



FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**PRINCIPIOS DE FLUORESCENCIA**

Autor: Luis Alfonso Escudero Ballesteros

Profesor: D. Jorge Rubio Retama

Convocatoria: Julio 2018

# ÍNDICE

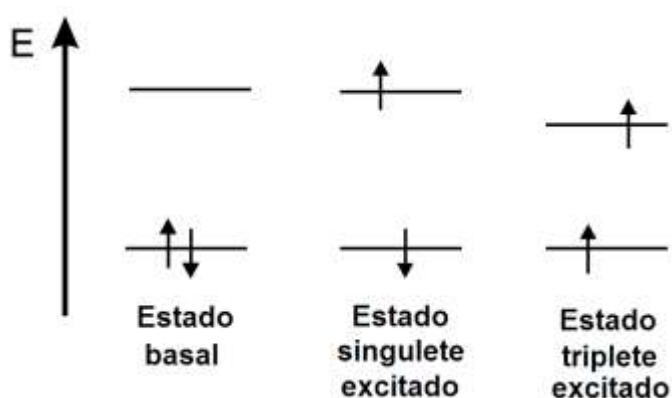
1. Resumen	3
2. Introducción	3
2.1 Diagrama de Jablonski	5
3. Espectroscopía Raman	6
4. Laser femtosegundo	10
5. Aniquilación triplete	11
6. Nanopartículas de conversión ascendente	13
7. Conclusiones	18
8. Bibliografía	19

# 1. RESUMEN

Durante los últimos 20 años se ha producido un considerable aumento en el uso de la fluorescencia en técnicas biológicas. A día de hoy, es uno de los métodos más utilizados en campos de la salud, tales como biotecnología, citometría de flujo, diagnóstico de enfermedades, secuenciación de ADN o análisis genético, debido principalmente a su alta sensibilidad. A lo largo del trabajo se irán conociendo los distintos métodos que se aplican sobre el proceso de fluorescencia, así como sus aplicaciones.

# 2. INTRODUCCIÓN

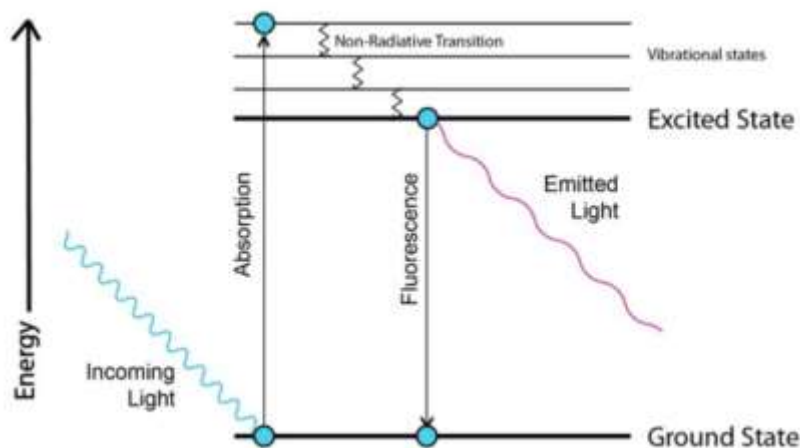
La luminiscencia es la emisión de luz por parte de cualquier sustancia, debido a estados electrónicamente excitados. La luminiscencia se encuentra dividida en dos categorías: fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado. <sup>(1)</sup>



Las moléculas poseen electrones. Así, los pares de electrones que se encuentren en cada orbital se encuentran apareados, constituyendo un estado basal o fundamental. En este momento, la molécula presenta un momento magnético nulo. A este momento se le llama  $S_0$ .

Al excitar los electrones, uno pasará a un orbital de mayor energía. Si mantiene su estado de spin, se dice que el par electrónico se encuentra en un estado de singlete excitado, siendo denotado como  $S_1$ . A este proceso se le denomina transición singlete-singlete. Por el contrario, si el electrón cambia su spin, entonces diremos que el par electrónico se encuentra en estado de triplete excitado, en el que se presentan los spines paralelos. Este estado se conoce como triplete debido a que corresponde a tres estados de igual energía. De acuerdo con la regla de Hund, este último estado presenta una menor energía que su singlete correspondiente.

En el fenómeno de fluorescencia, la luz absorbida aumenta la banda de energía de los electrones a un estado más excitado. Los electrones, antes de liberar en forma de luz la energía absorbida, pierden algo de energía por la vibración de las moléculas. Al volver a su estado inicial, los electrones emiten luz, dándose la fluorescencia. La fluorescencia ocurre de forma rápida, dándose la emisión en orden de  $10^8 \text{ s}^{-1}$ . <sup>(1)</sup>



La fosforescencia es la emisión de luz de estados de triplete excitados, en los cuales el electrón en el orbital excitado tiene la misma orientación de spin que el electrón del estado fundamental. La transición al estado fundamental esta “prohibida” y la emisión es lenta, pudiendo darse en orden de milisegundos o segundos.



Quinina

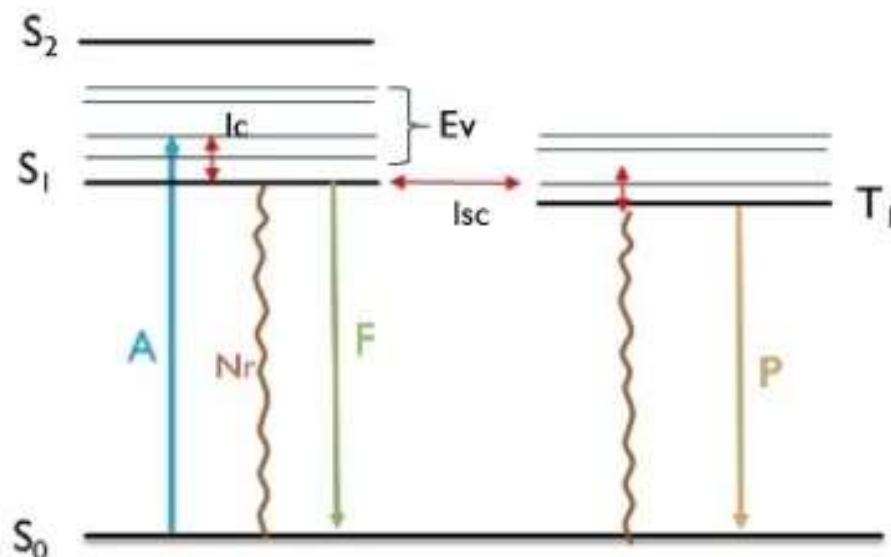
La fluorescencia suele aparecer en moléculas aromáticas. Así, una de las moléculas que presenta una fluorescencia más significativa es la quinina, presente entre otras cosas en la tónica. Esta apreciación fue primeramente observada por Sir John Frederick Willian Herschel. <sup>(1)</sup>

Si se observa un vaso de tónica expuesto a la luz solar, se puede observar un ligero resplandor azul sobre la superficie. Esto se debe a la excitación de la quinina por parte de la luz ultravioleta del sol. Una vez excitada la molécula, volverá a su estado fundamental, emitiendo esa franja azul visible en una longitud de onda próxima a los 450 nm.

Sin embargo, los átomos no suelen producir el fenómeno de fluorescencia, salvando la excepción del grupo de los lantánidos. La fluorescencia en estos átomos se debe a las transiciones electrónicas entre orbitales f.

## 2.1 DIAGRAMA DE JABLONSKI

El proceso que ocurre entre la absorción y la emisión de luz se ilustra mediante el diagrama de Jablonski <sup>(1)</sup>.



La línea base de color negro sólido, identificada como S<sub>0</sub> representa el estado fundamental de menor energía donde la molécula permanece estable. Cuando la molécula entra en contacto con la radiación electromagnética ocurre el fenómeno de absorción (A) donde la molécula puede entrar en un estado de vibración (Ev, lo que implica vibración/rotación de la molécula). Sin embargo, recordemos que la energía está cuantizada y para que la molécula logre alcanzar un nivel permitido (S<sub>1</sub>) pueden ocurrir dos fenómenos:

- Conversión interna (Ic) para pasar del estado excitado a uno de menor energía toda la energía de emisión se convierte en calor y no hay presencia de fotones liberados, no está del todo claro cómo es que se dispersa el calor liberado.
- Relajación vibracional (Nr): se da cuando ocurren colisiones entre el soluto y el solvente, donde este último transfiere térmicamente la energía necesaria para regresar al estado basal. Este proceso es tan eficiente que, no solo uno o dos cuantos de energía vibracional se pierden, sino todo el exceso de energía vibracional del estado excitado, en un tiempo de 10<sup>-13</sup> a 10<sup>-11</sup> segundos. Esto significa que antes de que una molécula excitada en solución pueda emitir un fotón sufrirá una relajación vibracional. Tanto la conversión interna como la relajación vibracional son procesos no radiactivos y son formas de emisión.

Por otro lado la fluorescencia es un proceso “radiactivo” de relajación que puede observarse cuando la emisión es producida debido a la relajación de la molécula excitada a cualquiera de los estados vibracionales del estado electrónico fundamental.

### 3. ESPECTROSCOPIA RAMAN

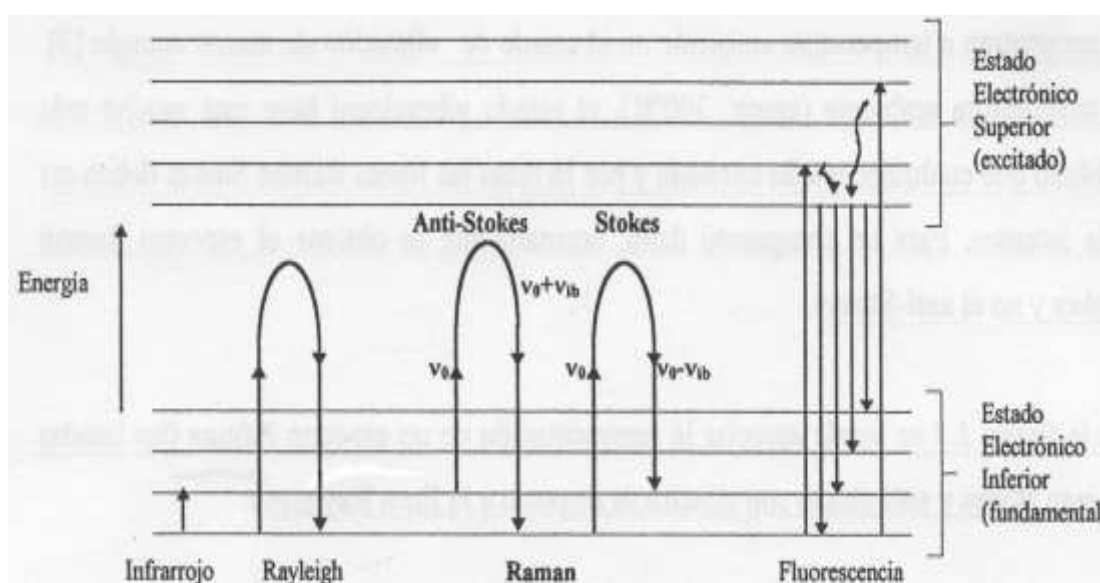
La espectroscopía Raman es una técnica fotónica de resolución alta que en pocos segundos es capaz de proporcionar información química y estructural de cualquier material o compuesto orgánico o inorgánico, permitiendo así su posible identificación. Esta técnica está basada en el examen de la luz dispersada por un material al incidir un haz de luz monocromático sobre él. Una parte de la luz es dispersada inelásticamente, experimentando pequeños cambios de frecuencia, que serán característicos del material analizado, e independientes de la frecuencia de la luz incidente. <sup>(2)</sup>

Se trata de una técnica de análisis realizada directamente sobre el material a analizar, sin necesidad de llevar a cabo ninguna preparación especial, además de no dañar el material a analizar.

Este fenómeno fue descrito por el físico indio Chandrasekhara Venkata Raman en 1928. Para llevar a cabo el descubrimiento, basó sus estudios en los trabajos realizados anteriormente por Rayleigh. A diferencia de éste, que consideraba el azul del mar como un reflejo del cielo, Raman realizó un experimento sencillo con el que pudo demostrar que el color del agua del mar procedía de un fenómeno propio, la dispersión de la luz, debido a su interacción con las moléculas de agua.

El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en hacer incidir un haz de luz monocromática de frecuencia  $\nu_0$  sobre una muestra cuyas características se desean determinar, y examinar la luz dispersada por dicha muestra. La mayor parte de la luz dispersada presenta la misma frecuencia que la luz incidente, pero una fracción muy pequeña presenta un cambio frecuencial, resultado de la interacción de la luz con la materia. La luz que mantiene la misma frecuencia  $\nu_0$  que la luz incidente se conoce como dispersión Rayleigh (discípulo de Raman), y no aporta ninguna información sobre la muestra analizada en cuanto a su composición. La luz dispersada que presenta frecuencias distintas a la de la radiación incidente, es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra, y es la que se conoce como dispersión Raman. Las nuevas frecuencias,  $+\nu_r$  y  $-\nu_r$ , son las frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra, e independientes de la radiación incidente.

Las variaciones de frecuencia observadas en el fenómeno de dispersión Raman, son equivalentes a variaciones de energía. Los iones y átomos enlazados químicamente para componer moléculas y redes cristalinas, están sometidos a un constante movimiento vibracional y rotacional. Estas oscilaciones se realizan a frecuencias bien determinadas en función de la masa de las partículas que intervienen y del comportamiento dinámico de los enlaces existentes. A cada uno de los movimientos vibracionales y rotacionales de la molécula le corresponderá un valor determinado de la energía molecular. Un diagrama energético en el que cada estado de energía se representa por una línea horizontal se muestra en la siguiente figura:

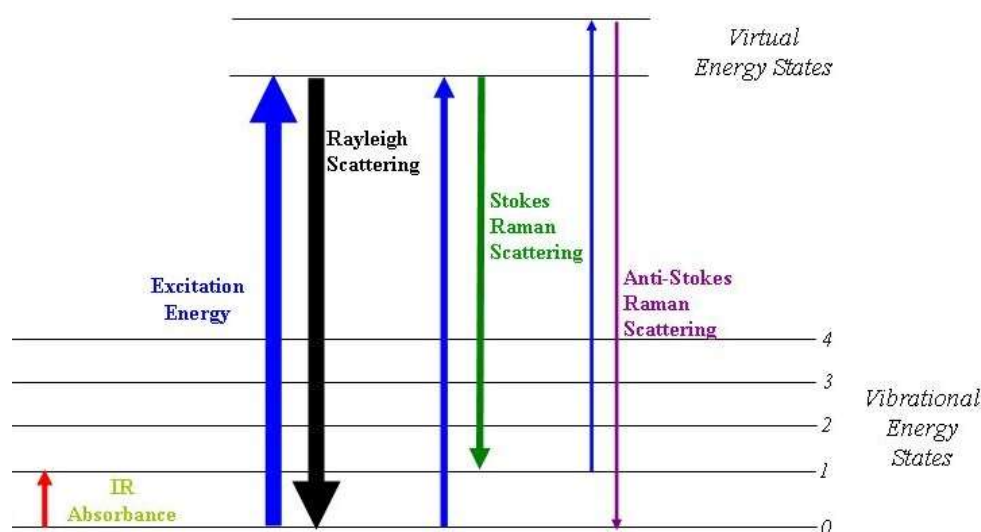


Cuando los fotones del haz de luz incidente, con energía  $h\nu_0$ , mucho mayor a la diferencia de energía entre dos niveles vibracionales o rotacionales de la molécula, chocan con ella, la mayor parte la atraviesan, pero una pequeña fracción son dispersados. Suele ser dispersado en torno a un fotón por cada  $10^{11}$  fotones incidentes. Esta dispersión puede ser interpretada de la siguiente manera: el fotón incidente lleva a la molécula transitoriamente a un nivel de energía vibracional o rotacional superior, no permitido, el cual abandona rápidamente para pasar a uno de los niveles de energía permitidos emitiendo un fotón. La frecuencia a la cual es liberado este fotón dependerá del salto energético realizado por la molécula.

Pueden darse los siguientes casos:

- Si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a la misma frecuencia que el fotón incidente, se dice que el choque es elástico, ya que ni el fotón ni la molécula sufren variaciones en su estado energético. La molécula vuelve al mismo nivel de energía que tenía antes del choque y el fotón dispersado tiene la misma frecuencia  $\nu_0$  que el incidente, dando lugar a la dispersión de Rayleigh.

- Por el contrario, si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a una frecuencia distinta de la incidente, se dice que el choque es inelástico (existe transferencia de energía entre la molécula y el fotón). En este caso pueden darse dos fenómenos:
  - Si el fotón dispersado tiene una frecuencia menor a la del incidente, se produce una transferencia de energía del fotón a la molécula que, después de saltar al estado de energía no permitido, vuelve a uno permitido mayor al que tenía inicialmente. El fotón es dispersado con frecuencia  $\nu_0 - \nu_r$  y se produce la dispersión Raman Stokes.
  - Si el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor a la del incidente, se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón. Esto significa que la molécula, inicialmente antes del choque no se encontraba en su estado vibracional fundamental, sino en uno de mayor energía, y después del choque pasa a este estado. El fotón es dispersado con frecuencia  $\nu_0 + \nu_r$  y se produce la dispersión Raman anti-Stokes.



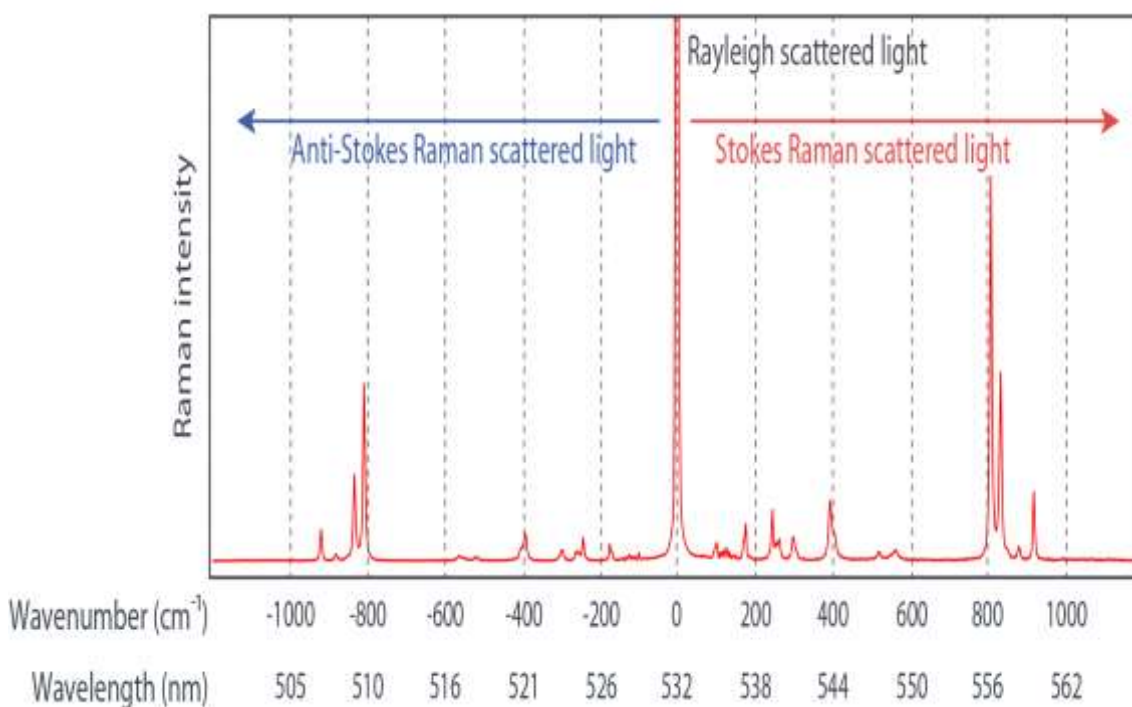
Cada material tendrá un conjunto de valores  $\nu_r$  característicos de su estructura poliatómica y de la naturaleza de los enlaces químicos que la forman.

A temperatura ambiente, según la ley de distribución de energías de Maxwell-Boltzman, el 99% de las moléculas se encuentra en el estado vibracional de menor energía, y por tanto, la probabilidad de que ocurran transferencias de energía que den lugar a la dispersión Raman Stokes es mucho mayor que la de la dispersión Raman anti-Stokes. Esto se traduce en que la intensidad de la dispersión Raman Stokes es en torno a 100 veces superior a la de la dispersión Raman anti-Stokes. <sup>(2)</sup>



En algunas ocasiones, debido a la naturaleza química del material que se analiza, unido al efecto Raman, se produce el fenómeno de fluorescencia, pudiendo llegar a enmascarar las bandas Raman, por lo que sería de interés en estos casos medir el espectro anti-Stokes ya que a estas frecuencias, aunque el efecto Raman es más débil, también lo es el efecto de la fluorescencia y pueden aparecer bandas Raman en la parte anti-Stokes del espectro, que se encuentran enmascaradas en la parte Stokes.

Debido a la mayor incidencia de la dispersión Stokes con respecto a la anti-Stokes, se sitúa la de Stokes o clásica el eje positivo, dejando la anti- Stokes en el lado negativo.



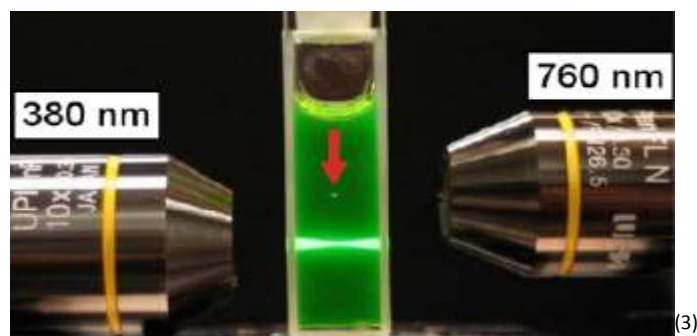
Dentro de la espectroscopía Raman anti-Stokes se pueden distinguir diferentes procesos:

- Láser femtosegundo
- Aniquilación triplete
- Nanopartículas de conversión ascendente (UCNP)

## 4. LÁSER FEMTOSEGUNDO

La posibilidad de una absorción simultánea de dos fotones fue predicha por Goppert-Mayer en 1931, aunque su verificación experimental no fue posible hasta el descubrimiento del láser. El concepto está basado en que dos fotones de energía  $E_1$  y  $E_2$  pueden ser absorbidos simultáneamente por un átomo o molécula y excitar al sistema tal como lo haría un solo fotón de energía. La probabilidad de una excitación de dos o más fotones es muy pequeña, y por tanto se requiere una intensidad muy grande de radiación para que la excitación ocurra.<sup>(3)</sup>

El desarrollo de generadores de pulsos láser de femtosegundo ( $1\text{fs}=10^{-15}\text{ s}$ ) ha hecho posible la obtención de intensidades suficientes para la observación de una variedad de procesos multifotónicos. Esto es posible gracias a la brevedad de los pulsos de femtosegundo. La siguiente representación muestra la fluorescencia resultante de absorciones de uno y dos fotones en una solución de fluoresceína. En el láser de dos fotones (derecha de la imagen), la fluorescencia está restringida al punto de enfoque, señalado con una flecha. Esta propiedad es aprovechada en la microscopía de fluorescencia de dos fotones (TPFM).

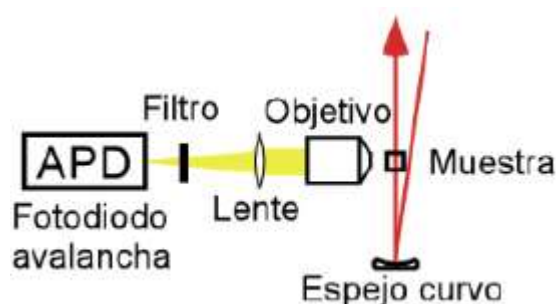


La TPFM fue demostrada por W. Denk y W. Webb en 1991, y actualmente está siendo muy utilizada en ciencias biológicas. En esta técnica, la muestra se ilumina con pulsos láser infrarrojos (IR) de femtosegundos enfocados y los fluoróforos presentes en el volumen de enfoque emiten fluorescencia tras experimentar una absorción de dos fotones. La fluorescencia emitida es utilizada para construir la imagen de la muestra. Conocer el espectro de dos fotones (TPS) de los fluoróforos empleados en TPFM es esencial, de ahí la importancia de la espectroscopía de dos fotones.<sup>(4)</sup>

El creciente empleo de la TPFM ha incrementado el interés en técnicas capaces de medir el TPS de un fluoróforo. Para determinar qué fluoróforo es útil en una determinada región del espectro electromagnético, cuál absorbe y emite fluorescencia de modo más eficiente, o para cuantificar su presencia en la muestra es necesario conocer su TPS. Dicho TPS ha de medirse directamente.

Existen dos maneras de determinar el TPS de un fluoróforo: una es determinar la sección transversal de absorción de dos fotones directamente midiendo la cantidad de luz absorbida al atravesar la muestra  $\sigma_{TPA}(\omega)$  (two-photon absorption cross-section) , o bien midiendo la fluorescencia generada como consecuencia de la excitación de dos fotones. A partir de la señal fluorescente se determina la correspondiente sección transversal  $\sigma_{TPE}(\omega)$  (two-photon excitation action cross-section). Dado que la cantidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de radiación absorbida, ambas secciones transversales se relacionan según  $\sigma_{TPE} = \eta \cdot \sigma_{TPA}$ , donde  $\eta$  es la eficiencia cuántica de fluorescencia.

Para medir el TPS de un fluoróforo se requiere excitar la muestra sucesivamente con pulsos láser a varias longitudes de onda.



Diseño experimental: los puntos láser modulados se enfocan en la muestra con un espejo curvo. La fluorescencia emitida se colecta con un objetivo y se enfoca con una lente en el detector, un fotodiodo avalancha. El filtro se utiliza para bloquear la radiación del láser. <sup>(4)</sup>

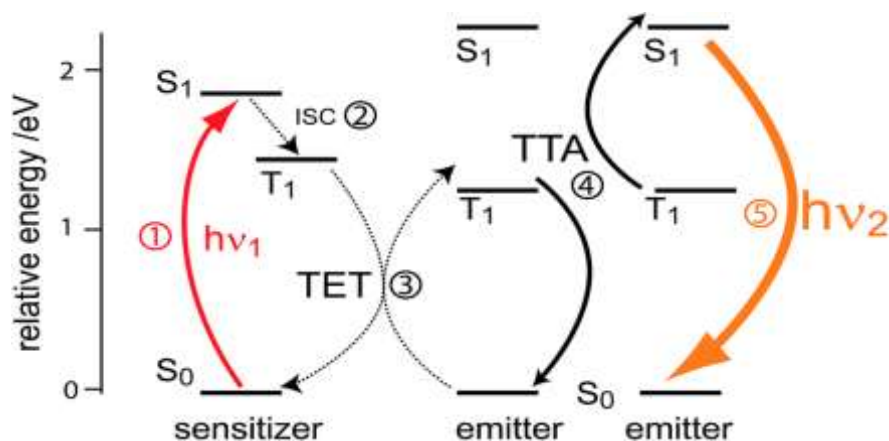
## 5. ANIQUILACIÓN TRIPLETE

Las células solares sensibilizadas con tinte (DSC) se han proclamado como un concepto prometedor en la recolección de energía solar asequible. A pesar de este entusiasmo, la comercialización generalizada aún no se ha producido. Se han presentado varias razones para esto, con un problema principal que es la energía relativamente alta del inicio de la absorción, lo que limita la eficacia de recolección de luz alcanzable de estos dispositivos. Aunque esto puede superarse, la disminución del inicio de la absorción suele ir acompañada de una caída en el voltaje de circuito abierto, que erosiona desproporcionadamente cualquier ganancia en la densidad de corriente. <sup>(5)</sup>

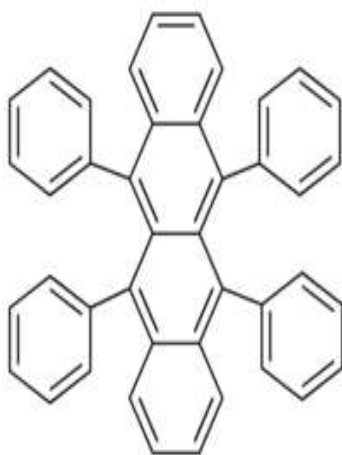
La operación general de las DSC implica la transferencia de electrones de un colorante fotoexcitado a un semiconductor (normalmente  $TiO_2$ ), seguido de la regeneración del colorante oxidado por un mediador rédox. Ambos procesos conllevan un gran gasto energético.

Para solucionar el problema que llevan consigo las DSC, surgió el enfoque de la conversión ascendente de fotones. Este sistema de aniquilación triplete-triplete (TTA-UC) fue capaz de recoger la luz roja transmitida a través de la capa activa y convertirla

químicamente a fotones de mayor energía que podrían ser absorbidos por la capa activa de la DSC y generar fotocorriente. <sup>(5)</sup>



El proceso TTA-UC implica la excitación de moléculas sensibilizadoras por la luz con energía por debajo de la energía de inicio del dispositivo. Los sensibilizadores con excitación singlete experimentan una conversión rápida entre sistemas al estado de triplete de más baja energía. A partir de aquí, pueden transferir energía a especies emisoras que aceptan tripletes del estado fundamental, siempre que la transferencia sea llevada a cabo por energía libre.



Una especie emisora es el rubreno. El primer estado triplete del rubreno (T1) es mayor que la mitad de la energía en su primer estado singlete excitado (S1), pero menos de la mitad de la energía T2, lo que significa que un complejo de dos tripletes excitados del rubreno puede aniquilar para dar un estado singlete excitado en la molécula emisora con una probabilidad bastante alta. El singlete excitado de la molécula de rubreno puede posteriormente emitir un fotón, como en la fluorescencia, con energía suficiente como para excitar el tinte en el electrodo de trabajo del DSC.

Por tanto, la escasa respuesta de las células solares sensibilizadas por colorante (DSC) a la luz roja e infrarroja es un impedimento significativo para la realización de altas fotocorrientes y, por lo tanto, mayores eficiencias. La conversión ascendente de fotones por medio de la aniquilación triplete-triplete (TTA-UC) es una técnica atractiva para usar estos fotones de baja energía que de otra manera se desperdiciarían para producir fotocorriente, sin interferir con el rendimiento fotoanódico de manera perjudicial. Además de esto, TTA-UC tiene una serie de características, distintas de otras tecnologías de conversión de fotones, lo que lo hace particularmente adecuado para el acoplamiento con tecnología DSC.

## 6. NANOPARTICULAS DE CONVERSIÓN ASCENDENTE

Las nanopartículas de conversión ascendente (UCNPs) son materiales inorgánicos dopados con lantánidos, capaces de absorber dos o más fotones de baja energía y emiten fluorescencia a una longitud de onda más corta que la longitud de onda de excitación. <sup>(6)</sup>

La excitación de las UCNPs es llevada a cabo por un láser de onda continua. El proceso de conversión ascendente surge por las transiciones electrónicas orbitales 4f-4f de los iones lantánido (conocidos como dopantes), los cuales estarán protegidos por los orbitales 5s y 5p completos, haciendo así que las radiaciones que se emiten sean resistentes a la degradación. <sup>(6)</sup>

La intensidad de la radiación de las nanopartículas se rige por la siguiente ecuación <sup>(7)</sup>

$$I_{UCPL} = K \times P^n$$

Siguiendo la ecuación, la intensidad de la radiación va a tener una dependencia no lineal de la densidad de la luz de excitación. En dicha ecuación,  $I_{UCPL}$  hace referencia a la intensidad de fotoluminiscencia,  $K$  al coeficiente del material,  $P$  a la potencia del láser, y  $n$  al número de fotones excitados que se necesitan para producir la fotoluminiscencia de conversión ascendente.

Los dopantes lantánidos presentan una elevada relación superficie-volumen, por lo que sufrirán desactivaciones, las cuales podrán darse de dos formas: por centros de enfriamiento superficiales vecinos en aquellos dopantes situados en la superficie o alrededor; o bien la energía de los dopantes puede migrar por la superficie de las nanopartículas. Estas desactivaciones son la causa por la cual las UCNPs presentan menor eficiencia cuántica.

La eficiencia cuántica de la conversión ascendente (UCQY) se define como la proporción entre el número de fotones de conversión ascendente emitidos y el número de fotones del IR cercano absorbidos.

$$UCQY = \frac{\text{fotones emitidos}}{\text{fotones absorbidos}} = \alpha \cdot \frac{\text{intensidad emitida por UCPL}}{\text{luz de excitación absorbida}} = \frac{I_{ucpl}}{\alpha \cdot P}$$

( $\alpha$ = coeficiente de absorción de la matriz a la longitud de onda de excitación)

Las UCNPs deben presentar una serie de propiedades: <sup>(8)</sup>

- Actuar selectivamente sobre la diana, evitando interacciones sobre el resto de células.
- Ser biocompatibles, dispersables y estables en medio biológicos.
- Ser capaces de excitarse sin excitar la matriz biológica.

- Tener elevada eficiencia y emisiones multicolor para mejorar el límite de detección.
- Pequeño tamaño y forma uniforme.
- Tener composición estequiométrica.
- Emitir fluorescencia que pueda ser detectada por espectroscopía o por imagen.

Han demostrado tener varias ventajas como sondas de fluorescencia debido a su alta estabilidad química y fotoquímica, baja toxicidad y ausencia de fotoblanqueo. Sin embargo, la característica más importante de los UCNPs, que les hace ser alternativa a los colorantes orgánicos clásicos, es su longitud de onda de excitación, que se encuentra en la región cercana infrarroja (NIR), típicamente a 980 nm. A esta excitación, se evita la autofluorescencia biomolecular de la longitud de onda, mientras se obtiene una menor dispersión de luz en comparación con la radiación UV-visible. Por tanto, se puede mejorar mucho la relación señal/ruido con el uso de UCNP como marcadores biológicos. El enfriamiento de esta fluorescencia solo se puede dar en la superficie de las partículas.<sup>(6)</sup>

Debido a las características anteriormente indicadas, la fluorescencia de conversión ascendente requeriría nanopartículas en las cuales los efectos relacionados con la superficie fuesen dominantes. Por tanto, es complicado encontrar un inhibidor eficaz para la fluorescencia de conversión ascendente. Entre otros inhibidores, el que más eficaz ha demostrado ser, y de ahí su mayor utilización, ha sido el óxido de grafeno soluble en agua (GO). Para que se produzca la inhibición, las nanopartículas tienen que ser capaces de adherirse a la superficie de GO. Se ha demostrado que los biopolímeros de ADN monocatenario (ssDNA) tienen una gran capacidad de unión a la superficie de GO debido principalmente a interacciones  $\pi$ - $\pi$  fuertemente atrayentes entre las nucleobases aromáticas y la estructura altamente insaturada de GO. Sin embargo, los electrones  $\pi$  de doble cadena de ADN (ADNs) se unen mediante apilamiento de bases, por lo que no estarían disponibles para interactuar con la superficie de GO.<sup>(6)</sup>

Sobre esta base sería interesante diseñar un sensor de fluorescencia utilizando UCNP y GO como par de transferencia energética de resonancia fluorescente (FRET). En presencia de la cadena de ADN complementario (ADNc), el proceso de hibridación conduciría a ADNs, y la fluorescencia de conversión ascendente sería detectable.<sup>(6)</sup>

La síntesis de UCPN necesita la producción de una matriz de soporte que será relevante a la hora de la eficiencia del proceso en la emisión de radiaciones de conversión ascendente. Esta matriz de soporte ha de ser químicamente estable y transparente en el espectro de interés. La matriz puede estar compuesta por distintos materiales, tales como óxidos ( $Y_2O_3$ ), oxisulfuros ( $Y_2O_2S$ ) o fluoruros ( $NaYF_4$ ). El número de fotones necesario está inversamente relacionado con la eficiencia, de tal forma que a mayor número de fotones necesarios, el proceso presentará una menor eficiencia, siendo así los fluoruros ( $NaYF_4$ ) los más eficientes. En estudios posteriores se pudo

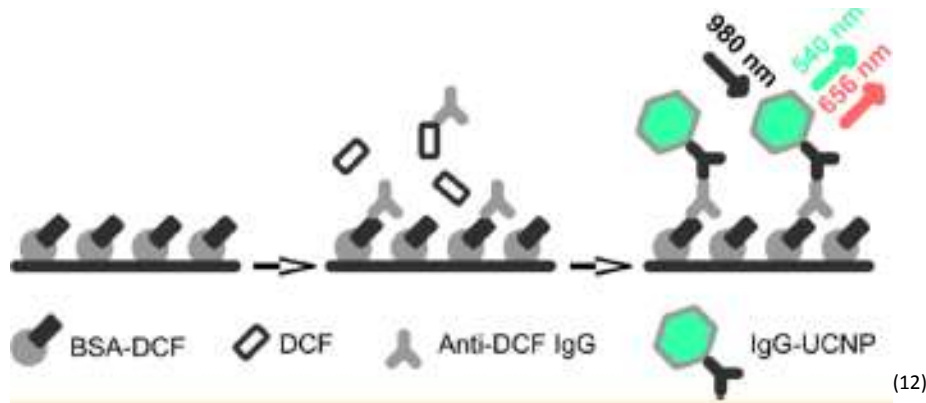
comprobar que el uso combinado de iones alcalinos ( $\text{Li}^+$ ) con las nanopartículas de fluoruro dopadas con lantánidos producía una mejora considerable en la fluorescencia de conversión ascendente.<sup>(9)</sup>

Además, el denominado campo cristal va a actuar sobre la eficiencia, de tal forma que una fase cristalina menos simétrica favorece la eficiencia del proceso. Una alternativa a esto consiste en el dopaje con iones catiónicos no luminiscentes, de tal forma que reemplazan los iones catiónicos de la red, disminuyendo así la simetría y aumentando la eficiencia.<sup>(10)</sup>

Otro factor que puede afectar a UCNP es la Resonancia de Plasmón de Superficie Localizada (LSPR). LSPR se produce por la interacción entre la luz incidente y un metal, dando por resultado una oscilación de los electrones en la interfase de la estructura metálica. Frente a esto, se han realizado varias comprobaciones en relación a estas interacciones, observando que nanopartículas de  $\text{NaYF}_4$  dopadas con  $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$  sobre una película de oro hace que se aumente la fluorescencia entre 5 y 315 veces. Era necesario ajustar la distancia entre el metal y las nanopartículas, por lo que se tenían que utilizar metales de capa fina.<sup>(11)</sup>

Los UCNPs se van a emplear con muchos y variados fines terapéuticos: en cirugía para el diagnóstico de tumores, en el operatorio y en el post-operatorio, para comprobar la correcta eliminación del tejido tumoral; envío de fármacos y liberación en el sitio previsto, para el transporte de fármacos antitumorales, etc.

- Diagnóstico de tumores: el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, ELISA, es una herramienta costosa para la detección específica y altamente sensible de muchos analíticos tóxicos, así como en el diagnóstico clínico. Sin embargo, se están realizando ensayos para reemplazar la técnica de ELISA por UCNP. Esto se debe a la gran sensibilidad que poseen las partículas de conversión ascendente, haciendo así que estén siendo utilizadas para la detección de cáncer de próstata.<sup>(12)</sup>
- Determinación de sustancias en el medio ambiente: tras el uso médico o veterinario de algunos fármacos, algunos metabolitos de éstos pueden quedarse en el medio ambiente. Esto es lo que sucede con el diclofenaco, un AINE muy utilizado. En la India, a través de UCNP, se ha podido comprobar que el número de buitres descendió debido a un metabolito del diclofenaco que se almacenaba en los cadáveres de los cuales se alimentaban, lo que les provocaba una insuficiencia renal que les producía la muerte. También, mediante UCNP se ha podido comprobar de una forma eficaz y barata la presencia del metabolito del diclofenaco en aguas europeas.<sup>(12)</sup>



- Bioimagen: los fluoróforos tradicionales no se pueden utilizar para esta aplicación, debido a que se excitan por radiaciones UV o visibles, presentando así autofluorescencia y dispersando la luz. Las UCNPs, sin embargo, se excitan por radiaciones NIR, además de presentar autofluorescencia y dispersión de luz mucho menores. Las nanopartículas de  $\text{NaYF}_4$  dopadas con  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$  y  $\text{Ho}^{3+}$  se utilizan para favorecer la emisión de color y así poder obtener imágenes celulares multicolor.<sup>(13)</sup> Dentro de la bioimagen destaca la técnica de tomografía óptica, que permite la obtención de imágenes tridimensionales a partir de imágenes obtenidas por la luz dispersada por ese cuerpo, por lo que se va a requerir un tejido altamente dispersante que es iluminado por un haz, produciendo así el fenómeno de fluorescencia, que mediante una serie de detectores se transformará en imagen. Esta técnica es muy sensible y eficaz en la detección de tumores.<sup>(14)</sup> Otro tipo de bioimagen es la denominada imagen multimodal, en la que se combinan diversos tipos de radiología, tales como resonancia magnética, tomografía computerizada o tomografía por emisión de positrones. En la resonancia magnética se van a utilizar nanopartículas con iones lantánido que actuarán como agentes de contraste: iones de  $\text{Gd}^{3+}$  (buen agente de contraste debido a sus siete electrones libres en los orbitales 4f), óxido de hierro superparamagnético,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , que actúa como agente de contraste negativo, y  $\text{Mn}^{2+}$  (debido a sus electrones libres en orbitales 4f).
- Administración de fármacos: las UCNP son capaces de mejorar la solubilidad, la eficacia, la distribución y la farmacocinética. Existen tres sistemas basados en UCNP para la administración de fármacos:<sup>(15)</sup>

  - Esferas con superficie mesoporosa: las nanopartículas se encuentran huecas, de tal forma que se rellenan con el fármaco, para posteriormente recubrirlas con una matriz mesoporosa.



- Conchas de sílice mesoporosa: las nanopartículas están recubiertas de capa de sílice mesoporosa, en cuyos abundantes poros se deposita el fármaco.
- Bolsas hidrófobas: en la superficie de las nanopartículas se encapsulan fármacos hidrófobos. Esto se produce debido a las interacciones hidrófobas entre los fármacos hidrófobos y el ligando de las nanopartículas.
- Liberación de fármacos: los fotones de las radiaciones UV influyen en la liberación del fármaco. El principal problema es la aparición de fototoxicidad y la limitación de penetración de la radiación. Este problema se soluciona mediante el uso de nanopartículas, que con la radiación NIR en vez de UV consiguen una mayor penetración en los tejidos, y por tanto, una obtención a priori del efecto deseado. La fotoactivación de las nanopartículas se realiza por dos procesos:
  - Fotorrelección inducida por NIR: se utiliza en los procesos en los que la liberación es mediada por luz para la liberación de moléculas orgánicas como proteínas o ácidos nucleicos. Dentro de este grupo destacan las nanopartículas NIR-UV, que tras ser irradiadas por luz UV se dividen, permitiendo así la activación de ácidos nucleicos en tejidos profundos.<sup>(16)</sup>
  - Fotovoltaje inducido por NIR: se utilizan nanopartículas  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$  con radiaciones NIR a UV y NIR a verde. Se emplean estos iones debido a su excitación a la longitud de onda de 980 nm.<sup>(16)</sup>
- Eliminación de tumores: la terapia fotodinámica de conversión ascendente es una técnica en la que se utilizan fármacos que producen oxígeno singlete para la eliminación de los tumores. Para ello, habrá un fotosensibilizador, luz y oxígeno. Cuando la luz irradia el fotosensibilizador, éste pasará a un estado excitado, que reaccionará con el oxígeno para dar el oxígeno singlete  $^1\text{O}_2$ , el cual será citotóxico, ejerciendo así su acción antitumoral. Esta técnica se ha utilizado para el tratamiento de algunos tipos de cáncer (próstata, pulmón...) La técnica anterior tiene el problema de la penetración de la luz visible para su activación. Frente a este problema, se han desarrollado nanopartículas que se excitan por radiación NIR y son capaces de excitar al fotosensibilizador para que inicie la cadena que producirá finalmente citotoxicidad con el oxígeno singlete, habiendo sido probado en el cáncer de vejiga.<sup>(17)</sup>

## 7. CONCLUSIONES

Las nanopartículas de conversión ascendente (UCNP) se han convertido en una gran herramienta en el diagnóstico, detección y tratamiento de procesos tumorales. Debido a su alta precisión, presentan infinidad de aplicaciones en campos de biosensibilización y bioimagen para el diagnóstico de enfermedades. A su vez, por su alta sensibilidad para la detección de cadenas de ADN, se posiciona como una alternativa muy interesante para el sector de la genética.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Lakowicz JR. Introduction to fluorescence. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Tercera edición, Baltimore, Maryland, USA: Springer; 2006. 1-27.
- 2) Pérez Pueyo R. Procesado y optimización de espectros Raman mediante técnicas de lógica difusa. *Dialnet*. 2005. Vol. 1. Cap. 1, 10-20.
- 3) Yves C ,Dantus M. Femtosecond laser pulses in two-photon spectroscopy and microscopy. *East Lansing*. 2016. 1: 47-59.
- 4) Yujie Shen, Alexander Voronin; Aleksei M. Zheltikov, Sean P. O'Connor, Vladislav V. Yakovlev, Alexei V. Sokolov et. al. Picosecond supercontinuum generation in large mode area photonic crystal fibers for coherent anti-Stokes Raman scattering microspectroscopy. *Nature*: 2018.Vol 9526: 1-12.
- 5) Nattestad A, Cheng YY, MacQueen RW, Wallace GG, Schmidt TW. Integrating a Triplet-triplet Annihilation Up-conversion System to Enhance Dye-sensitized Solar Cell Response to Sub-bandgap Light. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. 2014;(91):52028.
- 6) Alonso-Cristobal P, Vilela P, El-Sagheer A, Lopez-Cabarcos E, Brown T, Rubio Retama J. et al. Highly Sensitive DNA Sensor Based on Upconversion Nanoparticles and Graphene Oxide. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2015.
- 7) Chen G.Y, Somesfalean, G, Liu, Y, Zhang, Z.G, Sun, Q, Wang, F. Upconversion Emission Enhancement in  $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ -Codoped  $\text{Y}_2\text{O}_3$  Nanocrystals by Tridoping with  $\text{Li}^+$  Ions. *J. Phys. Rev*. 2008.
- 8) Johnson, N.J.J., Korinek, A., Dong, C., Van Veggel, F.C.J.M. Self-focusing by Ostwald ripening: a strategy for layer-by-layer epitaxial growth on upconverting nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc*. 2012. 134 (27), 11068–11071.
- 9) Cheng Q, Sui J, Cai W. Enhanced upconversion emission in  $\text{Yb}^{3+}$  and  $\text{Er}^{3+}$  codoped  $\text{NaGdF}_4$  nanocrystals by introducing  $\text{Li}^+$  ions. *Nanoscale*. 2012. 4, 779.
- 10) Kramer K. W, Biner D, Frei G, Gudel H.U, Luthi S.R. Mechanistic investigation of upconversion luminescence in  $\text{Er}^{3+}$ -doped  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{BaF}_2$  and  $\text{NaYF}_4$  phosphors. *Materials chemistry and physics*.2004. 162, 1244.

- 11) Zhang, Hua et al. Highly Spectral Dependent Enhancement of Upconversion Emission with Sputtered Gold Island Films. *Chemical communications (Cambridge, England)*.2011. 47.3: 979–981.
- 12) Hlavacek, A; Farka, Z; Hubner, M; Hornakova, V; Nemecek, D; Niessner, R; Skladal, P; Knopp, D; Gorris, HH. Competitive Upconversion-Linked Immunosorbent Assay for the Sensitive Detection of Diclofenac. *Analytical chemistry*. 2016. 88(11), p. 6011 – 6017.
- 13) Wang M, Mi c, Zhang Y, Liu J, Li F, Mao C et al. NIR-Responsive Silica-Coated NaYbF<sub>4</sub>:Er/Tm/Ho Upconversion Fluorescent Nanoparticles with Tunable Emission Colors and Their Applications in Immunolabeling and Fluorescent Imaging of Cancer Cells. *The Journal of Physical Chemistry*.2009. 113 (44), 19021-19027.
- 14) Chu, Liliang et al. Biocompatible near-Infrared Fluorescent Nanoparticles for Macro and Microscopic *in Vivo* Functional Bioimaging. *Biomedical Optics Express* 5.11 (2014): 4076–4088.
- 15) Wang, Chao, Liang Cheng, and Zhuang Liu. Upconversion Nanoparticles for Photodynamic Therapy and Other Cancer Therapeutics. *Theranostics* 3.5 (2013): 317–330.
- 16) Jayakumar MK, Idris NM and Zhang Y. Remote activation of biomolecules in deep tissues using near-infrared-to-UV upconversion nanotransducers. *PNAS* (2012) 109(22): 8483-8488.
- 17) Zhang P, Steelant W, Kumar M and Scholfield M. Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129 (15): 4526-4527