

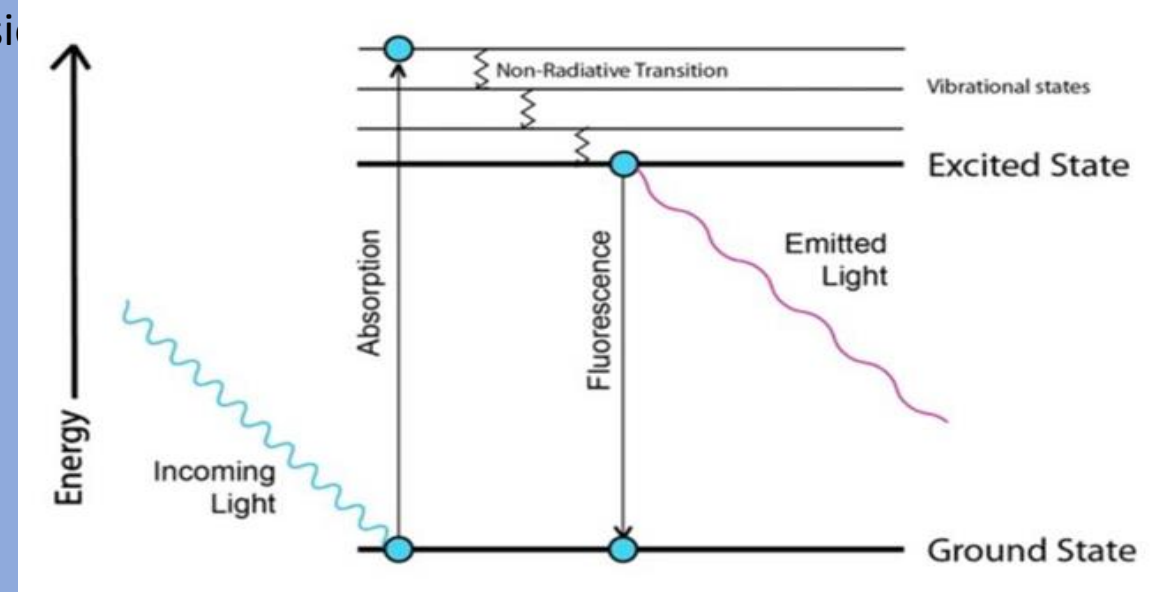


Principios de fluorescencia

Luis Alfonso Escudero Ballesteros
Trabajo de fin de grado
Julio 2018

Introducción

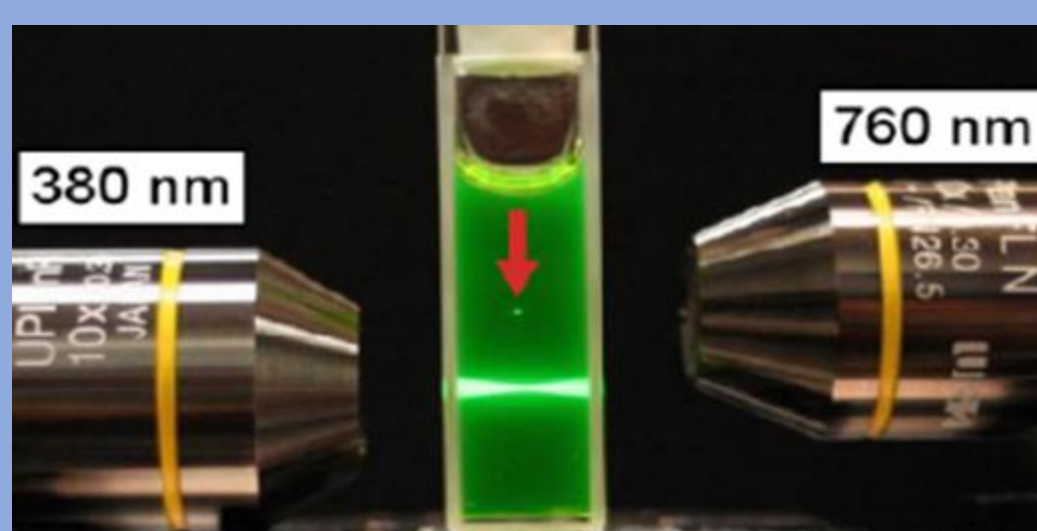
La fluorescencia consiste en la emisión de luz por parte de una sustancia debido al aumento de la banda de energía de los electrones a un estado más excitado, tras haber absorbido previamente luz. Los electrones, antes de liberar en forma de luz la energía previamente absorbida, pierden algo de energía debido a la vibración de las moléculas. Al volver a su estado inicial, los electrones emiten luz, dándose el fenómeno de fluorescencia. Esto sucede de forma rápida, dándose la emisión



La fluorescencia es un fenómeno que suele aparecer en moléculas aromáticas, siendo una de las más significativas la quinina, presente en la tónica. Esta apreciación fue primeramente observada por Sir John Frederick William Herschel. Sin embargo, los átomos no suelen producir fluorescencia, excepto el grupo de los lantánidos, debido a las transiciones electrónicas entre orbitales f.

Láser Femtosegundo

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. 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 se traduce en una alta precisión como se observa en la siguiente imagen:



Esta propiedad es aprovechada en la microscopía de fluorescencia de dos fotones (TPFM). 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.

Nanopartículas 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.

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.

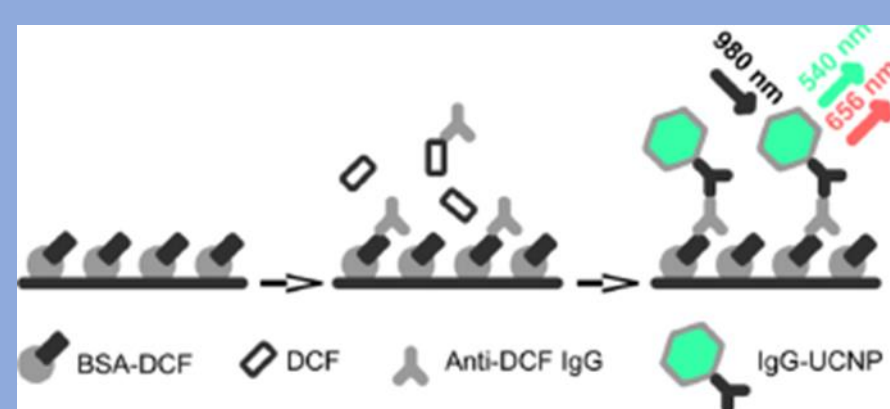
Las UCNPs han de cumplir una serie de requisitos:

- Ser biocompatibles, dispersables y estables en medios biológicos.
- Ser capaces de excitarse sin excitar la matriz biológica.
- Tener elevada eficiencia y emisiones multicolor para mejorar el límite de detección.
- Emitir fluorescencia que pueda ser detectada por espectroscopía o por imagen.
- Tener una longitud de onda de excitación en la región cercana infrarroja (NIR) de 980 nm, evitando así la autofluorescencia y obteniendo una menor dispersión de luz en comparación con la radiación UV-visible.

Utilizando un sensor de fluorescencia basado en UCNP y un inhibidor de fluorescencia como óxido de grafeno (GO), en presencia de la cadena de ADN complementario, el proceso de hibridación conduciría hacia ADNds, haciendo que la fluorescencia de conversión ascendente sea detectable.

La síntesis de UCNP necesita la producción de una matriz de soporte, que puede estar compuesta por distintos materiales, tales como óxidos (Y_2O_3), oxisulfuros ($\text{Y}_2\text{O}_2\text{S}$) o fluoruros (NaYF_4).

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; diagnóstico de metabolitos en el medio ambiente, como el diclofenaco en aguas residuales, etc.



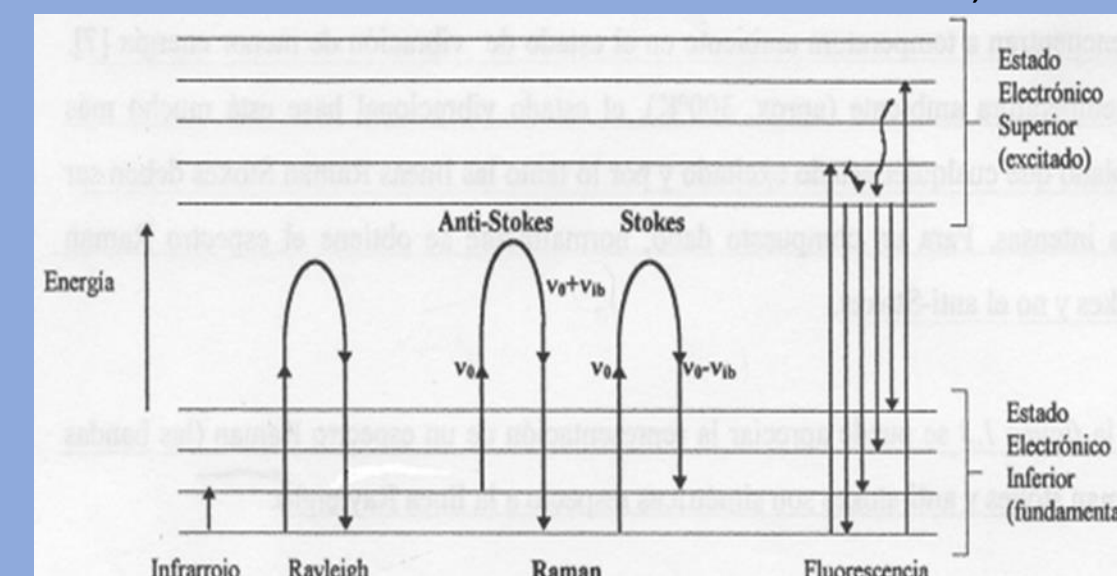
Conclusiones

- 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.



Espectroscopía 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. Es una técnica que se realiza directamente sobre el material a analizar, sin necesidad de realizar un tratamiento previo.



Al hacer incidir un haz de luz monocromático sobre el material, la mayor parte de la luz dispersada presenta la misma frecuencia que la luz incidente (dispersión de Rayleigh), no aportando información sobre la muestra.

Las variaciones de frecuencia son las que aportan información, denominándose dispersión de Raman, características de la naturaleza física y el estado de la muestra:

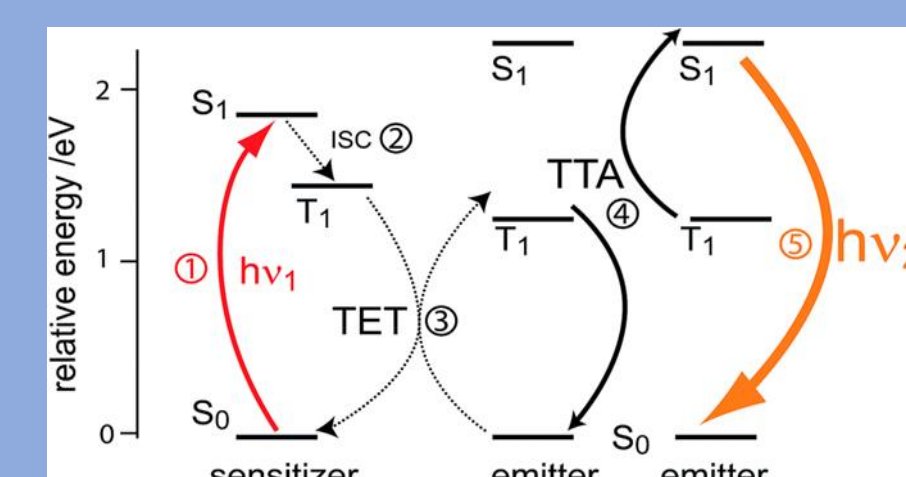
- Si el fotón dispersado tiene una frecuencia menor a la incidente, se produce la dispersión Raman Stokes.
- Si el fotón dispersado tiene una frecuencia mayor a la incidente, se produce la dispersión Raman anti-Stokes.

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 esto, la energía relativamente alta del proceso de absorción limita este proceso.

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.



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.

Bibliografía

- Lakowicz JR. Introduction to fluorescence. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Tercera edición, Baltimore, Maryland, USA: Springer; 2006. 1-27.
- Yves C, Dantus M. Femtosecond laser pulses in two-photon spectroscopy and microscopy. East Lansing. 2016. 1: 47-59;
- Pérez Pueyo R. Procesado y optimización de espectros Raman mediante técnicas de lógica difusa. Dialnet. 2005. Vol. 1. Cap. 1, 10-20.
- 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.
- 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.
- 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.
- Chen GY, Somesfalean, G, Liu, Y, Zhang, Z.G, Sun, Q, Wang, F. Upconversion Emission Enhancement in Yb3+/Er3+-Codoped Y2O3 Nanocrystals by Tridoping with Li+ Ions. J. Phys. Rev. 2008.
- Kramer K. W, Biner D, Frei G, Gudel H.U, Luthi S.R. Mechanistic investigation of upconversion luminescence in Er3+-doped BaCl2, BaF2 and NaYF4 phosphors. Materials chemistry and physics.2004. 162, 1244.
- 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.
- 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.
- Wang M, Mi c, Zhang Y, Liu J, Li F, Mao C et al. NIR-Responsive Silica-Coated NaYbF4: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.
- 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.
- Wang, Chao, Liang Cheng, and Zhuang Liu. Upconversion Nanoparticles for Photodynamic Therapy and Other Cancer Therapeutics. Theranostics 3.5 (2013): 317-330.
- 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.
- 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.