



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Instituto de Ciencia Molecular
Departamento de Química Orgánica
Doctorado en Química Sostenible

Tesis Doctoral

***Estrategia para estabilización de
nanopartículas de upconversion en medios
acuosos y su excitación a 800 nm***

Nestor Luis Estébanez Bloem

Directoras:

Prof. Dra. Julia Pérez Prieto

Dra. María González Béjar

Junio 2020

Dra. Julia Pérez Prieto, Profesora Catedrática de Química Orgánica de la Universitat de València y la Dra. María González Béjar Investigador Contratado Doctor PostRyC UV de la Universitat de València

CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral, titulada: ***Estrategia para estabilización de nanopartículas de upconversion en medios acuosos y su excitación a 800 nm***, se ha realizado bajo su dirección en el Instituto de Ciencia Molecular (ICMol) de la Universitat de València por el Licenciado en Química Nestor Luis Estébanez Bloem y autorizan su presentación para ser calificada como tesis doctoral internacional.

En Valencia, 9 de Junio de 2020

Fdo. Dra. Julia Pérez Prieto
Directora y Tutora

Fdo. Dra. María González Béjar
Directora

Dedicado a mi hija

Agradecimientos

Es mi deseo para iniciar esta tesis es dar un reconocimiento a todas las personas que han formado parte de este proyecto

Me gustaría comenzar con la Prof. Julia Pérez por ofrecerme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación que ha me permitido crecer profesionalmente por todos sus consejos y orientación para abordar cada uno de los retos planteados

A la Dra. María González por compartir sus conocimientos e ideas, por darme ánimos en los momentos complicados, por su confianza y consejos.

Al Dr. Thomas Hirsch por aceptarme en su grupo de investigación con una enorme hospitalidad durante mi periodo de estancia.

A todos los compañeros de Laboratorio que han pasado a lo largo de estos años, que han hecho divertido y agradable nuestro trabajo. Gracias todos por los buenos momentos. A Laura por orientarme cuando recién entraba a formar parte del laboratorio. A Juan por su compañerismo y su implicación en todos los proyectos que emprendimos.

A nivel personal no puedo empezar por otra persona que no sea Sora mi compañera de vida, que desde que comenzó nuestra aventura en la Hechicera has estado junto a mí en todos los momentos buenos y malos, dándome su apoyo, cariño, amor y en este último año dándome el regalo más grande nuestra hija Paula que desde su llegada se convirtió en mi motor

A mi madre y padre por el amor, cariño y por todos los sacrificios que han hecho por mí. Por darme consejos cuando los necesitaba, por regañarme o felicitarme cuando lo merecía y por apoyarme siempre. Por mostrarme y enseñarme con vuestro ejemplo como con trabajo las cosas se pueden conseguir.

Abreviaturas y símbolos

AIBN	azoisobutironitrilo
AMPS	Ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico
AO	Ácido oleico
CB[7]	Cucurbit[7]urilo
COP	Copolímero HEMA-co-AMPS
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DLS	Medidas de dispersión dinámica de luz
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DOX	Doxorrubicina
EDS	Dispersión de la energía de rayos X
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMU	Migración de energía
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ESA	Absorción del estado excitado
ET	Transferencia de energía
ETU	Transferencia de energía upconversion
FA	Ácido fólico
FRET	Transferencia de energía de resonancia Förster
FTIR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
HEMA	Monómero 2-hidroxietilmetacrilato
HRTEM	Microscopia de transmisión electrónica de alta resolución
IBU	Ibuprofeno
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
KMnO₄	Permanganato de potasio
λ	Longitud de onda
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
MB	Azul de metileno
M_n	Peso molecular promedio
M_w	Peso molecular
NaIO₄	Peryodato de sodio
NIR	Infrarrojo cercano
NOBF₄	Tetrafluoroborato de nitrosilo
NPs	Nanopartículas

PAA	Ácido poliacrílico
PAAm	Polialilamina
PAH	Polimero de hidrocloreuro de polialilamina
PEG	Polietilenglicol
PEGP	Polietilenglicol fosfato
PFD	1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-decanol
ppm	Partes por millón
PS	Poliestireno
PSB	Tampón fosfato salino
PSS	Poliestireno sulfonato
RMN	Resonancia magnética nuclear
τ	Tiempo de vida de fluorescencia
TEA	Trietilenamina
TEM	Microscopia de transmisión electrónica
TEOS	Tetraetil ortosilicato
TFD	Terapia fotodinámica
TGA	Análisis termogravimétrico
u.a.	Unidad arbitraria
UC	Upconversion
UCNP@COP	NP de NaYF ₄ :Yb, Er recubiertas con COP
UCNP@COP@MB	NP de NaYF ₄ :Yb, Er recubiertas con COP y azul de metileno
UCNP@oleato	NP de UCNP recubiertas con oleato
UCNP_{CS}	NP de UCNP con una capa de NaYF ₄ y recubiertas con oleato
UCNP_{CS,Er}@CB[7]	NP de NaYF ₄ :Yb,Er/NaYF ₄ recubiertas con CB[7]
UCNP_{CS,Er}@oleato	NP de NaYF ₄ :Yb,Er/NaYF ₄ recubiertas con oleato
UCNP_{CS,Tm}@CB[7]	NP de NaYF ₄ :Yb,Tm/NaYF ₄ recubiertas con CB[7]
UCNP_{CS,Tm}@oleat	NP de NaYF ₄ :Yb,Tm/NaYF ₄ recubiertas con oleato
o	
UCNP_{Er}@oleato	NP de NaYF ₄ :Yb,Tm recubiertas con oleato
UCNP_{Er}@PAMPS	NP de NaYF ₄ :Yb,Er recubiertas con PAMPS
UCNP_{Er}@PEGP	NP de NaYF ₄ :Yb,Er recubiertas con PEGP
UCNP_{Er}@PFD	NP de NaYF ₄ :Yb,Er recubiertas con PFD
UCNP_{Er}@PSS	NP de NaYF ₄ :Yb,Er recubiertas con PSS

UCNPs	Nanopartículas de upconversion
UCNP_{Tm}@oleato	NP de NaYF ₄ :Yb,Tm recubiertas con oleato
UCNP_{Tm}@PAMPS	NP de NaYF ₄ :Yb,Tm recubiertas con PAMPS
UCNP_{Tm}@PEGP	NP de NaYF ₄ :Yb,Tm recubiertas con PEGP
UCNP_{Tm}@PFD	NP de NaYF ₄ :Yb,Tm recubiertas con PFD
UCNP_{Tm}@PSS	NP de NaYF ₄ :Yb,Tm recubiertas con PSS
UV	Luz ultravioleta
UV	Ultravioleta
VIS	Visible
XRD	Difracción de rayos X

Índice

Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. Nanopartículas de upconversion.....	5
1.2. Mecanismos upconversion.....	7
1.3. Composición de las UCNPs.....	11
1.3.1 Matriz.....	11
1.3.2 Dopantes.....	13
1.4. Síntesis de nanopartículas de upconversion.....	15
1.4.1 Hidro(solvo)térmica.....	16
1.4.2 Descomposición Térmica.....	17
1.4.3 Estrategia Ostwald-Ripening.....	18
1.5. Modificación de la superficie de las UCNPs.....	19
1.5.1 Intercambio de ligando.....	21
1.5.2 Modificación del ligando.....	24
1.5.3 Interacciones entre ligandos.....	24
1.5.4 Encapsulado con un recubrimiento inorgánico.....	25
1.6. Modificación y optimización de las propiedades ópticas de las nanopartículas upconversion.....	27
1.6.1 Síntesis de UCNPs de tipo core-shell.....	28
1.6.2 Modificación de la longitud de onda de excitación.....	29
1.7. Aplicaciones de las nanopartículas de upconversion.....	31
1.7.1 Bioimagen.....	31
1.7.2 Liberación de fármacos y tratamientos.....	31
1.7.3 Sensores.....	32
1.7.4 Otras aplicaciones.....	34

Capítulo 2. Objetivos	37
2.1 Objetivo	39
2.2 Objetivos específicos	39
Capítulo 3. Metodología.....	41
3.1.1 Espectroscopía de absorción.....	43
3.1.2 Espectroscopía de emisión en estado estacionario	43
3.1.3 Espectroscopía de emisión resuelta en el tiempo.....	43
3.1.4 Rendimiento cuántico.....	44
3.2. Estructura y morfología	45
3.2.1 Difracción de Rayos X.....	45
3.2.2 Microscopía de transmisión electrónica	45
3.2.3 Microscopía electrónica de barrido de alta resolución. .	46
3.2.4 Dispersión dinámica de luz y potencial Z.....	46
3.3. Composición.....	47
3.3.1 Espectrometría de dispersión de energía de rayos X ...	47
3.3.2 Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente	47
3.3.3 Análisis termogravimétrico	47
3.3.4 Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier	48
3.3.5 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear.....	48
3.3.6 Cromatografía de exclusión	49
3.4. Otras técnicas	49
3.4.1 Medidas de pH	49
3.4.2 Centrifugación	49
Capítulo 4. Nanohíbridos de Upconversion resistentes a pH ácidos..	51

4.1.	Introducción.....	55
4.2.	Resultados y discusión.....	56
4.2.1	Síntesis y caracterización de UCNPs recubiertas con oleato.....	56
4.2.2	Síntesis del copolímero HEMA-co-AMPS.....	57
4.2.3	Síntesis del nanohíbrido de UCNP recubierto con el copolímero (HEMA-AMPS).....	60
4.2.4	Propiedades ópticas del nanohíbrido.....	63
4.2.5	Estabilidad del nanohíbrido a diferentes pHs.....	64
4.2.6	Síntesis de un sensor de pH.....	66
4.3.	Conclusión.....	70
4.4.	Metodología experimental.....	71
4.4.1	Materiales.....	71
4.4.2	Síntesis del copolímero (COP).....	71
4.4.3	Síntesis de las UCNP@oleato.....	72
4.4.4	Síntesis del nanohíbrido UCNP@COP.....	72
4.4.5	Estudio de estabilidad de UCNP@COP en medio ácido.....	73
Capítulo 5. Patente: Materiales cerámicos luminiscentes de upconversion.....		75
Capítulo 6. Polisulfonatos como ligandos de UCNPs para evitar su desintegración y estabilizarlas en medios fuertemente ácidos.....		81
6.1.	Introducción.....	83
6.2.	Resultados y discusión.....	85
6.2.1	Síntesis de UCNPs recubiertas con oleato.....	85
6.2.2	Síntesis y caracterización de UCNPs recubiertas con los distintos polímeros.....	86

6.2.3	Estabilidad de los nanohíbridos en condiciones fuertemente ácidas.....	90
6.2.4	Estabilidad de los nanohíbridos a baja concentración en medio acuoso.....	94
6.3.	Conclusiones.....	98
6.4.	Procedimiento experimental.....	99
6.4.1	Materiales.....	99
6.4.2	Síntesis de UCNP _s recubiertas con oleato.....	99
6.4.3	Preparación de UCNP _s libres de ligando orgánicos ...	100
6.4.4	Síntesis del polímero 2 acrilamido-2-metil-1-propanosulfonato (PAMPS).....	102
6.4.5	Síntesis de UCNP _{L_n} recubiertas con poliestireno sulfonato (UCNP _{L_n} @PSS).....	102
6.4.6	Síntesis de UCNP _{L_n} recubiertas con 2-acrylamido-2-metil-1-propanosulfonato (UCNP _{L_n} @PAMPS).	103
6.4.7	Síntesis de UCNP _{L_n} recubiertas con mPEG5K-fosfato (UCNP _{L_n} @PEGP).....	103
6.4.8	Síntesis de UCNP _{L_n} recubiertas con 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-decanol (UCNP _{L_n} @PFD).....	103
6.4.9	Estudio de estabilidad de los nanohíbridos en medio ácido.....	104
6.4.10	Estudio de estabilidad de UCNP _{Er} @PSS, UCNP _{Er} @PAMPS y UCNP _{Er} desnudas en dispersiones acuosas diluidas.....	104
Capítulo 7.	Preparación de nanohíbridos de upconversion sensibilizados con Nd ³⁺ sin utilizar estructuras multicapa.....	105
7.1.	Introducción.....	107
7.2.	Resultados y discusión.....	111

7.2.1.	Síntesis de UCNP _{CS} recubiertas con oleato.....	111
7.2.2.	Síntesis de nanohíbridos UCNP _{CS} @CB[7].....	113
7.2.3.	Síntesis de nanohíbridos UCNP _{CS} @CB[7]@Nd	115
7.2.4.	Análisis de las propiedades emisivas de los nanohíbridos y del proceso de transferencia de energía	117
7.3.	Conclusiones.....	124
7.4.	Procedimiento experimental.....	125
7.4.1.	Materiales.....	125
7.4.2.	Síntesis de UCNP de recubiertas con oleato.....	125
7.4.3.	Síntesis del recubrimiento inorgánico NaYF ₄ en las UCNP _{Er} @oleato y UCNP _{Tm} @oleato.....	126
7.4.4.	Síntesis de UCNP _{CS} libres de ligando orgánicos	127
7.4.5.	Síntesis de UCNP _{CS} @CB[7]	127
7.4.6.	Síntesis de UCNP _{CS,Ln} @CB[7]@Nd.....	128
	Conclusiones	129
	Resumen	135
	Abstract.....	141
	Referencias.....	145
	Lista de Publicaciones	155

Capítulo 1. Introducción

La nanotecnología comprende el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales con al menos una de sus dimensiones a escala nanométrica, siendo las nanopartículas de especial interés dentro de estos materiales.^[1, 2]

En los últimos años la nanotecnología ha tenido un gran auge, debido principalmente al desarrollo tecnológico, lo que ha permitido disponer de nuevos equipos capaces de caracterizar y manipular los nanomateriales. Este avance fue previsto por el científico Richard Feynman en su famoso discurso “*There`s plenty of room at the bottom*” en el año 1959, en el cual predijo que la ciencia lograría manipular moléculas y átomos como materiales de uso cotidiano.^[3]

Dentro la variedad de materiales a escala nanométrica encontramos las nanopartículas (NPs) definidas como todas aquellas partículas en las que todas sus dimensiones se encuentran comprendidas entre 1-100 nm.^[4] Por lo tanto, podemos considerar que las NPs son un material intermedio entre los átomos y los materiales volumétricos (*bulk*), con propiedades físicas y químicas que le diferencia de éstos, debido fundamentalmente a su elevada relación superficie/volumen y a sus defectos de superficie.^[4]

En general, las NPs se componen de un núcleo inorgánico u orgánico que se encuentra recubierto por algún tipo de ligando, el cual tiene un rol determinante en las propiedades químicas, físicas y ópticas, además de determinar su dispersabilidad en distintos disolventes.

Actualmente existen múltiples rutas sintéticas para la obtención de NPs, las cuales permiten controlar su composición, tamaño y forma además de propiedades sus fisicoquímicas.

La luminiscencia en las NPs es una propiedad que les otorga especial interés, debido a la variedad de aplicaciones en la que pueden ser empleadas, como por ejemplo la fabricación de dispositivos ópticos

y biomédicos. Hasta ahora la mayoría de los materiales fluorescentes utilizados para dichas aplicaciones, tales como complejos metálicos, colorantes orgánicos, proteínas, semiconductores, etc, son fluoróforos *down conversión*, es decir, emiten fotones de menor energía que la de los fotones absorbidos, dando lugar por tanto a fluorescencia con desplazamiento de Stokes.^[5, 6] Lamentablemente, estos fluoróforos presentan ciertas desventajas: bandas de emisión anchas, niveles de fototoxicidad importantes y fotoblanqueo (*photobleaching*) por exposición continua a la luz, etc.^[7]

A diferencia de los fluoróforos *down conversión*, los fluoróforos anti-Stokes o *upconversion* son materiales capaces de transformar fotones de baja energía en fotones de mayor energía y eliminar algunas de las limitaciones que se presentan con el uso de los fluoróforos *down conversión*. El fenómeno *upconversion* no es un descubrimiento reciente, ya que fue descrito por primera vez en 1959^[8] y, en el año 1960, Auzel y colaboradores demostraron por primera vez procesos de emisión *upconversion* en materiales compuestos por iones lantánidos.^[9] Desde entonces, se ha estudiado este fenómeno con materiales lantánidos de diferentes dimensiones hasta la obtención de un material a escala nanométrica, conocidos como nanopartículas de *upconversion* (UCNPs, por sus siglas en inglés), las cuales serán objeto de estudio en esta tesis doctoral.

1.1. Nanopartículas de upconversion

Las UCNPs son nanopartículas luminiscentes formadas generalmente por una matriz inorgánica inactiva, como por ejemplo NaYF₄ o LiYF₄, dopada por al menos dos tipos de iones lantánidos ópticamente activos, de los cuales uno actúa como sensibilizador absorbiendo luz del infrarrojo cercano (NIR) y el otro como activador, es decir que emite luz en el Ultravioleta-Visible (UV-Vis) e incluso en el NIR (figura 1.1).

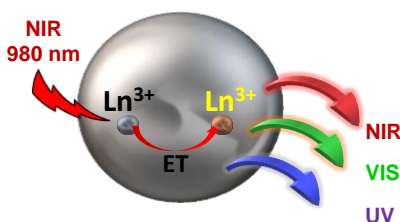


Figura 1.1. Representación esquemática del proceso upconversion en una UCNP. ET= transferencia de energía

Así pues, la principal propiedad de las UCNPs es el fenómeno de emisión upconversion al que deben su nombre. Este fenómeno se ha estudiado ampliamente y se describe como un proceso no lineal de la absorción de dos o más fotones de baja energía por el sensibilizador, el cual transfiere esta energía al activador que finalmente será el responsable de la emisión final de fotones de nivel energético superior (emisión anti-Stokes), figura 1.1. Generalmente, se utiliza la radiación NIR como fuente de excitación de las UCNPs para dar lugar a la emisión en el UV-vis. [10, 11].

Este fenómeno es una propiedad particular de los iones lantánidos trivalentes (Ln^{3+}), los cuales tienen sus orbitales electrónicos 4f parcialmente llenos ($4f^n 5s^2 5p^6$, $n=0-14$). [12] El acoplamiento de los electrones de los orbitales $4f^n$ con los electrones de los orbitales $5s^2$ y

$5p^6$ da lugar a transiciones $4f-4f$, las cuales por la regla de paridad están prohibidas. Sin embargo estas transiciones prohibidas pasan a ser transiciones parcialmente permitidas cuando los iones lantánidos activos se localizan dentro de un anfitrión cristalino tal como CaY_2 , LiYF_4 , $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$, etc.^[13] La composición y el tipo de estructura cristalina de la matriz afecta drásticamente la emisión de la NP.(se detalla en el apartado 1.3)

Además del comportamiento anti-Stokes de la emisión de las UCNPs, éstas se caracterizan por presentar: (i) bandas de emisión estrechas e intensas tras la excitación con láser de onda continua de baja potencia,^[14, 15] (ii) emisiones con tiempo de vida largos ($\sim\mu\text{s}$) en comparación con otro tipo de nanopartículas,^[16] (iii) grandes desplazamientos anti-Stokes (algunos cientos de nanómetros), (iv) elevada fotoestabilidad bajo irradiación continua en el rango del NIR o ultravioleta (UV),^[17-20] y (v) no presenta el fenómeno de fotoparpadeo ni fotoblanqueo.^[21]

Finalmente, el uso de radiación NIR como fuente de excitación permite una mayor penetración de la luz en los tejidos biológicos en comparación con el uso de longitudes de onda más cortas, lo que reduce los niveles de citotoxicidad y, adicionalmente, minimiza el efecto de la autofluorescencia en muestras biológicas debido a la excelente relación señal/ruido.^[22, 23]

Estas singulares propiedades de las UCNPs han atraído un enorme interés y a día de hoy se han publicado más de 25.000 artículos al respecto,^[24] que abarcan una amplia variedad de áreas de investigación que comprende desde el uso de las UCNPs para la construcción de láseres, sensores y celdas solares, hasta su utilización en aplicaciones biomédicas como marcadores biológicos, terapia fotodinámica o liberación controlada de fármacos.^[25-27]

1.2. Mecanismos upconversion

Los iones lantánidos presentan múltiples niveles energéticos (figura 1.2) y como consecuencia de esto existen diversas rutas posibles para la emisión upconversion después de la absorción de dos o más fotones en el NIR.

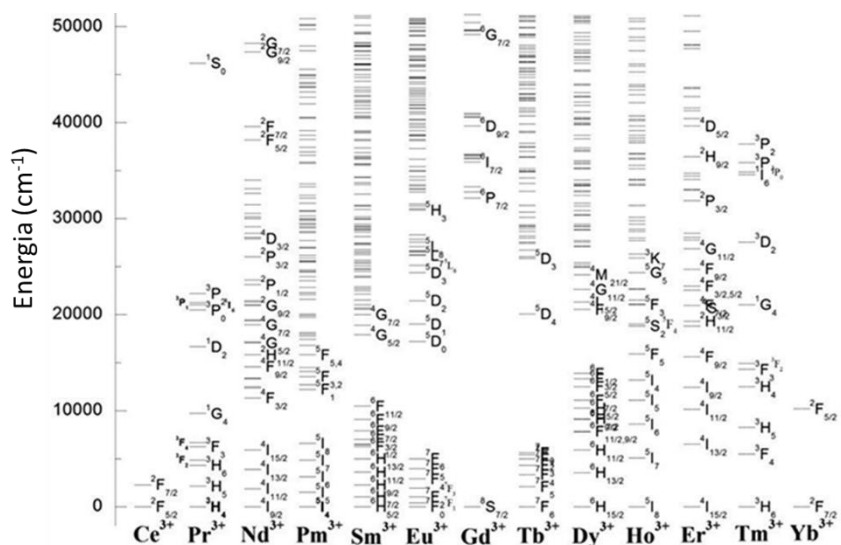


Figura 1.2. Diagrama de Dieke para los cationes lantánidos.

Aunque son múltiples los mecanismos propuestos, solo tres son los responsables de la mayoría de los procesos upconversion en las nanopartículas: absorción del estado excitado (**ESA**), transferencia de energía upconversion (**ETU**) y migración de energía (**EMU**).

El mecanismo **ESA** (por sus siglas en inglés *excited state absorption*) es el más sencillo, ya que en este caso la matriz está dopada con un único tipo de ion lantánido (Figura 1.3A). El primer paso es la absorción de un fotón por el lantánido, lo que ocasiona la transición de un electrón del estado fundamental al estado excitado (E1),^[28] seguido de la absorción del segundo fotón cuya energía permite la transición desde E1 a un estado energético mayor E2. Finalmente, la emisión upconversion ocurre tras la relajación desde el estado

energético superior E_2 al estado fundamental. Lamentablemente, a pesar de ser el mecanismo más sencillo necesita una serie de condiciones, tal como una alta densidad de fotones de excitación para evitar la disminución de la eficiencia upconversion causada por la relajación cruzada entre iones.^[29, 30]

El mecanismo más eficiente es el **ETU** (*energy transfer upconversion*) y ocurre cuando la matriz está dopada por al menos dos tipos distintos de iones lantánidos, denominados sensibilizador y activador. Tanto el sensibilizador como el activador pueden absorber un fotón y promocionar un electrón a sus respectivos estados excitados E y E_1 , (figura 1.3B). A continuación, el sensibilizador transfiere la energía de manera no radiativa al activador vía interacción resonante dipolo-dipolo y finalmente se relaja al estado fundamental.^[11] Este mecanismo es el más observado en las UCNPs y la eficiencia de la emisión upconversion va a estar influenciada por la distancia entre los iones.^[12]

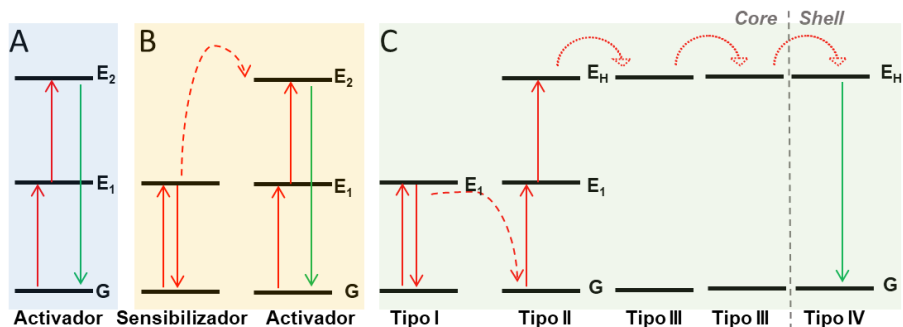


Figura 1.3 Esquema representativo de los mecanismos de emisión upconversion: A) ESA, B) ETU y C) EMU

El otro mecanismo relativamente eficiente en la emisión upconversion es el mediado por migración de energía o **EMU** (*Energy migration-mediated upconversion*). Para que este proceso tenga lugar es necesario que el dopaje con los diferentes iones lantánidos se realice en capas distintas (*shell*) de la nanopartícula,^[10] con la excepción de

que el sensibilizador sólo estará presente en una de las capas, bien sea en la interna o más externa. Así se facilita la transferencia de energía entre los lantánidos separados a través de la migración virtual de un fotón (figura 1.3C).

En la figura 1.4 se muestra el esquema de los procesos ETU y emisiones características de las UCNPs dopadas con $\text{Er}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ y $\text{Tm}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$, que son las utilizadas para el desarrollo de esta tesis. El espectro de emisión de las UCNPs dopadas con Yb^{3+} y Er^{3+} tras la excitación a 980 nm presenta tres bandas de emisión: una en el UV (máximo en 415 nm), una en el verde (máximos en 525 y 540 nm) y en otra en el rojo (máximo en 650 nm). Específicamente, un electrón de Yb^{3+} es promovido desde el nivel $^2\text{F}_{7/2}$ al estado $^2\text{F}_{5/2}$ y desde este nivel se promueve la transferencia de energía al nivel excitado $^4\text{I}_{11/2}$ del Er^{3+} (figura 1.4). La cooperación entre varios iones de Yb^{3+} permite poblar los niveles $^4\text{F}_{7/2}$ y $^4\text{F}_{9/2}$ del Er^{3+} por medio de procesos de transferencia de energía resonante, proceso seguido de la relajación no radiativa a los estados $^2\text{H}_{11/2}$ y $^4\text{S}_{3/2}$ y finalmente, su relajación al estado fundamental dando lugar a las emisiones en el verde. La relajación del estado excitado $^4\text{F}_{9/2}$ será la responsable de la emisión en el rojo (véase flechas en figura 1.4).^[15]

Estos procesos son bifotónicos, pero si se usan fuentes de excitación de potencias muy elevadas se pueden observar la emisión en 415 nm que se atribuye a un proceso trifotónico.^[15]

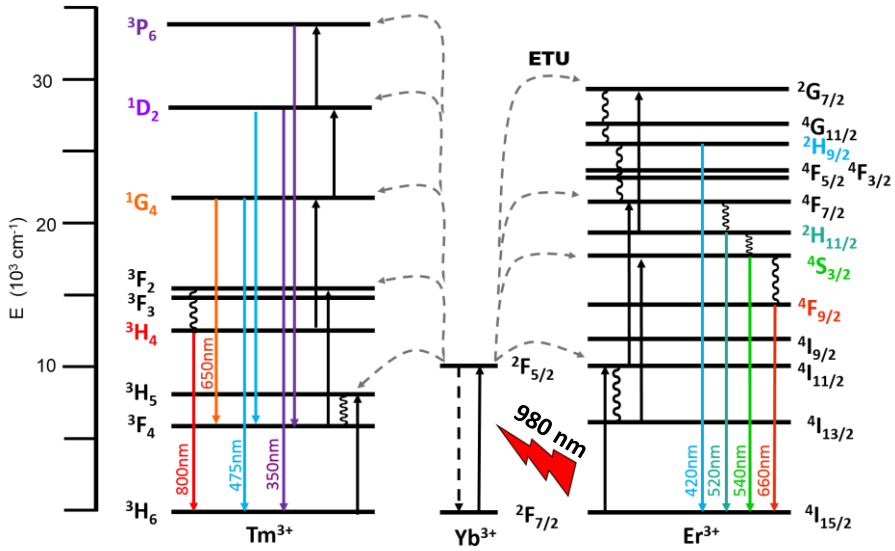


Figura 1.4. Esquema de los procesos ETU y emisiones características que tienen lugar en las UCNP dopadas con Yb^{3+} y Er^{3+} o Tm^{3+} .

Por otra parte, el espectro de emisión de las UCNPs dopadas con Yb^{3+} y Tm^{3+} presenta simultáneamente bandas de emisión en la región UV (máximo 360 nm), en el visible (máximos en 450, 475 y 640 nm) y en el NIR (máximo en 800 nm). A diferencia del Er^{3+} , el mecanismo comprende un proceso de más de dos fotones, debido a que los niveles energéticos superiores del Tm^{3+} se encuentran mucho más separados de sus niveles energéticos intermedios e inferiores como se observa en la figura 1.4. El proceso se inicia con la promoción de un electrón al estado excitado $^2F_{5/2}$ de Yb^{3+} , a partir del cual ocurren una variedad de procesos de transferencia de energía a los estados excitados del Tm^{3+} , seguido de diversos procesos de relajación no radiativa, y finalmente las emisiones correspondientes en el UV, Visible y NIR. Las bandas de emisión en 360 nm y 450 nm involucran un proceso de cuatro fotones, las emisiones en 475 nm y 630 nm implican tres fotones y finalmente, la emisión en 800 nm es el resultado de un proceso bifotónico.

1.3. Composición de las UCNPs

De manera general, las UCNPs están constituidas por una matriz inorgánica que actúa como soporte inactivo y está dopada con iones lantánidos, que serán los responsables de la emisión de las UCNPs. Por tanto, la interacción entre la matriz y los dopantes, así como la distancia entre los iones en la red cristalina será fundamental para la eficiencia de la emisión upconversion.^[15] Además, tanto la variación del tipo de dopante como su concentración en la matriz permite controlar la emisión de las UCNPs en un rango amplio de longitudes de onda, como se muestra en la figura 1.5.^[31-33]

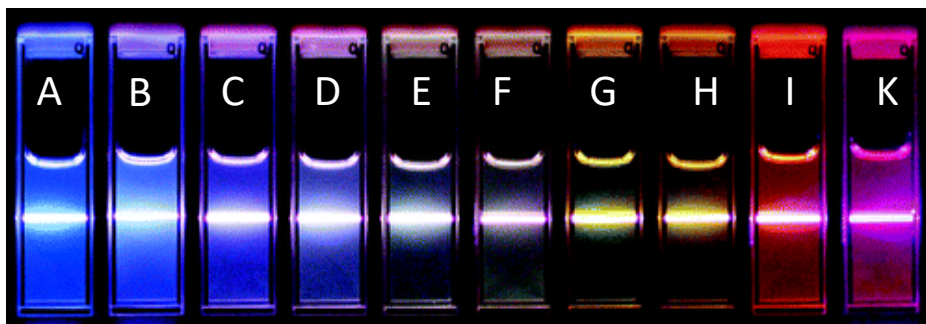


Figura 1.5. Imagen de dispersiones de UCNP con diferentes iones dopantes y en distintos porcentajes. (A) $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Tm}$ (20/0.2 %). (B-F) $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Tm/Er}$ (20/0.2/0.2-1.5 %). (G-K) $\text{NaYF}_4:\text{Yb/Er}$ (18-60/2 %). Adaptado con permiso de la Ref.^[33]. Copyright, (2008) American Chemical Society

1.3.1 Matriz

La matriz es el soporte inorgánico inactivo que contiene a los iones dopantes que aportan a las UCNPs las propiedades ópticas deseadas.^[10, 15, 30] Como se mencionó anteriormente, la emisión upconversion es el resultado de transiciones 4f-4f que de acuerdo a la regla de paridad no son permitidas pero que pasan a ser parcialmente permitida cuando los iones lantánidos se insertan en una red cristalina

con poca simetría, siendo determinante su ubicación dentro de la red cristalina, así como la distancia entre los lantánidos dopantes, para la obtención de procesos upconversion eficientes. [10]

A su vez, la matriz inorgánica se debe elegir teniendo en cuenta que ésta debe presentar tolerancia a los lantánidos, una buena estabilidad química y térmica y además una baja energía fonónica. En la tabla 1.1 se resume las matrices más utilizadas para las UCNPs. De manera general, se recurre a matrices compuestas por iones lantánidos, ya que la similitud de los radios atómicos con los lantánidos activos permite que el dopaje de la red cristalina sea más efectivo. Las matrices más comunes son Y_2O_3 , [34] $NaGdF_4$, [35] $LiYF_4$, [36] $NaYF_4$, [16, 21], $LnAlO_3$, [37] [38] y YVO_4 . [39] Existen además otros ejemplos de matrices que utilizan elementos alcalinotérreos (como Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) y de metales de transición (Zn^{4+} , Ti^{4+}) que presentan radios atómicos similares. [40]

Tabla 1.1. Matrices más utilizadas en la síntesis de UCNPs.

Material	Energía fonónica (cm ⁻¹)	Refs
Sílice	1100	[41]
LaPO ₄	1050	[41]
Y ₃ Al ₅ O ₁₂	860	[41]
Y ₂ Ti ₂ O ₇	712	[42]
Y ₂ O ₃	600	[43]
LiYF ₄	425	[44]
NaGdF ₄	400	[41]
NaYF ₄	370	[45]
LaF ₃	350	[42]
CaF ₂	350	[46]
YCl ₃	260	[44]
LaCl ₃	240	[41]

Las matrices de tipo MBF_4 , donde $M=K^+$, Na^+ , Li^+ y $B=Y^{3+}$ ó Gd^{3+} , son consideradas idóneas para ser dopadas con los iones dopantes Tm^{3+} , Er^{3+} y Ho^{3+} , debido a que presentan una baja energía de fonón (370 cm^{-1}) y una alta estabilidad química, siendo la matriz $NaYF_4$ la más empleada para diversas de aplicaciones.^[45]

Adicionalmente, esta matriz presenta dos fases cristalinas la hexagonal ($\beta\text{-NaBF}_4$) y la cúbica ($\alpha\text{-NaBF}_4$). La elección de la fase juega un papel importante en la eficiencia de la emisión upconversion, siendo la emisión de la fase hexagonal aproximadamente 10 veces mayor que la cúbica.^[47] Esto se debe a que la menor simetría de la fase hexagonal mejora el nivel de acoplamiento entre los orbitales 4f de los lantánidos, aumentando así la probabilidad de las transiciones electrónicas 4f-4f prohibidas según la regla de paridad.^[48]

1.3.2 Dopantes

Al igual que la matriz, la elección de los dopantes (activador y sensibilizador) juega un papel fundamental en las propiedades ópticas de las UCNPs, tanto el activador como el sensibilizador son iones de tierras raras, pero el sensibilizador posee un único estado excitado, mientras que el activador tiene múltiples niveles de energía en forma de escalera.

Los iones lantánidos Er^{3+} , Tm^{3+} y Ho^{3+} son los iones mas utilizados como activadores para obtener luminiscencia en el visible, ya que sus niveles energéticos dispuestos en forma de escalera favorecen el proceso ETU.^[21] Por otra parte, el Yb^{3+} es el sensibilizador por excelencia para el estudio de la emisión upconversion, ya que presenta un elevado coeficiente de absorción molar en la región del NIR y además su único estado energético excitado ($^2F_{5/2}$) coincide energéticamente con algunos estados excitados de los activadores,

haciendo posible la absorción de múltiples fotones, y transferencia de energía.^[49]

La tabla 1.2 muestra un resumen de los dopantes (lantánidos) más comunes donde se detalla las transiciones responsables de las emisiones de cada uno de estos.

Tabla 1.2. Lantánidos utilizados como dopantes en las UCNPs y sus correspondientes transiciones 4f.^[10]

Activador	Emisión UC (nm) $\lambda_{exc}=980$ nm	Transiciones 4f
Pr ³⁺	485, 520, 538, 605, 635, 645, 670, 690, 720	³ P ₀ → ³ H ₄ , ³ P ₁ → ³ H ₅ , ³ P ₀ → ³ H ₅ , ¹ D ₂ → ³ H ₄ , ³ P ₀ → ³ F ₂ , ³ P ₀ → ³ H ₆ , ³ P ₁ → ³ F ₃ , ³ P ₀ → ³ F ₃ , ³ P ₀ → ³ F ₄ ,
Nd ³⁺	430, 482, 525, 535, 580, 600, 664, 766	² P _{1/2} → ⁴ I _{9/2} , ² P _{1/2} → ⁴ I _{11/2} , ² P _{1/2} → ⁴ I _{13/2} , ⁴ G _{7/2} → ⁴ I _{9/2} , ² P _{1/2} → ⁴ I _{15/2} , ⁴ G _{7/2} → ⁴ I _{11/2} , ⁴ G _{5/2} → ² G _{7/2} , ² G _{7/2} → ⁴ I _{9/2} , ⁴ G _{7/2} → ⁴ I _{13/2} , ⁴ G _{7/2} → ⁴ I _{15/2}
Sm ³⁺	520, 541, 555, 590, 645, 657, 700, 799-873	⁴ G _{7/2} → ⁶ H _{5/2} , ⁴ F _{3/2} → ⁶ H _{5/2} , ⁴ G _{5/2} → ⁶ H _{5/2} , ⁴ G _{5/2} → ⁶ H _{7/2} , ⁴ G _{7/2} → ⁶ H _{9/2} , ⁴ G _{5/2} → ⁶ H _{9/2} , ⁴ G _{5/2} → ⁶ H _{11/2} , ⁶ F _{11/2} → ⁶ H _{5/2}
Eu ³⁺	416, 429, 490, 510, 535, 554, 590, 613	⁵ D ₃ → ⁷ F ₁ , ⁵ D ₃ → ⁷ F ₂ , ⁵ D ₂ → ⁷ F ₂ , ⁵ D ₂ → ⁷ F ₃ , ⁵ D ₁ → ⁷ F ₁ , ⁵ D ₁ → ⁷ F ₂ , ⁵ D ₀ → ⁷ F ₁ , ⁵ D ₀ → ⁷ F ₂
Gd ³⁺	278, 305, 312	⁶ I _{7/2} → ⁸ S _{7/2} , ⁶ P _{5/2} → ⁸ S _{7/2} , ⁶ P _{7/2} → ⁸ S _{7/2}
Tb ³⁺	381, 415, 438, 489, 541, 584, 619	⁵ D ₃ → ⁷ F ₆ , ⁵ D ₃ → ⁷ F ₅ , ⁵ D ₂ → ⁷ F ₄ , ⁵ D ₄ → ⁷ F ₆ , ⁵ D ₄ → ⁷ F ₅ , ⁵ D ₄ → ⁷ F ₄ , ⁵ D ₄ → ⁷ F ₃
Dy ³⁺	378, 408, 487, 543, 569, 570, 610, 655, 663	⁴ G _{11/2} → ⁶ H _{13/2} , ⁴ G _{9/2} → ⁶ H _{13/2} , ⁴ G _{9/2} → ⁴ H _{11/2} , ⁴ I _{15/2} → ⁶ H _{13/2} , ⁴ G _{11/2} → ⁶ H _{11/2} , ⁴ F _{9/2} → ⁶ H _{13/2} , ⁴ G _{11/2} → ⁶ H _{9/2} , ⁴ G _{11/2} → ⁶ H _{7/2} , ⁴ F _{9/2} → ⁴ H _{11/2} ,
Ho ³⁺	524, 655	⁵ F ₄ , ⁶ S ₂ → ⁵ I ₈ , ⁵ F ₅ → ⁵ I ₈
Er ³⁺	415, 525, 542, 655	² H _{9/2} → ⁴ I _{15/2} , ² H _{11/2} → ⁴ I _{15/2} , ⁴ S _{3/2} → ⁴ I _{15/2} , ⁴ F _{9/2} → ⁴ I _{15/2}
Tm ³⁺	290, 345, 362, 450, 475, 644, 694, 800	¹ I ₆ → ³ H ₆ , ¹ I ₆ → ³ F ₄ , ¹ D ₂ → ³ H ₆ , ¹ D ₂ → ³ F ₄ , ^G ₄ → ³ H ₆ , ¹ G ₄ → ³ F ₄ , ³ F ₃ → ³ H ₆ , ³ H ₄ → ³ H ₆
Yb ³⁺	450-500	2 X ² F _{5/2} → ² F _{7/2}

Otro parámetro a tener en cuenta es la relación molar activador/sensibilizador. A concentraciones de sensibilizador mucho mayor que la del activador, se favorece la transferencia de energía en sentido del sensibilizador al activador; mientras que concentraciones elevadas de activador puede causar procesos de auto-desactivación (*self-quenching*). Para evitar este último fenómeno se utilizan concentraciones menores al 3% de activador.^[10] En esta tesis se ha

estudiado principalmente UCNPs de NaYF_4 dopadas con Er^{3+} (3 %) y Tm^{3+} (0.5 %).

1.4. Síntesis de nanopartículas de upconversion

Las estrategias para la síntesis de UCNPs pueden ser de tipo *top-down* o *bottom-up*,^[50] siendo esta última la estrategia más utilizada para la síntesis de UCNP con poca dispersión de tamaño.^[51] Los métodos *bottom-up* más utilizados son: coprecipitación, descomposición térmica, hidro(solvo)térmica, Ostwald-Ripening, sol-gel, líquidos iónicos y microondas. La figura 1.6 muestra algunas imágenes de ejemplos de UCNPs sintetizadas mediante estos métodos.

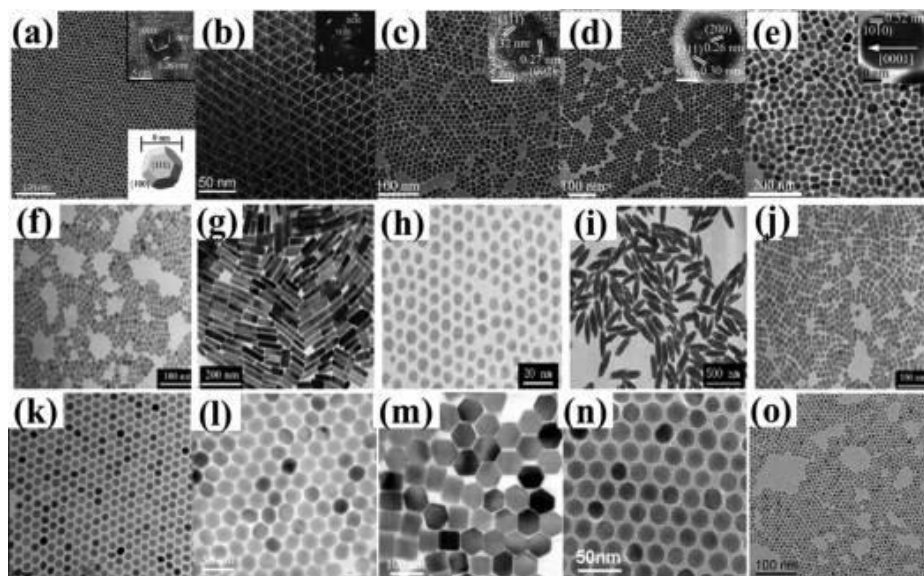


Figura 1.6 Imágenes de TEM de las distintas UCNP obtenidas por los distintos métodos de sintéticos: (A-E) método hidro(solvo)térmica, (F-J) método de descomposición térmica. (K-O) método de Ostwald-Ripening. Reproducido con permiso de Ref.^[52] Copyright (2014) American Chemical Society

Dependiendo de las propiedades de la nanopartícula que se busque sintetizar, tales como composición, tamaño, morfología y propiedades ópticas, etc, se definen parámetros como la temperatura de reacción, el tiempo de reacción, disolventes, así como el tipo de ligando y su concentración a utilizar en la síntesis.^[12, 26, 48, 53] A continuación se resume los procedimientos de síntesis más utilizados.

1.4.1 Hidro(solvo)térmica

Este procedimiento sintético precisa de altas presiones y temperaturas más bajas que otros métodos (250°C), por encima del punto crítico del disolvente. La reacción se lleva a cabo en una autoclave donde se mezclan los disolventes orgánicos en presencia del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como surfactante.^[32] Los tiempos de reacción varían entre 5 y 24 horas. El tamaño de las UCNPs obtenidas se encuentra en el rango de 100-500 nm. La principal desventaja de este método es la dificultad de obtener UCNPs de menor tamaño.

La preparación de UCNP de $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Er}^{3+},\text{Yb}^{3+}$ por este método ha sido ampliamente estudiado por Zeng J. y colaboradores, utilizando agua destilada, ácido acético y etanol como disolventes y el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y EDTA como surfactantes para controlar la morfología y tamaño. Los tamaños de las UCNPs obtenidas utilizando estos precursores fueron mucho menores (entorno a los 50 nm). Sin embargo, el tamaño y la morfología no resulta fácil de controlar.^[54]

Este método sintético permite adicionalmente la obtención de UCNPs solubles en medios acuosos en un solo paso, utilizando por ejemplo una la mezcla de $(\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COOH})_3\text{Ln}$, NaF y una variedad de polímeros orgánicos (como ácido poliacrílico (PAA) o ácido

polietilenglicol (PEG)), que brindan la solubilidad en medios acuosos y hace posible la bioconjugación con moléculas biológicas.^[55]

1.4.2 Descomposición Térmica

Este método es quizás el más extendido para la preparación de UCNPs y se utiliza exclusivamente para la síntesis de matrices del tipo NaYF₄, NaGdF₄, NaLuF₄, LiYF₄ y KGdF₄.

El primer estudio de la síntesis por este método de UCNPs con matriz NaYF₄ dopadas con Yb³⁺/Er³⁺ y Yb³⁺/Tm³⁺ se publicó en el año 2006,^[56] obteniéndose UCNPs con alto grado de cristalinidad tanto para la fase cúbica(α) como para la fase hexagonal (β).^[57, 58]

Como precursores organometálicos se utilizan generalmente trifluoroacetatos de los Ln³⁺, los cuales se mezclan con el disolvente 1-octadeno y con ácido oleico u oleilamina como agentes coordinantes.^[56]

La cinética de crecimiento de las UCNPs sigue el mecanismo de LaMer^[59-61] que puede resumirse en cuatro etapas: (i) la descomposición de los trifluoroacetatos y comienzo de la nucleación (250°C), (ii) crecimiento de las NPs y formación de la fase cúbica(α), (iii) disolución de las NPs formadas, agregado de las NPs disueltas y formación de NPs más grandes, y finalmente (iv) a altas temperaturas (~300°C) transformación de la fase cúbica a la hexagonal ($\alpha \rightarrow \beta$) obteniéndose así β -UCNP con alto grado de cristalinidad. La figura 1.7 resume los pasos sintéticos descritos.

La variación de parámetros como la temperatura, concentración de reactivos o tiempo de reacción nos permite modular la morfología, forma y tamaño de las UCNPs.^[62] Es importante destacar que pequeñas variaciones en la temperatura final de reacción implica una variación importante en el tamaño de las UCNPs, además del incremento de la polidispersidad del tamaño de las mismas, lo que

representa un reto en cuanto a la reproducibilidad entre síntesis diferentes.

Si bien este método se utiliza para obtener UCNPs de fase hexagonal (β - NaYF_4) con tamaños que van desde 15 a 40 nm, tiene la desventaja de generar subproductos de reacción tóxicos, por lo que es necesario utilizar una protección adecuada durante la síntesis.^[56, 63, 64]

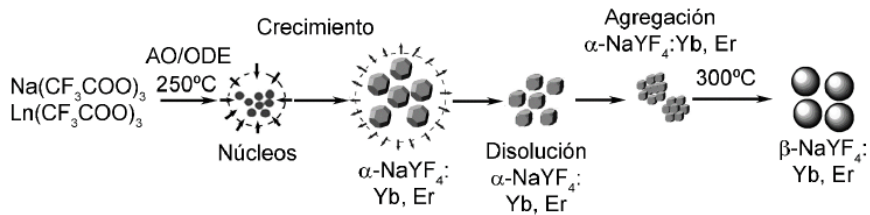


Figura 1.7. Representación de la cinética de crecimiento de las UCNP por el método de descomposición térmica para la obtención de las UCNP con fase hexagonal.

1.4.3 Estrategia Ostwald-Ripening

También llamado método de co-precipitación a alta temperatura, es un método que se basa en el principio Ostwald-Ripening, en el que las partículas más grandes, y por tanto con una relación superficie/volumen baja, se encuentran favorecidas energéticamente con respecto a partículas con una relación superficie/volumen mayor.^[65]

Zhang y colaboradores diseñaron esta estrategia con el objetivo de obtener UCNPs dopadas con $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ y $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$, con un alto grado de pureza de cualquiera de las fases cristalinas (hexagonal o cúbica), pero sustituyendo los trifluoroacetatos por sales de cloruros de los lantánidos (LnCl_3) como fuente del lantánido. Esta variación elimina la formación de subproductos tóxicos debido a la descomposición de los trifluoroacetatos.

Adicionalmente, es necesaria la adición de NH_4F como fuente de fluoruro y una mezcla de 1-octadeceno como disolvente de alto punto de ebullición y ácido oleico como agente coordinante.^[66]

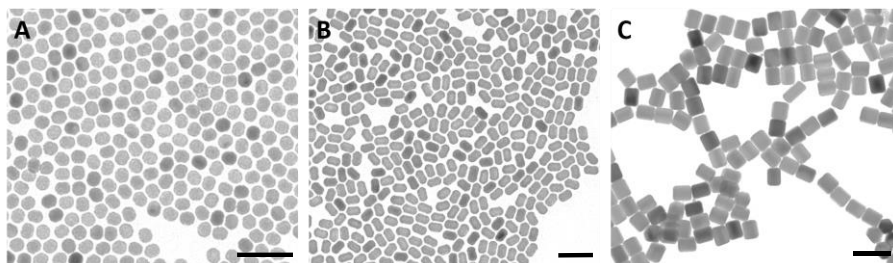


Figura 1.8. Imágenes de TEM de $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Er/Yb}$. A) nanoesferas. B) nanoelipses. C) nanoplatos obtenida por medio del método Ostwald-Ripening. Escala de barra 100 nm

Este método se basa en la formación de pequeños co-precipitados amorfos de NaYF_4 a temperatura ambiente y tras un aumento de la temperatura ($\geq 300^\circ\text{C}$) se induce un crecimiento uniforme de las NPs, donde la variación de parámetros tales como temperatura, relación de ácido oleico/1-octadeceno o tiempo de reacción permite controlar la forma y tamaño de las UCNPs,^[67, 68] figura 1.8.

Otros métodos como el de microondas^[69, 70] o utilización de líquidos iónicos^[71, 72] son métodos menos utilizados, a pesar de ser estrategias novedosas e interesantes y que pueden representar soluciones a situaciones específicas.

1.5. Modificación de la superficie de las UCNPs

Los constantes avances en la optimización de los distintos métodos para la síntesis de UCNPs han permitido controlar múltiples parámetros como son tamaño, forma y cristalinidad de las UCNPs. Sin embargo, a excepción de los procesos que hacen uso de autoclave,

todos los métodos sintéticos descritos llevan a la formación de UCNPs recubiertas con ácido oleico u oleilamina. La cadena hidrofóbica de estos recubrimientos restringe su uso en medios acuosos lo cual es una limitante importante para el uso de las UCNP en bioaplicaciones.

Es por esto que se han desarrollado múltiples estrategias para modificar la superficie y transformar las UCNPs hidrofóbicas en UCNPs hidrofílicas.^[50, 73] Es de esperar que la modificación de la superficie de la NPs no solo garantice su dispersabilidad en medios acuosos , sino que también dote a las UCNPs de una mayor funcionabilidad, permitiendo así interacciones con una variedad de biomoléculas, como por ejemplo ciclodextrina^[74] anticuerpos^[75] y ADN.^[76] La figura 1.9 muestra diferentes tipos de ligandos y posibles bioconjugaciones con la superficie de la UCNP.

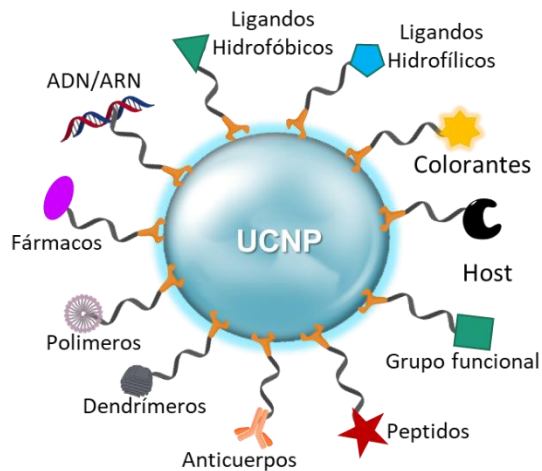


Figura 1.9. Esquema que representa la decoración de la UCNP con diferentes biomoléculas y otros ligandos.

Las estrategias desarrolladas para modificar la superficie de las UCNPs se pueden agrupar en cuatro grupos distintos, los cuales se describen a continuación.

1.5.1 Intercambio de ligando

La modificación de la superficie de las UCNPs por medio de intercambio de ligando puede ser de dos tipos: intercambio directo o intercambio por etapas.

La estrategia de intercambio directo del ligando consiste en reemplazar el oleato de la superficie de las UCNPs por moléculas hidrofílicas o polímeros con grupos hidrofílicos. Esta modificación ocurre en una única etapa y, de manera general, se utilizan un exceso del nuevo compuesto o ligando, elevadas temperaturas y tiempos largos de reacción.

Para que el intercambio del ligando ocurra eficazmente es indispensable que los compuestos a intercambiar cuenten con grupos anclantes con una mayor afinidad por la superficie de la UCNP que el oleato, tales como el $-NH_2$, SH, PO_3^- , entre otros.

Conociendo que la fuerza de interacción de los distintos grupos anclantes crece en el orden $-SH$, $-NH_2$, $-COO^-$ y PO_3^- ,^[50, 77] es de esperar que los polímeros con grupos fosfatos sean candidatos ideales para llevar a cabo un intercambio de ligando directo. De hecho Van Veggel y colaboradores demostraron este comportamiento desplazando y sustituyendo los grupos oleato de la superficie de las UCNPs por el polímero PEG₆₀₀, mediante una mezcla hexano/etanol a 70 °C durante 24 horas, en presencia de un exceso del polímero.^[78] La figura 1.10 muestra el esquema general del cambio de intercambio de ligando directo.

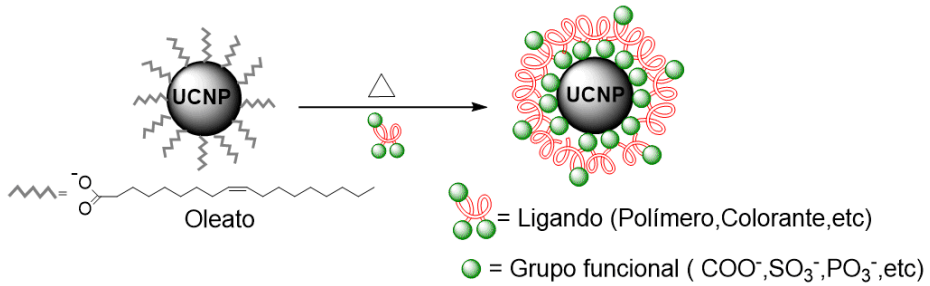


Figura 1.10. Esquema general de intercambio de ligando directo.

Adicionalmente, un incremento en la temperatura y en los tiempos de reacción facilita el desplazamiento del oleato por ligandos con otros grupos afines tales como aminas (polialilamina(PAAm))^[79] o tioles (PEG-SH).^[80, 81] Además, es importante tener en cuenta que los ligandos polidentados tales como el ácido poliacrílico que facilitan el desplazamiento de ligandos monodentados debido a su capacidad multiquelante.^[82]

En el intercambio de ligando por etapas, en la primera etapa se elimina el oleato de la superficie de las UCNPs y en la segunda se adiciona el nuevo ligando que recubrirá la UCNP. A día de hoy existen dos protocolos descritos para la modificación por etapas:

i) Adición de ácidos fuertes (HCl), ^[83] estrategia desarrollada por Bogdan en 2011, que consiste en la adición de un ácido para protonar el oleato y obtener UCNPs sin recubrimiento orgánico (UCNP-desnudas), figura 1.11, seguido de la adición del ligando con el que se desea recubrir las UCNPs.

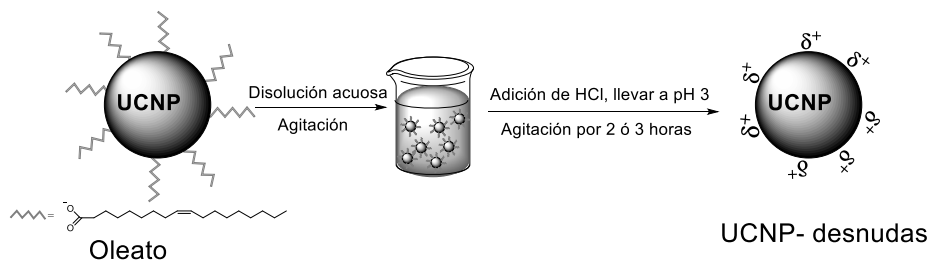


Figura 1.11. Esquema sintético para la obtención de UCNP desnudas propiciada por el uso de ácido (HCl).

ii) Tratamiento con NOBF_4 , en el cual se elimina el oleato y las UCNP se estabilizan electrostáticamente por medio de la coordinación de los iones BF_4^- a la superficie. Durante este último proceso las UCNP dispersas inicialmente en el ciclohexano se transfieren al disolvente más hidrofílico (dimetilformamida, DMF).^[50, 84, 85] Luego, las nanopartículas se recubren con el ligando adecuado, tales como polímeros o colorantes. Este procedimiento se resume en la figura 1.12.

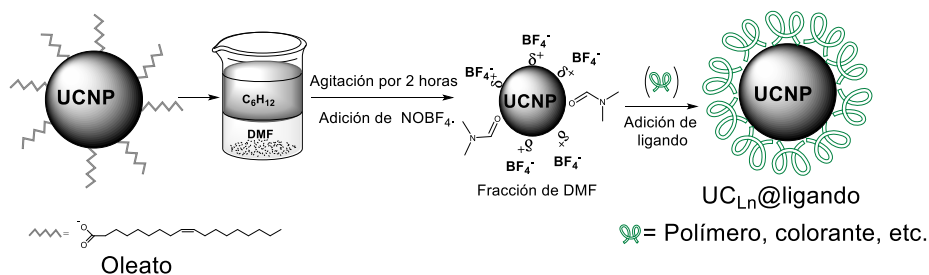


Figura 1.12. Esquema de intercambio de ligandos en dos etapas por medio de tratamiento con reactivo NOBF_4 y posterior recubrimiento con nuevo ligando.

Ejemplos de la modificación de la superficie por ambas estrategias se encuentran ampliamente descritos para distintos polímeros^[86], colorantes^[87] e incluso macrociclos.^[88]

1.5.2 Modificación del ligando

Esta estrategia busca evitar la eliminación del oleato mediante la modificación del mismo por medio de la oxidación del doble enlace de la cadena alquílica, transformando así el doble enlace en un grupo carboxilo o epóxido.^[48, 89] Para ello se utilizan usualmente dos reactivos, el ozono y el reactivo de Lemieux-von Rudloff, el cual consiste en una mezcla de permanganato de potasio (KMnO_4) y de la sal de peryodato de sodio (NaIO_4) en disolución acuosa.^[90] La oxidación del doble enlace a carboxilo no sólo mejora la dispersabilidad de la nanopartícula en medios acuosos, sino que además facilita la funcionalización de la nanopartícula con moléculas de interés.^[90]

1.5.3 Interacciones entre ligandos

Esta estrategia implica la adición de una nueva capa orgánica por afinidad entre el ligando inicial (oleato) y el nuevo ligando. La naturaleza de la interacción entre ambos ligandos puede ser electrostática o hidrofóbica.

El primer tipo de interacción se basa en las atracciones electrostáticas entre especies de cargas opuestas. Por medio de este método podemos obtener múltiples capas unidas entre ellas sobre la superficie de las UCNPs;^[16] además permite modular de una forma eficiente el grosor de la capa orgánica alrededor de las UCNPs. Un ejemplo de recubrimiento de este tipo es el nanohíbrido multicapas UCNP@PAH@PSS, obtenido por medio de la atracción electrostática entre el polímero de hidrocloreuro de polialilamina (PAH) y el poliestireno sulfonato de sodio (PSS).^[91]

Por otra parte, la modificación de las UCNPs por interacciones hidrofóbicas involucra interacciones de Van der Waals entre las cadenas hidrofóbicas del nuevo ligando y el ligando hidrofóbico inicial

(oleato) para formar una nueva capa.^[17, 92] (Ver figura 1.13) El nuevo ligando debe contar con una parte hidrofílica que, debido a las interacciones entre las cadenas alquílicas, queda expuesta en la superficie de las UCNPs otorgándoles dispersabilidad en medios acuosos.^[50]

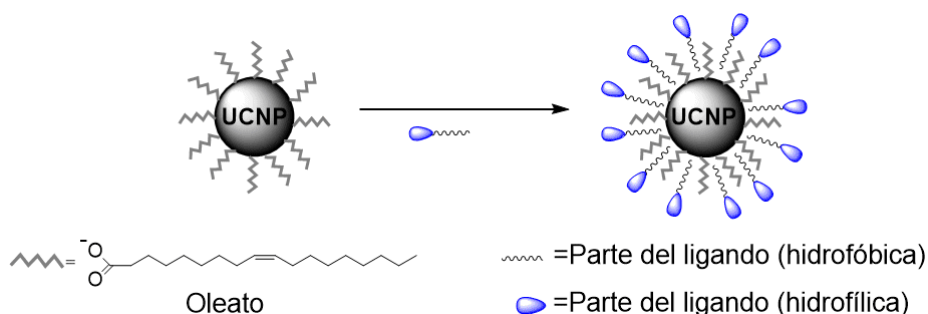


Figura 1.13. Esquema general de la modificación de la superficie de las UCNP basada en las interacciones hidrofóbicas de los ligandos (oleato)

Esta metodología no solo induce una especial estabilidad y solubilidad en medios acuosos, sino que también permite preservar las propiedades ópticas de las UCNPs. Sin embargo, la elección de los compuestos a utilizar para favorecer estas interacciones debe realizarse de manera selectiva, ya que la presencia de cadenas alquílicas muy largas, que excedan la longitud del oleato, debilita las interacciones de Van der Waals e interfiere en la estabilidad de la nueva capa. Una amplia variedad de polímeros, tales como PEG, polietileniminas y fosfolípidos con distinto tamaño de cadenas lipofílicas, han demostrado ser muy eficientes en la modificación de la superficie de las nanopartículas.^[93]

1.5.4 Encapsulado con un recubrimiento inorgánico

La formación de una capa de sílice en la superficie de las UCNPs es una estrategia que ha sido ampliamente estudiada debido a

la diversidad de grupos funcionales que nos permite introducir (-COOH, -NH₂, -SH, entre otros), lo que amplía la posibilidad de bioconjugar las UCNPs con diversas moléculas.^[52, 94]

El recubrimiento se lleva a cabo por medio de un método de microemulsión inversa que involucra la presencia de surfactantes y lleva a la formación de recubrimientos de SiO₂. Generalmente, el precursor del recubrimiento es el tetraetil ortosilicato (TEOS) y como surfactante IGEPAL CO-520.^[50] Además, se adiciona un pequeño exceso de amoniacaco que garantiza que la concentración de ácido silícico esté por encima de la de nucleación, lo que garantiza a su vez el crecimiento constante del recubrimiento. Por lo tanto, el grosor del recubrimiento va depender de la cantidad de precursor. Frank C.J.M. van Veggel y colaboradores demostraron el recubrimiento de UNCP por el método Stöber obteniendo un recubrimiento de sílice de un grosor uniforme de 15 nm.^[95] En un estudio similar Zhang y colaboradores demostraron que es posible obtener recubrimientos uniformes de las UCNPs de entre 1-3 nm.^[96]

En la figura 1.14 se resume el procedimiento, en el primer paso se forma un recubrimiento de SiO₂ y seguidamente se adiciona un ligando que permite mejorar su solubilidad en medios acuosos y conjugarse con distintas moléculas orgánicas.

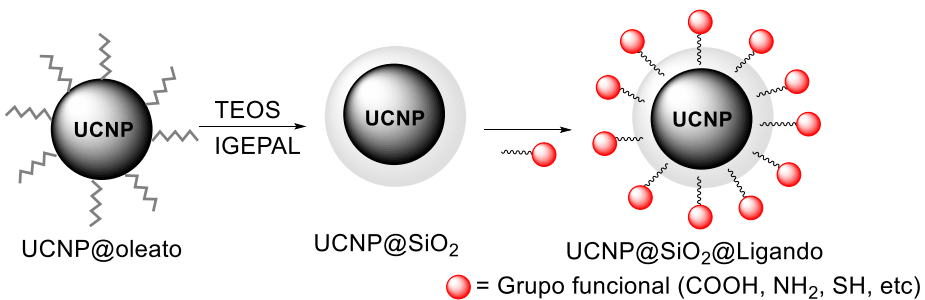


Figura 1.14. Esquema general de la silanización de la superficie de la UCNP y posterior recubrimiento con el ligando de interés.

A pesar de sus propiedades, existen importantes desventajas cuando se recubre con sílice, tales como la poca dispersabilidad que presentan las UCNP@SiO₂ en medios acuosos y la tendencia a agregarse a las pocas horas de la encapsulación de las UCNPs.^[97, 98] Este problema se acentúa cuando se aplican pasos de centrifugación en el proceso de purificación haciendo imposible resuspender las UCNPs en agua.^[94, 95]

Otro tipo de encapsulado es el recubrimiento con óxido de titanio. El primer ejemplo fue descrito por Wang y colaboradores en el año 2005, los cuales recubrieron de manera homogénea NPs de Er₂O₃ con TiO₂.^[99] Estos primeros resultados condujeron a su aplicación en otros tipos de UCNPs y recubrimientos similares, y a su utilización en fotocátalisis para convertir fotones NIR a UV^[100]. Sin embargo, al igual que el encapsulado con sílice, la principal desventaja de este tipo de recubrimiento es la tendencia a agregación de las UCNPs.

1.6. Modificación y optimización de las propiedades ópticas de las nanopartículas upconversion

La emisión de las UCNPs depende de la elección del tipo de matriz, así como de los iones lantánidos que la dopan. Sin embargo, otros factores como los defectos de la superficie de las UCNP, los ligandos y el disolventes también influyen en la eficiencia de la emisión upconversion.^[52]

La alta concentración de iones dopantes distribuidos en la estructura cristalina de las UCNPs hace que los iones Ln³⁺ cercanos a la superficie se desactiven mediante procesos no radiativos, siendo estos procesos favorecidos por la alta relación superficie/volumen de las nanopartículas.^[10, 52] Por otra parte, los medios acuosos afectan la intensidad de emisión de la UCNP, debido a que las moléculas de agua

son capaces de despoblar el estado excitado (${}^2F_{5/2}$) de los iones Yb^{3+} . Estas limitaciones han sido resultas por medio de las siguientes estrategias: (i) síntesis de UCNP de tipo core-shell y (ii) modificación de la longitud de onda de excitación.

1.6.1 Síntesis de UCNPs de tipo core-shell

El recubrimiento de las UCNPs con una capa inorgánica cristalina e isoestructural, como por ejemplo CaF_2 o NaYF_4 , da lugar a UCNPs de tipo core@shell (UCNP_{CS}). Este recubrimiento reduce de manera significativa la pérdida de energía causada por los defectos de la superficie de las UCNP, mejorando así sus propiedades emisivas. El primer ejemplo de UCNP_{CS} fue descrito por Lezhdina y colaboradores, quienes describieron la síntesis de $\text{LaF}_3:\text{Yb, Ho}@ \text{LaF}_3$ y $\text{LaF}_3:\text{Nd}@ \text{LaF}_3$.^[101]

En el año 2007, Chow y colaboradores consiguieron un aumento en la intensidad de emisión de las UCNPs de $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Er}$ y $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Tm}$ de 7 y 29 veces, respectivamente, cuando éstas fueron recubiertas con una capa de NaYF_4 .^[102] observando un aumento alrededor del 300 % en el rendimiento cuántico.

Posteriormente, se demostró que el aumento de las propiedades emisivas de las UCNPs es mayor al utilizar recubrimiento con dopantes activos, como por ejemplo de las UCNP_{CS} de $\text{NaGdF}_4:\text{Yb, Er}@ \text{NaYbF}_4$, las cuales presentan un incremento de 3 y 10 veces en la intensidad de la emisión verde y rojo, en comparación con las mismas UCNP_{CS} con un recubrimiento inerte (NaYF_4).^[35]

La intensidad de emisión de las UCNP se ha mejorado aún más utilizando estructuras multicapas más complejas de tipo core@shell@shell, como por ejemplo las UCNPs de $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Tm}@ \text{NaYF}_4:\text{Yb, Er}@ \text{NaYF}_4:\text{Yb, Tm}$ descritas por Zhang y

colaboradores.^[103] Lamentablemente, el incremento de capas dificulta no solo la obtención de recubrimientos homogéneos, sino también obtención recubrimientos de grosor similar entre síntesis distintas.^[102, 104, 105]

1.6.2 Modificación de la longitud de onda de excitación

Una de las condiciones indispensables para utilizar las UCNPs en bioaplicaciones es que éstas sean compatibles en medios acuosos. La modificación de la superficie de las UCNPs facilita su dispersabilidad en medios acuosos, sin embargo, existen dos limitaciones asociadas al uso del Yb^{3+} como sensibilizador de las UCNPs.

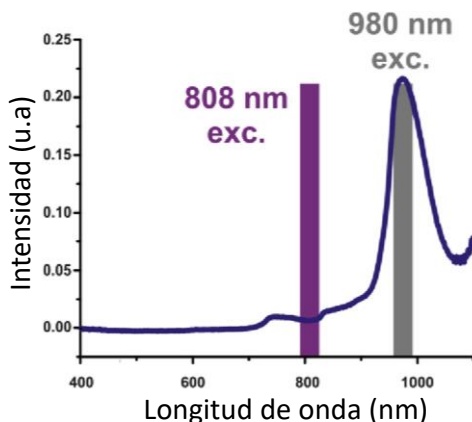


Figura 1.15 Espectro de absorción del agua y rango de longitudes de onda utilizadas para excitar las UCNPs, con máximos en 980 nm (gris) y 808 nm (morado). Obsérvese el solapamiento entre el máximo de absorción del agua y la irradiación a 980 nm. Adaptada con permiso de Ref. ^[24] Copyright (2018) Elsevier B.V.

En primer lugar, los iones Yb^{3+} sufren la desactivación del estado excitado $^2\text{F}_{5/2}$ por las moléculas de H_2O . En segundo lugar, el Yb^{3+} presenta su máximo de absorción a la misma longitud de onda que el agua (980 nm), lo que implica que parte de la luz de excitación NIR a 980 nm es absorbida por el agua. Figura 1.15; y en consecuencia, se

produce un sobrecalentamiento del medio que limita su uso en muestras biológicas.^[24]

Esta última limitación se ha abordado mediante la introducción de iones Nd^{3+} , ya sea en el núcleo o en el recubriendo inorgánico de las UCNP_{CS} . La adición de iones Nd^{3+} permite sustituir la excitación a 980 nm por una longitud de onda de excitación de 808 que corresponde al máximo de absorción el Nd^{3+} . La figura 1.16 ilustra el mecanismo de emisión upconversion tras la de excitación del Nd^{3+} .

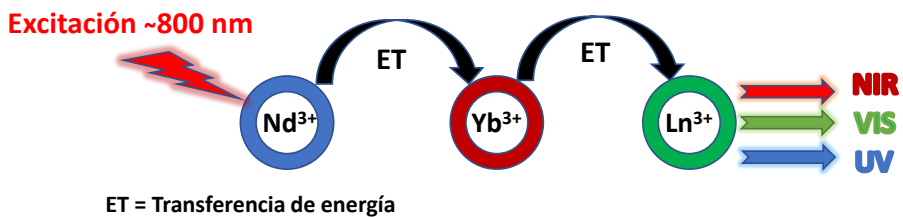


Figura 1.16. Mecanismo del proceso de emisión UCNP excitando al Nd^{3+} ($\lambda_{\text{exc}}=808$ nm) en una nanopartícula dopada con Yb^{3+} , Nd^{3+} y Ln^{3+} . (donde Ln^{3+} es un activador)

Un ejemplo de UCNPs con Nd^{3+} en el núcleo son las del tipo $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Nd}@\text{NaYF}_4$, en las cuales se observó un sobrecalentamiento menor con la excitación a 808 nm en comparación con la de 980 nm.^[106] Sin embargo, la concentración de Nd^{3+} no debe ser superior al 2% para evitar la desactivación del activador (Er^{3+}).

Por otra parte, se ha demostrado que dopar con Nd^{3+} los recubrimientos inorgánicos, en lugar del núcleo de las UCNPs permite no solo minimizar los procesos de desactivación, sino también incrementar el porcentaje de Nd^{3+} como dopante, alcanzando un incremento de hasta 7 veces en la intensidad de emisión upconversion ($\lambda_{\text{exc}}=808$ nm) con UCNPs del tipo $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Nd}@\text{NaYF}_4:\text{Nd}$ (20%

de Nd^{3+}) en comparación con las $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er,Nd}@ \text{NaYF}_4$ (2% de Nd^{3+}).^[107]

1.7. Aplicaciones de las nanopartículas de upconversion

1.7.1 Bioimagen

La aplicación de NPs en bioimagen ha demostrado ser una herramienta muy útil para la visualización de muestras biológicas, brindando una mejora en la información específica sobre la morfología, anatomía y fisiológica, lo que facilita la detección de enfermedades.

Las UCNPs en particular han demostrado ser un material idóneo en bioimagen debido a su estabilidad frente al fotoblanqueo. Además, el uso de luz NIR presenta una mayor penetración en los tejidos biológicos en comparación con otro tipo de luz y evita la autofluorescencia de las muestras. Algunos estudios han demostrado la eficiencia de las UCNPs en la obtención de imágenes en vivo de células cancerígenas en ovarios,^[78] y colon,^[108] así como la detección de antígenos específicos de tejidos prostáticos^[109] y mamario^[110].

Otra de las ventajas del uso de las UCNPs es que permiten obtener imágenes a través de resonancia magnética dopando la matriz de las UCNPs con iones Gd^{3+} , los cuales son agentes de contraste.^[111]

1.7.2 Liberación de fármacos y tratamientos

La combinación de la luminiscencia upconversion con la administración de fármacos es una estrategia novedosa para el suministro de medicamentos, debido a la excelente relación señal/ruido de las UCNPs lo que facilita el seguimiento de su emisión en muestras biológicas.^[21] En general, en este tipo de aplicaciones se registra el comportamiento de la emisión upconversion (intensidad, rendimiento cuántico, etc) en función de la concentración del fármaco presente en

el sistema, y cuya liberación se promueve por la variación de parámetros tales como el pH, la temperatura o radiación. [112, 113]

Los modelos más empleados son los fármacos doxorubicina (DOX) e ibuprofeno (IBU). En el caso del DOX, este se ha encapsulado por medio de interacciones hidrofóbicas utilizando un sistema de UCNPs y poli etilenglicol conjugado con ácido fólico (FA); y su liberación intracelular del fármaco se realizó por variación en el pH y se confirmó mediante la luminiscencia upconversion. [114]

De forma similar se ha desarrollado un sistema de UCNPs para la liberación del fármaco IBU, que utiliza la variación del rendimiento cuántico de la emisión de upconversion para determinar la cantidad del fármaco presente en el sistema. [115] En ambos estudios, las UCNPs además de proporcionar la respuesta óptica del sistema, también se comportan como una plataforma de transporte del fármaco.

Además, las UCNPs han sido funcionalizadas con compuestos orgánicos, tales como el azul de metileno, rosa de bengala y ftalocianina de zinc, todos ellos capaces de generar especies reactivas de oxígeno (ERO) tras la excitación en el NIR. Por lo tanto, las UCNPs recubiertas con este tipo de compuestos orgánicos las transforma en candidatos ideales para emplearse en terapia fotodinámica (TFD); los resultados más exitosos se han obtenido en terapias contra el cáncer. [116, 117]

1.7.3 Sensores

Las UCNPs han sido ampliamente utilizadas en la detección química de biomoléculas, como por ejemplo enzimas, ADN, polinucleótidos o anticuerpos, [118] además de sensores de pH [119]. Estos sensores se basan en la combinación de la emisión de la UCNP y la funcionalidad de un ligando orgánico que, generalmente, suele ser fotoactivo y recubre las nanopartículas.

En estos sistemas dador-aceptor que utiliza la emisión de las UCNPs, el mecanismo de detección puede ser de dos tipos: de filtro interno (también llamado emisión-reabsorción) y de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, por sus siglas en inglés).

Para la obtención de sensores basados en el mecanismo de filtro interno deben cumplirse las siguientes condiciones: (i) que exista un solapamiento importante entre la emisión de las UCNPs y la absorción del ligando que la recubre, (ii) un reconocimiento químico o supramolecular entre el ligando que recubre las UCNPs y el analito a detectar, (iii) que la interacción entre el ligando y el analito genere un cambio significativo en la banda de absorción del ligando (aumento, disminución o desplazamiento). Teniendo esto en cuenta, se han desarrollado sensores de pH^[120], CO₂^[121], Cr⁶⁺^[122] y antioxidantes.^[123]

Por otra parte, en los sensores basados en procesos FRET, el solapamiento de los espectros, así como la distancia entre el dador y aceptor son parámetros determinantes en la eficiencia de estos sistemas. Al igual que los sensores basados en procesos de filtro interno, con el par dador-aceptor adecuado, el espectro de absorción del aceptor sufre cambios significativos en presencia del analito objetivo. En los últimos años se han desarrollado un importante número de sondas de detección basados en procesos FRET para la detección de iones como CN⁻^[124], NO²⁻^[125], Hg²⁺^[126], o de biomoléculas como la adivina, ADN, RNA.^[16, 90, 127]

La emisión de las UCNPs permite la detección ratiométrica. La existencia de múltiples bandas de emisión de las UCNPs permite seleccionar la banda de emisión específica como referencia, mientras que las otras varían de acuerdo con la concentración de los analitos. Así, se puede seleccionar la banda de emisión de 470 nm en las UCNPs de Tm³⁺. Para la superposición con la absorción del cromóforo orgánico,

mientras que las otras bandas de emisión (como la de 800 nm) no se ven afectadas. Por tanto, solo una banda de emisión de las UCNPs variará por los cambios en el entorno, pudiendo así utilizar las otras bandas de emisión como bandas de referencia para mediciones cuantitativas.

Un ejemplo de estos análisis ratiométricos es la detección de iones CN^- a través de un sistema de UCNPs dopadas con $\text{Er}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ y recubiertas con un complejo de Ir, en donde el análisis ratiométrico se realiza entre las intensidades de las bandas de emisión a 540 y 800 nm de las UCNPs (I_{540}/I_{800}), utilizando específicamente la señal a 800 nm como señal de referencia, mientras que la señal a 540 nm (que se solapa con la banda de absorción del complejo de Ir) varía por la presencia de los iones CN^- ^[124]

1.7.4 Otras aplicaciones

Por otra parte, las UCNPs tienen interés para el desarrollo de aplicaciones optoelectrónicas tales como celdas solares,^[128, 129] sensores físicos^[130] y tintas de seguridad.^[21] Un claro ejemplo de esto son los estudios recientes de las aplicaciones de las UCNPs en seguridad. Así, en los que se han desarrollado cristales líquidos dopados con UCNPs que pueden utilizarse como películas infalsificables para tarjetas de crédito, billetes, tiques e identificaciones, y que pueden ser detectados por aparatos portátiles,^[131] lo que abre una nueva área de estudio en el futuro inmediato para este material.

La tabla 1.3. resume algunas de las aplicaciones de las UCNPs descritas en la bibliografía con uso de las UCNP, donde se detalla su matriz, dopantes y el tipo recubrimiento empleado.

Tabla 1.3. Aplicaciones biomédicas de las UCNPs

Material UC	Recubrimiento	Aplicación	Ref.
NaYF ₄ :Yb/Er	Sílice mesoporosa	Terapia fotodinámica	[132]
	SiO ₂	Terapia fotodinámica, Imagen celular, bioimagen	[133]
	PAA/PEI	Liberación genómica	[134]
	PEG	Imagen celular	[114]
	Óxido de hierro	Liberación de fármaco, bioimagen	[135]
	Ácido fólico	Liberación de fármaco	[136]
	Plata (Ag ⁺)	Terapia fotodinámica, bioimagen	[137]
	Ciclodextrinas	Sensor bacterial	[138]
	Rodamina B	Sensor de mercurio	[139]
	Mec-C-NH ₂ PAA/Au	Sensor de ADN	[140]
NaYF ₄ :Yb/Tm	NaYF ₄ :Yb/Er/ Sílice mesoporosa	Liberación de fármaco	[141]
	PAA-Cu	Sensor de pesticida	[142]
	Sílice mesoporosa	Bioimagen	[143]
	NYF ₄	Terapia fotodinámica	[144]
NaYF ₄ :Yb/Tm@ NaGdY ₄ :Yb	TiO ₂	Terapia fotodinámica	[145]
Gd ₃ O ₃ :Yb/Er	Sílice mesoporosa	Liberación de fármaco, Bioimagen	[146]
NaGdF ₄ :Yb/Er	Fe	Bioimagen	[147]
	NaGdF ₄	Bioimagen	[148]
CaF ₂ :Yb/Ho	NaGdF ₄	Bioimagen	[149]
NaY(WO ₄) ₂ : Yb/Er	-	Sensor de temperatura	[150]
NaYb(Mn)F ₄ : Er/Tm	NaYF ₄	Sensor de temperatura (nanotermómetro)	[150]
NaYF ₄ :Yb/Er,Tm	PPA	Sensor de H ₂ S	[151]

Capítulo 2. Objetivos

2.1 Objetivo

Sintetizar y caracterizar nanohíbridos de nanopartículas de upconversion recubiertos con ligandos funcionales para aplicaciones biológicas.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de upconversion recubiertas con un polímero biocompatible.
 - ✓ Evaluar la estabilidad del nanohíbrido en condiciones fuertemente ácidas
 - ✓ Explorar la aplicación del nanohíbrido como sonda de pH
- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de upconversion recubiertas con polímeros que presentan diferentes grupos anclantes.
 - ✓ Evaluar la estabilidad de los distintos nanohíbridos en condiciones fuertemente ácidas
 - ✓ Estudiar la protección que otorga los recubrimientos contra la desintegración de las nanopartículas en condiciones acuosas a baja concentración.
- Sintetizar nanopartículas de upconversion de tipo core-shell y posterior construcción de un nanohíbrido utilizando una estrategia de puzle molecular.

- ✓ Estudiar la versatilidad del cucurbit[7]urilo como pegamento entre la superficie de la nanopartícula de upconversion e iones lantánidos
- ✓ Explorar las propiedades ópticas del nanohíbrido resultante excitando a distintas longitudes de ondas en el infrarrojo cercano.

Capítulo 3. Metodología

En este capítulo se describen las diferentes técnicas utilizadas para la caracterización de las propiedades ópticas de los nanohíbridos de upconversion estudiados en esta tesis. Además, se describen las técnicas empleadas para el estudio de la morfología y composición química.

3.1. Propiedades ópticas

3.1.1 Espectroscopía de absorción

Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro SECOMAN UVI Light UV-Visible. Las medidas se llevaron a cabo utilizando cubetas de cuarzo de dimensiones 1x1x4 cm.

3.1.2 Espectroscopía de emisión en estado estacionario

Los espectros de emisión en estado estacionario se midieron en un Fluorímetro SLM AmingoBowmann series 2 (AB2), utilizando como fuente de excitación diodos laser acoplados al equipo. En los capítulos 4 y 6 se usó un diodo láser de 975 nm (Thorlabs L975P1WJ) y en el capítulo 4 un diodo laser de 980 nm CW (CNI Optoelectronics Tech. Co. MDL-H-980nm-5W. $P=1.5 \text{ KW/cm}^2$).

Para el registro del espectro se utiliza el software AB2 versión 5.5. Las medidas se realizaron en cubetas de cuarzo triangulares (capítulo 4) y en cubetas de cuarzo de 1x1x4 cm (capítulos 5 y 6). Todas las medidas se realizaron a temperatura ambiente y en aire.

3.1.3 Espectroscopía de emisión resuelta en el tiempo.

La medida de los tiempos de vida de emisión upconversion de los nanohíbridos estudiados en el capítulo 6 se realizó utilizando un microscopio multifotón Olympus FV1000MPE acoplado a un microscopio vertical Olympus BX61WI y equipado con un objetivo de inmersión en agua 25 x (1.05 NA). Este microscopio está equipado con

un láser multifotón Mai Tai HP Deep See, con un ancho de pulso de 100 fs como fuente de excitación. El láser se enfoca sobre la muestra a 980 nm con una potencia de excitación de 30 mW.

La densidad de potencia de excitación se determinó con un punto focal de aproximadamente 1 μm de radio. Las imágenes se adquirieron mediante una lente de inmersión Olympus 25x 1.05 N.A., filtros de emisión apropiados y un tiempo de permanencia de 2 μs pixel⁻¹ y una resolución de 1024x1024 píxeles. La emisión se detecta en un detector de rango visible de 4 canales (420-500 / 515-580 / 590-650 / 660-740).

Las muestras analizadas se prepararon vertiendo gota a gota una dispersión en agua de los nanohíbridos correspondientes en un portaobjetos de vidrio del microscopio (25 x 75 mm). Luego, se evaporó el disolvente y la muestra se cubrió con un cubreobjetos de vidrio (22 x 22 mm).

3.1.4 Rendimiento cuántico

El rendimiento cuántico de emisión se define como la relación entre el número de fotones emitidos y fotones absorbidos por la muestra. La medida del rendimiento cuántico de emisión upconversión de los nanohíbridos estudiados en el capítulo 6 se llevó a cabo en un espectrómetro Quantaurus-QY Plus UV-NIR (C13534-11). Como fuente de excitación se utilizaron láseres de una longitud de onda de 980 nm (potencia láser 0,5 W) y 808 nm (808 ± 5 nm; potencia láser 1,6 W) acoplados al espectrómetro. El tamaño del haz de excitación del láser es de 1 mm x 0,1 mm y el tiempo de exposición fue de 145,6 ms.

3.2. Estructura y morfología

3.2.1 Difracción de Rayos X

La cristalinidad de las UCNPs y nanohíbridos sintetizados se estudiaron mediante los espectros de difracción de rayos X (DRX). Estos espectros se registraron en un Difractómetro Bruker D8 Advance, equipado con una fuente de radiación de $\text{CuK}\alpha$. ($\lambda=1.54060 \text{ \AA}$), funcionando a un voltaje de 40 kV, monocromador secundario de haz difractado y un detector LynxEye. El equipo cuenta con el software de evaluación de datos EVA DIFFRAC PLUS. El rango angular de medida de los espectros fue de $2-80^\circ$ (2θ), con un tamaño de paso de 0.020° y tiempo de adquisición de 38.4 segundos.

3.2.2 Microscopía de transmisión electrónica

La técnica de microscopía de transmisión electrónica (TEM, por sus siglas en inglés *transmission electron microscopy*) se utilizó para determinar la cristalinidad, tamaño, forma y homogeneidad de las UCNPs sintetizadas, así como también para evaluar el espesor de los recubrimientos orgánicos preparados.

Las imágenes de TEM se registraron en un microscopio Jeol 1010 equipado con una cámara AMT RX80 (8Mpx) y funcionando a 100 kV. Las imágenes de microscopía de alta resolución (HRTEM) se registraron en un microscopio TECNAI G2F20, funcionando a 200 kV y equipado con un dispositivo acoplado (CCD) GATAN y el software "Digital micrograph" para la adquisición y tratamiento de imágenes.

Las muestras se prepararon depositando las disoluciones de las UCNPs sobre una rejilla de malla de cobre recubierta de carbono (malla 300; 3 mm en diámetro) seguido de la evaporación del disolvente. En los estudios del capítulo 5 y 6 se utilizaron disoluciones de los nanohíbridos de 0,5 mg/mL para preparar la rejilla del TEM. Dependiendo de la naturaleza del disolvente, el proceso se llevó a cabo

a temperatura ambiente o al vacío durante periodos de tiempo que oscilaron de 2 a 12 horas.

3.2.3 Microscopía electrónica de barrido de alta resolución

El estudio de microscopía electrónica de barrido de alta resolución, por sus siglas en inglés (HRSTEM) se llevó a cabo en el Instituto de Nanociencia de Aragón (INA) de la Universidad de Zaragoza (Capítulo 6). Las imágenes se registraron en un microscopio FEI Titan, funcionando a 120 kV. Este microscopio está equipado con un corrector de sonda de Cs, un monocromador y una fuente de electrones X-FEG ultrabrillante. La convergencia del ángulo fue de 25 mrad.

La obtención de imágenes HRSTEM se realizó utilizando un detector de campo oscuro anular de ángulo alto (HAADF). Los ángulos interno y externo para las micrografías registradas con este detector fueron de 48 y 200 mrad, respectivamente. La muestra del nanohíbrido analizado se preparó depositando una gota de la muestra suspendida en etanol en una rejilla de malla de cobre recubierta de carbón de las mismas especificaciones a las empleadas para las medidas de TEM.

3.2.4 Dispersión dinámica de luz y potencial Z

Las medidas de dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial Z se realizaron con un espectrómetro Malvern Zetasizer Nano Z, equipado con un Láser HeNe (10 mW) a 633 nm.

En el capítulo 6 las medidas se realizaron manteniendo las muestras en agitación hasta estabilizar el pH de la solución, seguido de un proceso de centrifugado de 2 minutos a bajas revoluciones (1000 rpm/min) para eliminar los posibles agregados a la disolución.

En el capítulo 7 las medidas de DLS se realizaron en un ángulo de dispersión de 173° . Las muestras se midieron a diferentes pH y a una concentración de 1 mg/mL del nanohíbrido en agua.

Las medidas de potencial Z de las disoluciones de las muestras se realizaron en celdas capilares DTS1070.

3.3. Composición

3.3.1 Espectrometría de dispersión de energía de rayos X

La técnica de espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) se utilizó para determinar la composición de las UCNPs sintetizadas. Los espectros se registraron en un equipo de microscopía electrónica de barrido HITACHI S-4800, equipado con detector Bruker XFlash 5030 y el software QUANTAX 400 para la adquisición y análisis de los espectros.

3.3.2 Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente

La espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) se utilizó para determinar de forma cuantitativa los elementos presentes en las UCNPs (capítulo 6). Las medidas se realizaron en ICP-MS Agilent 7900.

3.3.3 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) se utilizó para estudiar los recubrimientos orgánicos de los nanohíbridos sintetizados y determinar su porcentaje en peso. En el capítulo 4 se estudió el contenido de copolímero que recubre las UCNPs y el comportamiento térmico del copolímero. Por otra parte, en el capítulo 5 se utilizó para determinar el porcentaje de los distintos ligandos presentes en los nanohíbridos después de las respectivas funcionalizaciones. Finalmente, en el capítulo 6, la técnica se utilizó para estimar la cantidad de CB[7] que se encuentra recubriendo las UCNPs.

En el capítulo 4 las curvas de TGA se registraron en un equipo modelo Perkin-Elmer TGA-7, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y en corriente de nitrógeno.

En el capítulo 5, las curvas de TGA se registraron en un TGA 550, en un rango de temperatura 50-750 °C (aumento de 5 °C/min), sensibilidad de 0.1 microgramos, un aumento de 5 °C/min y bajo flujo de aire de 50 mL/min.

En el capítulo 6 las curvas de TGA se registraron en un equipo TG-TGA Pyris Diamond, en un rango de temperatura 25-800 °C (aumento de 5 °C/min), sensibilidad de 0.1 microgramos y bajo flujo de aire de 50 mL/min.

3.3.4 Espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier

Esta técnica se utilizó para analizar los recubrimientos orgánicos de las UCNPs estudiadas en esta tesis. Los espectros de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) se registraron utilizando un espectrómetro FT-IR Thermo Nicolete Nexus, con módulo ATR Smart Orbit™. Los espectros se registraron en un rango de número de onda de 4000-500 cm⁻¹, temperatura ambiente y ciclo de 64 repeticiones y una resolución de 4 cm⁻¹.

3.3.5 Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

Los espectros de ¹H-RMN se registraron a temperatura ambiente en un espectrómetro de RMN Bruker AVANCE DRX 300 o Bruker 400AV con iman Oxford de 300 MHz o 400 MHz. Como disolvente se utilizó cloroformo deuterado o agua deuterada. Los cambios se informan en partes por millón (δ , ppm) utilizando el pico del disolvente como interno referencia interna.

3.3.6 Cromatografía de exclusión

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) se utilizó para determinar el peso molecular promedio (M_n), el peso molecular (M_w) y la polidispersidad (M_w/M_n) de los co-polímeros estudiados en capítulo 6. En este estudio se utilizó un sistema SEC equipado con una bomba de HPLC isocrática Waters 1515, un detector de índice de refracción Waters 2414 y dos columnas Styragel HR3 y HR5 de Waters. Se empleó DMF (1% en peso de LiBr) como eluyente a 30 °C y un caudal de 0,7 mL min⁻¹. Se utilizó poliestireno (PS) como estándar para la calibración.

3.4. Otras técnicas

3.4.1 Medidas de pH

El pH de las dispersiones de los nanohíbridos estudiados se registró en un pH-metro (GLP21) acoplado a un electrodo de pH 50-26.

3.4.2 Centrifugación

Los procesos de centrifugación se realizaron utilizando centrifugas Eppendorf 5804R y Thermo-Scientific Legend XIR.

Capítulo 4. Nanohíbridos de Upconversion resistentes a pH ácidos

Tal y como se ha descrito anteriormente, es prácticamente imprescindible realizar la modificación de la superficie de las UCNPs obtenidas por las distintas rutas sintéticas, con el fin de introducir los ligandos adecuados para su uso en las distintas aplicaciones. La gran mayoría de los ligandos orgánicos utilizados presentan carboxilato, amina o tioles como grupos anclantes a la superficie de la UCNP.

La naturaleza de los grupos anclantes juega un papel crucial para mantener el pasivado de las UCNPs, conservar sus propiedades coloidales, evitar interferencias de las UCNPs con el medio (por ejemplo, medio celular), así como preservar la funcionalidad adicional que puede proporcionar el ligando conjugado a moléculas de interés e incluso proteger las UCNPs de su desintegración en medios acuosos.

Una parte de los estudios realizados con nanomateriales de upconversion tienen como objetivo su uso en aplicaciones biológicas, por lo que se realizan en disoluciones fisiológicas, como el tampón fosfato salino (PSB por sus siglas en inglés) o disoluciones acuosas, esto es en medio poco ácidos. Hay que tener en cuenta que la coordinación de los ligandos por sus grupos carboxilato, amina o tiol se puede ver seriamente comprometida en medios a $\text{pH} \leq 4$. De hecho, la exposición a $\text{pH} 4$ es una de las estrategias empleadas para eliminar el oleato de la superficie de las UCNPs.

Por lo tanto, la poca estabilidad de la mayoría de los pasivados en condiciones ácidas supone un serio inconveniente para la utilización de UCNPs en aplicaciones en medios ácidos, tales como ensayos que simulan las condiciones de acidez del estómago (próximo a $\text{pH} 2$) o incluso aplicaciones distintas a las biológicas, como, por ejemplo, procesos de formación de composites que requieren medios ácidos.

En los próximos tres capítulos de la presente tesis doctoral se describirán estudios de búsqueda de ligandos con grupos anclantes adecuados para mantener la pasivación de la superficie de las UCNPs en medios acuosos y medios ácidos.

4.1. Introducción

En este trabajo nos planteamos sintetizar un nanohíbrido estable en condiciones fuertemente ácidas. Para ello, se requiere de un grupo funcional anclante fuertemente ácido como el sulfónico, el cual es mucho más ácido que el carboxílico ($pK_a = -3$ vs $pK_a = 4$).^[152] Además, el correspondiente sulfonato tiene tres posibles puntos de coordinación, lo que le da una mayor flexibilidad en sus modos de coordinación.^[153, 154]

Diferentes estudios han demostrado la interacción de grupos sulfonatos con iones lantánidos,^[155-157] como por ejemplo, la formación de clústeres de sulfonatos con iones lantánidos trivalentes^[158] o el uso de polímeros con grupos sulfonatos para encapsular nanopartículas inorgánicas dopadas con iones lantánidos.^[159, 160]

Teniendo en cuenta las propiedades anteriormente descritas, consideramos que, si el recubrimiento orgánico de la UCNP se realiza con un polímero que cuenta con un alto porcentaje de grupos sulfonatos en su estructura, éstos podrían anclarse fuertemente a la superficie de la nanopartícula. La liberación de la superficie de la UCNP de estos grupos anclantes, se vería muy desfavorecida, lo que le brindaría a los nanohíbridos resultantes una importante estabilidad y funcionalidad en un amplio rango de pHs ácidos.

Por otra parte, al recubrir las UCNPs con un polímero de este tipo, cabe esperar que no todos los grupos sulfonatos se anclen a la superficie de la nanopartícula, sino que parte de ellos se encuentren en la periferia del nanohíbrido resultante, pudiendo así interactuar con otros compuestos por medio de interacciones covalentes o iónicas, dependiendo de la naturaleza del compuesto. De esta forma, se podrían formar nuevos nanohíbridos con interesantes aplicaciones, tales como sondas de pH o liberación controlada de fármacos con el pH.^[161, 162]

En este estudio nos enfocamos en la síntesis y caracterización de UCNPs recubiertas con un polímero biocompatible, el cual se ancla de manera eficiente a la superficie de las UCNPs por medio de los grupos sulfonatos presentes en su estructura. La naturaleza de este enlace otorgara estabilidad al nanohíbrido en condiciones fuertemente ácidas.

A continuación, se describe el método de síntesis y modificación de la superficie de las UCNPs con los polímeros, así como la caracterización de la estructura y morfología de las mismas utilizando técnicas tales como XRD, TEM, IR y TGA. Además, se detallan las propiedades ópticas y estabilidad de las nanopartículas a diferentes rangos de pH.

4.2. Resultados y discusión

4.2.1 Síntesis y caracterización de UCNPs recubiertas con oleato

La síntesis de las $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ (UCNP@oleato) se realizó mediante el método de descomposición térmica a alta temperatura.^[67] Para ello, se utilizaron las sales de los lantánidos hexahidratadas ($\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) con una mezcla de ácido oleico y 1-octadeceno en medio básico y elevando la temperatura (305 °C) por un periodo de 1 hora.

Las imágenes de TEM de las UCNP@oleato obtenidas mostraron la formación de nanopartículas homogéneas con un tamaño de $(25,3 \pm 1,5) \times (20,5 \pm 1,4)$ nm, figura 4.1. Adicionalmente, el difractograma de XRD confirmó la fase cristalina hexagonal (JCPDS standard card no. 28-1192), mientras que el análisis por EDS reveló una relación entre los átomos de los lantánidos de $\text{Y}^{3+}(79\%):\text{Yb}^{3+}(18%):\text{Er}^{3+}(3\%)$.

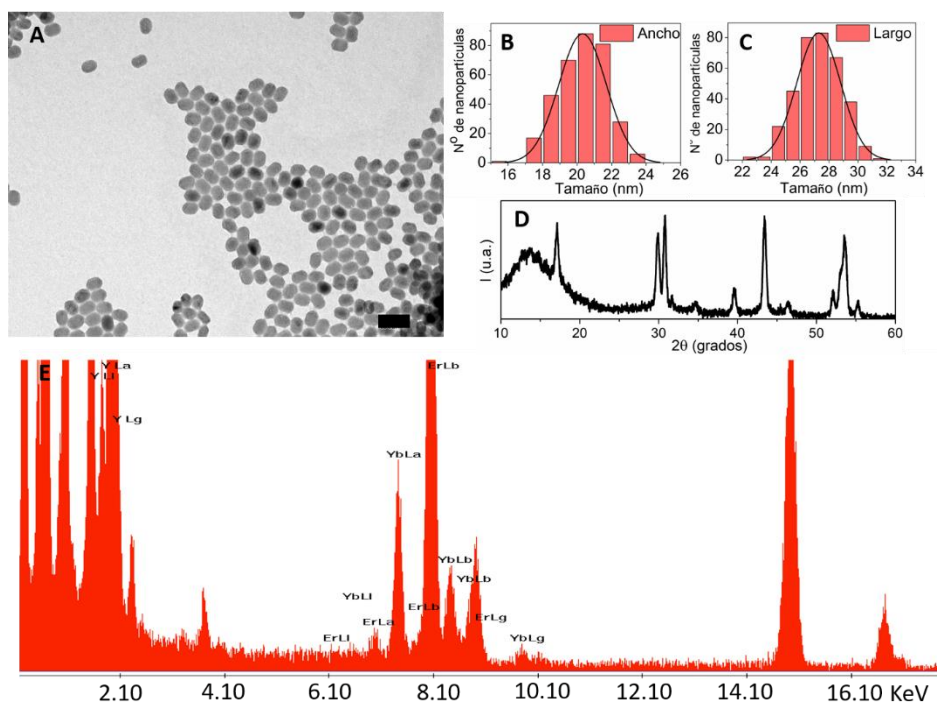


Figura 4.1 A) Imagen de TEM; B) Histogramas; C) Espectro de XDR y D) EDS de las UCNP@oleato. Escala de la barra de la imagen de TEM: 50nm

4.2.2 Síntesis del copolímero HEMA-co-AMPS

Se llevó a cabo la síntesis del copolímero seleccionado HEMA-co-AMPS o COP por medio de un proceso de polimerización vía radicales libres,^[163] partiendo de los monómeros 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) y ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (AMPS) en una relación 70:30 y en presencia de un porcentaje elevado de α,α' -azoisobutironitrilo (AIBN) como iniciador.^[163, 164] La figura 4.2 muestra el esquema de la síntesis del COP.

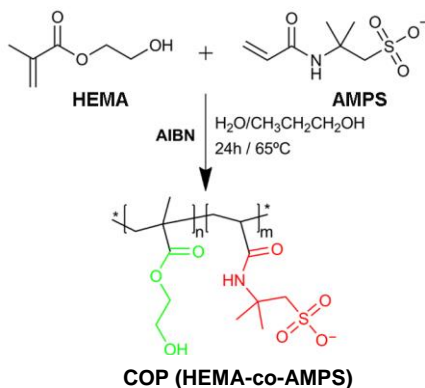


Figura 4.2. Esquema de la síntesis del COP (HEMA-co-AMPS)

La formación del COP se confirmó mediante $^1\text{H-RMN}$ y FTIR, figuras 4.3 y 4.4. En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ se detalla la ausencia de las bandas de los protones vinílicos de HEMA y AMPS (entre 5.6 y 6.2 ppm), tal y como se describe para este COP.^[163] Adicionalmente, en la tabla 4.1 se resumen las señales para los monómeros y el copolímero.

Por otra parte, en el espectro de FTIR se observó que las bandas del AMPS correspondientes a los dobles enlaces carbono-carbono (1552 cm^{-1}) y a la flexión fuera del plano ($1000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$) desaparecen, figura 4.4. Además, cambian las bandas debidas al estiramiento sp^3 del C-H ($2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$), mientras que una nueva banda aparece a 1452 cm^{-1} debido los grupos metileno en la nueva estructura.

El espectro muestra también las bandas debidas al estiramiento asimétrico y simétrico del S=O del grupo sulfónico del COP (en 1367 cm^{-1} y 1069 cm^{-1} , respectivamente) y de estiramiento del S-O (671 cm^{-1}), lo cual confirma la formación del polímero.

El análisis mediante cromatografía de exclusión mostró que el COP se obtuvo con una baja polidispersidad (1.09) y un peso molecular de $19.763\text{ mg mol}^{-1}$ (M_n).

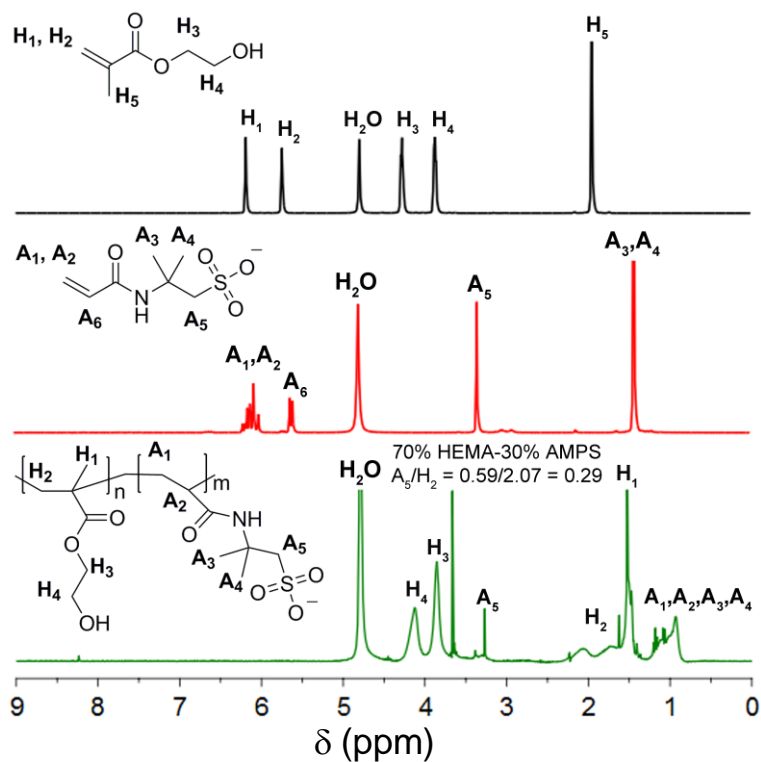


Figura 4.3. Comparación de los espectros de ^1H -RMN de a) HEMA, b) AMPS (línea roja) y c) COP registrados en D_2O .

Tabla 4.1 Resumen de los valores de integración para las señales de ^1H -RMN.

	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆
HEMA	1.00	1.00	2.02	1.99	2.94	--	--	--	--	--	--
AMPS	--	--	--	--	--	2.11	--	6.14	--	2.03	1.00
COP	3.28	2.07	2.00	2.20	--	--	2.39	--	--	0.59	--

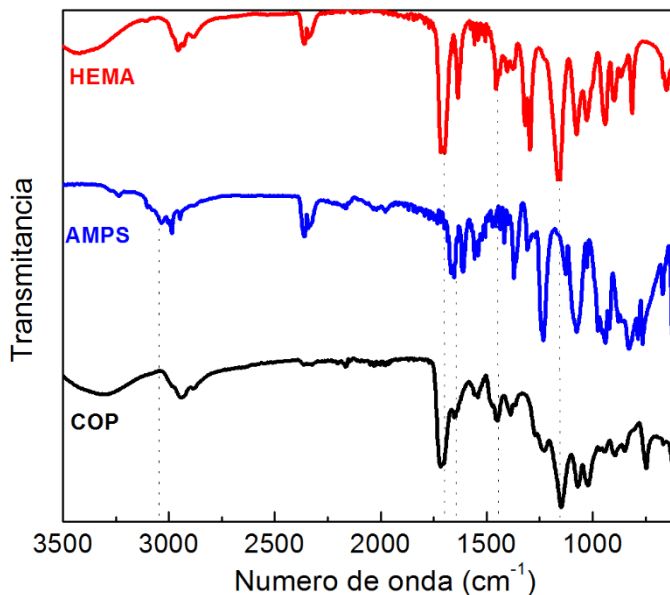


Figura 4.4. Comparación de los espectros de FTIR-ATR de a) HEMA, b) AMPS y c) COP. Las líneas punteadas identifican aquellas bandas que desaparecen o se modifican en el COP con respecto a sus precursores HEMA y AMPS.

4.2.3 Síntesis del nanohíbrido de UCNP recubierto con el copolímero (HEMA-AMPS)

Una vez sintetizado el COP, se realizó el recubrimiento de las UCNPs. La funcionalización se llevó a cabo mediante un proceso de intercambio de ligando representado en la figura 4.5. De manera general, se mezcló las UCNP@oleato con el COP en condiciones básicas y se dejó en agitación durante 24 h, seguido de un proceso de precipitación y purificación (ver detalles en metodología experimental).

El nanohíbrido obtenido, denominado UCNP@COP, presentó una elevada dispersabilidad en agua. Esto es una clara indicación del desplazamiento del oleato de las UCNPs por el COP, ya que los grupos hidrofílicos del COP que quedan en la periferia de las nanopartículas le

otorgan una mayor dispersabilidad en medios acuosos, a diferencia del recubrimiento de las UCNP con oleato.

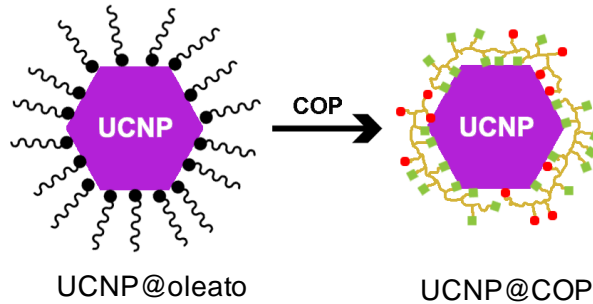


Figura 4.5. Representación esquemática de la síntesis del nanohíbrido UCNP@COP por medio de un proceso de intercambio directo donde los grupos sulfonatos del polímero desplazan al oleato.

Las imágenes de HRTEM de UCNP@COP (Figura 4.6) muestra un fino recubrimiento de un grosor de aproximadamente 1.7 nm del COP alrededor de la nanopartícula, confirmando así el anclaje múltiple del copolímero a la superficie de las UCNPs.

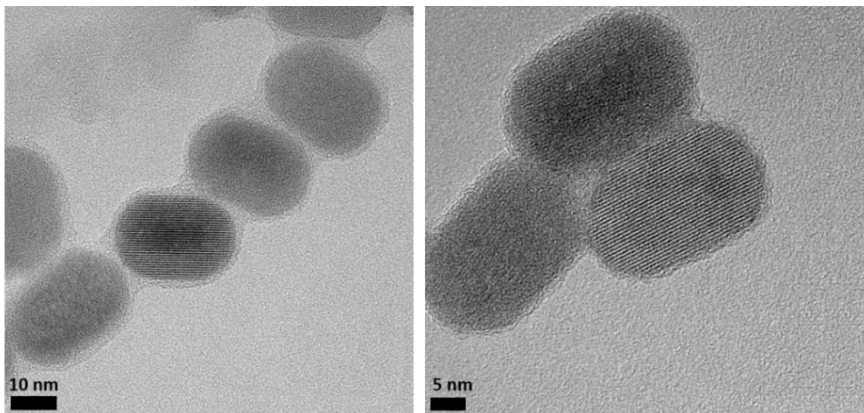


Figura 4.6. A) Imágenes de HRTEM del nanohíbrido UCNP@COP a diferentes aumentos 10 nm (izquierda) y 5 nm (derecha). En ambas fotografías se logra apreciar recubrimiento orgánico alrededor de las UCNP.

El nanohíbrido también se caracterizó mediante ^1H -RMN, FTIR-ATR y TGA, figura 4.7. En el espectro de ^1H -RMN se confirma el intercambio del ligando por el COP, ya que no hay las señales de los protones olefínicos del oleato. Además, se observó un desplazamiento hacia campo alto de las señales de los protones del CH_2SO_3^- y $\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ del COP.

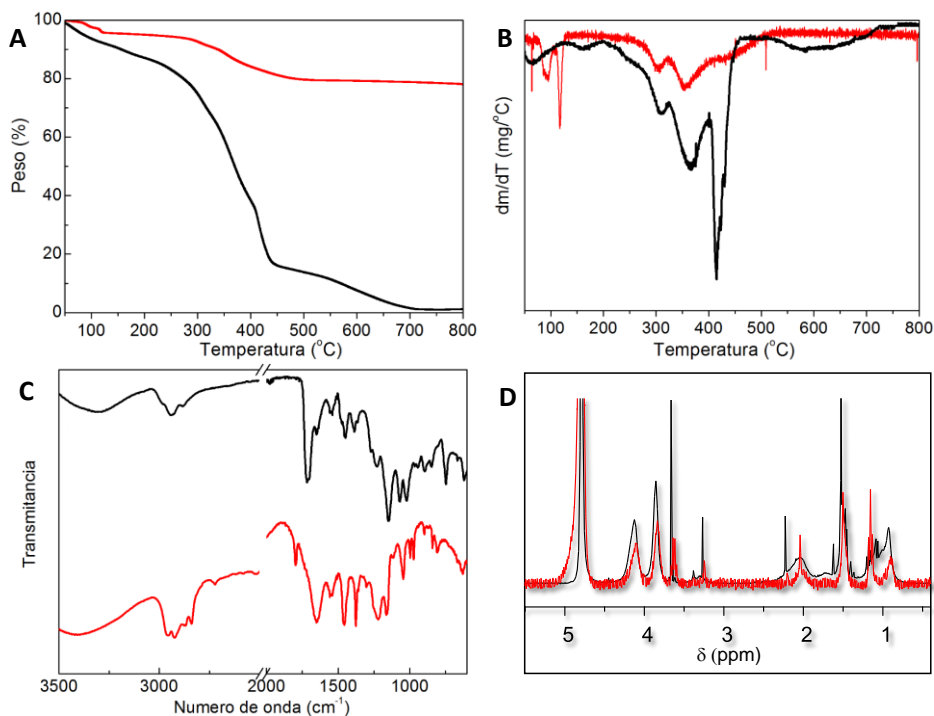


Figura 4.7 Comparación de los espectros de A) termogramas, B) derivadas de las curvas termogravimétricas, C) FTIR-ATR y D) ^1H -RMN de UCNP@COP (línea roja) y COP (línea negra).

Por otra parte, el espectro de FTIR muestra un cambio significativo en la intensidad y en la frecuencia de las bandas más características del COP, tales como la del éster, amida y sulfonato (señales en 1723 y 1396 cm^{-1}). Los cambios observados en estos espectros indican un cambio conformacional del polímero como

consecuencia de la unión a la superficie de las nanopartículas. La cantidad de COP sobre UCNP@COP se estimó en un 20% por TGA. Además, se observó que la pérdida de peso a 430 °C en UCNP@COP es mayor que en el COP (a 400 °C), sugiriendo así una mayor estabilidad del COP cuando está anclado a la superficie de las UCNP.

Por último, el análisis de los espectros de XRD del nanohíbrido confirmó que la fase cristalina hexagonal de las UCNPs no cambia al realizar el intercambio de ligando.

4.2.4 Propiedades ópticas del nanohíbrido

El espectro de emisión de los nanohíbridos UCNP@COP dispersados en agua ($\lambda_{exc}=980$ nm), figura 4.8, muestra las bandas de emisión en la zona del violeta, verde y rojo características del Er^{3+} relacionadas con las transiciones $^4H_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$, $^2H_{11/2} \rightarrow ^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ y $^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$, respectivamente.

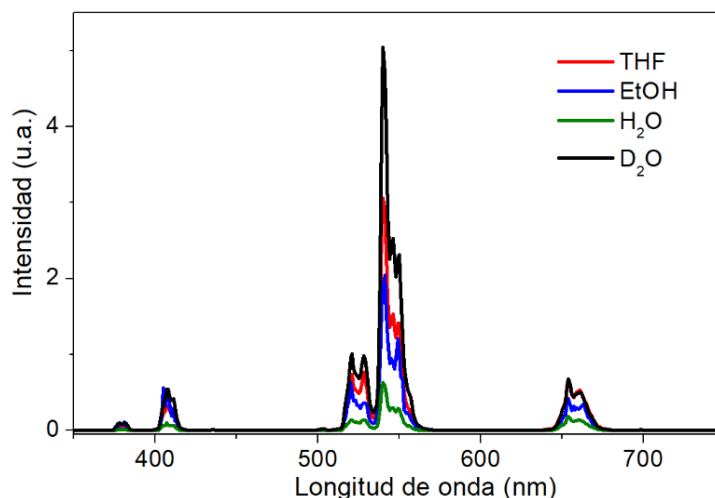


Figura 4.8 Espectro de emisión ($\lambda_{exc}= 980$ nm) de UCNP@COP registrados en diferentes disolventes y a la misma concentración de UCNP.

Sin embargo, las intensidades de emisión del nanohíbrido varían cuando éste se dispersa en otros disolventes, siendo la intensidad de emisión mayor en D₂O que en agua (figura 4.8), lo cual se atribuye a las diferencias de energía de vibración de los enlaces O-H y O-D, lo que afecta a la eficiencia de la desactivación de la luminiscencia de los lantánidos mediante procesos no radiativos.^[165]

4.2.5 Estabilidad del nanohíbrido a diferentes pHs

La estabilidad del nanohíbrido UCNP@COP se estudió en un rango de pH de 2 a 10. Las propiedades ópticas del nanohíbrido no sufren importantes cambios en esta escala de pH, tal y como se puede observar en la figura 4.9

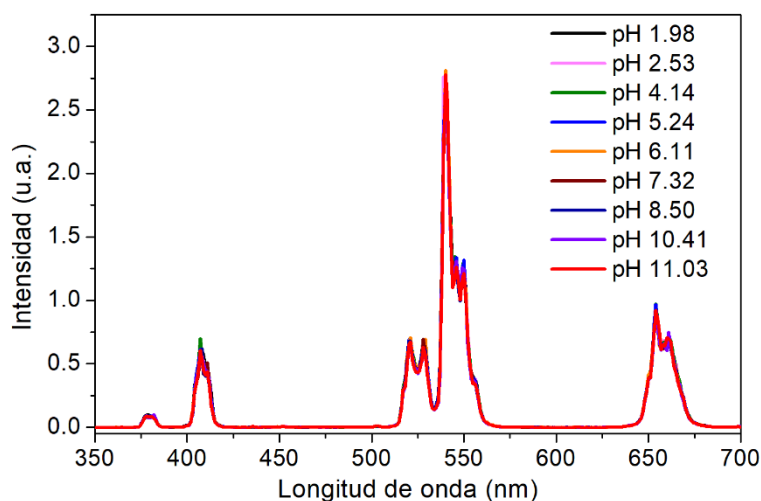


Figura 4.9. Comparación entre los espectros de emisión ($\lambda_{exc}=980$ nm) de UCNP@COP registrados en diferentes valores de pH (1 mg/mL).

Por otra parte, un análisis del potencial zeta del nanohíbrido reveló cambios significativos en el potencial con respecto al pH (de -33 mV a -22 mV al variar el pH del medio de 9 a 3), figura 4.10. Por consiguiente, no todos los grupos sulfonatos están anclados a la

superficie de la UCNP, sino que parte están en la periferia y por tanto se protonan progresivamente al disminuir el pH del medio.

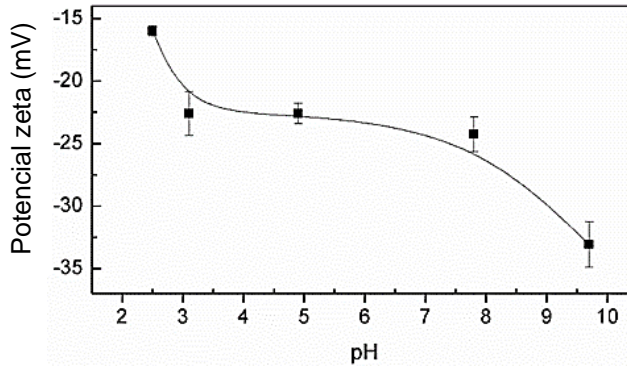


Figura 4.10. Dependencia del potencial zeta de UCNP@COP con respecto al pH del medio.

De especial interés es conocer la capacidad que tiene el COP de permanecer anclado a la superficie de las UCNPs en condiciones fuertemente ácidas. Para ello, una muestra del nanohíbrido se dispersó en agua y se acidificó con una disolución de HCl hasta llegar a pH 2. Esta dispersión se incubó por un periodo de dos horas y a continuación las UCNP se centrifugaron y se purificaron.

El espectro de FTIR de las UCNP resultantes demostró que el COP permanece anclado a las UCNPs, ya que se observan las bandas características del COP (figura 4.11). Además, el valor de potencial Z del nanohíbrido después del tratamiento ácido y suspendido en medio acuoso a pH=8 es de -34.8 mV, valor muy similar al obtenido en el estudio de potencial zeta del UCNP@COP en función del pH (ver figura 4.10).

Ambos resultados demuestran que el nanohíbrido es estable en este rango de pH ácidos, lo cual le hace un potencial candidato para aplicaciones en las que la estabilidad del recubrimiento de las UCNP es determinante.

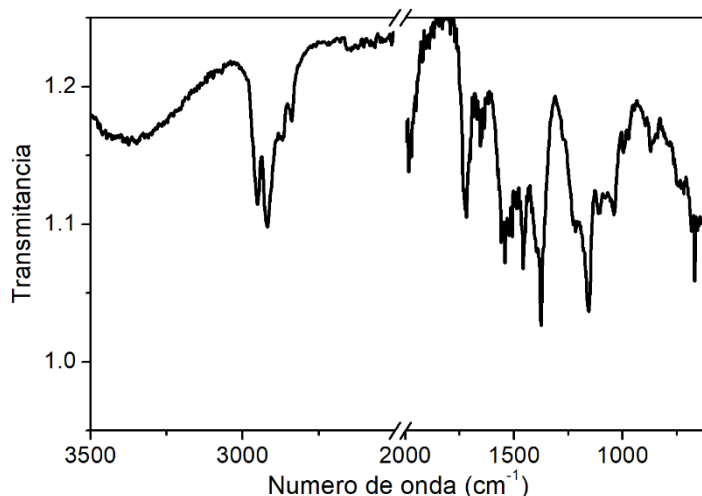


Figura 4.11. Espectro FTIR del nanohíbrido UCNP@COP después del tratamiento ácido (pH=2) y tras varios lavados.

4.2.6 Síntesis de un sensor de pH

Teniendo en cuenta la existencia de grupos sulfonato del COP en la periferia del nanohíbrido UCNP@COP, nos propusimos ensamblar un colorante básico por interacciones electrostáticas en la periferia del nanohíbrido. El objetivo era obtener un nanohíbrido capaz de liberar progresivamente el colorante al cambiar el pH, figura 4.12.

Se seleccionó como modelo la molécula de azul de metileno (MB), un catión orgánico soluble en agua, ampliamente utilizado como modelo para estudiar procesos de fotocatalisis y como fotosensibilizador^[166, 167] para la producción de oxígeno singlete.^[168]

El nanohíbrido UCNP@COP@MB se obtuvo mezclando 1.5 mg de MB por cada mg de UCNP@COP en agua. Después de 2 h de agitación de la mezcla, el nanohíbrido se separó por centrifugación y se purificó haciendo varios lavados con agua.

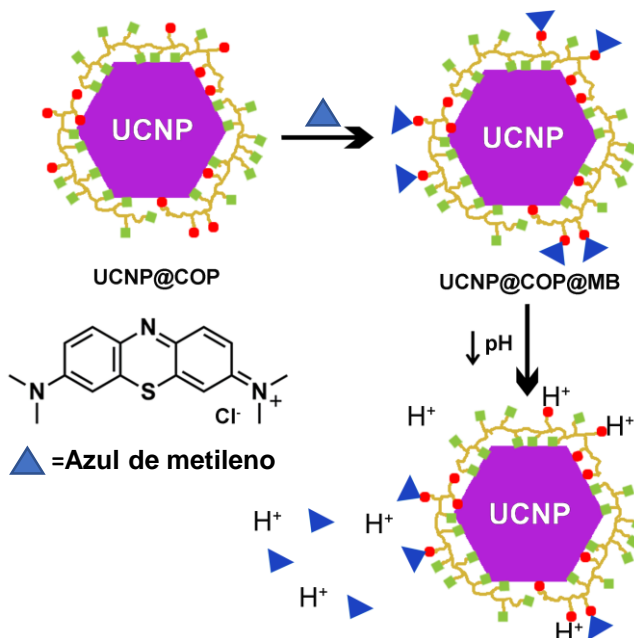


Figura 4.12. Esquema del ensamblaje de UCNP@COP con el MB para dar lugar a la formación del nanohíbrido UCNP@COP@MB, el cual libera el MB estimulado por adiciones crecientes de H⁺.

El espectro de absorción del UCNP@COP@MB presentó la banda de absorción característica del MB indicando el anclaje eficaz del catión a la superficie de las UCNP@COP. Se demostró una proporción de 1.8 nmol de MB por cada 3 mg de nanohíbrido.

La proporción de grupos sulfonato se determinó considerando que el 20 % del peso en UCNP@COP es de COP y que el 30 % del copolímero es AMPS (ver TGA en figura 4.7), obteniendo una proporción de grupos sulfonato de 9 nmol por cada 3 mg de UCNP@COP. Esto quiere decir que al menos el 20 % de los grupos sulfonato se coordinan con MB y el resto está anclado a la superficie.

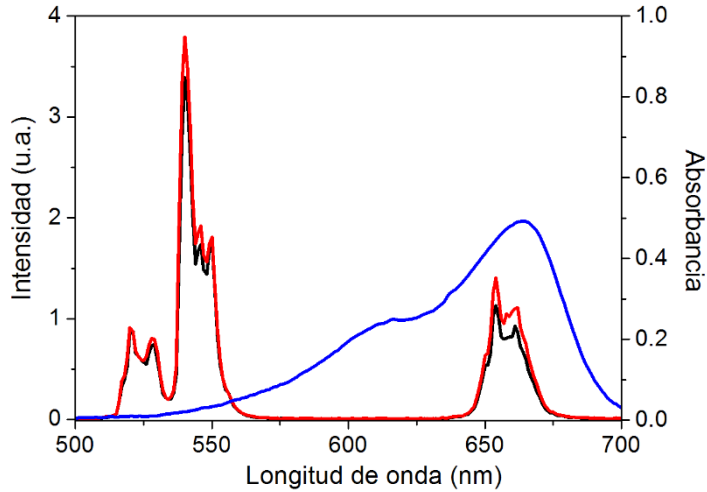


Figura 4.13. Comparación entre el espectro de absorción de MB (línea azul) y los espectros de emisión ($\lambda_{exc}= 980$ nm) de los nanohíbridos UCNP@COP (línea roja) y UCNP@COP@MB (línea negra) [1 mg/mL].

Con respecto al espectro de emisión de UCNP@COP@MB, se observó una clara disminución de la relación de áreas entre las bandas de emisión en el rojo y verde (I_{650}/I_{540} , emisión en 650 y 540 nm) en comparación con las de UCNP@COP (figura 4.13). Obsérvese que éste es el rango de emisión en el que el MB presenta su banda de absorción (máximo en 660 nm). Por tanto, la desactivación de la emisión upconversion indica un proceso de transferencia de energía de las UCNP al MB (figura 4.13).

La eficiencia (η) del proceso de transferencia se estimó en un 20 % utilizando la siguiente ecuación:

$$\eta = \frac{I_D - I_{DA}}{I_D} \quad \text{Ec.1}$$

Donde I_D e I_{DA} son las integrales de las emisiones del nanohíbrido precursor UCNP@COP y de UCNP@COP@MB, respectivamente.

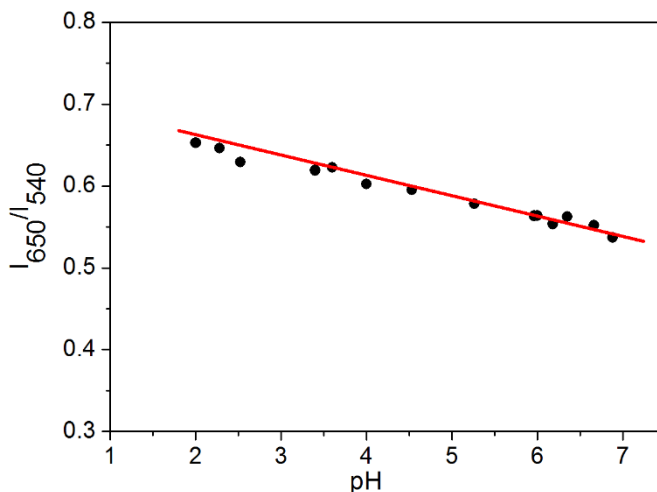


Figura 4.14. Representación de la relación de las bandas de emisión de upconversion R/G vs. pH de UCNP@COP@MB.

Finalmente, se exploró la liberación del MB del nanohíbrido al variar el pH y se realizó el análisis de la relación I_{650}/I_{540} del nanohíbrido. De esta forma, un aumento en el valor de la relación indica la disminución de la concentración de MB sobre la superficie del nanohíbrido UCNP@COP. Se observó la existencia de una correlación entre la relación de bandas R/G y el pH en un rango de pH de 2 a 7 tal y como se muestra en la figura 4.14, con una completa liberación del MB a un pH de ≈ 2 que presenta un valor similar a la relación I_{650}/I_{540} del nanohíbrido UCNP@COP (0.65).

4.3. Conclusión

En este capítulo se ha sintetizado un nanohíbrido de UCNP de NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ recubierta con el copolímero (HEMA-co-AMPS). El copolímero se ancla firmemente a la superficie de la UCNP mediante los grupos sulfonato, brindando así una elevada estabilidad del pasivado de la UCNP en condiciones fuertemente ácidas (~2).

Además, los grupos sulfonato en la periferia del nanohíbrido permitieron el anclaje de un catión orgánico, específicamente azul de metileno, para formar un nanohíbrido capaz de liberar progresivamente el catión con la disminución del pH del medio. El nanohíbrido actúa como un nano-sistema de liberación de azul de metileno en un amplio intervalo de pH, proceso que fue seguido determinando la relación entre las bandas de emisión del nanohíbrido.

4.4. Metodología experimental

4.4.1 Materiales

Para la síntesis de UCNPs se usaron los cloruros de los lantánidos hexahidratados ($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{TmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{NdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) con purezas superiores 99.9%, 1-octadeceno (95%), ácido oleico (70%), NaOH y NH_4F (99.99%). Para la síntesis del copolímero se utilizó los monómeros 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA), ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico (AMPS), α, α' -azoisobutironitrilo (AIBN) y Na_2CO_3 . Los disolventes utilizados han sido cloroformo (Fischer), etanol, diclorometano, acetonitrilo y éter dietílico (Scharlau), tetrahidrofurano y n-propanol (Sigma-Aldrich)

4.4.2 Síntesis del copolímero (COP)

La síntesis del copolímero se llevó a cabo mezclando los monómeros (HEMA, 14 mL, 0,1154 moles) y AMPS (6 g; 0,0289 moles) en balón de dos bocas de 250 mL. Luego se adicionó AIBN (600 mg; 3,65 mmoles) como iniciador de la reacción, seguido de 150 mL de mezcla agua milliQ/n-propanol (1:1) previamente desoxigenada.

La mezcla de reacción se mantiene en agitación magnética y corriente de nitrógeno continua por 30 min y luego se calienta a 65°C por un periodo de 24 horas. Pasado este tiempo la reacción se enfría en baño agua-hielo y los disolventes orgánicos se evaporan en un rotavapor hasta obtener una solución viscosa. Luego, se adicionan una fracción de volumen similar de cloroformo y se agita vigorosamente durante 5 horas. Posteriormente, se separa la emulsión de la fracción con cloroformo y se centrifuga (10.000 rpm durante 10 min) obteniéndose tres fracciones distintas; la fracción intermedia es la que corresponde al copolímero y fue secada al vacío para eliminar los disolventes.

4.4.3 Síntesis de las UCNP@oleato

La síntesis de las UCNPs se realizó por el método de descomposición térmica con algunas modificaciones.^[67] En un matraz de tres bocas de 50 mL se adicionan $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,8 mmol), $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,18 mmol) y $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,02 mmol) y se mezclan con 12 mL de ácido oleico y 15 mL de 1-octadeceno. La mezcla de reacción se calienta a 160 °C bajo corriente continua de nitrógeno y agitación, la temperatura de reacción se mantiene hasta solubilizar totalmente las sales. A continuación, la reacción se deja enfriar hasta aproximadamente los 110 °C y se adiciona una mezcla de NaOH (2,5 mmoles) y NH_4F (4,0 mmoles) disueltos en 10 mL de metanol y la temperatura se mantiene hasta eliminar todo el metanol. Finalmente, la reacción se calienta hasta 305 °C bajo flujo de nitrógeno durante una hora. Las nanopartículas se precipitan por centrifugación (10.000 rpm durante 10 min) y se purifican lavando el precipitado tres veces con una mezcla hexano:acetona:metanol (2,7:2,5:1v/v).

4.4.4 Síntesis del nanohíbrido UCNP@COP

50 mg del copolímero (COP) se dispersan en 100 mL de una mezcla de diclorometano:tetrahidrofurano (1:1) y se mantiene en agitación continua durante 48 horas. Una vez se dispersa el copolímero, se adiciona 1 g de Na_2CO_3 y se agita vigorosamente durante 2 horas. Seguidamente, la disolución se decanta para eliminar el Na_2CO_3 . Este sólido se lava con 10 mL de tetrahidrofurano que se une con la disolución madre y esta disolución se concentra en un rotavapor. Finalmente, se adicionan 10 mg de UCNP sobre la disolución resultante donde se encuentran dispersos los 50 mg del copolímero. Dicha dispersión se mantiene en agitación magnética durante 24 horas y el producto resultante se centrifuga y se lava con alícuotas de tetrahidrofurano hasta eliminar todo el copolímero en exceso.

4.4.5 Estudio de estabilidad de UCNP@COP en medio ácido

5 mg de UCNP@COP se dispersan en 5 mL de agua por ultrasonificación y seguidamente se añaden pequeñas cantidades de disoluciones de HCl hasta que la dispersión alcanza un pH de 2. En este punto la dispersión se mantiene en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la dispersión se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descarta y el sólido resultante se lava 3 veces utilizando alícuotas de 10 mL de H₂O c/u; después de cada lavado se aplica el proceso de centrifugación. Finalmente, las UCNPs resultantes se secan al vacío hasta eliminar la humedad y se analizan por FTIR.

Contribución del autor:

Recalde, I.; **Estebanez, N.**; Francés-Soriano, L.; Liras, M.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J., Upconversion nanoparticles with a strong acid-resistant capping. *Nanoscale* **2016**, 8 (14), 7588-7594.

Índice de Impacto (JCR): 7.367

Capítulo 5. Patente: Materiales cerámicos luminiscentes de upconversion

Como se ha mencionado a lo largo del capítulo anterior, el uso de UCNPs pasivadas con ligandos orgánicos presenta generalmente baja estabilidad a pHs ácidos lo cual limita su uso en numerosas aplicaciones que requieren la utilización de condiciones ácidas, como por ejemplo la síntesis de materiales compuestos cerámicos con emisión upconversion.

Considerando la relevancia de los resultados obtenidos en cuanto a la estabilidad de los nanohíbridos de UCNP en condiciones ácidas, y debido a la necesidad comercial de contar con materiales cerámicos obtenidos por medio de un proceso sol-gel, que incluye una etapa de acidificación en condiciones drásticas, en colaboración con la empresa CIEMMAT desarrollamos un método sintético para la obtención de materiales cerámicos con elevada luminiscencia upconversion utilizando UCNPs.

Teniendo en cuenta el éxito de los resultados obtenidos de esta colaboración, se patentó el proceso de preparación de compuestos cerámicos con UCNP, patente WO 2018/002405A1. Esta invención comprende la utilización de UCNPs (de diferente composición) recubiertas con un ligando orgánico anclado a la superficie de la nanopartícula mediante un enlace estable covalente.

Las UCNPs se preparan en las siguientes etapas: i) adición de las UCNPs desnudas a un disolvente polar, las cuales presentan grupos -O, -OH, -HOH o combinaciones de estos en su superficie, ii) adición de una base en exceso de tipo MOH, donde M es un metal alcalino como por ejemplo Na, K o Li. iii) eliminación del exceso del base seguido de la adición de un compuesto orgánico de fórmula X-CH₂CO-Z, donde X es un Halógeno y Z es -H, -R, -COR, -OH, -OCOR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NHCOR, -SR o -SCOR, y R es una cadena alquílica lineal o ramificada.

De esta forma se obtienen las UCNPs con el recubrimiento orgánico, denominadas UCNP@ligando, con el ligando orgánico anclado a la superficie mediante enlaces covalentes. El compuesto de fórmula $X-CH_2CO-Z$, que comprende un halógeno directamente enlazado al carbono en alfa al grupo carbonilo (CO) y el cual se encuentra a una distancia exacta de dos carbonos (CH_2CO) de Z, reacciona con los grupos reactivos de la superficie de las UCNP desnudas ($-O^-$, $-OH$ o $-HOH$) formándose un enlace químico fuerte (enlace covalente) entre los mismos, demostrado mediante un análisis por espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS). Esto permite que el ligando se mantenga fuertemente unido a la superficie de las nanopartículas en medios extremadamente ácidos

Las UCNP@ligando obtenidas se utilizan posteriormente para preparar un compuesto luminiscente, mediante un proceso de encapsulación en una matriz cerámica.

El compuesto cerámico de esta invención se obtiene mediante un proceso de síntesis sol-gel, una ruta de síntesis química que comprende la síntesis de una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido (denominada sol) y la hidrólisis y condensación de dicho sol dando lugar a la formación de un gel.

El proceso de síntesis sol-gel comprende las siguientes etapas: i) dispersión de las UCNP@ligando en un disolvente polar (alrededor de 4 % en peso) que comprende un precursor de alcóxido metálico (M-OR, ej. tetraetilortosilicato TEOS, metiltriatoxisilano MTES, metiltrimetoxisilano), un agente dispersante (poliacrilatos) y un agente tensioactivo (polidimetilsiloxano); ii) adición de agua a la dispersión de la etapa (i) para dar lugar a una reacción de hidrólisis y formación de un sol; iii) condensación del sol de la etapa (ii) dando lugar a la formación de un gel que encapsula las UCNP@ligando; iv) envejecimiento y

secado del gel obtenido en la etapa (iii) para dar lugar a un material compuesto luminiscente cerámico; y finalmente v) densificación del material compuesto resultante de la etapa (iv) mediante tratamiento térmico.

Dependiendo de las características deseadas del material compuesto final, el proceso de síntesis sol-gel se realiza mediante vía ácida. La naturaleza del alcóxido determinará el rango de pH en el que tendrá lugar la condensación sol y formación gel (etapa ii y iii).

Las características más importantes de esta invención son la obtención de UCNPs resistentes en medios acuosos y ácidos, y la obtención de un material compuesto luminiscente (UCNP + matriz cerámica) con una capacidad emisiva de más de 100 veces superior con respecto a la emisión de las UCNPs de partida.

Finalmente, la combinación de ambos materiales, matriz y nanopartículas, potencia las propiedades luminiscentes de upconversion y la estabilidad de las nanopartículas, además de proporcionar un material compuesto con altas prestaciones luminiscentes de upconversion.

Contribución del autor:

Inventores: PÉREZ PRIETO, Julia; Avda. Blasco Ibáñez,13, E-46010 Valencia (ES). GONZÁLEZ BÉJAR, María; Avda. Blasco Ibáñez, 13, E-46010 Valencia (ES). **ESTÉBANEZ BLOEM, Néstor Luis**; Avda. Blasco Ibáñez, 13, E-46010 Valencia (ES). FERNÁNDEZ LOZANO, José Francisco; Instituto de Cerámica y Vidrio, ICV-CSIC, Kelsen, 5, E-28049 Madrid (ES). ENRÍQUEZ PÉREZ, Esther; Instituto de Cerámica y Vidrio, ICVCSIC, Kelsen, 5, E-28049 Madrid (ES). LÓPEZ BUENDÍA, Ángel Miguel; Pare Cientific, Catedrático Agustin Escardino, 9, E-46980 Paterna, Valencia (ES).

Title: LUMINESCENT UPCONVERSION MATERIALS AND METHOD FOR PREPARING SAME. **WO 2018/002405 A1**

Capítulo 6. Polisulfonatos como ligandos de UCNPs para evitar su desintegración y estabilizarlas en medios fuertemente ácidos.

6.1. Introducción

Como se ha descrito en los capítulos anteriores, las propiedades fotofísicas de las UCNPs las han convertido en un material nanométrico objeto de estudio en diversas áreas de investigación, siendo de especial interés su aplicación en el campo de la biología. [24, 134]

Estudios recientes han demostrado la desintegración de las α - y β -NaYF₄:Ln UCNPs en medios acuosos,^[169] sobre todo aquellas suspensiones donde la concentración de las UCNP es menor a 100 $\mu\text{g/mL}$.^[170, 171] Esta degradación trae como consecuencia la pérdida de la luminiscencia de las UCNPs, lo cual se asocia directamente a la pérdida de los lantánidos activos de la matriz de la nanopartícula. Este comportamiento de las nanopartículas en disolución constituye una limitación para su uso en aplicaciones donde las concentraciones de UCNP utilizadas serán en el rango de $\mu\text{g/mL}$ a ng/mL o incluso pg/mL .^[172]

Además de la concentración de las nanopartículas en disolución, otros factores juegan un papel importante en la desintegración de las UCNPs en medios acuosos tales como el pH o la naturaleza del recubrimiento de las nanopartículas.^[83, 173] Recientemente, Suokka, T. y colaboradores publicaron una propuesta novedosa para evitar la desintegración de las UCNPs, la cual consiste en recubrir su superficie con ácido poli-acrílico y estabilizarlas en medio acuoso por medio de la adicción de iones fluoruro.^[170] Lamentablemente, esta estrategia necesita una alta concentración de fluoruro, lo que se desaconseja su uso en tejidos y células vivas debido a su elevada citotoxicidad. ^[174-176]

Además, se ha demostrado que nanohíbridos de UCNPs recubiertos con compuestos con grupo fosfato o citratos resultan en una desintegración drástica de la nanopartícula, mientras que la

utilización de un recubrimiento con un anclaje multidentado mediante grupos fosfatos, como el del ácido etilendiamino tetra(metilenfosfónico) [EDTMP], disminuye la desintegración de los nanohíbridos en medios acuosos.^[177] Estos resultados indican la fuerte coordinación entre EDTMP y la superficie de las UCNP debido a la fuerte interacción entre los fosfatos con los cationes presentes en la superficie de la UCNP, combinado con el efecto del multianclaje, permitiendo la protección de los nanohíbridos de su desintegración en medios acuosos.

Esto demuestra que un recubrimiento orgánico no solo debe proporcionar dispersabilidad y compatibilidad con diferentes tipos de moléculas en medios acuosos, sino que además debe de proteger a la nanopartícula de la desintegración en dicho medio. Por estas razones y considerando los resultados de nuestros estudios con UCNPs recubiertas con polímeros (capítulo 4), en este trabajo nos planteamos como objetivo la síntesis de nanohíbridos de UCNP recubiertos con polímeros capaces de proteger la integridad de las nanopartículas. Para ello, nos propusimos recubrir las UCNPs con polímeros de diferente funcionalidad tales como: poli(ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico) (PAMPS), poliestireno sulfonato (PSS), polietilenglicol fosfato (PEGP) y 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-decanol (PFD) y así como estudiar su estabilidad química y foto-estabilidad en medio acuoso.

En este estudio demostraremos no sólo que los recubrimientos con grupos sulfonato protegen las nanopartículas de la desintegración cuando se utilizan bajas concentraciones en medios acuosos, sino que además les dota de una estabilidad poco frecuente en condiciones fuertemente ácidas.

6.2. Resultados y discusión

6.2.1 Síntesis de UCNPs recubiertas con oleato

Para el desarrollo de este estudio se sintetizaron dos tipos de UCNPs recubiertas con oleato UCNP@oleato: NaYF₄:Yb,Er y NaYF₄:Yb,Tm, utilizando el método de descomposición térmica con pequeñas modificaciones (ver sección experimental).^[86] Este método utiliza los cloruros del lantánido correspondiente, LnCl₃.6H₂O, con ácido oleico como agente dispersante y 1-octadeceno como disolvente. La caracterización de las UCNP_{Ln}@oleato obtenidas se realizó por las técnicas de TEM, XRD, e ICP-masas, las cuales confirmaron la homogeneidad en el tamaño de las nanopartículas (ver figura 6.1), la fase cristalina hexagonal y la composición de las UCNPs.

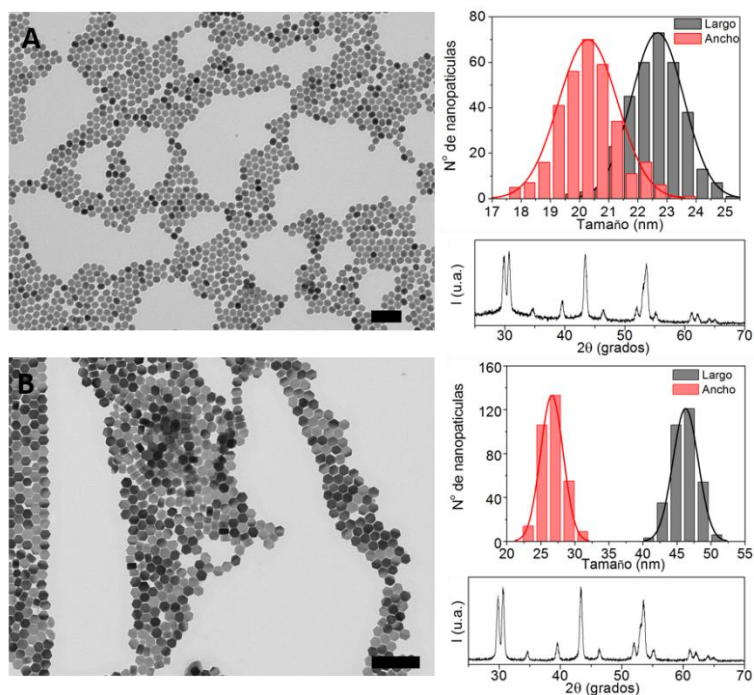


Figura 6.1. Imágenes de TEM con su respectivo histograma y XRD. A) UCNP_{Tm}@oleato B) UCNP_{Er}@oleato. Escala de barra 100 nm

6.2.2 Síntesis y caracterización de UCNPs recubiertas con los distintos polímeros

Una vez sintetizadas las $UCNP_{Ln}@oleato$, se llevó a cabo la funcionalización con los distintos polímeros siguiendo distintas metodologías, ver detalles en la figura 6.2. En primer lugar, se eliminó el oleato de la superficie de las $UCNP@oleato$ empleando dos estrategias distintas, La primera estrategia consistió en dispersar las $UCNP_{Ln}@oleato$ en disolución acuosa a pH 3 tras la adición de HCl, manteniéndolas en agitación por un periodo de 3 horas, obteniendo así nanopartículas libres de oleato, denominadas $UCNP_{Ln}$ -desnudas.^[83] (Ver parte experimental)

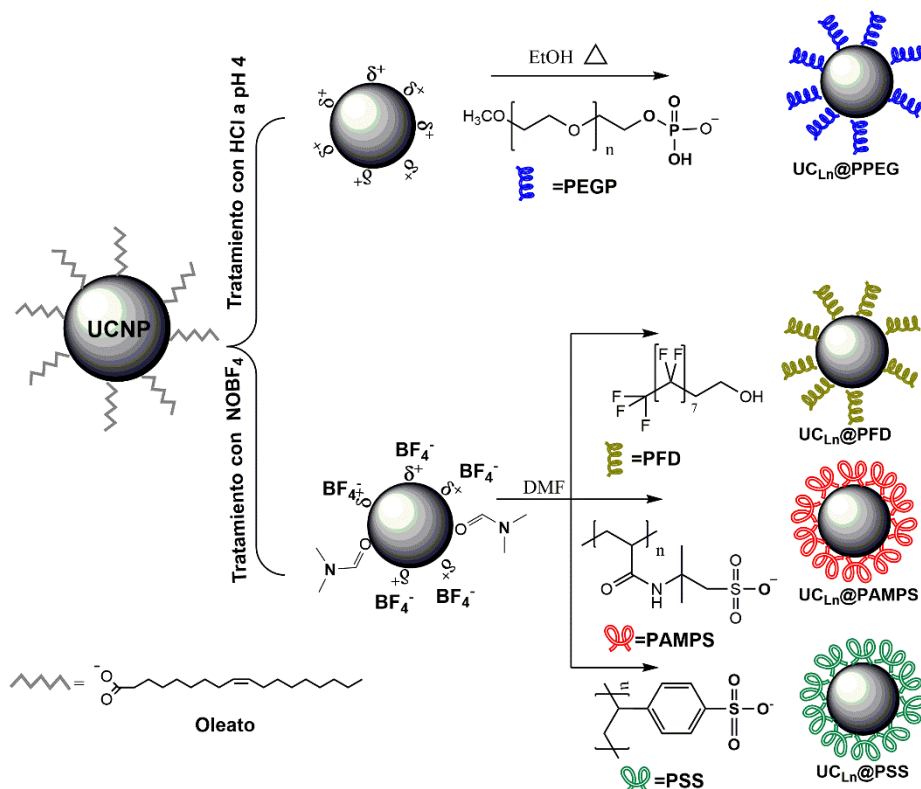


Figura 6.2. Representación de los diferentes procedimientos utilizados para funcionalizar las UCNP con los polímeros seleccionados (PEGP, PFD, PAMPS y PSS)

La segunda estrategia consistió en un proceso de intercambio de ligando utilizando tetrafluoroborato de nitrosonio (NOBF_4), obteniendo así nanopartículas libres de oleato y estabilizadas con BF_4^- , denominadas $\text{UCNP}_{\text{Ln}}@ \text{BF}_4$.^[84]

Posteriormente, las nanopartículas libres de ligando, ya sea UCNP_{Ln} -desnudas o $\text{UCNP}_{\text{Ln}}@ \text{BF}_4$, se hicieron reaccionar con los polímeros PSS, PAMPS, PEGP y PFD. Las estructuras de los polímeros, así como los detalles del procedimiento de funcionalización se resumen en la figura 6.2 y en el procedimiento experimental. La funcionalización de las UCNP_{Ln} con los polímeros se corroboró por medio de HRTEM, FTIR y TGA.

Las imágenes de HRTEM mostraron el recubrimiento de las UCNPs con una fina capa orgánica alrededor de la superficie de las nanopartículas, figura 6.3. El grosor estimado del recubrimiento de los nanohíbridos fue de $2,5 \pm 0,1 \text{ nm}$ ($\text{UC}_{\text{Tm}}@ \text{PAMPS}$), $1,6 \pm 0,3$ ($\text{UC}_{\text{Tm}}@ \text{PSS}$), $2,2 \pm 0,3 \text{ nm}$ ($\text{UC}_{\text{Tm}}@ \text{PEGP}$) y $0,7 \pm 0,3$ ($\text{UC}_{\text{Tm}}@ \text{PFD}$). Se obtuvieron resultados similares en las imágenes de HRTEM de los nanohíbridos de Er, figura 6.4.

Igualmente, los espectros de FTIR muestran claramente las señales características de los polímeros que recubren la superficie de las nanopartículas, figura 6.5. Por ejemplo, la vibración C-H en 2880 cm^{-1} de los polímeros, la vibración de flexión del C-O en 1110 cm^{-1} asociado a las cadenas de PEG, la señal en 1240 cm^{-1} característico de P=O en el PEGP, las dos señales en 1220 y 1045 cm^{-1} correspondiente al estiramiento asimétrico y simétrico, respectivamente, del grupo S=O de los polímeros AMPS y PSS y, las múltiples bandas en la zona 1350 - 1100 cm^{-1} asociadas a los estiramientos de la cadena del perfluoroalquil en el ligando PFD (ver figura 6.5).

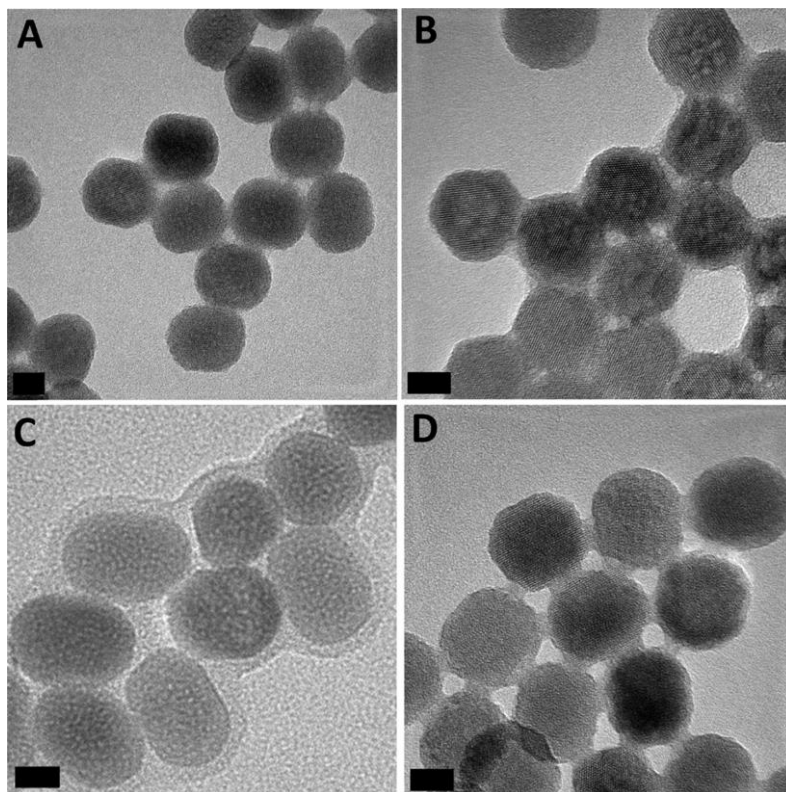


Figura 6.3. Imágenes de HRTEM de los nanohíbridos de Tm: A) UC_{Tm}@PAMPS, B) UC_{Tm}@PSS, C) UC_{Tm}@PEGP y D) UC_{Tm}@PFD. Escala de barra 10 nm.

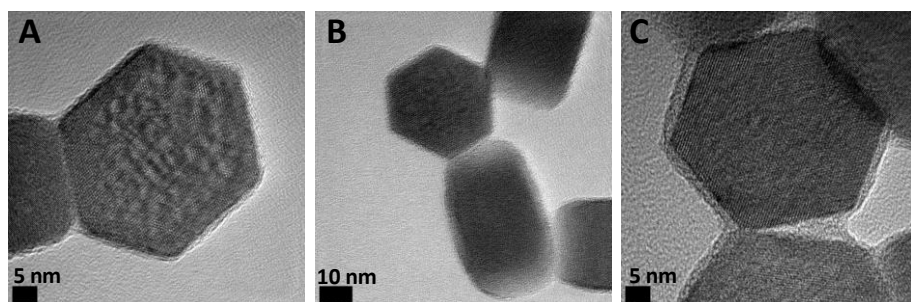


Figura 6.4. Imágenes de HRTEM de los nanohíbridos de Er: A) UC_{Er}@PSS, B) UC_{Er}@PAMPS y C) UC_{Er}@PEGP.

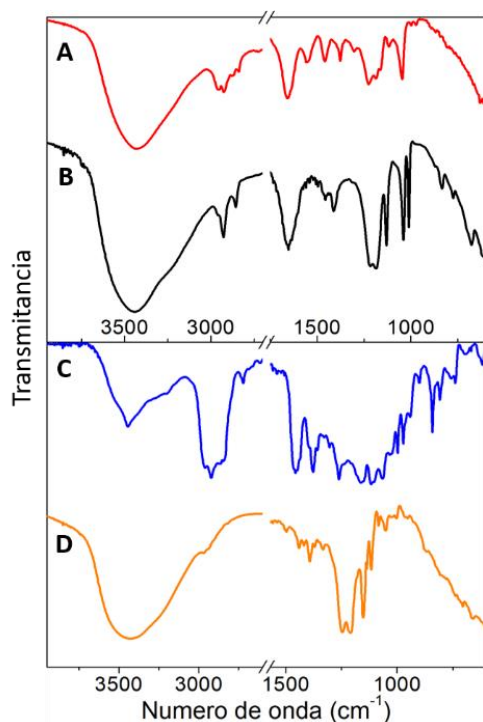


Figura 6.5. Espectros de FTIR de los nanohíbridos de Tm: A) UC_{Tm}@PAMPS, B) UC_{Tm}@PSS, C) UC_{Tm}@PEGP y D) UC_{Tm}@PFD.

En conjunto, estos resultados demuestran la funcionalización exitosa con los polímeros en la superficie de las UCNPs obteniendo así diferentes nanohíbridos.

Las propiedades ópticas de los nanohíbridos en disolución se estudiaron midiendo los espectros de emisión excitando a 980 nm. Los espectros de los nanohíbridos de Tm³⁺ muestran cuatro bandas por debajo 500 nm [¹I₆ → ³F₄ (en 345 nm), ¹D₂ → ³H₆ (en 368 nm), ¹D₂ → ³F₄ (en 450 nm), y ¹G₄ → ³H₆ (en 475 nm)] y otras dos bandas en 650 y 800 nm (ver figura 6.6).

Por otra parte, en los espectros de emisión de los nanohíbridos de Er^{3+} se observaron las tres señales características en 525 nm (${}^2\text{H}_{11/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$) and 545 nm (${}^4\text{S}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$) y 660 nm (${}^4\text{F}_{9/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$).

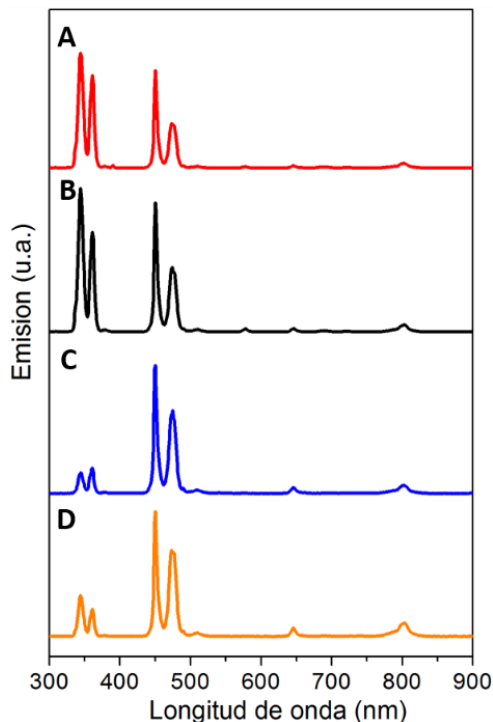


Figura 6.6. Espectros de emisión ($\lambda_{\text{exc}}=980$ nm) de los nanohíbridos de Tm: A) $\text{UC}_{\text{Tm}}@$ PAMPS, B) $\text{UC}_{\text{Tm}}@$ PSS, C) $\text{UC}_{\text{Tm}}@$ PEGP y D) $\text{UC}_{\text{Tm}}@$ PFD.

6.2.3 Estabilidad de los nanohíbridos en condiciones fuertemente ácidas

Como se describió inicialmente, el objetivo de este trabajo era evaluar la eficiencia de los diferentes recubrimientos poliméricos para proteger las UCNP_s de su desintegración en medios acuosos.

Con este estudio buscamos determinar si los polímeros que recubren las UCNP_{Ln} son capaces de permanecer inalterables en la superficie de la nanopartícula en condiciones fuertemente ácidas y

además, si son capaces de proteger las nanopartículas de su desintegración en medios acuosos a concentraciones muy bajas, permitiendo de esta forma su uso en medios biológicos, así como en aplicaciones donde se utilizan condiciones muy ácidas.

Experimentalmente, la estabilidad en medio ácido se llevó a cabo preparando dispersiones en agua de los nanohíbridos $UCNP_{L_n}@AMPS$, $UCNP_{L_n}@PSS$, $UCNP_{L_n}@PEGP$ y $UCNP_{L_n}@PFD$ a $pH= 2$ adicionando concentraciones crecientes de HCl. Las suspensiones de los nanohíbridos se mantuvieron en agitación durante 12 horas y, finalmente, se centrifugaron y lavaron con alícuotas de agua milliQ. Los productos resultantes fueron analizados por FTIR.

En la figura 6.7 se muestra la comparación de los espectros de infrarrojo de los nanohíbridos antes y después del tratamiento ácido. En los espectros se observa claramente que los nanohíbridos recubiertos con los polímeros que utilizan grupos sulfonatos como grupo anclante (PSS y AMPS) permanecen unidos a la nanopartícula después del tratamiento ácido, mientras que el recubrimiento con PEGP y PFD se eliminó totalmente de las nanopartículas.

Este resultado se confirmó también mediante los valores de potencial zeta de los distintos nanohíbridos (ver tabla 6.1), los cuales muestran que los valores de los nanohíbridos recubiertos con los polímeros con grupos sulfonato no se modifican después del tratamiento ácido. A diferencia de éstos, los valores de potencial zeta de los nanohíbridos recubiertos con los polímeros PEGP y PFD varían después del tratamiento, lo cual sugiere una modificación en la superficie de los nanomateriales. Además, los valores obtenidos son similares a los de las $UCNP$ -desnudas obtenidas por tratamiento ácido o por tratamiento con $NOBF_4$ (19 mV, aproximadamente en ambos casos). Estos datos demuestran que el recubrimiento con PEGP y PFD

ha sido eliminado de la superficie de las UCNP como consecuencia del debilitamiento de la coordinación del polímero inducida por el ácido.^{[178,}

179]

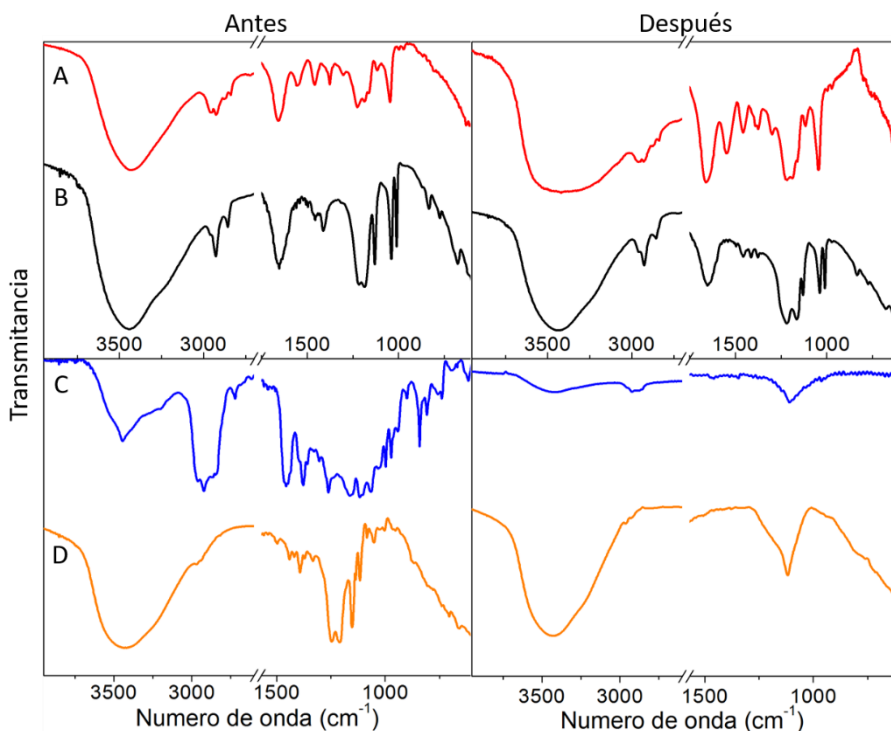


Figura 6.7. Espectros de infrarrojo de los nanohíbridos; (A) UCNPT_m@AMPS, (B)UCNP_{Tm}@PSS, (C)UCNP_{Tm}@PEGP,(D) UCNPT_m@PFD. antes (izquierda) y después (derecha) del tratamiento ácido.

Tabla 6.1. Valores de potencial zeta de UCNPL_n recubiertas con los distintos polímeros.

Muestra	Potencial zeta / mV	
	Antes de tratamiento	Después de tratamiento ^a
UC _{Er} @PAMPS	-26.9±1.2	-25.9±1.4
UC _{Tm} @PSS	-31.2±1.3	-32.0±1.4
UC _{Tm} @PEGP	-2.6±0.3	14.8±0.5
UC _{Tm} @PFD	11.5±0.6	18.6±0.5

^amuestras dispersadas en H₂O después de tratamiento ácido

La permanencia del recubriendo orgánico sobre la superficie se puede visualizar en las imágenes de HRTEM de la figura 6.8 para los nanohíbridos de Er. Obsérvese que la capa de los polímeros AMPS y PSS permanecen inalteradas después del tratamiento ácido. Por el contrario, en los nanohíbridos recubiertos con PEGP y PFD desaparece la capa orgánica del nanohíbrido y se observan las UCNPs desnudas.

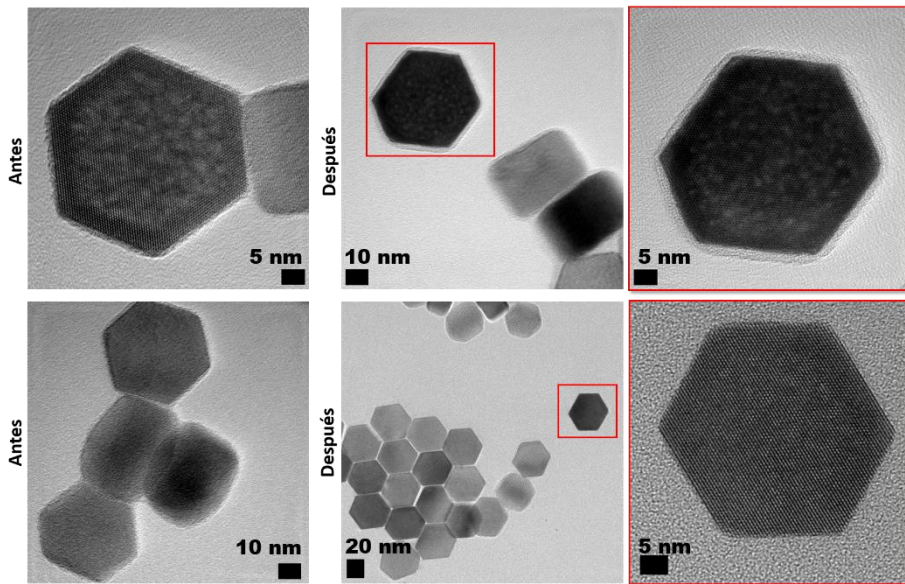


Figura 6.8. Imágenes de HRTEM de los nanohíbridos $UCNP_{Er}@PSS$ (arriba) y $UCNP_{Er}@PEGP$ (abajo), antes (izquierda) y después (centro) del tratamiento ácido. A la derecha de la figura se muestra la imagen ampliada de la nanopartícula señalada en el recuadro rojo dentro de la imagen central.

En resumen, utilizando tres técnicas distintas se demostró la pérdida de los recubrimientos de los polímeros en los nanohíbridos $UCNP_{Ln}@PEGP$ y $UCNP_{Ln}@PFD$ bajo condiciones de elevada acidez. Por el contrario, los polímeros AMPS y PSS permanecen anclados a la superficie de las nanopartículas.

Esta diferencia en la estabilidad se debe a que los polímeros AMPS y PSS utilizan como grupo de anclaje los grupos sulfonato de su estructura, los cuales presentan un menor pK_a en comparación con los grupos anclantes de los otros dos polímeros. Además, el efecto multi-anclante de los polímeros AMPS y PSS otorga una ventaja adicional, aumentando la estabilidad de los nanohíbridos.

6.2.4 Estabilidad de los nanohíbridos a baja concentración en medio acuoso

Teniendo en cuenta que los nanohíbridos $UCNP_{Ln}@AMPS$ y $UCNP_{Ln}@PSS$ presentan una elevada estabilidad en condiciones ácidas, nos planteamos si el recubrimiento con estos dos polímeros también otorgaría cierto grado de protección a las nanopartículas ante la posible desintegración en medios acuosos y en condiciones de baja concentración.

Como se describió anteriormente, la desintegración de las UCNPs en medios acuosos se hace más patente en concentraciones de nanopartículas menores a $100 \mu\text{g}/\text{mL}$.^[170]

Por ello, se prepararon dispersiones de $UCNP_{Er}@PSS$, $UCNP_{Er}@AMPS$ en agua Milli-Q a una concentración de $10 \mu\text{g}/\text{mL}$. Como muestra control se preparó una dispersión de UCNPs sin ningún tipo de recubrimiento ($UCNP_{Er}$ -desnuda) a la misma concentración.

Mediante ICP-masas se analizaron alícuotas idénticas de cada una de las suspensiones a las 24, 48, 72 y 96 horas de preparación, tal y como se describe en la figura 6.9. Esto nos permitió registrar el grado de desintegración de las nanopartículas en función del tiempo. En cada una de las alícuotas analizadas se determinó la concentración total de lantánidos disueltos y se comparó con la cantidad de lantánido de la dispersión de partida.

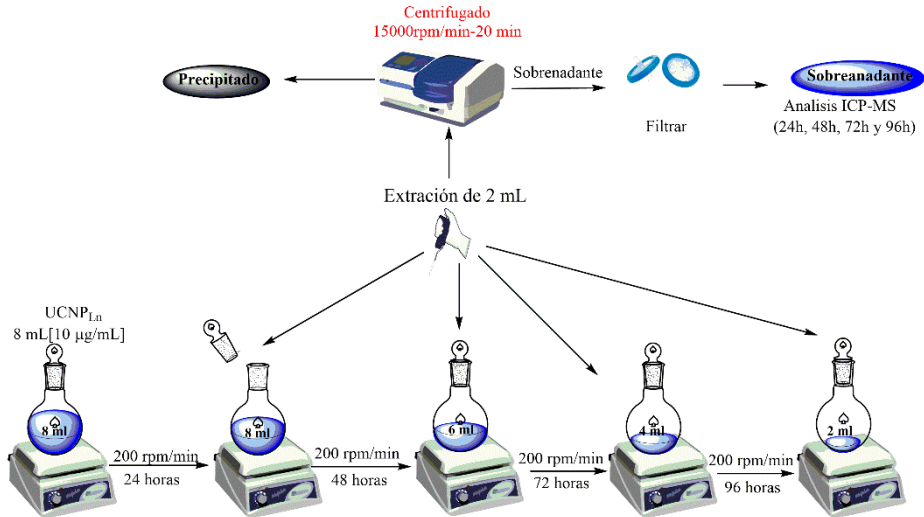


Figura 6.9. Esquema del procedimiento seguido para determinar la estabilidad de las UCNP en agua en dispersiones diluidas

En la tabla 6.2 se resumen los resultados obtenidos. Se observó que la concentración de lantánido total en las $UCNP_{Er}$ -desnuda es 100 veces mayor que la del nanohíbrido $UCNP_{Er}@PSS$ y más de 3 veces la de $UCNP_{Er}@PAMPS$, lo cual demuestra claramente que los polímeros AMPS y PSS protegen eficientemente a las nanopartículas de la desintegración en medio acuoso, siendo el polímero PSS el recubrimiento más eficaz para proteger a las nanopartículas.

Esta diferencia en la capacidad de protección de los dos polímeros se atribuyó a la hidrofobia de parte de la estructura del PSS, así como a la mayor concentración de grupos sulfonato de éste, los cuales se enlazan más fuertemente a la superficie en comparación con los posibles enlaces amida del PAMPS.

Tabla 6.2. Resultados del estudio de degradación de $UCNP_{Er}$ con ligandos sulfonados siguiendo el protocolo de la figura 6.9

Muestra	Tiempo (h)	Sobrenadante (μM)			
		Ln^{3+} Total	Er^{3+}	Y^{3+}	Yb^{3+}
$UCNP_{Er}$	24	4.63	0.0930	3.77	0.780
	48	6.44	0.120	5.29	1.03
	72	2.70	0.0536	2.19	0.458
	96	0.200	$4.65E^{-3}$	0.123	0.0712
$UCNP_{Er}@PSS$	24	0.0422	$1.13 E^{-3}$	0.0327	$8.32 E^{-3}$
	48	0.376	$6.16 E^{-3}$	0.307	0.0625
	72	0.280	$4.64 E^{-3}$	0.239	0.0363
	96	0.352	$3.82 E^{-3}$	0.317	0.0319
$UCNP_{Er}@PAMPS$	24	1.39	0.0275	1.12	0.244
	48	1.69	0.0340	1.32	0.331
	72	1.56	0.0307	1.26	0.269
	96	0.214	$4.61 E^{-3}$	0.151	0.0588

La evolución del nanohíbrido $UCNP_{Er}@PSS$ se siguió además por TEM durante 96 horas utilizando como muestra control la $UCNP_{Er}$ -desnuda, figura 6.10. Los resultados de este ensayo muestran claramente la drástica desintegración de las $UCNP_{Er}$ -desnudas, mientras que el nanohíbrido recubierto con el polímero PSS muestra una mayor estabilidad. Estos hechos demuestran una vez más la eficiencia del recubrimiento con el PSS para la protección de las nanopartículas de la desintegración causada por la progresiva disolución de los lantánidos en medios acuosos.

Finalmente, se estudió el efecto de la desintegración de las nanopartículas sobre sus propiedades ópticas. Para ello, se midieron los espectros de emisión de las dispersiones de los nanohíbridos más estables $UCNP_{Er}@PSS$ y $UCNP_{Tm}@PSS$ a una concentración de 5 $\mu g/mL$ y se compararon con los de una dispersión control de $UCNP_{Er}$ -

desnudas. Los espectros de emisión se registraron a intervalos de 90 minutos durante un periodo total de 24 horas.

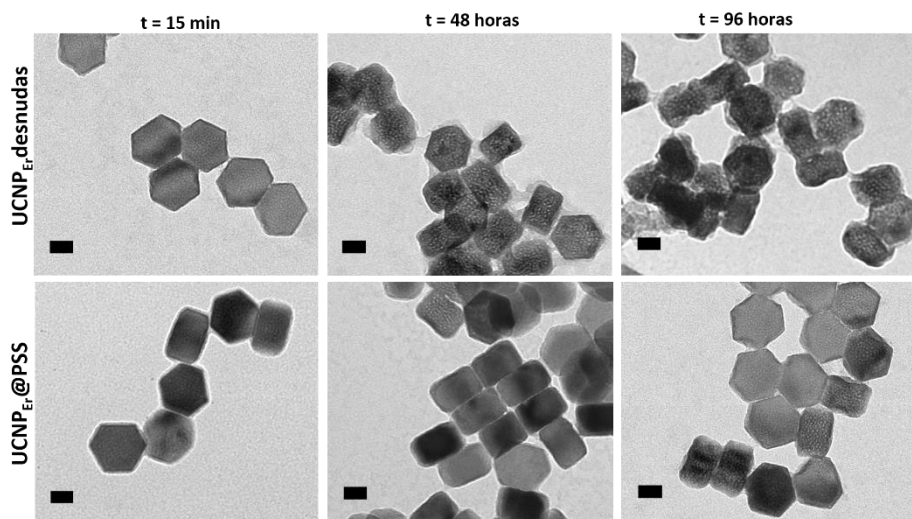


Figura 6.10. Imágenes de TEM de las $UCNP_{Er}$ -desnudas (arriba) y $UCNP_{Er}@PSS$ (abajo) tomadas a diferentes tiempos después de preparar la dispersión ($5 \mu\text{g/mL}$) en agua. Escala de la barra: 20 nm.

La figura 6.11 muestra la representación de la intensidad de emisión en función del tiempo de incubación para los tres nanohíbridos analizados. Obsérvese como la muestra control de $UCNP_{Er}$ -desnuda muestra una caída pronunciada en la intensidad de emisión con respecto al tiempo de incubación en medio acuoso, debida a la pérdida de los iones lantánido dopantes como consecuencia de la desintegración de las nanopartículas, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de ICP-masas (tabla 6.2). Sin embargo, las muestras recubiertas con el polímero PSS presentan una mayor fotoestabilidad.

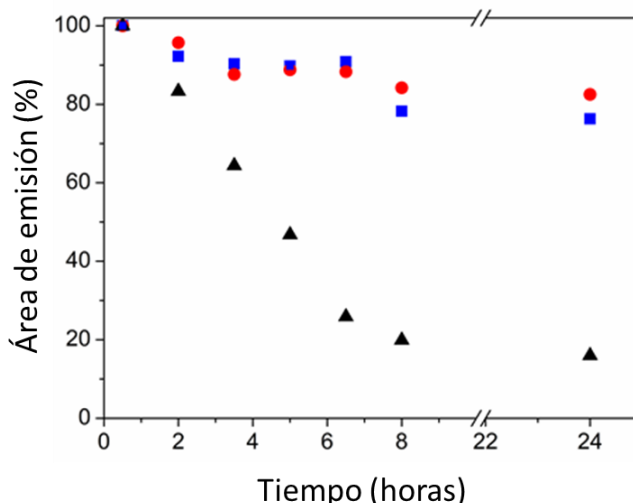


Figura 6.11. Intensidad de emisión (área bajo la curva) a diferentes periodos de incubación de las dispersiones analizadas: UCNP_{Er}@PSS (cuadros azules), UCNP_{Tm}@PSS (círculos rojos) y UCNP_{Er}-desnuda (triángulos negros). La concentración es de 5 $\mu\text{g/mL}$.

6.3. Conclusiones

En este trabajo se han sintetizado nanohíbridos de UCNP recubiertos de polímeros con diferentes grupos funcionales como grupos anclantes, tales como sulfonatos, amidas y fluor.

Por otra parte, se ha demostrado que los nanohíbridos preparados con los polímeros sulfonados son los más estables en condiciones fuertemente ácidas, debido a la fuerte interacción de estos grupos con la superficie de la UCNP. Además, estos polímeros brindaron a las UCNPs una mayor resistencia a la desintegración asociada a dispersiones acuosas con baja concentración de nanopartícula.

6.4. Procedimiento experimental

6.4.1 Materiales

Los reactivos químicos empleados para la síntesis de las UCNPs fueron los cloruros de los lantánidos hexahidratados ($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{TmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) con purzas de todos ellos superiores 99,9%, 1-octadeceno (95%), ácido oleico (70%), NaOH y NH_4F (99,99%). Los reactivos utilizados para realizar recubrimientos fueron los polímeros: poliestireno sulfonato sódico (PM de ~70.000 Sigma Aldrich), polietilenglicol fosfato (Sigma Aldrich), 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-decanol ($\geq 97\%$ Alfa Aesar) y 2-acrilamido-2 metil-1-propanosulfonato (PM de 25.000 Sigma Aldrich).

6.4.2 Síntesis de UCNPs recubiertas con oleato

Síntesis de UCNP_{Er}@oleato

La síntesis de las UCNPs de $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ se realizó por medio del método de descomposición térmica con algunas modificaciones con respecto al descrito en el capítulo 4.^[86] En un matraz de tres bocas de 1000 mL se adicionan: $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (15,6 mmol), $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4,0 mmol), $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,4 mmol), ácido oleico (160 mL) y 1-octadeceno (300 mL). La mezcla de reacción se mantiene en agitación con corriente de nitrógeno continua y se calienta hasta 160°C. Cuando las sales se solubilizan por completo, la reacción se lleva a temperatura ambiente y, posteriormente, se le adicionan 100 mL de una disolución que contienen 0,5 M de NaOH y 0.8 M de NH_4F . La disolución resultante se calienta a 120°C hasta eliminar el metanol. Luego, la reacción se calienta a 305°C y se mantiene a esta temperatura durante 90 min, en reflujo y corriente continua de nitrógeno.

Finalmente, las nanopartículas se precipitan por centrifugación (7000 rpm por 5 min). A continuación, se lavan tres veces de la siguiente

forma: primero se lava con cloroformo y se precipitan por adición de un exceso de metanol; posteriormente se lava con ciclohexano y se precipitan por adición de un exceso de acetona. Las nanopartículas resultantes se dispersan en 50 mL de ciclohexano.

Síntesis de UCNP_{Tm}@oleato

El procedimiento para la síntesis de las UCNPs de NaYF₄:Yb,Tm es similar al descrito para las de Er³⁺. En un matraz de tres bocas de 1000 mL se adicionan YCl₃.6H₂O (15,0 mmol), YbCl₃.6H₂O (5,0 mmol) y TmCl₃.6H₂O (0,06 mmol), ácido oleico (160 mL) y 1-octadeceno (300 mL). La mezcla de reacción se mantiene en agitación con corriente de nitrógeno continua y se calienta hasta 160 °C. Cuando las sales se solubilizan por completo, la reacción se lleva a temperatura ambiente y posteriormente se le adicionan 100 mL de una disolución que contienen 0,5 M de NaOH y 0.8 M de NH₄F. La disolución resultante se calienta a 120 °C hasta eliminar el metanol. Luego, la reacción se calienta a 305 °C y se mantiene a esta temperatura durante 90 min, en reflujo y corriente de nitrógeno continua.

Finalmente, las nanopartículas se precipitan por centrifugación (7000 rpm por 5 min). A continuación, se lavan tres veces de la misma forma que la descrita anteriormente.

6.4.3 Preparación de UCNPs libres de ligando orgánicos

La eliminación del oleato de la superficie de las UCNP_{L_n}@oleato se realizó utilizando dos estrategias diferentes, las cuales se describen a continuación.

Eliminación de oleato con HCl.

Este procedimiento busca eliminar el oleato de la superficie de las nanopartículas utilizando una disolución de HCl generando así UCNPs desnudas, dispersables en medios acuosos.^[83] En general, 10 mL de una disolución de HCl (0,1 M, pH =3) se adicionan a 50 mg de

UCNP_{L_n}@oleato en estado sólido. La mezcla se sonica para dispersar las nanopartículas y a continuación se mantiene en agitación durante 3 horas, el pH de la dispersión se verifica cada 30 minutos y se reajusta a pH=3 con la adición de pequeñas alícuotas del HCl (en caso de ser necesario). Después de este tratamiento, el ácido oleico se extrae con éter dietílico en un embudo de decantación. Finalmente, las UCNPs desnudas (UCNP_{L_n}-desnudas) se precipitan con la adición de un exceso de acetona y se separan por centrifugación (10000 rpm durante 8 minutos).

Intercambio de ligando oleato por BF₄⁻

El intercambio de ligando se realizó siguiendo el protocolo descrito en la literatura, el cual utiliza NOBF₄ para desplazar oleato presente inicialmente en la superficie de las UCNPs.^[84] En general, en un balón de fondo plano de 50 mL se mezcla 10 mL de una dispersión de UCNP_{L_n}@oleato [25 mg/mL] en ciclohexano con 10 mL de DMF. Luego se adicionan 250 mg de NOBF₄ y esta mezcla de reacción se mantiene en agitación vigorosa durante 60 min. A continuación, se detiene la agitación y se deja que se separe la fase de DMF que es la fracción que contiene las UCNPs. Finalmente, las UCNPs se precipitan por la adición de un exceso de 100 mL de cloroformo y se centrifugan (7000 rpm durante 5 minutos).

Las UCNPs resultantes se lavan (por triplicado) con 5 mL de DMF, se precipitan con la adición de 50 mL de cloroformo, y se separan por centrifugación. Finalmente, después de lavar las UCNPs se re-dispersan en 5 mL de DMF y se centrifugan (2000 rpm durante 3 min). El sólido se descarta y se conserva el sobrenadante que contiene las UCNP_{L_n}@BF₄.

6.4.4 Síntesis del polímero 2 acrilamido-2-metil-1-propanosulfonato (PAMPS)

La preparación del polímero PAMPS se realizó por un método radicalario utilizando un porcentaje alto de AIBN como iniciador, siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía. ^[163] En un matraz de fondo redondo de 100 mL se mezclan 14 g de AMPS y 500 mg de AIBN con 60 mL de una mezcla de agua Milli-Q:n-propanol (1:1) previamente desoxigenado. La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante por 2 horas bajo corriente continua de nitrógeno. Luego, la mezcla se calienta a 65°C durante 24 horas. Finalmente, la reacción se enfría en un baño de agua-hielo y se adicionan 50 mL de cloroformo y se mantiene la mezcla en agitación vigorosa durante 3 horas. La reacción se detiene y se forman dos fases, la fase más densa consiste en una emulsión y se descarta. En la otra fase menos densa se eliminan las trazas de disolvente orgánico y el polímero se seca al vacío.

6.4.5 Síntesis de UCNP_{L_n} recubiertas con poliestireno sulfonato (UCNP_{L_n}@PSS)

Se mezclan 2 mL de UCNP_{L_n}@BF₄ [50 mg/mL] con 3 mL de DMF y 1,7 mL de PSS y se mantiene la mezcla en agitación magnética vigorosa durante 24 horas a 60 °C. Durante este proceso el recubrimiento de BF₄⁻ es remplazado por el PSS.

La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente y se centrifuga (15.000 rpm durante 20 minutos). El precipitado (UCNP_{L_n}@PSS) se purifica mediante tres lavados con 10 mL de agua milliQ para eliminar el exceso de PSS. Posteriormente, los lavados se centrifugan a 15.000 rpm durante 15 minutos. Después de los lavados se descartan las fases acuosas y las nanopartículas se dispersan en 5 mL de DMF.

6.4.6 Síntesis de UCNP_{L_n} recubiertas con 2-acrylamido-2-metil-1-propanosulfonato (UCNP_{L_n}@PAMPS)

Se mezclan 2 mL de UCNP_{L_n}@BF₄ [50 mg/mL] con 500 mg de PAMPS disueltos en 3 mL de DMF y la mezcla resultante se agita vigorosamente durante 24 horas a 60°C. El proceso de purificación es el mismo al descrito en la síntesis de UCNP_{L_n}@PSS.

6.4.7 Síntesis de UCNP_{L_n} recubiertas con mPEG5K-fosfato (UCNP_{L_n}@PEGP)

El recubrimiento de las UCNPs con el polímero mPEG5K-fosfato se realizó siguiendo el protocolo de intercambio en dos etapas.^[73] Aproximadamente 50 mg de UCNP_{L_n}-desnudas dispersas en 2 mL de etanol se mezclaron con 300 mg de PEG-fosfato. La mezcla se agita durante 12 horas a 60°C, y después se enfría a temperatura ambiente. El producto resultante (UCNP_{L_n}@PEGP) se precipita por centrifugación (15.000 rpm por 20 minutos) y las nanopartículas se purifican lavando con 10 mL de agua MilliQ, seguido de centrifugación a 15.000 rpm durante 15 minutos; el procedimiento de lavado se repite tres veces.

6.4.8 Síntesis de UCNP_{L_n} recubiertas con 1H,1H,2H,2H-per-fluoro-1-decanol (UCNP_{L_n}@PFD)

Se mezclan 2 mL de UCNP_{L_n}@BF₄ [50 mg/mL] con 500 mg 1H,1H,2H,2H-per-fluoro-1-decanol (PFD) disueltos en 3 mL de DMF con cuatro gotas de trietilamina, y la mezcla de reacción se agita vigorosamente durante 24 horas a 50 °C. La dispersión resultante se lleva a cabo a temperatura ambiente y se centrifuga a 15.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se descarta y el sólido se redispersa en 10 mL de metanol y, finalmente, se centrifuga a 15.000 rpm durante 15 minutos; este procedimiento se realiza por triplicado. Finalmente, el producto UCNP_{L_n}@PFD se redispersa en 5 mL de DMF.

6.4.9 Estudio de estabilidad de los nanohíbridos en medio ácido

Se prepara una dispersión del nanohíbrido correspondiente ($\text{UCNP}_{\text{Ln}}@$ ligando) a una concentración [1 mg/mL] en agua milliQ. A 5 mL de esta dispersión se adicionan diferentes alícuotas (5 o 10 μL) de una solución de HCl (0,1 o 0,5 M) a temperatura ambiente hasta alcanzar un $\text{pH}=2$ y se mantiene la dispersión en estas condiciones durante 12 horas. Posteriormente, la muestra se centrifuga a 15.000 rpm durante 20 minutos y el sólido obtenido se purifica lavando dos veces con alícuotas de 5 mL de agua milliQ. Finalmente, el sólido se seca al vacío y se analiza por FTIR.

6.4.10 Estudio de estabilidad de $\text{UCNP}_{\text{Er}}@$ PSS, $\text{UCNP}_{\text{Er}}@$ PAMPS y UCNP_{Er} desnudas en dispersiones acuosas diluidas

Se preparan dispersiones de 8 mL de cada uno de los nanohíbridos en agua a una concentración de [10 $\mu\text{g}/\text{mL}$]. Las dispersiones se agitaron en un orbital a 200 rpm/min a temperatura ambiente. A las 24 horas se toma una alícuota de 2 mL de cada una de las disoluciones y se centrifugan a 15.000 rpm durante 20 minutos. Para eliminar las UCNPs, el sobrenadante se filtra usando un filtro ACRODISC GHP 0.2 μm , y el sobrenadante resultante se analiza por ICP-masas. Este procedimiento se repite a las 48, 72 y 96 horas (Ver figura 6.9).

Contribución del autor:

Estebanez, N.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J., Polysulfonate Cappings on Upconversion Nanoparticles Prevent Their Disintegration in Water and Provide Superior Stability in a Highly Acidic Medium. *ACS Omega* **2019**, 4 (2), 3012-3019.

Índice de Impacto (JCR): 3.901

Capítulo 7. Preparación de nanohíbridos de upconversion sensibilizados con Nd³⁺ sin utilizar estructuras multicapa

7.1. Introducción

Las UCNPs presentan un elevado interés en bio-aplicaciones^[180, 181] debido a sus propiedades únicas. Sin embargo, existen algunos factores que limitan su aplicación, así su baja dispersabilidad en los medios acuosos y la utilización de una longitud de onda de 980 nm para la excitación de las UCNPs. La baja dispersabilidad en medios acuosos ha sido abordada con éxito mediante la modificación de la superficie de las UCNPs con recubrimientos que le otorgan la dispersabilidad deseada en medios acuosos.

A pesar de la eficiencia del proceso upconversion usando la longitud de onda de 980 nm, su uso implica un importante problema para las aplicaciones biológicas puesto que el agua presenta un máximo de absorción a esta misma longitud de onda. Por lo tanto muestras biológicas, como células o tejidos, pueden sufrir daños por sobrecalentamiento al ser expuestas a la radiación a 980 nm, siendo el efecto mayor en aplicaciones que requieren alta densidad de potencia y periodos prolongados de irradiación.^[182]

Como se ha descrito en los capítulos anteriores, la excitación y emisión de la UCNP depende en gran medida de los iones de lantánidos que la dopan. El Yb^{3+} es el sensibilizador más ampliamente utilizado, ya que presenta una única y estrecha banda de absorción alrededor de 980 nm, un elevado coeficiente de absorción y una energía del estado excitado $^2\text{F}_{5/2}$ que coincide perfectamente con el de las transiciones f-f de numerosos lantánidos activadores (como Er^{3+} , Tm^{3+} , Ho^{3+} etc.). Es por esto que la modificación del Yb^{3+} como sensibilizador por otro elemento que absorba en una longitud de onda distinta a 980 nm resulta muy compleja.

Se han propuesto diferentes estrategias para abordar esta limitación^[183-187]; así la excitación de las UCNPs en el NIR a longitudes de onda menores (generalmente 915 nm). Esta opción minimiza el sobrecalentamiento del sistema, pero implica una pérdida importante de la luminiscencia upconversion debido al menor coeficiente de absorción de las nanopartículas. Por tanto, la sustitución de la longitud de onda de excitación de 980 nm a 915 nm no es la opción más óptima para aprovechar la emisión de estas nanopartículas.

Otra propuesta desarrollada en los últimos años ha sido dopar la matriz o el recubrimiento inorgánico de las UCNPs con el lantánido Nd^{3+} , el cual presenta una banda de absorción en 800 nm. La absorción del agua a 800 nm es muy baja en comparación con la de 980 nm ($0,02 \text{ cm}^{-1}$ vs $0,48 \text{ cm}^{-1}$),^[188-190] por lo que la utilización de una fuente de irradiación a 800 nm minimiza el sobrecalentamiento asociado a la absorción del agua.^[106, 191, 192]

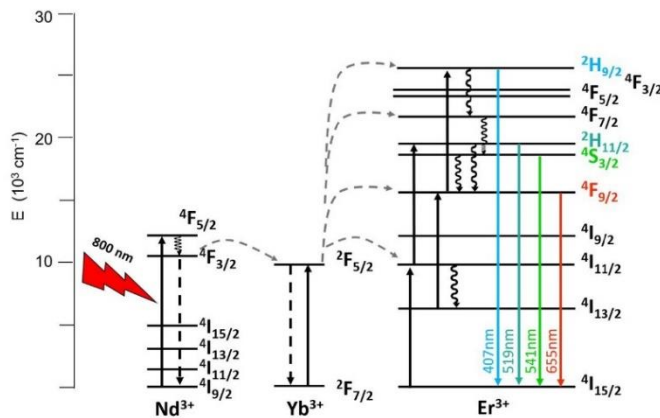


Figura 7.1. Esquema del proceso de transferencia de energía sensibilizado por el Nd^{3+} .

La emisión de upconversion en UCNPs dopadas con Nd^{3+} tiene lugar a través de un proceso de transferencia de energía en el que el átomo de Nd^{3+} absorbe la radiación (800 nm) y la transfiere al

sensibilizador Yb^{3+} . Posteriormente, el Yb^{3+} transfiere la energía al activador (Er^{3+} o Tm^{3+}), tal y como se ilustra en la figura 7.1.

Una desventaja de dopar las UCNP_s con Nd^{3+} es que éste induce una importante desactivación de la emisión upconversion debido a la transferencia de energía en sentido inverso, es decir desde el activador (Er^{3+} o Tm^{3+}) al Nd^{3+} , en consecuencia la concentración de Nd^{3+} no debe ser superior al 2%.^[193, 194] Para evitar este fenómeno es necesario separar por medio de capas inorgánicas (preferiblemente activas) el Nd^{3+} del activador presente en la matriz como se representa en la figura 7.2.^[184, 195]

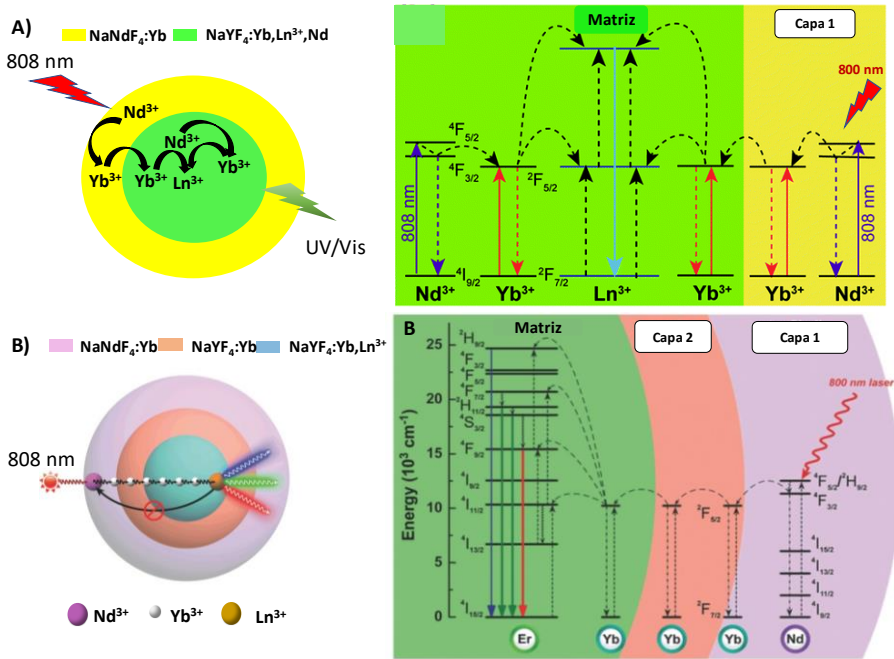


Figura 7.2. Estructuras y procesos de transferencia de energía entre los lantánidos en la matriz y recubrimientos inorgánicos activos excitando al Nd^{3+} ($\lambda_{\text{exc}}=808 \text{ nm}$). A) UCNP_{CS} dopada con Nd^{3+} en matriz (< 2%) y en matriz activa.^[196] B) UCNP_{CS} multicapas activas y dopada con Nd^{3+} únicamente en el recubrimiento. Adaptado con permiso de la Ref.^[197] Copyright (2013), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.

Sin embargo, preparar UCNPs con múltiples capas de distintos dopantes alrededor de la matriz de la nanopartícula implica un aumento significativo en el tiempo de reacción, un incremento de la probabilidad de obtener nanopartículas polidispersas y una baja reproducibilidad del grosor de las capas inorgánicas entre los distintos procesos de recubrimiento, además de limitar su uso en aplicaciones donde existan procesos de transferencia de energía tipo LRET, donde la distancia dador-aceptor es determinante para la eficiencia del proceso.^[107, 183, 184, 197]

Teniendo en cuenta las dificultades que implica preparar UCNPs con múltiples capas inorgánicas, en este trabajo nos planteamos una estrategia alternativa para obtener nanohíbridos de UCNP con un recubrimiento inactivo de NaYF₄ (UCNP_{CS}) decorado con Nd³⁺ a una distancia determinada de la superficie de la NP utilizando una macromolécula. Este recubrimiento orgánico tiene que actuar como una plataforma para el anclaje del Nd³⁺ y a su vez ser capaz de permitir que ocurran los procesos de transferencia de energía (figura 7.1).

Para llevar a cabo la síntesis de estos nanohíbridos se seleccionó el macrociclo cucurbit[7]urilo (CB[7]) para el recubrimiento orgánico de las UCNP_{CS},^[88] en la figura 7.3 se ilustra la estructura del macrociclo. La elección de este compuesto se justifica por presentar una estructura simétrica que consta de dos portales, cada uno de ellos con siete grupos carbonilos. La polaridad de los portales permite la interacción con la superficie de la UCNP_{CS}^[88, 198] así como con cationes.^[199] Por tanto los grupos carbonilos libres del macrociclo podrían coordinarse con iones lantánidos, como el Nd³⁺, por medio de interacciones ion-dipolo.^[200, 201]

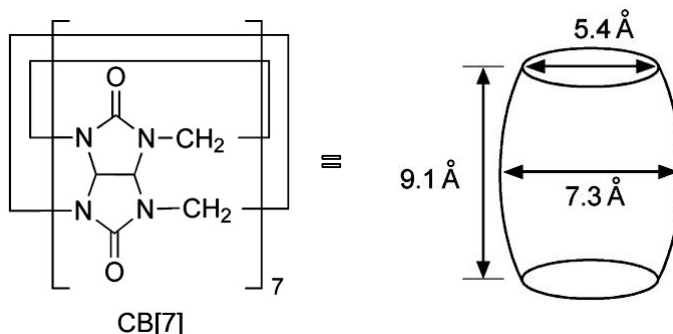


Figura 7.3. Estructura y dimensiones del CB[7]. Adaptado con permiso de la Ref.^[199] Copyright (2011), American Chemical Society

En este capítulo se describe la metodología desarrollada para la síntesis de nanohíbridos de UCNP_{CS} con CB[7], seguida del anclaje del lantánido Nd^{3+} en el portal libre de CB[7] y su posterior caracterización. Además, se detalla las propiedades ópticas de los nanohíbridos obtenidos tras irradiar a 980 nm, y lo que es aún más importante, irradiando a 800 nm para confirmar la transferencia de energía del Nd^{3+} .

7.2. Resultados y discusión

7.2.1. Síntesis de UCNP_{CS} recubiertas con oleato

Para este estudio se seleccionaron dos tipos de nanopartículas de tipo core-shell, una dopada con $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ y otra con $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$, $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}$ y $\text{UCNP}_{\text{CS,Tm}}$ respectivamente. En primer lugar, se sintetizaron las UCNP recubiertas con oleato y, posteriormente, se realizó el recubrimiento de éstas con la capa inorgánica de NaYF_4 .

La síntesis de UCNP recubiertas con oleato se llevó a cabo por el método de descomposición térmica a alta temperatura descrito en los capítulos anteriores, utilizando las sales de los cloruros de los lantánidos, NH_4F y NaOH en una mezcla de 1-octadeceno y ácido oleico, y calentamiento durante una hora a 305 °C . Las imágenes de

TEM (figura 7.4) muestran la formación de UCNP@oleato monodispersas, con un tamaño de $35\pm 2 \times 41\pm 2$ nm para las nanopartículas dopadas con $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ y $17\pm 1 \times 24\pm 1$ nm para las dopadas con $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$.

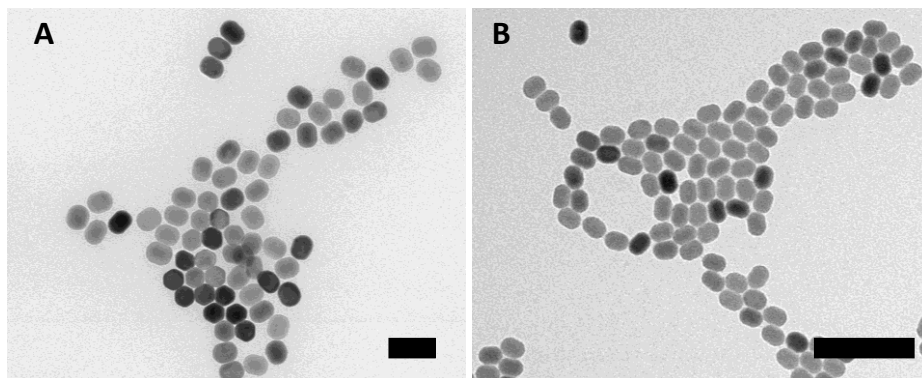


Figura 7.4. Imágenes de TEM: A) $\text{UCNP}_{\text{Er}}@oleato$, B) $\text{UCNP}_{\text{Tm}}@oleato$. Escala de barra: 100 nm

El recubrimiento con la capa inorgánica inactiva de NaYF_4 se realizó adicionando las $\text{UCNP}_{\text{Ln}}@oleato$ a una mezcla de las sales $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaOH y NH_4F disueltas en 1-octadeceno y ácido oleico, y se aumentó la temperatura de reacción a 325°C .^[202]

La figura 7.5 muestra las imágenes de TEM de ambas nanopartículas $\text{UCNP}_{\text{CS}}@oleato$, denominadas como $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@oleato$ y $\text{UCNP}_{\text{CS,Tm}}@oleato$. Las imágenes confirmaron su monodispersidad, y el tamaño de la capa inorgánica se estimó en 3 ± 1 y 24 ± 4 para $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}$ y 4 ± 2 y 7 ± 2 para $\text{UCNP}_{\text{CS,Tm}}$. Además, el análisis de XRD demostró que presentan una fase cristalina hexagonal.

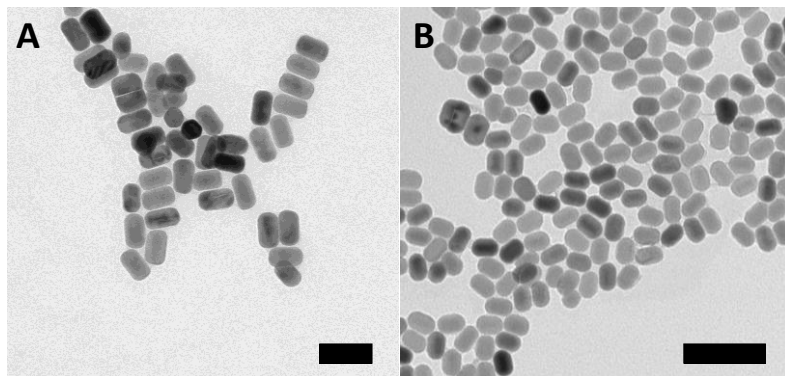


Figura 7.5. Imágenes de TEM de las UCNP_{CS}.
 A) NaYF₄:Yb,Er/NaYF₄@oleato. B) NaYF₄:Yb,Tm/NaYF₄@oleato.
 Escala de barra: 100 nm

El análisis de la composición de las UCNP_{CS}@oleato por EDS permitió determinar el porcentaje de los lantánidos de las nanopartículas. Así, se obtuvo Y³⁺ (89.5%), Yb³⁺ (9.5%) y Er³⁺ (1%) para la UCNP_{CS,Er} y de Y³⁺ (88.6%), Yb³⁺ (11.4%) y Tm³⁺ (por debajo de límite de detección) para UCNP_{CS,Tm}.

7.2.2. Síntesis de nanohíbridos UCNP_{CS}@CB[7]

Para funcionalizar la superficie de las UCNP_{CS}@oleato con CB[7] se utilizó un procedimiento en dos etapas. En la primera etapa se elimina el oleato de la superficie de las UCNP_{CS}@oleato por medio del tratamiento ácido a pH 2 con HCl.^[83] La segunda etapa consiste en mezclar las UCNP_{CS} desnudas obtenidas con una solución de CB[7] y dejar la mezcla en agitación durante 48 horas, siguiendo la estrategia empleada en el grupo en estudios anteriores.^[88]

Los espectros de FTIR de los nanohíbridos obtenidos, UCNP_{CS,Er}@CB[7] y UCNP_{CS,Tm}@CB[7], presentan una banda intensa en 1735 cm⁻¹ debida a la vibración de estiramiento del grupo carbonilo (C=O) de uno de los portales del CB[7], que en comparación con el valor

del (C=O) del CB[7] libre presenta un desplazamiento a mayores frecuencias (1720 cm^{-1}) lo cual confirma el anclaje del CB[7] con la superficie de las NPs (figura 7.6C). Este desplazamiento de 15 cm^{-1} se atribuye a la desviación del plano inicial del enlace C=O en comparación con el plano formado por los enlaces N-C-N una vez el CB[7] se une a la superficie de las NPs.^[88, 198]

El espesor de la capa orgánica de CB[7] en las UCNP_{CS} se estimó mediante las imágenes de HRTEM en 1-2 nm para ambos nanohíbridos ($\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@CB[7]$ y $\text{UCNP}_{\text{CS,Tm}}@CB[7]$, ver figura 7.7. Estos valores coinciden con los esperados teniendo en cuenta la altura de la molécula del CB[7] (0.91 nm , figura 7.3).

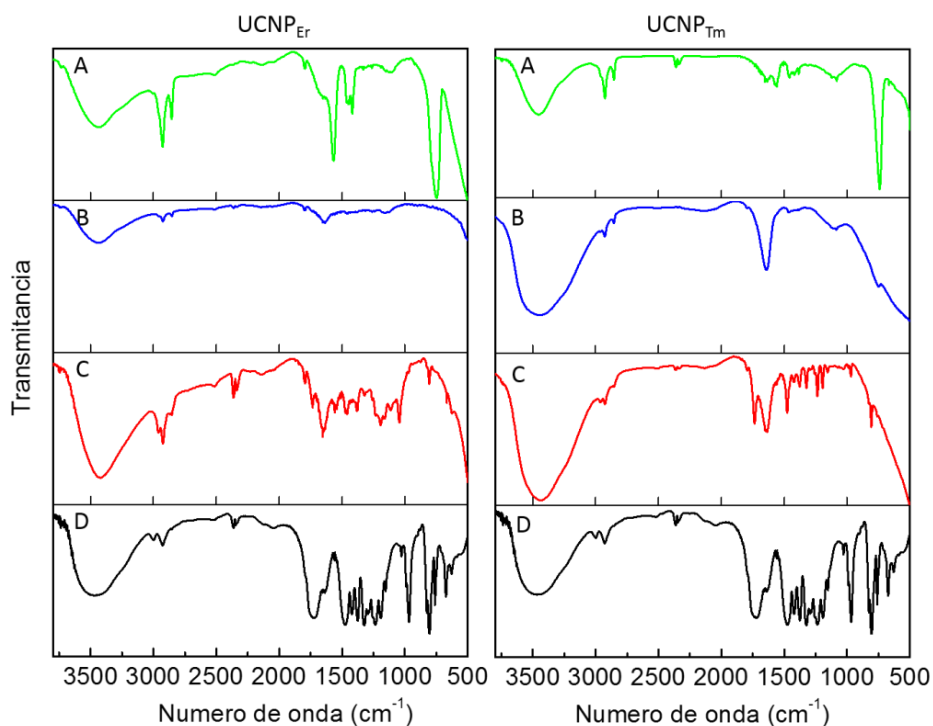


Figura 7.6. Espectros de FTIR de las $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}$ (izquierda), $\text{UCNP}_{\text{CS,Tm}}$ (derecha): A) $\text{UCNP}_{\text{CS,@oleato}}$, B) $\text{UCNP}_{\text{CS,-desnudas}}$, C) $\text{UCNP}_{\text{CS,@CB[7]}}$, D) CB[7]

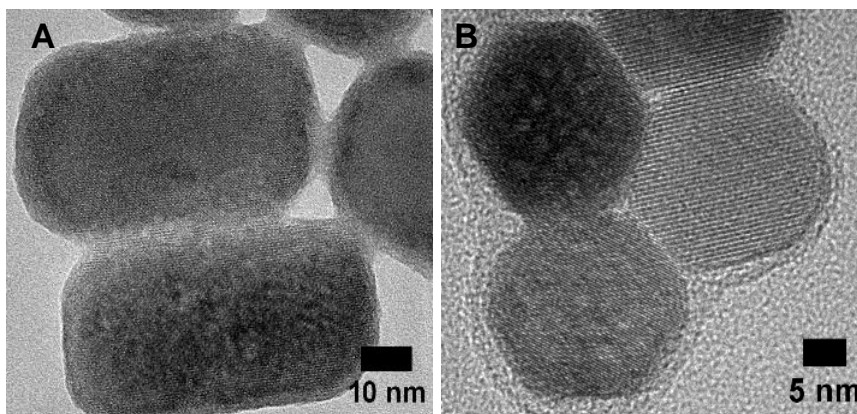


Figura 7.7. Imágenes de HRTEM: A) $\text{UCNP}_{\text{cs,Er}}@CB[7]$, B) $\text{UCNP}_{\text{cs,Tm}}@CB[7]$

7.2.3. Síntesis de nanohíbridos $\text{UCNP}_{\text{cs}}@CB[7]@Nd$

La síntesis de los nanohíbridos con Nd^{3+} se llevó a cabo mezclando una dispersión acuosa del correspondiente nanohíbrido $\text{UCNP}_{\text{cs}}@CB[7]$ (concentración de 2 mg/mL) con una disolución de Nd^{3+} (preparada con la sal $\text{NdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 24 horas y el nanohíbrido resultante se purificó con tres lavados de agua y procesos de centrifugación para eliminar el exceso de Nd^{3+} .

Para confirmar el anclaje del Nd^{3+} al recubrimiento orgánico se registraron los espectros EDS de los dos nanohíbridos resultantes, denominados $\text{UCNP}_{\text{cs,Er}}@CB[7]@Nd$ y $\text{UCNP}_{\text{cs,Tm}}@CB[7]@Nd$, (ver figura 7.8). Ambos espectros mostraron claramente la señal correspondiente al Nd^{3+} y se estimó una relación de 2 átomos de Nd^{3+} por molécula de $\text{CB}[7]$.

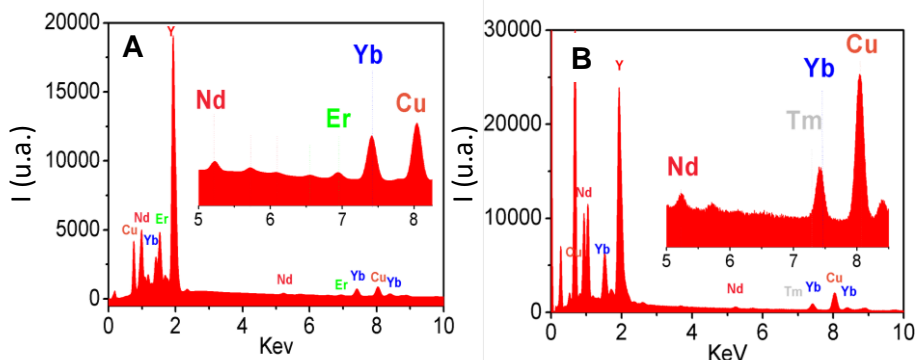


Figura 7.8. Espectros EDS: A) $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@\text{CB}[7]@\text{Nd}$ y B) $\text{UCNP}_{\text{CS,Tm}}@\text{CB}[7]@\text{Nd}$

En colaboración con el Dr. Raul Arenal del Instituto de Nanociencias de Aragón se realizó un estudio de los nanohíbridos mediante la técnica de microscopía de transmisión de campo oscuro (HAADF-HRSTEM), la cual permite determinar átomos individuales, figura 7.9. Las imágenes del nanohíbrido $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@\text{CB}[7]@\text{Nd}$ confirman una vez más la presencia de una capa orgánica recubriendo la superficie de $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}$ correspondiente al CB[7], con un espesor aproximado de 2 nm. Además, el análisis por micrografía HAADF-HRSTEM reveló la presencia de átomos pesados incrustados en la capa orgánica, tal y como se detalla en el rectángulo dentro de la imagen en la figura 7.9B. El perfil de intensidad de los átomos observados muestra claramente dos picos de dimensión e intensidad que concuerda con la presencia de átomos individuales de Nd^{3+} (figura 7.9C).

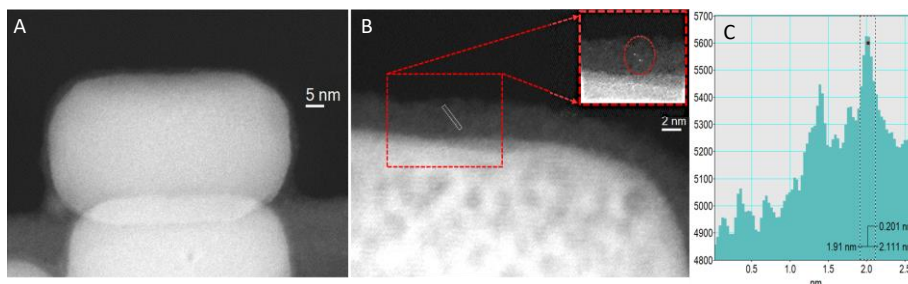


Figura 7.9. A) Imagen de HAADF-STEM del nanohíbrido UCNP_{cs,Er}@CB[7]@Nd, B) imagen HAADF-STEM de alta resolución del nanohíbrido UCNP_{cs,Er}@CB[7]@Nd enfocando el recubrimiento orgánico con una capa de 2–3 nm, y C) perfil de intensidad de los átomos de Nd³⁺ observados.

7.2.4. Análisis de las propiedades emisivas de los nanohíbridos y del proceso de transferencia de energía

Para estudiar las propiedades fotofísicas de los nanohíbridos sintetizados por esta nueva metodología, se midió la emisión de upconversion en estado estacionario y en tiempo resuelto.

En la figura 7.10 se muestran los espectros de emisión de upconversion de los nanohíbridos excitando con un diodo laser de 980 nm. El espectro de UCNP_{cs,Er}@CB[7]@Nd mostro las bandas de emisión características del Er³⁺ en 550 nm (⁴S_{3/2} → ⁴I_{15/2}) acompañado de una señal menos intensa en 520 en nm (²H_{11/2} → ⁴I_{15/2}) y una última banda centrada en 670 nm (⁴F_{9/2} → ⁴I_{15/2}), En el caso de UCNP_{cs,Tm}@CB[7]@Nd se observaron las bandas de emisión características del Tm³⁺ en 360 nm (¹D₂ → ³H₆), 450 nm (¹D₂ → ³F₄), 475 nm (¹G₄ → ³H₆), 644 nm (¹G₄ → ³F₄) y 800 nm (³H₄ → ³H₆).

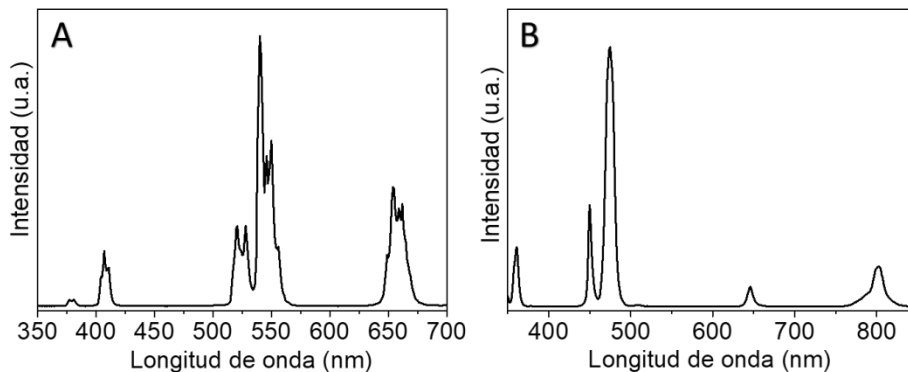


Figura 7.10. Espectros de emisión de A) UCNPC_{CS,Er}@CB[7]@Nd B) y UCNPC_{CS,Tm}@CB[7]@Nd.

El análisis de la cinética de emisión upconversion se realizó utilizando la técnica de microscopía multifotón, una metodología novedosa utilizada en nuestro grupo de investigación para medir tiempos de vida de las UCNPs.^[203] Esta técnica implica la utilización de un microscopio de fluorescencia equipado con un láser multifotón de alta potencia que nos permite registrar imágenes con buena resolución y contraste, además cuenta con un sistema de detección de cuatro canales de emisión bien definidos: canal 1 (420-500 nm), canal 2 (515-560 nm), canal 3 (590-650 nm) y canal 4 (660-740 nm).

Experimentalmente, la preparación de las muestras se realizó depositando 2 o 3 gotas de dispersiones de los nanohíbridos (cloroformo) en un portamuestra seguido de secado a temperatura ambiente hasta eliminar el disolvente (aproximadamente 24 hrs) y finalmente, protección de la muestra se con un cubreobjeto.

El análisis de las muestras con el microscopio de emisión nos permite realizar un barrido de una zona de la muestra enfocando pixel a pixel y punto a punto hasta construir una imagen bidimensional. Cabe destacar que, debido a los tiempos de vida de las UCNPs en la escala de μ s las imágenes obtenidas de las muestras de UCNP utilizando

tiempos de adquisición cortos se verán como estelas en el sentido del barrido, en lugar de puntos. Es importante además destacar que debido a la resolución del equipo (1024x1024 píxeles), las estelas obtenidas no corresponden a la emisión de una nanopartícula si no que corresponde a un conjunto de nanopartículas situadas en la superficie de la zona analizada al cual a efectos prácticos se le denomina agregado.

Finalmente, el perfil de intensidad se obtiene a través del trazado de una línea en la misma dirección del barrido de la imagen de estela del agregado, así pues, se obtendrá un perfil de intensidades que realizando la operación adecuada, es posible transformar la medida de píxeles a medidas de tiempo y obtener así la curva de desactivación de la luminiscencia. La figura 7.11 representa un ejemplo.

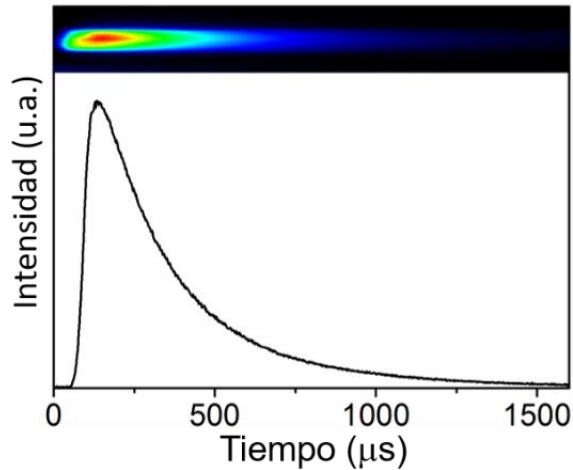


Figura 7.11. Imagen de microscopía multifotón de un agregado de UCNP y el perfil de intensidad en función del tiempo obtenido al analizar su la emisión.

La figura 7.12 muestra un espectro de emisión de la UCNP dopada con Er^{3+} identificando las cuatro áreas de detección o canales de microscopía confocal. Así, después de escanear una zona se obtendrán 4 imágenes (una por canal).

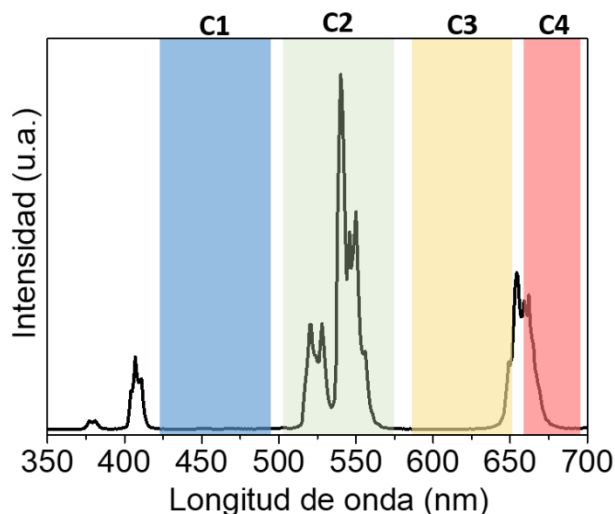


Figura 7.12. Espectro de emisión de UCNP dopadas con Er^{3+} . Las zonas identificadas en colores representan los canales de detección en el microscopio de emisión, C1 (420-500 nm), C2 (515-560), C3 (590-650 nm) y C4 (660-740 nm).

Con esta técnica se tomaron imágenes del nanohíbrido $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@CB[7]@Nd$ y del nanohíbrido $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@CB[7]$ como control. Las muestras se prepararon sobre un soporte de vidrio y las imágenes se adquirieron irradiando a 980 nm y 800 nm, con tiempos de adquisición de 2 μs por pixel.

La figura 7.13 muestra las imágenes obtenidas irradiando a 980 nm (7.13 A y 7.13 B). En ambos nanohíbridos se observan estelas muy definidas en el canal 2 que corresponden a las bandas de emisión en 520 nm y 540 nm. Además, también se observaron estelas en el canal

3 y 4, aunque mucho menos intensas, que corresponden a la banda de emisión centrada en 650 nm.

Cabe destacar que, cuando las imágenes de los nanohíbridos se registraron excitando a 800 nm, sólo el nanohíbrido $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@CB[7]@Nd$ presentó emisión en forma de estelas en el canal 2 (imagen 7.13 D), lo cual claramente indica la contribución del Nd^{3+} a la respuesta positiva del sistema.

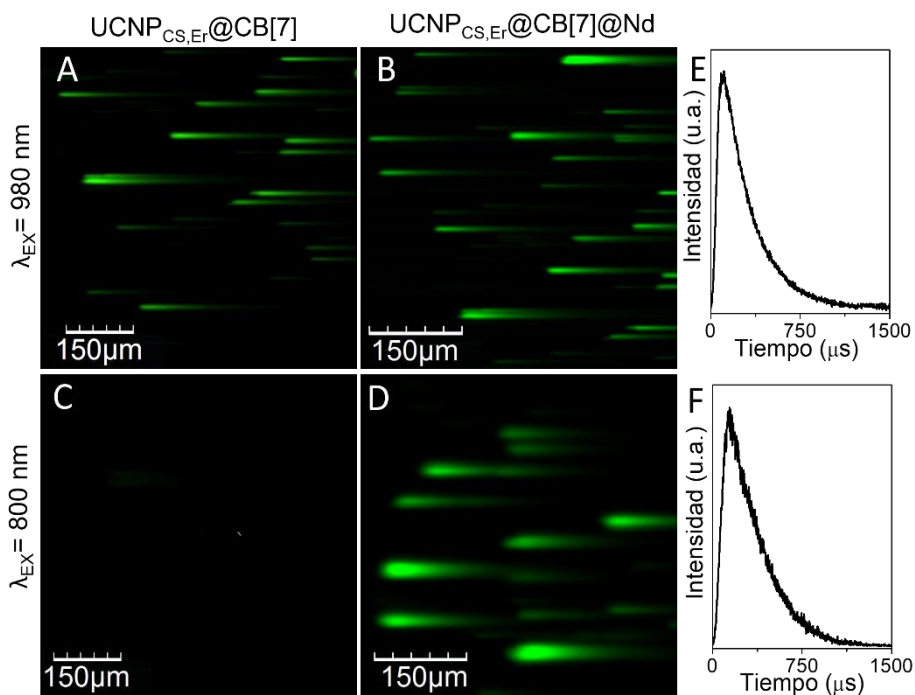


Figura 7.13. (A,B,C,D) Imágenes de confocal de $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@CB[7]$ y de $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@CB[7]@Nd$ a $\lambda_{\text{exc}} = 980 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{exc}} = 800 \text{ nm}$, en el canal 2 (515–560 nm con tiempos de adquisición de $2 \mu\text{s}$ por pixel). (E,F) Perfil de intensidad en función del tiempo de $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@CB[7]@Nd$, obtenidos con $\lambda_{\text{exc}} = 980 \text{ nm}$ y 800 nm , respectivamente.

En la tabla 7.1. Se resumen los valores de tiempos de vida calculados mediante el tratamiento de las imágenes de microscopía, analizando la intensidad de emisión en función del tiempo de las estelas observadas. Obsérvese que los valores de tiempo de vida son muy similares para $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@CB[7]@Nd$ y $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@CB[7]$ tanto excitando a 980 nm, como excitando a 800 nm a $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@CB[7]@Nd$.

Tabla 7.1. Resumen de los tiempos de vida calculados a partir de imágenes de microscopía en el canal 2 a las dos longitudes de irradiación (980 y 800 nm).

Muestra	Canal 2 (515-560 nm)	
	$\lambda_{\text{exc}} = 980 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{exc}} = 800 \text{ nm}$
$\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@CB[7]$	245± 7 μs	No detectado
$\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@CB[7]@Nd$	240± 4 μs	227± 6 μs

Los resultados de este último estudio demuestran que al excitar a 800 nm, el neodimio en el nanohíbrido $\text{UCNP}_{\text{CS,Er}}@CB[7]@Nd$ absorbe la energía y se desencadena un proceso en cascada de transferencia de energía, véase esquema en la figura 7.14. El proceso se inicia con la transferencia de energía (ET) desde el Nd^{3+} hacia el Yb^{3+} , seguido de la transferencia de energía al activador (Er^{3+}) a través de un mecanismo de transferencia de energía ETU responsable final de la emisión upconversion en el UV-VIS.

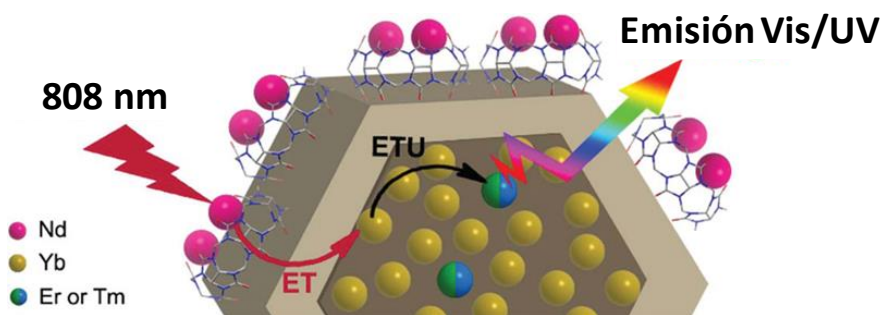


Figura 7.14. Representación esquemática del proceso de emisión en el nanohíbrido UCNP_{CS,Ln}@CB[7]@Nd. El proceso se inicia después de la irradiación a 800 nm donde el Nd³⁺ coordinado al recubrimiento orgánico de CB[7] sensibiliza y transfiere la energía a los iones Yb³⁺. Seguidamente ocurre una migración de energía del Yb³⁺ al Er³⁺ o Tm³⁺.

Por último, se midieron los rendimientos cuánticos absolutos de los nanohíbridos excitando a 980 nm y se observó que una mayor eficiencia en el nanohíbrido UCNP_{CS,Er}@CB[7] con respecto a UCNP_{CS,Er}@CB[7]@Nd (1 % vs 0.6% respectivamente), lo cual es una evidencia de transferencia de energía del Yb³⁺ al Nd³⁺. Por otra parte, el rendimiento cuántico de emisión de UCNP_{CS,Er}@CB[7]@Nd excitando a 800 nm es menor (0.001%) lo que demuestra la existencia de transferencia de energía desde el Nd³⁺ al Yb³⁺, a pesar del recubrimiento de la UCNP con una capa inactiva de NaYF₄.

7.3. Conclusiones

En resumen, en este trabajo se describe una estrategia modular sencilla que permite preparar nanohíbridos de tipo UCNP_{CS,Ln}@CB[7]@Nd. En estos nanohíbridos los iones de Nd³⁺ no se encuentran en la estructura cristalina de las UCNP, sino interaccionando con el ligando orgánico que recubre la superficie de las NPs, específicamente curcubit[7]urilo, que los ubica a una distancia próxima a 1 nm de la superficie de la nanopartícula.

Cabe destacar que la excitación de los nanohíbridos a 800 nm produce emisión upconversion, por lo que representa el primer ejemplo donde el fotosensibilizador se ubica en el recubrimiento orgánico de la superficie de las NPs. Además, se demuestra por primera vez que el Nd³⁺ es capaz de fotosensibilizar procesos de upconversion cuando sin estar encapsulado en la matriz inorgánica de las NPs.

En definitiva, este estudio es una prueba concepto, pero abre nuevas oportunidades de síntesis de estructuras basadas en UCNPs.

7.4. Procedimiento experimental

7.4.1. Materiales

Los reactivos químicos empleados para la síntesis de las UCNPs fueron: cloruros de los lantánidos hexahidratados ($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{TmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{NdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) con purzas superiores al 99.9%, 1-octadeceno (95%), ácido oleico (70%), NaOH y NH_4F (99.99%) y CB[7].

7.4.2. Síntesis de UCNP de recubiertas con oleato

Síntesis de UCNP_{Er}@oleato

La síntesis de las nanopartículas se realizó mediante el método de descomposición térmica con algunas modificaciones.^[67] En un matraz de tres bocas de 50 mL se adicionan $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mmol), $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,05 mmol) y $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,005 mmol), ácido oleico (8mL) y 1-octadeceno (15 mL). La adición de 2 mL de metanol, manteniendo la mezcla en agitación magnética y corriente de N_2 y elevando a 160°C permite la solubilización de las sales. Una vez tenemos una solución perfectamente homogénea, se baja la temperatura a 100°C y se añade una disolución de NH_4F (1,0 mmol) y NaOH (0,63 mmol) en metanol (5 mL). Se mantiene la temperatura hasta eliminar el metanol, seguidamente la temperatura de la reacción se eleva hasta los 305 °C esta temperatura se mantiene durante 90 minutos, Y en este punto se deja enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Finalmente, las UCNP@oleato son separadas mediante centrifugación a 9000 rpm durante 15 minutos y se lavan tres veces con una mezcla hexano/acetona/metanol (2,7:2,5:1 v/v)

Síntesis de UCNP_{Tm}@oleato

Para la obtención de estas nanopartículas se siguió el procedimiento descrito para las nanopartículas dopadas con erbio pero utilizando tulio y las cantidades adicionadas. La reacción se realizó con una mezcla de ácido oleico y 1-octadeceno (12 mL y 15 mL respectivamente). Las cantidades de las sales adicionadas fueron YCl₃.6H₂O (0,78 mmol), YbCl₃.6H₂O (0,19 mmol) y TmCl₃.6H₂O (0,002 mmol). A partir de este punto se sigue el procedimiento descrito anteriormente para la síntesis de las UCNPs dopadas con erbio.

7.4.3. Síntesis del recubrimiento inorgánico NaYF₄ en las UCNP_{Er}@oleato y UCNP_{Tm}@oleato

El procedimiento para la formación del recubrimiento de composición equivalente al de la matriz de las UCNPs (NaYF₄) se realiza de la misma manera para ambas nanopartículas.^[202] En un matraz de 25 mL de tres bocas se adicionan 4 mL de ácido oleico y 8 mL de 1-octadeceno. Seguidamente, se adicionan 0,2 mmol de YCl₃.6H₂O disueltos en 1 mL de metanol. A continuación, se calienta la mezcla hasta los 160 °C en corriente de N₂ y agitación magnética hasta solubilizar totalmente la sal de YCl₃. Una vez se tiene una solución totalmente homogénea se baja la temperatura de la mezcla de reacción hasta 80 °C y se adicionan 100 mg de UCNP@oleato suspendidas en 5 mL de cloroformo. Tras la eliminación del cloroformo, se añade gota a gota de una disolución de metanol que contiene NaOH (1,3 mmol) y NH₄F (2,0 mmol). Seguidamente, se eleva la temperatura de la reacción a 325°C y se mantiene a dicha temperatura durante un periodo de 25 minutos. Finalmente, las UCNP_{CS} se separan mediante centrifugación a 9000 rpm durante 15 minutos y se lavan tres veces con una mezcla hexano/acetona/metanol (2,7:2,5:1 v/v).

7.4.4. Síntesis de UCNP_{CS} libres de ligando orgánicos

Las UCNP_{CS} desnudas se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito anteriormente.^[83] Se dispersaron 100 mg de UCNP_{CS}@oleato en una disolución de HCl a pH 4. La mezcla de reacción se mantiene en agitación vigorosa por un periodo de 2 horas aproximadamente (asegurándose que la reacción se mantenga a pH 4 durante las dos horas de reacción).

El ácido oleico formado se eliminó de la mezcla por medio de un proceso de extracción con éter dietílico. La fase acuosa obtenida después de las extracciones contiene las nanopartículas desnudas, las cuales se precipitan adicionando un exceso de acetona y posterior centrifugado (9000 rpm por 15 min).

7.4.5. Síntesis de UCNP_{CS}@CB[7]

El método sintético utilizado para funcionalizar las UCNP_{CS} con el CB[7] se realizó siguiendo el método desarrollado y descrito con anterioridad por nuestro grupo de investigación.^[88]

Se dispersan 0,01 mmol del CB[7] en 8 mL de agua milliQ. Paralelamente se preparó una dispersión de las UCNP_{CS}-desnudas de 30 mg en 10 mL de agua MilliQ y se sónico durante 15 minutos. A continuación, se mezclan ambas disoluciones y se mantiene en agitación orbital a 350 rpm durante 24 horas. Las nanopartículas se precipitaron centrifugando a 10.000 rpm durante 10 min.

Los excesos de CB[7] se eliminan con procesos de sonicado durante 10 minutos con 15 mL de agua MilliQ seguido por centrifugación (10000 rpm por 10 minutos). El proceso de lavado se realiza por duplicado con agua MilliQ y por triplicado con acetonitrilo.

7.4.6. Síntesis de UCNP_{CS,Ln}@CB[7]@Nd

Para la preparación de los nanohíbridos, se dispersaron 30 mg UCNP_{CS,Ln}@CB[7] en 15 mL de agua MilliQ. Seguidamente se añadió un exceso de la sal NdCl₃·6H₂O (4 moles de Nd³⁺ por cada mol CB[7] presente en los nanohíbridos UCNP_{CS}@CB[7]). La mezcla se mantiene en agitación orbital a 400 rpm durante 24 horas. Finalmente, las nanopartículas se separan centrifugando a 9000 rpm durante 15 minutos 17°C y se lavan por triplicado con alícuotas de 10 mL de agua MilliQ.

Contribución del autor:

Estebanez, N.; Ferrera-González, J.; Francés-Soriano, L.; Arenal, R.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J., Breaking the Nd³⁺-sensitized upconversion nanoparticles myth about the need of onion-layered structures. *Nanoscale* **2018**, *10* (26), 12297-12301.

Índice de Impacto (JCR): 6.970

Conclusiones

Las conclusiones de la presente tesis focalizada en la síntesis y caracterización de nanohíbridos de nanopartículas de upconversion son las siguientes:

- Se sintetizó con éxito el nanohíbrido de upconversion recubierto con una capa delgada de un copolímero HEMA-co-AMPS (COP), UCNP@COP. El copolímero se ancla a la superficie de las UCNP mediante grupos sulfonato, lo que está de acuerdo con la extraordinaria estabilidad del recubrimiento de las UCNPs en medios fuertemente ácidos (pH=2).
- Se preparó el nanohíbrido UCNP@COP@MB anclando azul de metileno a la UCNP@COP, utilizando para ello los grupos sulfonato libres en la periferia de UCNP@COP. La liberación de moléculas de MB se controla con el pH.
- Se llevó a cabo una invención registrada en la patente internacional WO 2018/002405A1, en la cual se describe la preparación de compuestos cerámicos luminiscentes formados por la combinación entre UCNPs recubiertas con ligandos orgánicos de tipo X-CH₂CO-Z (X corresponde a algún halógeno y Z es -H, -R, -COR, -OH, -NH₂, -NHR, -NR₂ donde R es una cadena alquílica lineal o ramificada), y una matriz cerámica.
- El compuesto cerámico se preparó utilizando un proceso sol-gel que requiere condiciones ácidas. El material compuesto presenta un efecto de sinergia que potencia la estabilidad de las UCNPs y su luminiscencia (incremento de la capacidad emisiva del material resultante en más de 100 veces con respecto a la emisión de las UCNPs iniciales), proporcionando así un material con altas prestaciones luminiscentes de upconversion.

- Se sintetizaron nanohíbridos de UCNPs recubiertos con los polímeros PAMPS, PSS, PEGP y PDF. Los nanohíbridos recubiertos con los polímeros PAMPS y PSS presentaron una gran estabilidad en disoluciones acuosas a pH 2, lo que es debido a la fuerte interacción entre los grupos sulfonato y la superficie de las nanopartículas. Sin embargo, los nanohíbridos pasivados con los polímeros PEGP y PFD se liberaban de la superficie de las nanopartículas en dichas condiciones.
- Los recubrimientos con AMPS y PSS proporcionan una importante protección a las UCNPs evitando su desintegración en medios acuosos.
- Se sintetizaron nanohíbridos de $\text{UCNP}_{\text{Cs}}@CB[7]@Nd$ utilizando el portal libre del CB[7] para fijar los iones Nd^{3+} fuera de la estructura cristalina de la NP y a una distancia de su superficie de 1 nm aprox.
- La excitación selectiva del neodimio a 800 nm demostró que el Nd^{3+} puede actuar como sensibilizador en procesos de upconversion cuando se encuentra en la capa orgánica.

Conclusions

The conclusions of this thesis, focused on the synthesis and characterization of nanohybrids from upconversion nanoparticles, can be summarized as follows:

- Upconversion nanohybrids coated with a thin layer of a HEMA-co-AMPS (COP) copolymer, UCNP@COP, were successfully synthesized. The copolymer is anchored to the UCNP surface by means of sulfonate groups, which agrees with the extraordinary stability of the UCNP coating in strongly acidic media (pH = 2).

- The nanohybrid UCNP@COP@MB was prepared by anchoring methylene blue to UCNP@COP, using the free sulfonate groups on the periphery of the nanohybrid. The release of MB molecules is controlled by the pH.

- An invention registered in international patent WO2018/002405A1 was carried out, which describes the preparation of luminescent ceramic compounds prepared by the combination between luminescent UCNPs coated with organic ligands of X-CH₂CO-Z formula (X corresponds to some halogen and Z is -H, -R, -COR, -OH, -NH₂, -NHR, -NR₂ where R is a linear or branched alkyl chain), and a ceramic matrix.

- The ceramic compound was prepared using a sol-gel process that requires acidic conditions. The composite material presents a synergy effect that enhances the stability of the UCNPs and their luminescence (an increase in the emissive capacity of the resulting material by more than 100 times with respect to the emission of the initial UCNPs), thus providing a material with high performance in luminescent upconversion.

- Upconversion nanohybrids coated with the polymers PAMPS, PSS, PEGP and PDF were synthesized. The nanohybrids coated with the PAMPS and PSS polymers showed great stability in aqueous solutions at pH 2, attributed to the strong interaction between the sulfonate groups and the surface of the nanoparticles. However, the nanohybrids passivated with the PEGP and PFD polymers were released from the surface of the nanoparticles under such conditions.

- Coatings with AMPS and PSS provide important protection to UCNPs by preventing their disintegration in aqueous media.

- UCNP_{CS}@CB[7]@Nd nanohybrids were synthesized by using the free portal of the CB[7] to anchor the Nd³⁺ ions outside the crystal structure of the NP and at approximately 1 nm of distance from its surface.

- Selective excitation of neodymium at 800 nm showed that Nd³⁺ can act as a sensitizer in upconversion processes when it is in the organic layer.

Resumen

Actualmente existe una importante variedad de métodos sintéticos para la preparación de UCNPs, los cuales permiten controlar parámetros tales como tamaño, forma o fase de las UCNPs. A pesar de ello, la estabilidad del recubrimiento de las UCNPs en medios acuosos y, principalmente, en medios ácidos es una de las limitaciones para su uso en diversas aplicaciones biológicas o tecnológicas. Además, la longitud de onda de excitación NIR de la UCNP es relevante cuando se utilizan disoluciones acuosas, ya que la absorción del agua a 980 nm filtra la absorción del Yb^{3+} y causa calentamiento de la muestra, lo que es particularmente nocivo para muestras biológicas. La solución aportada en la bibliografía es utilizar Nd^{3+} como fotosensibilizador de Yb^{3+} para, finalmente, producir el proceso de emisión upconversion. Esta solución permite utilizar luz NIR a 800 nm, donde el agua presenta escasa absorción, pero requiere de síntesis de UCNPs multicapa para distanciar el Nd^{3+} del activador (emisor de la luz).

Por lo tanto, la estabilidad y funcionalidad de la capa orgánica que recubre la UCNP, así como la excitación de la UCNP a longitudes donde no absorbe el agua, son retos importantes a abordar y requieren del diseño e ingeniería de la superficie de las UCNPs. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han establecido estrategias para avanzar en la estabilidad de las UCNPs y, por tanto, su versatilidad en aplicaciones biológicas y/o tecnológicas.

En los capítulos 5, 6 y 7 se describen los estudios de la estabilidad de la estructura cristalina de las UCNPs. En primer lugar, se estudió la estabilidad en medios ácidos de nanohíbridos de UCNP (específicamente, NaYF_4 dopada con Yb^{3+} y Er^{3+}) pasivados con el copolímero HEMA-co-AMPS (COP), *capítulo 5*. El recubrimiento de la superficie de la UCNP con el copolímero resultó en una estabilidad excepcional del nanohíbrido UCNP@COP en condiciones fuertemente ácidas (pH 2). La estabilidad del recubrimiento es debida a la fuerte

interacción de los grupos sulfonatos (SO_3^-) del COP con la superficie de la UCNP. Esta fuerte interacción no se observa con otros grupos anclantes comúnmente utilizados en las UCNPs, tales como los carboxilatos, aminas o tiolatos, cuya mayor basicidad facilita su protonación en medios ácidos, disminuyendo así su capacidad de coordinación a la superficie de la UCNP.

Se exploró la aplicación del nanohíbrido UCNP como sensor de pH mediante el anclaje de un colorante catiónico, específicamente azul de metileno (MB), a los grupos sulfonato en la periferia de UCNP@COP. La liberación del colorante se puede rastrear desde pH neutro hasta un pH de aproximadamente 2.

La colaboración con la empresa CEINNMMAT para preparar composites luminiscentes basados en UCNPs reveló que el pasivado de las UCNPs con los recubrimientos convencionales daba lugar a composites poco luminiscentes debido al medio ácido necesario para el proceso sol-gel. Por lo que el objetivo planteado fue desarrollar UCNPs recubiertas con pequeñas moléculas que permaneciesen ancladas a la superficie de la UCNP para permitir desarrollar un composite luminiscente.

En el *capítulo 6* se comenta la síntesis de UCNPs de NaYF_4 dopada con Yb^{3+} y Er^{3+} o Tm^{3+} recubiertas con ligandos orgánicos de longitud de cadena corta y de fórmula $\text{X-CH}_2\text{CO-Z}$, donde X es un halógeno y Z es -H, -R, -COR, -OH, -NH₂, -NHR, -NR₂ (donde R es una cadena alquílica lineal o ramificada). La unión de estos ligandos a la superficie de las UCNP permitió desarrollar un material composite con una matriz cerámica por medio de un proceso sol-gel que requiere una etapa de drástico tratamiento ácido. Esta invención para la síntesis del composite con el material luminiscente fue patentada con éxito y se encuentra registrada en la patente internacional WO 2018/002405 A1.

En el *capítulo 7* se estudió cómo estabilizar el recubrimiento de las UCNPs en medios fuertemente ácidos, así como evitar la desintegración de la estructura de la UCNP en medios acuosos, proceso observado por otros autores en dispersiones de UCNP pasivadas con policarboxilatos con concentraciones inferiores a 100 $\mu\text{g/mL}$.

UCNPs dopadas con Yb^{3+} y Er^{3+} o Tm^{3+} y recubiertas con los ligandos pAMPS, PSS, PDF o PPEG fueron expuestas a condiciones fuertemente ácidas (pH 2). Las imágenes de HRTEM y los espectros de FTIR demostraron que los nanohíbridos recubiertos con pAMPS y PSS no se vieron afectados, es decir el ligando permaneció fuertemente anclado a la superficie por el grupo sulfonato. Sin embargo, bajo estas condiciones, el recubrimiento de la UCNP desaparece cuando se utiliza PDF y PPEG.

Teniendo en cuenta la estabilidad de los nanohíbridos de UCNP recubiertos con pAMPS y PSS a pH 2, posteriormente se llevó a cabo un análisis para determinar la protección que estos ligandos podían proporcionar frente a la desintegración de la UCNP en medio acuoso, utilizando dispersiones muy diluidas ($<10 \mu\text{g/mL}$). Con fines comparativos, los estudios fueron también realizados con la UCNP desnuda. Los análisis de ICP-masas, TEM y emisión demostraron que los recubrimientos otorgan una importante protección a las UCNP, reduciendo la pérdida de iones lantánidos y, por tanto, la desintegración de la estructura cristalina en medio acuoso. En consecuencia, la intensidad de emisión de las UCNP recubiertas con estos ligandos no varía significativamente, al contrario de lo observado para las UCNP desnudas. Estos datos confirman que los recubrimientos seleccionados, ambos con grupos anclantes sulfonato, no solo otorgan dispersabilidad a las UCNP en medios acuosos, sino que además

preservan la integridad de la nanopartícula en medios acuosos y evitan la toxicidad causada por la liberación de iones fluoruro.

Por último, en el *capítulo 8* se prepararon nanohíbridos novedosos con iones Nd^{3+} en la capa orgánica de la UCNP con el fin de estudiar su potencial como sensibilizador del proceso de upconversion. El objetivo era modificar la longitud de onda de irradiación de 980 nm a 800 nm evitando la síntesis de UCNPs multicapa. Se desarrolló una estrategia novedosa para anclar los átomos de Nd^{3+} utilizando un macrociclo orgánico, específicamente cucurbit[7]urilo (CB[7]), macromolécula simétrica, rígida y con dos portales idénticos con capacidad para anclar cationes. La unión del CB[7] a la superficie de las UCNP desnudas dio lugar a UCNP@CB[7].

La posterior adición de Nd^{3+} permitió la formación del nanohíbrido UCNP@CB[7]@Nd, por interacción ion-dipolo del ión lantánido con el portal libre del CB[7]. La presencia de iones Nd^{3+} en la capa orgánica delgada que recubre la superficie de la UCNP se confirmó por EDS. Además, las imágenes HAADF-STEM permitieron detectar la presencia de iones Nd^{3+} en el recubrimiento orgánico de la UCNP, a una distancia de 1 nm de la superficie de la UCNP. La excitación a 800 nm de una muestra de UCNP@CB[7]@Nd depositada en vidrio demostró la transferencia de energía $\text{Nd} \rightarrow \text{Yb} \rightarrow \text{Er}$ en el nanohíbrido, a pesar de que la UCNP presentaba una shell inactiva (NaYF_4). Este es el primer ejemplo en la bibliografía que demuestra que el Nd^{3+} es capaz de fotosensibilizar un proceso de upconversion sin estar encapsulado en una matriz inorgánica.

Abstract

Currently, there are different methodologies for the preparation of UCNPs with controlled crystalline phase, size and shape. However, the organic coating of the UCNP obtained upon their functionalization, usually shows low stability in aqueous and acidic media which hindered their use in biological or technological applications. In addition, the use of NIR excitation in aqueous solutions could heat the medium due to competitive water absorption with Yb^{3+} ions at 980 nm, which is particularly harmful for biological samples. The latest limitation has been addressed by using Nd^{3+} ions together with Yb^{3+} as photosensitizers, which allows excitation at 800 nm, a wavelength where water absorption is low. However, this approach requires the synthesis of multilayer UCNPs to separate the Nd^{3+} from the activator (light emitter).

All this considered, the stability and functionality of the organic ligands at UCNP surface, as well as the preparation of systems that allow the selection of excitation wavelengths where water absorption is minimal, are important challenges to be addressed which require the design and surface engineering of the UCNPs. In this doctoral thesis several strategies have been addressed to advance in the stability of the UCNPs and, therefore, their versatility in biological and/or technological applications.

Chapters 5, 6, and 7 describe the stability of the UCNP crystal structure. First, the stability of UCNP nanohybrids (specifically, NaYF_4 doped with Yb^{3+} and Er^{3+}) passivated with the HEMA-co-AMPS (COP) copolymer was studied in acidic media, chapter 5. The UCNP capped with this copolymer, UCNP@COP, resulted in an exceptional stability under strongly acidic conditions (pH=2). The stability of the coating was attributed to the strong interaction of the sulfonate groups (SO_3^-) of the

COP with the UCNP surface. This strong interaction is not observed with other anchoring groups commonly used in UCNP, such as carboxylates, amines or thiolates, whose greater basicity facilitates their protonation in acidic media, thus reducing their ability to coordinate to the UCNP surface.

The application of the UCNP nanohybrid as pH sensor was explored through anchoring of a cationic dye, specifically methylene blue (MB), to the sulfonate groups at the periphery of UCNP@COP. The release of MB can be tracked from neutral to a pH of about 2.

In collaboration with the company CEINMMAT to prepare luminescent composites based on UCNP, it was observed that the passivation of UCNP with conventional coatings resulted in low-luminescent composites due to the acidic medium necessary for the sol-gel process. Therefore, we focused on the development of UCNP coated with small molecules that would remain anchored to the UCNP surface and allow the preparation of a luminescent composite.

In chapter 6, the synthesis of Yb^{3+} and Er^{3+} or Tm^{3+} doped NaYF_4 UCNP coated with short-chain length organic ligands of $\text{X-CH}_2\text{CO-Z}$ formula is described, where X is a halogen and Z is -H, -R, -COR, -OH, - NH_2 , -NHR, - NR_2 (where R is a straight or branched alkyl chain). The union of these ligands to the UCNP surface allowed to develop a composite material within a ceramic matrix by means of a sol-gel process that requires a drastic acid treatment step. This invention for the synthesis of the composite with the luminescent material was successfully patented and is registered in the international patent WO 2018/002405 A1.

In Chapter 7, we studied the stabilization of the UCNP coating in strongly acidic media, as well as how to avoid the disintegration of the UCNP structure in aqueous media, a process observed by other authors

in dispersions of UCNP passivated with polycarboxylates at concentrations below 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

UCNPs doped with Yb^{3+} and Er^{3+} or Tm^{3+} and coated with the pAMPS, PSS, PDF or PPEG ligands were exposed to strongly acidic conditions (pH 2). The HRTEM images and FTIR spectra showed that the pAMPS and PSS coated nanohybrids were not affected, indicating that the ligand remained strongly anchored to the surface by the sulfonate group. In contrast, the UCNP coating disappears under identical conditions when PDF and PPEG (fluorinated or phosphorylated polymers) are used.

Taking into account the stability of the UCNP nanohybrids coated with pAMPS and PSS at pH 2, an analysis to determine the protection that these ligands could provide against the disintegration of UCNP in aqueous medium was carried out, using highly diluted dispersions ($<10 \mu\text{g}/\text{mL}$). The results were compared with those using naked UCNP. The analysis of ICP-MS, TEM and emission showed that the coatings provided an important protection to UCNPs, reduced the loss of lanthanide ions and, therefore, the disintegration of the UCNP crystalline structure in the medium. Consequently, the emission intensity variation of UCNPs coated with these ligands was significantly lower. In contrast with that observed for naked UCNPs. These results confirm that the selected coatings, both with sulfonate anchoring groups, not only provide dispersibility to UCNP in aqueous media, but also preserve their integrity in aqueous media and prevent the toxicity caused by the release of fluoride ions.

Finally, in Chapter 8, novel nanohybrids with Nd^{3+} ions in the organic layer of the UCNP were prepared to study its potential as a sensitizer of the upconversion process by modification of the irradiation wavelength from 980 nm to 800 nm avoiding the synthesis of multilayer

UCNPs. A novel strategy to anchor the Nd^{3+} atoms using an organic macrocycle was developed, specifically the cucurbit[7]uril (CB[7]), a symmetric and rigid macromolecule with two identical portals capable of anchoring cations. The binding of the CB[7] to the surface of the naked UCNP resulted in UCNP@CB[7].

The subsequent addition of Nd^{3+} resulted in the formation of the nanohybrid UCNP@CB[7]@Nd, by ion-dipole interaction of the lanthanide ion with the free portal of CB[7]. The presence of Nd^{3+} ions within the thin organic layer coating the UCNP surface was confirmed by EDS, together with HAADF-STEM images which showed the presence of Nd^{3+} ions in the organic coating at a distance of 1 nm from the UCNP surface. The excitation of UCNP@CB[7]@Nd deposited on glass at 800 nm demonstrated the transfer of energy between $\text{Nd} \rightarrow \text{Yb} \rightarrow \text{Er}$ in the nanohybrid, despite the fact that UCNP had an inactive shell (NaYF_4). This is the first example in the literature showing that Nd^{3+} is available to photosensitize an upconversion process without being encapsulated in an inorganic matrix.

Referencias

- [1] S. Anu Mary Ealia, M. P. Saravanakumar, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* **2017**, 263, 032019.
- [2] B. Bhushan, in *Springer Handbook of Nanotechnology* (Ed.: B. Bhushan), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2007**, pp. 1-12.
- [3] R. P. Feynman, *Engineering and Science* **1960**, 23, 22-36.
- [4] M. A. El-Sayed, *Accounts of Chemical Research* **2004**, 37, 326-333.
- [5] S.-n. Uno, D. K. Tiwari, M. Kamiya, Y. Arai, T. Nagai, Y. Urano, *Microscopy* **2015**, 64, 263-277.
- [6] M. Stanisavljevic, S. Krizkova, M. Vaculovicova, R. Kizek, V. Adam, *Biosensors and Bioelectronics* **2015**, 74, 562-574.
- [7] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, *Nature Methods* **2008**, 5, 763-775.
- [8] N. Bloembergen, *Physical Review Letters* **1959**, 2, 84-85.
- [9] F. Auzel, *Academic Science* **1966**, 1016.
- [10] X. Li, F. Zhang, D. Zhao, *Chemical Society Reviews* **2015**, 44, 1346-1378.
- [11] F. Auzel, *Chemical Reviews* **2004**, 104, 139-174.
- [12] H. T. Zhang, L. P.; Liu, X. M., in *Upconverting Nanomaterials; CRC Press*, **2016**, p. 19.
- [13] R. Naccache, Q. Yu, J. A. Capobianco, *Advanced Optical Materials* **2015**, 3, 482-509.
- [14] Z. Xia, Z. Xu, in *Phosphors, Up Conversion Nano Particles, Quantum Dots and Their Applications: Volume 1* (Ed.: R.-S. Liu), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2017**, pp. 285-341.
- [15] H. Dong, L.-D. Sun, C.-H. Yan, *Chemical Society Reviews* **2015**, 44, 1608-1634.
- [16] J. Zhou, Q. Liu, W. Feng, Y. Sun, F. Li, *Chemical Reviews* **2015**, 115, 395-465.
- [17] Y. I. Park, J. H. Kim, K. T. Lee, K.-S. Jeon, H. B. Na, J. H. Yu, H. M. Kim, N. Lee, S. H. Choi, S.-I. Baik, H. Kim, S. P. Park, B.-J. Park, Y. W. Kim, S. H. Lee, S.-Y. Yoon, I. C. Song, W. K. Moon, Y. D. Suh, T. Hyeon, *Advanced Materials* **2009**, 21, 4467-4471.
- [18] N. M. Idris, Z. Li, L. Ye, E. K. W. Sim, R. Mahendran, P. C.-L. Ho, Y. Zhang, *Biomaterials* **2009**, 30, 5104-5113.
- [19] Z. Li, Y. Zhang, S. Jiang, *Advanced Materials* **2008**, 20, 4765-4769.
- [20] M. Yu, F. Li, Z. Chen, H. Hu, C. Zhan, H. Yang, C. Huang, *Analytical Chemistry* **2009**, 81, 930-935.
- [21] K. Lingeshwar Reddy, R. Balaji, A. Kumar, V. Krishnan, *Small* **2018**, 14, 1801304.
- [22] H. H. Gorris, O. S. Wolfbeis, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, 52, 3584-3600.
- [23] G. Tian, Z. Gu, L. Zhou, W. Yin, X. Liu, L. Yan, S. Jin, W. Ren, G. Xing, S. Li, Y. Zhao, *Advanced Materials* **2012**, 24, 1226-1231.
- [24] L. M. Wiesholler, T. Hirsch, *Optical Materials* **2018**, 80, 253-264.

- [25] K. W. Prorok, D.; Misiak, M.; Bednarkiewicz, A., in *Upconverting Nanomaterials*; CRC Press, **2016**.
- [26] A. Bansal, Z. Yong, in *Upconverting Nanomaterials*; CRC Press, **2016**, p. 255.
- [27] O. S. Wolfbeis, *Chemical Society Reviews* **2015**, *44*, 4743-4768.
- [28] H. Dong, L.-D. Sun, C.-H. Yan, *Nanoscale* **2013**, *5*, 5703-5714.
- [29] C. C. Lin, R.-S. Liu, in *Phosphors, Up Conversion Nano Particles, Quantum Dots and Their Applications: Volume 1* (Ed.: R.-S. Liu), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2017**, pp. 1-29.
- [30] W. Zhang, S. Yang, J. Li, W. Gao, Y. Deng, W. Dong, C. Zhao, G. Lu, *Applied Catalysis B: Environmental* **2017**, *206*, 89-103.
- [31] A. Patra, C. S. Friend, R. Kapoor, P. N. Prasad, *Applied Physics Letters* **2003**, *83*, 284-286.
- [32] G. Yi, H. Lu, S. Zhao, Y. Ge, W. Yang, D. Chen, L.-H. Guo, *Nano Letters* **2004**, *4*, 2191-2196.
- [33] F. Wang, X. Liu, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 5642-5643.
- [34] J. A. Capobianco, F. Vetrone, J. C. Boyer, A. Speghini, M. Bettinelli, *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 1181-1187.
- [35] F. Vetrone, R. Naccache, V. Mahalingam, C. G. Morgan, J. A. Capobianco, *Advanced Functional Materials* **2009**, *19*, 2924-2929.
- [36] B. F. Zhang, M. Frigoli, F. Angiuli, F. Vetrone, J. A. Capobianco, *Chemical Communications* **2012**, *48*, 7244-7246.
- [37] K. Lemański, B. Bondzior, D. Szymański, P. J. Dereń, *New Journal of Chemistry* **2019**, *43*, 6242-6248.
- [38] D. Wawrzynczyk, M. Nyk, A. Bednarkiewicz, W. Strek, M. Samoc, *Journal of Nanoparticle Research* **2014**, *16*, 2690.
- [39] V. Mahalingam, R. Naccache, F. Vetrone, J. A. Capobianco, *Opt. Express* **2012**, *20*, 111-119.
- [40] G. Wang, Q. Peng, Y. Li, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 14200-14201.
- [41] S. Heer, K. Kömpe, H. U. Güdel, M. Haase, *Advanced Materials* **2004**, *16*, 2102-2105.
- [42] B. P. Singh, A. K. Parchur, R. K. Singh, A. A. Ansari, P. Singh, S. B. Rai, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15*, 3480-3489.
- [43] K. Rademaker, *Rare Earth-doped Alkali-lead-halide Laser Crystals of Low-phonon Energy*, Cuvillier, **2005**.
- [44] J. Ganem, S. R. Bowman, *Nanoscale Research Letters* **2013**, *8*, 455.
- [45] J. Shan, W. Kong, R. Wei, N. Yao, Y. Ju, *Journal of Applied Physics* **2010**, *107*, 054901.
- [46] L. G. Jacobsohn, C. J. Kucera, T. L. James, K. B. Sprinkle, J. R. DiMaio, B. Kokuoz, B. Yazgan-Kukouz, T. A. DeVol, J. Ballato, *Materials* **2010**, *3*, 2053-2068.
- [47] M. Wang, G. Abbineni, A. Clevenger, C. Mao, S. Xu, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2011**, *7*, 710-729.
- [48] M. V. DaCosta, S. Doughan, Y. Han, U. J. Krull, *Analytica Chimica Acta* **2014**, *832*, 1-33.
- [49] B. R. Judd, *Physical Review* **1962**, *127*, 750-761.
- [50] V. Muhr, S. Wilhelm, T. Hirsch, O. S. Wolfbeis, *Accounts of Chemical Research* **2014**, *47*, 3481-3493.

- [51] F. Zhang, in *Photon Upconversion Nanomaterials* (Ed.: F. Zhang), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2015**, pp. 21-71.
- [52] G. Chen, H. Qiu, P. N. Prasad, X. Chen, *Chemical Reviews* **2014**, *114*, 5161-5214.
- [53] K. W. Krämer, D. Biner, G. Frei, H. U. Güdel, M. P. Hehlen, S. R. Lüthi, *Chemistry of Materials* **2004**, *16*, 1244-1251.
- [54] Z.-G. Yan, C.-H. Yan, *Journal of Materials Chemistry* **2008**, *18*, 5046-5059.
- [55] M. Wang, C.-C. Mi, J.-L. Liu, X.-L. Wu, Y.-X. Zhang, W. Hou, F. Li, S.-K. Xu, *Journal of Alloys and Compounds* **2009**, *485*, L24-L27.
- [56] H.-X. Mai, Y.-W. Zhang, R. Si, Z.-G. Yan, L.-d. Sun, L.-P. You, C.-H. Yan, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 6426-6436.
- [57] F. Wang, X. Liu, *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 976-989.
- [58] Y.-W. Zhang, X. Sun, R. Si, L.-P. You, C.-H. Yan, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 3260-3261.
- [59] V. K. LaMer, R. H. Dinegar, *Journal of the American Chemical Society* **1950**, *72*, 4847-4854.
- [60] C. B. Murray, C. R. Kagan, M. G. Bawendi, *Annual Review of Materials Science* **2000**, *30*, 545-610.
- [61] J. Park, J. Joo, S. G. Kwon, Y. Jang, T. Hyeon, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 4630-4660.
- [62] X. Ye, J. E. Collins, Y. Kang, J. Chen, D. T. N. Chen, A. G. Yodh, C. B. Murray, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 22430.
- [63] J.-C. Boyer, F. Vetrone, L. A. Cuccia, J. A. Capobianco, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 7444-7445.
- [64] J.-C. Boyer, L. A. Cuccia, J. A. Capobianco, *Nano Letters* **2007**, *7*, 847-852.
- [65] P. W. Voorhees, *Journal of Statistical Physics* **1985**, *38*, 231-252.
- [66] V. Voliani, M. Gemmi, L. Francés-Soriano, M. González-Béjar, J. Pérez-Prieto, *The Journal of Physical Chemistry C* **2014**, *118*, 11404-11408.
- [67] Z. Li, Y. Zhang, *Nanotechnology* **2008**, *19*, 345606.
- [68] H.-S. Qian, Y. Zhang, *Langmuir* **2008**, *24*, 12123-12125.
- [69] S. Komarneni, D. Li, B. Newalkar, H. Katsuki, A. S. Bhalla, *Langmuir* **2002**, *18*, 5959-5962.
- [70] Q. Pang, J. Shi, Y. Liu, D. Xing, M. Gong, N. Xu, *Materials Science and Engineering: B* **2003**, *103*, 57-61.
- [71] A. Patra, C. S. Friend, R. Kapoor, P. N. Prasad, *The Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 1909-1912.
- [72] A. Patra, C. S. Friend, R. Kapoor, P. N. Prasad, *Chemistry of Materials* **2003**, *15*, 3650-3655.
- [73] S. F. Himmelstoß, T. Hirsch, *Particle & Particle Systems Characterization* **2019**, *36*, 1900235.
- [74] C. Ma, T. Bian, S. Yang, C. Liu, T. Zhang, J. Yang, Y. Li, J. Li, R. Yang, W. Tan, *Analytical Chemistry* **2014**, *86*, 6508-6515.
- [75] Q. Zhan, J. Qian, H. Liang, G. Somesfalean, D. Wang, S. He, Z. Zhang, S. Andersson-Engels, *ACS Nano* **2011**, *5*, 3744-3757.
- [76] L. Wang, Y. Li, *Chemical Communications* **2006**, 2557-2559.
- [77] M. Buchner, V. Muhr, S. Himmelstoß, T. Hirsch, **2016**, pp. 69-100.

- [78] J.-C. Boyer, M.-P. Manseau, J. I. Murray, F. C. J. M. van Veggel, *Langmuir* **2010**, *26*, 1157-1164.
- [79] L. Xia, X. Kong, X. Liu, L. Tu, Y. Zhang, Y. Chang, K. Liu, D. Shen, H. Zhao, H. Zhang, *Biomaterials* **2014**, *35*, 4146-4156.
- [80] 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, J. Pérez-Prieto, *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2*, 4554-4563.
- [81] V. Voliani, M. González-Béjar, V. Herranz-Pérez, M. Duran-Moreno, G. Signore, J. M. Garcia-Verdugo, J. Pérez-Prieto, *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, 13538-13546.
- [82] L. Francés-Soriano, M. González-Béjar, J. Pérez-Prieto, in *Upconverting Nanomaterials*, **2016**.
- [83] N. Bogdan, F. Vetrone, G. A. Ozin, J. A. Capobianco, *Nano Letters* **2011**, *11*, 835-840.
- [84] A. Dong, X. Ye, J. Chen, Y. Kang, T. Gordon, J. M. Kikkawa, C. B. Murray, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 998-1006.
- [85] A. Nsubuga, K. Zarschler, M. Sgarzi, B. Graham, H. Stephan, T. Joshi, *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57*, 16036-16040.
- [86] S. Wilhelm, M. Kaiser, C. Würth, J. Heiland, C. Carrillo-Carrion, V. Muhr, O. S. Wolfbeis, W. J. Parak, U. Resch-Genger, T. Hirsch, *Nanoscale* **2015**, *7*, 1403-1410.
- [87] V. Muhr, C. Würth, M. Kraft, M. Buchner, A. J. Baeumner, U. Resch-Genger, T. Hirsch, *Analytical Chemistry* **2017**, *89*, 4868-4874.
- [88] L. Francés-Soriano, M. González-Béjar, J. Pérez-Prieto, *Nanoscale* **2015**, *7*, 5140-5146.
- [89] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [90] Z. Chen, H. Chen, H. Hu, M. Yu, F. Li, Q. Zhang, Z. Zhou, T. Yi, C. Huang, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 3023-3029.
- [91] L. Wang, R. Yan, Z. Huo, L. Wang, J. Zeng, J. Bao, X. Wang, Q. Peng, Y. Li, *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 6054-6057.
- [92] S. H. Nam, Y. M. Bae, Y. I. Park, J. H. Kim, H. M. Kim, J. S. Choi, K. T. Lee, T. Hyeon, Y. D. Suh, *Angewandte Chemie* **2011**, *123*, 6217-6221.
- [93] C. Chen, C. Li, Z. Shi, *Adv Sci (Weinh)* **2016**, *3*, 1600029-1600029.
- [94] F. Chen, G. Hableel, E. R. Zhao, J. V. Jokerst, *Journal of Colloid and Interface Science* **2018**, *521*, 261-279.
- [95] S. Sivakumar, P. R. Diamente, F. C. J. M. van Veggel, *Chemistry – A European Journal* **2006**, *12*, 5878-5884.
- [96] Z. Li, Y. Zhang, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 7732-7735.
- [97] M. Wang, C. Mi, Y. Zhang, J. Liu, F. Li, C. Mao, S. Xu, *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, 19021-19027.
- [98] N. M. Idris, M. K. Gnanasammandhan, J. Zhang, P. C. Ho, R. Mahendran, Y. Zhang, *Nature Medicine* **2012**, *18*, 1580-1585.
- [99] J. Wang, F.-Y. Wen, Z.-H. Zhang, X.-D. Zhang, Z.-J. Pan, P. Zhang, P.-L. Kang, J. Tong, L. Wang, L. Xu, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2006**, *180*, 189-195.

- [100] W. Qin, D. Zhang, D. Zhao, L. Wang, K. Zheng, *Chemical Communications* **2010**, *46*, 2304-2306.
- [101] M. M. Lezhnina, T. Jüstel, H. Kätker, D. U. Wiechert, U. H. Kynast, *Advanced Functional Materials* **2006**, *16*, 935-942.
- [102] F. Zhang, R. Che, X. Li, C. Yao, J. Yang, D. Shen, P. Hu, W. Li, D. Zhao, *Nano Letters* **2012**, *12*, 2852-2858.
- [103] Q. Dou, N. M. Idris, Y. Zhang, *Biomaterials* **2013**, *34*, 1722-1731.
- [104] K. A. Abel, J.-C. Boyer, C. M. Andrei, F. C. J. M. van Veggel, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2011**, *2*, 185-189.
- [105] C. Dong, A. Korinek, B. Blasiak, B. Tomanek, F. C. J. M. van Veggel, *Chemistry of Materials* **2012**, *24*, 1297-1305.
- [106] J. Shen, G. Chen, A.-M. Vu, W. Fan, O. S. Bilsel, C.-C. Chang, G. Han, *Advanced Optical Materials* **2013**, *1*, 644-650.
- [107] X. Xie, N. Gao, R. Deng, Q. Sun, Q.-H. Xu, X. Liu, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 12608-12611.
- [108] D. K. Chatterjee, A. J. Rufaihah, Y. Zhang, *Biomaterials* **2008**, *29*, 937-943.
- [109] H. J. M. A. A. Zijlmans, J. Bonnet, J. Burton, K. Kardos, T. Vail, R. S. Niedbala, H. J. Tanke, *Analytical Biochemistry* **1999**, *267*, 30-36.
- [110] K. L. Reddy, M. Rai, N. Prabhakar, R. Arppe, S. B. Rai, S. K. Singh, J. M. Rosenholm, V. Krishnan, *RSC Advances* **2016**, *6*, 53698-53704.
- [111] Y. Liu, K. Ai, J. Liu, Q. Yuan, Y. He, L. Lu, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 1437-1442.
- [112] Z. Hou, C. Li, P. a. Ma, Z. Cheng, X. Li, X. Zhang, Y. Dai, D. Yang, H. Lian, J. Lin, *Advanced Functional Materials* **2012**, *22*, 2713-2722.
- [113] X. Kang, Z. Cheng, D. Yang, P. a. Ma, M. Shang, C. Peng, Y. Dai, J. Lin, *Advanced Functional Materials* **2012**, *22*, 1470-1481.
- [114] C. Wang, L. Cheng, Z. Liu, *Biomaterials* **2011**, *32*, 1110-1120.
- [115] X. Kang, Z. Cheng, C. Li, D. Yang, M. Shang, P. a. Ma, G. Li, N. Liu, J. Lin, *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115*, 15801-15811.
- [116] H. Dong, S. Tang, Y. Hao, H. Yu, W. Dai, G. Zhao, Y. Cao, H. Lu, X. Zhang, H. Ju, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2016**, *8*, 3107-3114.
- [117] F. Lu, L. Yang, Y. Ding, J.-J. Zhu, *Advanced Functional Materials* **2016**, *26*, 4778-4785.
- [118] A. Sedlmeier, H. H. Gorris, *Chemical Society Reviews* **2015**, *44*, 1526-1560.
- [119] L. Xie, Y. Qin, H.-Y. Chen, *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 1969-1974.
- [120] L.-N. Sun, H. Peng, M. I. J. Stich, D. Achatz, O. S. Wolfbeis, *Chemical Communications* **2009**, 5000-5002.
- [121] R. Ali, S. M. Saleh, R. J. Meier, H. A. Azab, I. I. Abdelgawad, O. S. Wolfbeis, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2010**, *150*, 126-131.
- [122] H. Chen, J. Ren, *Talanta* **2012**, *99*, 404-408.
- [123] Y. Zhai, C. Zhu, J. Ren, E. Wang, S. Dong, *Chemical Communications* **2013**, *49*, 2400-2402.
- [124] J. Liu, Y. Liu, Q. Liu, C. Li, L. Sun, F. Li, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 15276-15279.
- [125] J. Chen, H. Chen, C. Zhou, J. Xu, F. Yuan, L. Wang, *Analytica Chimica Acta* **2012**, *713*, 111-114.
- [126] Q. Liu, J. Peng, L. Sun, F. Li, *ACS Nano* **2011**, *5*, 8040-8048.
- [127] M. Kumar, Y. Guo, P. Zhang, *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24*, 1522-1526.

- [128] D. Li, G. Chen, in *Dye-Sensitized Solar Cells* (Eds.: M. Soroush, K. K. S. Lau), Academic Press, **2019**, pp. 325-340.
- [129] Q. Guo, J. Wu, Y. Yang, X. Liu, J. Jia, J. Dong, Z. Lan, J. Lin, M. Huang, Y. Wei, Y. Huang, *Journal of Power Sources* **2019**, *426*, 178-187.
- [130] C. A. Tajon, H. Yang, B. Tian, Y. Tian, P. Ercius, P. J. Schuck, E. M. Chan, B. E. Cohen, *Optical Materials* **2018**, *84*, 345-353.
- [131] S. Ye, Y. Teng, A. Juan, J. Wei, L. Wang, J. Guo, *Advanced Optical Materials* **2017**, *5*, 1600956.
- [132] F. Xu, L. Ding, W. Tao, X.-z. Yang, H.-s. Qian, R.-s. Yao, *Materials Letters* **2016**, *167*, 205-208.
- [133] H. Wang, R.-l. Han, L.-m. Yang, J.-h. Shi, Z.-j. Liu, Y. Hu, Y. Wang, S.-j. Liu, Y. Gan, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2016**, *8*, 4416-4423.
- [134] M. Lin, Y. Gao, T. J. Diefenbach, J. K. Shen, F. J. Hornicek, Y. I. Park, F. Xu, T. J. Lu, M. Amiji, Z. Duan, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, *9*, 7941-7949.
- [135] H. Xu, L. Cheng, C. Wang, X. Ma, Y. Li, Z. Liu, *Biomaterials* **2011**, *32*, 9364-9373.
- [136] X. Liang, J. Fan, Y. Wang, Y. Zhao, R. Jin, T. Sun, M. Cheng, X. Wang, *Journal of Rare Earths* **2017**, *35*, 419-429.
- [137] B. Dong, S. Xu, J. Sun, S. Bi, D. Li, X. Bai, Y. Wang, L. Wang, H. Song, *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21*, 6193-6200.
- [138] B. Jin, S. Wang, M. Lin, Y. Jin, S. Zhang, X. Cui, Y. Gong, A. Li, F. Xu, T. J. Lu, *Biosensors and Bioelectronics* **2017**, *90*, 525-533.
- [139] Z. Dong-sheng, Z. Da-shun, S. Hai-yan, K. Zhang, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2014**, *118*, 1062-1067.
- [140] J. Liu, J. Cheng, Y. Zhang, *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *43*, 252-256.
- [141] J. Lai, B. P. Shah, Y. Zhang, L. Yang, K.-B. Lee, *ACS Nano* **2015**, *9*, 5234-5245.
- [142] Q. Mei, H. Jing, Y. Li, W. Yisibashaer, J. Chen, B. Nan Li, Y. Zhang, *Biosensors and Bioelectronics* **2016**, *75*, 427-432.
- [143] M. K. G. Jayakumar, A. Bansal, B. N. Li, Y. Zhang, *Nanomedicine* **2015**, *10*, 1051-1061.
- [144] B.-Y. Wang, M.-L. Liao, G.-C. Hong, W.-W. Chang, C.-C. Chu, *Nanomaterials (Basel)* **2017**, *7*, 269.
- [145] Z. Hou, Y. Zhang, K. Deng, Y. Chen, X. Li, X. Deng, Z. Cheng, H. Lian, C. Li, J. Lin, *ACS Nano* **2015**, *9*, 2584-2599.
- [146] S. Huang, Z. Cheng, Y. Chen, B. Liu, X. Deng, P. a. Ma, J. Lin, *RSC Advances* **2015**, *5*, 41985-41993.
- [147] P. Ramasamy, P. Chandra, S. W. Rhee, J. Kim, *Nanoscale* **2013**, *5*, 8711-8717.
- [148] M. Wang, G. Abbineni, A. Clevenger, C. Mao, S. Xu, *Nanomedicine: NBM* **2011**, *7*, 710-729.
- [149] S. Hao, L. Yang, H. Qiu, R. Fan, C. Yang, G. Chen, *Nanoscale* **2015**, *7*, 10775-10780.
- [150] A. Pandey, V. K. Rai, V. Kumar, V. Kumar, H. C. Swart, *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *209*, 352-358.
- [151] J. Peng, C. L. Teoh, X. Zeng, A. Samanta, L. Wang, W. Xu, D. Su, L. Yuan, X. Liu, Y.-T. Chang, *Advanced Functional Materials* **2016**, *26*, 311-311.

- [152] L. Kotin, M. Nagasawa, *Journal of the American Chemical Society* **1961**, *83*, 1026-1028.
- [153] B. Xiao, P. J. Byrne, P. S. Wheatley, D. S. Wragg, X. Zhao, A. J. Fletcher, K. M. Thomas, L. Peters, J. S. O. Evans, J. E. Warren, W. Zhou, R. E. Morris, *Nature Chemistry* **2009**, *1*, 289-294.
- [154] J. A. Hurd, R. Vaidhyanathan, V. Thangadurai, C. I. Ratcliffe, I. L. Moudrakovski, G. K. H. Shimizu, *Nature Chemistry* **2009**, *1*, 705-710.
- [155] Q.-Y. Liu, W.-F. Wang, Y.-L. Wang, Z.-M. Shan, M.-S. Wang, J. Tang, *Inorganic Chemistry* **2012**, *51*, 2381-2392.
- [156] P. Thuéry, *CrystEngComm* **2012**, *14*, 3363-3366.
- [157] P. Thuéry, *Crystal Growth & Design* **2012**, *12*, 1632-1640.
- [158] F.-Y. Yi, Q.-P. Lin, T.-H. Zhou, J.-G. Mao, *Crystal Growth & Design* **2010**, *10*, 1788-1797.
- [159] M. J. Tapia, H. D. Burrows, *Langmuir* **2002**, *18*, 1872-1876.
- [160] H. Sami, A. K. Maparu, A. Kumar, S. Sivakumar, *PLOS ONE* **2012**, *7*, e36195.
- [161] J. Liu, Y. Huang, A. Kumar, A. Tan, S. Jin, A. Mozhi, X.-J. Liang, *Biotechnology Advances* **2014**, *32*, 693-710.
- [162] D. Wencel, T. Abel, C. McDonagh, *Analytical Chemistry* **2014**, *86*, 15-29.
- [163] M. R. A. d. Armas, y Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, Universidad Complutense de Madrid **2002**.
- [164] M. R. Aguilar, A. Gallardo, J. San Román, A. Cifuentes, *Macromolecules* **2002**, *35*, 8315-8322.
- [165] K. Kogej, S. M. Fonseca, J. Rovisco, M. E. Azenha, M. L. Ramos, J. S. Seixas de Melo, H. D. Burrows, *Langmuir* **2013**, *29*, 14429-14437.
- [166] Y. Min, G. He, Q. Xu, Y. Chen, *Journal of Materials Chemistry A* **2014**, *2*, 1294-1301.
- [167] S. A. Ansari, M. M. Khan, M. O. Ansari, J. Lee, M. H. Cho, *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117*, 27023-27030.
- [168] A. F. Dos Santos, L. F. Terra, R. A. M. Wailemann, T. C. Oliveira, V. d. M. Gomes, M. F. Mineiro, F. C. Meotti, A. Bruni-Cardoso, M. S. Baptista, L. Labriola, *BMC Cancer* **2017**, *17*, 194-194.
- [169] D. Lisjak, O. Plohl, M. Ponikvar-Svet, B. Majaron, *RSC Advances* **2015**, *5*, 27393-27397.
- [170] S. Lahtinen, A. Lyytikäinen, H. Päckilä, E. Hömppi, N. Perälä, M. Lastusaari, T. Soukka, *The Journal of Physical Chemistry C* **2017**, *121*, 656-665.
- [171] O. Dukhno, F. Przybilla, V. Muhr, M. Buchner, T. Hirsch, Y. Mély, *Nanoscale* **2018**, *10*, 15904-15910.
- [172] A. Gnach, T. Lipinski, A. Bednarkiewicz, J. Rybka, J. A. Capobianco, *Chemical Society Reviews* **2015**, *44*, 1561-1584.
- [173] J. A. Mindell, *Annual Review of Physiology* **2012**, *74*, 69-86.
- [174] M. P. Santoyo-Sanchez, M. del Carmen Silva-Lucero, L. Arreola-Mendoza, O. C. Barbier, *Biological Trace Element Research* **2013**, *152*, 367-372.
- [175] G. Otting, *Journal of Biomolecular NMR* **2008**, *42*, 1-9.
- [176] O. Barbier, L. Arreola-Mendoza, L. M. Del Razo, *Chemico-Biological Interactions* **2010**, *188*, 319-333.
- [177] R. Li, Z. Ji, J. Dong, C. H. Chang, X. Wang, B. Sun, M. Wang, Y.-P. Liao, J. I. Zink, A. E. Nel, T. Xia, *ACS Nano* **2015**, *9*, 3293-3306.

- [178] K. S. Mishra, N. Suryaprakash, *Molecules* **2017**, *22*.
- [179] M. Güizado-Rodríguez, A. Ariza-Castolo, G. Merino, A. Vela, H. Noth, V. I. Bakhmutov, R. Contreras, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 9144-9152.
- [180] I. Recalde, N. Estebanez, L. Francés-Soriano, M. Liras, M. González-Béjar, J. Pérez-Prieto, *Nanoscale* **2016**, *8*, 7588-7594.
- [181] N. Estebanez, M. González-Béjar, J. Pérez-Prieto, *ACS Omega* **2019**, *4*, 3012-3019.
- [182] M. J. Weber, *Physical Review B* **1971**, *4*, 3153-3159.
- [183] Q. Zhan, B. Wang, X. Wen, S. He, *Opt. Mater. Express* **2016**, *6*, 1011-1023.
- [184] X. Xie, Z. Li, Y. Zhang, S. Guo, A. I. Pendharkar, M. Lu, L. Huang, W. Huang, G. Han, *Small* **2017**, *13*, 1602843.
- [185] Y. Zhang, Z. Yu, J. Li, Y. Ao, J. Xue, Z. Zeng, X. Yang, T. T. Y. Tan, *ACS Nano* **2017**, *11*, 2846-2857.
- [186] Z. Hou, K. Deng, C. Li, X. Deng, H. Lian, Z. Cheng, D. Jin, J. Lin, *Biomaterials* **2016**, *101*, 32-46.
- [187] B. Liu, C. Li, P. Yang, Z. Hou, J. Lin, *Advanced Materials* **2017**, *29*, 1605434.
- [188] R. Arppe, I. Hyppänen, N. Perälä, R. Peltomaa, M. Kaiser, C. Würth, S. Christ, U. Resch-Genger, M. Schäferling, T. Soukka, *Nanoscale* **2015**, *7*, 11746-11757.
- [189] Y.-F. Wang, G.-Y. Liu, L.-D. Sun, J.-W. Xiao, J.-C. Zhou, C.-H. Yan, *ACS Nano* **2013**, *7*, 7200-7206.
- [190] S. Singh, R. G. Smith, L. G. Van Uitert, *Physical Review B* **1974**, *10*, 2566-2572.
- [191] B. del Rosal, U. Rocha, E. C. Ximendes, E. Martín Rodríguez, D. Jaque, J. G. Solé, *Optical Materials* **2017**, *63*, 185-196.
- [192] E. S. Levy, C. A. Tajon, T. S. Bischof, J. Iafrati, A. Fernandez-Bravo, D. J. Garfield, M. Chamanzar, M. M. Maharbiz, V. S. Sohal, P. J. Schuck, B. E. Cohen, E. M. Chan, *ACS Nano* **2016**, *10*, 8423-8433.
- [193] L. Marciniak, K. Prorok, L. Francés-Soriano, J. Pérez-Prieto, A. Bednarkiewicz, *Nanoscale* **2016**, *8*, 5037-5042.
- [194] E. C. Ximendes, W. Q. Santos, U. Rocha, U. K. Kagola, F. Sanz-Rodríguez, N. Fernández, A. d. S. Gouveia-Neto, D. Bravo, A. M. Domingo, B. del Rosal, C. D. S. Brites, L. D. Carlos, D. Jaque, C. Jacinto, *Nano Letters* **2016**, *16*, 1695-1703.
- [195] D. Hudry, D. Busko, R. Popescu, D. Gerthsen, A. M. M. Abeykoon, C. Kübel, T. Bergfeldt, B. S. Richards, *Chemistry of Materials* **2017**, *29*, 9238-9246.
- [196] X. Huang, J. Lin, *Journal of Materials Chemistry C* **2015**, *3*, 7652-7657.
- [197] Y. Zhong, G. Tian, Z. Gu, Y. Yang, L. Gu, Y. Zhao, Y. Ma, J. Yao, *Advanced Materials* **2014**, *26*, 2831-2837.
- [198] Y. Sun, W. Zhang, B. Wang, X. Xu, J. Chou, O. Shimoni, A. T. Ung, D. Jin, *Chemical Communications* **2018**, *54*, 3851-3854.
- [199] H. Tang, D. Fuentealba, Y. H. Ko, N. Selvapalam, K. Kim, C. Bohne, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 20623-20633.
- [200] L.-L. Liang, Y. Zhao, K. Chen, X. Xiao, K. J. Clegg, Y.-Q. Zhang, Z. Tao, S.-F. Xue, Q.-J. Zhu, G. Wei, *Polymers* **2013**, *5*.
- [201] E. A. Mainicheva, A. A. Tripolskaya, O. A. Gerasko, D. Y. Naumov, V. P. Fedin, *Russian Chemical Bulletin* **2006**, *55*, 1566-1573.

- [202] N. J. J. Johnson, A. Korinek, C. Dong, F. C. J. M. van Veggel, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 11068-11071.
- [203] L. Francés-Soriano, S. Gonzalez-Carrero, E. Navarro-Raga, R. E. Galian, M. González-Béjar, J. Pérez-Prieto, *Advanced Functional Materials* **2016**, *26*, 5131-5138.

Lista de Publicaciones

Artículos publicados relacionados con la tesis

Journal Citation Reports (JCR)

Capítulo 4.

1. 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 (14), 7588-7594.

Índice de Impacto (JCR): 7.367 ; Cuartil: Q1

Capítulo 6.

2. **Estebanez, N.**; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J., Polysulfonate Cappings on Upconversion Nanoparticles Prevent Their Disintegration in Water and Provide Superior Stability in a Highly Acidic Medium. *ACS Omega* **2019**, 4 (2), 3012-3019.

Índice de Impacto (JCR): 3.901; Cuartil: Q1

Capítulo 7

3. **Estebanez, N.**; Ferrera-González, J.; Francés-Soriano, L.; Arenal, R.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J., Breaking the Nd³⁺-sensitized upconversion nanoparticles myth about the need of onion-layered structures. *Nanoscale* **2018**, 10 (26), 12297-12301.

Índice de Impacto (JCR): 6.970; Cuartil: Q1

Patentes relacionada con la tesis

Capítulo 4.

Inventores: PÉREZ PRIETO, Julia; Avda. Blasco Ibáñez, 13, E-46010 Valencia (ES). GONZÁLEZ BÉJAR, María; Avda. Blasco Ibáñez, 13, E-46010 Valencia (ES). **ESTÉBANEZ BLOEM, Néstor Luis**; Avda. Blasco Ibáñez, 13, E-46010 Valencia (ES). FERNÁNDEZ LOZANO, José Francisco; Instituto de Cerámica y Vidrio, ICV-CSIC, Kelsen, 5, E-28049 Madrid (ES). ENRÍQUEZ PÉREZ, Esther; Instituto de Cerámica y Vidrio, ICVCSIC, Kelsen, 5, E-28049 Madrid (ES). LÓPEZ BUENDÍA, Ángel Miguel; Pare Cientific, Catedrático Agustín Escardino, 9, E-46980 Paterna, Valencia (ES).

Title: LUMINESCENT UPCONVERSION MATERIALS AND METHOD FOR PREPARING SAME. **WO 2018/002405 A1**

Otras contribuciones del autor.

1. **Estebanez, N.**; Ferrera-González, J.; Cortez-Cevallos, I. A.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J., Lengthening the Lifetime of Common Emissive Probes to Microseconds by a Jigsaw-Like Construction of NIR-Responsive Nanohybrids. *Advanced Optical Materials* **2020**, 8 (8), 1902030.
2. **Estebanez, N.**; Cortes-Villena, A.; Ferrera-Gonzalez, J.; Galian, R. E.; González-Béjar, M.; González-Carrero, S*.; Pérez-Prieto, J.*
Enviado.



Cite this: *Nanoscale*, 2016, **8**, 7588

Upconversion nanoparticles with a strong acid-resistant capping†

Ileana Recalde,^a Nestor Estebanez,^a Laura Francés-Soriano,^a Marta Liras,^{‡b} María González-Béjar^{*a} and Julia Pérez-Prieto^{*a}

Water-dispersible upconversion nanoparticles (β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺, UCNP) coated with a thin shell of a biocompatible copolymer comprising 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) and 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulphonsulphonic acid (AMPS), which we will term COP, have been prepared by multidentate grafting. This capping is remarkably resistant to strong acidic conditions as low as pH 2. The additional functionality of the smart UCNP@COP nanosystem has been proved by its association to a well-known photosensitizer (namely, methylene blue, MB). The green-to-red emission ratio of the UC@COP@MB nanohybrid exhibits excellent linear dependence in the 7 to 2 pH range as a consequence of the release of the dye as the pH decreases.

Received 25th September 2015,
Accepted 9th March 2016

DOI: 10.1039/c5nr06653k

www.rsc.org/nanoscale

Introduction

Upconversion nanoparticles (UCNPs) with an inorganic matrix doped with rare earths (*e.g.* NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺) have unique photophysical features, such as a large anti-Stokes shift emission after near-infrared (NIR) excitation by using a low-power continuous-wave diode laser. Their excitation at NIR wavelengths considerably reduces background fluorescence, which usually impairs the performance of fluorescence-based assays.^{1,2} In addition, UCNPs do not undergo photobleaching or photoblinking.^{1,2} UCNPs with a hexagonal phase have been extensively used due to their superior upconversion efficiency.¹

UCNPs are usually coated with organic ligands, typically carboxylates.³ However, they lose their coating in a medium with a pH below 4, since the carboxylate (*e.g.*, oleate ligand) is protonated and eventually separates from the nanoparticle surface. In fact, this is the strategy used by Capobianco *et al.* to prepare “naked” UCNPs.³ This capping removal does not only apply to carboxylate ligands but also to ligands anchored *via* other groups.^{4,5–7} It has to be taken into account that the role of the organic capping is not only to determine the dispersibility of a nanoparticle in a specific medium, but also to provide the nanosystem with additional functionality and/or impede

the UCNPs from causing any undesirable interference in the environment (such as a cellular environment).⁸ This protection is of particular relevance in biological applications.⁹

Organic-capped nanoparticles with the ligand remaining at the nanoparticle surface in a broad range of pHs, and particularly at low pHs (such as that of stomach acid which is close to 2), require high acidic anchoring groups. Sulphonic acids are dramatically more acidic (pK_a *ca.* –3) than oleic acid and therefore we envisaged that polymers with a high percentage of sulphonic groups could be grafted to the UCNP surface, thus providing a polymer-capped UCNP with high stability not only in a wide range of pHs, but interestingly in highly acidic media. Indeed, the sulphonic group is ionized in virtually the entire range of pHs¹⁰ and the sulphonate group has three potential coordination sites, which allow for more flexible coordination modes and, as a consequence, can form highly flexible frameworks^{11,12} and hydrogen bonding networks.^{13,14} Thus, trivalent lanthanide sulphonates have been used to build clusters,¹⁵ organic extended frameworks,¹⁶ and complexes,^{17,18} as well as polymeric materials.¹⁹ Polystyrene sulphonate/polyallylamine hydrochloride polymer capsules can host lanthanide-doped inorganic nanoparticles (LaF₃:Tb³⁺, LaVO₄:Eu³⁺ and GdF₃:Tb³⁺) in their hollow cavity.²⁰

In addition, the presence of some of the sulphonic groups at the periphery of the polymer-capped UCNP would provide the system with additional functionality, *e.g.* by covalently linking a pH-probe to give rise to a pH-sensor or by ionic binding to a drug to generate a pH-responsive drug delivery and release nanosystem.²¹ The pH is a key target parameter in a broad range of applications, such as life sciences, food and beverage processing, soil examination, and marine and pharmaceutical research, among others.²²

^aInstituto de Ciencia Molecular (ICMol), Universitat de València, Catedrático José Beltrán, 2, 46980 Paterna, Spain. E-mail: maria.gonzalez@uv.es; julia.perez@uv.es

^bInstituto de Química Orgánica General, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQOG-CSIC), Juan de la Cierva, 3, 28006 Madrid, Spain

†Electronic supplementary information (ESI) available: Additional spectra and data of HEMA, AMPS, COP, UCNP@oleate, UCNP@COP, and UCNP@COP@MB. See DOI: 10.1039/c5nr06653k

‡Current address: IMDEA Energy Institute, Parque tecnológico de Móstoles, Avda. Ramón de la Sagra, 3, 28935, Móstoles, Madrid.

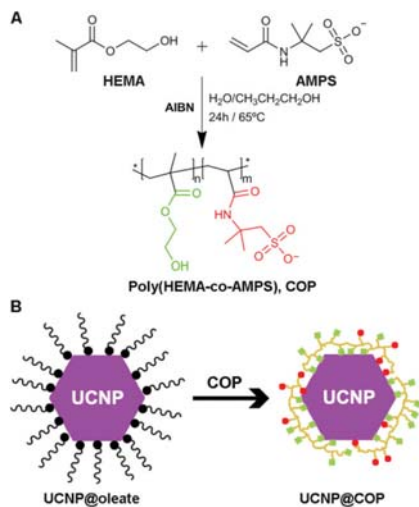


Fig. 1 (A) Structure of the HEMA and AMPS monomers and the synthesis of the poly(HEMA-co-AMPS) co-polymer (COP). (B) Scheme of the synthesis of the functional UCNP@COP nano hybrid.

In particular, water-dispersible UCNPs have recently been proved to be useful for pH measurement and sensing.^{23–26} These UCNPs presented a pH-probe (fluorescent or not) embedded in a silica shell or polymer matrix. The probe underwent a spectral shift according to the pH and, as a consequence, the degree of overlap between its absorption and the UCNP emission wavelengths varied, thus resulting in a change in the ratio between the UCNP emission bands.^{23,25} The response to pH reported for these systems was practically linear in the pH-range of 6–11^{23,24} and 3.2–7.2.²⁵

We report here the preparation of water-dispersible NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ UCNPs capped with a thin shell of a biocompatible copolymer *via* sulphonate-grafting (Fig. 1). The polymer remained firmly attached under strongly acidic conditions (pH down to 2). As proof of the additional functionality of this polymer-capped UCNP, it was electrostatically bound to a well-known photosensitizer, namely methylene blue (MB). This provided a pH-responsive MB release nanosystem with an excellent linear correlation between the ratiometric photoluminescence of the UCNPs and the pH in the 2–7 range.

Results and discussion

Preparation and characterisation of COP

2-Hydroxyethylmethacrylate (HEMA) and 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulphonic acid (AMPS) have previously been used to obtain highly cross-linked copolymers and hydrogels.^{27–30} However, it is possible to minimize the cross-linking and therefore to obtain a water-soluble polymer *via* free radical polymerization at a moderate temperature by using a high percentage of azobisisobutyronitrile (AIBN) as the

initiator^{31,32} (Fig. 1). Thus, the synthesis of the poly(HEMA-co-AMPS) co-polymer with an HEMA/AMPS 70:30 molar ratio, here termed COP, was possible due to the difference in reactivity between methacrylate and acrylamide ($r_{\text{HEMA}} = 6.81$, $r_{\text{AMPS}} = 0.116$)³³ in the free-radical polymerization and by performing a suitable purification protocol, as described by other authors³² (see Experimental section).

The copolymer was characterised by proton Nuclear Magnetic Resonance (¹H-NMR), Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared (FTIR-ATR) spectroscopy, and Thermal Gravimetric Analysis (TGA); see Fig. 2. For comparison, the data of the monomers have been included in the ESI (see Fig. S1–S2†). The ¹H-NMR spectrum of COP matches the

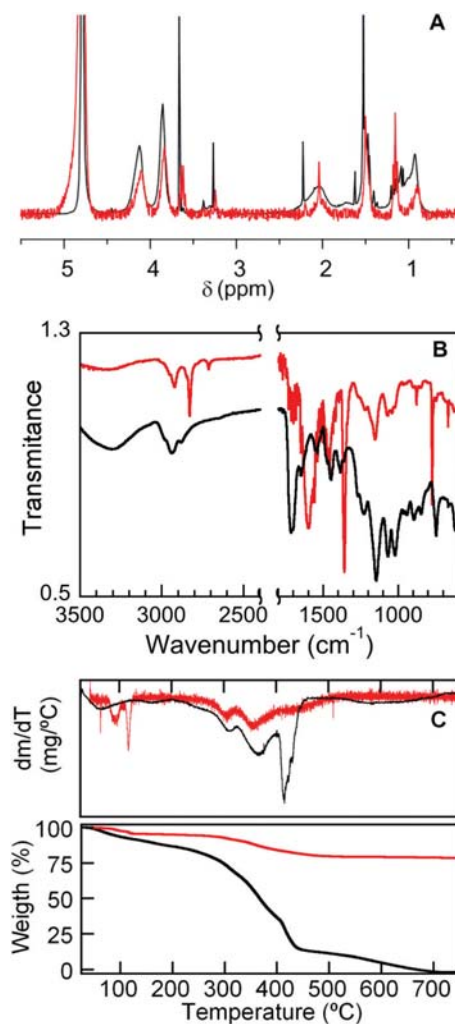


Fig. 2 (A) ¹H-NMR spectra of COP and UCNP@COP in D₂O. (B) FTIR-ATR spectra of COP and UCNP@COP. (C) First derivatives (Top) and TGA analyses (Bottom) of UCNP@COP and COP; black line: COP, red line: UCNP@COP.

one previously reported³¹ and illustrates the disappearance of the vinylic signals of HEMA and AMPS monomers (5.6–6.2 ppm, see ESI†).

The 70 : 30 HEMA/AMPS ratio in the poly(HEMA-*co*-AMPS) co-polymer was confirmed by integrating the CH₂SO₃H and O-CH₂CH₂O methylene protons corresponding to each monomer (see Fig. S1 in the ESI† for detailed values).

The comparison between the FTIR-ATR spectra of HEMA and AMPS monomers and that of COP also evidenced the generation of the copolymer.³² Thus, the signals corresponding to carbon double bonds at 1552 cm⁻¹, and the out-of-plane bending peaks that appear in the 1000–650 cm⁻¹ range for the AMPS monomer disappear whereas the band between 2800–3000 cm⁻¹ is modified due to the CH groups (sp³ stretch) and a new band at 1452 cm⁻¹ can be observed due to the new methylene groups (see Fig. 2 and Fig. S2 in ESI† for comparison with the monomers). Indeed, the two bands of the carbonyl groups (amide and ester) can be observed at 1637 and 1708 cm⁻¹, respectively.

Remarkably, the characteristic S=O asymmetric and symmetric stretches of the COP sulphonic groups are observed at 1367 and 1069 cm⁻¹, respectively, while the S-O stretch is found at 671 cm⁻¹. The copolymer had low polydispersity (1.09) and a molecular weight of ~19 763 g mol⁻¹ (see Table S1 in ESI†).

Preparation and characterisation of the copolymer-capped UCNP (UCNP@COP)

First, oleate-capped NaYF₄:Yb,Er nanoparticles (UCNP@oleate), used as precursors of the copolymer-capped UCNPs (UCNP@COP) were synthesised following a previously reported protocol with some modifications (see ESI†).^{34,35} Transmission electron microscopy (TEM) images of UCNPs@oleate showed the formation of monodisperse hexagonal nanoprisms with a uniform height of 27.3 ± 1.5 nm, and a base length of 20.5 ± 1.4 nm (Fig. 3).

The X-Ray Diffraction (XRD) pattern of the UCNPs revealed the formation of mainly the hexagonal phase structure as bulk β-NaYF₄ (Joint Committee on Powder Diffraction Standards, card no.: JCPDS 16-0334), (see Fig. S3 in the ESI†). The atomic ratios of lanthanides in the nanoparticles were obtained by energy-dispersive X-Ray Experiments (EDX) and were NaYF₄(79%):Yb³⁺(18%),Er³⁺(3%), see Fig. S4.†

Then, the UCNPs@oleate nanoparticles were treated with COP under basic conditions to perform the ligand exchange (see Experimental part for further details). The resulting system exhibited a high dispersibility in water, thus corroborating the efficient ligand exchange as well as the presence of hydrophilic groups at the nanohybrid periphery.³⁶

High-Resolution TEM (HRTEM) images (e.g. Fig. 3c) show the UCNPs@COP nanohybrid presents a thin polymer shell of a thickness of ca. 1.7 ± 0.3 nm, which is consistent with the copolymer multigrafting to the UCNP surface.

Fig. 2 shows the comparison between the ¹H-NMR and FTIR-ATR spectra, as well as the TGA of UCNPs@COP, and those of COP. The ¹H-NMR of the UCNPs@COP nanohybrid cor-

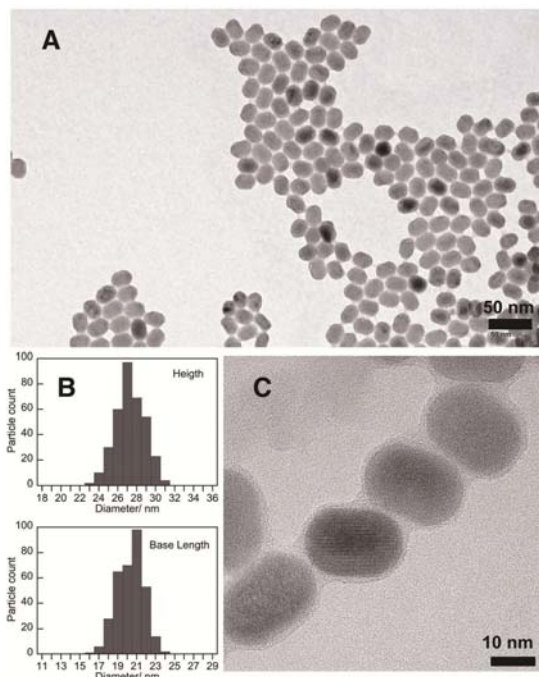


Fig. 3 Representative (A) TEM image of UCNPs@oleate. (B) Histograms of the particle size distribution of UCNPs@oleate. (C) HRTEM image of UCNPs@COP.

roborated the efficient exchange of the oleic acid with the copolymer, since no olefinic signals were detected in the spectrum (see Fig. S5†), and also there was a slight up-field shift of characteristic signals of the copolymer, such as those of CH₂SO₃⁻ and O-CH₂CH₂O. In addition, the FTIR-ATR spectrum revealed significant changes in the band intensity and frequency in the most characteristic bands of COP, such as that of the ester, amide, and sulphate groups (e.g., see bands at 1723 cm⁻¹, and 1396 cm⁻¹).

These changes are consistent with considerable conformational changes in the polymer after grafting to the UCNP surface as well as with the involvement of some of the above-mentioned groups in the binding. The amount of COP in the nanohybrid was determined by TGA (Fig. 2c). The weight contribution of the copolymer in the UCNPs@COP nanohybrid was ca. 20 wt%. The main weight losses (at ca. 298 °C and 352 °C) occurred at similar temperatures to those of COP. However, the typical weight loss at ca. 400 °C observed for this kind of copolymers³² occurred at ca. 430 °C for UCNPs@COP; this suggests a higher thermal stability of the polymer when attached to the UCNP surface. The emission spectrum of the UCNPs@COP nanohybrid at 980 nm excitation wavelength was registered in water (Fig. 4).

As expected, the upconversion emission spectrum of UCNPs@COP showed the typical emissions of the NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ UCNP^{37,38} (the violet, green, and red upconversion emis-

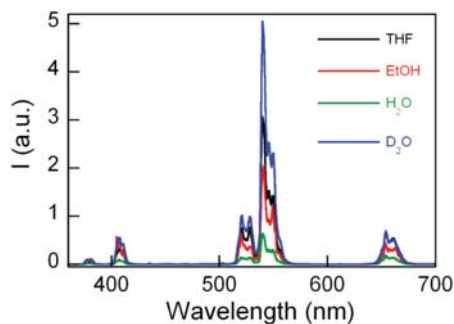


Fig. 4 Upconversion emission spectra UCNP@COP: THF (black), EtOH (red), H₂O (green) and D₂O (blue) under 980 nm laser excitation. The spectra were recorded using the same nanoparticle core concentration.

sions which are characteristic of Er³⁺ and correspond to the ²H_{9/2} → ⁴I_{15/2}, (²H_{11/2}, ⁴S_{3/2}) → ⁴I_{15/2}, and ⁴F_{9/2} → ⁴I_{15/2} transitions, respectively). The emission was exactly the same after 2 h of irradiation, thus evidencing the photostability of the nano-hybrid.

The UCNP@COP nano-hybrid was also dispersible in other media, such as THF, ethanol, and D₂O (Fig. 4). As previously observed for other water-dispersible UCNP, the upconversion emission was considerably higher in D₂O than in water, due to differences in energy of the O–H and O–D stretch vibrations that affect the efficiency of the non-radiative deactivation of the lanthanide luminescence.³⁹

The capping of the UCNP@COP nano-hybrid proved to be stable in a wide range of pHs (from 2 to *ca.* 10), which is consistent with the involvement of the sulphonate groups in the COP multigrafting. As an example, UCNP@COP nanoparticles were dispersed in water solution at a pH of *ca.* 2 for 2 h and then the nanoparticles were precipitated by centrifugation. The solid was washed with water, centrifuged and dried under vacuum. The FTIR spectrum of the solid corroborated that COP remained anchored to the UCNP surface (see Fig. S6†). Moreover, measurements of the conductivity and zeta potential of their colloidal solution and of the supernatants from the purification process were consistent with the negligible loss of COP under the acid treatment (see Table S2†).

The unusual stability of the UCNP organic capping in strong acid media makes UCNP@COP nano-hybrids particularly suitable for many applications where the maintenance of the UCNP capping is crucial for their performance.

It was not expected that all the sulphonate groups would be involved in the COP binding to the UCNP surface, but rather that some would be at the nano-hybrid periphery and, consequently, they would progressively protonate when the pH of the medium decreased. Indeed, the zeta potential of UCNP@COP changed from –33 mV at basic conditions (pH *ca.* 9.5) to –22 mV in the 8 to 3 pH range and became less negative at pHs below 3 (–16 mV at pH *ca.* 2.5), see Fig. 5. These changes are in accordance with those reported for

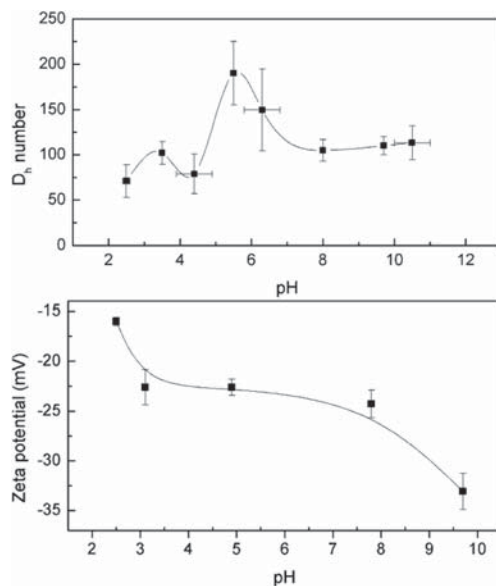


Fig. 5 (Top) Dependence of hydrodynamic diameter (D_h) or (Bottom) Zeta potential vs. pH for UCNP@COP dispersed in water (1 mg mL⁻¹).

poly(styrene sulphonate)-capped UCNP⁴⁰ and they are consistent with the low pK_a of the sulphonate groups.

The dynamic light scattering (DLS) analysis (Fig. 5) performed in the same pH range revealed a considerable change in the hydrodynamic diameter (at *ca.* pH 5), which could be attributed to nanoparticle aggregation at a certain pH/zeta potential.

In spite of the changes in the hydrodynamic diameter, the emission spectra of UCNP@COP registered at different pHs (from *ca.* 2 to 13) showed a negligible dependence on the pH (see Fig. S7 in ESI†).

Building a pH-responsive MB-release nanosystem

UCNP@COP could be electrostatically bound to a cationic molecule by making use of the sulphonate groups at the nano-hybrid periphery. Assemblies based on electrostatic attraction have previously been reported.⁴¹ Consequently, the UCNP@COP nano-hybrid could be useful to build NIR-responsive nanosystems able to release progressively functional molecules attached to their periphery *via* competitive binding of H⁺ at decreasing pHs, *i.e.* *via* pH-stimulus.

As a proof of concept we used methylene blue (MB), which is a water-soluble, positively charged cationic dye commonly used as model pollutant to evaluate photocatalytic efficiency^{42,43} or as a photosensitizer for singlet oxygen generation (Fig. 6).⁴⁴

The absorption spectrum of MB exhibits a maximum at 660 nm with a shoulder at *ca.* 550 nm (ref. 45) (Fig. 7). Its release from the nano-hybrid could be observed in a ratiometric fashion taking into account the overlap of the MB

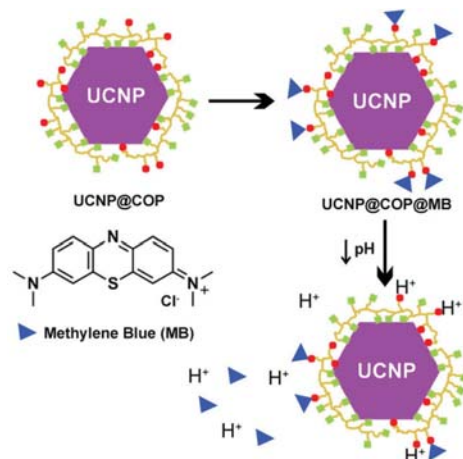


Fig. 6 Electrostatic assembly of UCNP@COP and MB to lead to the UCNP@COP@MB nanohybrid, which releases MB as the pH decreases.

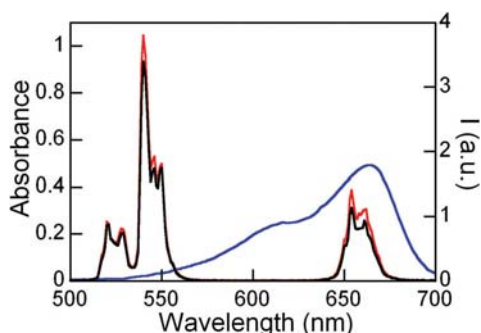


Fig. 7 Upconversion emission spectra of UCNP@COP (red line) and UCNP@COP@MB (black line) solutions (1 mg mL^{-1}) under 980 nm laser excitation in water. MB absorption spectrum has been included for comparison (Blue line).

absorption spectrum with the red emission of the UCNP. The quenching of such emission would be recovered as MB is released when the H^+ concentration increases.

After several assays to estimate the binding capacity of the UCNP@COP to MB, we eventually prepared the UCNP@COP@MB hybrid by reacting 1.5 nmol of MB per mg of UCNP@COP in water. After stirring the mixture for 2 h, the nanoparticles were separated from the solution by centrifugation, washed with water, and finally re-dispersed in water.

Fig. 7 compares the absorption of MB and the emission spectra of UCNP@COP and UCNP@COP@MB nanohybrids. Indeed, the absorption spectrum of UCNP@COP@MB showed the typical band of the dye (see Fig. S8 in ESI†). Taking into account the absorbance of MB in the UCNP@COP@MB and the MB molar absorption coefficient ($58311.9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), the MB amount per 3 mg of UCNP@COP@MB was roughly esti-

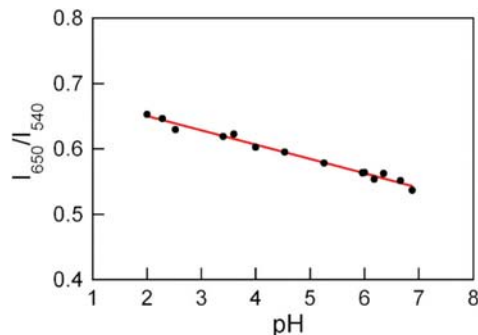


Fig. 8 Plot of R/G emission (area under the curve) ratio vs. pH for the water-dispersible UCNP@COP@MB nanosystem.

ated as 1.8 nmol. In addition, considering that 20% of the weight of UCNP@COP corresponds to COP and 30% of the copolymer is AMPS, the amount of sulphonate in 3 mg of UCNP@COP was estimated as *ca.* 9 nmol.

Therefore, at least 20% of the sulphonic groups of the copolymer capping are coordinated to MB at a neutral pH and the rest are probably involved in the copolymer grafting to the UCNP surface.

The emission spectrum of UCNP@COP@MB evidenced a decrease in the red-to-green (R/G) emission ratio compared to that in UCNP@COP; this suggests energy transfer from the UCNP to the dye.

The efficiency of the process (η) was calculated as 20% by using a simple formula based on emission intensities (eqn (1))

$$\eta = (I_D - I_{DA})/I_D \quad (1)$$

where I_{DA} and I_D are the integrated red emission of UCNP@COP@MB and UCNP@COP nanohybrids.

The spectral overlap integral (J), was calculated as $4.8 \times 10^{12} \text{ nm}^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ by using the following equation (eqn (2))

$$J = \sum \sigma_D(\lambda)\sigma_A(\lambda)\lambda^4\delta\lambda \quad (2)$$

where σ_D is the normalised donor emission spectrum, λ is the light wavelength, and σ_A is the acceptor molar extinction coefficient.

We next studied the dependence of the R/G emission ratio in UCNP@COP@MB on the pH. No changes were observed in the basic range. Remarkably, a good correlation between this ratio and the pH was observed in the 2–7 pH range (Fig. 8). The sample at the lowest pH was centrifuged to determine the degree of MB release at this pH, thus evidencing practically the complete release of MB at this pH.

Experimental

Synthesis of COP copolymer

Briefly, 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) was purified by column chromatography that contained GC20 grade alumina

(Polysciences). The purified monomers were stored in darkness at 4 °C. 2-Acrylamide-2-methylpropanesulphosulphonic (AMPS) was used without previous purification. 2,2'-Azobisisobutyronitrile (AIBN) was purchased from Sigma-Aldrich.

Co-polymerization was carried out in a deoxygenated mixture of milli-Q water/*n*-propanol (50 : 50 v/v; total volume of 150 mL) containing HEMA (14 mL, 0.1154 mol), AMPS (6 g, 0.0289 mol), and AIBN as initiator (600 mg, 3.65 mmol). So, the HEMA/AMPS molar ratio in the feed was 80 : 30. The solution was deoxygenated by nitrogen bubbling for 30 min and continuously stirred at 65 °C for 24 h. The reaction was stopped by cooling (using an ice-bath), the supernatant was separated, and the organic solvents were removed at reduced pressure. Then, chloroform was added and the mixture was vigorously stirred during 5 h. Subsequently, in a separation funnel, the supernatant wet chloroform emulsion was separated and transferred to a centrifuge tube (10 000 rpm, 10 min). Three phases were observed, the first denser phase was discarded and the second one was vacuum dried (14 g) and characterised as poly(HEMA-*co*-AMPS) (7 : 3). This copolymer was used for the UCNP coating.

Synthesis of the oleate-capped UCNP

NaYF₄:Yb(18%),Er(3%) nanocrystals were synthesised following a previously reported protocol with some modifications (see ESI†).

Preparation of the copolymer-capped UCNP

Firstly, poly(HEMA-*co*-AMPS) (50 mg) was dispersed in 100 mL of a 70 : 30 mixture of dichloromethane : tetrahydrofuran (DCM : THF) and constantly stirred for *ca.* 48 h. Once the copolymer had dispersed, 1 g of Na₂CO₃ was slowly added and the mixture was energetically stirred for 2 hours (bubble formation was patent). Then, the co-polymeric solution was decanted in order to eliminate Na₂CO₃. The solid was washed with 10 mL of THF and decanted again. The final solution was concentrated by rotary-evaporation. Finally, 10 mg of UCNP were added to a dispersion of 50 mg of COP in 10 mL of THF (5/1 wt%). The dispersion was vigorously stirred for 24 h, and the resulting crude was centrifuged and washed with THF until no polymer was detected by UV in the THF solution, usually 30–60 mL were necessary.

Emission and dynamic light scattering measurement of the nanohybrid at different pHs

The nanohybrid was dispersed in milliQ water (1 mg mL⁻¹) and the pH of the colloidal solution was measured. Then, the pH was changed by adding minimal amounts (5 μL) of an aqueous solution of sodium hydroxide or HCl solution as required. After each addition, the pH and the emission (as well as, the dynamic light scattering and zeta potential in the case of UCNP@COP) were measured at room temperature. The pH was registered before and after each measurement. Each DLS value was the average of 10–20 independent measurements and an average of 10 rounds.

Conclusions

We report here the synthesis of a NIR-responsive nanohybrid consisting of NaYF₄:Er³⁺,Yb³⁺ UCNP capped with a thin shell of a biocompatible HEMA-AMPS copolymer, which remains firmly anchored to the UCNP due to sulphonate-multigrafting to the UCNP surface. This capping not only remains stable in highly acidic media (as low as a pH of *ca.* 2), but also enables the UCNP@COP nanohybrid to bind electrostatically to cationic molecules, which can be progressively released when the pH decreases. Therefore, these nanohybrids can be used as functional molecule-release nanosystems. The process can be tracked in a wide range of pHs (from neutral to a pH of *ca.* 2) by monitoring the nanohybrid emission if the absorption spectrum of the molecule overlaps with some of the emission bands of the UCNP.

Acknowledgements

We thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Projects CTQ2014-60174; Maria de Maeztu: MDM-2015-0538; M.G.B. Ramón y Cajal contract and L.F.S. F.P.U. grant), UE (FP7-PEOPLE, PCIG09-GA-2011, I.R. contract), and UV (VLC-Campus, 02_MCI-26-2015, N.E. contract). We also thank the SCSIE of the University of Valencia for providing access to the NMR, TEM and XRD facilities.

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 N. Bogdan, F. Vetrone, G. A. Ozin and J. A. Capobianco, *Nano Lett.*, 2011, 11, 835–840.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 T. Y. Cao, Y. Yang, Y. Gao, J. Zhou, Z. Q. Li and F. Y. Li, *Bio-materials*, 2011, 32, 2959–2968.
- 7 J. P. Yang, D. K. Shen, X. M. Li, W. Li, Y. Fang, Y. Wei, C. Yao, B. Tu, F. Zhang and D. Y. Zhao, *Chem. – Eur. J.*, 2012, 18, 13642–13650.
- 8 L. Wang and C. Li, *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 15862–15871.
- 9 N. Bogdan, E. M. Rodriguez, F. Sanz-Rodriguez, M. A. C. Iglesias de la Cruz, A. Juarranz, D. Jaque, J. G. Sole and J. A. Capobianco, *Nanoscale*, 2012, 4, 3647–3650.
- 10 L. Kotin and M. Nagasawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, 83, 1026–1028.
- 11 B. Xiao, P. J. Byrne, P. S. Wheatley, D. S. Wragg, X. Zhao, A. J. Fletcher, K. M. Thomas, L. Peters, S. O. EvansJohN,

- J. E. Warren, W. Zhou and R. E. Morris, *Nat. Chem.*, 2009, **1**, 289–294.
- 12 J. A. Hurd, R. Vaidyanathan, V. Thangadurai, C. I. Ratcliffe, I. L. Moudrakovski and G. K. H. Shimizu, *Nat. Chem.*, 2009, **1**, 705–710.
- 13 S. A. Dalrymple and G. K. H. Shimizu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 12114–12116.
- 14 T. Z. Forbes and S. C. Sevov, *Inorg. Chem.*, 2009, **48**, 6873–6878.
- 15 F.-Y. Yi, Q.-P. Lin, T.-H. Zhou and J.-G. Mao, *Cryst. Growth Des.*, 2010, **10**, 1788–1797.
- 16 Q.-Y. Liu, W.-F. Wang, Y.-L. Wang, Z.-M. Shan, M.-S. Wang and J. Tang, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 2381–2392.
- 17 P. Thuéry, *Cryst. Growth Des.*, 2012, **12**, 1632–1640.
- 18 P. Thuéry, *CrystEngComm*, 2012, **14**, 3363–3366.
- 19 M. J. Tapia and H. D. Burrows, *Langmuir*, 2002, **18**, 1872–1876.
- 20 H. Sami, A. K. Mapparu, A. Kumar and S. Sivakumar, *PLoS One*, 2012, **7**, e36195.
- 21 J. Liu, Y. Huang, A. Kumar, A. Tan, S. Jin, A. Mozhi and X.-J. Liang, *Biotechnol. Adv.*, 2013, **32**, 693–710.
- 22 D. Wencel, T. Abel and C. McDonagh, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 15–29.
- 23 L.-N. Sun, H. Peng, M. I. J. Stich, D. Achatz and O. S. Wolfbeis, *Chem. Commun.*, 2009, 5000–5002.
- 24 L. Xie, Y. Qin and H.-Y. Chen, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 1969–1974.
- 25 R. Arppe, T. Nareoja, S. Nylund, L. Mattsson, S. Koho, J. M. Rosenholm, T. Soukka and M. Schaferling, *Nanoscale*, 2014, **6**, 6837–6843.
- 26 T. V. Esipova, X. Ye, J. E. Collins, S. Sakadzic, E. T. Mandeville, C. B. Murray and S. A. Vinogradov, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, **109**, 20826–20831.
- 27 Y. Yuan, R. Liu, C. Wang, J. Luo and X. Liu, *Prog. Org. Coat.*, 2014, **77**, 785–789.
- 28 M. A. Taleb, D. E. Hegazy and G. A. Mahmoud, *Int. J. Polym. Mater. Polym.*, 2014, **63**, 840–845.
- 29 A. Khabibullin, S. D. Minter and I. Zharov, *J. Mater. Chem. A*, 2014, **2**, 12761–12769.
- 30 D. K. Lee, K. J. Lee, Y. W. Kim and J. H. Kim, *Desalination*, 2008, **233**, 104–112.
- 31 M. R. Aguilar, A. Gallardo, J. San Román and A. Cifuentes, *Macromolecules*, 2002, **35**, 8315–8322.
- 32 M. R. Aguilar de Armas, *Universidad Complutense de Madrid and Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros*, 2002.
- 33 M. R. Aguilar, A. Gallardo, M. M. Fernández and J. San Román, *Macromolecules*, 2002, **35**, 2036–2041.
- 34 Z. Zhenquan and Y. Li, *Nanotechnology*, 2008, **19**, 345606–345610.
- 35 V. Voliani, M. Gemmi, L. Frances-Soriano, M. González-Béjar and J. Perez-Prieto, *J. Phys. Chem. C*, 2014, **118**, 11404–11408.
- 36 Z. Jiang, Y. Shi, Z.-J. Jiang, X. Tian, L. Luo and W. Chen, *J. Mater. Chem. A*, 2014, **2**, 6494–6503.
- 37 F. Auzel, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 139–173.
- 38 F. Wang and X. Liu, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 976–989.
- 39 K. Kogej, S. M. Fonseca, J. Rovisco, M. E. Azenha, M. L. Ramos, J. S. Seixas de Melo and H. D. Burrows, *Langmuir*, 2013, **29**, 14429–14437.
- 40 L. Wang, R. Yan, Z. Huo, L. Wang, J. Zeng, J. Bao, X. Wang, Q. Peng and Y. Li, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 6054–6057.
- 41 J. Peng, W. Xu, C. L. Teoh, S. Han, B. Kim, A. Samanta, J. C. Er, L. Wang, L. Yuan, X. Liu and Y.-T. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 2336–2342.
- 42 Y. Min, G. He, Q. Xu and Y. Chen, *J. Mater. Chem. A*, 2014, **2**, 1294–1301.
- 43 S. A. Ansari, M. M. Khan, M. O. Ansari, J. Lee and M. H. Cho, *J. Phys. Chem. C*, 2013, **117**, 27023–27030.
- 44 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.
- 45 O. Yazdani, M. Irandoust, J. B. Ghasemi and S. Hooshmand, *Dyes Pigm.*, 2012, **92**, 1031–1041.

Supporting Information

for

Upconversion nanoparticles with a strong acid-resistant capping

Ileana Recalde,^a Nestor Estebanez,^a Laura Francés-Soriano,^a Marta Liras,^b María González-Béjar,^{a,*} and Julia Pérez-Prieto,^{a,*}

^aInstituto de Ciencia Molecular (ICMol), Universitat de Valencia. Catedrático José Beltrán, 2, 46980 Paterna, Spain.

^bInstituto de Química Orgánica General, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IQOG-CSIC). Juan de la Cierva, 3, 28006 Madrid, Spain. Current address: IMDEA Energy Institute, Parque tecnológico de Móstoles, Avda. Ramón de la Sagra, 3, 28935, Móstoles, Madrid.

Contact authors: maria.gonzalez@uv.es; julia.perez@uv.es

INDEX:

Page S2-S3: Materials and methods.

Page S4: Figure S1. Top: ¹H-NMR spectra of HEMA, AMPS and COP in D₂O. Bottom: Integration values for ¹H-NMR signals.

Page S4: Table S1. Characterisation of COP.

Page S5: Figure S2. FTIR-ATR spectra of HEMA, AMPS and COP.

Page S5: Figure S3. X-ray power diffraction (XRD) spectrum of the UCNP@oleate and UCNP@COP.

Page S6: Figure S4. Energy-dispersive X-ray (EDX) of UCNP@oleate.

Page S6: Figure S5. ¹H-NMR spectra of (top) UCNP@COP (D₂O) and (bottom) UCNP@oleate (CDCl₃).

Page S7: Figure S6. FTIR-ATR spectrum of the precipitate obtained by centrifugation of a sample of UCNP@COP nanoparticles after being dispersed in water and kept at a pH of ca. 2 for 2h. **Table S2.** Zeta potential and conductivity values of the precipitate re-dispersed in water (1 mg/mL, pH=8) and the supernatant obtained after centrifugation of a sample of UCNP@COP nanoparticles dispersed in water and kept at a pH of ca. 2 for 2h.

Page S7: Figure S7. Figure S7. Emission spectra ($\lambda_{exc} = 980$ nm) of UCNP@COP (1 mg/mL in water) at different pHs.

Page S8: Figure S8. Absorption spectrum of MB in UCNP@COP@MB.

Materials. Lanthanide chlorides ($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; >99.9%, all of them), 1-octadecene (95%), oleic acid (99.9%), NaOH, and NH_4F (99.99%) were used for the synthesis of UCNPs. 2-hydroxyethyl methacrylate and 2-acrylamido-2-methylpropanesulphonic acid (AMPS) and 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) were used for the polymerizations. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and used as received without previous purification. Sodium carbonate (Na_2CO_3) was purchased from Merck and used as received.

Solvents used in this work are chloroform (Fischer), ethanol (Scharlau), dichloromethane (DCM; Scharlau), tetrahydrofuran (THF; Sigma-Aldrich), acetonitrile (ACN; Scharlau), n-propanol (Sigma-Aldrich) and diethyl ether (Scharlau) were used as received.

Synthesis of oleate-capped UCNPs. $\text{NaYF}_4\text{:Yb}$ (18%), Er (2.0%) nanoparticles were synthesized following a previously reported protocol with some modifications.¹ Basically, $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.8 mmol), $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.18 mmol), and $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (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 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 NH_4F (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 one hour. 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.

Methods. $^1\text{H-NMR}$ spectra were registered at room temperature in a Bruker AVANCE DRX 300 spectrometer. Deuterated chloroform or deuterated water were used as solvents. Chemical shifts are reported in parts per million (δ , ppm) using the peak of the solvent as internal reference. The following abbreviations are used to describe signals: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (complex multiplet).

Attenuated Total Reflectance (ATR) spectra were recorded using a FT-IR spectrometer Thermo Nicolette Nexus, with ATR module Smart Orbit™. The spectra were recorded in a wavenumber range of 4000-500 cm^{-1} .

The absorption measurements were carried out in a SECOMAN UVI Light UV-Visible spectrophotometer.

The pH measurements were registered with a pH-Meter GLP 21+ (Crison).

Upconversion emission spectra were collected by excitation of the samples with a CW 975 nm diode laser (Thorlabs L975P1WJ) with an excitation density of 249.4 mW/cm² and coupled to the SLM Amingo Bowmann series 2 (AB2) fluorimeter (Microbeam, S.A.). A front face set up has been used to avoid scattering in the colloidal dispersions when coated with polymers. The emission spectra have been recorded under the same conditions (laser power, slits (2nm), speed scan, etc.).

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) was carried out by using a Field Emission Gun (FEG) TECNAI G₂F20 microscope operated at 200 kV equipped with a charged coupled device (CCD) GATAN and “Digital Micrograph” Software of image acquisition and treatment. The TEM samples were prepared by dropping sample solutions onto a 300-mesh carbon coated copper grid (3 mm in diameter) followed by the evaporation of the solvent.

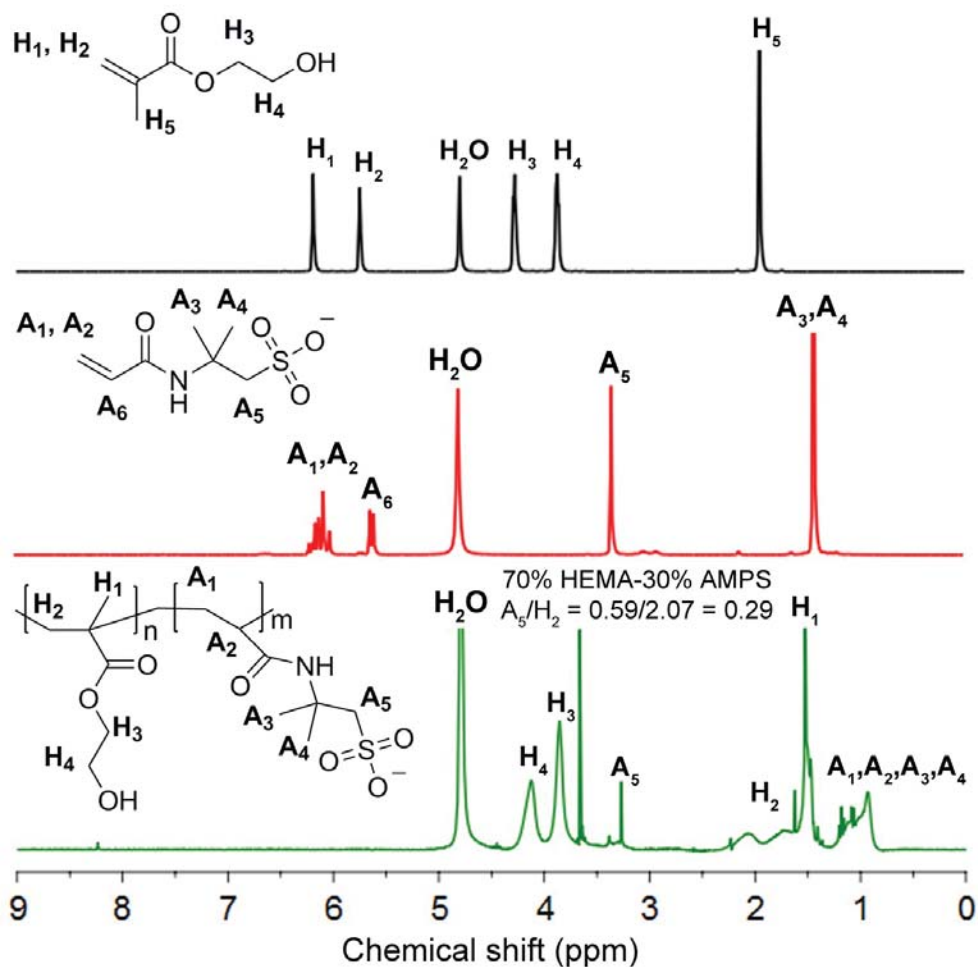
The ligand contents in the copolymer-capped UCNPs and the thermal behavior of the copolymer were evaluated by thermogravimetric analysis (TGA). The thermogram curves were recorded on a Perkin-Elmer TGA-7 model, at a heating rate of 10°C/min, under nitrogen.

The average molecular number (Mn), molecular weight (Mw) and polydispersity (Mw/Mn) of the copolymer were determined by size exclusion chromatography (SEC) system equipped with a Waters 1515 Isocratic HPLC Pump with a Waters 2414 refractive index detector and provided with two columns Styragel HR3 and HR5 from Waters, using DMF (1 % wt. LiBr) as eluent at 30 °C and a flow rate of 0,7 mL min⁻¹. Polystyrene (PS) standards were employed for the calibration.

XRD was carried out with a PANalytical Empyrean X-ray powder diffractometer Cu radiation Oxford Cryostream provided with hybrid monochromator (Cu K alpha 1), focussing mirror and PIXcel detector XRPD for capillary measurements. Dynamic light scattering (DLS) measurements were performed using a Malvern Zetasizer Nano Z spectrometer with a 10 mW HeNe laser at 633 nm. All measurements were performed at a scattering angle of 173°. All samples are measured at 1mg/mL concentration in water. Samples were kept in solution overnight before measurements in order to ensure pH equilibration (initial pH = 3.5).

References

- (1) Zhenquan Li, Z., *Y Nanotechnology*, **2008**, *19*, 345606-345610.



	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆
HEMA	1.00	1.00	2.02	1.99	2.94	--	--	--	--	--	--
AMPS	--	--	--	--	--	2.11	6.14	--	--	2.03	1.00
COP	3.28	2.07	2.00	2.20	--	2.39			0.59	--	

Figure S1. Top: ¹H-NMR spectra of HEMA (black line), AMPS (red line) and COP (green line) in D₂O. Bottom: normalized integration values for HEMA, AMPS, and COP.

Table S1. Characterisation of Poly(HEMA-co-AMPS) copolymer (COP).

M_{nSEC} (g mol ⁻¹)	M_{wSEC} (g mol ⁻¹)	M_w/M_n	T_g (°C)
19763	21548	1.09	120-150

M_{nSEC} , average number (calculated by SEC), M_w/M_n polydispersity index and T_g , glass transition temperature.

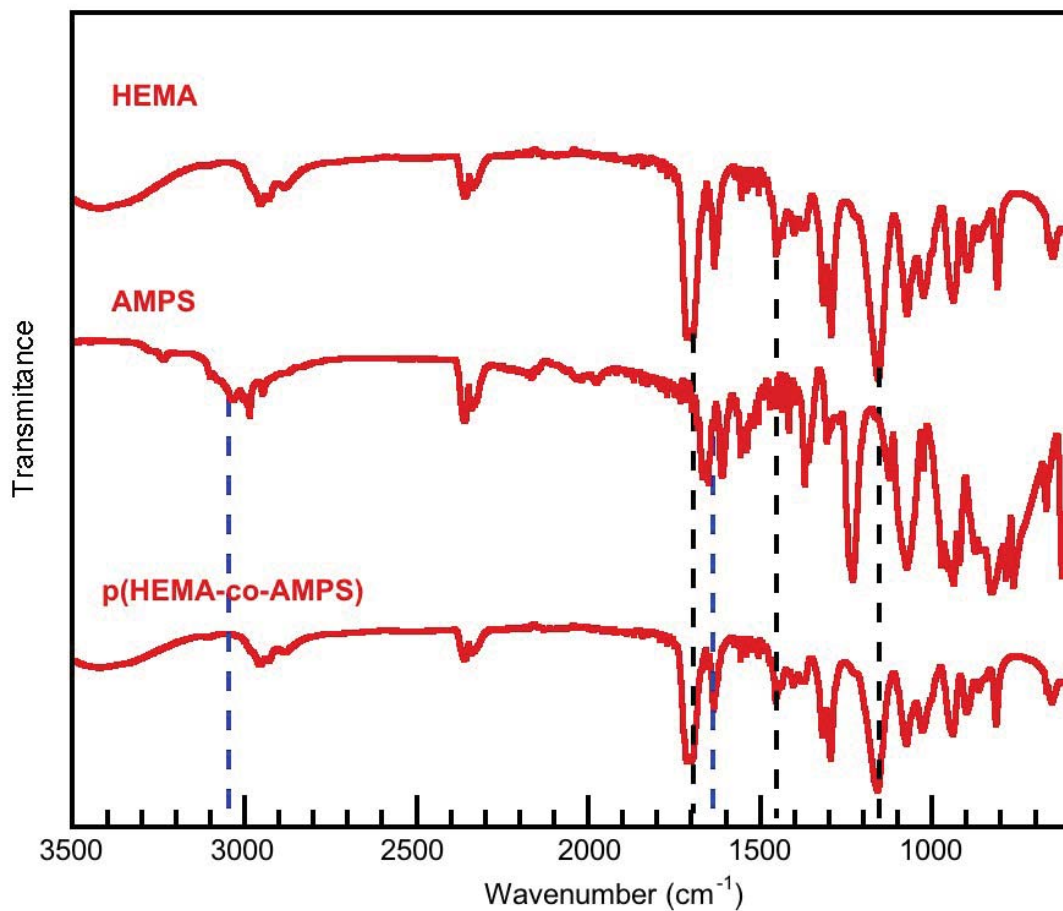


Figure S2. FTIR-ATR spectra of HEMA (top), AMPS (middle) and (HEMA-co-AMPS) copolymer, COP (bottom).

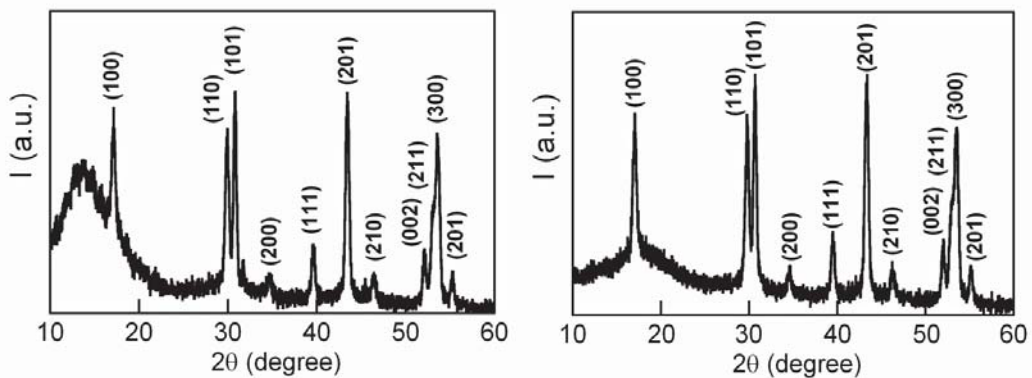


Figure S3. X-ray power diffraction of (XRD) spectrum of the UCNP@oleate(left) and UCNP@COP (right),(JCPDS standard card no. 28-1192).¹

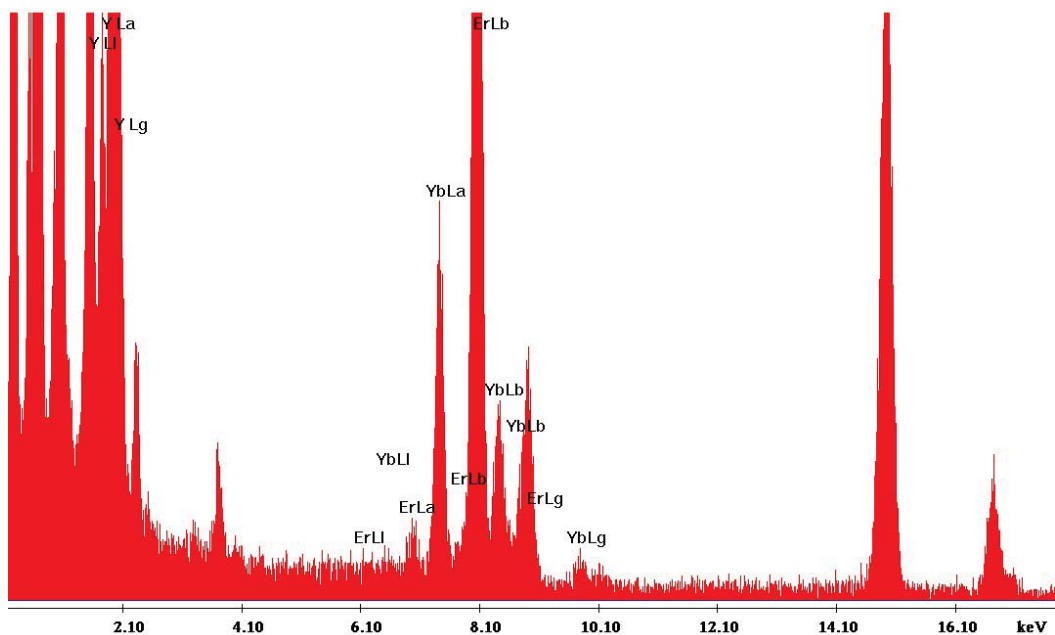


Figure S4. Energy-dispersive X-ray (EDX) of UCNP@oleate.

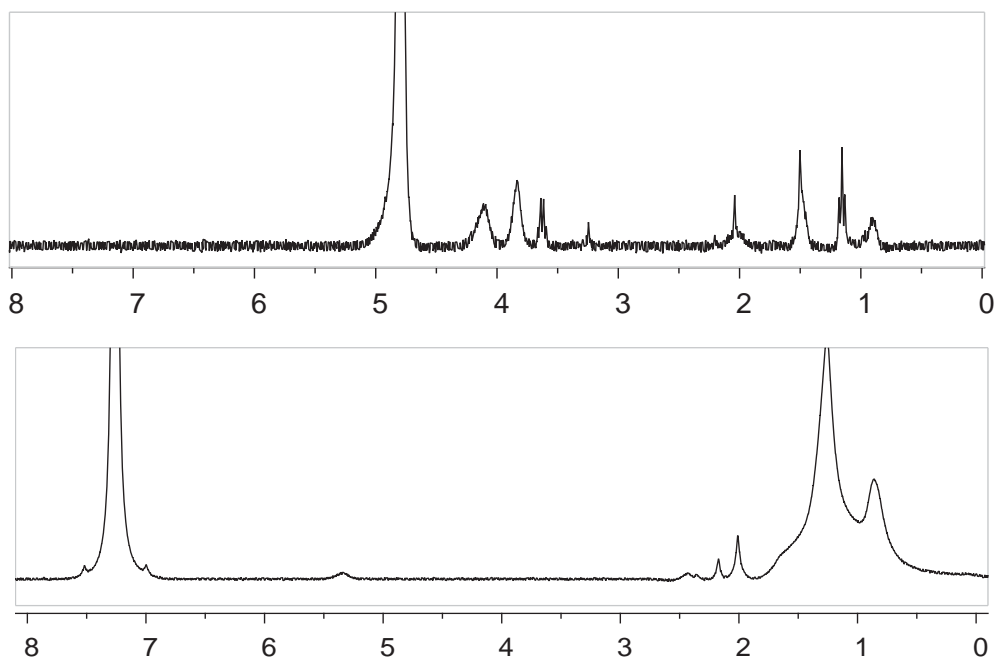


Figure S5. $^1\text{H-NMR}$ spectra of (top) UCNP@COP (D_2O) and (bottom) UCNP@oleate (CDCl_3).

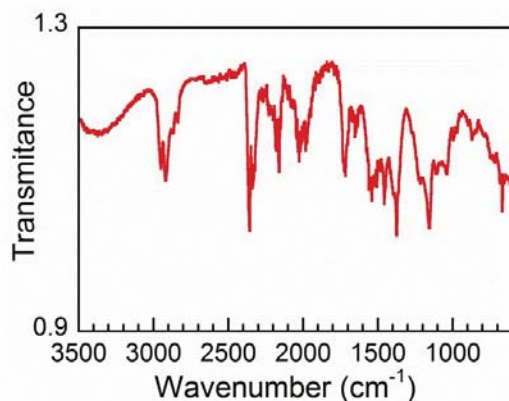


Figure S6. FTIR-ATR spectrum of the precipitate obtained by centrifugation (10000 rpm, 10 min) of a sample of UCNP@COP nanoparticles after being dispersed in water and kept at pH ca. 2 for 2h.

Table S2. Zeta potential and conductivity values of the precipitate re-dispersed in water (1 mg/mL, pH=8) and the supernatant obtained after centrifugation (10000 rpm, 10 min) of a sample of UCNP@COP nanoparticles dispersed in water and kept at pH ca. 2 for 2h.

Sample	Zeta Potential (mV)	Conductivity (ms·cm ⁻¹)
Precipitate*	-34.8 ± 1.2	0.0542 ± 0.0007
Supernatant	-3.4 ± 1.0	3.425 ± 0.195

*water colloidal solution

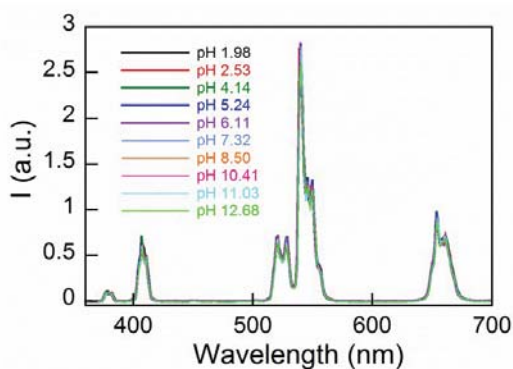


Figure S7. Emission spectra ($\lambda_{exc} = 980$ nm) of UCNP@COP (1 mg/mL in water) at different pHs.

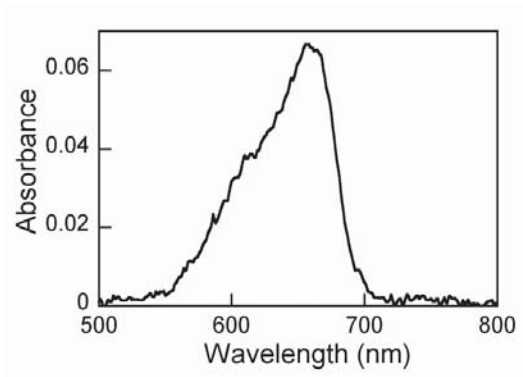


Figure S8. Absorption spectrum of MB in UCNP@COP@MB obtained after subtracting the spectrum of UCNP@COP@MB (2 mg/mL in water) and that of UCNP@COP.



Polysulfonate Cappings on Upconversion Nanoparticles Prevent Their Disintegration in Water and Provide Superior Stability in a Highly Acidic Medium

Nestor Estebanez,[†] María González-Béjar,^{*,†,‡,§} and Julia Pérez-Prieto^{*,†,‡,§}

[†]Instituto de Ciencia Molecular (ICMol) [‡]Departamento de Química Orgánica, Universitat de València, C/Catedrático José Beltrán, 2, 46980 Paterna, Valencia, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: The stability of organic cappings on hexagonal NaYF₄:Ln³⁺ upconversion nanoparticles (UCNPs) is crucial for their luminescence efficiency in aqueous solutions. The capping removal quickens as the acidity of the medium increases. We demonstrate here that polysulfonates, namely poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonate) (PAMPS) and poly(sodium 4-styrene sulfonate) (PSS), remain anchored to the surface of NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺/Tm³⁺ UCNPs even at a pH as low as 2 due to strong acidity of the sulfonate anchoring groups (pK_a of ca. -3). Bare UCNPs progressively disintegrate into their compositional F⁻, Na⁺, Y³⁺, and Ln³⁺ ions. Their disintegration is particularly worrying in highly diluted dispersions of nanoparticles because both the lanthanide ions and/or the bare UCNPs can cause undesirable interference in a chemical or biological environment. Remarkably, the UC@PSS nanohybrid is particularly chemically stable, exhibiting an amazingly low release of Y³⁺ and Ln³⁺ ions for up to 96 h in highly diluted water dispersions (10 μg/mL). Additional advantages of the use of PSS as capping layer are its biocompatibility and its high dispersibility in water, together with easy further functionalization of the UCNP@PSS nanohybrids.

INTRODUCTION

Lanthanide-doped upconversion nanoparticles (UCNPs) consist of an inert crystalline matrix doped with at least two types of trivalent lanthanide ions (Ln), such as Yb³⁺ and Er³⁺, one of which absorbs near-infrared (NIR) light and transfers it to the other, which emits photons of higher energy than those absorbed.^{1,2} Fluorine-containing matrices are the most common as they have low phonon energies, and those with a hexagonal phase (β) are more thermodynamically stable than those with a cubic phase (α). For example, β -NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺/Tm³⁺ UCNPs are colorless and, after NIR-excitation with a low-power continuous-wave diode laser, can produce large anti-Stokes shifted (red and green) narrow-band fluorescence emissions and even NIR-to-NIR upconversion, which makes deep-tissue imaging possible. These features, together with the fact that they do not undergo photobleaching or photoblinking and in view of their very low toxicity, make UCNPs of high relevance in biological and technological applications.

However, disintegration of α - and β -NaYF₄:Ln UCNPs in water has recently been reported,³ especially in highly diluted nanoparticle suspensions.^{4,5} As they progressively disintegrate, their upconversion luminescence intensity usually decreases due to the loss of active Ln ions from the host matrix, and their toxicity increases due to the release of F⁻, Ln³⁺, and Y³⁺ ions. The disintegration of NaYF₄:Ln UCNPs leads to the release of compositional ions, some of which are (cyto)toxic (particularly, fluoride ions).⁶ In addition, toxicology studies on rats have shown that lanthanide chlorides such as that of ytterbium tend to accumulate in the liver, bones, and spleen; in the liver, they can interact with proteins, affecting enzyme activity and physiological function.⁷

The disintegration of these UCNPs is concentration- and pH-dependent. In concentrated suspensions, equilibrium is achieved with minimal disintegration, and the change in the luminescence intensity is also negligible, whereas in diluted (μ M) samples, the nanoparticles can disintegrate almost completely, thereby reaching the solubility equilibrium. In terms of the acidity of the medium, pristine UCNPs (i.e., oleate-capped UCNPs) are unstable in acidic physiological fluids such as lysosomes (pH ca. 4.5–5.0).⁸ It has to be taken into account that at pH = 4, carboxylate-capped UCNPs lose their protected capping; in fact, bare UCNPs can be prepared by treatment of the NPs with HCl at pH 4, which protonates the oleate ligand resulting in the release of oleic acid.⁹ This capping removal does not only apply to carboxylate ligands but also to many other types of ligands.

Soukka et al.⁴ have recently put forward a solution to prevent the disintegration of UCNPs in highly diluted water dispersions (few micrograms per milliliter); their solution is made by adding fluoride ions, which have a high impact on the solubility equilibrium, eventually decelerating the disintegration of poly(acrylic acid)-capped UCNPs. Unfortunately, this strategy needs a considerably high concentration (mM) of fluoride, which, from the point of view of their use in live cells, is not advisable due to its (cyto)toxicity.¹⁰

The requirement of ligands to remain on the nanoparticle surface in a broad range of pH values, and particularly, at low pH values (such as that of stomach acid, which is close to 2), is that they possess strongly ionizable anchoring groups. These

Received: October 30, 2018

Accepted: January 21, 2019

Published: February 11, 2019

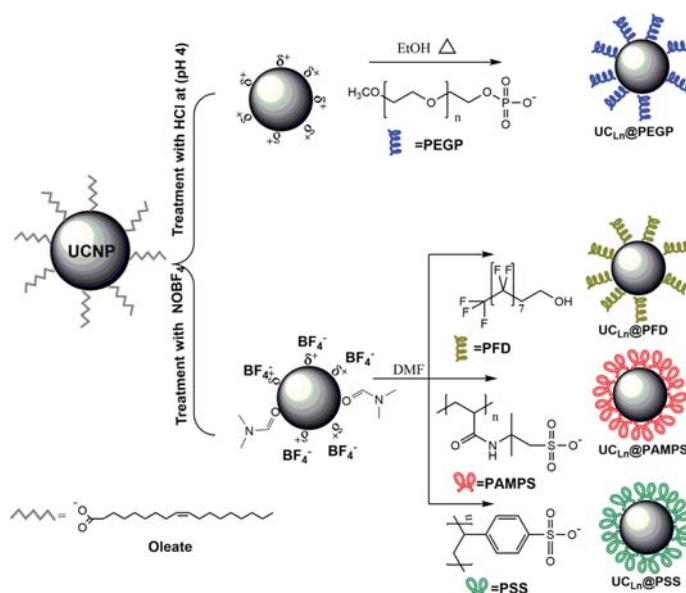


Figure 1. Scheme of the synthetic procedure used for building the coated upconversion nanoparticles ($UC_{Ln}@PAMPS$, $UC_{Ln}@PSS$, $UC_{Ln}@PEGP$, and $UC_{Ln}@PFD$) and structure of the ligands: poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonate) (PAMPS); polystyrene sulfonate (PSS); mPEGSK-phosphate (PEGP); and 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-decanol (PFD).

groups may help modulate the extent to which the nanoparticle is absorbed in the organism (e.g., the gastrointestinal tract) and its bioavailability (e.g., nanoparticle ionization decreases absorption).¹³ An organic shell completely covering and strongly anchored to the UCNP surface might prevent undesirable interference in biological environments (interactions with different blood components or any biological fluids, formation of a protein corona).^{11,12}

Xia et al. demonstrated that a multichelating phosphonate coating (ethylenediamine tetra(methylene phosphonate), EDTMP) can prevent the disintegration in water of $NaYF_4:Er^{3+},Yb^{3+}$ NPs (200 μg NP/mL), whereas UCNPs capped with monophosphonates and citrate are drastically damaged. These facts can be attributed to the strong coordination of EDTMP to the UCNP surface as a consequence of the affinity of the phosphonate group to the cations at the surface, combined with the hexadentate binding of the ligand by means of its four phosphonates and two amine groups. The EDTMP-capped NPs showed a high resistance to disintegration when incubated in phagolysosomal simulated fluid (pH 4.5) for 24 h. It is worth mentioning that these studies were performed with relatively high concentrations of NPs.¹⁴

Many applications of UCNPs require that the NPs possess an organic capping that (i) provides them with high dispersibility in water, (ii) protects them from disintegrating in water at neutral pH and/or acid media, (iii) makes their further functionalization possible and/or impedes the UCNPs from causing any undesirable interference in the (chemical or cellular) environment, and (iv) is biocompatible.

With the aim of obtaining more stable UCNPs in water, we focused on coating the UCNP surface with multichelating, strongly acidic ligands, specifically, polysulfonates. The sulfonic group is a strong acid (pK_a of ca. -3) which is virtually ionized

throughout the entire range of pH values; the sulfonate group has three potential coordination sites and can be effectively grafted to the UCNP surface.¹⁵

We demonstrate here that polysulfonates, such as polystyrene sulfonate (PSS), remain anchored to the surface of $NaYF_4:Ln^{3+}$ UCNPs even at pH of ca. 2 and that highly diluted water dispersions of the $UCNP@PSS$ nano hybrid (10 $\mu g/mL$) show an amazingly low release of Y^{3+} and Ln^{3+} ions for up to 96 h.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and Characterization of the Polymer-Capped UCNPs. First, different organic ligands with functional groups able to coordinate Ln^{3+} ions, specifically, phosphate, sulfonate, and even fluoride,^{16–22} were used for coating the UCNP surface with the purpose of comparing the resistance to acids of the corresponding capping under a strong acid medium (pH of ca. 2). Two types of upconversion nanoparticles (UCNPs), namely $NaYF_4:Yb^{3+},Er^{3+}$ and $NaYF_4:Yb^{3+},Tm^{3+}$, were synthesized by thermal decomposition with oleic acid and 1-octadecene at high temperature following a slightly modified well-known protocol. A batch of oleate-capped $\beta-NaYF_4:Yb^{3+},Er^{3+}$ ($UC_{Er}@OA$) and two different batches of $\beta-NaYF_4:Yb^{3+},Tm^{3+}$ ($UC_{Tm1}@OA$ and $UC_{Tm2}@OA$) were used for the studies reported here.²³ Experimental details, X-ray diffraction (XRD) data, transmission electron microscopy (TEM) images, size distribution histograms, and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) analyses can be found in the Supporting Information (Figures S1 and S2 and Table S1). TEM images showed that $UC_{Tm1}@OA$, $UC_{Tm2}@OA$, and $UC_{Er}@OA$ NPs were uniform hexagonal prisms, and their average sizes were $(22.7 \pm 0.9) \times (20.3 \pm 1.0)$ nm, $(32.9 \pm 1.9) \times (22.4 \pm 2.2)$ nm, and $(46.7 \pm 1.8) \times (28.6 \pm 1.4)$ nm, respectively.

Next, bare UCNPs were prepared by treatment of the oleate-capped NPs either with HCl at pH 4 or by addition of NOBF_4 to lead to $\text{UC}_{\text{Ln}}@\text{BF}_4$.^{24,25} The low binding affinity of the BF_4^- anion to the UCNP surface together with the strong coordination capability of the Ln^{3+} ions makes the secondary surface modification possible. Then, the as-prepared bare UCNPs were reacted with the selected ligands, namely (i) poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonate) (PAMPS), (ii) poly(sodium 4-styrene sulfonate) (PSS) with an M_w of 70000, (iii) mPEG5K-phosphate (PEGP), and (iv) 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-decanol (PFD) (Figure 1), to afford $\text{UC}_{\text{Ln}}@\text{PAMPS}$, $\text{UC}_{\text{Ln}}@\text{PSS}$, $\text{UC}_{\text{Ln}}@\text{PEGP}$, and $\text{UC}_{\text{Ln}}@\text{PFD}$ NPs, respectively (see the Materials and Methods section for further details).

The successful coating of the UC_{Ln} surface with PAMPS, PSS, PEGP, and PFD was corroborated by HRTEM, FTIR (Figures 2 and 3), and TGA (Figure S3–S5 in the Supporting

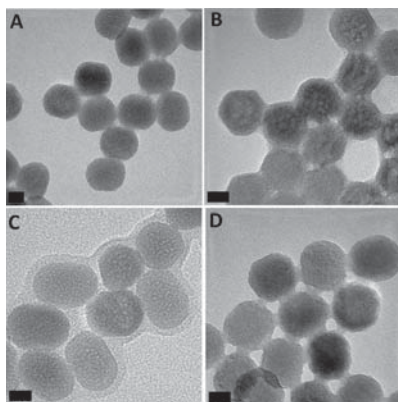


Figure 2. Representative HRTEM images of (A) $\text{UC}_{\text{Tm}1}@\text{PAMPS}$, (B) $\text{UC}_{\text{Tm}1}@\text{PSS}$, (C) $\text{UC}_{\text{Tm}2}@\text{PEGP}$, and (D) $\text{UC}_{\text{Tm}1}@\text{PFD}$. Scale bar 10 nm.

Information). Thus, Figure 2 shows high-resolution TEM (HRTEM) images of representative samples of the four coated UC_{Tm} NPs where the presence of an organic layer can be observed around the surface of the inorganic NPs (see Figure S6 for coated UC_{Er} NPs). The thickness of the capping was 2.5 ± 0.1 nm in the case of $\text{UC}_{\text{Tm}}@\text{PAMPS}$, 1.6 ± 0.3 nm for $\text{UC}_{\text{Tm}}@\text{PSS}$, and 2.2 ± 0.3 nm for $\text{UC}_{\text{Tm}}@\text{PEGP}$. The thinner capping (ca. $0.7 \text{ nm} \pm 0.3 \text{ nm}$) of the $\text{UC}_{\text{Tm}}@\text{PFD}$ NPs is consistent with the smaller size of the perfluoroalkanol ligand. As expected, the nanoparticle sizes after surface functionalization remained identical to that of the parent UC_{Ln} NP.

The FTIR spectrum of the samples (see Figure 3, left) clearly showed the characteristic signals of each ligand coating the UC_{Ln} surface; briefly, (i) the C–H stretching vibration around 2880 cm^{-1} in all of them, (ii) the C–O stretching vibration at 1110 cm^{-1} associated with the backbone of the PEG chains and the vibration at ca. 1240 cm^{-1} typical of P=O in PEGP, (iii) the two bands centered at ca. 1220 and 1045 cm^{-1} , which correspond to the stretching vibration (asymmetric and symmetric, respectively) of the S=O groups in the sulfonated polymers, and the bands at ca. 1700 cm^{-1} attributed to C=O of the amide in PAMPS, and (iv) the multiple strong bands in the range of 1350 – 1100 cm^{-1} assigned to C–F stretching modes of the perfluoroalkyl chain of PFD.²⁶ In

addition, the comparison between the spectra of the ligand-coated UCNPs and that of the corresponding ligand (not shown) evidenced the effect of the anchoring to the NP surface on the ligand vibrations, for example, fewer bands in the 1550 to 1000 cm^{-1} region due to the interaction of fluorine atoms with the UCNP surface, specifically with Y^{3+} and/or Ln^{3+} ions.

In fact, lanthanide shift reagents have been applied to the study of alkyl fluorides by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. Important findings are that the chemical shift induced by Yb^{3+} shift reagents decreases as the distance from the fluorine atom to the observed nucleus increases, and the resolution of the shifted resonances is poor for the nucleus closest to the fluorine center.²⁰ These shifts have been attributed to the formation of fluorine-coordinated lanthanide complexes. $^{19}\text{F-NMR}$ spectra of the ligand and $\text{UC}_{\text{Ln}}@\text{PFD}$ were recorded in deuterated-methanol (see Figure S7) because the $^{19}\text{F-NMR}$ spectra can be useful to determine the type of anchoring of PFD to the NP surface (via multidentate chelation or an active functional group located at the end of the chain, termed brush-like interaction). Both spectra showed seven bands at -82.85 , -115.15 , -123.15 , -123.40 , -124.20 , -125.25 , and -127.75 ppm; the most significant difference between them was that the multiplet at -82.85 ppm in PFD, assigned to CF_3 , turned into a broad band in $\text{UC}_{\text{Ln}}@\text{PFD}$. This is consistent with the interaction of PFD with the NP surface via the CF_3 group, although from the negligible changes in the chemical shifts of the ligand, it can be inferred that this interaction is weak.

Thermogravimetric analyses (TGA) of the $\text{UC}_{\text{Ln}}@\text{ligand}$ NPs, namely $\text{UC}_{\text{Ln}}@\text{PAMPS}$, $\text{UC}_{\text{Ln}}@\text{PSS}$, $\text{UC}_{\text{Ln}}@\text{PEGP}$, and $\text{UC}_{\text{Ln}}@\text{PFD}$ NPs, were carried out to determine the presence and amount of ligand bound to the nanoparticle surface (see Figure S5 in the Supporting Information). A weight loss of ca. 10 wt % was observed at temperatures below $750 \text{ }^\circ\text{C}$ for the four of them, and it can be attributed to the organic capping.

The emission spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 975 \text{ nm}$) of $\text{UC}_{\text{Tm}1}@\text{PAMPS}$, $\text{UC}_{\text{Tm}1}@\text{PSS}$, $\text{UC}_{\text{Tm}2}@\text{PEGP}$, and $\text{UC}_{\text{Tm}1}@\text{PFD}$ NPs, as well as those of $\text{UC}_{\text{Er}}@\text{PAMPS}$ and $\text{UC}_{\text{Er}}@\text{PSS}$, are shown in Figure S8 (see the Supporting Information). The UC_{Tm} NPs showed the typical Tm^{3+} emission bands: four of them below 500 nm [$^1\text{I}_6 \rightarrow ^3\text{F}_4$ (at 345 nm), $^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{H}_6$ (at 368 nm), $^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{F}_4$ (at 450 nm), and $^1\text{G}_4 \rightarrow ^3\text{H}_6$ (at 475 nm) transitions] and other three bands at 650 , 700 , and 800 nm . In the case of the UC_{Er} NPs, the three more intense emission bands can be observed in the green spectral region centered at λ_{em} at 525 ($^2\text{H}_{11/2}/^4\text{I}_{15/2}$ transition) and 545 nm ($^4\text{S}_{3/2}/^4\text{I}_{15/2}$ transition) and in the red spectral region centered at λ_{em} at 660 nm ($^4\text{F}_{9/2}/^4\text{I}_{15/2}$ transition).

As stated before, our purpose was to evaluate the efficiency of different ligands to protect the UC_{Ln} surface even in a highly acidic aqueous medium as low as pH 2. It is equally important to prevent the disintegration of UC_{Ln} in highly diluted water dispersions (few micrograms per milliliter). Both occurrences, the loss of the organic capping and the disintegration of the inorganic core, can cause undesirable interference in a chemical or biological environment. The next two sections are devoted to presenting and discussing the results after acid treatment of the four coated UC_{Ln} NPs as well as the extraordinary chemical and photophysical stability of the sulfonate-coated NPs in water.

Stability of the Polymer Capping of UC_{Ln} in Strongly Acidic Media. Each coated UC_{Ln} was dispersed in milliQ-water, and the pH of the colloidal dispersion was measured at room temperature. Then, the sample was acidified (see the

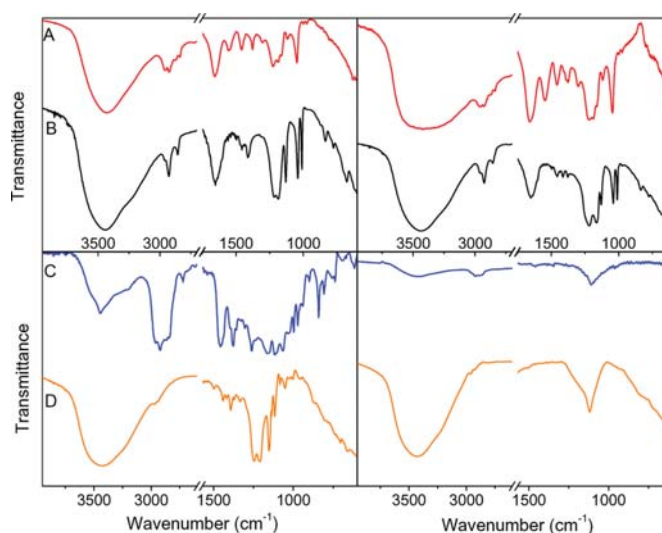


Figure 3. FTIR spectra of (A) $UC_{Tm}@PAMPS$, (B) $UC_{Tm}@PSS$, (C) $UC_{Tm}@PEGP$, and (D) $UC_{Tm}@PFD$ before (left) and after (right) acid treatment.

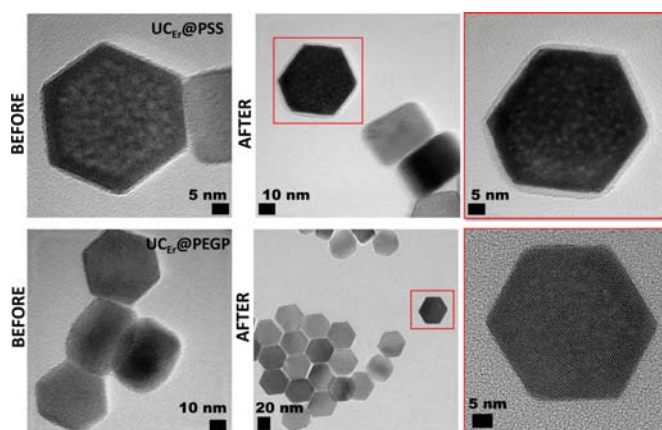


Figure 4. Representative HRTEM images of $UC_{Er}@PSS$ (top) and $UC_{Er}@PEGP$ (bottom), before (left) and after (center) acid treatment; expanded image of the nanoparticles is shown in the red square in the center images (right).

Materials and Methods section) with HCl solution down to pH 2, and its emission was measured after 12 h (see Supporting Information, Figures S9 and S10). Next, the sample was centrifuged and washed with milliQ-water, eventually obtaining a solid, which was analyzed by FTIR. Figure 3 (right) shows the FTIR spectra after acid treatment and reveals that only those cappings with sulfonate groups remain anchored to the surface of the UC_{Ln} NPs, that is, $UC_{Tm}@PAMPS$ and $UC_{Tm}@PSS$, while no capping was then distinguished for $UC_{Tm}@PEGP$ and $UC_{Tm}@PFD$ (see Figure S11 for the UC_{Er} nano hybrids). Figure 4 shows HRTEM images of $UC_{Er}@PSS$ and $UC_{Er}@PEGP$ captured after acid treatment compared to those before such treatment (see Figure S12 for other samples). The fact that the sulfonated ligands remained anchored to the UCNP surface in strong acid medium is relevant from the point of view of UCNP

applications, because the maintenance of the organic capping is crucial for its performance. Remarkably, polysulfonate-capped UC_{Ln} were emissive at acidic pH values (Figure S13). The failure of $UC_{Ln}@PEGP$ and $UC_{Ln}@PFD$ to maintain the capping under strong acid media can be attributed to acid-induced weakening of the coordination of the ligand to the NP surface (see Footnote *ii* for $UC_{Ln}@PFD$).^{27,28}

The change in the NP surface charge as a consequence of the acid treatment was consistent with the variation of the zeta potential of the NPs (see Table S2 in the Supporting Information). Before and after acid treatment, UC_{Ln} and $UC_{Ln}@BF_4$ show positive values (≈ 19 mV), whereas those of $UC_{Ln}@PSS$ and $UC_{Ln}@PAMPS$ are negative (≈ -31 and -26 mV, respectively, due to the anionic polymers). However, $UC_{Ln}@PEGP$ and $UC_{Ln}@PFD$ show either slightly negative (≈ -3 mV) or slightly positive (≈ 11 mV) zeta potential values,

Table 1. Total Molar Amount of Dissolved Lanthanide Ions^a from UC_{Er}@PSS, UC_{Er}@PAMPS, and Naked UC_{Er}^b

sample	time (h)	supernatant (μM) ^c				
		Ln ³⁺ total	Ln ³⁺ loss (%) ^d	Er ³⁺	Y ³⁺	Yb ³⁺
UC _{Er}	24	4.63	4.41	0.0930	3.77	0.780
	48	6.44	6.05	0.120	5.29	1.03
	72	2.70	2.56	0.0536	2.19	0.458
	96	0.200	0.21	4.65×10^{-3}	0.123	0.0712
UC _{Er} @PSS	24	0.0422	0.0555	1.13×10^{-3}	0.0327	8.32×10^{-3}
	48	0.376	0.479	6.16×10^{-3}	0.307	0.0625
	72	0.280	0.346	4.64×10^{-3}	0.239	0.0363
	96	0.352	0.420	3.82×10^{-3}	0.317	0.0319
UC _{Er} @PAMPS	24	1.39	4.03	0.0275	1.12	0.244
	48	1.69	4.97	0.0340	1.32	0.331
	72	1.56	4.51	0.0307	1.26	0.269
	96	0.214	0.669	4.61×10^{-3}	0.151	0.0588

^aLn³⁺: Y³⁺, Yb³⁺, and Er³⁺ ions. ^b10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, incubated in milliQ-water up to 96 h. ^cDetermined by ICP-MS. ^dPercentage of dissolved Ln³⁺ from the starting UC_{Er} nanoparticle.

respectively, before acid treatment (dispersed in milliQ-water), but their zeta potential was similar to that of the bare UC_{Ln} after acid treatment (see Table S3), which evidences the removal of their capping ligand. Indeed, DLS showed no sign of aggregation for these nanohybrids (e.g., UC_{Er}@PSS in Figure S14).

Chemical and Photophysical Stability of the Sulfonate-Coated UC_{Er} NPs in Water. The disintegration of the inorganic core of UC_{Er} in highly diluted aqueous dispersions (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8mL) was evaluated for those systems that showed stable organic capping upon acid treatment, that is, UC_{Er}@PSS and UC_{Er}@PAMPS. For this purpose, the dissolution of UC_{Er}@PSS and UC_{Er}@PAMPS into their constituents, Y³⁺, Yb³⁺, and Er³⁺/Tm³⁺, was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), which is an appropriate quantification method for the release of the ions from the inorganic nanoparticles,⁴ and the process was monitored for up to 96 h. For comparative purposes, the disintegration of the bare UC_{Er} NPs was also analyzed. Briefly, 8 mL of each colloid (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was vortexed (200 rpm/min) at room temperature for 24h. Then, a 2mL aliquot was taken, and after centrifugation (15000 rpm/min, 20 min) and filtration, the supernatant was analyzed by ICP-MS. This process was repeated at 24 h intervals up to 96 h with aliquots taken from the remaining solution to determine the chemical stability of the nanoparticles (see results in Table 1 and a schematic representation of the process in Figure S15 in the Supporting Information).

Data in Table 1 show that the two sulfonated polymers clearly prevented the disintegration of the NP when compared to that of the bare NP (there was a 100-fold less dissolved Ln³⁺ total concentration for the PSS-capped nanoparticle compared to the bare UC_{Er} after 24 h), but PSS was more effective than PAMPS. This could be attributed to the high hydrophobicity of the polystyrene moiety in PSS and/or the higher content of sulfonate groups in this polymer that have a stronger binding capacity than the amide in PAMPS.

An interesting observation was the decrease in the Ln³⁺ concentration in the supernatant arising from the disintegration of the bare UC_{Er} NPs under prolonged incubation in water, specifically 72 and 96 h (Table 1). This may be due to the deposition of the ions as complexes on the NP surface. In fact, ICP-MS results of the solid residue in the centrifuged samples at 24, 48, 72, and 96 h showed how the ratio between

lanthanides in the bare UC_{Er} nanoparticles was changing over time (Figure S16). Interestingly, the ratio of Y increased, but the ratio of both Yb and Er decreased. This explains why the total ion concentration in the supernatant decreased with extended suspension times. This process was much less evident in UC_{Er}@PAMPS, once again corroborating the high chemical stability provided by PAMPS to the inorganic nanoparticle. In addition, the structural integrity of the bare UC_{Er} and UC_{Er}@PSS nanoparticles was monitored by TEM for up to 96 h. These experiments show the drastic corrosion of the bare nanoparticles. These images also demonstrate the beneficial effect of the polysulfonate in preventing the nanoparticle disintegration (Figure S17).

Finally, the photophysical stability, that is, the upconversion luminescence in aqueous media of UC_{Er}@PSS, UC_{Tm}@PSS, and naked UC_{Er} (particle concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), was evaluated. The luminescence spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 975 \text{ nm}$) were registered after incubating the nanoparticles for 24 h (every 90 min for the first 8 h and then at 24 h) in pure water while being slowly shaken. The area under the curve was calculated for each measurement. Figure 5 clearly shows a loss of emission intensity for bare UC_{Er}. As explained above, this fact could be attributed not only to the loss of doping ions (Yb/Er) and disintegration of UC_{Er}, but also to adsorption of some of the “dissolved” ions on the nanoparticle surface. Undoubtedly, the best photostability was observed for UC_{Ln}@PSS, which

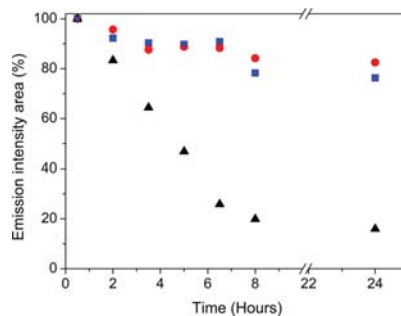


Figure 5. Emission intensity (area under the curve) over time for water dispersions of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ UC_{Er}@PSS (blue squares), UC_{Tm}@PSS (red circles), and naked UC_{Er} (black triangles).

wholly agrees with the lower dissolution of lanthanide ions in water as observed by ICP-MS. Therefore, coating the UC_{L_n} with PSS not only allowed chemical stability in highly acidic medium but also prevented dissolution of its inorganic UC_{L_n} core into its lanthanide ions and preserved the upconversion emission for longer periods.

CONCLUSIONS

In summary, we demonstrate here that not only do highly acidic polysulfonates remain strongly coordinated to the NaYF₄:Ln³⁺ UCNPs in strong acidic media and provide the nanoparticle with high dispersibility in water as well as additional functionality but also these cappings meet the requirements for an adequate protection of NaYF₄:Ln³⁺ UCNPs to preserve their integrity in highly diluted water dispersions. These are especially interesting results because an adequate capping can preserve the luminescence properties of the UCNPs as well as avoid the (bio)toxicity caused by the disintegration of the nanoparticles into toxic ions, such as fluoride ions. The next step is to study the capacity of the sulfonate capping to preserve the chemical stability and photophysical features of the nanoparticles in highly diluted, strongly acidic solutions; these studies are ongoing and will be reported in due course.

MATERIALS AND METHODS

The chemicals used for the nanoparticle syntheses were lanthanide chlorides (YCl₃·6H₂O, YbCl₃·6H₂O, ErCl₃·6H₂O, TmCl₃·6H₂O, and NdCl₃·6H₂O (>99.9%, all of them)), 1-octadecene (95%), oleic acid (70%), and NaOH and NH₄F (99.99%). All of these chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and used as received without previous purification. The chemicals used for the coatings were poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonate), (*M_w* of ~25,000) (see the Supporting Information), poly(sodium 4-styrene sulfonate), PSS (*M_w* of ~70,000, Sigma-Aldrich), mPEG5K-phosphate (Sigma-Aldrich), and 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-decanol (>97%, Alfa Aesar). Transmission electron microscopy (TEM) images were obtained using a Jeol 1010 microscope operating at 100 kV equipped with a digital camera (AMT RX80; 8 megapixels). For the preparation of the samples, 10 μL of a 0.5 mg·mL⁻¹ solution of the UCNPs was left to dry under vacuum at room temperature on a Formvar/carbon film supported on a 300-mesh copper grid. High-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) images were recorded using a TECNAI G2 F20 microscope operating at 200 kV (point resolution of 0.24 nm) and equipped with a CCD GATAN camera. XRD analyses were performed on a Bruker D8 Advance A25 diffractometer using Cu Kα ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$) radiation at a voltage of 40 kV and 30 mA, and a LynxEye detector. The powder diffraction pattern was scanned over the angular range of 2–80° (2θ) with a step size of 0.020° at room temperature. All FTIR spectra were obtained using an FTIR Thermo Nicolet Nexus spectrophotometer at room temperature with 64 scans and a resolution of 4 cm⁻¹ between 400 and 4000 cm⁻¹. The TGA analyses were carried out using a TGA 550 from TA instruments with an operative temperature range 50–800 °C and 0.1 microgram sensitivity. The samples were heated from 50 to 750 °C, with an increase of 5 °C·min⁻¹ and under air flux of 50 mL·min⁻¹. The pH measurements were carried out by using a pH meter (GLP21). Centrifugation was carried out in a Thermo-Scientific Legend

XIR. ICP-MS analyses were carried out using an ICP-MS Agilent 7900. Dynamic light scattering and zeta potential (ζ) analyses were performed on a Zetasizer Nano ZS from Malvern.

Synthesis of UC_{L_n} Coated with Polystyrene Sulfonate (UC_{L_n}@PSS). A mixture of 2 mL of UC_{L_n}@BF₄ dispersed in DMF (50mg/mL), DMF (3 mL) and PSS (1.7 mL) was kept under vigorous stirring at 60 °C. This turbid mixture was further stirred for 24 h. Then, the BF₄⁻ capping was replaced by PSS. The dispersion was centrifuged for 20 min at 15000 rpm, and the supernatant was discarded. Then, the coated UC_{L_n}@PSS NPs were redispersed in 10 mL of milliQ-water and centrifuged for 15 min at 15000 rpm to remove excess PSS. This step was repeated three times. Finally, the pellet was redispersed in DMF (5 mL) and centrifuged for 3 min at 2000 rpm to get rid of larger agglomerates.

Synthesis of UC_{L_n} Coated with Poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonate) (UC_{L_n}@PAMPS). To 2 mL of a UC_{L_n}@BF₄ dispersion (50mg/mL DMF), 500 mg of AMPS dissolved in 3 mL of DMF was added and kept under vigorous stirring at 60 °C for 24 h to displace BF₄⁻ and obtain UC_{L_n}@PAMPS. The following steps were identical to those described above for purification of UC_{L_n}@PSS.

Synthesis of UC_{L_n} Coated with mPEG5K-Phosphate (UC_{L_n}@PEGP). Naked UC_{L_n} NPs were coated with mPEG5K-phosphate by following the procedure previously described.^{29,30} In short, approximately 50 mg of naked UC_{L_n} dispersed in 2 mL of absolute ethanol was placed into a glass vial, and 300 mg of PEG-phosphate ligand was added to it. The vial was capped tightly, and the resulting solution was stirred overnight at 60 °C. Then, it was cooled to room temperature, UC_{L_n}@PEGP NPs were collected via centrifugation at 15000 rpm for 20 min, and the supernatant was discarded. The pellet was redispersed in 10 mL of milliQ-water and centrifuged for 15 min at 10000 rpm. This washing step was repeated in triplicate.

Synthesis of UC_{L_n} Coated with 1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-decanol (UC_{L_n}@PFD). To 2 mL of a UC_{L_n}@BF₄ dispersion in DMF (50mg/mL), 500 mg of 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-decanol dissolved in 3 mL of DMF and four drops of triethylamine were added under vigorous stirring at 50 °C for 24 h. The dispersion was centrifuged for 20 min at 15000 rpm, and the supernatant was discarded. The pellet was redispersed in 10 mL of methanol and centrifuged for 15 min at 15000 rpm twice. Additionally, it was washed two times by dispersion in 10 mL of methanol. Finally, the pellet was redispersed in 5 mL of DMF.

Steady-State Photoluminescence. Steady-state photoluminescence spectra were obtained at room temperature with a 2 nm slit width and 5 nm·s⁻¹ speed scan using an SLM Amingo Bowmann series 2 (AB2) fluorometer (Microbeam, S.A.). The AB2 software (v.5.5) was used to register the data. Upconversion emission spectra were recorded by excitation at 975 ± 10 nm using a CW 975 nm diode laser (Thorlabs L975P1WJ) as an excitation source coupled to the fluorometer.

Measurement of the Nanohybrid Emission versus pH. The selected coated UC_{L_n} was dispersed in milliQ-water (5 mg × 5 mL⁻¹), and the pH of the colloidal dispersion was measured at room temperature. Subsequently, different aliquots (5 or 10 μL) of HCl solution (0.1 or 0.5M) were added, and after each addition, the pH and the emission were measured up to pH 2 or slightly lower. Next, the emission was registered again after 12 h under continuous stirring. After that, the sample was centrifuged at 15000 rpm for 20 min, and the

solid was washed twice with 5 mL of milliQ-water. After removing the supernatant, the solid was dried under vacuum, and the FTIR spectrum was registered.

Chemical Stability of UC_{Er}@PSS, UC_{Er}@PAMPS and Bare UC_{Er}@PSS in Water. A dissolution test of the UC_{Ln} NPs into its constituents Y³⁺, Yb³⁺, and Er³⁺/Tm³⁺ was performed for UC_{Er}@PSS, UC_{Er}@PAMPS, and bare UC_{Er}@PSS. In each case, the colloid (8 mL, 10 μg/mL) in water was shaken (200 rpm/min) at room temperature for 24 h. Then, a 2 mL aliquot was taken and centrifuged at 15000 rpm for 20 min to remove the majority of the UC_{Ln}, and the supernatant was subsequently filtered³¹ by using an ACRODISC GHP 0.2 μm filter to avoid the presence of UC_{Ln}. This process was repeated three times to determine the chemical stability of the nanoparticles for up to 96 h (see results in Table 1). Finally, the supernatants were taken for analysis by ICP-MS using a spectrometer (IC-MS Agilent 7900) (see schematic representation of the process in Figure S13 in the Supporting Information).

Photophysical Stability of UC_{Ln}@PSS in Water. The effect of the Ln³⁺ ion dissolution from the UCNP on their upconversion emission was studied by following a procedure similar to that previously described.⁴ Briefly, UC_{Ln}@PSS (5 μg/mL) and naked-UC_{Er} (5 μg/mL) solutions in water were prepared and stirred at room temperature. The emission intensity of these solutions was monitored by recording the emission spectrum between 0 and 24 h. Then, the area under the emission peaks was measured.

■ ASSOCIATED CONTENT

5 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsomega.8b03015.

Experimental procedure, zeta potential data, ICP-MS analyses, XRD, ¹⁹F-NMR and TGA spectra, additional TEM images, FTIR spectra, emission spectra and emission of a water dispersion of UCNPs vs time (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: maria.gonzalez@uv.es (M.G.-B.).

*E-mail: julia.perez@uv.es (J.P.-P.).

ORCID

María González-Béjar: 0000-0001-5434-4210

Julia Pérez-Prieto: 0000-0002-5833-341X

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank MINECO (CTQ2017-82711-P) partially cofinanced with FEDER funds, Maria de Maeztu (MDM-2015-0538), RTC-2016-5114-5 (contract NEB), RyC (MGB), and Fundación Ramón Areces for financing this research.

■ ADDITIONAL NOTES

[†]The coordination chemistry of fluorocarbon C–F moieties with metal cations has been previously reviewed in 1997 and 2004 (see refs 16 and 17). In addition, the activation of C–F

bonds by bonding lanthanide ions has been reported (see refs 18 and 19).

[‡]NMR measurements combined with DFT theoretical calculations have revealed the existence of intramolecular hydrogen bonds in organofluorine-substituted derivatives of different classes of molecules (ref 27). In addition, it has been suggested that proton–fluoride interactions can play a significant role in the stabilization of conformational molecular states, especially via cooperativity (ref 28)

■ REFERENCES

- (1) Gnach, A.; Bednarkiewicz, A. Lanthanide-Doped up-Converting Nanoparticles: Merits and Challenges. *Nano Today* **2012**, *7*, 532–563.
- (2) Wu, X.; Chen, G.; Shen, J.; Li, Z.; Zhang, Y.; Han, G. Upconversion Nanoparticles: A Versatile Solution to Multiscale Biological Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 166–175.
- (3) Lisjak, D.; Plohl, O.; Ponikvar-Svet, M.; Majaron, B. Dissolution of Upconverting Fluoride Nanoparticles in Aqueous Suspensions. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 27393–27397.
- (4) Lahtinen, S.; Lyytikäinen, A.; Pääkkilä, H.; Hömppi, E.; Perälä, N.; Lastusaari, M.; Soukka, T. Disintegration of Hexagonal NaYF₄:Yb³⁺,Er³⁺ Upconverting Nanoparticles in Aqueous Media: The Role of Fluoride in Solubility Equilibrium. *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 656–665.
- (5) Dukhno, O.; Przybilla, F.; Muhr, V.; Buchner, M.; Hirsch, T.; Mély, Y. Time-Dependent Luminescence Loss for Individual Upconversion Nanoparticles upon Dilution in Aqueous Solution. *Nanoscale* **2018**, *10*, 15904–15910.
- (6) Santoyo-Sanchez, M. P.; del Carmen Silva-Lucero, M.; Arreola-Mendoza, L.; Barbier, O. C. Effects of Acute Sodium Fluoride Exposure on Kidney Function, Water Homeostasis, and Renal Handling of Calcium and Inorganic Phosphate. *Biol. Trace Elem. Res.* **2013**, *152*, 367–372.
- (7) Otting, G. Prospects for Lanthanides in Structural Biology by NMR. *J. Biomol. NMR* **2008**, *42*, 1–9.
- (8) Mindell, J. A. Lysosomal Acidification Mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* **2012**, *74*, 69–86.
- (9) Bogdan, N.; Vetrone, F.; Ozin, G. A.; Capobianco, J. A. Synthesis of Ligand-Free Colloidally Stable Water Dispersible Brightly Luminescent Lanthanide-Doped Upconverting Nanoparticles. *Nano Lett.* **2011**, *11*, 835–840.
- (10) Barbier, O.; Arreola-Mendoza, L.; Del Razo, L. M. Molecular Mechanisms of Fluoride Toxicity. *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, *188*, 319–333.
- (11) Shannahan, J. H.; Podila, R.; Aldossari, A. A.; Emerson, H.; Powell, B. A.; Ke, P. C.; Rao, A. M.; Brown, J. M. Formation of a Protein Corona on Silver Nanoparticles Mediates Cellular Toxicity via Scavenger Receptors. *Toxicol. Sci.* **2015**, *143*, 136–146.
- (12) Ahsan, S. M.; Rao, C. M.; Ahmad, M. F. Nanoparticle-Protein Interaction: The Significance and Role of Protein Corona BT - *Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles*; Saquib, Q., Faisal, M., Al-Khedhairi, A. A., Alatar, A. A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp 175–198.
- (13) Voutchkova, A. M.; Osimitz, T. G.; Anastas, P. T. Toward a Comprehensive Molecular Design Framework for Reduced Hazard. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 5845–5882.
- (14) Li, R.; Ji, Z.; Dong, J.; Chang, C. H.; Wang, X.; Sun, B.; Wang, M.; Liao, Y.-P.; Zink, J. I.; Nel, A. E.; et al. Enhancing the Imaging and Biosafety of Upconversion Nanoparticles through Phosphonate Coating. *ACS Nano* **2015**, *9*, 3293–3306.
- (15) Recalde, I.; Estebanez, N.; Francés-Soriano, L.; Liras, M.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Upconversion Nanoparticles with a Strong Acid-Resistant Capping. *Nanoscale* **2016**, *8*, 7588–7594.
- (16) Plenio, H. The Coordination Chemistry of the CF Unit in Fluorocarbons. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 3363–3384.
- (17) Plenio, H. The Coordination Chemistry of Fluorine in Fluorocarbons. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 650–655.

- (18) Perutz, R. N. A Catalytic Foothold for Fluorocarbon Reactions. *Science* **2008**, *321*, 1168.
- (19) Burdeniuc, J.; Jedicka, B.; Crabtree, R. H. Recent Advances in C–F Bond Activation. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *130*, 145–154.
- (20) San Filippo, J., Jr.; Nuzzo, R. G.; Romano, L. J. Application of Lanthanide Shift Reagents to Alkyl Fluorides. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 2546.
- (21) Träff, A. M.; Janjetovic, M.; Ta, L.; Hilmersson, G. Selective C–F Bond Activation: Substitution of Unactivated Alkyl Fluorides Using Yb13. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12073–12076.
- (22) Janjetovic, M.; Träff, A. M.; Hilmersson, G. Mild and Selective Activation and Substitution of Strong Aliphatic C–F Bonds. *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 3772–3777.
- (23) Wilhelm, S.; Kaiser, M.; Würth, C.; Heiland, J.; Carrillo-Carrion, C.; Muhr, V.; Wolfbeis, O. S.; Parak, W. J.; Resch-Genger, U.; Hirsch, T. Water Dispersible Upconverting Nanoparticles: Effects of Surface Modification on Their Luminescence and Colloidal Stability. *Nanoscale* **2015**, *7*, 1403–1410.
- (24) Dong, A.; Ye, X.; Chen, J.; Kang, Y.; Gordon, T.; Kikkawa, J. M.; Murray, C. B. A Generalized Ligand-Exchange Strategy Enabling Sequential Surface Functionalization of Colloidal Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 998–1006.
- (25) Muhr, V.; Würth, C.; Kraft, M.; Buchner, M.; Baeumner, A. J.; Resch-Genger, U.; Hirsch, T. Particle-Size-Dependent Förster Resonance Energy Transfer from Upconversion Nanoparticles to Organic Dyes. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 4868–4874.
- (26) Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S. *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*; Saunders Golden Sunburst Series; Harcourt College Publishers, 2001.
- (27) Mishra, S. K.; Suryaprakash, N. Intramolecular Hydrogen Bonding Involving Organic Fluorine: NMR Investigations Corroborated by DFT-Based Theoretical Calculations. *Molecules* **2017**, *22*, 423.
- (28) Güizado-Rodríguez, M.; Ariza-Castolo, A.; Merino, G.; Vela, A.; Noth, H.; Bakhmutov, V. I.; Contreras, R. Weak Intramolecular Proton–Hydride and Proton–Fluoride Interactions: Experimental (NMR, X-Ray) and DFT Studies of the Bis(NBH₃) and Bis(NBF₃) Adducts of 1,3-Dimethyl-1,3-Diazolidine. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9144–9152.
- (29) Das, G. K.; Stark, D. T.; Kennedy, I. M. Potential Toxicity of Up-Converting Nanoparticles Encapsulated with a Bilayer Formed by Ligand Attraction. *Langmuir* **2014**, *30*, 8167–8176.
- (30) Boyer, J.-C.; Manseau, M.-P.; Murray, J. L.; van Veggel, F. C. J. M. Surface Modification of Upconverting NaYF₄ Nanoparticles with PEG–Phosphate Ligands for NIR (800 nm) Biolabeling within the Biological Window. *Langmuir* **2010**, *26*, 1157–1164.
- (31) Plohl, O.; Kralj, S.; Majaron, B.; Fröhlich, E.; Ponikvar-Svet, M.; Makovec, D.; Lisjak, D. Amphiphilic Coatings for the Protection of Upconverting Nanoparticles against Dissolution in Aqueous Media. *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 6975–6984.

Supporting information

Polysulfonate Cappings on Upconversion Nanoparticles Prevent their Disintegration in Water and Provide Superior Stability in a Highly Acidic Medium

Nestor Estebanez^a, María González-Béjar,^{a,b,*} Julia Pérez-Prieto^{a,b*}

^aInstituto de Ciencia Molecular (ICMol)/ ^bDepartamento de Química Orgánica, Universitat de València. C/Catedrático José Beltrán, 2, 46980 Paterna (Valencia), Spain.

Contact authors: maria.gonzalez@uv.es; julia.perez@uv.es

INDEX

Synthesis of oleate-capped nanoparticles (UC _{Er} @OA)	S2
Synthesis of oleate-capped nanoparticles (UC _{Tm} @OA)	S2
Ligand exchange with BF ₄ ⁻	S2
Ligand removal with HCl	S2
Synthesis of polymer 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonate (PAMPS)	S3
Figure S1. XRD spectra of UC _{Ln} @OA	S3
Figure S2. Low-resolution TEM images of UC _{Ln} @OA	S4
Table S1. Composition of UC _{Ln} @OA	S4
Figure S3. HRTEM images of UC _{Tm1} @PAMPS and UC _{Tm1} @PSS	S4
Figure S4. FTIR spectra of UC _{Tm1} @PAMPS, UC _{Tm2} @PEGP and UC _{Tm1} @PFD	S5
Figure S5. Thermogravimetric analyses of UC _{Tm1} @BF ₄ , UC _{Tm1} @AMPS, UC _{Tm1} @PSS and UC _{Tm1} @PFD	S6
Figure S6. HRTEM images of UC _{Er} @PSS and UC _{Er} @AMPS before and after acid treatment	S6
Figure S7. ¹⁹ F-NMR spectra of PFD and UC _{Tm1} @PFD	S7
Figure S8. Emission spectra of nanohybrids	S8
Figure S9. Emission spectra of UC _{Er} @PAMPS and UC _{Er} @PSS after acid treatment	S8
Figure S10. Emission spectra of UC _{Tm2} @PEGP and UC _{Tm1} @PFD after acid treatment	S9
Figure S11. FTIR spectra of nanohybrids before and after acid treatment	S9
Figure S12. HRTEM images of UC _{Er} @AMPS and UC _{Tm2} @PEGP before and after acid treatment	S10
Figure S13. Comparison between emission spectra of UC _{Tm1} @PSS and UC _{Er} @PSS in water at pH 6.5 and pH 2.0	S10
Table S2. Values of zeta potential of nanohybrids	S10
Table S3. Values of zeta potential UC _{Tm1} @BF ₄ , UC _{Tm2} and UC _{Er} @BF ₄	S11
Figure S14. Dynamic scattering (DLS) of UC _{Tm1} @PSS dispersed in DMF.	S11
Figure S15. Schematic representation of the procedure followed to study the stability of the UCNP in water	S11
Figure S16. Ratio between lanthanides in bare UC _{Er} nanoparticles at different dissolution times.	S12
Figure S17. TEM images of bare UC _{Er} and UC _{Er} @PSS at 15 minutes, 48 and 96 hours	S12

Synthesis of oleate-capped NaYF₄:Yb³⁺(16%),Er³⁺(2%) nanoparticles (UC_{Er}@OA). In a 1000 mL three-necked flask, YCl₃·6H₂O (15.6 mmol), YbCl₃·6H₂O (4.0 mmol), ErCl₃·6H₂O (0.4 mmol), oleic acid (160 mL) and octadecene (300 mL) were stirred at 160 °C under an atmosphere N₂ until lanthanides salts were completely dissolved. The reaction was then cooled to room temperature and 100 ml of methanol containing NaOH (0.5M) and NH₄F (0.8M) were added at once. The colloidal suspension was stirred for 30 min at 120 °C, under a flow of nitrogen and then heated to reflux at 305-308 °C for 90 minutes. Afterwards, the mixture was cooled to room temperature. The formed UCNPs were precipitated by addition of ethanol and isolated via centrifugation at 7000 rpm for 5 minutes. The white pellet was washed three times by dispersion of the UCNPs in chloroform and then precipitated by addition of excess of ethanol, additionally washed three times by dispersion in cyclohexane, and then precipitated by addition of excess of acetone. Finally, the purified UC_{Er}@OA were dispersed in cyclohexane.

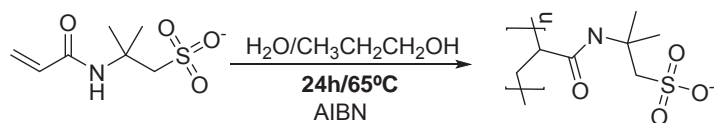
Synthesis of oleate-capped NaYF₄:Yb³⁺(16%),Tm³⁺(0.35%) nanoparticles (UC_{Tm}@OA). In a 1000 mL three-necked flask, YCl₃·6H₂O (15.0 mmol), YbCl₃·6H₂O (5.0 mmol), TmCl₃·6H₂O (0.06 mmol), oleic acid (160 mL) and octadecene (300 mL) were stirred at 160 °C under an atmosphere N₂ until lanthanides salts were completely dissolved. The reaction was then cooled to room temperature and 100 ml of methanol containing NaOH (0.5M) and NH₄F (0.8M) were added at once. The colloidal suspension was stirred for 30 min at 120 °C, under a flow of nitrogen and then heated to reflux at 305-308 °C for 90 minutes. Afterwards, the mixture was cooled to room temperature. The formed UCNPs were precipitated by addition of ethanol and isolated via centrifugation at 7000 rpm for 5 minutes. The white pellet was washed three times by dispersion of the UCNPs in chloroform and then precipitated by addition of excess of ethanol, additionally washed three times by dispersion in cyclohexane, and then precipitated by addition of excess of acetone. Finally, the purified UC_{Tm}@OA were dispersed in cyclohexane.

Ligand exchange with BF₄⁻. We used a ligand-exchange strategy using nitrosonium tetrafluoroborate (NOBF₄) to replace the original oleate ligands attached to the UCNPs.^{1,2} In particular, in 50 mL round bottom flask 10 mL of UC_{Ln}@OA [25 mg/mL] dispersed in cyclohexane and then 10 mL dimethylformamide (DMF) were added. This resulted in a two-phase system consisting of an upper layer of cyclohexane (containing the OA-coated UCNPs) and a subjacent layer of DMF. Subsequently 250 mg of NOBF₄ were added at once under vigorous stirring and the mixture was stirred for 60 minutes. This resulted in the phase transfer of the UCNPs from cyclohexane to DMF. The UCNPs in the slightly turbid DMF phase were precipitated by adding 100 mL of chloroform and were collected by centrifugation (7000 rpm, 5 minutes).

The transparent pellet was redispersed in 5 mL of DMF, precipitated again by addition of an excess of chloroform (50ml), and collected by centrifugation. This wash was repeated three times. Afterwards, the pellet was redispersed in 5 mL of DMF and centrifuged (2000 rpm, 3 minutes) in order to get rid of larger agglomerates to afford UC_{Ln}@BF₄.

Ligand removal with HCl. For this synthesis we used a protocol based on two-steps. The first one is the complete removal of the hydrophobic ligand oleate by treatment of hydrophobic UCNPs with hydrochloric acid that can strip the native ligands off the surface to generate ligand-free and water-dispersible particles.³ The UC_{Ln}@OA (50 mg) were dried and then, dispersed in 0.1 M HCl (10 ml, pH = 3), sonicated in an ultrasonic bath and stirred for 3 hours while adjusting the pH value to 3 by the addition of the HCl solution every 30 min. After this, the oleic acid was extracted with diethyl ether and the process was repeated until the solution became almost transparent. Naked UCNPs (UC_{Ln}) were precipitated with acetone and centrifuged (10000 rpm for 8 min), and collected by dried under vacuum.

Synthesis of poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonate acid, PAMPS) The polymer (PAMPS) has been prepared via free radical polymerization by using a high percentage of azobisisobutyronitrile (AIBN) as initiator as previously reported.⁴ The free radical polymerization and purification was carried out by following a previously described protocol.⁵



Scheme 1. Synthesis of PAMPS.

Briefly, polymerization was carried out in a deoxygenated mixture of milli-Q water/n-propanol (50: 50 v/v; total volume of 60 mL) containing, AMPS (14 g, 67mmol), and AIBN as initiator (500 mg, 3.00 mmol). The solution was deoxygenated with nitrogen for 2 hours and continuously stirred at 65 °C for 24 h. The reaction was cooled (using an ice-bath) Then, 50 mL chloroform were added and the mixture was vigorously stirred during 3 h. The reaction was stopped and two phases were observed, the denser phase (strong emulsion) was discarded. Organic solvents were removed at reduced pressure from the other one and, then, dried under vacuum.

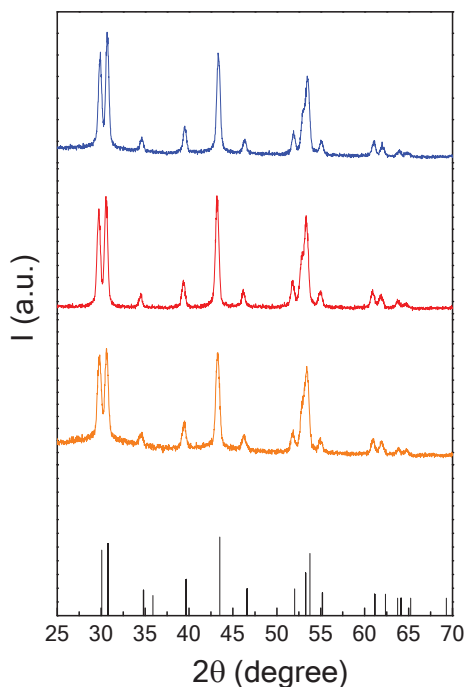


Figure S1. XRD spectra of: Orange-line: NaYF₄:Yb,Tm (UC_{Tm1}@OA); red line: NaYF₄:Yb,Tm (UC_{Tm2}@OA) and blue line: NaYF₄:Yb,Er (UC_{Er}@OA) and hexagonal NaYF₄ standard (JCPDS PDF number 16-0334).

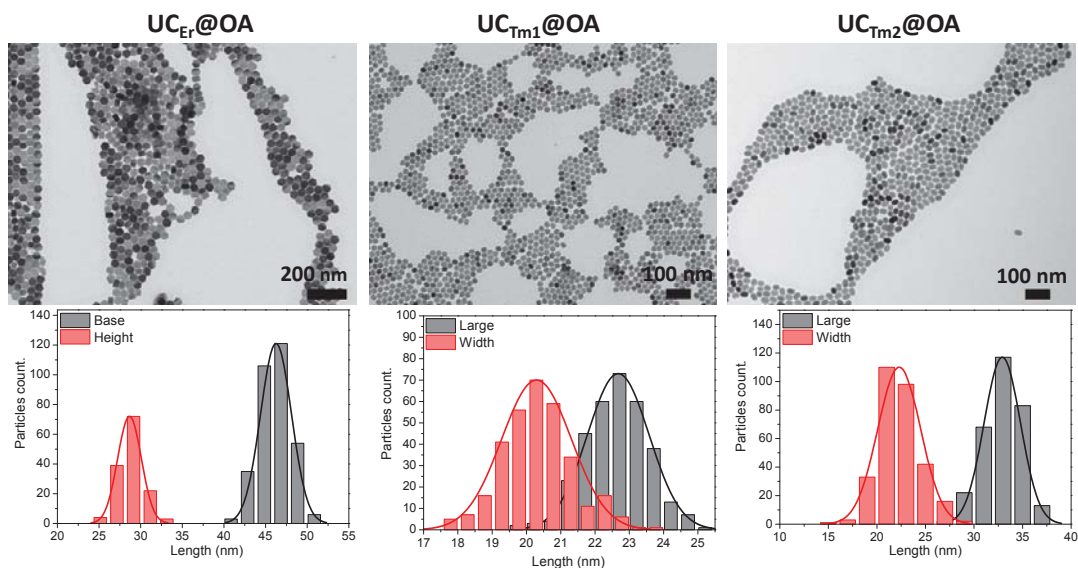


Figure S2. Representative low-resolution TEM images for UC_{L_n} together with size distribution histograms constructed from these TEM particle measurements: (left) UC_{Er}@OA, (Middle) UC_{Tm1}@OA and (right) UC_{Tm2}@OA.

Table S1. Content of rare-earth ions of UC_{L_n}@OA determined by ICP-MS.

Samples	Code	Er ⁺³ [%mol]	Tm ⁺³ [%mol]	Yb ⁺³ [%mol]	Y ⁺³ [%mol]
NaYF ₄ :Yb,Tm	UC _{Tm1} @OA		0.3	75.9	23.8
NaYF ₄ :Yb,Tm	UC _{Tm2} @OA		0.3	76.2	23.5
NaYF ₄ :Yb,Er	UC _{Er} @OA	2.1		16.9	81.0

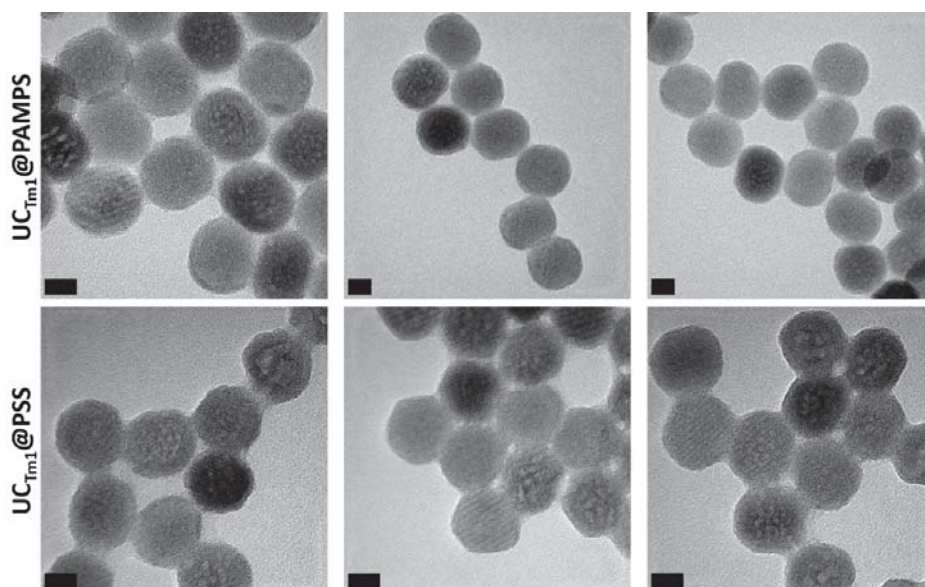


Figure S3. Representative HRTEM images of (top) UC_{Tm1}@PAMPS and (bottom) UC_{Tm1}@PSS. Scale bar 10 nm.

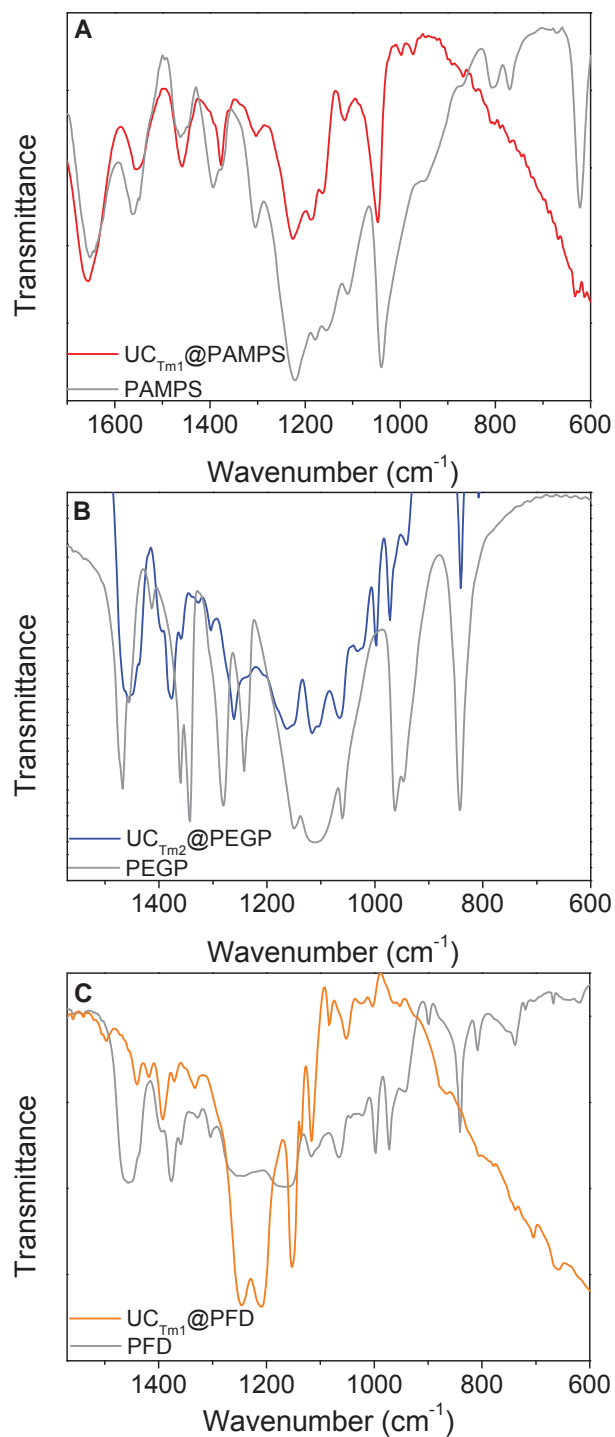


Figure S4. FTIR spectra of (A) UC_{Tm1}@PAMPS (red line), (B) UC_{Tm2}@PEGP (blue line) and (C) UC_{Tm1}@PFD (orange line). The grey line in A-C corresponds to PAMPS, PEGP and PFD, respectively.

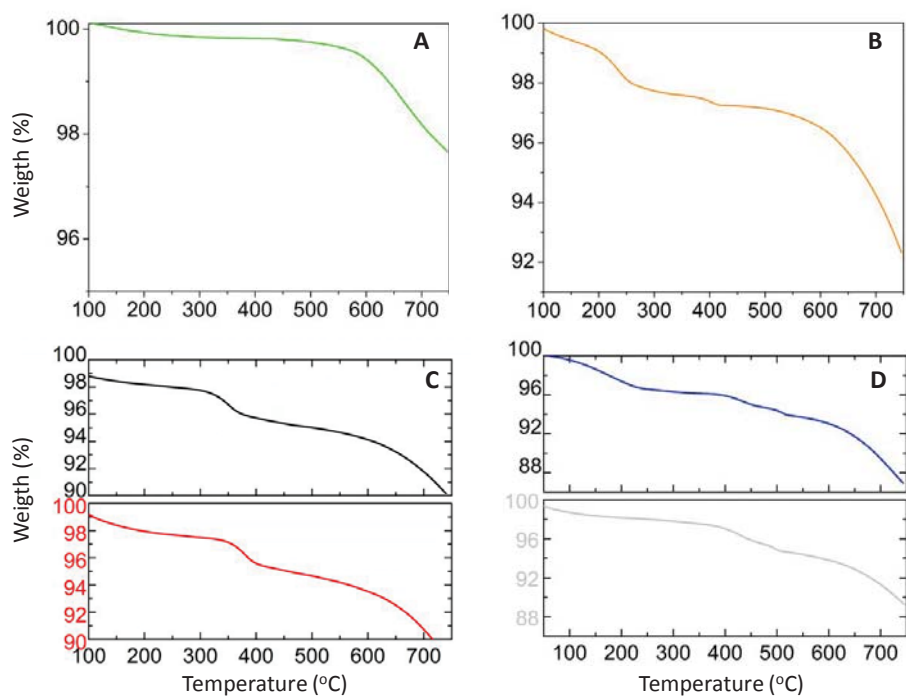


Figure S5. Thermograms of (A) UC_{Tm1}@BF₄ (green), (B) UC_{Tm1}@PFD (orange). UC_{Tm1}@AMPS (red), (C) comparison between UC_{Er}@AMPS (black) and UC_{Tm1}@AMPS (red) and (D) comparison between UC_{Er}@PSS (blue) and UC_{Tm1}@AMPS (gray).

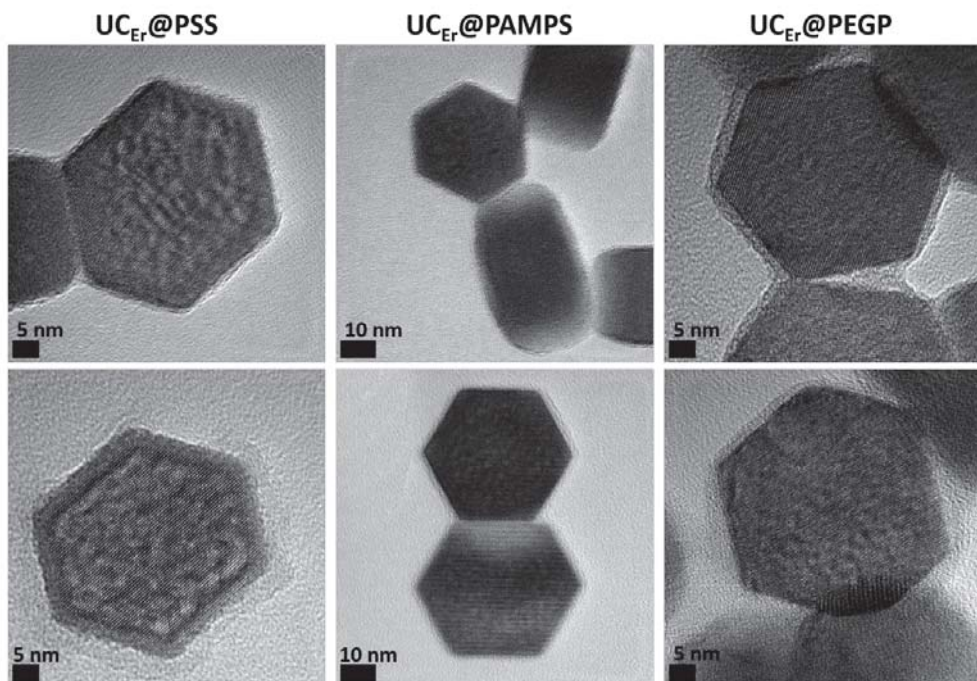


Figure S6. Representative HRTEM images of (left) UC_{Er}@PSS, (middle) UC_{Er}@AMPS and (right) UC_{Er}@PEGP.

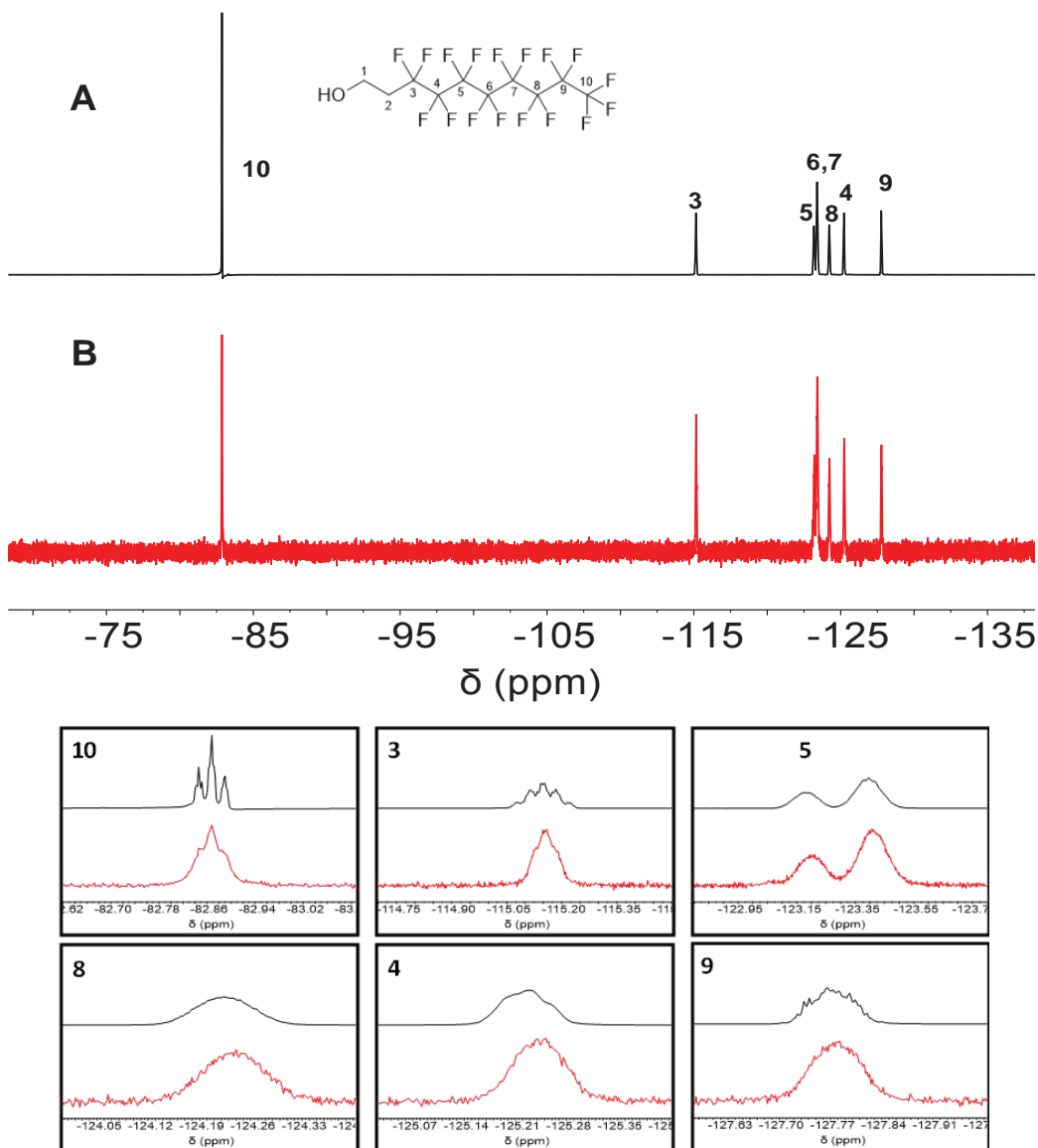


Figure S7. ^{19}F -NMR spectra of (A) PFD and (B) UC-Tm_1 @PFD in deuterated methanol. (C) Amplification of signals 1-7 of the ^{19}F -NMR spectra.

^{19}F -NMR of 1H,1H,2H,2H-perfluoro-1-decanol.

^{19}F -NMR (MEOD) δ_{F} , ppm: -82.85 (3F, t, CF_3), -115.15 (2F, m, $\text{CH}_2\text{-CF}_2\text{-CF}_2$), -123.15 and -123.40 (6F, m, $\text{CH-(CF}_2)_2\text{-CF}_2$, $\text{CH}_2\text{(CF}_2)_3\text{-CF}_2$, $\text{CF}_2\text{(CF}_2)_2\text{-CF}_3$), -124.20 (2F, m, $\text{CF}_2\text{-CF}_2\text{-CF}_3$), -125.25 (2F, m, $\text{CH}_2\text{-CF}_2\text{-CF}_2$), -127.75 (2F, m, $\text{CF}_2\text{-CF}_3$).

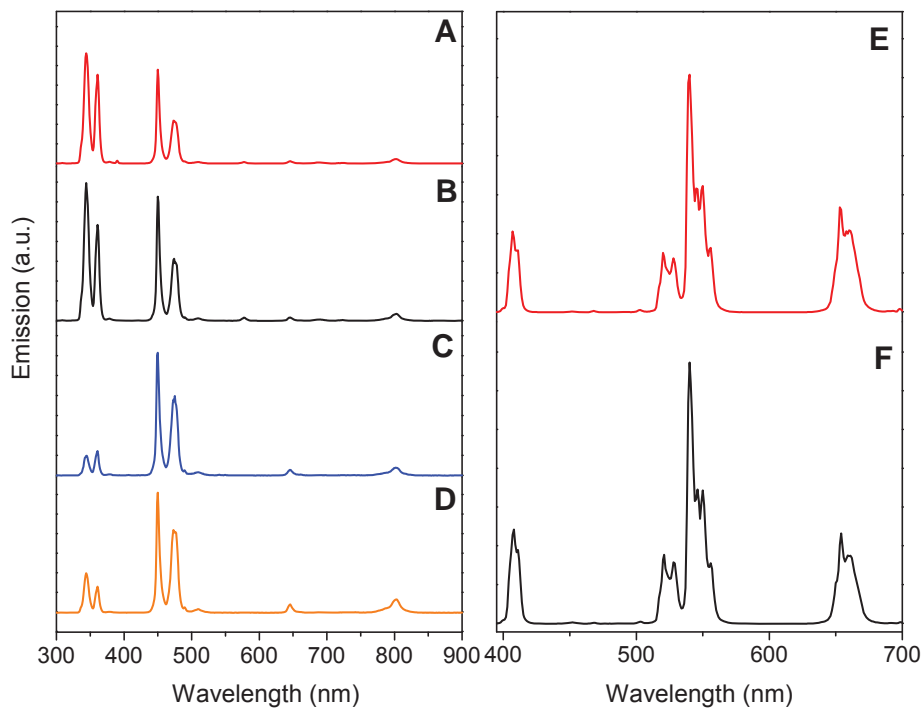


Figure S8. Emission spectra of (A) UC_{Tm1}@PAMPS [5mg/ml DMF], (B) UC_{Tm1}@PSS [5mg/ml DMF], (C) UC_{Tm2}@PEGP [2mg/ml H₂O], (D) UC_{Tm1}@PFD [5mg/ml DMF], (E) UC_{Er}@PAMPS [5mg/ml DMF] and (F) UC_{Er}@PSS [5mg/ml DMF]. (λ_{ex} = 975 nm).

Stability of the polymer capping of UC_{L_n} in strongly acidic media

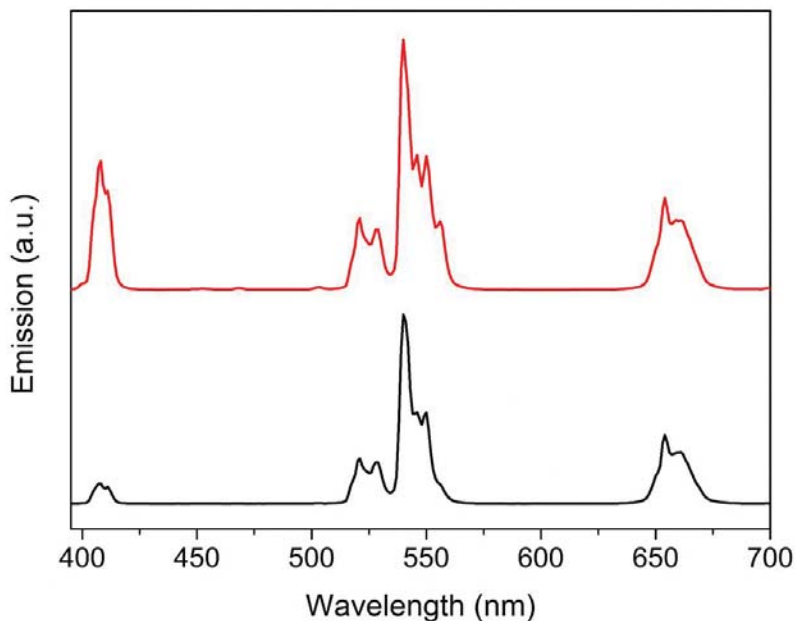


Figure S9. Emission spectra of UC_{Er}@PAMPS (top) and UC_{Er}@PSS (bottom) after acid treatment. The concentration of the solutions was 1 mg/mL in H₂O. (λ_{ex} = 975 nm).

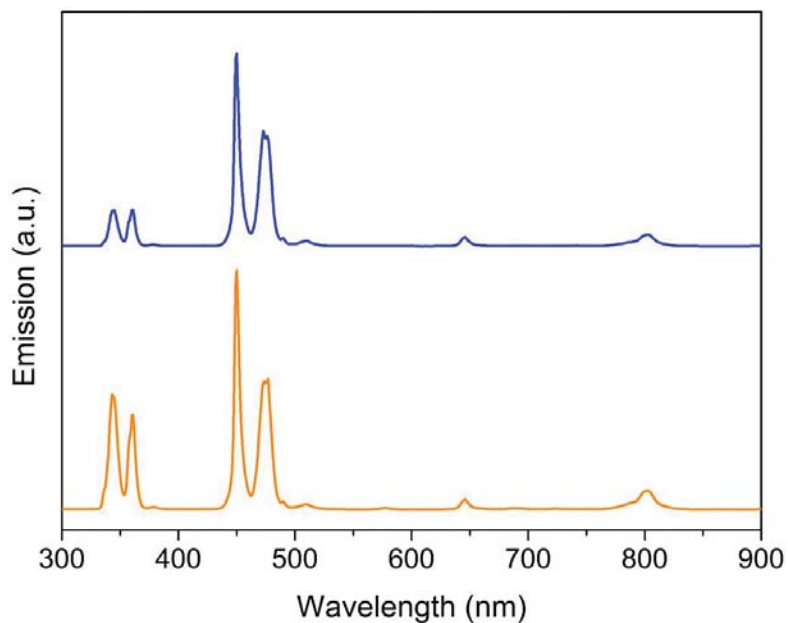


Figure S10. Emission spectra of UC_{Tm2}@PEGP (top) and UC_{Tm1}@PFD (bottom) after acid treatment. The concentration of the solutions was 1 mg/mL in H₂O. ($\lambda_{\text{ex}}=975$ nm).

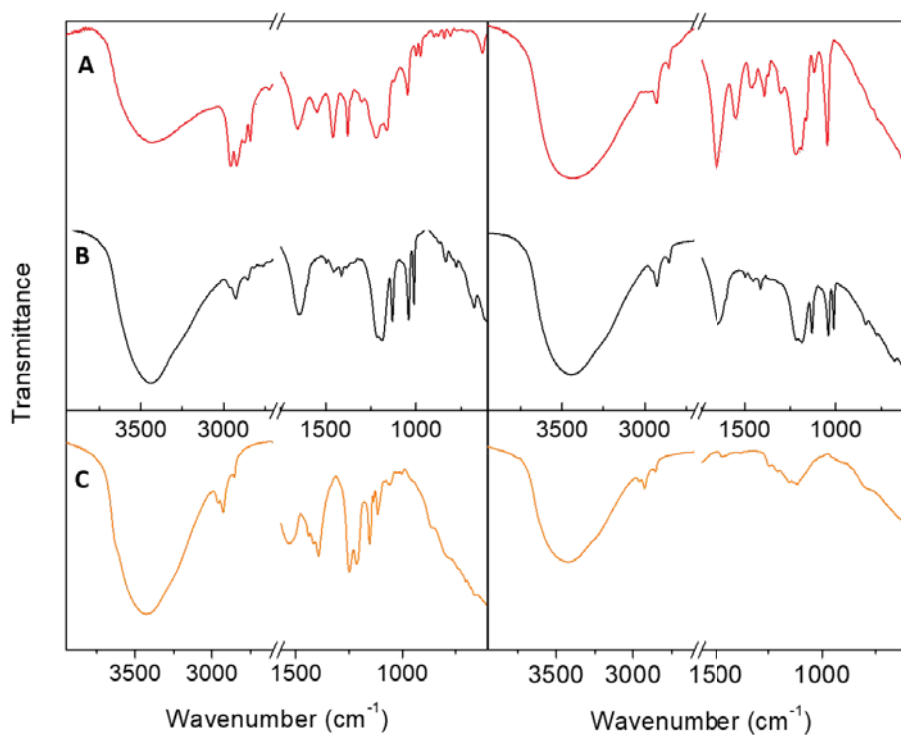


Figure S11. FTIR spectra of (A) UC_{Er}@PAMPS, (B) UC_{Er}@PSS and (C) UC_{Er}@PFD before (left) and after (right) acid treatment.

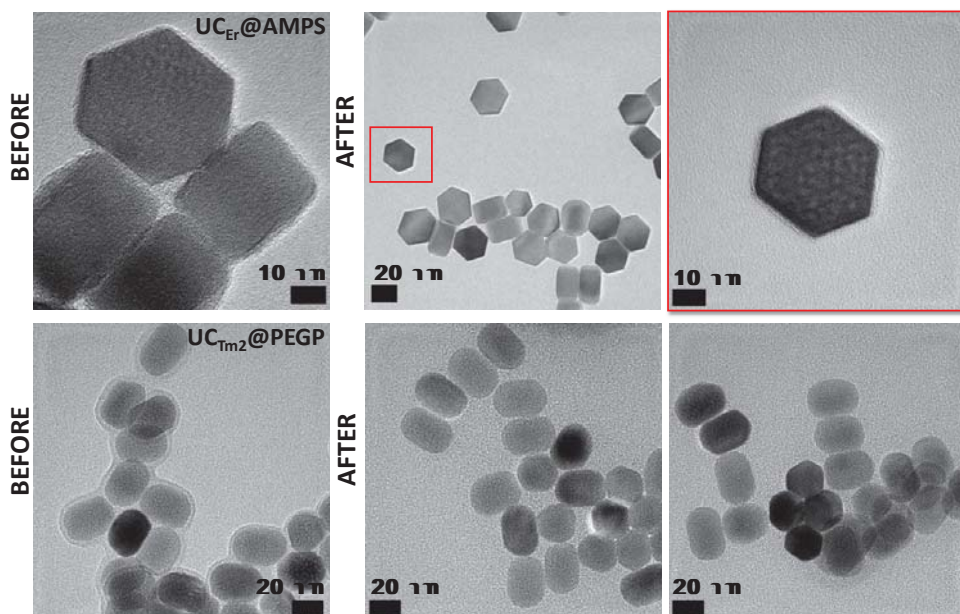


Figure S12. Representative HRTEM images of UC_{Er}@AMPS (top) and UC_{Tm2}@PEGP (bottom) before (left) and after (right) acid treatment.

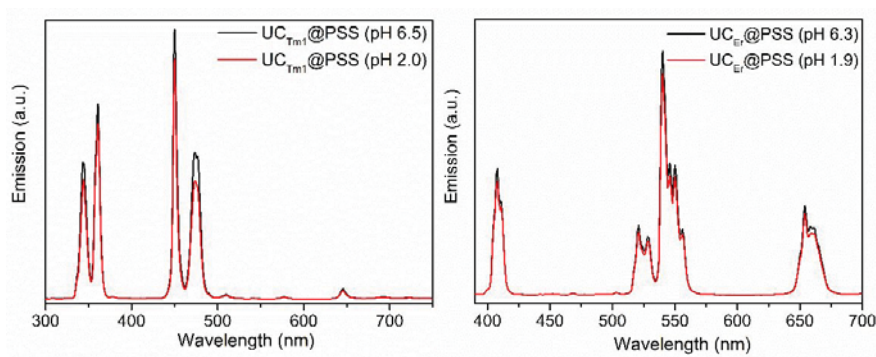


Figure S13. Comparison between emission spectra of Left: UC_{Tm1}@PSS (1.4 mg/mL) in water at pH 6.5 (black) and pH 2.0 (red) and Right: UC_{Er}@PSS (1.2 mg/mL) in water at pH 6.3 (black) and pH 1.9 (red). ($\lambda_{\text{ex}} = 975 \text{ nm}$).

Table S2. Values of zeta potential (ζ) of UC_{L_n}@ligand nanoparticles.

Sample	Zeta potential (ζ)/ mV	
	Before acid treatment	After acid treatment ^a
UC _{Er} @PAMPS	-26.9±1.2	-25.9±1.4
UC _{Tm1} @PSS	-31.2±1.3	-32.0±1.4
UC _{Tm2} @PEGP	-2.6±0.3	14.8±0.5
UC _{Tm1} @PFD	11.5±0.6	18.6±0.5

^aSamples were dispersed in MQ-H₂O after acid treatment.

Table S3. Values of zeta potential (ζ) of bare UC_{L_n} dispersed in MQ-H₂O.

Sample	Zeta potential (ζ) _{pH=5.5} /mV
UC _{Tm1} @BF ₄	19.3±0.5
UC _{Tm2} naked	19.4±0.4
UC _{Er} @BF ₄	20.3±0.6

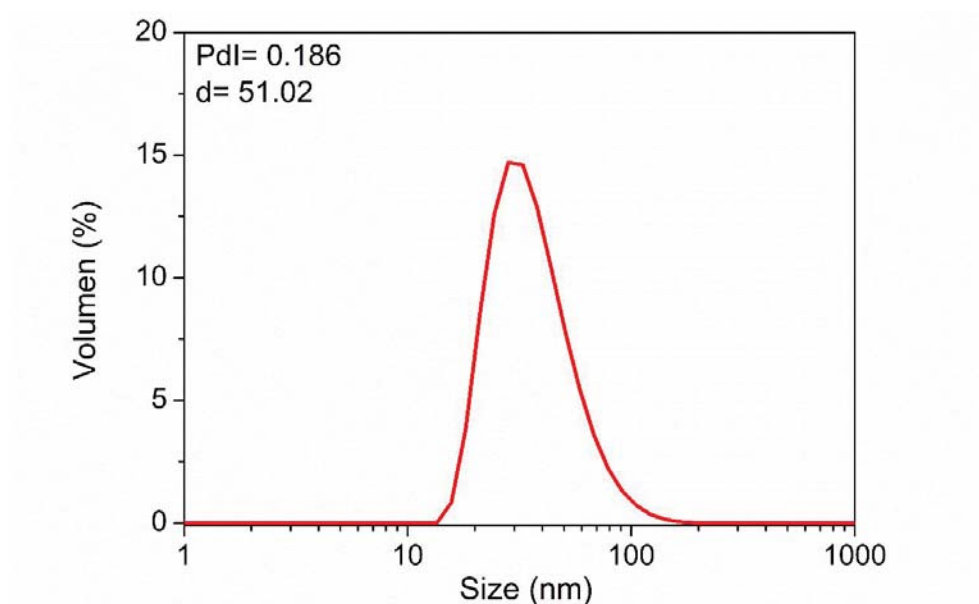


Figure S14. Dynamic scattering (DLS) of UC_{Tm1}@PSS dispersed in DMF.

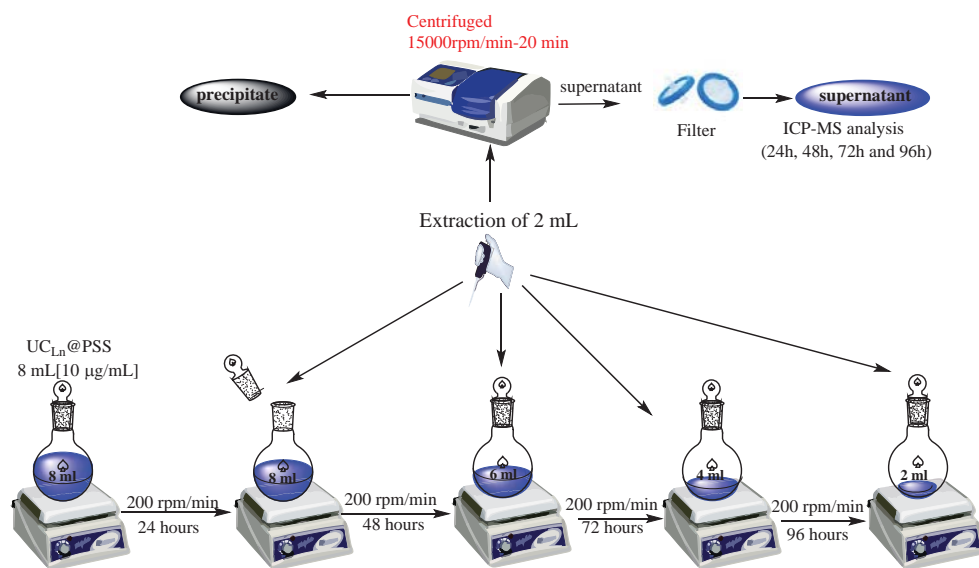


Figure S15. Schematic representation of the procedure followed to study the stability of the UCNP in water

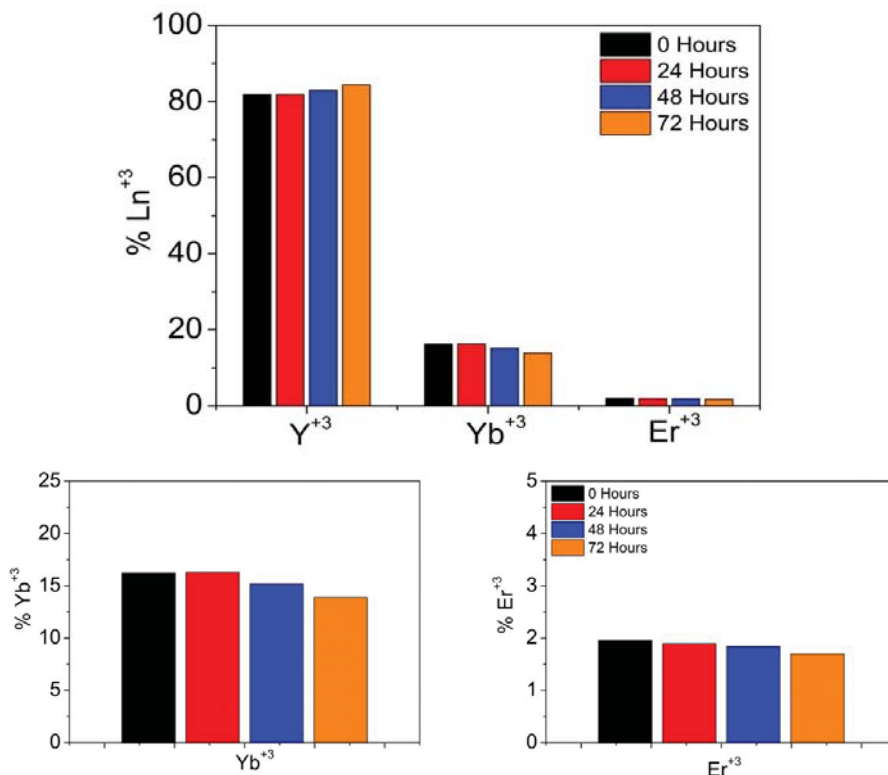


Figure S16. Ratio between lanthanides in bare UC_{Er} nanoparticles at different dissolution times: 24, 48, 72 and 96 h (calculated from ICP-MS results of the solid residue in the centrifuged samples).

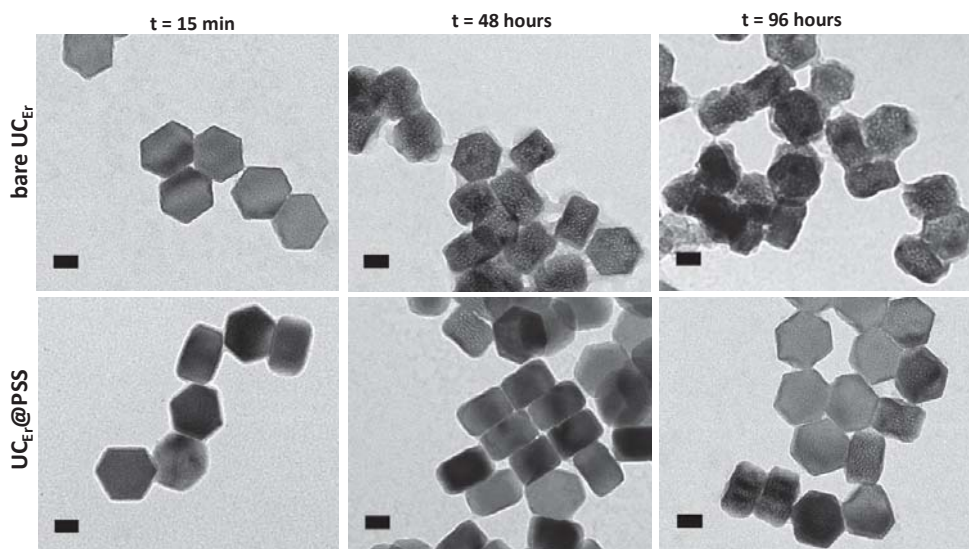


Figure S17. Representative low-resolution TEM images bare UC_{Er} (top) and UC_{Er}@PSS (bottom), 15 minutes (left), 48 hours (center) and 96 hours (right) in water dispersions at 5 μg/ml. Scale bar 20 nm.

References.

1. Dong, A.; Ye, X.; Chen, J.; Kang, Y.; Gordon, T.; Kikkawa, J. M.; Murray, C. B. A Generalized Ligand-Exchange Strategy Enabling Sequential Surface Functionalization of Colloidal Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (4), 998–1006.
2. Muhr, V.; Würth, C.; Kraft, M.; Buchner, M.; Baeumner, A. J.; Resch-Genger, U.; Hirsch, T. Particle-Size-Dependent Förster Resonance Energy Transfer from Upconversion Nanoparticles to Organic Dyes. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (9), 4868–4874.
3. Bogdan, N.; Vetrone, F.; Ozin, G. A.; Capobianco, J. A. Synthesis of Ligand-Free Colloidally Stable Water Dispersible Brightly Luminescent Lanthanide-Doped Upconverting Nanoparticles. *Nano Lett.* **2011**, *11* (2), 835–840.
4. Aguilar, M. R.; Gallardo, A.; San Román, J.; Cifuentes, A. Micellar Electrokinetic Chromatography: A Powerful Analytical Tool To Study Copolymerization Reactions Involving Ionic Species. *Macromolecules* **2002**, *35* (22), 8315–8322.
5. Recalde, I.; Estebanez, N.; Francés-Soriano, L.; Liras, M.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. Upconversion Nanoparticles with a Strong Acid-Resistant Capping. *Nanoscale* **2016**, *8* (14), 7588–7594.



Cite this: *Nanoscale*, 2018, **10**, 12297

Received 31st January 2018,
Accepted 12th June 2018

DOI: 10.1039/c8nr00871j

rsc.li/nanoscale

Breaking the Nd³⁺-sensitized upconversion nanoparticles myth about the need of onion-layered structures†

Nestor Estebanez,^a Juan Ferrera-González,^a Laura Francés-Soriano,^a Raul Arenal,^{b,c} María González-Béjar^{b,*} and Julia Pérez-Prieto^{b,*}

Up to now, most strategies to build efficient 800 nm-light responsive upconversion nanoparticles (UCNPs) have included onion-layered structures, in which Nd³⁺ is confined within the inorganic crystal structure of at least one layer. We report here an easy room-temperature modular preparation of core-shell UCNPs consisting of NaYF₄:Yb,Er(Tm)/NaYF₄ (UC_{CS}) with Nd³⁺ anchored at the organic capping by using cucurbituril[7] (CB[7]) as an adhesive. Strikingly, excitation at 800 nm effectively triggers the upconversion emission of UC_{CS}@CB[7]@Nd nanohybrids.

Lanthanide upconversion nanoparticles (UCNPs) convert near-infrared (NIR) light to shorter wavelengths by means of multi-photon absorption assisted by real electronic excited states.¹ Their good photo(physical) stability, size-independent optical features, narrow emission lines, large anti-Stokes shift and low long-term cytotoxicity make them far superior to other traditionally used emissive nanoparticles (NPs), such as quantum and carbon dots and gold NPs.

Initially, core-shell β-NaYF₄:Yb,X/NaYF₄ (X = Er, Tm) (UC_{CS}) have been the preferred choice due to their supreme upconversion luminescence (UCL) attributed to their hexagonal crystal structure¹ together with the presence of an inert NaYF₄ inorganic shell that reduces the surface quenching effects due to energy migration to the surface.² In these UCNPs, Yb absorbs 980 nm light (absorption cross section of ~10⁻²⁰ cm²)³ and transfers the energy to the activator (e.g. Er, Tm). Given that water absorbs at 980 nm, but hardly at all at 800 nm (absorption coefficient 0.48 vs. 0.02 cm⁻¹, respectively),⁴ Nd³⁺-doped UCNPs able to upconvert light of ≈800 nm to visible or NIR have been developed over the last decade with a view to mini-

mizing water absorption and its associated heating effects, as well as improving the penetration depth into tissues.⁵ Nd³⁺-sensitized UCL after 800 nm excitation occurs as a result of Nd → Yb → activator (Er/Tm) energy transfer (Scheme S1†) due to the fact that the Nd³⁺ absorption cross-section (1.2 × 10⁻¹⁹ cm²) is 10 times higher than that of Yb³⁺.^{5c,6}

Thus, Nd³⁺ acts as the primary sensitizer to absorb 800 nm photons, and Yb³⁺ is the bridging sensitizer, which transfers energy to the activator.^{5c,7} Unfortunately, Nd³⁺ induces a drastic quenching effect caused by efficient back energy transfer from the activator to Nd³⁺.⁸ The most widely used strategy to build efficient 800 nm-light responsive UCNPs include onion-layered structures.^{7b,9} In these structures, Nd³⁺ is confined within the inorganic crystal structure of at least one layer, it is encapsulated in the core and/or the shell in order to facilitate the energy transfer to Yb³⁺, and it is usually in a different layer from that of the activators (core and/or the shell) in order to facilitate the energy transfer to Yb³⁺. In addition, architectures in which a sandwiched shell (only doped with Yb³⁺), between a core doped with Yb³⁺ and the activator ions and an outer shell doped with Nd³⁺ (and sometimes Yb³⁺) have also been built with the same purpose. An inert and thick outer shell has been considered crucial to overcome concentration quenching effects in lanthanide-doped NPs.^{7b,10} There is no doubt that the synthesis of these structures is elaborate, challenging and time-consuming.^{6,7,11} A new class of 800 nm-light responsive UCNPs without Nd³⁺ sensitizers is that of Er³⁺-enriched nanostructures^{2c,10,12} (e.g., NaErF₄@NaYF₄), in which a thick shell mitigates the concentration quenching effect.

Based on the reported low responsiveness of Nd³⁺ luminescence to surface quenching,^{7b} and with the aim of preparing Nd³⁺-sensitized UCNPs by a less challenging procedure than that of onion-layered nanostructures, we planned an alternative, modular synthesis of UCNPs with non-encapsulated Nd³⁺ ions at the NP periphery at a fixed distance from the NP surface. Here we present a new, easy to perform strategy to prepare UCNPs responsive to both 980 nm and 800 nm excitation. It consists of a modular construction based on a set of

^aInstituto de Ciencia Molecular (ICMol), University of Valencia, Catedrático José Beltrán 2, 46980 Paterna, Valencia, Spain.

E-mail: maria.gonzalez@uv.es, julia.perez@uv.es

^bLaboratorio de Microscopias Avanzadas (LMA),

Instituto de Nanociencia de Aragón (INA), U. Zaragoza, 50018 Zaragoza, Spain

^cARAID Foundation, 50018 Zaragoza, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental data, EDS, HRTEM, TEM images, XRD, ATR-FTIR, TGA, emission spectra, confocal images and conversion of intensity profile to kinetics. See DOI: 10.1039/c8nr00871j

three components that place Nd^{3+} at *ca.* 1 nm from the surface of a core-shell $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{X}/\text{NaYF}_4$ ($\text{X} = \text{Er}, \text{Tm}$) NP. Remarkably, we demonstrate here that Nd^{3+} , even if it is not within the nanocrystal lattice, can act as a sensitizer of UCL after its excitation at 800 nm (Fig. 1). This modular design is proposed in the wake of our recent discoveries, which showed not only that core $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{X}$ (UC_C) NPs can be efficiently capped with rigid cucurbituril hosts ($\text{CB}[n]$, $n = 5-7$)¹³ but also that the $\text{CB}[n]$ free portal (*i.e.* the portal not interacting with the UC_C surface) can readily bind to cations.¹⁴

Accordingly, UC_CS have been capped with cucurbituril[7] ($\text{UC}_\text{CS}@\text{CB}$) and, subsequently, Nd^{3+} has been added to cap the free CB portal, thus producing $\text{UC}_\text{CS}@\text{CB}@\text{Nd}$ nano-hybrids (Fig. 1). This architecture would mitigate cross-relaxation processes between Nd and the activator, even when using a relatively thin inactive shell and, therefore, under the potential occurrence of ion diffusion during the epitaxial growth process.^{15,16}

Firstly, oleate-capped UCNPs, $\text{UC}_\text{CS,Er}@\text{OA}$ and $\text{UC}_\text{CS,Tm}@\text{OA}$, are prepared as previously described and fully characterized.^{2a,17} $\text{UC}_\text{CS,Er}@\text{OA}$ have an average size of $38 \pm 2 \times 66 \pm 3$ nm which includes an anisotropic shell of an inert NaYF_4 layer of *ca.* 3×26 nm. The size of $\text{UC}_\text{CS,Tm}@\text{OA}$ is $21 \pm 1 \times 31 \pm 2$ nm which includes a NaYF_4 layer of *ca.* 4×7 nm. Secondly, naked UC_CS are obtained by acidification of $\text{UC}_\text{CS}@\text{OA}$ with HCl .¹⁸ Then, a mixture of $\text{CB}[7]$ and naked UC_CS is stirred for 48 hours to afford water-dispersible $\text{UC}_\text{CS}@\text{CB}$ NPs nano-hybrids.^{13a}

HRTEM images prove that the shape and size of UC_CS remain identical upon addition of $\text{CB}[7]$ (see experimental details and Fig. S1–S7 in the ESI†). Fig. 2A, B, D show a thin sheath covering $\text{UC}_\text{CS,Er}$ attributed to $\text{CB}[7]$ (see Fig. S3† for $\text{UC}_\text{CS,Tm}@\text{CB}$). Finally, $\text{UC}_\text{CS}@\text{CB}@\text{Nd}$ nano-hybrids were prepared by mixing $\text{UC}_\text{CS}@\text{CB}$ with an excess of NdCl_3 salt.

Indeed, the presence of Nd^{3+} in the thin organic capping is confirmed by energy dispersive X-rays spectroscopy (EDS; see Fig. 2E and Table S1 in the ESI†). The ratio of Nd^{3+} was *ca.* 2 atoms per CB molecule for both $\text{UC}_\text{CS,Er}@\text{CB}@\text{Nd}$ and $\text{UC}_\text{CS,Tm}@\text{CB}@\text{Nd}$ nano-hybrids. This suggests the coordination of two Nd^{3+} ions at each CB free portal.¹⁹

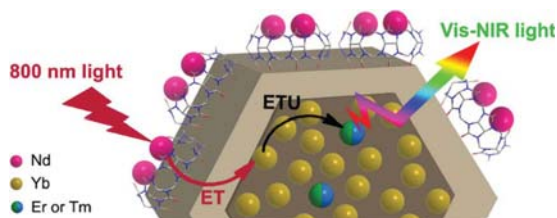


Fig. 1 Schematic representation of a $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{X}/\text{NaYF}_4$ ($\text{X} = \text{Er}, \text{Tm}$) core-shell NP (UC_C) coated with $\text{CB}[7]$ and Nd^{3+} and the processes occurring after 800 nm excitation: Nd^{3+} ions anchored at the outer rigid organic capping ($\text{CB}[7]$) serve as sensitizers and transfer the energy to Yb^{3+} ions; upconversion emission occurs after subsequent energy migration from Yb^{3+} ions to $\text{Er}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$.

High-angle annular dark-field (HAADF) scanning transmission electron microscopy (STEM) HAADF-HRSTEM is a very appropriate technique for the detection of single atoms.²⁰ Therefore, it was used to corroborate the presence of Nd^{3+} at the organic capping of $\text{UC}_\text{CS,Er}@\text{CB}@\text{Nd}$. It is worth noting that no evidence of irradiation damage in this layer was detected during the acquisition of the images. Fig. 2A corresponds to an image of two nano-hybrids. As it can be deduced from the HAADF-HRSTEM image (Fig. 2B), these nano-hybrids show a high degree of crystallinity and they are covered by an organic shell with a thickness of about 2–3 nm. The HAADF-HRSTEM micrograph shows the presence of heavy atoms embedded in this organic layer; the highlighted circle in the rectangular area depicted in the inset of Fig. 2B shows two bright dots. The intensity profile extracted from the rectangular area of inset Fig. 2B shows two clearly distinguishable peaks, with a full-width at half-maximum close to 2 Å, which correspond to the two bright dots. The dimensions and intensity of the 2 bright dots as compared to that of the organic sheath, allow us to assign them to Nd single atoms embedded in the covering layer of the NPs. It's worth mentioning that the different brightness of these two neighbouring atoms may be caused by their different location, in terms of height, within the layer. In fact, this aspect is related to the focus conditions and the depth of field.^{20c-e}

The UCL spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 980$ nm) of $\text{UC}_\text{CS,Er}@\text{CB}$ and $\text{UC}_\text{CS,Er}@\text{CB}@\text{Nd}$ exhibit the Er^{3+} characteristic emission bands at *ca.* 550 nm ($4\text{S}_{3/2} \rightarrow 4\text{I}_{15/2}$) with a small shoulder at 520 nm ($2\text{H}_{11/2}, 4\text{S}_{3/2} \rightarrow 4\text{I}_{15/2}$) and another band centred at 670 nm ($4\text{F}_{9/2} \rightarrow 4\text{I}_{15/2}$) (see Fig. 2 for $\text{UC}_\text{CS,Er}@\text{CB}@\text{Nd}$; spectrum of $\text{UC}_\text{CS,Er}@\text{CB}$ is similar, not shown); see Fig. S8† for $\text{UC}_\text{CS,Tm}@\text{CB}$ and $\text{UC}_\text{CS,Tm}@\text{CB}@\text{Nd}$.^{1b}

A laser scanning confocal equipment was used to determine the performance of the $\text{UC}_\text{CS}@\text{CB}@\text{Nd}$ NPs using short dwell times after NIR excitation, at both 800 nm and 980 nm. This makes it possible not only to study the occurrence of energy transfer processes in the $\text{UC}_\text{CS}@\text{CB}@\text{Nd}$ nano-hybrids but it has also proved to be a useful tool to evaluate luminescence lifetime in a range of several tens of microseconds (see ESI†).²¹

Therefore, samples were prepared by drop-casting a water dispersion of the corresponding NPs onto a 25×75 mm microscope glass slide. Then, solvent was evaporated and the sample was covered with a 22×22 mm glass slide.

The 515–560 nm channel was used to follow the emissive behavior of $\text{UC}_\text{CS,Er}@\text{CB}@\text{Nd}$ and, for comparative purposes, $\text{UC}_\text{CS,Er}@\text{CB}$, taking into account that the emission of these NPs is the strongest in this channel (Fig. 2J). As expected, confocal images of $\text{UC}_\text{CS,Er}@\text{CB}@\text{Nd}$ and $\text{UC}_\text{CS,Er}@\text{CB}$ at $\lambda_{\text{ex}} = 980$ nm showed the green emission of the NPs (Fig. 2F and G). The emission quantum yield upon 980 nm excitation of $\text{UC}_\text{CS}@\text{CB}[7]@\text{Nd}$ and $\text{UC}_\text{CS}@\text{CB}[7]$ was measured by using a Quantaurus-QY Plus UV-NIR absolute quantum yield spectrometer (further details in ESI†). $\text{UC}_\text{CS}@\text{CB}[7]$ exhibited a higher emission efficiency than the Nd-capped UCNP (1% vs. 0.6%,

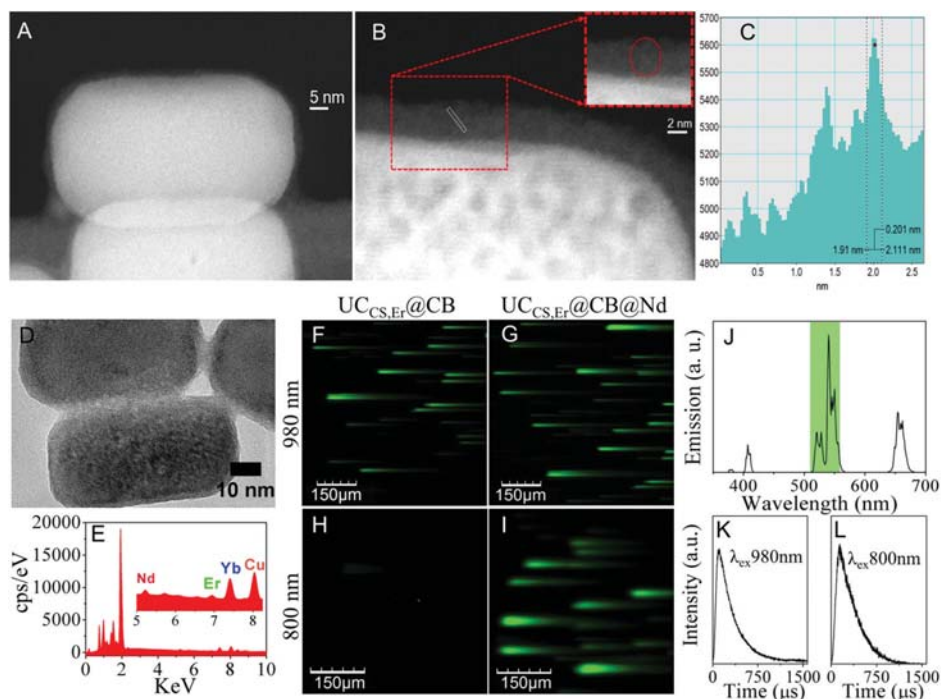


Fig. 2 (A) HAADF-STEM micrograph of two superposed UC_{CS,Er}@CB@Nd NPs partially deposited on the carbon support film; in both of them, though it is more evident in the one on top, a thin organic layer is visible; (B) high-resolution HAADF-STEM image of another UC_{CS,Er}@CB@Nd NP also covered by a 2–3 nm shell; in the shell, two bright dots can be seen in the highlighted rectangular area (inset at the top); these dots can be identified as Nd single atoms in the NP organic layer; (C) an intensity profile has been obtained on them. These dots can be identified as Nd single atoms embedded in this covering layer of the NPs; (D) HRTEM image and (E) EDS analysis of UC_{CS,Er}@CB@Nd nanohybrids; (F,G,H,I) confocal images of UC_{CS,Er}@CB@Nd and UC_{CS,Er}@CB at $\lambda_{\text{ex}} = 980$ nm and $\lambda_{\text{ex}} = 800$ nm (515–560 nm, 2 μs per pixel); (J) emission spectrum at $\lambda_{\text{ex}} = 980$ nm of a 0.3 mg mL⁻¹ dispersion of UC_{CS,Er}@CB@Nd in MilliQ water; (K,L) intensity profile of UC_{CS}@CB@Nd NPs obtained from the trace of the emission showed by an aggregate after excitation at (K) 980 nm and (L) 800 nm a dwell time of 2 μs per pixel.

respectively). This is consistent with energy transfer from Yb to Nd.

Then, the images were registered at $\lambda_{\text{ex}} = 800$ nm to demonstrate the occurrence of Nd \rightarrow Yb \rightarrow Er energy transfer in the UC_{CS,Er}@CB@Nd UCNP (Fig. 2H and I). Likewise, excitation at 785 nm of UC_{CS,Er}@CB and UC_{CS,Er}@CB@Nd under the same optical setup (0.497 μm per pixel; 2.0 μs per pixel) evidenced the Nd \rightarrow Yb \rightarrow Er energy transfer (Fig. S9†).

The Er emission quantum yield upon 808 nm excitation of UC_{CS}@CB[7]@Nd was 0.001%. This corroborated that the energy transfer from Nd to Yb occurred despite of the inactive shell.

To our knowledge, there are no conventional onion-layered structures to compare our nanohybrid with, *i.e.*, there are no papers reporting on the efficiency of onion-layered UCNPs with the Nd-doped shell separated from the core doped with the Yb, activator ions by the inactive NaYF₄ matrix. It is clear that there is room for increasing the efficiency of NaYF₄:Yb, Er@NaYF₄@CB@Nd by using an active shell (*e.g.*, NaYbF₄) instead of un-doped NaYF₄.

Finally, Fig. 2K and L show the intensity profiles of UC_{CS,Er}@CB@Nd NPs obtained from the trace of the emission exhibited by an aggregate after excitation at 980 nm and 800 nm at a dwell time of 2 μs per pixel (Fig. S10†). The UCL decay lifetimes of the green emission at $\lambda_{\text{ex}} = 980$ nm were of 245 ± 7 μs and 240 ± 4 μs for UC_{CS,Er}@CB and UC_{CS,Er}@CB@Nd, respectively. The value was similar for the UC_{CS,Er}@CB@Nd photoluminescence decay at $\lambda_{\text{ex}} = 800$ nm (227 ± 6 μs). Fig. S11–18† illustrate the confocal images for each sample and channel.

Last but not least, these UC_{CS}@CB@Nd nanohybrids could also be used for NIR-to-NIR down conversion fluorescence imaging by following the emission of Nd at about 900, 1060, and 1340 nm.

Conclusions

In summary, we report here an easy modular strategy for preparing UCNPs comprising NaYF₄:Yb,Er (Tm)/NaYF₄/Nd in

which Nd^{3+} is not located in the crystal structure of the UC_{CS} , but in its organic capping ligand at about 1 nm from the NP surface. Interestingly, the emission of the NP can be triggered after 800 nm excitation. To our knowledge, this is not only the first example of a lanthanide photosensitizer in the organic capping of an UCNP, but it is also the first that demonstrates that Nd^{3+} is able to photosensitize the upconversion process even when it is not encapsulated in an inorganic matrix.

This study is a proof-of-concept, but we anticipate that these architectures will open up new opportunities for constructing novel UCNPs. The easy preparation of these nano-systems will stimulate new areas of research relevant to human health.

Conflicts of interest

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

We thank MINECO (CTQ2017-82711-P), partially co-financed with FEDER funds; MAT2016-79776-P, Maria de Maeztu: MDM-2015-0538; RTC-2016-5114-5, FPU (LSF, JFG), contract (NEB); RyC (MGB) and Fundación Ramón Areces for financing this research. RA also acknowledges Government of Aragon and ESF under the project “Construyendo Europa desde Aragon” 2014–2020 (grant number E/26). TEM measurements were performed in SCSIE (University of Valencia) or Laboratorio de Microscopias Avanzadas (Instituto de Nanociencia de Aragon-University of Zaragoza). Hamamatsu is also acknowledged for kindly providing a Quantaurus-QY Plus UV-NIR absolute quantum yield spectrometer (C13534-11).

Notes and references

- (a) Z. Gu, L. Yan, G. Tian, S. Li, Z. Chai and Y. Zhao, *Adv. Mater.*, 2013, **25**, 3758; (b) X. Li, F. Zhang and D. Zhao, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 1346; (c) W. Xu, X. Chen and H. Song, *Nano Today*, 2017, **17**, 54; (d) S. Han, R. Deng, X. Xie and X. Liu, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 11702; (e) Z. Yin, H. Li, W. Xu, S. Cui, D. Zhou, X. Chen, Y. Zhu, G. Qin and H. Song, *Adv. Mater.*, 2016, **28**, 2518.
- (a) N. Francolon, D. Boyer, F. Leccia, E. Jouberton, A. Walter, C. Bordeianu, A. Parat, D. Felder-Flesch, S. Begin-Colin, E. Miot-Noirault, J. M. Chezal and R. Mahiou, *Nanomedicine*, 2016, **12**, 2107; (b) M. Y. Hossain, A. Hor, Q. Luu, S. J. Smith, P. S. May and M. T. Berry, *J. Phys. Chem. C*, 2017, **121**, 16592; (c) N. J. Johnson, S. He, S. Diao, E. M. Chan, H. Dai and A. Almutairi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 3275.
- M. J. Weber, *Phys. Rev. B: Solid State*, 1971, **4**, 3153.
- (a) S. Singh, R. G. Smith and L. G. Van Uitert, *Phys. Rev. B: Solid State*, 1974, **10**, 2566; (b) R. Arppe, I. Hyppänen, N. Perälä, R. Peltomaa, M. Kaiser, C. Würth, S. Christ, U. Resch-Genger, M. Schäferling and T. Soukka, *Nanoscale*, 2015, **7**, 11746; (c) Y.-F. Wang, G.-Y. Liu, L.-D. Sun, J.-W. Xiao, J.-C. Zhou and C.-H. Yan, *ACS Nano*, 2013, **7**, 7200.
- (a) E. S. Levy, C. A. Tajon, T. S. Bischof, J. Iafrazi, A. Fernandez-Bravo, D. J. Garfield, M. Chamanzar, M. M. Maharbiz, V. S. Sohal, P. J. Schuck, B. E. Cohen and E. M. Chan, *ACS Nano*, 2016, **10**, 8423; (b) B. del Rosal, U. Rocha, E. C. Ximendes, E. Martín Rodríguez, D. Jaque and J. G. Solé, *Opt. Mater.*, 2017, **63**, 185; (c) J. Shen, G. Chen, A.-M. Vu, W. Fan, O. S. Bilsel, C.-C. Chang and G. Han, *Adv. Opt. Mater.*, 2013, **1**, 644.
- X. Xie, N. Gao, R. Deng, Q. Sun, Q.-H. Xu and X. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 12608.
- (a) R. Wang and F. Zhang, in *Near-infrared Nanomaterials: Preparation, Bioimaging and Therapy Applications*, ed. F. Zhang, 2016, p. 1; (b) X. Xie, Z. Li, Y. Zhang, S. Guo, A. I. Pendharkar, M. Lu, L. Huang, W. Huang and G. Han, *Small*, 2017, **13**, 1602843.
- (a) L. Marciniak, K. Prorok, L. Francés-Soriano, J. Pérez-Prieto and A. Bednarkiewicz, *Nanoscale*, 2016, **8**, 5037; (b) E. C. Ximendes, W. Q. Santos, U. Rocha, U. K. Kagola, F. Sanz-Rodríguez, N. Fernández, S. Gouveia-Neto Ada, D. Bravo, A. M. Domingo, B. del Rosal, C. D. Brites, L. D. Carlos, D. Jaque and C. Jacinto, *Nano Lett.*, 2016, **16**, 1695.
- (a) Y. Zhang, Z. Yu, J. Li, Y. Ao, J. Xue, Z. Zeng, X. Yang and T. T. Tan, *ACS Nano*, 2017, **11**, 2846; (b) Z. Hou, K. Deng, C. Li, X. Deng, H. Lian, Z. Cheng, D. Jin and J. Lin, *Biomaterials*, 2016, **101**, 32; (c) B. Liu, C. Li, P. Yang, Z. Hou and J. Lin, *Adv. Mater.*, 2017, **29**, 1605434.
- D. Hudry, D. Busko, R. Popescu, D. Gerthsen, A. M. M. Abeykoon, C. Kübel, T. Bergfeldt and B. S. Richards, *Chem. Mater.*, 2017, **29**, 9238.
- (a) Y. Zhong, G. Tian, Z. Gu, Y. Yang, L. Gu, Y. Zhao, Y. Ma and J. Yao, *Adv. Mater.*, 2014, **26**, 2831; (b) Q. Zhan, B. Wang, X. Wen and S. He, *Opt. Mater. Express*, 2016, **6**, 1011.
- (a) J. Zuo, Q. Li, B. Xue, C. Li, Y. Chang, Y. Zhang, X. Liu, L. Tu, H. Zhang and X. Kong, *Nanoscale*, 2017, **9**, 7941; (b) Q. Chen, X. Xie, B. Huang, L. Liang, S. Han, Z. Yi, Y. Wang, Y. Li, D. Fan, L. Huang and X. Liu, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2017, **56**, 7605.
- (a) L. Francés-Soriano, M. González-Béjar and J. Pérez-Prieto, *Nanoscale*, 2015, **7**, 5140; (b) Y. Sun, W. Zhang, B. Wang, X. Xu, J. Chou, O. Shimoni, A. T. Ung and D. Jin, *Chem. Commun.*, 2018, **54**, 3851.
- H. Tang, D. Fuentealba, Y. H. Ko, N. Selvapalam, K. Kim and C. Bohne, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 20623.
- (a) R. Kompan, J. P. Klare, B. Voss, J. Nordmann, H. J. Steinhoff and M. Haase, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 6506; (b) H. Dong, L. D. Sun, W. Feng, Y. Gu, F. Li and C. H. Yan, *ACS Nano*, 2017, **11**, 3289; (c) B. Chen, D. Peng,

- X. Chen, X. Qiao, X. Fan and F. Wang, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 12788.
- 16 Optical inert layers of radial thickness over 12 nm have been constructed to avoid energy migration in multidoped, multilayer UCNPs. Reference 15*b*.
- 17 (a) J. Tang, L. Lei, H. Feng, H. Zhang and Y. Han, *J. Fluoresc.*, 2016, **26**, 2237; (b) C. Chen, N. Kang, T. Xu, D. Wang, L. Ren and X. Guo, *Nanoscale*, 2015, **7**, 5249; (c) S. Wilhelm, M. Kaiser, C. Würth, J. Heiland, C. Carrillo-Carrion, V. Muhr, O. S. Wolfbeis, W. J. Parak, U. Resch-Genger and T. Hirsch, *Nanoscale*, 2015, **7**, 1403; (d) Q. Xiao, Y. Ji, Z. Xiao, Y. Zhang, H. Lin and Q. Wang, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 1527.
- 18 N. Bogdan, F. Vetrone, G. A. Ozin and J. A. Capobianco, *Nano Lett.*, 2011, **11**, 835.
- 19 (a) 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, *Polymers*, 2013, **5**, 418; (b) E. A. Mainicheva, A. A. Tripolskaya, O. A. Gerasko, D. Y. Naumov and V. P. Fedin, *Russ. Chem. Bull.*, 2006, **55**, 1566.
- 20 (a) V. Ortalan, A. Uzun, B. C. Gates and N. D. Browning, *Nat. Nanotechnol.*, 2010, **5**, 843; (b) J. Lu, C. Aydin, N. D. Browning and B. C. Gates, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 5842; (c) R. Arenal, K. March, C. P. Ewels, X. Rocquefelte, M. Kociak, A. Loiseau and O. Stephan, *Nano Lett.*, 2014, **14**, 5509; (d) A. Mayoral, Y. Sakamoto and I. Diaz, in *Advanced Transmission Electron Microscopy: Applications to Nanomaterials*, ed. F. L. Deepak, A. Mayoral and R. Arenal, Springer International Publishing, Cham, 2015, p. 93; (e) L. Liu, U. Díaz, R. Arenal, G. Agostini, P. Concepción and A. Corma, *Nat. Mater.*, 2017, **16**, 132.
- 21 L. Francés-Soriano, S. Gonzalez-Carrero, E. Navarro-Raga, R. E. Galian, M. González-Béjar and J. Pérez-Prieto, *Adv. Funct. Mater.*, 2016, **26**, 5131.

Supplementary information

Breaking the Nd³⁺-sensitized upconversion nanoparticles myth about the need of onion-layered structures

Nestor Estebanez,^a Juan Ferrera-González,^a Laura Francés-Soriano,^a Raul Arenal,^{b,c} María González-Béjar^{a*} and Julia Pérez-Prieto^{a*}

^a Instituto de Ciencia Molecular (ICMol), University of Valencia, Spain

^b Laboratorio de Microscopias Avanzadas (LMA), Instituto de Nanociencia de Aragon (INA), U. Zaragoza, 50018 Zaragoza – Spain

^c ARAID Foundation, 50018 Zaragoza - Spain

INDEX

Materials and methods.....	S2
Methods and equipment	S4
Scheme S1. Schematic representation of the energy transfer from Nd ³⁺ to Yb ³⁺ and Er ³⁺	S6
Figure S1. Low-resolution TEM images of UC _{C,Er} and UC _{C,Tm}	S7
Figure S2. Low-resolution TEM images of UC _{CS,Er} and UC _{CS,Tm}	S8
Figure S3. High-resolution TEM image of UC _{CS,Tm} @CB.....	S9
Figure S4. XRD spectra of UC _{CS,Er} and UC _{CS,Tm}	S9
Figure S5. EDS spectra of UC _{CS} @CB and UC _{CS} @CB@Nd	S10
Table S1. Composition of UC _{CS} @CB and UC _{CS} @CB@Nd from EDS.....	S10
Figure S6. FTIR spectra of UC _{CS} @oleate, UC _{CS} -naked and UC _{CS} @CB	S11
Figure S7. Thermogravimetric analyses of UC _{CS,Er} @CB and UC _{CS,Tm} @CB.....	S11
Figure S8. Emission spectra a of UC _{CS,Tm} @CB and UC _{CS,Tm} @CB@Nd.....	S12
Figure S9. Multiphoton microscopy images of UC _{CS,Er} @CB and UC _{CS,Er} @CB@Nd (λ _{ex} =785 nm).....	S12
Figure S10. Kinetic profile from multiphoton time-resolved microscopy	S12
Figure S11. Emission spectra of UC _{CS,Er} and UC _{CS,Tm}	S13
Figure S12. Multiphoton microscopy images of UC _{CS,Er} @CB (λ _{ex} =980).....	S13
Figure S13. Multiphoton microscopy images of UC _{CS,Er} @CB (λ _{ex} =800).....	S13
Figure S14. Multiphoton microscopy images of UC _{CS,Er} @CB@Nd (λ _{ex} =980 nm)	S14
Figure S15. Multiphoton microscopy images of UC _{CS,Er} @CB@Nd (λ _{ex} =800 nm)	S14
Figure S16. Multiphoton microscopy images of UC _{CS,Tm} @CB (λ _{ex} =980 nm).....	S15
Figure S17. Multiphoton microscopy images of UC _{CS,Tm} @CB@Nd (λ _{ex} =980 nm).....	S15
Figure S18. Multiphoton microscopy images of UC _{CS,Tm} @CB@Nd (λ _{ex} =800 nm).....	S15
References	S16

Experimental

Materials and methods

Chemicals: The chemicals used for the nanoparticles syntheses were: lanthanide chlorides ($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{TmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{NdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (>99.9%, all of them)), Cucurbituril[7] hydrate (>99%), 1-octadecene (95%), oleic acid (70%), NaOH and NH_4F (99.99%). All these chemicals were purchased from Sigma-Aldrich and used as received without previous purification.

Synthesis

Synthesis of oleate-capped $\text{NaYF}_4 \cdot \text{Yb}^{3+}$, Er^{3+} nanoparticles ($\text{UC}_{\text{C,Er}}@OA$)

$\text{NaYF}_4 \cdot \text{Yb,Er}$ nanoparticles were synthesized by following a previously reported protocol with some modifications.¹ In a 50 mL round-bottom flask, oleic acid (8 mL) and octadecene (15 mL) were added. Then, a solution containing $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.80 mmol), $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.20 mmol) and $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.02 mmol) dissolved in methanol (2 mL) was added to the flask and the mixture was stirred at 160 °C under N_2 until everything was dissolved. Next, the solution was cooled to 100°C and 4 mL of a methanol solution containing NaOH (2.5 mmol) and NH_4F (4.0 mmol) were slowly added into the flask during 5 min. Then the solution was heated until 125 °C under N_2 flow and continuous stirring to remove completely methanol and water traces. Finally, the reaction was heated at 305 °C under N_2 flux during one hour. After that, the solution was cooled to room temperature and the nanoparticles were precipitated by centrifugation (9000 rpm, 15 min, 25 °C). Later on, the oleate-capped UCNPs were washed three times with (2.7:2.5:1 v/v) hexane/acetone/methanol solution.

Synthesis of oleate-capped $\text{NaYF}_4 \cdot \text{Yb}^{3+}$, Tm^{3+} nanoparticles ($\text{UC}_{\text{C,Tm}}@OA$)

$\text{NaYF}_4 \cdot \text{Yb,Tm}$ nanoparticles were synthesized by following a previously reported protocol with some modifications.¹ In a 50 mL round-bottom flask, $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.80 mmol), $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.20 mmol), $\text{TmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.002 mmol), oleic acid (12 mL) and octadecene (15 mL) were stirred at 160 °C under N_2 until complete dissolution of lanthanides salts. Then, the solution was cooled to 110°C and 10 mL of a methanol solution containing NaOH (2.5 mmol) and NH_4F (4.0 mmol) were slowly added into the flask. Methanol was removed at 100 °C under N_2 flow and continuous stirring. Finally, the reaction was heated at 305 °C under N_2 flux during one hour. After that, the solution was cooled to room temperature and the nanoparticles were precipitated by centrifugation (9000 rpm, 15 min, 25 °C). Later on, the oleate-capped UCNPs were washed three times with (2.7:2.5:1 v/v) hexane/acetone/methanol solution.

Synthesis of oleate-capped $\text{NaYF}_4 \cdot \text{Yb}^{3+}$, $\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$ core/shell nanoparticles ($\text{UC}_{\text{CS,Er}}@OA$) or $\text{NaYF}_4 \cdot \text{Yb}^{3+}$, $\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$ core/shell nanoparticles ($\text{UC}_{\text{CS,Tm}}@OA$)

In a 50 mL round-bottom flask, oleic acid (4 mL) and octadecene (8 mL) were added. Then, $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.25 mmol) was dissolved in methanol (1 mL) and added to the flask. The mixture was stirred at 160 °C under N_2 until methanol was evaporated.

Next, the solution was cooled to 80°C and a solution of UC_C@OA (100 mg in 5 mL) of chloroform was slowly added and the mixture was heated at 100°C while 4 mL of a methanol solution containing NaOH (1.3 mmol) and NH₄F (2.0 mmol) were slowly added into the flask during 5 min. Methanol was removed at 125 °C under N₂ flow and continuous stirring. Finally, the reaction was heated at 325 °C under N₂ flux during 25 minutes. After that, the solution was cooled to room temperature and the nanoparticles were precipitated by centrifugation (9000 rpm, 15 min, 17 °C). Later on, the oleate-capped UCNPs were washed three times (3x15 mL) with (2.7:2.5:1 v/v) hexane/acetone/methanol solution.

Synthesis of ligand-free UC_{CS,Er} or UC_{CS,Tm}

Oleate ligand was removed from the nanoparticle surface by following a previously described protocol.^{2,3} Briefly, 150 mg of UC_{CS,Er}@OA or UC_{CS,Tm}@OA were dispersed in 15 mL of HCl aqueous solution at pH 3 and stirred for 2 h. After that, three extractions with diethyl ether (3x15 mL) were carried out in order to remove the free oleic acid. Then, ether phases were recombined and re-extracted with water. Ligand-free nanoparticles were recovered by precipitation with acetone and subsequent centrifugation at 9000 rpm for 15 min (17°C). Finally, the as-prepared UC_{CS,Er} or UC_{CS,Tm} were redispersed in MilliQ water.

Synthesis of CB[7]-capped nanohybrids (UC_{CS}@CB)

These nanohybrids were prepared by following our previously reported protocol.⁴ Briefly, in a centrifuge tube 0.012 mmol (14 mg) of CB[7] were added to 30 mg of ligand-free UCNPs (UC_{CS,Er} or UC_{CS,Tm}) 15 mL of MilliQ water. Then, the mixture was sonicated for 15 minutes. The solution was stirred during 48 h in an orbital shaker at 350 ppm and kept in the dark. In order to remove the excess of CB[7], 2 extra cycles of centrifugation at 9000 rpm x 15 minutes (17°C) were carried out: firstly with 10 mL of water and secondly with 10 mL of acetonitrile. Both UC_{CS}@CB (UC_{CS,Er}@CB or UC_{CS,Tm}@CB) were easily resuspended in MilliQ water.

Synthesis of Nd³⁺-capped UC_{CS}@CB nanohybrids (UC_{CS}@CB@Nd)

UC_{CS}@CB nanohybrids (30 mg) were dissolved in 15 mL of MilliQ water. Then, NdCl₃·6H₂O was added in excess (4 mol of Nd per mol of CB in the shell for UC_{CS,Er}@CB or UC_{CS,Tm}@CB) and, the mixture was stirred in an orbital shaker for 24 h at 400 rpm in the dark. Later on, nanoparticles were separated by centrifugation (9000 rpm, 15 min, 17° C). Finally, the UC_{CS}@CB@Nd nanohybrids were washed with MilliQ water (10 mL) followed by centrifugation.

Methods and equipment

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Transmission electron microscopy (TEM) images were obtained using a Jeol 1010 microscope operating at 100 kV equipped with a digital camera AMT RX80 (8Mpx). For the preparation of the samples, 10 μL of a 0.5 mg·mL⁻¹ solution of the UCNPs was left to dry under vacuum at room temperature on a formvar/carbon film supported on a 300 mesh copper grid. High-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) images were recorded using a

TECNAI G2 F20 microscope operating at 200 kV (point resolution of 0.24 nm) and equipped with a CCD GATAN camera.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

The top and cross-sectional SEM images were obtained using a HITACHI S-4800, with a spotlight of field emission (FEG). Images were acquired at 20 kV.

The EDS analysis was carried out in HITACHI S-4800, equipped with XFlash 5030 Bruker detector and acquisition software QUANTAX 400.

High-resolution scanning transmission electron microscopy (HRSTEM)

The TEM samples were prepared by dispersing a drop of the ultrasonicated suspension in ethanol onto copper carbon holey grids.

TEM studies have been developed using a FEI Titan Low-Base microscope, working at 120 kV. This microscope is equipped with a Cs probe corrector, a monochromator and ultra-bright X-FEG electron source. The convergence angle was 25 mrad. HRSTEM imaging was performed by using high-angle annular dark field (HAADF) detector. The inner and outer angles for the micrographs recorded with this detector were 48 and 200 mrad, respectively.

X-ray power diffraction (XRD)

XRD analyses were performed on a Bruker D8 Advance A25 diffractometer using $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$) radiation at a voltage of 40 kV and 30 mA, and a LynxEye detector. The powder diffraction pattern was scanned over the angular range of 2-80° (2θ) with a step size of 0.020°, at room temperature.

Fourier-transform infrared spectra measurements (FTIR)

All FTIR spectra were performed using a FTIR Thermo Nicolette Nexus spectrophotometer at room temperature with 64 scans and a resolution of 4 cm^{-1} between 400 and 4000 cm^{-1} .

Thermogravimetric analysis (TGA)

The TGA analyses were carried out using a TG-TGA Pyris Diamond system with an operative temperature range 25-1100 °C and 0.1 microgram sensitivity. The samples were heated from 25 to 800 °C, with an increase of 5°C·min⁻¹ and under air flux of 50 mL·min⁻¹.

Centrifugation

Centrifugation was carried out in an Eppendorf Centrifuge 5804 R.

Steady-state photoluminescence

Steady-state photoluminescence spectra were obtained at room temperature with a 2-nm slit width and 5 $\text{nm}\cdot\text{s}^{-1}$ speed scan using a SLM Aminco Bowmann series 2 (AB2) fluorometer (Microbeam, S.A.). The AB2 software (v. 5.5) was used to register the data. All data were acquired in a front face set up. Upconversion emission spectra were

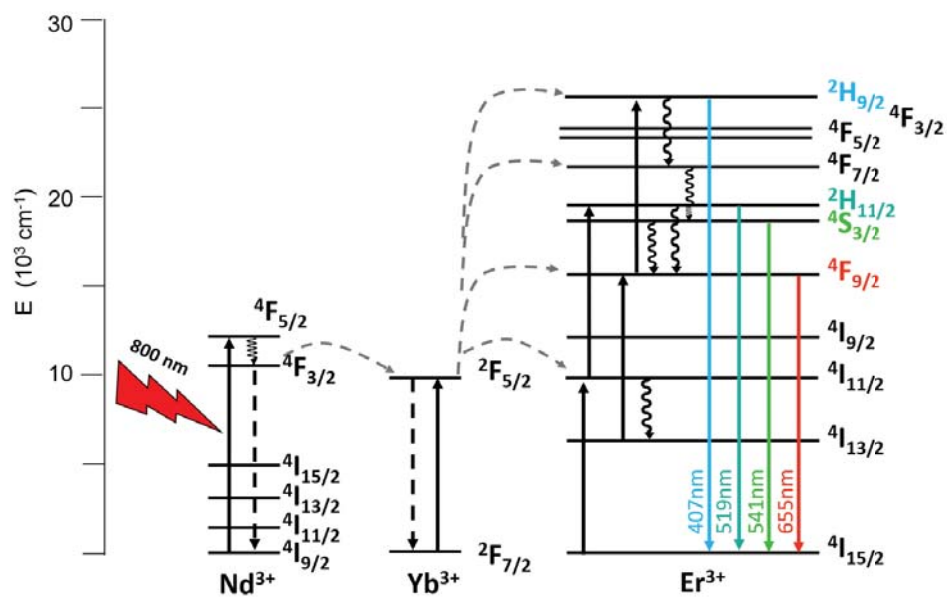
recorded by excitation at 975 ± 10 nm using a CW 975 nm diode laser (Thorlabs L975P1WJ) as excitation source coupled to the fluorometer.

Time-resolved photoluminescence

Measurements for the up-conversion luminescence were performed using an Olympus FV1000MPE laser scanning confocal coupled to an Olympus BX61WI upright microscope equipped with a 25x water immersion objective (1.05 NA). This confocal was provided with a Mai Tai HP Deep See multiphoton laser with a pulse width of 100 fs as excitation source. The laser focused over the sample was tuned to 980 nm with an excitation power of 30 mW. The excitation power density was determined with a focused spot of about a 1 μm radius. The image was acquired by means of a 25x 1.05 N.A. Olympus dipping lens, appropriated emission filters and dwell time of 2 $\mu\text{s}\cdot\text{pixel}^{-1}$ and a resolution of 1024x1024 pixels. Emission is detected in a 4 channel visible-range detector (420-500/515-580/590-650/660-740). Samples were prepared by drop-casting a water dispersion of the corresponding NPs onto a 25x75 mm microscope glass slide. Then, solvent was evaporated and the sample was covered with a 22x22 mm glass slide.

Upconversion quantum yield measurements

For the measurement of the upconversion quantum yield a Quantaury-QY Plus UV-NIR absolute quantum yield spectrometer (C13534-11) was used. The nano hybrids were excited with an internal 980 nm (laser power 0.5W) or a CW 808 nm laser ($808 \pm 5\text{nm}$; laser power 1.6W) coupled to the spectrometer as excitation source. The spot size was 1 mmx0.1 mm and an exposure time of 145.6 ms.



Scheme S1. Schematic representation of energy transfer from Nd^{3+} to Yb^{3+} and Er^{3+} .

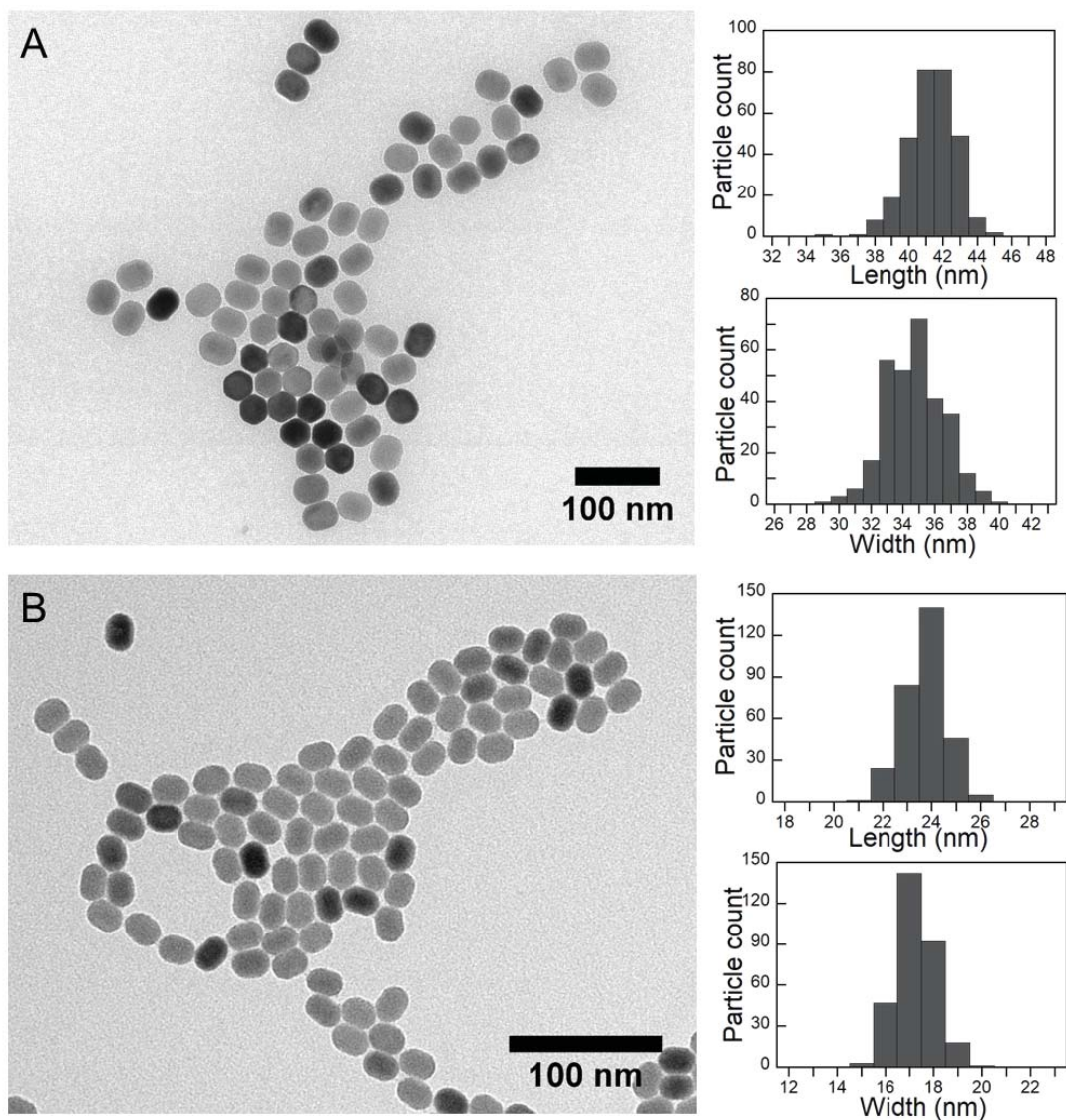


Figure S1. Representative low-resolution TEM images for UC_C together with size distribution histograms constructed from these TEM particle measurements: (A) $NaYF_4:Yb,Er$ ($UC_{C,Er}$) and (B) $NaYF_4:Yb,Tm$ ($UC_{C,Tm}$).

Figure S1A illustrates that $NaYF_4:Yb,Er$ cores are hexagonal nanoprisms⁵ with a narrow particle size distribution 35 ± 2 nm (hexagon width) \times 41 ± 1 nm (rod length). After the anisotropic shell growth of the undoped $NaYF_4$ shell, the as-synthesized $UC_{CS,Er}$ ($NaYF_4:Yb,Er/NaYF_4$) display an average size of 38 ± 2 nm (width) \times 66 ± 3 nm (length) indicating as expected, a slight increase along one preferential direction (Figure S2A).⁶⁻⁹

Similarly figure S1B illustrates $NaYF_4:Yb,Tm$ cores are hexagonal nanoprisms with a size distribution 17 ± 1 nm (hexagon width) \times 24 ± 1 nm (rod length). After the anisotropic shell growth of the undoped $NaYF_4$ shell, the as-

synthesized $UC_{CS,Tm}$ ($NaYF_4:Yb,Tm/NaYF_4$) display an average size of 21 ± 1 nm (width) \times 31 ± 2 nm (length) indicating as expected,⁶⁻⁸ a slight increase along one preferential direction (Figure S2B).

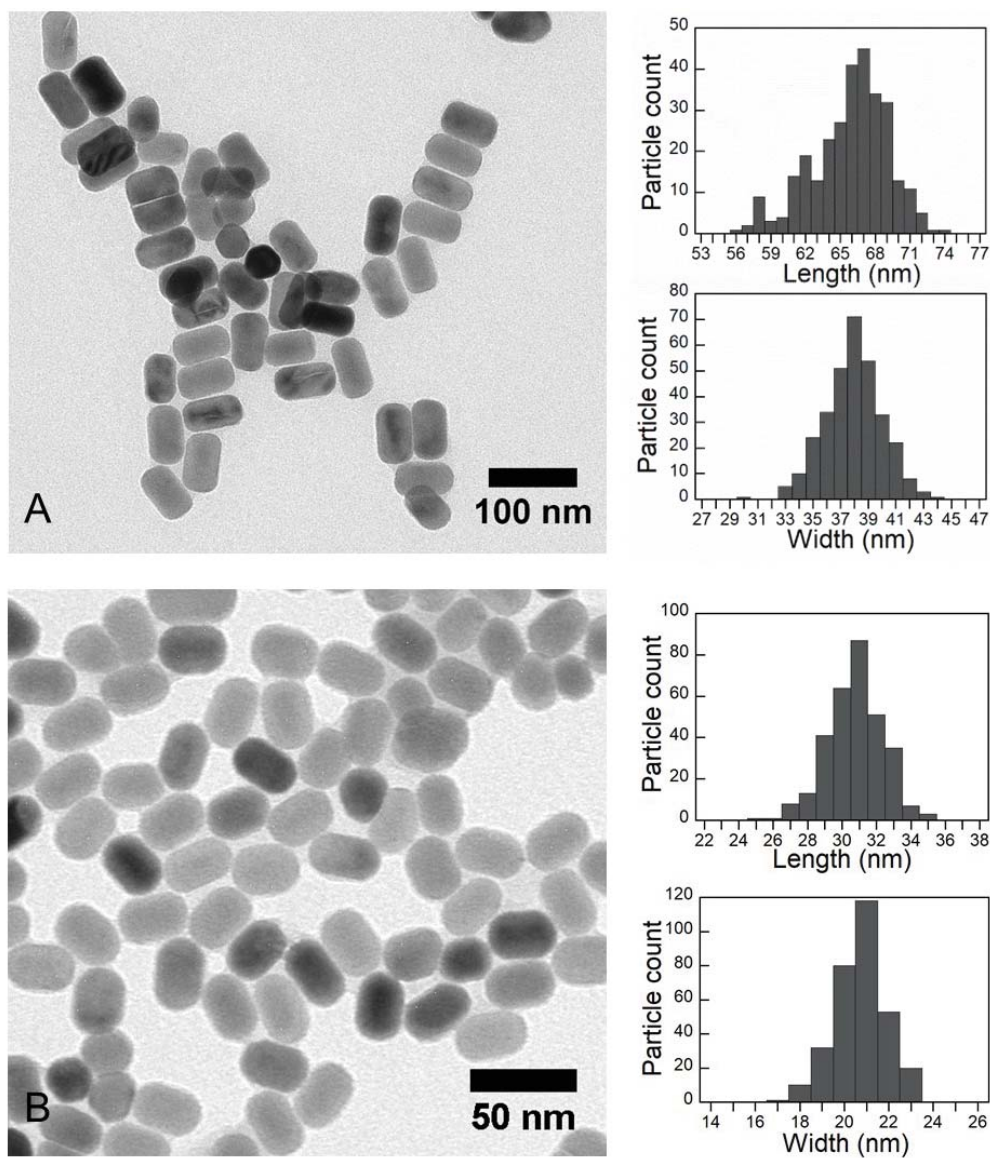


Figure S2. Representative low-resolution TEM images for UC_{CS} together with size distribution histograms constructed from these TEM particle measurements: (A) $NaYF_4:Yb,Er/NaYF_4$ ($UC_{CS,Er}$) and (B) $NaYF_4:Yb,Tm/NaYF_4$ ($UC_{CS,Tm}$).

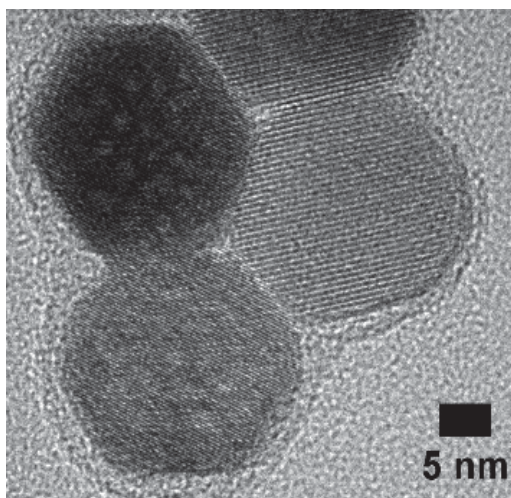


Figure S3. High-resolution TEM image of UC_{CS,Tm}@CB.

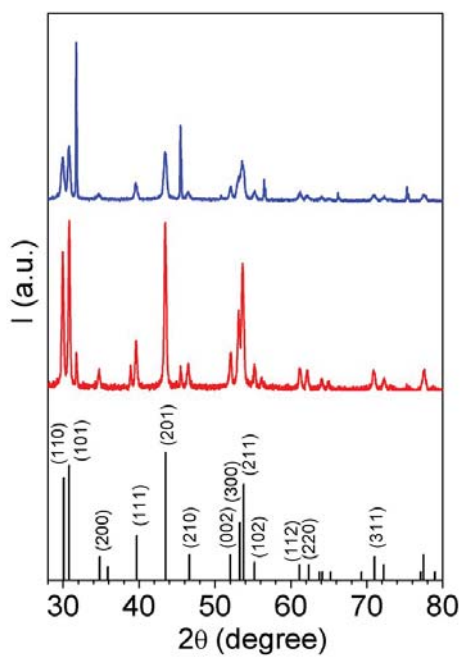


Figure S4. XRD spectra of: UC_{CS}: NaYF₄:Yb,Tm/NaYF₄ (blue), NaYF₄:Yb,Er/NaYF₄ (red) and hexagonal NaYF₄ standard (JCPDS PDF number 16-0334). The extra peaks are due to NaCl (DB card number 01-070-2509 Halite, syn; 2θ: 31.64, 45.39, 56.31).

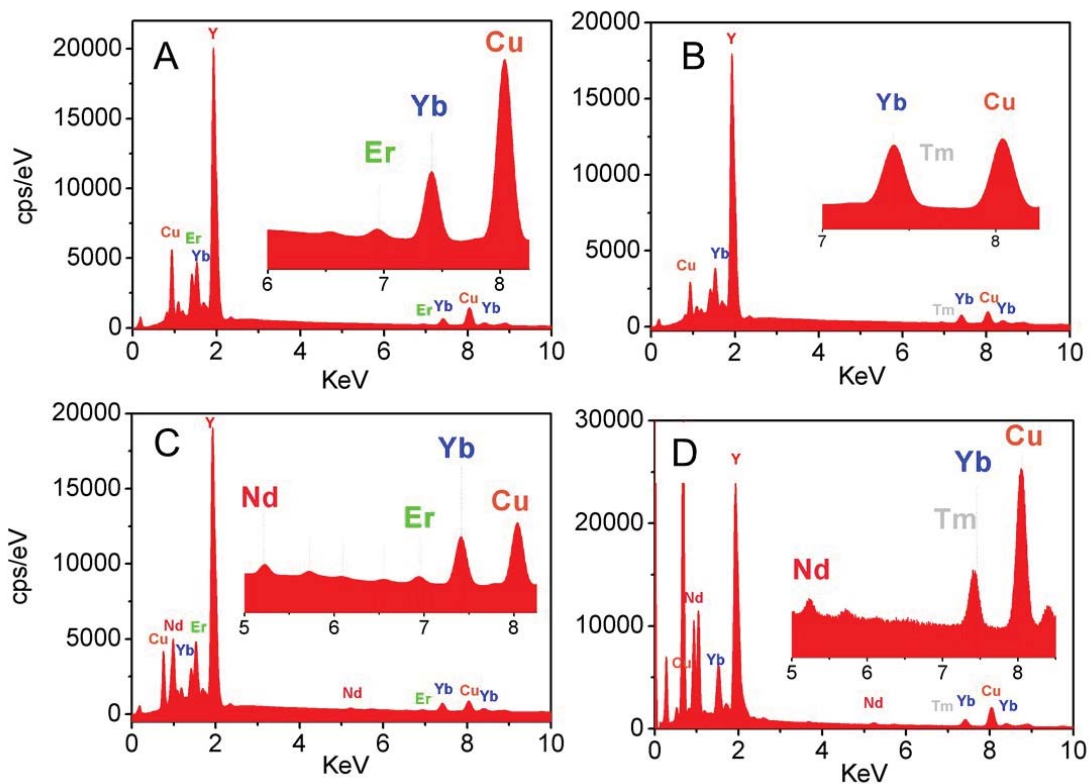


Figure S5. EDS spectra of (A) $UC_{CS,Er}@CB$; (B) $UC_{CS,Tm}@CB$; (C) $UC_{CS,Er}@CB@Nd$; (D) $UC_{CS,Tm}@CB@Nd$ (20 kV).

Table S1. Composition of samples from EDS.

Nanohybrid	Atom. C[at%]				
	Yttrium	Ytterbium	Erbium	Thulium	Neodymium
$UC_{CS,Er}@CB$	89.5 ± 0.1	9.5 ± 0.1	1.0 ± 0.04	—	—
$UC_{CS,Er}@CB@Nd$	88.5 ± 0.6	9.1 ± 0.5	1.0 ± 0.7	—	1.4 ± 0.05
$UC_{C,Tm}@OA$	80.9 ± 1.0	19.0 ± 0.7	—	<LOD* (<1)	—
$UC_{CS,Tm}@CB$	88.6 ± 0.4	11.4 ± 0.4	—	<LOD* (<1)	—
$UC_{CS,Tm}@CB@Nd$	88.7 ± 0.6	9.5 ± 0.1	—	<LOD* (<1)	1.7 ± 0.2

* Limit of detection of the method

The presence of CB7 was corroborated by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and thermogravimetric analyses (TGA) (Figures S6-S7).

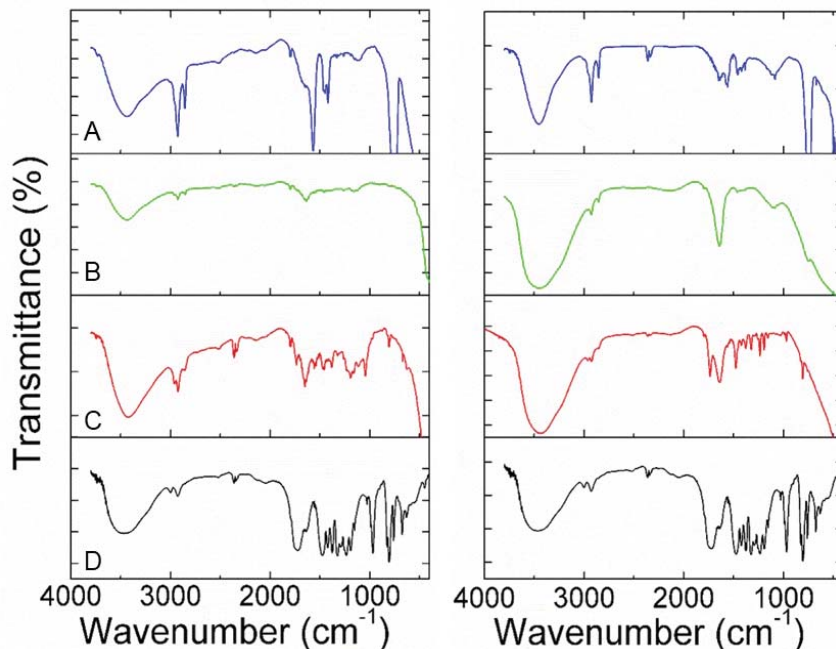


Figure S6. FTIR spectra of (A) $UC_{CS,Er}@OA$ (blue, left) and $UC_{CS,Tm}@OA$ (blue, right); (B) $UC_{CS,Er}$ (green, left) and $UC_{CS,Tm}$ (green, right); (C) $UC_{CS,Er}@CB$ (red, left) and $UC_{CS,Tm}@CB$ (red, right) nanohybrids. (D) CB[7] has been added for comparison purposes.

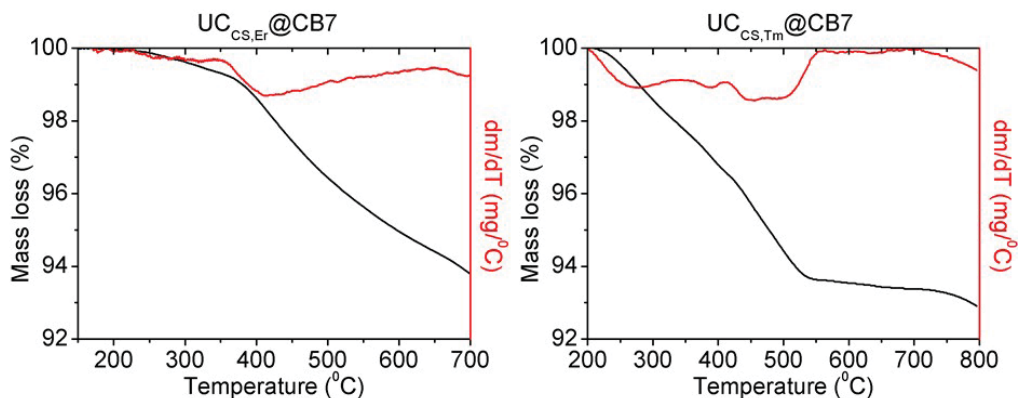


Figure S7. Thermogravimetric analyses (TGA) of $UC_{CS,Er}@CB$, (left) $UC_{CS,Tm}@CB$ (right), expressed as weight (%) as a function of applied temperature together with their first derivative (red lines).

Thus, the FTIR spectra of $UC_{CS}@CB$ nanohybrids exhibited a strong band at 1735 cm^{-1} , which corresponds to the stretching vibration of CB[7] carbonyl groups (C=O). As expected, this band shifted as compared to 1720 cm^{-1} of free CB[7] due to the interaction between CB[7] and the NP. Moreover, the TGA of $UC_{CS}@CB$ nanohybrids showed a weight loss of 5.3% for $UC_{CS,Er}@CB$ and 6.2% for $UC_{CS,Tm}@CB$ at ca. 430°C (peak of the first derivate) characteristic of CB[7] (Figure S7).

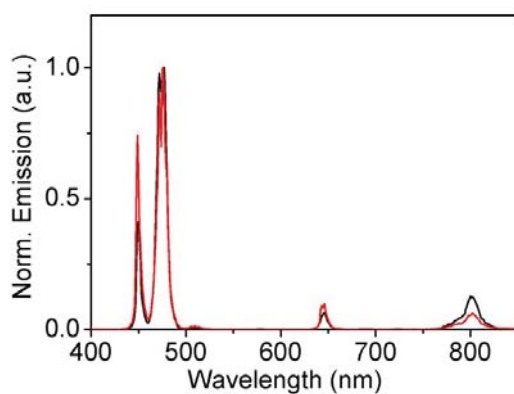


Figure S8. Normalized emission spectra at 475 nm of: UC_{CS,Tm}@CB (black line) and UC_{CS,Tm}@CB@Nd (red line).

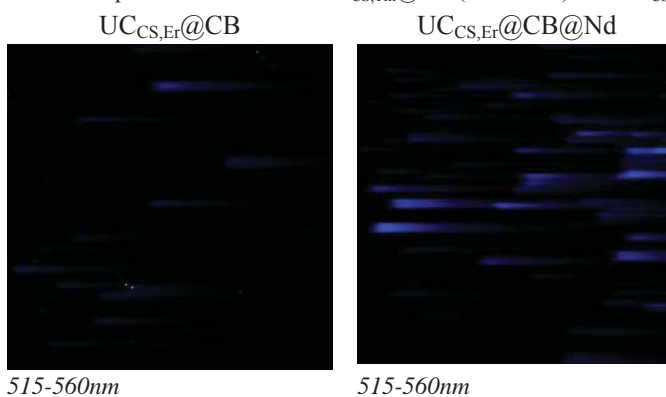


Figure S9. Multiphoton microscopy images of UC_{CS,Er}@CB and UC_{CS,Er}@CB@Nd under the same excitation and optical setup (λ_{ex} =785 nm; 0.497 $\mu\text{m}/\text{pixel}$; 2.0 $\mu\text{s}/\text{pixel}$).

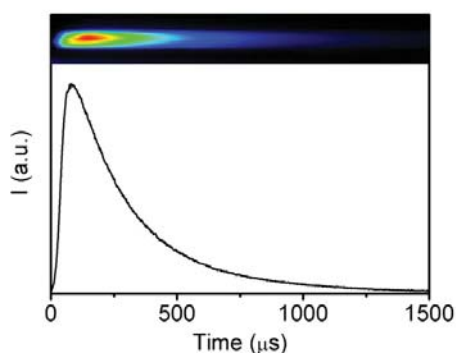


Figure S10. Example of kinetic profile obtained from an intensity profile using multiphoton time-resolved microscopy. All kinetic traces obtained by this method showed the characteristic rise and decay phases of the UCNPs.

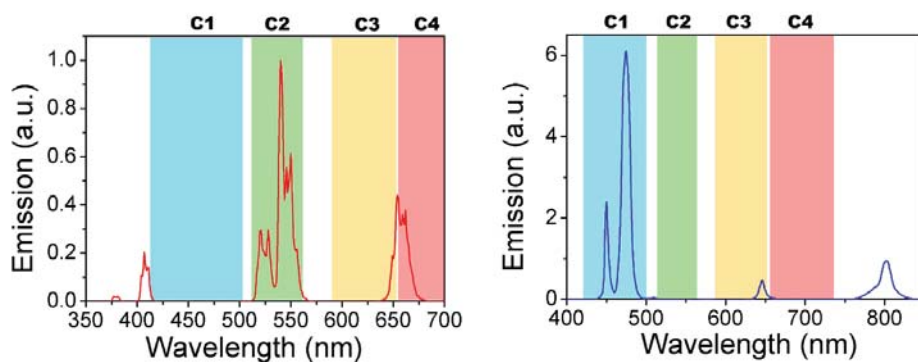


Figure S11. Emission spectra of UC_{CS,Er} (left) and UC_{CS,Tm} (right). Detection channels are depicted in colored rectangles.

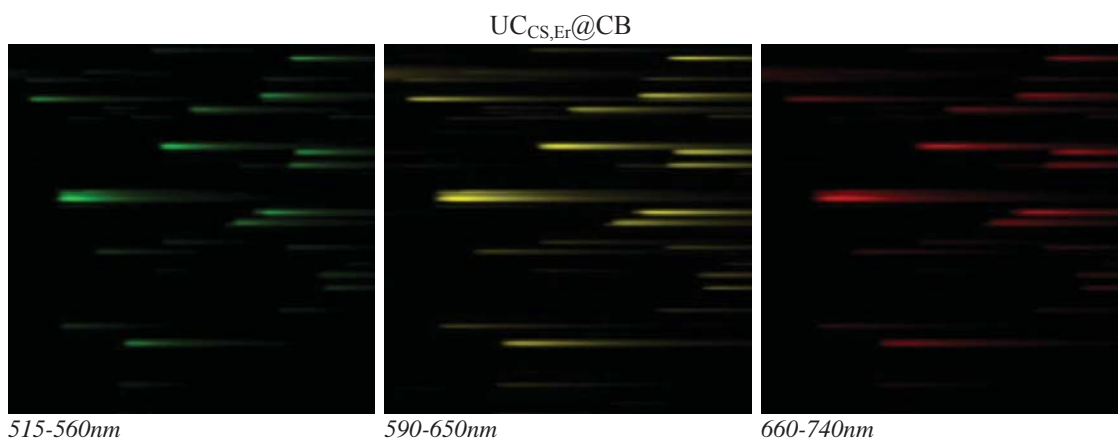


Figure S12. Multiphoton microscopy images of UC_{CS,Er}@CB (λ_{ex} =980 nm; 0.497 $\mu\text{m}/\text{pixel}$; 2.0 $\mu\text{s}/\text{pixel}$).

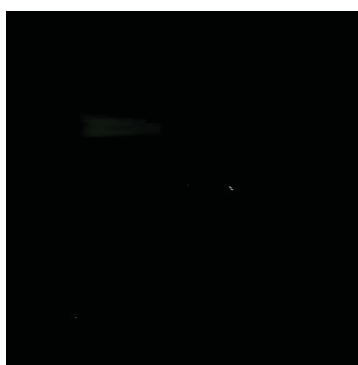


Figure S13. Multiphoton microscopy image of UC_{CS,Er}@CB. The image is the overlapping of all detection channels at sensitivities >400V (λ_{ex} =800 nm; 0.497 $\mu\text{m}/\text{pixel}$; 2.0 $\mu\text{s}/\text{pixel}$).

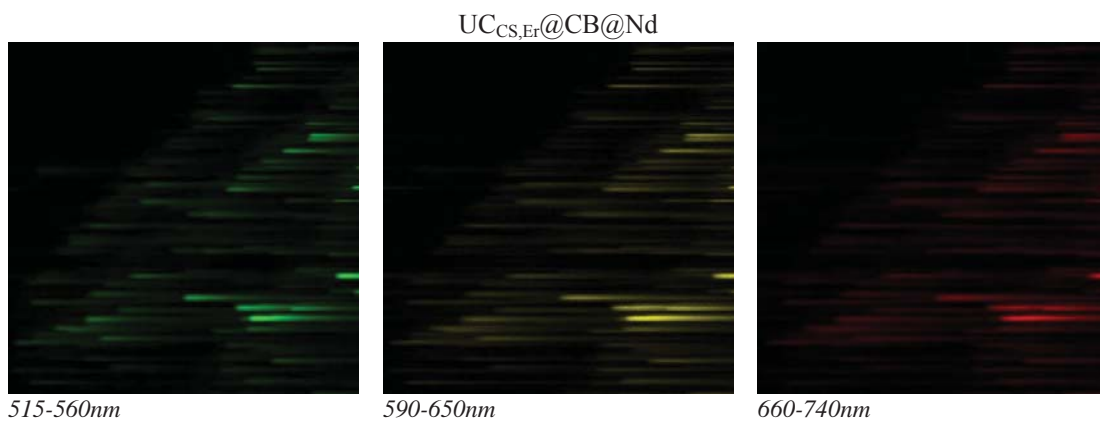


Figure S14. Multiphoton microscopy images of $UC_{CS,Er}@CB@Nd$ ($\lambda_{ex}=980$ nm; 0.497 $\mu\text{m}/\text{pixel}$; 2.0 $\mu\text{s}/\text{pixel}$).

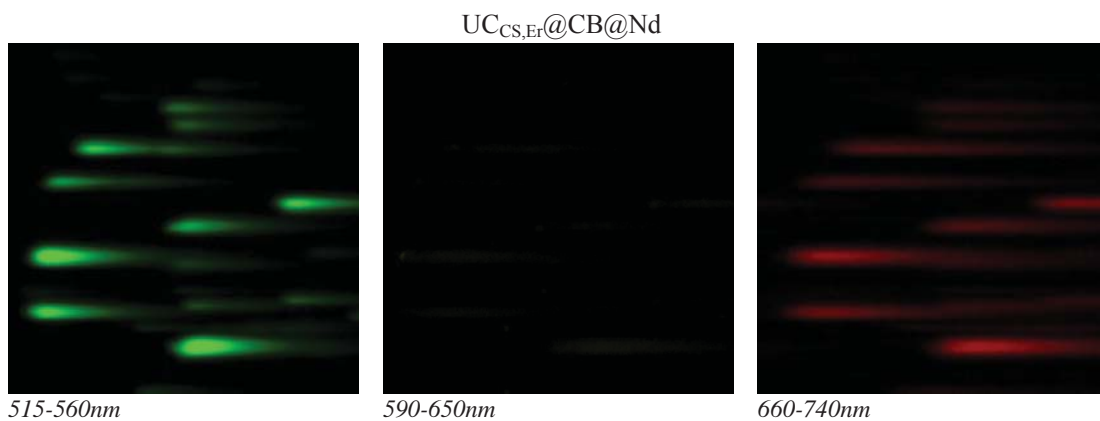


Figure S15. Multiphoton microscopy images of $UC_{CS,Er}@CB@Nd$ ($\lambda_{ex}=800$ nm; 0.497 $\mu\text{m}/\text{pixel}$; 2.0 $\mu\text{s}/\text{pixel}$).

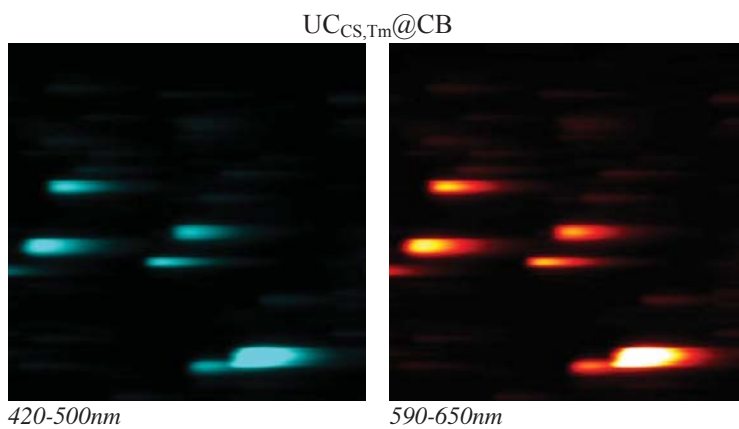


Figure S16. Multiphoton microscopy images of $UC_{CS,Tm}@CB$ ($\lambda_{ex}=980$ nm; 0.124 $\mu\text{m}/\text{pixel}$; 8.0 $\mu\text{s}/\text{pixel}$).

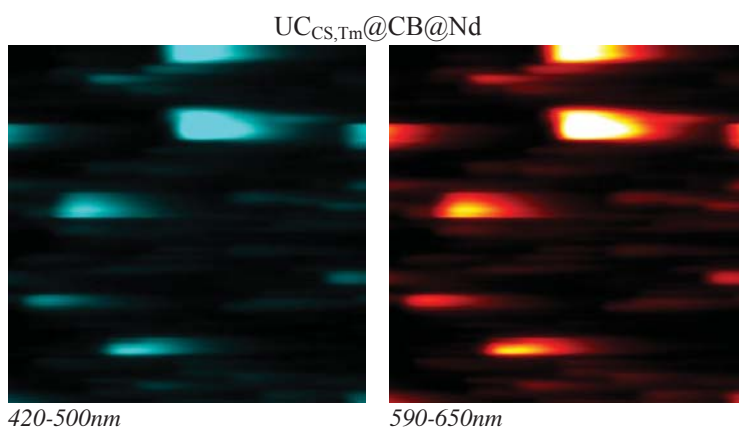


Figure S17. Multiphoton microscopy images of $UC_{CS,Tm}@CB@Nd$ ($\lambda_{ex}=980$ nm; 0.159 $\mu\text{m}/\text{pixel}$; 8.0 $\mu\text{s}/\text{pixel}$).

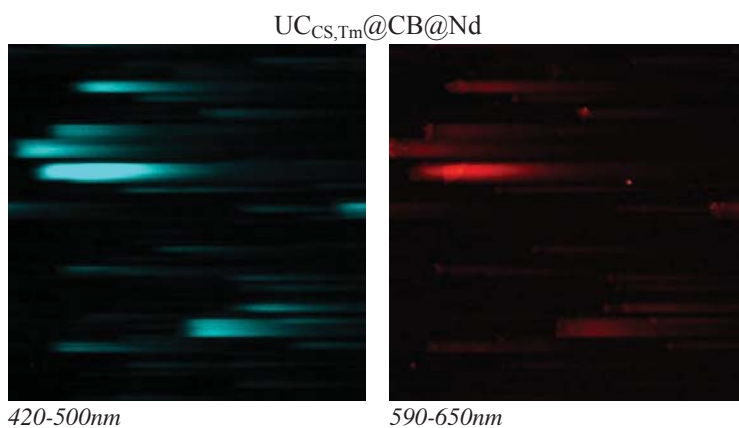


Figure S18. Multiphoton microscopy images of $UC_{CS,Tm}@CB@Nd$ ($\lambda_{ex}=800$ nm; 0.497 $\mu\text{m}/\text{pixel}$; 8.0 $\mu\text{s}/\text{pixel}$).

References

1. Z. Li and Y. Zhang, *Nanotechnology*, 2008, **19**, 345606.
2. A. Dong, X. Ye, J. Chen, Y. Kang, T. Gordon, J. M. Kikkawa and C. B. Murray, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 998-1006.
3. N. Bogdan, F. Vetrone, G. A. Ozin and J. A. Capobianco, *Nano letters*, 2011, **11**, 835-840.
4. L. Francés-Soriano, M. González-Béjar and J. Pérez-Prieto, *Nanoscale*, 2015, **7**, 5140-5146.
5. V. Voliani, M. Gemmi, L. Francés-Soriano, M. González-Béjar and J. Pérez-Prieto, *J. Phys. Chem. C*, 2014, **118**, 11404-11408.
6. C. Chen, N. Kang, T. Xu, D. Wang, L. Ren and X. Guo, *Nanoscale*, 2015, **7**, 5249-5261.
7. J. Tang, L. Lei, H. Feng, H. Zhang and Y. Han, *J. Fluoresc.*, 2016, **26**, 2237-2246.
8. C. Zhang and J. Y. Lee, *ACS Nano*, 2013, **7**, 4393-4402.
9. N. Francolon, D. Boyer, F. Leccia, E. Jouberton, A. Walter, C. Bordeianu, A. Parat, D. Felder-Flesch, S. Begin-Colin, E. Miot-Noirault, J.-M. Chezal and R. Mahiou, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 2016, **12**, 2107-2113.

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual

Oficina Internacional

(43) Fecha de publicación internacional
04 de enero de 2018 (04.01.2018)



(10) Número de publicación internacional
WO 2018/002405 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

C09K11/02 (2006.01) C09K11/8S (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES20 17/070474

(22) Fecha de presentación internacional:

29 de junio de 2017 (29.06.2017)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201630886 30 de junio de 2016 (30.06.2016) ES

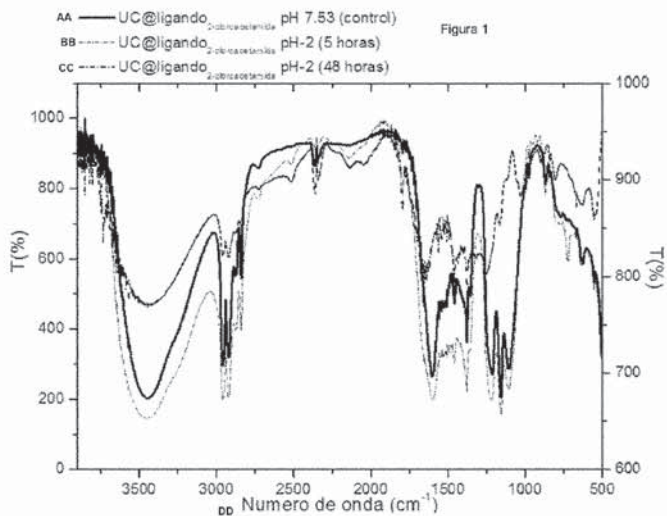
(71) Solicitantes: INNCEINMAT S.L [ES/ES]; Avda. Ferrandis Salvador, 5-Entlo., E-12100 Grao de Castellón (Castellón de la Plana) (ES). UNIVERSITAT DE VALEN-

CIA [ES/ES]; Avda. Blasco Ibáñez, 13, E-46010 Valencia (ES). CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; Serrano, 117., E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores: PÉREZ PRIETO, Julia; Avda. Blasco Ibáñez, 13, E-46010 Valencia (ES). GONZÁLEZ BÉJAR, María; Avda. Blasco Ibáñez, 13, E-46010 Valencia (ES). ESTÉBANEZ BLOEM, Néstor Luis; Avda. Blasco Ibáñez, 13, E-46010 Valencia (ES). FERNÁNDEZ LOZANO, José Francisco; Instituto de Cerámica y Vidrio, ICV-CSIC, Kelsen, 5, E-28049 Madrid (ES). ENRÍQUEZ PÉREZ, Esther; Instituto de Cerámica y Vidrio, ICV-CSIC, Kelsen, 5, E-28049 Madrid (ES). LÓPEZ BUEN-DÍA, Ángel Miguel; Pare Científic, Catedrático Agustín Escardino, 9, E-46980 Paterna, Valencia (ES). URQUIO-

(54) Title: LUMINESCENT UPCONVERSION MATERIALS AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) Título: MATERIALES LUMINISCENTES DE UPCONVERSION Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LOS MISMOS



AA UC@ligand_2-chloroacetamide pH 7.53 (control)
BB UC@ligand_2-chloroacetamide pH 2 (5 hours)
CC UC@ligand_2-chloroacetamide pH 2 (48 control)
DD Wave number (cm⁻¹)

(57) Abstract: The present invention relates to nanoparticles of formula $MLnF_4:RE^{+3}$, where M is an alkaline metal, Ln is a lanthanide element or an analog thereof and RE^{+3} is an ion of rare earth elements or combinations thereof, characterized in that said nanoparticles comprise organic ligands bound to the surface thereof by means of covalent bonds. The invention also relates to a method for preparing the luminescent upconversion nanoparticles of the invention, to the use of the luminescent upconversion nanoparticles of the invention as fluorescent markers or photosensitizers and to a luminescent composite material comprising the luminescent upconversion nanoparticles of the invention.



WO 2018/002405 A1

LA CASAS, María del Mar; Avda. Pi y Margall, 4-21,
E-46100 Burjassot, Valencia (ES).

(74) **Mandatario:** ARIAS SANZ, Juan; ABG PATENTES,
S.L., Avda. de Burgos, 16D, Edificio EUROMOR, E-28036
Madrid (ES).

(81) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(57) **Resumen:** La presente invención se refiere a nanopartículas de fórmula $MLnF^+RE^{+3}$, donde M es un metal alcalino, Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo y RE^{+3} es un ión de tierras raras o combinaciones de los mismos; caracterizadas porque dichas nanopartículas comprenden ligandos orgánicos unidos a su superficie mediante enlaces covalentes. La invención además se refiere a un método de preparación de las nanopartículas luminescentes de *upconversion* de la invención, al uso de las nanopartículas luminescentes de *upconversion* de la invención como marcadores fluorescentes o foto sensibilizadores y a un material compuesto luminescente que comprende las nanopartículas luminescentes de *upconversion* de la invención.

DESCRIPCIÓN

Materiales luminiscentes de *upconversion* y método de preparación de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención está relacionada con el área de materiales luminiscentes de *upconversion*. Más específicamente la presente invención está relacionada con nanopartículas y materiales compuestos luminiscentes de *upconversion* y métodos para la preparación de los mismos.

Antecedentes de la invención

Los procesos de *upconversion* consisten en la emisión de fotones a alta energía en el intervalo ultravioleta-visible-infrarrojo cercano tras absorciones secuenciales de fotones de menor energía, normalmente en el infrarrojo cercano. En la actualidad, el desarrollo de nanopartículas constituidas por la combinación de una matriz cristalina adecuada y de ciertos iones lantánido trivalentes (Ln^{3+}), los cuales son capaces de producir emisión eficiente por *upconversion* ("*Lantanide-upconversion nanoparticles*" Ln-UCNPs), ha adquirido una gran relevancia en el ámbito de la nanofotónica, como por ejemplo NaYF_4 dopadas con tierras raras como Er^{3+} , Yb^{3+} y/o Tm^{3+} . Esto se debe a los tiempos de vida media largos de la fotoluminiscencia de los Ln^{3+} (desde los μs a varios ms), y a la baja densidad de potencia óptica que requiere la excitación de las Ln-UCNPs, lo que hace posible el uso de láseres de diodo en continuo como fuente de excitación (mucho más económicos que los láseres pulsados que se requieren normalmente). Además, las Ln-UCNPs pueden emitir a diferentes longitudes de onda a través de la selección o combinación de los iones Ln^{3+} , presentan escasa toxicidad y una extraordinaria fotoestabilidad. Estos materiales de formulación tipo $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er(Tm)}$ son conocidos desde los años 70 (Menyuk N. *et al.*; *Appl. Phys. Lett.*, 1972, 21, 159; Sommerdijk J.L. and Brill A., *Philips Tech. Rev.* 1974, 34, 1) por su efecto de *upconversion*, y se obtuvieron en tamaño nanométrico posteriormente (Zeng J. H. *et al.*; *Adv. Mater.* 2005, 17, 2119).

Todas estas ventajas de las Ln-UCNPs permiten una amplia variedad de aplicaciones fotónicas como marcadores luminiscentes actuando como elementos de seguridad

(WO 2014/090867 A2, Chen G. *et al.*; *Chem. Soc. Rev.*, 2015, 44, 1680-1713) o en técnicas de formación de imagen en diagnóstico y biomedicina (US 2009/0081461 A1), en las que el uso de excitación en el infrarrojo cercano permite mayor profundidad de penetración en tejidos biológicos, con mínimo daño en organismos vivos. También son aplicadas en la fabricación de pantallas y dispositivos luminosos, y en tecnología de generación de luz blanca, para lo que se requiere la incorporación de las Ln-UCNPs en materiales compuestos híbridos, por dispersión o infiltración en materiales vitreos o poliméricos, y por depósito como láminas delgadas sobre sustratos cristalinos, materiales todos ellos transparentes en el infrarrojo cercano. La generación de luz blanca por balance de las emisiones de *upconversion* de las Ln-UCNPs constituye una alternativa a otros sistemas de luz blanca como por ejemplo los LEDs.

La investigación y el desarrollo de las anteriores aplicaciones fotónicas han sido posibles gracias al desarrollo de una gran variedad de rutas químicas de preparación de Ln-UCNPs, incluyendo principalmente co-precipitación (Wang L. Y. *et al.*; *Angew. Chem., Int. Ed.* 2005, 44(37), 6054-6057), descomposición térmica (Q. Li and Y. Zhang, *Nanotechnology* 2008, 19, 345606), síntesis solvotermal (Rhee H. W. *et al.*; *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130(3), 784-785), síntesis por combustión (Liu Y. S. *et al.*; *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42(16), 6924-6958) y síntesis sol-gel (Patra A. *et al.*; *J. Phys. Chem. B* 2002, 106(8), 1909-1912).

En todas estas rutas sintéticas, las Ln-UCNPs obtenidas están pasivadas con ligandos orgánicos anclados a la superficie de las nanopartículas mediante interacciones no-covalentes y utilizando grupos aniónicos o con pares de electrones libres, tales como grupos carboxilatos, fosfatos, tiolatos o aminas. La solicitud internacional WO 2012/091778 A2 describe Ln-UCNPs de $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$, $\text{Gd}_2\text{O}_3:\text{Yb,Er}$, $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb,Er}$, CeO_2 o $\text{NaGdF}_4:\text{Tb}$, todas ellas pasivadas con oleato. La solicitud estadounidense US 2010/0261263 A1 describe Ln-UCNPs con estructura núcleo/coraza que comprenden un núcleo de $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Ln}$ con cubierta de NaYF_4 y pasivadas con polietilenglicol o polietilenimina. Los ligandos son esenciales para controlar el tamaño y la forma de las Ln-UCNPs durante su proceso de síntesis en disolución, así como para evitar el colapso de las nanopartículas y, como consecuencia, su precipitación.

Las Ln-UCNPs obtenidas mediante estos métodos son generalmente hidrofóbicas, siendo esto una desventaja para diversas aplicaciones para las cuales es necesario

que las Ln-UCNPs sean dispersables en medios acuosos, por ejemplo para su aplicación en muestras biológicas. Este inconveniente se soluciona habitualmente en el estado de la técnica mediante intercambio del ligando o pasivado con macromoléculas como polímeros (Muhr V. *et al.*; *Acc. Chem. Res.*, 2014, 47 (12), 3481-3493) u oxidación del ligando (Naccache R. *et al.*; *Chem. Mater.*, 2009, 21(4), 717-723) con el fin de conferir hidrofilia a las Ln-UCNPs.

Sin embargo, el pasivado con ligandos orgánicos de las Ln-UCNPs descritas en el estado de la técnica presenta baja estabilidad en medios ácidos debido a que los ligandos empleados se descoordinan de la superficie de la nanopartícula a pH ácidos (Liras M. *et al.*; *Chem. Mater.* 2014, 26, 4014-4022). De hecho, es habitual eliminar los ligandos carboxilato anclados a Ln-UCNPs mediante su protonación a pH ca. 4 (Bogdan N. *et al.*; *Nano Lett.*, 2011, 11, 835-840). Esta baja estabilidad del pasivado orgánico frente a pHs ácidos supone un inconveniente para el uso de este tipo de nanopartículas en numerosas aplicaciones que requieren de medio ácido, como por ejemplo la síntesis de materiales compuestos cerámicos mediante la técnica sol-gel como las que se requieren en la presente invención.

Por tanto, a pesar de la gran variedad de Ln-UCNPs y rutas de síntesis de las mismas descritas en el estado de la técnica, existe aún la necesidad de obtener nuevas Ln-UCNPs estables en medios ácidos y con alta eficiencia de *upconversion*. Estas nuevas Ln-UCNPs deben ser además aplicables como materiales particulados o en lámina manteniendo su transparencia y preferiblemente con estabilidad y dureza de tipo cerámico. Aunque se ha descrito la preparación de recubrimientos cerámicos mediante la técnica sol-gel, como por ejemplo en WO 2012/1 13953 A1, existe aún la necesidad en el estado de la técnica de recubrimientos cerámicos que comprendan Ln-UCNPs con alta eficiencia luminiscente.

30 Breve descripción de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado nanopartículas con propiedades luminiscentes de *upconversion*, estables en medios extremadamente ácidos como consecuencia de la fuerte unión de ligandos orgánicos a la superficie de las nanopartículas. Además, las nanopartículas de la invención son solubles en medio

acuoso y pueden ser conjugadas a otras moléculas, y por lo tanto, cambiar su interacción con el medio (solubilidad) o incorporar moléculas funcionales.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a nanopartículas de fórmula
 5 $MLnF_4:RE^{+3}$, donde M es un metal alcalino, Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo y RE^{+3} es un ión de tierras raras o combinaciones de los mismos; caracterizadas porque dichas nanopartículas comprenden ligandos orgánicos unidos a su superficie mediante enlaces covalentes.

10 Las nanopartículas de la invención presentan propiedades luminiscentes de *upconversion* y se sintetizan a partir de nanopartículas precursoras desnudas (UCN_{Pna_kEj}), caracterizadas porque comprenden grupos $-O^-$, $-OH$ o $-HOH$ en su superficie que derivan de las moléculas de agua presentes en el medio de síntesis. Las UCN_{Pna_kEj} se obtienen previamente mediante, por ejemplo, tratamiento en medio
 15 ácido de UCNP pasivadas con ligandos oleato u otros carboxilatos. Se aprovecha por tanto la funcionalidad de la superficie de las $UCNP_{naked}$ (grupos $-O^-$, $-OH$ o $-HOH$) para la obtención de las nanopartículas de la invención ($UCNP@ligando$, donde "ligando" se refiere a un compuesto orgánico unido mediante un enlace estable covalente a la superficie de las nanopartículas).

20

Por tanto, otro aspecto de la presente invención proporciona un método de preparación de nanopartículas luminiscentes de *upconversion* de fórmula $MLnF_4:RE^{+3}$, donde M es un metal alcalino, Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo y RE^{+3} es un ión de tierras raras o combinaciones de los mismos; caracterizadas porque
 25 dichas nanopartículas comprenden ligandos orgánicos unidos a su superficie mediante enlaces covalentes, que comprende las etapas de:

a) añadir a un disolvente polar nanopartículas precursoras de fórmula $MLnF_4:RE^{+3}$, donde M es un metal alcalino, Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo y RE^{+3} es un ión de tierras raras o combinaciones de los mismos;
 30 caracterizadas porque dichas nanopartículas comprenden grupos $-O^-$, $-OH$, $-HOH$ o combinaciones de los mismos en su superficie;

b) añadir sobre la mezcla resultante de la etapa (a) una base en exceso; y

c) tras eliminar el exceso de base de la mezcla resultante de la etapa (b), añadir un compuesto de fórmula $X-CH_2CO-Z$ donde X es un halógeno, Z es $-H$, $-R$, $-COR$,

-OH, -OCOR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NHCOR, -SR o -SCOR, y R es una cadena alquílica lineal o ramificada.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a nanopartículas de fórmula
5 MLnF₄:RE⁺³ donde M es un metal alcalino, Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo y RE⁺³ es un ión de tierras raras o combinaciones de los mismos; caracterizadas porque dichas nanopartículas comprenden ligandos orgánicos unidos a su superficie mediante enlaces covalentes, obtenibles mediante el método de preparación como se define anteriormente.

10

Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de las nanopartículas luminiscentes de *upconversion* como se definen anteriormente como marcadores fluorescentes o fotosensibilizadores.

15 La presente invención proporciona además un material compuesto luminiscente que comprende las nanopartículas luminiscentes de *upconversion* como se definen anteriormente. La combinación de ambos componentes (matriz y nanopartículas) da lugar a una potenciación de las propiedades luminiscentes de *upconversion* y estabilidad de las nanopartículas, y proporciona un material compuesto con altas
20 prestaciones luminiscentes de *up-conversion*.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un material compuesto luminiscente que comprende las nanopartículas luminiscentes de *upconversion* como se definen anteriormente.

25

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso del material compuesto luminiscente como se define anteriormente como marcador fluorescente o fotosensibilizador.

30 Finalmente, otro aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso del material compuesto luminiscente como se define anteriormente en los sectores de papel, plástico, envase, textil, automovilístico, pinturas, biológico, médico-farmacéutico, seguridad documental, trazadores, pigmentos cerámicos, optoelectrónico o fotovoltaico.

35

Figuras

Figura 1: Comparación de espectros FTIR para UCNP@ligando ₂-cloroacetamida a diferentes pHs; donde UCNP es NaYF₄:Yb, Er.

5

Figura 2: Comparación de espectros de emisión para UCNP@ligando ₂-cloroacetamida a diferentes pHs; donde UCNP es NaYF₄:Yb, Er donde a) pH es 7,53 (control); b) pH es 2,00; c) pH es 2,00 después de 2 horas; y d) pH es 7,53 después de 48 horas.

10 Figura 3: Espectro XPS C _{1s} para la 2-cloroacetamida (arriba) y para UCNP@ligando ₂-cloroacetamida (abajo); donde UCNP es NaYF₄:Yb, Er.

Figura 4: Espectro XPS N _{1s} para la 2-cloroacetamida (izqda.) y para UCNP@ligando ₂-cloroacetamida (abajo); donde UCNP es NaYF₄:Yb, Er.

15

Figura 5: Espectro XPS C _{1s} para la 2-cloroacético (arriba) y para UCNP@ligando ₂-cloroacético (abajo); donde UCNP es NaYF₄:Yb, Er.

Figura 6: Espectro XPS O _{1s} para el ácido 2-cloroacético (arriba) y para
20 UCNP@ligando ₂-cloroacético (abajo); donde UCNP es NaYF₄:Yb, Er.

Figura 7: Luminiscencia del material compuesto que comprende UCNP@ligando ₂-cloroacetamida; donde UCNP es NaYF₄:Yb, Er, encapsuladas mediante procedimiento sol-gel.

25

Descripción detallada de la invención

El objeto principal de la presente invención es proporcionar nanopartículas luminiscentes de *upconversion*, más específicamente nanopartículas de fórmula
30 MLnF₄:RE⁺³, donde M es un metal alcalino, Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo y RE⁺³ es un ión de tierras raras o combinaciones de los mismos; caracterizadas porque dichas nanopartículas comprenden ligandos orgánicos unidos a su superficie mediante enlaces covalentes, así como materiales compuestos cerámicos de propiedades sinérgicas que contienen dichas nanopartículas.

35

Los procesos de "upconversion" consisten en la emisión de fotones a alta energía en el intervalo ultravioleta-visible-infrarrojo cercano tras absorciones secuenciales de fotones de menor energía.

5 Por tanto, las nanopartículas de la invención presentan propiedades luminiscentes de *upconversion* con emisión en el rango visible-ultravioleta-infrarrojo cercano, tras excitaciones múltiples con fotones de menor energía, en particular en el infrarrojo cercano.

10 Las nanopartículas de la invención pueden presentar estructura cúbica, hexagonal, esférica, tetragonal, romboédrica, monoclinica, triclínica o una combinación de las mismas. Las nanopartículas de la invención tienen preferiblemente un tamaño medio menor o igual a 500 nm, aún más preferiblemente entre alrededor de 20 nm y alrededor de 500 nm.

15

Las nanopartículas de la invención presentan una matriz de fórmula $M\text{LnF}_4$ dopada con iones trivalentes de tierras raras RE^{3+} o combinaciones de los mismos y donde M es un metal alcalino y Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo.

20 En una realización preferida, M es Na o Li. En otra realización preferida, RE^{3+} es Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Gd^{3+} o mezclas combinaciones de los mismos.

El término "elemento lantánido" se refiere a un elemento que forma parte del periodo 6 de la tabla periódica y se selecciona de La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho,
25 Er, Tm, Yb y Lu, preferiblemente Yb.

El término "análogo del mismo" se refiere a un elemento situado dentro del grupo 3 de la tabla periódica y que es químicamente similar a un elemento lantánido. En una realización preferida, el elemento análogo es Y.

30

Un ejemplo no limitativo de matriz es NaYF_4 dopada con Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Gd^{3+} o combinaciones de los mismos.

En una realización particular, las nanopartículas de la invención tienen estructura
35 núcleo/coraza. El término "estructura núcleo/coraza" se refiere a nanopartículas que

comprenden un núcleo de un material interior y una coraza de un material exterior. Las nanopartículas obtenibles mediante el método de preparación como se define anteriormente con estructura núcleo/coraza pueden tener la misma o diferente composición química para el material interior del núcleo y para el material exterior de la coraza. Un ejemplo no limitativo de nanopartículas de la invención con estructura núcleo/coraza es $\text{NaYF}_4:\text{RE}^{3+}/\text{NaYF}_4:\text{RE}^{3+}$ o $\text{NaYF}_4:\text{RE}^{3+}/\text{NaYF}_4$.

Las nanopartículas de la invención comprenden además ligandos orgánicos unidos por enlaces covalentes a su superficie los cuales comprenden una unidad $-\text{CH}_2\text{CO}-$. Esta unidad corta permite que los ligandos se mantengan fuertemente unidos a la superficie de las nanopartículas de la invención incluso en medios extremadamente ácidos, a diferencia de los grupos anclantes mediante enlaces de coordinación o iónicos descritos en el estado de la técnica, los cuales se descoordinan de la superficie de las nanopartículas en medios de pHs ácidos.

El término "enlace covalente" se refiere a un enlace que se produce entre dos átomos con una diferencia de electronegatividad entre dichos átomos menor a 1,7, y en el cual dichos átomos alcanzan el octeto estable, compartiendo electrones del último nivel.

Por ello, en una realización particular, las nanopartículas de la invención comprenden ligandos orgánicos unidos a su superficie mediante enlaces covalentes resistentes a pHs fuertemente ácidos, preferiblemente a pHs entre alrededor de 1,0 y alrededor de 4,0.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método de preparación de nanopartículas luminiscentes de *upconversion* de fórmula $\text{MLnF}_4:\text{RE}^{+3}$, donde M es un metal alcalino, Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo y RE^{+3} es un ión de tierras raras o combinaciones de los mismos; caracterizadas porque dichas nanopartículas comprenden ligandos orgánicos unidos a su superficie mediante enlaces covalentes, que comprende las etapas de:

a) añadir a un disolvente polar nanopartículas precursoras de fórmula $\text{MLnF}_4:\text{RE}^{+3}$, donde M es un metal alcalino, Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo y RE^{+3} es un ión de tierras raras o combinaciones de los mismos; caracterizadas porque dichas nanopartículas comprenden grupos $-\text{O}^-$, $-\text{OH}$, $-\text{HOH}$ o combinaciones de los mismos en su superficie;

- b) añadir sobre la mezcla resultante de la etapa (a) una base en exceso; y
- c) tras eliminar el exceso de base de la mezcla resultante de la etapa (b), añadir un compuesto de fórmula $X-CH_2CO-Z$ donde X es un halógeno, Z es -H, -R, -COR, -OH, -OCOR, $-NH_2$, -NHR, $-NR_2$, -NHCOR, -SR o -SCOR, y R es una cadena alquílica lineal o ramificada.

Por tanto, el método de preparación de las nanopartículas de la invención comprende una etapa (a) que implica añadir a un disolvente polar nanopartículas precursoras de fórmula $MLnF_4:RE^{+3}$, donde M es un metal alcalino, Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo y RE^{+3} es un ión de tierras raras o combinaciones de los mismos; caracterizadas porque dichas nanopartículas comprenden grupos $-O^-$, -OH, -HOH o combinaciones de los mismos en su superficie.

En una realización preferida, M es Na o Li. En otra realización preferida, RE^{3+} es Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Gd^{3+} o mezclas combinaciones de los mismos. En una realización preferida, Ln es Y.

Un ejemplo no limitativo de matriz de las nanopartículas de la invención es $NaYF_4$ dopada con Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Gd^{3+} o combinaciones de los mismos.

Ejemplos no limitativos de disolventes polares adecuados para la etapa (a) del método de la invención son dimetilformamida (DMF), acetonitrilo (ACN), tetrahidrofurano (THF) o mezcla de los mismos.

En otra realización preferida, la etapa (a) del método de la invención tiene lugar a una temperatura desde alrededor de 25 °C a alrededor de 80 °C.

El método de preparación de las nanopartículas de la invención comprende además una etapa (b) que comprende añadir sobre la mezcla resultante de la etapa (a), como se ha definido anteriormente, una base en exceso.

Bases adecuadas para la etapa (b) del método de la invención son bases inorgánicas, como por ejemplo bases del tipo MOH donde M es un metal alcalino, tales como NaOH, KOH, LiOH o mezcla de las mismas.

35

En una realización preferida la base en exceso de la etapa (b) del método de la invención es una base inorgánica, aún más preferiblemente NaOH.

5 En otra realización preferida, la base de la etapa (b) del método de la invención se añade en exceso entre 10% y 50% en peso.

El método de la invención comprende además una etapa (c) que consiste tras eliminar el exceso de base de la mezcla resultante de la etapa (b), como se ha definido anteriormente, añadir un compuesto orgánico de fórmula $X-CH_2CO-Z$ donde X es un
10 halógeno, Z es -H, -R, -COR, -OH, -OR, -OCOR, -NH₂, -NHR, -NR₂, -NHCOR, -SR o -SCOR, y donde R es una cadena alquílica lineal o ramificada.

El compuesto de fórmula $X-CH_2CO-Z$, que comprende un halógeno directamente enlazado al carbono en alfa al grupo carbonilo (CO) y el cual se encuentra a una
15 distancia exacta de dos carbonos (CH_2CO) de Z, reacciona con los grupos reactivos de la superficie de las nanopartículas (-O⁻, -OH o -HOH) formándose un enlace químico fuerte (enlace covalente) entre los mismos y que permite que el ligando se mantenga fuertemente unido a la superficie de las nanopartículas de la invención incluso en medios extremadamente ácidos.

20

El grupo Z del compuesto de fórmula $X-CH_2CO-Z$ aporta funcionalidad a la superficie de las nanopartículas de la invención, lo que permite su conjugación con otras moléculas funcionales y/o su interacción con el medio (solubilidad). En una realización preferida, Z es -H, -NH₂ o -OCOR.

25

El grupo R es una cadena alquílica lineal o ramificada. Ejemplos no limitativos de grupos R adecuados para la etapa (c) del método de la invención son -CH₃, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂CH(CH₃)₂.

30 Ejemplos no limitativos de compuestos de fórmula $X-CH_2CO-Z$ adecuados para la etapa (c) del método de la invención son 2-cloroacetamida, 2-bromoacetamida, ácido 2-cloroacético, ácido 2-bromoacético, y 2-cloroacetato de etilo, preferiblemente 2-cloroacetamida y ácido 2-cloroacético.

En una realización particular, el método de preparación de las nanopartículas como se define anteriormente comprende una etapa adicional (d) que comprende precipitar las nanopartículas obtenidas en la etapa (c). La precipitación de las nanopartículas de la etapa (d) del método de la invención se realiza preferiblemente mediante centrifugación.

En otra realización aún más particular, la etapa (d) del método de la invención comprende además lavado y secado del precipitado.

Por tanto, las nanopartículas obtenidas a través del método de la presente invención son estables en medios extremadamente ácidos, debido a que la reacción del compuesto de fórmula $X-CH_2CO-Z$ con los grupos reactivos de la superficie de las nanopartículas da lugar a un enlace covalente entre los mismos y que permite que el ligando se mantenga fuertemente unido a la superficie de las nanopartículas incluso en medios extremadamente ácidos.

Por ello, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a nanopartículas luminiscentes de *upconversion* de fórmula $M Ln F_4 : RE^{+3}$, donde M es un metal alcalino, Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo y RE^{+3} es un ión de tierras raras o combinaciones de los mismos; caracterizadas porque dichas nanopartículas comprenden ligandos orgánicos unidos a su superficie mediante enlaces covalentes, obtenibles mediante el método de preparación como se define anteriormente.

Las nanopartículas obtenibles mediante el método de preparación como se define anteriormente presentan propiedades luminiscentes de *upconversion* con emisión en el rango visible-ultravioleta-infrarrojo cercano, tras excitaciones múltiples con fotones de menor energía, en particular en el infrarrojo cercano.

Las nanopartículas obtenibles mediante el método de preparación como se define anteriormente pueden presentar estructura cúbica, hexagonal, esférica, tetragonal, romboédrica, monoclínica, triclínica o una combinación de las mismas. Las nanopartículas obtenibles mediante el método de preparación como se define anteriormente tienen preferiblemente un tamaño medio menor o igual a 500 nm, aún más preferiblemente entre alrededor de 20 nm y alrededor de 500 nm.

35

Las nanopartículas obtenibles mediante el método de preparación como se define anteriormente presentan una matriz de fórmula $M\text{LnF}_4$ dopada con iones trivalentes de tierras raras RE^{3+} o combinaciones de los mismos y donde M es un metal alcalino y Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo.

5

En una realización preferida, M es Na o Li. En otra realización preferida, RE^{3+} es Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Gd^{3+} o combinaciones de los mismos. En una realización preferida, Ln es Y.

10 Un ejemplo no limitativo de matriz de las nanopartículas de la invención es NaYF_4 dopada con Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Gd^{3+} o combinaciones de los mismos.

En una realización particular, las nanopartículas obtenibles mediante el método de preparación como se define anteriormente tienen estructura núcleo/coraza. El término

15 "estructura núcleo/coraza" se refiere a nanopartículas que comprenden un núcleo de un material interior y una coraza de un material exterior. Las nanopartículas obtenibles mediante el método de preparación como se define anteriormente con estructura núcleo/coraza pueden tener la misma o diferente composición química para el material interior del núcleo y para el material exterior de la coraza. Un ejemplo no limitativo de
20 nanopartículas obtenibles mediante el método de preparación como se define anteriormente con estructura núcleo/coraza es $\text{NaYF}_4:\text{RE}^{3+}/\text{NaYF}_4$ o $\text{NaYF}_4:\text{RE}^{3+}/\text{NaYF}_4:\text{RE}^{3+}$.

Las nanopartículas obtenibles mediante el método de preparación como se define anteriormente están caracterizadas porque comprenden además ligandos orgánicos
25 unidos covalentemente a su superficie los cuales comprenden una unidad $-\text{CH}_2\text{CO}-$. Esta unidad corta permite que los ligandos se mantengan fuertemente unidos, incluso en medios extremadamente ácidos- a la superficie de las nanopartículas obtenibles mediante el método de preparación como se define anteriormente.

30

Por ello, en una realización particular, las nanopartículas obtenibles mediante el método de preparación como se define anteriormente están caracterizadas porque comprenden ligandos orgánicos unidos a su superficie mediante enlaces covalentes resistentes a pHs fuertemente ácidos, preferiblemente a pHs entre alrededor de 1,0 y
35 alrededor de 4,0.

Además, las nanopartículas de la presente invención son estables tanto dispersas en medios acuosos u orgánicos, integradas en un material *masterbatch* o en forma de polvo fino, aportando versatilidad al dosificado y almacenaje de las mismas.

5

Adicionalmente, las nanopartículas de la presente invención poseen baja toxicidad y pueden conjugarse con moléculas bio-compatibles, lo que las hace compatibles con aplicaciones como marcador fluorescente o fotosensibilizadores, por ejemplo, de tumores, en el sector biológico o médico-farmacéutico.

10

Por ello, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de las nanopartículas luminiscentes de *upconversion* como se define anteriormente como marcadores fluorescentes o fotosensibilizadores, preferiblemente en el sector biológico o médico-farmacéutico.

15

La presente invención proporciona además un material compuesto luminiscente que comprende las nanopartículas luminiscentes de *upconversion* como se definen anteriormente.

20 En una realización preferida, el material compuesto luminiscente como se define anteriormente es transparente.

El término "transparente" se refiere a un material que deja pasar fácilmente la luz en el rango visible.

25

El término "material compuesto" se refiere a combinaciones de al menos dos tipos de materiales para conseguir la combinación de propiedades que no es posible obtener en los materiales originales. Estos materiales compuestos presentan una matriz con carácter continuo y responsable de las propiedades físicas y químicas, y una carga de carácter discreto.

30

En el material compuesto de la presente invención, y como se ha mencionado anteriormente, la combinación de ambos materiales (matriz y nanopartículas) da lugar a un efecto de sinergia ya que potencia las propiedades luminiscentes de

upconversion y de estabilidad de las nanopartículas, y proporciona un material compuesto con altas prestaciones luminiscentes de *upconversion*.

5 En una realización particular, las nanopartículas luminiscentes de *upconversion* comprendidas en el material compuesto de la presente invención presentan una capacidad emisiva de más de 100 veces respecto a las nanopartículas luminiscentes de *upconversion* originales, en una realización aún más preferida de más de 600 veces.

10 En otra realización particular, el material compuesto luminiscente de la presente invención es un material compuesto cerámico. Dicho material comprende las nanopartículas como se definen anteriormente encapsuladas en una matriz cerámica.

15 En una realización preferida, el material compuesto luminiscente de la presente invención es un material compuesto cerámico obtenible mediante un proceso de síntesis sol-gel. Por "proceso de síntesis sol-gel" se entiende aquellas rutas químicas ampliamente conocidas en el campo de la técnica de la presente invención y que comprenden la síntesis de una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido (denominada sol) y la hidrólisis y condensación de dicho sol para formar un material
20 sólido lleno de solvente (gel).

En otra realización preferida, el proceso de síntesis sol-gel que comprende las siguientes etapas:

25 i) dispersión de las nanopartículas luminiscentes de *upconversion* como se definen anteriormente en un disolvente polar que comprende un precursor de alcóxido metálico, un agente dispersante y un agente tensioactivo;

ii) adición de agua a la dispersión de la etapa (i) para dar lugar a una reacción de hidrólisis y formación de un sol;

iii) condensación del sol de la etapa (ii) dando lugar a la formación de un gel;

30 iv) envejecimiento y secado del gel obtenido en la etapa (iii) para dar lugar a un material compuesto luminiscente cerámico; y

v) densificación del material compuesto resultante de la etapa (iv) mediante tratamiento térmico.

En la etapa (i) del proceso de síntesis sol-gel de la presente invención comprende la dispersión de las nanopartículas luminiscentes de *upconversion* de la invención en un disolvente polar que comprende un precursor de alcóxido metálico, un agente dispersante y un agente tensoactivo, y opcionalmente, un agente retardante del
5 secado.

En el contexto de la presente invención, el término "agente dispersante" se refiere a un aditivo que mantiene estable la dispersión de la etapa (i) del proceso de síntesis sol-gel de la invención. Ejemplos no limitativos de agentes dispersantes adecuados para
10 el proceso de síntesis sol-gel de la presente invención son los poliacrilatos como el ácido poliacrílico.

En el contexto de la presente invención, el término "agente tensoactivo" se refiere a un aditivo que modifica la superficie de contacto entre dos fases y favorece el mojado de
15 las nanopartículas. El agente tensoactivo también incluye un agente filmógeno o nivelante como un polidimetilsiloxano modificado con poliéteres.

La dispersión de la etapa (i) se obtiene empleando procesos de alta velocidad de cizalla. Ejemplos no limitativos de dispersión de alta velocidad de cizalla adecuados
20 para la etapa (i) del proceso de síntesis sol-gel de la presente invención son dispersión tipo Cowless, dispersión empleando sistemas rotor-estator o sistemas como molienda por atricción con microbolas. Los medios empleados deben ser eficaces para favorecer que las nanopartículas estén dispersas en el medio y en caso de existir aglomerados, estos deben estar dentro de un tamaño inferior a 200 nm.

25 En una realización preferida, el disolvente polar es un alcohol o mezcla de alcoholes, preferiblemente un alcohol primario o mezcla de alcoholes primarios.

En otra realización preferida, las nanopartículas luminiscentes de *upconversion* de la
30 etapa (i) se dispersan en una concentración entre el 0,1% y el 10% en peso, preferiblemente alrededor de 4% en peso.

En el contexto de la presente invención, por "alcóxido metálico" se entiende un compuesto químico que comprende un átomo metálico M unido al menos a un grupo
35 orgánico a través de un átomo de oxígeno (M-OR). El alcóxido metálico se forma *in*

situ o *ex situ* a partir de un precursor de tipo inorgánico como pueden ser nitratos, cloruros o percloratos metálicos, o de tipo orgánico como acetatos o acetilacetatos. Ejemplos de alcóxidos metálicos no limitativos adecuados para el proceso de síntesis sol-gel de la presente invención cuando el metal es por ejemplo silicio son tetraetil
5 ortosilicato (TEOS), metiltrietoxisilano (MTES), metiltrimetoxisilano, 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano o viniltrietoxisilano.

Dependiendo de las características deseadas para el material compuesto final, el proceso de síntesis sol-gel se realiza por vía ácida, preferiblemente empleando un
10 precursor de alcóxido de silicio, como por ejemplo cloruro de silicio, o bien por vía básica, preferiblemente empleando un precursor de alcóxido de zinc, como por ejemplo acetato de zinc. La naturaleza del alcóxido determinará el rango de pH en el que tendrá lugar la condensación del sol y formación del gel (etapa (Ni)).

15 La dispersión de la etapa (i) del proceso de síntesis sol-gel de la presente invención puede comprender opcionalmente un agente retardante del secado.

En ausencia de indicaciones de lo contrario, los componentes de la dispersión de la etapa (i) listados son ampliamente conocidos por el experto en la materia para los
20 procesos de síntesis sol-gel y pueden ser de tipo orgánico o inorgánico.

El proceso de síntesis sol-gel de la presente invención comprende además una etapa (ii) de adición de agua a la dispersión de la etapa (i) para dar lugar a una reacción de hidrólisis y formación de un sol.
25

En una realización particular, la etapa (ii) comprende además la adición de un catalizador que acelera la reacción de hidrólisis. Ejemplos no limitativos de catalizadores adecuados para el proceso de síntesis sol-gel de la presente invención son de tipo inorgánico, como por ejemplo ácido clorhídrico, y de tipo orgánico, como
30 por ejemplo etanolamina.

El proceso de síntesis sol-gel de la presente invención comprende además una etapa (iii) de condensación del sol de la etapa (ii) dando lugar a la formación un gel. El gel obtenido
35 actúa como elemento encapsulante de las nanopartículas luminiscentes de

upconversion de la presente invención de forma que impide la agregación de las mismas.

5 En una realización particular, la formación del gel en la etapa (iii) tiene lugar a un pH entre ≤ 6 y ≥ 2 . El pH puede determinarse mediante la naturaleza ácida o básica del alcóxido metálico empleado en la etapa (i) como se ha definido anteriormente.

El proceso de síntesis sol-gel de la presente invención comprende además una etapa (iv) de envejecimiento del gel obtenido en la etapa (iii).

10

El envejecimiento del gel favorece la homogeneidad del mismo. Un ejemplo no limitativo de envejecimiento de un gel obtenido en la etapa (iii) es el uso de un acetato de cinc como precursor del alcóxido metálico mediante calentamiento a 60 °C durante 72 horas en un matraz cerrado para favorecer los procesos de hidrólisis y condensación de los cationes de Zn(II).

15

La etapa (iv) del proceso de síntesis sol-gel de la presente invención comprende además secado del gel envejecido para la eliminación del disolvente dando lugar a un material compuesto luminiscente, y que comprende tratamiento térmico del mismo en un rango de temperaturas comprendido entre 30 °C y 200 °C. Este proceso se lleva a cabo, por ejemplo, en una estufa a 60 °C durante 24 horas en una bandeja de cristalización.

20

El proceso de síntesis sol-gel de la presente invención comprende además una etapa (v) de densificación del material compuesto cerámico resultante de la etapa (iv) mediante tratamiento térmico eliminando los residuos orgánicos de los precursores. El tratamiento térmico se lleva a cabo a una temperatura entre 300 °C y 600 °C con un tiempo de residencia entre 0,1 a 24 horas.

25

30 En una realización particular, el proceso de síntesis sol-gel de la presente invención comprende además una etapa (vi) de acondicionado del material compuesto resultante mediante molienda para obtener un tamaño de partícula en un rango de tamaños deseado. Un ejemplo no limitativo consiste en molturar en seco en un molino de mezclado empleando bolas de zircona estabilizada de 1 mm de diámetro durante 30 minutos para obtener un material pulverulento consistente en nanopartículas

35

luminiscentes de la invención dispersas en una matriz sol-gel densificada con un tamaño promedio donde el 90% de las partículas presenten un tamaño inferior a 10 μm .

- 5 En una realización particular, el material compuesto luminiscente de la invención posee alta resistencia a agentes químicos y estabilidad térmica, preferiblemente a temperaturas $\geq 400^\circ\text{C}$. Estas propiedades permiten su aplicación como marcadores de seguridad formando parte de pinturas, en la preparación de materiales cerámicos funcionales o formando parte de recubrimiento de grandes superficies. En otra
- 10 realización preferida, el material compuesto luminiscente es incoloro, lo que permite su aplicación como marcador de autenticación o de calidad en sectores como el sector del papel, envase o textil.

- Por tanto, un aspecto final de la presente invención se refiere al uso del material
- 15 compuesto luminiscente como se define anteriormente en los sectores de papel, plástico, envase, textil, automovilístico, biológico, médico-farmacéutico, seguridad documental, trazadores, pigmentos cerámicos, optoelectrónica o fotovoltaico.

Ejemplos

- 20 La primera parte de la sección experimental (Ejemplos 1 a 3) se refiere a la preparación de las nanopartículas de la presente invención. La segunda parte de la sección experimental (Ejemplos 4 a 7) se refiere a la evaluación de la estabilidad del enlace del ligando a la superficie de la nanopartículas de la presente invención en medios ácidos, lo que es de interés entre otras aplicaciones, para su encapsulamiento
- 25 sol-gel. La tercera parte de la sección experimental (Ejemplos 8 y 9) se refiere a la preparación del material compuesto de la presente invención.

Ejemplo 1: Síntesis de nanopartículas $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ pasivadas con oleato (UCNP@oleato)

- 30 Se sintetizaron nanopartículas de $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ siguiendo el proceso descrito en Francés-Soriano *et al.* (*Nanoscale* 2015, 7, 5140 - 5146). En particular, una mezcla de 0,8 mmol de $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,18 mmol de $\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,02 mmol de $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,02 mmol), 12 mL de ácido oleico y 15 mL de octadeceno (ODE) se calentó a 160°C en un matraz de 50 mL y agitación continua. Tras la disolución de las sales de lantánido
- 35 (ca. 30 minutos), la mezcla se enfrió a unos 110°C y entonces se adicionaron

lentamente 10 ml_ de una disolución de metanol, NaOH (2,5 mmol) y NH_4F (4,0 mmol). La mezcla se desgasificó a 100 °C durante 30 min y agitación continuada. Finalmente la mezcla se calentó a 305 °C bajo atmósfera de N_2 durante 1h. Posteriormente, la solución se enfrió a temperatura ambiente y las nanopartículas precipitaron mediante
5 centrifugación (10000 rpm, 10 min, 25 °C). Las nanopartículas pasivadas con oleato se lavaron tres veces con soluciones de (43,5:40,5:16 v/v) hexano/acetona/metanol.

Ejemplo 2: Síntesis de nanopartículas $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ desnudas (UCNP_{na^{ked}})

Las nanopartículas $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ desnudas se prepararon siguiendo el
10 procedimiento de Capobianco *et al.* (*Nano Lett.* 2011, 11, 835-840). En particular, 100 mg de UCNP@oleato se dispersaron en 10 mL de HCl acuoso a pH 4. La mezcla se agitó durante 2 h y la disolución se mantuvo a pH 4 adicionando HCl 0,1 M. Se eliminó el ácido oleico mediante extracción con éter dietílico (3 veces). Se juntaron todas las fases etéreas y se realizó una re-extracción con agua. Se combinó ácido oleico con
15 todas las fases acuosas y se re-extrajo con éter dietílico. Las UCNP_{na^{ked}} se recuperaron de la fase acuosa por precipitación con acetona seguida de centrifugación (10000 rpm, 15 min, 25 °C). El precipitado se lavó tres veces con acetona y se re-precipitaron por centrifugación. Finalmente las UCNP_{na^{ked}} se dispersaron en agua Milli Q.

20

Ejemplo 3: Síntesis de nanopartículas $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ pasivadas con 2-cloroacetamida (UCNP@ligando_{2-cloroacetamida})

Las nanopartículas UCNP_{na^{ked}} se dispersaron en DMF, se basificó el medio con hidróxido sódico, y tras la separación del exceso de NaOH, se adicionó el ligando 2-
25 cloroacetamida sólido a la disolución coloidal. Tras 48h de agitación, se indujo la precipitación de las nanopartículas pasivadas (UCNP@ligando_{2-cloroacetamida}) por centrifugación, el sólido se lavó varias veces y finalmente se secó.

Ejemplo 4: Síntesis de nanopartículas $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ pasivadas con ácido 2-cloroacético (UCNP@ligando_{2-cloroacético})

Las nanopartículas UCNP_{na^{ked}} se dispersaron en DMF, se basificó el medio con hidróxido sódico, y tras la separación del exceso de NaOH, se adicionó el ligando 2-
30 cloro-acético sólido a la disolución coloidal. Tras 48h de agitación, se indujo la precipitación de las nanopartículas pasivadas (UCNP@ligando_{2-cloro-acético}) por centrifugación, el sólido se lavó varias veces y finalmente se secó.

Ejemplo 5: Estabilidad de UCNP@ligando 2-cloroacetamida en medio ácido

Se obtuvieron los espectros de FTIR (*Fourier transform infrared spectroscopy*) para las nanopartículas UCNP@ligando 2-cloroacetamida (Figura 1) preparadas según se describe en el Ejemplo 3, y después de 5 y 48 horas en disolución acuosa a pH 2. Así, las nanopartículas UCNP@ligando 2-cloroacetamida mostraron una variación insignificante de sus propiedades emisivas cuando se mantienen dispersas en agua a pH 2 durante 48 horas, como se puede confirmar en la Figura 2b. Posteriormente, las nanopartículas UCNP@ligando 2-cloroacetamida se precipitaron mediante basificación hasta pH neutro por adición de NaOH y centrifugación, se lavaron con agua y se secaron. El análisis de las mismas por FTIR (Figura 1) demuestra que el ligando orgánico no se descoordina de las nanopartículas UCNP@ligando 2-cloroacetamida y sus propiedades emisivas se mantienen sin cambios (Figura a-d2).

Ejemplo 6: Caracterización XPS de las nanopartículas UCNP@ligando 2-cloroacetamida.

Para la comparación del ligando libre y unido, se obtuvieron los espectros XPS C_{1s} para las nanopartículas UCNP@ligando 2-cloroacetamida (Figura 3, abajo) preparadas según lo descrito en el Ejemplo 3 y para el ligando libre de partida, esto es, 2-cloroacetamida (Figura 3, arriba). También se obtuvieron los espectros XPS N_{1s} para las nanopartículas UCNP@ligando 2-cloroacetamida (Figura 4, abajo) preparadas según lo descrito en el Ejemplo 3 y para el compuesto orgánico de partida 2-cloroacetamida (Figura 4, arriba).

Cabe destacar los importantes cambios en los valores de energía del C_{1s} y N_{1s} entre el compuesto orgánico de partida 2-cloroacetamida y el ligando orgánico de UCNP@ligando 2-cloroacetamida. Estos desplazamientos son consistentes con una reacción química entre el compuesto orgánico de partida 2-cloroacetamida y la superficie de la nanopartícula lo que permite la permanencia del ligando sobre la superficie de la nanopartícula en medios fuertemente ácidos.

Sin embargo, los espectros XPS C_{1s} para las nanopartículas UCNP@oleato conocidas en el estado de la técnica y preparadas según el Ejemplo 1, muestran pequeños cambios en relación con el ácido oleico libre. Este hecho se observa también para diferentes ácidos carboxílicos, como por ejemplo, ácido decanoico o ácido dodecanodioico (Liu Y. *et al. Nanoscale* 2011, 3, 4804) y demuestra que el ligando queda adsorbido sobre la superficie de la nanopartícula a través del grupo carboxilato.

La pequeña variación de energía del grupo funcional que queda adsorbido sobre la superficie de la nanopartícula es un hecho general para las nanopartículas descritas en el estado de la técnica como muestra por ejemplo el espectro XPS N_{1s} de la oleilamina libre que interacciona con la nanopartícula por el grupo amino y presenta un valor de ca. 400 eV en ambos casos, libre y coordinado (Goel, V. Thesis 2011, McGill University, Montreal).

Ejemplo 7: Caracterización XPS de las nanopartículas UCNP @ligando_{2-cloroacético}.

Similarmente al Ejemplo 6, se obtuvieron, para su comparación, los espectros XPS C_{1s} para las nanopartículas UCNP@ligando_{2-cloroacético} (Figura 5, abajo) preparadas según lo descrito en el Ejemplo 4 y para el compuesto orgánico de partida 2-cloroacético (Figura 5, arriba). También se obtuvieron los espectros XPS O_{1s} para las nanopartículas UCNP@ligando_{2-cloroacético} (Figura 6, abajo) preparadas según lo descrito en el Ejemplo 4 y para el compuesto orgánico de partida ácido 2-cloroacético (Figura 6, arriba).

Cabe destacar los importantes cambios en los valores de energía del C_{1s} y del O_{1s} entre el compuesto orgánico de partida 2-cloroacético y el ligando orgánico de la nanopartícula UCNP@ligando_{2-cloroacético}. Al igual que para el Ejemplo 6, este desplazamiento es consistente con una reacción química entre el compuesto orgánico de partida 2-cloroacético y la superficie de la nanopartícula, lo que permite la permanencia del ligando sobre la superficie de la nanopartícula en medios fuertemente ácidos.

Ejemplo 8: Preparación de un material compuesto incoloro transparente por encapsulamiento sol-gel en medio ácido de nanopartículas UCNP @ligando_{2-cloroacetamida}.

Para el encapsulamiento de nanopartículas UCNP@ligando_{2-cloroacetamida} se preparó un sol-gel de sílice de manera que el pigmento quedó en disolución con EtOH en una concentración del 0,6 g/L.

300 mg nanopartículas UCNP@ligando_{2-cloroacetamida} se añadieron a 50ml_ EtOH con agitación y se dejaron homogeneizar durante unos minutos. Seguidamente se añadieron 24 ml_ de TEOS y a continuación se añadieron 7,2 ml_ de agua desionizada, gota a gota para favorecer la mezcla del TEOS con el agua y permitir que se produzcan las reacciones de hidrólisis. Finalmente se incorporaron el ácido clorhídrico (< 0,1 ml_) también gota a gota hasta alcanzar un pH de aproximadamente 4. Se dejó

agitar durante al menos 1h. La disolución resultante se dejó únicamente secar a temperatura ambiente durante 48h. Se obtuvieron aproximadamente unos 7,5 g de polvo. La relación obtenida de UCNP@ligando _{2-cloroacetamida}/sol-gel fue de 1/25 dando una emisión de color verde (Figura 7). La comparación de la emisión de 1 mg de UCNP@ligando _{2-cloroacetamida} y la de 1 mg del material compuesto demostró que el material compuesto es unas 25 veces más emisivo. De aquí se deduce que el tratamiento sol-gel incrementó la capacidad emisiva de las UCNPs en unas 625 veces.

Ejemplo 9: Preparación de un material compuesto mediante un proceso de síntesis sol-gel en medio básico con partículas UCNP@ligando _{2-cloroacetamida}.

Para el encapsulamiento de nanopartículas de UCNP@ligando _{2-cloroacetamida} se llevó a cabo un sol-gel en un medio básico, utilizando un precursor de Zn.

Se añadieron 7,5 g de acetato de Zinc en 50 mL de etanol en agitación adicionando 20 mg de nanopartículas y se dejó homogeneizar durante un par de minutos hasta que el acetato quedó disuelto en el alcohol. Seguidamente se añadió la dispersión de nanopartículas y se agitó durante al menos 2 minutos. A continuación, se añadió 3 mL de etanolamina gota a gota para favorecer la mezcla con el etanol y permitir que se produzcan las reacciones con el acetato de Zinc. La etanolamina actúa como catalizador y estabilizador de la solución. Una vez añadida la etanolamina, la disolución debe tener un pH de 7 o mayor. Se dejó agitar durante al menos 1h. La disolución resultante se dejó secar a temperatura ambiente durante 48 h hasta que se evaporó la mayor parte del etanol. Después de este tiempo se obtuvo un líquido muy viscoso, que se trató térmicamente a 300 °C para que se formara la estructura del ZnO durante 1 hora para una mayor cristalinidad y eliminación de residuos. Tras el tratamiento térmico se obtuvieron aproximadamente unos 2,8 g de polvo con emisión de color rosado.

REIVINDICACIONES

1. Nanopartículas luminiscentes de *upconversion* de fórmula $MLnF_4:RE^{+3}$, donde M es un metal alcalino, Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo y RE^{+3} es un ión de tierras raras o combinaciones de los mismos; caracterizadas porque dichas nanopartículas comprenden ligandos orgánicos unidos a su superficie mediante enlaces covalentes.
2. Nanopartículas según la reivindicación 1, donde los ligandos orgánicos unidos a su superficie mediante enlaces covalentes comprenden una unidad $-CH_2CO-$.
3. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, con un tamaño medio <500 nm.
4. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde las nanopartículas tienen estructura núcleo/coraza.
5. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde M es Na o Li.
6. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde RE^{3+} es Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Gd^{3+} o combinaciones de los mismos.
7. Método de preparación de nanopartículas luminiscentes de *upconversion* de fórmula $MLnF_4:RE^{+3}$, donde M es un metal alcalino, Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo y RE^{+3} es un ión de tierras raras o combinaciones de los mismos; caracterizadas porque dichas nanopartículas comprenden ligandos orgánicos unidos a su superficie mediante enlaces covalentes, que comprende las etapas de:
 - a) añadir a un disolvente polar nanopartículas precursoras de fórmula $MLnF_4:RE^{+3}$, donde M es un metal alcalino, Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo y RE^{+3} es un ión de tierras raras o combinaciones de los mismos; caracterizadas porque dichas nanopartículas comprenden grupos $-O^-$, $-OH$, $-HOH$ o combinaciones de los mismos en su superficie;
 - b) añadir sobre la mezcla resultante de la etapa (a) una base en exceso; y

c) tras eliminar el exceso de base de la mezcla resultante de la etapa (b), añadir un compuesto de fórmula $X-CH_2CO-Z$ donde X es un halógeno, Z es -H, -R, -COR, -OH, -OCOR, $-NH_2$, -NHR, $-NR_2$, -NHCOR, -SR o -SCOR, y R es una cadena alquílica lineal o ramificada.

5

8. Método de preparación de las nanopartículas según la reivindicación 7, donde el disolvente polar de la etapa (a) es dimetilformamida, acetonitrilo, tetrahidrofurano o mezcla de los mismos.

10 9. Método de preparación de las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, donde la etapa (a) tiene lugar a una temperatura desde alrededor de 25 °C a alrededor de 80 °C.

15 10. Método de preparación de las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde la base en exceso de la etapa (b) es una base inorgánica, preferiblemente NaOH.

20 11. Método de preparación de las nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde Z es -H, $-NH_2$ o -OCOR en el compuesto de la etapa (c) de fórmula $X-CH_2CO-Z$.

25 12. Método de preparación de las nanopartículas según la reivindicación 11, donde el compuesto de fórmula $X-CH_2CO-Z$ de la etapa (c) es 2-cloroacetamida o ácido 2-cloroacético.

25

30 13. Nanopartículas luminiscentes de *upconversion* de fórmula $M LnF_4 \cdot RE^{+3}$, donde M es un metal alcalino, Ln es un elemento lantánido o un análogo del mismo y RE^{+3} es un ión de tierras raras o combinaciones de los mismos; y que comprenden ligandos orgánicos unidos a su superficie mediante enlaces covalentes, obtenibles mediante el método de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12.

14. Uso de las nanopartículas luminiscentes de *upconversion* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 13 como marcadores fluorescentes o fotosensibilizadores.

35 15. Uso de las nanopartículas luminiscentes de *upconversion* según la reivindicación 14 en el sector biológico o médico-farmacéutico.

16. Material compuesto luminiscente que comprende las nanopartículas luminiscentes de *upconversion* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 13.
- 5 17. Material compuesto luminiscente según la reivindicación 16, donde el material compuesto es cerámico.
18. Material compuesto luminiscente según cualquiera de las reivindicaciones 16 y 17, donde el material compuesto es transparente.
- 10 19. Material compuesto luminiscente según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, obtenible mediante un proceso de síntesis sol-gel.
20. Uso del material compuesto luminiscente según cualquiera de las reivindicaciones 15 16 a 19 como marcador fluorescente o fotosensibilizador.
21. Uso del material compuesto luminiscente según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20 en los sectores de papel, plástico envase, textil, automovilístico, biológico, médico-farmacéutico, seguridad documental, trazadores, pigmentos cerámicos, 20 optoelectrónica o fotovoltaico.

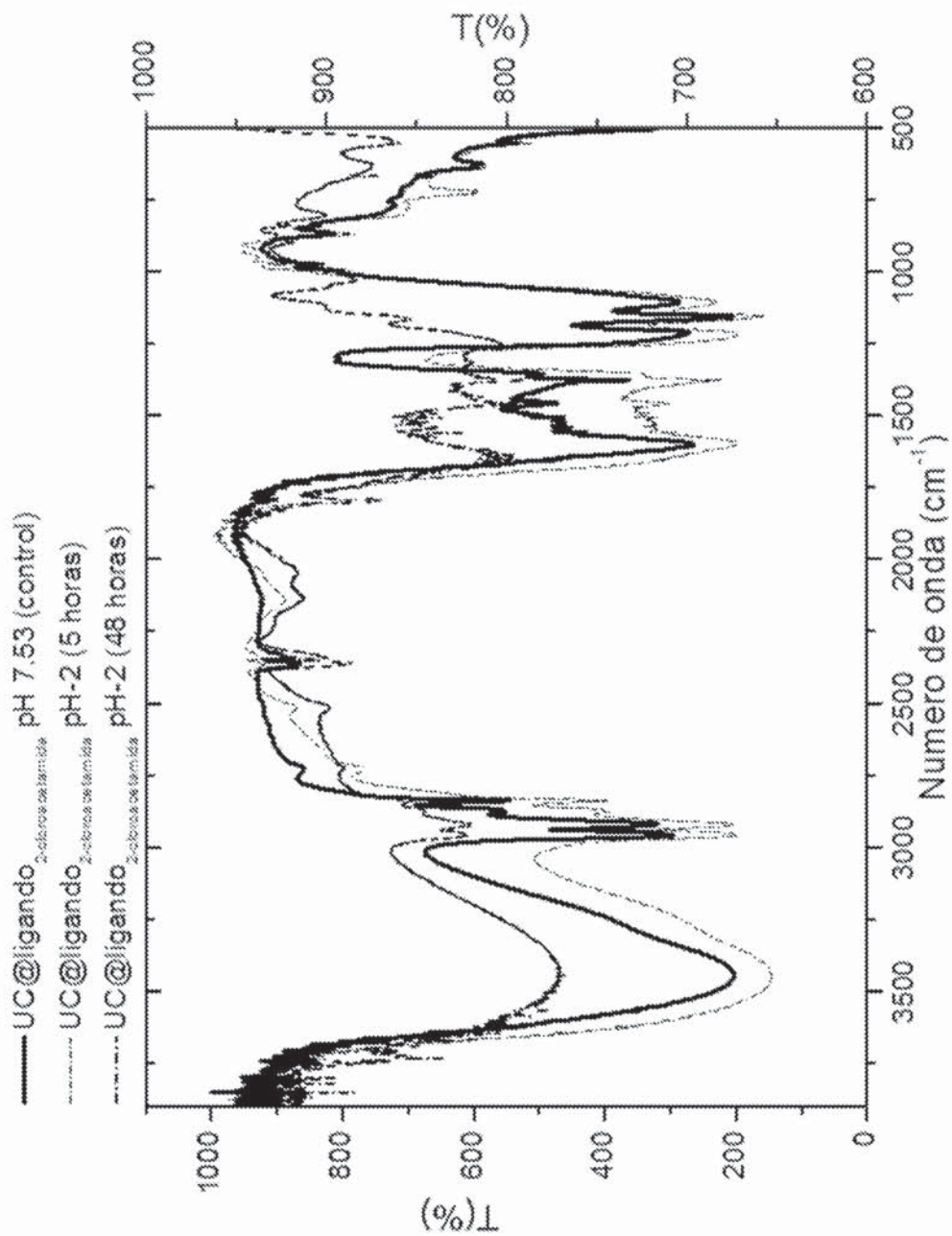


Figura 1

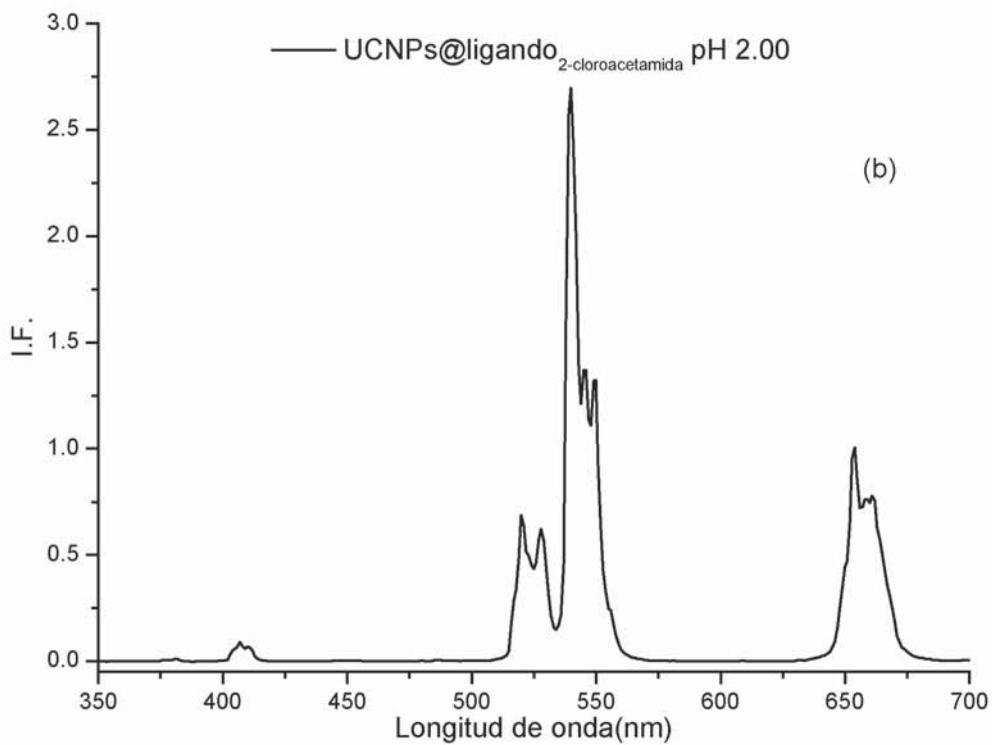
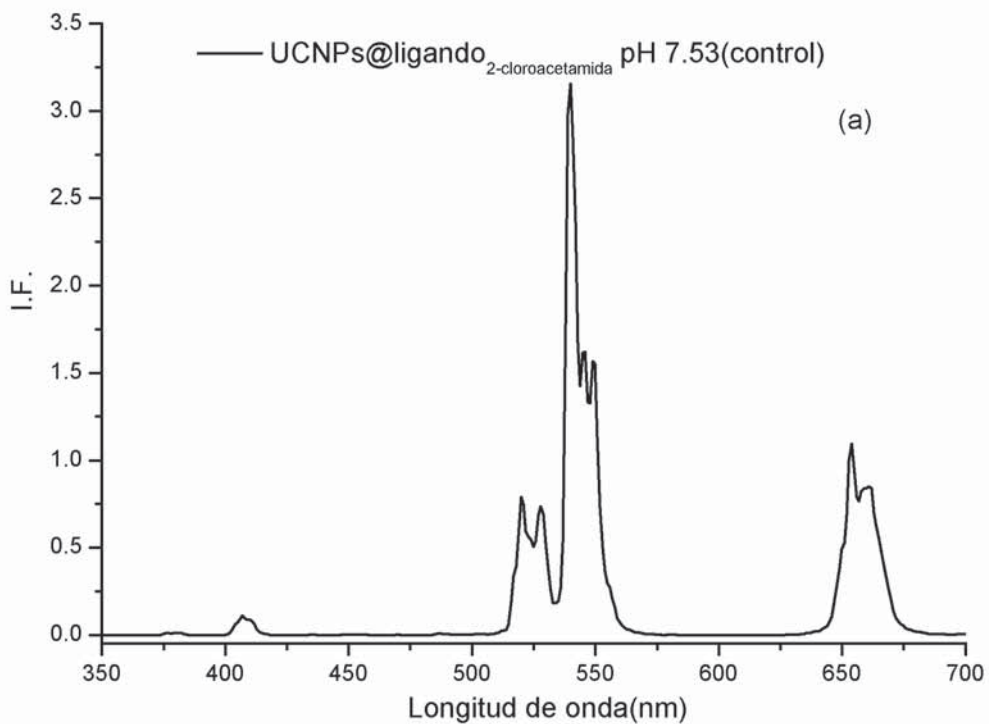


Figura 2

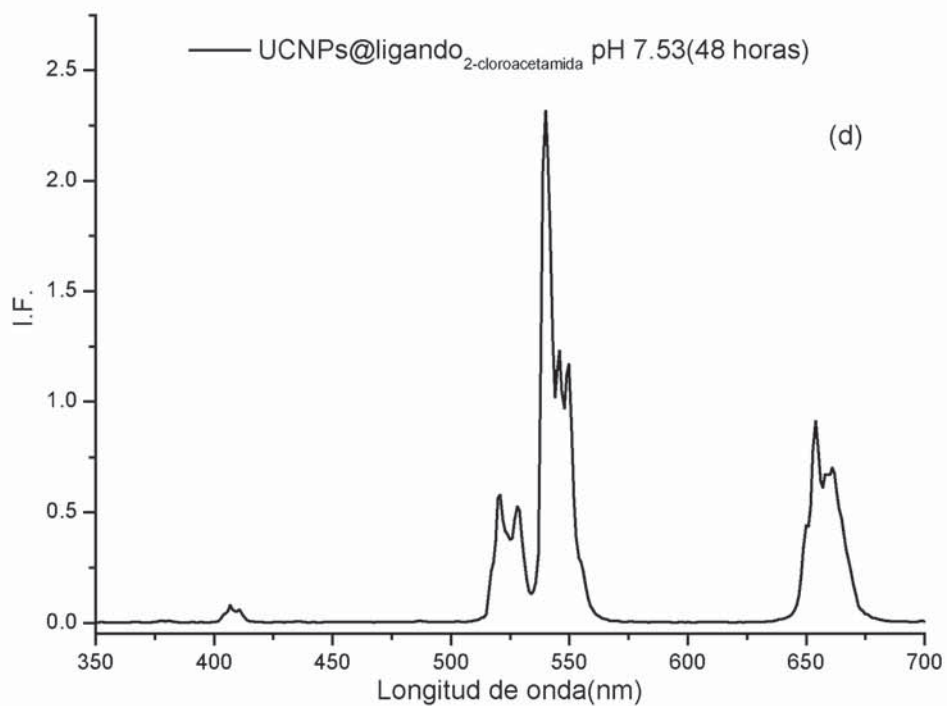
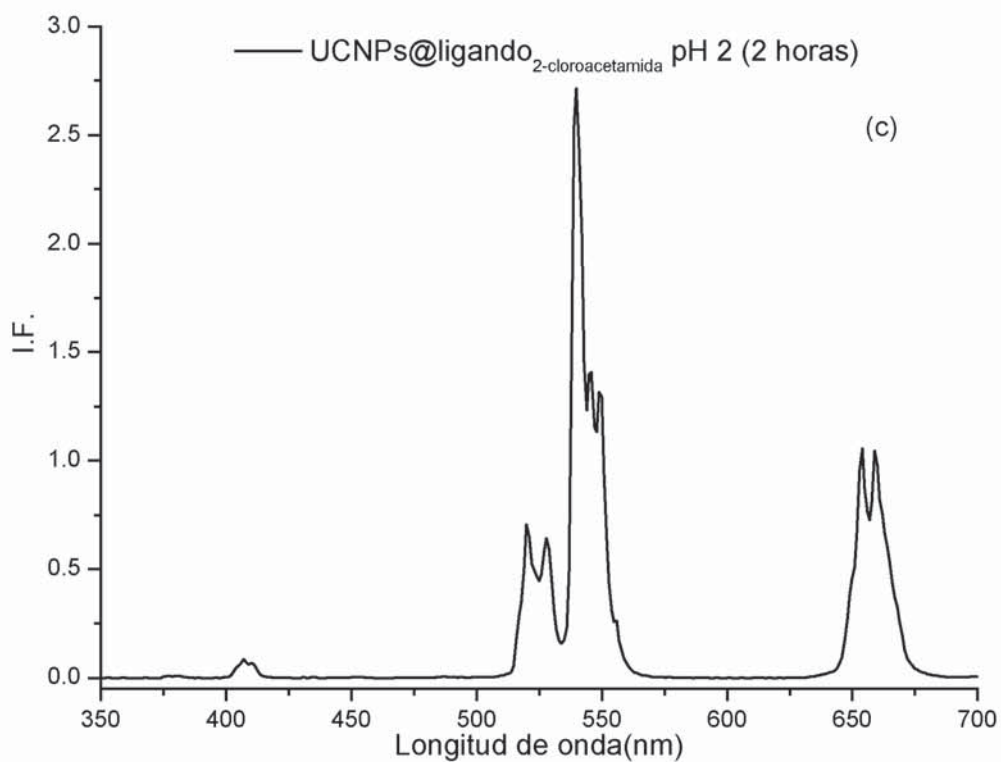


Figura 2 (cont.)

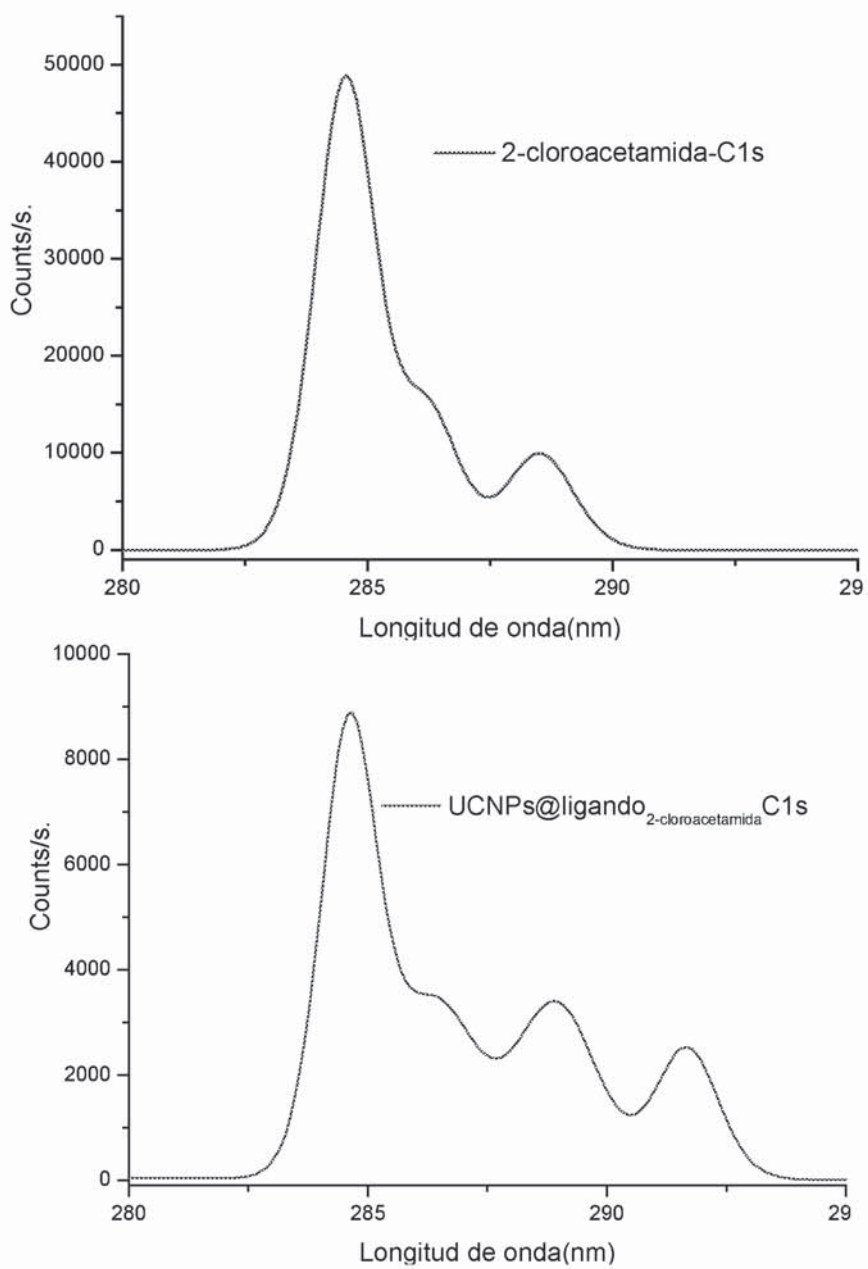


Figura 3

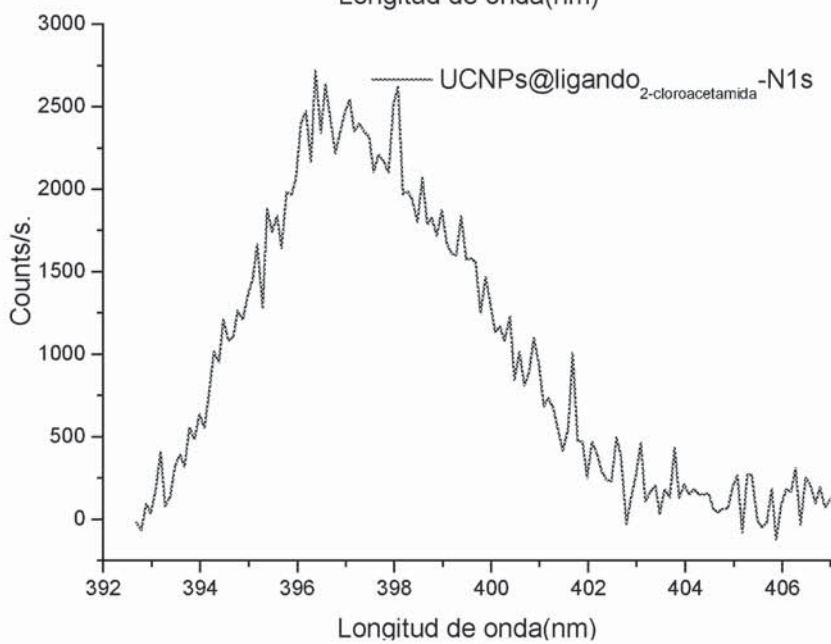
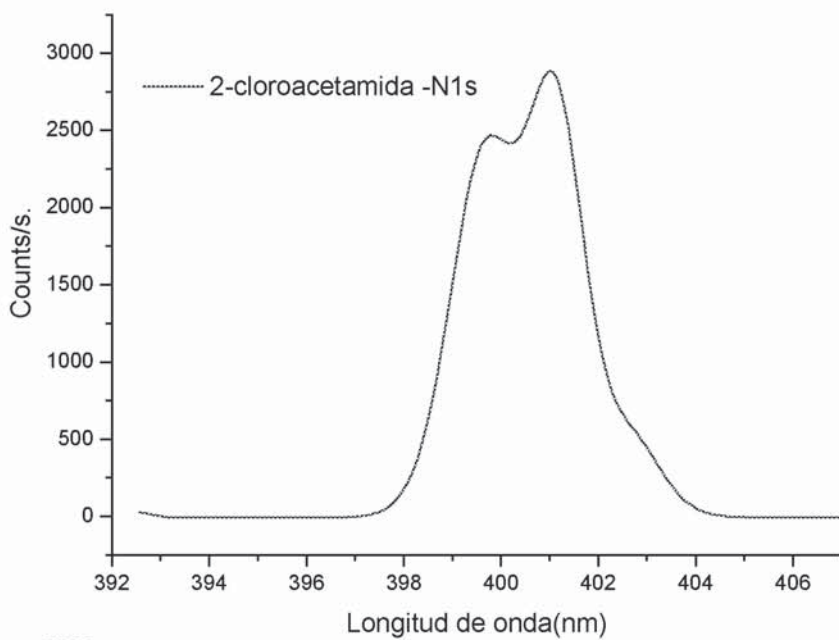


Figura 4

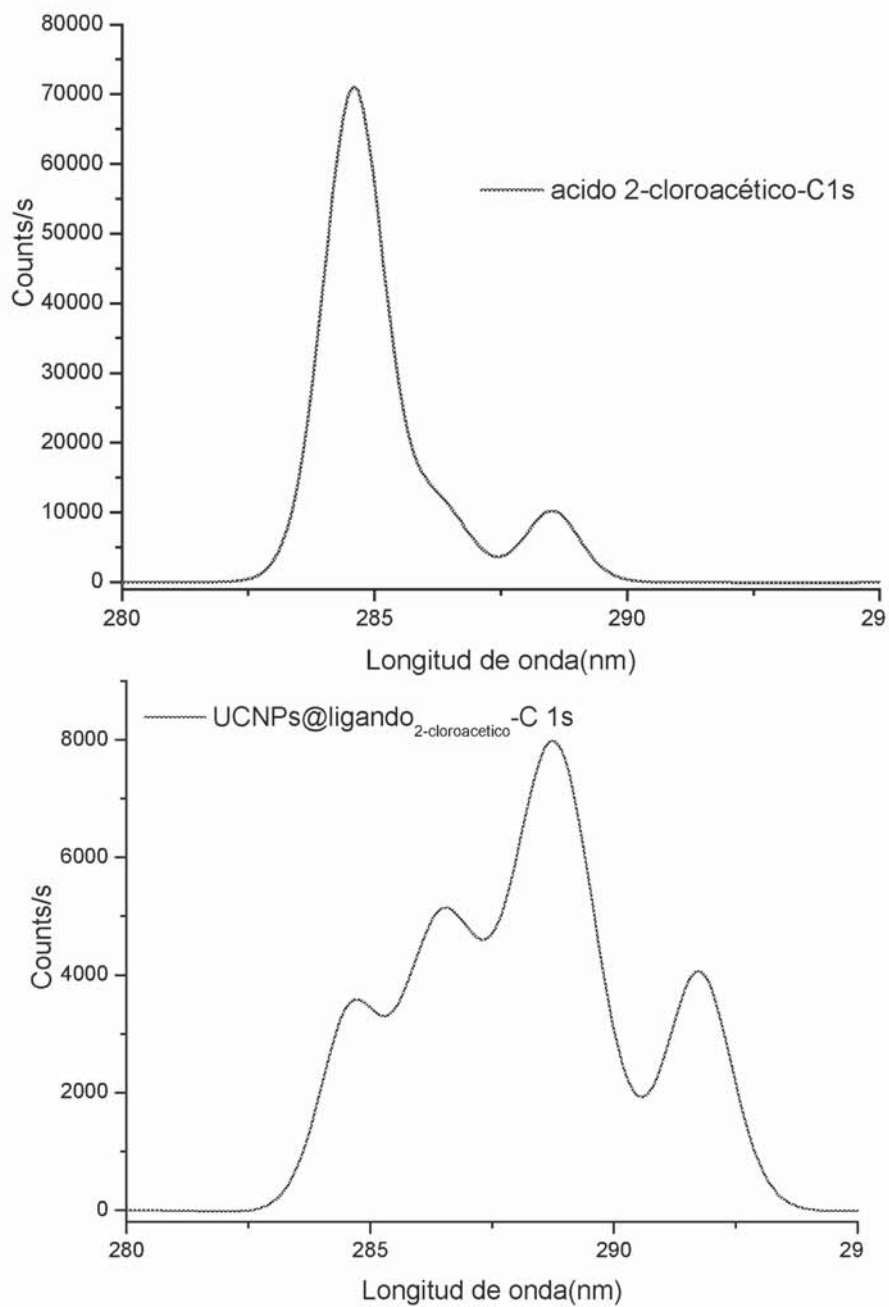


Figura 5

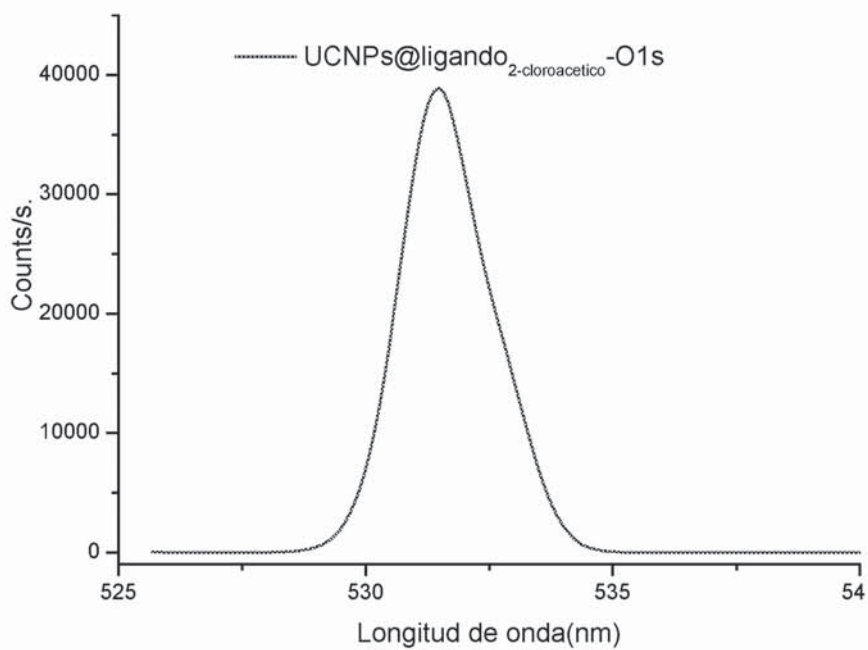
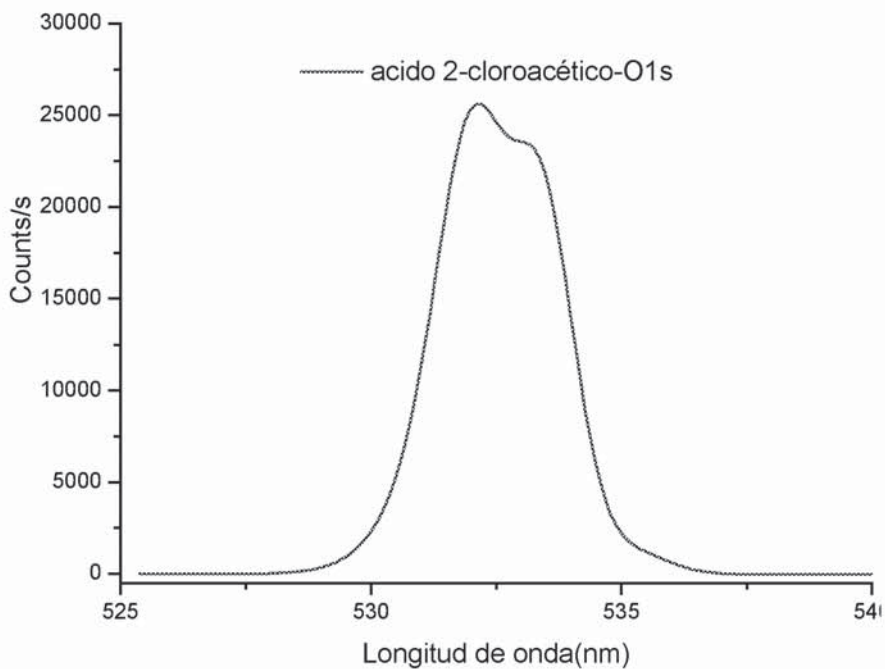


Figura 6

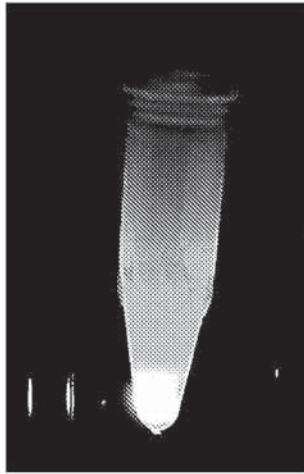


Figura 7

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ES2017/070474

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Inv. C09 k1 1/02 C09 k1 1/85

ADD.

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C09 K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EP^Q-Internal, W^PI Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría ^{1*}	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	WO 201 5/1 02535 AI (UNIV SINGAPORE [SG]) 9 de julio de 2015 (2015-07-09) párrafo [031 -]; reivindicaciones 1-18 -----	1-21
X	W0 2008/0481 90 AI (UNIV SINGAPORE [SG] ; ZHANG YONG [SG] ; LI ZHENQUAN [SG]) 24 de abril de 2008 (2008-04-24) página 43, línea 15 - línea 25; reivindicaciones 1-60; ejemplo 3 -----	1-7, 13-21
A	EP 1 431 352 AI (NANOSOLUTIONS GMBH [DE]) 23 de junio de 2004 (2004-06-23) párrafos [0029] - [0101]; reivindicaciones 1-20 -----	8-12
X	EP 1 431 352 AI (NANOSOLUTIONS GMBH [DE]) 23 de junio de 2004 (2004-06-23) párrafos [0029] - [0101]; reivindicaciones 1-20 -----	1-21
X	W0 2009/054946 AI (LOS ALAMOS NAT SECURITY LLC [US]; MUENCHHAUSEN ROSS EDWARD [US]; MCKIGN) 30 de abril de 2009 (2009-04-30) resumen; reivindicaciones 1-20 -----	1-6, 13-21
A	----- -/--	7-12

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 16 de noviembre de 2017	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 27/ 11/20 17
---	--

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado Kbvecs, Monika
N° de fax 254	N° de teléfono

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	WO 201 4/1 16631 AI (UNIV MASSACHUSETTS MEDICAL [US]) 31 de julio de 2014 (2014-07-31) reivindicaciones 1-59 -----	1-6, 13-21 7-12
A	US 201 6/1 22635 AI (LIU XIAOGANG [SG] ET AL) 5 de mayo de 2016 (2016-05-05) reivindicaciones 1-20 -----	1-21
A	US 201 4/261 031 AI (KELLAR JON [US] ET AL) 18 de septiembre de 2014 (2014-09-18) reivindicaciones 1-20 -----	1-21

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES2017/070474

Wo	2015102535	Al	09-07 -2015	CN	105939708	A	14-09 -2016
				SG	11201605521T	A	30-08 -2016
				US	2017000887	Al	05-01 -2017
				wo	2015102535	Al	09-07 -2015

Wo	2008048190	Al	24-04 -2008	SG	175647	Al	28-11 -2011
				US	RE43944	E	29-01 -2013
				US	2011127445	Al	02-06 -2011
				wo	2008048190	Al	24-04 -2008

EP	1431352	Al	23-06 -2004	DE	60226258	T2	28-05 -2009
				EP	1431352	Al	23-06 -2004

Wo	2009054946	Al	30-04 -2009	us	2009302195	Al	10-12 -2009
				wo	2009054946	Al	30-04 -2009

Wo	2014116631	Al	31-07 -2014	us	2015362432	Al	17-12 -2015
				wo	2014116631	Al	31-07 -2014

us	2016122635	Al	05-05 -2016	NINGUNA			

us	2014261031	Al	18-09 -2014	us	2014261031	Al	18-09 -2014
				wo	2015137995	Al	17-09 -2015

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2017/070474

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C09K11/02 C09K11/85
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C09K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal , WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Wo 2015/102535 AI (UNIV SINGAPORE [SG]) 9 July 2015 (2015-07-09) paragraph [031-] ; claims 1-18 -----	1-21
X	Wo 2008/048190 AI (UNIV SINGAPORE [SG] ; ZHANG YONG [SG] ; LI ZHENGQUAN [SG]) 24 April 2008 (2008-04-24)	1-7 , 13-21
A	page 43, line 15 - line 25; claims 1-60; example 3 -----	8-12
X	EP 1 431 352 AI (NANOSOLUTIONS GMBH [DE]) 23 June 2004 (2004-06-23) paragraphs [0029] - [0101] ; claims 1-20 -----	1-21
X	wo 2009/054946 AI (LOS ALAMOS NAT SECURITY LLC [US] ; MUENCHHAUSEN ROSS EDWARD [US] ; MCKIGN) 30 April 2009 (2009-04-30)	1-6, 13-21
A	abstract; claims 1-20 -----	7-12
-/-- -		

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 16 November 2017	Date of mailing of the international search report 27/11/2017
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Kbvecs , Moni ka
--	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2017/070474

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Wo 2014/116631 AI (UNIV MASSACHUSETTS MEDICAL [US]) 31 July 2014 (2014-07-31)	1-6, 13-21
A	cl aims 1-59	7-12

A	us 2016/122635 AI (LIU XIAOGANG [SG] ET AL) 5 May 2016 (2016-05-05)	1-21
	cl aims 1-20	

A	us 2014/261031 AI (KELLAR JON [US] ET AL) 18 September 2014 (2014-09-18)	1-21
	cl aims 1-20	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2017/070474

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2015102535	A1	09-07-2015	CN 105939708 A	14-09-2016
			SG 11201605521T A	30-08-2016
			US 2017000887 A1	05-01-2017
			WO 2015102535 A1	09-07-2015

WO 2008048190	A1	24-04-2008	SG 175647 A1	28-11-2011
			US RE43944 E	29-01-2013
			US 2011127445 A1	02-06-2011
			WO 2008048190 A1	24-04-2008

EP 1431352	A1	23-06-2004	DE 60226258 T2	28-05-2009
			EP 1431352 A1	23-06-2004

WO 2009054946	A1	30-04-2009	US 2009302195 A1	10-12-2009
			WO 2009054946 A1	30-04-2009

WO 2014116631	A1	31-07-2014	US 2015362432 A1	17-12-2015
			WO 2014116631 A1	31-07-2014

US 2016122635	A1	05-05-2016	NONE	

US 2014261031	A1	18-09-2014	US 2014261031 A1	18-09-2014
			WO 2015137995 A1	17-09-2015
