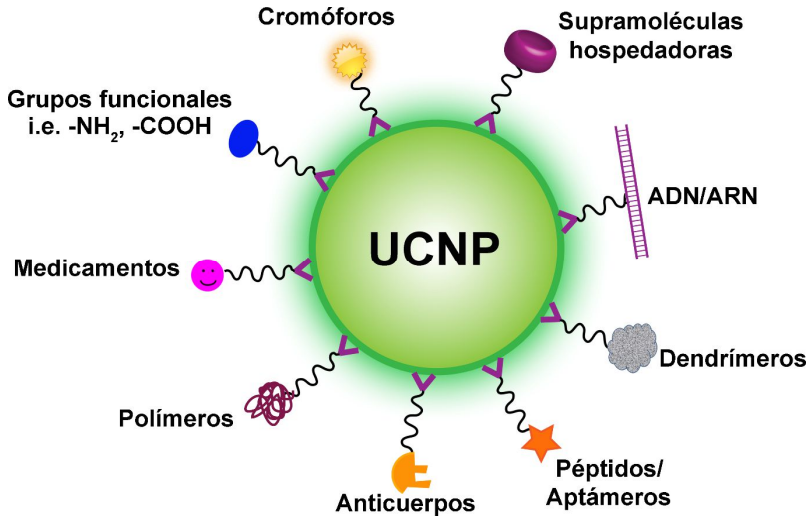


Figura 1.11. Esquema representativo de algunas de las diferentes funcionalidades que puede aportar el ligando a la superficie de las UCNPs.

Hay una gran variedad de métodos descritos para modificar la superficie de las UCNPs como intercambio de ligando, modificación del ligando original, recubrimiento con polímeros anfílicos o surfactantes, interacciones huésped-receptor, bioconjugación o silanización.^{60,61,80,95,132}

En los siguientes puntos se hará un repaso breve a cada uno de los métodos de modificación de la superficie.

1.7.1- Intercambio de ligando

El intercambio de ligando es la sustitución del ligando original por el ligando deseado que dotará de nuevas propiedades a las UCNPs. Existen dos vías para lograrlo, intercambio directo de ligando o en dos pasos.

1.7.1.1- Intercambio directo de ligando

En este método, el ligando nuevo tiene una mayor afinidad por la superficie de las UCNPs y, por tanto, es capaz de desplazar al ligando original (Figura 1.12).¹³⁵ La fuerza de interacción de los grupos funcionales con la superficie de las UCNPs crece el siguiente orden: -SH, -NH₂, -COO⁻, -PO₃⁻.⁶¹

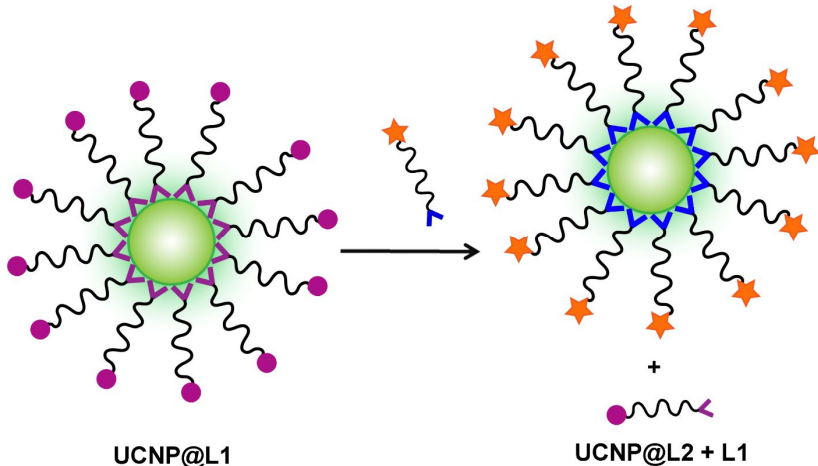


Figura 1.12. Esquema general del intercambio directo de ligando. UCNP@L1: UCNP recubiertas con ligando 1; UCNP@L2: UCNP recubiertas con ligando 2.

Por ello, un ligando con un grupo fosfato es capaz de desplazar de la superficie un ligando carboxilato tal y como describieron Boyer y col. en su trabajo.¹³⁶ En él, el polímero polietilenglicol con grupos $-\text{PO}_3^-$ (PEG- PO_3^-) es capaz de desplazar el oleato de la superficie de las UCNP mediante agitación de las UCNP recubiertas de oleato (UCNP@OA) en presencia del PEG- PO_3^- . De este modo se obtienen nanopartículas de $\text{NaYF}_4: \text{Yb}, \text{Tm}$ dispersables en agua.

Además, el incremento del tiempo o de la temperatura de reacción permite el desplazamiento del oleato con aminas como poli(alilamina) (PAA)¹³⁷ o tioles como PEG-SH.¹³⁸ La modificación con PEG otorga a las UCNP dispersabilidad en agua así como biocompatibilidad.⁷⁹ Además, los polímeros PEG heterobifuncionales como COOH-PEG-SH o NH_2 -PEG-SH aportan un grupo funcional adicional ($-\text{COOH}$ o $-\text{NH}_2$, respectivamente) adecuados para una bioconjugación posterior.¹³⁸

El uso de polímeros con diferentes grupos funcionales capaces de coordinarse a los Ln^{3+} en la superficie, les permite actuar como ligandos polidentados, incrementado así la afinidad por la superficie de las UCNP. Por ejemplo, un copolímero (COP) formado por 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) y ácido 2-acrilamido-2-

metil-1-propanosulfonsulfónico (AMPS) es capaz de desplazar el ligando oleato debido a su capacidad multiquelante. Se obtienen NaYF₄: Yb, Er dispersables en agua y resistentes a pH ácidos.¹³⁹

Desde el punto de vista de una reacción química este proceso resulta fácil, ya que consiste en la simple agitación. No obstante, el método requiere de tiempos largos de agitación (desde 4h hasta varios días) en presencia de un exceso del ligando deseado y las UCNP tienden a agregarse durante el proceso. Además, el intercambio directo de ligando requiere de la optimización de los parámetros de reacción para cada ligando.¹⁴⁰

1.7.1.2- Intercambio de ligando en dos etapas

Esta estrategia consiste en la eliminación del oleato de la superficie de las UCNP seguido de la adición del ligando nuevo.

A día de hoy existen tres métodos para la eliminación del ligando de la superficie. El primero consiste en el uso de tetrafluoroborato de nitrosilo (NOBF₄), reemplazando ligandos como OA o OM en la superficie de la UCNP por iones BF₄⁻, obteniendo partículas casi desnudas y dispersables en agua.¹⁴¹

En el segundo se obtienen nanopartículas desnudas tras la eliminación del oleato mediante protonación del grupo carboxilato en presencia de HCl.¹⁴²

El último método y, el menos usado, es la eliminación del ligando OA mediante ultrasonidos en exceso de etanol.¹⁴³

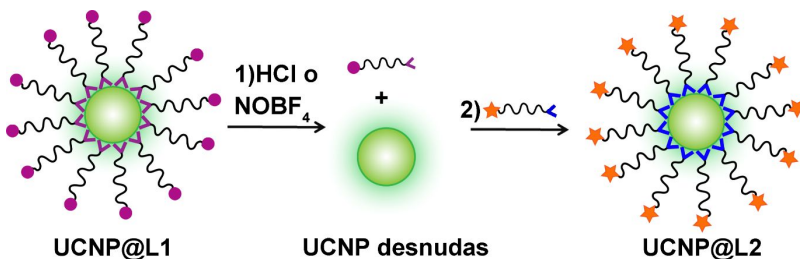


Figura 1.13. Esquema general del intercambio de ligando en dos etapas. UCNP@L1: UCNP recubiertas con ligando 1; UCNP@L2: UCNP recubiertas con ligando 2.

Tras la eliminación del ligando nativo, se puede añadir fácilmente cualquier tipo de ligando siempre que contenga un grupo anclante adecuado, lo que evita la agregación durante el proceso de intercambio (Figura 1.13).⁶¹

1.7.2- Modificación del ligando

La modificación del ligando oleato de las UCNP iniciales se puede realizar a través de la simple oxidación del doble enlace en la cadena de la OA u OM a un grupo carboxilo o epóxido (Figura 1.14).⁹⁵

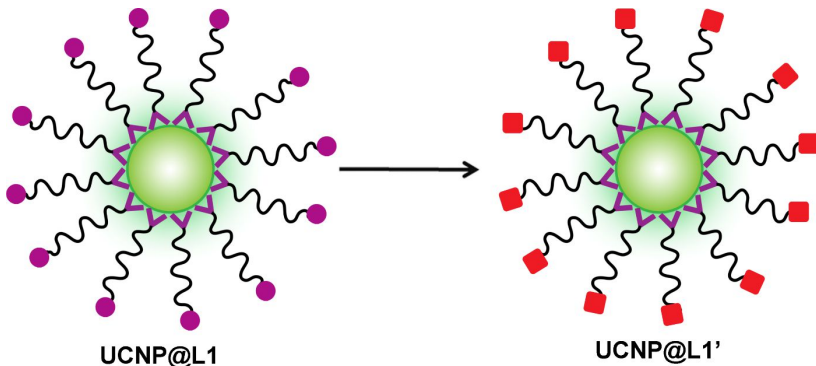


Figura 1.14. Esquema general del procedimiento de modificación del ligando. UCNP@L1: UCNP recubiertas con ligando 1; UCNP@L1': UCNP recubiertas con ligando 1 modificado.

Para ello, se utilizan reactivos oxidantes como el ozono o el de Lemieux-von Rudloff. Las UCNP así obtenidas se pueden unir covalentemente a otras moléculas de interés.⁴ A pesar de ser un método sencillo, está limitado por el escaso número de ligandos que se pueden introducir (aldehídos, epóxidos y ácidos carboxílicos).⁶¹

1.7.3- Interacciones entre ligandos

Esta estrategia se basa en la adición de una nueva capa orgánica de un nuevo ligando debido a las interacciones entre el ligando nativo y el nuevo. La atracción de ambos ligandos se puede dar mediante interacciones electrostáticas, hidrofóbicas (interdigitación) o huésped-receptor.¹³⁵

1.7.3.1- Interacciones electrostáticas

En base a la atracción electrostática entre especies de carga opuesta, es posible modificar la superficie de las UCNP. Incluso se pueden hacer nanohíbridos de varias capas diferentes unidas entre ellas mediante interacciones electrostáticas (Figura 1.15).¹³⁵

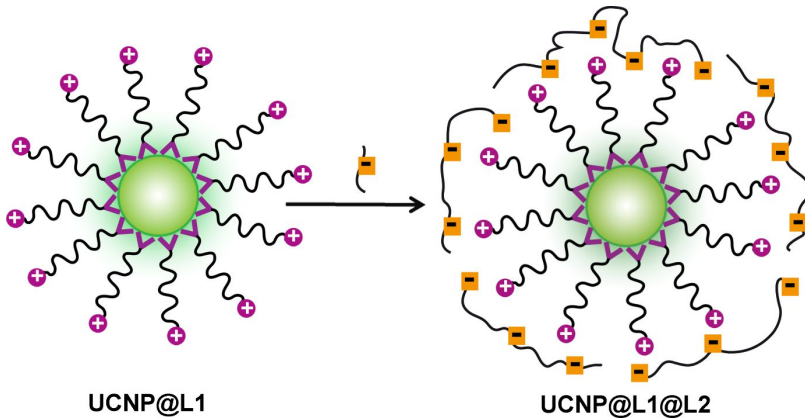


Figura 1.15. Esquema general de la modificación de la superficie de las UCNP basada en interacciones electrostáticas entre los ligandos. UCNP@L1: UCNP recubiertas con ligando 1; UCNP@L1@L2: UCNP recubiertas con ligando L1, recubiertas con L2.

Por ejemplo, teniendo en cuenta las atracciones electrostáticas entre la poli(hidrocloruro de alilamina) (PAH, por sus siglas en inglés), cargada positivamente y el poli(4-estirenosulfonato de sodio) (PSS, por sus siglas en inglés), cargado negativamente, se puede construir un nanohíbrido multicapa.¹⁴⁴ Así, una capa de PAH con carga positiva se puede añadir sobre UCNP cuya superficie está cargada negativamente. Sobre esta última, se puede depositar una capa de PSS con carga negativa. Así se consigue la síntesis de UCNP@PAH/PSS/PAH.¹⁴⁴

Este método se conoce como modificación de la superficie capa por capa y permite el control de la carga en la superficie así como el grosor de la capa orgánica alrededor de la UCNP.⁸⁶

1.7.3.2- Interacciones hidrofóbicas

Esta estrategia, también conocida como interdigitación, se basa en las interacciones de van der Waals entre la cadena hidrofóbica del ligando en la superficie de la UCNP y las cadenas alquílicas hidrofóbicas de otro ligando o bien con la parte hidrofóbica de un polímero anfifílico o surfactante (Figura 1.16).¹⁴⁰

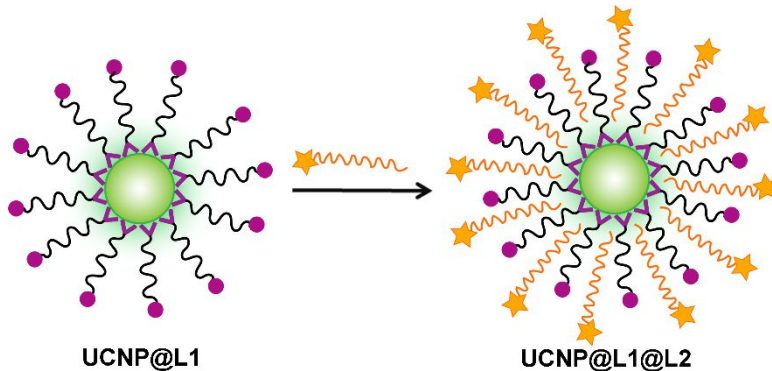


Figura 1.16. Esquema general de la modificación de la superficie de las UCNP basada en interacciones entre las cadenas hidrofóbicas de dos ligandos. UCNP@L1: UCNP recubiertas con ligando 1; UCNP@L1@L2: UCNP recubiertas con ligando L1, recubiertas con L2.

Polímeros anfifílicos, como polietilenimina (PEI), PEG, ácido poliacrílico (PAA) o N-succinil-N'-octil chitosan (SOC), fosfolípidos, como maleimida o biotina y surfactantes, como CTAB o TWEEN 80, se han utilizado para modificar la superficie de UCNP mediante interacciones hidrofóbicas entre cadenas lipofílicas.^{86,132}

1.7.3.3- Interacciones huésped-receptor

Esta estrategia se basa en interacciones tipo huésped-receptor, como por ejemplo la α -ciclodextrina (α -CD) con el adamantano acético¹⁴⁵ o con OA.¹⁴⁶ En estos casos se produce la transferencia de fase de las UCNP desde una fase orgánica que contiene las UCNP a una fase acuosa que contiene la α -CD debido a la formación de complejos huésped-receptor UCNP@AA@CD y UCNP@OA@CD (Figura 1.17).

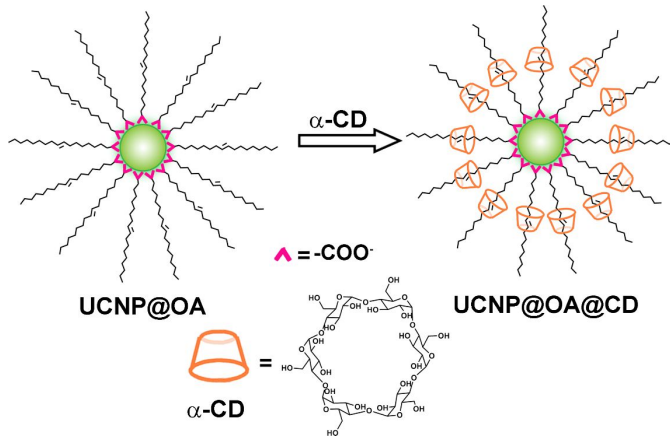


Figura 1.17- Esquema de la modificación de la superficie de las UCNP basada en interacciones huésped-receptor entre la cavidad interna de la α -ciclodextrina (α -CD) y la cadena hidrofóbica del ligando. Adaptado con permiso de la referencia 146. Copyright 2011, Elsevier Ltd.

1.7.4- Silanización

La silanización o recubrimiento con sílice es un método basado en la adición de una capa inorgánica de sílice (amorfa o porosa) sobre las UCNP, lo que las convierte en dispersables en agua y biocompatibles.⁶⁰ Además ofrece una gran flexibilidad en grupos funcionales (-COOH, -NH₂, -SH...), que se pueden utilizar para la posterior conjugación con otras moléculas (Figura 1.18).

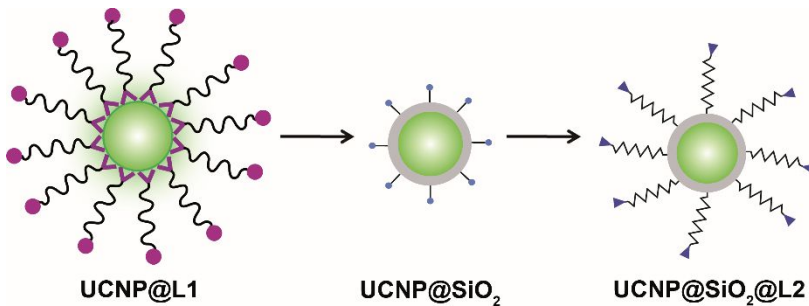


Figura 1.18- Esquema general de la silanización. UCNP@L1: UCNP recubiertas con ligando 1 (hidrofóbico); UCNP@SiO₂: UCNP recubiertas con una capa de sílice; UCNP@SiO₂@L2: UCNP recubiertas con una capa de sílice conjugadas a un ligando hidrofílico (L2).

Por ejemplo, nanopartículas de NaYF₄: Yb, Tm se han recubierto con sílice mesoporosa modificada con grupos azo.

Posteriormente, se introdujeron moléculas de doxorubicina (DOX) en los poros de la sílice mesopora. En este sistema, los grupos azo actúan como motores moleculares debido a cambios conformacionales inducidos por la luz y pueden utilizarse para la liberación controlada de un fármaco tras la excitación a 975 nm.¹⁴⁷

No obstante, tras el recubrimiento con sílice se incrementa la polidispersidad de la muestra comparado con la misma muestra antes de ser tratada. En el caso de capas de sílice delgadas es muy difícil comprobar que el proceso de silanización ha concluido. Aunque el proceso de silanización no modifica las propiedades ópticas de las UCNP, las UCNP@SiO₂ son poco estables en agua y tienden a agregarse y precipitar en cuestión de horas.^{73,140}

1.8- Aplicaciones

1.8.1- Seguridad

Hoy en día, la seguridad en los documentos impresos es importante para poder mantener la confidencialidad de documentos como cheques bancarios. Las tintas de seguridad que se han usado hasta ahora son tintas downconversion que con las tecnologías existentes hoy en día se han vuelto mucho más fáciles de falsificar. Por eso las tintas de seguridad basadas en UCNP están consideradas como la siguiente generación de tintas.⁸⁹ Por ejemplo, Meruga y col. han utilizado nanopartículas de NaYF₄: Yb, Er (o Tm) para imprimir en papel códigos de respuesta rápida (QR, de sus siglas en inglés). Tras su iluminación con luz NIR, el código QR pasa a ser visible y se puede leer con un teléfono inteligente (smartphone).¹⁴⁸

1.8.2- Sensores

Las UCNP pueden usarse como sensores físicos o (bio)químicos debido a la combinación de la emisión UC y la funcionalidad del ligando orgánico.⁸⁶ Hasta hoy, la aplicabilidad de las UCNP como sensores físicos se centra en la nanotermometría. Ésta se define como la obtención de la temperatura de un sistema con una resolución espacial sub-micrométrica.⁸³

La nanotermometría óptica se basa en la dependencia de la temperatura de las propiedades ópticas de un material, en este caso la fluorescencia de las UCNP. Dos de los niveles energéticos del Er^{3+} , $^4\text{S}_{3/2}$ y $^2\text{H}_{11/2}$, están térmicamente acoplados y la intensidad de emisión se ve afectada por los cambios de temperatura. Así, se puede hacer una curva de calibrado con la relación de intensidad de luminiscencia (I_{525}/I_{545}) y su dependencia con la temperatura.⁸⁷ Como ejemplo, las $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$, Er UCNP se han usado para medir con exactitud la temperatura interna de una célula.¹⁴⁹

La aplicación de las UCNP como sensores bio(químicos) está más extendida. La detección química utiliza UCNP funcionalizadas con moléculas fotoactivas cuya absorbancia se solapa con la emisión de las UCNP. Por otro lado los sensores bioquímicos son UCNP dispersables en agua y funcionalizadas con receptores.⁸⁶ En ambos casos la presencia del analito se determinará a través de la respuesta óptica, que será directamente proporcional a la concentración.¹³²

1.8.3- Bioimagen

Una parte fundamental en la biomedicina es la visualización de muestras biológicas con el fin de obtener información morfológica, anatómica y fisiológica de ellas para poder detectar enfermedades o ver cuál es la mejor forma de administrar un tratamiento determinado.¹³² El uso de luz NIR permite una mayor penetración en los tejidos y evita la autofluorescencia de las muestras biológicas.^{79,150} Esto, sumado a sus excelentes propiedades ópticas y químicas, las hace óptimas para su uso en aplicaciones biomédicas como bioimagen.

Debido a la gran variedad de UCNP existentes éstas pueden aplicarse en un amplio número de técnicas no invasivas de bioimagen (fluorescencia, ultrasonidos, nuclear, rayos X, etc.).¹⁵⁰ Destaca su aplicación en la bioimagen por fluorescencia (FI), por sus propiedades emisivas, y biomagen por resonancia magnética (MRI), debido a la posibilidad de introducción de Gd^{3+} como agente de contraste en la estructura de las UCNP.¹⁵⁰

Además, la correcta selección de la composición de los nanohíbridos basados en UCNP permitiría su uso en biomagen multimodal, es decir, en la obtención de imágenes mediante la combinación de dos o más técnicas diferentes (por ejemplo, FI-MRI o FI-ultrasonidos).^{58,80,140,150}

1.8.4- Terapia

La bioimagen es indispensable para la detección de enfermedades, pero las UCNP también son muy útiles como agentes terapéuticos, especialmente en terapias contra el cáncer. Las UCNP destacan por su uso en terapia fotodinámica (TFD), terapia fototérmica (TFT) o quimioterapia.¹⁵⁰

La TFD consiste en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) mediante la activación con luz de un fotosensibilizador (FS). Las UCNP funcionalizadas con moléculas orgánicas como el azul de metileno (AM), ftalocianina de zinc (II) (ZnPc) o chlorin e6, son capaces de generar ERO, en concreto oxígeno singlete, tras su excitación en el NIR.¹³²

De manera análoga, las UCNP funcionalizadas con agentes fototérmicos como nanopartículas de Ag o Au pueden usarse en TFT. De esta forma, la transferencia eficiente de energía a las AuNP tras la excitación de las UCNP a 975 nm, produce un aumento de la temperatura, causando daño a las células.¹⁵¹

La quimioterapia basada en UCNP incluye dos aspectos: terapia guiada por bioimagen y la liberación controlada del fármaco por luz. Por ejemplo, las UCNP unidas a DOX a través de un grupo azo cuyo enlace se rompe excitando a 975 nm, permite la liberación controlada por luz del agente quimioterapéutico.¹⁴⁷

1.8.5- Otras aplicaciones

Es posible combinar una o más aplicaciones dentro de un mismo nanosistema configurando adecuadamente las propiedades de las UCNP a través de la selección del ligando, tamaño, forma y composición. Este tipo de NP reciben el nombre de UCNP

multifuncionales y pueden combinar, por ejemplo, la terapia e imagen¹⁵² o terapia y diagnóstico (*teragnosis*).⁸⁰

Además de todas las aplicaciones comentadas, las UCNP se pueden aplicar en la construcción de celdas solares⁸⁵ o láseres^{81,153} en dispositivos luminiscentes como los LCD (dispositivos de cristal líquido)¹⁵⁴ o en fotocátalisis.^{155,156}

1.9- Bibliografía

- (1) Bhushan, B. In *Springer Handbook of Nanotechnology*; Bhushan, B., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2010, p 1.
- (2) Feynman, R. *Caltech Engineering and Science* **1960**, *23*, 22.
- (3) Rao, C. N. R.; Müller, A.; Cheetham, A. K. In *The Chemistry of Nanomaterials*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2005, p 1.
- (4) Chen, G.; Roy, I.; Yang, C.; Prasad, P. N. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2826.
- (5) Prasad, P. N. In *Nanophotonics*; John Wiley & Sons, Inc.: 2004, p 177.
- (6) El-Sayed, M. A. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 326.
- (7) Prasad, P. N. In *Nanophotonics*; John Wiley & Sons, Inc.: 2004, p 79.
- (8) M Hosokawa; K. Nogi; M Naito; Yokoyama, T. *Nanoparticle Technology Handbook (Second Edition)*; Elsevier: Amsterdam, 2012.
- (9) Alivisatos, A. P. *Science* **1996**, *271*, 933.
- (10) Cao, G.; Wang, Y. In *Nanostructures and Nanomaterials*; 2nd ed.; WORLD SCIENTIFIC: 2012, p 433.
- (11) Yin, Y.; Alivisatos, A. P. *Nature* **2005**, *437*, 664.
- (12) Ozin, G. A. *Adv. Mater.* **1992**, *4*, 612.
- (13) Nam, J.; Won, N.; Bang, J.; Jin, H.; Park, J.; Jung, S.; Jung, S.; Park, Y.; Kim, S. *Adv. Drug Del. Rev.* **2013**, *65*, 622.
- (14) Varun, K. A. S.; Andrei, V. Z.; Ewa, M. G. *J. Phys. Condens. Matter* **2013**, *25*, 194101.
- (15) Probst, J.; Dembski, S.; Milde, M.; Rupp, S. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **2012**, *12*, 49.
- (16) Schäferling, M.; Resch-Genger, U. In *Reviews in Fluorescence 2016*; Geddes, C. D., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2017, p 71.
- (17) Petryayeva, E.; Algar, W. R.; Medintz, I. L. *Appl. Spectrosc.* **2013**, *67*, 215.
- (18) Wolfbeis, O. S. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4743.
- (19) Wu, X.; Tian, F.; Zhao, J. X.; Wu, M. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2013**, *9*, 1265.
- (20) Pu, C.; Qin, H.; Gao, Y.; Zhou, J.; Wang, P.; Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 3302.
- (21) Murray, C. B.; Norris, D. J.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706.
- (22) Pérez-Prieto, J. *Photochem. Photobiol.* **2013**, *89*, 1291.
- (23) Yu, W. W.; Qu, L.; Guo, W.; Peng, X. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854.
- (24) Forster, L. S. *Photochem. Photobiol.* **1976**, *23*, 445.
- (25) Schmidt, L. C.; Pertegas, A.; González-Carrero, S.; Malinkiewicz, O.; Agouram, S.; Mínguez Espallargas, G.; Bolink, H. J.; Galián, R. E.; Pérez-Prieto, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 850.
- (26) Mitzi, D. B. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2355.
- (27) Chen, C.-W.; Hsiao, S.-Y.; Chen, C.-Y.; Kang, H.-W.; Huang, Z.-Y.; Lin, H.-W. *J. Mater. Chem. A* **2015**, *3*, 9152.
- (28) Gonzalez-Carrero, S.; Francés-Soriano, L.; González-Béjar, M.; Agouram, S.; Galian, R. E.; Pérez-Prieto, J. *Small* **2016**, *12*, 5245.
- (29) González-Carrero, S.; Galian, R. E.; Pérez-Prieto, J. *Part. Part. Syst. Charact.* **2015**, *32*, 709.
- (30) Yang, W. S.; Noh, J. H.; Jeon, N. J.; Kim, Y. C.; Ryu, S.; Seo, J.; Seok, S. I. *Science* **2015**.

- (31) Stranks, S. D.; Snaith, H. J. *Nat. Nano.* **2015**, *10*, 391.
- (32) Yahia-Ammar, A.; Sierra, D.; Mérola, F.; Hildebrandt, N.; Le Guével, X. *ACS Nano* **2016**, *10*, 2591.
- (33) Chen, L.-Y.; Wang, C.-W.; Yuan, Z.; Chang, H.-T. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 216.
- (34) Vanegas, J. P.; Zaballos-García, E.; González-Béjar, M.; Londoño-Larrea, P.; Pérez-Prieto, J. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 17678.
- (35) Shang, L.; Dong, S.; Nienhaus, G. U. *Nano Today* **2011**, *6*, 401.
- (36) Ho, D.; Wang, C.-H. K.; Chow, E. K.-H. *Sci. Adv.* **2015**, *1*.
- (37) Xu, X.; Ray, R.; Gu, Y.; Ploehn, H. J.; Gearheart, L.; Raker, K.; Scrivens, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12736.
- (38) Lim, S. Y.; Shen, W.; Gao, Z. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 362.
- (39) Li, H.; Kang, Z.; Liu, Y.; Lee, S.-T. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 24230.
- (40) Baker, S. N.; Baker, G. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6726.
- (41) Zhang, J.; Yu, S.-H. *Mater. Today* **2016**, *19*, 382.
- (42) Campos, B. B.; Contreras-Cáceres, R.; Bandoz, T. J.; Jiménez-Jiménez, J.; Rodríguez-Castellón, E.; Esteves da Silva, J. C. G.; Algarra, M. *Carbon* **2016**, *106*, 171.
- (43) Wood, C. S.; Stevens, M. M. *Nature* **2016**, *539*, 505.
- (44) Vlasov, I. I.; Shiryaev, A. A.; Rendler, T.; Steinert, S.; Lee, S.-Y.; Antonov, D.; Voros, M.; Jelezko, F.; Fisenko, A. V.; Semjonova, L. F.; Biskupek, J.; Kaiser, U.; Lebedev, O. I.; Sildos, I.; Hemmer, P. R.; Konov, V. I.; Gali, A.; Wrachtrup, J. *Nat. Nano.* **2014**, *9*, 54.
- (45) Fu, C.-C.; Lee, H.-Y.; Chen, K.; Lim, T.-S.; Wu, H.-Y.; Lin, P.-K.; Wei, P.-K.; Tsao, P.-H.; Chang, H.-C.; Fann, W. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 727.
- (46) Tisler, J.; Balasubramanian, G.; Naydenov, B.; Kolesov, R.; Grotz, B.; Reuter, R.; Boudou, J.-P.; Curmi, P. A.; Sennour, M.; Thorel, A.; Börsch, M.; Aulenbacher, K.; Erdmann, R.; Hemmer, P. R.; Jelezko, F.; Wrachtrup, J. *ACS Nano* **2009**, *3*, 1959.
- (47) Sarkar, S. K.; Bumb, A.; Wu, X.; Sochacki, K. A.; Kellman, P.; Brechbiel, M. W.; Neuman, K. C. *Biomed. Opt. Exp.* **2014**, *5*, 1190.
- (48) Williams, O. A.; Nesladek, M.; Daenen, M.; Michaelson, S.; Hoffman, A.; Osawa, E.; Haenen, K.; Jackman, R. B. *Diamond Relat. Mater.* **2008**, *17*, 1080.
- (49) Li, J.-L.; Bao, H.-C.; Hou, X.-L.; Sun, L.; Wang, X.-G.; Gu, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1830.
- (50) Duch, M. C.; Budinger, G. R. S.; Liang, Y. T.; Soberanes, S.; Urich, D.; Chiarella, S. E.; Campochiaro, L. A.; Gonzalez, A.; Chandel, N. S.; Hersam, M. C.; Mutlu, G. M. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 5201.
- (51) Atchudan, R.; Edison, T. N. J. I.; Perumal, S.; Karthikeyan, D.; Lee, Y. R. *J Photochem. Photobiol. B* **2016**, *162*, 500.
- (52) Li, J.; Zhang, W.; Chung, T.-F.; Slipchenko, M. N.; Chen, Y. P.; Cheng, J.-X.; Yang, C. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12394.
- (53) Ahlinder, L.; Henych, J.; Lindstrom, S. W.; Ekstrand-Hammarstrom, B.; Stengl, V.; Osterlund, L. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 59447.
- (54) De Volder, M. F. L.; Tawfick, S. H.; Baughman, R. H.; Hart, A. J. *Science* **2013**, *339*, 535.
- (55) Jariwala, D.; Sangwan, V. K.; Lauhon, L. J.; Marks, T. J.; Hersam, M. C. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 2824.
- (56) Wu, Z.; Song, T.; Sun, B. *ChemNanoMat* **2017**, *3*, 75.
- (57) Wu, H.-C.; Chang, X.; Liu, L.; Zhao, F.; Zhao, Y. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 1036.
- (58) Dong, H.; Sun, L.-D.; Yan, C.-H. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1608.
- (59) Lin, C. C.; Liu, R.-S. In *Phosphors, Up Conversion Nano Particles, Quantum Dots and Their Applications: Volume 1*; Liu, R.-S., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2017, p 1.
- (60) Sedlmeier, A.; Gorris, H. H. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1526.
- (61) Muhr, V.; Wilhelm, S.; Hirsch, T.; Wolfbeis, O. S. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 3481.
- (62) Chan, E. M. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1653.
- (63) Auzel, F. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 139.
- (64) He, G. S.; Markowicz, P. P.; Lin, T.-C.; Prasad, P. N. *Nature* **2002**, *415*, 767.
- (65) Wang, Y.; Wang, D.; Zhao, Z.; Wu, C.; Wang, D.; Ci, Z. In *Phosphors, Up Conversion Nano Particles, Quantum Dots and Their Applications: Volume 1*; Liu, R.-S., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2017, p 509.

- (66) Xia, Z.; Xu, Z. In *Phosphors, Up Conversion Nano Particles, Quantum Dots and Their Applications: Volume 1*; Liu, R.-S., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2017, p 285.
- (67) Park, Y. I.; Kim, J. H.; Lee, K. T.; Jeon, K.-S.; Na, H. B.; Yu, J. H.; Kim, H. M.; Lee, N.; Choi, S. H.; Baik, S.-I.; Kim, H.; Park, S. P.; Park, B.-J.; Kim, Y. W.; Lee, S. H.; Yoon, S.-Y.; Song, I. C.; Moon, W. K.; Suh, Y. D.; Hyeon, T. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4467.
- (68) Li, Z.; Zhang, Y.; Jiang, S. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4765.
- (69) Idris, N. M.; Li, Z.; Ye, L.; Wei Sim, E. K.; Mahendran, R.; Ho, P. C.-L.; Zhang, Y. *Biomaterials* **2009**, *30*, 5104.
- (70) Yu, M.; Li, F.; Chen, Z.; Hu, H.; Zhan, C.; Yang, H.; Huang, C. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 930.
- (71) Barnes, M. D.; Mehta, A.; Thundat, T.; Bhargava, R. N.; Chhabra, V.; Kulkarni, B. J. *Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 6099.
- (72) Wang, F.; Banerjee, D.; Liu, Y.; Chen, X.; Liu, X. *Analyst* **2010**, *135*, 1839.
- (73) Chen, G.; Qiu, H.; Prasad, P. N.; Chen, X. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 5161.
- (74) Li, X.; Zhang, F.; Zhao, D. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1346.
- (75) Wang, F.; Liu, X. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 976.
- (76) Liu, Y.; Tu, D.; Zhu, H.; Chen, X. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6924.
- (77) Yang, D.; Ma, P. a.; Hou, Z.; Cheng, Z.; Li, C.; Lin, J. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1416.
- (78) DaCosta, M. V.; Doughan, S.; Han, Y.; Krull, U. J. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *832*, 1.
- (79) Gnach, A.; Lipinski, T.; Bednarkiewicz, A.; Rybka, J.; Capobianco, J. A. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1561.
- (80) Gu, Z.; Yan, L.; Tian, G.; Li, S.; Chai, Z.; Zhao, Y. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 3758.
- (81) Scheps, R. *Prog. Quant. Electron.* **1996**, *20*, 271.
- (82) Christ, S.; Schäferling, M. *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 034004.
- (83) González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 042002.
- (84) Prorok, K.; Wawrzyńczyk, D.; Misiak, M.; Bednarkiewicz, A. In *Upconverting Nanomaterials*; CRC Press: 2016, p 195.
- (85) Ramasamy, P.; Manivasakan, P.; Kim, J. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 34873.
- (86) Francés-Soriano, L.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. In *Upconverting Nanomaterials*; CRC Press: 2016, p 101.
- (87) Hemmer, E.; Vetrone, F. In *Upconverting Nanomaterials*; CRC Press: 2016, p 319.
- (88) Bansal, A.; Yong, Z. In *Upconverting Nanomaterials*; CRC Press: 2016, p 255.
- (89) Baride, A.; Meruga, J. In *Upconverting Nanomaterials*; CRC Press: 2016, p 291.
- (90) Zhang, H.; Tu, L. P.; Liu, X. M. In *Upconverting Nanomaterials*; CRC Press: 2016, p 19.
- (91) Naccache, R.; Yu, Q.; Capobianco, J. A. *Adv. Opt. Mat.* **2015**, *3*, 482.
- (92) Mahata, M. K.; Hofsäss, H. C.; Vetter, U. *Photon-Upconverting Materials: Advances and Prospects for Various Emerging Applications*, 2016.
- (93) Gai, S.; Li, C.; Yang, P.; Lin, J. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 2343.
- (94) Dong, H.; Sun, L.-D.; Yan, C.-H. *Nanoscale* **2013**, *5*, 5703.
- (95) Wang, M.; Abbineni, G.; Clevenger, A.; Mao, C.; Xu, S. *Nanomedicine* **2011**, *7*, 710.
- (96) *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *83*, 284.
- (97) Yi, G.; Lu, H.; Zhao, S.; Ge, Y.; Yang, W.; Chen, D.; Guo, L.-H. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2191.
- (98) Capobianco, J. A.; Vetrone, F.; Boyer, J. C.; Speghini, A.; Bettinelli, M. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 1181.
- (99) Heer, S.; Lehmann, O.; Haase, M.; Güdel, H.-U. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3179.
- (100) Heer, S.; Kömpe, K.; Güdel, H. U.; Haase, M. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 2102.
- (101) Wang, G.; Peng, Q.; Li, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14200.
- (102) Bednarkiewicz, A.; Dereń, P. J.; Lemański, K. *J. Phys. Chem. Solids* **2015**, *85*, 102.
- (103) Wawrzyńczyk, D.; Nyk, M.; Bednarkiewicz, A.; Strek, W.; Samoc, M. *J. Nanopart. Res.* **2014**, *16*, 2690.
- (104) Mahalingam, V.; Naccache, R.; Vetrone, F.; Capobianco, J. A. *Opt. Express* **2012**, *20*, 111.
- (105) Menyuk, N.; Dwight, K.; Pierce, J. W. *Appl. Phys. Lett.* **1972**, *21*, 159.
- (106) Suyver, J. F.; Grimm, J.; Krämer, K. W.; Güdel, H. U. *J. Lumin.* **2005**, *114*, 53.

- (107) Krämer, K. W.; Biner, D.; Frei, G.; Güdel, H. U.; Hehlen, M. P.; Lüthi, S. R. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 1244.
- (108) Wang, F.; Liu, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5642.
- (109) Wang, F.; Liu, X. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1378.
- (110) Zhang, Y.; Li, Z.; Wu, X.; Gang, H. In *Upconverting Nanomaterials*; CRC Press: 2016, p 139.
- (111) Judd, B. R. *Phys. Rev.* **1962**, *127*, 750.
- (112) Speghini, A.; Pedroni, M.; Zaccheroni, N.; Rampazzo, E. In *Upconverting Nanomaterials*; CRC Press: 2016, p 37.
- (113) Zhang, F. In *Photon Upconversion Nanomaterials*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2015, p 21.
- (114) Wang, H.; Lau, M.; Sannomiya, T.; Gokce, B.; Barcikowski, S.; Odawara, O.; Wada, H. *RSC Advances* **2017**, *7*, 9002.
- (115) Wang, H.-Q.; Tilley, R. D.; Nann, T. *CrystEngComm* **2010**, *12*, 1993.
- (116) Zhang, Y.-W.; Sun, X.; Si, R.; You, L.-P.; Yan, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3260.
- (117) H.-X. Mai; Y.-W. Zhang; Rui Si; Zheng-Guang Yan; L.-d. Sun; L.-P. You; Yan, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6426.
- (118) Mai, H.-X.; Zhang, Y.-W.; Sun, L.-D.; Yan, C.-H. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 13730.
- (119) Shan, J.; Ju, Y. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91*, 123103.
- (120) Ye, X.; Collins, J. E.; Kang, Y.; Chen, D. T. N.; Yodh, A. G.; Murray, C. B. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 22430.
- (121) Zeng, J. H.; Su, J.; Li, Z. H.; Yan, R. X.; Li, Y. D. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2119.
- (122) Yang, J.; Shen, D.; Li, X.; Li, W.; Fang, Y.; Wei, Y.; Yao, C.; Tu, B.; Zhang, F.; Zhao, D. *Chemistry* **2012**, *18*, 13642.
- (123) Li, C.; Lin, J. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 6831.
- (124) Li, Z.; Zhang, Y. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 345606.
- (125) Hudry, D.; Abeykoon, A. M. M.; Dooryhee, E.; Nykpanchuk, D.; Dickerson, J. H. *Chem. Mater.* **2016**, *28*, 8752.
- (126) Voorhees, P. W. *J. Stat. Phys.* **1985**, *38*, 231.
- (127) Lorbeer, C.; Cybińska, J.; Mudring, A.-V. *Cryst. Growth Des.* **2011**, *11*, 1040.
- (128) Liu, X.; Zhao, J.; Sun, Y.; Song, K.; Yu, Y.; Du, C.; Kong, X.; Zhang, H. *Chem. Commun.* **2009**, 6628.
- (129) Mi, C.; Tian, Z.; Cao, C.; Wang, Z.; Mao, C.; Xu, S. *Langmuir* **2011**, *27*, 14632.
- (130) Wang, H.-Q.; Nann, T. *ACS Nano* **2009**, *3*, 3804.
- (131) Hazra, C.; Adusumalli, V. N. K. B.; Mahalingam, V. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2014**, *6*, 7833.
- (132) Chen, C.; Li, C.; Shi, Z. *Adv. Sci.* **2016**, *3*, 1600029.
- (133) Cheng, Z.; Lin, J. *Macromol. Rapid Comm.* **2015**, *36*, 790.
- (134) Esipova, T. V.; Ye, X.; Collins, J. E.; Sakadzic, S.; Mandeville, E. T.; Murray, C. B.; Vinogradov, S. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 20826.
- (135) Zhou, J.; Liu, Q.; Feng, W.; Sun, Y.; Li, F. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 395.
- (136) Boyer, J.-C.; Manseau, M.-P.; Murray, J. I.; van Veggel, F. C. J. M. *Langmuir* **2010**, *26*, 1157.
- (137) Xia, L.; Kong, X.; Liu, X.; Tu, L.; Zhang, Y.; Chang, Y.; Liu, K.; Shen, D.; Zhao, H.; Zhang, H. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4146.
- (138) Voliani, V.; González-Béjar, M.; Herranz-Pérez, V.; Duran-Moreno, M.; Signore, G.; García-Verdugo, J. M.; Pérez-Prieto, J. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 13538.
- (139) Recalde, I.; Estébanez, N.; Francés-Soriano, L.; Liras, M.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. *Nanoscale* **2016**, *8*, 7588.
- (140) Dong, H.; Du, S. R.; Zheng, X. Y.; Lyu, G. M.; Sun, L. D.; Li, L. D.; Zhang, P. Z.; Zhang, C.; Yan, C. H. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10725.
- (141) Dong, A.; Ye, X.; Chen, J.; Kang, Y.; Gordon, T.; Kikkawa, J. M.; Murray, C. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 998.
- (142) Bogdan, N.; Vetrone, F.; Ozin, G. A.; Capobianco, J. A. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 835.
- (143) Li, Z.; Li, Y.; Wang, Y.; Miao, H.; Du, Y.; Liu, H. *J. Alloys Compd* **2014**, *613*, 18.
- (144) Wang, L.; Yan, R.; Huo, Z.; Wang, L.; Zeng, J.; Bao, J.; Wang, X.; Peng, Q.; Li, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6054.

- (145) Liu, Q.; Li, C.; Yang, i.; Yi, T.; Li, F. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5551.
- (146) Liu, Q.; Chen, M.; Sun, Y.; Chen, G.; Yang, T.; Gao, Y.; Zhang, X.; Li, F. *Biomaterials* **2011**, *32*, 8243.
- (147) Liu, J.; Bu, W.; Pan, L.; Shi, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4375.
- (148) Jeevan, M. M.; William, M. C.; May, P. S.; QuocAnh, L.; Grant, A. C.; Jon, J. K. *Nanotechnology* **2012**, *23*, 395201.
- (149) Vetrone, F.; Naccache, R.; Zamarrón, A.; Juarranz de la Fuente, A.; Sanz-Rodríguez, F.; Martínez Maestro, L.; Martín Rodríguez, E.; Jaque, D.; García Solé, J.; Capobianco, J. A. *ACS Nano* **2010**, *4*, 3254.
- (150) González-Béjar, M.; Francés-Soriano, L.; Pérez-Prieto, J. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2016**, *4*, 47.
- (151) Cheng, L.; Yang, K.; Li, Y.; Chen, J.; Wang, C.; Shao, M.; Lee, S.-T.; Liu, Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7385.
- (152) Liu, B.; Li, C.; Xing, B.; Yang, P.; Lin, J. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 4884.
- (153) Patel, D. N.; Hardy, L. A.; Smith, T. J.; Smith, E. S.; Wright Iii, D. M.; Sarkisov, S. J. *Lumin.* **2013**, *133*, 114.
- (154) Milliez, J.; Rapaport, A.; Bass, M.; Cassanho, A.; Janssen, H. P. *J. Display Technol.* **2006**, *2*, 307.
- (155) Wang, W.; Huang, W.; Ni, Y.; Lu, C.; Xu, Z. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 340.
- (156) Huang, M.-Z.; Yuan, B.; Dai, L.; Fu, M.-L. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *460*, 264.

Capítulo 2- Objetivos

The aim of this work is the synthesis, characterization and further functionalization of upconversion luminescent nanoparticles for their application in different areas.

The specific objectives are:

- Preparation of $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ or $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ co-doped NaYF_4 nanoparticles by a high temperature co-precipitation method. Thus, the influence of different synthetic parameters (reaction temperature and fluoride source addition temperature) in the final shape, size and crystallinity phase of the NaYF_4 nanoparticles will be evaluated.
- Synthesis and characterization $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ nanoparticles coated with a photosensitizer, specifically a diiodo substituted Bodipy (IBDP), and PEG to improve their biocompatibility and dispersibility in aqueous medias (UCNP-IBDP@PEG).
 - Study of the energy transfer processes between UCNP and IBDP in the nanohíbrid UCNP-IBDP@PEG upon NIR irradiation and their singlet oxygen generation efficiency.
 - Evaluation of the nanohybrid cytotoxicity and their applicability in photodynamic therapy through in vitro assays with human neuroblastoma derived cells.
- Functionalization of $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ nanoparticles with cucurbit[n]urils, CB[n] ($n=6, 7, 8$), and evaluation of UCNP@CB[n] nanohybrid ability to interact with interesting organic molecules, such as tricyclic basic dyes, specifically methylene blue and pyronin Y.
 - Study of the energy transfer between UCNP and dyes and, depending on the dye, evaluation of the nanohybrid capability to generate singlet oxygen upon NIR irradiation.
- Assembling of UCNP nanoparticles with perovskite nanoparticles (PK) and evaluation of energy transfer processes from the UCNP to PK after NIR irradiation.

➤ Evaluation of the efficacy in the nanohybrid formation, as well as the energy transfer using a multiphoton laser scanning confocal microscope.

- Surface modification of UCNPs with a thermoresponsive amphiphilic polymer thin layer. Characterization and evaluation of the optical response of the nanohybrid to different conditions (T, pH).

Capítulo 3- Técnicas instrumentales

3.1- Espectroscopía de absorción UV-Vis

Los espectros de absorción UV-Vis se registraron usando cubetas de cuarzo (1x1x4 cm) en un espectrómetro SECOMAN Uvi Light XT-5 equipado con el software Labpower junior version 3.05.

3.2- Espectroscopía de emisión de up-conversion

Los espectros de emisión de up-conversion de las diferentes muestras se obtuvieron por excitación a 975 nm usando un láser diodo de 975 nm (Thorlabs L975P1WJ) acoplado a un fluorímetro SLM AmingoBowmann series 2 (AB2). Los espectros se registraron usando el software AB2 version 5.5. Para todos los espectros de emisión se usaron cubetas de cuarzo triangulares para irradiar frontalmente (*front face*) de manera que el haz de excitación no atraviesa la muestra, evitando así la pérdida de emisión debida a la turbidez de las dispersiones de nanopartículas. Los espectros de luminiscencia de UC se midieron en aire y a temperatura ambiente, con una apertura de 2 nm, una velocidad de escaneado de 4 nm/s. La densidad de potencia fue de 249.4 mW·cm⁻².

3.3- Microscopía de transmisión electrónica

Con la microscopía electrónica se analiza la morfología, tamaño y estructura cristalina de un sólido a escala atómicas. El proceso consiste en la formación de una imagen a través de la focalización de los haces dispersados por una muestra tras su iluminación con un haz de electrones (sometido a una fuente de aceleración 100-400 kV).

La principal ventaja de la microscopía electrónica de transmisión (TEM, de sus siglas en inglés) es que se consigue la amplificación de la imagen, con un poder de resolución mil veces mayor que el óptico (máximo de 0.3 nm y 0.1 nm para TEM y TEM de alta resolución, respectivamente).

Las imágenes de microscopía electrónica fueron obtenidas usando un microscopio JEOL 1010 a 100 kV equipado con una cámara digital AMT RX80 de 8 Mpx. Para la preparación de la muestra, 10 µL de una dispersión 0.5 mg/mL de nanopartículas se

depositaron sobre un film de carbono soportado en una grid de cobre de 300 mesh. El disolvente se evaporó a vacío durante una noche (disolventes orgánicos) o 24 h (agua).

Las imágenes de microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM, de sus siglas en inglés) se tomaron usando un microscopio TECNAI G² F20 operando a 200 kV con una resolución de 0.24 nm y equipado con una cámara CCD (*charge coupled device*) GATAN y un software “Digital Micrograph” para la adquisición y tratamiento de imágenes.

3.4- Análisis de reconocimiento de fase y textura

El análisis de reconocimiento de fase y textura (TPRA, de sus siglas en inglés) se llevó a cabo usando el software ASTAR y un paquete de hardware de la Nanomegas Company directamente conectado a un microscopio Zeiss libra a través de un dispositivo Digistar P1000.

Los patrones de difracción obtenidos durante el barrido del haz de electrones se registraron directamente en la pantalla usando una cámara rápida externa CCD capaz de recoger entre 20 y 50 difractogramas por segundo. Tras media hora se recogen 40000 patrones de difracción correspondientes a una rejilla de 200x200 puntos. La resolución espacial del registro de datos depende del tamaño del haz de electrones. El TEM aquí usado no está equipado con una pistola de emisión de campo, consecuentemente, la principal limitación no es por el tamaño del haz sino por el brillo. El tamaño del haz más pequeño usado fue de 10 nm tomando la muestra cada 4 nm. Los patrones se registraron utilizando o bien el modo estándar de nanodifracción o el modo de precesión.

3.5- Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

Los espectros de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR, de sus siglas en inglés) se midieron usando un espectrofotómetro FTIR Thermo Nicolete Nexus a

temperatura ambiente con 64 repeticiones y una resolución de 4 cm^{-1} entre 400 y 4000 cm^{-1} . Las muestras se depositaron directamente sobre el cristal.

En el capítulo 5 se obtuvieron con un Spectrum One FTIR spectrometer (Perkin-Elmer) equipado con un accesorio de reflexión total atenuada (ATR, de sus siglas en inglés) bajo condiciones no forzadas. Las muestras se depositaron en contacto directo con el cristal de diamante sin preparación previa. Las medidas se hicieron con una resolución de 8 cm^{-1} y 8 repeticiones por espectro.

3.6- Centrifugación

La centrifugación para la precipitación de las nanopartículas se realizó con una centrifuga Eppendorf 5804 R.

3.7- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) se obtuvieron a temperatura ambiente con un espectrómetro Bruker 400AV (o Bruker-300) con imán Oxford de 400 MHz (o 300 MHz) de boca estándar, equipado con dos canales de radiofrecuencia. Los desplazamientos químicos (δ) están reportados en partes por millón (ppm) utilizando el pico del disolvente como referencia interna. Para la preparación de la muestra, los compuestos orgánicos o nanopartículas se secaban a vacío durante 24 h y después se disolvían o dispersaban en el disolvente deuterado correspondiente. Las siguientes abreviaciones son usadas para describir las señales: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuadruplete), m (multiplete).

3.8- Análisis termo-gravimétrico

La termogravimetría es una técnica analítica que permite medir la pérdida de la masa de una muestra frente al aumento de la temperatura, al aplicar un programa de temperatura controlado y una atmósfera específica. Con los datos obtenidos, se obtiene la curva característica de pérdida de masa (%) vs. temperatura, donde la descomposición de un determinado compuesto orgánico viene

determinada por una pendiente abrupta. La temperatura a la mitad de esta pendiente, corresponde con la temperatura de sublimación. Esta se puede obtener fácilmente de los mínimos relativos en la representación de la primera derivada.

Los espectros de análisis termogravimétrico (TGA, de sus siglas en inglés) se hicieron usando un sistema TG-TGA PyrisDiamond con un rango de temperatura de 25-1100°C y una sensibilidad de 0.1 µg. Las muestras sólidas y previamente secadas al vacío durante 24 horas, se calentaron desde 25°C a 1100°C, con una rampa de temperatura de 5°C·min⁻¹ y bajo un flujo de aire o nitrógeno de 50 mL·min⁻¹.

3.9- Difracción de rayos X

Este fenómeno tiene lugar al interaccionar un haz de rayos X, de una determinada longitud de onda, con los electrones de una sustancia sólida cristalina, que producen un cambio en la dirección del haz incidente. El haz difractado contiene información sobre la posición y tipo de los átomos encontrados en su camino.

Un cristal está compuesto por varias celdas unidad y la interferencia constructiva del haz difractado en una determinada dirección de todas la celdas será suficientemente intenso como para ser detectado. Por ello, los picos de difracción siguen la ley de Bragg, que predice la dirección en la que se da interferencia constructiva entre haces de rayos X dispersados coherentemente por un cristal.

Ley de Bragg:
$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \text{sen}\theta$$

Cada material cristalino, tiene un difractograma característico, donde cada pico corresponde a la difracción en una de las caras y en una dirección determinada, lo que permite identificar la fase o fases cristalinas presentes.

El análisis de los patrones de difracción de rayos X (XRD, de sus siglas en inglés) se llevó a cabo en un difractómetro de polvo modelo D5005 marca Bruker. Tiene una configuración θ -2 θ , tubo de rayos X de ánodo de Cu, con monocromador secundario de haz

difractado y detector de centelleo. El equipo cuenta con un programa de evaluación de datos EVA DIFFRAC PLUS. Las intensidades difractadas se midieron a temperatura ambiente desde ángulos 2θ de 2° a 80° , con una resolución de 0.02° y un tiempo de adquisición de 38.4 segundos por punto.

3.10- Cálculo del rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete (Φ_Δ)

Las curvas de desactivación de fosforescencia de oxígeno singlete se midieron de la siguiente manera: las disoluciones se pusieron en cubetas de sílice fundida de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ tapadas con un tapón *septum* y después se irradiaron a 532 nm con un láser (frecuencia doblada a 532 nm, $\sim 8 \text{ ns}$ de pulso. 12 mJ, con un láser Q-switched Nd/YAG a 1064 nm). Los estudios de emisión NIR se realizaron con un detector NIR Hamamatsu Peltier-cooled (-62.8°C , modelo H10330-75) a 850 V acoplado a un ordenador que controla la rejilla del monocromador. Un filtro de paso largo, tipo FEL1150 de Thorlabs se puso enfrente del monocromador. La corriente fotoeléctrica del multiplicador se almacenó en un osciloscopio digital (Tektronix TDS 2012).

Se midieron los tiempos de incremento de señal con tiempos cortos (50 ns) utilizando el amplificador SR-445 de Stanford Research. El software Luzchem LFP se utilizó para adquirir y procesar los datos. Todas las muestras se midieron en idénticas condiciones experimentales (misma irradiación, día y alineación del sistema).

3.11- Espectroscopía de emisión de tiempo resuelto

3.11.1- Luminiscencia de tiempo resuelto de las UC

Las curvas de desactivación de fluorescencia de las UCNP se obtuvieron usando dos técnicas diferentes. Por un lado, en el capítulo 6 se usó un espectrofluorímetro FLS980 (Edinburg Scientific) equipado con un láser diodo de 8W quasi-CW de 975 nm acoplado a una fibra óptica. Un filtro dicróico de paso corto se usó para desactivar la radiación del láser a 975 nm, dejando pasar todo

el espectro visible a través del monocromador. El sistema de FLS980 desencadenó la desactivación y se usó un software de multiescalado de Edinburg Scientific para registrar las curvas. Todas las medidas se hicieron a temperatura ambiente.

Por otro lado, en el capítulo 8, se usó un microscopio confocal multifotón acoplado a un microscopio vertical BX61WI motorizado y equipado con un objetivo de inmersión en agua XPLN25xWMP exclusivo para microscopía multifotónica, con una apertura numérica de 1.05 y una distancia de trabajo de 2 mm. Este equipo dispone de un láser Mai-Tai HP DeepSee (Spectra Physics) pulsado, de ancho de pulso de 100 fs. El láser se sintonizó a 975 nm y se enfocó sobre la muestra con una potencia de excitación de 30 mW. Las imágenes se adquirieron con filtros que recogen la emisión entre 420 nm y 460 nm, un tiempo de permanencia de 2 $\mu\text{s}\cdot\text{pixel}^{-1}$ y una resolución de 1024x1024 pixels.

3.11.2- Luminiscencia de tiempo resuelto de las perovskitas

La fotoluminiscencia de las perovskitas se midió usando un espectrómetro de tiempo de vida de fluorescencia *Compact fluorescence lifetime spectrometer C11367, Quantaaurus-Tau* con un pulso de luz LED de 340 nm.

El tiempo de vida medio (τ_{av}) fue calculado a partir de una desaparición triexponencial usando la siguiente ecuación:

$$\tau_{av} = \frac{A_1 \cdot \tau_1 + A_2 \cdot \tau_2 + A_3 \cdot \tau_3}{A_1 + A_2 + A_3}$$

donde τ es el tiempo de vida y A es el factor preexponencial.

3.12- Rendimientos cuánticos absolutos

Los rendimientos cuánticos de fotoluminiscencia se determinaron usando un equipo Hamamatsu C9920-02 absolute PL Quantum Yield Measurement System con una $\lambda_{exc} = 350$ nm para las perovskitas.

3.13- Temperatura crítica más baja de la disolución

Las medidas de temperatura crítica más baja de las disoluciones (LCST, de sus siglas en inglés) se midieron en un espectrofotómetro Cary 3 BIO-Varian UV-Visible equipado con un dispositivo de control de la temperatura Peltier. El LCST fue definido como la temperatura en el punto de inflexión de la curva de dispersión frente a la temperatura. La temperatura se elevó de 5 a 80°C a una velocidad de 1°C·min⁻¹. Las medidas de pH se realizaron con un pH-Metro GLP 21 (Crison).

3.14- Dispersión dinámica de la luz

La dispersión dinámica de la luz (DLS, de sus siglas en inglés) es uno de los métodos comunes para la determinación del tamaño de las nanopartículas. La incidencia de un haz de luz monocromática sobre una solución coloidal de partículas produce la dispersión de la luz en todas las direcciones debido a la formación de dipolos oscilantes en las nubes electrónicas.

El análisis de las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada con el tiempo, causadas por el movimiento Browniano de las nanopartículas, permite calcular su radio hidrodinámico.

El movimiento Browniano viene descrito por la ecuación de Stokes-Einstein, de la cual se puede deducir que partículas más grandes se mueven más lentamente (menores coeficientes de difusión).

Ecuación de Stokes-Einstein:
$$R_H = \frac{k_B \cdot T}{6\pi\eta D_T}$$

donde R_H es el radio hidrodinámico, k_B la constante de Boltzmann's, T la temperatura absoluta, η la viscosidad y D_T el coeficiente de difusión.

Cabe destacar que con esta técnica se obtiene el valor para el radio hidrodinámico, el cual tiene en cuenta la capa orgánica alrededor de la nanopartícula, así como el espesor de la capa de solvatación. Por tanto, las mismas NP dispersadas en diferentes disolventes tendrán diferentes valores de R_H .

Las medidas de DLS se hicieron usando un espectrómetro Malvern Zetasizer Nano Z con un láser HeNe de 10 mW a 633 nm. Todas las medidas se hicieron con un ángulo de dispersión de 173°. Las muestras se midieron inmediatamente después de la diálisis a una concentración aproximada de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en agua (pH = 5).

Capítulo 4- Síntesis y caracterización de β -NaYF₄

4.1- Introducción

Entre las diferentes UCNP que se han publicado aquellas formadas por la matriz β -NaYF₄ codopadas con Yb³⁺ y Er³⁺ son las que presentan mayor eficiencia en la conversión de luz NIR en luz Vis. Por ejemplo, su emisión es 20 y 6 veces mayor que las UCNP de La₂O₃:Yb,Er y La₂(MoO₄)₃:Yb,Er, respectivamente.¹

Además, como ya se ha comentado, las propiedades luminiscentes de las UCNP dependen del tamaño de la NP. A diferencia de otras NP, como QD, esta dependencia no se debe al confinamiento cuántico sino a la mayor relación superficie/volumen (S/V).² A medida que disminuye el tamaño de la NP, aumenta la relación S/V lo que aumenta la exposición de un mayor número de Ln³⁺ que se pueden desactivar por las vibraciones energéticas más altas de las moléculas de disolvente del entorno.^{2,3} No obstante, estos efectos se pueden evitar recubriendo las UCNP, por ejemplo con una capa de NaYF₄ lo que aumenta su emisión en 40 veces.³

Por otro lado, no se ha demostrado el efecto de la forma de la nanopartícula en la eficiencia de la emisión UC, pero sí se ha estudiado su efecto en las futuras aplicaciones. Por ejemplo, las UCNP en forma de nanorods (nanoelipses) se asocian de manera más efectiva a la membrana celular (bicapa lipídica) que las esféricas, debido a la menor energía necesaria para curvarse alrededor de un nanorod que de una esfera.⁴ Por ello, los nanorods son adecuados para aplicaciones donde se requiere de la máxima asociación con las células como TFD o liberación controlada de medicamentos, mientras que los prismas hexagonales son los mejores para aplicaciones que no se requiere asociación con las células, como obtención de imágenes del flujo sanguíneo.⁴

Por tanto, el control de la estructura, forma y tamaño del cristal de las UCNP es fundamental para determinar sus propiedades y con ello, su futura aplicación.⁵ En las últimas décadas se han hecho numerosos esfuerzos para desarrollar rutas sintéticas con las cuáles poder controlar las propiedades de las UCNP a través de modificaciones en los parámetros de la síntesis.^{5,6}

Mientras que en la síntesis hidro(solvo)térmica es complicado controlar la fase cristalina en UCNP menores de 50 nm,⁷ en la descomposición térmica es más sencillo controlar tanto la fase como el tamaño o la forma de las UCNP modificando la temperatura y/o tiempo de reacción o la cantidad y/o tipo de ligando.⁸⁻¹²

El método de síntesis de UCNP utilizado a lo largo de esta Tesis es el de coprecipitación a alta temperatura (Figura 4.1) porque parte de los cloruros de lantánidos y una cantidad de NH₄F estequiométrica, no genera subproductos tóxicos y no requiere de equipamientos caros (p.ej. autoclaves).^{13,14}

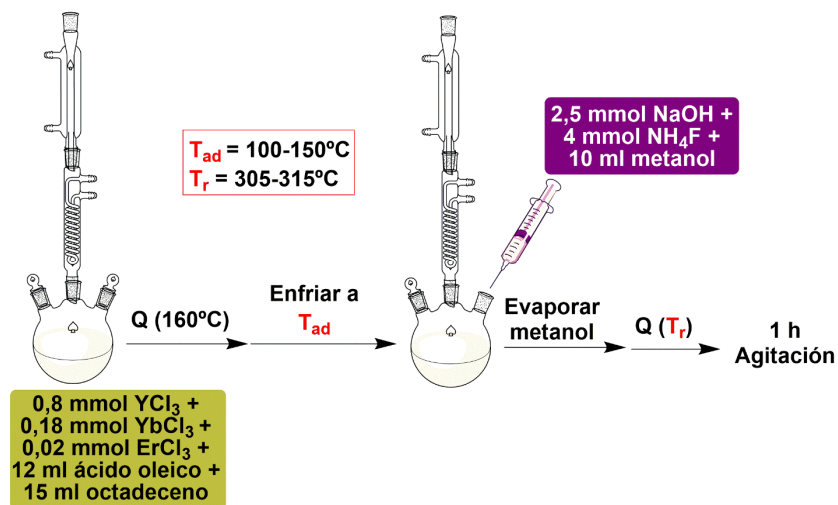


Figura 4.1. Esquema de la síntesis de UCNP.

Aunque con este método se obtienen fácilmente UCNP en fase hexagonal, sus imágenes de TEM muestran una mezcla de estructuras como hexágonos y rods o cubos y rods (también ocurre con otros métodos, p.ej. descomposición térmica).^{12,14-19} Esta heterogeneidad en las muestras podría ser aparente, es decir, podría estar causada por la perspectiva en la que se observa la muestra, donde los métodos convencionales de TEM se quedan cortos. Un método novedoso para analizar la verdadera geometría de las UCNP es el análisis de reconocimiento de fases y texturas (ARTF, de sus siglas en inglés). Este método registra los patrones

de difracción electrónica a nivel nanométrico con haces de electrones estrechos (1-50 nm). Es decir, un haz de electrones barre una área de pocos μm^2 mientras que el TEM se mantiene en modo de difracción, lo que permite la asignación tanto de la fase del cristal como su orientación cristalográfica para cada patrón.²⁰

En este capítulo se evaluará mediante ARTF los efectos de la temperatura de reacción y de la temperatura de adición del NH₄F a la mezcla de reacción en la forma y tamaño final de las UCNP.

4.2- Resultados y discusión

4.2.1- Síntesis de UCNP recubiertas de oleato: UCNP@OA.

Las UCNP@OA se sintetizaron siguiendo un procedimiento descrito en la bibliografía que parte de los cloruros de lantánidos disueltos en una mezcla de AO/ODE a 160°C. Esta disolución se enfría a una temperatura determinada (T_{ad}) a la cual se añade lentamente una disolución en metanol que contiene NaOH y NH₄F (en cantidades estequiométricas respecto a los lantánidos). Tras la adición, se calienta la reacción durante una hora (T_r).¹⁴

	T_{ad} (°C)	T_r (°C)	Forma TEM	Tamaño (nm)
M1	100	305	Rods	34,9±2,0 x 21,3±1,9
M2	100	305	Rods	33,1±2,9 x 19,5±1,9
M3	100	305	Rods	36,0±3,2 x 20,1±1,9
M4	100	305	Rods	33,9±2,8 x 20,8±2,1
M5	100	315	Rods	40,2±2,9 x 21,1±2,6
M6	110	305	Rods	36,1±2,4 x 19,6±2,7
M7	110	305	Rods	35,0±2,2 x 2,1±2,3
M8	110	315	Rods	46,5±2,5 x 20,8±2,3
M9	110	315	Rods	41,1±4,0 x 25,2±3,9
M10	140	305	Cubos	30 ± 3
M11	140	315	Cubos	53 ± 3
M12	150	315	Cubos	40 ± 3

Tabla 4.1. Tamaño y forma de las UCNP obtenidas en diferentes condiciones de síntesis (T_{ad} y T_r).

La reacción se llevó a cabo modificando T_{ad} (100-140°C) así como T_r (305-315°C), véase Figura 4.1. La Tabla 4.1 muestra los tamaños y formas aparentes de las muestras obtenidas en las diferentes condiciones de síntesis.

A una T_{ad} de 110°C se observa un aumento del tamaño de la nanopartícula si se modifica la T_r de 305 a 315°C. Esto lo podemos ver comparando las muestras M1 y M5 donde la forma de las UCNPs es elongada (rods) y al aumentar la temperatura a 315°C se observa un aumento del tamaño de $(34,9 \pm 2,0) \times (21,3 \pm 1,9)$ nm a $(40,2 \pm 2,9) \times (21,1 \pm 2,6)$ nm. Esto también se observa a T_{ad} superior de 140°C (M10 y M11, véase Figura 4.2).

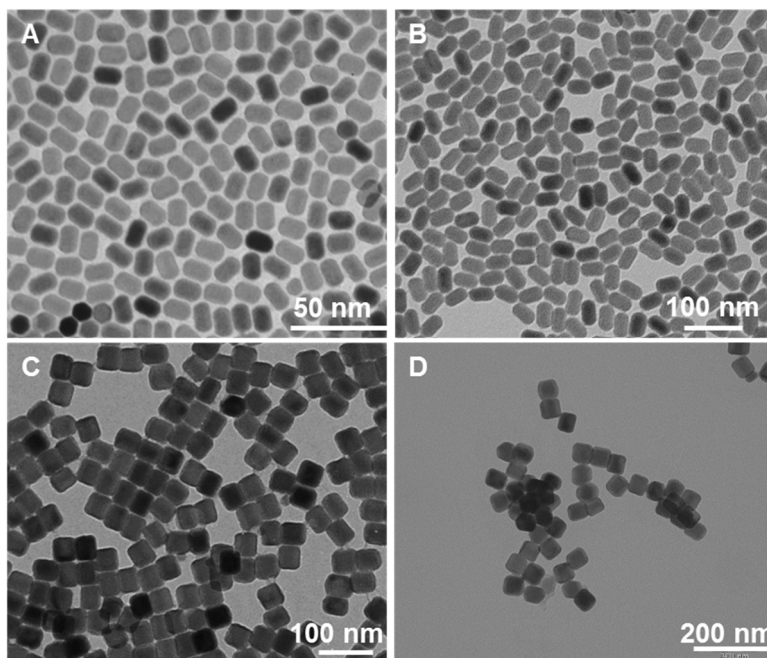


Figura 4.2. Imágenes de TEM de las muestras: A) M1, B) M5, C) M10 y D) M11.

Para observar el cambio producido por diferencias en la T_{ad} , se compararon, por ejemplo, las muestras M5 y M11 que tienen una T_r igual (315°C) pero T_{ad} diferentes (100 y 140°C, respectivamente, Figura 4.3). En ambos casos, las imágenes presentan una mezcla de formas, que en M11 son hexágonos y cubos y hexágonos y rods

(elipses) para M5. Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente en condiciones de síntesis similares.¹⁷

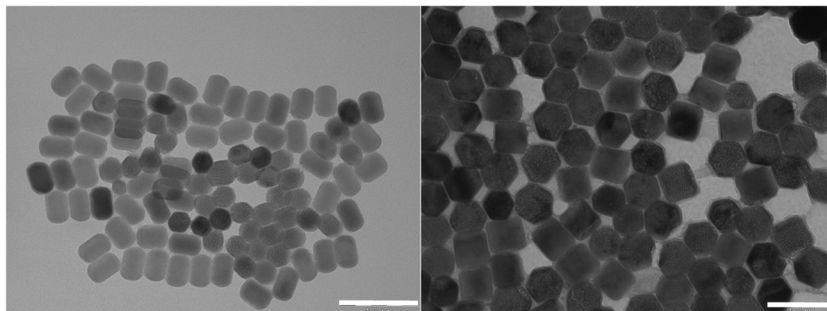


Figura 4.3. Imágenes de TEM de las muestras M5 (izquierda) y M11 (derecha) depositadas sobre la grid desde una dispersión 0.5 mg·mL⁻¹ de cloroformo. Barra de escala: 100 nm.

Recientemente, se ha descrito el mecanismo de crecimiento de UCNP en este método.²¹ Este se basa en la separación del proceso de nucleación que comienza a ocurrir en el momento de la adición de los precursores y del posterior crecimiento de las UCNP al aumentar la temperatura. Por ello, mayores temperaturas de adición propiciarán que los núcleos se agreguen entre sí en todas las direcciones más rápidamente dando lugar a formas más simétricas, como cubos.

Para poder obtener la geometría real de las muestras que ahora parecen ser una mezcla de dos tipos diferentes, se tomaron imágenes TEM a diferentes ángulos de inclinación, 45° y 60°, además de la que se hace habitualmente, 0°.

La Figura 4.4 muestra como a ángulos de inclinación de 60° las nanopartículas que inicialmente (0°) tenían forma de hexágono pasaban a ser rods, mientras que los que tenían forma de rods eran hexágonos cuando el eje de inclinación era perpendicular al lado más largo, o no variaban su forma cuando el eje de inclinación era paralelo al lado más largo. Esto sugería que todas las UCNP tenían forma de prismas hexagonales.

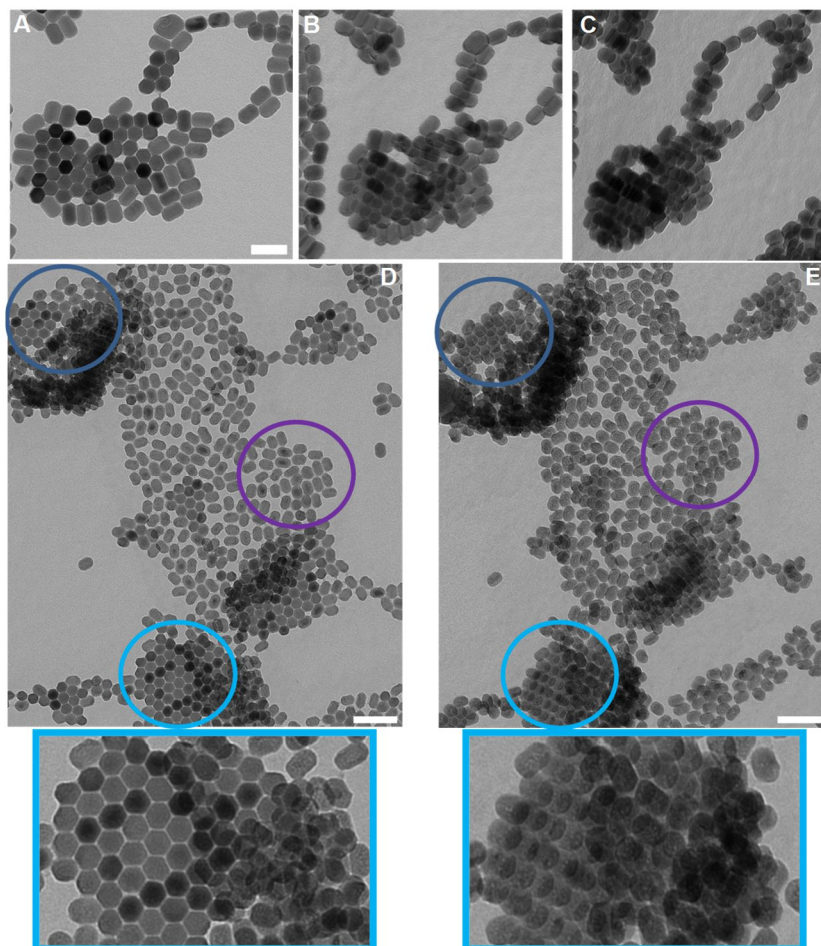


Figura 4.4. Imágenes de TEM de la muestra M5 a 0° (A), 45° (B) y a 60° (C). Barra de escala 50 nm. Imágenes TEM de la muestra M5 a 0° (D) y a 45° (E). Las zonas marcadas muestran las diferentes formas al pasar de 0° a 45°. Debajo: ampliación de la zona marcada en azul.

Con la finalidad de ver si la forma observada se debía a una orientación cristalográfica específica de los nanocristales se llevó a cabo el análisis ARTF de las muestras que tenían formas hexagonales, rectangulares y cúbicas. Las orientaciones cristalográficas, expresadas en coordenadas, a las que se harán referencia en adelante se refieren a las orientaciones perpendiculares al plano del observador (eje z).

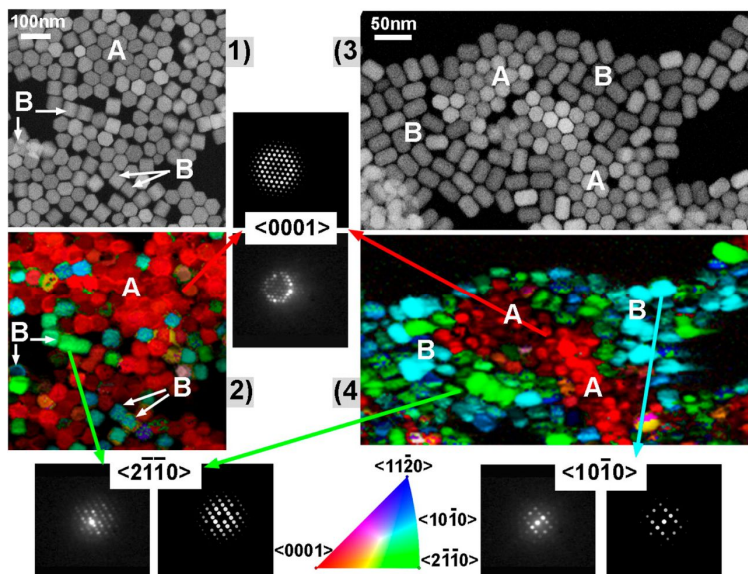


Figura 4.5. Imágenes de TEM (1) y mapa de orientación (2) de un agregado de nanopartículas de la muestra M11. Imágenes TEM (3) y mapa de orientación (4) de un agregado de nanopartículas de la muestra M5. El color de los mapas corresponde a las diferentes direcciones cristalográficas señaladas debajo de la figura. Se muestran los patrones correspondientes a las orientaciones $\langle 0001 \rangle$, $\langle 2-1-10 \rangle$ y $\langle 10-10 \rangle$ junto con las simuladas de mayor coincidencia. Las A y B marcan las zonas con hexágonos y rods respectivamente.

El ARTF registra los patrones de difracción electrónica con haces de electrones muy estrechos barriendo un área de pocos μm^2 en un TEM que se mantiene en modo de difracción. Los mapas de textura y fase del área estudiada se obtienen mediante el software ASTAR (más detalles en la sección experimental) que asigna la fase del cristal así como la orientación cristalográfica de cada uno de los patrones registrados.²⁰

Los patrones de difracción que se obtuvieron de las muestras se compararon con los generados a partir de los correspondientes en la base de datos para cristales de NaYF₄ hexagonales²² y cúbicas.²³

Las Figuras 4.5 y 4.6 muestran los mapas de orientación y fase obtenidos de las muestras M5 y M11. A partir de estos mapas se puede deducir claramente que todas las nanopartículas se encuentran en fase hexagonal.

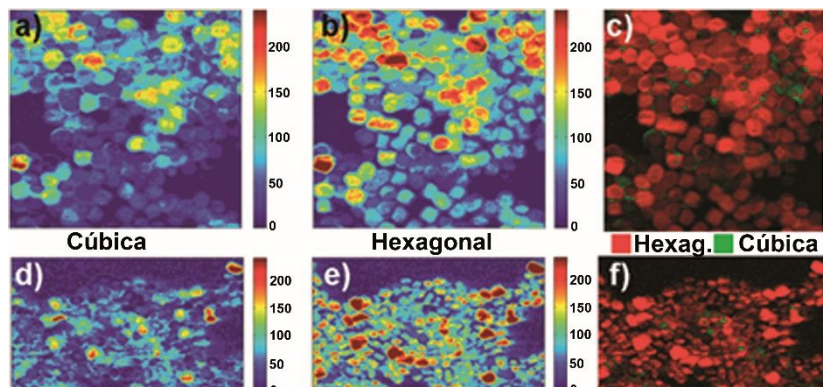


Figura 4.6. Gráficas del factor de concordancia dados por el programa de indexación entre las fases cúbicas (a, d) y hexagonal (b, e). Fases de NaYF₄ con su correspondiente mapa de fases (c, f). Las imágenes de la parte superior corresponden a la M11 mientras que las de abajo corresponden a la M5. Las áreas representadas corresponden a las mostradas en la Figura 5. El factor de concordancia es sistemáticamente más alto para la fase hexagonal.

Cuando un cristal presenta forma de hexágono su orientación cristalográfica siempre está cerca de $\langle 0001 \rangle$ (en rojo), y esto corresponde con las bases de los prismas (cara superior e inferior, Figura 4.7). Sin embargo, las UCNP que muestran forma rectangular tienen orientaciones cercanas a $\langle 10\bar{1}0 \rangle$ y $\langle 2\bar{1}10 \rangle$ (azul claro y verde azulado) que se pueden asignar a los laterales de los prismas hexagonales.

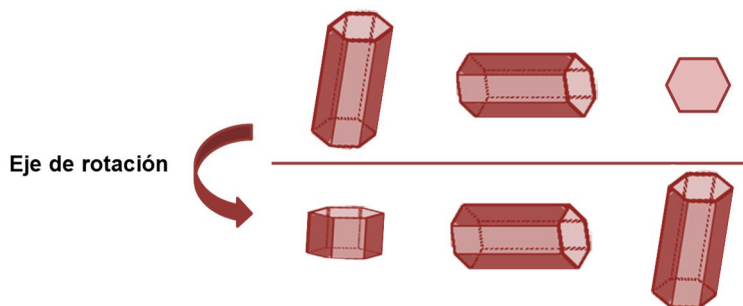


Figura 4.7. Representación esquemática de la forma observada en un prisma hexagonal según la perspectiva.

Además, el análisis de la textura de la muestra M5 demuestra que las UCNP son prismas hexagonales pero crecen

preferentemente en la dirección $\langle 0001 \rangle$, teniendo caras laterales rectangulares.

Análogamente se puede explicar aquellas UCNP que presentan hexágonos y cubos, como es el caso de la M11. Todas las nanopartículas están en fase hexagonal y aquellas con forma hexagonal se corresponden con una orientación cristalográfica cercana a $\langle 0001 \rangle$, mientras que las de forma cúbica tienen una orientación perpendicular a $\langle 0001 \rangle$. En esta muestra, las velocidades de crecimiento en las direcciones axial y lateral del prisma son similares, y por ello se obtienen prismas hexagonales con una altura menor.

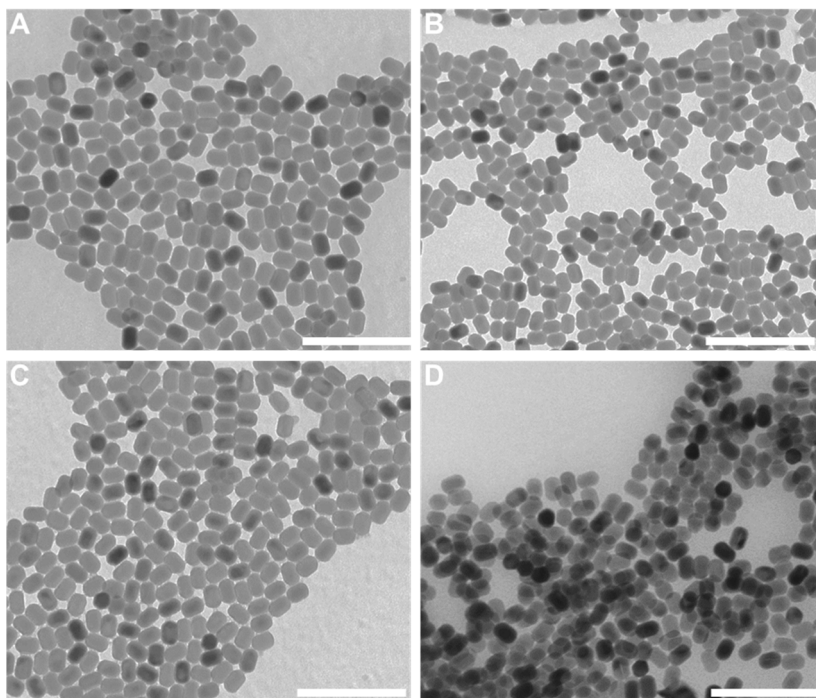


Figura 4.8. Imágenes de TEM de la muestra M9 dispersadas en cloroformo (A y B) sin sonicar y tras 20 minutos, respectivamente, en tolueno (C) y en butanol (D).

Adicionalmente, se estudió la dependencia de la distribución aleatoria de las UCNP sobre las rejillas de TEM con el tiempo de sonicación y con el disolvente (Figura 4.8). La deposición de la gota de la dispersión de UCNP en cloroformo tras diferentes tiempos de

sonicación no mostró diferencias significativas en las imágenes finales. Esto sugería que no había ningún tipo de organización de las UCNP en superestructuras.

Además, se depositaron las UCNP dispersas en diferentes disolventes como tolueno, diclorometano, dietiléter, acetato de etilo y tetrahidrofurano. Tampoco se apreció que disolventes de diferentes polaridades indujeran la deposición de los cristales preferentemente por una de las caras. Los resultados difieren a lo observado anteriormente en otro grupo de investigación y podría deberse a diferencias en el protocolo de síntesis.¹⁷

4.3- Conclusiones

Se ha demostrado mediante la técnica de ARTF que las UCNP preparadas por el método de coprecipitación a alta temperatura u Oswald Ripening a diferentes T_{ad} y T_r son prismas hexagonales homogéneos en fase hexagonal, a pesar de las primeras observaciones en el TEM. Además, la forma de las UCNP se puede controlar modificando la T_{ad} y mientras que el tamaño final se puede controlar modificando la T_r .

4.4- Procedimiento experimental

4.4.1- Material

Los reactivos químicos usados para la síntesis de UCNP fueron: cloruros de lantánidos hexahidratados de pureza >99,9% (YCl₃·6H₂O, YbCl₃·6H₂O y ErCl₃·6H₂O), 1-octadeceno (95%), ácido oleico (99,9%), NaOH y NH₄F (99,99%). Todos los reactivos se usaron tal y como se recibieron.

4.4.2- Síntesis de nanopartículas de UCNP@OA

NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺ se sintetizaron siguiendo un protocolo descrito anteriormente pero con algunas modificaciones.¹⁴ En un matraz de 50 mL de fondo redondo y de tres bocas se añade 242,9 mg (0,8 mmol) de YCl₃·6H₂O, 69,7 mg (0,18 mmol) de YbCl₃·6H₂O, 7,6 mg (0,02 mmol) de ErCl₃·6H₂O, 12 ml de ácido oleico y 15 mL de octadeceno. La mezcla se calienta a 160°C, bajo agitación

constante y en atmósfera de nitrógeno hasta la completa disolución de las sales (aproximadamente 30 minutos). A continuación, se enfría la disolución a una temperatura variable entre 100 y 150°C (T_{ad}) y se añade gota a gota una disolución de metanol que contiene 101,5 mg de NaOH (2,5 mmol) y 148,3 mg NH₄F (4 mmol). La mezcla resultante se calienta, bajo agitación constante, a 100°C hasta la completa evaporación de metanol (aproximadamente 30 minutos).

Finalmente, se calienta a la temperatura de reacción (T_r , 305-315°C), bajo flujo de nitrógeno durante una hora. Después, la mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente y las nanopartículas se precipitan por centrifugación (10000 rpm, 10 min, 25°C). Las UCNP@OA obtenidas se lavan dos veces con una mezcla de disolventes hexano:acetona:metanol (2,7:2,5:1 v/v) y una última vez con etanol. Las nanopartículas se secan durante 24 h a vacío.

4.4.3- ARTF

El análisis ARTF se llevó a cabo usando el software ASTAR y un paquete de hardware de la Nanomegas Company directamente conectado a un microscopio Zeiss libra a través de un dispositivo Digistar P1000.²⁰

Un haz de electrones (> 10 nm) barre una rejilla de 200x200 puntos, obteniéndose 40000 difractogramas registrados en una cámara CCD externa.

Para las muestras de tamaño menor (M1 y M5) se usó el modo estándar de nano-difracción, mientras que para las de mayor tamaño (M10 y M11) se usó el modo de precesión, con un ángulo de precesión de 1°.

Aunque la coincidencia de patrones es más eficiente con el modo de precesión, se usó el estándar para las muestras más pequeñas porque el pequeño desdibujamiento (inevitable) del haz en modo de precisión puede ser crítico cuando el tamaño del cristal se aproxima al tamaño del haz.

Los conjuntos de patrones de difracción registrados se analizaron mediante un software específico que lleva a cabo la correspondencia con los patrones de la base de datos en todas las orientaciones posibles del cristal en una fase cristalina concreta (hexagonal o cúbica). El patrón para cada una de las fases de la base de datos puede generarse en presencia de muchas fases cristalinas en la muestra.

4.5- Bibliografía

- (1) Yi, G.; Lu, H.; Zhao, S.; Ge, Y.; Yang, W.; Chen, D.; Guo, L.-H. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2191.
- (2) van Veggel, F. C. J. M.; Dong, C.; Johnson, N. J. J.; Pichaandi, J. *Nanoscale* **2012**, *4*, 7309.
- (3) Zhao, J.; Lu, Z.; Yin, Y.; McRae, C.; Piper, J. A.; Dawes, J. M.; Jin, D.; Goldys, E. M. *Nanoscale* **2013**, *5*, 944.
- (4) Tree-Udom, T.; Seemork, J.; Shigyou, K.; Hamada, T.; Sangphech, N.; Palaga, T.; Insin, N.; Pan-In, P.; Wanichwecharungruang, S. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 23993.
- (5) Xu, C. T.; Zhan, Q.; Liu, H.; Somesfalean, G.; Qian, J.; He, S.; Andersson-Engels, S. *Laser Photonics Rev.* **2013**, *7*, 663.
- (6) Lu, Z.; Dan, Z.; Gejihu, D. *Mater. Res. Express* **2016**, *3*, 025009.
- (7) Pan L.; He M.; Ma J.; Tang W.; Gao G.; He R.; Su H.; D., C. *Theranostics* **2013**, *3*, 210.
- (8) Zhao, J.; Jia, T.; Wang, X.; Kong, X. *J. Nanomater.* **2014**, *2014*, 7.
- (9) Ye, X.; Collins, J. E.; Kang, Y.; Chen, J.; Chen, D. T. N.; Yodh, A. G.; Murray, C. B. *PNAS* **2010**, *107*, 22430.
- (10) Escudero, A.; Carrillo-Carrión, C.; Zyuzin, M. V.; Parak, W. J. *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374*, 48.
- (11) Guo, J.; Ma, F.; Gu, S.; Shi, Y.; Xie, J. *J. Alloy. Compd.* **2012**, *523*, 161.
- (12) Boyer, J.-C.; Cuccia, L. A.; Capobianco, J. A. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 847.
- (13) Liu, J.; Chen, G.; Hao, S.; Yang, C. *Nanoscale* **2017**, *9*, 91.
- (14) Li, Z.; Zhang, Y. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 345606.
- (15) Wang, L.; Li, Y. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 727.
- (16) Boyer, J.-C.; Vetrone, F.; Cuccia, L. A.; Capobianco, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7444.
- (17) H.-X. Mai; Y.-W. Zhang; Rui Si; Zheng-Guang Yan; L.-d. Sun; L.-P. You; Yan, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6426.
- (18) Heer, S.; Kömpe, K.; Güdel, H. U.; Haase, M. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 2102.
- (19) Mai, H.-X.; Zhang, Y.-W.; Sun, L.-D.; Yan, C.-H. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 13721.
- (20) Portillo, J.; Rauch, E. F.; Nicolopoulos, S.; Gemmi, M.; Bultreys, D. *Mater. Sci. Forum* **2010**, *644*, 1.
- (21) Hudry, D.; Abeykoon, A. M. M.; Dooryhee, E.; Nykypanchuk, D.; Dickerson, J. H. *Chem. Mater.* **2016**, *28*, 8752.
- (22) Krämer, K. W.; Biner, D.; Frei, G.; Güdel, H. U.; Hehlen, M. P.; Lüthi, S. R. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 1244.
- (23) Hund, F. Z. *Anorg. Chem.* **1950**, *261*, 106.

Capítulo 5- Modificación de UCNP con un derivado de Bodipy para su aplicación en terapia fotodinámica

5.1- Introducción

La terapia fotodinámica (TFD) es un tratamiento no invasivo contra el cáncer basado en la administración y/o transporte de un fotosensibilizador (FS) seguido de la irradiación con luz, que desencadena la producción de especies tóxicas para las células (Figura 5.1).^{1,2} Básicamente, tras la irradiación, el FS absorbe la energía y alcanza su estado excitado singlete (^1FS), que tras un cruce intersistemas genera su estado excitado triplete (^3FS). Seguidamente, el ^3FS transfiere su energía al oxígeno molecular (tripleto) para formar oxígeno singlete (mecanismo tipo 2) o un electrón, dando lugar a otras especies reactivas de oxígeno (mecanismo tipo 1).¹⁻³

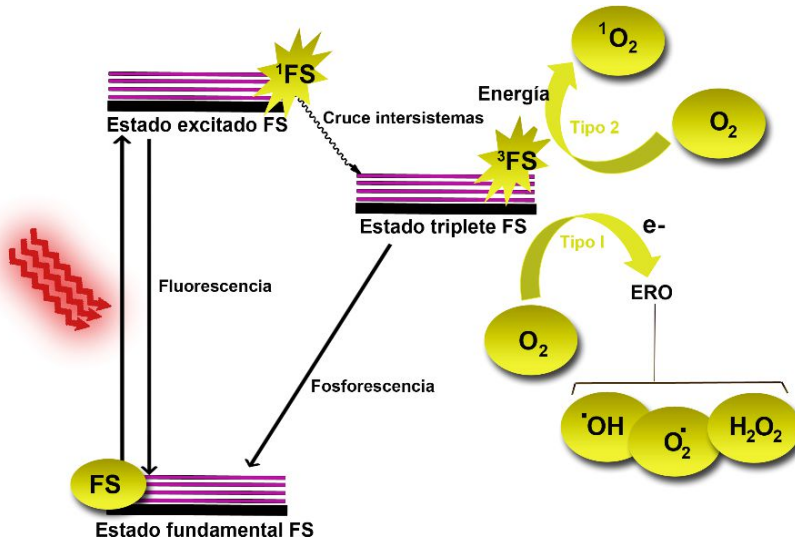


Figura 5.1. Mecanismos en la generación de ERO tras la irradiación de un FS.

En comparación con las terapias actuales como quimioterapia o radioterapia, la TFD minimiza el daño a las células sanas y los efectos secundarios como las náuseas o la depresión del sistema inmunológico, ya que las especies tóxicas se generan solamente en el lugar de irradiación.⁴

Habitualmente, los FS usados en TFD son moléculas orgánicas o complejos que absorben en el VIS. De entre todos

destacan las porfirinas,⁵ el azul de metileno (AM),⁶ el rosa de bengala (RB)⁷ o las ftalocianinas de zinc (PhZn).^{8,9} Sin embargo, la mayoría de ellos, presenta solubilidad moderada en agua, tienden a agregarse, pierden su actividad fotoquímica tras largos periodos de irradiación y el uso de luz VIS limita la penetración de la luz en los tejidos.¹⁰

Por ello, la fabricación de nanohíbridos compuestos por la combinación de UCNP y FS para TFD ha despertado mucho interés. La excitación de las UCNP y la posterior transferencia de energía (TE) al FS, posibilita una TFD más eficiente en un mayor volumen de tejido (debido a la penetración mayor de la luz NIR en el tejido).²

Para que tenga lugar una TE eficiente desde las UCNP al FS, el FS tiene que estar cerca de la superficie de las UCNP y además el espectro de absorción del FS tiene que solaparse con el de emisión de las UCNP.^{11,12} El nanohíbrido UCNP-FS debe tener también una gran cantidad de FS, ser dispersable en agua, estable y biocompatible.¹³

A día de hoy se han descrito diversos sistemas UCNP-FS con FS como, Ru(bpy)₃²⁺,¹⁴ PhZn,¹⁵⁻²⁰ hipericina,²¹ AM,²² RB,^{23,24} porfirinas,²⁵⁻²⁹ chlorin e6,^{30,31} o fulereno monomoléculico.³² Existen diferentes estrategias para obtener nanohíbridos dispersables en agua y con alto contenido en moléculas de FS. Principalmente, el FS queda embebido en la capa de sílice (amorfa o mesoporosa) que recubre las UCNP^{14,33} o bien en una capa polimérica.^{29,30}

Con el fin de evitar la pérdida progresiva de FS de la capa de sílice o de polímero que recubre las UCNP, el FS se puede unir covalentemente a la capa de material orgánico que recubre las UCNP.^{20,23} Por ejemplo, el RB se ha unido covalentemente a las UCNP de NaYF₄:Yb,Er recubiertas con dihidrógenofosfato de 2-aminoetil.²³

A lo largo de este capítulo se describirá un método sencillo para la preparación de nanohíbridos basado en el anclaje directo de un FS a la superficie de las UCNP de NaYF₄: Yb, Er.

El FS escogido es el ácido 3-(2',6'-diyodo-1',3',5',7'-tetrametil-4',4'-difluoro-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacen-8'-il)propanoico (IBDP), un derivado diyodado del Bodipy (Figura 5.2). Se eligió este cromóforo porque se prepara fácilmente,³⁴ presenta altos coeficientes de extinción molar en la región VIS (202 M⁻¹·cm⁻¹ en 525 nm), baja agregación, resistencia al fotoblanqueo,³⁴⁻³⁷ alto rendimiento cuántico de formación del estado excitado triplete debido al efecto del átomo pesado interno y un grupo carboxílico como grupo anclante a la superficie de la UCNP.

Para mejorar la dispersabilidad en medios acuosos del nanohíbrido, se recubrirá con una capa de PEG. Se obtienen así dos nanohíbridos diferentes, el UCNP-IBDP@OA (dispersable en medios orgánicos) y el UCNP-IBDP@PEG (dispersable en medios acuosos). Se estudiará la emisión en estado estacionario y tiempo resuelto para determinar la naturaleza del proceso de TE entre la UCNP y el IBDP.

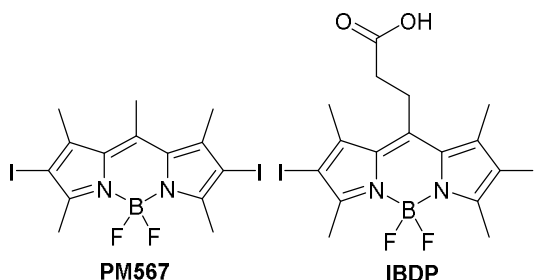


Figura 5.2. Estructuras del PM567 y del IBDP.

Además, se evaluará la capacidad de los nanohíbridos para generar oxígeno singlete tras la irradiación a 975 nm. Y, finalmente, se realizarán estudios *in vitro* con una línea celular derivada de neuroblastoma humano, para probar la eficacia del nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG en TFD.

5.2- Resultados y discusión

5.2.1- Síntesis y caracterización de los nanohíbridos.

La Figura 5.3 muestra un esquema general de los nanohíbridos sintetizados en este capítulo. Se partió de UCNP de

NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺ recubiertas de oleato (UCNP@OA), que se sintetizaron de manera análoga a los capítulos anteriores.^{a, 38}

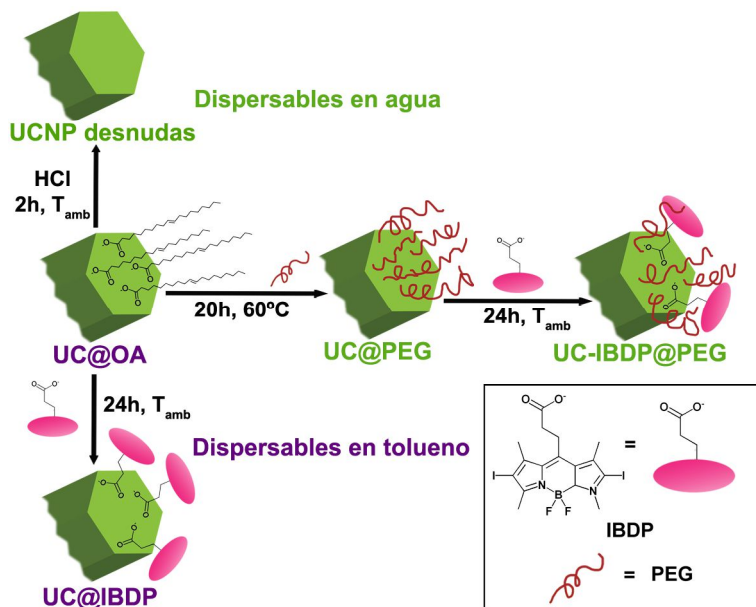


Figura 5.3. Esquema de la síntesis de los nanohíbridos usados en este estudio. T_{amb}: temperatura ambiente.

Tras calentar durante 1 h a 300°C una mezcla de los cloruros de lantánidos, NaOH y NH₄F en presencia de AO y ODE como disolventes coordinantes y no coordinantes, respectivamente, se obtienen nanoprismas hexagonales uniformes.

Las imágenes de TEM y HRTEM (Figura 5.4) muestran la monodispersidad y uniformidad las UCNP obtenidas, con tamaños de (25,8 ± 1,6) x (18,0 ± 1,4) nm. Además, la alta cristalinidad de las UCNP se puede constatar en el HRTEM, donde se aprecian los márgenes de los planos cristalinos con un espaciado-*d* de 0,52 nm. Esto corresponde con el espaciado de los planos (100) de la fase cristalina hexagonal de NaYF₄. El espectro XRD (Figura 5.5)

^a A lo largo de este capítulo, se han utilizado dos lotes de UCNP diferentes obtenidos de dos síntesis diferentes. Con uno de ellos se realizaron todos los estudios correspondientes al mecanismo de transferencia de energía y con el otro los correspondientes a la formación de oxígeno singlete y estudios *in vitro* (del cual se muestran las imágenes).

también constata la formación de cristales β -NaYF₄, donde sólo aparecen las señales correspondientes a la fase cristalina hexagonal pura.

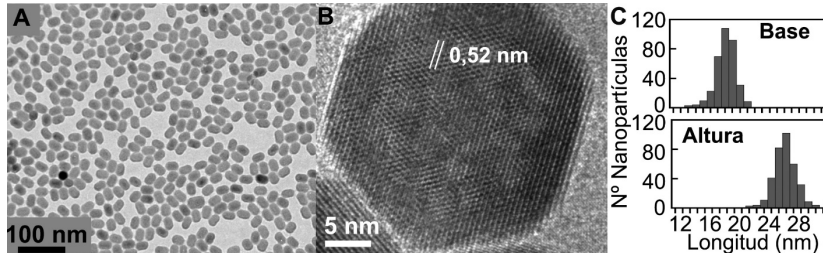


Figura 5.4. A) Imagen de HRTEM de las UCNP@OA. B) Imagen HRTEM de un nanoprisma hexagonal de UCNP@OA. C) Distribución de los tamaños de las UCNP@OA.

Por otro lado, las relaciones entre los átomos de lantánidos en las UCNP obtenidos por el EDX fueron de NaYF₄(81%): Yb³⁺(16%), Er³⁺(3%).

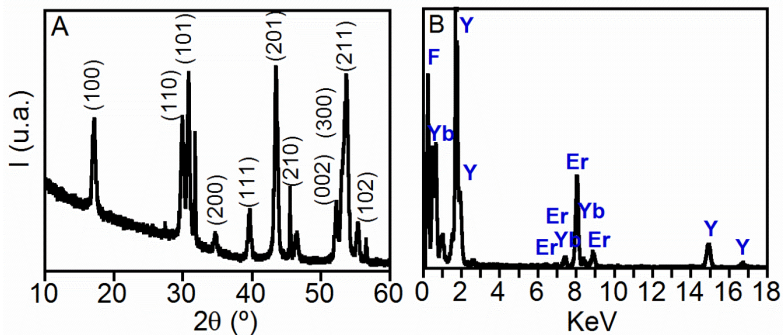


Figura 5.5. A) Espectro de XRD de las nanoprismas hexagonales de NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺ (JCPDS estándar no. 28-1192).³⁸ B) Espectro EDX de las UCNP NaYF₄:Yb³⁺(16%), Er³⁺(3%).

Para mejorar la dispersabilidad de las UCNP en agua, se recubrieron con una capa de un PEG heterofuncional, concretamente HS-PEG-NH₂, siguiendo un procedimiento previamente descrito.³⁹ El polímero se coordina a la superficie de las UCNP a través del grupo tiol mientras que el grupo amino queda libre para posibles futuras interacciones y/o funcionalizaciones.

Las UCNP@PEG obtenidas presentan dispersabilidad en agua sin incrementar el tamaño original de las UCNP, de hecho, las

imágenes de HRTEM, muestran un espesor de la capa orgánica alrededor de las UCNP de $2,5 \pm 0,6$ nm (Figura 5.6). Además, el PEG es biocompatible y previene la aglomeración e interacciones no específicas con las proteínas y las células, lo cual lo hace muy interesante desde el punto de vista biológico.⁴⁰

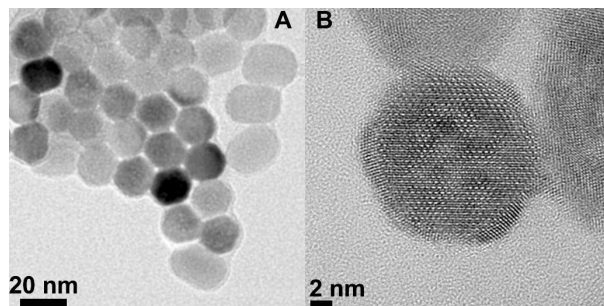


Figura 5.6. Imágenes de HRTEM de las UCNP@PEG. En la imagen B se puede observar la matriz cristalina de la UCNP recubierta por una capa orgánica, atribuida al PEG.

5.2.2.1- Síntesis y caracterización de UCNP-IBDP@OA

El nanohíbrido se preparó de manera muy sencilla, mediante agitación a temperatura ambiente durante 24 horas de una mezcla que contenía UCNP@OA e IBDP en un tampón acuoso de TEA (pH 7,5). Seguidamente, el nanohíbrido UCNP-IBDP@OA se separó mediante centrifugación y se lavó con acetonitrilo para eliminar el exceso de IBDP no anclado a la superficie de las UCNP. El espectro de absorción del nanohíbrido en tolueno mostraba la banda de absorción característica del IBDP (Figura 5.7).

Se llevaron a cabo varios intentos de dispersar el nanohíbrido en agua. Sin embargo, su escasa solubilidad en agua inducía su precipitación como un sólido rosa, mientras que el sobrenadante quedaba incoloro. Esto sugería que el IBDP se une firmemente a la superficie a través del grupo carboxilato.^b

^b Nótese que el grupo carboxílico se desprotona al pH en el que tiene lugar la reacción (7.5).

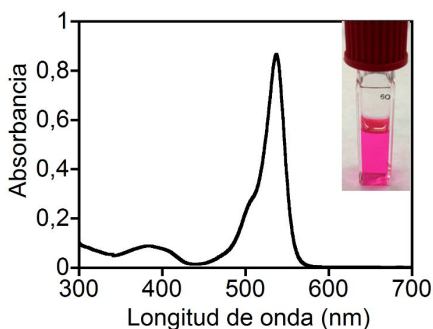


Figura 5.7. Espectro de absorción del nanohíbrido UCNP-IBDP@OA en tolueno. Inserción: fotografía de la dispersión en tolueno.

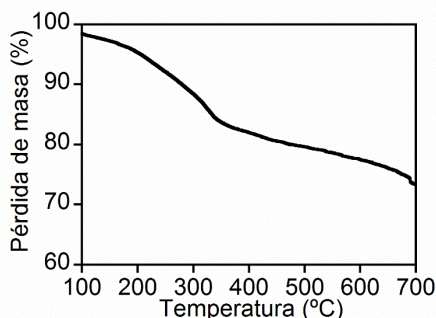


Figura 5.8. Curva de TGA del nanohíbrido UCNP-IBDP@OA.

Para comprobar que el IBDP no quedaba únicamente encapsulado en la capa orgánica del ligando, se hizo una síntesis bajo las mismas condiciones de reacción, pero usando el homólogo PM567, el cual no tiene la cadena con el grupo carboxílico (Figura 5.2). Se obtuvo un precipitado blanco y un sobrenadante amarillento, lo que confirmó que las UCNP@OA quedaban intactas mientras que el PM567 se recuperaba en el sobrenadante.

La curva de TGA del nanohíbrido mostraba un salto alrededor de 250°C con una pérdida de masa de casi un 30%, que se atribuye a la cantidad de IBDP en la superficie de las UCNP.

5.2.2.2- Síntesis y caracterización de UCNP-IBDP@PEG

El nanohíbrido se preparó de manera análoga al apartado anterior. Se agitó durante 24 horas una mezcla de UCNP@PEG en

presencia de IBDP a pH = 7,5, seguido de centrifugación y posterior purificación para eliminar el exceso de IBDP.

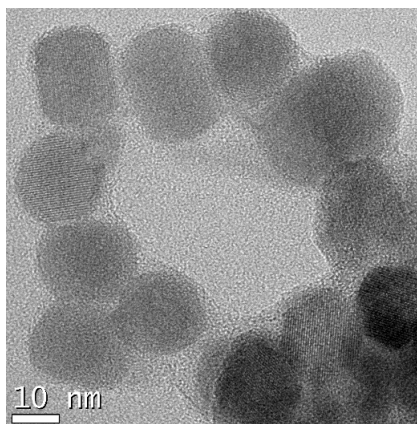


Figura 5.9. Imagen HRTEM de las UCNP-IBDP@PEG.

Las imágenes de HRTEM mostraron que no existía variación del tamaño en las UCNP debido a la incorporación del IBDP (Figura 5.9).

El espectro UV-VIS de esta dispersión demostró la incorporación del IBDP en el nanohíbrido resultante (Figura 5.10). Esto se confirmó con el espectro de ^{19}F -RMN, donde aparecía una señal sobre -146 ppm que es característica del IBDP (Figura 5.11).

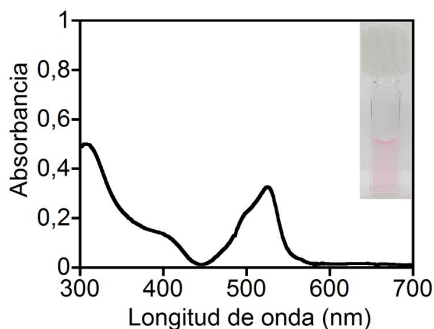


Figura 5.10. Espectro de absorción de una dispersión de UCNP-IBDP@PEG ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en agua. Inserción: fotografía de la dispersión en agua.

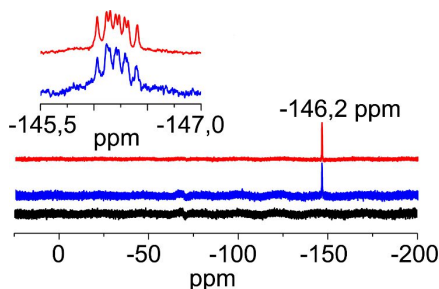


Figura 5.11. Espectro de ^{19}F -RMN del IBDP (línea roja), UCNP-IBDP@PEG (línea azul) y UCNP@PEG (línea negra) en CDCl_3 .

La cuantificación de IBDP en el nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG se hizo a partir de su espectro de absorción, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar del IBDP, y de la curva de TGA (Figura 5.12). Se estimó un 43% de PEG y un 10% de IBDP con respecto a la masa del núcleo de UCNP.

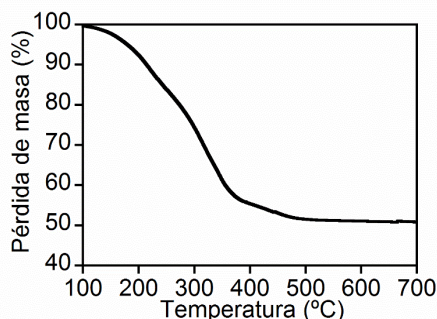


Figura 5.12. Curva de TGA de las UCNP-IBDP@PEG.

Con el objetivo de aplicar este nanohíbrido en sistemas biológicos, se hicieron ensayos de estabilidad en agua, PBS y medio de cultivo (medio DMEM/F-12 de Life Technologies); el nanohíbrido se dispersó en dichos medios y se centrifugó pasadas 24 horas. El espectro de absorción del sobrenadante se medía para ver si se desprendía IBDP. Si no se observaba pérdida de IBDP, se volvía a redispersar y se repetía la operación transcurridas 24 horas.

Los resultados mostraron que el nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG era estable en agua y PBS durante tres meses, mientras que solamente permanecía estable durante una semana

en el medio de cultivo. Por lo tanto, el nanohíbrido era suficientemente estable para estudios en condiciones biológicas.

5.2.3- Estudio de la transferencia de energía en los nanohíbridos

Un requisito para que exista transferencia de energía resonante (TER) es el solapamiento entre el espectro de absorción del aceptor de energía (IBDP) y el de emisión del dador de energía (UCNP).^{23,41}

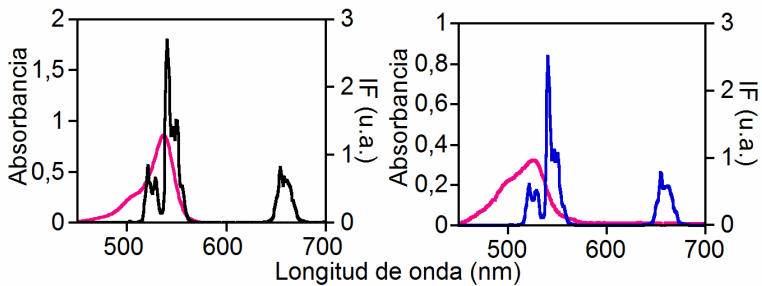


Figura 5.13. Solapamiento de los espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 975 \text{ nm}$) de las UCNP de partida con el espectro de absorción del IBDP en el nanohíbrido. Izquierda: emisión de UCNP@OA (línea negra) y absorción de UCNP-IBDP@OA (línea rosa) en tolueno. Derecha: emisión de UCNP@PEG (línea azul) y absorción de UCNP-IBDP@PEG (línea rosa) en agua.

La Figura 5.13 muestra el solapamiento de las correspondientes UCNP de partida con el espectro de absorción del IBDP en el nanohíbrido resultante. A simple vista, se observan diferencias en los espectros de absorción de IBDP dependiendo del disolvente, debido a las diferentes interacciones con éste.^{42,43} De hecho, se estimó una integral de solapamiento (J) mucho mayor para el caso de UCNP-IBDP@OA ($J = 9,948 \cdot 10^{15} \text{ nm}^4 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) que para UCNP-IBDP@PEG ($J = 1,226 \cdot 10^{13} \text{ nm}^4 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Por lo tanto, en ambos nanohíbridos se podría dar TER desde las UCNP al IBDP. Para evaluar la posible TER, se registraron los espectros de emisión de los diferentes nanohíbridos tras la excitación a 975 nm. Los espectros obtenidos se compararon con los de UCNP@OA, UCNP@PEG y las nanopartículas desnudas (UCNP_d, Figura 5.14).

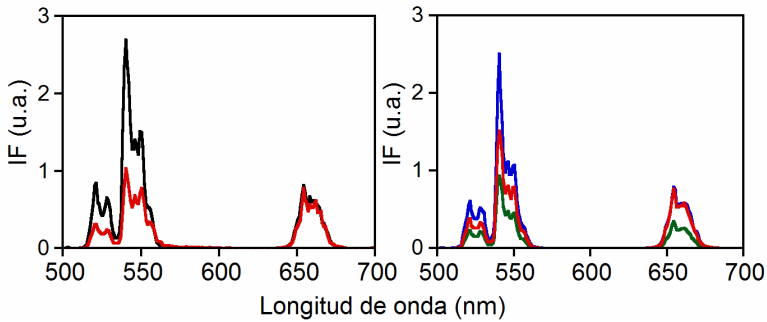


Figura 5.14. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 975 \text{ nm}$) de las dispersiones de; izquierda: UCNPs@OA (línea negra) y UCNPs-IBDP@OA (línea roja) en tolueno y derecha: UCNPs_d (línea verde), UCNPs@PEG (línea azul) y UCNPs-IBDP@PEG (línea roja).

Todas las UCNPs usadas para las medidas se prepararon a partir de las mismas UCNPs@OA, para evitar posibles diferencias entre distintos lotes de UCNPs (tamaño, forma...). Tras la irradiación a 975 nm, todas las nanopartículas exhibían las tres bandas de emisión características del Er^{3+} . Una banda muy intensa en 540 nm debida a la transición $^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$, otra banda en 520 nm originada por la transición ($^2\text{H}_{11/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$) y la correspondiente a la transición $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$) sobre 670 nm.⁴⁴ La potencia de excitación fue proporcional a la intensidad de excitación al cuadrado (Figura 5.15), lo que indica que en el proceso de emisión estaban implicados dos fotones, tal y como está descrito en bibliografía.⁴⁵

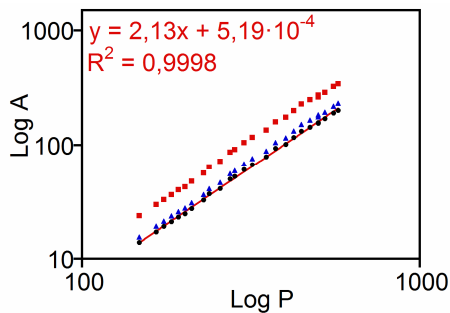


Figura 5.15. Representación logarítmica de las intensidades integradas de las emisiones UC obtenidas frente a las potencias de excitación a 975 nm. A: área bajo la curva de emisión; P: potencia de irradiación en mW.

Tal y como se esperaba, la emisión de la UCNP_d era menos intensa que la de UCNP@PEG debido al efecto protector (pasivado) del PEG sobre la superficie de las nanopartículas.

A simple vista se observa que la presencia del IBDP en los nanohíbridos induce una desactivación de la emisión verde (510-560 nm) de las UCNP, que es justo donde el IBDP presenta su banda de absorción.

Se estimó la eficiencia de la transferencia de energía usando la siguiente fórmula:

$$\eta = \frac{I_D - I_{DA}}{I_{DA}}$$

donde I_{DA} e I_D son las integrales de las emisiones (area bajo la curva de la banda correspondiente en el espectro de emisión) del nanohíbrido D-A (UCNP-IBDP@PEG o UCNP-IBDP@OA) y el del respectivo nanohíbrido precursor (UCNP@PEG o UCNP@OA).

A partir del rango de emisión entre 510 y 560 nm se calculó que la emisión disminuía en un 50% para UCNP-IBDP@OA y un 30% para UCNP-IBDP@PEG. La mayor desactivación del nanohíbrido hidrofóbico es debida al mayor solapamiento entre la absorción del IBDP y la emisión UC, así como a la mayor cantidad de IBDP por nanopartícula con respecto al hidrofílico (40% vs. 10%). No obstante, no se observó la emisión del IBDP debido a su bajo rendimiento cuántico de fluorescencia ($\Phi_F=0,02$ en metanol).³⁵

Para conocer la naturaleza de la transferencia de energía observada, se hicieron las medidas de luminiscencia de tiempo resuelto. Los perfiles de las cinéticas de emisión de las UCNP_d, UCNP@PEG, UCNP@OA, UCNP-IBDP@PEG y UCNP-IBDP@OA tras la excitación a 975 nm muestran las fases de aparición y desaparición características de las UCNP (Figura 5.16). Estas dos componentes corresponden a la etapa de sensibilización del Er³⁺, seguida de la desaparición del estado excitado del Er³⁺.⁴⁶

Los tiempos de vida de aparición y desaparición (τ_a y τ_d , respectivamente) se determinaron mediante el ajuste de los datos

obtenidos. Todos los ajustes presentaban una buena correlación y los τ_a y τ_d se calcularon por triplicado (Anexo 1 y Tabla 5.1).

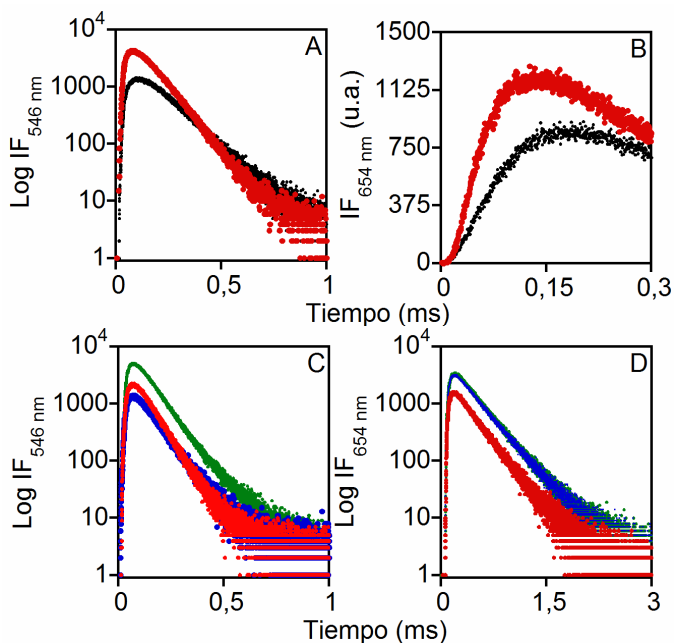


Figura 5.16. Perfiles cinéticos de las UCNP@OA (línea negra) y UCNP-IBDP@OA (línea roja) en tolueno a A) 546 nm, B) 654 nm; y UCNP_d (línea verde), UCNP@PEG (línea azul) y UCNP-IBDP@PEG (línea roja) en agua a C) 546 nm, D) 654 nm.

Los tiempos de vida de desaparición de la emisión de las UCNP eran del orden de decenas a centenas de μ s y los correspondientes a la emisión en el rojo eran bastante más largos (250-320 μ s) que los correspondientes a la emisión verde (65-125 μ s). Las diferencias observadas solo se pueden atribuir a procesos no radiativos debido a la interacción de las UCNP con el disolvente, ligando y la presencia del IBDP como aceptor.

Como era de esperar, las vibraciones O-H del agua desactivan los estados excitados de los iones lantánidos debido a interacciones multifotónicas no radiativas.^{43,47} Por ello, los tiempos de vida de desaparición tanto de la emisión a 546 nm como la emisión a 654 nm de los nanohíbridos dispersables en tolueno eran más largos que aquellos de los dispersables en agua (Tabla 5.1).

Se observó que el impacto del disolvente era más suave en el caso de la emisión roja (aprox. 300 vs 280 μs) que en el de la emisión verde (aprox. 80 vs. 120 μs), lo cual sugería que la población de los niveles más energéticos y su correspondiente desaparición no radiativa son más susceptibles a las vibraciones O-H.^{43,48}

UCNP	${}^4\text{S}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ $\lambda_{\text{em}} = 546 \text{ nm}$		${}^4\text{F}_{9/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}^b$ $\lambda_{\text{em}} = 654 \text{ nm}$	
	$\tau_a, \mu\text{s}$	$\tau_d, \mu\text{s}$	$\tau_a, \mu\text{s}$	$\tau_d, \mu\text{s}$
<u>Dispersable en agua</u>				
UCNP _d	45 ± 7	78 ± 3	70 ± 10	277 ± 6
UCNP@PEG	44 ± 5	82 ± 2	69 ± 7	281 ± 4
UCNP-IBDP@PEG	54 ± 7	67 ± 2	63 ± 7	252 ± 4
<u>Dispersable en tolueno</u>				
UCNP@OA	94 ± 4	119 ± 1	122 ± 18	304 ± 8
UCNP-IBDP@OA	58 ± 10	96 ± 6	61 ± 6	317 ± 4

Tabla 5.1. Tiempos de vida de luminiscencia obtenidos como la media de tres ajustes diferentes para los diferentes nanohíbridos tras la excitación a 975 nm.

En el caso de los tiempos de aparición se observaron discrepancias aún mayores, donde los tiempos para la emisión verde y roja de las UCNP@OA (94 y 122 μs , respectivamente) eran incluso el doble de largos que los correspondientes a UCNP@PEG (44 y 69 μs , respectivamente). Esto demostraba la rápida saturación de los estados excitados intermedios del Er^{3+} en las nanopartículas UCNP@PEG en agua.

La presencia del IBDP en el UCNP-IBDP@PEG producía un acortamiento del tiempo de desaparición de la emisión en 546 nm desde 82 μs a 67 μs , equivalente a una pérdida del 18%. De manera análoga el τ_d de la emisión verde UCNP-IBDP@OA tenía un valor de 96 μs frente los 119 μs de UCNP@OA.

En cuanto a los tiempos de desaparición a 654 nm, mientras que para el nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG fue un 10% más corta que en el UCNP@PEG, la correspondiente en UCNP-IBDP@OA fue ligeramente más larga que en UCNP@OA (Tabla 5.1); la explicación para esto requiere estudios adicionales.

Respecto a los tiempos de aparición de los nanohíbridos con IBDP, los τ_a en 654 nm eran más rápidos debido a la presencia del IBDP en los nanohíbridos, mientras que los τ_a de la emisión en 546 nm mostraban un acortamiento a casi la mitad en el nanohíbrido UCNP-IBDP@OA comparado con UCNP@OA. No se apreciaban cambios en el caso del PEG.

Esto indicaba que el IBDP jugaba un papel en el proceso de upconversion y podía cambiar el balance entre ETU y el fenómeno de despoblación durante las etapas intermedias, a pesar del desajuste entre los niveles de energía del aceptor IBDP y la energía de los estados excitados del Er^{3+} .

Una interpretación válida para el comportamiento de UCNP-IBDP@OA podría ser que la presencia de IBDP hace posible una desaparición competitiva para el estado excitado del Yb^{3+} (Yb^{3+*}). Esto es, el Yb^{3+} podría estar implicado tanto en la población del estado excitado del IBDP (IBDP*) tras la absorción de un segundo fotón, como en la sensibilización del Er^{3+} (Figura 5.17). Como consecuencia, los tiempos de vida de aparición de la emisión en el rojo y en el verde podrían reflejar la disminución de la contribución del Yb^{3+} en la población de los estados excitados del Er^{3+} responsables de la emisión.

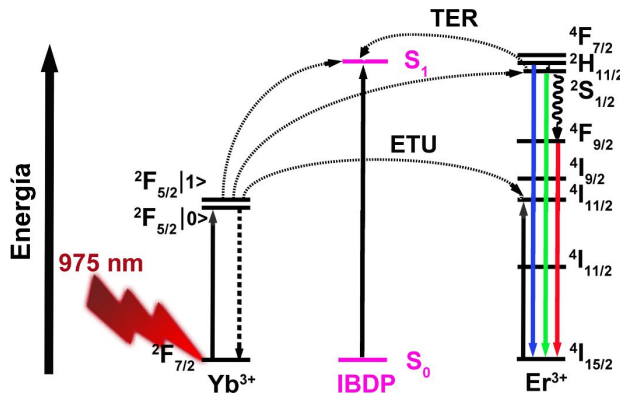
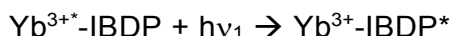
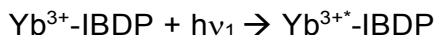


Figura 5.17. Representación esquemática de los procesos de transferencia de energía competitivos desde el estado excitado del Yb^{3+} al Er^{3+} e IBDP.

Con la finalidad de comprobar esta hipótesis, se prepararon los complejos lipofílicos Yb^{3+} -(IBDP)₃, los cuales se excitaron a 975

nm. Se observó la emisión anti-Stokes a pesar de la baja sección eficaz de absorción de los iones Yb^{3+} (comparada con la excitación Stokes del IBDP) en el NIR y la baja fluorescencia del IBDP. Esto sugiere el siguiente mecanismo:



Está descrito que los compuestos basados en Bodipy son capaces de seguir procesos de absorción bifotónicos.⁴⁹ Así que se hicieron experimentos control para clarificar el papel del lantánido en la emisión del IBDP en el complejo tras la excitación en el NIR.

La Figura 5.18 muestra que la emisión del IBDP en el complejo es mucho más eficiente que la del IBDP solo tras la excitación a 975 nm. Además, las medidas de tiempo resuelto revelaron que el $\text{Yb}^{3+}\text{-BDP}^*$ tenía un tiempo de vida mucho más largo ($\sim 5 \mu\text{s}$) que el IBDP^* , cuya emisión es del orden de unos ns. También se comprobó que la emisión en el complejo era proporcional a la segunda potencia de la intensidad de excitación a 975 nm y, por tanto, el proceso requería de dos fotones de baja energía.

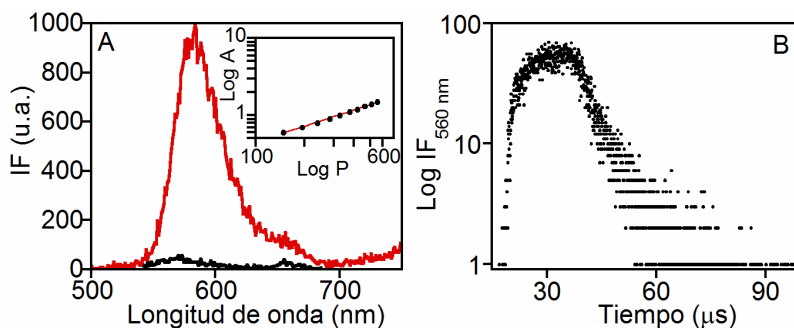


Figura 5.18. A) Comparación de la emisión del IBDP (línea negra) y del complejo $\text{Yb}^{3+}\text{-(IBDP)}_3$ (línea roja) en tolueno tras la excitación a 975 nm. Inserción: dependencia de la intensidad de emisión de la potencia de excitación. B) Perfil cinético de la emisión anti-Stokes del IBDP en el complejo ($\lambda_{\text{exc}} = 975 \text{ nm}$).

Estos datos, confirmaron que el Yb está implicado en la emisión del IBDP y, por tanto, apoya la teoría de que el Yb^{3+} puede desactivarse a través de dos vías competitivas: población de los estados excitados del Er^{3+} y el del IBDP.

5.2.4- Capacidad del nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG para la generación de oxígeno singlete.

Los datos anteriores indican que la presencia del IBDP en el nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG produce una desactivación de la emisión de las UCNP alrededor de un 30% en el rango entre 510 y 560 nm aproximadamente, debido a un proceso de transferencia de energía no trivial de las UCNP al IBDP. A continuación, se evalúa la capacidad del IBDP para transferir esta energía al oxígeno molecular para producir las ERO, concretamente oxígeno singlete.

Para ello, primero se estudió la capacidad del IBDP para formar $^1\text{O}_2$ tras su excitación en el visible (532 nm). La Figura 5.19A muestra el espectro de emisión del $^1\text{O}_2$, cuyo máximo de emisión se encuentra en 1270 nm. La cantidad de oxígeno singlete generado se determinó a partir de las curvas de desaparición de fosforescencia del $^1\text{O}_2$ en la región NIR (Figura 5.19B).

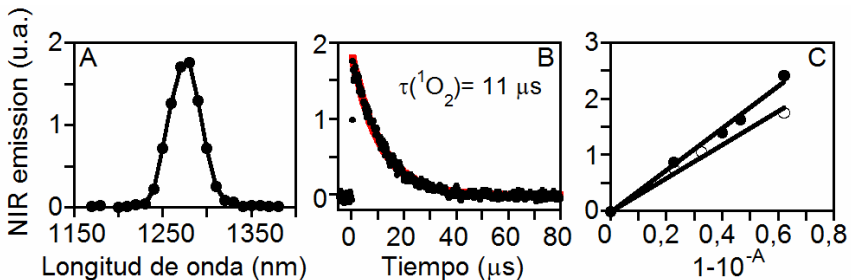


Figura 5.19. A) Espectro de emisión del $^1\text{O}_2$ registrado tras la excitación de una disolución de IBDP. B) Desaparición de la fosforescencia registrada a 1270 nm tras la excitación a 532 nm de la disolución de IBDP en metanol. C) Gráficas para los Φ_{Δ} del IBDP y RB en metanol.

La representación de los valores de fosforescencia a 1270 nm frente a los de $1-10^{-A}$, donde A es la absorbancia, para diferentes concentraciones de IBDP en metanol, permitió estimar un valor de 0,61 para el rendimiento de generación de oxígeno

singlete (Φ_{Δ}) del IBDP en metanol usando como estándar RB (Figura 5.19C).

Por otro lado, la evaluación de la producción de $^1\text{O}_2$ por el UCNP-IBDP@PEG se llevó a cabo usando una sonda química, el ácido 9,10-antracenediil-bis(metilen)dimalónico (AABD).^{16,50} La formación de oxígeno singlete tras la excitación a 975 nm de UCNP-IBDP@PEG en una disolución acuosa (D_2O) se comprobó a través de la medida de la disminución de la intensidad de emisión del AABD en función del tiempo de irradiación con un láser diodo a 975 nm. La Figura 5.20 muestra cómo la emisión del AABD disminuye con el tiempo de exposición del nanohíbrido al NIR, debido a la formación de su endoperóxido, el cual no es fluorescente.

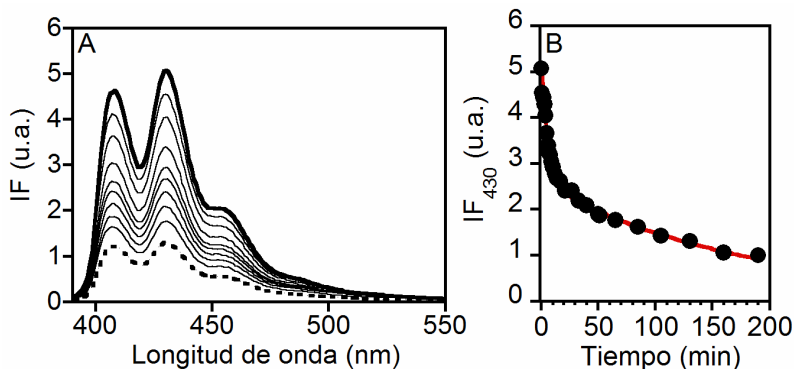


Figura 5.20. A) Disminución de la intensidad de emisión de AABD con el tiempo debido a la generación de $^1\text{O}_2$ tras la irradiación en el NIR del nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG en agua deuterada (intervalos de tiempo: 0, 1, 4, 6, 10, 14, 21, 40, 65, 130 min). B) Disminución de la intensidad de emisión del AABD registrada a 430 nm hasta 200 min.

Los datos se ajustaron a una curva de desactivación exponencial, con una velocidad constante de desactivación de la fluorescencia del AABD de $2,57 \text{ min}^{-1}$. Este comportamiento es análogo al observado en experimentos similares.³

Tras 15 minutos de irradiación, la intensidad de emisión del AABD disminuyó a la mitad, poniendo de manifiesto la alta eficiencia en la producción de $^1\text{O}_2$ del nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG. Como experimento control, se irradiaron en condiciones análogas una disolución de AABD en ausencia y

presencia de UCNP@PEG, sin observar cambios en la emisión de AABD con el tiempo. Además, con la finalidad de maximizar la eficiencia de generación de $^1\text{O}_2$ se optimizó la cantidad de IBDP en el nanohíbrido. Para ello, se llevaron a cabo diferentes síntesis en las que se varió la relación en masa IBDP/UCNP (desde 0,05 a 1 mg IBDP/mg UCNP). Se observó que un aumento de la relación IBDP/UCNP aumentaba la cantidad de IBDP en el nanohíbrido^c así como la eficiencia del nanohíbrido en la producción de oxígeno singlete (Figura 5.21).

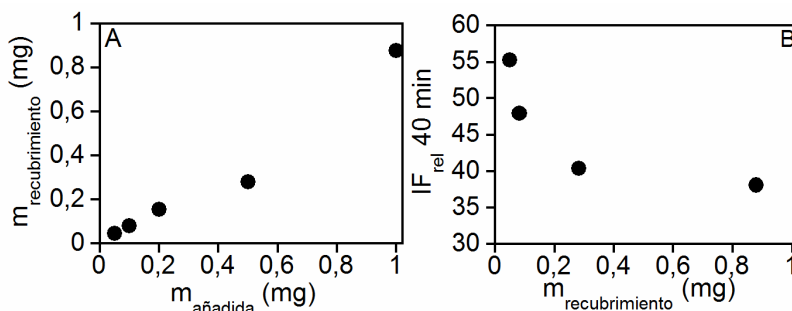


Figura 5.21. A) Masa de IBDP por mg de UCNP presente en el nanohíbrido resultante frente a la masa añadida de IBDP por mg de UCNP en la reacción. B) Intensidad de emisión relativa del AABD tras 40 minutos de irradiación a 975 nm en función de la cantidad de IBDP en el nanohíbrido.

No obstante, el incremento de la relación en el nanohíbrido por encima de 0,28 mg IBDP/mg UCNP (equivalente a 0,5 mg IBDP/mg UCNP añadidos en la síntesis), no suponía una mejora significativa de la eficiencia en la generación de oxígeno singlete del nanohíbrido resultante. Por ello, se escogió el nanohíbrido sintetizado en dichas condiciones para hacer todos los estudios descritos a lo largo de este capítulo.

La Figura 5.22 muestra un esquema simplificado de los procesos que tienen lugar tras la excitación a 975 nm de una dispersión acuosa del nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG. Primero, tiene lugar el mecanismo ETU ya conocido. Brevemente, el Yb^{3+}

^c La cantidad final de IBDP en el nanohíbrido se calculó a partir de la masa añadida de IBDP en la reacción y la presente en el sobrenadante de la reacción, estimada a partir de su espectro de absorción.

absorbe un fotón de 975 nm pasando a su estado excitado (${}^2F_{7/2} \rightarrow {}^2F_{5/2}$) y, tras la absorción de un segundo fotón, puebla el estado excitado del IBDP (${}^1IBDP^*$) y los estados excitados del Er^{3+} (${}^2H_{11/2}$, ${}^4S_{3/2}$, ${}^4F_{9/2}$), produciéndose así la emisión de luz en el VIS. Además, se puede producir transferencia de energía desde los niveles energéticos ${}^2H_{11/2}$ y ${}^4S_{3/2}$ al IBDP, dando lugar al ${}^1IBDP^*$ y, posteriormente, el estado excitado triplete (${}^3IBDP^*$) tras un cruce intersistema. Finalmente, el ${}^3IBDP^*$ transfiere energía al oxígeno molecular en estado triplete, formando el 1O_2 .

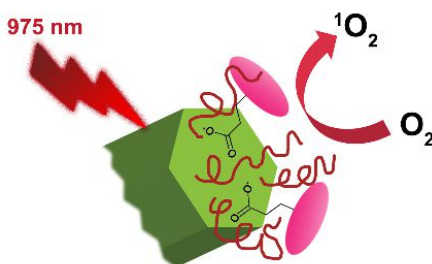


Figura 5.22. Esquema simplificado de la generación de 1O_2 por el UCNP-IBDP@PEG tras la irradiación en el NIR.

5.2.5- Estudios de fototoxicidad *in vitro* del nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG

En primer lugar, se comprobó que el nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG era estable en PBS y en medio de cultivo, lo que era prometedor para aplicaciones biológicas.

Seguidamente se hicieron ensayos de viabilidad celular para ver si la presencia del nanohíbrido afectaba a la proliferación de las células. Para ello, se incubaron durante 24 horas células de neuroblastoma humano SH-SY5Y con diferentes cantidades del nanohíbrido y se llevó a cabo un ensayo XTT para evaluar la viabilidad celular, asumiendo que el 100% era la muestra cultivada en ausencia del nanohíbrido (Figura 5.23). El ensayo XTT es un ensayo colorimétrico para la determinación de células metabólicamente activas.

Mientras que a una concentración de $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ no se observaban cambios en la proliferación de las células, se

observaba una disminución de aproximadamente un 10% a concentraciones de hasta $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Solo a concentraciones mucho más elevadas ($250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) se observaban evidencias de toxicidad del nanohíbrido, disminuyendo en un 40% el número de células vivas ($n = 5$; $p < 0.01$, Test “U” de Mann Whitney).

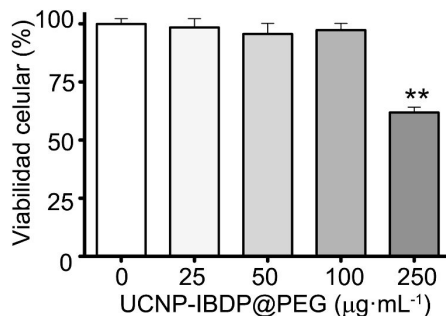


Figura 5.23. Viabilidad celular in vitro de las células SH-SY5Y incubadas a diferentes concentraciones de UCNP-IBDP@PEG (0, 25, 50, 100 y $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 24 h.

Esta baja toxicidad está en consonancia con otros trabajos publicados con UCNP y diferentes tipos de células.^{32,51-53} Además, a concentraciones superiores a $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, se ha descrito la formación de membranas irregulares, agregados celulares o cromatina nuclear condensada en células incubadas con UCNP@PEG.³⁹

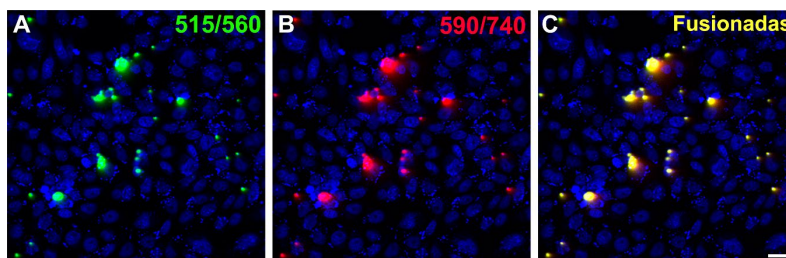


Figura 5.24. Internalización del nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG por las células SH-SY5Y. Tras la excitación a 975 nm, las nanopartículas en las células, presentan emisión en el verde y el rojo (a y b). La emisión de las UCNP corrobora la alta co-localización. El núcleo celular está teñido con DAPI. Barra de escala: $20 \mu\text{m}$.

La internalización de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de UCNP-IBDP@PEG en un medio de cultivo por las células SH-SY5Y fue completa tras 24

h. Se detectaron señales fluorescentes (emisión verde y roja) en el citoplasma de las células. Además, la alta colocación de ambas señales fluorescentes sugería la presencia de las UCNP-IBDP@PEG en el interior de las células (Figura 5.24). Esto corroboraba también que el nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG mantenía sus propiedades luminiscentes en el interior de la célula.

Por tanto, tras comprobar que el nanohíbrido no era tóxico y mantenía sus propiedades luminiscentes en el interior de la célula, se evaluó su capacidad para generar oxígeno singlete en el interior de la célula. Para ello, se incubaron las células SH-SY5Y con $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ del nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG y se irradiaron durante 45 minutos con un láser de CW a 975 nm con una potencia total de 239 mW.

Al finalizar la irradiación, se añadieron los componentes del kit Life Technologies LIVE/DEAD® a la placa Petri (Figura 5.25). Las células con membranas dañadas exhibían fluorescencia en el rojo debido a la tinción de los ácidos nucleicos con el etidio homodímero-1 (EthD1), el cual es incapaz de atravesar las células vivas. Por otro lado, las células vivas exhibían emisión verde, debido a la conversión de la calceína AM en calceína fluorescente usando estearasas citosólicas no específicas.⁵⁴⁻⁵⁶

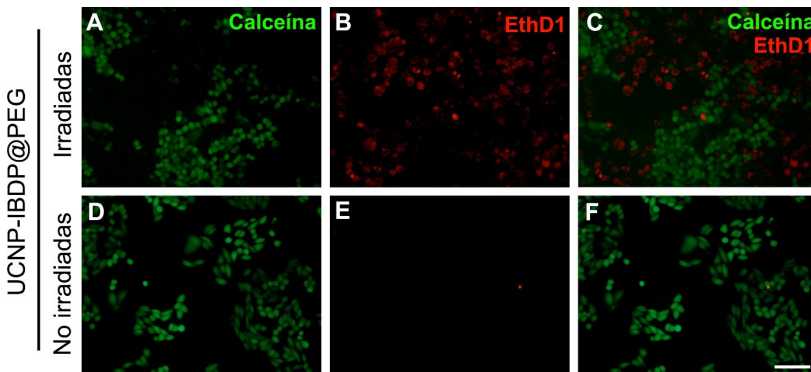


Figura 5.25. Las células SH-SY5Y incubadas con UCNP-IBDP@PEG (A-C) irradiadas con un láser de CW a 975 nm durante 45 min. Ensayos de viabilidad celular realizados con un kit Life Technologies LIVE/DEAD®. Las células con daño celular exhibían fluorescencia roja ($\lambda_{\text{exc}}= 510\text{-}560$; $\lambda_{\text{em}} = 590$) mientras que las sanas verde ($\lambda_{\text{exc}} =450\text{-}490$; $\lambda_{\text{em}} =515\text{-}565$ nm). No se observaron cambios en las no irradiadas (D-F). Barra escala: 100 μm .

Se determinó un $50,6 \pm 3,2$ % de mortalidad celular, indicativo de una alta eficacia PDT in vitro. Los ensayos control demostraron que tanto las células incubadas con UCNP-IBDP@PEG no irradiadas como las incubadas con y sin UCNP@PEG permanecían intactas (Figura 5.26).

En un principio, se atribuyó la muerte celular inducida por oxígeno singlete a procesos de necrosis.^{57,58} Pero, posteriormente, se demostró que la causa principal se debe a procesos apoptóticos, ya que se observaba un gran número de cambios morfológicos y bioquímicos en las células en presencia de radicales de oxígeno.^{15,59}

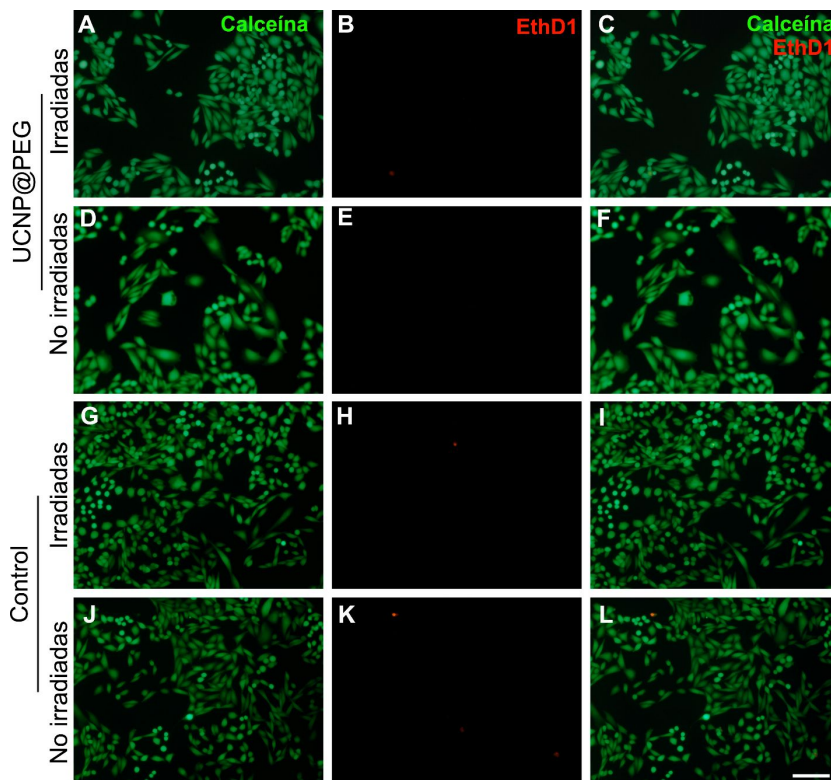


Figura 5.26. Las células SH-SY5Y incubadas con UCNP@PEG (A-F) o en medio de control (G-L) se irradiaron con un láser de CW a 975 nm durante 45 min. Se realizaron los ensayos de viabilidad celular con un kit Life Technologies LIVE/DEAD®. Las células con daño celular exhibían fluorescencia roja ($\lambda_{exc} = 510-560$; $\lambda_{em} = 590$) mientras que las sanas verde ($\lambda_{exc} = 450-490$; $\lambda_{em} = 515-565$ nm). Barra escala: 100 μ m.

Para dilucidar los procesos que se desencadenan tras la irradiación en el NIR de las células incubadas con UCNP-IBDP@PEG, se sembraron las células SH-SY5Y en una placa de pocillos y se irradió específicamente en un área definida. Posteriormente, se obtuvieron las secciones semifinas de los cultivos celulares teñidas con azul de toluidina, de manera que se podían apreciar detalles morfológicos de las células (Figura 5.27). Se observó que las células control (incubadas sin UCNP-IBDP@PEG o con UCNP-IBDP@PEG pero no irradiadas) no presentaban diferencias, es decir, estaban sanas. Sin embargo, las células incubadas con UCNP-IBDP@PEG e irradiadas, mostraban numerosos signos de daño celular (Figura 5.27).

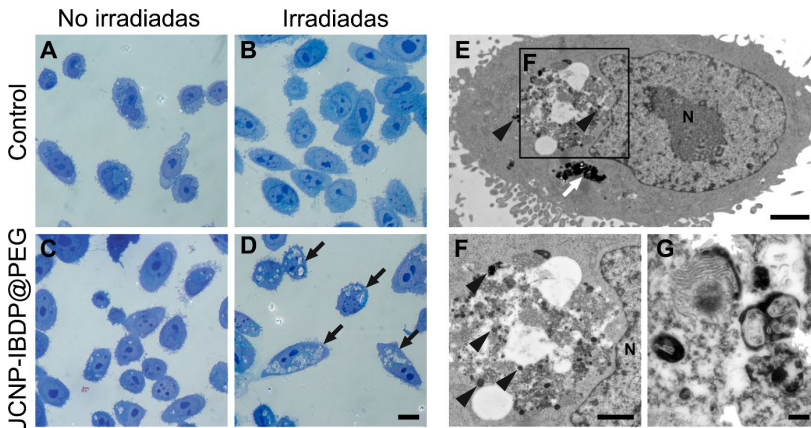


Figura 5.27. Secciones semifinas y ultrafinas de las células SH-SY5Y tras la irradiación a 975 nm. Células incubadas con (A y B) y sin UCNP-IBDP@PEG (C y D) comparadas sin o tras la irradiación, respectivamente. E-G Imágenes TEM de las células tras la irradiación en presencia UCNP-IBDP@PEG. N: núcleo. Las flechas negras señalan zonas con grandes vacuolas (E) y acumulaciones de UCNP (F). Barra de escala: A-D: 10 μm ; E: 2 μm ; F: 1 μm y G: 200 μm .

La Figura 5.27D muestra la aparición de vacuolas en el citosol, aparición de protuberancias, membranas nucleares irregulares, así como células pictónicas (alargadas). El análisis por microscopía electrónica (Figura 5.27E) mostró grandes masas de materia heterogénea junto con vacuolas vacías (tamaño de hasta 3 μm). Otras células presentaban muchas más vacuolas pero de menor tamaño.

A mayor magnificación se llegaron a detectar las UCNP tanto en la periferia como en el interior de las vacuolas (Figura 5.27F). Además, se observaba la aparición de masas membranosas (Figura 5.27G).

La aparición de vacuolas en el citoplasma se atribuía al daño producido por el oxígeno singlete generado tras la irradiación a 975 nm, tal y como se ha descrito previamente para la exposición de las células a una gran variedad de sustancias químicas y compuestos bioactivos.⁶⁰

Por lo tanto, el nanohíbrido presentó alta eficiencia y homogeneidad en la inducción de muerte celular y además conservaba la luminiscencia en el interior de la célula, lo que podría ser de utilidad para bioimagen y TFD. Por otro lado, los grupos terminales amino del PEG (libres en la periferia del nanohíbrido) podrían ser usados para unir covalentemente otros FS^d u otras moléculas capaces de reconocer específicamente un tipo de células o unirse específicamente a las membranas celulares.^{18,30,32} Esto facilitaría el transporte de las UCNP a las células cancerígenas e incrementaría su eficacia de internalización en las células, y por tanto evitaría su acumulación en la matriz extracelular.⁶¹ En resumen, el nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG es muy eficiente para TFD, bioimagen y, además, tiene la capacidad para unirle a posteriori ligandos concretos y mejorar por ejemplo la especificidad con las células.

5.3- Conclusiones

Se ha diseñado un nanohíbrido basado en un derivado diyodado del Bodipy (IBDP) con un grupo carboxilato como punto de anclaje a la superficie de las UCNP y, simultáneamente, embebido en una capa de un derivado del polietilenglicol (UCNP-IBDP@PEG). La presencia del PEG ha otorgado al nanohíbrido dispersabilidad en agua y, además, un efecto protector sobre el IBDP, que evita su pérdida progresiva del nanohíbrido.

^d Una cantidad mayor de FS en la periferia de la UCNP no asegura una mayor eficiencia de la TFD.

Las medidas de luminiscencia de estado estacionario y de tiempo resuelto sobre este nanohíbrido y su análogo hidrofóbico (UCNP-IBDP@OA) demostraron el papel crucial del IBDP en los procesos de upconversion. La presencia del IBDP en los nanohíbridos produjo una desactivación de la emisión UC en el verde debido a la TER desde los estados excitados del Er^{3+} al IBDP. Además, se ha demostrado que el estado metaestable del Yb^{3+} , formado tras la absorción de un fotón NIR, puede desaparecer a través de dos caminos competitivos: población de los estados excitados del Er^{3+} o transferencia de energía al IBDP. Esto causaba el acortamiento de los tiempos de vida de aparición.

Con el uso de una sonda química, AABD, se determinó la gran eficacia del nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG para la generación de oxígeno singlete tras su excitación en el NIR. Los ensayos *in vitro* demostraron que el nanohíbrido se internalizaba en células derivadas de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) y con una baja citotoxicidad. Tras la irradiación en el NIR (45 min, 239 mW) de las células incubadas en presencia del nanohíbrido, se observó aproximadamente un 50% de muerte celular. Por lo tanto, el nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG es un potencial candidato para aplicación en TFD.

5.4- Procedimiento experimental

5.4.1- Materiales

A continuación, se detallan los reactivos necesarios para la síntesis de las UCNP: LnCl_3 hexahidratados de pureza >99,9% ($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 1-octadeceno (95%), ácido oleico (99,9%), NaOH y NH_4F (99,99%). HS-PEG- NH_2 (3,0 kDa), el ácido 9,10-antracenedilo-bis(metileno) dimalónico (ABDA) así como todos los reactivos y disolventes necesarios para la síntesis de IBDP se obtuvieron de fuentes comerciales.

5.4.2- Síntesis de UCNP@OA

Las nanopartículas de $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ recubiertas con oleato se sintetizaron siguiendo un procedimiento descrito

anteriormente pero con algunas modificaciones.³⁸ En un matraz de 50 mL de fondo redondo se añade 242,9 mg (0,8 mmol) de $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 69,7 mg (0,18 mmol) de $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 7,6 mg (0,02 mmol) de $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 12 ml de ácido oleico y 15 mL de octadeceno. La mezcla se calienta a 160°C, bajo agitación constante y en atmósfera protectora de nitrógeno hasta que se disuelvan las sales (~ 30 minutos). Tras enfriar la disolución a 100°C, se añade lentamente una disolución de metanol que contiene 101.5 mg de NaOH (2,5 mmol) y 148.3 mg NH_4F (4 mmol). A continuación, la mezcla se calienta a 100°C bajo agitación constante hasta que se evapore todo el metanol (~ 30 minutos).

Finalmente, se calienta la mezcla de reacción a 305°C, bajo flujo de nitrógeno durante una hora. Después, se enfría a temperatura ambiente y las UCNP@OA se precipitan mediante centrifugación (10000 rpm, 10 min, 25°C). El precipitado obtenido se lava dos veces con una mezcla de disolventes hexano:acetona:metanol (2,7:2,5:1 v/v) y una última vez con etanol. Las nanopartículas se secan durante 24 h al vacío.

5.4.3- Síntesis de UCNP desnudas

Las UCNP desnudas se sintetizaron siguiendo un protocolo experimental descrito previamente.⁶² Se dispersaron 100 mg de UCNP@OA en 10 mL de una disolución acuosa de HCl a pH 4. La mezcla se agitó durante 2 horas y el pH se mantuvo en 4 añadiendo gotas de una disolución de HCl 0,1 M. El ácido oleico se eliminó de la mezcla mediante triple extracción con éter dietílico. Las fases orgánicas se recombinaron y se extrajeron con éter. Finalmente, se juntaron las fases acuosas resultantes y se reextrajeron con éter. Las UCNP desnudas se recuperaron de la fase acuosa mediante su precipitación con acetona y posterior centrifugación (10000 rpm, 15 min, 25°C). Las nanopartículas se secaron al vacío durante 24 h y se redispersaron en agua Milli Q.

5.4.4- Síntesis de UCNP@PEG

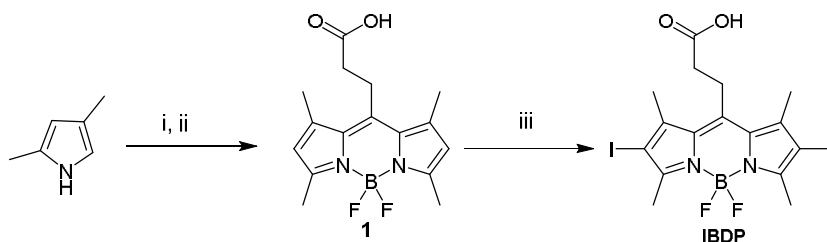
Las UCNP@PEG se sintetizaron mediante un método de derivatización previamente descrito en nuestro grupo.³⁹ Así, se

sonicaron 5 mL de una dispersión de UCNP@OA (10 mg) en cloroformo burbujeado con N₂ durante 15 minutos. Seguidamente, se añadió un exceso de HS-PEG-NH₂ (100 mg; 20 mg·mL⁻¹) y se agitó la mezcla de reacción durante una noche a 60°C en atmósfera de N₂.⁶³

Se evaporó a vacío el cloroformo de la dispersión turbia resultante. El sólido obtenido se redispersó en 5 mL de agua MilliQ tras 15 minutos de sonicación. Para eliminar el exceso de PEG, se llevaron a cabo cinco ciclos de centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos con un volumen total de acetonitrilo de 50 mL. Las UCNP@PEG se redispersaron en 1 mL de trietilenamina (TEA, 40 mM, pH 7,5) y guardadas en la nevera (4°C) durante una semana como máximo antes de su uso.

5.4.5- Síntesis y caracterización de IBDP

Se sintetizó el compuesto 1 a partir del 2,3-dimetilpirrol y del cloruro de succinilo en presencia de trietilamina y el complejo trifloruro de boro-dietiléter (Esquema 1). Seguidamente, se llevó a cabo una yodación con ácido yódico y yodo con un protocolo ligeramente modificado³⁵ Los datos de caracterización del IBDP obtenido coincide con los descritos previamente.³⁴



Esquema 1- Síntesis del IBDP: i) (CH₂COOCl)₂/DCM; ii) Et₃N/BF₃OEt₂; iii) I₂, EtOH, HIO₃, H₂O, 99%.

5.1.5.1- 2,6-diyodo-1,3,5,7,8-pentametil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (1).

Una mezcla de 2,4-dimetilpirrol (1g, 10 mmol) y cloruro de succinilo (0,58 mL, 5,2 mmol) en diclorometano (50 mL) se calentó a reflujo bajo argón durante 30 minutos. Primero, se añadió la trietilamina (6 mL, 60 mmol) a temperatura ambiente y, después de

30 minutos de agitación, el eterato dietílico de trifluoruro de boro (6,3 mL, 50 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas en atmósfera de argón y la reacción se desactivó con 60 mL de una disolución acuosa 0,1 M HCl.

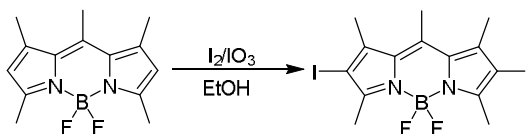
Se llevó a cabo una extracción y las fracciones orgánicas se combinaron y lavaron tres veces con 40 mL de una disolución saturada de NaHCO₃. Después, se combinaron las fases acuosas y se acidificaron con HCl 0,1 M, extraídas con acetato de etilo y secado con MgSO₄. El residuo naranja obtenido se purificó mediante una columna cromatográfica instantánea (*flash*) (gel de sílice, hexano-acetato de etilo 1:1 como eluyente). Se obtuvieron 0.5 g de unos cristales naranjas (rendimiento = 30 %); CCF (acetato de etilo): R_f = 0,15; ¹H- RMN (300 MHz): δ = 2,44 (s, 6 H, CH₃-C1', CH₃-C7'), 2,52 (s, 6 H, CH₃-C3', CH₃-C5'), 2,66 (m, 2 H, CH₂-CO), 3,34 (m, 2 H, CH₂-C8'), 6,09 (s, 2H, H-C2', H-C6'), (OH no observado) ppm. ¹³C-RMN (75 MHz): δ = 13,48, 15,6 (CH₃-C3', CH₃-C5', CH₃-C1', CH₃-C7'), 23,5 (CH₂-C8'), 34,1 (CH₂-CO), 121,0 (C2', C6'), 130,1 (C-7'a, C-8'a), 139,0 (C-1', C-7'), 141,7 (C-8'), 153,8 (C-3', C-5'), 176,2 (C=O) ppm. MS (EI), m/z (%) = 277 [M⁺-COO] (93), 254 (100).

5.1.5.1- Ácido 3-(2',6'-diyodo-1',3',5',7'-tetrametil-4',4'-difluoro-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacen-8'-ilo)propanoico.

Una disolución de ácido yódico (0,325 g, 1,9 mmol) en 5 mL de agua se añadió gota a gota a una mezcla del compuesto 1 (300 mg, 0,93 mmol), yodo (0,354 g, 1,4 mmol) y etanol (100 mL). La mezcla se calentó durante 20 minutos a 60°C. Se obtuvo un sólido rosa correspondiente al IBDP puro (rendimiento del 99%, 0.5 mg) que se usó sin ningún tipo de purificación previa. CCF (acetato de etilo): R_f = 0,15; ¹H NMR (300 MHz): δ = 2,51 (s, 6 H, CH₃-C1', CH₃-C7'), 2,6 (s, 6 H, CH₃-C3', CH₃-C5'), 2,6 (m, 2 H, CH₂-CO), 3,40 (m, 2 H, CH₂-C8'), (OH no observada) ppm; ¹³C NMR (75 MHz): δ = 15,6, 20,04 (CH₃-C3', CH₃-C5', CH₃-C1', CH₃-C7'), 23,3 (CH₂-C8'), 33,7 (CH₂-CO), 98,5 (C-2', C-6'), 130,1 (C-8'), 141,3 (C-1', C-7'), 141,6 (C-7'a, C-8'a), 153,3 (C-3', C-5'), 173,8 (C=O) ppm. MS (ESI⁻), m/z (%) = 570,9 [M (masa nominal)-H⁺].

5.4.6- Síntesis de PM567

El 2,6-Diyodo-1,3,5,7,8-pentametil-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno se sintetizó de manera análoga al IBDP siguiendo un método descrito en la bibliografía.³⁵ Básicamente, la yodación se hizo con yodo, ácido yódico y metanol a temperatura ambiente del 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno. La caracterización del producto purificado coincidió con lo descrito previamente.⁶⁴



Esquema 2- Síntesis del PM567.

5.4.7- Síntesis de UCNP-IBDP@PEG

Una dispersión de UCNP@PEG (300 μL , 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en TEA (40 mM, pH 7,5) se sonicó durante 15 minutos y se le añadió una disolución de IBDP (1,5 mg) en TEA (0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 24 horas. Se eliminó el exceso del fotosensibilizador con 5 ciclos de centrifugación (10000 rpm, 10 min) y sonicación (15 min) en acetonitrilo ($V_{\text{T}} = 50 \text{ mL}$). El nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG se resuspendió en 3 mL de agua MilliQ o TEA y se guardó a 4°C.

5.4.8- Síntesis de UCNP-IBDP@OA

El nanohíbrido UCNP-IBDP@OA se preparó de manera análoga al UCNP-IBDP@PEG. Se sonicó durante 15 minutos una mezcla que contenía 5 mg de UCNP@OA, 2,5 mg de IBDP y 3 mL del tampón de TEA (pH = 7,5). La mezcla se agitó durante 24 h, en la oscuridad y a temperatura ambiente. El nanohíbrido se precipitó mediante centrifugación (10000 rpm, 10 min) y se redispersó en acetonitrilo (5 mL) seguido de centrifugación, para eliminar el exceso de IBDP. Se llevaron a cabo 5 ciclos más. Finalmente, el nanohíbrido UCNP-IBDP se resuspendió en tolueno.

5.4.9- Cálculo de las integrales de solapamiento espectral (J)

La integral de solapamiento espectral se estimó usando el software gratuito de aje 2.2-UV-Vis-IR Spectral (de FluorTools) a través de la siguiente ecuación:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot F_D(\lambda) d\lambda$$

Donde ε_A es el espectro del coeficiente de extinción del aceptor en $M^{-1} \cdot cm^{-1}$, λ es la longitud de onda en nm y F_D es el espectro de emisión del dador normalizado a un área de 1.

5.4.10- Síntesis de los complejos Yb-IBDP.

Para la preparación de los complejos se disolvieron a 160°C, 7 mg de $YbCl_3 \cdot 6H_2O$ en 1,2 mL AO y 1,5 mL de ODE. Tras enfriar a temperatura ambiente esta disolución, se tomaron 700 μL que se mezclaron con 450, 890, 1300 μL de una disolución de IBDP en tolueno ($6 \text{ mg} \cdot mL^{-1}$) para el complejo 1:1, 1:2 y 1:3, respectivamente. Luego se añadió tolueno hasta completar un volumen total de 2 mL. Las disoluciones se sonicaron durante 10 minutos.

5.4.11- Cálculos del rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete (Φ_{Δ}).

La cantidad de oxígeno singlete generado se determinó a partir de las curvas de desaparición de fosforescencia del 1O_2 en la región NIR. El rendimiento cuántico de formación de 1O_2 se define como el número de moléculas de 1O_2 emisoras por fotón absorbido por el FS.

Para determinar el rendimiento cuántico se usaron disoluciones de RB en metanol como estándar. Para ello, se prepararon diferentes disoluciones de IBDP y RB en metanol cuyas absorbancias en la longitud de onda de excitación ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) fueron menores de 0,40. Se representaron los valores de fosforescencia del 1O_2 a 1270 nm de estas disoluciones (tras la

excitación con un láser a 532 nm) frente a los de $1 \cdot 10^{-A}$, donde A es la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de excitación.⁶⁵ Φ_{Δ} del IBDP se estimó usando la relación entre las pendientes de cada recta según la ecuación:

$$\Phi_{IBDP} = \Phi_{RB} \cdot \frac{\text{pendiente}_{IBDP}}{\text{pendiente}_{RB}}$$

se usa como referencia el Φ_{Δ} del RB ($\Phi_{RB} = 0,76$)⁶⁶ y Φ_{IBDP} corresponde al rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete del IBDP.

5.4.12- Determinación de la generación de oxígeno singlete con una sonda química.

Para determinar la generación de oxígeno singlete por los nanohíbridos tras excitación a 975 nm, se usó el ácido 9,10-antracenediil-bis(metilen) dimalónico (AABD). Esta sonda se ha usado con anterioridad para determinar la capacidad de otros nanohíbridos basados en UCNP-FS para generar oxígeno singlete.^{14,16} El AABD es un compuesto fluorescente que en presencia de 1O_2 forma su endoperóxido, el cual no presenta emisión.^{14,16} Por tanto, la cantidad de 1O_2 puede determinarse indirectamente a través de la disminución de la intensidad del AABD.

Para ello, se preparó una dispersión en un tampón de fosfato (PBS, pH 7,2, 1,5 mL) que contenía el nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) y AABD ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$), que se mantuvo en la oscuridad y bajo continua agitación.^e Se registró la emisión del AABD a 400 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$) tras diferentes intervalos de irradiación con un láser diodo a 975 nm y con una potencia de 138,5 mW.

Para comparar los resultados, se hicieron las mismas medidas y bajo las mismas condiciones para una disolución de AABD ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$) en PBS. Además, se hicieron experimentos

^e El medio ligeramente básico aseguraba la desprotonación del ácido que favorecía la solubilidad de la sonda en medios acuosos.

control con muestras que contenían AABD y UCNP@PEG. Todas las medidas se hicieron en cubetas de cuarzo 1x1 cm² y usando disoluciones en agua deuterada, saturadas de oxígeno y a temperatura ambiente.

5.4.13- Ensayos de citotoxicidad

La citotoxicidad in vitro se midió en células SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) usando el XTT Cell Proliferation Kit II (Roche, Mannheim, Alemania). Este es un ensayo colorimétrico para la cuantificación no radiactiva de la proliferación celular, viabilidad y la citotoxicidad. El kit está compuesto por la sal de tetrazolio XTT (sal de 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfopenilo]-2H-tetrazolio-5-carboxianilida), que mediante un mecanismo celular complejo se reduce al cromóforo soluble en agua fomazano XTT. Esta biorreducción sólo se da en células vivas y, por tanto, la cantidad del cromóforo se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas en el cultivo.

Las células se sembraron en una placa de cultivo de 96 pocillos y a una densidad de 3·10⁴ células por pocillo, bajo una humedad del 100% y se cultivaron a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas. Se añadieron diferentes concentraciones de UCNP-IBDP@PEG (0, 25, 50, 100 y 250 µg·mL⁻¹) en medio de cultivo celular a los pocillos y se volvieron a incubar durante 24 horas más a 37°C y 5% CO₂.

Al día siguiente, el reactivo XTT (50 µL; 0,3 mg·mL⁻¹) se añadió a cada pocillo y la placa se incubó durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Seguidamente, se midió la absorbancia a 450 nm con un espectrofotómetro de microplacas (Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

Se hicieron cinco réplicas para cada concentración de nanohíbrido. Se calculó la viabilidad de las células tratadas (%) usando la siguiente ecuación y asumiendo que la viabilidad de las no tratadas era del 100%:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{A_{450}\ células\ tratadas}{A_{450}\ células\ control} \times 100$$

5.4.14- Estudios de la aplicabilidad de las UCNP-IBDP@PEG en terapia fotodinámica.

Para este estudio *in vitro* se usaron células SH-SY5Y derivadas de neuroblastoma humano. Las células se cultivaron en un medio de Dulbecco modificado con medio Eagle/F-12 (DMEM/F-12) suplementado con un 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 50 IU·mL⁻¹ de penicilina y 50 µg·mL⁻¹ de estreptomina. Las células SH-SY5Y se sembraron en una placa de cultivo de 60 mm y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas, lavándolas posteriormente con PBS.

Se usó un haz de láser colimado procedente un láser diodo de CW a 975 nm (Thorlabs L975P1WJ) para irradiar la placa Petri. La potencia de salida se midió con un medidor de potencia a la distancia exacta del área de irradiación (Thorlabs PM100A) y después, se irradiaron las células durante 45 minutos. La placa Petri se mantuvo a 37°C durante la irradiación.

Tras la irradiación, se hizo un test de viabilidad celular usando el Cell LIVE/DEAD® Kit (Life Technologies). La fluorescencia se registró usando un microscopio invertido Zeiss Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania), en el rango 515-565 nm y 590-740 nm para el verde (Calceína) y el rojo (EthD1), respectivamente. El brillo y contraste de las imágenes se ajustó usando el software Fiji. La cuantificación se llevó a cabo contando el número de células vivas frente al de células muertas en el campo del microscopio localizado justo en el centro de la zona irradiada (n= 3 réplicas).

Además, para comprobar la morfología en detalle de las células, éstas se sembraron en una cámara Permax de 4 pocillos (Nalgene Nunc International, Naperville, IL). Después, las células se irradiaron como se ha descrito arriba y, seguidamente se fijaron en una PBS 0,1 M con un 3,5% de glutaraldehído durante una hora a 37°C. Las células se fijaron posteriormente en OsO₄ al 2% durante a una hora a temperatura ambiente y mantenidas en acetato de uranilo al 2%, en la oscuridad y a 4°C durante 2 horas.

Finalmente, las células se lavaron con agua destilada, se deshidrataron en etanol y se embebieron en la resina Durcupan (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) durante una noche. Tras la polimerización, se cortaron una serie de secciones semifinas (1,5 μm) con un ultramicrotomo UC-6 (Leica, Heidelberg, Alemania) y se tintaron con azul de toluidino al 1%. Se tomaron fotomicrografías digitales con un microscopio Nikon Eclipse E800. Las secciones ultrafinas (60-70 nm) también se prepararon y se tintaron con citrato de plomo (disolución de Reynolds). Finalmente, las microfotografías se obtuvieron usando un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G² Spirit (FEI Europe, Eindhoven, Holanda) equipado con una cámara digital Morada (Olympus Soft Image Solutions GmbH, Münster, Alemania).

5.5- Bibliografía

- (1) Dougherty, T. J. *Photochem. Photobiol.* **1993**, *58*, 895.
- (2) Wang, C.; Cheng, L.; Liu, Z. *Theranostics* **2013**, *3*, 317.
- (3) Zhang, P.; Steelant, W.; Kumar, M.; Scholfield, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4526.
- (4) Brown, S. B.; Brown, E. A.; Walker, I. *Lancet Oncol.* **2004**, *5*, 497.
- (5) Roby, A.; Erdogan, S.; Torchilin, V. P. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *62*, 235.
- (6) Tardivo, J. P.; Del Giglio, A.; de Oliveira, C. S.; Gabrielli, D. S.; Junqueira, H. C.; Tada, D. B.; Severino, D.; de Fátima Turchiello, R.; Baptista, M. S. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2005**, *2*, 175.
- (7) Neckers, D. C. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1989**, *47*, 1.
- (8) Jori, G.; Fabris, C. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2000**, *43*, 181.
- (9) Garcia, A. M.; Alarcon, E.; Muñoz, M.; Scaiano, J. C.; Edwards, A. M.; Lissi, E. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 507.
- (10) Ideta, R.; Tasaka, F.; Jang, W.-D.; Nishiyama, N.; Zhang, G.-D.; Harada, A.; Yanagi, Y.; Tamaki, Y.; Aida, T.; Kataoka, K. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 2426.
- (11) Francés-Soriano, L.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. In *Upconverting Nanomaterials*; CRC Press: 2016, p 101.
- (12) Chen, C.; Li, C.; Shi, Z. *Adv. Sci.* **2016**, *3*, 1600029.
- (13) Nam, J.; Won, N.; Bang, J.; Jin, H.; Park, J.; Jung, S.; Jung, S.; Park, Y.; Kim, S. *Adv. Drug Del. Rev.* **2013**, *65*, 622.
- (14) Guo, Y.; Kumar, M.; Zhang, P. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 6071.
- (15) Guo, H.; Qian, H.; Idris, N. M.; Zhang, Y. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **2010**, *6*, 486.
- (16) Qian, H. S.; Guo, H. C.; Ho, P. C.-L.; Mahendran, R.; Zhang, Y. *Small* **2009**, *5*, 2285.
- (17) Cui, S.; Chen, H.; Zhu, H.; Tian, J.; Chi, X.; Qian, Z.; Achilefu, S.; Gu, Y. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 4861.
- (18) Cui, S.; Yin, D.; Chen, Y.; Di, Y.; Chen, H.; Ma, Y.; Achilefu, S.; Gu, Y. *ACS Nano* **2013**, *7*, 676.
- (19) Xiao, Q.; Ji, Y.; Xiao, Z.; Zhang, Y.; Lin, H.; Wang, Q. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1527.
- (20) Xia, L.; Kong, X.; Liu, X.; Tu, L.; Zhang, Y.; Chang, Y.; Liu, K.; Shen, D.; Zhao, H.; Zhang, H. *Biomaterials* **2014**, *35*, 4146.
- (21) Yang, X.; Xiao, Q.; Niu, C.; Jin, N.; Ouyang, J.; Xiao, X.; He, D. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 2757.
- (22) Chen, F.; Zhang, S.; Bu, W.; Chen, Y.; Xiao, Q.; Liu, J.; Xing, H.; Zhou, L.; Peng, W.; Shi, J. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 7082.

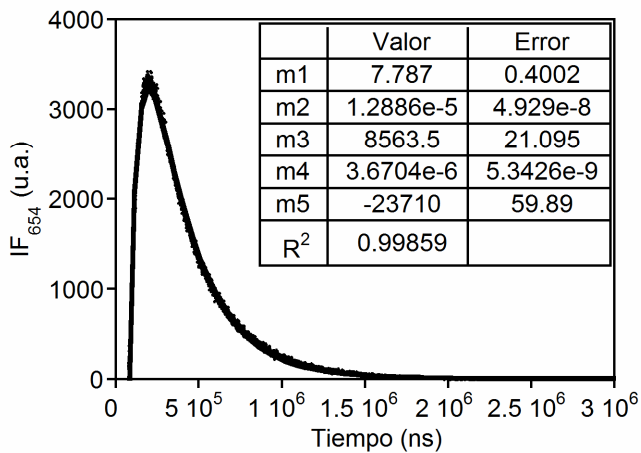
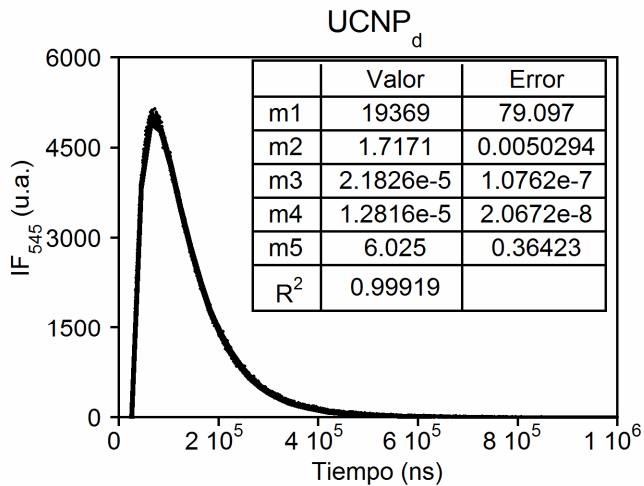
- (23) Liu, K.; Liu, X.; Zeng, Q.; Zhang, Y.; Tu, L.; Liu, T.; Kong, X.; Wang, Y.; Cao, F.; Lambrechts, S. A. G.; Aalders, M. C. G.; Zhang, H. *ACS Nano* **2012**, *6*, 4054.
- (24) Wang, D.; Xue, B.; Kong, X.; Tu, L.; Liu, X.; Zhang, Y.; Chang, Y.; Luo, Y.; Zhao, H.; Zhang, H. *Nanoscale* **2015**, *7*, 190.
- (25) Wu, T.; Kaur, S.; Branda, N. R. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2317.
- (26) Yuan, Q.; Wu, Y.; Wang, J.; Lu, D.; Zhao, Z.; Liu, T.; Zhang, X.; Tan, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13965.
- (27) Shan, J.; Budijono, S. J.; Hu, G.; Yao, N.; Kang, Y.; Ju, Y.; Prud'homme, R. K. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 2488.
- (28) Guan, M.; Dong, H.; Ge, J.; Chen, D.; Sun, L.; Li, S.; Wang, C.; Yan, C.; Wang, P.; Shu, C. *NPG Asia Mater.* **2015**, *7*, e205.
- (29) Zhou, A.; Wei, Y.; Wu, B.; Chen, Q.; Xing, D. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9*, 1580.
- (30) Park, Y. I.; Kim, H. M.; Kim, J. H.; Moon, K. C.; Yoo, B.; Lee, K. T.; Lee, N.; Choi, Y.; Park, W.; Ling, D.; Na, K.; Moon, W. K.; Choi, S. H.; Park, H. S.; Yoon, S.-Y.; Suh, Y. D.; Lee, S. H.; Hyeon, T. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 5755.
- (31) Wang, C.; Cheng, L.; Liu, Z. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1110.
- (32) Idris, N. M.; Gnanasammandhan, M. K.; Zhang, J.; Ho, P. C.-L.; Mahendran, R.; Zhang, Y. *Nature Med.* **2012**, *18*, 1580.
- (33) Wu, S.; Hana, G.; Milliron, D. J.; Alonia, S.; Altoea, V.; Talapin, D. V.; Cohena, B. E.; Schuck, P. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 10917.
- (34) Hui Lim, S.; Thivierge, C.; Nowak-Sliwinska, P.; Han, J.; van den Bergh, H.; Wagnières, G.; Burgess, K.; Lee, H. B. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2865.
- (35) Yogo, T.; Urano, Y.; Ishitsuka, Y.; Maniwa, F.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2.
- (36) Erbas, S.; Gorgulu, A.; Kocakusakogullaric, M.; Akkaya, E. U. *Chem. Commun.* **2009**, 4956.
- (37) Adarsh, N.; Avirah, R. R.; Ramaiah, D. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5720.
- (38) Li, Z.; Zhang, Y. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 345606.
- (39) Voliani, V.; González-Béjar, M.; Herranz-Pérez, V.; Duran-Moreno, M.; Signore, G.; Garcia-Verdugo, J. M.; Pérez-Prieto, J. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 13538.
- (40) Xia, X.; Yang, M.; Wang, Y.; Zheng, Y.; Li, Q.; Chen, J.; Xia, Y. *ACS Nano* **2011**, *6*, 512.
- (41) Wang, M.; Chen, Z.; Zheng, W.; Zhu, H.; Lu, S.; Ma, E.; Tu, D.; Zhou, S.; Huang, M.; Chen, X. *Nanoscale* **2014**, *6*, 8274.
- (42) Cong, T.; Ding, Y.; Xin, S.; Hong, X.; Zhang, H.; Liu, Y. *Langmuir* **2016**, *32*, 13200.
- (43) Wurth, C.; Kaiser, M.; Wilhelm, S.; Grauel, B.; Hirsch, T.; Resch-Genger, U. *Nanoscale* **2017**, *9*, 4283.
- (44) Auzel, F. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 139.
- (45) Boyer J-C, V. F., Cuccia L A, Capobianco J A *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7444.
- (46) Hehlen, M. P.; Frei, G.; Güdel, H. U. *Phys. Rev. B* **1994**, *50*, 16264.
- (47) Lü, Q.; Guo, F.; Sun, L.; Li, A. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 2836.
- (48) Riittamäki, T.; Hyppänen, I.; Kankare, J.; Soukka, T. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 17736.
- (49) Zhang, X.; Xiao, Y.; Qi, J.; Qu, J.; Kim, B.; Yue, X.; Belfield, K. D. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9153.
- (50) Kuznetsova, N. A.; Gretsova, N. S.; Yuzhakova, O. A.; Negrimovskii, V. M.; O. L. Kaliya; Luk'yanets, E. A. *Russ. J. Gen. Chem.* **2001**, *71*, 36.
- (51) Nyk, M.; Kumar, R.; Ohulchansky, T. Y.; Bergey, E. J.; Prasad, P. N. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3834.
- (52) Wang, C.; Cheng, L.; Xu, H.; Liu, Z. *Biomaterials* **2012**, *33*, 4872.
- (53) Gnach, A.; Lipinski, T.; Bednarkiewicz, A.; Rybka, J.; Capobianco, J. A. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1561.
- (54) Papadopoulos, N. G.; Dedoussis, G. V. Z.; Spanakos, G.; Gritzapis, A. D.; C. N., B.; Papamichail, M. *J. Immunol. Methods.* **1994**, *177*, 101.
- (55) Hayes, A. W.; Third Edition ed., 1994.
- (56) Kaneshiro, E. S.; Wyder, M. A.; Wu, Y.-P.; Cushion, M. T. *J. Microbiol. Methods* **1993**, *17*, 1.
- (57) Henderson, B. W.; Dougherty, T. J. *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55*, 145.

- (58) Moan, J.; Berg, K. *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55*, 931.
- (59) Agarwal, M. L.; Clay, M. E.; Harvey, E. J.; Evans, H. H.; Antunez, A. R.; Oleinick, N. L. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 5993.
- (60) Aki, T.; Nara, A.; Uemura, K. *Cell. Biol. Toxicol.* **2012**, *28*, 125.
- (61) Davis, M. E.; Chen, Z.; Shin, D. M. *Nature Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 771.
- (62) Bogdan, N.; Vetrone, F.; Ozin, G. A.; Capobianco, J. A. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 835.
- (63) Boyer, J.-C.; Manseau, M.-P.; Murray, J. I.; van Veggel, F. C. J. M. *Langmuir* **2010**, *26*, 1157.
- (64) Bonardi, L.; Ulrich, G.; Ziessel, R. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2183.
- (65) Oliveros, E.; Bossman, S. H.; Nonell, S.; Martí, C.; Heit, G.; Tröscher, G.; Neuner, A.; Martínez, C.; Braun, A. M. *New. J. Chem.* **1999**, *23*, 85.
- (66) Gollnick, K.; Franken, T.; Fouda, M. F. R.; Paur, H. R.; Held, S. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1992**, *12*, 57.

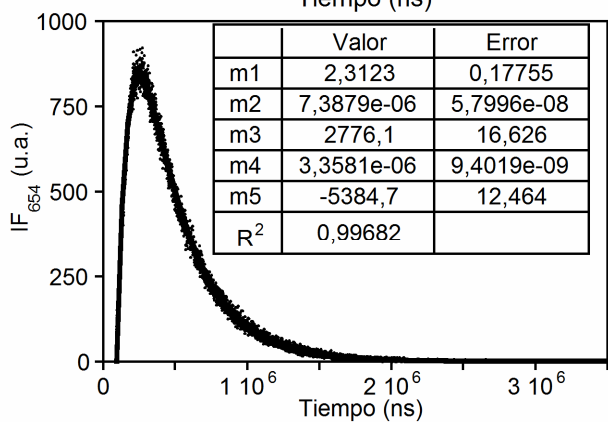
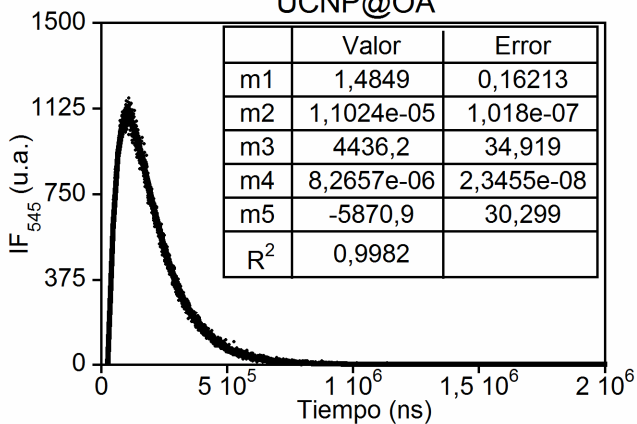
Anexo 1- Perfiles cinéticos de desaparición de fluorescencia de los nanohíbridos

Los tiempos de vida de aparición y desaparición (τ_a y τ_d) se determinaron a partir del ajuste de los datos a la siguiente ecuación:

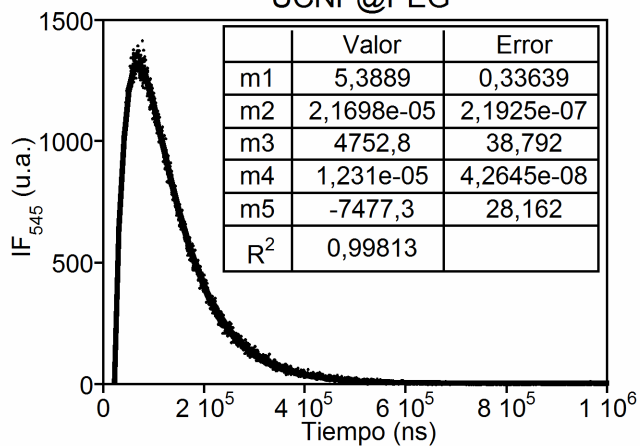
$$y = A_1(1 - A_2 \cdot \exp^{-A_3 \cdot t}) \cdot \exp^{-A_4 \cdot t} + A_5$$

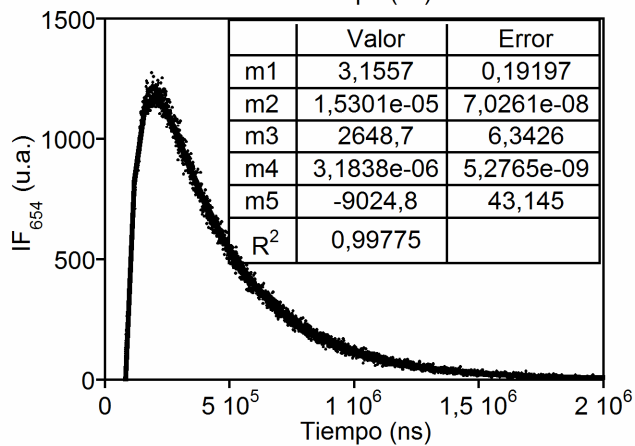
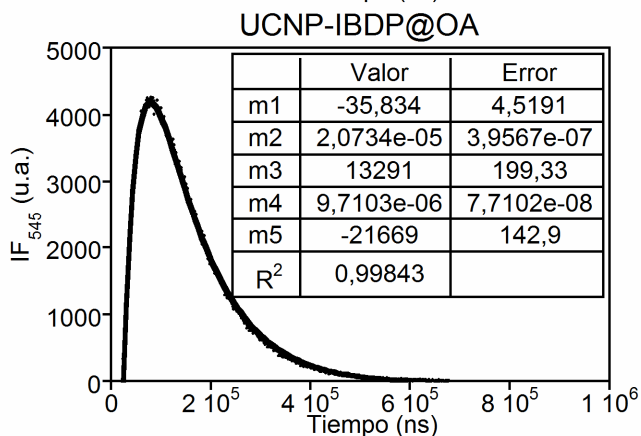
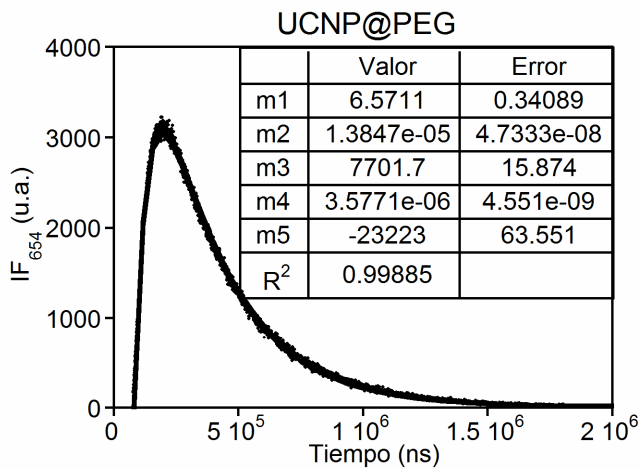


UCNP@OA

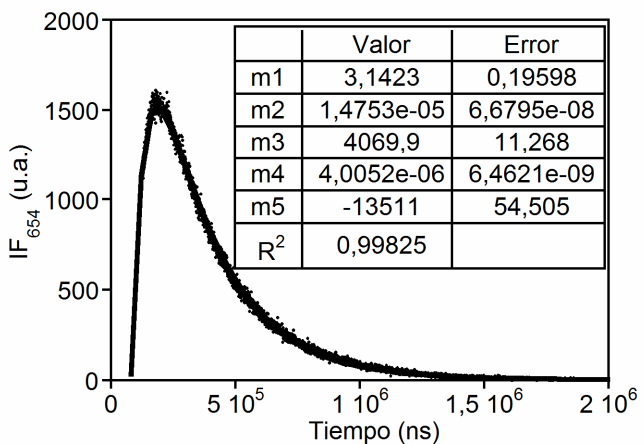
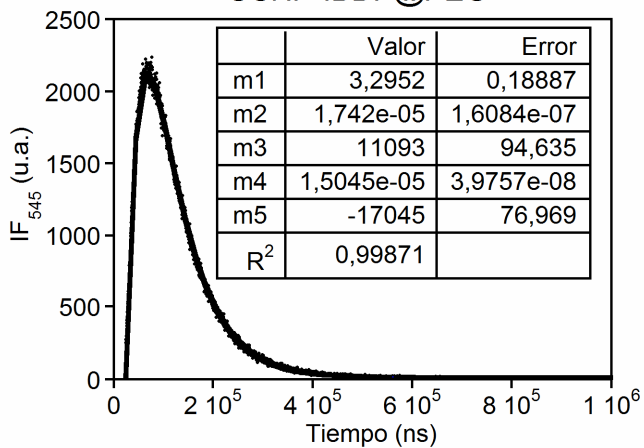


UCNP@PEG





UCNP-IBDP@PEG



***Capítulo 6- Síntesis de UCNP recubiertas con
cucurbit[n]uril como dadores de energía***

6.1- Introducción

Los cucurbit[n]urilos (CB[n], $n=5-10$) son moléculas macrocíclicas solubles en agua formadas por (n) unidades de glicolurilo unidas por puentes de metileno.^{1,2} Estos macrociclos presentan forma de calabaza (cucurbita) a la cual deben su nombre, con dos portales idénticos en los extremos formados por los oxígenos de los grupos carbonilos y una cavidad interna hidrofóbica.³⁻⁶ Tienen una altura de 0,91 nm y el tamaño de la cavidad interna aumenta con el número de unidades de glicolurilo en la estructura, siendo 0,39 nm para CB[6], 0,54 nm para CB[7] y 0,69 nm para CB[8] (Figura 6.1).^{4,6} Los CB[n] son de gran interés debido a su capacidad de reconocimiento molecular⁴ y muchas moléculas orgánicas pueden estabilizarse en el interior de la cavidad a través de interacciones hidrofóbicas.⁶⁻⁸

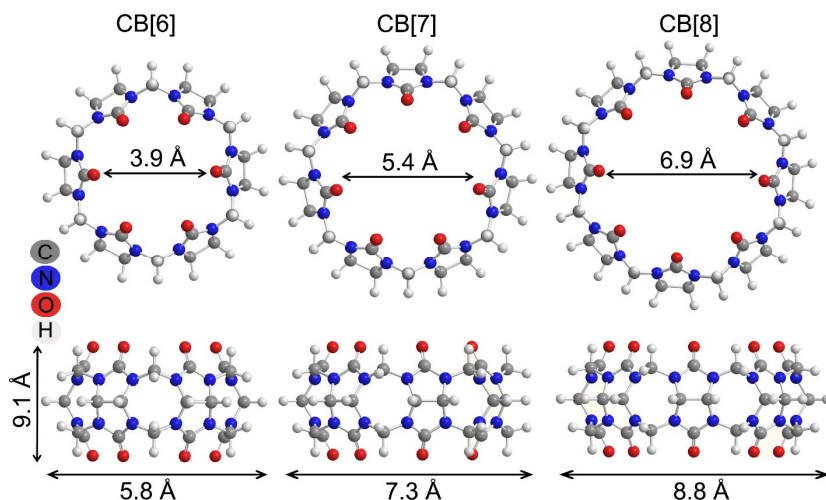


Figura 6.1. Estructura del CB[6], CB[7] y CB[8].

Además, los carbonilos situados en los extremos pueden interactuar mediante interacciones ión-dipolo⁸ con un gran número de cationes metálicos,^{5,8,9} entre ellos los cationes de lantánidos,¹⁰⁻¹⁴ así como unirse a la superficie de nanopartículas metálicas como oro,¹⁵⁻¹⁷ plata,^{18,19} platino²⁰ o paladio.²¹

Los complejos huésped-receptor de los CB[n] con cromóforos básicos tricíclicos han sido muy estudiados debido a las

cruce intersistemas al estado triplete del 52%) es mucho mayor que el de la radiativa ($\Phi_F \sim 3\%$). El AM presenta una elevada eficiencia en la formación de oxígeno singlete ($\Phi_\Delta \sim 50\%$, Tabla 6.1).

	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Phi_F(\text{c})$	$\Phi_F(\text{c+CB}[7])$	$\Phi_F(\text{c+CB}[8])$	Φ_Δ
PY	658	576	0,47	0,86	0,15	0,12
AM	545	684	0,03	0,13	0,01	0,52

Tabla 6.1. Propiedades fotofísicas de los cromóforos AM y PY en agua.^{7,29} $\Phi_F(\text{c})$, $\Phi_F(\text{c+CB}[7])$ y $\Phi_F(\text{c+CB}[8])$: rendimiento cuántico de fluorescencia del cromóforo, del complejo cromóforo@CB[7] y del complejo cromóforo@CB[8]. Φ_Δ : rendimiento cuántico de formación $^1\text{O}_2$.

Los nanohíbridos UC@CB[n]@AM (n =6 y 7) fueron evaluados como fotosensibilizadores para la generación de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). La formación de $^1\text{O}_2$ tras la excitación en el NIR fue determinada con una sonda química, específicamente 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF), siguiendo la disminución de su absorción debido a su reacción con $^1\text{O}_2$.

6.2- Resultados y discusión

6.2.1- Preparación de los nanohíbridos de UC@CB[n]

Los nanohíbridos UC@CB[n] se prepararon por agitación de una mezcla de nanopartículas de $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ desnudas y el correspondiente CB[n] (n=6, 7 y 8).

Las imágenes de HRTEM constataron la obtención de UCNP homogéneas en forma de prismas hexagonales con un tamaño de $(32.7 \pm 1.7) \times (19.1 \pm 1.4)$ nm (Figura 6.3). Además, se puede observar que la funcionalización con los diferentes CB[n] no afecta ni a la forma ni al tamaño de las UCNP.

Las imágenes HRTEM muestran una fina capa orgánica alrededor de cada UCNP. El tamaño de esta capa fue de $1,2 \pm 0,1$ nm para UC@CB[6], $1,5 \pm 0,3$ nm para UC@CB[7] y $1,2 \pm 0,2$ para UC@CB[8]. Estos espesores son consistentes con la altura del CB[n] (0,91 nm).³⁰

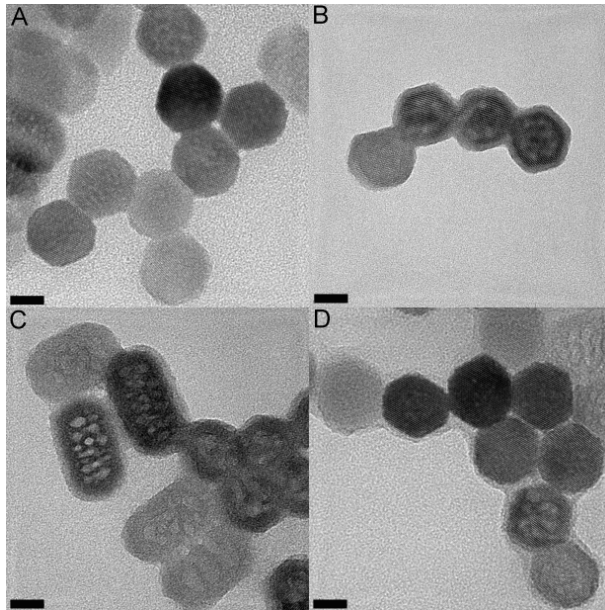


Figura 6.3. Imágenes de HRTEM de A) UCNP desnudas, B) UC@CB[6], C) UC@CB[7] y D) UC@CB[8]. Barra de escala: 10 nm.

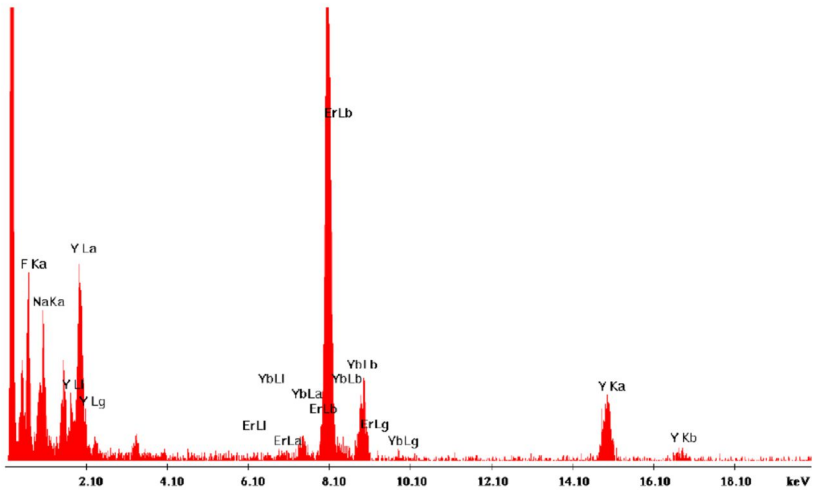


Figura 6.4. EDX de las nanopartículas NaYF₄: Yb³⁺(18%), Er³⁺(2%).

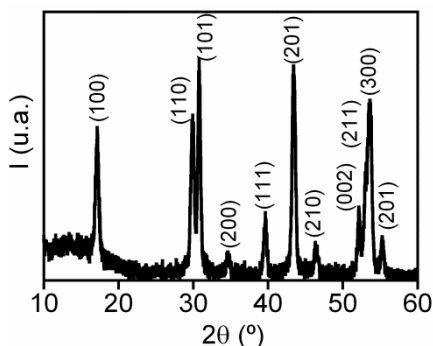


Figura 6.5. Espectro de XRD de las UCNP desnudas.

El análisis de dispersión de energía de rayos X (EDX) y el XRD (Figura 6.4 y Figura 6.5, respectivamente) corroboraron la obtención de UCNP de composición NaYF₄: Yb³⁺(18%), Er³⁺ (2%) y en fase hexagonal.

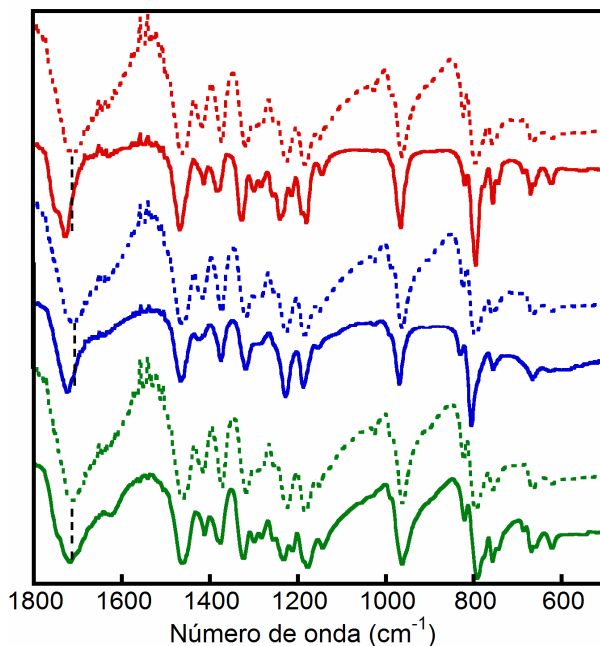


Figura 6.6. Espectros FTIR de CB[n] (línea punteada) y UC@CB[n] (línea continua) de n= 6 (línea roja), 7 (línea azul), 8 (línea verde).

Se llevaron a cabo medidas de espectroscopía FTIR con la finalidad de verificar el recubrimiento de las UCNP con los CB[n] a través de los grupos carbonilos de uno de sus portales. La Figura

6.6 muestra los espectros FTIR del CB[6], CB[7] y CB[8] comparados con sus respectivos UC@CB[n].

La banda intensa sobre 1720 cm^{-1} corresponde al estiramiento vibracional $\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{O})$, que se desplaza a valores más altos en el nanohíbrido. El desplazamiento es más alto para los nanohíbridos UC@CB[6] (16 cm^{-1}) y UC@CB[7] (17 cm^{-1}) que para el UC@CB[8] (4 cm^{-1}). Estos cambios sugieren una interacción de los CB[n] con la superficie de las UCNP a través del grupo carbonilo. Los desplazamientos a número de ondas mayores se deben a desplazamientos del enlace C=O con respecto del plano que forman los enlaces N-C-N cuando el CB[n] se ancla en la superficie de las UCNP. Estos cambios son menos significativos en el CB[8], probablemente debido a una interacción menos efectiva con la superficie de la UCNP.

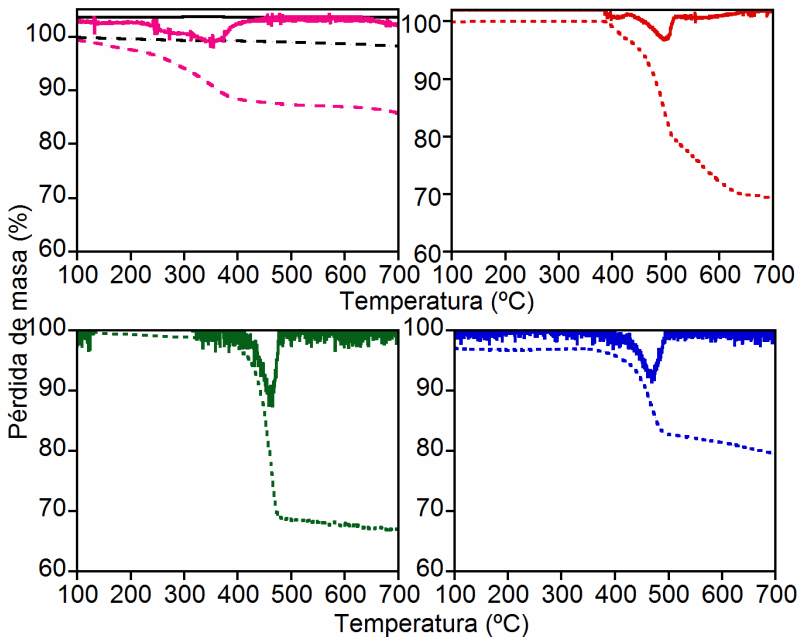


Figura 6.7. Curvas de TGA (discontinuas) y su primera derivada (continuas) de las UCNP desnudas (línea negra), UCNP@OA (línea rosa), UC@CB[6] (línea roja), UC@CB[7] (línea azul) y UC@CB[8] (línea verde).

Los TGA de los diferentes nanohíbridos UC@CB[n] fueron registrados para determinar la cantidad de CB[n] adherida a la superficie de la nanopartícula. Las curvas de TGA y sus primeras derivadas (Figura 6.7) muestran la pérdida de masa correspondiente al CB[n]. Se observa descomposición a partir de 420°C para UC@CB[6] y UC@CB[8] mientras que para UC@CB[7] se produce a menores (sobre 370°C). Estos datos coinciden con lo publicado para los CB[n].³⁰ La pérdida de masa por debajo de 500°C del 31%, 33% y 14% para UC@CB[6], UC@CB[7] y UC@CB[8], respectivamente, y es atribuible a la pérdida del CB[n].

La Figura 6.8 muestra los espectros de emisión UC de los nanohíbridos. Todos los espectros se midieron excitando a 980 nm en “front face” usando una dispersión del nanohíbrido de 1 mg·mL⁻¹ (concentración de UCNP).

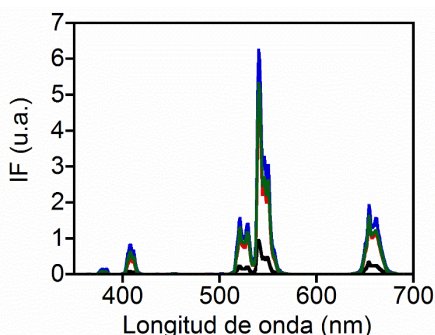


Figura 6.8. Comparación de los espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$) de UCNP (línea negra), UC@CB[6] (línea roja), UC@CB[7] (línea azul) y UC@CB[8] (línea verde).

La intensidad de emisión de los UC@CB[n] aumenta drásticamente en comparación con la de las UCNP desnudas. La emisión en 540 nm de UC@CB[6], UC@CB[7] y UC@CB[8] fue de 4,9, 6,9 y 5,4 mayor que la de las desnudas, respectivamente.

6.2.2- Nanohíbridos UC@CB[n] como dadores de energía

Con la finalidad de estudiar la versatilidad de estos nanohíbridos como dadores de energía y como base para la fabricación de nanohíbridos más complejos, se hicieron ensayos con dos cromóforos tricíclicos catiónicos, el AM y la PY.

Estudios previos han demostrado las interacciones entre diferentes CB[n] y cromóforos como el AM y la PY.⁷ El tamaño de la cavidad de los CB[n] depende del número de unidades de glicolurilo (n) y por tanto, a mayor n mayor será el tamaño de las moléculas que pueda albergar dicha cavidad. Por ejemplo, el CB[7] puede encapsular el AM pero el CB[8] es capaz de estabilizar el dímero del AM (AM₂) en su interior, mientras que en la cavidad del CB[6] no cabe ninguno de los dos.⁷ Esto se puede comprobar con el espectro de absorción y emisión de mezclas conteniendo CB[n] y AM.¹⁶ La Figura 6.9 muestra como los espectros de absorción y emisión de la mezcla CB[6]/AM corresponden con los del AM libre. Sin embargo, en la mezcla de CB[7]/AM se observa un desplazamiento de la absorción y de la emisión hacia el azul (Figura 6.9) debido a la formación del complejo de inclusión CB[7]@AM.¹⁶ En el caso del CB[8], el espectro de absorción, con máximo en 611 nm, corresponde al AM₂ y, por tanto, la emisión es muy baja ($\Phi_F \sim 1\%$).

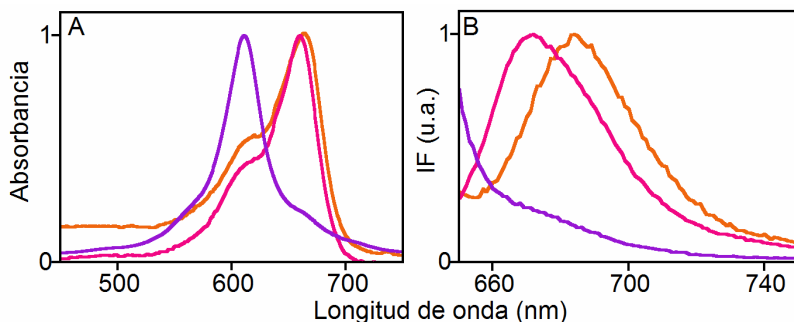


Figura 6.9. Espectros normalizados de absorción (A) y de emisión ($\lambda_{exc} = 640$ nm, B) de disoluciones de CB[6]/AM (línea naranja), CB[7]/AM (línea rosa) y CB[8]/AM (línea violeta).

Resultados análogos se obtienen con la mezcla PY. El CB[7] puede encapsular a una molécula de PY, pero el CB[6] es demasiado pequeño para albergar en su interior la molécula de PY. La cavidad mucho más grande del CB[8] permite la encapsulación del trímero (PY)₃ que no es emisoro.⁷

6.2.2.1- Formación de nanohíbridos UC@CB[n]@AM

Se añadieron concentraciones crecientes de una disolución acuosa de AM a 2 mL de una dispersión de UC@CB[n] en agua de concentración $0,018 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Teniendo en cuenta los resultados del TGA (Figura 6.7), se calculó una cantidad de CB[n] de 5,5, 5,3 y $2,4 \text{ }\mu\text{M}$ para UC@CB[6], UC@CB[7] y UC@CB[8], respectivamente. Se adicionaron alícuotas de una disolución acuosa de AM (0-100 μL) de manera que la última alícuota igualaba la concentración de CB[n] con la de AM.

Tras cada adición se registraron los espectros de emisión con $\lambda_{\text{exc}} = 980 \text{ nm}$ y 640 nm , así como el espectro de absorción de la mezcla. Para simplificar vamos a centrarnos en la mezcla correspondiente a la última adición, donde la concentración de CB[n] y de AM son iguales.

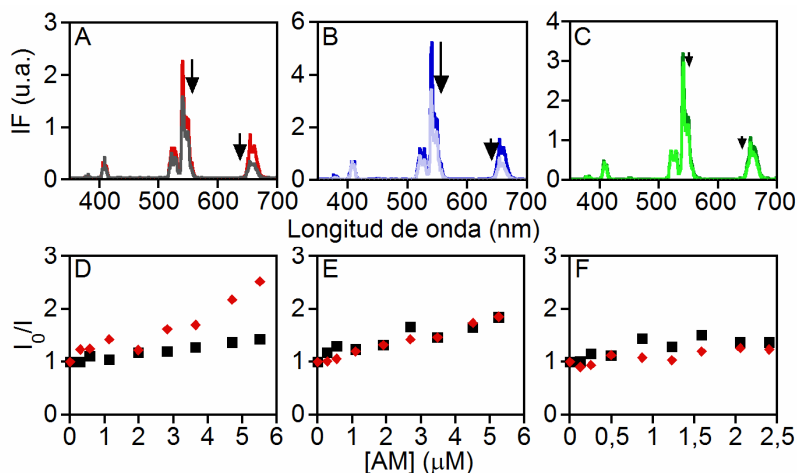


Figura 6.10. Arriba: Espectro de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 980 \text{ nm}$) de A) UC@CB[6], B) UC@CB[7] y C) UC@CB[8] antes y después de la adición de AM en concentración similar a la de CB. Debajo: Cambio en la intensidad de emisión para los nanohíbridos UC@CB[n] a 540 (negro) y 654 (rojo) nm tras la adición de concentraciones crecientes de AM.

La Figura 6.10 muestra los espectros de emisión $\lambda_{\text{exc}} = 980 \text{ nm}$ de los nanohíbridos antes y después de la adición de AM. Se observa una desactivación de la fluorescencia en 550 y 650 nm para UC@CB[6] y UC@CB[7] tras la adición de AM. Para el

UC@CB[8] la disminución de la emisión es insignificante. La desactivación observada se debe a la transferencia de energía de las UCNP al AM debido al solapamiento del espectro de emisión de las UCNP con el de absorción del AM. En cuanto a las diferencias observadas entre los UC@CB[n], podría deberse a diferencias en la interacción entre el nanohíbrido y el AM.

El espectro de absorción de UC@CB[8]/AM muestra un máximo de absorción en 611 nm aproximadamente y no presenta emisión (Figura 6.11). Estos datos están de acuerdo con la encapsulación del dímero en el interior del CB[8], que lleva a la formación del nanohíbrido UC@CB[8]@AM₂.

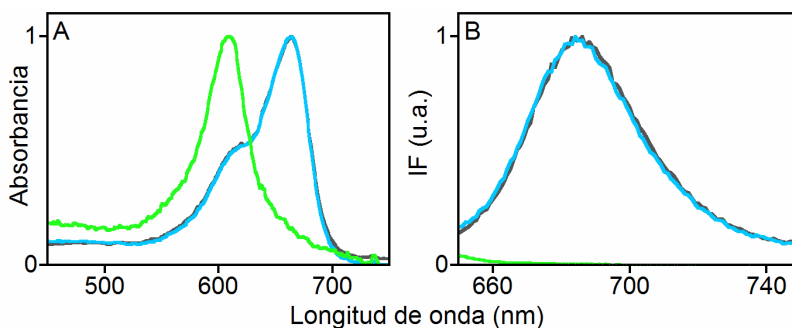


Figura 6.11. Espectros de absorción (izquierda) y de emisión ($\lambda_{exc} = 640$ nm, derecha) normalizados de dispersiones de UC@CB[6]/AM (línea gris), UC@CB[7]/AM (línea azul) y UC@CB[8]/AM (línea verde).

Los espectros de absorción y emisión tanto de UC@CB[7]/AM como de UC@CB[6]/AM son prácticamente idénticos, con un máximo de absorción en 664 nm y uno de emisión en 684 nm (Figura 6.11), los cuales coinciden con los del AM libre.

Los resultados son consistentes con la formación de complejos de exclusión entre los nanohíbridos UC@CB[6] y UC@CB[7] y AM, esto es la formación del nanohíbrido UC@CB[n]@AM. Se deduce que la encapsulación del AM en la cavidad del CB[n] ($n = 6$ y 7) no es un proceso competitivo con la unión del CB[n] a la superficie de la UCNP.

Con la finalidad de obtener información sobre la interacción entre el CB[n] del nanohíbrido UC@CB[n] y el AM, se registraron

los espectros ^1H -RMN de una dispersión de UC@CB[7]@AM en D_2O (Figura 6.12).

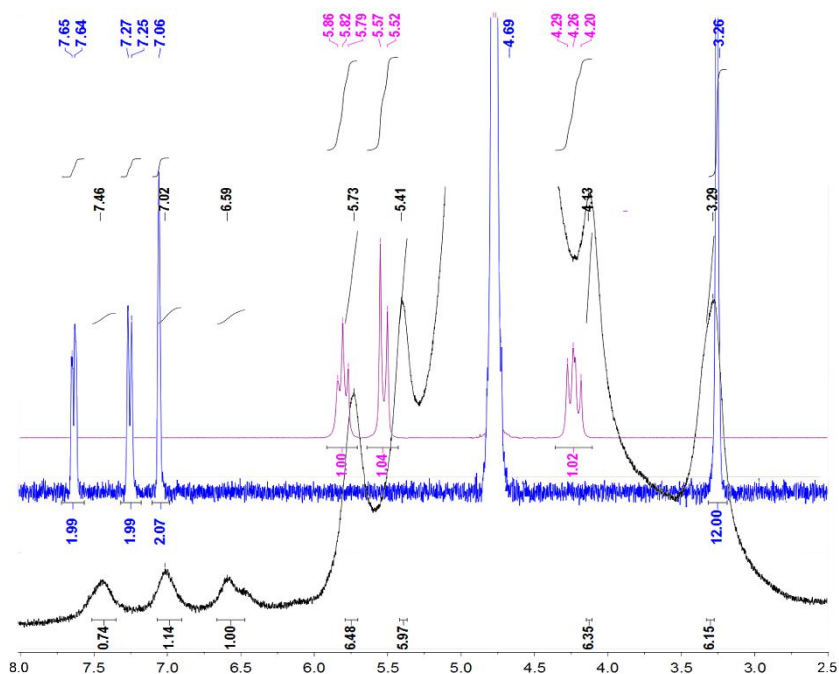


Figura 6.12. Espectro de ^1H -RMN de UC@CB[7]/AM (línea negra) y AM (línea azul) y CB[7] (línea violeta) en D_2O . Los desplazamientos químicos (δ) están en ppm.

Cabe destacar que las señales correspondientes al AM y CB[7] en el nanohíbrido son más anchas en comparación con el AM y CB[7] libre debido a su restringida rotación en el nanohíbrido.

En cuanto al desplazamiento de las señales, a excepción de los protones del grupo dimetilamino (que se desplazan ligeramente a campos más bajos) el resto de los protones del AM, sobre todo los que están cerca del átomo de azufre así como los correspondientes al CB, se desplazaban a campos más altos.

Por otro lado, el número de señales correspondientes al AM en el nanosistema UC@CB[7]@AM fue el mismo que en el AM libre. Por tanto, se descarta la coordinación del AM a través de uno de los grupos dimetilamino y se propone su localización simétrica

en el portal de carbonilos libre del CB[n] y se unió a los carbonilos a través del catión de azufre central (Figura 6.13).

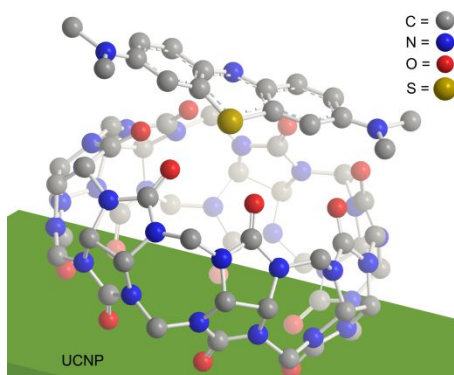


Figura 6.13. Interacción propuesta entre UCNP, CB[7] y AM.

6.2.2.2- Formación de nanohíbridos UC@CB[n]@PY

Se realizaron experimentos análogos con la PY. Los espectros de absorción y emisión excitando a 980 nm y a 540 nm se muestran en la Figura 6.14.

Las tendencias observadas para la PY fueron similares a las del AM. Los espectros de absorción de las mezclas UC@CB[n]/PY muestran la típica banda del monómero de la PY con λ_{\max} a 545 nm en el caso de $n=6$ y 7 y la banda con λ_{\max} a 500 nm correspondiente al dímero para $n=8$.

Los espectros de emisión de las mezclas UC@CB[n]/PY excitando a la PY ($\lambda_{\text{exc}} = 540$ nm ($n=6$ y 7) y 500 nm ($n=8$)), mostraron una emisión intensa en $\lambda_{\text{em}} = 570$ nm, mientras que apenas se observa emisión para el caso del dímero.

En cuanto a los espectros de emisión excitando a 980 nm, se observó una intensa desactivación de la fluorescencia de la UCNP en el caso de UC@CB[6] y UC@CB[7], mientras que no se detectaron cambios en la emisión para UC@CB[8] (espectro no mostrado). La desactivación de la emisión UC por la PY en el nanohíbrido UC@CB[n]@PY ($n=6$ y 7) es mucho mayor que la producida por el AM en el nanohíbrido UC@CB[n]@AM ($n=6$ y 7), puesto que existe un mayor solapamiento entre el espectro de

absorción de la PY y el de emisión de las UC (integrales de solapamiento estimadas: $J_{AM}=1,395 \cdot 10^{15} \text{ nm}^4 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y $J_{PY}=1,913 \cdot 10^{15} \text{ nm}^4 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

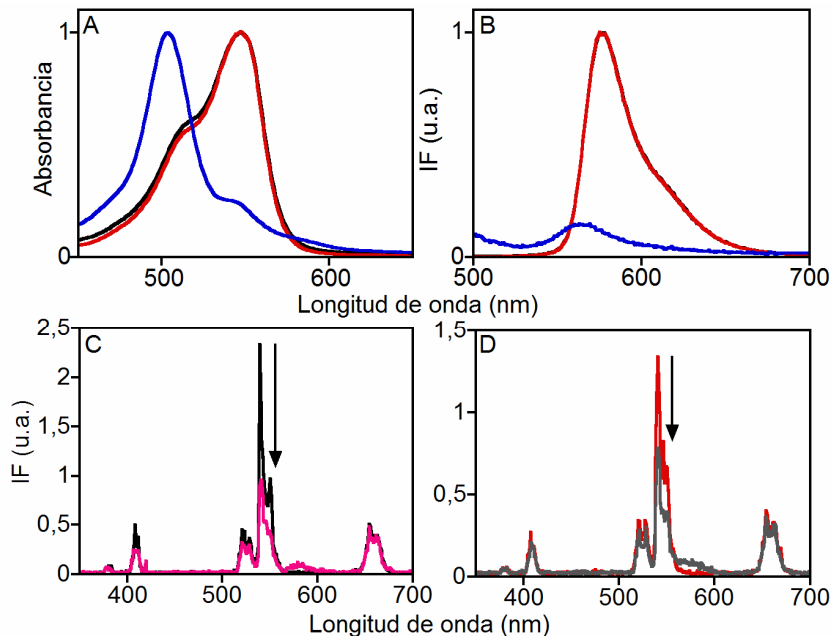


Figura 6.14. Espectros de absorción (A) y de emisión excitando a 500 nm (B) de UC@CB[n]/PY, n=6 (línea negra), n=7 (línea roja) y n=8 (línea azul). Espectros de emisión ($\lambda_{exc}=980 \text{ nm}$) de UC@CB[6] (C) y UC@CB[7] (D) antes y después de la adición de PY.

A diferencia de la emisión del AM, la emisión de la PY es mucho más intensa ($\Phi \sim 47\%$) y apenas se solapa con la de las UCNP. Por tanto, en el espectro de emisión ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$) del nanohíbrido UC@CB[n]@PY (n= 6 y 7) se observó la banda de emisión del monómero de la PY ($\lambda_{max} = 573 \text{ nm}$, Figura 6.14) evidenciando así la transferencia de energía desde la UCNP a la PY.

La interacción propuesta entre la UC@CB[7] y PY en el nanohíbrido UC@CB[7]@PY es análoga a la propuesta para el AM (Figura 6.15).

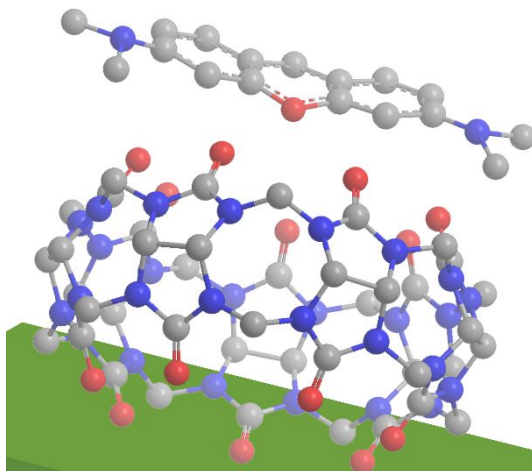


Figura 6.15. Interacción propuesta para UC@CB[7] y PY.

6.2.3- Recuperación de los nanohíbridos UC@CB[n]

Se centrifugaron las muestras a 10000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se redispersó con la misma cantidad de agua milliQ y se midieron los espectros de absorción del precipitado redispersado y del sobrenadante comparándolos con los obtenidos de la mezcla UC@CB[n]/AM (Figura 6.16).

En todos los casos la mayoría del AM permanece en el sobrenadante y el precipitado corresponde a los correspondientes nanohíbridos UC@CB[n]. Para el caso de UC@CB[n]/AM (n= 6 y 7) aparece la banda de absorción característica del AM. Como era de esperar el espectro de la mezcla UC@CB[8]/AM corresponde al complejo de inclusión AM₂@CB[8]. Teniendo en cuenta que en las mezclas iniciales la concentración de CB y AM era la misma, y el AM queda encapsulado como dímero en el sobrenadante, la mitad de los CB quedaron libres.

Por lo tanto, el precipitado de la mezcla UC@CB[8]/AM está formado por UCNP parcialmente cubiertas con unidades de CB[8] y, por eso, la emisión de upconversion disminuye comparada con la de UC@CB[8].

Estos resultados sugieren que la interacción entre el CB[n] y el UCNP en los nanosistemas UC@CB[n]/AM ($n = 6$ y 7) es más fuerte que la del CB[n] y AM. En el caso UC@CB[8]/AM, la interacción entre el AM₂ y la cavidad interna del CB[8] es mucho más fuerte que la interacción UC@CB[8].

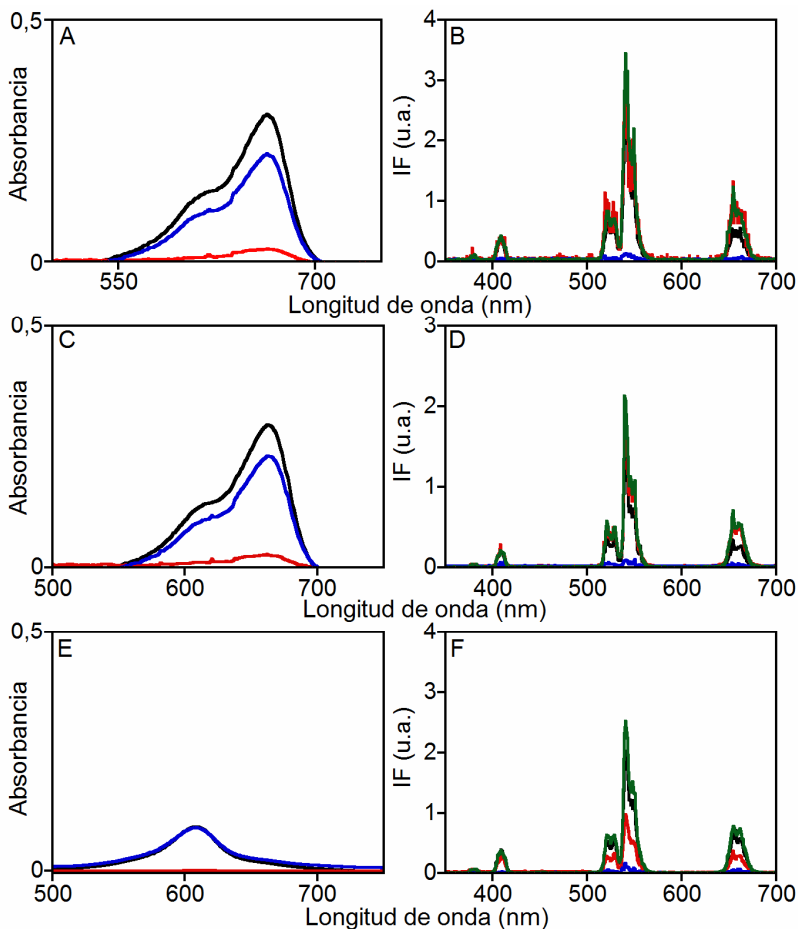


Figura 6.16. Espectros de absorción (A, C y E) y de emisión (B, D y F) a $\lambda_{exc} = 980$ nm de dispersiones de UC@CB[n]/AM (en negro), del precipitado (en rojo) y del sobrenadante (en azul) obtenidos tras la centrifugación. A y B: $n=6$, C y D: $n=7$ y E y F: $n=8$. Para comparar se ha añadido en verde la emisión del correspondiente UC@CB[n].

6.2.4-Capacidad de los nanohíbridos UCNP@CB[n]@AM para generar oxígeno singlete

El AM ha sido usado en una gran variedad de aplicaciones fotoquímicas incluyendo su utilización como fotosensibilizador en terapia fotodinámica.^{24,31} Por ello, se evaluó la capacidad del nanosistema UC@CB[n]@AM (con concentración AM:CB 1:1) para generar oxígeno singlete tras irradiar en el NIR. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se esperaría que la mezcla UC@CB[8]/AM fuera poco eficaz, ya que la eficiencia en la producción de $^1\text{O}_2$ es mucho menor para el AM₂ que para el monómero cuando se excita al cromóforo.²⁴

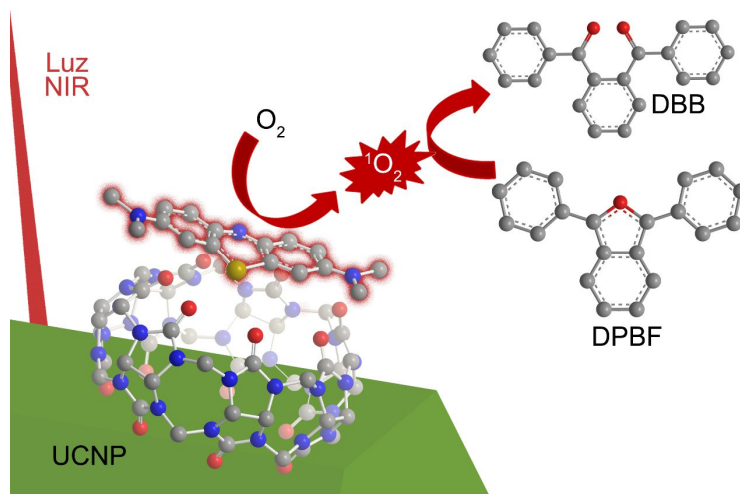


Figura 6.17. Esquema de la detección de la generación de $^1\text{O}_2$.

Para determinar la formación de oxígeno singlete, se usó DPBF como sonda interna. Se eligió esta sonda ya que presenta una banda de absorción en el rango de 350-450 nm donde no absorbe ni el AM ni el AM₂. El DPBF reacciona rápidamente en presencia de $^1\text{O}_2$ formando el dibenzoilbenceno (DBB), que no presenta absorción en el rango 350-450 nm (Figura 6.17). Además el DPBF es una sonda selectiva, ya que no reacciona ni con oxígeno molecular ni con aniones superóxidos.

Se irradiaron los nanohíbridos UC@CB[n]@AM ($n = 6$ y 7) en presencia de DPBF a diferentes intervalos de tiempo tras los

cuáles se midió el espectro de absorción. La Figura 6.18 muestra la disminución de la banda correspondiente al DPBF ($\lambda_{\text{max}} = 422$ nm) tras cada intervalo de irradiación a 980 nm de una mezcla de UC@CB[7]/AM en presencia de DPBF. Esto indica que se está generando $^1\text{O}_2$ tras la excitación de la UCNP.

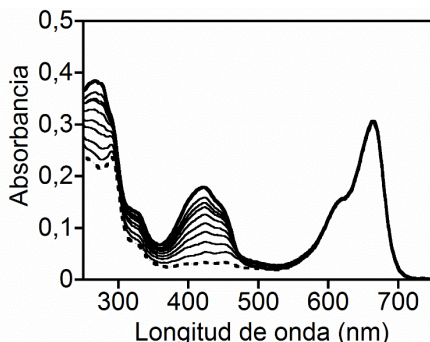


Figura 6.18. Espectros de absorción medidos antes y después de cada intervalo de tiempo de irradiación en el NIR de la mezcla UC@CB[7]/AM hasta 70 minutos.

El mecanismo de generación de $^1\text{O}_2$ es complejo, ya que implica diferentes pasos de transferencia de energía. Al irradiar los nanohíbridos a 980 nm, se produce la transferencia de energía de las UCNP al AM, generándose su estado excitado singlete (^1AM) y tras cruce intersistemas da lugar a su estado excitado triplete (^3AM). Seguidamente, ^3AM transfiere su energía al oxígeno molecular para formar oxígeno singlete, el cual reacciona con el DPBF produciendo DBB.

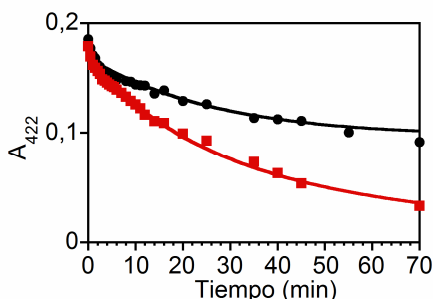


Figura 6.19. Absorción a 422 nm tras cada intervalo de tiempo de irradiación de la mezcla de DPBF y UC@CB[n]/AM n = 6 (línea negra) y n = 7 (línea roja).

El nanohíbrido UC@CB[6]@AM también resultó eficaz en la producción de $^1\text{O}_2$. La Figura 6.19 muestra la degradación de la sonda DPBF tras la irradiación del nanohíbrido a 980 nm. A partir de los datos obtenidos a intervalos de tiempos cortos (30 segundos) para los primeros 15 minutos, se calculó la velocidad de degradación del DPBF que fue de 80 min^{-1} y 11 min^{-1} , aproximadamente, para UC@CB[7]@AM y UC@CB[6]@AM, respectivamente.

Las diferencias observadas entre los nanohíbridos UC@CB[6]@AM y UC@CB[7]@AM se deben, por un lado, a la menor luminiscencia de UC@CB[6] y, por otro lado, a la menor cantidad de CB[6] que de CB[7] en la superficie de la UCNP.

6.3- Conclusiones

Se ha demostrado que el CB[n] ($n = 6, 7$ y 8) se adsorbe espontáneamente sobre la superficie de las nanopartículas de $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}(18\%), \text{Er}^{3+}(2\%)$ obteniendo los nanohíbridos UC@CB[n]. Estos nanohíbridos son altamente estables y emisivos y, además, son capaces de formar complejos de exclusión ($n = 6$ y 7) con cromóforos tricíclicos básicos como AM y PY a través del portal de carbonilos libre del CB. En el caso de UC@CB[8], el AM desestabiliza la interacción entre CB[8] y UCNP debido a la formación de complejos de inclusión $\text{AM}_2\text{@CB}[8]$.

En el caso de los nanohíbridos UC@CB[n]@PY ($n = 6$ y 7) se ha observado la emisión de la PY tras la irradiación del nanohíbrido en el NIR debido a la transferencia de energía desde la UCNP a la PY. El nanosistema UC@CB[7]@AM ha resultado ser más eficiente en la producción de oxígeno singlete tras su irradiación a 980 nm.

Por tanto, los nanohíbridos UC@CB[n] pueden actuar como plataforma para la construcción de nanosistemas más complejos y como eficientes dadores de energía a cromóforos catiónicos. Teniendo en cuenta el interés de los cromóforos tricíclicos básicos en terapia fotodinámica, los sistemas UCNP@CB[7]@AM pueden ser de gran interés para este tipo de tratamientos.

6.4- Procedimiento experimental

6.4.1- Material

Los reactivos químicos usados para la síntesis de nanopartículas fueron: cloruros de lantánidos hexahidratados de pureza >99,9% ($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 1-octadeceno (95%), ácido oleico (99,9%), NaOH y NH_4F (99,99%). Todos ellos, los CB[n] y AM fueron usados sin purificación previa. La PY fue purificada mediante una doble recrystalización con etanol.

6.4.2- Síntesis de nanopartículas de NaYF_4 : Yb^{3+} , Er^{3+} recubiertas con oleato

Las UCNP@OA se sintetizaron mediante el mismo procedimiento que en capítulos anteriores.³²

6.4.3- Síntesis de nanopartículas de NaYF_4 : Yb^{3+} , Er^{3+} desnudas

Las UCNP desnudas se sintetizaron siguiendo un protocolo experimental descrito previamente y explicado en el Capítulo 5.³³

6.4.4- Síntesis de nanopartículas de NaYF_4 : Yb^{3+} , Er^{3+} derivatizadas con CB[n]

Se disolvieron 0,01 mmol del correspondiente CB[n] ($n=6, 7$ y 8) en 5 mL de agua MilliQ. Por otro lado, 30 mg de UCNP desnudas se sonicaron durante 15 minutos en 10 mL agua MilliQ hasta conseguir su total redispersión. Se añadió la disolución de CB[n] a la dispersión de UCNP desnudas y se agitó en la oscuridad durante 24 horas en un agitador orbital a 350 rpm. Las nanopartículas se precipitaron por centrifugación (10000 rpm, 10 min, 25°C) y se desechó el sobrenadante.

Con la finalidad de eliminar el exceso de CB[n], el precipitado se sonicó durante 10 minutos en 15 mL de agua seguido de su centrifugación (10000 rpm, 10 min, 25°C). En total se realizaron 5 ciclos sonicación/centrifugación con un volumen total de 30 mL de agua y 45 mL de acetonitrilo.

Finalmente, tras 24 h al vacío, las UC@CB[n] se redispersaron en agua MilliQ.

6.4.5- Modelos moleculares

Los modelos moleculares en 3D se construyeron con el software ChemBio 3D Ultra versión 12.0. y se optimizó la energía con el método MM2 incluido en este software.

6.5- Bibliografía

- (1) Kim, J.; Jung, I. S.; Kim, S. Y.; Lee, E.; Kang, J. K.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Kim, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 540.
- (2) Koner, A. L.; Nau, W. M. *Supramol. Chem.* **2007**, *19*, 55.
- (3) Ghale, G.; Nau, W. M. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2150.
- (4) Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844.
- (5) Choudhury, S. D.; Mohanty, J.; Pal, H.; Bhasikuttan, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1395.
- (6) Masson, E.; Ling, X.; Joseph, R.; Kyeremeh-Mensah, L.; Lu, X. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 1213.
- (7) Montes-Navajas, P.; Corma, A.; Garcia, H. *Chem. Phys. Chem.* **2008**, *9*, 713.
- (8) Tang, H.; Fuentealba, D.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; Kim, K.; Bohne, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20623.
- (9) Lü, J.; Lin, J.-X.; Cao, M.-N.; Cao, R. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 1334.
- (10) Chen, K.; Liang, L.-L.; Liu, H.-J.; Zhang, Y.-Q.; Xue, S.-F.; Tao, Z.; Xiao, X.; Zhu, Q.-J.; Lindoy, L. F.; Wei, G. *CrystEngComm* **2012**, *14*, 7994.
- (11) Gerasko, O. A.; Mainicheva, E. A.; Naumova, M. I.; Yurjeva, O. P.; Alberola, A.; Vicent, C.; Llusar, R.; Fedin, V. P. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, *2008*, 416.
- (12) Liang, L.-L.; Zhao, Y.; Chen, K.; Xiao, X.; Clegg, J.; Zhang, Y.-Q.; Tao, Z.; Xue, S.-F.; Zhu, Q.-J.; Wei, G. *Polymers* **2013**, *5*, 418.
- (13) Liang, L.-L.; Zhao, Y.; Zhang, Y.-Q.; Tao, Z.; Xue, S.-F.; Zhu, Q.-J.; Liu, J.-X. *CrystEngComm* **2013**, *15*, 3943.
- (14) Thuéry, P. *CrystEngComm* **2012**, *14*, 8128.
- (15) Kaser, S.; Biedermann, F.; Baumberg, J. J.; Scherman, O. A.; Mahajan, S. *Nano Lett.* **2012**, *12*, 5924.
- (16) Lanterna, A.; Pino, E.; Doménech-Carbo, A.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. *Nanoscale* **2014**, *6*, 9550.
- (17) Taylor, R. W.; Lee, T.-C.; Scherman, O. A.; Esteban, R.; Aizpurua, J.; Huang, F. M.; Baumberg, J. J.; Mahajan, S. *ACS Nano* **2011**, *5*, 3878.
- (18) Lu, X.; Masson, E. *Langmuir* **2011**, *27*, 3051.
- (19) Premkumar, T.; Lee, Y.; Geckeler, K. E. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 11563.
- (20) Cao, M.; Wu, D.; Gao, S.; Cao, R. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 12978.
- (21) Cao, M.; Lin, J.; Yanga, H.; Cao, R. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5088.
- (22) Gensch, T.; Braslavsky, S. E. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 101.
- (23) Menezes, P. F. C.; Bernal, C.; Imasato, H.; Bagnato, V. S.; Perussi, J. R. *Laser Phys.* **2007**, *17*, 468.
- (24) Tardivo, J. P.; Del Giglio, A.; de Oliveira, C. S.; Gabrielli, D. S.; Junqueira, H. C.; Tada, D. B.; Severino, D.; de Fátima Turchiello, R.; Baptista, M. S. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2005**, *2*, 175.
- (25) Obstoy, B.; Salaun, M.; Bohn, P.; Veresezan, L.; Sesboué, R.; Thiberville, L. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2016**, *15*, 109.
- (26) Lim, E. J.; Oak, C.-H.; Heo, J.; Kim, Y.-H. *Oncol. Rep.* **2013**, *30*, 856.

- (27) Fawcett, N. C.; Creed, D.; Thompson, R. L.; Presser, D. W. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 719.
- (28) Balraju, P.; Janu, Y.; Roy, M. S.; Sharma, G. D. In *AIP Conf. Proc.* 2016; Vol. 135, p 1004.
- (29) Junqueira, H. C.; Severino, D.; Dias, L. G.; Gugliotti, M. S.; Baptista, M. S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4*, 2320.
- (30) Lee, J. W.; Samal, S.; Selvapalam, N.; Kim, H.-J.; Kim, K. *Acc. Chem. Res.* **2003**, 621.
- (31) M, L.; P, J.; Paula, A.; Severino, D.; Regina, M.; de Oliveir, H. P. M., *Phenothiazinium Dyes as Photosensitizers (PS) in Photodynamic Therapy (PDT): Spectroscopic Properties and Photochemical Mechanisms In Advanced Aspects of Spectroscopy* 2012, p 693.
- (32) Li, Z.; Zhang, Y. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 345606.
- (33) Bogdan, N.; Vetrone, F.; Ozin, G. A.; Capobianco, J. A. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 835

***Capítulo 7- Síntesis de UCNP decoradas con
nanopartículas de $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbBr}_3$***

7.1- Introducción

La combinación de diferentes tipos de nanomateriales es una herramienta útil para la creación de nanohíbridos con propiedades excepcionales. No obstante, el ensamblaje de los nanomateriales requiere un alto control en la síntesis, manipulación y caracterización de los nanomateriales. A día de hoy se han sintetizado nanohíbridos combinando UCNP con nanopartículas inorgánicas¹ como quantum dots,²⁻⁸ nanopartículas metálicas⁹⁻²⁵ y magnetitas.²⁶

En los últimos años, las nanopartículas de perovskitas de haluro organometálicas han alcanzado gran interés por su aplicabilidad en el campo de celdas fotovoltaicas²⁷⁻³¹ y dispositivos emisores de luz (LED).³²⁻³⁶ Son especialmente interesantes las de fórmula general AMX_3 , donde A es un catión orgánico de amonio, como metilamonio o etilamonio, M es el ión metálico (Pb, Sn...), y X es un halógeno. Estas nanopartículas poseen unas propiedades ópticas únicas, tales como bandas de absorción anchas, un elevado coeficiente de absorción molar y bandas de emisión estrechas.^{37,38} Además, presentan propiedades excitónicas^{39,40} y conductividad eléctrica.^{41,42}

Existe un gran número de UCNP funcionalizadas con diferentes fluoróforos orgánicos,⁴³⁻⁴⁶ pero su combinación con nanopartículas luminiscentes se limita a *quantum dots* de $CdSe$ ²⁻⁸ o *carbon dots*.⁴⁷ A diferencia de los QD, las nanopartículas de perovskita $CH_3NH_3PbBr_3$ (PK) se pueden sintetizar en condiciones muy suaves y tienen altos rendimientos cuánticos de luminiscencia y alta fotoestabilidad en aire sin necesidad de cubrirlas con una capa inorgánica.⁴⁸⁻⁵¹

El objetivo de este capítulo es lograr el ensamblaje de dos tipos de nanopartículas luminiscentes, UCNP y PK, con la finalidad de conseguir una transferencia eficiente de energía entre ellas. Esto requiere por un lado una unión efectiva entre los dos tipos de NP y por otro lado que no se vean afectadas las propiedades emisivas tanto del dador como del aceptor.

A lo largo del capítulo se describirán dos estrategias para conseguir la unión entre UCNP y PK. La primera de ellas es muy habitual en este campo y se basa en la interdigitación de los ligandos debido a interacciones hidrofóbicas.⁴ La segunda de ellas, es una técnica novedosa, en la que se usa CB[7] como agente de unión de las dos nanopartículas. Como se vió en el capítulo anterior, los CB[n] (n=6-8) son capaces de adsorberse gracias a la coordinación entre los carbonilos y los Ln³⁺ en la superficie de las UCNP, quedando un portal de carbonilos libre, capaz de interactuar con cationes.^{52,53}

Se demostrará que el CB[7] es capaz de pegar las PK a la superficie de las UCNP, lo que permite una transferencia de energía no trivial desde las UCNP a las PK tras la excitación en el NIR. Además, se usará un microscopio confocal de barrido con láser multifotónico como técnica para evaluar la eficacia de las estrategias de ensamblaje de ambas nanopartículas.

7.2- Resultados y discusión

7.2.1- Preparación y caracterización de los nanohíbridos Upconversion-Perovskita

Para este estudio se usaron las UCNP de NaYF₄: Yb³⁺, Tm³⁺ (UC) con la finalidad de maximizar el solapamiento de la emisión UC (<500 nm) y de la absorción de las CH₃NH₃PbBr₃ (PK) y evitar así el solapamiento entre sus bandas de emisión.

En primer lugar, se sintetizaron las UC recubiertas con oleato (UC_{OA}) de manera análoga a la de los anteriores capítulos, pero reemplazando el ErCl₃ por TmCl₃. Los detalles de la síntesis están descritos en el apartado de procedimiento experimental. Las imágenes de TEM (Figura 7.1) muestran que las UC_{OA} son prismas hexagonales de tamaño (27,8 ± 1,6) x (18,1 ± 1,4) nm. El XRD (Figura 7.2) y el análisis EDX (Figura 7.3) determinaron que las UC_{OA} son de fase hexagonal y de composición NaYF₄: Yb³⁺ (22%), Tm³⁺ (1%).

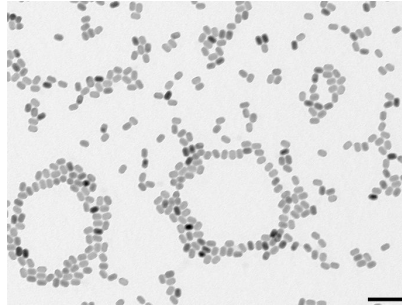


Figura 7.1. Imagen TEM de las UC_{O_A}. Barra de escala: 100 nm.

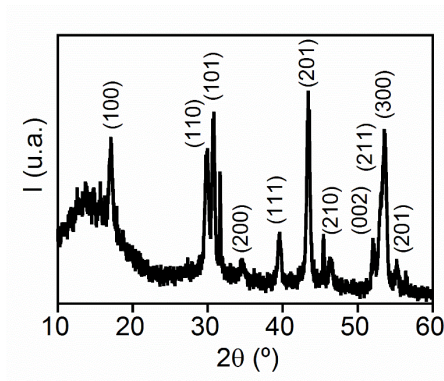


Figura 7.2. Espectro de XRD de las UC_{O_A}.

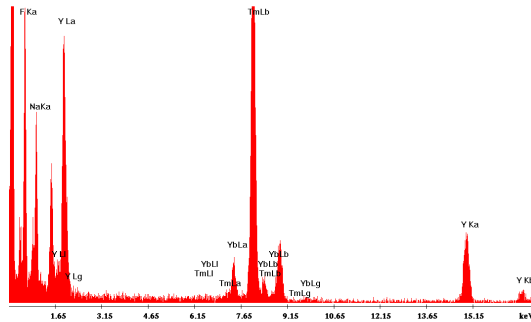


Figura 7.3. Análisis EDX de las nanopartículas NaYF₄: Yb³⁺(22%), Tm³⁺(1%).

Parte de las UC@OA se desnudaron mediante acidificación con HCl para obtener UC_n,⁵⁴ mientras que el resto se usó para el ensamblaje de UC y PK por el método de interdigitación.

7.2.1.1- Preparación y caracterización del nanohíbrido UC_n@PK_{CB}.

El primer intento de síntesis del nanohíbrido se llevó a cabo mediante la adición de una dispersión de UC_n a una dispersión de perovskitas recubiertas con CB[7] (PK_{CB}), véase la Figura 7.4.

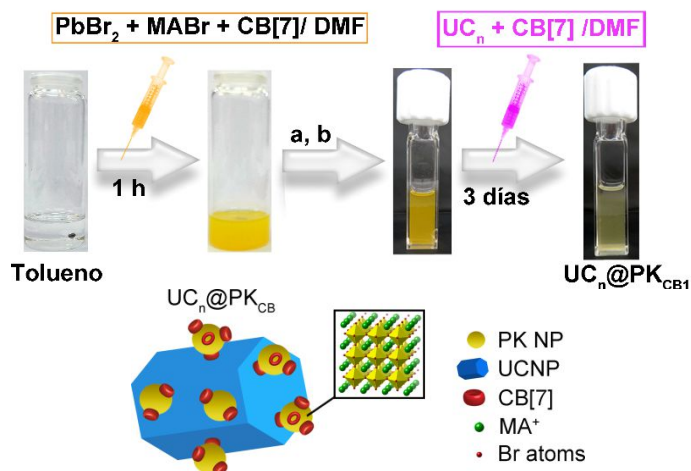


Figura 7.4. Esquema de preparación de nanohíbridos UC_n@PK_{CB1} e interacción propuesta para los nanohíbridos UC_n@PK_{CB}. a) centrifugación y separación del precipitado y b) redispersión del precipitado en tolueno.

La síntesis de PK_{CB} se llevó a cabo mediante el método de inyección en disolvente. Básicamente, se inyectaron 200 μL de una disolución de DMF que contenía CB[7], bromuro de metilamonio (MABr) y PbBr₂ (relación molar MABr/PbBr₂ 2:1 y PbBr₂ /CB[7] 14.3:1.0) en 5 mL de tolueno. Inmediatamente después de la inyección se observó un cambio de coloración de incoloro a naranja (Figura 7.4), indicando la formación de perovskitas. Éstas mostraron poca dispersabilidad, lo cual indicaba una baja eficiencia en la formación de la perovskita como nanopartícula.

A pesar de esto, se midieron los espectros de absorción y emisión (Figura 7.5), donde se observaba una emisión muy pequeña con un máximo en 538 nm (rendimientos cuánticos no medibles).

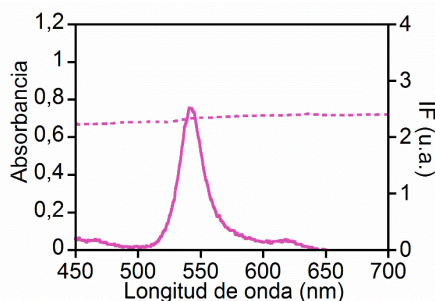


Figura 7.5. Espectro de absorción (--) y de emisión (—) de la PK_{CB} en tolueno (λ_{exc} = 350 nm).

Aun así, y teniendo en cuenta la gran flexibilidad estructural que poseen las perovskitas, se añadió UC_n a esta dispersión naranja. Tras la adición de las UC_n no se observó ningún cambio en el color de la dispersión, pero el coloide cambió a un color amarillento después de un tiempo de agitación prolongado (3 días) en presencia de un exceso de CB[7] (Figura 7.4 y Figura 7.6). Estos resultados sugerían la formación del nanohíbrido UC_n@PK_{CB1}, no obstante, su emisión (λ_{exc} = 350 nm) era muy baja, con rendimientos cuánticos del 5% (Tabla 7.1).

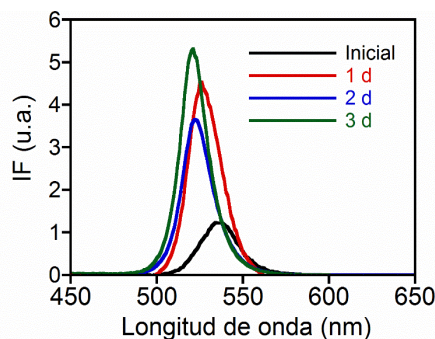


Figura 7.6. Evolución del espectro de emisión de las PK_{CB} después de la adición de UC_n (inicial) y tras la agitación durante 1, 2 y 3 días (1d, 2d y 3d, respectivamente) en presencia de un exceso de CB[7].

Con el objetivo de mejorar las propiedades emisivias del nanohíbrido, se siguió la misma estrategia pero añadiendo bromuro de adamantilamonio (ADABr) a la disolución precursora de perovskitas, obteniendo el nanohíbrido UC_n@PK_{CB2}.

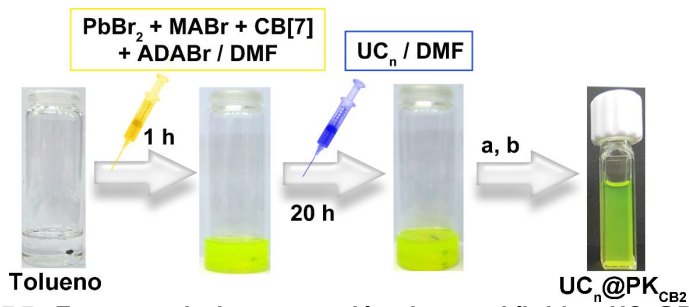


Figura 7.7. Esquema de la preparación de nanohíbridos $\text{UC}_n@PK_{CB2}$. a) Decantación y separación del precipitado y b) redispersión del precipitado en tolueno.

La Figura 7.7 muestra el procedimiento seguido en la preparación de $\text{UC}_n@PK_{CB2}$. Brevemente, a una disolución de MABr, ADABr, CB[7] y PbBr_2 se añadieron las UC_n y se agitó a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 20 h. El nanohíbrido resultante se precipitó por decantación durante una noche.

	PK_{CB}	$\text{UC}_n@PK_{CB1}$	$\text{UC}_n@PK_{CB2}$	PK_{OCA}	$\text{UC}_{OA}@PK_{OCA}$
λ_{em} (nm)	538	523	525	527	529
ATMM (nm)	26	22	18	25	24
τ_{av} (ns)	---	319	1303.2	545.5	865.7
Φ_F	---	0,05	0,13	0,71	0,69
τ_1 (ns)	---	30.0	68.5	33.7	29.6
(A ₁ %)	---	(67,5)	(62,2)	(69,3)	(79,9)
τ_2 (ns)	---	164,2	402,5	203,1	228,0
(A ₂ %)	---	(27,1)	(28,7)	(25,1)	(16,7)
τ_3 (ns)	---	670,5	2120,1	1054,3	1664,9
(A ₃ %)	---	(5,4)	(9,1)	(5,5)	(3,3)

Tabla 7.1. Comparación de los datos de fotoluminiscencia de PK_{CB} , $\text{UC}_n@PK_{CB}$, PK_{OCA} y $\text{UC}_{OA}@PK_{OCA}$ en tolueno. Las contribuciones (A_i) están en paréntesis.

La Figura 7.8 muestra una imagen TEM representativa del nanohíbrido $\text{UC}_n@PK_{CB2}$, donde se observa claramente la presencia de nanopartículas de perovskitas de tamaño $4,3 \pm 1,4$ nm

alrededor de la superficie de las UC_n. Cabe destacar que no se observó la presencia de perovskitas *bulk* o de perovskitas embebidas en placas. La obtención de imágenes de HRTEM de alta resolución no fue posible debido a la descomposición de las perovskitas provocada por el haz de electrones, tal y como se ha demostrado publicaciones anteriores.⁵⁵⁻⁵⁹

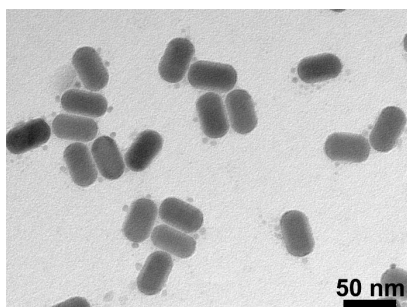


Figura 7.8. Imagen TEM del nanohíbrido UC_n@PK_{CB2}.

En cuanto a las propiedades fotofísicas (Tabla 7.1 y Figura 7.9) del nanohíbrido UC_n@PK_{CB2}, el espectro de absorción verifica la presencia de los dos tipos de NPs. Se aprecia un máximo de absorción en 520 nm correspondiente a las PK así como la dispersión causada por la presencia de las UCs.

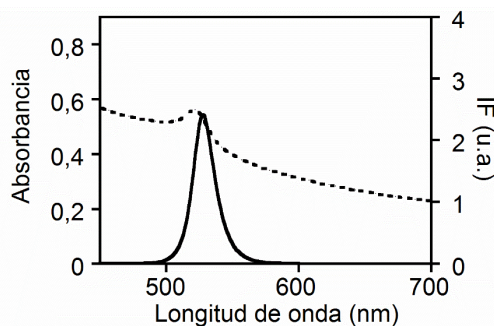


Figura 7.9. A) Espectro de absorción (--) y espectro de emisión (—) a $\lambda_{exc} = 350$ nm de UC_n@PK_{CB2}. B) Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 980$ nm) de UC_n (--) y de UC_n@PK_{CB2} (—).

Además, la emisión a λ_{exc} de 350 nm mostró una banda muy estrecha, con una ATMM de 18 nm, y con un máximo en 525 nm. El rendimiento cuántico de emisión (Φ_F) en el nanohíbrido UC_n@PK_{CB2} (13%) fue bastante más alto que en el nanohíbrido

UC_n@PK_{CB1} (5%). Eso sugiere que el ADABr tiene un papel beneficioso en la cristalización de la perovskita sobre la superficie de las UC_n.

Para comprobar la presencia del CB[7] como elemento de unión entre las dos nanopartículas, se realizó el espectro FTIR (Figura 7.10). Tal y como se comentó en el capítulo anterior el CB[7] tiene una banda intensa en 1710 cm⁻¹ correspondiente a la vibración de estiramiento de los grupos carbonilos (ν_{as} = C=O)). En el caso del nanohíbrido UC_n@PK_{CB2}, esta banda se desplaza a 1734 cm⁻¹, debido a la interacción con las nanopartículas.⁵²

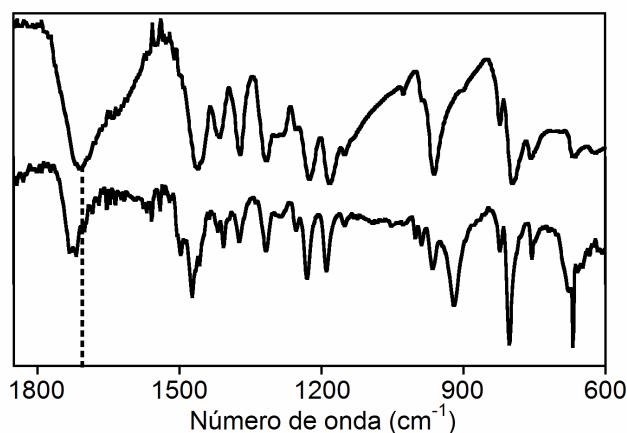


Figura 7.10. Espectro FTIR del CB[7] (arriba) y de UC_n@PK_{CB2} (abajo).

Las PK son materiales muy sensibles al entorno, especialmente al cambio de disolvente. La disolución de las PK en disolventes como DMSO, DMF o acetona, entre otros, revierte las PK a sus precursores, lo que destruye las PK observándose la pérdida de coloración de la disolución.

El espectro de ¹H-RMN del nanohíbrido UC_n@PK_{CB2} en DMSO corresponde a los compuestos orgánicos que formaban parte de la nanopartícula de perovskita (Figura 7.11). Sin embargo, no se observaron las señales correspondientes al ADABr. Esto indica que el ADABr no formaba parte de la nanopartícula pasivada, pero que juega un papel muy importante en la cristalización de las

PK sobre la superficie de las UC_n, obteniéndose PK más luminiscentes (Tabla 7.1 y Figura 7.11).

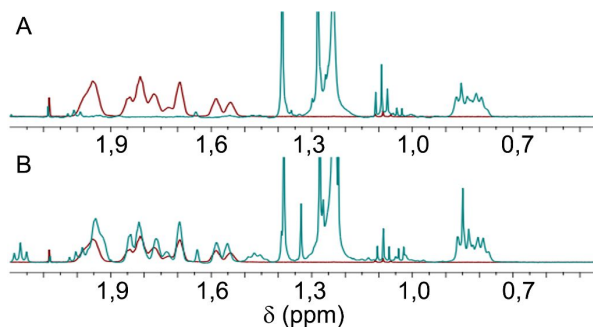


Figura 7.11. Espectro de ¹H-RMN en DMSO de A) ADABr (línea roja) y UC_n@PK_{CB2} (línea azul) y B) ADABr (línea roja) y sobrenadante de la síntesis de UC_n@PK_{CB2} (línea azul).

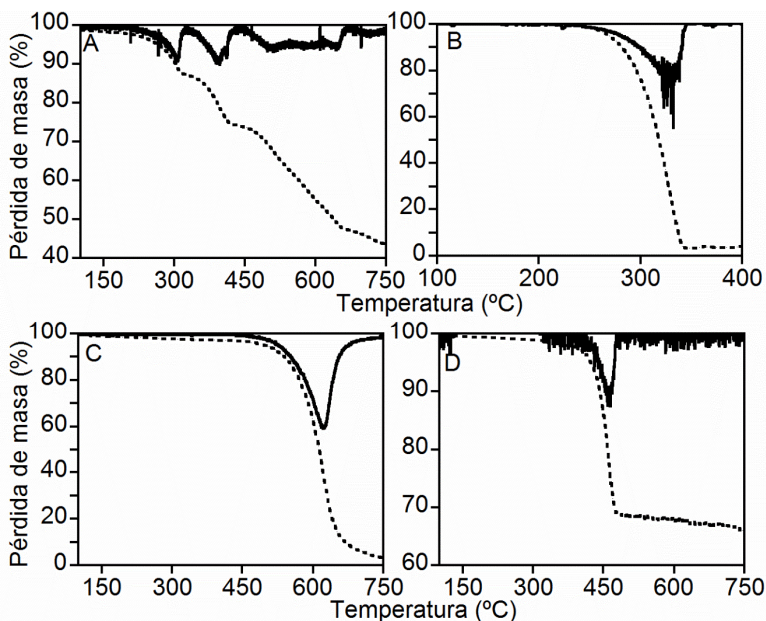


Figura 7.12. Curva de TGA (--) y primera derivada (—) de: A) UC_n@PK_{CB2}, B) MABr, C) PbBr₂ y D) UCNP@CB[7].

El espectro de TGA del nanohíbrido UC_n@PK_{CB2} (Figura 7.12A) confirma la presencia de CB[7] en el nanohíbrido. Se aprecian tres pérdidas de peso importantes, una del 18% antes de los 304°C, otra del 12% a 390°C y la última del 30% entre 500 y

650°C. El pico de la primera derivada de las curvas correspondientes a MABr, UCNP@CB[7] y PbBr₂ se encuentra a 335°C, 460°C y 625°C, respectivamente. Por tanto, estos componentes en el nanohíbrido se subliman a temperaturas inferiores. Además, se observa que alrededor de un 40% de la masa no se descompone/sublima a temperaturas superiores a 800°C, lo que es típico de las nanopartículas de upconversion.⁵²

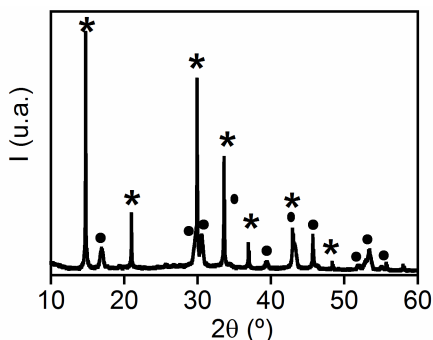


Figura 7.13. Espectro XRD del nanohíbrido UC_n@PK_{CB2}. Los picos de difracción correspondientes a las perovskitas están marcados con un asterisco y los correspondientes a las upconversion con un punto.

Con la finalidad de comprobar la presencia de los dos tipos de nanopartículas, se registró el espectro de XRD del nanohíbrido UC_n@PK_{CB2}. La Figura 7.13 muestra los picos de difracción característicos de las nanopartículas CH₃NH₃PbBr₃⁴⁸ que no se solapan con los de las UC hexagonales, siendo los más intensos los correspondientes a los planos (001) en 14.9°, (011) en 21.1°, (002) en 30.1°, (021) en 33.7° y (211) en 37.1°.

7.2.1.2- Preparación y caracterización del nanohíbrido UC_{OCA}@PK_{OCA}

La otra estrategia que se siguió para la obtención de un nanohíbrido entre PK y UC fue mediante la interdigitación de las cadenas hidrofóbicas de sus ligandos (Figura 7.14).

Para ello, primero se sintetizaron perovskitas estabilizadas con octilamonio (PK_{OCA}) de tamaño medio 5,7 ± 2,2 nm mediante un procedimiento descrito previamente en la literatura.⁴⁹ Estas nanopartículas presentan un máximo de absorción en 525 nm y un máximo de emisión en 527 nm tras su excitación a 350 nm (Figura

7.15 y Tabla 7.1). Las PK_{OCA} presentaron un rendimiento cuántico de fluorescencia del 71%.

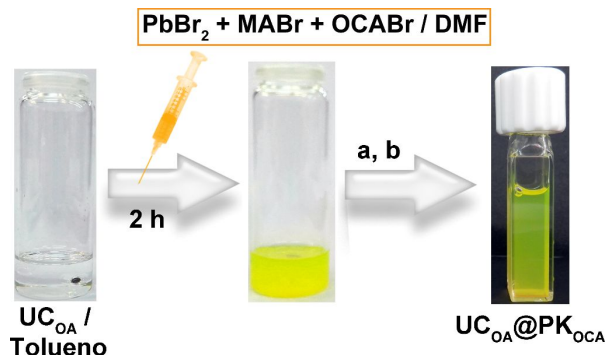


Figura 7.14. Esquema de la síntesis del nanohíbrido UC_{OA}@PK_{OCA}. a) decantación y separación del precipitado y b) redispersión del precipitado en tolueno.

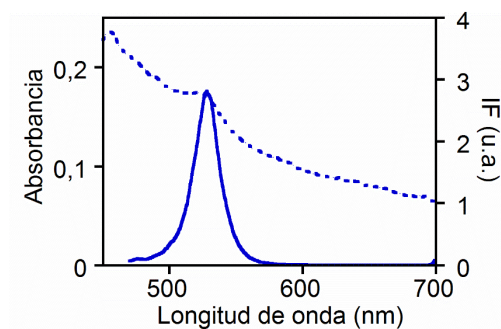


Figura 7.15- Espectro de absorción (---) y de emisión (—) a $\lambda_{exc} = 350$ nm de las PK_{OCA}.

Se realizaron varios intentos de interdigitación entre los ligandos de octilamonio y oleato a través de la agitación de las PK_{OCA} con las UC_{OA} en tolueno, pero en ninguno de ellos se logró obtener el nanohíbrido UC_{OA}@PK_{OCA}.

Por lo tanto, se modificó el procedimiento revirtiendo las PK_{OCA} a sus precursores mediante la disolución de la perovskita en DMF, lo que producía un cambio de color de la disolución de amarillo a incolora. Posteriormente, se añadía esta disolución de precursores gota a gota a una disolución de UC_{OA}, lo que inducía la cristalización de las PK_{OCA} sobre la superficie de las UC_{OA}.

Para ello, unos μL de la disolución anterior en DMF se añadieron gota a gota a una dispersión de UC_{OA} en tolueno, obteniendo una mezcla de color amarillo. De esta dispersión se obtuvo un precipitado por decantación durante una noche. La Figura 7.16 muestra una imagen representativa de TEM del precipitado y confirma la formación del nanohíbrido $\text{UC}_{\text{OA}}@\text{PK}_{\text{OCA}}$ via interdigitación del octilamonio con el oleato que recubre las UC_{OA} seguido inmediatamente de una cristalización de las PK_{OCA} en la superficie de las UC_{OA} . El tamaño de las PK_{OCA} en el nanohíbrido $\text{UC}_{\text{OA}}@\text{PK}_{\text{OCA}}$ fue de $4,6 \pm 1,7 \text{ nm}$.

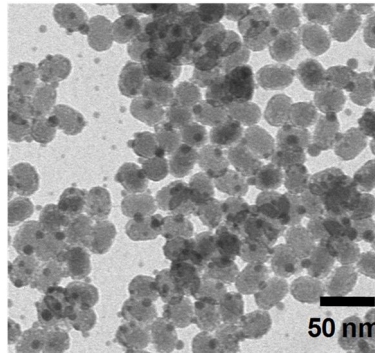


Figura 7.16. Imagen representativa de TEM del nanohíbrido $\text{UC}_{\text{OA}}@\text{PK}_{\text{OCA}}$.

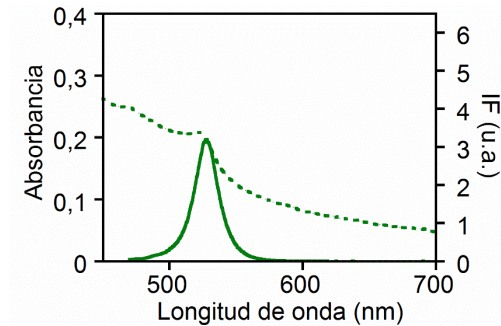


Figura 7.17. Espectro de absorción (--) y de emisión (—) a $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ de las $\text{UC}_{\text{OA}}@\text{PK}_{\text{OCA}}$.

La fotoluminiscencia en estado estacionario a $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ aportó información sobre el comportamiento óptico de las PK_{OCA} en el nanohíbrido $\text{UC}_{\text{OA}}@\text{PK}_{\text{OCA}}$. Las perovskitas presentaban una banda de emisión estrecha (FWHM = 24 nm) con un máximo en 529 nm y un rendimiento cuántico del 69% (Figura 7.17 y Tabla 7.1).

7.2.2- Estudio comparativo de la eficacia de las estrategias

Para determinar la eficacia de cada una de las estrategias, las muestras se excitaron en el NIR y se registraron sus espectros de emisión con la finalidad de evaluar la transferencia de energía desde la UC a la PK. Se comparó la emisión de las UC_n con la del nanohíbrido UC_n@PK_{CB} (Figura 7.18) y la de las UC_{OA} con la del nanohíbrido UC_{OA}@PK_{OCA} (Figura 7.19), todos los espectros fueron medidos en *front face*.

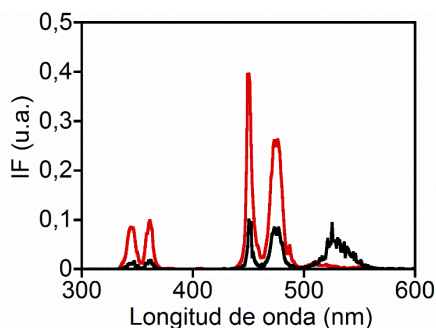


Figura 7.18. Espectro de emisión ($\lambda_{exc} = 975$ nm) de UC_n (línea roja) y del nanohíbrido UC_n@PK_{CB} (línea negra) en DMF:tolueno (0.025:1).

El espectro de UC_n muestra cuatro bandas de emisión características del Tm³⁺ entre 300 y 500 nm, correspondientes a las transiciones $^1I_6 \rightarrow ^3F_4$ (345 nm), $^1D_2 \rightarrow ^3H_6$ (368 nm), $^1D_2 \rightarrow ^3F_4$ (450 nm) and $^1G_4 \rightarrow ^3H_6$ (475 nm).¹ Para simplificar la discusión, las bandas a 650, 700 y 800 nm no se muestran ya que no se observan cambios en ellas.

Si comparamos el espectro de absorción de las PK_{OCA} con el de emisión de las UC, podemos ver que existe un solapamiento de los dos espectros por debajo de 500 nm. La excitación en el NIR del nanohíbrido UC_n@PK_{CB2} muestra una disminución de la emisión por debajo de 500 nm del 75% respecto a las UC_n. La aparición de una nueva banda de emisión con un máximo cerca de 525 nm, que coincide con la emisión de la PK (Figura 7.9), sugería la transferencia de energía desde las UC a las PK tras la excitación en el NIR. Además, como experimento control se excitaron las PK a 975 nm sin observar ninguna emisión, confirmando así que la

nueva banda de emisión correspondía a la transferencia de energía desde UC_n a PK_{CB} y no a la excitación bifotónica directa de las PK_{CB}.

Para poder evaluar la eficiencia de la transferencia de energía se tuvieron en cuenta dos condiciones experimentales importantes: i) las concentraciones de las dos muestras, UC_n y UC_n@PK_{CB2}, fueron idénticas y ii) la excitación fue en *front face* y en cubetas triangulares. A partir de los espectros obtenidos de esta manera, se estimó la transferencia de energía usando la siguiente ecuación:

$$E(\%) = \frac{I_{PK}}{(I_0 - I)_{UC} \Phi_{PK}} \cdot 100$$

donde I_{PK} es el área bajo la curva de la emisión PK en el espectro de emisión del nanohíbrido (500-560 nm); Φ_{PK} es el rendimiento cuántico de la PK en el nanohíbrido UC_n@PK_{CB2} (Tabla 7.1); (I₀)_{UC} es el área bajo la curva entre 300 y 500 nm del espectro de emisión de las UC_n y I_{UC} del nanohíbrido UC_n@PK_{CB2}. De este modo, se estimó una eficiencia de transferencia de energía desde la UC a la PK cercana al 100%.

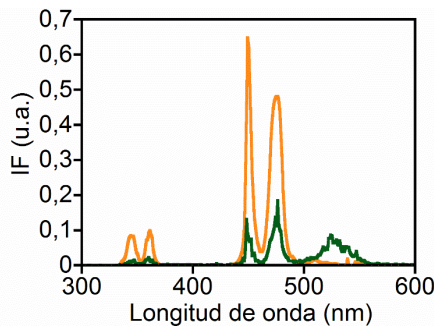


Figura 7.19. Espectro de emisión ($\lambda_{exc} = 975 \text{ nm}$) de UC_{OA} (línea naranja) y del nanohíbrido UC_{OA}@PK_{OCA} (línea verde) en tolueno.

Para el caso del nanohíbrido UC_{OA}@PK_{OCA}, los espectros de emisión tras la excitación en el NIR se muestran en la Figura 7.19. Se observó una desactivación de la emisión del 66% a longitudes de onda menores de 500 nm y la emisión del material de perovskita sobre 530 nm, confirmando así la transferencia de energía desde las UC_{OA} a las PK_{OCA}. De manera análoga, se

hicieron cálculos de eficiencia de transferencia de energía para el nanohíbrido UC_{OA}@PK_{OCA}, obteniéndose una eficacia del 26%.

7.2.3- Microscopía confocal como herramienta para la visualización del ensamblaje

Se planteó el uso de un microscopio confocal para visualizar la eficacia del ensamblaje entre la UC y la PK, así como para corroborar que la transferencia de energía desde la UC a la PK ocurre a través de interacciones dipolo-dipolo y no via un proceso de reabsorción trivial de la emisión.

Las muestras se prepararon mediante la deposición de una gota de una dispersión en tolueno o agua del correspondiente nanohíbrido en un portaobjetos de vidrio para microscopio de 25x75 mm. Se dejó evaporar el disolvente y después se cubrió la muestra cubreobjetos de 22x22 mm.

Los experimentos se llevaron a cabo en un microscopio confocal de barrido láser, equipado con un láser multifotónico con un pulso de 100 fs y una potencia de excitación de $950 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-1}$ a una $\lambda_{\text{exc}} = 975 \text{ nm}$. La densidad de potencia de excitación se determinó con un spot focalizado de $1 \mu\text{m}$ de radio. Las imágenes se adquirieron mediante un objetivo de inmersión de $25 \times 1,05 \text{ NA}$ y filtros de emisión entre 420 y 500 nm y un tiempo de permanencia de $2 \mu\text{s} \cdot \text{pixel}^{-1}$.

En estas condiciones, las imágenes de agregados de nanopartículas mostraban una cola de emisión en la dirección del barrido (Figura 7.20). Esta cola desaparecía al incrementar el tiempo de permanencia a $40 \mu\text{s} \cdot \text{pixel}^{-1}$, por tanto, la cola se podía atribuir a la desaparición de la emisión tras el paso del haz sobre los agregados. Este comportamiento de las UC había sido descrito previamente.^{60,61}

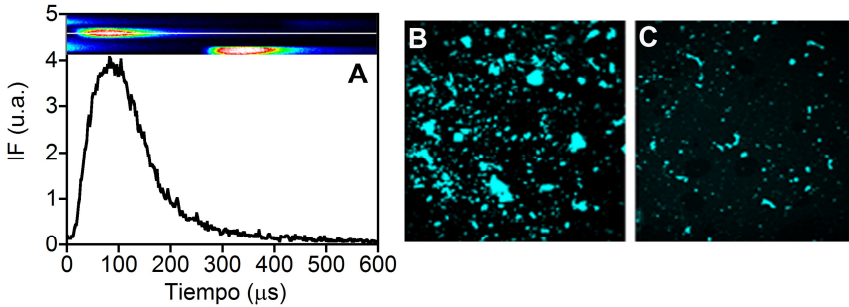


Figura 7.20. A) Perfil de intensidad de las UC_n obtenido a partir de la línea blanca trazada sobre la emisión de un agregado tras la excitación a 975 nm y un tiempo de permanencia de 2 μs·pixel⁻¹. Imágenes de las UC_n (B) y de las UC_{OA} (C) con un tiempo de permanencia de 40 μs·pixel⁻¹.

Generalmente, las nanopartículas con tiempos de vida de emisión largos son problemáticas para la obtención de imágenes en microscopía confocal a tiempos de permanencia cortos, debido a la pérdida de resolución en la dirección del barrido. No obstante, con estas imágenes se puede obtener información sobre la variación de la emisión con el tiempo.

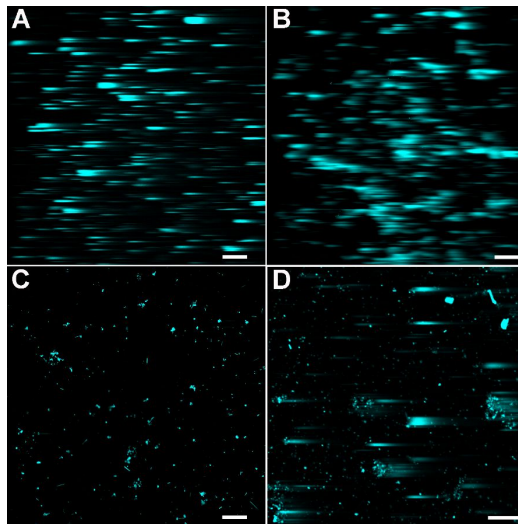


Figura 7.21. Imagen confocal a $\lambda_{exc} = 975$ nm y un tiempo de permanencia de 2 μs·pixel⁻¹ de A) UC_n, B) UC_{OA}, C) UC_n@PK_{CB2} y D) UC_{OA}@PK_{OA}.

Por lo tanto, a partir del perfil de intensidad obtenido del trazado de una línea en la dirección de barrido sobre la imagen de

un agregado, se pueden obtener las curvas de desactivación de la luminiscencia (Figura 7.20). Esto es posible, tras convertir las distancias medidas en pixels en la escala de tiempo usando el valor del tiempo de permanencia.

Si comparamos las imágenes obtenidas para UC_n, UC_{OA}, UC_n@PK_{CB2} y UC_{OA}@PK_{OCA} (Figura 7.21), se observan claras diferencias en los tiempos de vida. El tiempo de vida disminuyó drásticamente para el nanohíbrido UC_n@PK_{CB2} con respecto a UC_n en casi todos los agregados. Sin embargo, en el caso de UC_{OA}@PK_{OCA}, no todos los agregados fueron desactivados de manera homogénea.

Los perfiles cinéticos de las UC muestran las fases de aparición y desaparición características de las upconversion (Figura 7.22). Los tiempos de desaparición (τ_d) se determinaron mediante el ajuste de los datos a los procesos de sensibilización (aparición) y posterior desaparición del estado excitado del Tm³⁺ (desaparición).

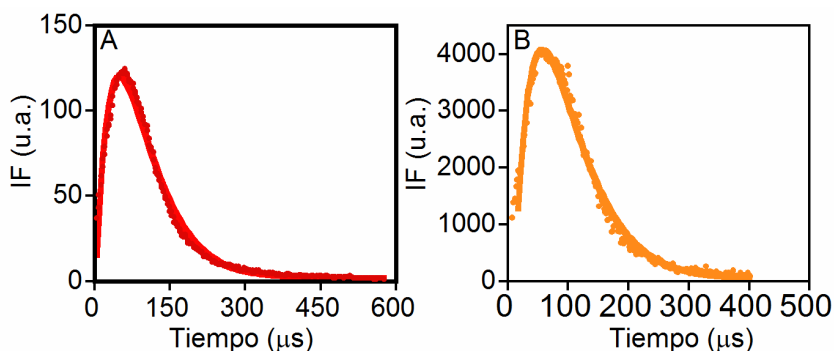


Figura 7.22. Ajuste de las cinéticas de emisión ($\lambda_{exc} = 975 \text{ nm}$) de: A) UC_n y B) UC_{OA}@PK_{OCA}.

De este modo, se obtuvo un valor de $53 \pm 2 \mu\text{s}$ para el tiempo de desaparición (Tabla 7.2).

En cuanto al tiempo de vida del Tm³⁺ en el nanohíbrido UC_n@PK_{CB2} fue difícil de medir con este equipo debido a la drástica disminución (se estimó un tiempo de desaparición de $1,4 \mu\text{s}$). El uso de esta técnica permitió afirmar que el ensamblaje en UC_n@PK_{CB2} era muy homogéneo, que existía una transferencia de energía no

radiativa desde la UC a la PK tras la excitación en el NIR y que este proceso era muy eficiente.

Cinética	τ_d (μ s)	R ²
1	49,9	0,990
2	55,9	0,987
3	52,0	0,981
Media	53 ± 2	

Tabla 7.2. Tiempos de vida de las UC_n obtenidos tras el ajuste de las cinéticas.

Los estudios análogos para el nanohíbrido UC_{OA}@PK_{OCA} (Tabla 7.3 y Figura 7.21), mostraron diferentes valores para la desaparición del Tm³⁺ dependiendo del agregado, observándose valores de 47 ± 9 μ s para aquellos en los que se apreciaba cola y menores de 2 μ s en los que no se apreciaba. Esto demostró menor homogeneidad de la muestra.

Cinética	UC _{OA}		UC _{OA} @PK _{OCA}	
	τ_d (μ s)	R ²	τ_d (μ s)	R ²
1	53,8	0,980	55,7	0,995
2	46,6	0,993	41,6	0,995
3	57,8	0,967	46,0	0,988
Media	53 ± 5		47 ± 9	

Tabla 7.3. Tiempos de vida de UC_{OA} y UC_{OA}@PK_{OCA} obtenidos tras el ajuste de las cinéticas.

Con el objetivo de evaluar la fiabilidad de este método para medidas de luminiscencia resuelta en el tiempo de UCNP, se realizaron medidas con nanopartículas de NaYF₄: Yb, Er desnudas y recubiertas con oleato que previamente se habían medido con un espectrofluorímetro equipado con un láser de 975 nm.⁶² Los valores obtenidos por este método se ajustaban bastante bien a los obtenidos con el espectrofluorímetro. Las pequeñas variaciones observadas se asignaron a las diferencias en la preparación de la muestra, ya que el espectrofluorímetro registra los espectros de las

UCNP en dispersión, mientras que con el confocal se registran en sólido.

Por tanto, se demostró la utilidad del microscopio confocal convencional para las medidas de tiempos de fluorescencia de UCNP con una sensibilidad de decenas de microsegundos. Como la escala de tiempo está directamente relacionada con el tiempo de permanencia del equipo, la única manera de mejorar la resolución es usando equipos que hagan el barrido más rápido, es decir, que tengan tiempos de permanencia más cortos.⁶³

7.2.4- Evaluación de la fotoestabilidad de los nanohíbridos

Finalmente, se evaluó la fotoestabilidad del nanohíbrido que mostró mayor eficiencia en la transferencia de energía, esto es el UC_n@PK_{CB2}.

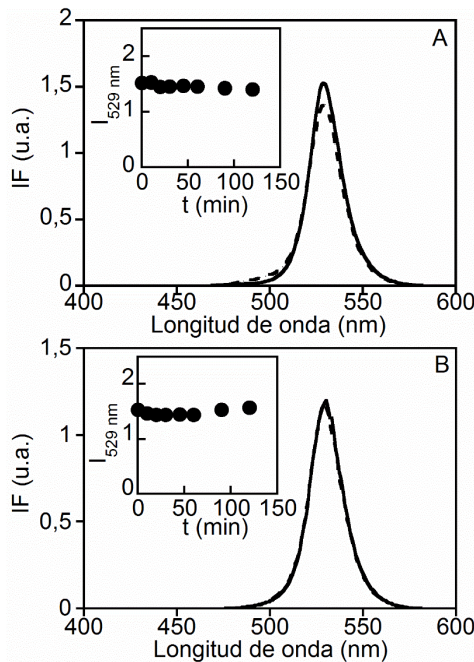


Figura 7.23. Comparación del espectro de emisión de una dispersión en tolueno del nanohíbrido UC_n@PK_{CB2} antes y después de 120 minutos de irradiación a: A) $\lambda_{exc} = 975 \text{ nm}$ B) $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$. Inserción: Evolución del máximo de emisión con el tiempo.

Se registró la intensidad de emisión de la PK a 529 nm de una dispersión en tolueno del nanohíbrido irradiada a 350 nm (excitación PK) y a 975 nm (excitación UC) en aire durante 120 minutos.

Los resultados se muestran en la Figura 7.23, donde se aprecia que tras 120 minutos de irradiación en el UV no se perdió luminiscencia de la PK, mientras que tras la excitación en el NIR se observa una disminución de un 10% de luminiscencia. Consecuentemente, se puede decir que el nanohíbrido UC_n@PK_{CB2} resultó ser muy fotoestable en ambos casos.

7.3- Conclusiones

Se ha demostrado la preparación eficaz de un nuevo nanohíbrido consistente en nanopartículas de UC y PK. La estrategia usada se basa en la capacidad del CB[7] para anclarse a la superficie de los dos tipos de nanopartículas a través de los portales de carbonilos. Así las UC y las PK quedan unidas firmemente y muy próximas, permitiendo así una transferencia de energía desde las UC a las PK de aproximadamente 100% tras la excitación del nanohíbrido a 975 nm.

Además, un microscopio multifotón confocal comercial permitió determinar tanto los tiempos de vida de fluorescencia de las UC como la homogeneidad de la muestra.

El nanohíbrido UC_n@PK_{CB2} mostró ser altamente fotoestable tras irradiación a 350 nm y 980 nm durante 2 horas. Por lo tanto, los nanohíbridos UC_n@PK_{CB2} resultan ser de especial interés para la aplicación en celdas fotovoltaicas y para dispositivos luminiscentes.

7.4- Procedimiento experimental

7.4.1- Material

Para la síntesis de las UCNP se usaron los siguientes reactivos: cloruros de lantánidos hexahidratados de pureza >99,9% (YCl₃·6H₂O, YbCl₃·6H₂O y TmCl₃·6H₂O), 1-octadeceno (95%),

ácido oleico (99,9%), NaOH y NH₄F (99,99%). Para la síntesis de las perovskitas se necesitaron bromuro de octilamonio, bromuro de metilamonio, bromuro de plomo (II), CB[7], bromuro de adamantilamonio y tolueno (grado analítico). Todas las sales de bromuro de organoamonio se sintetizaron por reacción con la correspondiente amina en H₂O/HBr tal y como se ha descrito anteriormente.⁶⁴ El resto de reactivos se usaron tal y como se recibieron. El tolueno para las medidas espectroscópicas era de grado HPLC (High performance liquid chromatography)

7.4.2- Síntesis de nanopartículas de NaYF₄: Yb³⁺(22%), Tm³⁺(1,2%) recubiertas con oleato

Las nanopartículas UC_{OA} se sintetizaron siguiendo el mismo procedimiento que en los capítulos anteriores, pero usando las siguientes sales de partida: 242,9 mg (0,8 mmol) de YCl₃·6H₂O (242,7 mg, 0,8 mmol), YbCl₃·6H₂O (85,2 mg, 0,22 mmol) y TmCl₃·6H₂O (4,6 mg, 0,012 mmol).

7.4.3- Síntesis de nanopartículas de NaYF₄: Yb³⁺(22%), Tm³⁺(1,2%) desnudas

Para la síntesis de UC_n se siguió el procedimiento descrito en capítulos anteriores.

7.4.4- Síntesis de UC_n@PK_{CB1}

Se añadió una disolución de MABr en DMF (19 µL, 3,4 µmol; 20 mg·mL⁻¹) a una disolución de PbBr₂ en DMF (100 µL, 2,7 µmol; 10 mg·mL⁻¹) en un vial de vidrio de 1 mL. Esta mezcla se agitó en un agitador orbital durante 15 minutos. Después, se añadió una disolución de CB[7] en DMF (18 µL, 0,19 µmol; 12 mg·mL⁻¹) y se volvió a agitar a 400 rpm durante 30 minutos.

Seguidamente, esta mezcla se añadió muy lentamente sobre 5 mL de tolueno bajo agitación magnética y la agitación se mantuvo a temperatura ambiente y en la oscuridad durante una hora. Se observó el cambio de una disolución incolora a naranja. El material de perovskita (PK_{CB}) se precipitó mediante centrifugación (7000 rpm, 6 min) y fue redispersado en tolueno (5 mL). A

continuación, se añadieron las UC_n en DMF (120 μL, 5.4 mg, 45 mg·mL⁻¹) y CB[7] (20 μL, 0,20 μmol, 12 mg·mL⁻¹) a la dispersión que se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 3 días. Los nanohíbridos se aislaron por decantación durante la noche.

7.4.5- Síntesis de UC_n@PK_{CB2}

Una disolución de MABr en DMF (19 μL, 3,4 μmol; 20 mg·mL⁻¹) y una disolución de ADABr en DMF (53 μL, 2,3 μmol; 10 mg·mL⁻¹) se añadieron a una disolución de PbBr₂ en DMF (100 μL, 2,7 μmol; 10 mg mL⁻¹) en un vial de vidrio de 1 mL. La mezcla se agitó en un agitador orbital durante 15 minutos a 400 rpm. Entonces, se añadió una disolución de CB[7] en DMF (18 μL, 0,19 μmol; 12 mg mL⁻¹) y se agitó durante 30 minutos a 400 rpm.

A continuación, se añadió gota a gota a 5 mL de tolueno bajo agitación magnética vigorosa durante 1 hora. La mezcla cambió de incolora a amarillo durante la adición.

Finalmente, UC_n en DMF (120 μL, 5,4 mg; 45 mg mL⁻¹) se añadieron y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente en un agitador orbital a 300 rpm durante 24 horas. Los nanohíbridos se separaron por decantación durante una noche.

7.4.6- Síntesis de PK_{OCA}

Se sintetizaron siguiendo un procedimiento descrito en la literatura.⁴⁹ Brevemente, 1-octadeceno (2 mL, 6,26 mmol) se calentó a 80°C bajo agitación. Seguidamente, se añadió el bromuro de octilamonio (OCABr) (33,6 mg, 0,16 mmol). Después se añadieron en 100 μL de DMF el MABr (26,6 mg, 0,24 mmol) y el PbBr₂ (36,7 mg, 0,10 mmol). La mezcla resultante se enfrió a 60°C e inmediatamente después, se añadieron 5 mL de acetona con la finalidad de inducir la precipitación de las perovskitas.

El exceso de reactivos se separó mediante centrifugación (7000 rpm, 20 °C, 10 min) y las perovskitas sólidas se secaron al vacío durante una noche. Las perovskitas se revirtieron a sus

precursores mediante dispersión en DMF (34 mg·mL⁻¹) convirtiendo la disolución en incolora.

A continuación, se resintetizaron las perovskitas inyectando 100 µL de esta disolución en 5 mL de tolueno. Finalmente, se precipitaron las PK_{OCA} mediante centrifugación (6000 rpm, 25°C, 4 min).

7.4.7- Síntesis de nanohíbridos UC_{OA}@PK_{OCA}

Se añadieron gota a gota 80 µL de los precursores de PK_{OCA} en DMF (34 mg·mL⁻¹) a una dispersión de UC_{OA} en tolueno (4 mL; 2 mg·mL⁻¹), obteniendo una dispersión amarilla. Se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente, bajo agitación magnética durante 2 horas. Por último, los nanohíbridos se aislaron tras su decantación durante la noche.

7.4.8- Ensayos de fotoestabilidad

Dispersiones de los nanohíbridos de UC_n@PK_{CB2} fueron introducidas en cubetas de cuarzo (1x1 cm²). La fotoestabilidad de las perovskitas en los nanohíbridos fue analizada irradiando las muestras a 350 nm (lámpara de xenón) o 975 nm (láser diodo) y midiendo la emisión tras cada intervalo de irradiación.

7.5- Bibliografía

- (1) Li, X.; Zhang, F.; Zhao, D. *Chem. Soc. Rev* **2015**, *44*, 1346.
- (2) Li, Z.; Zhang, Y.; Jiang, S. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4765.
- (3) Nguyen, T.-L.; Spizzirri, P.; Wilson, G.; Mulvaney, P. *Chem. Commun.* **2008**, 176.
- (4) Yan, C.; Dadvand, A.; Rosei, F.; Perepichka, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8868.
- (5) Bednarkiewicz, A.; Nyk, M.; Samoc, M.; Strek, W. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 17535.
- (6) Xu, S.; Xu, S.; Zhu, Y.; Xu, W.; Zhou, P.; Zhou, C.; Dong, B.; Song, H. *Nanoscale* **2014**, *6*, 12573.
- (7) Mattsson, L.; Wegner, K. D.; Hildebrandt, N.; Soukka, T. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 13270.
- (8) Chan, M.-H.; Chen, C.-W.; Lee, I. J.; Chan, Y.-C.; Tu, D.; Hsiao, M.; Chen, C.-H.; Chen, X.; Liu, R.-S. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 10267.
- (9) Li, S.; Xu, L.; Ma, W.; Wu, X.; Sun, M.; Kuang, H.; Wang, L.; Kotov, N. A.; Xu, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 306.
- (10) Yang, J.; Yang, Z.; Wang, Y.; Qiu, J.; Song, Z. *J. Non-Cryst. Solids* **2016**, *437*, 53.
- (11) Zhang, H.; Li, Y.; Ivanov, I. A.; Qu, Y.; Huang, Y.; Duan, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2865.
- (12) Zhang, S.-Z.; Sun, L.-D.; Tian, H.; Liu, Y.; Wang, J.-F.; Yan, C.-H. *Chem. Commun.* **2009**, 2547.
- (13) Li, L.-L.; Lu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5272.
- (14) Li, Z. Q.; Chen, S.; Li, J. J.; Liu, Q. Q.; Sun, Z.; Wang, Z. B.; Huang, S. M. *J. Appl. Phys.* **2012**, *111*, 014310.

- (15) Priyam, A.; Idris, N. M.; Zhang, Y. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 960.
- (16) Fujii, M.; Nakano, T.; Imakita, K.; Hayashi, S. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 1113.
- (17) Song, Y.; Liu, G.; Dong, X.; Wang, J.; Yu, W.; Li, J. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 18527.
- (18) Zhang, C.; Lee, J. Y. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 15253.
- (19) Xu, W.; Zhu, Y.; Chen, X.; Wang, J.; Tao, L.; Xu, S.; Liu, T.; Song, H. *Nano Res.* **2013**, *6*, 795.
- (20) Lv, R.; Yang, P.; Dai, Y.; Gai, S.; He, F.; Lin, J. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 15550.
- (21) Lv, R.; Yang, G.; He, F.; Dai, Y.; Gai, S.; Yang, P. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 43391.
- (22) He, L.; Mao, C.; Cho, S.; Ma, K.; Xi, W.; Bowman, C. N.; Park, W.; Cha, J. N. *Nanoscale* **2015**, *7*, 17254.
- (23) Qu, A.; Wu, X.; Xu, L.; Liu, L.; Ma, W.; Kuang, H.; Xu, C. *Nanoscale* **2017**.
- (24) Xiang, J.; Tong, X.; Shi, F.; Karsenti, P.-L.; Zhao, Y. *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 9343.
- (25) Li, C.; Zuo, J.; Li, Q.; Chang, Y.; Zhang, Y.; Tu, L.; Liu, X.; Xue, B.; Zhao, H.; Zhang, H.; Kong, X. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *92*, 335.
- (26) Zhang, F.; Braun, G. B.; Pallaoro, A.; Zhang, Y.; Shi, Y.; Cui, D.; Moskovits, M.; Zhao, D.; Stucky, G. D. *Nano Lett.* **2012**, *12*, 61.
- (27) Stranks, S. D.; Snaith, H. J. *Nat. Nano.* **2015**, *10*, 391.
- (28) Yang, W. S.; Noh, J. H.; Jeon, N. J.; Kim, Y. C.; Ryu, S.; Seo, J.; Seok, S. I. *Science* **2015**.
- (29) Kojima, A.; Teshima, K.; Shirai, Y.; Miyasaka, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6050.
- (30) Zhou, H.; Chen, Q.; Li, G.; Luo, S.; Song, T.-b.; Duan, H.-S.; Hong, Z.; You, J.; Liu, Y.; Yang, Y. *Science* **2014**, *345*, 542.
- (31) Aygüler, M. F.; Weber, M. D.; Puscher, B. M. D.; Medina, D. D.; Docampo, P.; Costa, R. D. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 12047.
- (32) Xing, J.; Yan, F.; Zhao, Y.; Chen, S.; Yu, H.; Zhang, Q.; Zeng, R.; Demir, H. V.; Sun, X.; Huan, A.; Xiong, Q. *ACS Nano* **2016**, *10*, 6623.
- (33) Kirakosyan, A.; Kim, J.; Lee, S. W.; Swathi, I.; Yoon, S.-G.; Choi, J. *Cryst. Growth Des.* **2017**, *17*, 794.
- (34) Tan, Z.-K.; Moghaddam, R. S.; Lai, M. L.; Docampo, P.; Higler, R.; Deschler, F.; Price, M.; Sadhanala, A.; Pazos, L. M.; Credgington, D.; Hanusch, F.; Bein, T.; Snaith, H. J.; Friend, R. H. *Nat. Nano* **2014**, *9*, 687.
- (35) Li, G.; Tan, Z.-K.; Di, D.; Lai, M. L.; Jiang, L.; Lim, J. H.-W.; Friend, R. H.; Greenham, N. C. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 2640.
- (36) Pathak, S.; Sakai, N.; Wisnivesky Rocca Rivarola, F.; Stranks, S. D.; Liu, J.; Eperon, G. E.; Ducati, C.; Wojciechowski, K.; Griffiths, J. T.; Haghighirad, A. A.; Pellaroque, A.; Friend, R. H.; Snaith, H. J. *Chem. Mater.* **2015**, *27*, 8066.
- (37) Mitzi, D. B. *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 791.
- (38) Chen, C.-W.; Hsiao, S.-Y.; Chen, C.-Y.; Kang, H.-W.; Huang, Z.-Y.; Lin, H.-W. *J. Mater. Chem. A* **2015**, *3*, 9152.
- (39) J. Calabrese; N. L. Jones; R. L. Harlow; N. Herron; D. L. Thorn; Wang, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2328.
- (40) Tanaka, K.; Takahashi, T.; Ban, T.; Kondo, T.; Uchida, K.; Miura, N. *Solid State Commun.* **2003**, *127*, 619.
- (41) Mitzi, D. B.; Feild, C. A.; Harrison, W. T. A.; Guloy, A. M. *Nature* **1994**, *369*, 467.
- (42) Chung, I.; Song, J. H.; Im, J.; Androulakis, J.; Malliakas, C. D.; Li, H.; Freeman, A. J.; Kenney, J. T.; Kanatzidis, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8579.
- (43) González-Béjar, M.; Liras, M.; Francés-Soriano, L.; Voliani, V.; Herranz-Pérez, V.; Duran-Moreno, M.; Garcia-Verdugo, J. M.; Alarcon, E. I.; Scaiano, J. C.; Pérez-Prieto, J. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 4554.
- (44) Su, Q.; Feng, W.; Yang, D.; Li, F. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 32.
- (45) Zhou, J.; Liu, Q.; Feng, W.; Sun, Y.; Li, F. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 395.
- (46) Wang, M.; Chen, Z.; Zheng, W.; Zhu, H.; Lu, S.; Ma, E.; Tu, D.; Zhou, S.; Huang, M.; Chen, X. *Nanoscale* **2014**, *6*, 8274.
- (47) Wu, Z.; Li, H.; Liu, Z. *Sens. Actuators, A-Chem.* **2015**, *206*, 531.
- (48) Schmidt, L. C.; Pertegas, A.; González-Carrero, S.; Malinkiewicz, O.; Agouram, S.; Mínguez Espallargas, G.; Bolink, H. J.; Galián, R. E.; Pérez-Prieto, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 850.

- (49) Gonzalez-Carrero, S.; Galian, R. E.; Pérez-Prieto, J. *J. Mater. Chem. A* **2015**, *3*, 9187.
- (50) Huang, H.; Susha, A. S.; Kershaw, S. V.; Hung, T. F.; Rogach, A. L. *Adv. Sci.* **2015**, n/a.
- (51) Zhang, F.; Zhong, H.; Chen, C.; Wu, X.-g.; Hu, X.; Huang, H.; Han, J.; Zou, B.; Dong, Y. *ACS Nano* **2015**, *9*, 4533.
- (52) Frances-Soriano, L.; Gonzalez-Bejar, M.; Perez-Prieto, J. *Nanoscale* **2015**, *7*, 5140.
- (53) Tang, H.; Fuentealba, D.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; Kim, K.; Bohne, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20623.
- (54) Bogdan, N.; Vetrone, F.; Ozin, G. A.; Capobianco, J. A. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 835.
- (55) Sichert, J. A.; Tong, Y.; Mutz, N.; Vollmer, M.; Fischer, S.; Milowska, K. Z.; García Cortadella, R.; Nickel, B.; Cardenas-Daw, C.; Stolarczyk, J. K.; Urban, A. S.; Feldmann, J. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 6521.
- (56) Tyagi, P.; Arveson, S. M.; Tisdale, W. A. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 1911.
- (57) Zhu, F.; Men, L.; Guo, Y.; Zhu, Q.; Bhattacharjee, U.; Goodwin, P. M.; Petrich, J. W.; Smith, E. A.; Vela, J. *ACS Nano* **2015**, *9*, 2948.
- (58) Akkerman, Q. A.; Motti, S. G.; Srimath Kandada, A. R.; Mosconi, E.; D'Innocenzo, V.; Bertoni, G.; Marras, S.; Kamino, B. A.; Miranda, L.; De Angelis, F.; Petrozza, A.; Prato, M.; Manna, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1010.
- (59) Yuan, H.; Debroye, E.; Janssen, K.; Naiki, H.; Steuwe, C.; Lu, G.; Moris, M.; Orgiu, E.; Uji-i, H.; De Schryver, F.; Samorì, P.; Hofkens, J.; Roeffaers, M. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 561.
- (60) Pichaandi, J.; Boyer, J.-C.; Delaney, K. R.; van Veggel, F. C. J. M. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 19054.
- (61) Gainer, C. F.; Utzinger, U.; Romanowski, M. *J. Biomed. Opt.* **2012**, *17*, 0760031.
- (62) Francés-Soriano, L.; Liras, M.; Kowalczyk, A.; Bednarkiewicz, A.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. *Nanoscale* **2016**, *8*, 204.
- (63) Lu, Y.; Zhao, J.; Zhang, R.; Liu, Y.; Liu, D.; Goldys, E. M.; Yang, X.; Xi, P.; Sunna, A.; Lu, J.; Shi, Y.; Leif, R. C.; Huo, Y.; Shen, J.; Piper, J. A.; Robinson, J. P.; Jin, D. *Nat. Photon.* **2014**, *8*, 32.
- (64) Papavassiliou, G. C.; Pagona, G.; Karousis, N.; Mousdis, G. A.; Koutselas, I.; Vassilakopoulou, A. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 8271.

Capítulo 8- Funcionalización de UCNP con polímeros termosensibles

8.1- Introducción

El diseño de UCNP multifuncionales, es decir, que combinen diferentes propiedades como dispersabilidad en agua, liberación de fármacos o reconocimiento molecular, despierta mucho interés, principalmente para aplicaciones biomédicas.¹⁻⁴

La dependencia de las propiedades de las UCNP, por ejemplo la luminiscencia, a estímulos externos como la temperatura, pH o la presencia de un determinado analito, abre un gran abanico de posibilidades para la aplicación de las UCNP como sensores (bio)químicos o físicos.⁵⁻¹⁰

El uso de polímeros con respuesta a estímulos externos como ligandos de nanopartículas fluorescentes puede dar lugar a nanohíbridos que combinen o modifiquen las propiedades de ambos o bien presenten nuevas propiedades debido al efecto sinérgico entre el ligando y la NP.^{11,12}

Como ya se ha mencionado en capítulos anteriores en los métodos de síntesis de UCNP más utilizados se obtienen UCNP hidrofóbicas.¹³⁻¹⁵ El uso de las UCNP en aplicaciones biológicas requiere que éstas sean dispersables en agua.¹⁶ Para ello, existe una gran variedad de métodos, la mayoría de ellos utiliza polímeros solubles en agua incorporados a la capa orgánica de la UCNP vía intercambio de ligando o interdigitación de polímeros anfífilicos.¹⁷⁻²¹ No obstante, las UCNP se han sintetizado directamente recubiertas con polímeros hidrofílicos, como ácido poliacrílico (APA) o PEI,²² pero, salvo algunas excepciones,²³ se obtienen UCNP polidispersas.²⁴

Generalmente, el recubrimiento de las UCNP con un polímero hidrofílico conlleva una disminución en la intensidad de emisión.^{25,26} Además, durante el proceso de intercambio de ligando puede producirse la agregación de las UCNP,^{18,27} mientras que el recubrimiento con polímeros anfífilicos a través de interdigitación de las cadenas hidrofóbicas es a menudo poco estable.²⁰ Por otro lado, los polímeros pueden incrementar de manera no deseada el tamaño de las UCNP y/o inducir la agregación de las nanopartículas.^{19,28}

Los copolímeros basados en metacrilato de 2-(acetiltio)-etilo (AcSEMA), contienen un grupo tiol protegido por un acetilo capaz de polimerizarse a través de una polimerización radicalaria de transferencia atómica (ATRP, de sus siglas en inglés). Los copolímeros con metacrilato de metilo (MAM) y metacrilato de 2-(2-metoxietoxi)etilo (MEO₂MA) se han usado para funcionalizar QD, AuNP e incluso láminas de grafeno, a través de una reacción sencilla y en condiciones suaves, debido a la interacción con los grupos tiol.^{11,12,29}

En este capítulo, se describe el recubrimiento de nanopartículas de NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺ con el copolímero, P(MEO₂MA-co-SEMA) (Figura 8.1), que actúa como ligando multiquelante debido a la coordinación de los grupos tiolato con la superficie de las UCNP,³⁰ que quedan recubiertas con una capa fina de polímero.

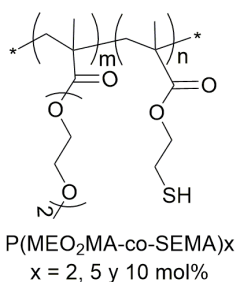


Figura 8.1. Estructura del copolímero P(MEO₂MA-co-SEMA).

La presencia de éteres en las cadenas poliméricas proporciona solubilidad al sistema tanto en medios acuosos como en medios orgánicos. Además, los polímeros metacrílicos con pequeñas cadenas laterales de oligoetilenglicol a una determinada temperatura, conocida como temperatura crítica más baja de disolución (LCST, de sus siglas en inglés) pueden sufrir un cambio drástico y repentino en su solubilidad en agua.³¹⁻³³ Así, la dispersabilidad del nanohíbrido UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA) se ve afectada por encima de su LCST, a partir de la cual se produce la agregación de las nanopartículas. Además, se estudió la reversibilidad de este proceso, así como la estabilidad de los nanohíbridos.

8.2- Resultados y discusiones

8.2.1- Síntesis y caracterización de las UCNP recubiertas con oleato

Las nanopartículas de NaYF₄: Yb, Er recubiertas con oleato (UCNP@OA) se sintetizaron siguiendo un procedimiento descrito en la literatura pero con algunas modificaciones.^{34,35}

El patrón de XRD de las UCNP@OA (Figura 8.2) reveló la formación de la fase hexagonal β-NaYF₄ pura (Joint Committee on Powder Diffraction Standards, card n°: JCPDS 16-0334). La composición de las UCNP fue NaYF₄: Yb³⁺(20%), Er³⁺(3%), que se calculó a partir de la relación atómica de lantánidos obtenida mediante EDX, véase la Figura 8.3.

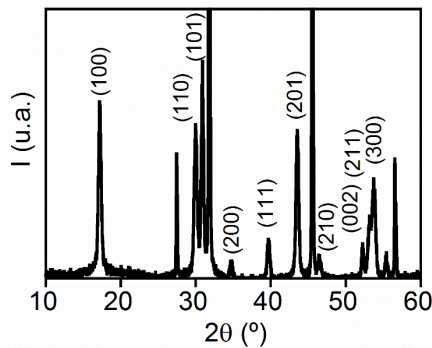


Figura 8.2. Espectro de XRD de las UCNP@OA. Los picos de difracción extra en el espectro de las UCNP@OA corresponden a NaCl (DB card number 01-070-2509 Halite, syn; 2θ: 27,33, 31,64, 45,39, 56,41).

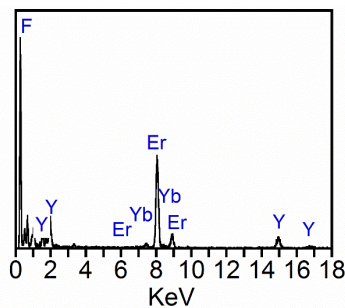


Figura 8.3. Espectro EDX de las nanopartículas UCNP@OA.

La Figura 8.4 muestra las imágenes representativas de TEM y HRTEM de las UCNP@OA, donde se observa la obtención de prismas hexagonales monodispersos de tamaños uniformes ($33,9 \pm 2,8$)x($20,7 \pm 2,1$) nm.

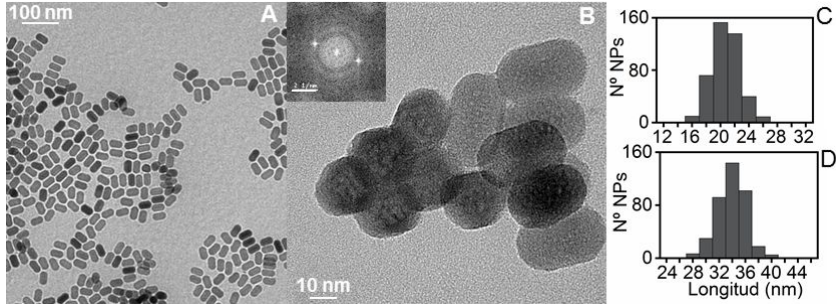


Figura 8.4- Imágenes TEM (A) y HRTEM (B) de las UCNP@OA. Inserción: FFT, barra de escala, 2,5 nm. Histogramas de distribución de tamaño de las UCNP@OA de la base (C) y de la altura (D) del prisma hexagonal.

8.2.2- Síntesis y caracterización de las UCNP recubiertas con los polímeros termosensibles

La Figura 8.5 muestra un esquema de la síntesis de los polímeros termosensibles que contienen un grupo tiol protegido por un grupo acetato, concretamente P(MEO₂MA-co-AcSEMA)-x, donde x se refiere al número de grupos de tiol por mol de polímero (x= 2, 5, 10 mol%).

Los polímeros se sintetizaron a través de una polimerización radicalaria (ATRP) controlada, que permitió la obtención de polímeros con baja polidispersidad.¹¹

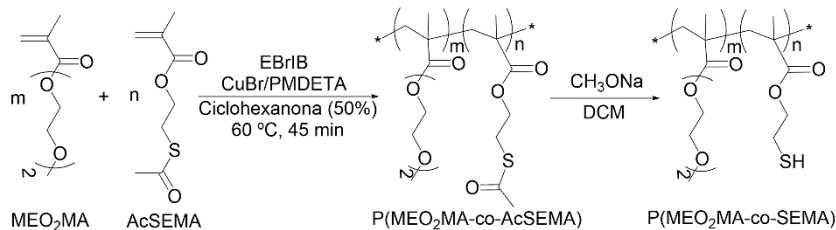


Figura 8.5. Esquema de la síntesis de P(MEO₂MA-co-AcSEMA) y su posterior hidrólisis.¹¹ PMDETA: pentametildietilentriamina. EBriB: 2-bromo-2-metilpropanoato de etilo. DCM: diclorometano.

La caracterización de los polímeros se muestra en la Tabla 8.1. El índice de polidispersidad de cada polímero se estimó a partir

de su masa molecular obtenida por cromatografía de exclusión de tamaños (SEC). Los valores obtenidos fueron de 1,2 aproximadamente (Tabla 8.1), lo cual indicaba la baja polidispersidad del polímero sintetizado a través de ATRP. Estos polímeros presentan propiedades anfífilas, debido a los grupos éteres de las cadenas del comonomero MeO₂MA. Estos grupos también le proporcionan propiedades termosensibles al polímero que colapsa en medios acuosos por encima de la temperatura LCST, lo que aumenta la opacidad de la disolución.^{11,31-33}

x	F _{AcSEMA}	Conv.	M _{nSEC}	M _w /M _n	T _{max}	T _g
2	0,02	59	24265	1,19	339	-28
5	0,05	61	29505	1,26	329	-27,4
10	0,10	74	29447	1,25	320	-25,5

Tabla 8.1. Caracterización de los P(MEO₂MA-co-AcSEMA)-x sintetizados; x es % mol de grupos tiol, F_{AcSEMA}, es la fracción molar experimental en el copolímero (calculada por ¹H-RMN), conversión (%), M_{nSEC} (g·mol⁻¹) media numérica (calculada por SEC), M_w/M_n índice de polidispersidad, T_{max}: temperatura de descomposición (°C) y T_g: temperatura de transición vítrea (°C).

Se han descrito algunos ejemplos que demuestran que los tioles, como SH-PEG³⁰ o el ácido 3-mercaptopropionico,² pueden desplazar al oleato de la superficie de las UCNP. Por ello, los copolímeros P(MEO₂MA-co-AcSEMA)-x se usaron para la reacción de intercambio directo de ligando con las UCNP@OA (Figura 8.6). La hidrólisis *in situ* de éstos, genera los grupos tiol capaces de desplazar al ligando oleato de la superficie de las UCNP@OA. Estos copolímeros tienen un elevado número de grupos tiol, lo que les permite actuar como ligandos multiquelantes, aumentando así su afinidad por la superficie de la UCNP.

Se usó una disolución saturada de metóxido de sodio (MeONa) con el fin de proporcionar el medio básico necesario para la hidrólisis *in situ* de los grupos tioacetato a grupos tiol.

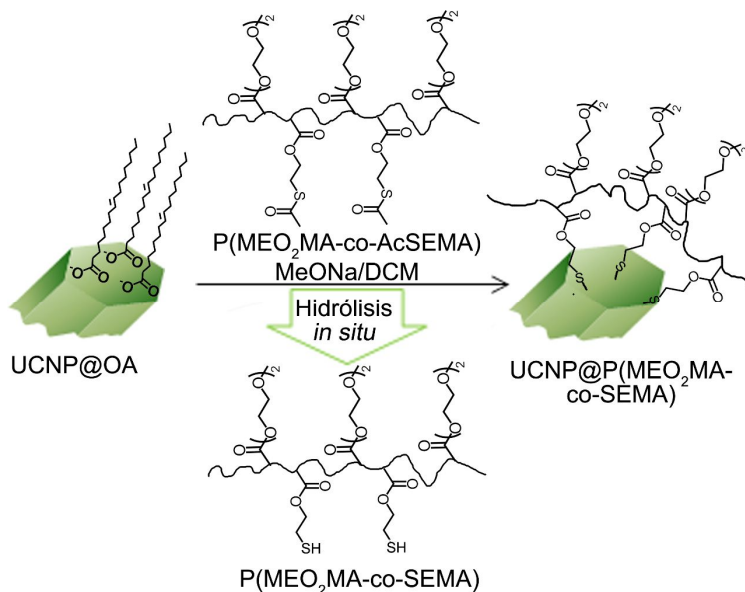


Figura 8.6. Esquema de la síntesis de los nanohíbridos multifuncionales UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x.

A medida que avanzaba la reacción, se observó la formación de un residuo sólido blanco, que se identificó como oleato sódico por FTIR-ATR (Figura 8.7).³⁶ La finalización de la hidrólisis se comprobó por FTIR-ATR, donde se observó la desaparición de la señal del carbonilo -SCOCH₃ sobre 1685 cm⁻¹, que en el polímero inicial aparecía como un hombro de la señal principal de carbonilo. Finalmente, las UCNP recubiertas con polímero se purificaron mediante diálisis.

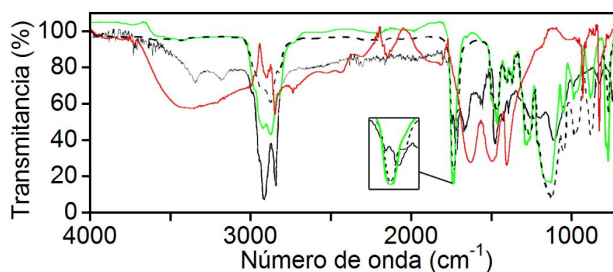


Figura 8.7. Espectros FTIR-ATR de: UCNP@OA (línea negra), P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 (línea discontinua), oleato de sodio³⁶ (línea roja) y nanohíbrido UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 (línea verde). Inserción: ampliación de la banda del carbonilo.

Para comprobar que los polímeros se coordinaban a la superficie de la UCNP a través de los grupos tiol, se realizaron experimentos control.

Así, se agitaron las UCNP@OA en presencia del copolímero P(MEO₂MA-co-AcSEMA)-x pero sin metóxido de sodio. Debido a la ausencia de MeONa, el medio de reacción no era adecuado para que tuviera lugar la hidrólisis de los grupos tioacetato a tiol. Consecuentemente, no se observó la formación de los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA). Estos resultados difieren a lo observado en otro tipo de NP como QD²⁹ o AuNP¹¹ donde los grupos tioacetato sí que podían actuar como grupos anclantes a la superficie de las NP.

Además, se llevó a cabo la reacción de intercambio de ligando en condiciones análogas, pero con el homopolímero P(MEO₂MA). En esta ocasión tampoco se observó la formación de las UCNP recubiertas con el polímero. Esto ponía de manifiesto que las condiciones suaves de hidrólisis utilizadas en la reacción son insuficientes para hidrolizar los ésteres y conseguir el anclaje del polímero a la superficie de la UCNP a través de los grupos carboxilato. Estos experimentos permiten afirmar que la unión a la superficie de las UCNP tiene lugar a través de los grupos tiol, generados *in situ* vía hidrólisis.

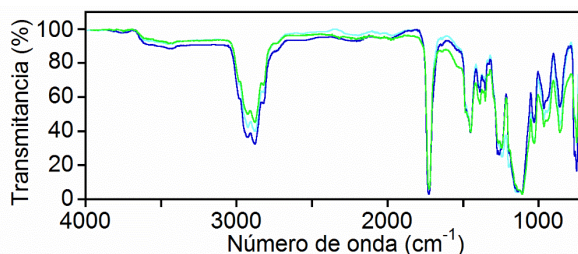


Figura 8.8- Espectro de FTIR-ATR del nanohíbrido UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-2 (línea azul claro), -5 (línea azul oscuro) y -10 (línea verde) en mol % de AcSEMA.

Los espectros FTIR-ATR y ¹H-RMN de los nanohíbridos (Figura 8.8 y Figura 8.9) evidenciaban la eliminación del oleato de

la superficie de las UCNP, la desaparición de los grupos tioéster y la interacción del tiol con la superficie de la UCNP.

El espectro FTIR-ATR del nanohíbrido UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 (Figura 8.7) mostró, además de la desaparición de la señal del carbonilo -SCOCH₃ (~1685 cm⁻¹), la desaparición de la señal a 1710 cm⁻¹ correspondiente al carbonilo del oleato. La Figura 8.8 muestra la obtención de resultados análogos para los otros dos nanohíbridos (x = 2 y 5 mol%).

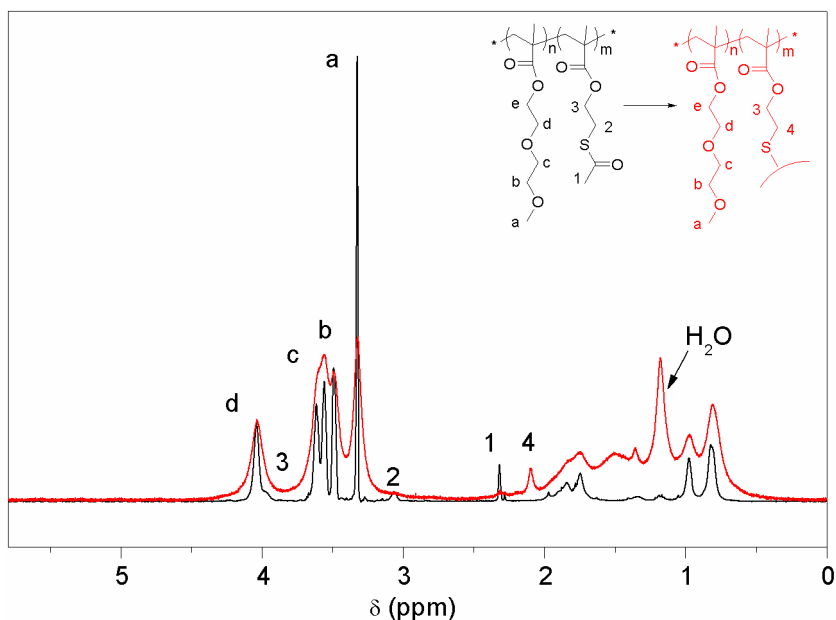


Figura 8.9. Espectro de ¹H-RMN del P(MEO₂MA-co-AcSEMA)-10 (línea negra) y de las UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 (línea roja) en CDCl₃.

El espectro de ¹H-RMN del nanohíbrido UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 comparado con el P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 también confirmó el intercambio del oleato por el copolímero desacetilado. Así no se observan las señales olefinicas (sobre 5.3 ppm en UCNP@OA) ni la señal del -SCOCH₃ (~2.3 ppm, señal 1 en la Figura 8.9) y la señal correspondiente al -CH₂-S se desplaza desde 3 ppm a ~2 ppm.

Además, se observó un ensanchamiento de las señales como resultado de la limitación del movimiento del polímero cuando está anclado a la superficie de las UCNP (Figura 8.9).

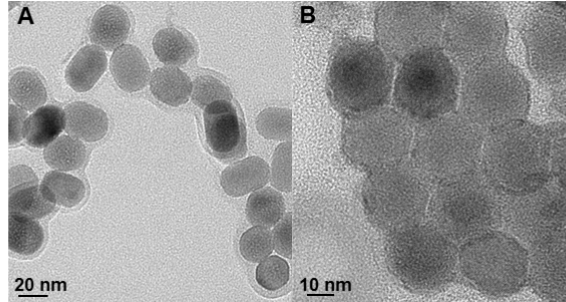


Figura 8.10. Imágenes HRTEM de las UCNP@P(MEO₂MA-co-AcSEMA)-2 (A) y de las UCNP@P(MEO₂MA-co-AcSEMA)-5 (B).

Las imágenes de HRTEM de los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x mostraban una capa fina en la periferia de las UCNP, atribuible al polímero (Figura 8.10). Además, el espesor de dicha capa era independiente del número de grupos tiol presentes en los copolímeros. No se observó variación en el tamaño tras el recubrimiento polimérico (altura alrededor de 33 nm) ni diferencias de afinidad del polímero por las diferentes caras del prisma hexagonal.

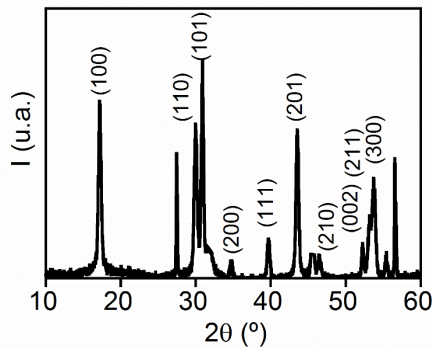


Figura 8.11. Espectro de XRD de las UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x.

Por otro lado, el patrón de difracción de rayos X de los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x es idéntico al de las UCNP@OA, lo que indica que el recubrimiento con el copolímero no produce cambios en la fase cristalina de las UCNP (Figura 8.11).

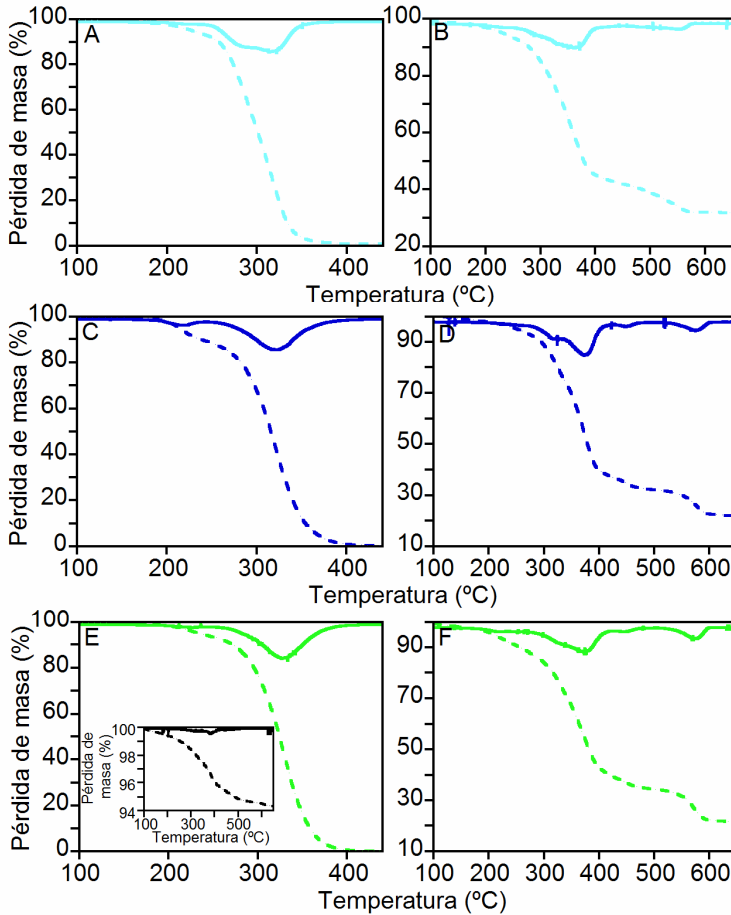


Figura 8.12. Curvas de TGA de los polímeros P(MEO₂MA-co-AcSEMA)-x (A, C, E) comparadas con los de los respectivos nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x (B, D, F): -2 (línea azul claro), -5 (línea azul oscuro), y -10 (línea verde). Inserción: TGA de las UCNP@OA.

Para determinar la cantidad de polímero que recubría las UCNP, así como el efecto de la funcionalización en las propiedades térmicas de los polímeros, se llevaron a cabo los TGA. En las UCNP@OA, la cantidad de oleato alrededor de las UCNP era del 6%, mientras que para las UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x el contenido en material orgánico alcanzó valores cercanos al 80% (Figura 8.12).

En todos los casos, la principal pérdida de peso en los nanohíbridos ocurría sobre 350°C, valor más elevado comparado al

de los correspondientes polímeros (sobre 300°C). Esto significaba que los polímeros eran más estables térmicamente en el nanohíbrido y ponía de manifiesto, nuevamente, la interacción del polímero con la superficie de las UCNP.

8.2.3- Propiedades emisivas de los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x

La presencia de las cadenas de poliéster en la periferia de las UCNP posibilitó la dispersabilidad de los nanohíbridos tanto en medios acuosos como en medios orgánicos. Las propiedades emisivas de los nanohíbridos se midieron tanto en diclorometano como en agua, usando una cubeta triangular colocada para irradiar en *front face*. Con fines comparativos, todos los espectros de emisión se hicieron a la misma concentración de UCNP (0.62 mg·mL⁻¹). Para ello se tuvo en cuenta la cantidad de polímero obtenida a partir del TGA (Figura 8.13) y el valor del área bajo la curva del espectro de emisión de las UCNP@OA en diclorometano se utilizó como referencia (se le asignó el valor de 1).

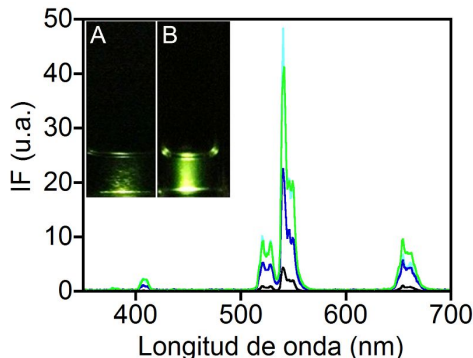


Figura 8.13. Espectros de emisión UC en diclorometano de UCNP@OA (negro) y UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-2 (línea azul), -5 (línea azul oscuro) y -10 (línea verde). Inserción: Fotografías de las dispersiones en diclorometano (0,62 mg·mL⁻¹) de UCNP@OA (a) y UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 (b) bajo la excitación con un láser diodo a 975 nm.

La Tabla 8.2 muestra los valores de emisión relativos en los agua y diclorometano. La emisión de los nanohíbridos en diclorometano era mayor que la de las UCNP@OA iniciales. Se

observó un mayor incremento con el nanohíbrido UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-2 (9,6 veces).

UCNP	Eficiencia relativa	
	CH ₂ Cl ₂	H ₂ O
UCNP@OA	1	--
UCNP@P(MEO ₂ MA-co-SEMA)-2	9,6	2,4
UCNP@P(MEO ₂ MA-co-SEMA)-5	5,1	2,0
UCNP@P(MEO ₂ MA-co-SEMA)-10	9,4	2,3

Tabla 8.2. Comparación de la emisión entre las UCNP@OA y las UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x en diclorometano y agua.

Además, la intensidad de emisión de los nanohíbridos en agua era el doble que las de UCNP@OA iniciales en diclorometano. No obstante, la luminiscencia de todos los nanohíbridos en agua disminuía significativamente respecto a su luminiscencia en diclorometano. Esto se atribuye a la desactivación de la emisión UC en agua, debido a que los modos vibracionales más energéticos (O-H) de las moléculas de agua producen un incremento de la relajación multifotónica no radiativa de los estados excitados de los lantánidos.³⁷⁻⁴⁰ Estudios previos han demostrado también la desactivación de la emisión de las UCNP a causa de las vibraciones de rotación de los enlaces C-H y C-C de los ligandos orgánicos.⁴⁰

Aun así, el recubrimiento de las UCNP con P(MEO₂MA-co-SEMA)-x producía un incremento de su emisión en ambos disolventes. Una posible explicación sería que el uso de un polímero multiquelante y de cadenas cortas reduce el efecto de la desactivación de los grupos (CH₂)_n con altas energías de tensión vibracional. Además, el recubrimiento con una capa fina de polímero multiquelante podría pasivar los defectos de la superficie de las UCNP más eficientemente, lo que produciría un aumento de su eficiencia UC.^{41,42}

Se han descrito diversos métodos para conseguir un incremento de la eficiencia de la emisión UC. De manera general, podemos distinguir entre métodos activos y métodos pasivos.⁴³ Los métodos activos están basados en la interacción de los lantánidos

dopantes con la superficie plasmónica de los metales nobles, logrando incrementos de entre 2 y 12 veces la emisión UC inicial. Para ello, los metales tienen que estar suficientemente cerca de los Ln^{3+} , pero se debe evitar el contacto directo. Por eso, las estrategias habituales suelen recubrir las UCNP con una capa de sílice, de nanopartículas de Fe_2O_3 o de un polímero, por ejemplo poliamidoamina (PAMAM) y posteriormente se embeben las AuNP en dicha capa o bien se recubre con una capa de oro.⁴⁴⁻⁵⁶ Aunque el uso de metales nobles puede incrementar los rendimientos cuánticos de emisión UC, también puede contribuir al aumento de la autofluorescencia así como de la dispersión Raman, que disminuye la relación señal-ruido, no deseable para bioensayos.⁴³

Por otro lado, los métodos pasivos incluyen la variación de la composición, fase cristalina, forma, tamaño de las UCNP, así como controlar la estructura y la química en su periferia o la distribución de los Ln^{3+} en la matriz inorgánica.^{43,57} Por ejemplo, el crecimiento de una capa inerte de NaYF_4 de grosores entre 1 y 15 nm alrededor de las UCNP de $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$, Tm^{3+} produce un incremento de la emisión de hasta 20 veces comparada con la inicial. Además, este incremento crece exponencialmente con el grosor de la capa inerte.⁵⁸ Recientemente, se ha demostrado que el recubrimiento con una capa inerte de unos 2 nm de NaGdF_4 de nanopartículas de $\text{NaGdF}_4:\text{Yb}/\text{Ln}$ ($\text{Ln} = \text{Er}, \text{Ho}, \text{Tm}$) de 3-4 nm, conlleva un incremento de alrededor de 1000 veces la emisión inicial de las UCNP.^{59,60}

Posteriormente, las UCNP se pueden hacer hidrofílicas mediante su recubrimiento con un ligando hidrofílico, como PAA.⁶⁰ Aunque este método no previene la desactivación de la luminiscencia en agua, al mejorar la eficiencia de las UCNP, se obtiene como resultado unas UCNP 4 veces más emisivas comparadas con sus predecesoras UCNP@OA.⁶⁰ En este caso, la desactivación de la fluorescencia se atribuyó a la presencia del PAA en la superficie. No obstante, en nuestro caso el polímero no produce desactivación de la emisión, ya que la misma UCNP, soluble en diclorometano y en agua, muestra un incremento de la emisión en ambos disolventes.

Así, viendo la complejidad de los métodos activos y pasivos descritos para el incremento de la emisión de las UCNP en agua, es importante destacar la simplicidad de nuestro método para incrementar la eficiencia en la emisión UC.

El incremento de la emisión UC de los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x en agua en comparación con UCNP@OA en diclorometano, puede ser atribuido a que las cadenas metacrílicas hidrofóbicas quedan situadas muy próximas a la superficie de las UCNP debido a la coordinación simultánea del polímero a través de múltiples puntos de anclaje. Esto evitaría la penetración de las moléculas de agua a través de la capa orgánica hidrofóbica y con ello la interacción de la superficie de las UCNP con las moléculas de agua. Así se evita la desactivación de la emisión de los Ln³⁺ de la superficie.

Finalmente, se evaluó la fotoestabilidad de los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x. Tras largos tiempos de irradiación con luz NIR (70 minutos), no se observó variación en la emisión de las UC.

8.2.4- Propiedades termosensibles de los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x

En un polímero termosensible, la temperatura afecta a su forma de interactuar con el entorno. Así, la solubilidad en agua de un polímero puede verse afectada por la temperatura debido a cambios conformacionales en las cadenas de los polímeros, causando interacciones intermoleculares hidrofóbicas entre las moléculas de polímero.

Cuando dicho polímero está anclado a la superficie de una nanopartícula, el estímulo térmico podría dar lugar a la agregación de las nanopartículas. La habilidad para controlar el auto-ensamblaje de las nanopartículas es de interés para muchas aplicaciones. Por ejemplo, polímeros sensibles a la temperatura se han utilizado para regular el nanoensamblaje mediado por ADN controlando la liberación del fármaco que transporta.⁶¹

Los polímeros seleccionados para recubrir las nanopartículas poseen un esqueleto metacrílico y cadenas laterales cortas de oligo(etilenglicol).^{31-33,62} Estos polímeros colapsan de manera reversible en agua cuando alcanzan la temperatura LCST. El incremento del número de comonómeros AcSEMA en el copolímero P(MEO₂MA-co-AcSEMA) disminuye la temperatura LCST.¹¹ No obstante, tras la desprotección del grupo tiol, los copolímeros P(MEO₂MA-co-SEMA) muestran un incremento de su LCST debido al incremento del balance hidrofóbico, llegando a valores cercanos al del homopolímero P(MEO₂MA) (~26°C).¹¹

La Figura 8.14 compara las curvas obtenidas al representar los valores de dispersión normalizada en 700 nm en función de la temperatura para los copolímeros y los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x.

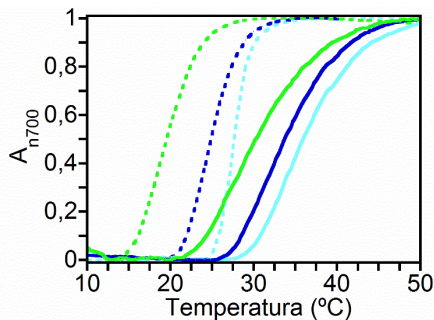


Figura 8.14. Dispersión normalizada en 700 nm en función de la temperatura para los copolímeros P(MEO₂MA-co-AcSEMA)-x (líneas discontinuas) y para UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x (líneas continuas) en agua (1 mg·mL⁻¹) y a pH 5; x = 2 (líneas azul claro), 5 (líneas azul oscuro) y 10 (líneas verde).

Los valores de LCST corresponden con el punto de inflexión de dicha curva. Los valores de LCST a pH 5 cambian a temperaturas mayores para los polímeros unidos a través de los grupos tiolato a la superficie de las nanopartículas que para los polímeros libres. Al igual que ocurre con los copolímeros, el valor de LCST se desplaza a temperaturas mayores con el incremento del número de grupos tiol. El valor de LCST resultante se debe al balance entre los monómeros hidrofóbicos e hidrofílicos en la periferia de la nanopartícula. La temperatura de transición en uno

de los nanohíbridos se encuentra cerca de la temperatura del cuerpo humano ($36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$), lo que resulta muy prometedor para su aplicación de estos nanohíbridos en bioimagen con respuesta a la temperatura o como biosensores.

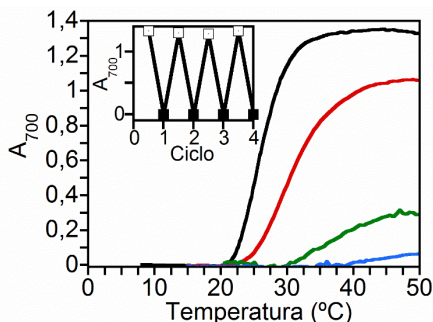


Figura 8.15. Absorción en 700 nm en función de la temperatura para UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 dispersado en agua ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) a diferentes pH; pH = 3,5 (línea negra), pH = 5 (línea roja), pH = 6,5 (línea verde) y pH = 7 (línea azul). Inserción: cambios en la emisión en 700 nm tras varios ciclos de frío (15°C , cuadrado negro) / calor (40°C , cuadrado blanco).

Además, se demostró que el valor de LCST era modulable con el pH, aunque sólo a pH por debajo de 7. Por ejemplo, para el nanohíbrido UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 se midió el valor de LCST a diferentes pH (Figura 8.15). Se observó que la LCST disminuye con el pH y, además, el salto en la curva es más abrupto. Respuestas similares se observaron también con los copolímeros P(MEO₂MA-co-SEMA) previamente, pero no en los copolímeros acetilados correspondientes.¹¹ Por ello, estos cambios se pueden atribuir a la presencia de grupos ionizables (tiol) en la periferia del nanohíbrido. Es decir, que parte de los grupos tiolato actuarían como grupos anclante a la superficie UCNP y otra parte quedarían en la periferia, otorgando dependencia con el pH. Esta interpretación es consistente con los cambios físicos reversibles de los nanohíbridos con la temperatura así como con el pH.^a

El proceso termosensible se siguió por TEM y DLS. La Figura 8.16 muestra las imágenes de TEM del nanohíbrido

^a Las señales del grupo tiol de los polímeros son de difícil detección en FTIR y ¹H-RMN.

UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 preparados a partir de una dispersión en agua por debajo y por encima del valor de LCST (18 y 60°C, respectivamente).

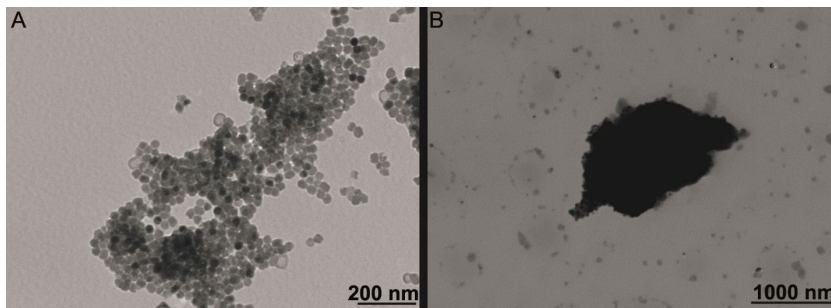


Figura 8.16. Imágenes representativas de TEM del UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 a 18°C (a) y 60°C (b) a pH 5.

A 18°C, se observó que el nanohíbrido estaba bien disperso sobre la rejilla de cobre, observándose su tamaño de $(33,6 \pm 3,5) \times (21,7 \pm 1,4)$ nm y el recubrimiento de polímero de $3,1 \pm 0,9$ nm. La poca agregación es causada básicamente por la evaporación del disolvente (véase Tabla 8.3 para el resto de nanohíbridos).

x	Tamaño UCNP (nm)	Recubrimiento (nm)
2	$(35,3 \pm 1,4) \times (21,6 \pm 2,0)$	$(3,9 \pm 0,6)$
5	$(32,4 \pm 2,0) \times (22,9 \pm 1,5)$	$(3,1 \pm 1,0)$
10	$(33,6 \pm 3,5) \times (21,7 \pm 1,4)$	$(3,1 \pm 0,9)$

Tabla 8.3. Tamaños de las UCNP así como del recubrimiento en los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x.

Por otro lado, las imágenes de TEM del nanohíbrido a temperatura superior al valor de LCTS mostraron grandes agregados con diámetros superiores a 1000 nm, resultando difícil la visualización de nanopartículas (Figura 8.16B). Se observó el mismo comportamiento para el resto de nanohíbridos.

Es decir, el recubrimiento polimérico otorgó a las UCNP propiedades termosensibles. Se observó que los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x se agregaban y desagregaban

por encima y por debajo de la LCST, respectivamente (Figura 8.17). Esto ocurría en ambos disolventes.

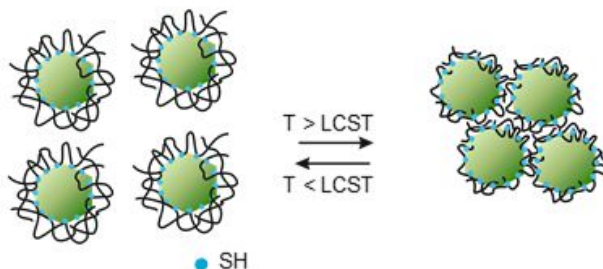


Figura 8.17. Esquema del proceso de agregación/desagregación de UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x inducido por la temperatura.

Al incrementar la temperatura por encima del valor de LCST del nanohíbrido UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x, las cadenas del polímero unido a la superficie a través de muchos puntos de anclaje, se contraen y los nanohíbridos se reorganizan en redes debido a la transición del nanohíbrido de hidrofílico a hidrofóbico (Figura 8.17). Este comportamiento puede deberse a la pérdida de moléculas de agua,⁶³ que interactúan débilmente con las unidades-CH₂CH₂O- del polímero cuando se aumenta la temperatura.^b

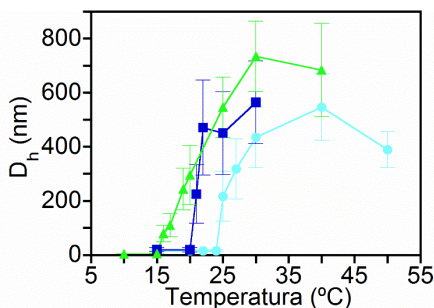


Figura 8.18. Dependencia del número D_h con la temperatura para UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x dispersados en agua a pH 5 (1 mg·mL⁻¹); x = 2 (línea azul), 5 (línea azul oscuro) y 10 (línea verde) mol % de SEMA.

Las medidas de DLS a diferentes temperaturas mostraron que la media del diámetro hidrodinámico (D_h) incrementaba con la

^b Estudios previos con PEG han demostrado que la fuerza de la interacción polímero-agua era más baja al aumentar la temperatura

temperatura (Figura 8.18). La media del D_h para el nanohíbrido con el menor contenido en grupos tiol fue de 540 ± 122 nm, mientras que fue de 740 ± 130 nm para el de mayor contenido. Por lo tanto, la capacidad para colapsar y agregarse de los nanohíbridos era dependiente del número de tioles, aumentando la agregación con el número de grupos tiol.

La Figura 8.19 muestra la distribución del tamaño a cada temperatura y demuestra la pequeña distribución de tamaños que tienen los agregados a cada temperatura.

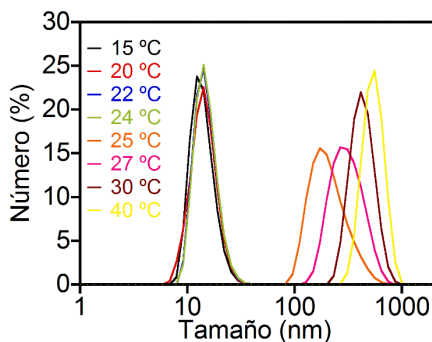


Figura 8.19. Dependencia de la distribución de tamaños del nanohíbrido UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-2 de la temperatura.

8.2.5- Dependencia de la emisión con el pH y la temperatura

Se estudió el efecto de la temperatura y el pH sobre las propiedades emisivas de los nanohíbridos en agua.

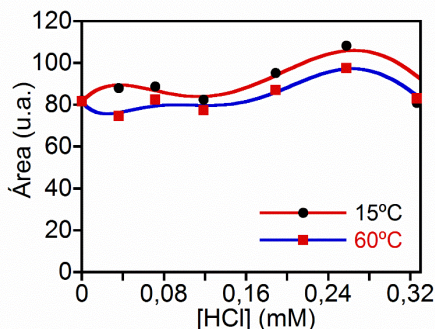


Figura 8.20. Dependencia de la emisión de UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 (área bajo la curva entre 400 y 700 nm) con la concentración de HCl.

. Para ello, se eligieron dos temperaturas, una por debajo y otra por encima del valor de LCST (15 y 60°C, respectivamente), y la emisión UC se midió a diferentes valores de pH (Figura 8.20).

La emisión del nanohíbrido UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 solo fue un 20% más baja a 60°C que a 15°C (Figura 8.20) y además este proceso resultó ser reversible, recuperando el nanohíbrido su emisión incluso tras 10 ciclos seguidos de agregación-desagregación (Figura 8.21).

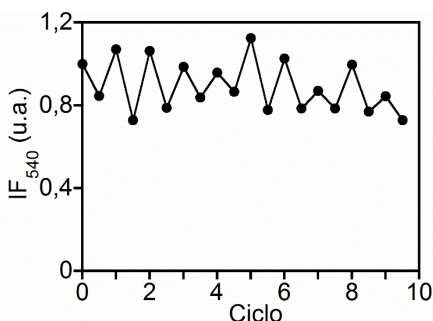


Figura 8.21. Intercambio reversible de la intensidad de emisión en 540 nm del nanohíbrido UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 desde 15°C a 60°C en agua a pH 9. La emisión de la dispersión inicial se normalizó a 1.

La mayor emisión a 15°C que a 60°C es consistente con los resultados publicados para UCNP en fase hexagonal con diferentes ligandos.^{64,65}

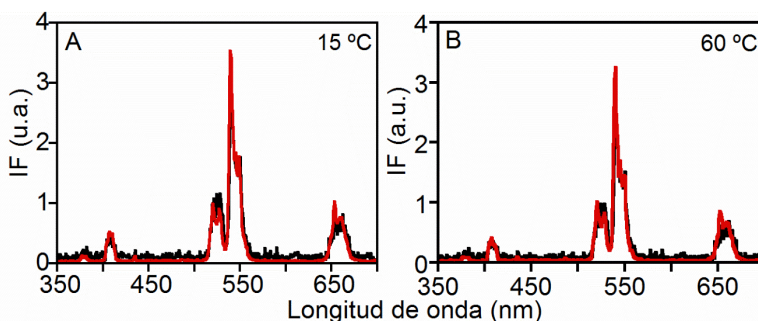


Figura 8.22. Comparación de la emisión ($\lambda_{exc} = 975 \text{ nm}$) con el tiempo del nanohíbrido UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 en agua a temperatura de 15°C (A) y 60°C (B). El espectro rojo fue registrado tras los 10 ciclos y el negro es la misma muestra pero 3 meses después.

Finalmente, los nanohíbridos exhibieron excelente estabilidad química con el tiempo. De hecho, las propiedades emisivas de las dispersiones acuosas de UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 usadas para los experimentos de reversibilidad, así como la de pH 3.5, permanecieron prácticamente inalteradas tras 3 meses (Figura 8.22 y Figura 8.23).

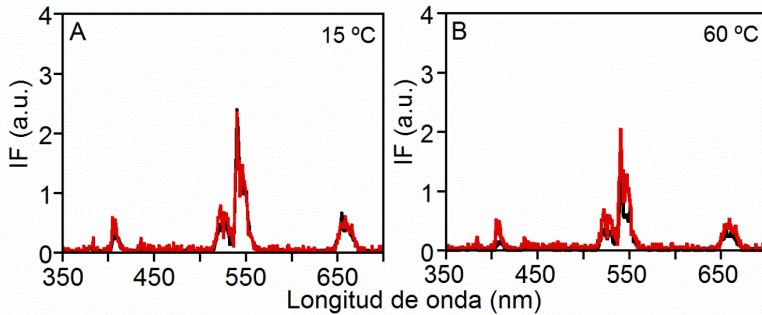


Figura 8.23. Comparación de la emisión con el tiempo del nanohíbrido UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 en agua a 15°C (A) y 60°C (B). El espectro rojo se registró tras la acidificación con HCl hasta pH 3.6 y el negro es la misma muestra pero tres meses después.

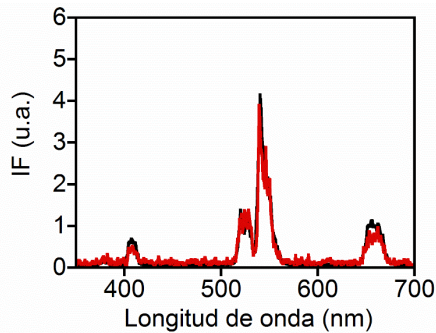


Figura 8.24. Comparación de la emisión a 15°C del nanohíbrido UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 en agua (línea roja) y el resuspendido tras una semana en medio de cultivo (línea negra).

Además, el nanohíbrido también resultó estable en el medio de cultivo. De hecho, los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 se dispersaron en un medio de DMEM/F-12 libre de rojo de fenol suplementado con un 10% de suero fetal de ternera y 1 mM de piruvato de sodio a 37°C. La dispersión se mantuvo durante una semana en la nevera, tras la cual se centrifugó y resuspendió

en el mismo volumen de agua. El espectro de emisión no mostró diferencias con la del nanohíbrido inicial (Figura 8.24).

8.3- Conclusiones

Se ha modificado la periferia de las UCNP de manera sencilla a través del intercambio de ligando original con un polímero multiquelante. El polímero se coordina a la superficie de la UCNP a través de varios grupos tiolato, lo que permite su recubrimiento con una capa fina de polímero y evita el aumento del tamaño del nanohíbrido final. Los nanohíbridos resultantes eran anfifílicos y presentaban un incremento de su emisión UC, tanto en agua como en diclorometano. Este método es mucho más sencillo que los descritos en la literatura para conseguir un incremento en la emisión UC.

Por otro lado, los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x presentan propiedades termosensibles. Éstos se agregaban de manera reversible por encima de la LCST, sin que sus propiedades emisivas se vieran alteradas. Por último, pero no por ello menos importante, los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x muestran una buena estabilidad química, térmica y luminiscente con el tiempo y bajo diferentes condiciones. Esto podría ser muy útil para su futura aplicación en bioimagen, terapia o transporte de medicamentos.

8.4- Procedimiento experimental

8.4.1- Materiales

Los reactivos necesarios para la síntesis de las UCNP fueron: LnCl₃ hexahidratados de pureza >99.9% (YCl₃·6H₂O, YbCl₃·6H₂O y ErCl₃·6H₂O), 1-octadeceno (95%), ácido oleico (99,9%), NaOH y NH₄F (99,99%). Estos reactivos se usaron tal cual se recibieron, sin ningún tipo de purificación previa.

Los copolímeros P(MEO₂MA-co-AcSEMA)-x se sintetizaron siguiendo un procedimiento descrito con anterioridad¹¹ y se usaron en la síntesis de UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x.

Los disolventes se secaron por métodos estándar o por elución a través de un sistema de secado en columna Pure Solv Innovative Technology. La diálisis se llevó a cabo usando una tubería con membrana de celulosa regenerada de MWCO 50kDa de RC Spectra/Por®7-Spectrum Labs.

8.4.2- Síntesis de las UCNP recubiertas con oleato.

Las nanopartículas de $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}(20\%), \text{Er}^{3+}(3\%)$ recubiertas de oleato se sintetizaron de manera análoga a los capítulos anteriores.³⁵

8.4.3- Síntesis de UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-x

Se preparó una mezcla que contenía 29 mg de UCNP@OA y 43 mg de P(MEO₂MA-co-SEMA)-x (1/1,5 wt %) en 2 mL de diclorometano. Seguidamente, se añadió una pequeña cantidad de MeONa bajo agitación continua a temperatura ambiente. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 días para asegurarse de la completa funcionalización de las UCNP por los grupos tiolato. Tras la eliminación del sólido blanco insoluble correspondiente al oleato sódico, se evaporó el disolvente en el rotavapor a presión reducida. El crudo resultante se redispersó en THF y se pasó a través de un tubo con membrana de celulosa regenerada de MWCO-50 kDa para someterlo a diálisis con THF:H₂O (7:3) v/v reemplazando las fracciones cada 12-24 horas hasta que no se detectó polímero en el espectro UV en las fracciones dializadas (normalmente tras 60-90 mL).

8.4.4- Medidas de la emisión UC con el pH y la temperatura

Se preparó una disolución acuosa a pH 11 añadiendo metóxido de sodio en agua (1,3 mg en 10 mL). El nanohíbrido se dispersó en esta disolución (5 mg en 8 mL) y el pH de la disolución coloidal se midió primero a 15°C y después a 60°C. Seguidamente, se añadieron alícuotas de una disolución de HCl (5 µL en 10 mL) y tras cada adición se registró el pH y el espectro de emisión primero a 15°C y después a 60°C

8.5- Bibliografía

- (1) Gu, Z.; Yan, L.; Tian, G.; Li, S.; Chai, Z.; Zhao, Y. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 3758.
- (2) DaCosta, M. V.; Doughan, S.; Han, Y.; Krull, U. J. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *832*, 1.
- (3) Chen, G.; Qiu, H.; Prasad, P. N.; Chen, X. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 5161.
- (4) Guan, M.; Dong, H.; Ge, J.; Chen, D.; Sun, L.; Li, S.; Wang, C.; Yan, C.; Wang, P.; Shu, C. *NPG Asia Mater.* **2015**, *7*, e205.
- (5) Ju, Q.; Noor, M. O.; Krull, U. J. *Analyst* **2016**, *141*, 2838.
- (6) Wang, L.; Yan, R.; Huo, Z.; Wang, L.; Zeng, J.; Bao, J.; Wang, X.; Peng, Q.; Li, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6054.
- (7) Christ, S.; Schäferling, M. *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 034004.
- (8) González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. *Methods Appl. Fluoresc.* **2015**, *3*, 042002.
- (9) Schäferling, M.; Resch-Genger, U. In *Reviews in Fluorescence 2016*; Geddes, C. D., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2017, p 71.
- (10) Mattsson, L.; Wegner, K. D.; Hildebrandt, N.; Soukka, T. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 13270.
- (11) Liras, M.; García, O.; Guarrotxena, N.; Palacios-Cuesta, M.; Quijada-Garrido, I. *Polymer Chem.* **2013**, *4*, 5751.
- (12) Liras, M.; Quijada-Garrido, I.; Palacios-Cuesta, M.; Muñoz-Durieux, S.; García, O. *Polymer Chem.* **2014**, *5*, 433.
- (13) Naccache, R.; Yu, Q.; Capobianco, J. A. *Adv. Opt. Mat.* **2015**, *3*, 482.
- (14) Chen, C.; Li, C.; Shi, Z. *Adv. Sci.* **2016**, *3*, 1600029.
- (15) Escudero, A.; Carrillo-Carrión, C.; Zyuzin, M. V.; Parak, W. J. *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374*, 48.
- (16) González-Béjar, M.; Francés-Soriano, L.; Pérez-Prieto, J. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2016**, *4*, 47.
- (17) Sedlmeier, A.; Gorris, H. H. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1526.
- (18) Muhr, V.; Wilhelm, S.; Hirsch, T.; Wolfbeis, O. S. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 3481.
- (19) Wu, T.; Boyer, J.-C.; Barker, M.; Wilson, D.; Branda, N. R. *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 2495.
- (20) Hu, W.; Lu, X.; Jiang, R.; Fan, Q.; Zhao, H.; Deng, W.; Zhang, L.; Huang, L.; Huang, W. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9012.
- (21) Jiang, G.; Pichaandi, J.; Johnson, N. J. J.; Burke, R. D.; van Veggel, F. C. J. M. *Langmuir* **2012**, *28*, 3239.
- (22) Wang, M.; Mi, C.-C.; Liu, J.-L.; Wu, X.-L.; Zhang, Y.-X.; Hou, W.; Li, F.; Xu, S.-K. *J. Alloys Compd.* **2009**, *485*, L24.
- (23) Wang, Z.; Liu, C.; Chang, L.; Li, Z. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 12186.
- (24) Speghini, A.; Pedroni, M.; Zaccheroni, N.; Rampazzo, E. In *Upconverting Nanomaterials*; CRC Press: 2016, p 37.
- (25) Wang, F.; Wang, J.; Liu, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7456
- (26) Kumar, R.; Nyk, M.; Ohulchansky, T. Y.; Flask, C. A.; Prasad, P. N. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 853.
- (27) Boyer, J.-C.; Manseau, M.-P.; Murray, J. I.; van Veggel, F. C. J. M. *Langmuir* **2010**, *26*, 1157.
- (28) Budijono, S. J.; Shan, J.; Yao, N.; Miura, Y.; Hoye, T.; Austin, R. H.; Ju, Y.; Prud'homme, R. K. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 311.
- (29) Liras, M.; García, O.; Quijada-Garrido, I.; Ellis, G.; Salavagione, H. J. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2*, 1723.
- (30) Voliani, V.; González-Béjar, M.; Herranz-Pérez, V.; Duran-Moreno, M.; Signore, G.; García-Verdugo, J. M.; Pérez-Prieto, J. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 13538.
- (31) Lutz, J.-F. *J. Polymer Sci. Part A: Polymer Chem.* **2008**, *46*, 3459.
- (32) Lutz, J. F.; Weichenhan, K.; Akdemir, O.; Hoth, A. *Macromolecules* **2007**, *40*, 2503.
- (33) Lutz, J.-F. o.; Hoth, A. *Macromolecules* **2006**, *39*, 893.
- (34) Voliani, V.; Gemmi, M.; Francés-Soriano, L.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. J. *Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 11404.
- (35) Li, Z.; Zhang, Y. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 345606.
- (36) Lee, D. H.; Condrate, R. A., Sr. *J. Mater. Sci.* **1999**, *34*, 139.
- (37) Boyer, J.-C.; Manseau, M.-P.; Murray, J. I.; Veggel, F. C. J. M. v. *Langmuir* **2010**, *26*, 1157.

- (38) Cong, T.; Ding, Y.; Xin, S.; Hong, X.; Zhang, H.; Liu, Y. *Langmuir* **2016**, *32*, 13200.
- (39) Wurth, C.; Kaiser, M.; Wilhelm, S.; Grauel, B.; Hirsch, T.; Resch-Genger, U. *Nanoscale* **2017**, *9*, 4283.
- (40) Heer, S.; Kömpe, K.; Güdel, H. U.; Haase, M. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 2102.
- (41) Patel, D. N.; Hardy, L. A.; Smith, T. J.; Smith, E. S.; Wright Iii, D. M.; Sarkisov, S. J. *Lumin.* **2013**, *133*, 114.
- (42) Zhao, J.; Lu, Z.; Yin, Y.; McRae, C.; Piper, J. A.; Dawes, J. M.; Jin, D.; Goldys, E. M. *Nanoscale* **2013**, *5*, 944.
- (43) Gnach, A.; Bednarkiewicz, A. *Nano Today* **2012**, *7*, 532.
- (44) Li, C.; Zuo, J.; Li, Q.; Chang, Y.; Zhang, Y.; Tu, L.; Liu, X.; Xue, B.; Zhao, H.; Zhang, H.; Kong, X. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *92*, 335.
- (45) Priyam, A.; Idris, N. M.; Zhang, Y. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 960.
- (46) Xiang, J.; Tong, X.; Shi, F.; Karsenti, P.-L.; Zhao, Y. *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 9343.
- (47) Yang, J.; Yang, Z.; Wang, Y.; Qiu, J.; Song, Z. *J. Non-Cryst. Solids* **2016**, *437*, 53.
- (48) Song, Y.; Liu, G.; Dong, X.; Wang, J.; Yu, W.; Li, J. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 18527.
- (49) Xing, H.; Bu, W.; Zhang, S.; Zheng, X.; Li, M.; Chen, F.; He, Q.; Zhou, L.; Peng, W.; Hua, Y.; Shi, J. *Biomaterials* **2012**, *33*, 1079.
- (50) Sudheendra, L.; Ortalan, V.; Dey, S.; Browning, N. D.; Kennedy, I. M. *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 2897.
- (51) Li, Z.; Wang, L.; Wang, Z.; Liu, X.; Xiong, Y. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 3291.
- (52) Zhang, C.; Lee, J. Y. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 15253.
- (53) Zhang, S.-Z.; Sun, L.-D.; Tian, H.; Liu, Y.; Wang, J.-F.; Yan, C.-H. *Chem. Commun.* **2009**, 2547.
- (54) Zhang, H.; Li, Y.; Ivanov, I. A.; Qu, Y.; Huang, Y.; Duan, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2865.
- (55) Kannan, P.; Rahim, F. A.; Chen, R.; Teng, X.; Huang, L.; Sun, H.; Kim, D.-H. *Appl. Mater. Inter.* **2013**, *5*, 3508.
- (56) Qu, A.; Wu, X.; Xu, L.; Liu, L.; Ma, W.; Kuang, H.; Xu, C. *Nanoscale* **2017**.
- (57) Zhang, H.; Tu, L. P.; Liu, X. M. In *Upconverting Nanomaterials*; CRC Press: 2016, p 19.
- (58) Liu, L.; Qin, F.; Zhao, H.; Lv, T.; Zhang, Z.; Cao, W. *J. Alloys Compd.* **2016**, *684*, 211.
- (59) Liu, J.; Chen, G.; Hao, S.; Yang, C. *Nanoscale* **2017**, *9*, 91.
- (60) Yi, G.-S.; Chow, G.-M. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 341.
- (61) D. Gamelin, H. G., in: H. Yersin In *Transition Metal and Rare Earth Compounds* Springer, Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, 2001; Vol. 24, p 1.
- (62) París, R.; Quijada-Garrido, I.; García, O.; Liras, M. *Macromolecules* **2011**, *44*, 80.
- (63) Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Migliardo, F.; Migliardo, P.; Romeo, G. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 10272.
- (64) Sedlmeier, A.; Achatz, D. E.; Fischer, L. H.; Gorris, H. H.; Wolfbeis, O. S. *Nanoscale* **2012**, *4*, 7090.
- (65) Marciniak, L.; Prorok, K.; Francés-Soriano, L.; Pérez-Prieto, J.; Bednarkiewicz, A. *Nanoscale* **2016**, *8*, 5037.

Conclusiones

Conclusions

Several conclusions can be drawn from the present Thesis focused on the synthesis of new nanomaterials based on NaYF₄ co-doped nanoparticles.

1. Texture and phase recognition analysis (TPRA) demonstrated that UCNPs obtained in different syntheses, using the high temperature co-precipitation method, were uniform and monodispersed hexagonal prisms. Variations of the reaction temperature (T_r) modified the final size of the nanoparticles, while the modification of the fluoride source addition temperature (T_{ad}) led to changes in the shape of the UCNPs.

2. A diiodo-substituted Bodipy derivative was successfully chemisorbed to the UCNP surface through its carboxylate group. Two different nanohybrids were designed, the first one with IBDP and OA anchored to its surface, UCNP-IBDP@OA, was hydrophobic. The other one with the IBDP simultaneously embedded in an SH-PEG-NH₂ layer, UCNP-IBDP@PEG, was hydrophilic.

2.1. Steady-state and time-resolved measurements showed that the presence of IBDP modulate the upconversion processes. On the one hand, a green emission quenching was observed, as compared with their precursor, due to the energy transfer from Er³⁺ excited states to the IBDP. On the other hand, a competitive way for the decay of the Yb³⁺ excited state via energy transfer to the IBDP excited state was demonstrated, leading to shorter rise times. This process is more important in an organic solvent.

2.2. Moreover, UCNP-IBDP@PEG nanohybrid displayed an excellent performance for *in vitro* photodynamic therapy. Thus, NIR irradiation (45 min, 239 mW·cm⁻²) of human neuroblastoma SH-SY5Y cells incubated with UCNP-IBDP@PEG nanohybrid, caused 50% of cell death. Furthermore, UCNP-IBDP@PEG showed good biocompatibility and no cytotoxicity without NIR irradiation.

3. Different cucurbit[n]urils (n = 6, 7 and 8) were spontaneously anchored to the surface of naked NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ nanoparticles

leading to highly emissive and water-dispersible UCNP@CB[n] nanohybrids.

3.1. UCNP@CB[n] (n = 6, 7) nanohybrids act as a scaffold for energy acceptors, specifically tricyclic basic dyes methylene blue and pyronin Y, via the free carbonyl portal of the CB[n]. Exclusion complexes with the dyes were observed for UCNP@CB[6] and UCNP@CB[7], while the dyes in UCNP@CB[8] destabilised the interaction between UCNP and the CB due to the encapsulation of the dye dimer in the CB[8] cavity.

3.2. Pyronin Y emission was observed upon NIR excitation of the UCNP@CB[n]@PY (n = 6, 7) nanohybrids due to energy transfer from the UCNP to pyronin Y. Analogously, the NIR excitation of the nanohybrids with methylene blue led to efficient singlet oxygen generation due to energy transfer from the UCNP scaffold to the dye.

4. UCNPs were effectively assembled with perovskite nanoparticles (PK) by an innovative strategy based on the use of CB[7] portals that anchor to the surface of both nanoparticles.

4.1. The perovskite nanoparticles were located firmly and closely to the UCNP surface, allowing for efficient energy transfer from the UCNP to the perovskite nanoparticle (ca. 100%). These nanohybrids displayed good photostability under UV and NIR light, making them suitable for photovoltaics and luminescent devices.

4.2. A novel technique was developed to evaluate luminescence lifetime in the range of several tens of microseconds by using a commercial multiphoton laser scanning confocal microscope. This technique proved useful for verifying the success of the assembling strategy and the homogeneity of the sample.

5. NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ nanoparticles were coated with a thin layer of P(MEO₂MA-co-SEMA) multidentate copolymers via direct ligand exchange. The copolymer was anchored through thiolate groups to the UCNP surface. The presence of 2-(2-methoxyethoxy)ethyl side chains of MEO₂MA extending out from the methacrylic main chain anchored to the UCNP surface, made UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA) nanohybrids dispersible in both aqueous and organic

media. The nanohybrids showed an enhanced emission up to a factor of 10 in dichloromethane and a factor of 2 in water compared with its hydrophobic precursor (UCNP@OA).

5.1. TEM images and Dynamic Light Scattering (DLS) measurements demonstrated that nanohybrids undergo a sudden aggregation in water at a certain temperature, called lower critical solution temperature (LCST) due to the presence of short oligoethylene glycol side chains. Furthermore, the aggregation of UCNPs was reversible after decreasing the temperature below the LCST, thus retaining their emissive properties even after several cycles, which demonstrated their high thermostability.

5.2. In addition, UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA) nanohybrids displayed exceptional photo- and chemical stability over time (up to 3 months) at different pHs (pH = 3.5 and 6.5) where their emissive properties remained practically unchanged. Finally, the stability of the colloidal solution of UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 nanohybrid in a media typical for cell culturing was also demonstrated, which makes UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA) nanohybrids useful for future biological applications (such as drug delivery).

Conclusiones

De la presente Tesis centrada en la síntesis de nuevos nanomateriales basados en nanopartículas codopadas de NaYF_4 , se pueden extraer varias conclusiones.

1. El análisis de reconocimiento de fases y texturas (TPRA) demostró que las UCNP obtenidas en diferentes síntesis a través del método de coprecipitación a alta temperatura, eran prismas hexagonales uniformes y monodispersos. Variaciones en la temperatura de reacción (T_r), modificaban el tamaño final de las nanopartículas, mientras que la modificación de la temperatura de adición de la fuente de fluoruro (T_{ad}) llevó a cambios en la forma de las UCNP.

2. Un derivado diiodado del Bodipy se quimisorbió en la superficie de las UCNP a través de su grupo carboxilato. Se diseñaron dos nanohíbridos diferentes, el primero con IBDP y OA anclados a la superficie, UCNP-IBDP@OA, era hidrofóbico. El otro con el IBDP embebido simultáneamente en una capa del polímero SH-PEG-NH₂, UCNP-IBDP@PEG, era hidrofílico.

2.1. Las medidas de luminiscencia de tiempo resuelto y estado estacionario mostraron que la presencia del IBDP puede modular los procesos de upconversion. Por un lado, se observó la desactivación de la emisión en el verde, comparado con sus precursores, debido a la transferencia de energía desde el estado excitado del Er^{3+} al IBDP. Por otro lado, se demostró un camino competitivo para la desaparición del estado excitado del Yb^{3+} a través de la transferencia de energía al IBDP, lo que causaba un acortamiento de los tiempos de aparición. Este proceso era más importante en disolventes orgánicos.

2.2. Adicionalmente, el nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG mostró un excelente comportamiento en terapia fotodinámica *in vitro*. La irradiación en el NIR (45 min, $239 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) de células SH-SY5Y derivadas de neuroblastoma humano incubadas con el nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG, causó un 50% de muerte celular. Además, el nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG mostró buena biocompatibilidad y no resultaron citotóxicos sin irradiación NIR.

3. El anclaje de diferentes cucurbit[n]urilos ($n= 6, 7$ y 8) sobre la superficie de $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ llevó a la síntesis de nanohíbridos $\text{UCNP@CB}[n]$ altamente emisivos y dispersables en agua.

3.1. Los nanohíbridos $\text{UCNP@CB}[n]$ ($n= 6, 7$) pueden actuar como plataforma para aceptores de energía, específicamente para los cromóforos tricíclicos básicos azul de metileno y pironina Y, a través del portal de carbonilos libre en el $\text{CB}[n]$. Se observó la formación de complejos de exclusión para $\text{UCNP@CB}[6]$ y $\text{UCNP@CB}[7]$, mientras que en $\text{UCNP@CB}[8]$ los cromóforos desestabilizaban la interacción entre la UCNP y el CB debido a la encapsulación del dímero del cromóforo en la cavidad del $\text{CB}[8]$.

3.2. Se observó la emisión de la pironina Y tras la excitación de los nanohíbridos $\text{UCNP@CB}[n]@PY$ ($n=6$ y 7) con luz NIR, debido a la transferencia de energía desde las UCNP a la pironina Y. Análogamente, la excitación de los nanohíbridos con azul de metileno resultó en la generación eficiente de oxígeno singlete debido a la transferencia de energía desde las UCNP al cromóforo.

4. Se logró el ensamblaje eficiente de UCNP a nanopartículas de perovskita (PK) a través de una estrategia innovadora basada en el uso de los portales del $\text{CB}[7]$ como anclaje a la superficie de ambos tipos de nanopartículas.

4.1. Las PK se situaban firmemente y muy cerca de la superficie de las UCNP, lo que permitía la transferencia de energía eficiente desde las UCNP a las PK (aprox. 100%). Estos nanohíbridos mostraron buena fotoestabilidad bajo irradiación UV y NIR, lo cual las hace adecuadas para su uso en dispositivos luminiscentes y fotovoltaicos.

4.2. Se desarrolló una técnica novedosa para evaluar los tiempos de vida de luminiscencia en el rango de decenas de microsegundos haciendo uso de un microscopio confocal de barrido con láser multifotónico comercial. Esta técnica resultó útil en la verificación del éxito de la estrategia de ensamblaje, así como la homogeneidad de la muestra.

5. Se recubrieron las nanopartículas de $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ con una capa fina del copolímero multidentado $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA-co-SEMA})$

vía intercambio directo de ligando. El copolímero se ancló a través de los grupos tiolatos a la superficie de las UCNP. La presencia de las cadenas laterales de 2-(2-metoxietoxi)etilo del MEO₂MA, que se extienden fuera de la cadena metacrílica principal anclada a la superficie de las UCNP, hace que los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA) sean dispersables en medios orgánicos y acuosos. Los nanohíbridos mostraron un incremento de la emisión de hasta 10 veces en diclorometano y de 2 veces en agua comparado con su precursor hidrofóbico (UCNP@OA).

5.1. Las imágenes de TEM y las medidas de dispersión dinámica de la luz (DLS) demostraron que los nanohíbridos experimentan agregación en agua repentina a una determinada temperatura, llamada temperatura crítica más baja (LCST). Esto era debido a la presencia de cadenas cortas de oligoetilenglicol. Además, la agregación de las UCNP era reversible tras la disminución de la temperatura por debajo de la LCST, y conservaban sus propiedades emisivas incluso tras varios ciclos, lo cual demostraba su alta termoestabilidad.

5.2. Además, los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA) mostraron una excepcional estabilidad foto(química) con el tiempo (hasta 3 meses) a diferentes pH (pH = 3,5 y 6,5), donde sus propiedades emisivas permanecían prácticamente inalteradas. Finalmente, se demostró la estabilidad de la disolución coloidal del nanohíbrido UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 en un medio típico para cultivo celular, lo cual hace a los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA) útiles para futuras aplicaciones biológicas (como transporte de fármacos).

Conclusions

De la present Tesi centrada en la síntesi de nous nanomaterials basats en nanopartícules codopades de NaYF₄, es poden extraure diverses conclusions.

1. L'anàlisi de reconeixement de fases i textures (TPRA) va demostrar que les UCNP obtingudes en diferents síntesi a través del mètode de coprecipitació a alta temperatura, eren prismes hexagonals uniformes i monodispersos. Variacions en la temperatura de reacció (T_r), van modificar la grandària final de les nanopartícules, mentre que la modificació de la temperatura d'addició de la font de fluorur (T_{ad}) va comportar un canvi en la forma de les UCNP.

2. Un derivat diiodat del Bodipy es va quimisorbir en la superfície de les UCNP a través del seu grup carboxilat. Es van dissenyar dos nanohíbrids diferents, el primer amb IBDP i el OA ancorats a la superfície de la UCNP, UCNP-IBDP@OA, era hidrofòbic. L'altre, amb el IBDP embegut simultàniament en una capa del polímer SH-PEG-NH₂, UCNP-IBDP@PEG, era hidrofílic.

2.1. Les mesures de luminiscència de temps resolt i estat estacionari van mostrar que la presència del IBDP pot modular els processos de upconversion. D'una banda, es va observar la desactivació de la emissió en el verd, comparat amb els seus precursors, a causa de la transferència d'energia des de l'estat excitat del Er³⁺ al IBDP. D'altra banda, es va demostrar un camí competitiu per a la desaparició de l'estat excitat del Yb³⁺ a través de la transferència d'energia al IBDP, que produïa un escurçament dels temps d'aparició. Aquest procés era més important en dissolvents orgànics.

2.2. Addicionalment, el nanohíbrid UCNP-IBDP@PEG va mostrar un excel·lent comportament en teràpia fotodinàmica *in vitro*. La irradiació en el NIR (45 min, 239 mW·cm⁻²) de cèl·lules SH-SY5Y derivades de neuroblastoma humà incubades amb el nanohíbrid UCNP-IBDP@PEG, va causar un 50% de mort cel·lular. A més, el nanohíbrid UCNP-IBDP@PEG va mostrar una bona

biocompatibilitat i no va resultar citotòxic en absència d'irradiació NIR.

3. L'adsorció simultània de diferents cucurbit[n]urils ($n=6, 7$ i 8) sobre la superfície de nanopartícules de $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ va resultar en la síntesi de nanohíbrids $\text{UCNP@CB}[n]$ altament emissius i dispersables en aigua.

3.1. Els nanohíbrids $\text{UCNP@CB}[n]$ ($n=6, 7$) poden actuar com a motlle per a acceptors d'energia, específicament per als cromòfors tricíclics bàsics blau de metilè i pironina Y, a través del portal carbonílic lliure en el $\text{CB}[n]$. Es va observar la formació de complexos d'exclusió per a $\text{UCNP@CB}[6]$ y $\text{UCNP@CB}[7]$, mentre que per a $\text{UCNP@CB}[8]$ els cromòfors desestabilitzen la interacció entre les UCNP a causa de l'encapsulació del dímer del cromòfor en la cavitat del $\text{CB}[8]$.

3.2. Es va observar l'emissió de la pironina Y després de l'excitació dels nanohíbrids $\text{UCNP@CB}[n]@PY$ ($n=6$ i 7) amb llum NIR a causa de la transferència d'energia des de les UCNP a la pironina Y. De manera anàloga, l'excitació dels nanohíbrids amb blau de metilè va resultar en la generació eficient d'oxigen singlet a causa de la transferència d'energia des de les UCNP al cromòfor.

4. Es va aconseguir l'acoblament eficient de UCNP a nanopartícules de perovskita (PK) a través d'una estratègia innovadora basada en l'ús dels portals del $\text{CB}[7]$ com punts d'ancoratge a la superfície d'ambdós tipus de nanopartícules.

4.1. Les PK es situaven fermament i molt pròximes de la superfície de les UCNP, que permetia la transferència eficient d'energia des de les UCNP fins les PK (aprox. 100%). Aquests nanohíbrids van mostrar una bona fotoestabilitat baix irradiació UV i NIR, la qual cosa els fa apropiats per al seu ús en dispositius luminescents i fotovoltaics.

4.2. Es va desenvolupar una tècnica innovadora per avaluar els temps de vida de luminiscència en el rang de desenes de microsegons fent ús d'un microscopi confocal d'escombrat amb làser multifotònic comercial. Esta tècnica va ser útil en la verificació

de l'èxit de l'estratègia d'acoblament, així com la homogeneïtat de la mostra.

5. Es van recobrir les nanopartícules de $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ amb una capa fina del copolímer multidentat $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA-co-SEMA})$ via intercanvi directe de lligand. El copolímer es va ancorar a través dels grups tiolats de la superfície de les UCNP. La presència de les cadenes laterals de de 2-(2-metoxietoxi)etil del MEO_2MA , que s'estenen cap a fora de la cadena metacrílica principal ancorada a la superfície de les UCNP, fa que els nanohíbrids $\text{UCNP@P}(\text{MEO}_2\text{MA-co-SEMA})$ siguin dispersables en medis orgànics i aquosos. Els nanohíbrids van mostrar un increment de l'emissió de fins 10 vegades en diclorometà i de 2 vegades en aigua en comparació amb el seu precursor hidrofòbic (UCNP@OA).

5.1. Les imatges de TEM i les mesures de dispersió dinàmica de la llum (DLS) van demostrar que els nanohíbrids experimentaven una agregació en aigua de manera sobtada a una determinada temperatura, anomenada temperatura crítica més baixa (LCST). Açò estava causat per la presència de cadenes curtes d'oligoetilenglicol. A més, l'agregació de les UCNP era reversible després de la disminució de la temperatura per sota del valor de LCST, i conservaven les seues propietats emissives inclús després de diversos cicles consecutius, la qual cosa demostrava la seua alta termoestabilitat.

5.2. A més, els nanohíbrids $\text{UCNP@P}(\text{MEO}_2\text{MA-co-SEMA})$ van mostrar una excepcional estabilitat foto(química) amb el temps (fins a 3 mesos) a diferents pH (pH = 3,5 i 6,5), on les seues propietats emissives romanien pràcticament inalterades. Finalment, es va demostrar l'estabilitat de la dissolució col·loïdal del nanohíbrid $\text{UCNP@P}(\text{MEO}_2\text{MA-co-SEMA})-10$ en un medi típic per a cultiu cel·lular, la qual cosa fa als nanohíbrids $\text{UCNP@P}(\text{MEO}_2\text{MA-co-SEMA})$ útils per a futures aplicacions biològiques (com transport de fàrmacs).

Resúmenes

Abstract

In the last decades *nanochemistry* has reached great interest due to the importance of developing innovative and unique materials at nanometric scale, specifically nanoparticles. The properties of nanomaterials differ from those at a larger scale, so nanochemistry open innovative ways in science to develop materials with new properties and novel performance.

Upconversion nanoparticles (UCNPs) are lanthanides inorganic based nanocrystals, such as NaYF₄ co-doped with lanthanides cations (such as Er³⁺, Yb³⁺, Tm³⁺...). UCNPs display excellent chemical, thermal and photostability, good biocompatibility, narrow bandwidth, long luminescence times, no photoblinking and no photobleaching. Most importantly, they can emit in the visible after their excitation at the near-infrared (NIR) because of their intra-configurational 4f electron transitions. Hence, UCNPs are of great interest in many fields such as security, photocatalysis or sensing and specially in biomedicine (bioimaging, photodynamic therapy...) due to the high penetration depth of the NIR light in tissues.

Nanochemistry plays a crucial role in architecting UCNPs, firstly, in the development of new synthetic routes and/or control of the reaction parameters in order to achieve monodisperse and uniform UCNPs with high UC efficiency. Secondly, nanochemistry is important for surface engineering, since it deals with the convenient modification and functionalization of the UCNPs surface to provide them with desired properties and functionalities.

This thesis is focused in the synthesis of new nanomaterials based on NaYF₄ co-doped nanoparticles with exceptional properties and their further derivatization. Texture and phase recognition analysis (TPRA) based on electron nanodiffraction technique is used to characterize the geometry of UCNPs synthesized by the high temperature co-precipitation strategy which uses stoichiometric amounts of NH₄F. Here, we confirmed experimentally that despite the apparently different shapes of samples (hexagons, rods, and

cubes), all the nanocrystals are actually β -phase hexagonal prisms. This is of relevance since many biological features of nanostructures, such as cellular internalization and cytotoxicity, are governed by their geometry. In addition, reproducibility in biological experiments is paramount.

In addition, water-dispersible, ca. 30 nm-sized $\text{NaYF}_4: \text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ UCNP, capped with a polyethylene glycol (PEG) derivative and highly loaded with a singlet oxygen photosensitizer, specifically a diiodo-substituted Bodipy (IBDP), was synthesized. The photosensitizer, bearing a carboxylic group, was anchored to the UCNP surface and, at the same time, embedded in the PEG capping; the combined action of the UCNP surface and PEG facilitated the loading for an effective energy transfer and, additionally, avoided photosensitizer leaching from the nanohybrid (UCNP-IBDP@PEG).

The effectiveness of the nanohybrids in generating singlet oxygen after NIR excitation with a continuous wavelength laser was evidenced by using a probe molecule. In vitro assays demonstrated that the UCNP-IBDP@PEG nanohybrid was taken up by the SH-SY5Y human neuroblastoma-derived cells showing low cytotoxicity. Moreover, ca. 50% cancer cell death was observed after NIR irradiation (45 min, $239 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$).

Steady-state and time-resolved emission studies on this nanohybrid, and on its hydrophobic analogous, shows that the Yb^{3+} metastable state, formed after absorption of a NIR photon, can decay via two competitive energy transfer processes: sensitization of IBDP after absorption of a second NIR photon and population of Er^{3+} excited states.

Moreover, spontaneous adsorption of cucurbit[n]uril, CB[n] ($n = 6, 7, \text{ and } 8$), on the surface of naked $\text{NaYF}_4: \text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ gave rise to UCNP@CB[n] exclusion complexes. These complexes proved to be highly stable as well as highly emissive under near-infrared excitation. By using two tricyclic basic dyes (specifically, methylene blue and pyronin Y) as a proof of concept, we demonstrate that the UCNP@CB[n] ($n = 6, 7$) nanohybrids can form

exclusion complexes with this type of dyes via the CB carbonyl free portal, i.e., UCNP@CB@dye hybrids, thus making it possible to locate a high concentration of the dyes close to the UCNP and, consequently, leading to efficient energy transfer from the UCNP to the dye.

Furthermore, CB[7] was used to assemble two different nanoparticles, UCNPs and $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbBr}_3$ perovskite nanoparticles (PK). This innovative strategy allows to anchor the perovskite nanoparticles firmly and closely to the naked UCNPs surface, thus leading to $\text{UC}_n\text{@PK}_{\text{CB}}$ nanohybrids.

A commercial multiphoton laser scanning confocal microscope is used to demonstrate the successful assembly. This technique proves to be useful to evaluate luminescence lifetime in the range of several tens of μs and allows visualization of the extraordinarily efficient nontrivial resonance energy transfer from the upconversion nanoparticle to the perovskite after NIR excitation of the nanohybrid as well as the homogeneity of the $\text{UC}_n\text{@PK}_{\text{CB}}$ sample. The considerable photostability of the perovskite in these nanohybrids is demonstrated by prolonged irradiation of the nanohybrid under UV light as well as under NIR light.

Last but not least, UCNPs were capped with a thin polymer shell by replacing the oleate ligand of hydrophobic UCNPs by multidentate thiolate-grafting of P(MEO₂MA-co-SEMA) copolymers. The presence of the 2-(2-methoxyethoxy)ethyl side chains of MEO₂MA extending out of the nanohybrid made them water-dispersible and thermosensibles. The UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA) nanohybrids exhibited an enhanced emission by up to a factor of 10, as compared with that of their hydrophobic precursor in dichloromethane and even in water (a factor of 2).

Their thermoresponsiveness was modulated by the pH; this is consistent with the presence of some thiol groups at the nanohybrid periphery. Remarkably, the nanohybrid emission, as well as its stability, was almost independent of the aggregation state (in the basic-acid and temperature range studied here). The formation of stable water-dispersible UCNPs with enhanced

emission, together with their amphiphilic and temperature-responsive polymer coating, is promising for building multifunctional nanostructures for intracellular imaging, therapy, and drug delivery.

Resumen

En las últimas décadas la *nanoquímica* ha alcanzado gran interés debido a la importancia de desarrollar materiales únicos e innovadores en la escala nanométrica, específicamente nanopartículas. Las propiedades de los nanomateriales son diferentes de las de los respectivos materiales a gran escala, así la nanoquímica abre caminos innovadores en la ciencia para desarrollar materiales con nuevas propiedades y comportamientos novedosos.

Las nanopartículas de upconversion (UCNP) están compuestas por nanocristales inorgánicos que contienen lantánidos, como NaYF_4 codopados con cationes lantánidos (como Er^{3+} , Yb^{3+} , Tm^{3+} ...). Las UCNP tienen una excelente estabilidad química, térmica y lumínica, buena biocompatibilidad, bandas de emisión estrechas, tiempos de vida de luminiscencia largos y, además, no presentan ni fotoblanqueo ni fotoparpadeo. De especial interés, su propiedad más importante es que pueden emitir en el visible tras su excitación en el infrarrojo cercano (NIR) debido a transiciones electrónicas entre sus niveles 4f. Por lo tanto, las UCNP son de gran interés en muchos campos como en seguridad, fotocatalisis, fabricación de celdas solares o sensores y, especialmente, en biomedicina (bioimagen, terapia fotodinámica...) debido a la gran profundidad de penetración de la luz NIR en los tejidos.

La nanoquímica juega un papel crucial en la fabricación de nanomateriales basados en UCNP, así como en el desarrollo de nuevas rutas sintéticas y/o en el control de los parámetros de reacción con la finalidad de obtener UCNP monodispersas y uniformes con alta eficiencia en la emisión UC. Además, la nanoquímica es importante en la ingeniería de la periferia de las UCNP, esto es la adecuada modificación y funcionalización de la periferia de las UCNP para dotarlas de las propiedades y funcionalidades deseadas.

Esta tesis está centrada en la síntesis de nuevos nanomateriales basados en nanopartículas codopadas de NaYF_4

con propiedades excepcionales, así como su posterior derivatización. El análisis de reconocimiento de textura y fase (TPRA) basado en la técnica de nanodifracción electrónica se ha usado para caracterizar la geometría de las UCNP sintetizadas por el método coprecipitación a alta temperatura, el cual usa cantidades estequiométricas de NH_4F . Además, se ha confirmado experimentalmente que, a pesar de las diferentes formas aparentes que mostraban las muestras (hexágonos, rods y cubos), todos los nanocristales eran prismas hexagonales en fase β . Esto es de gran relevancia ya que algunas propiedades biológicas de las nanopartículas, como su internalización en células o citotoxicidad, están gobernadas por su geometría. Además, la reproducibilidad en los experimentos biológicos es de vital importancia.

Además, se han sintetizado UCNP de $\text{NaYF}_4: \text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ dispersables en agua y con tamaños de, aproximadamente, 30 nm, recubiertas con un derivado del polietilenglicol (PEG) y con una gran cantidad de un fotosensibilizador, específicamente un Bodipy diiodado (IBDP). El IBDP, que tiene un grupo carboxílico, se ha anclado a la superficie de la UCNP a través de su grupo carboxilato y, simultáneamente, se ha embebido en la capa de PEG. La acción combinada de la superficie de las UCNP y del PEG han facilitado la carga del IBDP para conseguir una transferencia de energía eficiente y, adicionalmente, evita la pérdida progresiva del IBDP del nanohíbrido (UCNP-IBDP@PEG).

La efectividad del nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG en la generación de oxígeno singlete tras su excitación en el NIR con un láser de onda continua se ha demostrado con el uso de una sonda molecular. Los ensayos *in vitro* han demostrado que células derivadas de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) internalizaron el nanohíbrido UCNP-IBDP@PEG, así como la baja citotoxicidad del nanohíbrido. Además, se ha observado cerca del 50% de muerte celular tras la irradiación con luz NIR (45 min, 239 mW).

Las medidas de luminiscencia de estado estacionario y de tiempo resuelto sobre este nanohíbrido y su análogo hidrofóbico, han mostrado que el estado metaestable del Yb^{3+} , formado tras la

absorción de un fotón NIR, puede desaparecer a través de dos procesos de transferencia de energía competitivos: sensibilización del IBDP tras la absorción de un segundo fotón NIR o población de los estados excitados del Er^{3+} .

Por otra parte, la adsorción espontánea de cucurbit[n]urilos, $\text{CB}[n]$ ($n = 6, 7, \text{ y } 8$), sobre la superficie desnuda de las nanopartículas $\text{NaYF}_4: \text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ dio lugar a la formación de los complejos de exclusión $\text{UCNP}@ \text{CB}[n]$. Estos complejos han mostrado alta estabilidad así como alta emisión tras la excitación en el NIR. Como prueba de concepto, se han usado dos cromóforos tricíclicos básicos, específicamente azul de metileno y pironina Y, para demostrar que los nanohíbridos $\text{UCNP}@ \text{CB}[n]$ ($n = 6 \text{ y } 7$) pueden formar complejos de exclusión con este tipo de cromóforos a través del portal de carbonilos libre, para dar lugar los nanohíbridos $\text{UCNP}@ \text{CB}@ \text{cromóforo}$. Esto hace posible localizar una gran concentración de los cromóforos cerca de la superficie de la UCNP y, consecuentemente, permite la transferencia de energía desde la UCNP al cromóforo.

Además, el $\text{CB}[7]$ se ha usado para ensamblar dos tipos diferentes de nanopartículas, UCNP y nanopartículas de perovskita de $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbBr}_3$ (PK). Esta innovadora estrategia permite la localización de las PK firmemente y muy cerca de la superficie desnuda de las UCNP, lo que permite la obtención de nanohíbridos $\text{UC}_n@ \text{PK}_{\text{CB}}$.

Un microscopio confocal de barrido con láser multifotónico comercial se ha usado para verificar el éxito del ensamblaje. Esta técnica ha demostrado ser útil para evaluar tiempos de vida de luminiscencia en el rango de varias decenas de microsegundos y permite la evaluación de la eficiencia de la transferencia de energía resonante no trivial desde la UCNP a la PK tras la excitación en el NIR, así como la homogeneidad de la muestra $\text{UC}_n@ \text{PK}_{\text{CB}}$. Además, se ha demostrado la fotoestabilidad de la perovskita en estos nanohíbridos tras la irradiación prolongada del nanohíbrido con luz UV y NIR.

Y por último, pero no menos importante, las UCNP se han recubierto con una capa fina de polímero tras reemplazar el ligando oleato por el copolímero multiquelante P(MEO₂MA-co-SEMA), anclado a la superficie de las UCNP a través de grupos tiolato. La presencia de las cadenas laterales de 2-(2-metoxietoxi)etilo, que se extiende hacia afuera del nanohíbrido, los hace dispersables en agua y termosensibles. Los nanohíbridos UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA) han exhibido un incremento de la emisión 10 veces mayor, comparado con su precursor hidrofóbico en diclorometano, y 2 veces mayor en agua.

Además, el pH modula las propiedades termosensibles de los nanohíbridos. Esto es consistente con la presencia de algunos grupos tiol en la periferia del nanohíbrido. Cabe destacar, que la emisión del nanohíbrido, así como su estabilidad, era independiente del estado de agregación (en el rango de pH y temperatura estudiado aquí). La obtención de UCNP dispersables en agua que presentan incremento de su emisión y, además, propiedades anfifílicas y termosensibles, es muy prometedor para el diseño de nanoestructuras multifuncionales para, por ejemplo, su aplicación en imagen intracelular, terapia y liberación controlada de fármacos.

Resum

En les últimes dècades la nanoquímica ha aconseguit un gran interès com a conseqüència de la importància de desenvolupar materials únics i innovadors a l'escala nanomètrica, específicament nanopartícules. Les propietats dels nanomaterials són diferents de les dels corresponents materials a gran escala, així la nanoquímica obri camins innovadors en la ciència per a desenvolupar materials amb noves propietats i nous comportaments.

Les nanopartícules de upconversion (UCNP) estan compostes per nanocristalls inorgànics que contenen lantànids, com NaYF_4 codopades amb cations lantànids (com Er^{3+} , Yb^{3+} , Tm^{3+} ...). Les UCNPs tenen una excel·lent estabilitat química, tèrmica i lumínica, bona biocompatibilitat, bandes d'emissió estretes, temps de vida de luminiscència llargs, i a més a més, no presenten ni fotoblanqueig ni fotoparalleig. Però, la seua propietat més important és que poden emetre en el visible després de la seua excitació en infraroig pròxim (NIR) a causa de les transicions electròniques entre els seus nivells 4f. Per tant, les UCNPs són de gran interès en molts camps com en seguretat, fotocatalisi, fabricació de cel·les solars o sensors i, especialment, en biomedicina (biomatge, teràpia fotodinàmica...) a causa de la gran profunditat de penetració de la llum NIR en els teixits.

La nanoquímica té un paper crucial en la fabricació de nanomaterials basats en UCNPs, així com en el desenvolupament de noves rutes sintètiques i/o en el control dels paràmetres de reacció amb la finalitat d'obtenir UCNPs monodisperses i uniformes amb alta eficiència en la emissió UC. I, segon, la nanoquímica és important en l'enginyeria de la perifèria de les UCNPs, açò és l'adequada modificació i funcionalització de la perifèria de les UCNPs per a dotar-les de les propietats i funcionalitats desitjades.

Esta tesi està centrada en la síntesi de nous nanomaterials basats en nanopartícules codopades de NaYF_4 amb propietats excepcionals, així com la seua posterior derivatització. L'anàlisi de reconeixement de textura i fase (TPRA) basat en la tècnica de

nanodifracció electrònica s'ha emprat per a caracteritzar la geometria de les UCNP sintetitzades pel mètode de coprecipitació a alta temperatura, el qual utilitza quantitats estequiomètriques de NH_4F . A més, s'ha confirmat experimentalment que, malgrat les diferents formes aparents que mostraven les mostres (hexàgons, rods i cubs), tots els nanocristalls eren primes hexagonals en fase β . Açò és de gran rellevància, ja que algunes propietats biològiques de les nanopartícules, com la seua internalització a les cèl·lules o la citotoxicitat, estan governades per la seua geometria. A més, la reproductibilitat en els experiments biològics és de vital importància.

A més, s'han sintetitzat UCNP de $\text{NaYF}_4: \text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ dispersables en aigua i amb una mida, d'aproximadament, 30 nm, recobertes amb un derivat del polietilenglicol (PEG) i amb una gran quantitat d'un fotosensibilitzador, específicament un Bodipy diodat (IBDP). El IBDP, que té un grup carboxílic, s'ha ancorat a la superfície de la UCNP a través del seu grup carboxilat i, simultàniament, s'ha embegut en la capa de PEG. L'acció combinada de la superfície de les UCNP i del PEG han facilitat la càrrega del IBDP per aconseguir una transferència d'energia eficient i, addicionalment, evita la pèrdua progressiva del IBDP del nanohíbrid (UCNP-IBDP@PEG).

L'efectivitat del nanohíbrid UCNP-IBDP@PEG en la generació d'oxigen singlet després de la seua excitació en el NIR amb un làser d'ona continua s'ha demostrat amb l'ús d'una sonda molecular. Els assajos *in vitro* han demostrat que cèl·lules derivades de neuroblastoma humà (SH-SY5Y) van internalitzar el nanohíbrid UCNP-IBDP@PEG, així com la baixa citotoxicitat del nanohíbrid. A més, s'ha observat prop del 50 % de mort cel·lular després de la irradiació amb llum NIR (45 min, 239 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$).

Les mesures de luminiscència d'estat estacionari i de temps resolt sobre aquest nanohíbrid i el seu anàleg hidrofòbic, han demostrat que l'estat metastable del Yb^{3+} , format després de l'absorció d'un fotó NIR, pot desaparèixer a través de dos processos de transferència d'energia competitiu: sensibilització del IBDP

després de l'excitació d'un segon fotó NIR o població dels estats excitats del Er^{3+} .

Per altra banda, l'adsorció espontània de cucurbit[n]urils, $\text{CB}[n]$ ($n = 6, 7, \text{ i } 8$), sobre la superfície nua de les nanopartícules de $\text{NaYF}_4: \text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ va donar lloc a la formació dels complexos d'exclusió $\text{UCNP}@ \text{CB}[n]$. Estos complexos han demostrat alta estabilitat així com alta emissió després de l'excitació en el NIR. Com a prova de concepte, s'han emprat dos cromòfors tricíclics bàsics, específicament blau de metilè i pironina Y, per a demostrar que els nanohíbrids $\text{UCNP}@ \text{CB}[n]$ ($n = 6 \text{ i } 7$) poden formar complexos d'exclusió amb aquest tipus de cromòfors a través del portal de carbonils lliure, que dona lloc a la formació dels nanohíbrids $\text{UCNP}@ \text{CB}@ \text{cromòfor}$. Açò possibilita la localització d'una gran concentració dels cromòfors prop de la superfície de les UCNP i, conseqüentment, permet la transferència d'energia des de la UCNP al cromòfor.

A més a més, el $\text{CB}[7]$ s'ha emprat per a l'acoblament de dos tipus diferents de nanopartícules, UCNP i nanopartícules de perovskita de $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbBr}_3$ (PK). Aquesta innovadora estratègia, permet la localització de les PK fermament i molt pròximes a la superfície nua de les UCNP, el que comporta a la formació dels nanohíbrids $\text{UC}_n@ \text{PK}_{\text{CB}}$.

Un microscopi confocal d'escombrat amb làser multifotònic comercial s'ha utilitzat per a verificar l'èxit de l'acoblament. Aquesta tècnica ha demostrat ser útil per a avaluar temps de vida de luminiscència en el rang de diverses desenes de microsegons i permet l'avaluació de l'eficiència de la transferència d'energia ressonant no trivial des de la UCNP a la PK després de l'excitació en el NIR, així com la homogeneïtat de la mostra $\text{UC}_n@ \text{PK}_{\text{CB}}$. A més, s'ha demostrat la fotoestabilitat de la perovskita en aquests nanohíbrids després de la irradiació perllongada del nanohíbrid amb llum UV i NIR.

I per últim, però no menys importat, les UCNP s'han recobert amb una capa fina de polímer després de reemplaçar el lligand oleat pel copolímer multiquelante $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA-co-SEMA})$, ancorat a

la superfície de les UCNP a través de grups tiolats. La presència de les cadenes laterals de 2-(2-metoxietoxi)etil, que s'estenen cap a fora del nanohíbrid, els fa dispersables en aigua i termosensibles. Els nanohíbrids UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA) han exhibit un augment de l'emissió de 10 vegades, en comparació amb el seu precursor hidrofòbic en diclorometà, i 2 vegades major en aigua.

A més, el pH modula les propietats termosensibles dels nanohíbrids. Açò és consistent amb la presència d'alguns grups tiol a la perifèria del nanohíbrid. Cal destacar, que l'emissió del nanohíbrid, així com la seua estabilitat, era independent de l'estat d'agregació (en el rang de pH i temperatures estudiades). La formació de UCNP dispersables en aigua, que presenten un augment de la seua emissió i, a més a més, propietats amfifíliques i termosensibles, és molt prometedora per al disseny de nanoestructures multifuncionals per a, per exemple, la seua aplicació en imatge intracel·lular, teràpia i l'alliberament controlat de fàrmacs.

Publicaciones

Publicaciones en las que está basada esta tesis

1. Voliani, V.; Gemmi, M.; Francés-Soriano, L.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. **“Texture and Phase Recognition Analysis of β -NaYF₄ Nanocrystals.”** *J. Phys. Chem. C.* **2014**, 118, 11404-11408.
2. González-Béjar, M.; Liras, M.; Francés-Soriano, L.; Voliani, V.; Herranz-Pérez, V.; Duran-Moreno, M.; Garcia-Verdugo, J. M.; Alarcon, E. I.; Scaiano, J. C.; Pérez-Prieto, J. **“NIR excitation of upconversion nanohybrids containing a surface grafted Bodipy induces oxygen-mediated cancer cell death.”** *J. Mater. Chem. B.* **2014**, 2, 4554-63.
3. Francés-Soriano, L.; Liras, M.; Kowalczyk, A.; Bednarkiewicz, A.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. **“Energy transfer in diiodoBodipy-grafted upconversion nanohíbrids.”** *Nanoscale.* **2016**, 8, 204-208.
4. Francés-Soriano, L.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. **“Cucurbit[n]uril-capped upconversion nanoparticles as highly emissive scaffolds for energy acceptors.”** *Nanoscale.* **2015**, 7, 5140-46
5. Francés-Soriano, L.; Gonzalez-Carrero, S.; Navarro-Raga, E.; Galian, R. E.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. **“Efficient Cementing of CH₃NH₃PbBr₃ Nanoparticles to Upconversion Nanoparticles Visualized by Confocal Microscopy.”** *Adv. Funct. Mater.* **2016**, 26, 5131-5138.
6. Liras, M.; González-Béjar, M.; Peinado, E.; Francés-Soriano, L.; Pérez-Prieto, J.; Quijada-Garrido, I.; García, O. **“Thin Amphiphilic Polymer-Capped Upconversion Nanoparticles: Enhanced Emission and Thermoresponsive Properties.”** *Chem. Mater.* **2014**, 26, 4014-22.

Otras publicaciones

1. Francés-Soriano, L.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. **“Chapter 5-Synergistic Effects in Organic-Coated Upconversion Nanoparticles, In Upconverting Nanomaterials: Perspectives, Synthesis, and Applications”** Altavilla, C., Ed.; CRC Press Boca Raton, Florida (USA), **2016**, 101-138.
2. Gonzalez-Carrero, S.; Francés-Soriano, L.; González-Béjar, M.; Agouram S.; Galian, R. E.; Pérez-Prieto, J. **“The Luminescence of CH₃NH₃PbBr₃ Perovskite Nanoparticles Crests the Summit and Their Photostability under Wet Conditions is Enhanced.”** *Small*. **2016**, 12, 5245-5250.
3. Recalde, I.; Estébanez, N.; Francés-Soriano, L.; Liras, M.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. **“Upconversion nanoparticles with a strong acid-resistant capping.”** *Nanoscale*. **2016**, 8, 7588-7594.
4. Marciniak, L.; Prorok, K.; Francés-Soriano, L.; Pérez-Prieto, J.; Bednarkiewicz, A. **“A broadening temperature sensitivity range with a core-shell YbEr@YbNd double ratiometric optical Nanothermometer.”** *Nanoscale*. **2016**, 8, 5037-5042.
5. González-Béjar, M.; Francés-Soriano, L.; Pérez-Prieto, J. **“Upconversion nanoparticles for bioimaging and regenerative medicine.”** *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2016**, 4, 47(1)-47(9).
6. Francés-Soriano, L.; Pocoví-Martínez, S.; Pérez-Prieto, J.; González-Béjar, M. **“Reversible phase transfer of quantum dots by gas bubbling.”** *Green Materials*. **2014**, 2, 62-68.
7. Pocoví-Martínez, S.; Francés-Soriano, L.; Zaballos-García, E.; Scaiano, J. C.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. **“CO₂ switchable nanoparticles: reversible water/organic-phase exchange of gold nanoparticles by gas bubbling.”** *RSC Adv.* **2013**, 3, 4867-4871.
8. Delgado-Pérez, T.; Holmquist, M.; Francés, L.; Gálvez, J.; García-Doménech, R. **“Aplicación de la topología molecular**

para la predicción de la biodegradación anaerobia de clorofenoles.” *Afinidad*. **2013**, 70, 107-111.

9. Plane, J. M.; Whalley, C. L.; Frances-Soriano, L.; Goddard, A.; Harvey, J. N.; Glowacki, D. R.; Viggiano, A. A. “**O₂(a¹Δ_g) + Mg, Fe, and Ca: experimental kinetics and formulation of a weak collision, multiwell master equation with spin-hopping.**” *J. Chem. Phys.* **2012**, 137, 014310(1)-014310(13).

Texture and Phase Recognition Analysis of β -NaYF₄ Nanocrystals

Valerio Voliani,^{*,†,‡,§} Mauro Gemmi,[‡] Laura Francés-Soriano,[§] María González-Béjar,[§]
and Julia Pérez-Prieto^{*,§}

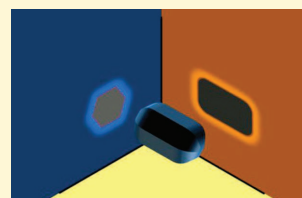
[†]NEST - Scuola Normale Superiore and Istituto Nanoscienze-CNR, Piazza San Silvestro 12, 56127 Pisa, Italy

[‡]Center for Nanotechnology Innovation @NEST, Istituto Italiano di Tecnologia, Piazza San Silvestro 12, 56127 Pisa, Italy

[§]Universitat de Valencia, Instituto de Ciencia Molecular, ICMol, Catedrático Jose Beltrán, 2, 46980 Paterna, Valencia, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Texture and phase recognition analysis (TPRA) based on electron nanodiffraction technique is used to characterize the geometry of up-conversion nanocrystals (UCNCs) synthesized by the common thermal-decomposition protocol in the presence of a stoichiometric amount of NH₄F. Here, we confirmed experimentally that despite the apparently different shapes of samples (hexagons, rods, and cubes), all the nanocrystals are actually β -phase hexagonal prisms. This is of relevance since many biological features of nanostructures, such as cellular internalization and cytotoxicity, are governed by their geometry. In addition, reproducibility in biological experiments is paramount.



INTRODUCTION

Lanthanide-doped up-converting nanocrystals (UCNCs) exhibit excellent chemical and thermal stability, as well as low cytotoxicity.^{1–5} They can be excited by NIR light, leading to discrete emission in the visible, i.e., well-separated from the infrared, excitation, with an absolute quantum yield of about 0.3% (30 nm UCNCs),^{4,6} and they present high resistance to photobleaching and photoblinking.^{7,8} In addition, the significantly small spectral overlap of their emission with that of endogenous cellular fluorophores allows a virtually non-autofluorescent background, and consequently a high signal-to-noise ratio in cellular imaging.⁹

As a result, UCNCs overcome several problems associated with conventional imaging probes and have recently emerged as highly promising nanomaterials for a variety of biomedical research applications, from multimodal imaging to drug delivery and therapy, such as cell-labeling and tracking,¹⁰ small animal imaging,¹¹ delivery of drugs and genetic material,^{12,13} photodynamic therapy,¹⁴ and photothermal therapy.¹⁵

To transfer UCNCs from proof-of-concept materials to real biomedical applications some key parameters must be taken into account, among which is their geometry (size and shape).^{8,16,17} This is a point of considerable interest for the reproducibility of biological experiments, as otherwise different batches of the same nanomaterial could display different results in cell studies. Indeed, it has been demonstrated that, in general, the size and shape of a nanoparticle strongly affect^{16,18} (i) the kinetics of uptake and the saturation concentration of the cellular internalization, (ii) the binding and activation energy of membrane receptors and subsequent protein expression, and (iii) their cytotoxicity.

Unfortunately, transmission electron microscopy (TEM) images of UCNCs produced by common protocols^{8,19,20}

usually show a mix of structures, such as hexagons/rods and cubes/rods. The same behavior is also shown by one of the most typical methods to synthesize β -phase UCNCs, namely the thermal-decomposition process using both lanthanide chloride precursors and a stoichiometric amount of NH₄F.^{20–25}

We suspected that such heterogeneity in the samples could be merely apparent, i.e., a matter of perspective. An intriguing method to analyze the real geometry of UCNCs batches would be the texture and phase recognition analyses (TPRA). This is a novel technique able to exploit with nanometrical resolution the recording of electron diffraction patterns with narrow electron beams (from 50 to 1 nm). In this method, the electron beam is scanned on an area of a few μm^2 while the TEM is kept in diffraction mode, and the crystal phase and its crystallographic orientation of each recorded pattern are assigned.²⁷

Here we report a texture analysis study which demonstrates that although TEM images of the same batch of UCNCs apparently showed different shapes (rods, cubes, and/or hexagons), the nanocrystals were all hexagonal prisms. This fact was found for nanoparticles prepared by the thermal-decomposition strategy in the presence of NH₄F and using different temperature conditions. Thus, we also demonstrate that the aspect ratio of the UCNCs depends on the temperature at which NH₄F is added and on the temperature at which the reaction is conducted. These results address and confirm experimentally the geometrical uniformity of UCNCs synthesized by the stoichiometric addition of the fluoride reagent.

Received: March 14, 2014

Revised: May 7, 2014

Published: May 8, 2014

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and used as-received.

Synthesis of Up-Converting NaYF₄:Yb³⁺ (18%), Er³⁺ (2.0%) Nanoparticles. UCNCs were synthesized following a protocol reported elsewhere with some modifications.²

Briefly, YCl₃·6H₂O (0.8 mmol), YbCl₃·6H₂O (0.18 mmol), and ErCl₃·6H₂O (0.02 mmol) were mixed with 12 mL of oleic acid and 15 mL of octadecene (ODE) in a 50-mL round-bottom Pyrex flask under continuous stirring. The solution was heated under nitrogen atmosphere at 160 °C until a homogeneous solution was obtained (ca. 30 min). The mixture was then cooled to 100 or 140 °C (see Table 1) and 10 mL of

Table 1. Samples Synthesized at a Particular Ratio of the Temperature of NH₄F Addition to the Temperature of the Reaction (T_{add}/T_r) and Relative Geometry

	$T_{\text{add}} / ^\circ\text{C}$	$T_r / ^\circ\text{C}$	shape	TEM	size/nm
S1	100	305	rods		$34.9 \pm 2.0 \times 21.3 \pm 1.9$
S2	i.d.	i.d.	rods		$33.1 \pm 2.9 \times 19.5 \pm 1.9$
S3	i.d.	i.d.	rods		$36 \pm 3.2 \times 20.1 \pm 1.9$
S4	i.d.	i.d.	rods		$33.9 \pm 2.8 \times 20.8 \pm 2.1$
S5	100	315	rods		$40.2 \pm 2.9 \times 21.1 \pm 2.6$
S6	110	305	rods		$36.1 \pm 2.4 \times 19.6 \pm 2.7$
S7	i.d.	i.d.	rods		$35 \pm 2.2 \times 21 \pm 2.3$
S8	110	315	rods		$46.5 \pm 2.5 \times 20.8 \pm 2.3$
S9	i.d.	i.d.	rods		$41.1 \pm 4.0 \times 25.2 \pm 3.9$
S10	140	305	cubic (square)		30 ± 3
S11	140	315	cubic (square)		53 ± 3
S12	150	315	cubic (square)		40 ± 3

methanol solution containing NaOH (2.5 mmol) and NH₄F (4.0 mmol) was added dropwise. The solution was stirred under nitrogen bubbling to remove methanol (ca. 30 min) and then the solution was heated at 300 or 315 °C for 1 h. Afterward, the solution was cooled at room temperature and the nanocrystals were precipitated by centrifugation (10 000 rpm, 10 min, 25 °C). Finally, the oleate-capped UCNCs were washed three times with hexane/acetone/methanol (43.5:40.5:16 v/v) solution.

TEM Imaging. TEM images of the samples at 0° tilt were obtained by using a JEOL JEM-1010 instrument operated at 100 kV. TEM analysis was carried out on a Zeiss Libra 120 operating at 120 kV equipped with an in-column omega filter. TEM grids (copper/carbon grids, 300 mesh) were prepared by putting on them one drop of colloid (0.5 mg/mL). After evaporation of the solvent, the grid was stored dry and imaged the day after. Nanoparticles sizes were calculated by using ImageJ software.

Texture Analysis and Phase Recognition. Texture analysis was carried out using an ASTAR software and hardware package of the Nanomegas Company directly connected to the Zeiss libra microscope through the Nanomegas Digistar P1000 device.²⁸

The diffraction patterns obtained during the scanning of the beam are recorded directly on the fluorescent screen using an external fast CCD that is able to collect 50–20 patterns per second. A data collection of 40 000 patterns corresponding to a grid of 200 × 200 points was recorded in half an hour. The spatial resolution of the data collection depends on the size of the beam. In our TEM, which is not a field emission gun, we were limited primarily not by the size of the beam but by its

brightness instead. The smaller beam size used to record a well-defined pattern was 10 nm, with a sampling step of 4 nm. The patterns can be collected in standard nano diffraction mode or in precession mode and we used the former in the sample having smaller crystal sizes (S1,S5) and the latter (with precession angle of 1°) in the sample having larger crystal sizes (S10, S11). Although the matching is more efficient with precession on, we choose to not use precession in the smaller size samples because the unavoidable small blurring of the beam in precession mode can be critical when the crystal size is approaching the beam size. The set of recorded patterns was analyzed through specific software that performs a matching between the experimental patterns and a set of generated patterns according to all possible crystal orientations of a selected crystal phase. The database for each phase can be generated in the case of the presence of several crystal phases in the sample.

RESULTS AND DISCUSSION

NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ up-conversion nanocrystals (UCNCs) were synthesized following a previously described method² that uses a stoichiometric amount of NH₄F. The reaction was initially conducted with two different addition (T_{add} , 100 and 140 °C) and reaction (T_r , 305 and 315 °C) temperatures (samples S1, S5, S10, S12, Table 1).

Interestingly, TEM bright field images at 0° tilt showed that the resulting UCNCs apparently have a stochastic mix of rod/hexagon or cube/hexagon shapes, depending on the T_{add} (100 or 140 °C, respectively). Moreover, the size of the nanoparticles increased with T_r (Table 1, Figure 1 and Supporting

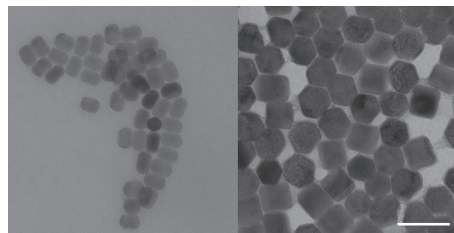


Figure 1. TEM images of UCNCs made at different T_{add}/T_r (respectively, S5 and S11) deposited on TEM grids from chloroform solution. Scalebar 100 nm.

Information (S1) Figure S1). Our data are in accordance with other data reported elsewhere using similar reactions.²⁶ Usually, the control over the final shape of UCNCs in this type of high temperature processes can be explained from the point of view of system-free energy without taking the free energy change of organic species into account.²⁶

UCNCs were then imaged at different tilt angles (45° and 60°) in order to verify if these two different typologies of particles were actually related to two different crystal shapes. At high tilt angles, the hexagonal-shaped nanoparticle appeared as an elongated prism (Figure 2 and SI Figures S2–3), while the rod-shaped nanoparticle presented an almost hexagonal shape if the tilt axis was normal to its longest side or remained unchanged if the tilt axis was parallel to that side. These observations suggested that the particles all have the same hexagonal prismatic shape.

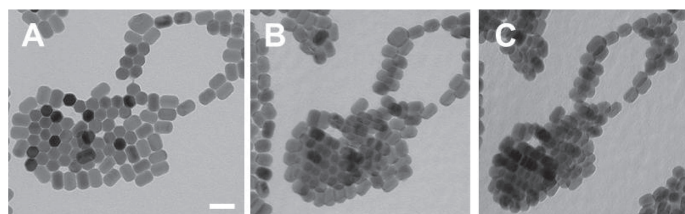


Figure 2. TEM images of S5 tilted at 0° (A), 45° (B), and 60° (C). After tilting, the hexagons show a prismatic-shape. Scalebar 50 nm.

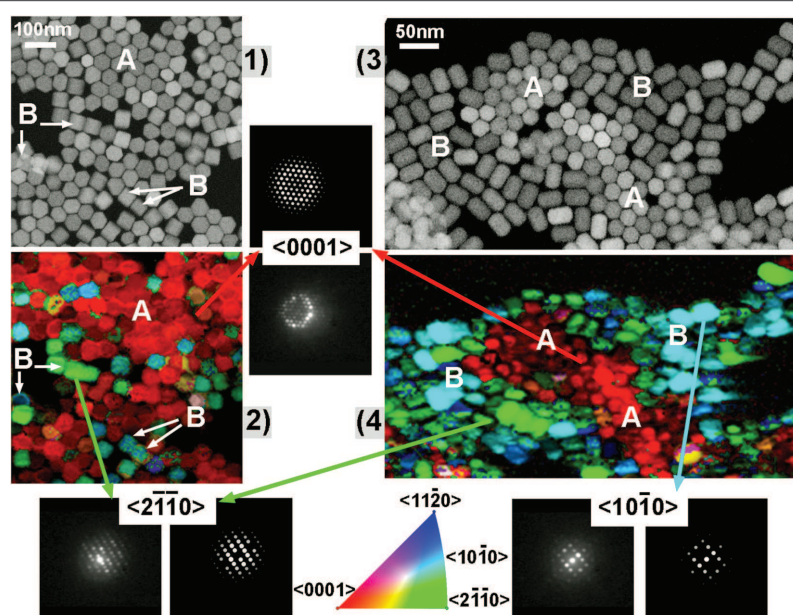


Figure 3. (1, 2) STEM image and orientation map of an aggregate of nanoparticles belonging to S5. (3, 4) STEM image and orientation map of an aggregate of nanoparticles belonging to S11. To facilitate the interpretation of the map the color code corresponding to different crystallographic directions is reported at the bottom. Patterns corresponding to almost precise $\langle 0001 \rangle$, $\langle 2-1-10 \rangle$, and $\langle 10-10 \rangle$ orientations are displayed together with the corresponding simulated best match. Regions of hexagonal particles and regions of rod/square particles are indicated with A and B, respectively. For an interpretation of the crystallographic orientations in terms of crystal faces it must be recalled that $\langle 0001 \rangle$, $\langle 2-1-10 \rangle$, and $\langle 10-10 \rangle$ general crystal directions are parallel to the corresponding $\{0001\}$, $\{2-1-10\}$, and $\{10-10\}$ general reciprocal directions.

To check if their shape was related to a specific crystallographic orientation of the nanocrystals, we carried out a texture analysis on the UCNCs samples showing hexagonal, rectangular, and cubical shapes. Note that we refer to the orientation of the normal to the observed plane (usually indicated as z direction), expressed in crystal coordinates, when we indicate crystallographic orientation.

Texture and phase recognition analyses (TPRA) record the electron diffraction patterns with narrow electron beams by scanning an area of a few μm^2 in the TEM kept in diffraction mode. Then, the ASTAR software (see Experimental Section) assigns the crystal phase and its crystallographic orientation to each recorded pattern, thus obtaining texture and phase maps of the investigated area.²⁷ We would like to stress here that, thanks to TPRA, we were able to address and confirm experimentally the shape of the nanocrystals.

The diffraction patterns of the samples were compared to two databases generated according to the hexagonal²⁹ and cubic³⁰ crystal structures of NaYF_4 . Orientation and phase maps registered for samples S5 and S11 are displayed in Figures 3 and 4. From these maps it emerges that, regardless of their shapes, all the nanoparticles belong to the hexagonal phase. If a crystal presents a hexagonal shape, its crystallographic orientation is always close to $\langle 0001 \rangle$ (red), usually corresponding to the hexagonal top and bottom faces of the prism. The rectangular nanoparticles have orientations close to $\langle 10-10 \rangle$ and $\langle 2-1-10 \rangle$ (light blue or green-blue), ascribable to two possible lateral faces of a hexagonal prism. The texture analysis of sample S5 (and also that of S11) was consistent with nanoparticles of a hexagonal prismatic shape with a preferential growth along the $\langle 0001 \rangle$ direction.

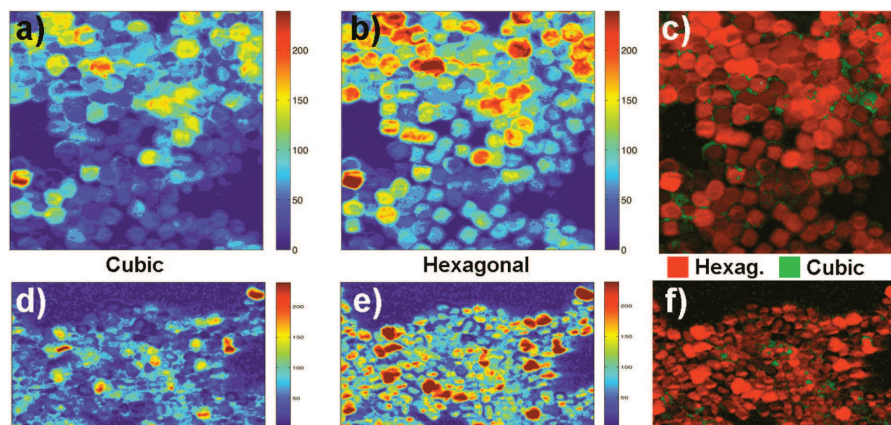


Figure 4. Plots of the agreement factor (index) given by the indexing program for matching the cubic (a, d) and the hexagonal (b, e) NaYF_4 phases and the corresponding phase map with the best choice (c, f). The plots at the top correspond to the S11 sample while those at the bottom correspond to the S5 sample. The areas pictured correspond to those shown in Figure 3. The agreement factor is systematically higher for the hexagonal phase.

The samples containing UCNCs with the usual hexagonal shape and those with a shape approaching a square showed similar behavior. Indeed, the texture analysis of S11 confirmed that, also in this case, all the nanoparticles had a hexagonal crystal structure and that those with a hexagonal shape had a crystallographic orientation close to (0001). The square nanoparticles had an orientation which was always normal to (0001). Therefore, though they had grown with a similar rate along the axial and lateral directions of the prism, the texture analysis confirmed once again that the nanoparticles had a hexagonal prismatic shape.

Finally, the dependence of the stochastic distribution of UCNCs on TEM grids was also studied. The deposition after different sonication time resulted in no differences in the final images, suggesting that there was no organization of UCNCs in superstructures, such as tiled floor, when suspended in solvents. Neither did the polarity of the solvents induce significant variation in the preferential deposition of the structures on one face, contrary to the results of a previous work.²⁶ Indeed, the UCNCs were suspended and tested in solvents such as dichloromethane, toluene, diethyl ether, THF, and ethyl acetate, and no differences were observed among the final samples (data not shown). This discrepancy could be ascribed to differences in the synthetic procedure to obtain the UCNCs.

CONCLUSIONS

In summary, we have demonstrated by TPRA that the UCNCs, prepared using a stoichiometric amount of the fluoride reagent and different T_{add}/T_r temperatures, are actually hexagonal prisms. In addition, it is possible to control the shape of the nanoparticles by the T_{add} and to control their final size by the T_r . Therefore, biological experiments performed on these types of UCNCs should not concur in misinterpretation caused by the observation by transmission electron microscopy (TEM) of different geometries in the UCNC batch. Remarkably, texture and phase analysis based on electron nanodiffraction is crucial to prove the single phase nature of the sample and to confirm

the interpretation in terms of hexagonal prismatic shape of the UCNCs.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

TEM images of the samples at various tilted angles. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: v.voliani@sns.it

*E-mail: julia.perez@uv.es

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project CTQ2011-27758, M.G.B Juan de la Cierva contract and L.F.S. FPU). This research was supported by (i) a Marie Curie Career Integration Grant within the seventh European Community Framework Programme, and (ii) the Tuscany Region Grant for Innovation Exonodi in collaboration with Exosomics Siena S.p.A. We thank prof. Stefano Luin for his support.

REFERENCES

- (1) Wang, F.; Liu, X. Recent Advances in the Chemistry of Lanthanide-Doped Upconversion Nanocrystals. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 976–89.
- (2) Voliani, V.; González-Béjar, M.; Herranz-Pérez, V.; Duran-Moreno, M.; Signore, G.; García-Verdugo, J. M.; Pérez-Prieto, J. Orthogonal Functionalisation of Upconverting NaYF_4 Nanocrystals. *Chem.—Eur. J.* **2013**, *19*, 13538–13546.
- (3) Zhou, J.; Liu, Z.; Li, F. Upconversion Nanophosphors for Small-Animal Imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1323–49.
- (4) Van Veggel, F. C. J. M.; Dong, C.; Johnson, N. J. J.; Pichaandi, J. Ln(3+)-Doped Nanoparticles for Upconversion and Magnetic

Resonance Imaging: Some Critical Notes on Recent Progress and Some Aspects to Be Considered. *Nanoscale* **2012**, *4*, 7309–21.

(5) Boyer, J.-C.; Carling, C.-J.; Gates, B. D.; Branda, N. R. Two-Way Photoswitching Using One Type of near-Infrared Light, Upconverting Nanoparticles, and Changing Only the Light Intensity. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15766–72.

(6) Boyer, J.-C.; van Veggel, F. C. J. M. Absolute Quantum Yield Measurements of Colloidal $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$, Yb^{3+} Upconverting Nanoparticles. *Nanoscale* **2010**, *2*, 1417–9.

(7) Idris, N. M.; Li, Z.; Ye, L.; Sim, E. K. W.; Mahendran, R.; Ho, P. C.-L.; Zhang, Y. Tracking Transplanted Cells in Live Animal Using Upconversion Fluorescent Nanoparticles. *Biomaterials* **2009**, *30*, 5104–13.

(8) Shen, J.; Zhao, L.; Han, G. Lanthanide-Doped Upconverting Luminescent Nanoparticle Platforms for Optical Imaging-Guided Drug Delivery and Therapy. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *65*, 744–755.

(9) Dong, H.; Sun, L.; Yan, C. Basic Understanding of the Lanthanide Related Upconversion Emissions. *Nanoscale* **2013**, *5*, 5703–5714.

(10) Nam, S. H.; Bae, Y. M.; Park, Y. I.; Kim, J. H.; Kim, H. M.; Choi, J. S.; Lee, K. T.; Hyeon, T.; Suh, Y. D. Long-Term Real-Time Tracking of Lanthanide Ion Doped Upconverting Nanoparticles in Living Cells. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 6093–7.

(11) Nyk, M.; Kumar, R.; Ohulchanskyy, T. Y.; Bergey, E. J.; Prasad, P. N. High Contrast in Vitro and in Vivo Photoluminescence Biomaging Using near Infrared to near Infrared up-Conversion in Tm^{3+} and Yb^{3+} Doped Fluoride Nanophosphors. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3834–3838.

(12) Wang, C.; Cheng, L.; Liu, Z.; Tao, H. Drug Delivery with Upconversion Nanoparticles for Multi-Functional Targeted Cancer Cell Imaging and Therapy. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1110–20.

(13) Guo, H.; Idris, N. M.; Zhang, Y. LRET-Based Biodetection of DNA Release in Live Cells Using Surface-Modified Upconverting Fluorescent Nanoparticles. *Langmuir* **2011**, *27*, 2854–2860.

(14) Shan, J.; Budijono, S. J.; Hu, G.; Yao, N.; Kang, Y.; Ju, Y.; Prud'homme, R. K. Pegylated Composite Nanoparticles Containing Upconverting Phosphors and Meso-Tetraphenyl Porphine (TPP) for Photodynamic Therapy. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 2488–2495.

(15) Cheng, L.; Yang, K.; Li, Y.; Chen, J.; Wang, C.; Shao, M.; Lee, S.-T.; Liu, Z. Facile Preparation of Multifunctional Upconversion Nanoparticles for Multimodal Imaging and Dual-Targeted Photothermal Therapy. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 7385–90.

(16) Verma, A.; Stellacci, F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. *Small* **2010**, *1*, 12–21.

(17) Voliani, V.; Ricci, F.; Luin, S.; Beltram, F. Peptidic Coating for Gold Nanospheres Multifunctionalizable with Photostable and Photolabile Moieties. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 14487–14493.

(18) Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 662–8.

(19) Wang, L.; Li, Y. Controlled Synthesis and Luminescence of Lanthanide Doped NaYF_4 Nanocrystals. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 727–734.

(20) Boyer, J.-C.; Vetrone, F.; Cuccia, L. A.; Capobianco, J. A. Synthesis of Colloidal Upconverting NaYF_4 Nanocrystals Doped with Er^{3+} , Yb^{3+} and Tm^{3+} , Yb^{3+} via Thermal Decomposition of Lanthanide Trifluoroacetate Precursors. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7444–5.

(21) Boyer, J.; Cuccia, L. A.; Capobianco, J. A. Synthesis of Colloidal Upconverting Monodisperse Nanocrystals. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 847–852.

(22) Mai, H.-X.; Zhang, Y.-W.; Si, R.; Yan, Z.-G.; Sun, L.; You, L.-P.; Yan, C.-H. High-Quality Sodium Rare-Earth Fluoride Nanocrystals: Controlled Synthesis and Optical Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6426–36.

(23) Mai, H.; Zhang, Y.; Sun, L.; Yan, C. Highly Efficient Multicolor Up-Conversion Emissions and Their Mechanisms of Monodisperse NaYF_4 : Yb, Er Core and Core/Shell-Structured Nanocrystals. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 13721–13729.

(24) Li, Z.; Zhang, Y. An Efficient and User-Friendly Method for the Synthesis of Hexagonal-Phase NaYF_4 :Yb, Er/Tm Nanocrystals with Controllable Shape and Upconversion Fluorescence. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 345606.

(25) Mai, H.-X.; Zhang, Y.-W.; Sun, L.-D.; Yan, C.-H. Highly Efficient Multicolor Up-Conversion Emissions and Their Mechanisms of Monodisperse NaYF_4 :Yb,Er Core and Core/Shell-Structured Nanocrystals. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 13721–13729.

(26) Mai, H. H.-X.; Zhang, Y.-W. Y.; Si, R.; Yan, Z.-G. Z.; Sun, L.; You, L.-P.; Yan, C.-H. High-Quality Sodium Rare-Earth Fluoride Nanocrystals: Controlled Synthesis and Optical Properties. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6426–6436.

(27) Portillo, J.; Rauch, E. F.; Nicolopoulos, S.; Gemmi, M.; Bultreys, D. Precession Electron Diffraction Assisted Orientation Mapping in the Transmission Electron Microscope. *Mater. Sci. Forum* **2010**, *644*, 1–7.

(28) Darbal, A. D.; Gemmi, M.; Portillo, J.; Rauch, E.; Nicolopoulos, S. Nanoscale Automated Phase and Orientation Mapping in the TEM. *Microsc. Today* **2012**, *20*, 38–42.

(29) Krämer, K. W.; Biner, D.; Frei, G.; Güdel, H. U.; Hehnen, M. P.; Lüthi, S. R. Hexagonal Sodium Yttrium Fluoride Based Green and Blue Emitting Upconversion Phosphors. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 1244–1251.

(30) Hund, F. Das Ternäre Fluorid NaYF_4 . *Z. Anorg. Chem.* **1950**, *261*, 106–115.

NIR excitation of upconversion nanohybrids
containing a surface grafted Bodipy induces
oxygen-mediated cancer cell death†María González-Béjar,^{‡*a} Marta Liras,^{‡be} Laura Francés-Soriano,^{‡a} Valerio Voliani,^{‡a}
Vicente Herranz-Pérez,^{‡cd} María Duran-Moreno,^{‡cd} Jose M. García-Verdugo,^{‡cd}
Emilio I. Alarcon,^{‡b} Juan C. Scaiano^{‡ab} and Julia Pérez-Prieto^{‡*a}

We report the preparation of water-dispersible, ca. 30 nm-sized nanohybrids containing NaYF₄:Er³⁺, Yb³⁺ up-conversion nanoparticles (UCNPs), capped with a polyethylene glycol (PEG) derivative and highly loaded with a singlet oxygen photosensitizer, specifically a diiodo-substituted Bodipy (IBDP). The photosensitizer, bearing a carboxylic group, was anchored to the UCNP surface and, at the same time, embedded in the PEG capping; the combined action of the UCNP surface and PEG facilitated the loading for an effective energy transfer and, additionally, avoided photosensitizer leaching from the nanohybrid (UCNP-IBDP@PEG). The effectiveness of the nanohybrids in generating singlet oxygen after near-infrared (NIR) excitation (975 nm) with a continuous wavelength (CW) laser was evidenced by using a probe molecule. *In vitro* assays demonstrated that the UCNP-IBDP@PEG nanohybrid was taken up by the SH-SY5Y human neuroblastoma-derived cells showing low cytotoxicity. Moreover, ca. 50% cancer cell death was observed after NIR irradiation (45 min, 239 mW).

Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2014, 2,
4554Received 28th February 2014
Accepted 6th May 2014

DOI: 10.1039/c4tb00340c

www.rsc.org/MaterialsB

Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is a non-invasive cancer treatment that after selective delivery/administration of a photosensitizer (PS) uses light as an activator to produce reactive oxygen species for sequential cancer eradication. This therapy is beneficial when compared to chemotherapy and radiotherapy since it minimizes toxicity of healthy cells and side effects such as nausea, vomiting, and immune-suppression.^{1,2} However, most of the photosensitizers lose photochemical activity and present

limited cell-penetrating capacity due to their easy aggregation and poor solubility in aqueous solutions;³ among them are photofrin,⁴ methylene blue,⁵ rose bengal,⁶ Zn-phthalocyanines,^{7,8} and merocyanine 540.⁹ Combination of photosensitizers (either *via* conjugation or complexation) with macromolecules, such as liposomes, lipids, and oligosaccharides,^{1,10–12} helps their delivery. In addition, silica-based nanoparticles were recently developed to entrap water-insoluble photosensitizing agents and proved to be effective PDT drug carriers in aqueous media.^{13,14}

Multifunctional nanosystems that integrate multiple materials with different properties can provide new opportunities for simultaneous diagnosis and therapy of diseases. In this regard, the search for efficient PDT-photosensitizer/nanomaterial nanohybrids has been encouraging research in the last decade.¹ The application of magnetic nanoparticles,¹⁵ optical down-converting nanoparticles, such as quantum dots¹⁶ and metallic nanoparticles,^{17–19} and photon up-converting nanoparticles¹ (UCNPs) is being explored as functional carriers of PDT-photosensitizers.

The so-called UCNPs are rare-earth fluoride nanocrystals, such as NaYF₄, co-doped with trivalent lanthanides (such as Er, Yb, Tm) and are particularly relevant in the field of PDT^{1,14,20–24} since they display good biocompatibility, narrow bandwidth, long-lived emission, high photostability, and no photoblinking.²⁵ Most importantly, they exhibit absorption in the near-infrared (NIR) region which penetrates soft tissues to a greater extent than visible light,^{1,21,26–29} and, consequently,

^aInstituto de Ciencia Molecular/ICMOL, Universidad de Valencia, C/José Beltrán 2, 46980, Paterna, Valencia, Spain. E-mail: maria.gonzalez@uv.es; julia.perez@uv.es^bDepartment of Chemistry and Centre for Catalysis Research and Innovation, University of Ottawa, 10, Marie Curie, Ottawa, Ontario, K1N 6N5, Canada^cLaboratorio de Neurobiología Comparada, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universidad de Valencia, CIBERNED, C/Catedrático José Beltrán, 2, 46980 Paterna, Valencia, Spain^dUnidad Mixta de Esclerosis Múltiple y Neuroregeneración, IIS Hospital La Fe, Valencia, Spain^eDepartamento de Química y Propiedades de Materiales Poliméricos, Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, CSIC, Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available: XRD, EDX, synthesis of IBDP dyes, UCNP-IBDP@PEG absorption spectrum and TGA, plot for singlet oxygen quantum yield determination, singlet oxygen emission spectrum and phosphorescence decay at 1270 nm, control assays of SH-SY5Y cells incubated with UCNP@PEG or control medium, and confocal images of UCNP-IBDP@PEG incubated with SH-SY5Y cells. See DOI: 10.1039/c4tb00340c

‡ The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

minimizes photo damage to living organisms and reduces autofluorescence background. Moreover, UCNPs can be excited with low-cost NIR continuous wave (CW) diode lasers which can be applied to illuminate large areas using low excitation energies and their emission wavelengths can be tuned as desired by selecting the co-doping lanthanide ratio.^{29,30} These interesting features make them useful for a large diversity of applications, among which bioimaging^{23,31–33} combines well with that of the photosensitizing capacity of UCNP–PS nanohybrids.³⁴ Comparatively, two-photon excited PDT also uses NIR light.¹ However, in this strategy, the photosensitizer (a photon down-converting PS) is excited by simultaneous absorption of two NIR low energy photons and requires the use of pulsed lasers as the light source to excite focused, small areas to obtain sufficient instantaneous energy to make the two-photon excitation possible.

There are several methods to make these UCNPs water-dispersible, such as coating them with silica^{35,36} or polymers.^{37–42} Specifically, PS embedded in silica-coated UCNPs (PS:Ru(bpy)₃²⁺,²⁴ zinc phthalocyanine (ZnPc),^{23,35} merocyanine 540,¹⁴ hypericin⁴³ and methylene blue⁴⁴) has recently been reported in the context of singlet oxygen generation. In addition, rose bengal,⁴⁵ ZnPc,^{46–48} pyropheophorbide a,⁴⁹ and chlorin e6 (Ce6)^{41,50} have been embedded in polymeric shells.

The drawbacks of some of these systems are the low PS payload and/or their leaching under experimental conditions. The high surface/volume ratio of the nanoparticles, combined with the capacity of their surface and ligands to establish stabilizing binding interactions with the PDT photosensitizer, is an appealing strategy for improving the UCNP efficiency as a nanocarrier. Consequently, an ideal UCNP–PS nanohybrid for PDT would be a water-dispersible nanosystem with a large loading of a photosensitizer that exhibits a high capacity to generate reactive oxygen species (ROS), such as singlet oxygen,

and is easily derivatized to incorporate a good anchoring group on the UCNP surface, thus making a considerable PS loading possible and, at the same time, avoiding leaching.

We report here the design and synthesis of β -NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ UCNPs carrying an efficient singlet oxygen photosensitizer, specifically a Bodipy derivative, anchored to its surface and embedded in the organic capping of the nanoparticle provided by a soft organic macromolecule such as a PEG derivative (Scheme 1). These nanoparticles, with a diameter of ca. 30 nm, bear a considerable loading of the Bodipy derivative, and are highly biocompatible *in vitro*. Their capacity for killing cancer cells after NIR excitation has been proven in an SH-SY5Y human neuroblastoma-derived cell line.

Experimental

Materials

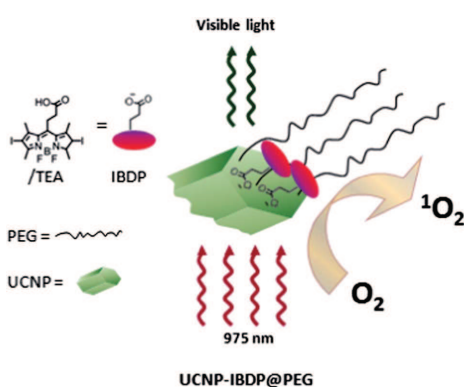
The chemicals used for the UCNP synthesis were: lanthanide chlorides (YCl₃·6H₂O, YbCl₃·6H₂O and ErCl₃·6H₂O (>99.9%, all of them)), 1-octadecene (95%), oleic acid (99.9%), NaOH and NH₄F (99.99%). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and used as received without previous purification. HS-PEG-NH₂ was purchased from Rapp-Polymer (3.0 kDa). 9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid (ABDA) was purchased from Aldrich. The synthesis of IBDP is described in the ESI.†

Synthesis of oleate-capped up-converting NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ nanoparticles: UCNP@oleate

NaYF₄:Yb, Er nanoparticles were synthesized following a previously reported protocol with some modifications.⁵¹ Briefly, YCl₃·6H₂O (0.8 mmol), YbCl₃·6H₂O (0.18 mmol), and ErCl₃·6H₂O (0.02 mmol) were mixed with 12 mL oleic acid and 15 mL octadecene (ODE) in a 50 mL round-bottom Pyrex flask under continuous stirring. The solution was heated to 160 °C. Once everything was dissolved, the mixture was cooled to 110 °C. A 10 mL methanol solution containing NaOH (2.5 mmol) and NH₄F (4.0 mmol) was slowly added into the flask. The metal-oleate complexes in solution were stirred with a glass-coated magnetic stirring bar while being slowly heated to remove methanol, degassed at 100 °C for 30 min, heated to 305 °C and, finally, kept under N₂ flux during one hour. Then, the solution was cooled to room temperature and the nanoparticles were precipitated by centrifugation (10 000 rpm, 10 min, 25 °C). Later on, UCNP@oleate nanoparticles were washed three times with a (43.5 : 40.5 : 16 v/v) hexane–acetone–methanol solution.

Synthesis of PEG-coated NaYF₄:Yb/Er up-converting nanoparticles: UCNP@PEG

These nanoparticles were prepared by using a method recently developed by our group.⁴⁰ A solution of UCNPs (10 mg) in degassed CHCl₃ (5 mL) was sonicated for 15 minutes. Then, 100 mg of HS-PEG-NH₂ were added. The solutions had 20 mg mL⁻¹ of the hetero-functional PEG. The conjugation process was



Scheme 1 Oversimplified image illustrating how UCNP@PEG (hexagonal nanoprisms with polymeric shell) transfers its energy (wavy green arrows) to IBDP (pink ovals: see structure on the left) coordinated to the UCNP surface after being excited with a 975 nm CW diode. Triplet–triplet energy transfer from IBDP to oxygen leads to singlet oxygen generation.

performed in the presence of an excess of the PEG derivative.³⁷ The mix was kept in N₂ under strong stirring at 60 °C overnight.

The opalescent solution was evaporated in a vacuum and 5 mL of MilliQ water were added. The dispersion was sonicated for 15 minutes. Then, 5 cycles of centrifugation at 10 000 rpm × 10 minutes with a total of 50 mL of acetonitrile were carried out in order to remove the oleate and PEG excess. The PEG-encapsulated UCNP (UCNP@PEG) were resuspended in 1 mL of MilliQ water (or triethylamine, TEA, 40 mM, pH 7.5) and stored at +4 °C for a maximum of one week before their use.

Synthesis of UCNP-IBDP@PEG

The nanohybrids used in all the studies reported here (unless indicated) were prepared as follows: a solution of UCNP@PEG (300 μL, 10 mg mL⁻¹) in triethylamine buffer (TEA, 40 mM, pH 7.5) was sonicated for 15 minutes and poured into a solution of 3-(2',6'-diiodo-1',3',5',7'-tetramethyl-4',4'-difluoro-4'-bora-3',4',4'-diazas-indacene-8'yl)propanoic acid (IBDP, 1.5 mg; UCNP-IBDP@PEG 1 mg per 0.5 mg ratio) in TEA (0.5 mg mL⁻¹). After stirring at RT for 24 h, the mixture was purified by centrifugation/sonication in acetonitrile (5 cycles of centrifugation for 10 minutes at 10 000 rpm; sonication for 15 min). The nanohybrids (UCNP-IBDP@PEG) were re-suspended in 3 mL of MilliQ water or TEA and stored at +4 °C.

Other UCNP-IBDP@PEG nanohybrids were prepared using different UCNP-IBDP@PEG weight ratios to determine the best IBDP loading for the ABDA photodegradation in the presence of oxygen (see Fig. S8 in the ESI†).

UV-visible absorption measurements

All UV-visible measurements were performed using an Agilent G1103A spectrometer equipped with quartz cuvettes. All samples were analyzed in MilliQ water or buffer solutions.

Fluorescence and up-conversion emission measurements

Up-conversion emission spectra were recorded by excitation at 975 nm using a CW 975 nm diode laser (Thorlabs L975P1WJ) as the excitation source coupled to the SLM Amingo Bowmann series 2 (AB2) fluorimeter (Microbeam, S.A.) and using a front-face set up.

Singlet oxygen quantum yield (Φ_Δ) calculations

The singlet oxygen phosphorescence decay traces were measured as follows: the aerated solutions placed in 1 × 1 cm² fused silica cuvettes and capped with septa were irradiated at 532 nm with a laser (frequency doubled at 532 nm, ~8 ns pulses, 12 mJ, from a Q-switched Nd:YAG laser at 1064 nm). NIR emission studies⁵² were carried out using a Peltier-cooled (-62.8 °C) Hamamatsu NIR detector (Model H10330-75) operating at 850 V coupled with a computer-controlled grating monochromator. A long pass filter, type FEL1150 filter from Thorlabs was placed in front of the monochromator. The photocurrent from the photomultiplier was stored on a digital oscilloscope (Tektronix TDS 2012). Signal rise times as short times (50 ns) were measured using the amplifier SR-445 from

Stanford Research. Luzchem LFP software was used to acquire and process the data. All samples were measured under identical experimental conditions (same irradiation, day, and system alignment).

The amount of singlet oxygen generated was determined from phosphorescence decay curves in the NIR region by registering the phosphorescence decay data at 1270 nm. The singlet oxygen quantum yield is defined as the number of emitting ¹O₂ molecules per photon absorbed by the photosensitizer. It has been estimated by using the ratio of slopes of linear plots of IBDP for the intensity of singlet oxygen phosphorescence (NIR excitation) against 1-10^{-A},⁵³ using a rose bengal (RB) solution in methanol as a standard, where A is the absorbance of the sample at the excitation wavelength. Different diluted solutions of IBDP and RB were prepared, such that their absorbance at the excitation wavelength (λ_{ex} = 532 nm) would be <0.40. Then the corresponding phosphorescence decay trace was recorded using this λ_{ex} and the quantum yield was obtained by:

$$\Phi_{\text{IBDP}} = \Phi_{\text{RB}} \frac{\text{slope}_{\text{IBDP}}}{\text{slope}_{\text{RB}}}$$

where RB stands for Rose Bengal used as a reference (Φ = 0.76)⁵⁴ and IBDP stands for the corresponding BDP derivative. Φ is the corresponding singlet oxygen quantum yield.

Singlet oxygen generation monitored by chemical photoconsumption of 9,10-anthracenediyl-bis(methylene) dimalonate (ABDA)

The samples were placed in quartz cuvettes (1 × 1 cm path length) and the emission was monitored in an AB2 series spectrofluorimeter. All measurements were carried out in oxygen-saturated deuterium oxide solutions at room temperature. A similar method has been previously used to determine the ability of other UCNP-photosensitizer nanocomposites to generate singlet oxygen.^{24,35} The induced generation of singlet oxygen was estimated by measuring the decrease of ABDA fluorescence due to the formation of its endoperoxide. Briefly, a phosphate buffer solution (pH 7.2, 1.5 mL) containing 1 mg mL⁻¹ of UCNP-IBDP@PEG and ABDA (2 × 10⁻⁵ M) solution was prepared and kept under stirring. This solution was irradiated with a CW 975 nm diode laser of 138.5 mW in order to excite the UCNP-IBDP@PEG and generate singlet oxygen, and the ABDA emission (λ_{ex} = 380 nm) was recorded at different time intervals. For comparative purposes, a solution of ABDA (2 × 10⁻⁵ M) in a phosphate buffer was also irradiated under the same conditions. In addition, a control sample containing UCNP-IBDP@PEG and ABDA was kept in the dark (except when taking its fluorescence λ_{ex} = 380 nm, monitoring at 400 nm) at different time intervals.

Transmission electron microscopy (TEM)

Transmission electron microscopy (TEM) images were taken using a Jeol 1010 microscope operating at 100 kV equipped with a charge-coupled device (CCD) camera. High resolution TEM (HRTEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) were

carried out by using a Field Emission Gun (FEG) TECNAI G2F20 microscope operated at 200 kV. Usually, for the preparation of the UCNP samples, 10 μL of a 0.5 mg mL^{-1} solution of the UCNPs was left to dry under air at room temperature on a formvar/carbon film supported on a 300 mesh copper grid.

Cytotoxicity assays

In vitro cytotoxicity was measured using a XTT Cell Proliferation Kit II (Roche, Mannheim, Germany) on SH-SY5Y cells (ATCC CRL-2266). Cells were seeded onto a 96-well plate at a density of 3×10^4 cells per well, under 100% humidity, and were cultured at 37 °C and 5% CO_2 for 24 h; different concentrations of UCNP-IBDP@PEG (0, 25, 50, 100 and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, diluted in culture medium) were then added to the wells. The cells were then incubated at 37 °C under 5% CO_2 for another 24 h.

The following day, an XTT reagent (50 μL ; 0.3 mg mL^{-1}) was added to each well and the plate was incubated at 37 °C under 5% CO_2 for 4 h. Then, the absorbance at 450 nm was measured with a standard scanning multi-well spectrophotometer (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Five replicates of each condition were carried out. The viability of untreated cells was assumed to be 100%, while relative viability of treated cells (%) was calculated using the formula shown below.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{mean of } A_{450} \text{ value of treatment group}}{\text{mean of } A_{450} \text{ value of control}} \times 100$$

Photodynamic performance of neuroblastoma cells with UCNP-IBDP@PEG

SH-SY5Y cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium/F-12 (DMEM/F-12) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 50 IU mL^{-1} penicillin, and 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin. SH-SY5Y cells were seeded onto 60 mm culture plates, allowed to incubate for 24 h at 37 °C and then washed with phosphate buffered saline (PBS).

A power-adjustable CW 975 nm diode laser (Thorlabs L975P1WJ) was collimated and used to irradiate the Petri dish. The output power was measured with a power-meter at the exact distance of the irradiation area (Thorlabs PM100A) and next, the cells were irradiated for 45 min. The Petri dish was kept at 37 °C while being irradiated.

Subsequently, cell viability was assessed by using a Cell LIVE/DEAD® Kit (Life Technologies). Fluorescence was recorded using a Zeiss Axiovert 40 CFL inverted microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany), in the 515–565 nm and 590–740 nm ranges for green (calcein) and red (EthD1), respectively. Images were adjusted for brightness and contrast and analyzed with Fiji imaging software. Quantification was conducted by counting living vs. dead cells in the microscope's field located right in the center of the irradiated area ($n = 3$ replicates).

Additionally, in order to check cellular fine morphology cells were seeded on 4-well Permax chamber slides (Nalgene Nunc International, Naperville, IL). Then, cells were irradiated as described above and subsequently fixed in 3.5% glutaraldehyde in a 0.1 M phosphate buffer (PBS) for 1 hour at 37 °C. Cells were post-fixed in 2% OsO_4 for 1 hour at room temperature and

stained in 2% uranyl acetate in the dark for 2 h at 4 °C. Finally, cells were rinsed in distilled water, dehydrated in ethanol, and embedded overnight in Durcupan resin (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Following polymerization, serial semithin sections (1.5 μm) were cut with a UC-6 ultramicrotome (Leica, Heidelberg, Germany) and stained with 1% toluidine blue. Digital photomicrographs were acquired using a Nikon Eclipse E800 microscope. Ultrathin sections (60–70 nm) were also prepared and stained with lead citrate (Reynolds' solution). Finally, photomicrographs were obtained under a FEI Tecnai G² Spirit transmission electron microscope (FEI Europe, Eindhoven, Netherlands) using a Morada digital camera (Olympus Soft Image Solutions GmbH, Münster, Germany).

Results and discussion

Synthesis of $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ UCNP coated with a PEG derivative and loaded with IBDP

Oleate capped $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ up-conversion nanoparticles (UCNP@oleate) were synthesized at high temperatures by using oleic acid and 1-octadecene as the organic capping ligand and a non-coordinating solvent, respectively.^{54,55,56} The XRD pattern of the UCNP (Fig. S1†) revealed the formation of the same pure hexagonal phase structure as that of bulk $\beta\text{-NaYF}_4$ (JCPDS 16-0334). The atomic ratios of lanthanides in the nanoparticles were obtained by energy-dispersive X-ray experiments (EDX) and were $\text{NaYF}_4(81\%)\text{:Yb}^{3+}(16\%), \text{Er}^{3+}(3\%)$; see Fig. S2.† Fig. 1 shows the transmission electron microscopy (TEM) and high-resolution TEM (HRTEM) images obtained for the mono-disperse hexagonal nanoprisms together with the histogram that shows that they had a uniform side length of approximately 16.1 ± 1.4 nm, a height of 25.8 ± 1.6 nm, and a base length of 18.0 ± 1.4 nm. These nanoparticles stood or lay on the TEM grids as shown in Fig. 1A and C. The HRTEM shows the clear lattice fringes with a d -spacing of 0.52 nm (Fig. 1C). This is in accordance with the lattice spacing in (100) planes of hexagonal $\beta\text{-NaYF}_4$ and it is indicative of their high crystallinity.⁴⁸

The coating of these particles made them hydrophobic; thus, the UCNP@oleate was coated with a layer of bifunctional polyethylene glycol (HS-PEG-NH₂) following our recently reported protocol.⁴⁰ The layer of the soft organic macromolecules made the UCNPs water-dispersible without increasing significantly their size.⁴⁰ In fact, a polymeric shell thickness of about 2.5 ± 0.6 nm was evident in the TEM images of the PEG-coated UCNPs (UCNP@PEG); see Fig. 1D–E. In addition, capping of the UCNP with PEG is advantageous from a biological point of view, since it is non-toxic and prevents agglomeration and non-specific interactions with proteins and cells.³⁷

The photosensitizer, 3-(2',6'-diiodo-1',3',5',7'-tetramethyl-4',4'-difluoro-4'-bora-3',a',4'-a-diaza-s-indacen-8'-yl)propanoic acid (IBDP, Scheme S1†), is easily prepared⁵⁸ (see the ESI†) and exhibits high extinction coefficients in the visible region, in particular *ca.* 525 nm (molar extinction coefficient of $202 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 525 nm), low probability of aggregation and resistance to photobleaching,^{58–61} high triplet quantum yield, due to the internal heavy atom effect,^{59,62} and a good anchoring group to the UCNP, specifically a carboxylic group.

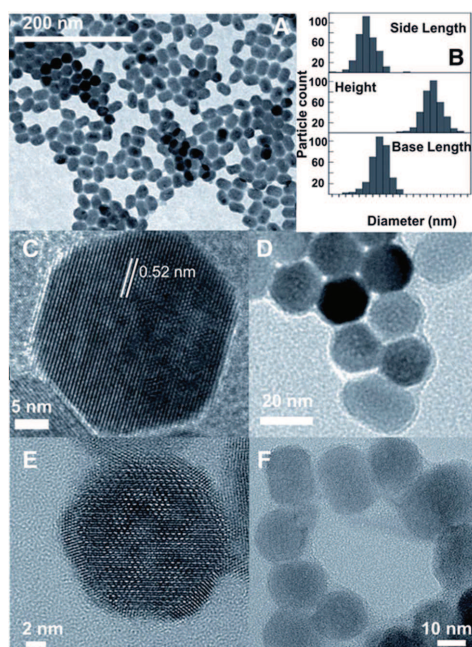


Fig. 1 (A) TEM images of UCNP@oleate nanoparticles. (B) Distribution of particle sizes of UCNP@oleate; mean size of 25.8 nm (height), and 16.1 nm (side length), and a base length of 18.0 ± 1.4 nm. (C) HRTEM images of a hexagonal nanoprism of UCNP@oleate. (D) TEM image of UCNP@PEG with a shell thickness of 2.5 nm. (E) HRTEM images of UCNP@PEG. (F) HRTEM image of UCNP-IBDP@PEG.

Fig. S3† shows the pink colloidal solution of the nanoparticle obtained after adding IBDP to UCNP@PEG at pH = 7.5, followed by centrifugation and purification. The UV-visible spectrum of this solution showed the incorporation of IBDP in the resulting UCNP (UCNP-IBDP@PEG); see Fig. S4.† This was further corroborated by ^{19}F -NMR; thus, the spectrum of the UCNP-IBDP@PEG nanohybrids showed a signal at -146 ppm, ascribed to IBDP (Fig. 2).

The effectiveness in the IBDP loading was estimated from the UV-vis absorption spectrum of UCNP-IBDP@PEG, by using the molar extinction coefficient of IBDP, and it tallied with TGA analysis (Fig. S5†). Thus, values of 43% and 10% with respect to the UCNP core (w/w) were estimated for IBDP and the PEG, respectively. Examples of Bodipy aggregation are rare.⁶³ Consequently, we did not detect the formation of the IBDP dimers, which would absorb at lower and higher wavelengths than the monomer,⁶³ in the UV-Vis absorption spectrum of a UCNP-IBDP@PEG nanohybrid in spite of the large cargo. The efficient PS loading is in accordance with the ability of the carboxylate groups to coordinate lanthanides⁶⁴ and offers advantages for PS loading.

The UCNP-IBDP@PEG nanohybrids proved to be stable in both water and PBS after keeping them in these media for three

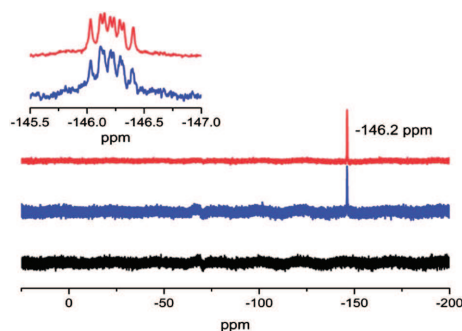


Fig. 2 ^{19}F -NMR of IBDP (top), UCNP-IBDP@PEG (middle) and UCNP@PEG (bottom) in CDCl_3 .

months. The stability of the nanohybrids was also checked in the cell culture medium (see Experimental section). After one week in this medium, the nanohybrids were recovered by centrifugation while the supernatant remained practically colourless.

Control experiments showed that the addition of IBDP to UCNP@oleate nanoparticles (under the same experimental conditions as those used with UCNP@PEG, *i.e.*, basic conditions, UCNP/ CH_3CN ; TEA/IBDP) led to the precipitation of the nanoparticles as a pink solid. This confirmed that the UCNP@IBDP nanohybrids were not dispersible in the medium due to the limited solubility of the Bodipy moiety at the nanoparticle periphery. Attempts to suspend these nanoparticles in water were not fruitful, while the supernatant remained colorless. This suggests that IBDP had become firmly grafted to the nanoparticle surface. In addition, this assay corroborated that PEG in the UCNP-IBDP@PEG nanohybrid played a key role in their water dispersibility. Moreover, under the same conditions, the addition of PM567, a Bodipy lacking the carboxylate group, to UCNP@oleate nanoparticles, led to a white solid and a yellowish solution evidencing that most of the nanoparticles were centrifuged out while PM567 remained dissolved (UCNP/ CH_3CN ; TEA/PM567).

Capacity of the UCNP-IBDP@PEG nanohybrid for singlet oxygen generation

Fig. 3 shows the UV-visible absorption spectrum of IBDP together with the upconversion luminescence spectra of UCNP@PEG and UCNP-IBDP@PEG in PBS upon 975 nm laser diode excitation. The UCNP@PEG emission spectrum exhibits an intense band at 540 nm ($^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$) with a small shoulder on the left ($^2\text{H}_{11/2}, ^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$) and another at *ca.* 670 nm ($^4\text{F}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$).^{65,66} As expected from the overlap between the absorption spectrum of IBDP and the emission features of the UCNP@oleate, UCNP-IBDP@PEG excitation at 975 nm led to a quenching of the emission bands where IBDP absorbs (decrease of a 32% of the intensity in the 513–560 nm range), whereas the red emission was nearly unchanged. This quenching did not

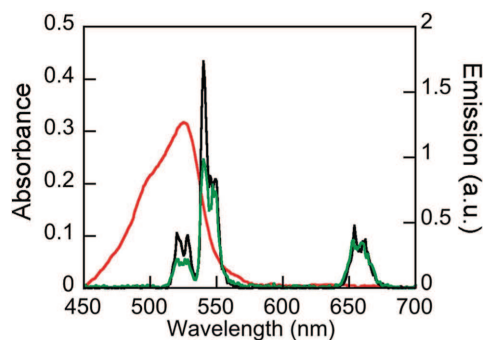


Fig. 3 IBDP (1.7 μM) UV-visible absorption spectrum (red line) and luminescence emission spectra of solutions of UCNP@PEG (1 mg mL^{-1} , black line) and UCNP-IBDP@PEG (1 mg mL^{-1} , green line) in PBS.

result in a new emission in the spectrum, as expected from the negligible fluorescence of IBDP ($\Phi_f = 0.02$ in methanol).⁵⁹

The efficiency of IBDP for $^1\text{O}_2$ generation (Φ_Δ) was estimated as 0.61 in methanol by using RB as a standard ($\Phi_\Delta = 0.76$, see Experimental section and Fig. S6–S7†). The effective generation of $^1\text{O}_2$ was also chemically demonstrated by using a singlet oxygen probe, specifically the disodium salt of 9,10-anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid (ABDA).^{35,67} Thus, the formation of singlet oxygen after excitation at 975 nm of UCNP-IBDP@PEG in aqueous solution (D_2O) was assessed by measuring the decrease of the ABDA emission, a selective singlet oxygen trap, as a function of the irradiation time using a 975 nm CW laser where only the UCNP core absorbs. Fig. 4 shows how the ABDA emission decreases with the exposure time of the nanohybrid to NIR, due to the formation of the corresponding, non-fluorescent ABDA endoperoxide. The data were fitted into an exponential decay function (rate constant for photobleaching of ABDA: $k = 2.57 \text{ min}^{-1}$); this behaviour has been previously attributed to the probe quenching by the generated singlet oxygen.¹⁴ The UCNP-IBDP@PEG proved

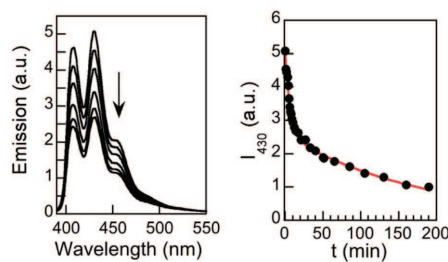


Fig. 4 Left: decrease in ABDA emission intensity over time due to singlet oxygen emission generated by NIR excitation of the UCNP-IBDP@PEG nanohybrid in deuterated water (time intervals: 0, 1, 4, 6, 10, 14 min). Right: decrease in the ABDA emission intensity registered at 430 nm for up to 200 min.

highly efficient in ABDA bleaching, since the emission of the latter decreased by *ca.* 50% after only 15 min of NIR irradiation with low power. Comparatively, under the same conditions, the irradiation of ABDA in the absence and in the presence of UCNP@PEG showed no decrease of ABDA fluorescence in the same time-scale.

Scheme 1 shows a simplified representation of the process that would produce singlet oxygen upon NIR excitation of the UCNP-IBDP@PEG nanohybrid. The photophysical pathways that are taken when this nanohybrid is excited with NIR light (975 nm) should be as follows. First, the upconversion process leads to the well-known erbium emissions. The IBDP derivative absorbs light from the $^4\text{F}_{7/2}$ and the $^2\text{H}_{11/2}$ erbium levels reaching its singlet-excited state that leads to its triplet excited state by intersystem crossing. Then, singlet oxygen is generated by triplet-triplet energy transfer from the IBDP triplet to oxygen in the ground state.

In vitro photocytotoxicity of UCNP-IBDP@PEG nanohybrids against cells

The UCNP-IBDP@PEG nanohybrid proved stable in PBS and cell culture medium and therefore, it further provided a suitable framework for biological applications. To corroborate this, human neuroblastoma SH-SY5Y cells were cultured at different concentrations of the nanohybrid in order to test their effect on cell proliferation. This was assessed by using an XTT-assay (Fig. S9†). Cell viability of the control cells was assumed to be 100%. After 24 h incubation with UCNP-IBDP@PEG at 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, no effect on cell viability was measurable. When the concentration of the nanohybrid was increased to 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, cell viability dropped to less than 10%. Only with a 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration, the toxicity of the nanohybrid was evident with a significant reduction of 40% in viable cells ($n = 5$; $P < 0.01$, Mann Whitney's "U" test). These safe working conditions in the 1–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ range are in accordance with those published^{68,69} by others using other UCNP derivatives and different cell types.⁷⁰ Furthermore, under the highest 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ condition irregular membranes, cellular aggregates, condensed nuclear chromatin and even picnotic cells were visible, as previously observed for the PEGylated UCNPs (data not shown).⁴⁰

The uptake of UCNP-IBDP@PEG by SH-SY5Y cells, incubated with 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of the nanohybrid diluted in a culture medium, was completed in 2 h. We were also able to detect cytoplasmic fluorescent signals in both the green and red emission spectra of the nanohybrid, highly co-localizing (Fig. S10†), which proved that this nanohybrid could be used for simultaneous cell imaging and PDT.⁴⁵ This confirms that UCNP-IBDP@PEG nanohybrids were taken up by cells and maintained their photosensitive characteristics intracellularly.

Then, our experiments demonstrated the efficacy of the *in vitro* PDT with the UCNP-IBDP@PEG nanohybrid, which led to destruction of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. Here, cells incubated with UCNP-IBDP@PEG (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) were irradiated for 45 min with CW laser light operating at 975 nm with a total power of 239 mW, thus resulting in a $50.6 \pm 3.2\%$ cell mortality.

The power used by us was below 1 W and therefore suitable for clinical applications and most PDT experiments. After NIR exposure the components of the LIVE/DEAD® Kit were added to the Petri dish as described in the protocol. Cells with compromised membranes exhibit red-fluorescence from the live-cell-impermeant nucleic acid stain ethidium homodimer-1 (EthD1) whereas cells with intact cell membranes convert nonfluorescent calcein AM into bright green-fluorescent calcein by using nonspecific cytosolic esterases.^{71–73}

It was determined that only NIR-irradiated cells were damaged whereas the non-irradiated cells remained intact (Fig. 5). Control experiments incubated with UCNP@PEG or in the absence of nanoparticles (Fig. S10 A–F and G–L,† respectively) did not show any cell death, thus proving that cell lethality is solely due to the irradiation of the UCNP–IBDP@PEG nanohybrid.

The human neuroblastoma SH-SY5Y cell line shows neuroblastic characteristics⁷⁴ and, thus, we presumed that it would serve as a good model to test our system *in vitro*. Consequently, we tested the potential use of this system for PDT. The mechanism of induced cell-death by cellular ¹O₂ accumulation was first thought to be due to necrosis,^{75,76} but it was later found to be caused mainly by apoptotic processes. This was supported by the most relevant morphological and biochemical changes observed in cells subjected to oxygen radicals: chromatin condensation, membrane alteration, and mitochondrial swelling and apoptotic bodies.^{23,77}

To further investigate the underlying processes triggered by NIR light irradiation of UCNP–IBDP@PEG incubated cells, we seeded SH-SY5Y cells in 4-well chamber slides and irradiated a

defined area of the well surface, while the rest of it remained completely out of the laser beam. We then obtained toluidine blue-stained semithin sections of the cell culture in order to appreciate the fine details of the cells (Fig. 6). We observed that the appearance of control cells was healthy, with no detectable differences between the irradiated and the non-irradiated cells (Fig. 6A and B). Conversely, when the nanohybrid-incubated cells were irradiated, they showed abundant signs of cell damage when compared to their non-irradiated counterpart (Fig. 6C and D).

These alterations included an increase in cytosolic vacuoles, swelling, irregular nuclear membranes and picnotic cells. When analyzed with electron microscopy, treated cells exhibited large masses of heterogeneous matter together with empty vacuole-like spaces (Fig. 6E). These structures measured up to 3 μm in diameter. Other cells presented smaller but more numerous masses. At higher magnification, UCNP–IBDP@PEG particles were detectable, highly electron-dense, in the periphery and within these structures (Fig. 6F). On occasions, membranous masses were also observed (Fig. 6G). Cytoplasmic vacuolization upon exposure to a variety of chemicals and bioactive substances has been extensively reported⁷⁸ and in our system it can be confidently attributed to singlet oxygen after NIR light irradiation.

It is essential to pursue new steps with the aim of maximizing PDT usefulness, since most studies report partial effectiveness in inducing cancer cell death and with a discrepant homogeneity.⁷⁹ Also, it is crucial to improve the specificity of anti-tumoral treatments, especially when surrounded by extremely sensitive areas like the central nervous

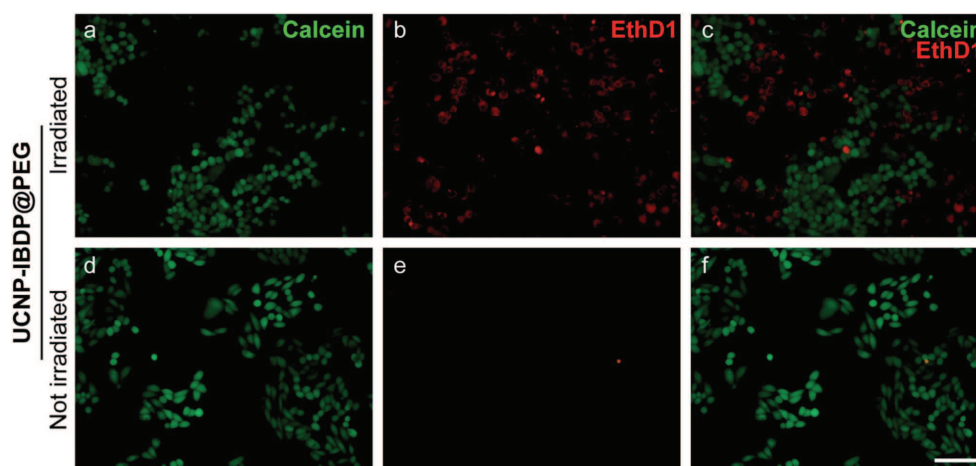


Fig. 5 SH-SY5Y cells incubated with UCNP–IBDP@PEG (A–F) were irradiated with a CW laser at 975 nm for 45 min. Cell viability was subsequently assayed with a Life Technologies LIVE/DEAD® Kit. Cells with compromised membranes exhibit red-fluorescence from the live-cell-impermeant nucleic acid stain ethidium homodimer-1 (λ_{ex} : 510–560 nm; λ_{em} : 590 nm). Cells with intact cell membranes are able to use nonspecific cytosolic esterases to convert nonfluorescent calcein AM into green-fluorescent calcein (λ_{ex} : 450–490 nm; λ_{em} : 515–565 nm). No perceptible changes were detected on the irradiation spot in either group (D–F). Scale bar = 100 μm.

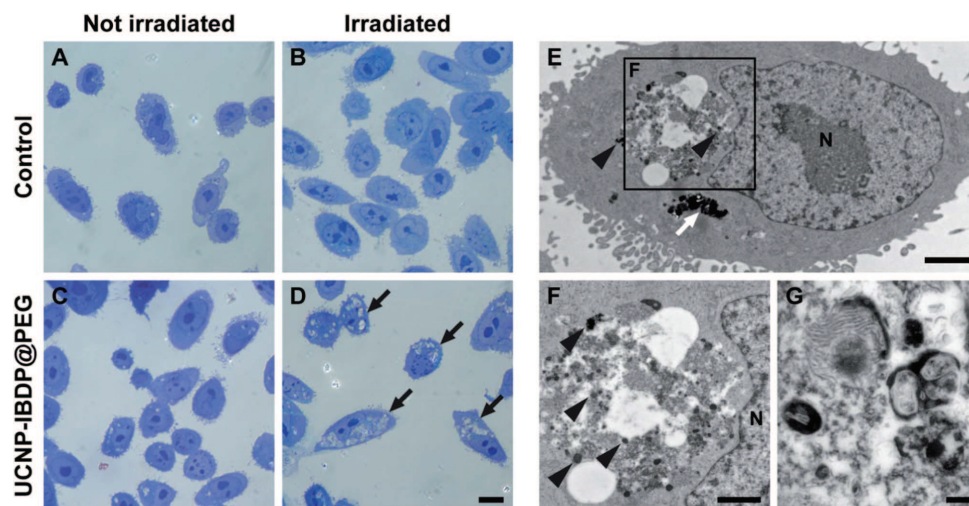


Fig. 6 Semithin and ultrathin sections of SH-SY5Y cells after irradiation with a 975 nm laser diode. Control (A and B) and UCNP-IBDP@PEG incubated cells (C and D) are compared in a NIR light irradiated zone and in a non-irradiated area of the same Petri dish. The nanohybrid-treated cells of the irradiated area (D) show exceptionally large vacuoles (black arrows) and signs of cellular damage. In electron microscopy images (E–G) UCNP accumulations are detectable (E, white arrow), and also scattered single nanoparticles (arrowheads) within masses of heterogeneous cellular matter. The rest of the cytoplasmic content and microvilli are well preserved. At higher magnification UCNPs are evident within the mass (F, arrowheads), which presents a heterogeneous appearance and severe vacuolization. This is the most frequent structure, although occasionally membranous structures are also found (G). (A–D) are toluidine blue-stained semithin sections, (E–G) are transmission electron microscopy images. N, nucleus. Scale bar: (A–D) = 10 μm ; (E) = 2 μm ; (F) = 1 μm ; and (G) = 200 nm.

system. This is still more challenging due to tumoral cell heterogeneity.

Our UCNP-IBDP@PEG nanohybrid allows for additional functionalization since it still has the ability to bind covalently other PS by using the free terminal amino groups, which would make a higher loading possible (although a higher loading does not guarantee a better PDT efficiency).^{46,50} The idea of PS co-loading using silica-coated UCNPs has been recently proven successful for PDT *in vivo*.⁶⁸ Alternatively, the free terminal amino groups would be of utmost importance for the addition of potential targeting ligands that provide specific nanoparticle–cell surface interactions, targeting nanoparticles to specific cancer cell membrane-receptor proteins. This facilitated guidance of ligands enhances cellular uptake into cancer cells, rather than increasing nanoparticle accumulation in the tumor's extracellular matrix.⁶⁰ For this reason, we think that our system represents a good candidate for PDT, with additional uses in bioimaging and ability to bind specific ligands in order to improve cell specificity.

Conclusions

In summary, we have successfully developed a UCNP-IBDP@PEG nanohybrid comprising an upconversion nanoparticle core and a PEG shell, and IBDP chemisorbed to the UCNP core surface and, at the same time, embedded in the PEG capping.

To the best of our knowledge, this is the first time that a photosensitizer has been chemisorbed on the UCNP surface. This nanocomposite, of *ca.* 30 nm diameter, acts as an efficient carrier of a considerable amount of the photosensitizer, it is dispersible in PBS and stable in the colloidal solution, and it generates reactive oxygen species after NIR excitation. These features make this nanohybrid an ideal candidate for PDT. The terminals on PEG chains are still available for conjugation with, for example, targeting ligands or other photosensitizers matching the absorption of the red emission of the UCNP (for complete use of upconversion energy to maximize PDT efficiency).

The UCNP-IBDP@PEG nanohybrid did not cause cell death under the standard cell culture conditions, and proved capable of effectively reducing the number of human neuroblastoma SH-SY5Y cells *in vitro*. Hence, it opens the way for their use in low-invasive tumoral phototherapy.

Abbreviations

UCNPs	Up-conversion nanoparticles
PEG	Polyethylene glycol
PDT	Photodynamic therapy
PS	Photosensitizer
NIR	Near-infrared

CW	Continuous wave
ROS	Reactive oxygen species
ABDA	Anthracenediyl-bis(methylene) dimalonate
TEA	Triethanolamine
IBDP	Diiodo-1',3',5',7'-tetramethyl-4',4'-difluoro-4'-bora-3',4',4'-diazas-indacen-8-yl)propanoic acid
Φ_{Δ}	Singlet oxygen quantum yield
LFP	Laser flash photolysis
RB	Rose bengal
TEM	Transmission electron microscopy
XRD	X-ray diffraction
EthD1	Ethidium homodimer-1

Acknowledgements

We thank Mr Michel Grenier for his help with the laser diode and temperature control assembly and Arturo Prudencio (Mibrobeam, S.A.) for his help with the fluorimeter set-up and laser diode calibration. We thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project CTQ2011-27758, M.G.B. Juan de la Cierva contract and L.F.S. FPU), the University of Valencia (JCS for a visiting professorship) and the Fundació La Marató de TV3 (121730/31/32). This research was supported by a Marie Curie Career Integration Grants within the 7th European Community Framework Programme. The authors also thank NSERC and University of Ottawa for the generous financial support.

Notes and references

- 1 C. Wang, L. Cheng and Z. Liu, *Theranostics*, 2013, **3**, 317–330.
- 2 T. J. Dougherty, *Photochem. Photobiol.*, 1993, **58**, 895–900.
- 3 R. Ideta, F. Tasaka, W.-D. Jang, N. Nishiyama, G.-D. Zhang, A. Harada, Y. Yanagi, Y. Tamaki, T. Aida and K. Kataoka, *Nano Lett.*, 2005, **5**, 2426–2431.
- 4 A. Roby, S. Erdogan and V. P. Torchilin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2006, **62**, 235–240.
- 5 J. P. Tardivo, A. Del Glio, C. S. de Oliveira, D. S. Gabrielli, H. C. Junqueira, D. B. Tada, D. Severino, R. F. Turchiello and M. S. Baptista, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2005, **2**, 175–191.
- 6 D. C. Neckers, *J. Photochem. Photobiol. A*, 1989, **47**, 1–29.
- 7 A. M. Garcia, E. Alarcon, M. Muñoz, J. C. Scaiano, A. M. Edwards and E. Lissi, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, **10**, 507–514.
- 8 G. Jori and C. Fabris, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2000, **43**, 181–185.
- 9 E. Alarcón, A. Aspée, M. González-Béjar, A. M. Edwards, E. Lissi and J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2010, **9**, 861–869.
- 10 Y. Cheng, A. C. Samia, J. D. Meyers, I. Panagopoulos, B. Fei and C. Burda, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 10643–10647.
- 11 Y. Cheng, J. D. Meyers, A.-M. Broome, M. E. Kenney, J. P. Basilion and C. Burda, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 2583–2591.
- 12 M. González-Béjar, P. Montes-Navajas, H. García and J. C. Scaiano, *Langmuir*, 2009, **25**, 10490–10494.
- 13 I. Roy, T. Y. Ohulchanskyy, H. E. Pudavar, E. J. Bergey, A. R. Oseroff, J. Morgan, T. J. Dougherty and P. N. Prasad, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 7860–7865.
- 14 P. Zhang, W. Steelant, M. Kumar and M. Scholfield, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 4526–4527.
- 15 D. B. Tada, L. L. R. Vono, E. L. Duarte, R. Itri, P. K. Kiyohara, M. S. Baptista and L. M. Rossi, *Langmuir*, 2007, **23**, 8194–8199.
- 16 A. C. S. Samia, X. Chen and C. Burda, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 15736–15737.
- 17 V. Voliani, G. Signore, O. Vittorio, P. Faraci, S. Luin, J. Pérez-Prieto and F. Beltram, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 4225–4230.
- 18 E. C. Dreaden, M. A. Mackey, X. Huang, B. Kangy and M. A. El-Sayed, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 3391–3404.
- 19 Y. Zhang, K. Aslan, M. J. R. Previte, S. N. Malyn and C. D. Geddes, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 25108–25114.
- 20 B. Ungun, R. K. Prud'homme, S. J. Budijono, J. Shan, S. F. Lim, Y. Ju and R. Austin, *Opt. Express*, 2009, **17**, 80–86.
- 21 F. Wang, D. Banerjee, Y. Liu and X. C. X. Liu, *Analyst*, 2010, **135**, 1839–1854.
- 22 C. Li and J. Lin, *J. Mater. Chem.*, 2010, **20**, 6831–6847.
- 23 H. Guo, H. Qian, N. M. Idris and Y. Zhang, *Nanomedicine*, 2010, **6**, 486–495.
- 24 Y. Guo, M. Kumar and P. Zhang, *Chem. Mater.*, 2007, **19**, 6071–6072.
- 25 S. Wu, G. Hana, D. J. Milliron, S. Alonia, V. Altoea, D. V. Talapin, B. E. Cohena and P. J. Schuck, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**, 10917–10921.
- 26 J. C. G. Bünzil and S. V. Eliseeva, *Chem. Sci.*, 2013, **4**, 1939–1949.
- 27 N. Menyuk, K. Dwight and J. W. Pierce, *Appl. Phys. Lett.*, 1972, **21**, 159–162.
- 28 J.-C. Boyer, C.-J. Carling, B. D. Gates and N. R. Branda, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 15766–15772.
- 29 Z. Li, Y. Zhang and S. Jiang, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 4765–4769.
- 30 F. Wang and X. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 5642–5643.
- 31 S. F. Lim, R. Riehn, W. S. Ryu, N. Khanarian, C.-k. Tung, D. Tank and R. H. Austin, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 169–174.
- 32 R. Kumar, M. Nyk, T. Y. Ohulchanskyy, C. A. Flask and P. N. Prasad, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, **19**, 853–859.
- 33 K. König, *J. Microsc.*, 2000, **200**, 83–104.
- 34 C. Li, Z. Hou, Y. Dai, D. Yang, Z. Cheng, P. A. Ma and J. Lin, *Biomater. Sci.*, 2013, **1**, 213–223.
- 35 H. S. Qian, H. C. Guo, P. C.-L. Ho, R. Mahendran and Y. Zhang, *Small*, 2009, **5**, 2285–2290.
- 36 R. A. Jalil and Y. Zhanga, *Biomaterials*, 2008, **29**, 4122–4128.
- 37 J.-C. Boyer, M.-P. Manseau, J. I. Murray and F. C. J. M. V. Veggel, *Langmuir*, 2010, **26**, 1157–1164.
- 38 F. Wang, D. V. Chatterjee, Z. Li, Y. Zhang, X. Fan and M. Wang, *Nanotechnology*, 2006, **17**, 5786–5791.
- 39 N. J. J. Johnson, N. M. Sangeetha, J.-C. Boyer and F. C. J. M. V. Veggel, *Nanoscale*, 2010, **2**, 771–777.
- 40 V. Voliani, M. González-Béjar, V. Herranz-Pérez, M. Duran-Moreno, G. Signore, J. M. Garcia-Verdugo and J. Pérez-Prieto, *Chem. - Eur. J.*, 2013, **19**, 13538–13546.
- 41 C. Wang, L. Cheng and Z. Liu, *Biomaterials*, 2011, **32**, 6145–6154.

- 42 J. Jin, Y.-J. Gu, C. W.-Y. Man, J. Cheng, Z. Xu, Y. Zhang, H. Wang, V. H.-Y. Lee, S. H. Cheng and W.-T. Wong, *ACS Nano*, 2011, **5**, 7838–7847.
- 43 X. Yang, Q. Xiao, C. Niu, N. Jin, J. Ouyang, X. Xiao and D. He, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 2757–2763.
- 44 F. Chen, S. Zhang, W. Bu, Y. Chen, Q. Xiao, J. Liu, H. Xing, L. Zhou, W. Peng and J. Shi, *Chem. - Eur. J.*, 2012, **18**, 7082–7090.
- 45 K. Liu, X. Liu, Q. Zeng, Y. Zhang, L. Tu, T. Liu, X. Kong, Y. Wang, F. Cao, S. A. G. Lambrechts, M. C. G. Aalders and H. Zhang, *ACS Nano*, 2012, **6**, 4054–4062.
- 46 S. Cui, D. Yin, Y. Chen, Y. Di, H. Chen, Y. Ma, S. Achilefu and Y. Gu, *ACS Nano*, 2013, **7**, 676–688.
- 47 S. Cui, H. Chen, H. Zhu, J. Tian, X. Chi, Z. Qian, S. Achilefu and Y. Gu, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 4861–4873.
- 48 Q. Xiao, Y. Ji, Z. Xiao, Y. Zhang, H. Lin and Q. Wang, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 1527–1529.
- 49 A. Zhou, Y. Wei, B. Wu, Q. Chen and D. Xing, *Mol. Pharmaceutics*, 2012, **9**, 1580–1589.
- 50 Y. I. Park, H. M. Kim, J. H. Kim, K. C. Moon, B. Yoo, K. T. Lee, N. Lee, Y. Choi, W. Park, D. Ling, K. Na, W. K. Moon, S. H. Choi, H. S. Park, S.-Y. Yoon, Y. D. Suh, S. H. Lee and T. Hyeon, *Adv. Mater.*, 2012, **24**, 5755–5761.
- 51 Z. Li and Y. Zhang, *Nanotechnology*, 2008, **19**, 345606–345610.
- 52 B. Cojocaru, M. Laferrière, E. Carbonell, V. Parvulescu, H. García and J. C. Sciaiano, *Langmuir*, 2008, **24**, 4478–4481.
- 53 E. Oliveros, S. H. Bossman, S. Nonell, C. Martí, G. Heit, G. Tröschler, A. Neuner, C. Martínez and A. M. Braun, *New J. Chem.*, 1999, **23**, 85–93.
- 54 K. Gollnick, T. Franken, M. F. R. Fouda, H. R. Paur and S. Held, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1992, **12**, 57–81.
- 55 H.-X. Mai, Y.-W. Zhang, R. Si, Z.-G. Yan, L.-d. Sun, L.-P. You and C.-H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 6426–6436.
- 56 F. Vetrone, J.-C. Boyer, L. A. Cuccia and J. A. Capobianco, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 7444–7445.
- 57 X. Xia, M. Yang, Y. Wang, Y. Zheng, Q. Li, J. Chen and Y. Xia, *ACS Nano*, 2011, **6**, 512–522.
- 58 S. Hui Lim, C. Thivierge, P. Nowak-Sliwinska, J. Han, H. van den Bergh, G. Wagnières, K. Burgess and H. B. Lee, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 2865–2874.
- 59 T. Yogo, Y. Urano, Y. Ishitsuka, F. Maniwa and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 12162–12163.
- 60 S. Erbas, A. Gorgulu, M. Kocakusakogullaric and E. U. Akkaya, *Chem. Commun.*, 2009, 4956–4958.
- 61 N. Adarsh, R. R. Avirah and D. Ramaiah, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 5720–5723.
- 62 M. J. Ortiz, A. R. Agarrabeitia, G. Duran-Sampedro, J. Bañuelos Prieto, T. Arbeloa Lopez, W. A. Massad, H. A. Montejano, N. A. García and I. Lopez Arbeloa, *Tetrahedron*, 2012, **68**, 1153–1162.
- 63 R. Paris, I. Quijada-Garrido, O. García and M. Liras, *Macromolecules*, 2011, **44**, 80–86.
- 64 M. Ottonelli, G. Musso and G. Dellepiane, *J. Phys. Chem. A*, 2008, **112**, 11960–11964.
- 65 J.-C. Boyer, F. Vetrone, L. A. Cuccia and J. A. Capobianco, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 7444–7445.
- 66 F. Auzel, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 139–173.
- 67 N. A. Kuznetsova, N. S. Gretsova, O. A. Yuzhakova, V. M. Negrimovskii, O. L. Kaliya and E. A. Luk'yanets, *Russ. J. Gen. Chem.*, 2001, **71**, 36–41.
- 68 N. M. Idris, M. K. Gnanasammandhan, J. Zhang, P. C.-L. Ho, R. Mahendran and Y. Zhang, *Nat. Med.*, 2012, **18**, 1580–1585.
- 69 M. Nyk, R. Kumar, T. Y. Ohulchansky, E. J. Bergey and P. N. Prasad, *Nano Lett.*, 2008, **8**, 3834–3838.
- 70 C. Wang, L. Cheng, H. Xu and Z. Liu, *Biomaterials*, 2012, **33**, 4872–4881.
- 71 A. W. Hayes, in *Principles and Methods of Toxicology*, ed. Raven Press, New York, 3rd edn., 1994, pp. 1231–1258.
- 72 N. G. Papadopoulos, G. V. Z. Dedoussis, G. Spanakos, A. D. Gritzapis, C. N. Baxevanis and M. Papamichail, *J. Immunol. Methods*, 1994, **177**, 101–111.
- 73 E. S. Kaneshiro, M. A. Wyder, Y.-P. Wu and M. T. Cushion, *J. Microbiol. Methods*, 1993, **17**, 1–16.
- 74 M. C. Lee, B. W. Kim, J. S. Kim, J. S. Lee, K. S. Kim, J. H. Lee, J. H. Nam, S. M. Rowe and S. U. Kim, *Brain Tumor Pathol.*, 1997, **14**, 5–11.
- 75 J. Moan and K. Berg, *Photochem. Photobiol.*, 1992, **55**, 931–948.
- 76 B. W. Henderson and T. J. Dougherty, *Photochem. Photobiol.*, 1992, **55**, 145–157.
- 77 M. L. Agarwal, M. E. Clay, E. J. Harvey, H. H. Evans, A. R. Antunez and N. L. Oleinick, *Cancer Res.*, 1991, **51**, 5993–5996.
- 78 T. Aki, A. Nara and K. Uemura, *Cell Biol. Toxicol.*, 2012, **28**, 125–131.
- 79 E. C. Costa, V. M. Gaspar, J. G. Marques, P. Coutinho and I. J. Correia, *PLoS One*, 2013, **8**, e70072.
- 80 M. E. Davis, Z. Chen and D. M. Shin, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2008, **7**, 771–782.

Cite this: *Nanoscale*, 2016, 8, 204Received 18th October 2015,
Accepted 22nd November 2015

DOI: 10.1039/c5nr07229h

www.rsc.org/nanoscale

Energy transfer in diiodoBodipy-grafted upconversion nanohybrids†

 Laura Francés-Soriano,^a Marta Liras,^b Agnieszka Kowalczyk,^c Artur Bednarkiewicz,^d Maria González-Béjar^{*a} and Julia Pérez-Prieto^{*a}

Steady-state and time-resolved emission studies on nanohybrids consisting of NaYF₄:Yb,Er and a diiodo-substituted Bodipy (UCNP-IBDP) show that the Yb³⁺ metastable state, formed after absorption of a near-infrared (NIR) photon, can decay via two competitive energy transfer processes: sensitization of IBDP after absorption of a second NIR photon and population of Er³⁺ excited states.

Understanding resonant energy transfer (RET) processes between emissive nanoparticle donors and organic dye acceptors is of paramount importance for both fundamental photophysics and application oriented studies. Detailed studies on the RET phenomenon can be found in the literature mostly regarding Quantum Dot (QD) donors.¹ In contrast, only a few examples of time-resolved studies have been reported for upconversion nanoparticles (UCNPs) acting as RET donors.^{2–5}

Whereas QDs undergo down-conversion after excitation, the UCNPs emit in the visible spectral range upon near infrared (NIR) excitation due to multiple intra-configurational 4fⁿ electron transitions.⁶ This up-conversion process paves the way to initiate a photodynamic (PDT) reaction with deeply penetrating NIR light and shall enable more efficient PDT at larger tissue volumes.

There are however two challenges to make this possible. Since the PDT may occur only upon efficient ET from UCNPs to photosensitisers, anchoring photosensitisers (PSs) directly to UCNPs and finding PSs of an appropriate excitation spectrum (*i.e.* overlapping the luminescence of up-converting

lanthanides) are of critical importance.⁷ In particular, ytterbium and erbium co-doped sodium yttrium fluoride (NaYF₄:Er³⁺,Yb³⁺) nanoparticles have been used as energy donors for different PSs, such as Ru(bpy)₃²⁺,⁸ zinc phthalocyanine,^{5,9} merocyanine 540,¹⁰ hypericin,¹¹ methylene blue,^{12,13} rose bengal,³ pyropheophorbide a,¹⁴ chlorin e6,¹⁵ and a diiodo-Bodipy compound.¹⁶ These UCNPs have also been proved to be successful energy donors to QDs¹⁷ and other fluorescent dyes¹⁸ such as rhodamine 6G.¹⁹ In all these systems, the spectral overlap of the UCNP emission spectrum with the PS absorption spectrum is a prerequisite for efficient energy transfer (ET).

Moreover, for organic/inorganic fluorophores the ET yield (η) depends on the donor-to-acceptor separation distance (r_{DA}) with an inverse 6th power law due to the dipole-dipole coupling mechanism following a simple relation $\eta = [1 + (r_{DA}/R_0)^6]^{-1}$, where R_0 is the Förster distance ($R_0 < 10$ nm).²

For upconverting nanoparticles, there are numerous donors within a single nanoparticle, which display a whole range of effective distances to acceptors anchored at the surface, and the photophysics behind UC-RET is a more complex phenomenon.

Different strategies have been used to anchor the PS molecules as dense and as close to the surface as possible, by grafting or adsorption to the surface, or by covalent linkage to the nanoparticle functional capping.

In this context, we have recently designed a nano hybrid made of NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ UCNPs and a diiodo-substituted Bodipy derivative (namely, 3-(2',6'-diiodo-1',3',5',7'-tetramethyl-4',4'-difluoro-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacen-8'yl)propanoic acid; IBDP), which is anchored to the nanoparticle surface directly and embedded in the organic capping (a polyethyleneglycol, PEG, derivative).¹⁶ This nano hybrid was dispersible in water due to its polymeric coating.

Now, to determine the efficiency of the energy transfer process between IBDP and the UCNP core in UCNP-IBDP nano hybrids, both steady-state and time-resolved emission measurements were carried out with water- or organic-dispersible nano hybrids (Fig. 1). Nano hybrids were prepared from the same batch of oleate-capped UCNPs (UCNP@OA), and their

^aInstituto de Ciencia Molecular (ICMol)/Departamento de Química Orgánica, Universidad de Valencia, C/ Catedrático José Beltrán 2, 46100 Paterna, Valencia, Spain. E-mail: julia.perez@uv.es, maria.gonzalez@uv.es

^bIMDEA Energy Institute, Parque tecnológico de Móstoles, Avda. Ramón de la Sagra, 3, 28935 Móstoles, Madrid, Spain

^cWrocław Research Centre EIT⁺, ul. Stabłowicka 147, 54-066 Wrocław, Poland

^dDepartment of Excited States Spectroscopy, Institute of Low Temperature and Structure Research, Polish Academy of Sciences, ul. Okólna 2, 50-422 Wrocław, Poland

† Electronic supplementary information (ESI) available: TEM pictures and their corresponding histograms, UV-visible, power dependence plot and decay fittings. See DOI: 10.1039/c5nr07229h

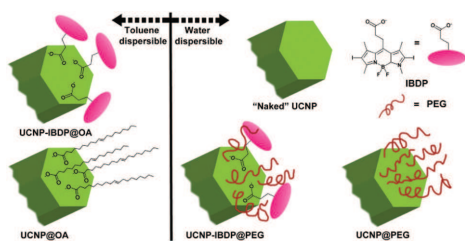


Fig. 1 Descriptive image illustrating the up-conversion nanoparticles with different coatings and solubility selected for this study.

photophysical properties were compared with those of the UCNPs@OA and naked UCNPs (UCNP_{naked}), which also originated from the same UCNPs@OA batch.

This made it possible to compare the influence of the nanoparticle capping and the solvent itself on the optical properties of the nanohybrids.

Upconversion nanoparticles (NaYF₄:Yb³⁺(16%),Er³⁺(4%)) capped with oleate (UCNP@OA) were synthesised by following a protocol described in the literature with some modifications (see ESI Fig. S1–S3†).²⁰ Transmission electron microscopy (TEM and high resolution TEM, HRTEM) showed that the UCNPs are uniform hexagonal prisms (38.4 ± 1.7 and 13.6 ± 1.4 nm, height and side, respectively, Fig. S1†). Then, naked UCNPs (UCNP_{naked}) and UCNPs@PEG²¹ were synthesised by removing the oleate ligand of UCNPs@OA by acidification with HCl,²² whereas UCNPs@PEG were synthesised by exchanging the oleate with HS-PEG-NH₂²¹ (see Fig. S4 and ESI† for further details).

We have previously reported that the ligand exchange reaction of UCNPs@PEG with IBDP led to water-dispersible nanohybrids (UCNP-IBDP@PEG),¹⁶ see Fig. S5† and experimental details in the ESI†. Similar methods were applied to UCNPs@OA nanoparticles in order to produce lipophilic hybrid (UCNP-IBDP@OA) nanoparticles. Briefly, a mixture of IBDP and the UCNPs@OA was sonicated in water in the presence of triethylamine for 15 min to ensure the deprotonation of the IBDP carboxylic group and, consequently, its grafting to the UCNPs surface.²² Then, the mixture was stirred for 24 h in an orbital shaker at room temperature. Then, the nanoparticles were centrifuged and washed five times in acetonitrile in order to remove the excess of IBDP. Finally, the UCNPs-IBDP@OA nanohybrid (pink powder) was re-suspended in toluene (see experimental details in the ESI†).

The UV-Vis absorption spectra (Fig. 2) and TGA analyses (not shown) of UCNPs-IBDP@OA and UCNPs-IBDP@PEG revealed an IBDP load of 40% and 10%, respectively. Fig. 2 shows the comparison between the emission spectra of the water-dispersible nanoparticles, *i.e.*, UCNPs_{naked}, UCNPs@PEG, and UCNPs-IBDP@PEG on the left panel, while right panel compares the spectra of the toluene-dispersible nanoparticles, *i.e.*, UCNPs@OA and UCNPs-IBDP@OA, after 975 nm excitation.

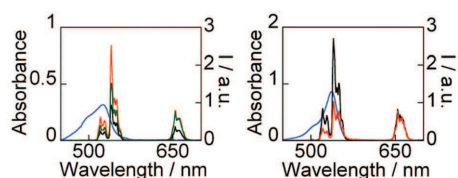


Fig. 2 (Left) UV-Visible absorption spectrum of IBDP in UCNPs-IBDP@PEG (blue line); emission spectra of water solutions of UCNPs naked (black line), UCNPs@PEG (red line), and UCNPs-IBDP@PEG (green line). (Right) UV-Visible absorption spectrum of IBDP in UCNPs-IBDP@OA in toluene (blue line); emission spectra of toluene solutions of UCNPs@OA (black line) and UCNPs-IBDP@OA (red line). The spectra were recorded using a front face set-up after excitation at 975 nm. The green to red emission intensity ratio was found to be 3.2 (UCNPs@OA), 1.6 (UCNPs@IBDP), 2.5 (naked) and 2.5 (UCNPs@PEG), and 1.8 (UCNPs@IBDP@PEG), respectively. The UCNPs-IBDP@PEG and UCNPs-IBDP@OA solutions contained 1 mg of the nanohybrid and the IBDP concentration was 0.7 μM and 1.7 μM, respectively.

The UV-Visible absorption spectrum of IBDP has been included in both solvents to compare the overlap between the absorption spectrum of IBDP (the energy acceptor) and the emission of the UCNPs (energy donor) in both water and toluene, as such overlap is a prerequisite for RET to occur.^{3,5} The overlap is quantified with the spectral overlap integral (J) calculated as $J = \sum \sigma_D(\lambda) \sigma_A(\lambda) \lambda^4 \delta \lambda$, where σ_D is the normalized donor emission spectrum, the σ_A is the acceptor molar extinction coefficient, and λ is the wavelength of light.

Upon excitation at 975 nm (where Yb³⁺ absorbs), the emission spectra of all the UCNPs exhibited three bands owing to Er³⁺ emission: an intense band at 540 nm (⁴S_{3/2} → ⁴I_{15/2}), another close emission at 520 nm (²H_{11/2} → ⁴I_{15/2}), and a red band at longer wavelengths (at *ca.* 670 nm, ⁴F_{3/2} → ⁴I_{15/2}).²³ Power dependence measurements showed that emission was proportional to the 2nd power of excitation intensity, which is consistent with previously reported values (Fig. S8†).²⁴ As expected, all the bands of UCNPs_{naked} were less intense than those of the PEG-capped UCNPs, which is consistent with the capacity of PEG to passivate the UCNPs surface (Fig. 1, left).

A comparison between the emission spectrum of each nanohybrid, UCNPs-IBDP@PEG and UCNPs-IBDP@OA, and its precursor, *i.e.*, UCNPs@PEG and UCNPs@OA, respectively, revealed that the IBDP induced quenching of the green UCNPs emission band, where IBDP absorption was present. The efficiency of the RET was calculated by using simple formula based on either emission intensity or emission lifetimes, $\eta = (I_D - I_{DA})/I_D = 1 - \tau_{DA}/\tau_D$, where I_{DA} and I_D are the integrated emission of the D-A nanohybrid (UCNPs-IBDP@PEG and UCNPs-IBDP@OA) and the respective nanohybrid precursor emission (UCNPs@PEG and UCNPs@OA), while τ_{DA} and τ_D are the luminescence lifetimes of D-A and D alone species, at the D emission wavelength. The intensities in the 513–560 nm range decreased by *ca.* 50% and 30% for UCNPs-IBDP@OA and UCNPs-IBDP@PEG, respectively (similar results were obtained

when the intensities at 546 nm were compared). In quantitative terms, the J overlap of UCNP-IBDP@OA in toluene was larger than that of UCNP-IBDP@PEG in water ($9.948 \times 10^{15} \text{ nm}^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and $1.226 \times 10^{13} \text{ nm}^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectively), but, as mentioned above, the loading of IBDP was also larger in the former. No emission of energy acceptor molecules appeared in the nanohybrids, which is consistent with the negligible fluorescence quantum yield of IBDP ($\Phi_f = 0.02$ in methanol).²⁵

As a control experiment, small volumes of a toluene solution of a diiodoBodipy lacking the carboxylic acid group (specifically, 4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4-diaza-s-indacene), IBDPnc, $5 \times 10^{-3} \text{ M}$) were added to an oleate-capped UCNP dispersed in toluene (1 mg ml^{-1}) up to a final IBDPnc concentration of 0.45 mM . Fig. S9† shows the decrease of the green emission with increasing concentrations of IBDPnc. It was expected that this substance would not anchor the UCNP surface and, consequently, the quenching of the UCNP emission was presumed to be due to filter effects.

To gain insight into the nature of the intermolecular quenching process in the nanohybrids and corroborate the filter effects in the UCNP@OA/IBDPnc mixtures, we carried out time-resolved measurements of all the UCNPs. The emission of UCNP@OA, recorded at 546 and 654 nm, showed no time-dependence in the presence of increasing IBDPnc concentrations up to the highest concentrations tested. This confirmed that the energy transfer in the intermolecular system occurred *via* a trivial emission-reabsorption mechanism.

The kinetic traces at $\lambda_{\text{exc}} = 975 \text{ nm}$ excitation for the UCNP_{naked}, UCNP@PEG, UCNP@OA, UCNP-IBDP@PEG, and UCNP-IBDP@OA showed characteristic rise and decay phases (Fig. 3, Table 1, and ESI†).²⁶ The rise and decay lifetimes (τ_{rise} and τ_{decay} , respectively) were determined by fitting the data and these two components correspond to the sensitisation and subsequent decay of the Er^{3+} excited state. All the fittings exhibited good quality match and the τ_{rise} and τ_{decay} decays were estimated in triplicate.

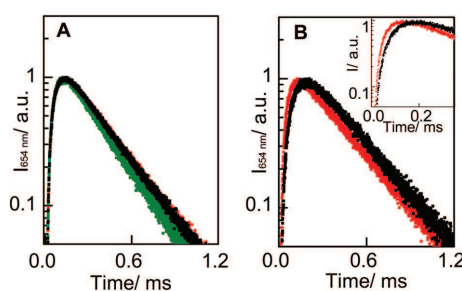


Fig. 3 Kinetic profiles at 654 nm of (A) UCNP_{naked} (black trace), UCNP@PEG (red trace), and UCNP-IBDP@PEG (green trace) in water and (B) UCNP@OA (black trace) and UCNP-IBDP@OA (red trace) in toluene; amplification on the 0–0.2 ms time scale. Note that intensities are not real.

Table 1 Luminescence lifetimes for the UCNPs excited at 975 nm^a

UCNP	⁴ S _{3/2} → ⁴ I _{15/2} ^b green emission		⁴ F _{9/2} → ⁴ I _{15/2} ^c red emission	
	τ_{rise} , μs	τ_{decay} , μs	τ_{rise} , μs	τ_{decay} , μs
Water dispersible				
UCNP _{naked}	45 ± 7	78 ± 3	70 ± 10	277 ± 6
UCNP@PEG	44 ± 5	82 ± 2	69 ± 7	281 ± 4
UCNP-IBDP@PEG	54 ± 7	67 ± 2	63 ± 7	252 ± 4
Toluene dispersible				
UCNP@OA	94 ± 4	119 ± 1	122 ± 18	304 ± 8
UCNP-IBDP@OA	58 ± 10	96 ± 6	61 ± 6	317 ± 4

^a Average value of three fittings. ^b $\lambda_{\text{em}} = 546 \text{ nm}$. ^c $\lambda_{\text{em}} = 654 \text{ nm}$.

The decay lifetimes of the UCNP emission were in the tens to hundredths μs range and those for the red emission were longer (*ca.* 250–320 μs) than those of the green (65–125 μs), see Table 1. The fitted kinetics for each of the UCNPs is shown in the ESI (Fig. S10–S20†).

In this study, we used the same batch of UCNP@OA for the preparation of the other four samples and no change in the crystalline phase, size, or shape of the UCNP core was detected upon hybrid formation.

Therefore, the observed differences in the decay lifetimes shall be attributed to non-radiative processes due to the interaction of the UCNPs with the solvent, the capping ligand, and, in the case of the nanohybrids, the diiodoBodipy acceptor molecules.

As expected, taking into account that O–H vibrations deactivate the lanthanide excited states due to multiphonon non-radiative interactions,²⁷ the decay of the green and red emissions was longer for the UCNPs dispersed in toluene than in water (Table 1). This impact of the solvent was less pronounced for the red emission (*ca.* 300 vs. 280 μs) as compared to water (Table 1). This impact of the solvent was less pronounced for the red emission (*ca.* 300 vs. 280 μs) as compared to water (Table 1). Larger discrepancies can be observed for the luminescence rise-times, where the toluene dispersed UCNP@OA exhibited almost twice as long values (94 and 122 μs for green and red, respectively) as compared to water soluble UCNP@PEG (44 and 69 μs for green and red, respectively).

This observation demonstrates the fast saturation of intermediate excited state levels of Er^{3+} ions in water dispersible UCNP@PEG NPs and most probably supports the hypothesis of the critical role of the Yb^{3+} energy migration network in releasing the absorbed energy through the surface Yb^{3+} ions.

In addition, the presence of IBDP in UCNP-IBDP@PEG led to shortening of τ_{decay} (from 82 μs to 67 μs , $\eta = 1 - \tau_{\text{DA}}/\tau_{\text{D}} = 18\%$). Similar behaviour was observed for the green emission of the lipophilic nanohybrid (τ_{decay} of 119 μs and 96 μs , $\eta = 19\%$, for UCNP@OA and UCNP-IBDP@OA, respectively, Table 1).

The presence of IBDP in both UCNP-IBDP@PEG and UCNP-IBDP@OA demonstrated faster rise-times of the red

emission band kinetics, in comparison with non-IBDP NPs. This behavior indicates that the IBDP plays a role in the up-conversion and changes the balance between ETU and depopulation phenomena during the intermediate steps despite evident energy mismatch between the excited states of Er^{3+} donors and energy levels of IBDP acceptors.

Moreover the red emission decay in UCNP-IBDP@PEG was *ca.* 10% shorter than that of UCNP@PEG , while the red decay in UCNP-IBDP@OA was slightly longer than that in UCNP@OA . The interpretation of such relations is not straightforward and requires further investigations.

Regarding the rise-times (τ_{rise}) of the green and red emission donor hybrids, again the hydrophilic UCNP@PEG NPs exhibited shorter values than UCNP@OA . Remarkably, the τ_{rise} of the UCNP-IBDP@OA green emission decreased almost two-fold as compared to that of UCNP@OA , and similar shortening was also detected for the τ_{rise} of the red emission. Such consistent behaviour was not observed for PEG coated NPs.

A likely interpretation for the lipophilic UCNP-IBDP@OA could be that the presence of IBDP makes a competitive decay possible for the metastable state of Yb^{3+} (Yb^{3+*}). Specifically, Yb^{3+*} could be involved not only in the population of Er^{3+} excited states but also in that of IBDP (IBDP^*) after the absorption of a second photon (Fig. 4). As a consequence, the rise-times of both red and green emissions would reflect the decrease of the contribution of Yb^{3+*} to populate the Er^{3+} excited states involved in those emissions.

To corroborate this hypothesis we prepared the lipophilic $\text{Yb}^{3+}(\text{IBDP})_3$ complex (see ESI† for experimental details) which was excited at 975 nm. Remarkably, the anti-Stokes IBDP fluorescence (Fig. 5 left, in blue) was detected in spite of the considerably low absorption cross section of the Yb^{3+} ions (as compared to Stokes excitation of IBDP) at the NIR and the low fluorescence of the diiodo-Bodipy.

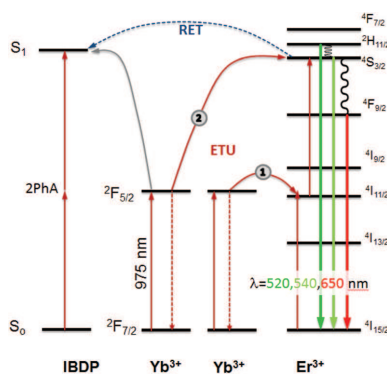


Fig. 4 Schematic picture showing the competitive energy transfer from Yb^{3+} excited state (Yb^{3+*}) to Er^{3+} and IBDP.

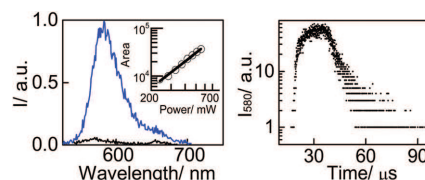
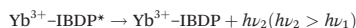
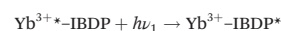
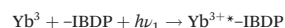


Fig. 5 Left: comparison between the emission spectra of IBDP (black) and of $\text{Yb}^{3+}(\text{IBDP})_3$ complex in toluene under NIR 975 nm excitation. The inset demonstrates the power dependence – the anti-Stokes emission intensity, which is proportional to the 2nd power of the excitation intensity. Right: kinetic time profile of the anti-Stokes IBDP emission in $\text{Yb}^{3+}(\text{IBDP})_3$ under 975 nm laser excitation.

This suggested that the $\text{Yb}^{3+}(\text{IBDP})_3$ complex can up-convert following the proposed scheme



It is known that Bodipy compounds are capable of undergoing two-photon absorption processes.²⁸ Therefore, control experiments were carried out to confirm the involvement of the lanthanide in the emission of IBDP in the $\text{Yb}^{3+}(\text{IBDP})_3$ when excited at 975 nm. Fig. 5 left shows the much more efficient emission of the Bodipy in the complex. Moreover, time-resolved measurements evidenced that the emission lifetime of $\text{Yb}^{3+} - \text{IBDP}^*$ was *ca.* 5 μs (Fig. 5 right), a great deal longer than that of IBDP^* , whose emission lifetime was not higher than a few ns. Finally, power-dependence measurements corroborated that the IBDP emission after NIR excitation of $\text{Yb}^{3+}(\text{IBDP})_3$ was proportional to the 2nd power of the 975 nm excitation intensity (inset of Fig. 5 left). The latter observation evidenced the need to involve two low energy 975 nm photons, to obtain a visible emission of IBDP.

Conclusions

We have prepared hydrophobic and hydrophilic UCNP-IBDP nanohybrids, which showed a decrease in their green to red emission compared to their precursors. Time-resolved experiments demonstrated that the quenching of the green emission was due to the energy transfer from the UCNP to the anchored IBDP. Furthermore, the decrease in the efficiency of green and red emissions in UCNP-IBDP was attributed to the competitive decay of Yb^{3+*} via energy transfer to IBDP after absorption of a second photon. This process was more competitive in an organic solvent. Therefore, a comparison between the emission rise-times, as well as between the emission decay lifetimes, of the nanohybrids and those of $\text{UCNP}_{\text{naked}}$

UCNP@PEG, and UCNP@OA gave valuable information about the excited states involved in UCNP emission kinetics.

Acknowledgements

We thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Projects CTQ2014-60174; M. G. B.: Ramón y Cajal contract and L. F. S.: F.P.U. grant). The work was partially supported by the grant DEC-2012/05/E/ST5/03901 from Narodowe Centrum Nauki, Poland.

Notes and references

- 1 A. R. Clapp, I. L. Medintz, H. T. Uyeda, B. R. Fisher, E. R. Goldman, M. G. Bawendi and H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 18212–18221.
- 2 T. Riittamäki, I. Hyppänen, J. Kankare and T. Soukka, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 17736–17742.
- 3 K. Liu, X. Liu, Q. Zeng, Y. Zhang, L. Tu, T. Liu, X. Kong, Y. Wang, F. Cao, S. A. G. Lambrechts, M. C. G. Aalders and H. Zhang, *ACS Nano*, 2012, **6**, 4054–4062.
- 4 Y. Wang, K. Liu, X. Liu, K. Dohnalová, T. Gregorkiewicz, X. Kong, M. C. G. Aalders, W. J. Buma and H. Zhang, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2011, **2**, 2083–2088.
- 5 M. Wang, Z. Chen, W. Zheng, H. Zhu, S. Lu, E. Ma, D. Tu, S. Zhou, M. Huang and X. Chen, *Nanoscale*, 2014, **6**, 8274–8282.
- 6 A. Gnach and A. Bednarkiewicz, *Nano Today*, 2012, **7**, 532–563; F. Wang, D. Banerjee, Y. Liu and X. C. X. Liu, *Analyst*, 2010, **135**, 1839–1854.
- 7 C. Wang, L. Cheng and Z. Liu, *Theranostics*, 2013, **3**, 317–330.
- 8 Y. Guo, M. Kumar and P. Zhang, *Chem. Mater.*, 2007, **19**, 6071–6072.
- 9 H. Guo, H. Qian, N. M. Idris and Y. Zhang, *Nanomedicine*, 2010, **6**, 486–495; H. S. Qian, H. C. Guo, P. C.-L. Ho, R. Mahendran and Y. Zhang, *Small*, 2009, **5**, 2285–2290; S. Cui, H. Chen, H. Zhu, J. Tian, X. Chi, Z. Qian, S. Achilefu and Y. Gu, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 4861–4873; S. Cui, D. Yin, Y. Chen, Y. Di, H. Chen, Y. Ma, S. Achilefu and Y. Gu, *ACS Nano*, 2013, **7**, 676–688; Q. Xiao, Y. Ji, Z. Xiao, Y. Zhang, H. Lin and Q. Wang, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 1527–1529.
- 10 P. Zhang, W. Steelant, M. Kumar and M. Scholfield, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 4526–4527.
- 11 X. Yang, Q. Xiao, C. Niu, N. Jin, J. Ouyang, X. Xiao and D. He, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 2757–2763.
- 12 F. Chen, S. Zhang, W. Bu, Y. Chen, Q. Xiao, J. Liu, H. Xing, L. Zhou, W. Peng and J. Shi, *Chem. – Eur. J.*, 2012, **18**, 7082–7090.
- 13 L. Francés-Soriano, M. González-Béjar and J. Pérez-Prieto, *Nanoscale*, 2015, **7**, 5140–5146.
- 14 A. Zhou, Y. Wei, B. Wu, Q. Chen and D. Xing, *Mol. Pharmaceutics*, 2012, **9**, 1580–1589.
- 15 C. Wang, L. Cheng and Z. Liu, *Biomaterials*, 2011, **32**, 6145–6154; Y. I. Park, H. M. Kim, J. H. Kim, K. C. Moon, B. Yoo, K. T. Lee, N. Lee, Y. Choi, W. Park, D. Ling, K. Na, W. K. Moon, S. H. Choi, H. S. Park, S.-Y. Yoon, Y. D. Suh, S. H. Lee and T. Hyeon, *Adv. Mater.*, 2012, **24**, 5755–5761.
- 16 M. González-Béjar, M. Liras, L. Francés-Soriano, V. Voliani, V. Herranz-Pérez, M. Duran-Moreno, J. M. Garcia-Verdugo, E. I. Alarcon, J. C. Scaiano and J. Pérez-Prieto, *J. Mater. Chem. B*, 2014, **2**, 4554–4563.
- 17 L. Mattsson, K. D. Wegner, N. Hildebrandt and T. Soukka, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 13270–13277; A. Bednarkiewicz, M. Nyk, M. Samoc and W. Strek, *J. Phys. Chem. C*, 2010, **114**, 17535–17541; C. Yan, A. Dadvand, F. Rosei and D. F. Perepichka, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 8868–8869; Z. Li, Y. Zhang and S. Jiang, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 4765–4769; T. L. Nguyen, P. Spizzirri, G. Wilson and P. Mulvaney, *Chem. Commun.*, 2009, 174–176.
- 18 X. Li, F. Zhang and D. Zhao, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 1346–1378.
- 19 R. Chen, V. D. Ta, F. Xiao, Q. Zhang and H. Sun, *Small*, 2013, **7**, 1052–1057.
- 20 Z. Li and Y. Zhang, *Nanotechnology*, 2008, **19**, 345606.
- 21 V. Voliani, M. González-Béjar, V. Herranz-Pérez, M. Duran-Moreno, G. Signore, J. M. Garcia-Verdugo and J. Pérez-Prieto, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 13538–13546.
- 22 N. Bogdan, F. Vetrone, G. A. Ozin and J. A. Capobianco, *Nano Lett.*, 2011, **11**, 835–840.
- 23 J.-C. Boyer, F. Vetrone, L. A. Cuccia and J. A. Capobianco, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 7444–7445; F. Auzel, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 139–173.
- 24 V. F. Boyer J-C, L. A. Cuccia and J. A. Capobianco, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 7444–7445.
- 25 T. Yogo, Y. Urano, Y. Ishitsuka, F. Maniwa and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 12162–12163.
- 26 M. P. Hehlen, G. Frei and H. U. Güdel, *Phys. Rev. B: Condens. Matter*, 1994, **50**, 16264–16273.
- 27 Q. Lü, F. Guo, L. Sun and A. Li, *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**, 2836–2844.
- 28 X. Zhang, Y. Xiao, J. Qi, J. Qu, B. Kim, X. Yue and K. D. Belfield, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 9153–9160.



Cite this: *Nanoscale*, 2015, 7, 5140
Received 14th January 2015,
Accepted 12th February 2015
DOI: 10.1039/c5nr00295h
www.rsc.org/nanoscale

Cucurbit[*n*]uril-capped upconversion nanoparticles as highly emissive scaffolds for energy acceptors†

Laura Francés-Soriano, María González-Béjar* and Julia Pérez-Prieto*

Spontaneous adsorption of cucurbit[*n*]uril CB[*n*] (*n* = 6, 7, and 8) on the surface of naked upconversion nanoparticles (UCNPs), in particular, NaYF₄:Er³⁺(2%),Yb³⁺(18%) gave rise to UCNP@CB[*n*] exclusion complexes. These complexes proved to be highly stable as well as highly emissive under near-infrared excitation. By using two tricyclic basic dyes (specifically, methylene blue and pyronin Y) as a proof of concept, we demonstrate that the UCNP@CB[*n*] (*n* = 6, 7) nanohybrids can form exclusion complexes with this type of dyes via the CB carbonyl free portal, i.e., UCNP@CB@dye hybrids, thus making it possible to locate a high concentration of the dyes close to the UCNP and, consequently, leading to efficient energy transfer from the UCNP to the dye.

Upconversion nanoparticles (UCNPs), such as ytterbium and erbium co-doped sodium yttrium fluoride nanoparticles (NaYF₄:Er³⁺,Yb³⁺), emit in the visible after being excited in the near infrared (NIR) due to their intra-configurational 4f^{*n*} electron transitions.^{1,2} They display unique photoluminescence properties, such as anti-Stokes luminescence, narrow emission bands and good chemical stability. In addition, the absence of autofluorescence, photobleaching and photoblinking together with the deep tissue penetration of the NIR light make them suitable for bioapplications.^{2–8}

UCNPs are usually synthesised at high temperatures by using organic capping ligands and non-coordinating solvents (e.g. oleic acid and 1-octadecene).^{9–13} Their poor water-dispersibility is the main handicap for their bioapplication and their derivatisation with polymers or silica shell is being extensively studied.^{14–16} Another strategy to make them water dispersible is by making them naked (i.e. free of ligand)¹⁷ or by encapsulating the lipophilic ligands of the UCNPs inside the cavity of macromolecules like cyclodextrins.^{5,18,19}

Cucurbit[*n*]urils (CB[*n*], *n* = 5–10) are another kind of water-soluble macrocyclic hosts with considerable molecular recognition abilities.^{20,21} They present a “pumpkin” shape with the urea oxygen atoms at the edges and tilted inwards and have a height of 0.91 nm.²² They form strong inclusion complexes with many types of organic guests by making use of their internal hydrophobic cavity.²⁰ Interestingly, the carbonyl-fringed portals of CB[*n*] can interact with metallic cations and bind to gold surfaces,²⁶ as well as to the surface of silver,^{27,28} platinum,²⁹ palladium,³⁰ and gold nanoparticles.^{31–33} Furthermore, the interaction between CB[*n*] and lanthanide cations has also been demonstrated.^{34–38}

With regard to CB guests, the host-guest complexes between CB[*n*] and tricyclic basic dyes have been studied previously and depending on the CB size, 1 : 1 or 1 : 2 complexes can be formed.^{39,40} For example, CB[7] encapsulates a methylene blue (MB) monomer, while an MB dimer (MB₂) is encapsulated inside CB[8].³⁹ Encapsulation of dyes inside the CB[*n*] cavities can be advantageous: enhanced fluorescence emission and lifetime, photostabilisation, increased solubility in water, and de-aggregation.³⁹ Tricyclic basic dyes have been extensively studied as dye lasers and photosensitizers, among other applications.⁴¹

Regarding the formation of CB exclusion complexes, we have recently prepared CB[7]-capped AuNPs (Au@CB) by reacting naked AuNPs with CB[7] and we have demonstrated that Na⁺ and NH₄⁺ ions block the entrance of O₂ to the CB cavity of the Au@CB hybrids.³¹

Now, we have focused on the potential assembling of CBs on the naked UCNPs to obtain UCNP@CB nanohybrids. The CB units could be exploited as hosts for the functional molecules (FM), thus placing them close to the UCNP surface. Alternatively, the CB cavity could host a moiety attached to the FM, thus placing the FM at a certain distance from the UCNP surface. In addition, the UCNP@CB could be used as a scaffold for FM to build an UCNP@CB@FM exclusion complex by making use of a favourable interaction between the molecule and the CB free carbonyl portal. In the last case, the UCNP@CB nanohybrids would allow the increase of the local concentration

Instituto de Ciencia Molecular (ICMol)/Departamento de Química Orgánica, Universidad de Valencia, C/Catedrático José Beltrán 2, 46980 Paterna, Valencia, Spain. E-mail: julia.perez@uv.es, maria.gonzalez@uv.es; Fax: +34-963543576; Tel: +34-963543050

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental methods, TEM images, EDX, XRD, absorption and emission spectra, ¹H-NMR. See DOI: 10.1039/c5nr00295h

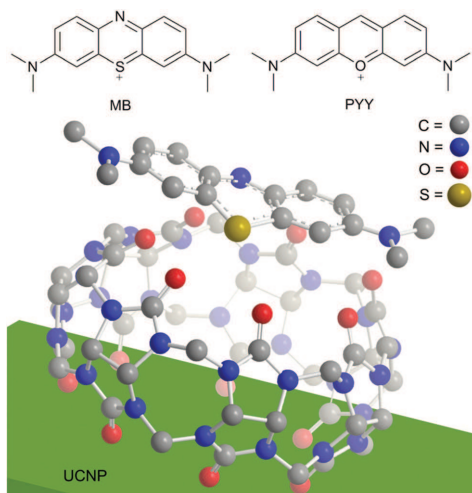


Fig. 1 Top: Structure of the dyes used in this study, methylene blue (MB) and pyronin Y (PYY). Bottom: Proposed interaction between the UCNP, cucurbit[7]uril (CB[7]), and MB. The outer diameter of CB[7] is 1.6 nm,²² while the MB long axis is 1.275 nm.⁴²

of a FM close to the UCNP surface while fixing their relative orientation and it would be more accessible to other molecules as if they were encapsulated inside the CB cavity.

In this report, we demonstrate that the naked UCNPs form stable UCNP@CB exclusion complexes with different sized-CBs and the UCNP@CB nanohybrids can be used as scaffolds as well as energy donors for cationic dyes anchored to the CB free carbonyl portal (a charge-dipole interaction). We have used MB and pyronin Y (PYY) as a proof of concept (see Fig. 1).

Preparation of UCNP@CB nanohybrids

Naked NaYF₄:Yb³⁺(18%), Er³⁺(2%) UCNPs were synthesised in two steps. First, oleate-capped nanoparticles (UCNP@OA) were prepared by following a previously described protocol⁴³ and then, the oleate ligand was removed by acidification with HCl.¹⁷ UCNP@CB nanohybrids were prepared by addition of a mixture of the corresponding CB[n] (*n* = 6, 7, 8) and the naked UCNP in water for 15 min, followed by stirring the mixture at room temperature for 24 h. Centrifugation made the separation of the UCNP (white powder) from the CB[n] excess possible (see experimental details in ESI†).

The nanoparticles were characterised by transmission electron microscopy (TEM and high resolution TEM, HRTEM). As shown in Fig. 2 and S1,† the naked UCNPs were uniform hexagonal prisms and their height and length were (32.7 ± 1.7) and (19.1 ± 1.4) nm, respectively. The addition of CB[n] to the naked UCNPs did not change their shape or size (Fig. 2).

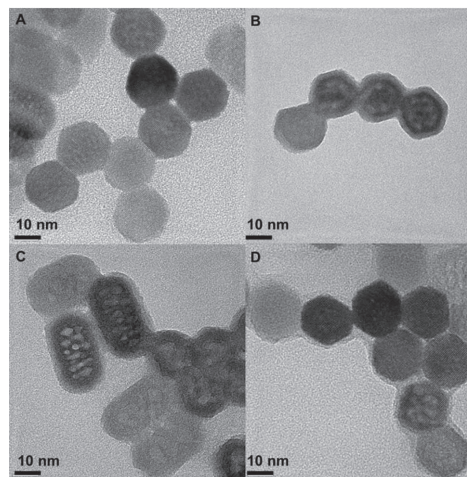


Fig. 2 Representative HRTEM image of the naked UCNPs (A), UCNP@CB[6] (B), UCNP@CB[7] (C), and UCNP@CB[8] (D).

HRTEM images show the thin organic capping of the UCNP@CB[n] nanohybrids. The thickness of this capping was 1.2 ± 0.1 nm in the case of UCNP@CB[6], 1.5 ± 0.3 nm in the UCNP@CB[7], and 1.2 ± 0.2 nm for the UCNP@CB[8]. These data are consistent with the height of the CB[n] (9.1 Å).⁴⁴

The energy-dispersive X-ray (EDX) analysis and X-ray diffraction (XRD) spectrum of the UCNPs corroborated the hexagonal phase of the NaYF₄:Er³⁺(2%),Yb³⁺(18%) nanoparticles; see Fig. S2 and S3.†

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was carried out to verify that the UCNPs were capped with the different CB[n] via one of the carbonyl portals. The FTIR spectrum of CB[6], CB[7], CB[8], and the respective CB-capped UCNPs are shown in Fig. 3. The strong band assigned to the CB ν_{as}(C=O) stretching vibration shifted to higher values in the nanohybrid. The shift was greater in the case of UCNP@CB[6] and UCNP@CB[7] (15 cm⁻¹ and 17 cm⁻¹, respectively) than in UCNP@CB[8] (4 cm⁻¹).

These changes corroborated the interaction of the CBs with the UCNP surface through the carbonyl groups (Fig. 1). The ν_{as}(C=O) stretching at higher values suggests a further deviation from the planarity of the C=O bond compared with the N-C-N plane when the CB anchored to the nanoparticle surface and this is significant for the smaller CBs. The smaller shift (4 cm⁻¹) for the largest CB as compared to that for the smaller ones (~15–17 cm⁻¹) can be attributed to a less effective interaction of the CB with the nanoparticle surface (see below).

Emission spectra of the nanohybrids were compared with that of the naked UCNPs (Fig. 4). These spectra were recorded at a concentration of 1 mg (nanoparticle core) in a 1 ml solution, using front face excitation at 980 nm.

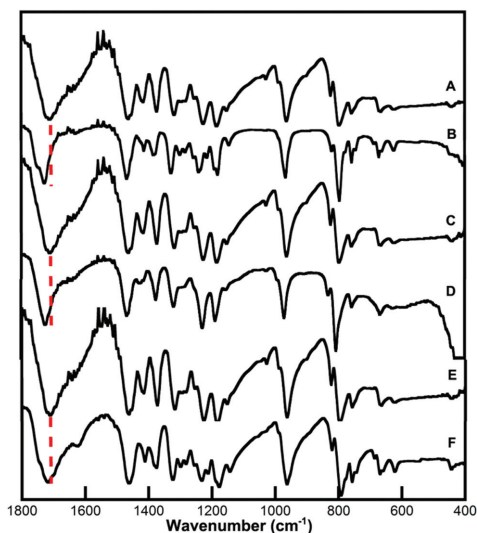


Fig. 3 FTIR spectra of (A) CB[6], (B) UCNP@CB[6], (C) CB[7], (D) UCNP@CB[7], (E) CB[8] and (F) UCNP@CB[8].

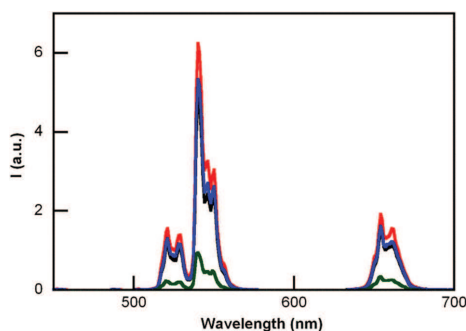


Fig. 4 Emission spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 980 \text{ nm}$) of aqueous dispersions of UCNP@CB[6] (black line), UCNP@CB[7] (red line), UCNP@CB[8] (blue line) and the naked UCNP (green line).

The emission intensity of the naked UCNP drastically increased due to the CB-capping. The enhancement recorded at 540 nm was 4.9, 6.9, and 5.4 times more than that of the naked UCNP for UCNP@CB[6], UCNP@CB[7], and UCNP@CB[8], respectively. Comparatively, the emission of the UCNP@OA nanoparticles in chloroform was only 3.5 times greater than that of the naked UCNPs in water (Fig. S4†).

Thermogravimetric analyses (TGA) of the UCNP@CB nanoconjugates and CBs were performed to gain insight into the CB[n] loading on the UCNP surface. The peak of the first derivative indicates the point of the greatest rate of change in the weight

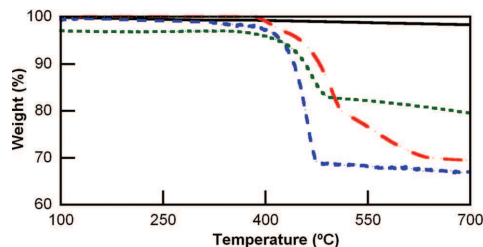


Fig. 5 Thermogravimetric analysis (TGA) of the UCNP (—), UCNP@CB[6] (—), UCNP@CB[7] (—) and UCNP@CB[8] (—).

loss curve. No decomposition was observed up to 420 °C for $n = 6$ and 8, although CB[7] starts decomposing at a lower temperature (370 °C); this is in agreement with the differences detected for the different sized CBs.⁴⁴ Fig. 5 compares the TGA spectrum of the naked UCNPs with that of UCNP@CB[7]. The weight loss before reaching 500 °C can mostly be attributed to the loss of CB[n] which is 31%, 33%, and 14% for UCNP@CB[6], UCNP@CB[7], and UCNP@CB[8], respectively.

UCNP@CB nanoconjugates as scaffolds and energy donors

As proof of concept, the versatility of the nanoconjugates as scaffolds and energy donors was tested with two cationic dyes, in particular methylene blue (MB) and pyronin Y (PYY).

Increasing concentrations of MB were added to water solutions of the UCNP@CB[n] nanoconjugates (2 mL of a 0.018 mg mL⁻¹ of UCNP@CB[n] in water). According to the TGA data, the CB[n] molar concentration of the UCNP@CB[n] dispersions was 5.5, 5.25, and 2.4 μM for UCNP@CB[6], UCNP@CB[7], and UCNP@CB[8], respectively. Aliquots of aqueous MB solutions were added (up to 100 μL) until the MB and CB[n] molar concentrations were the same.

The emission spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 980 \text{ nm}$) were recorded after each addition. Fig. 6 shows the decrease of UCNP@CB[7] emission (see bands with λ_{max} ca. 650 nm and 540 nm) at the highest MB concentration. A similar trend was found for UCNP@CB[6], while MB led to insignificant quenching of the UCNP@CB[8] emission (Fig. S5†). The different trend in the emission quenching for the nanoconjugates should be related to the type of interaction between the UCNP@CB[n] nanoconjugate and MB, *i.e.*, the formation of either an exclusion or inclusion complex and the hosting of either MB or MB₂.

The spectra of the UCNP@CB[8]/MB mixtures showed the efficient formation of the MB₂ dimer³⁹ with λ_{max} at ca. 611 nm and consequently the emission of these mixtures was practically non-existent (Fig. 7 and S6†).

Remarkably, the absorption and emission spectra of the UCNP@CB[7]/MB mixtures (at λ_{max} at ca. 664 and 684 nm,

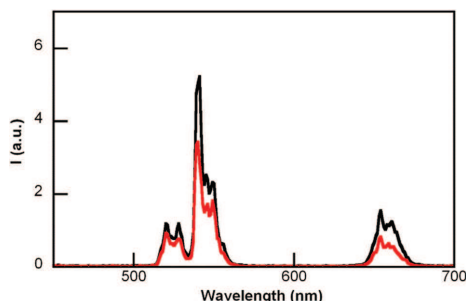


Fig. 6 Emission spectra (λ_{exc} 980 nm) of UCNP@CB[7] before and after the addition of MB (MB and CB were at the same concentration).

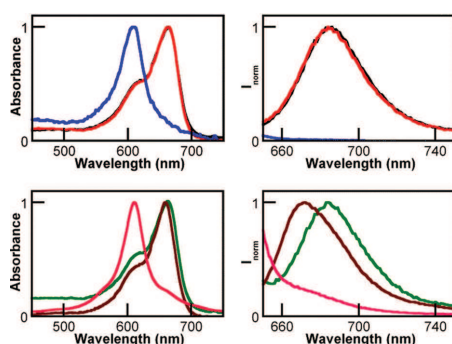


Fig. 7 Top: (left) Absorption and (right) emission spectra at λ_{exc} = 640 nm of water solutions of UCNP@CB[n]/MB containing MB and CB at the same concentration: UCNP@CB[6]/MB (black line), UCNP@CB[7]/MB (red line), and UCNP@CB[8]/MB (blue line); the absorption spectra of the UCNP@CB[n]/MB mixture as well as the emission spectra of UCNP@CB[n]/MB ($n = 6$ and 7) have been normalized. Bottom: (left) Absorption and (right) emission spectra at λ_{exc} = 640 nm of water solutions of CB[6]/MB (green line), CB[7]/MB (brown line), and CB[8]/MB (pink line); all of them at the same MB concentration. The spectra of CB[n]/MB ($n = 6$ and 7) have been normalized.

respectively) were coincident with that of UCNP@CB[6]/MB and free MB; see Fig. 7 left and S6.†

It has to be taken into account that CB[7] can encapsulate MB and this results in a blue-shifted absorption and emission (Fig. 7) due to the formation of the CB[7]@MB inclusion complex,³¹ which is not possible for CB[6].

These results are consistent with the formation of exclusion complexes between the UCNP@CB[n] ($n = 6, 7$) nano-hybrids and MB, *i.e.*, the formation of UCNP@CB[n]@MB nanosystems due to a more favourable interaction between the cationic dye and the CB free carbonyl portal of the UCNP@CB[n] nano-hybrid than between the CB cavity and the cationic dye (Fig. 1).

The ¹H-NMR spectrum of the UCNP@CB[7]/MB (the same concentration of CB and MB) was recorded to corroborate the anchoring of MB to the UCNP@CB nano-hybrid and to gain

insight into the orientation of MB in the nanosystem. As expected, the signals of the CB and MB moieties were broader in the UCNP@CB[7]/MB nano-hybrid compared with those of free MB and CB[7] (Fig. 8 and S7†). With the exception of the protons of the dimethylamino groups which underwent a slight low field shift, the other MB protons, mainly those close to the sulphur atom as well as those of the CB moiety, shifted to high field. Remarkably, the number of signals for the MB moiety of UCNP@CB[7]/MB was the same as that for MB, thus ruling out the coordination of MB through one of the dimethylamino groups. Consequently, we propose that MB stands symmetrically located on the CB[n] free carbonyl portal and it is bound to the carbonyls *via* the MB central sulphur cation (Fig. 2).

Similar experiments were carried out with pyronin Y (PYY). The UCNP emission was considerably quenched while using UCNP@CB[6] and UCNP@CB[7], but no emission changes were detected in the case of UCNP@CB[8] (Fig. 9).

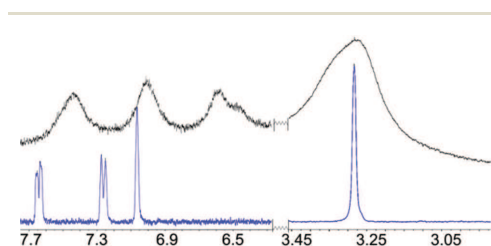


Fig. 8 Comparison between the ¹H-NMR spectrum of UCNP@CB[7]-@MB (top) and that of MB (bottom).

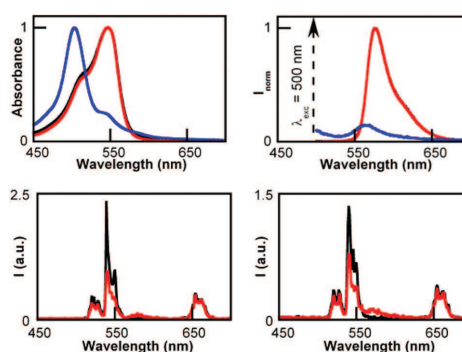


Fig. 9 Top: (left) Absorption and (right) emission spectra (λ_{exc} 540 nm) of water dispersion of UCNP@CB[n]/PYY containing PYY and CB at the same concentration: UCNP@CB[6]/PYY (black line), UCNP@CB[7]/PYY (red line), and UCNP@CB[8]/PYY (blue line); the absorption spectra of the UCNP@CB[n]/PYY mixtures as well as the emission spectra of UCNP@CB[n]/PYY ($n = 6, 7$ and 8) have been normalized. Bottom: Emission spectra (λ_{exc} 980 nm) of UCNP@CB[n] ($n = 6$ and 7), at the left and right hand, respectively) before (black line) and after (red line) the addition of PYY; PYY and CB were at the same concentration.

As observed for MB, the different trend in the nanohybrid emission quenching was consistent with the formation of UCNP@CB[*n*]@PYY (*n* = 6 and 7) nanohybrids. The absorption spectra of the UCNP@CB[*n*]@PYY mixtures showed the typical band of the monomer at λ_{max} 545 nm for *n* = 6, 7, while the PYY dimer (λ_{max} 500 nm) was observed for *n* = 8 (Fig. 9, top; Fig. S8†). In contrast to the MB emission, the PYY band slightly overlaps with that of the UCNP (Fig. 9, top). Consequently, the emission spectra at λ_{ex} 545 nm of UCNP@CB[*n*]@PYY (*n* = 6, 7) showed the PYY monomer emission (peak at λ_{max} 563 nm), thus evidencing the energy transfer from the UCNP to PYY (Fig. 9, bottom; see the proposed interaction between UCNP@CB[7] and PYY in Fig. S9†).

Recovery of the UCNP@CB nanohybrids

UCNP@CB[*n*]/MB solutions containing the same concentration of CB and MB were centrifuged at 10 000 rpm for 10 minutes at room temperature. The absorption spectrum of the precipitate and the supernatant were compared with that of the corresponding UCNP@CB[*n*]/MB mixture (Fig. 10).

These spectra showed that in all cases, most of the MB remained in the supernatant and the precipitate consisted of UCNP@CB[*n*]. The supernatant of the UCNP@CB[*n*]/MB

mixture (*n* = 6, 7) contained only free MB, while that of the UCNP@CB[8]/MB contained the MB₂@CB[8] inclusion complex. It has to be taken into account that the concentration of CB and MB in the UCNP@CB[8]/MB mixture was the same and, since MB was encapsulated as a dimer within the CB cavity, half of the CB units in UCNP@CB[8] remained empty. Therefore, the precipitate from the UCNP@CB[8]/MB mixture consisted of UCNPs partially capped with CB[8] units and, consequently, exhibited lower emission. These data suggest that in UCNP@CB[*n*]@MB (*n* = 6 and 7), the binding between CB and UCNP is stronger than that between CB and MB. In the case of UCNP@CB[8]/MB, the binding of MB₂ to the CB cavity proved to be stronger than the binding of MB₂@CB[8] to the UCNP surface.

UCNP@CB@MB in singlet oxygen generation

Methylene blue has been used in a variety of photochemical applications including photodynamic therapy.^{45,46} Therefore, the UCNP@CB[*n*]/MB mixtures with the higher molar concentration of MB were tested in the generation of singlet oxygen under near-IR irradiation (in particular, at 980 nm). In principle, one would expect the UCNP@CB[8]/MB mixture to be the least efficient, since MB dimers are less efficient in the ¹O₂ generation than the MB monomer.⁴⁶

1,3-Diphenylisobenzofuran (DPBF) was used as a probe of singlet oxygen generation. This probe seemed to be adequate for these studies since it presents a broad absorption band in the 350–450 nm range where MB and MB₂ exhibit negligible absorbance. DPBF is a good energy acceptor because it reacts rapidly with ¹O₂. It does not react either with the ground state molecular oxygen or with the superoxide anion, and its only reaction with ¹O₂ is chemical, leading to dibenzoylbenzene (DBB), which does not absorb in the 350–450 nm wavelength range.

Irradiation at 980 nm of UCNP@CB[*n*]@MB (*n* = 6 and 7) nanohybrids in the presence of DPBF at different intervals of time (up to 70 min) led to degradation of the probe, which was monitored by the loss of absorbance at 422 nm (*A*₄₂₂). Fig. 11 (top) shows the absorption spectra of the UC@CB[7]@MB solution in the presence of DPBF, before and after each irradiation, while Fig. 11 (bottom) shows the comparison between the loss of absorbance at *A*₄₂₂ in the presence of UCNP@CB[6] and of UCNP@CB[7]. This process involves several energy transfer processes: upconversion emission after excitation of UCNP@CB[*n*]@MB at 980 nm; energy transfer from the UCNP to MB to lead eventually to the MB triplet excited state (³MB) and energy transfer from ³MB to molecular oxygen to form singlet oxygen, which reacts with DPBF to produce DBB. The rate of consumption of the substrate, calculated from the measurements at shorter irradiation time periods (30 seconds) for the first 15 min was *ca.* 80 min⁻¹ and 11 min⁻¹ for UCNP@CB[7] and UCNP@CB[6], respectively.

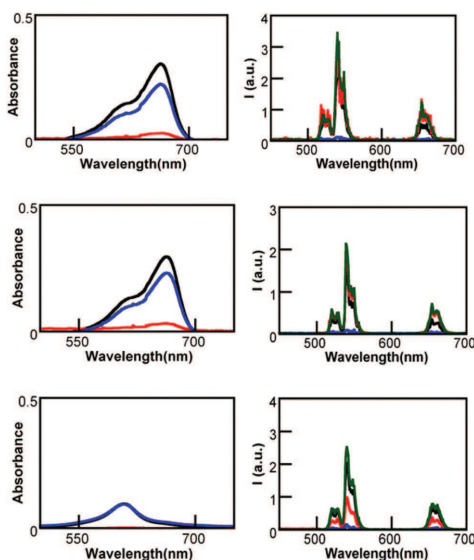


Fig. 10 Absorption (left) and emission spectra (right) at λ_{ex} = 980 nm of the UCNP@CB[*n*]/MB mixture (in black), the precipitate (in red) and the supernatant (in blue) obtained after centrifugation. Top: *n* = 6; centre: *n* = 7; bottom: *n* = 8. For comparative purposes the emission spectrum of the corresponding UCNP@CB[*n*] is included (in green).



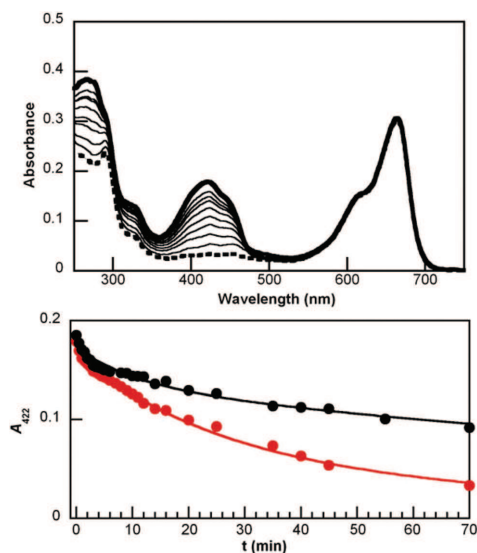


Fig. 11 (Top) Absorption spectrum of an aqueous dispersion of UCNP@CB[7]@MB and DPBF (thick line) and its evolution after prolonged irradiation at 980 nm (up to 70 min, --). (Bottom) Plot showing the degradation of DPBF (monitored at 422 nm) in the presence of its corresponding UCNP@CB[n]/MB mixture: $n = 6$ (black), $n = 7$ (red).

The lower efficiency of the nanohybrid UCNP@CB[6]@MB than that of the UCNP@CB[7]@MB in halving the DPBF concentration is consistent with the lower luminescence of UCNP@CB[6]@MB (see Fig. 4) combined with the lower dye load of this nanohybrid (see TGA data).

Conclusions

We have demonstrated that the spontaneous adsorption of CB[n] ($n = 6, 7$, and 8) on NaYF₄:Er³⁺(2%),Yb³⁺(18%) nanoparticle surface gives rise to UCNP@CB[n] nanohybrids, which have been proved to be highly stable. Those with $n = 6$ and 7 lead to exclusion complexes with MB, in which the interaction between MB and the CB carbonyl portal is weaker than that between the UCNP surface and CB. However, MB destabilised the interaction between the UCNP and the CB in UCNP@CB[8] due to the CB-encapsulation of the MB₂ dimer. Similarly, PYY also led to spontaneous attachment to the CB free carbonyl portals of the UCNP@CB[n] ($n = 6, 7$) systems and energy transfer from the scaffold to PYY produced the emission of the dye under NIR-irradiation.

In addition, the UCNP@CB[7]@MB nanohybrid has been proved to be more efficient in the singlet oxygen generation than the UCNP@CB[6]@MB nanohybrid under NIR excitation. Therefore, UCNP@CB[n] nanohybrids can act as scaffolds and

efficient energy donors for cationic dyes by matching the nature of the UCNP with that of the dye. Taking into account the interest of tricyclic basic dyes in photodynamic therapy, these UCNP@CB[7]@dye supramolecular systems may be highly advantageous for this type of treatment.

Acknowledgements

We thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Projects CTQ2011-27758; Ramón y Cajal contract for M.G.B. and F.P.U. grant for L.F.S.).

Notes and references

- 1 A. Gnach and A. Bednarkiewicz, *Nano Today*, 2012, 7, 532–563.
- 2 F. Wang, D. Banerjee, Y. Liu and X. C. X. Liu, *Analyst*, 2010, 135, 1839–1854.
- 3 X. Wang, J. Zhuang, Q. Peng and Y. Li, *Nature*, 2005, 437, 121–124.
- 4 F. Wang and X. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 5642–5643.
- 5 M. An, J. Cui, Q. He and L. Wang, *J. Mater. Chem. B*, 2013, 1, 1333–1339.
- 6 J.-C. G. Bunzli and S. V. Eliseeva, *Chem. Sci.*, 2013, 4, 1939–1949.
- 7 L.-Q. Xiong, Z.-G. Chen, M.-X. Yu, F.-Y. Li, C. Liu and C.-H. Huang, *Biomaterials*, 2009, 30, 5592–5600.
- 8 J. Zhou, Y. Sun, X. Du, L. Xiong, H. Hu and F. Li, *Biomaterials*, 2010, 31, 3287–3295.
- 9 H. S. Qian, H. C. Guo, P. C.-L. Ho, R. Mahendran and Y. Zhang, *Small*, 2009, 5, 2285–2290.
- 10 J. C. Boyer, F. Vetrone, L. A. Cuccia and J. A. Capobianco, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 7444–7445.
- 11 J.-C. Boyer, L. A. Cuccia and J. A. Capobianco, *Nano Lett.*, 2007, 7, 847–852.
- 12 H.-Q. Wang and T. Nann, *ACS Nano*, 2009, 3, 3804–3808.
- 13 H.-X. Mai, Y.-W. Zhang, R. Si, Z.-G. Yan, L.-d. Sun, L.-P. You and C.-H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 6426–6436.
- 14 J. Chen and J. X. Zhao, *Sensors*, 2012, 12, 2414–2435.
- 15 M. Liras, M. González-Béjar, E. Peinado, L. Francés-Soriano, J. Pérez-Prieto, I. Quijada-Garrido and O. García, *Chem. Mater.*, 2014, 26, 4014–4022.
- 16 V. Voliani, M. González-Béjar, V. Herranz-Pérez, M. Duran-Moreno, G. Signore, J. M. García-Verdugo and J. Pérez-Prieto, *Chem. – Eur. J.*, 2013, 19, 13538–13546.
- 17 N. Bogdan, F. Vetrone, G. A. Ozin and J. A. Capobianco, *Nano Lett.*, 2011, 11, 835–840.
- 18 Y. Ding, H. Zhu, X. Zhang, J. J. Zhu and C. Burda, *Chem. Commun.*, 2013, 49, 7797–7799.
- 19 Q. Liu, C. Li, T. Yang, T. Yi and F. Li, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 5551–5553.
- 20 E. Masson, X. Ling, R. Joseph, L. Kyeremeh-Mensah and X. Lu, *RSC Adv.*, 2012, 2, 1213–1247.

- 21 G. Ghale and W. M. Nau, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**, 2150–2159.
- 22 J. Kim, I. S. Jung, S. Y. Kim, E. Lee, J. K. Kang, S. Sakamoto, K. Yamaguchi and K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 540–541.
- 23 S. D. Choudhury, J. Mohanty, H. Pal and A. C. Bhasikuttan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 1395–1401.
- 24 H. Tang, D. Fuentealba, Y. H. Ko, N. Selvapalam, K. Kim and C. Bohne, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 20623–20633.
- 25 J. Lü, J.-X. Lin, M.-N. Cao and R. Cao, *Coord. Chem. Rev.*, 2013, **257**, 1334–1356.
- 26 Q. An, G. Li, C. Tao, Y. Li, Y. Wu and W. Zhang, *Chem. Commun.*, 2008, **17**, 1989–1991.
- 27 T. Premkumar, Y. Lee and K. E. Geckeler, *Chem. – Eur. J.*, 2010, **16**, 11563–11566.
- 28 X. Lu and E. Masson, *Langmuir*, 2011, **27**, 3051–3058.
- 29 M. Cao, D. Wu, S. Gao and R. Cao, *Chem. – Eur. J.*, 2012, **18**, 12978–12985.
- 30 M. Cao, J. Lin, H. Yanga and R. Cao, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 5088–5090.
- 31 A. Lanterna, E. Pino, A. Doménech-Carbó, M. González-Béjar and J. Pérez-Prieto, *Nanoscale*, 2014, **6**, 9550–9553.
- 32 R. W. Taylor, T.-C. Lee, O. A. Scherman, R. Esteban, J. Aizpurua, F. M. Huang, J. J. Baumberg and S. Mahajan, *ACS Nano*, 2011, **5**, 3878–3887.
- 33 S. Kasera, F. Biedermann, J. J. Baumberg, O. A. Scherman and S. Mahajan, *Nano Lett.*, 2012, **12**, 5924–5928.
- 34 P. Thuéry, *CrystEngComm*, 2012, **14**, 8128–8136.
- 35 L.-L. Liang, Y. Zhao, K. Chen, X. Xiao, J. Clegg, Y.-Q. Zhang, Z. Tao, S.-F. Xue, Q.-J. Zhu and G. Wei, *Polymer*, 2013, **5**, 418–430.
- 36 O. A. Gerasko, E. A. Mainicheva, M. I. Naumova, O. P. Yurjeva, A. Alberola, C. Vicent, R. Llusar and V. P. Fedin, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2008, **2008**, 416–424.
- 37 K. Chen, L.-L. Liang, H.-J. Liu, Y.-Q. Zhang, S.-F. Xue, Z. Tao, X. Xiao, Q.-J. Zhu, L. F. Lindoy and G. Wei, *CrystEngComm*, 2012, **14**, 7994.
- 38 L.-L. Liang, Y. Zhao, Y.-Q. Zhang, Z. Tao, S.-F. Xue, Q.-J. Zhu and J.-X. Liu, *CrystEngComm*, 2013, **15**, 3943.
- 39 P. Montes-Navajas, A. Corma and H. Garcia, *ChemPhysChem*, 2008, **9**, 713–720.
- 40 J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti and L. Isaacs, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 4844–4870.
- 41 P. F. C. Menezes, C. Bernal, H. Imasato, V. S. Bagnato and J. R. Perussi, *Laser Phys.*, 2007, **17**, 468–471.
- 42 K. Senthilkumar, P. Paul, C. Selvaraju and P. Natarajan, *J. Phys. Chem. C*, 2010, **114**, 7085–7094.
- 43 Z. Li and Y. Zhang, *Nanotechnology*, 2008, **19**, 345606–345610.
- 44 J. W. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, H.-J. Kim and K. Kim, *Acc. Chem. Res.*, 2003, **36**, 621–630.
- 45 L. M. Moreira, J. P. Lyon, A. P. Romani, D. Severino, M. R. Rodrigues and H. P. M. de Oliveira, in *Advanced Aspects of Spectroscopy*, 2012, pp. 393–422.
- 46 J. P. Tardivo, A. Del Giglio, C. S. de Oliveira, D. S. Gabrielli, H. C. Junqueira, D. B. Tada, D. Severino, R. de Fátima Turchiello and M. S. Baptista, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2005, **2**, 175–191.



Efficient Cementing of $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbBr}_3$ Nanoparticles to Upconversion Nanoparticles Visualized by Confocal Microscopy

Laura Francés-Soriano, Soranyel Gonzalez-Carrero, Enrique Navarro-Raga, Raquel E. Galian, María González-Béjar,* and Julia Pérez-Prieto*

Upconversion-perovskite nano hybrids are prepared by assembling $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbBr}_3$ perovskite nanoparticles (PK) with naked $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ nanoparticles (UC_n) via an innovative strategy consisting of using cucurbit[7]uril (CB[7]) to anchor the perovskite nanoparticles firmly and closely to the upconversion nanoparticles, thus leading to $\text{UC}_n@ \text{PK}_{\text{CB}}$ nano hybrids. A commercial multiphoton laser scanning confocal microscope is used to demonstrate the successful assembly. This technique proves to be useful to evaluate luminescence lifetime in the range of several tens of μs and allows visualization of the extraordinarily efficient nontrivial resonance energy transfer from the upconversion nanoparticle to the perovskite after near-infrared (NIR) excitation of the nano hybrid as well as the homogeneity of the $\text{UC}_n@ \text{PK}_{\text{CB}}$ sample. The considerable photostability of the perovskite in these nano hybrids is demonstrated by prolonged irradiation of the nano hybrid under UV light as well as under NIR light.

conventional organic fluorophores. In addition, the response of the UCs to NIR excitation impedes the autofluorescence of the medium (e.g., a biological medium) and makes their excitation deep in tissues possible due to the considerable penetration of the NIR light.^[1]

Undoubtedly, organolead halide perovskite materials of the general formula $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbX}_3$ (X is the halogen) are also of great interest due to their unique optical properties (broad absorption band, extremely high optical absorption coefficient, narrow emission),^[5] excitonic properties,^[6] and electrical conductivity,^[7] which make them useful for photovoltaic applications and luminescent devices.^[8]

Upconversion nanoparticles have been combined with a large number of different organic luminophores.^[9] However, there

are few examples of their assembly with luminescent nanoparticles; studies are limited to CdSe quantum dots^[2] or carbon dots.^[10] In contrast to CdSe quantum dots, organic-inorganic $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbBr}_3$ perovskite nanoparticles (PK) can be prepared under very mild conditions^[11] and they can exhibit high PL quantum yield and photostability in air without requiring an inorganic shell.^[11a,b] To the best of our knowledge, nano hybrids consisting of UCs and organometal halide perovskite nanoparticles have not been synthesized to date, and therefore their assembly is worth studying.

The assembly of two types of luminescent nanoparticles to lead to an efficient energy transfer and eventually to a nano hybrid with good emissive capacity is not trivial. On one hand, it requires an efficient linkage between both types of nanoparticles. On the other hand, the emissive properties of the donor and the acceptor should not be strongly affected in the assembly.

Interdigitation between the ligands on the nanoparticles is a usual strategy to assemble them.^[2e] We envisaged that rigid and considerably shorter compounds, specifically cucurbiturils (CB[n], $n = 5-7$), could be more suitable to attach nanoparticles (such as UCs and perovskites) firmly and closely. We have recently shown that naked $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ nanoparticles can be efficiently capped with CB[n].^[12] In addition, CB[n] possess two portals with the capacity to bind cations.^[13] Therefore, this type of rigid ligand may be anchored, simultaneously, to the surface of a UC and a perovskite nanoparticle (Figure 1).

1. Introduction

The combination of nanomaterials to make new nano hybrids with novel properties is an interesting and difficult task that requires exceptional control at the nanoscale. In particular, upconversion nanoparticles (UCs) have been combined with other inorganic nanoparticles^[1] such as quantum dots,^[2] metallic nanoparticles,^[3] and magnetites.^[4]

Increasing interest in UCs is based on their unique photoluminescence (PL) properties.^[1] Thus, lanthanide-doped UCs are able to convert near-infrared (NIR) light to visible light (anti-Stokes shifted luminescence) due to their intraconfigurational 4f electron transitions; they exhibit narrow emission bands; and they have higher chemical and photochemical stability than

L. Francés-Soriano, S. Gonzalez-Carrero,
Dr. R. E. Galian, Dr. M. González-Béjar,
Prof. J. Pérez-Prieto
Instituto de Ciencia Molecular (ICMol)
University of Valencia
C/ Catedrático José Beltrán
2, Paterna, Valencia 46980, Spain
E-mail: maria.gonzalez@uv.es; julia.perez@uv.es
Dr. E. Navarro-Raga
Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE)
University of Valencia
Burjassot, Valencia 46100, Spain



DOI: 10.1002/adfm.201600786

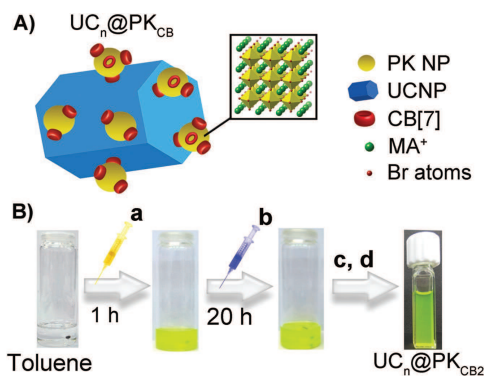


Figure 1. A) Structure proposed for the UC_n@PK_{CB} nanostructure. B) Schematic representation of the synthesis of UC_n@PK_{CB2}: (a) PbBr₂, MABr, ADABr, and CB[7] in DMF; (b) UC_n in DMF; (c) decantation and separation; and (d) dispersion in toluene.

We report here that CB[7] can be used to cement efficiently PK to the surface of naked UCs (UC_n), thus leading to an efficient nontrivial energy transfer from the UC to the PK after NIR excitation of the upconversion-perovskite nanostructure. Interestingly, a commercial multiphoton laser scanning confocal microscope proved to be a useful tool for evaluating the effectiveness of this innovative strategy for the assembly of the nanoparticles.

2. Results and Discussion

2.1. Preparation and Characterization of Upconversion-Perovskite Nanostructure

Upconversion nanoparticles of NaYF₄:Yb³⁺(22%), Tm³⁺ (1.2%) (UCs) were selected for this study due to the overlap between the UC emission at wavelengths <500 nm and the CH₃NH₃PbBr₃ PK absorption and because there is no overlap between their emission bands.

The first attempt to prepare the nanostructure consisted in the addition of CB[7]-capped perovskite nanoparticles (PK_{CB}) to naked UC (UC_n), based on the ability of CB[7] to stick to naked UCs (see the strategy in Figure S1 of the Supporting Information).^[14]

To that purpose, oleate-capped UC (UC_{OLA}) were synthesized following a method previously reported in literature.^[15] Transmission electron microscopy (TEM) images showed that UC_{OLA} were uniform hexagonal prisms and their average size was (27.8 ± 1.6) nm × (18.1 ± 1.4) nm. Size distribution histograms, energy dispersive X-ray analysis, and Powder X-Ray Diffraction (PXRD) data can be found in the Supporting Information (Figures S2–S4 of the Supporting Information). UC_n were easily prepared by acidification with HCl of a dispersion of UC_{OLA} nanoparticles.^[16]

However, the preparation of PK_{CB} was less satisfactory. A solution of CB[7] in *N,N*-dimethylformamide (DMF) was added

Table 1. Luminescence data ($\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm) of PK_{CB} and perovskite in the UC_n@PK_{CB} nanostructure.

	PK _{CB}	UC _n @PK _{CB1}	UC _n @PK _{CB2}
λ_{em} [nm]	538	523	525
FWHM [nm]	26	22	18
τ_{av} [ns]	–	319.4	1303.2
Φ_{F}	–	0.05	0.13

to a mixture of methylammonium bromide (MABr) plus PbBr₂ (CH₃NH₃Br/PbBr₂ with 2:1 molar ratio and PbBr₂/CB[7] with 14.3:1.0 molar ratio) also in DMF. Then, 200 μ L of the mixture was injected into 5 mL of toluene. However, this gave rise to orange perovskites with low dispersibility that indicated low efficiency in the formation of the perovskite as nanoparticle. Although we succeeded in registering the perovskite PL spectrum (peak at 538 nm; see Figure S5 of the Supporting Information), its emission was negligible. Nevertheless, taking into account the high structural flexibility of perovskites, this orange solution was used for the preparation of UC_n@PK_{CB1} nanostructure. Addition of UC_n nanoparticles to the perovskite dispersion did not lead to any color change. Interestingly, the colloidal dispersion became yellowish after prolonged stirring (3 d) in the presence of an additional amount of CB (see the emission spectra in Figure S1 of the Supporting Information), thus suggesting the formation of UC_n@PK_{CB1} nanostructure, although the emission ($\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm) of the perovskite in this nanostructure was low ($\Phi_{\text{F}} = 5\%$), see Table 1.

Remarkably, following the same strategy but adding adamantylammonium bromide (ADABr) to the perovskite precursors, we obtained UC_n@PK_{CB2} nanostructure, which contained more emissive perovskites (see the strategy in Figure 1).

Thus, UC_n were added to a toluene mixture containing MABr, ADABr, CB[7], and PbBr₂ and the dispersion was stirred at room temperature for 20 h. Then, the nanostructure were allowed to precipitate and were isolated by decantation. The role of ADABr in the formation of the UC_n@PK_{CB2} nanostructure was to facilitate the perovskite crystallization on the UC since it was not present in the final material. Figure 2A shows a representative TEM image of the isolated solid, where the presence of perovskite nanoparticles on the UC surface is clearly distinguished.^[17]

Remarkably, no bulk perovskites or perovskite nanoparticles embedded in amorphous material forming plaques can be observed. The size of PK nanoparticles on the nanostructure was 4.3 ± 1.4 nm. Figure 2B shows the absorption and PL ($\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm) spectra of the UC_n@PK_{CB2} nanostructure. The absorption spectrum evidences the presence of the perovskite ($\lambda_{\text{max}} = 520$ nm) as well as additional scattering due to the upconversion nanoparticle. The PL spectrum shows a very narrow band (full width at the half maximum, FWHM, of 18 nm) at $\lambda_{\text{max}} = 525$ nm (Table 1). The perovskite Φ_{F} in the UC_n@PK_{CB2} nanostructure was twofold higher than in the UC_n@PK_{CB1} nanostructure, which evidences the beneficial effect of ADABr addition in the crystallization of the perovskite on the UC_n surface.

These data are consistent with the formation of UC_n@PK_{CB2} nanostructure and the role of CB[7] as a cementing agent

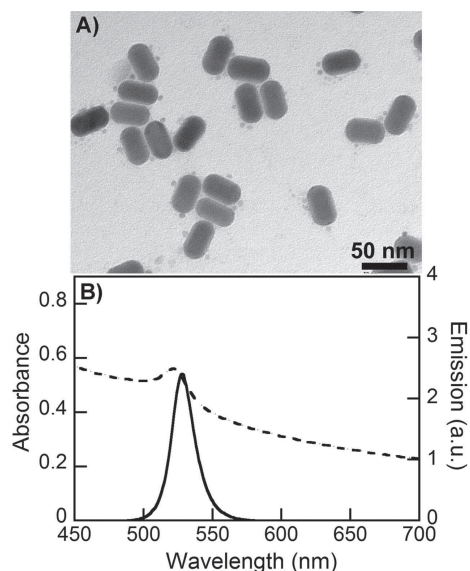


Figure 2. A) TEM image of $UC_n@PK_{CB2}$ nanohybrids. B) Absorption (black line) and emission spectra of $UC_n@PK_{CB2}$ nanohybrids (dashed line) in toluene. Emission measured using a front-face setup.

to bring the UC and the PK surfaces closer together. This was further corroborated by attenuated total reflectance Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy (Figure 3A). The FTIR spectrum of CB[7] exhibited a strong band at 1710 cm^{-1} which corresponds to the stretching vibration of its carbonyl groups, $\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{O})$. For $UC_n@PK_{CB2}$ nanohybrids this band shifted to 1734 cm^{-1} ; this change can be attributed to the interaction between CB[7] and the nanoparticles.^[12]

The thermogravimetric analysis (TGA) spectrum of the $UC_n@PK_{CB2}$ nanohybrid was also consistent with the presence of CB[7] (Figure 3B). It presented three main weight losses of ca. 18.0%, 12.0%, and 30% before reaching 300, 400, and 620 °C, respectively. The spectrum showed that about 40% of the mass did not decompose or sublimate at temperatures above 800 °C, which is a characteristic for this type of UCs.^[12] The peaks of the first derivative indicate the points at which the greatest rate changes in the weight loss curve occurred at ca. 304, 390, and in the 500–650 °C temperature range. Comparatively, the TGA spectra of the methylammonium salt, CB[7], and $PbBr_2$ (Figure S6, Supporting Information) show that the peak of the first derivative occurred at ca. 335, 460, and 625 °C, respectively. This indicates that these components in the nanohybrid are released at a lower temperature.

In addition, Figure 4 shows the PXRD spectrum of the $UC_n@PK_{CB2}$ nanohybrid where the characteristic diffraction peaks for $CH_3NH_3PbBr_3$ ^[11a] (most intense ones are (001), (011), (002), (021), and (211) at 14.9° , 21.1° , 30.1° , 33.7° , and 37.1° , respectively) can be assigned with minimal overlap with the diffraction peaks of the hexagonal UC.

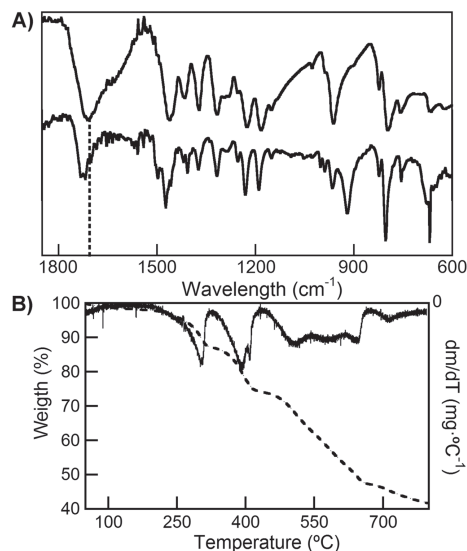


Figure 3. A) FTIR spectra of CB[7] (top) and $UC_n@PK_{CB2}$ (bottom). B) TGA heating curve of $UC_n@PK_{CB2}$ nanohybrid expressed as weight (%) as a function of applied temperature together with the corresponding first derivative.

2.2. Efficiency of the Cementing Strategy for the Preparation of the Nanohybrids

The energy transfer from the UC to the PK in the nanohybrids under NIR excitation can give information on the suitability of this strategy to build upconversion-perovskite nanohybrids. The emission of the UC_n as well as those of the nanohybrids after their excitation at 975 nm with a laser diode was measured with a front-face setup. Figure 5 shows four characteristic Tm^{3+} emission bands below 500 nm, which correspond to $^1I_6 \rightarrow ^3F_4$ (345 nm), $^1D_2 \rightarrow ^3H_6$ (368 nm), $^1D_2 \rightarrow ^3F_4$ (450 nm), and $^1G_4 \rightarrow ^3H_6$ (475 nm) transitions.^[1] The bands at 650, 700, and 800 nm can be seen in Figure S7 of the Supporting Information.

The absorption spectrum of the PK overlaps significantly with the emission of the UC below 500 nm (compare Figures 2B and 5). NIR excitation of the $UC_n@PK_{CB2}$ nanohybrids led to a considerable quenching of the UC emission below 500 nm (a decrease of 75% with regard to that of UC_n). This quenching resulted in a new emission band with a maximum at ca. 525 nm, which can be ascribed to the PK (Figure 2B), thus confirming the energy transfer from the UC to the PK after NIR excitation. Control experiments showed that the PKs did not give rise to any emission under the same conditions.

In order to estimate the energy transfer efficiency, several considerations were taken into account. First, the concentration of the UC material used in both samples, UC_n and $UC_n@PK_{CB}$, was identical, and second, they were excited at 975 nm using a front-face setup. The UC quenched emission, i.e., $(I_0 - I)_{UC}$, was calculated by subtracting the area under the curve of the

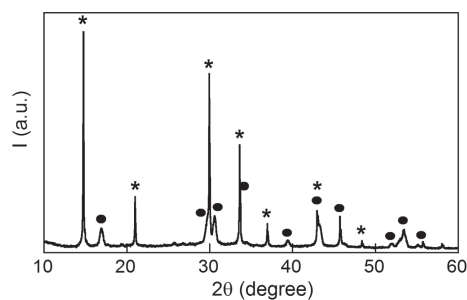


Figure 4. PXRD spectrum of $UC_n@PK_{CB2}$ nanohybrid. In this spectrum, the diffraction peaks of perovskite are marked with an asterisk and those of the upconversion nanoparticles with a dot.

nanohybrid emission spectrum (I_{UC}) from that of the UC_n emission spectrum (I_0)_{UC} (both in the 300–500 nm range). Then, the area under the curve of the perovskite emission (I_{PK}) in the $UC_n@PK_{CB}$ emission spectrum was calculated in the 500–560 nm range. The energy transfer efficiency (E) was estimated by using

$$E (\%) = \frac{I_{PK}}{(I_0 - I_{UC})\Phi_{PK}} 100 \quad (1)$$

where Φ_{PK} refers to the perovskite emission quantum yield in the $UC_n@PK_{CB}$ nanohybrids (0.13; see Table 1). Thus, the estimated energy transfer efficiency from the upconversion nanoparticle to the perovskite nanoparticle in the $UC_n@PK_{CB}$ nanohybrid was ca. 100%.

The suitability of the cementing strategy was then compared with that of interdigitation by building nanohybrids via the interaction between octylammonium-capped perovskites (PK_{OCA}) and oleate-capped UCs (UC_{OLA}) to lead to $UC_{OLA}@PK_{OCA}$ nanohybrids.

The PK_{OCA} were prepared with an average size of 5.7 ± 2.2 nm by following a previously reported protocol with some modifications (see the Experimental Section).^[11b] Their

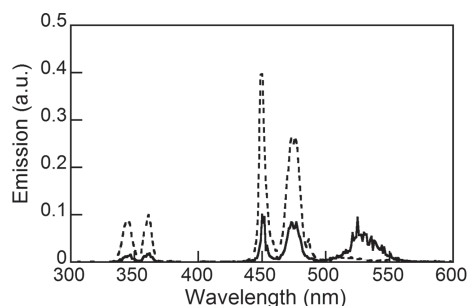


Figure 5. Emission spectra at $\lambda_{exc} = 975$ nm of UC_n (dashed line) and $UC_n@PK_{CB2}$ nanohybrids (black line) in DMF:toluene (0.025:1). Emission measured with a front-face setup.

optical features are shown in Figure S8 and Table S1 of the Supporting Information.

Then, the synthesis of the nanohybrids was addressed. Trials to obtain the $UC_{OLA}@PK_{OCA}$ nanohybrids via chain interdigitation between the oleate and octylammonium ligands on the UC and PK surfaces, by just mixing both types of nanoparticles in toluene, were fruitless. So a slightly different protocol was designed. Specifically, PK_{OCA} were dissolved in DMF to revert the perovskite back to its precursors. Then, some μ L of this colorless solution was added dropwise to a solution of UC_{OCA} in toluene. This led to a yellow dispersion from which a precipitate was isolated by decantation. Figure S9 (Supporting Information) shows representative TEM images of the precipitate that is consistent with the formation of the $UC_{OLA}@PK_{OCA}$ nanohybrids by interdigitation between the octylammonium and the oleate capping of UC_{OLA} followed by crystallization of the PK_{OCA} assembled with UC_{OLA} . The PK_{OCA} in the $UC_{OLA}@PK_{OCA}$ nanohybrids had an average diameter of 4.6 ± 1.7 nm.

Steady-state PL at $\lambda_{exc} = 350$ nm gave information about the optical features of the PK_{OCA} in the nanohybrid. They exhibited a narrow emission peak (FWHM, ≈ 24 nm) at 529 nm and an emission quantum yield (Φ_F) of 69% (Figure 6A and Table S1 of the Supporting Information).

NIR excitation of the $UC_{OLA}@PK_{OCA}$ led to a quenching of 66% of the UC emission below 500 nm combined with the emission of the perovskite material (maximum ca. 530 nm,

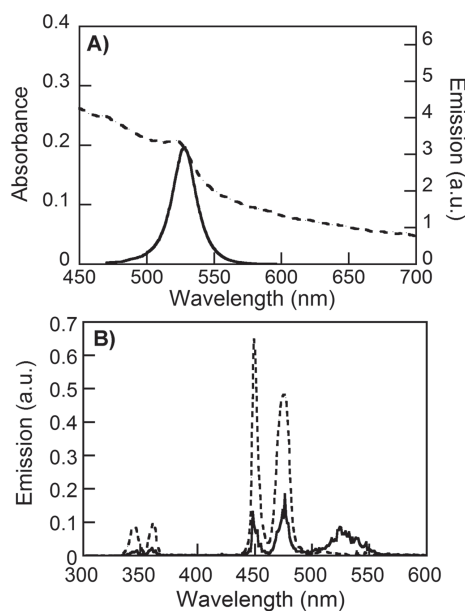


Figure 6. A) Absorption (dashed line) and emission spectra at $\lambda_{exc} = 350$ nm (black line) of $UC_{OLA}@PK_{OCA}$ nanohybrid. B) Emission spectra at $\lambda_{exc} = 975$ nm of UC_{OLA} (dashed line) and $UC_{OLA}@PK_{OCA}$ nanohybrid (black line) in toluene.

Figure 6B), thus confirming the energy transfer from the UC to the PK after NIR excitation. Similarly, the energy transfer efficiency for the UC_{OLA}@PK_{OCA} nanohybrid, calculated with Equation (1) and using the UC_{OLA} quantum yield, was only 26%.

2.3. Confocal Microscopy as an Efficient Tool to Visualize the Suitability of the Assembly

We envisaged that confocal microscopy could be useful to visualize the assembly efficiency between the UC and the PK throughout the sample, as well as to corroborate that the energy transfer from the UC to the PK occurs by dipole–dipole interaction instead of via a trivial emission–reabsorption mechanism.

Samples were prepared by dropcasting a solution (toluene or water) of the corresponding nanohybrid onto a 25 × 75 mm microscope glass slide. Then solvent was evaporated and the sample was covered with a 22 × 22 mm glass slide.

These experiments were carried out by using laser scanning confocal equipment provided with a multiphoton laser with a 100 fs pulse and an excitation power of 950 kW cm⁻² at $\lambda_{\text{exc}} = 975$ nm. The excitation power density was determined with a focused spot of about 1 μm radius. The image was acquired by means of a 25 × 1.05 N.A. Olympus dipping lens, an emission filter between 420 and 500 nm, and a dwell time of 2 $\mu\text{s pixel}^{-1}$.

Under these conditions, the images of small aggregates of UC_n and UC_{OLA} showed a clear tail in the fast-scan direction (Figures 7 and 8). This effect was completely suppressed by using a long dwell time of 40 $\mu\text{s pixel}^{-1}$ (Figure S10, Supporting Information), thus indicating that the tail observed was due to the slow emission decay after the passage of the beam over the aggregates. This behavior has been previously described for upconverting lanthanide nanoparticles.^[18]

Even though nanoparticles with long lifetimes are a drawback for obtaining images by scanning microscopy at short dwell times (because their long lifetime results in a loss of resolution in the fast-scan direction) these images contain information about the emission evolution over time. Hence, a luminescence decay curve can be easily obtained from intensity profiles along a line aligned with the fast-scan direction measured in the image (see Figures 7 and 8A for UC_n), because the distance scale in pixels of the profile can be converted into a time scale using the dwell time value.

Comparison between the images of UC_n, UC_{OLA}, UC_n@PK_{CB2}, and UC_{OLA}@PK_{OCA} in Figure 8 clearly evidences that the lifetime of UC_n is drastically shorter in UC_n@PK_{CB2} and this was the case in practically all the nanoparticles. However, the emission of UC_{OLA}@PK_{OCA} is not so homogeneously quenched.

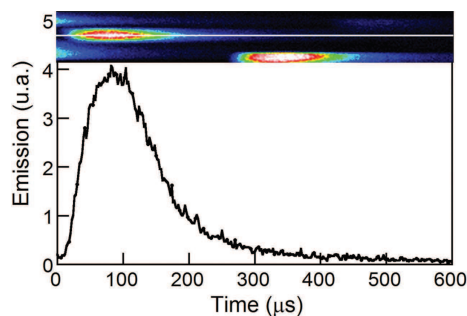


Figure 7. Intensity profile of UC_n obtained from the trace (white line) of the emission showed by an aggregate after excitation at 975 nm and a dwell time of 2 $\mu\text{s pixel}^{-1}$.

The kinetic traces of UC_n showed the characteristic rise and decay phases of UCs (Figure S11, Supporting Information). The rise and decay lifetimes (τ_{rise} and τ_{decay} , respectively) were determined by fitting the data to two components that are related to the sensitization (rise) and subsequent decay of the Tm³⁺ excited state (decay). The values were 503 ± 9 and 53 ± 2 μs for the rise and decay, respectively (Table S2, Supporting Information). The Tm³⁺ PL lifetime in the UC_n@PK_{CB2} nanohybrid

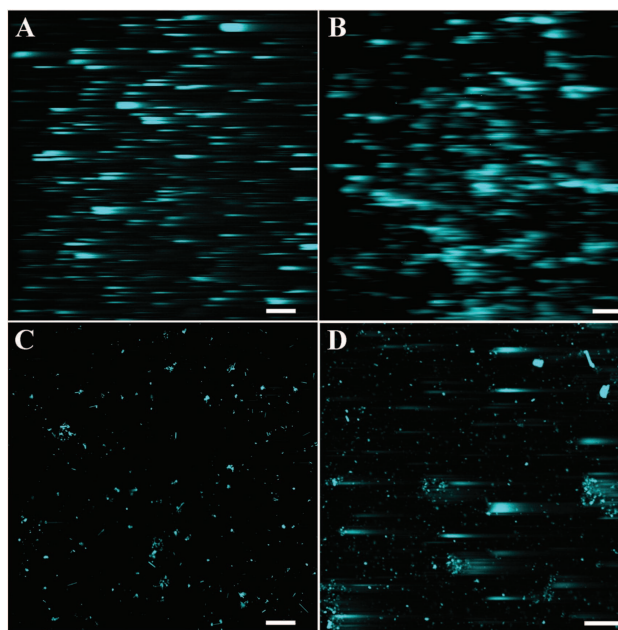


Figure 8. Confocal image at $\lambda_{\text{exc}} = 975$ nm and a dwell time of 2 $\mu\text{s pixel}^{-1}$ of A) UC_n, B) UC_{OLA}, C) UC_n@PK_{CB2}, and D) UC_{OLA}@PK_{OCA}. Scale bar: 50 μm .

decreased so drastically that it was hardly measurable with our equipment (we estimated a decay of about 1.4 μs), thus proving (i) the occurrence of an NIR-induced nonradiative energy transfer from the upconversion nanoparticle to the perovskite nanoparticle and (ii) the high efficiency of the process. The Ti^{3+} PL lifetime in the $\text{UC}_{\text{OLA}}@PK_{\text{OCA}}$ nanohybrid was $47 \pm 9 \mu\text{s}$ or less than 2 μs , depending on the aggregate. The fitted kinetic for each UCs is shown in Figures S11 and S12 of the Supporting Information.

In addition, these results show that laser scanning confocal microscopy can be a useful tool to measure luminescence lifetime in the range of several tens of microseconds. Since the resolution in the time scale depends on the dwell time, the only way to improve the resolution limit is by using faster-scanning systems.^[19]

To further confirm that this technique is reliable for time-resolved PL measurements of $\text{NaYF}_4:\text{RE}$ (RE: rare earth) nanoparticles, data^[20] obtained for naked and OLA-capped $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ nanoparticles by using a spectrofluorometer with a 975 nm laser diode were compared with those obtained with the confocal microscope (Table S4, Supporting Information). The data matched reasonably well taking into account that the samples measured by the spectrofluorometer were in solution, whereas those measured by the microscope were in solid state.

2.4. Photostability of the Nanohybrids

Finally, the photostability of the most efficient nanohybrid in the energy transfer process, i.e., $\text{UC}_n@PK_{\text{CB}2}$, was evaluated as a function of the irradiation time with two different excitation sources at 350 nm (PK excitation) and 975 nm (UC excitation). The emission of the nanohybrid dispersed in toluene was registered at 529 nm during 120 min of irradiation under air atmosphere (Figure 9). The UV excitation did not cause a decrease in the PK luminescence, whereas a loss of less than 10% was observed upon excitation at 975 nm. Thus, the $\text{UC}_n@PK_{\text{CB}2}$ nanohybrid exhibited high photostability under both excitation conditions.

3. Conclusion

We demonstrate here the efficient preparation of new nanohybrids consisting of upconversion and perovskite nanoparticles. These nanohybrids are prepared efficiently by using a novel strategy to assemble nanoparticles, which is based on the capacity of cucurbituril portals to anchor to the surface of both naked upconversion nanoparticles and CB-capped PK nanoparticles. Energy transfer from the UC to the perovskite nanoparticles under NIR excitation is extraordinarily efficient (ca. 100%). Moreover, we show that a commercial multiphoton laser scanning confocal microscope is a useful tool to evaluate luminescence lifetime in a range of several tens of microseconds. Furthermore, this technique is also useful for verifying the homogeneity of the emission of the sample.

Finally, prolonged irradiation of the nanohybrid under UV light, as well as under NIR light, demonstrated the considerable photostability of the system. These outstanding features make

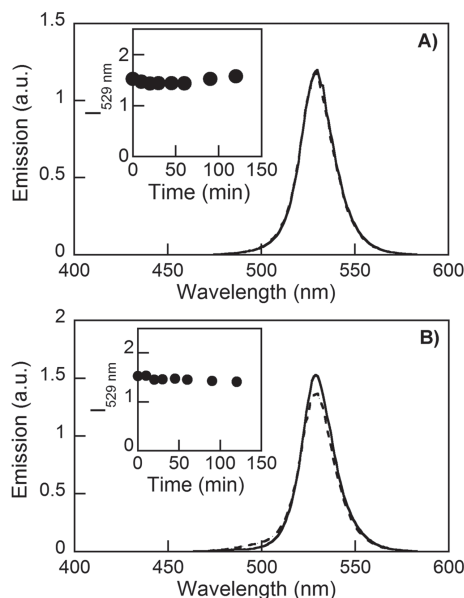


Figure 9. A) Comparison between the PL ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$) spectra of the perovskite in the $\text{UC}_n@PK_{\text{CB}2}$ nanohybrid dispersed in toluene before and after irradiation at 350 nm under air atmosphere for 120 min; inset: the PL as a function of the irradiation time. B) Comparison between the PL ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$) spectra of the perovskite in the $\text{UC}_n@PK_{\text{CB}2}$ nanohybrid dispersed in toluene before and after irradiation at 975 nm under air atmosphere for 120 min; inset: the PL as a function of the irradiation time.

these nanohybrids of great interest for photovoltaics and luminescent devices.

4. Experimental Section

Materials: Chemicals used for the upconversion nanoparticles synthesis were lanthanide chlorides ($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, and $\text{TmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (>99.9%, all of them), 1-octadecene (90%), oleic acid (70%), NaOH, and NH_4F (99.99%). All of them were used as received without previous purification. Chemicals used for the perovskite synthesis were octylammonium bromide (OCABr), MABr, lead(II) bromide, cucurbit[7]uril, ADABr, and toluene (analytical grade). All of the organoammonium bromide salts were synthesized by reaction with the corresponding amine in water/HBr as previously reported.^[21] The other chemicals were used as received without further purification. Toluene was high performance liquid chromatography (HPLC) quality for spectroscopic measurements.

Synthesis of Oleate-Capped Upconversion $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}$ (22%), Ti^{3+} (1.2%) Nanoparticles (UC_{OLA}): Upconversion nanoparticles were synthesized following a previously described protocol with some modifications (see the Supporting Information for further details).^[15]

Synthesis of Ligand-Free $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Ti}$ Upconversion Nanoparticles (UC_n): "Naked" upconversion nanoparticles were synthesized following a previously described method (see the Supporting Information for further details).^[22]

Synthesis of Upconversion/Cucurbit[7]uril-Perovskites Nanohybrid ($UC_n@PK_{CB}$): Two different strategies were developed to synthesize nanohybrids using CB[7] as a cementing agent.

$UC_n@PK_{CB1}$: A solution of MABr (19 μ L, 3.4 μ mol; 20 mg mL⁻¹) in DMF was added to a PbBr₂ solution (100 μ L, 2.7 μ mol; 10 mg mL⁻¹) in DMF in a 1 mL glass vial, and the mixture was stirred in an orbital shaker for 15 min. Then, a solution of CB[7] (18 μ L, 0.19 μ mol; 12 mg mL⁻¹) in DMF was added and the mixture was again stirred in an orbital shaker at 400 rpm for 30 min. The mixture was then slowly added to toluene (5 mL) under magnetic stirring and the stirring was continued at room temperature for 1 h. The solution color changed from colorless to orange (Figure S1, Supporting Information). The perovskite material (PK_{CB}) was isolated by centrifugation at 7000 rpm for 6 min and was redispersed in toluene (5 mL). Next, UC_n (120 μ L, 5.4 mg, 45 mg mL⁻¹) in DMF and CB[7] (20 μ L, 0.20 μ mol, 12 mg mL⁻¹) in DMF were added to the toluene solution and the mixture was magnetically stirred at room temperature for 3 d.

$UC_n@PK_{CB2}$: A solution of MABr (19 μ L, 3.4 μ mol; 20 mg mL⁻¹) in DMF and a solution of ADABr (53 μ L, 2.3 μ mol; 10 mg mL⁻¹) in DMF were added to a solution of PbBr₂ (100 μ L, 2.7 μ mol; 10 mg mL⁻¹) in DMF in a 1 mL glass vial, and the mixture was stirred in an orbital shaker for 15 min at 400 rpm. Then, a CB[7] solution (18 μ L, 0.19 μ mol, 12 mg mL⁻¹) in DMF was added and the mixture was stirred again in the orbital shaker at 400 rpm for 30 min.

The mixture was added dropwise to toluene (5 mL) under continuous magnetic stirring and kept for 1 h under stirring. The solution changed from colorless to yellow during addition (Figure 1). Next, UC_n (120 μ L, 5.4 mg; 45 mg mL⁻¹) in DMF were added and the mixture was stirred at room temperature in an orbital shaker at 300 rpm for 24 h. The nanohybrids were separated after decantation overnight.

Synthesis of Otylammonium Perovskites (PK_{OCA}): These perovskites were synthesized following a previously described protocol.^[11b] Briefly, 1-octadecene (2 mL, 6.26 mmol) was stirred and heated to 80 °C. Later on, OCABr (33.6 mg, 0.16 mmol) was added. Then, MABr (26.6 mg, 0.24 mmol) in DMF (100 μ L) and PbBr₂ (36.7 mg, 0.10 mmol) in DMF (100 μ L) were added. The solution was cooled to 60 °C and, immediately after, acetone (5 mL) was added to induce the precipitation of the perovskites. The unreactive material was separated by centrifugation (7000 rpm, 20 °C, for 10 min) and the solid perovskite nanoparticles were dried under vacuum overnight. The perovskites were reverted back to their precursors by dispersion in DMF (34 mg mL⁻¹), thus leading to a colorless solution. Then, the perovskites were resynthesized by injecting 100 μ L of this solution into toluene (5 mL). Finally, PK_{OCA} were precipitated by centrifugation (6000 rpm, room temperature, for 4 min).

Synthesis of Upconversion/ PK_{OCA} Nanohybrids ($UC_{OLA}@PK_{OCA}$): 80 μ L of the previously prepared PK_{OCA} precursors in DMF (34 mg mL⁻¹) was added dropwise to a solution of UC_{OLA} in toluene (4 mL; 2 mg mL⁻¹), thus leading to a yellow dispersion, which was kept at room temperature for 2 h. Finally, the nanohybrids were separated after decantation overnight.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

The authors thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CTQ2014-60174-P, Maria de Maeztu: MDM-2015-0538; FPU to L.F.S., RyC contract to M.G.B., FPI to S.G.C.) and FGUV (R.E.G.).

Received: February 14, 2016

Revised: March 22, 2016

Published online:

- [1] X. Li, F. Zhang, D. Zhao, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1346.
- [2] a) L. Mattsson, K. D. Wegner, N. Hildebrandt, T. Soukka, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 13270; b) A. Bednarkiewicz, M. Nyk, M. Samoc, W. Strek, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 17535; c) T.-L. Nguyen, P. Spizzirri, G. Wilson, P. Mulvaney, *Chem. Commun.* **2008**, 176; d) S. Xu, S. Xu, Y. Zhu, W. Xu, P. Zhou, C. Zhou, B. Dong, H. Song, *Nanoscale* **2014**, *6*, 12573; e) C. Yan, A. Dadvand, F. Rosei, D. F. Perepichka, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8868; f) Z. Li, Y. Zhang, S. Jiang, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 4765.
- [3] a) Y. Song, G. Liu, X. Dong, J. Wang, W. Yu, J. Li, *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 18527; b) A. Priyam, N. M. Idris, Y. Zhang, *J. Mater. Chem. C* **2012**, *22*, 960; c) W. Xu, Y. Zhu, X. Chen, J. Wang, L. Tao, S. Xu, T. Liu, H. Song, *Nano Res.* **2013**, *6*, 795; d) Z. Q. Li, S. Chen, J. J. Li, Q. Q. Liu, Z. Sun, Z. B. Wang, S. M. Huang, *J. Appl. Phys.* **2012**, *111*, 014310; e) H. Zhang, Y. Li, I. A. Ivanov, Y. Qu, Y. Huang, X. Duan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2865; f) L.-L. Li, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 5272; g) S.-Z. Zhang, L.-D. Sun, H. Tian, Y. Liu, J.-F. Wang, C.-H. Yan, *Chem. Commun.* **2009**, 2547; h) C. Zhang, J. Y. Lee, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 15253; i) M. Fujii, T. Nakano, K. Imakita, S. Hayashi, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 1113.
- [4] F. Zhang, G. B. Braun, A. Pallaoro, Y. Zhang, Y. Shi, D. Cui, M. Moskovits, D. Zhao, G. D. Stucky, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 61.
- [5] a) C.-W. Chen, S.-Y. Hsiao, C.-Y. Chen, H.-W. Kang, Z.-Y. Huang, H.-W. Lin, *J. Mater. Chem. A* **2015**, *3*, 9152; b) D. B. Mitzi, *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 791.
- [6] a) K. Tanaka, T. Takahashi, T. Ban, T. Kondo, K. Uchida, N. Miura, *Solid State Commun.* **2003**, *127*, 619; b) J. Calabrese, N. L. Jones, R. L. Harlow, N. Herron, D. L. Thorn, Y. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2328.
- [7] a) D. B. Mitzi, C. A. Feild, W. T. A. Harrison, A. M. Guloy, *Nature* **1994**, *369*, 467; b) I. Chung, J. H. Song, J. Im, J. Androulakis, C. D. Malliakas, H. Li, A. J. Freeman, J. T. Kenney, M. G. Kanatzidis, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8579.
- [8] a) Z.-K. Tan, R. S. Moghaddam, M. L. Lai, P. Docampo, R. Higler, F. Deschler, M. Price, A. Sadhanala, L. M. Pazos, D. Credgington, F. Hanusch, T. Bein, H. J. Snaith, R. H. Friend, *Nat. Nano* **2014**, *9*, 687; b) G. Li, Z.-K. Tan, D. Di, M. L. Lai, L. Jiang, J. H.-W. Lim, R. H. Friend, N. C. Greenham, *Nano Lett.* **2015**, *15*, 2640; c) S. Pathak, N. Sakai, F. Wisnivesky Rocca Rivarola, S. D. Stranks, J. Liu, G. E. Eperon, C. Ducati, K. Wojciechowski, J. T. Griffiths, A. A. Haghighirad, A. Pellaroque, R. H. Friend, H. J. Snaith, *Chem. Mater.* **2015**, *27*, 8066; d) M. F. Aygüler, M. D. Weber, B. M. D. Puscher, D. D. Medina, P. Docampo, R. D. Costa, *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 12047; e) A. Kojima, K. Teshima, Y. Shirai, T. Miyasaka, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6050; f) H. Zhou, Q. Chen, G. Li, S. Luo, T.-b. Song, H.-S. Duan, Z. Hong, J. You, Y. Liu, Y. Yang, *Science* **2014**, *345*, 542; g) D. B. Mitzi, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, *1*; h) D. B. Mitzi, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2355.
- [9] a) K. Liu, X. Liu, Q. Zeng, Y. Zhang, L. Tu, T. Liu, X. Kong, Y. Wang, F. Cao, S. A. G. Lambrechts, M. C. G. Aalders, H. Zhang, *ACS Nano* **2012**, *6*, 4054; b) J. Zhou, Q. Liu, W. Feng, Y. Sun, F. Li, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 395; c) M. González-Béjar, M. Liras, L. Francés-Soriano, V. Voliani, V. Herranz-Pérez, M. Duran-Moreno, J. M. García-Verdugo, E. I. Alarcón, J. C. Scaiano, J. Pérez-Prieto, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 4554; d) M. Wang, Z. Chen, W. Zheng, H. Zhu, S. Lu, E. Ma, D. Tu, S. Zhou, M. Huang, X. Chen, *Nanoscale* **2014**, *6*, 8274.
- [10] a) Y. Wang, P. Shen, C. Li, Y. Wang, Z. Liu, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1466; b) Z. Wu, H. Li, Z. Liu, *Sensor Actuat. B-Chem.* **2015**, *206*, 531.
- [11] a) L. C. Schmidt, A. Pertegas, S. González-Carrero, O. Malinkiewicz, S. Agouram, G. Mínguez Espallargas, H. J. Bolink, R. E. Galián, J. Pérez-Prieto, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 850; b) S. Gonzalez-Carrero, R. E. Galian, J. Pérez-Prieto, *J. Mater. Chem. A* **2015**, *3*, 9187; c) F. Zhang, H. Zhong, C. Chen, X.-G. Wu, X. Hu, H. Huang, J. Han, B. Zou, Y. Dong, *ACS Nano* **2015**, *9*, 4533; d) H. Huang,

- A. S. Susha, S. V. Kershaw, T. F. Hung, A. L. Rogach, *Adv. Sci.* **2015**, *2*, 2198.
- [12] L. Francés-Soriano, M. González-Béjar, J. Pérez-Prieto, *Nanoscale* **2015**, *7*, 5140.
- [13] H. Tang, D. Fuentealba, Y. H. Ko, N. Selvapalam, K. Kim, C. Bohne, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20623.
- [14] UC_{CB} nanoparticles were prepared by following the same protocol used to coat naked NaYF₄:Yb³⁺ (18%), Er³⁺ (2%) UCNPs with CBs.^[12]
- [15] Z. Li, Y. Zhang, *Nanotechnology* **2008**, *19*, 345606.
- [16] N. Bogdan, F. Vetrone, G. A. Ozin, J. A. Capobianco, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 835.
- [17] We found it very difficult to obtain high quality HRTEM images because the perovskites started to decompose while we were recording them.
- [18] a) C. F. Gainer, U. Utzinger, M. Romanowski, *J. Biomed. Opt.* **2012**, *17*, 0760031; b) J. Pichaandi, J.-C. Boyer, K. R. Delaney, F. C. J. M. van Veggel, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 19054.
- [19] Y. Lu, J. Zhao, R. Zhang, Y. Liu, D. Liu, E. M. Goldys, X. Yang, P. Xi, A. Sunna, J. Lu, Y. Shi, R. C. Leif, Y. Huo, J. Shen, J. A. Piper, J. P. Robinson, D. Jin, *Nat. Photon.* **2014**, *8*, 32.
- [20] L. Francés-Soriano, M. Liras, A. Kowalczyk, A. Bednarkiewicz, M. González-Béjar, J. Pérez-Prieto, *Nanoscale* **2016**, *8*, 204.
- [21] G. C. Papavassiliou, G. Pagona, N. Karousis, G. A. Mousdis, I. Koutselas, A. Vassilakopoulou, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 8271.
- [22] N. Bogdan, E. M. Rodriguez, F. Sanz-Rodriguez, M. a. C. Iglesias de la Cruz, A. Juarranz, D. Jaque, J. G. Sole, J. A. Capobianco, *Nanoscale* **2012**, *4*, 3647.

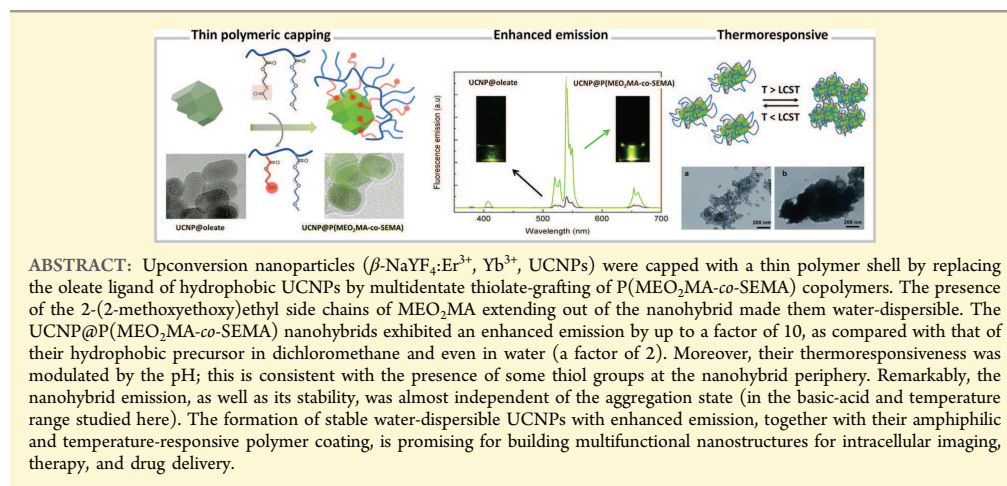
Thin Amphiphilic Polymer-Capped Upconversion Nanoparticles: Enhanced Emission and Thermoresponsive Properties

Marta Liras,^{*,†,||} María González-Béjar,[§] Elena Peinado,[†] Laura Francés-Soriano,[§] Julia Pérez-Prieto,[§] Isabel Quijada-Garrido,[‡] and Olga García[†]

[†]Departamento de Química y Propiedades de Materiales Poliméricos and [‡]Departamento de Química Física de Polímeros, Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICTP-CSIC), Juan de la Cierva, 3, 28006 Madrid, Madrid, Spain

[§]Instituto de Ciencia Molecular (ICMol)/ Departamento de Química Orgánica, Universidad de Valencia, Catedrático José Beltrán, 2, 46980 Paterna, Valencia, Spain

S Supporting Information



ABSTRACT: Upconversion nanoparticles (β - $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$, Yb^{3+} , UCNPs) were capped with a thin polymer shell by replacing the oleate ligand of hydrophobic UCNPs by multidentate thiolate-grafting of P(MEO₂MA-co-SEMA) copolymers. The presence of the 2-(2-methoxyethoxy)ethyl side chains of MEO₂MA extending out of the nanohybrid made them water-dispersible. The UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA) nanohybrids exhibited an enhanced emission by up to a factor of 10, as compared with that of their hydrophobic precursor in dichloromethane and even in water (a factor of 2). Moreover, their thermoresponsiveness was modulated by the pH; this is consistent with the presence of some thiol groups at the nanohybrid periphery. Remarkably, the nanohybrid emission, as well as its stability, was almost independent of the aggregation state (in the basic-acid and temperature range studied here). The formation of stable water-dispersible UCNPs with enhanced emission, together with their amphiphilic and temperature-responsive polymer coating, is promising for building multifunctional nanostructures for intracellular imaging, therapy, and drug delivery.

Fabrication of multifunctional nanoparticles with a combination of properties, such as water-dispersibility, emission, and response to external stimuli (pH, light, or temperature), among others, is of great interest for biomedical and bioengineering applications.¹ In this respect, the stabilization of emissive nanoparticles by stimuli-responsive polymers can be used to control their assembly, and consequently the symbiosis between both systems, i.e., the nanoparticle and its capping, can result in nanohybrids which combine the properties of the individual components, modify them, or exhibit novel properties.^{2,3}

Lanthanide upconversion nanoparticles (UCNPs) are unique since they can be excited with low-power continuous wave near-infrared (NIR) sources and emit at shorter wavelengths due to their intraconfigurational 4fⁿ electron transitions.^{4,5} Undoubtedly, hexagonal ytterbium and erbium codoped sodium yttrium fluoride nanoparticles ($\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}$, Yb^{3+}) are the most widely used due to their superior upconversion efficiency.⁴ UCNPs are being used in a great variety of

applications such as light emitting diodes, solar cells, and bioimaging,^{5–8} among others.⁹

These UCNPs are usually synthesized from the corresponding rare-earth chlorides, using an organic ligand and a noncoordinating solvent, such as oleic acid and 1-octadecene, respectively, and performing the reaction at high temperature.^{10–14} However, the nanoparticles must be water-dispersible for their bioapplication.¹⁵ Several methodologies have been addressed to solve their water-dispersibility; they generally involve the use of hydrophilic and biocompatible polymers to coat the UCNPs.^{10,16–19} Phase transfer of the hydrophobic UCNPs by ligand exchange with polymers, such as poly(acrylic acid) (PAA), poly(ethylene glycol) (PEG), or polyethylenimine (PEI), is an often-used strategy for the preparation of water-dispersible nanoparticles.^{18,20} In addition,

Received: May 8, 2014

Revised: June 13, 2014

Published: June 13, 2014

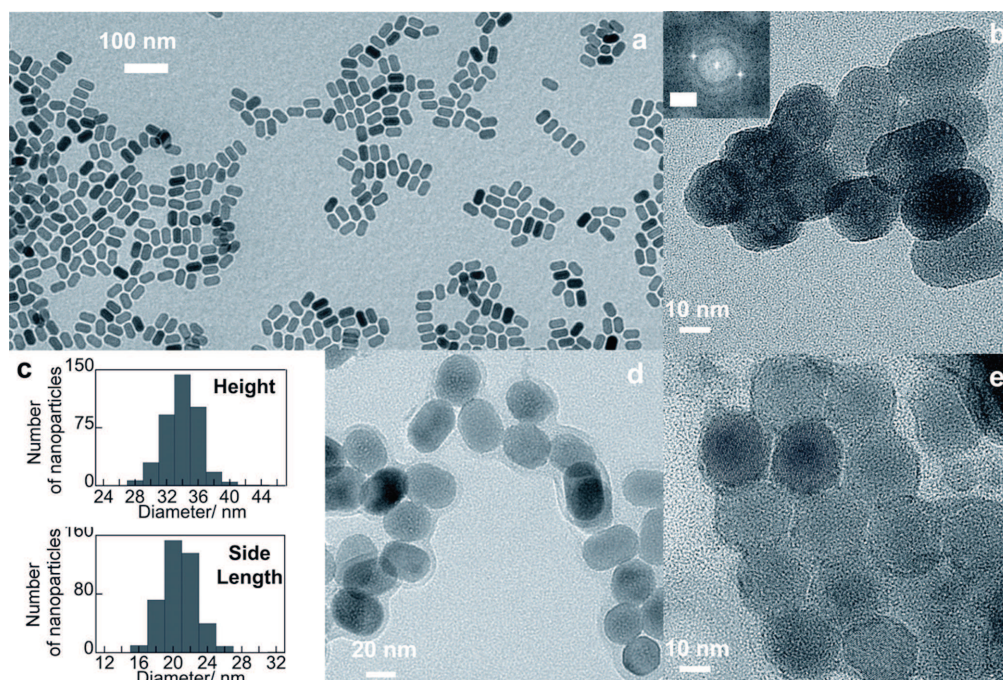


Figure 1. Representative a) TEM and HRTEM b) inset: FTT, scale bar 2.5 nm) images of UCNP@oleate. c) Histograms of the distribution of particle sizes of UCNP@oleate. d) HRTEM images UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-2 and e) UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-5. The samples were prepared from a dichloromethane solution.

hydrophilic UCNPs can be prepared by a one-pot procedure in the presence of hydrophilic polymers, such as PAA and PEL.²¹ Alternatively, encapsulation of hydrophobic UCNPs with amphiphilic copolymers by interpenetration of the polymer branches with that of the parent hydrophobic ligand,^{22–25} as well as via intercalation followed by cross-linking processes,²⁶ has also been reported. Although there are exceptions,²⁷ the one-pot synthesis of water-dispersible UCNPs usually results in a broad distribution of sizes with poor shapes, while ligand exchange processes often lead to nanoparticles with poor colloidal stability and decreased luminescence efficiency.^{6,16,28} Moreover, nanoparticles made water-dispersible by intercalation processes using amphiphilic polymers are often poorly stable,²⁹ an exception being those reported by Jiang et al.²⁶ and Huang et al.,²⁴ and show decreased luminescence.²⁴ Additionally, polymer capping can increase the nanohybrid size considerably^{22,25} and/or induce nanoparticle aggregation.²²

Our group recently described the synthesis of a series of copolymers based on a monomer, specifically 2-(acetylthio)ethyl methacrylate (AcSEMA), containing an acetyl protected thiol group in its structure and able to be polymerized by a controlled radical strategy, specifically via atom transfer radical polymerization (ATRP). Copolymers with methyl methacrylate (MMA) and 2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate (MEO₂MA) have proved useful for functionalizing nanoparticles such as QDs³ and AuNPs,² by a simple ligand exchange reaction, or even graphene sheets,³⁰ by a thiol click

chemistry reaction under mild conditions. On the other hand, thiol groups are able to coordinate with upconversion nanoparticles surfaces.^{6,31}

We presumed that the multidentate grafting of a polymer by means of pendant thiol groups on the UCNPs would provide a thin shell which would be advantageous. Additionally, the presence of ether chains in the polymeric shell extending out of the nanoparticle would lead to UCNPs dispersible in both aqueous and organic solvents. Moreover, methacrylic polymers with short oligoethylene glycol side chains undergo a sudden change in water solubility at a certain temperature,^{32–34} called lower critical solution temperature (LCST). Therefore, the aggregation of the nanoparticles, which are capped with a large number of short oligo(ethylene glycol) units, could be thermoresponsive. Poly(ethylene glycol)s have been regarded as wonder molecules in biomedical applications³⁵ due to their hydration capacity³⁶ and, lately, to their kosmotrope-like behavior.³⁷ Consequently, the combination of all these functionalities would provide interesting nanohybrids.

Here we report the effective polymer-coating of β -NaYF₄:Er³⁺, Yb³⁺ UCNPs by using multidentate P-(MEO₂MA-co-AcSEMA) copolymers. The AcSEMA moieties ensure a weak interaction of the polymer with the UCNP surface. The subsequent *in situ* hydrolysis of the acetylthiol groups, randomly distributed along the main chain of the copolymer, makes the multidentate grafting of the polymer through the thiolate groups possible. Thus, the hydrodynamic

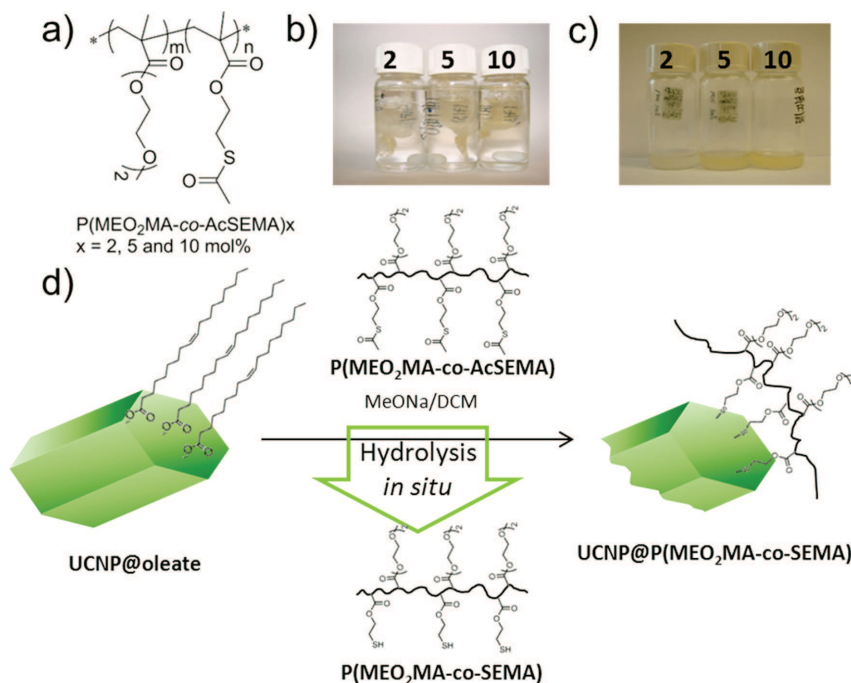


Figure 2. a) P(MEO₂MA-co-AcSEMA)-*x* copolymer structure. b) Photographs of UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA) during dialysis. c) Photographs of the purified UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA) dispersions. d) Scheme of the synthesis of the multifunctional UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-*x* nanohybrids.

nanoparticle size of the nanohybrid is small,³⁸ which is highly desirable for the future biological applications of our nanohybrids. Moreover, the presence of the 2-(2-methoxyethoxy)-ethyl moieties provides the UCNP with the desirable water dispersibility, biocompatibility, and thermoresponsiveness. In addition, as it will be discussed in this report, the methacrylic nature of the main chain protects the UCNP against water reaching its surface. Thus, the preparation of highly emissive, water-dispersible UCNPs capped with a thin shell of a thermoresponsive polymer is reported.

EXPERIMENTAL SECTION

Synthesis of Oleate-Capped UCNPs (UCNP@oleate). NaY-F₃:Yb (18%), Er (2.0%) nanocrystals were synthesized following a previously reported protocol with some modifications.³⁹ Basically, YCl₃ (0.8 mmol), YbCl₃ (0.18 mmol), and ErCl₃ (0.02 mmol) were mixed with 12 mL of oleic acid and 15 mL of octadecene (ODE) in a 50 mL round-bottom Pyrex flask under continuous stirring. The mixture was heated to 160 °C until complete dissolution of all the reagents, and then it was cooled down to ca. 110 °C. A 10 mL methanol solution containing NaOH (2.5 mmol) and NH₄F (4.0 mmol) was slowly added into the flask, and the solution was stirred while being slowly heated to remove methanol, degassed at 100 °C for 30 min, and heated to 305 °C under argon flux during 1 h. Then, the solution was cooled at room temperature, and the UCNPs were precipitated by centrifugation (10000 rpm, 10 min, 25 °C). Later on, the oleate-capped UCNPs were washed three times with a (43.5:40.5:16 v/v/v) hexane/acetone/methanol solution.

Synthesis of P(MEO₂MA-co-AcSEMA) copolymers as previously described.²

Preparation of Thermosensitive Polymer-Capped UCNPs. A solution of 29 mg of UCNP@oleate and 43 mg of P(MEO₂MA-co-AcSEMA) (1/1.5 wt %) in 2 mL of dichloromethane was prepared, and then a small amount of sodium methoxide (MeONa) was added under stirring at room temperature. The mixture was maintained at room temperature for 2 days in order to ensure the total functionalization of the UCNP surface by the thiolated polymers. After removing the insoluble white solid corresponding to sodium oleate (Figure S1A, ESI), the dispersion was rotevaporated under reduced pressure, and the resulting crude was redissolved in THF and placed inside a regenerated cellulose membrane tubing of MWCO-50 kDa (RC Spectra/Por7-Spectrum Laboratories) and dialyzed against THF/H₂O (7:3) v/v replacing fractions each 12–24 h until no polymer was detected in the dialyzed fraction by UV, usually after 60–90 mL.

Measurement of the Nanohybrid Emission with pH and Temperature. An aqueous solution at pH 11 was prepared by adding sodium methoxide to water (1.3 mg in 10 mL). The nanohybrid was dispersed in this solution (5 mg × 8 mL⁻¹), and the pH of the colloidal solution was measured first at 15 °C and then at 60 °C (samples equilibrated for 5 min at the indicated temperature). Subsequently, different aliquots of an HCl solution (5 μL in 10 mL) were added, and, after each addition, the pH and the emission were measured first at 15 °C and then at 60 °C.

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation and Characterization of Thermosensitive Polymer-Capped UCNPs. NaY-F₃:Yb (18%), Er (2.0%)

nanocrystals were synthesized following a previously reported protocol with some modifications (see the Experimental Section).^{39,40} The XRD pattern of the UCNP revealed the formation of mainly the hexagonal phase structure as bulk β - NaYF_4 (Joint Committee on Powder Diffraction Standards, card no.: JCPDS 16-0334), Figure S2B. The atomic ratios of lanthanides in the nanoparticles were obtained by energy-dispersive X-ray experiments (EDX) and were NaYF_4 (77% 9 : Yb^{3+} (20%), Er^{3+} (3%), Figure S3. Transmission electron microscopy (TEM) and high resolution TEM (HRTEM) images obtained for the monodisperse hexagonal nanoprisms together with the histogram show a uniform side length of approximately 20.7 ± 2.1 nm, a height of 33.9 ± 2.8 nm, and a base length of 23.2 ± 2.1 nm (Figure 1a to Figure 1c).

Thermosensitive polymers containing acetyl-protected thiol groups, specifically $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA-co-AcSEMA})_x$ polymers, were synthesized by ATRP of MEO_2MA and AcSEMA (Figure 2a).² All the polymers had low polydispersity and a similar molecular weight, but they differed in the amount of thiol groups per mol ($x = 2, 5, \text{ and } 10$ mol %) (see details in Table S1, ESI). These polymers were then used for the ligand exchange reaction on oleate-capped UCNPs (UCNP@oleate, Figure 2d).

Although there are a few examples in the literature using thiol as the anchoring groups to the UCNP surface (carboxylates are usually used for that purpose), we have recently coated UCNPs with thiol-ending oligomeric poly(ethylene glycol) under basic conditions,^{31,41} and Prasad et al. have used 3-mercaptopropionic acid for transferring UCNPs from chloroform solution to aqueous phase.⁶

Here we report the multidentate grafting of a polymer to the surface of $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ 3% nanoparticles by means of *in situ* generated thiolates. The exchange of the oleate-capping of UCNP@oleate by the thiolated polymers was possible under mild conditions by using a dichloromethane saturated solution of sodium methoxide; the basic medium ensures the *in situ* hydrolysis of the thioacetate to thiol groups. The end of the hydrolysis reaction was confirmed by FTIR-ATR following the disappearance of the $-\text{SCOCH}_3$ carbonyl signal (ca. 1685 cm^{-1}), a shoulder of the strong carbonyl band in the initial polymer, Figure S4, ESI). While the reaction took place, an insoluble white residue was formed, and it was identified as sodium oleate by FTIR-ATR⁴² (Figure S1A, ESI). Then, the polymer-coated UCNPs were purified by dialysis in order to remove the excess polymer. Figure 2b and 2c show the appearance of the samples during and after the dialysis process, respectively.

Control experiments showed that similar treatment of the UCNP@oleate with the UCNP@ $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA-co-SEMA})_x$ polymers, but in the absence of sodium methoxide, did not lead to UCNP@ $\text{P}(\text{ME}_2\text{OMA-co-AcSEMA})_x$ nanohybrids, indicating that only thiolate groups can anchor to the UCNP surface. This point shows a difference with other kinds of nanoparticles, such as gold nanoparticles² and quantum dots,³ where the thioacetate group is able to anchor to their surfaces. Control experiments showed that these mild hydrolysis conditions were unable to hydrolyze the ester groups of a $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA})$ homopolymer, and, consequently, UCNP@oleate nanoparticles were not transformed into a polymer-capped UCNPs by means of carboxylate grafting of the polymer to the nanoparticle surface.

The UCNP@ $\text{P}(\text{ME}_2\text{OMA-co-SEMA})_x$ nanohybrids were characterized by different techniques, such as FTIR and ^1H NMR, in order to corroborate the grafting of the polymer to

the UCNP surface. The FTIR-ATR spectra of the nanohybrids (Figure S5) evidenced the disappearance of the thioesters groups. The ^1H NMR measurements of the UCNP@ $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA-co-SEMA})_x$ nanohybrids (see Figure 3 for

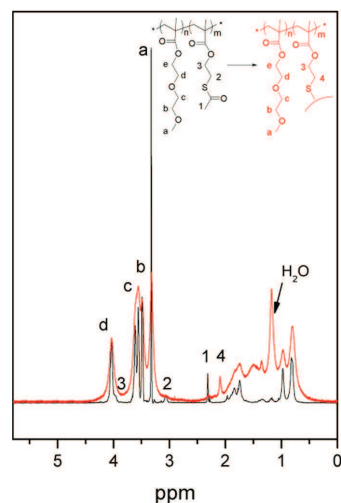


Figure 3. ^1H NMR spectra of $\text{P}(\text{MMA-co-AcSEMA})$ -10 (black line) and UCNP@ $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA-co-SEMA})$ -10 (red line) dissolved in CDCl_3 .

UCNP@ $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA-co-SEMA})$ -10 confirmed the efficient exchange of the oleate by the copolymer, since no olefinic signals were detected in the spectra (see Figure S6 in ESI for UCNP@oleate). The polymer signals broadened as a result of the restricted motion of the polymer when attached to the nanoparticle surface (Figure 3). In addition, the disappearance of the $-\text{SCOCH}_3$ signal (ca. 2.3 ppm) together with the shift of the $-\text{CH}_2\text{S}-$ signal (from 3 ppm to ca. 2 ppm) was compatible with the grafting of the thiolate to the UCNP surface.

The effective ligand exchange was also corroborated by FTIR-ATR. Thus, comparison between the FTIR spectra of UCNP@oleate and UCNP@ $\text{P}(\text{MEO}_2\text{MA-co-SEMA})$ -10 evidenced the absence of a signal or shoulder at 1710 cm^{-1} , corresponding to the carbonyl group of the oleate (see Figure S1B in the ESI).

Further evidence of the formation of UCNP@ $\text{P}(\text{ME}_2\text{OMA-co-SEMA})_x$ nanohybrids was established by transmission electron microscopy (TEM) studies. For instance, Figure 1 shows the TEM images of a representative sample where the presence of a thin layer of polymer (Table S2, ESI) can be detected around the UCNPs. Moreover, the thickness of the polymeric coating did not depend on the number of thiol groups present in the polymer and the nanoparticle sizes remained identical (height around 33 nm). On other hand, the XRD pattern of the UCNP@ $\text{P}(\text{ME}_2\text{OMA-co-SEMA})_x$ nanohybrids (Figure S2, ESI) remains identical than the parent UCNP@oleate. Therefore, the hexagonal phase structure was not affected by the polymer coating. In addition, apparently, the polymer coating did not exhibit a different affinity for different crystalline planes of the UCNP.

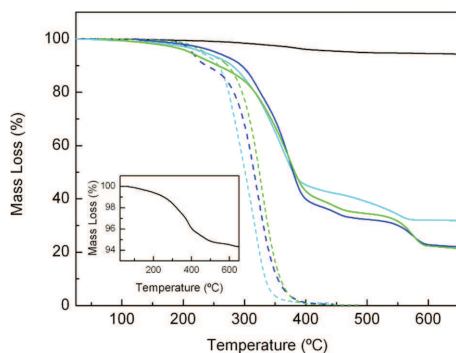


Figure 4. Thermogravimetric analysis (TGA) of the UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-*x* nanohybrid (full lines) -2 (light blue), -5 (dark blue), and -10 (green). TGA analyses of the reference P(MEO₂MA-co-AcSEMA)-*x* polymers (dashed lines) -2 (light blue), -5 (dark blue), and -10 (green) as well as the parent UCNP@oleate (black line) are included for comparison. Inset: UCNP@oleate TGA in detail.

The exact amount of polymer in each nanohybrid, as well as the effect of the functionalization on the thermal properties of the nanohybrids, was determined by thermogravimetric analysis (TGA). The weight contribution of the ligand was only around 6 wt % in the initial UCNP@oleate, while the organic content strongly increased, reaching about 80 wt % for UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-*x* nanohybrids (Figure 4). In all cases, the main weight loss (at ca. 350 °C) occurred at higher temperature than the corresponding polymer (ca. 300 °C), indicating a higher thermal stability of the nanohybrids and evidencing the considerable interaction of the copolymers with the UCNP surface.

Emissive Properties of the Polymer-Capped UCNP.

The presence of polyether chains in the polymer shell, extending out from the methacrylic main chain anchored to the nanoparticle surface, made the nanohybrids dispersible in both organic and aqueous solvents. The upconversion emission properties of the new materials were measured in dichloromethane and water using a front face setup. Table 1 shows the

Table 1. Comparative Emission between the Oleate- and the Copolymer-Capped UCNPs, Both in Organic (CH₂Cl₂) and Water Solution

sample	relative efficiency	
	CH ₂ Cl ₂	H ₂ O
UCNP@oleate	1	
UCNP@P(MEO ₂ MA-co-SEMA)-2	9.6	2.4
UCNP@P(MEO ₂ MA-co-SEMA)-5	5.1	2.0
UCNP@P(MEO ₂ MA-co-SEMA)-10	9.4	2.3

emission values for all samples in both solvents taking the area under the curve of the emission spectrum of the UCNP@oleate dissolved in dichloromethane as reference (assigned as value 1).

Interestingly, in dichloromethane, the emission of the UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-*x* nanohybrids was considerably higher than that of the UCNP@oleate, all measurements being recorded at the same UCNP core concentration (ca. 0.62 mg × mL⁻¹) (Figure 5). For example, the emission of UCNP@

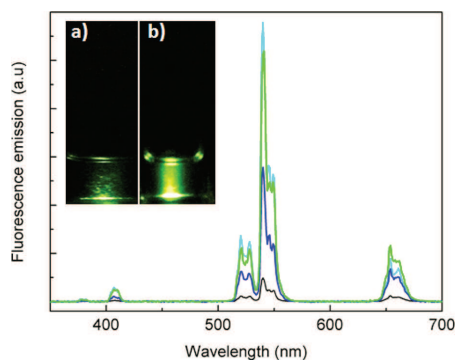


Figure 5. Upconversion emission of dichloromethane solution of UCNP@oleate (black) and UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-2 (light blue), -5 (dark blue), and -10 (green). Inset: photographs showing dichloromethane solutions of UCNP@oleate (a) and UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 (b) under 975 nm laser excitation in the absence of lab light. The spectra were recorded using the same nanoparticle core concentration (0.62 mg × mL⁻¹).

P(MEO₂MA-co-SEMA)-2 was 9.6-fold higher than that of the UCNP@oleate. Meanwhile, the emission of the UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-*x* nanohybrids in water, registered at 18 °C, was more than 2-fold higher than that of the UCNP@oleate, though it decreased ca. 60% compared to that of the polymer-capped UCNP in dichloromethane (Table 1).

The decrease in luminescence of the nanohybrid in water as compared with dichloromethane is attributed to the quenching of the UCNP emission by water due to an increase in the multiphoton relaxations of the lanthanide excited state in aqueous environments due to high energy vibration modes of water molecules.^{6,28,43} Also, organic ligands with high C–H and C–C vibrational oscillators have been suggested as quenchers of the UCNP emission.⁴⁴

In both media our nanohybrids show emission enhancement in comparison with the parent nanoparticles, UCNP@oleate. We suggest that the use of multidentate grafting of the polymeric shell with short ligand chain reduces the quenching effect of the (CH₂)_{*n*} groups which present high energy stretching vibration. In addition, we suggest that the multidentate grafted thin polymer can passivate the UCNP surface defects more efficiently.^{45,46} Several methods (active and passive) have been reported to enhance the upconversion emission of UCNPs to meet their requirement of high sensitivity, which is indispensable for their application in bioassays and bioimaging.⁴ The active method for upconversion enhancement is based on the interaction between upconverting lanthanide pairs (e.g., Yb³⁺/Er³⁺) with the surface plasmon of noble metals achieving emission enhancements from 2- to 12-fold.⁴ Thus, UCNPs are coated with a gold shell, which leads to a plasmonic upconversion emission enhancement as long as the direct contact between the gold and the UCNP is avoided.^{47–49} To that purpose, UCNP have been coated with silica,^{47,50,51} iron oxide nanoparticles,⁴⁸ or PAMAM⁵² and then with gold nanoparticles^{49,53} or a gold shell.⁵⁴ Bednarkiewicz et al. have recently pointed out that although the use of noble metals can enhance the upconversion quantum yield, it could also contribute to autofluorescence and Raman enhancement, and, as a consequence, the signal-to-noise ratio may become lower.⁴

The passive methods vary the composition, structure, and/or morphology of the UCNP, optimize their dopant concentration, modify their local chemical and structural environment, or control the distribution of active ions in the host materials.^{4,55} Thus, the growth of a ca. 3 nm wide, undoped NaYF₄ shell around the UCNP core has been used for improving the emissive properties of hydrophobic UCNP such as NaYF₄:Er³⁺, Yb³⁺ (7-fold enhancement). The subsequent coating of the core-shell UCNP with a hydrophilic polymer, specifically PAA, rendered them water-dispersible.⁵⁶ Although this strategy did not avoid the emission quenching by water completely, it led to UCNP with a ca. 4-fold emission enhancement compared to that of the hydrophobic, core nanoparticles. While in that case it was suggested that PAA was responsible for the decrease of the core-shell UCNP emission when transferring the nanoparticle from the organic solvent to water, this cannot be so in our case since the same UCNP is dispersible in dichloromethane and in water. Therefore, the emission decrease has to be attributed to the water environment or to the joint action of the polyether ligand and the water molecules. It is important to highlight that with a really simple methodology, as compared with those previously described for active and passive methods, we have achieved nanoparticles with an enhanced upconversion emission in both media. The fact that the nanohybrids show a 2-fold upconversion emission enhancement in water when compared to that of UCNP@oleate in an organic medium is probably due to the hydrophobic nature of the methacrylic main chain which is close to the UCNP surface thanks to the multidentate grafting. This hypothesis is strengthened because the relative ratio between the green and red emission did not change in water. It has to be taken into account that the emission quenching by water has been attributed to its vibrational modes (ca. 3600 cm⁻¹) which produce an increased nonradiative relaxation of the ⁴I_{11/2} level to the ⁴I_{13/2} level⁴³ and necessarily involves a strong interaction between the water molecules and the nanoparticle surface.

Moreover, the photostability of the samples was also studied by registering their emission after prolonged NIR-irradiation. This proved their considerable photostability, since no intensity changes were detected after 70 min of irradiation.

Thermoresponsive Properties of the Polymer-Capped UCNP. In a thermoresponsive polymer, temperature affects how it physically interacts with its environment. Thus, water can become a poor solvent for a water-soluble polymer due to conformational changes of the polymer chains, eventually causing hydrophobic intermolecular interactions between polymer molecules. When the polymer is grafted to the nanoparticle surface, the *stimulus* could lead to nanoparticle aggregation. The ability to control the assembly of nanoparticles is a major concern for many applications, for instance, temperature-sensitive smart polymers have been used to regulate DNA-mediated nanoassembly and encode nanocarrier drug release.⁵⁷

The polymers selected for nanoparticle capping in this work belong to a promising family of thermoresponsive polymers which possess a methacrylic backbone and short oligo(ethylene glycol) side chains.^{32–34,58} They undergo a drastic reversible collapse in water when the temperature reached the lower critical solution temperature (LCST) assumed in this work as the cloud point. In a previous work,² it was determined that the increase of hydrophobic AcSEMA in the P(MEO₂MA-co-AcSEMA) copolymers resulted in a decrease in the LCST.

After deprotection of the thiol group, hydrolyzed P(MEO₂MA-co-SEMA) copolymers exhibited an increase in the LCST due to the increase in the hydrophilic balance, reaching values close to that of the P(MEO₂MA) homopolymer (ca. 26 °C).

The polymeric capping endowed the up-converting nanohybrids with thermoresponsive properties. The polymer-coated nanoparticles displayed thermosensitive properties, as in solution they exhibited reversible aggregation/disaggregation above and below the LCST, respectively.

Figure 6a shows the scattering at 700 nm vs temperature curves for the nanohybrids together with that of the

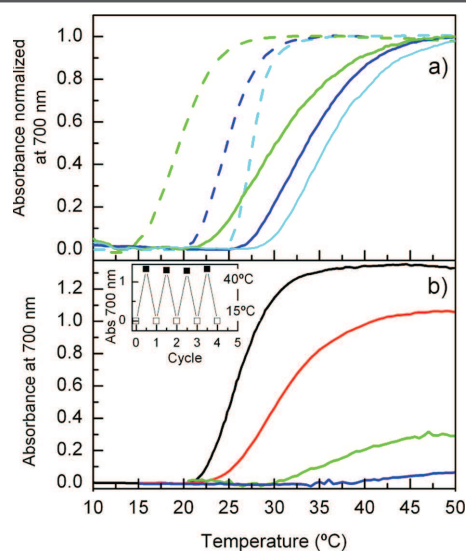


Figure 6. a) Normalized scattering at 700 nm vs temperature for P(MEO₂MA-co-AcSEMA)-*x* copolymers (dashed lines) and UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-*x* (full lines) dissolved (1 mg × mL⁻¹) in water; *x* = 2 (light blue), 5 (dark blue), and 10 (green); the pH of the colloidal samples was adjusted at pH 5. b) Scattering at 700 nm vs temperature for UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 dissolved (1 mg × mL⁻¹) in water at different pH: pH = 3.5 (black line), pH = 5 (red line), pH = 6.5 (green line), and pH = 7 (blue line). Inset: Changes in absorbance at 700 nm of a water dispersion of UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 (1 mg × mL⁻¹) at pH = 3.5 produced by temperature changing from 15 to 40 °C for several cycles.

corresponding P(MEO₂MA-co-AcSEMA)-*x* copolymers. The LCST values, registered at pH 5, changed drastically for the polymers covalently bound via thiolate groups to the nanoparticle surface; the LCST shifted depending on the thiol content in the polymer as observed in the parent polymers. The resulting LCST value is the consequence of the balance between the hydrophilic and hydrophobic monomers. The transition temperature in one of the nanohybrids was ca. that of human body temperature (36.5 ± 0.5 °C); this is promising for thermostimuli bioimaging and biosensor applications, among others, of the robust, smart UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA) nanohybrids.

In addition, we found that the LCST value of the nanohybrid was modulated with the pH, though this only occurred at pH

values below 7. For instance, the cloud point of the sample UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 was measured at different pHs (Figure 6b). The LCST value dropped with the pH, and, simultaneously, the cloud point became more abrupt. This change of the LCST with the pH was previously observed in the P(MEO₂MA-co-SEMA) polymers but not in the parent acetylated polymers, and it was attributed to the presence of ionizable groups, namely thiol groups, in the nanohybrid periphery.⁵ This is consistent with the reversible physical changes of the nanohybrids with the temperature (see inset Figure 6b) as well with the pH. These thiol groups would be hardly detectable by techniques like FTIR and NMR.⁵⁹ The thermosensitive process was also monitored by TEM and DLS. Figure 7 depicts the representative TEM images of UCNP@P

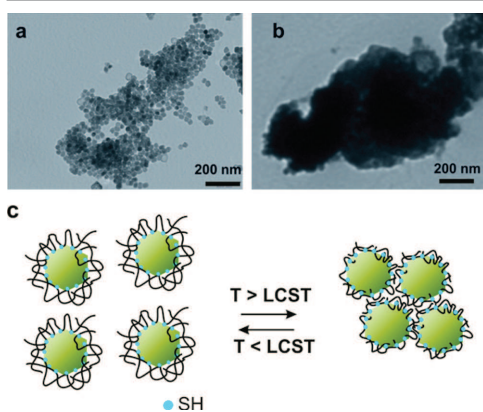


Figure 7. Representative TEM images of UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 at a) 18 °C and b) 60 °C; the pH of both colloidal samples was adjusted to pH 5. c) Illustration for the temperature-induced aggregation/deaggregation of UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA) in water.

P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 prepared from the same water colloidal solution at 18 and 60 °C (below and above the nanohybrid LCST). The UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-*x* nanoparticles from the sample at the lower temperature were well dispersed on the TEM copper grid and exhibited an average size of ca. (33.6 ± 3.5) × (21.7 ± 1.4) nm (NP core) and ca. (3.1 ± 0.9) nm (polymer coating) and little aggregation. As shown in Figure 7a (also in Figure S7 in the ESI), the nanoparticles were all on the same level, and the apparent aggregation was due to the evaporation as observed in the images of the dichloromethane solution. TEM images for the sample at a temperature above the LCST showed large spheres with diameters of up to 1000 nm, while individual small particles were rarely observed (Figure 7b). The same behavior was observed for the rest of the nanohybrids (see Figure S8 in the ESI).

Variable temperature DLS measurements showed that the average hydrodynamic diameter (D_h) increased with temperature (Figure 8), and it reverted when the sample was cooled down. This measurement is an alternative to the measurement of LCST as cloud point, taking into account that slight differences are due to the higher equilibrium time required. Moreover, TEM experiments showed that the collapse

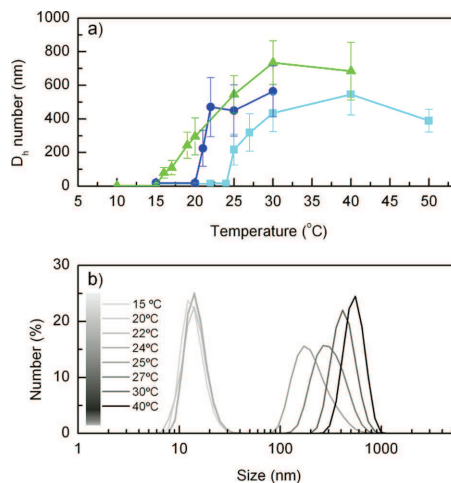


Figure 8. a) Dependence of D_h number versus temperature for UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-*x* dissolved (1 mg × mL⁻¹) in water solution equilibrated to pH 5: *x* = 2 (light blue), 5 (dark blue), and 10 (green) mol % of SEMA represented; b) dependence of the number versus the size for UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-2 at different temperatures.

depended on the thiol content. So, an average hydrodynamic diameter (D_h) of 540 ± 122 nm was found for the sample with the lowest thiol content, while it was 740 ± 130 nm for the sample with the highest one. Figure 8b shows the size distributions for each temperature and demonstrates the narrow size distribution of the aggregates at each temperature.

The mechanism of the temperature-induced self-assembly of the UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-*x* nanohybrids can be explained as shown in Figure 7c. By increasing the solution temperature to, and above, the LCST, the multidentate grafted P(MEO₂MA-co-SEMA) chains begin to shrink, and the nanohybrids organize themselves into networks driven by the force of a hydrophilic to hydrophobic transition. This behavior of the polymer can be related to the loss of the water molecules not tightly bound to the -OCH₂CH₂O- polymer units when the temperature increases, as it has been demonstrated for poly(ethylene glycol) (PEGs), where the temperature increase lowers the polymer-water interaction strength.³⁶

We also studied the effect of temperature and pH on the emissive properties of the water-dispersible, polymer-capped UCNPs. Again two temperatures, one above and the other below LCST, were chosen, and the upconversion emission was measured at different pHs. The emission of UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 was only 20% lower at 60 °C than at 15 °C (Figure S9 top, in ESI), and it showed reversibility for repetitive aggregation-disaggregation cycles (Figure S9 bottom, in ESI). The higher emission at 20 °C than at 60 °C of our polymer-capped UCNPs is consistent with others results reported for hexagonal NaYF₄:Er³⁺, Yb³⁺ nanocrystals with different surface ligands.^{60,61} Our experiments show that the collapse has no influence in the emission of the nanohybrids, and the behavior is similar to the nonpolymeric coated UCNPs (i.e., higher emission at lower temperatures).

Finally, the nanohybrids exhibited an extraordinary chemical stability over time. In fact, the emissive properties of the water dispersions of UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 used for the reversibility experiments (temperature and pH/temperature cycles) and the sample at pH 5 remained practically unchanged three months later (see details and Figures S10–S12 in the ESI). In addition, the stability of the colloidal solution of UCNP@P(MEO₂MA-co-SEMA)-10 in a media typical for cell culturing was also demonstrated (Figure S13, ESI).

CONCLUSIONS

In short, an approach to prepare UCNPs with a thin, functional polymer capping has been described. To our knowledge, this is the first time that a multidentate copolymer by means of thiol groups has been used for UCNP capping. The polymer endows the hybrid with amphiphilic and thermosensitive properties by the lateral ethylene glycol chains. In addition, the nanohybrids show enhanced emission in both organic and aqueous environment as compared with the parent UCNP@oleate. This simple approach shows better results than other complex approaches previously described in the literature. The new nanohybrid shows a remarkable thermo-, photo-, and chemical stability over time in different conditions. The polymer thermoresponsive properties allow the upconversion hybrid nanoparticles to self-assemble reversibly, while retaining their upconversion emission properties; this could be extremely useful for future applications in bioimaging drug delivery and therapeutics.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Materials and method as well as additional results are included. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: martaliras@ictp.csic.es.

Present Address

¹Instituto de Química Orgánica General, IQOG-CSIC, Juan de la Cierva, 3, 28006 Madrid, Spain.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (Projects CTQ2011-27758 and MAT2011-22861; M.G.B. Juan de la Cierva contract and L.F.S. F.P.U. grant). This research was supported by a Marie Curie Career Integration Grants within the seventh European Community Framework Programme (FP7-PEOPLE ref PCIG09-GA-2011).

REFERENCES

- Xue, X.; Wang, F.; Liu, X. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 13107.
- Liras, M.; García, O.; Guarrotxena, N.; Palacios-Cuesta, M.; Quijada-Garrido, I. *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 5751.
- Liras, M.; Quijada-Garrido, I.; Palacios-Cuesta, M.; Muñoz-Durieux, S.; García, O. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 433.
- Gnath, A.; Bednarkiewicz, A. *Nano Today* **2012**, *7*, 532.
- Wang, F.; Banerjee, D.; Liu, Y.; Liu, X. *C. X. Analyst* **2010**, *135*, 1839.
- Kumar, R.; Nyk, M.; Ohulchanskyy, T. Y.; Flask, C. A.; Prasad, P. N. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 853.
- Lim, S. F.; Riehn, R.; Ryu, W. S.; Khanarian, N.; Tung, C.-k.; Tank, D.; Austin, R. H. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 169.
- König, K. *J. Microsc.* **2000**, *200*, 83.
- Li, C.; Lin, J. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 6831.
- Qian, H. S.; Guo, H. C.; Ho, P. C.-L.; Mahendran, R.; Zhang, Y. *Small* **2009**, *5*, 2285.
- Boyer, J.-C.; Vetrone, F.; Cuccia, L. A.; Capobianco, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7444.
- Boyer, J.-C.; Cuccia, L. A.; Capobianco, J. A. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 847.
- Mai, H.-X.; Zhang, Y.-W.; Si, R.; Yan, Z.-G.; Sun, L.-d.; You, L.-P.; Yan, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6426.
- Wang, H.-Q.; Nann, T. *ACS Nano* **2009**, *3*, 3804.
- Chen, J.; Zhao, J. X. *Sensors* **2012**, *12*, 2414.
- Boyer, J.-C.; Manseau, M.-P.; Murray, J. I.; van Veggel, F. C. J. *M. Langmuir* **2010**, *26*, 1157.
- Wang, F.; Chatterjee, D. V.; Li, Z.; Zhang, Y.; Fan, X.; Wang, M. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 5786.
- Johnson, N. J. J.; Sangeetha, N. M.; Boyer, J.-C.; van Veggel, F. C. J. *M. Nanoscale* **2010**, *2*, 771.
- Zhou, J.; Liu, Z.; Li, F. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1323.
- Jin, J.; Gu, Y.-J.; Man, C. W.-Y.; Cheng, J.; Xu, Z.; Zhang, Y.; Wang, H.; Lee, V. H.-Y.; Cheng, S. H.; Wong, W.-T. *ACS Nano* **2011**, *5*, 7838.
- Wang, M.; Mi, C.-C.; Liu, J.-L.; Wu, X.-L.; Zhang, Y.-X.; Hou, W.; Li, F.; Xu, S.-K. *J. Alloys Compd.* **2009**, *485*, L24.
- Budijono, S. J.; Shan, J.; Yao, N.; Miura, Y.; Hoye, T.; Austin, R. H.; Ju, Y.; Prud'homme, R. K. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 311.
- Cheng, L.; Yang, K.; Zhang, S.; Shao, M.; Lee, S.; Liu, Z. *Nano Res.* **2010**, *3*, 722.
- Hu, W.; Lu, X.; Jiang, R.; Fan, Q.; Zhao, H.; Deng, W.; Zhang, L.; Huang, L.; Huang, W. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9012.
- Wu, T.; Boyer, J.-C.; Barker, M.; Wilson, D.; Branda, N. R. *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 2495.
- Jiang, G.; Pichaandi, J.; Johnson, N. J. J.; Burke, R. D.; van Veggel, F. C. J. *M. Langmuir* **2012**, *28*, 3239.
- Wang, Z.; Liu, C.; Chang, L.; Li, Z. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 12186.
- Wang, F.; Wang, J.; Liu, X. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 7456.
- Pichaandi, J.; Boyer, J.-C.; Delaney, K. R.; van Veggel, F. C. J. *M. J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 19054.
- Liras, M.; García, O.; Quijada-Garrido, I.; Ellis, G.; Salavagione, H. J. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2*, 1723.
- Voliani, V.; González-Béjar, M.; Herranz-Pérez, V.; Duran-Moreno, M.; Signore, G.; García-Verdugo, J. M.; Pérez-Prieto, J. *Chem.—Eur. J.* **2013**, *19*, 13538.
- Lutz, J. F.; Weichenhan, K.; Akdemir, O.; Hoth, A. *Macromolecules* **2007**, *40*, 2503.
- Lutz, J.-F.; Hoth, A. *Macromolecules* **2006**, *39*, 893.
- Lutz, J.-F. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, *46*, 3459.
- Veronese, F. M. *Biomaterials* **2001**, *22*, 405.
- Branca, C.; Magazù, S.; Maisano, G.; Migliardo, F.; Migliardo, P.; Romeo, G. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 10272.
- Chen, W.-Y.; Hsu, M.-Y.; Tsai, C.-W.; Chang, Y.; Ruaan, R.-C.; Kao, W.-H.; Huang, E. W.; Chung Chuan, H.-Y.-T. *Langmuir* **2013**, *29*, 4259.
- Smith, A. M.; Nie, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11278.
- Li, Z.; Zhang, Y. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 345606.
- Voliani, V.; Gemmi, M.; Frances-Soriano, L.; Gonzalez-Bejar, M.; Perez-Prieto, J. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 11404.
- Gonzalez Bejar, M.; Liras, M.; Frances-Soriano, L.; Voliani, V.; Herranz-Perez, V.; Duran-Moreno, M.; Garcia-Verdugo, J. M.; Alarcon, E.; Scaiano, T.; Perez-Prieto, J. *J. Mater. Chem. B* **2014**, DOI: 10.1039/C4TB00340C.
- Lee, D. H.; Condrate, R. A., Sr. *J. Mater. Sci.* **1999**, *34*, 139.
- Boyer, J.-C.; Manseau, M.-P.; Murray, J. I.; van Veggel, F. C. J. *M. Langmuir* **2010**, *26*, 1157.

- (44) Heer, S.; Kömpe, K.; Güdel, H. U.; Haase, M. *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 2102.
- (45) Zhao, J.; Lu, Z.; Yin, Y.; McRae, C.; Piper, J. A.; Dawes, J. M.; Jin, D.; Goldys, E. M. *Nanoscale* **2013**, *5*, 944.
- (46) Wu, S.; Ning, Y.; Chang, J.; Zhang, S. *J. Lumin.* **2013**, *143*, 492.
- (47) Priyam, A.; Idrisa, N. M.; Zhang, Y. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 960.
- (48) Cheng, L.; Yang, K.; Li, Y.; Chen, J.; Wang, C.; Shao, M.; Lee, S.-T.; Liu, Z. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 7385.
- (49) Li, Z.; Wang, L.; Wang, Z.; Liu, X.; Xiong, Y. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 3291.
- (50) Xing, H.; Bu, W.; Zhang, S.; Zheng, X.; Li, M.; Chen, F.; He, Q.; Zhou, L.; Peng, W.; Hua, Y.; Shi, J. *Biomaterials* **2012**, *33*, 1079.
- (51) Zhang, C.; Lee, J. Y. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 15253.
- (52) Kannan, P.; Rahim, F. A.; Chen, R.; Teng, X.; Huang, L.; Sun, H.; Kim, D.-H. *Appl. Mater. Inter.* **2013**, *5*, 3508.
- (53) Wawrzynczyk, D.; Bednarkiewicz, A.; Nyk, M.; Gordel, M.; Strek, W.; Samoc, M. *Opt. Mater.* **2012**, *34*, 1708.
- (54) Sudheendra, L.; Ortalan, V.; Dey, S.; Browning, N. D.; Kennedy, I. M. *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 2897.
- (55) Gamelin, D. R.; Güdel, H. U. In *Transition Metal and Rare Earth Compounds*; Yersin, H., Springer, Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, 2001; Vol. 24, p 1.
- (56) Yi, G.-S.; Chow, G.-M. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 341.
- (57) Hamner, K. L.; Alexander, C. M.; Coopersmith, K.; Reishofer, D.; Provenza, C.; Maye, M. M. *ACS Nano* **2013**, *7*, 7011.
- (58) Paris, R.; Quijada-Garrido, I.; García, O.; Liras, M. *Macromolecules* **2011**, *44*, 80.
- (59) The presence of the -SH group in alkyl thiols is usually confirmed by ¹H NMR following the proton-proton coupling between the alpha -CH₂- or -CH- and -SH. However, this coupling cannot be detected when the spectrum is recorded in solvents which possess electron donor groups interacting with the -SH via hydrogen bonding. In our nanohybrids, the presence of nearby ether groups could make the detection of the -SH groups difficult. In addition, the -SH group usually exhibits a weak signal in the FTIR spectrum, and the difficulties mentioned for ¹H NMR also apply.
- (60) Shan, J.; Kong, W.; Wei, R.; Yao, N.; Ju, Y. *J. Appl. Phys.* **2010**, *107*, 054901.
- (61) Sedlmeier, A.; Achatz, D. E.; Fischer, L. H.; Gorris, H. H.; Wolfbeis, O. S. *Nanoscale* **2012**, *4*, 7090.