

Instituto Politécnico Nacional
Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería y
Tecnologías avanzadas

Propiedades Ópticas de puntos cuánticos de CdSe/ZnS conjugados
con biomoléculas.

TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Tecnología Avanzada
presenta:

Ing. Oscar Saúl López de la Luz

No de registro: B091519

Directoras de Tesis: Dra. Tetyana Torchynska

Dra. Janna Douda

México D.F. Enero 2012



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 11 de Noviembre del 2010

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIITA en su sesión ordinaria No. 9 celebrada el día 18 del mes de noviembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<u>López</u> Apellido paterno	<u>de la Luz</u> Apellido materno	<u>Oscar Saúl</u> Nombre (s)							
		Con registro: <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">B</td> <td style="padding: 2px 5px;">0</td> <td style="padding: 2px 5px;">9</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">5</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">9</td> </tr> </table>	B	0	9	1	5	1	9
B	0	9	1	5	1	9			

Aspirante de:
Maestría

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
"Propiedades ópticas de puntos cuánticos de CdSe/ZnS conjugados con biomoléculas"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:
Estudios de propiedades ópticas de los puntos cuánticos de CdSe/ZnS por métodos de fotoluminiscencia Y Espectroscopia Raman; bioconjugación de estos con moléculas biológicas; estudios de las Propiedades ópticas de los puntos cuánticos de CdSe/ZnS conjugados con biomoléculas por Métodos de fotoluminiscencia y Espectroscopia Raman, análisis de los resultados; conclusiones

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dra. Tetyana Torchynska Dra. Janna Douda

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: SEPI-UPIITA-ESFM
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dra. Tetyana Torchynska

Dra. Janna Douda

Aspirante

Ing. Oscar Saúl López de la Luz

Presidente del Colegio

M. en C. Griselda Sánchez Otero



S. I. P.
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA
EN INGENIERÍA Y TECNOLOGÍAS AVANZADAS.
SECCION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 10:00 horas del día 15 del mes de diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de SEPI-UPIITA para examinar la tesis titulada:
Propiedades ópticas de puntos cuánticos de CdSe/ZnS conjugados con biomoléculas

Presentada por el alumno:

LÓPEZ

Apellido paterno

DE LA LUZ

Apellido materno

OSCAR SAÚL

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	5	1	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA AVANZADA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA Directores de tesis

DRA. TETYANA TORCHYNSKA

1er VOCAL

DRA. JANNA DOUDA

2º VOCAL

DR. JOSÉ LUIS CASAS ESPÍNOLA

PRESIDENTE

DR. JOSÉ NICOLÁS FERNÁNDEZ GARCÍA

SECRETARIO

DR. LUIS MARTÍN RESÉNDIZ

MENDOZA

3er VOCAL

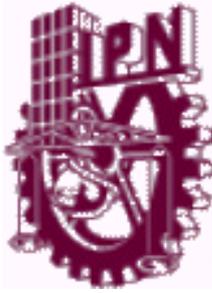


PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

M. EN C. GRISELDA SÁNCHEZ OTERO

S. E. P.

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERIOR IPN-PIA
EN INGENIERÍA Y TECNOLOGÍAS AVANZADAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO Y POSGRADUACIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México D. F. el día 4 del mes de Enero del año 2012, el (la) que suscribe Oscar Saúl López de la Luz alumno (a) del Programa de Maestría en Tecnología Avanzada con número de registro B091519, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería y Tecnología Avanzadas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Tetyana V. Torchynska y Janna Douda y cede los derechos del trabajo intitulado Propiedades ópticas de puntos cuánticos de CdSe/ZnS conjugados con biomoléculas, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección electrónica strato_7@yahoo.com.mx Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Oscar Saúl López de la Luz

Abstract

The optical properties of core/shell CdSe/ZnS quantum dots non conjugated and bioconjugated with antibody molecules Interleukin (IL 10) have been investigated. At the first QD emission with the peaks at 605nm, 655nm, 705nm and 800nm wavelength is studied by the photoluminescence spectroscopy. Then the Raman scattering spectra of mentioned QDs are studied.

It was revealed the variation of QD photoluminescence spectra at the bioconjugation of QDs with IL 10 antibodies. This variation is attributed to the quantum confinement Stark effect that occurs when an electric field is applied to the bioconjugated QDs. This electric field related to the electrical dipole moments of biomolecules. The Stark effect causes the band gap increases, which leads to the shift of PL peak of bioconjugated QDs into high energy range that accompanied by the asymmetry of PL bands as well. This effect has been studied in core/shell CdSe/ZnS QDs and compared with one in core/shell CdSeTe/ZnS QDs.

Raman scattering spectroscopy allowed us i) to estimate the composition of allows in CdSeTe/ZnS QDs and ii) to confirme the existence of electrical dipole moments in bioconjugated QDs. It were identified in non conjugated QDs the characteristic Raman peaks of CdSe and CdSeTe cores, ZnS shells, and amino PEG polymer. In bioconjugated quantum dots the new lines related to organic compounds in IL 10 antibodies were identified.

Resumen

Se investigaron las propiedades ópticas de los puntos cuánticos de estructura núcleo/coraza de CdSe/ZnS bioconjugados y no bioconjugados con moléculas de anticuerpo de Interleucina 10 (IL 10). En primer lugar se estudia la emisión de los puntos cuánticos con picos en 605nm, 655nm, 705nm y 800nm de longitud de onda, por medio de la técnica de Espectroscopia de Fotoluminiscencia. Después se estudian los puntos cuánticos mencionados, por medio de Espectroscopia Raman

Se puso de manifiesto la variación de los espectros de fotoluminiscencia (FL) de los puntos cuánticos con la bioconjugación con anticuerpos de IL-10. Esta variación se atribuye al efecto Stark de confinamiento cuántico, que se produce cuando un campo eléctrico se aplica a los puntos cuánticos bioconjugados. Este campo eléctrico se relaciona con los momentos dipolares eléctricos de las biomoléculas. El efecto Stark provoca el incremento de la banda prohibida, lo que lleva al cambio del pico máximo de FL de los puntos cuánticos bioconjugados hacia energía más alta, acompañado por la asimetría de las bandas de FL también. Este efecto se estudió en los puntos cuánticos de estructura núcleo /coraza CdSe/ZnS y se comparan con los puntos cuánticos de núcleo/coraza de CdSeTe/ ZnS.

La Espectroscopia Raman permitió I) Estimar la composición química en los puntos cuánticos de CdSeTe/ZnS y II) Confirmar la existencia de momentos dipolares eléctricos en los puntos cuánticos bioconjugados. En los puntos cuánticos no conjugados, se identificaron los picos Raman característicos de los núcleos de CdSe y CdSeTe, las corazas de ZnS, y del polímero amino PEG. En los puntos cuánticos bioconjugados se identificaron nuevos picos relacionados con los compuestos orgánicos del anticuerpo de IL-10.

Agradecimientos

Agradezco al gran Pueblo Mexicano por haber sostenido mi educación a través de los siguientes proyectos:

Proyecto SIP-20090301 "Bioconjugación de los puntos cuánticos de CdSe/ZnS con anticuerpos de cáncer"

Proyecto SIP-20100926 "Síntesis y preparación de los puntos cuánticos para aplicaciones biomédicas"

Proyecto SIP-20110487 "Encapsulamiento en polímeros y caracterización óptica de los puntos cuánticos de CdSe/ZnS"

Agradezco al Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías (CNMN) por su colaboración para utilizar sus instalaciones y el equipo de medición.

Agradezco a todos y cada uno de mis profesores, por los conocimientos que me brindaron, por su calidad humana y sobre todo por abrir mis ojos hacia horizontes más amplios.

Y en especial agradezco a mis directoras de Tesis Dra. Tetyana Torchiynska y Dra. Janna Douda por todo el apoyo recibido.

INDICE

Nomenclatura.....	1
Lista de figuras.	2
Lista de tablas.....	8
Introducción general.....	10
Justificación.....	11
Objetivo general.....	12
Objetivos particulares.	12
Capitulo 1: Estado del arte.....	13
1.1 Efectos cuánticos debidos al tamaño.....	13
1.2 Síntesis y Modificación de superficie de los puntos cuánticos.	21
1.3 Bioconjugación de puntos cuánticos.....	24
1.4 Efecto Stark.....	26
1.5 Espectroscopia Raman para los PC's Bioconjugados.....	29
1.6 Estudios de fotoluminiscencia de PCs.....	34
Capítulo 2: Muestras y métodos.....	40
2.1 Métodos.....	40
2.2 Muestras.....	56
Capítulo 3: Resultados experimentales y discusión.....	60
3.1 Análisis de los espectros de fotoluminiscencia de puntos cuánticos no conjugados de 605nm.....	60
3.2 Análisis de los espectros de fotoluminiscencia de puntos cuánticos con una emisión de 605nm con biomoléculas.....	62
3.3 Comparación de espectros con y sin bioconjugación de 605nm.....	63
3.4 Análisis de los espectros de fotoluminiscencia de puntos cuánticos con emisión de 655nm sin biomoléculas a temperatura de 300K.....	67
3.5 Análisis de los espectros de fotoluminiscencia de puntos cuánticos de emisión de 655nm con biomoléculas.....	71
3.6 Comparación de puntos cuánticos de 655nm de emisión con y sin biomoléculas.....	72
3.7 Comparación de puntos cuánticos de 705nm sin biomoléculas.....	78
3.8 Comparación de puntos cuánticos de 705nm con biomoléculas.....	79
3.9 Comparación de puntos cuánticos de 705nm con y sin biomoléculas.....	80
3.10 Comparación de puntos cuánticos de 800nm sin biomoléculas.....	84
3.11 Comparación de puntos cuánticos de 800nm con biomoléculas.....	86
3.12 Comparación de puntos cuánticos de 800nm con y sin biomoléculas.....	87
3.13 Análisis de Resultados:.....	91
Capitulo 4: Estudio de espectroscopia Raman de los puntos cuánticos.....	112
4.1 Estudio de Espectros Raman de las muestras de 605nm.....	112
4.2 Estudio de espectroscopia Raman de las muestras de 655nm.....	123
4.3 Estudio de los espectros Raman de las muestras de 800, 655 y 605 sin biomoléculas.....	135
Capitulo 5: Conclusiones Generales.....	139
Recomendaciones y trabajos futuros.....	139
Referencias:.....	140
Trabajos y participaciones derivados de este proyecto de investigación.....	145

Nomenclatura

CdSe/ZnS : estructura núcleo de seleniuro de cadmio-coraza de sulfuro de zinc

PCs: Puntos cuánticos

Si: Silicio

Ge: Germanio

NCs: Nanocristales

CdS: Sulfuro de Cadmio

CdTe: Telurio de cadmio

InP: Fosforo de Indio

InAs: Arseniuro de Indio

PbSe: Seleniuro de Plomo

Anticuerpo IL -10: Anticuerpo de interleucina 10

IgG1: Inmunoglobulina de isotipo 1

nm: Nanómetro

IgG: Inmunoglobulina

NH₂: Grupo Amino

EMA: effective mass approximation

Loci- (del latín *locus*, lugar; plural *loci*) es una posición fija sobre un cromosoma

ua: Unidades arbitrarias.

eV: (electrón Volt)

hν= Energía de emisión en electrón Volt.

FWHM: ancho medio a la mitad del máximo (Full width at half maximum).

ua: unidades arbitrarias.

Lista de figuras.

Figura 1.1. Proceso de Fotoluminiscencia: A) El material recibe un estímulo luminoso, B) Un electrón de la zona de valencia entra a la banda de conductividad, C) El electrón se relaja y decae hacia la banda de valencia, D) El electrón emite un fotón con la energía de la banda prohibida [61].	14
Figura 1.2. (A) Representación esquemática de la densidad de estados en un metal y un semiconductor de acuerdo a Alivisatos [86,87]: (A) en cada uno de los casos, las líneas discontinuas muestran el incremento de la separación de la banda prohibida desde un material en bulto a una molécula, entre la banda de valencia (VB) y la banda de conducción (CB). (B) la densidad de estados idealizada en una banda de un semiconductor en función de la libertad dimensional. 3D para un material en bulto, 2D para películas delgadas, 1D para nanoalambres o fibras, y 0D para puntos cuánticos.	15
Figura 1.3. Emisión máxima y tamaños de puntos cuánticos de diferente composición. Los puntos cuánticos pueden ser sintetizados a partir de varios tipos de materiales semiconductores (de los grupos II-VI: CdS, CdSe, CdTe...; grupos III-V: InP, InAs,...; grupo IV-VI: PbSe...) y caracterizados por las diferentes energías de bandas prohibidas en material en bulto. Las curvas representan datos experimentales en dependencia de la emisión (pico de la longitud de onda) con respecto al diámetro del punto cuántico, el rango de la emisión de la longitud de onda es de 400 a 1350nm, con variación del diámetro de 2 a 9.5nm [62].	16
Figura 1.4. Progreso de una infección del Virus Sincicial humano (RSV) monitoreado con puntos cuánticos bioconjugados. Inmediatamente después de una hora el (RSV) había sido identificado [64].	17
Figura 1.5. Esquema de la Interleucina 10 [88].	18
Figura 1.6. Imagen del frasco contenedor del anticuerpo IL-10.	19
Figura 1.7. Unidad básica de inmunoglobulinas constituida por dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras(L)[83].	19
Figura 1.8. Unidad básica de una inmunoglobulina en la que se indican los bucles de cadenas tanto ligeras (L) como pesadas (H)[83].	20
Figura 1.9. Imagen tomada por el método de difracción de rayos X [83].	21
Figura 1.10. Arreglo experimental para la síntesis de PCs de CdSe/ZnS: Síntesis típica del núcleo de CdSe [38].	22
Figura 1.11. Esquema general de PC's de CdSe/ZnS : a) Preparación de la coraza de ZnS sobre el núcleo de CdSe; encapsulamiento en polímero PEG-PE: 1,2 diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi-poli(etilenglicol)] [38].	23
Figura 1.12. Esquema de reacciones químicas de bioconjugación por medio de diferentes grupos (en 3 primeras reacciones) y por atracción electrostática (reacción 4) [64].	24
Figura 1.13. Diagrama de métodos de funcionalización de PCs incluyendo DNA thiolado (I) o péptidos con dominios adhesivos [65] o interacción electrostática [66] y enlaces covalentes.	25
Figura 1.14. La división de una línea de la muestra del espectro de helio [83].	26
Figura 1.15. Potencial de Coulomb de un excitón en tres dimensiones a) sin campo eléctrico b) con campo eléctrico [85].	27

Figura 1.16. La estructura de bandas de un pozo cuántico para a) sin campo eléctrico b) un campo eléctrico constante aplicado de forma perpendicular al pozo, sin tomar en consideración el potencial de Coulomb [85].	27
Figura 1.17. Ejemplo del efecto Stark en la función de onda del primer estado excitado del hidrogeno, A) Estado en el cual no se presenta momento dipolar, B) estado en el cual el momento dipolar se encuentra en dirección al campo eléctrico, de modo que disminuye su energía en presencia del campo eléctrico, C) Estado que tiene un momento dipolar contrario al campo eléctrico, razón por la cual aumenta su energía en presencia de campo eléctrico [108].	28
Figura 1.18. Nanopartículas codificadas y protegidas con polímero (PRENT): A) Espectros Raman de células de cáncer de mamario etiquetadas como BT474; B) Espectros Raman de células mamarias no cancerígenas etiquetadas con anticuerpo monoclonal de ratón en contra de EpCAM (Proteína asociada al cáncer); MGITC(marcador orgánico)-Codificado + PRENT (MGITC-anticuerpo de ratón) en rojo oscuro, MGITC-anticuerpo de ratón solamente en color verde, Buffer con los reactivos faltando anticuerpos en negro; C) Espectro con fondo sustraído de células marcadas PRENT-BT474 en rojo, PRENT-NH/3T3 en azul, y solución acuosa de MGITC-(anticuerpo de ratón) PRENT's en gris [78].	29
Figura 1.19. Espectros Raman de puntos cuánticos de CdS: (A) CdS-almidón (azul), almidón solamente (rojo) (B) CdS-maltodextrina (azul), maltodextrina solamente (rojo), wo es el armónico del núcleo semiconductor [79].	30
Figura 1.20. Espectros Raman de partículas no conjugadas (1,2) y partículas conjugadas con Osteopontina (3,4) [80].	31
Figura 1.21. Espectros de puntos cuánticos no conjugados (1, 2, 3) y conjugados con moléculas de anticuerpo PSA (4, 5, 6) [80].	32
Figura 1.22. Esquema que presenta la estructura de los PCs bioconjugados [68].	32
Figura 1.23. El espectro Raman muestra el pico principal del sustrato de silicio en las muestras no conjugadas (a) y conjugadas (b) con anticuerpos de IL 10 de las muestras de PCs de CdSe/ZnS [68].	33
Figura 1.24. Espectro Raman de muestras no conjugadas de 605nm de emisión (a) y conjugadas (b) con IL 10 de PCs de CdSe/ZnS en el rango de 100-800 cm^{-1} [68].	33
Figura 1.25. Espectro Raman de muestras no conjugadas (a) y conjugadas (b) de 605nm con anticuerpos de IL 10 de PCs de CdSe/ZnS en el rango de 800-1500 cm^{-1} [68].	34
Figura 1.26. Espectro Raman de muestras no conjugadas (a) y conjugadas (b) de 605nm con IL 10 en el rango de 1000 a 4000 cm^{-1} [68].	34
Figura 1.27. Ecuación característica del ajuste gaussiano y forma en la cual el algoritmo grafica el ajuste de curvas donde A=área bajo la curva, w=ancho de la curva, y0=línea base, xc,yc=coordenadas centrales, x=dato en el eje x, y=dato en el eje y...	35
Figura 1.28. Espectro de PL de puntos cuánticos de CdSe/ZnS (de 655nm de emisión), con emisión máxima de 655nm no conjugados y después de la bioconjugación con moléculas de IL 10.	36
Figura 1.29. Espectros de los PCs de 705nm de emisión a) no conjugados y b) conjugados con anticuerpo CAV 1 (Cavaolin 1) después de 30 minutos; c) después de 3 días a una temperatura de 50° C [82].	37

Figura 1.30. Espectros normalizados de fotoluminiscencia de PC's CdSe/ZnS de diferentes tamaños: (1) 3.2 nm ($\lambda = 525$ nm), (2) 3.5 nm ($\lambda = 560$ nm), (3) 5.1 nm ($\lambda = 605$ nm), (4) 6.3 nm ($\lambda = 640$ nm) [70].	38
Figura 1.31. Deconvolución del espectro de fotoluminiscencia en tres bandas elementales para los PCs de 560nm de emisión [70].	38
Figura 1.32. Espectro de fotoluminiscencia para muestras de PCs no conjugados (1) y conjugados (2) a una temperatura de 77 K [69].	39
Figura 2.1 Ejemplos de transiciones que producen luminiscencia: a) Transición a un estado excitado de energía y su posterior emisión; b) y c) Transición hacia un estado excitado y su posterior transición hacia estados intermedios no radiativos, donde un electrón puede quedar atrapado por un tiempo más prolongado y con la consecutiva emisión; d) Transición hacia un estado más alto de energía, con la consecutiva transición hacia un estado más bajo no radiativo y nuevamente hacia un estado más alto, con la consecutiva emisión de un fotón [71].	40
Figura 2.2. Arreglo experimental para medir fotoluminiscencia en el laboratorio de optoelectrónica de la ESFM.	41
Figura 2.3. Vista general del equipo empleado en el laboratorio de optoelectrónica de la ESFM.	41
Figura 2.4. Vista general del equipo empleado en el laboratorio de optoelectrónica de la ESFM	42
Figura 2.5. Equipo de Laser de He-Cd de 325nm y del laser de estado sólido de 535nm empleados en el laboratorio de optoelectrónica de la ESFM.	42
Figura 2.6. El detector fotomultiplicador empleado en las mediciones de esta tesis del laboratorio de optoelectrónica de la ESFM.	43
Figura 2.7. Vista general del equipo empleado en el laboratorio de la ESFM.	43
Figura 2.8. Diagrama del arreglo experimental	44
Figura 2.9. Esquema que representa las transiciones electrónicas de distintos tipos de espectroscopias vibracionales (ν_0 representa la frecuencia del láser). Mientras que V es el numero cuántico vibracional. El estado virtual es una distorsión de corta vida de la distribución de electrones ocasionada por el campo eléctrico de la luz incidente [72].	46
Figura 2.10. La polarización P inducida en una nube de electrones de una molécula por un campo eléctrico óptico incidente (la dispersión puede ocurrir en varias direcciones, se muestran a 90 y 180 grados).	46
Figura 2.11. Procesos de dispersión Raman A) en ausencia B) en presencia de partículas metálicas esferoidales.	48
Figura 2.12. Equipo de MicroRaman utilizado.	50
Figura 2.13. Punto cuántico con recubrimiento de polímero PEG y sus grupos funcionales presentes.	51
Figura 2.14. Diagrama de anticuerpo con enlaces de disulfuro presentes en su estructura.	52
Figura 2.15. Fragmentos de anticuerpo reducido.	52
Figura 2.16. Punto cuántico con fragmentos de anticuerpo conjugado.	53
Figura 2.17. Diagrama esquemático del proceso de Bioconjugación.	54
Figura 2.18. Etapa del proceso experimental de bioconjugación (ultrafiltración de los puntos cuánticos activados).	55

Figura 2.19. La campana de flujo laminar y la microcentrífuga utilizados en el proceso de bioconjugación.	55
Figura 2.20. El autor del presente trabajo realizando el proceso de bioconjugación... ..	55
Figura 2.21. Se muestran las partes constituyentes de puntos cuánticos recubrimientos, grupos funcionales así como anticuerpos presentes en la molécula bioconjugada, así como el sustrato donde se deposita la molécula.	56
Figura 2.22. Espectro absorción/emisión de los puntos cuánticos de 605nm proporcionado por Invitrogen [73].	57
Figura 2.23. Espectro absorción/emisión de los puntos cuánticos de 655nm proporcionado por Invitrogen [74].	57
Figura 2.24. Espectro absorción/emisión de los puntos cuánticos de 705nm proporcionado por Invitrogen [109].	57
Figura 2.25. Espectro absorción/emisión de los puntos cuánticos de 800nm proporcionado por Invitrogen [110].	58
Figura 3.1. Detalle de ajustes con curvas Gaussianas	60
Figura 3.2. Ajustes de los espectros de fotoluminiscencia con curvas Gaussianas para la muestra de 605 bioconjugadas con anticuerpo IL-10.	62
Figura 3.3. Espectros de las muestras de 605nm con y sin biomoléculas.	64
Figura 3.4. Espectros de 605nm de emisión característica con y sin biomoléculas.....	65
Figura 3.5. Espectros de las muestras de 605nm con y sin biomoléculas.	66
Figura 3.6. Ajuste con curvas Gaussianas de la muestra de 655nm sin biomoléculas.	67
Figura 3.7. Espectros de PL de los Kits 655-1 y 655-2.	69
Figura 3.8. Espectros de PL de los dos Kits de 655nm.	69
Figura 3.9. Comparación de espectros de 655nm	70
Figura 3.10. Los máximos de emisión de los espectros de la muestra 655P.....	72
Figura 3.11. Comparación entre espectros de 655nm con y sin bioconjugación.....	73
Figura 3.12. Comparación entre espectros de puntos cuánticos conjugados y no conjugados.	74
Figura 3.13. Comparación entre espectros de 655nm con y sin biomoléculas.....	75
Figura 3.14. Espectros de fotoluminiscencia de PBS.....	76
Figura 3.15. Espectros de fotoluminiscencia de las muestras de 705nm sin biomoléculas con ajuste gaussiano.....	78
Figura 3.16. Espectros de fotoluminiscencia de las muestras de 705nm con biomoléculas.	79
Figura 3.17. Espectros de fotoluminiscencia de las muestras de 705nm con (705P) y sin (705N) biomoléculas.....	81
Figura 3.18. Espectros de Fotoluminiscencia de las muestras de 705nm con (705P) y sin (705N) biomoléculas.....	82
Figura 3.19. Espectros de Fotoluminiscencia de las muestras de 705nm con (705P) y sin (705N) biomoléculas.....	83
Figura 3.20. Espectros de fotoluminiscencia de la muestra de 800nm con ajuste gaussiano.	85
Figura 3.21. Espectros de fotoluminiscencia	86
Figura 3.22. Espectros de Fotoluminiscencia de las muestras sin (800N) y con (800P) biomoléculas.	87

Figura 3.23. Espectros de fotoluminiscencia de 800nm con (800N(2)) y sin (800P(2)) biomoléculas.	88
Figura 3.24. Espectros de fotoluminiscencia de las muestras de 800nm con (800P (3)) y sin (800N (3)) biomoléculas.....	89
Figura 3.25. Espectros de fotoluminiscencia de 605nm con y sin bioconjugación.....	91
Figura 3.26. Espectros de fotoluminiscencia de las muestras de 655nm con y sin bioconjugación.....	92
Figura 3.27. Espectros de fotoluminiscencia de 705nm con y sin bioconjugación.....	93
Figura 3.28. Espectros de fotoluminiscencia de la muestra de 800nm con y sin bioconjugación.....	94
Figura 3.29 Espectros fotoluminiscencia de núcleo CdSe.....	95
Figura3.30. Espectros de Fotoluminiscencia de las muestras de núcleo con composición CdSeTe.....	97
Figura 3.31. Grafica de diámetro del núcleo vs Banda prohibida de las distintas composiciones químicas del núcleo usando la ecuación 3.1.....	100
Figura 3.32. Diámetro de las partículas vs el cambio energético de la emisión máxima de las muestras en el proceso de bioconjugación, con barras de error obtenidas mediante la desviación estándar, línea roja: ajuste con datos del núcleo de las partículas; línea negra: ajuste con datos del núcleo/coraza.....	103
Figura 3.33. Diagrama energético de la heteroestructura de CdSe/ZnS en bulto.....	105
Figura 3.34. Diagrama energético de la heteroestructura de CdSe/ZnS para la muestra de 655nm.....	105
Figura 3.35. Diagrama energético de la heteroestructura de CdSe/ZnS para la muestra de 605nm.....	106
Figura 3.36. Diagrama energético de la heteroestructura de CdSe ₈₅ Te ₁₅ /ZnS para la muestra de 705nm.....	106
Figura 3.37. Diagrama energético de la heteroestructura de CdSe ₅₀ Te ₅₀ /CdSe ₇₀ Te ₃₀ /ZnS para material en bulto.....	107
Figura 3.38. Diagrama energético de la heteroestructura de CdSe ₅₀ Te ₅₀ / CdSe ₇₀ Te ₃₀ /ZnS para la muestra de PCs de 800nm.....	108
Figura 3.39. Esquema que muestra la forma en la que los PCs cambian la distribución en el espectro de fotoluminiscencia de acuerdo a la cantidad de fragmentos de anticuerpos que se unen a ellos.....	109
Figura 3.40. Esquema que muestra el efecto Stark en los puntos cuánticos bioconjugados.....	110
Figura 3.41. Efecto Stark en diagrama de bandas.....	110
Figura 4.1. Espectros Raman de la muestra de 605nm con (605+IL10) y sin bioconjugación (605N), de anticuerpo solo (IL 10) depositado sobre el sustrato y del sustrato solo (Silicio), se muestran los espectros en escala completa.....	112
Figura 4.2. Espectros Raman de la muestra de 605nm con (605+IL10) y sin bioconjugación (605N), de anticuerpo solo depositado el mismo sustrato (IL 10) y del sustrato solo de silicio (Silicio), se muestran en una escala más pequeña.....	113
Figura 4.3. Espectros Raman de las muestras bioconjugadas (605+IL10) y sin bioconjugación (605N) de 605nm, de anticuerpo IL 10 depositado sobre el sustrato de silicio, y de sustrato de Silicio solo.....	116

Figura 4.4. Espectros de las muestras de puntos cuánticos bioconjugados y sin bioconjugar, de anticuerpo IL 10 y de Silicio solo.	120
Figura 4.5. Fotografía tomada a la muestra de 655nm bioconjugada con anticuerpo de IL 10 aumento de x10 (pequeña) y de x50 (grande).	123
Figura 4.6. Fotografía de la muestra de 655nm sin biomoléculas aumento de x50. ...	123
Figura 4.7. Espectros Raman de las muestras de 655nm bioconjugadas y sin bioconjugacion, de anticuerpo de IL 10 y de Silicio solo; se muestra escala completa.	124
Figura 4.8. Espectros Raman de las muestras de 655nm bioconjugadas y sin bioconjugación, de anticuerpo de IL 10 y de Silicio solo, se muestran detalles de picos pequeños.	125
Figura 4.9. Espectros Raman para las muestras de 655nm bioconjugadas, sin bioconjugar, de anticuerpo IL 10 y de Silicio solo.	128
Figura 4.10. Espectros Raman de las muestras de 655nm bioconjugada y sin bioconjugar, de anticuerpo IL 10 y de Silicio solo.	132
Figura 4.11. Espectros de muestras de puntos cuánticos no bioconjugados y sustrato de silicio, se muestran los picos en escala completa.	135
Figura 4.12. Espectros de muestras de puntos cuánticos no bioconjugados y sustrato de silicio, se muestran los picos en escala reducida.	136
Figura 4.13. Espectros de muestras de puntos cuánticos no bioconjugados.	136

Lista de tablas.

Tabla 1.1 Algunas características de las inmunoglobulinas; la vida media es en suero [83].	20
Tabla 2.1 Componentes de los kits de bioconjugación	59
Tabla 3.1 Comparación de las áreas y anchos medios a la mitad del máximo presentes en los espectros medidos.	61
Tabla 3.2. Se muestran las áreas normalizadas y los anchos medios a la mitad del máximo característicos de cada una de las mediciones de los espectros.	63
Tabla 3.3 Comparación de los espectros bioconjugados y no bioconjugados de puntos cuánticos de 605nm de emisión característica.	63
Tabla 3.4 Comparación entre los valores principales de los espectros de muestras de 605nm con y sin biomoléculas.	64
Tabla 3.5. Comparación entre los valores principales de los espectros de muestras de 605nm con y sin biomoléculas.	65
Tabla 3.6 Los datos de las tres mediciones de los espectros de la figura 3.6.	68
Tabla 3.7. Comparación de los parámetros de la figura 3.7.	68
Tabla 3.8. Comparación de los parámetros de cada espectro de los Kits 655nm.	70
Tabla 3.9. Comparación de datos de los dos kits de 655N.	71
Tabla 3.10 Comparación de datos entre mediciones de la muestra bioconjugada de 655P	71
.....	71
Tabla 3.11. Parámetros de espectros de 655 con y sin bioconjugación	73
Tabla 3.12. Comparación de datos entre espectros de 655nm con y sin biomoléculas.	74
.....	74
Tabla 3.13. Comparación de datos entre espectros de 655nm con y sin biomoléculas.	75
.....	75
Tabla 3.14 Parámetros de Fotoluminiscencia.	76
Tabla 3.15. Parámetros de fotoluminiscencia de la figura 3.15.	78
Tabla 3.16 Parámetros de la figura 3.16.	80
Tabla 3.17. Parámetros de la figura 3.17.	80
Tabla 3.18 Parámetros de la figura 3.18.	82
Tabla 3.19. Parámetros de la figura 3.19.	83
Tabla 3.20. Parametros de la figura 3.20.	84
Tabla 3.21. Parámetros de la figura 3.21.	86
Tabla 3.22. Parámetros de la figura 3.22.	88
Tabla 3.23. Parámetros de la figura 3.23.	89
Tabla 3.24. Parámetros de la figura 3.24.	90
Tabla 3.25. Parámetros de la figura 3.25.	91
Tabla 3.26. Parámetros de la figura 3.26.	92
Tabla 3.27. Parámetros de la figura 3.27.	93
Tabla 3.28. Parámetros de la figura 3.28.	94
Tabla 3.29. Parametros de la figura 3.29.	96
Tabla 3.30. Parámetros de la figura 3.30.	97
Tabla 3.31. Valores de fonones en diferentes estructuras semiconductoras.	99

Tabla 3.32. Picos Raman obtenidos experimentalmente.	100
Tabla 3.33. Diámetros de las diferentes muestras.....	101
Tabla 3.34. Calculo de cambios energéticos de los picos de emisión máxima de las diferentes muestras con y sin bioconjugación.	101
Tabla 3.35. Parámetros obtenidos para cada tamaño de PCs.	102
Tabla 3.36. Afinidad electrónica de materiales en bulto [119].	104
Tabla 4.1. Asignación de picos Raman de la figura 4.2.	114
Tabla 4.2. Asignación de picos Raman de la figura 4.3.	118
Tabla 4.3. Asignación de picos Raman de la figura 4.3.	119
Tabla 4.4. Asignación de picos Raman de la figura 4.4.	121
Tabla 4.5. Picos Raman característicos del silicio	122
Tabla 4.6 Asignación de los picos Raman de la figura 4.8.	127
Tabla 4.7. Asignación de picos Raman de la figura 4.9.	130
Tabla 4.8. Asignación de Picos Raman de la figura 4.9.	131
Tabla 4.9 Asignación de Picos Raman de la figura 4.10.	133
Tabla 3.31. Valores de fonones en diferentes estructuras semiconductoras.	137
Tabla 3.32. Picos Raman obtenidos experimentalmente.	138

Introducción general

El avance de la tecnología de los últimos años, nos ha permitido presenciar la miniaturización de gran parte los materiales y dispositivos para diferentes aplicaciones. El desarrollo de los materiales nanométricos de basa en sus peculiares características que los hacen únicos, esto permite vislumbrar un panorama muy amplio, donde los nanomateriales sean empleados para el avance, mejora y creación de dispositivos y técnicas en diversas áreas.

La nanotecnología llevo a ser una palabra clave en la investigación científica así como del interés público desde principios de los 90's, y una rama importante de esta es la nano biotecnología un área interdisciplinaria que atrae el interés de químicos, físicos, biólogos ingenieros, etc.

Entre las diferentes aéreas de investigación podemos encontrar:

- 1) El desarrollo de métodos de construcción de nanoestructuras y materiales nanoestructurados con componentes biológicos o biológicamente inspirados como proteínas, virus, células etc. Estas estructuras son destinadas a aplicaciones biológicas y no biológicas.
- 2) El uso de nano materiales sintéticos para regular y monitorear importantes procesos biológicos.
- 3) El desarrollo de materia suave y sintética compatible con los instrumentos analíticos para la construcción de nano estructuras importantes para la biología y medicina.

Los nanocristales son partículas nanométricas que contienen de unos pocos cientos a decenas de millares de átomos los cuales están ordenadas en una estructura cristalina, en la cual el movimiento de los electrones está confinado por una barrera de potencial en todas las direcciones.

Los cristales semiconductores comúnmente llamados puntos cuánticos (PCs, PCS) son vistos como un átomo artificial, en los cuales los niveles de energía son discretos tanto como en una molécula o en un átomo, sin embargo, la diferencia consiste en que la distancia de los niveles de energía puede ser manipulada mediante la variación del tamaño del nanocristal.

Los puntos cuánticos son altamente fluorescentes lo cual los hace muy atractivos como una alternativa a los marcadores orgánicos y proteínas fluorescentes en muchos casos. Además, aplicando los PCS se evita el trabajo con sustancias radioactivas, que actualmente se aplican en varios laboratorios para estudios de los procesos biológicos.

Justificación

El presente trabajo surge de la necesidad de conocer y dominar las estrategias de bioconjugación de puntos cuánticos de estructura núcleo-coraza de CdSe/ZnS con anticuerpos de Interleucina 10 (IL 10). El proceso de bioconjugación es fundamental para obtener partículas que puedan interactuar en procesos biológicos y así realizar no solo detección temprana de cáncer, sino visualizar una variedad de procesos. Estas partículas pueden caracterizarse con nuevas técnicas que puedan de manera rápida dar respuestas a incógnitas aún pendientes por resolver.

En los datos que se encuentran en la literatura respecto a espectroscopia de fotoluminiscencia, se han analizado espectros de diferentes tamaños de puntos cuánticos, sin embargo todos varían en cuanto a su morfología y sus intensidades. Además no existen muchos estudios sobre los efectos de bioconjugación con diferentes moléculas biológicas, sin mencionar específicamente de los de anticuerpos de diferentes enfermedades. En este trabajo se observan y se explican nuevos fenómenos que permiten aportar importantes datos para corroborar y aumentar los conocimientos en la materia.

En cuanto a espectroscopia Raman hay pocos datos acerca de los espectros de puntos cuánticos de CdSe/ZnS y no existe información con respecto a investigaciones de puntos cuánticos CdSeTe/ZnS. Los datos existentes solo se enfocan a los cambios observados antes y después de la bioconjugación. En el presente trabajo se hace un análisis mucho más profundo de espectro Raman, observando las características tanto de sustrato donde son depositados, del anticuerpo utilizado, y de los puntos cuánticos con diferente composición antes de la bioconjugación y después de la bioconjugación; por lo cual aporta más datos que puedan servir para analizar las características de todos los procesos involucrados.

Es necesario obtener la mayor cantidad posible de información acerca de sus propiedades ópticas (Fotoluminiscencia y Raman), ya que son las que se emplearán, en un futuro cercano para la detección temprana de cáncer o de otras enfermedades del ser humano. Además, este campo de aplicaciones puede extenderse a otras áreas como biología, medicina etc., una vez que se conozcan todas sus propiedades.

Objetivo general.

Realizar el proceso de bioconjugación de los puntos cuánticos de CdSe/ZnS núcleo-coraza de diferentes tamaños (de emisión 605nm y 655nm) y de CdSeTe/ZnS (con emisión 705nm y 800nm) con moléculas de anticuerpo de Interleucina 10 (IL-10) y el estudio de las propiedades ópticas de estas muestras bioconjugadas y no conjugadas, por medio de las técnicas de espectroscopia de fotoluminiscencia y Raman.

Objetivos particulares.

1. Realizar la bioconjugación de los puntos cuánticos de emisión 605nm, 655nm, 705nm y 800nm con moléculas de anticuerpo de IL 10.
2. Estudiar la fotoluminiscencia de los puntos cuánticos con emisión de 605nm, 655nm, 705nm y 800nm no conjugados y bioconjugados con moléculas de anticuerpo de IL 10.
3. Estudiar los espectros Raman de los puntos cuánticos núcleo/coraza con emisión de 605nm, 655nm, 705nm y 800nm no conjugados y bioconjugados con moléculas de anticuerpo de IL 10.
4. Realizar la comparación de los efectos obtenidos en puntos cuánticos de CdSe/ZnS y CdSeTe/ZnS no conjugados y bioconjugados.

Capítulo 1: Estado del arte

1.1 Efectos cuánticos debidos al tamaño.

Los efectos cuánticos debidos al tamaño observados en puntos cuánticos semiconductores (PCs) como Si, Ge, SiC...etc., han sido objeto de estudios durante las últimas dos décadas, empezando por la fotoluminiscencia visible descubierta en el silicio poroso. Esta atención fue motivada por las prometedoras aplicaciones de los PCs en dispositivos electrónicos y opto electrónicos basados en silicio (Si) así como por el interés en las propiedades físicas de los sistemas nanodimensionales con los efectos cuánticos [4].

Estos efectos son debidos a la reducción del tamaño de los PCs a unos cuantos nanómetros, que corresponde al mismo orden de magnitud que el llamado radio de Bohr. Los estados de energía de los portadores libres (electrones y huecos) están cuantizados en un cristal semiconductor. El movimiento de estos electrones y huecos está determinado por mecanismos cuánticos llamados efectos de confinamiento cuántico. Es por ello que los nanocristales son llamados puntos cuánticos.

La evidencia de los efectos cuánticos debidos al tamaño nanométrico de semiconductores provocados por excitones confinados, fue demostrada a principios de los 80's en PCs dispersos en vidrio en cristales alcali-haluros o en líquidos [1-2]. En PCs la consecuencia más importante del confinamiento cuántico es la aparición de niveles localizados de energía de los electrones y huecos, incrementando el nivel de energía de la banda prohibida y de las transiciones entre las bandas de absorción y luminiscencia.

Este efecto está asociado con el incremento de probabilidad de las transiciones ópticas también. El primer modelo teórico para los efectos cuánticos asociados al tamaño en los PCs el cual fue reportado en 1982 [3], estuvo basado en la aproximación de masa efectiva (effective mass approximation EMA) con bandas de energía parabólicas. Para PCs de forma esférica con radio promedio a y para barreras de potencial infinito en la interfaz del PC. El fenómeno del efecto cuántico debido al tamaño está gobernado por las relaciones entre los parámetros de tamaño: a , a_{Be} , a_{Bh} , a_B [3]:

$$a_{Be} = \frac{\hbar^2 \epsilon}{m_e^* e^2} \quad (1) \quad a_{Bh} = \frac{\hbar^2 \epsilon}{m_h^* e^2} \quad (2) \quad a_B = \frac{\hbar^2 \epsilon}{\mu e^2} \quad (3)$$

Donde a_{Be} , a_{Bh} , a_B , son los radios de Bohr de un electrón, un hueco, y un excitón, respectivamente, e es la carga del electrón, m_e^* , m_h^* son las masas efectivas de electrones y huecos para semiconductores con permitividad ϵ y μ es la masa reducida del par electrón hueco $\mu^{-1} = m_e^{*-1} + m_h^{*-1}$.

Los PCs se caracterizan por las propiedades inherentes de un cristal en bulto, y el tamaño finito de PCs fue incluido en consideración usando la barrera de potencial en la interface de PCs. Los valores de los parámetros como a , a_{Be} , a_{Bh} , a_B , son esencialmente más grandes que la constante de red para la mayoría de los semiconductores. Como resultado los PCs incluyen un gran número de átomos que están distribuidas en forma de red cristalina. De esta forma, en el

caso de EMA, las masas efectivas de electrones y huecos en NCs corresponden siempre al cristal ideal infinito del mismo material.

La palabra nanocristales es usada, como regla, si el tamaño del NC, a , es más grande q los parámetros: a_{Be} , a_{Bhv} a_B . De la misma forma, los NC pueden ser considerados como cajas cuánticas para electrones, huecos o excitones si el tamaño es comparable con los parámetros de tamaño ya mencionados. Estos puntos cuánticos de semiconductores son considerados como átomos artificiales debido a su similitud entre los niveles discretos de energía entre estos y los átomos [4].

Puesto que los niveles de energía de los PCs son dependientes del tamaño estos pueden ser ajustados de forma controlada sintetizando diferentes tamaños de NCs de la misma composición. Los niveles de energía de estos nanocristales contribuyen a las propiedades ópticas y fotónicas extraordinarias.

Los semiconductores se caracterizan por una banda de valencia y una banda de conductividad, separadas por la llamada banda prohibida (band gap Bg). En el efecto de luminiscencia, para los semiconductores de banda directa, un fotón con suficiente energía puede excitar a un electrón de la banda de valencia y hacerlo entrar a la banda de conductividad, dejando un hueco de carga positiva en la banda de valencia. Posteriormente ocurre un relajamiento del electrón en la banda de conductividad y este regresara a su estado base en la banda de valencia en el proceso de recombinación con el hueco existente en esta última, este relajamiento estará acompañado de la emisión de un fotón con la misma energía que la banda prohibida.

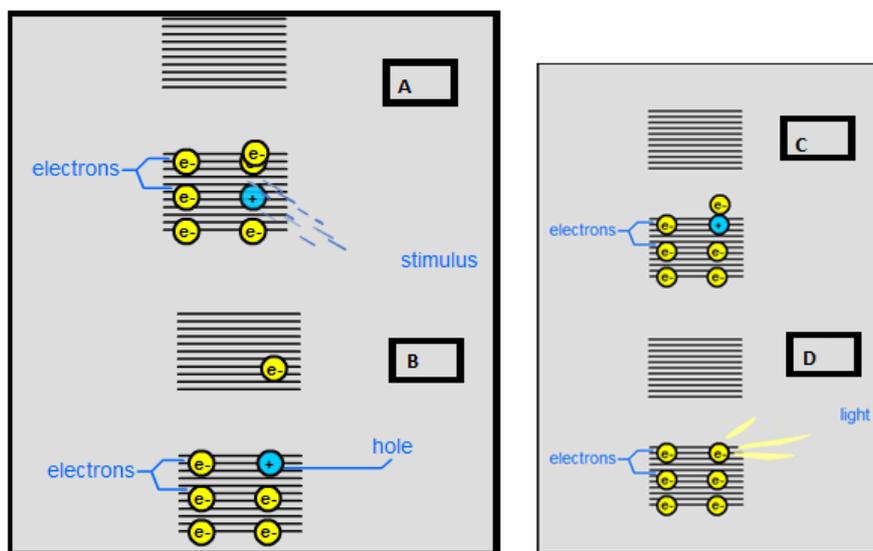


Figura 1.1. Proceso de Fotoluminiscencia: A) El material recibe un estímulo luminoso, B) Un electrón de la zona de valencia entra a la banda de conductividad, C) El electrón se relaja y decae hacia la banda de valencia, D) El electrón emite un fotón con la energía de la banda prohibida [61].

Una de las características de los materiales en bulto y de los sólidos cristalinos es que sus propiedades ópticas no cambian cuando su tamaño varía. Sin embargo, para los materiales nanométricos ocurren cambios significativos en sus propiedades, a veces, incluso, algunas propiedades cambian completamente comparando con los materiales en bulto. Existen dos efectos más importantes debido a los cuales suceden estos cambios. El primero es que el radio de los átomos de la superficie en un nano cristal es mucho más grande que en un material en bulto. El segundo es que las propiedades intrínsecas de los NCs son transformadas por los efectos cuánticos debidos al tamaño descritos anteriormente.

Las características ópticas y eléctricas debidas al confinamiento cuántico derivan de los cambios en la densidad electrónica de estados que fueron estudiados en los años 80s [5-7], y fueron desarrolladas tiempo después por Brus y colaboradores [8,9]. Desde el punto de vista de la química cuántica (fig. 1.2), en un PC los excitones se comportan de manera similar al átomo de hidrogeno y pueden ser descritos con un modelo semejante. A diferencia de los materiales en bulto, donde los electrones y huecos son libres de moverse, en un PC estos están confinados en el espacio. Este confinamiento provoca un incremento de la energía similar al modelo de una partícula en una caja.

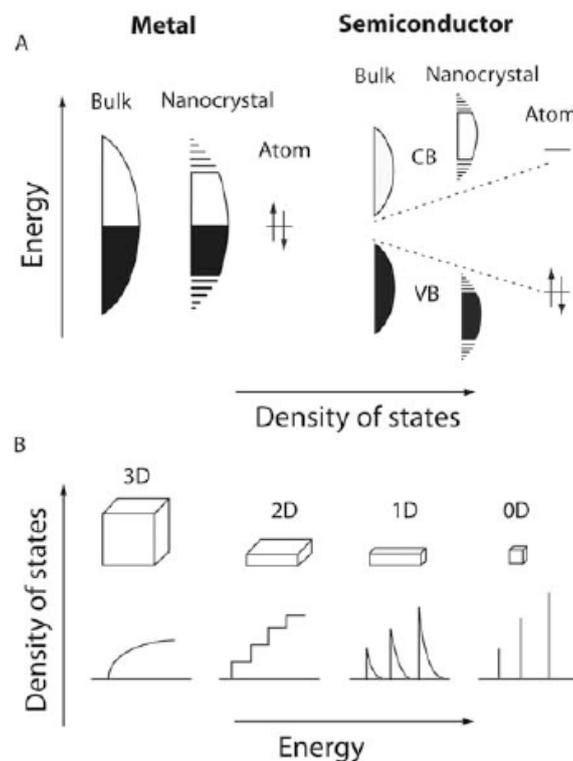


Figura 1.2. (A) Representación esquemática de la densidad de estados en un metal y un semiconductor de acuerdo a Alivisatos [86,87]: (A) en cada uno de los casos, las líneas discontinuas muestran el incremento de la separación de la banda prohibida desde un material en bulto a una molécula, entre la banda de valencia (VB) y la banda de conducción (CB). (B) la densidad de estados idealizada en una banda de un semiconductor en función de la libertad dimensional. 3D para un material en bulto, 2D para películas delgadas, 1D para nanoalambres o fibras, y 0D para puntos cuánticos.

Las propiedades ópticas de los PCs están relacionadas con la estructura electrónica la composición química y los efectos debidos al tamaño. El decremento del tamaño del cristal causa el cambio de absorción y puede variar prácticamente en toda la gama visible del espectro electromagnético (de 400 a 1350 nm) (figura 1.3).

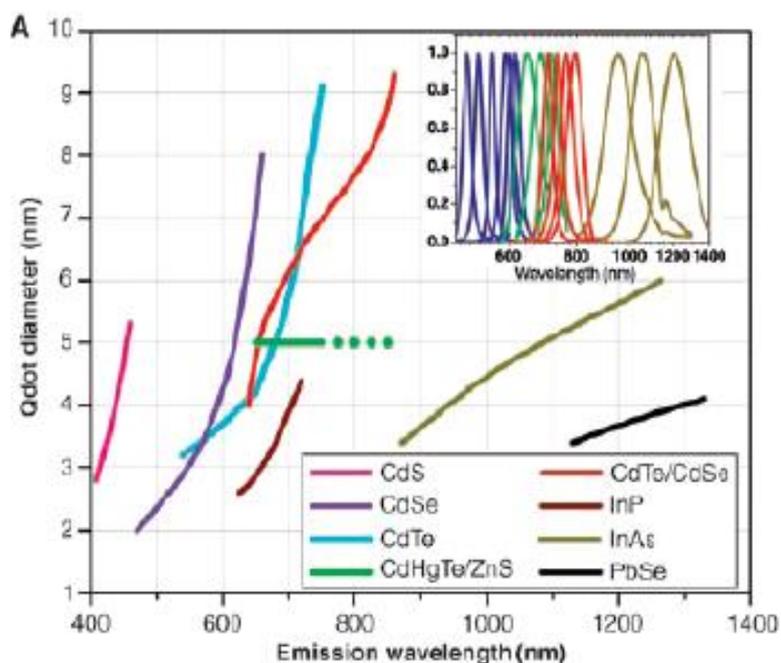


Figura 1.3. Emisión máxima y tamaños de puntos cuánticos de diferente composición. Los puntos cuánticos pueden ser sintetizados a partir de varios tipos de materiales semiconductores (de los grupos II-VI: CdS, CdSe, CdTe...; grupos III-V: InP, InAs,...; grupo IV-VI: PbSe...) y caracterizados por las diferentes energías de bandas prohibidas en material en bulto. Las curvas representan datos experimentales en dependencia de la emisión (pico de la longitud de onda) con respecto al diámetro del punto cuántico, el rango de la emisión de la longitud de onda es de 400 a 1350nm, con variación del diámetro de 2 a 9.5nm [62].

Los puntos cuánticos al presentar mejores propiedades fluorescentes que los materiales fluoróforos orgánicos pueden ser una alternativa para el análisis clínico de diversos padecimientos, con un principal enfoque hacia la detección temprana de cáncer.

Para producir imágenes ópticas de análisis clínicos se utilizan materiales fluoróforos, (por lo regular compuestos orgánicos, lantánidos, etc.). Cuando un fluoróforo se excita con un cuanto de energía específica (fotón), sus electrones cambian del nivel básico de energía a uno más alto. Durante este proceso el electrón pierde una parte de energía obtenida, generalmente debido a emisión de fonón y como resultado se emite un fotón de energía más baja.

Debido a este proceso de emisión de luz, el electrón de un estado de energía elevada vuelve a su estado normal. Los fluoróforos se dividen en dos categorías amplias: endógenos (los que se usan directamente in vivo) y exógenos (los que se usan in vitro). Al segundo grupo pertenecen agentes contrastantes basados en nano partículas [10].

Los PCs pertenecen a una nueva clase de biomarcadores luminiscentes, que superan las limitaciones de los marcadores orgánicos convencionales. La longitud de onda de la fluorescencia (color) depende del tamaño de la nano partícula. Además, los PCs de semiconductores son extremadamente estables y pueden estar expuestos a ciclos de excitación y fluorescencia durante varias horas sin pérdida de su eficiencia. Algunas de sus propiedades más importantes son: anchos específicos de excitación y estrechos espectros de emisión, resistencia a degradación metabólica, altos coeficientes de extinción y posibilidad para ser conjugados con las biomoléculas [11].

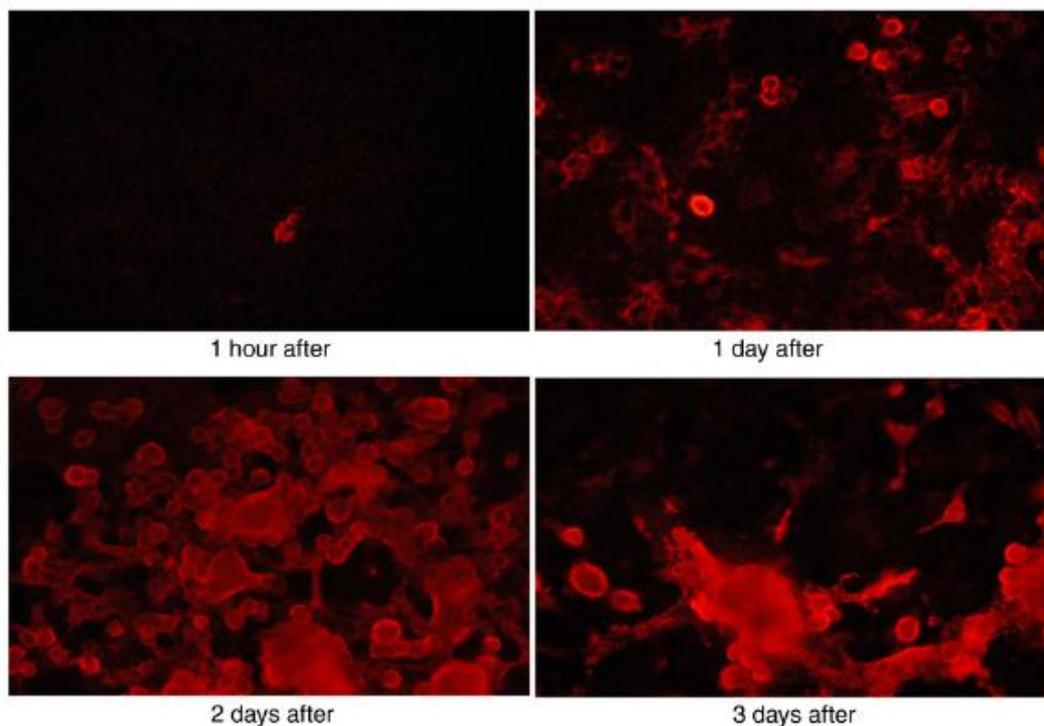


Figura 1.4. Progreso de una infección del Virus Sincicial humano (RSV) monitoreado con puntos cuánticos bioconjugados. Inmediatamente después de una hora el (RSV) había sido identificado [64].

Recientemente, PCs de semiconductores se están utilizando en estudios biológicos para producir imágenes luminiscentes de células (figura 1.4) o reacciones bioquímicas, por ejemplo, la reacción antígeno-anticuerpo para el estudio de cánceres. Estas imágenes se producen de células biológicas bajo iluminación con luz ultravioleta (UV) o visible y se pueden observar a través del microscopio óptico.

1.1.1 Anticuerpo de Interleucina 10

La interleucina 10 (IL-10) (figura 1.5) es una citoquina pleiotrópica que ha sido considerada tradicionalmente como inmunosupresora y anti-inflamatoria. Diferentes poblaciones celulares como células presentadoras de antígeno, (macrófagos, células dendríticas, etc.), linfocitos T (efectores del subtipo Th2 y linfocitos T reguladores), producen IL-10. Recientemente se ha demostrado que incluso los linfocitos T del subtipo Th1 también producen IL-10 en estados

terminales de diferenciación, como un mecanismo de inhibición de la respuesta inflamatoria, para minimizar el daño inmunopatológico [89].

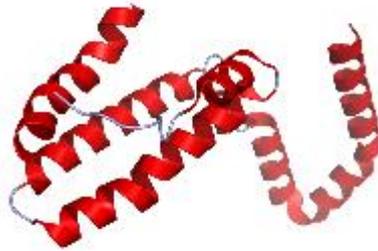


Figura 1.5. Esquema de la Interleucina 10 [88].

Algunos de los típicos efectos anti-inflamatorios de la IL-10 tienen lugar mediante la inhibición de las funciones de las células presentadoras de antígeno, disminuyendo su capacidad de producir citoquinas como IL-12 o TNF-alfa, así como la expresión de moléculas de MHC o co-estímulo necesarias para el desencadenamiento de las respuestas inflamatorias. Esto ha llevado a que el uso de esta citoquina se propone para el tratamiento de determinados procesos inflamatorios agudos o crónicos o en enfermedades autoinmunes [89].

En condiciones normales existe un equilibrio entre las funciones anti-inflamatorias de IL-10 y la capacidad de activación de una respuesta inmunitaria eficaz para combatir a agentes extraños. Sin embargo, en el caso de determinadas infecciones crónicas o de algunos tipos de cáncer, se ha visto que existe una sobreproducción de IL-10, que debido a las propiedades mencionadas anteriormente, impiden la correcta activación de una respuesta inmunitaria capaz de erradicar al agente infeccioso o a las células tumorales. Así, se ha demostrado que infecciones crónicas como la causada por el virus de la hepatitis C, se asocian a niveles superiores de IL-10, producida por linfocitos Th2 específicos de antígenos virales o por células T reguladoras, entre otros tipos celulares.

Además, recientemente se ha demostrado en un modelo animal de infección viral crónica que el factor clave que determina la cronificación de una infección versus la eliminación viral es IL-10. Así, en animales que carecen de IL-10 o en los que la interacción IL-10/IL-10R ha sido bloqueada, el desencadenamiento de respuestas antivirales eficaces es perfectamente funcional. Del mismo modo que en el caso de las infecciones, la falta de control inmune frente al crecimiento tumoral se ha asociado en diferentes modelos a una sobre-producción de IL-10.

En este tipo de modelos animales se ha demostrado que la inhibición de IL-10 podría tener un efecto benéfico sobre el desencadenamiento de respuestas inmunitarias. Todos estos datos sugieren que el desarrollo de nuevos compuestos que sean capaces de inhibir el efecto biológico de la IL-10 podría tener una gran repercusión en el tratamiento de diferentes infecciones o en el cáncer [89].

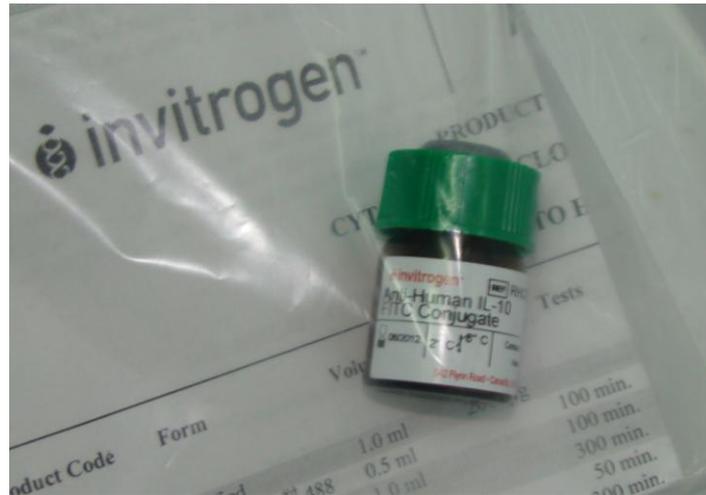


Figura 1.6. Imagen del frasco contenedor del anticuerpo IL-10.

Para la realización de esta tesis, se necesita un anticuerpo (figura 1.6) capaz de identificar a esta citoquina. Por esta razón se utilizó un anticuerpo del tipo IgG de ratón de un isotipo, 1 el cual de acuerdo a la literatura es capaz de reconocer la interleucina 10 (IL 10) [75] viral y humana; así como inhibir la función biológica de la IL 10 [75-77].

1.1.2 Inmunoglobulina

Como inmunoglobulina [83] se designa a todas las sustancias con capacidad de anticuerpo, debido a que son capaces de reconocer distintas toxinas bacterianas. Se conocen 5 tipos de inmunoglobulinas, cada una con características distintas como lo veremos en la tabla 1.1

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas que están formadas por cadenas polipeptídicas agrupadas, dependiendo del tipo de inmunoglobulina en una o varias unidades básicas.

1.1.3 Unidad básica

Cada unidad (figura 1.7) está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes de disulfuro y otras uniones de tipo no covalente.

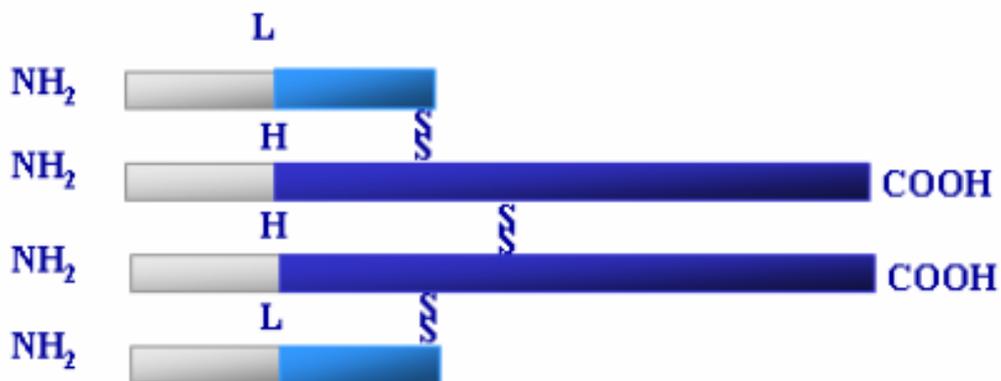


Figura 1.7. Unidad básica de inmunoglobulinas constituida por dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras(L)[83].

Tabla 1.1 Algunas características de las inmunoglobulinas; la vida media es en suero [83].

Algunas características bioquímicas de las inmunoglobulinas					
Clase	PM	Coficiente* sedimentación	Velocidad síntesis**	Vida media(%) (días)	carbohidratos
IgG	150.000	6,5	28	30	2,5
IgA	160.000	7,7	10	8	10
IgM	900.000	19	7	10	11
IgD	180.000	7	0,016	0,4	10
IgE	280.000	8	0,0005	---	10

*(S),Unidad svedberg ** (mg/Kg/día)

1.1.4 Cadenas ligeras

Hay dos tipos de cadenas ligeras [83], estructuralmente diferentes, que se conocen como cadenas ligeras tipo kappa (k) y cadenas tipo lambda (l). La familia de genes que codifica para la cadena ligera k se localiza en el cromosoma 2 y los loci (un **locus** (del latín *locus*, lugar; plural *loci*) es una posición fija sobre un cromosoma) de los genes homólogos que codifican para la cadena l, en el cromosoma 22. En cada molécula de inmunoglobulina las dos cadenas ligeras son del mismo tipo, k o bien l, pero nunca existe una de cada tipo en la misma inmunoglobulina.

Las cadenas ligeras están formadas por unos 200 aminoácidos con la particularidad de que existen dos puentes de disulfuro que unen grupos de unos cincuenta aminoácidos.

Concretamente la IgG1 posee 214 aminoácidos y su estructura secundaria y terciaria están determinadas por dos puentes disulfuro intracatenarios que unen los aminoácidos 23 con el 88 y 134 con el 193, (Figura 1.8). A su vez, estas cadenas ligeras tienen otro puente disulfuro intercatenario, por el cual cada una de ellas se une a una cadena pesada para constituir la unidad básica de las inmunoglobulinas. Este puente se encuentra en el último aminoácido (214) de la parte carboxílica para el tipo k y en el penúltimo para el tipo l.

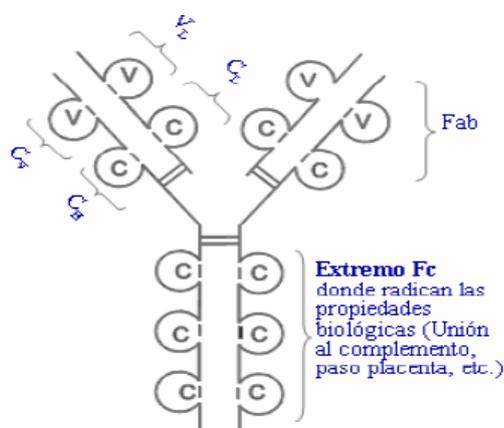


Figura 1.8. Unidad básica de una inmunoglobulina en la que se indican los bucles de cadenas tanto ligeras (L) como pesadas (H)[83].

1.1.5 Cadenas pesadas.

Estas cadenas (figura 1.9) poseen unos cuatrocientos aminoácidos estableciéndose entre algunos de ellos puentes disulfuro (intracatenarios) que asocian unos 60 aminoácidos y que condicionan la estructura secundaria del polipéptido. Por ejemplo, las cadenas pesadas de la IgG1 poseen 440 aminoácidos y los puentes disulfuro unen el aminoácido 22 con el 96, el 144 con el 200, el 261 con el 321 y el 367 con el 425.

Estas dos cadenas pesadas están unidas la una a la otra por puentes disulfuro intercatenarios, ya indicados anteriormente, y que pueden ser de uno a cinco dependiendo del tipo de inmunoglobulina [83].

En estas cadenas pesadas, y a nivel de los puentes disulfuro intercatenarios, hay una zona de unos 15 aminoácidos, de gran flexibilidad debido a su estructura y constituye lo que se denomina zona bisagra por donde se deforma la molécula de inmunoglobulina cuando se produce la unión con el antígeno, facilitándose así su acoplamiento con éste. Los loci (posiciones fijas sobre un cromosoma) de los genes que codifican para la cadena pesada se localizan en el brazo largo del cromosoma 14.

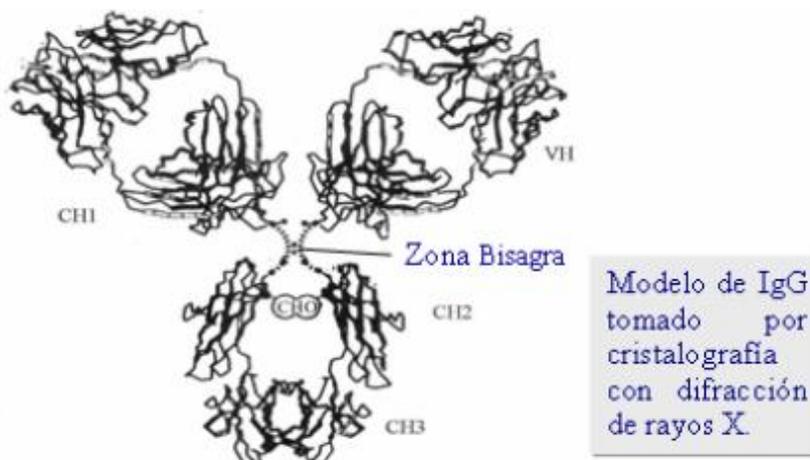


Figura 1.9. Imagen tomada por el método de difracción de rayos X [83].

1.2 Síntesis y Modificación de superficie de los puntos cuánticos.

Generalmente la preparación de nano partículas para la producción de imágenes biomédicas ocurre a través de las siguientes etapas [12]:

- Síntesis del núcleo de PCs por métodos que van desde el depósito de átomos en las fases sólidas hasta la síntesis coloidal en solución acuosa (figura 1.10) [13-16]. Sin embargo, debido a que el espectro de emisión de los PCs tiene menor anchura cuando las partículas son monodispersas en tamaño, los PCs de CdSe de mejor calidad se

pueden preparar a partir de los precursores pirofóricos como $\text{Cd}(\text{CH}_3)_2$ y de Selenio elemental en trioctilfosfina (TOP)/óxido de trioctilfosfina (TOPO) o hexadecilamina (HDA) a temperaturas de 250- 350° C [17, 18].

Más recientemente se demostró, que los PCs de CdSe o CdS se pueden formar a partir de otros precursores como CdO (Fig.10), $\text{Cd}(\text{OAc})_2$ [19] y de CdCO_3 [20, 21]. Para los PCs de CdS también se reportan algunos métodos de síntesis a temperatura ambiente [22-25]. Otro método para la preparación de núcleos cubiertos de surfactante es el método de síntesis en microemulsión (de micelas inversas) agua/aceite para producir CdS [26-28], CdSe [12], CdMnS [29, 30], ZnSe [31], ZnS:Mn [32].

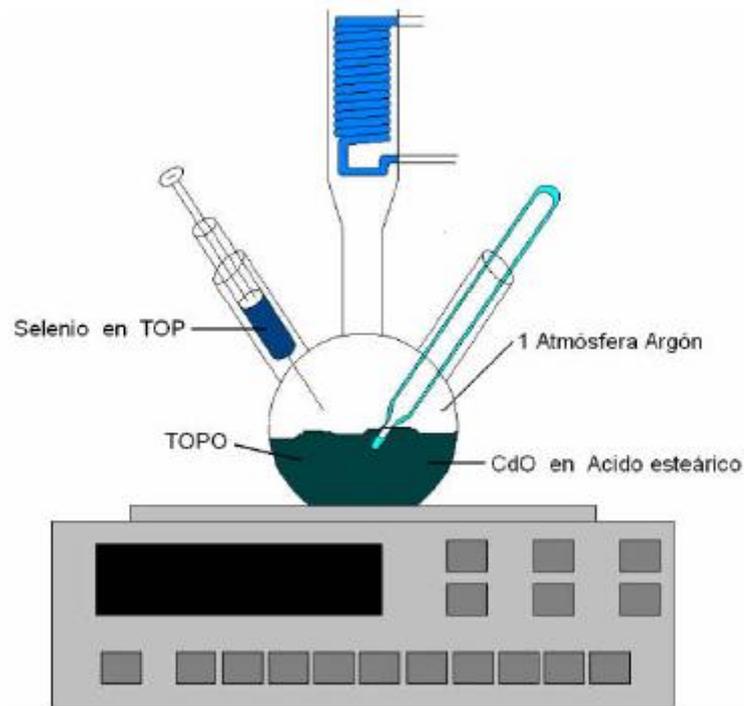


Figura 1.10. Arreglo experimental para la síntesis de PCs de CdSe/ZnS: Síntesis típica del núcleo de CdSe [38].

- b) Síntesis de la coraza para eliminar los defectos superficiales de los PCs y creación de las barreras de potencial (Fig. 1.11). La coraza previene la foto-corrosión y aumenta la eficiencia cuántica (el porcentaje de luz emitida respecto a la luz recibida durante la excitación) de partículas tipo núcleo-coraza de CdSe/ZnS PCs.

La coraza se agrega térmicamente en forma de otro semiconductor, que tiene la banda prohibida más grande comparando con la de material del núcleo [33-35]. Por ejemplo, para obtener partículas homogéneas (en forma y tamaño) con estructura núcleo/coraza uno de los métodos más eficientes es nuevamente el método de síntesis en microemulsión [22-25, 36].

Recientemente Rosenthal y colaboradores [37] describieron los métodos de síntesis de PCs más utilizados, junto con consejos prácticos para llevarlos a cabo, así como los diferentes métodos instrumentales para la caracterización de las estructuras resultantes de los PCs núcleo-coraza biológicamente activos.

- c) *Modificación de* la superficie de los PCs núcleo-coraza (Fig. 1.11). Para la aplicación de nanopartículas en soluciones y en agua es importante prevenir su agregación y

coagulación. Con este propósito se utilizan varios agentes dispersantes tales como surfactantes, polímeros, grupos quelantes, etc. Particularmente, para aplicaciones biológicas de PCs, estos deben ser hidrosolubles. Para incrementar la solubilidad en agua se aplican métodos tales como el encapsulamiento de PCs en micelas de fosfolípidos, adición de ditiotreitolo, dendrones orgánicos [39], ligandos oligoméricos [40-44] o agregación de poli(anhídrido maléico alt-1-tetradeceno) a la superficie de los PCs [45, 47]. También el silicio y el ácido mercaptopropiónico (MPA) se usan con éxito para este propósito [45, 48, 49, 36, 39, 47] y además facilitan la siguiente etapa de bioconjugación con moléculas de interés.

Últimamente se han publicado reportes sobre quitosano, que es un polímero natural y altamente eficiente para solubilizar partículas de PCs y facilitar la entrega intracelular de sus moléculas [50, 51]. Otra estrategia utilizada con el propósito de hacer PCs solubles en agua es el intercambio de ligandos hidrofóbicos en la superficie de los PCs por ligandos hidrofílicos [45]. Sin embargo, este método resulta ser menos eficiente, ya que puede causar la agregación de partículas y disminuir la fluorescencia [52].

Un método alternativo y que da buenos resultados es la aplicación de polímeros anfífilos, que contienen dos tipos de segmentos: hidrofóbicos (hidrocarburos) e hidrofílicos (como polietilenglicol o polímeros con grupos carboxílicos). Los segmentos hidrofóbicos reaccionan con las cadenas alquílicas de los ligandos en la superficie de los PCs, mientras que los segmentos hidrofílicos se quedan en la superficie y vuelven hidrosolubles a los PCs (Fig. 1.11). Para este propósito se reportan el ácido acrílico modificado con octilamina, los fosfolípidos derivados de polietilenglicol (PEG) y copolímeros de bloque [40, 53-57].

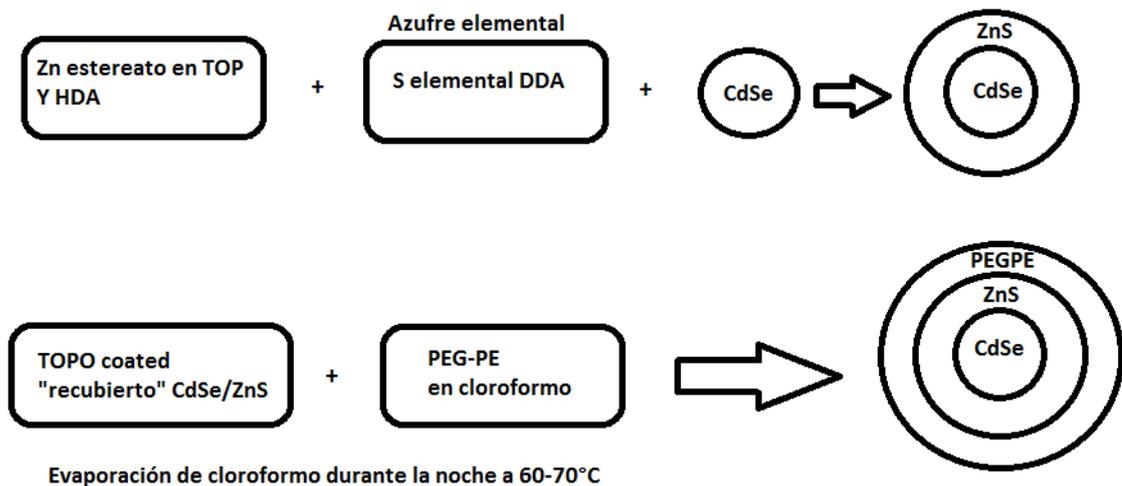


Figura 1.11. Esquema general de PC's de CdSe/ZnS : a) Preparación de la coraza de ZnS sobre el núcleo de CdSe; encapsulamiento en polímero PEG-PE: 1,2 diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxipoli(etilenglicol)] [38].

1.3 Bioconjugación de puntos cuánticos.

La modificación de los nanosistemas con moléculas selectivas permite lograr el “reconocimiento” e interacción de los PCs con las células específicas y se llama bioconjugación. Para su conjugación directa con las moléculas biológicas, los PCs deben tener grupos reactivos tales como amino (-NH₂), carboxilo (-COOH) o mercapto (-SH) (figuras 1.12-1.13) [64].

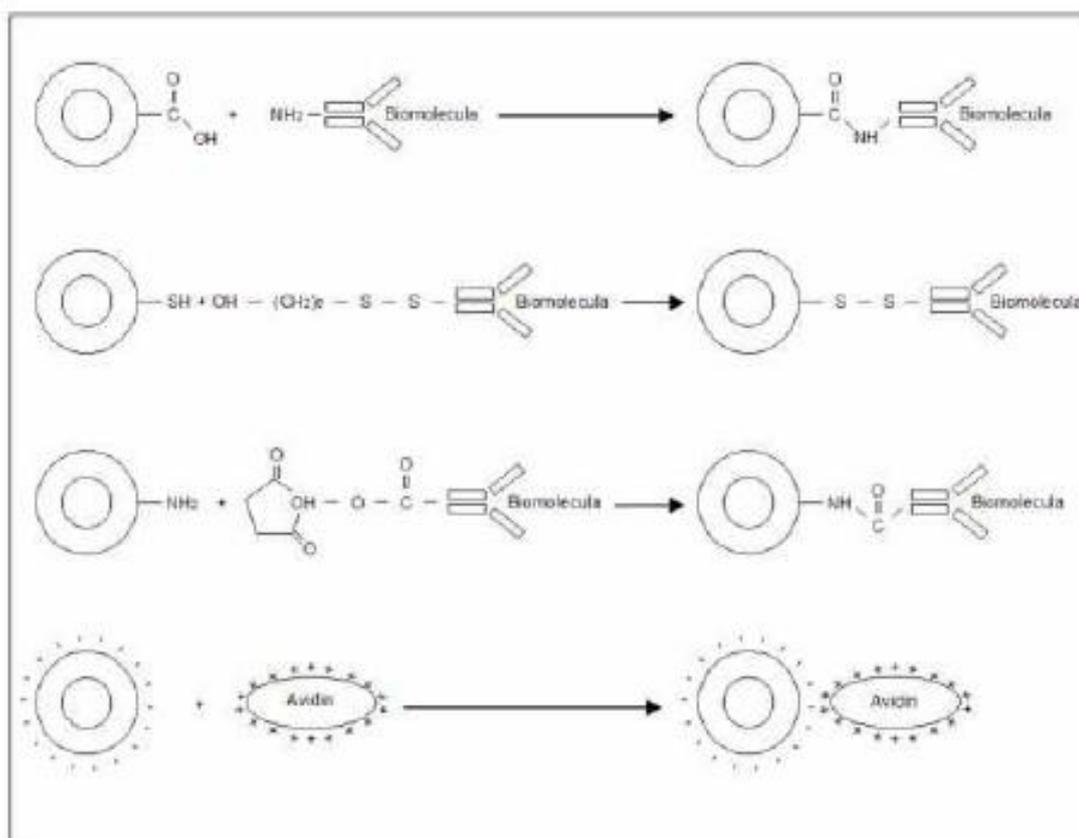


Figura 1.12. Esquema de reacciones químicas de bioconjugación por medio de diferentes grupos (en 3 primeras reacciones) y por atracción electrostática (reacción 4) [64].

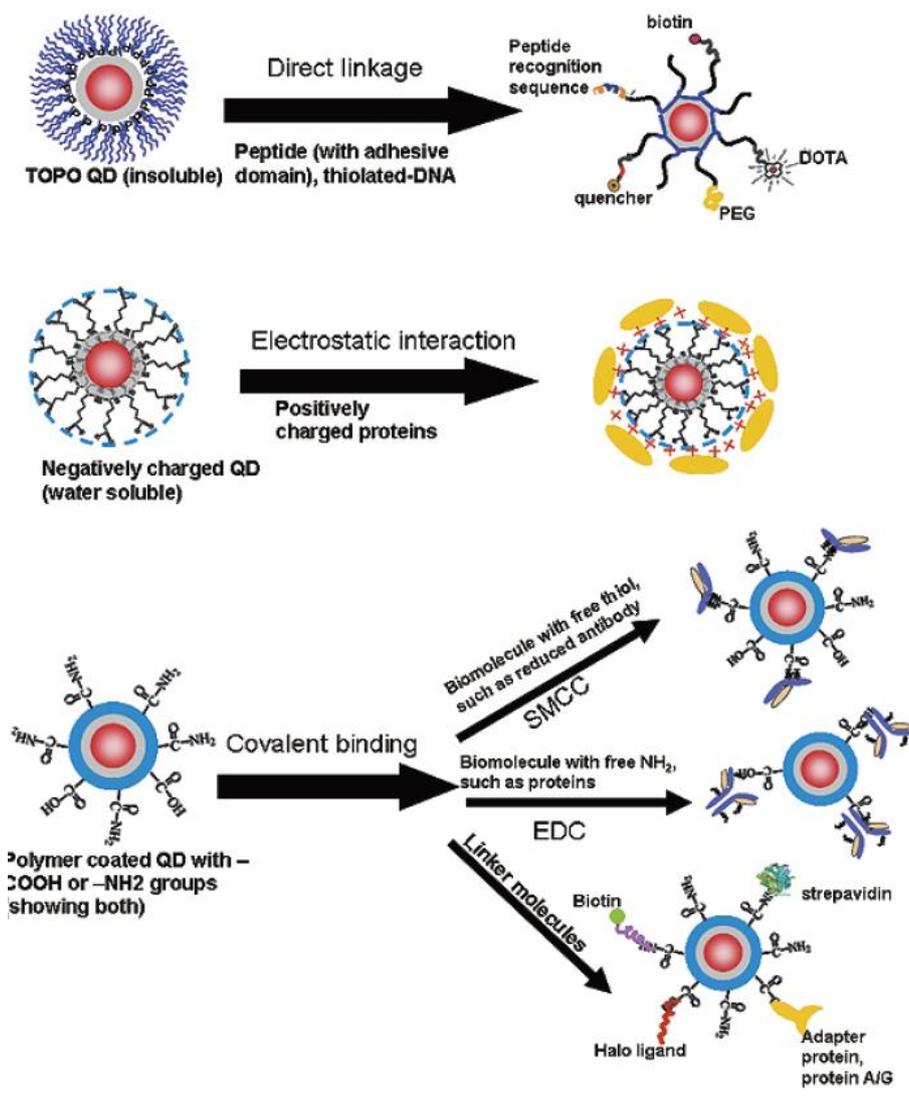


Figura 1.13. Diagrama de métodos de funcionalización de PCs incluyendo DNA thiolado (I) o péptidos con dominios adhesivos [65] o interacción electrostática [66] y enlaces covalentes.

Existen varios esquemas de bioconjugación, estos se ajustan dependiendo de los componentes de la biomolécula y la finalidad de la mismas [67].

1.4 Efecto Stark

El efecto Stark se produce cuando un átomo es colocado en un campo eléctrico constante y uniforme. Se observa que las líneas espectrales se dividen en varias componentes. El fenómeno fue descubierto por Stark en 1913 [83] y aunque la teoría de Bohr permitió explicar algunos aspectos, fue sólo con la Mecánica Cuántica que se logró la comprensión y explicación cabal del fenómeno.

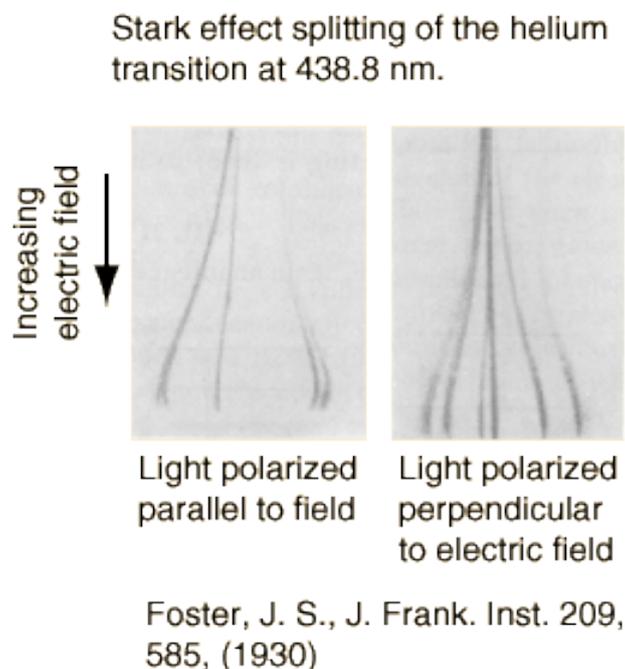


Figura 1.14. La división de una línea de la muestra del espectro de helio [83].

El desdoblamiento de los niveles de energía en un campo eléctrico requiere en primer lugar que el campo eléctrico polarice el átomo y luego interactue con el consecuente momento dipolar eléctrico. El caso más conocido es el del átomo más simple que es el hidrógeno.

En materiales en bulto o a gran escala es muy complicado observar este fenómeno debido a dos procesos, el primero es que para observar un cambio en los eigen-estados la energía de campo eléctrico $\epsilon E_s a_B$ (Radio de Bohr) debe ser comparable con el ancho espectral de las bandas de absorción

$$\epsilon E_s a_B \geq \Delta_{LT} (\text{ancho de bandas de absorción})$$

Esta ecuación requiere campos del orden de 10^6Vm^{-1} dependiendo de los parámetros del material. Por otro lado, dichos campos pueden ampliar o destruir las resonancias de los excitones debido a dos efectos, el primero es el campo de ionización del exciton, mediante el tunelamiento a través de la barrera finita de Coulomb en campos finitos como se ilustra en la figura 1.15.

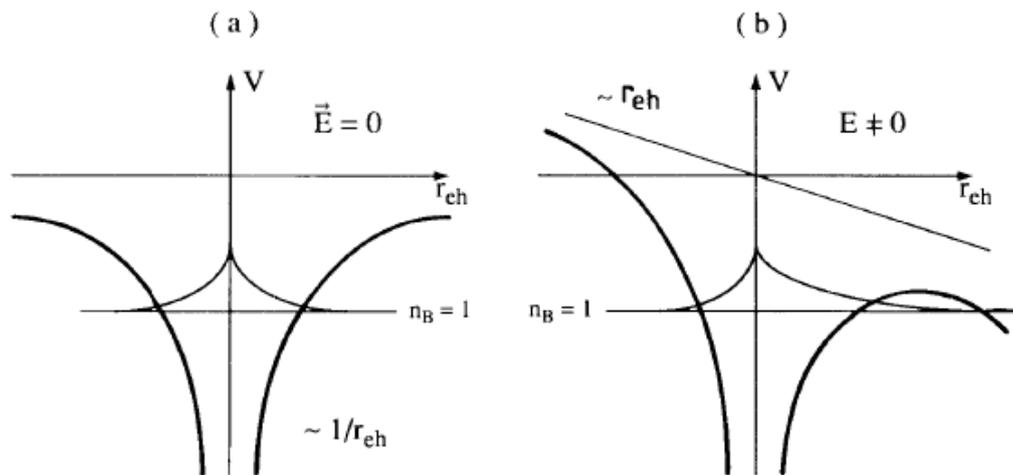


Figura 1.15. Potencial de Coulomb de un excitón en tres dimensiones a) sin campo eléctrico b) con campo eléctrico [85].

El otro mecanismo es el impacto de ionización, esto significa que los portadores que están siempre presentes en un semiconductor en una temperatura finita, pueden obtener altas energías en el campo eléctrico de tal forma que puedan ionizar a otro excitón si lo golpean, resultando en dos o más portadores y una ampliación de la colisión de la resonancia del excitón; por esta razón no existen muchos intentos exitosos que hayan sido reportados para observar directamente el efecto Stark en materiales en bulto.

En materiales a pequeña escala es posible observar el efecto Stark. Se observó que si se confinaba un electrón y un hueco entre barreras, por ejemplo en una estructura de pozos cuánticos como se muestra en la figura 1.16.

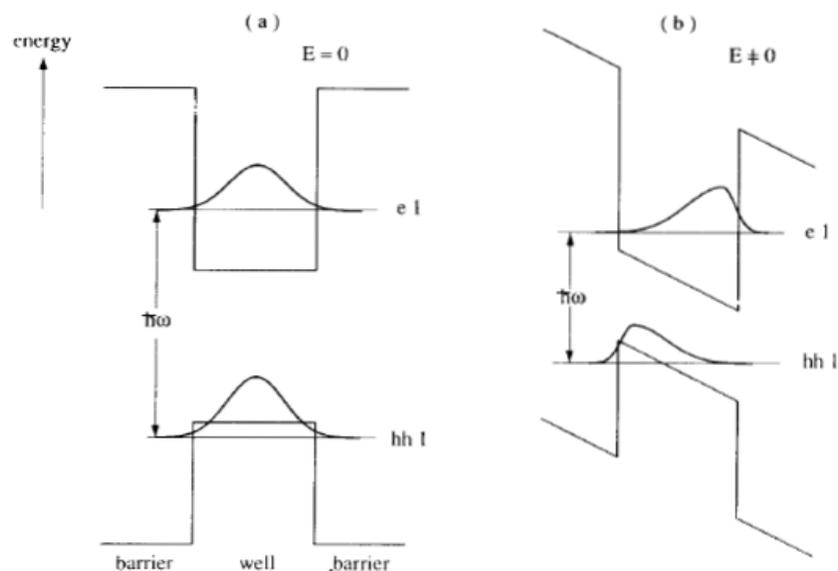


Figura 1.16. La estructura de bandas de un pozo cuántico para a) sin campo eléctrico b) un campo eléctrico constante aplicado de forma perpendicular al pozo, sin tomar en consideración el potencial de Coulomb [85].

Con un campo E_s orientado en forma perpendicular, el electron y el hueco cambian dentro de sus respectivas niveles reduciendo su separación energética, esto resulta aproximadamente en un desplazamiento hacia el rojo de la energía de la banda prohibida, así como de la resonancia del excitón.

La superposición de la función de onda del electrón y del hueco es reducida, resultando así en un decremento de la fuerza de oscilación y en un decremento de la fuerza de enlace. Este último efecto es solo una pequeña corrección de la reducción de la separación energética de los primeros niveles cuantizados. De esta forma se inducen nuevas transiciones que no estaban permitidas antes [85].

En la literatura existen referencias que este efecto ha sido observado en estructuras nano cristalinas de CdSe [84] las cuales también han sido recubiertas de una capa de ZnS en un sustrato de cuarzo. Aunque son de distinto tipo ya que estos fueron crecidos mediante fotolitografía, estos puntos cuánticos permiten discernir los fenómenos que se presentan en estas estructuras de la misma composición química a escala nanométrica. Se observa la presencia del efecto Stark cuadrático, que da por consecuencia un cambio espectral del espectro de emisión hacia bajas o altas energías dependiendo de la polarización del campo eléctrico.

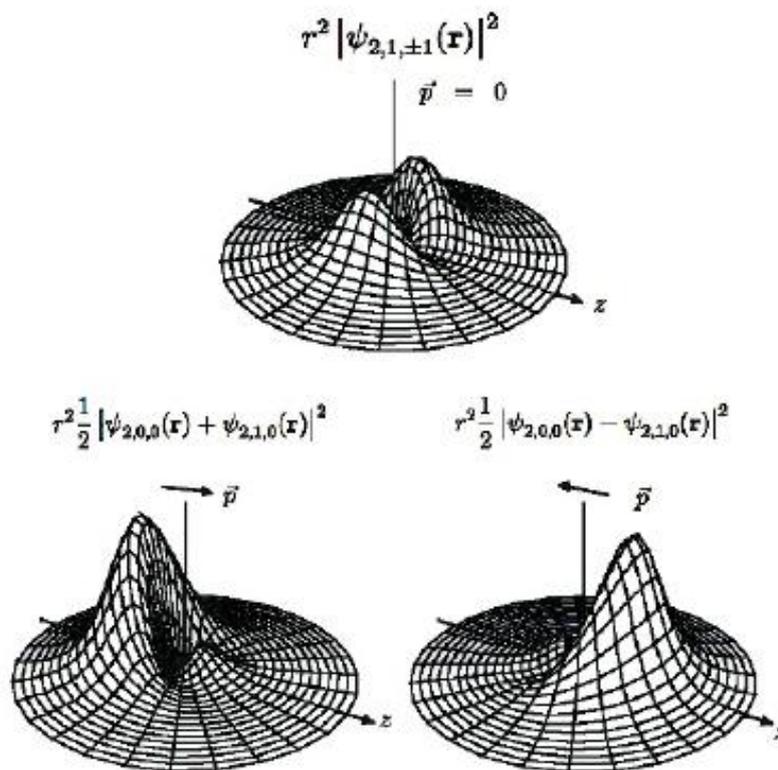


Figura 1.17. Ejemplo del efecto Stark en la función de onda del primer estado excitado del hidrogeno, A) Estado en el cual no se presenta momento dipolar, B) estado en el cual el momento dipolar se encuentra en dirección al campo eléctrico, de modo que disminuye su energía en presencia del campo eléctrico, C) Estado que tiene un momento dipolar contrario al campo eléctrico, razón por la cual aumenta su energía en presencia de campo eléctrico [108].

1.5 Espectroscopia Raman para los PC's Bioconjugados

La espectroscopia Raman es una técnica que permite obtener información valiosa para determinar características de composición química y estructural de diferentes materiales. Esta técnica fue aplicada a las partículas no conjugadas y bioconjugadas.

Se han obtenidos resultados [78, 79, 80], los cuales, permiten vislumbrar que es una técnica eficaz en la obtención de datos importantes de este tipo de estructuras.

En la literatura [78, 79, 80] encontramos estudios de diferentes nano estructuras en la cuales se han observado características muy similares; un ejemplo de ello son las nano estructuras de oro.

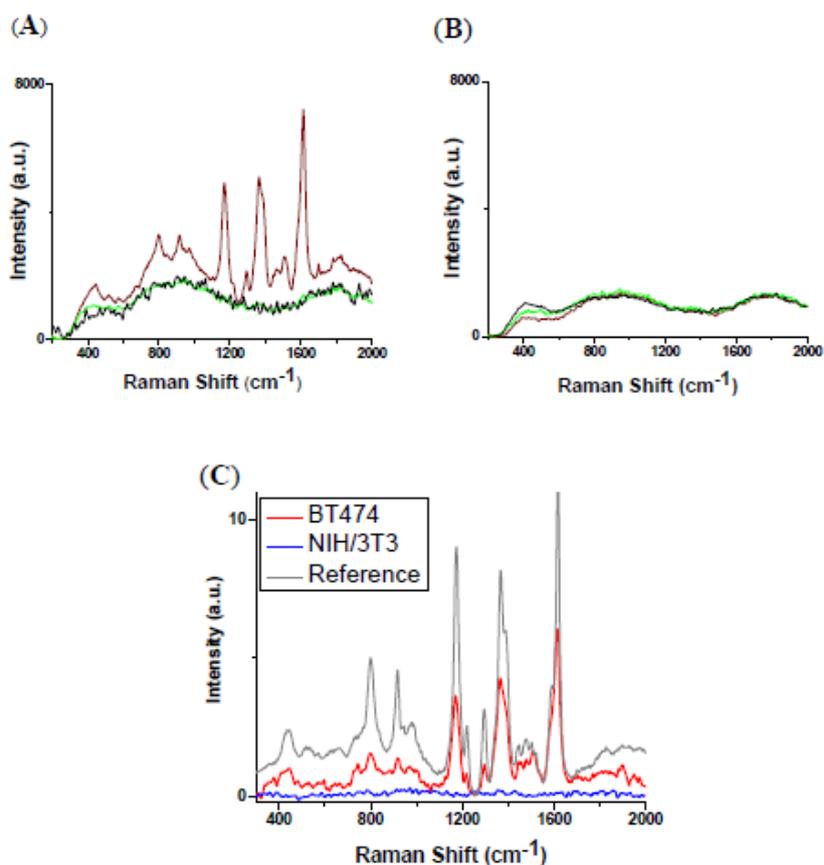


Figura 1.18. Nanopartículas codificadas y protegidas con polímero (PRENT): A) Espectros Raman de células de cáncer de mamario etiquetadas como BT474; B) Espectros Raman de células mamarias no cancerígenas etiquetadas con anticuerpo monoclonal de ratón en contra de EpCAM (Proteína asociada al cáncer); MGITC(marcador orgánico)-Codificado + PRENT (MGITC-anticuerpo de ratón) en rojo oscuro, MGITC-anticuerpo de ratón solamente en color verde, Buffer con los reactivos faltando anticuerpos en negro; C) Espectro con fondo sustraído de células marcadas PRENT-BT474 en rojo, PRENT-NH/3T3 en azul, y solución acuosa de MGITC- (anticuerpo de ratón) PRENT's en gris [78].

Estas nano partículas de oro al igual que los puntos cuánticos son revestidos de una capa polimérica PEG-SH, la cual les brinda mayor estabilidad a la estructura, así como la posibilidad de realizar experimentos de bioconjugación. En la Figura 1.18 podemos observar los resultados de espectroscopia Raman tanto para determinar los compuestos presentes en la nanopartícula así como para poder demostrar la estabilidad en los compuestos.

Podemos observar (figura 1.18) como las nano partículas de oro conjugadas con un anticuerpo específico brindan la posibilidad de obtener resultados muy certeros en el momento de marcar células, en los espectros podemos observar en azul que las muestras no cancerígenas no presentan señal debido a que no ocurrió el proceso de bioconjugación (las nano partículas no se unieron con estas células). Además, podemos observar como al unirse las partículas con las células cancerígenas presentan señal la cual es exactamente como la de las nano partículas funcionalizadas. Por esta misma razón es posible marcar y detectar células cancerígenas y no cancerígenas con el método de bioconjugación. Cabe mencionar, que estos híbridos inorgánico/orgánicos presentan mucha estabilidad y permiten muchas repeticiones de experimentos sin cambios de su intensidad óptica [78].

Es importante comparar los resultados de otro tipo de nano estructuras para observar características muy similares en las partículas se usaron en esta tesis. Se observó (figura 1.19), que se repite el patrón de comportamiento, como en el ejemplo, donde la señal simple del marcador orgánico es muy débil, sin embargo después de la conjugación para la nano esfera de oro la señal aumenta significativamente su intensidad, lo que posibilita la detección de la señal por diversos detectores.

Hemos analizado otros espectros reportados en la literatura, de puntos cuánticos de CdS que fueron recubiertos con distintas moléculas orgánicas (almidón y maltodextrina, que son azúcares conocidos). Se observó una intensidad mayor en los puntos cuánticos recubiertos por maltodextrina en sus estudios de espectroscopia Raman.

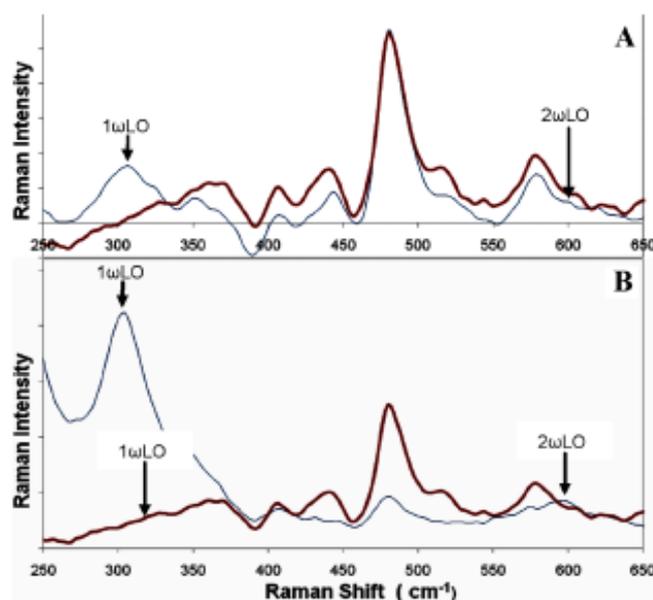


Figura 1.19. Espectros Raman de puntos cuánticos de CdS: (A) CdS-almidón (azul), almidón solamente (rojo) (B) CdS-maltodextrina (azul), maltodextrina solamente (rojo), ω_0 es el armónico del núcleo semiconductor [79].

Así mismo podemos observar (figura 1.19) cómo se presentan picos característicos para el CdS en 300 y 600 cm^{-1} y picos adyacentes en 576, 478, y 440 cm^{-1} los cuales pertenecen a las vibraciones esqueléticas de los azúcares presentes [79].

Esto confirma que la técnica de espectroscopia Raman permite observar no solo las vibraciones principales de los puntos cuárticos, sino también de los compuestos orgánicos presentes en nuestra partícula conjugada. De esta forma se registran las vibraciones de los compuestos presentes en nuestros puntos cuánticos bioconjugados correspondientes al polímero y el anticuerpo.

Anteriormente [80] sobre los puntos cuánticos de CdSe/ZnS se han hecho varios estudios tanto para partículas sin bioconjugación como para partículas bioconjugadas. En la figura 1.20 podemos observar un espectro de puntos cuánticos de 655nm sin bioconjugación y conjugados con moléculas de anticuerpo de Osteopontina.

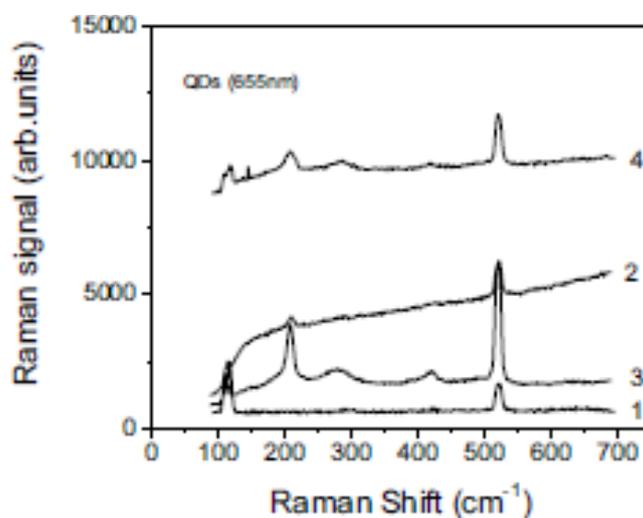


Figura 1.20. Espectros Raman de partículas no conjugadas (1,2) y partículas conjugadas con Osteopontina (3,4) [80].

En este caso se observa que las partículas sin bioconjugación muestran dos picos: uno de 512 cm^{-1} relativo al sustrato y un pico en 114 cm^{-1} que es debido a errores de instrumentación. Sin embargo, para las muestras bioconjugadas observamos picos adicionales los cuales se encuentran en las regiones de 208, 278, 408 cm^{-1} . El pico más intenso a 208 cm^{-1} corresponde al fonón óptico del núcleo de CdSe y su sobretono observado a 418 cm^{-1} , mientras que la banda de 278 cm^{-1} podemos asociarla a la coraza de ZnS.

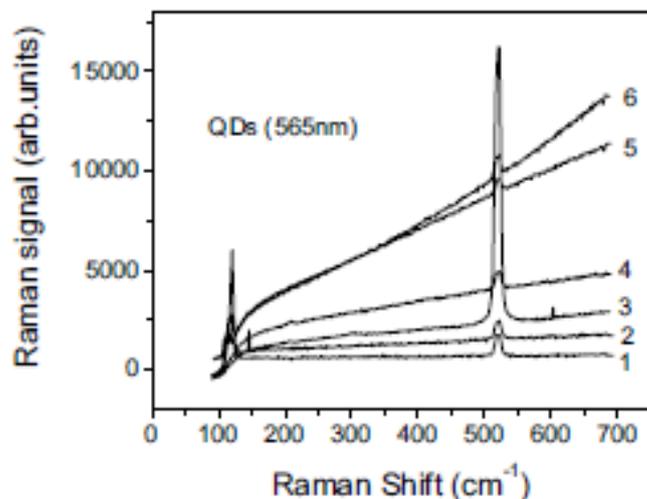


Figura 1.21. Espectros de puntos cuánticos no conjugados (1, 2, 3) y conjugados con moléculas de anticuerpo PSA (4, 5, 6) [80].

La figura 1.21 muestra puntos cuánticos del menor tamaño y con diferente emisión característica (565nm) los cuales presentan idénticos picos. Estos picos en ambas figuras se deben al sustrato de silicio. Como en el ejemplo anterior, para los PCs conjugados con otra biomolécula (el anticuerpo PSA), se observa aumento de la intensidad de señal de fondo debida a la reflexión difusa [80].

1.5.1 Puntos cuánticos conjugados con anticuerpos de IL 10

Los siguientes resultados (figura 1.22) son de puntos cuánticos comerciales de 605 nm de CdSe/ZnS recubiertos con polietilenglicol (PEG) y bioconjugados con anticuerpos de IL 10.

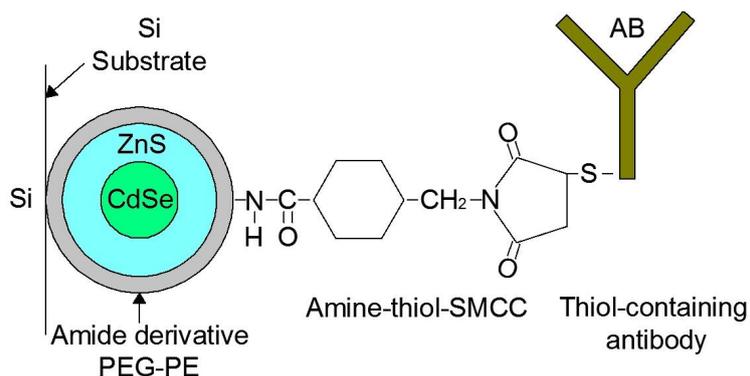


Figura 1.22. Esquema que presenta la estructura de los PCs bioconjugados [68].

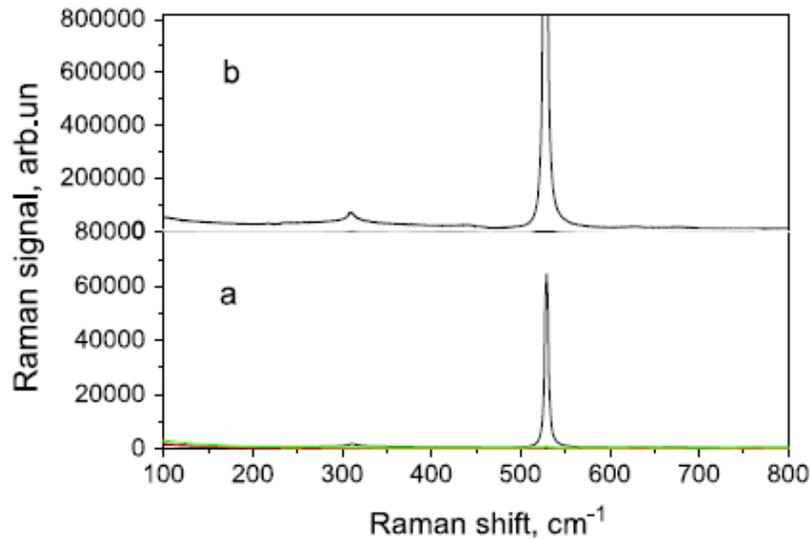


Figura 1.23. El espectro Raman muestra el pico principal del sustrato de silicio en las muestras no conjugadas (a) y conjugadas (b) con anticuerpos de IL 10 de las muestras de PCs de CdSe/ZnS [68].

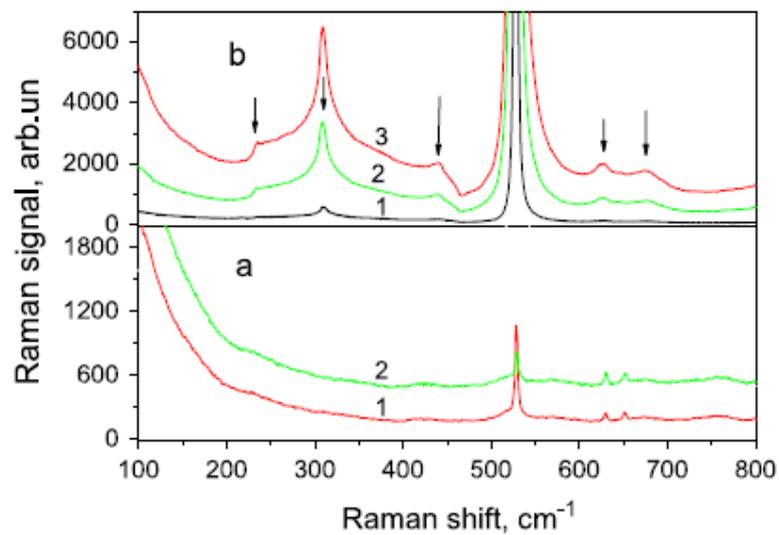


Figura 1.24. Espectro Raman de muestras no conjugadas de 605nm de emisión (a) y conjugadas (b) con IL 10 de PCs de CdSe/ZnS en el rango de 100-800 cm^{-1} [68].

En caso de puntos cuánticos comerciales de 605nm de CdSe/ZnS y bioconjugados (figuras 1.23 y 1.24) con anticuerpos de IL 10, las muestras no bioconjugadas presentan menor intensidad. Por otro lado, en las muestras conjugadas se observan nuevos picos marcados con flechas, lo cual indica una interacción existente entre la biomolécula y los PCs, además se observan unos picos característicos de los grupos orgánicos [68] (NH_2) y de los polímeros PEG [$OH-(CH_2-CH_2-O)_n-H$] que recubren la superficie de los PCs.

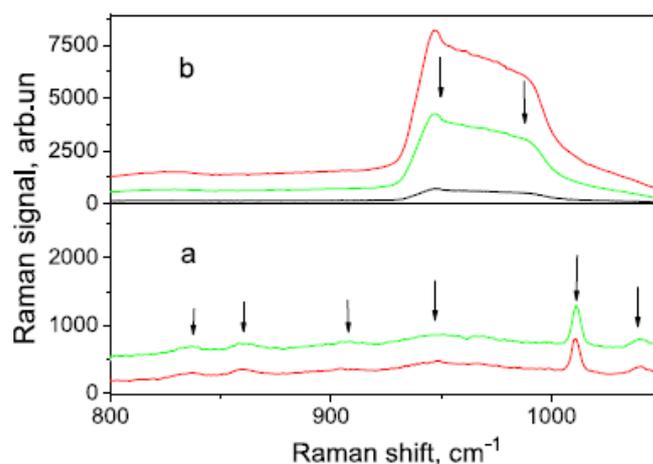


Figura 1.25. Espectro Raman de muestras no conjugadas (a) y conjugadas (b) de 605nm con anticuerpos de IL 10 de PCs de CdSe/ZnS en el rango de 800-1500 cm^{-1} [68].

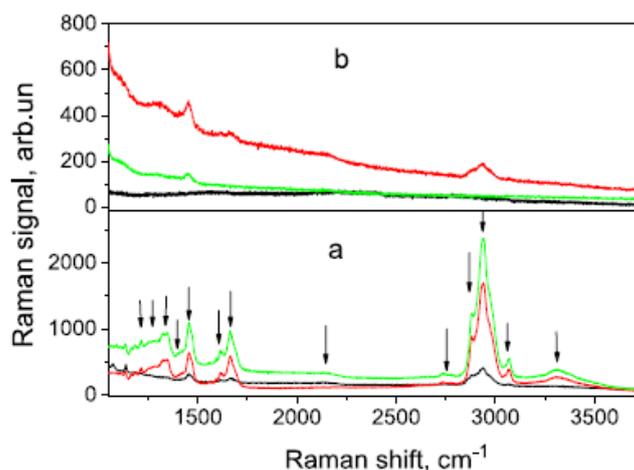


Figura 1.26. Espectro Raman de muestras no conjugadas (a) y conjugadas (b) de 605nm con IL 10 en el rango de 1000 a 4000 cm^{-1} [68].

En las figuras 1.25 y 1.26 se aprecian unos picos en las muestras bioconjugadas que se atenúan en forma y en intensidad. Este efecto se debe a una reabsorción de la luz dispersada y se relaciona con el polímero PEG. Además de este efecto, para las figuras que presentan mayor intensidad (partículas bioconjugadas) se concluyó que esto se debe a la interacción de las moléculas con los puntos cuánticos y el efecto SERS (Surface enhanced Raman Scattering).

1.6 Estudios de fotoluminiscencia de PCs.

La fotoluminiscencia es otra de las técnicas que permite obtener información estructural y de las particularidades ópticas de los PCs. Esta técnica se puede aplicar a los puntos cuánticos debido a su propiedad de emisión de luz después de excitación por una fuente luminosa de mayor energía que su banda prohibida. En el espectro de PL podemos observar las bandas

energéticas características, y sobre todo esta técnica es no destructiva, por lo cual podemos realizar numerosas mediciones sin afectar la estructura analizada.

Para obtener las bandas fundamentales se ocupa el método de deconvolución. Para ello se usan funciones Gaussianas y se ocupan los siguientes algoritmos para su transformación (figura 1.27).

$$y = y_0 + \frac{A}{w\sqrt{\pi/2}} e^{-2\frac{(x-x_c)^2}{w^2}}$$

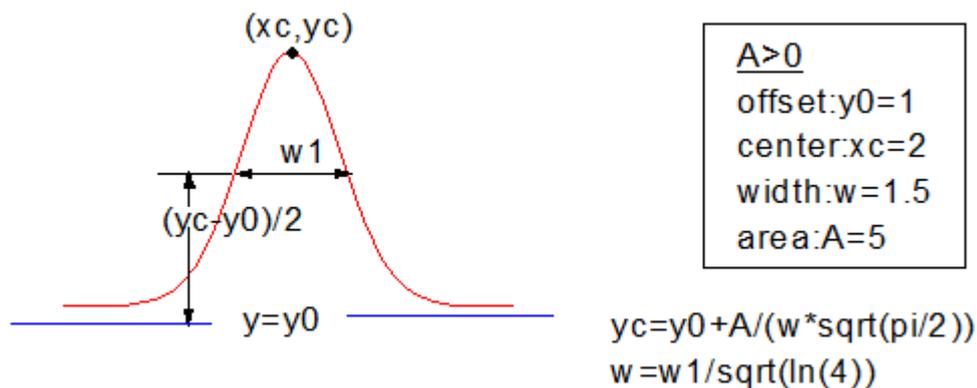


Figura 1.27. Ecuación característica del ajuste gaussiano y forma en la cual el algoritmo grafica el ajuste de curvas donde A=área bajo la curva, w=ancho de la curva, y0=línea base, xc,yc=coordenadas centrales, x=dato en el eje x, y=dato en el eje y.

Estos algoritmos permiten describir el comportamiento de nuestras muestras. Los datos proporcionados por el fabricante de muestras tienen una sola banda energética, centrada en una emisión característica, con una distribución Gaussiana. A base de estos datos podemos hacer un ajuste con este algoritmo para comprobar su comportamiento antes y después de la bioconjugación. Además nos permite caracterizar las señales obtenidas mediante información como su área (intensidad integrada), su ancho medio, y su intensidad.

El proceso de bioconjugación podría afectar las bandas energéticas presentes en nuestra molécula u otros procesos de recombinación, por lo cual podríamos necesitar este algoritmo para encontrar las bandas energéticas por medio de curvas Gaussianas.

En este campo se han realizado mediciones a muestras de PCs de diferentes tamaños sin y con bioconjugación. En los resultados más recientes han encontrado como se incrementa o disminuye la fotoluminiscencia dependiendo del tipo de biomolécula que se utilice [69], así como sus emisiones características [70].

En estudios realizados observamos características que permiten a comprender los mecanismos de recombinación presentes en las muestras de los PCs.

En un trabajo realizado por el grupo de investigación [81] se menciona el proceso de bioconjugación de puntos cuánticos de 655nm de emisión (fig.1.28), con y sin biomoléculas de anticuerpo IL 10 (IgG2a de ratón).

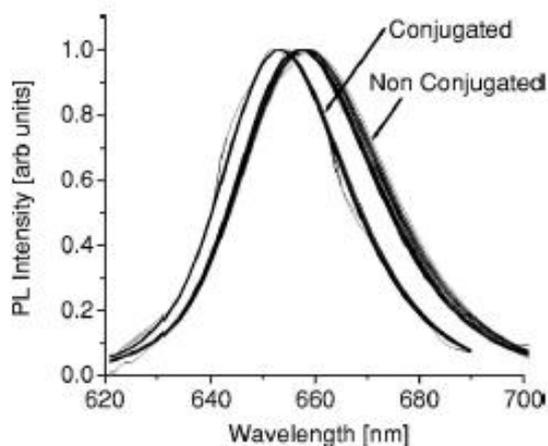


Figura 1.28. Espectro de PL de puntos cuánticos de CdSe/ZnS (de 655nm de emisión), con emisión máxima de 655nm no conjugados y después de la bioconjugación con moléculas de IL 10.

Se observa (figura 1.28) un desplazamiento hacia energías más altas, lo cual es explicado por varios fenómenos. Un fenómeno de los más importantes es que las moléculas orgánicas mediante fuerzas covalentes o electrostáticas imponen un campo eléctrico neto a través del punto cuántico, que a su vez contribuye al cambio en la emisión espectral mediante el efecto Stark, producido por cambios en los niveles excitónicos del punto cuántico.

Así mismo el proceso de almacenamiento de las muestras a temperatura ambiente y el lento secado de las moléculas de anticuerpo IL 10, provoca un aumento en el campo eléctrico y por consecuencia el desplazamiento espectral [81].

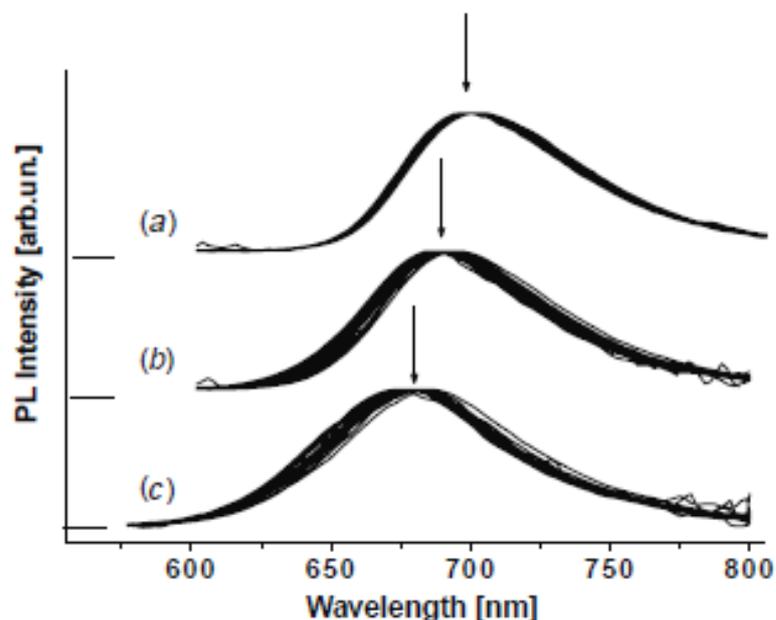


Figura 1.29. Espectros de los PCs de 705nm de emisión a) no conjugados y b) conjugados con anticuerpo CAV 1 (Cavaolin 1) después de 30 minutos; c) después de 3 días a una temperatura de 50° C [82].

En otro artículo [82] se presentan los efectos de la bioconjugación en puntos cuánticos de estructura núcleo/coraza de CdSe/ZnS antes y después de la bioconjugación con anticuerpo CAV 1 (Cavaolin 1).

Se discuten los efectos de la interacción química entre gas presente en la atmosfera (gas inerte o ambiental) y los puntos cuánticos, como un factor que afecta al desplazamiento que sufre el espectro de los puntos cuánticos, así mismo se explican dos teorías al respecto del desplazamiento espectral (figura 1.29). La primera teoría explica que se produce un estrés compresivo en la interfaz entre la muestra y el sustrato al secarse la muestra y es lo que provoca el desplazamiento hacia altas energías de los máximos de los espectros de PL. La siguiente teoría explica un desplazamiento hacia energías más bajas debido al efecto cuadrático Stark. Este efecto se provoca por el campo eléctrico con el incremento de carga debido a las moléculas orgánicas en los puntos cuánticos.

Al mismo tiempo debido al proceso de bioconjugación, ocurre una reducción de las cargas, la cual, puede modificar el campo eléctrico de los puntos cuánticos conjugados con moléculas polares o cargadas. De esta manera se afectaría la fotoluminiscencia de tal forma que ocurre un desplazamiento de la emisión máxima de los picos de PL hacia energías más altas. Se espera, que este efecto ocurriera en cualquiera de las fases (líquida o sólida después de secarse la muestra).

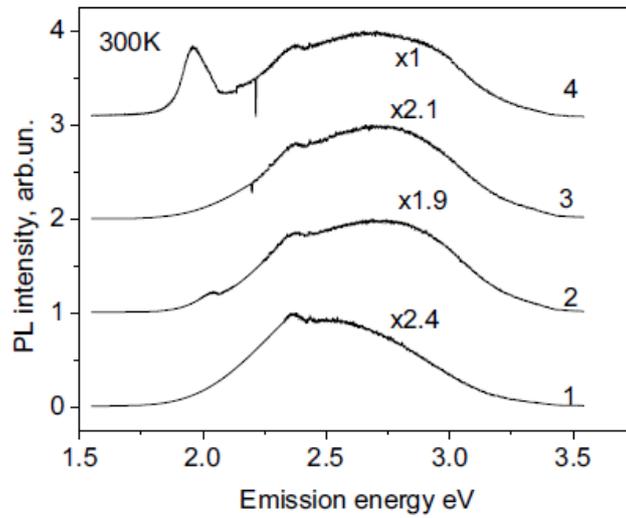


Figura 1.30. Espectros normalizados de fotoluminiscencia de PC's CdSe/ZnS de diferentes tamaños: (1) 3.2 nm ($\lambda = 525$ nm), (2) 3.5 nm ($\lambda = 560$ nm), (3) 5.1 nm ($\lambda = 605$ nm), (4) 6.3 nm ($\lambda = 640$ nm) [70].

En la figura 1.30 se observan las gráficas que se obtienen para diferentes tamaños de PCs en los cuales se aprecian las emisiones máximas. En el caso de la gráfica con número 4 los PCs de 640nm presentan un pico en 1.94eV que está relacionado al núcleo de CdSe. En el resto de las gráficas se observa un traslape de bandas energéticas. Debido a que hay una superposición de bandas, es necesario realizar deconvoluciones para observar de una manera más clara las emisiones de cada banda.

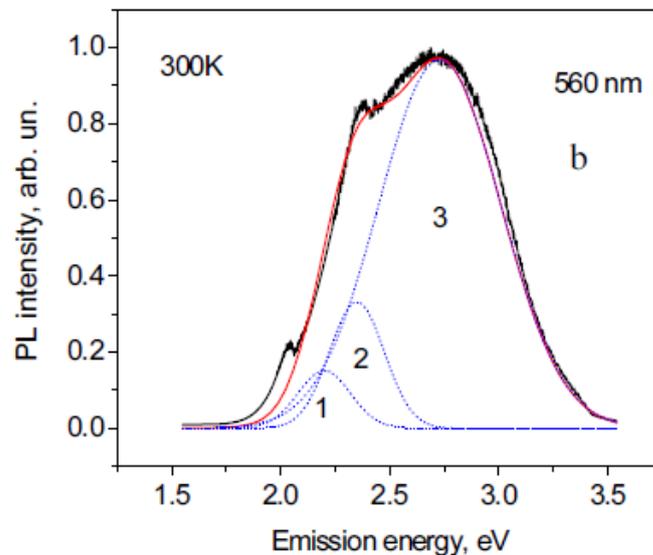


Figura 1.31. Deconvolución del espectro de fotoluminiscencia en tres bandas elementales para los PCs de 560nm de emisión [70].

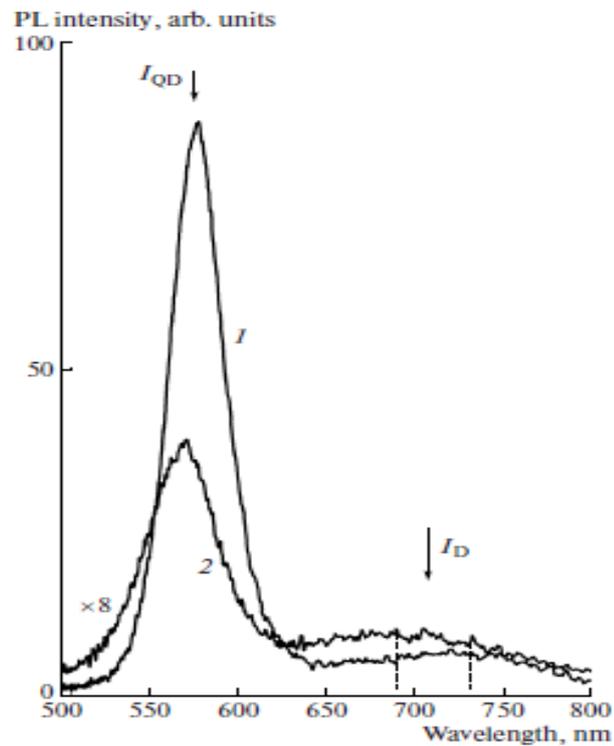


Figura 1.32. Espectro de fotoluminiscencia para muestras de PCs no conjugados (1) y conjugados (2) a una temperatura de 77 K [69].

En el caso de la figura 1.32 se presentan los espectros de fotoluminiscencia de PCs de CdSe/ZnS, los cuales fueron sintetizados a una temperatura de 190 grados celsius, con y sin bioconjugación, los que presentan bioconjugación tienen unidas moléculas de anticuerpo IL 10.

En este caso podemos observar como la intensidad de fotoluminiscencia disminuye con el proceso de bioconjugación, este grupo de investigación se apoya del estudio de rayos x para identificar las imperfecciones en la estructura cristalina, además de trabajar con temperaturas diferentes a la ambiente, lo cual al final muestra como resultados la explicación de sus resultados apoyados en los defectos cristalinos. Sin embargo aún faltan estudios adicionales para confirmar los efectos presentes en este proceso; lo que hay que resaltar son las bondades de este método no destructivo, para la caracterización de PCs.

Capítulo 2: Muestras y métodos

2.1 Métodos

2.1.1 Espectroscopia de Fotoluminiscencia

El proceso de fotoluminiscencia ocurre cuando un material es excitado por ondas electromagnéticas y el electrón sube a un nivel de energía más alto, por la absorción de un fotón. Después, ocurre el decaimiento espontaneo de este electrón a un nivel de energía más bajo, y el material emite un fotón en este proceso. Para conservar la energía, el fotón emitido no puede tener más energía que el fotón de excitación, a menos que dos o más fotones de excitación actúen en tándem (en serie).

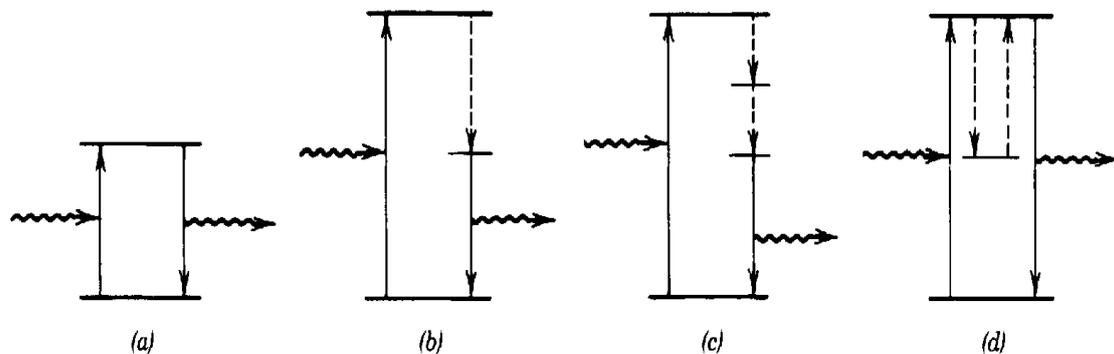


Figura 2.1 Ejemplos de transiciones que producen luminiscencia: a) Transición a un estado excitado de energía y su posterior emisión; b) y c) Transición hacia un estado excitado y su posterior transición hacia estados intermedios no radiativos, donde un electrón puede quedar atrapado por un tiempo más prolongado y con la consecutiva emisión; d) Transición hacia un estado más alto de energía, con la consecutiva transición hacia un estado más bajo no radiativo y nuevamente hacia un estado más alto, con la consecutiva emisión de un fotón [71].

2.1.2 Descripción del equipo empleado

Los espectros de fotoluminiscencia fueron medidos en el laboratorio de Optoelectrónica de la ESFM con el equipo siguiente:

Monocromador modelo SPEX:500M Marca JOBIN YVON-HORIBA

Fotodetector (PM) para el rango visible (GaAs) para Monocromador B Modelo: SPEX 500M

Láser He-Cd. Marca: KIMMON Modelo: IK3102R-G de 325 nm de longitud de onda característica.

Críostato de He, de ciclo cerrado Marca: JANIS RESEARCH COMPANY, INC.

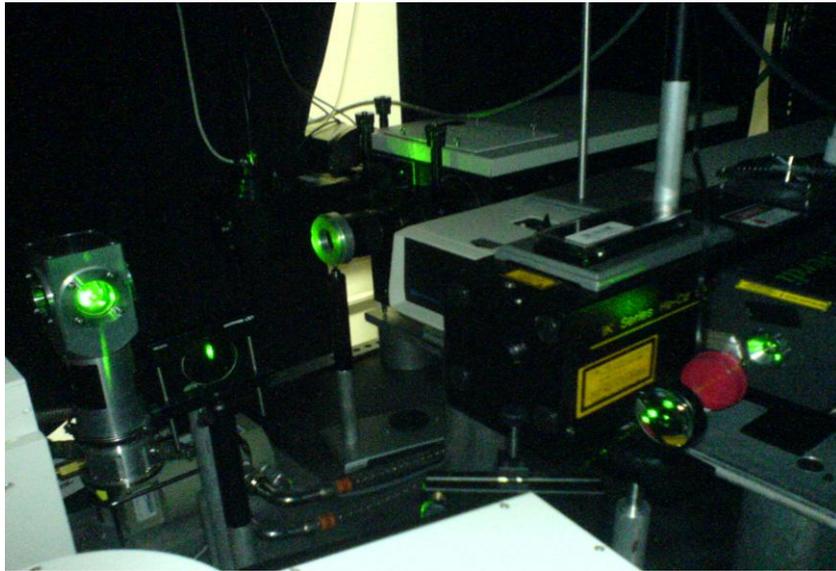


Figura 2.2. Arreglo experimental para medir fotoluminiscencia en el laboratorio de optoelectrónica de la ESFM.

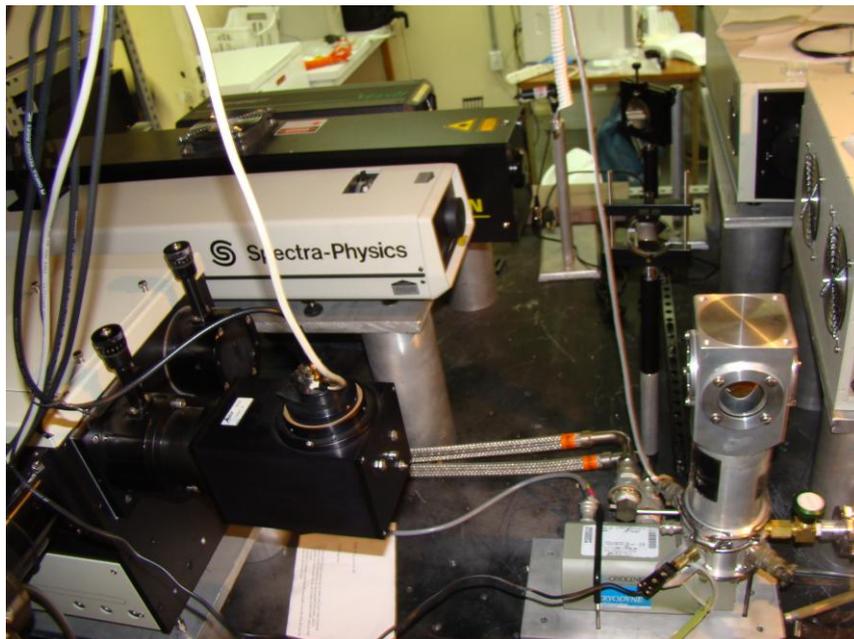


Figura 2.3. Vista general del equipo empleado en el laboratorio de optoelectrónica de la ESFM.



Figura 2.4. Vista general del equipo empleado en el laboratorio de optoelectrónica de la ESFM.



Figura 2.5. Equipo de Laser de He-Cd de 325nm y del laser de estado sólido de 535nm empleados en el laboratorio de optoelectrónica de la ESFM.

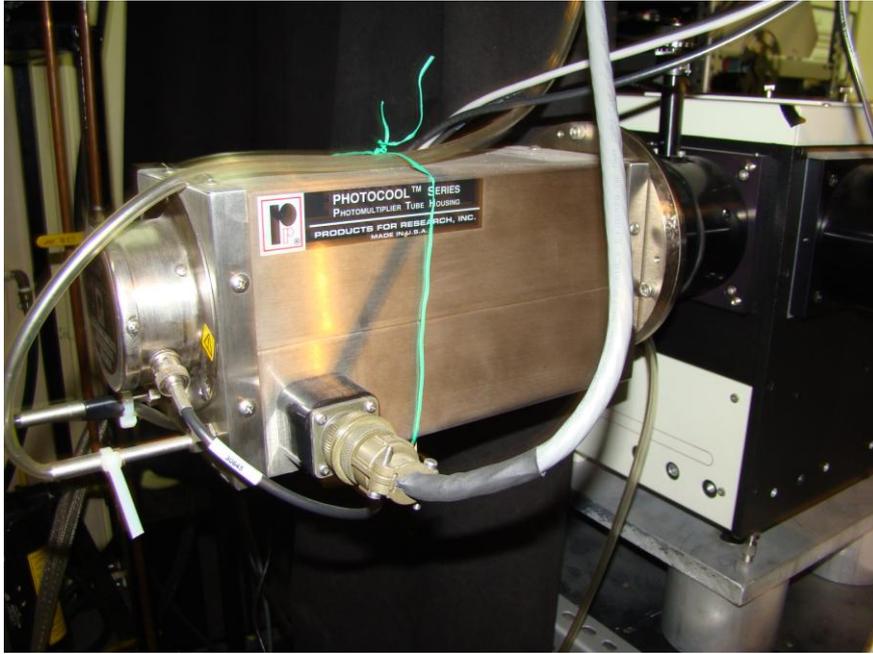


Figura 2.6. El detector fotomultiplicador empleado en las mediciones de esta tesis del laboratorio de optoelectrónica de la ESFM.



Figura 2.7. Vista general del equipo empleado en el laboratorio de la ESFM.

El arreglo experimental se muestra en el diagrama básico de la figura 2.8.

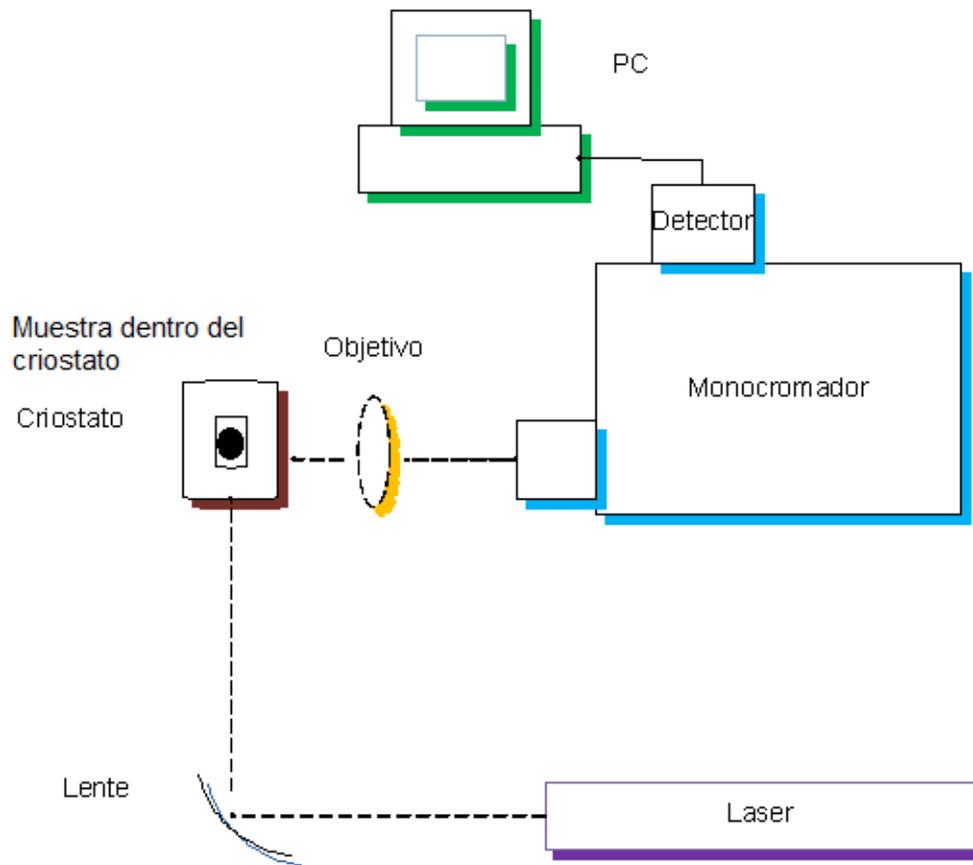


Figura 2.8. Diagrama del arreglo experimental

2.1.3 Espectroscopia Raman

La descripción clásica de la dispersión Raman ilustrada en la figura 2.9 es la siguiente: se produce una polarización en una molécula debido a un campo eléctrico oscilante originado por una fuente de luz. Este dipolo inducido entonces irradia la luz dispersada, con o sin intercambio de energía, con las vibraciones de la molécula.

La fuerza de la polarización inducida, la escala de polarizabilidad y el campo eléctrico se relacionan entre sí como:

$$P = \alpha E \quad (2.2.1)$$

Los tratamientos cuánticos y clásicos de la dispersión Raman están basados en la ecuación (2.2.1) cuyos tratamientos son muy valiosos para entender los efectos e interpretar los espectros.

El tratamiento clásico de la dispersión Raman está basado en los efectos de las vibraciones moleculares en la polarizabilidad α , se considera un campo eléctrico incidente que obedece la siguiente expresión:

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (2.2.2)$$

Donde ν_0 es la frecuencia del laser, E_0 es la amplitud del campo eléctrico, t el tiempo, las vibraciones moleculares son consideradas generalmente como compuestas de modos normales Q_j de los cuales hay $3N-6$ (ó $3N-5$ para una molécula lineal) en una molécula con N átomos

$$Q_j = Q_j^0 \cos 2\pi\nu_j t \quad (2.2.3)$$

Donde ν_j es la frecuencia normal característica del j -ésimo modo normal, Q_j^0 es la amplitud del modo normal de vibración molecular, la polarizabilidad de los electrones en la molécula será modulada por la vibración molecular de tal forma que:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q_j}\right)Q_j + \dots \quad (2.2.4)$$

Donde α_0 es la amplitud de la polarizabilidad de la molécula. De la ecuación (2.2.1) la polarización es el producto de las ecuaciones (2.2.2) y (2.2.4) con lo cual obtenemos (2.2.5) utilizando la identidad $\cos a \cos b = \frac{\cos(a+b) + \cos(a-b)}{2}$ e ignorando términos de orden más grande en la ecuación (2.2.4):

$$P = \alpha_0 E_0 \cos 2\pi\nu_0 t + E_0 Q_j^0 \left(\frac{\delta\alpha}{\delta Q_j}\right) \frac{\cos(\nu_0 + \nu_j) + \cos(\nu_0 - \nu_j)}{2} \quad (2.2.5)$$

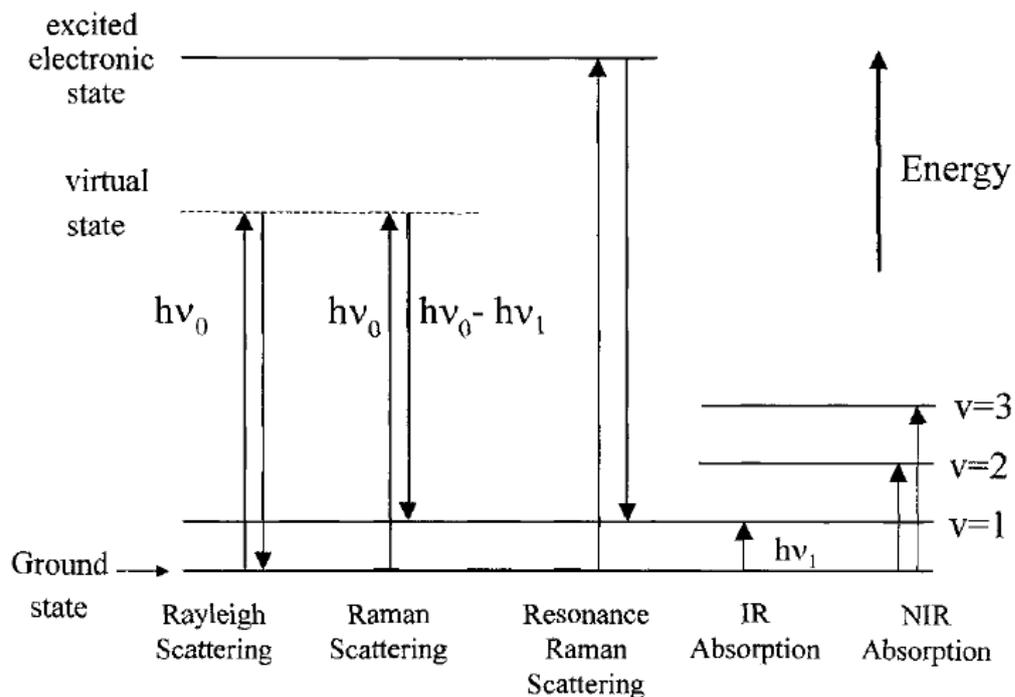


Figura 2.9. Esquema que representa las transiciones electrónicas de distintos tipos de espectroscopias vibracionales (ν_0 representa la frecuencia del láser). Mientras que V es el número cuántico vibracional. El estado virtual es una distorsión de corta vida de la distribución de electrones ocasionada por el campo eléctrico de la luz incidente [72].

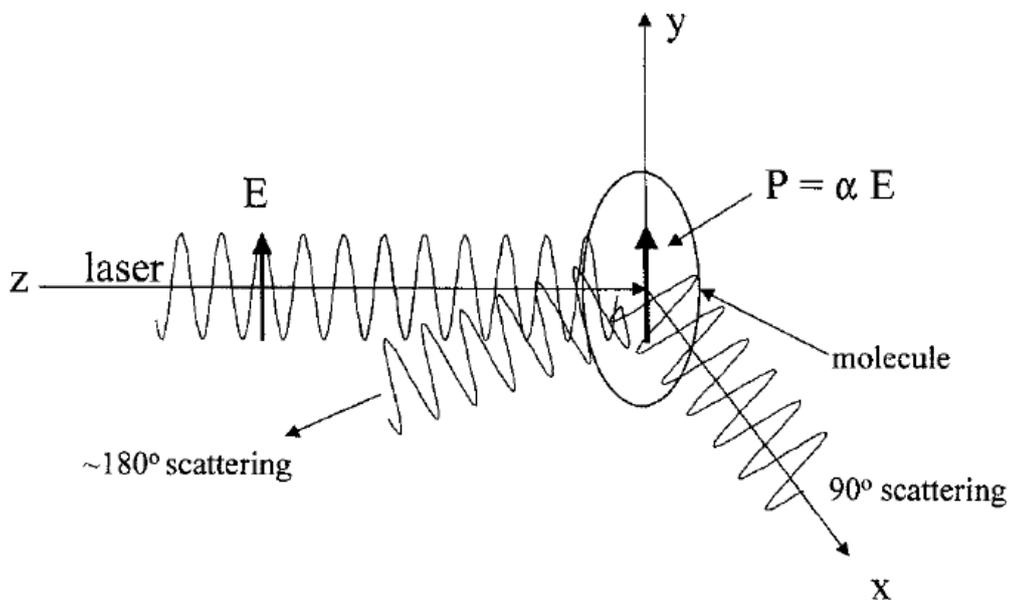


Figura 2.10. La polarización P inducida en una nube de electrones de una molécula por un campo eléctrico óptico incidente (la dispersión puede ocurrir en varias direcciones, se muestran a 90 y 180 grados).

Después de asumir que los electrones polarizados irradian luz a la frecuencia de sus oscilaciones la ecuación (2.2.5) demuestra que la luz será dispersada en tres frecuencias.

El primer término es la dispersión Rayleigh, la cual, está a la misma frecuencia del láser y tiene una magnitud proporcional a α_0 que es la polarizabilidad inherente de la molécula; el segundo término es la dispersión Raman anti-Stokes la cual ocurre a $\nu_0 + \nu_j$, y el tercer término es la dispersión Raman Stokes $\nu_0 - \nu_j$. Las transiciones asociadas con las dispersiones Raman Rayleigh y Stokes se muestra en la figura 2.10.

2.1.4 Dispersión Raman aumentada en superficies SERS (Surface Enhanced Raman Scattering).

El efecto SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) fue detectado por primera vez en 1974 por Fleischmann y colaboradores [90]. Desde entonces, se han realizado numerosos estudios teóricos [91-95] y experimentales [97-101] para explicarlo.

Dicho efecto se basa en el aumento de la difusión inelástica (señal Raman), procedente de determinadas moléculas en presencia de nanoestructuras de superficie rugosa, cuya intensidad excede en un factor de $10^5 - 10^6$ de lo que cabe esperar cuando la molécula no está ligada a la superficie metálica.

La causa del extraordinario aumento de la dispersión Raman en presencia de nanoestructuras metálicas es todavía materia de discusión. La mayor parte de los trabajos de investigación llevados a cabo para dilucidar la naturaleza de este fenómeno, conducen a la consideración de dos modelos fundamentales, basados ambos en la necesidad de la existencia de una superficie rugosa: a) el modelo electromagnético (EM) basado en la generación de plasmones superficiales que es el más importante, y b) el modelo químico o de transferencia de carga entre la superficie y la molécula analizada.

Todos los indicios experimentales hallados hasta la fecha, apuntan a considerar que ambos se dan simultáneamente, aunque no existe un acuerdo definitivo acerca de la contribución de cada uno de ellos en el factor de intensificación total.

Puesto que el efecto SERS está relacionado con la existencia de una geometría rugosa en la superficie metálica, el modelo EM puede simplificarse considerando la intensificación de la señal Raman cuando una radiación de frecuencia ω_0 incide sobre una partícula esférica o esferoidal aislada [103,104]. Es lo que se conoce como modelo de la esfera metálica y constituye la aproximación más simple al estudio teórico de estos sistemas. Según este modelo, la polarizabilidad de la molécula no se ve afectada por la presencia del metal [14].

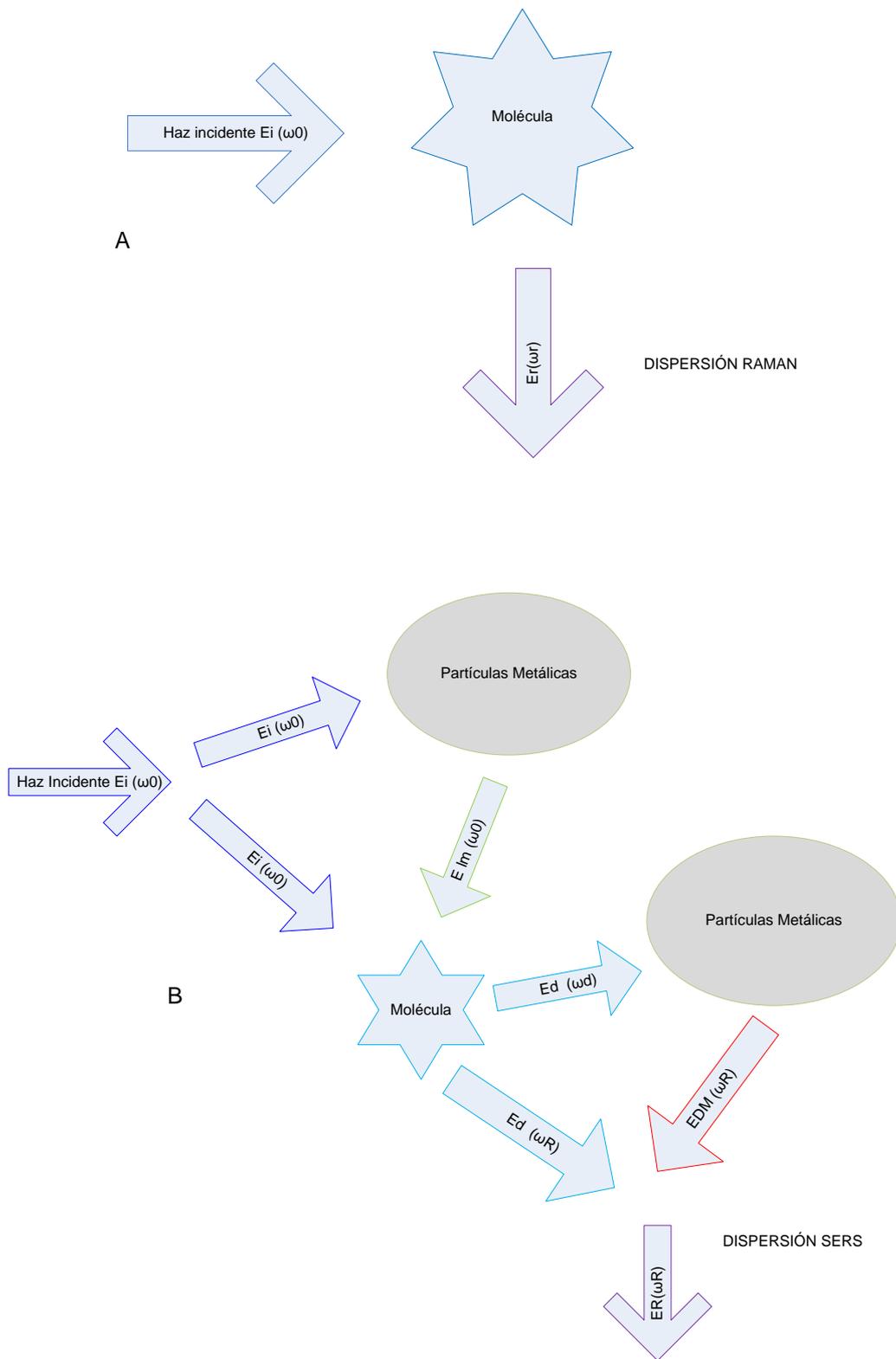


Figura 2.11. Procesos de dispersión Raman A) en ausencia B) en presencia de partículas metálicas esféricas.

En la figura 2.11 se muestra de forma esquemática el fenómeno que tiene lugar en un proceso de dispersión Raman en ausencia y en presencia de estas partículas metálicas tomadas como modelo.

Básicamente, la enorme amplificación que experimenta la radiación Raman se debe a dos procesos fundamentales: a) por una parte, se produce un considerable aumento de la intensidad del campo electromagnético incidente total que llega a la molécula, situada en posición r' y frecuencia ω ; ya que este campo está compuesto, no solamente de la radiación que incide directamente en la molécula, $E_i(r', \omega)$, sino también del campo que, a la misma frecuencia, es dispersado por el propio metal, $E_{IM}(r', \omega)$, el cual fue descrito por Mie [102].

El campo dispersado por la partícula metálica resulta ser muchísimo más grande cuando la frecuencia ω se hace coincidir con la frecuencia de resonancia de los plasmones superficiales del metal, es decir, de las oscilaciones de los electrones en el seno de la partícula metálica [106]. Por tanto, el campo eléctrico total E_I de frecuencia ω que incide sobre la molécula en r' será:

$$E_I(r', \omega) = E_i(r', \omega) + E_{IM}(r', \omega) \dots \dots \dots (2.3.1)$$

Este campo incidente induce en la molécula un momento dipolar $p(r', \omega)$ que, modulado por las vibraciones moleculares, emitirá radiación Raman de frecuencia ω_R y puede ser expresado en función de la polarizabilidad de la molécula α de la siguiente forma:

$$p(r', \omega) = \alpha E_I(r', \omega) \dots \dots \dots (2.3.2)$$

Por otra parte, el campo eléctrico asociado con la radiación Raman, de frecuencia ω_R , sufre también una amplificación similar a la del campo incidente. El campo eléctrico total dispersado, de frecuencia ω_R , que se observa en la posición r , es una composición del dispersado directamente por la molécula, $E_d(r, \omega_R)$, y el campo dispersado por la partícula metálica cuando son excitados los plasmones superficiales con una frecuencia ω_R , $E_{DM}(r, \omega_R)$. Por lo tanto, el campo eléctrico total dispersado, $E_R(r, \omega_R)$, será:

$$E_R(r, \omega_R) = E_d(r, \omega_R) + E_{DM}(r, \omega_R) \dots \dots \dots (2.3.3) [107].$$

2.1.5 El equipo experimental para la espectroscopia Raman

Lab-Raman HR800 Horiba Jovin-Yvon y un láser de estado sólido para la excitación de las muestras 605nm y 655nm con una longitud de onda de 785nm y una potencia de 20mW en configuración Backscattering y para Las Muestras de 705nm y 800nm uso de laser con una longitud de onda de 532nm y una potencia de 60mW en configuración Backscattering.

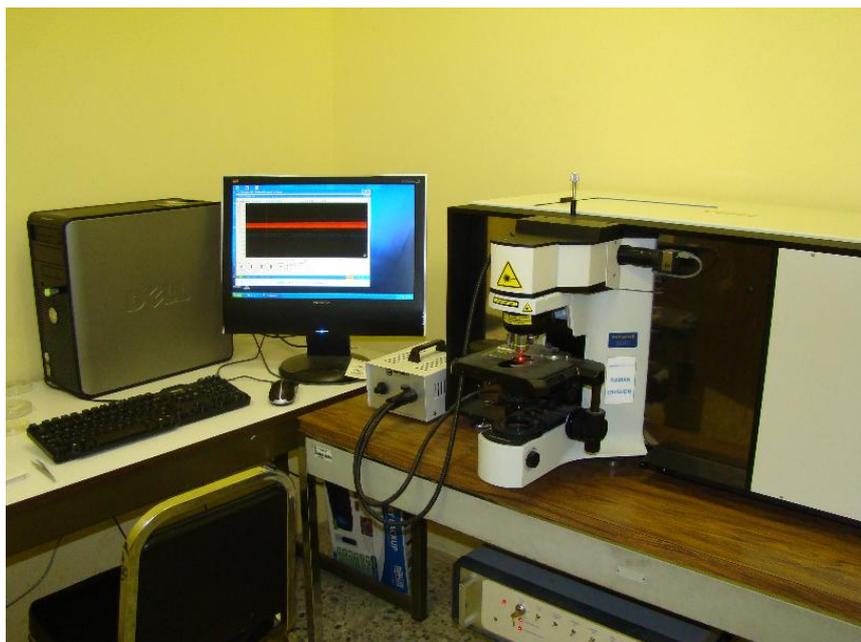


Figura 2.12. Equipo de MicroRaman utilizado.

2.1.6 Proceso de Bioconjugación

Por definición la bioconjugación es la unión de dos o más moléculas de origen biológico, dando como resultado a un nuevo sistema que combina las propiedades individuales de cada componente originando un sistema de características únicas.

Por otro lado, el proceso de bioconjugación puede ligar las moléculas biológicas con otro tipo de materiales: las partículas de metal (oro, plata), de semiconductores (CdSe, Zns, CdS) para producir los híbridos inorgánico/orgánicos.

Las técnicas de modificación y conjugación dependen del tipo de las moléculas que forman parte de este proceso. En algunos casos se emplean las moléculas conectoras (crosslinkers) que forman los puentes entre moléculas y participan en el proceso de bioconjugación. En caso de esta tesis la presencia de dichas moléculas es un factor muy importante para ligar los PC con biomoléculas de anticuerpos.

Nuestro punto cuántico tiene en sus extremos grupos funcionales propios del polímero con el que se recubrió, estos grupos funcionales son el carboxilo (COOH) y el amino (NH₂) (figura 2.13).

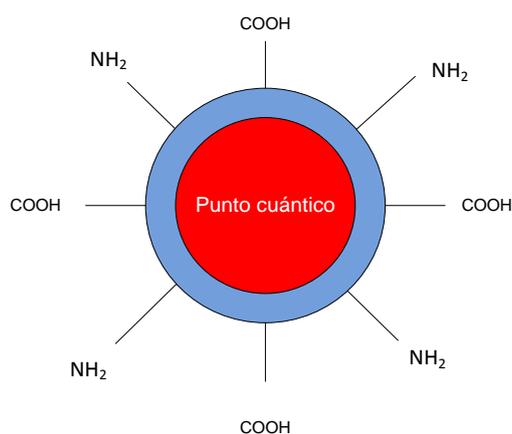


Figura 2.13. Punto cuántico con recubrimiento de polímero PEG y sus grupos funcionales presentes.

El anticuerpo antes de la bioconjugación se reduce para poder unirlo a los grupos funcionales que están presentes en el punto cuántico (figuras 2.14, 2.15).

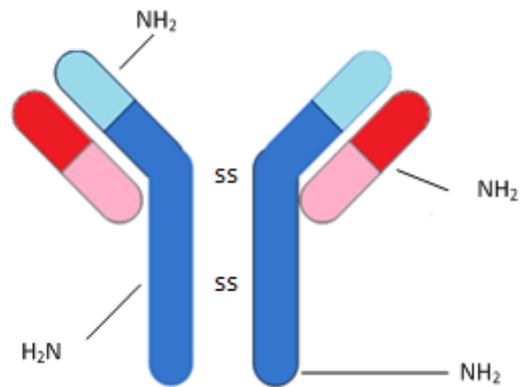


Figura 2.14. Diagrama de anticuerpo con enlaces de disulfuro presentes en su estructura.

En el proceso de reducción, el anticuerpo se separa de sus cadenas quedando los grupos $-SH$ (mercapto-tiol) libres para poder unirlos al punto cuántico (figura 2.15).

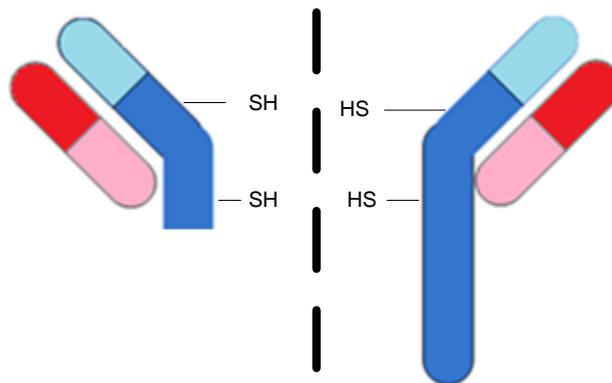


Figura 2.15. Fragmentos de anticuerpo reducido.

Para poder unir al punto cuántico al anticuerpo mediante el proceso de bioconjugación se utiliza un crosslinker que contenga los grupos funcionales capaces de reaccionar con ambas moléculas y así poder completar la reacción de conjugación (figura 2.16).

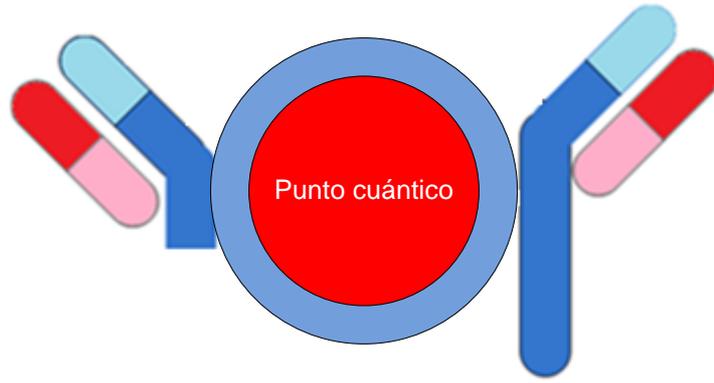


Figura 2.16. Punto cuántico con fragmentos de anticuerpo conjugado.

Para realizar el proceso de bioconjugación se utilizó el protocolo que contenía el kit de bioconjugación adquirido de la empresa Invitrogen, el diagrama esquemático del proceso se muestra en la figura 2.17.

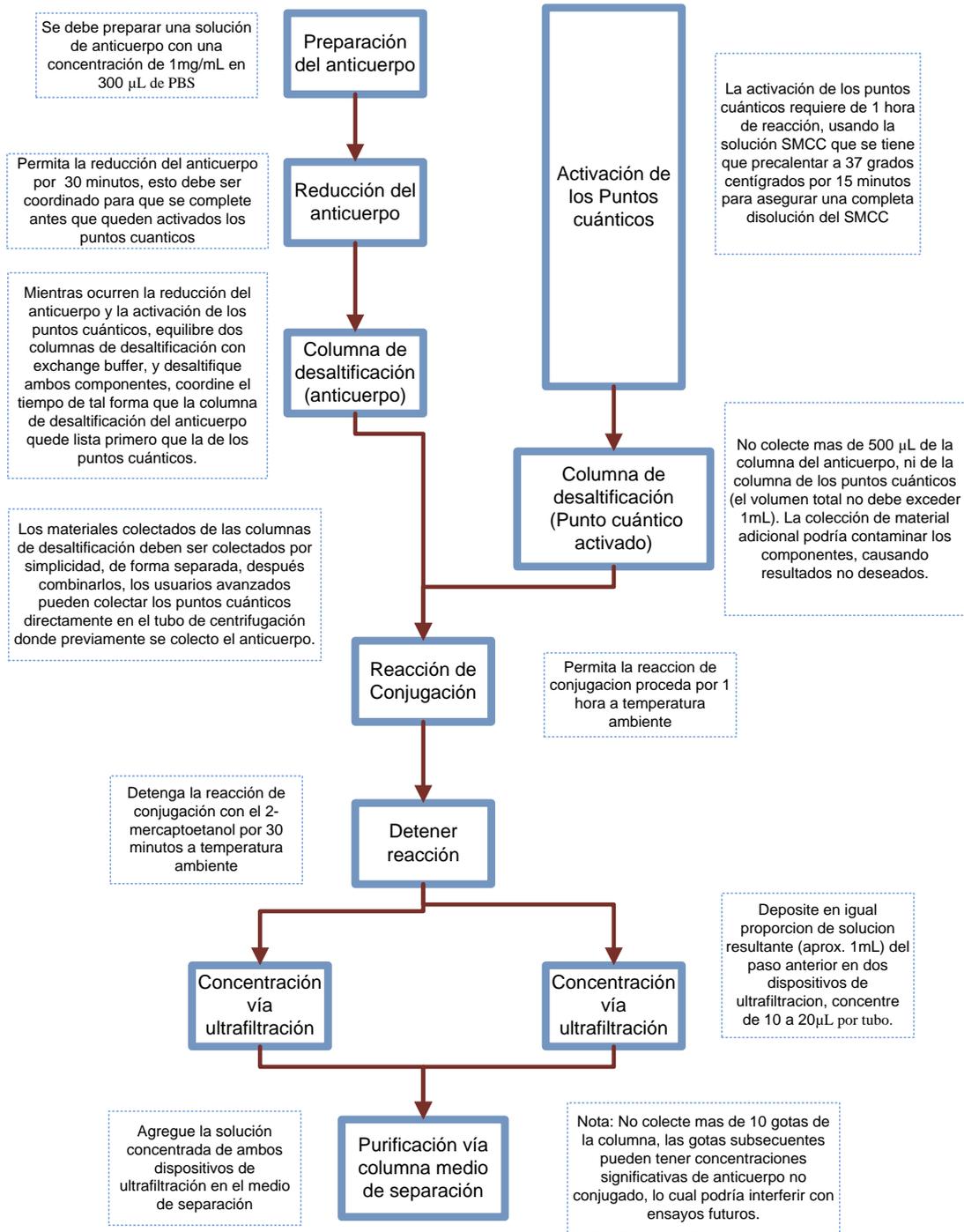


Figura 2.17. Diagrama esquemático del proceso de Bioconjugación.



Figura 2.18. Etapa del proceso experimental de bioconjugación (ultrafiltración de los puntos cuánticos activados).

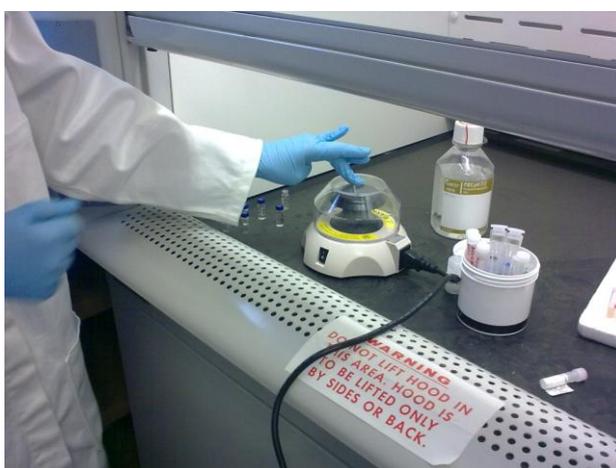


Figura 2.19. La campana de flujo laminar y la microcentrífuga utilizados en el proceso de bioconjugación.



Figura 2.20. El autor del presente trabajo realizando el proceso de bioconjugación.

Las muestras una vez funcionalizadas y listas para ser medidas se depositan en un sustrato de silicio cristalino y se dejan secar, de esta manera están listas para los análisis posteriores. El esquema completo de la bioconjugación con todos sus elementos queda de la forma siguiente:

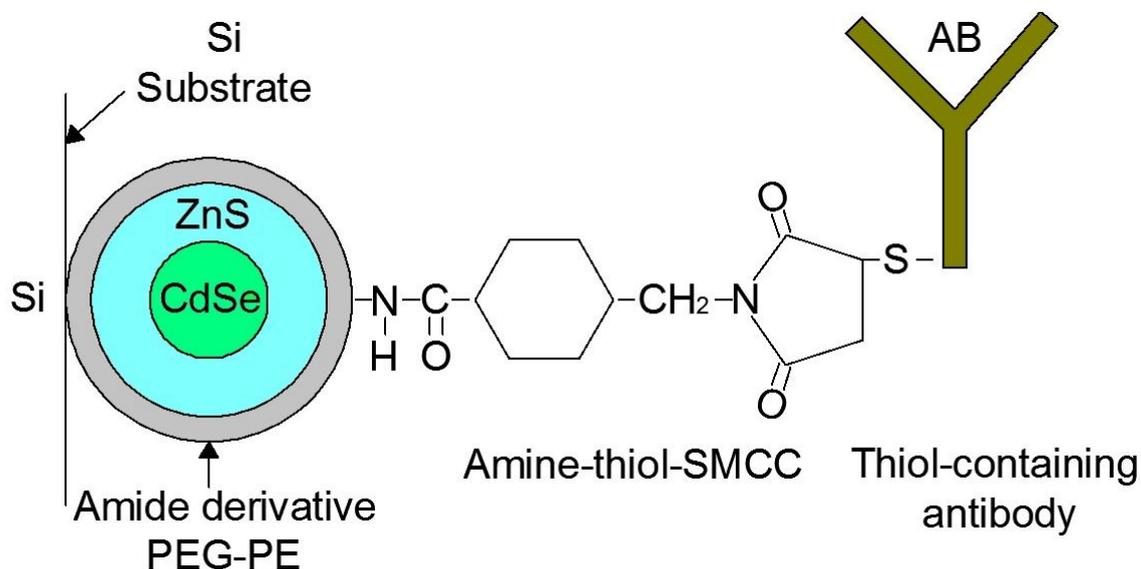


Figura 2.21. Se muestran las partes constituyentes de puntos cuánticos recubrimientos, grupos funcionales así como anticuerpos presentes en la molécula bioconjugada, así como el sustrato donde se deposita la molécula.

Las muestras s fueron medidas una semana después de realizarse el proceso de bioconjugación, de esta forma el lapso de medición entre muestras bioconjugadas y muestras no bioconjugadas fue de 1 semana.

2.2 Muestras

2.2.1 Puntos cuánticos (PCs)

Los puntos cuánticos utilizados para la investigación de esta tesis fueron adquiridos de la compañía INVITROGEN, estos PCs tienen las características necesarias para realizar el proceso de bioconjugación.

Las características que tienen estos puntos cuánticos son las siguientes:
Estructura núcleo /coraza de CdSe/ZnS, recubiertos con polímero PEG-PE: 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi-poli(etilen glicol)].

Los puntos cuánticos adquiridos fueron:

Qdot® 605 Antibody Conjugation Kit, emisión característica ~605nm

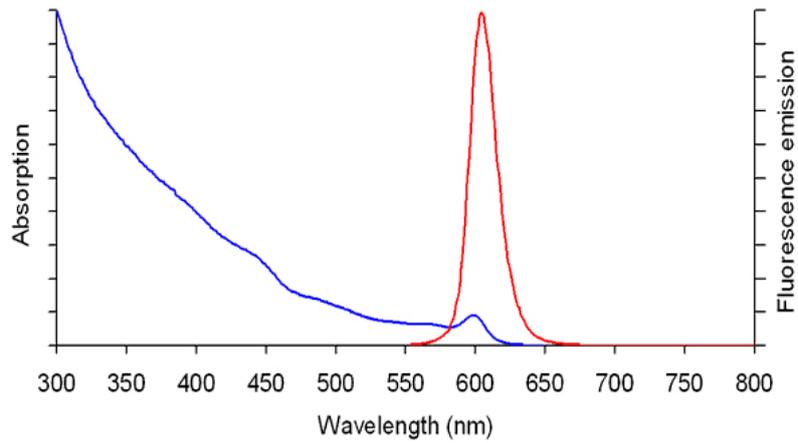


Figura 2.22. Espectro absorción/emisión de los puntos cuánticos de 605nm proporcionado por Invitrogen [73].

Qdot® 655 Antibody Conjugation Kit emisión característica ~655nm

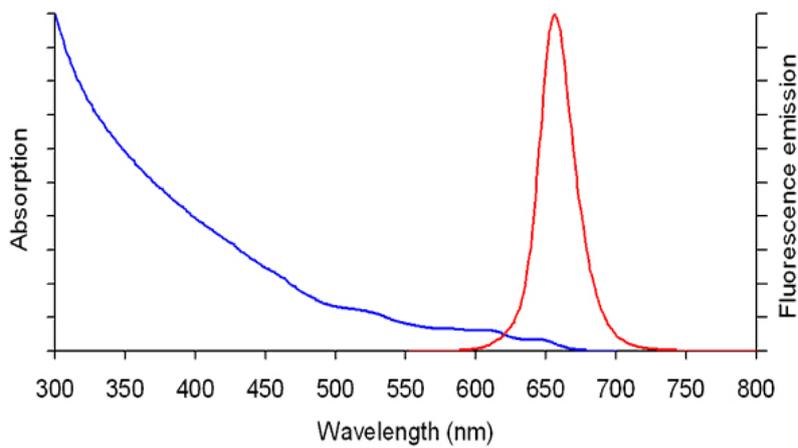


Figura 2.23. Espectro absorción/emisión de los puntos cuánticos de 655nm proporcionado por Invitrogen [74].

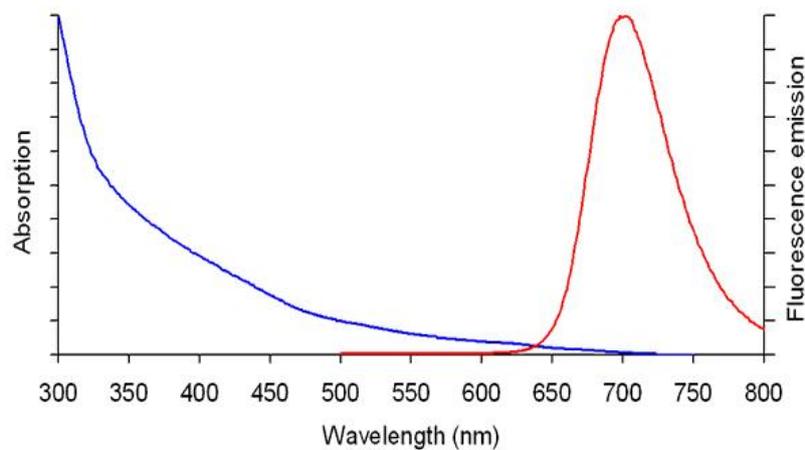


Figura 2.24. Espectro absorción/emisión de los puntos cuánticos de 705nm proporcionado por Invitrogen [109].

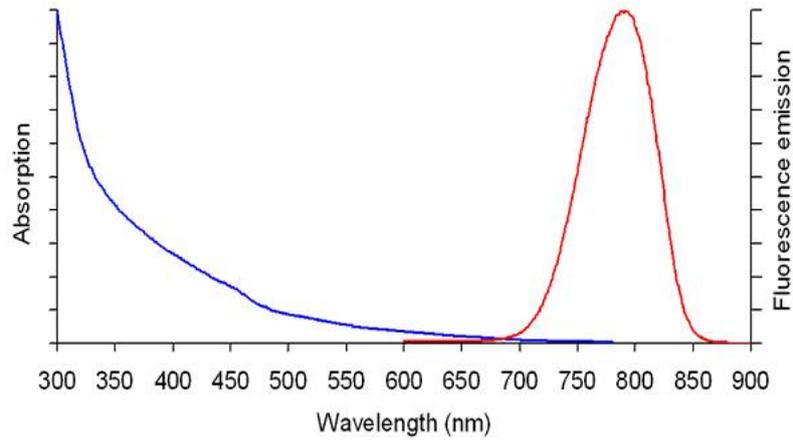


Figura 2.25. Espectro absorción/emisión de los puntos cuánticos de 800nm proporcionado por Invitrogen [110].

Cada uno de estos kits contiene:

Tabla 2.1 Componentes de los kits de bioconjugación

Material	Cantidad	Concentración
Qdot® nanocrystals (Componente A)	1 vial conteniendo 250µL	4µM
Solución SMCC (Componente B)	2 viales de 50µL	10mM solución en DMSO(Dimetil sulfóxido)
DTT(ditiotreitol) (Componente C)	50µL	1M
2-mercaptoetanol (Componente D)	50 µL	14.3 M
Exchange buffer (Componente E)	75 mL	50 mM MES, 2 mM EDTA, pH 6.0
Medio de separación (Componente F)	8 mL	suspensión que contiene 20% de etanol
Componentes consumibles		
Jeringa (Component H)	1	N/A
Columna (Componente I, para el Medio de separación (Componente F))	2	N/A
Tubo (Componente J)	1	N/A
Dispositivo de ultrafiltración (Componente K)	4	N/A
Tubo de centrifugación (Componente L)	8	N/A
Columna de desalificación (columna NAP™-5) (Componente M)	4	N/A

Capítulo 3: Resultados experimentales y discusión

Se estudiaron los puntos cuánticos de cuatro distintas emisiones características 605nm, 655nm, 705nm y 800nm; con (denotados por una P) y sin biomoléculas (denotados con una N) de anticuerpo IL-10. Se compararon las emisiones de todos estos PC para hacer las conclusiones sobre los cambios observados en los espectros de PL.

Para el análisis se realizaron ajustes con curvas Gaussianas, tomando en cuenta, que el fenómeno de Fotoluminiscencia es un fenómeno probabilístico. Este método permite ubicarla posición de bandas elementales y así caracterizar los espectros de las muestras. De esta forma se identifican los efectos de nuestros experimentos; cambios debido a interacciones entre los componentes: anticuerpo, polímero, núcleo/ coraza, etc.

Además, se hacen comparaciones con tres mediciones por cada muestra, ya sea bioconjugada o sin bioconjugación; esto con el fin de garantizar reproductibilidad de nuestros experimentos, se verifica que tengan patrones característicos y después se comparan las mediciones sin bioconjugación y con bioconjugación, con la finalidad de observar los cambios existentes y poder explicar los fenómenos que ocurren con el proceso de bioconjugación con el anticuerpo IL 10.

3.1 Análisis de los espectros de fotoluminiscencia de puntos cuánticos no conjugados de 605nm

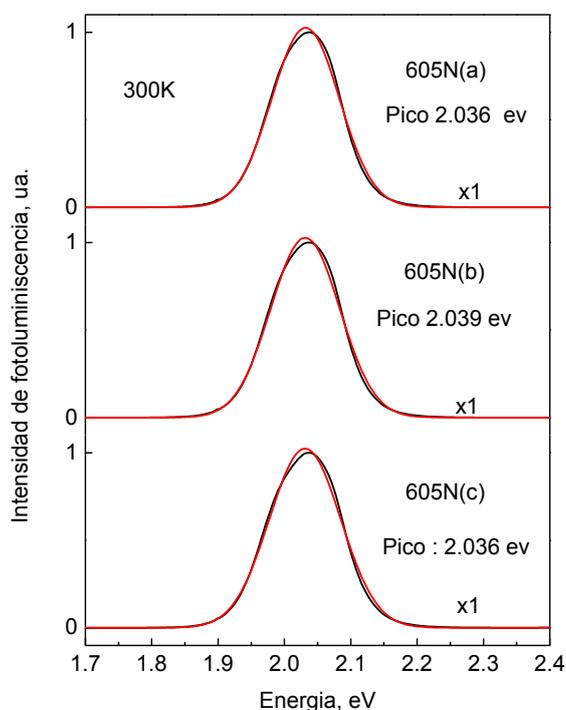


Figura 3.1. Detalle de ajustes con curvas Gaussianas

Para estas muestras de 605nm sin bioconjugación, el pico característico del núcleo se debe encontrar aproximadamente en 2.049eV.

En la figura 3.1 hacemos énfasis en los picos de emisión de los espectros; comparando a los espectros 605N(a) y 605N(b) como los que tienen el pico de emisión en 2.036eV con una diferencia energética de 0.013eV.

Para el espectro 605N(c) se encuentra la emisión máxima en 2.039eV, con una diferencia energética, (en comparación a la emisión que debería tener si emitiera justamente en 605nm), de 0.010eV. Estas diferencias energéticas tienen valores pequeños y están en un margen razonable de diferencia.

Tabla 3.1 Comparación de las áreas y anchos medios a la mitad del máximo presentes en los espectros medidos.

	605N(a)	605N(b)	605N(c)
Intensidad Integrada(ua)	0.130	0.133	0.138
FWHM(eV)	0.120	0.122	0.126
hν(eV)	2.036	2.039	2.036
Intensidad máxima(ua)	1.258E7	1.1896E7	1.149E7
Normalización	x1	x1	x1

Estos puntos cuánticos están recubiertos con polímero PEG-PE (Poli-etilenglicol-fosfatidiletanolamina), que es transparente a esas longitudes de onda de excitación. Por lo tanto, no debería haber ninguna banda extra en nuestras emisiones; Al realizar el ajuste con una curva Gaussiana nos damos cuenta que efectivamente, solo está presente la emisión del núcleo. Si analizamos los datos de la tabla 3.1 podemos observar las características de emisión de nuestra muestra para después poder comparar estos datos después de la bioconjugación.

3.2 Análisis de los espectros de fotoluminiscencia de puntos cuánticos con una emisión de 605nm con biomoléculas

Ahora analizaremos los espectros de nuestros puntos cuánticos bioconjugados con biomoléculas de anticuerpo IL-10.

Los espectros de la figura 3.2 presentan un comportamiento similar presentando regularidad en las curvas y sin aparición de hombros debidos a interacciones de la muestra después de la bioconjugación.

Para poder comprobar que efectivamente no se presentan hombros o bandas dentro de los espectros, se realizó el ajuste gaussiano y se confirmó la ausencia de hombros en los picos principales.

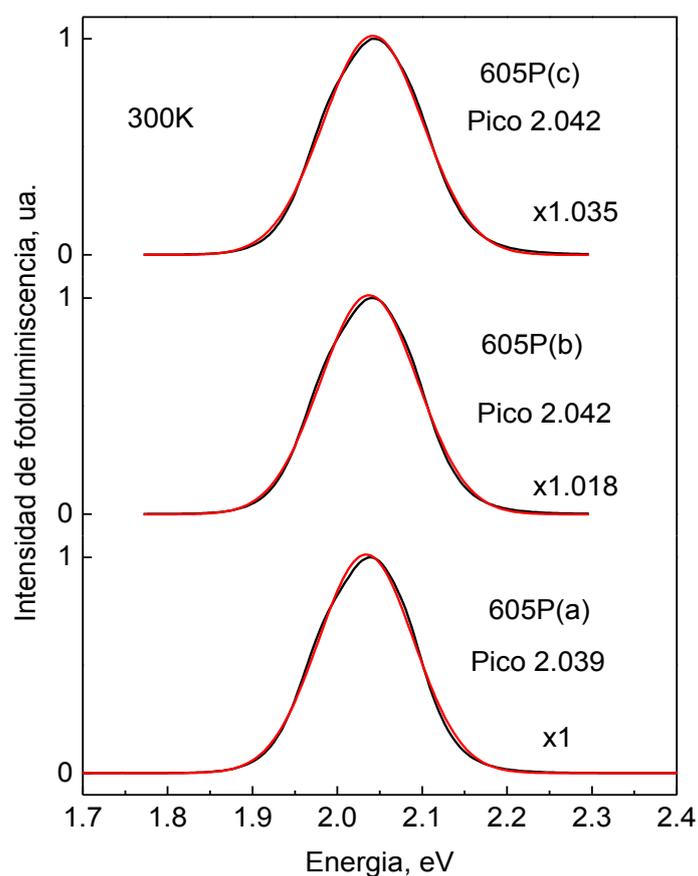


Figura 3.2. Ajustes de los espectros de fotoluminiscencia con curvas Gaussianas para la muestra de 605 bioconjugadas con anticuerpo IL-10.

Tabla 3.2. Se muestran las áreas normalizadas y los anchos medios a la mitad del máximo característicos de cada una de las mediciones de los espectros.

	605P(a)	605P(b)	605P(c)
Intensidad Integrada (ua.)	0.142	0.145	0.149
FWHM(eV)	0.132	0.135	0.138
hv(eV)	2.039	2.042	2.042
Intensidad máxima (ua.)	1.320E7	1.297E7	1.275E7
Normalización	x1	x1	x1

Una vez realizados los ajustes observamos que las curvas experimentales son Gaussianas, lo que indica la ausencia de emisiones que no sean del núcleo. La emisión máxima se presenta en promedio en 2.040 eV, que para este tamaño de los núcleos debería ser 2.049 eV, esta pequeña diferencia se debe a que los PC adquiridos no tienen tamaño exacto para dar esa emisión energética.

3.3 Comparación de espectros con y sin bioconjugación de 605nm.

Para esta sección se han dividido los espectros en tres pares, y cada una de las figuras contiene un espectro de muestras de 605nm bioconjugadas con anticuerpos de IL 10 y otro espectro de muestras no bioconjugadas.

Primera comparación de los espectros conjugados y no conjugados de puntos cuánticos de 605nm.

Tabla 3.3 Comparación de los espectros bioconjugados y no bioconjugados de puntos cuánticos de 605nm de emisión característica.

	605P(a)	605N(a)
Intensidad Integrada(ua)	0.142	0.130
FWHM(eV)	0.132	0.120
hv(eV)	2.039	2.036
Intensidad máxima(ua)	1.320E7	1.258E7
Normalización	x1	X1
ΔE (eV)	0.003	

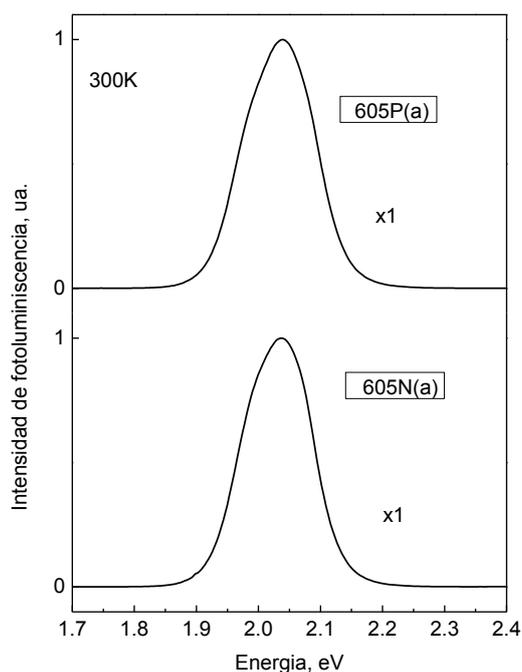


Figura 3.3. Espectros de las muestras de 605nm con y sin biomoléculas.

En la figura 3.3 se observa que el espectro de la muestra bioconjugada presenta una intensidad integrada y un ancho medio mayores, al igual que una emisión máxima en una energía más alta (por una pequeña diferencia de aprox. 3meV). En ambos casos, no se presentan bandas extras a la del núcleo, y se tiene el mismo orden de intensidad.

Segunda comparación de los espectros conjugados y no conjugados de puntos cuánticos de 605nm.

Tabla 3.4 Comparación entre los valores principales de los espectros de muestras de 605nm con y sin biomoléculas.

	605P(b)	605N(b)
Intensidad Integrada(ua)	0.145	0.133
FWHM(eV)	0.013	0.122
h ν (eV)	2.042	2.039
Intensidad máxima(ua)	1.297E7	1.189E7
Normalización	x1	x1
ΔE (eV)	0.003	

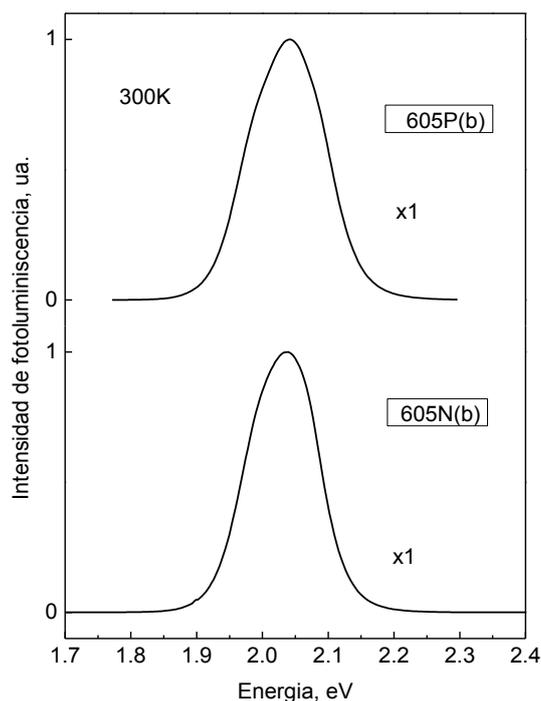


Figura 3.4. Espectros de 605nm de emisión característica con y sin biomoléculas

En esta comparación (figura 3.4) que corresponde a una segunda medición de las muestras, podemos observar, un aumento del ancho medio y de la intensidad integrada de los espectros de las partículas conjugadas con biomoléculas, como en el caso anterior. Así mismo, se observa un ligero desplazamiento hacia altas energías en la emisión, la cual es de 3meV. Sin embargo tienen el mismo orden en las magnitudes de intensidad máxima, y no se aprecian bandas extras además de la emisión del núcleo de los puntos cuánticos.

Tercera comparación de los espectros conjugados y no conjugados de puntos cuánticos de 605nm.

Tabla 3.5. Comparación entre los valores principales de los espectros de muestras de 605nm con y sin biomoléculas.

	605P(c)	605N(c)
Intensidad Integrada (ua)	0.149	0.138
FWHM (eV)	0.138	0.126
hν(eV)	2.042 eV	2.036 eV
Intensidad máxima	1.275E7	1.149E7
Normalización	x1	x1
ΔE (eV)	0.006	

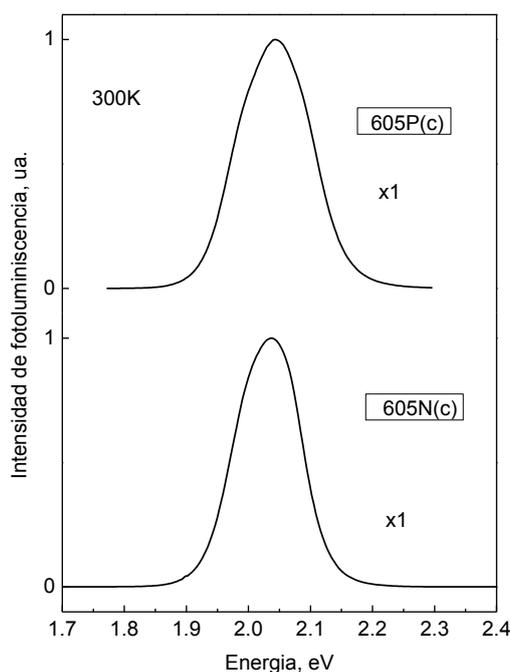


Figura 3.5. Espectros de las muestras de 605nm con y sin biomoléculas.

Al igual que en las gráficas anteriores observamos, que la intensidad integrada, el ancho medio, y la intensidad máxima son mayores en la muestra bioconjugada. De la misma forma se observa un desplazamiento muy ligero de la emisión hacia energías más altas además de conservarse el mismo orden de las intensidades máximas entre una y otra muestra. Nuevamente no se observa la presencia de bandas que no pertenecen al núcleo de partículas.

Análisis:

En este estudio de los espectros de fotoluminiscencia de las muestras de 605nm con y sin biomoléculas, podemos concluir que las muestras no sufrieron una gran variación de su comportamiento de emisión después del proceso de bioconjugación: conservan la forma y orden de magnitud de la intensidad. Además presentan un pequeño desplazamiento de los máximos de los picos hacia energías más altas.

Las pequeñas diferencias en variaciones de amplitud máxima, que hemos observado en los espectros de PL, lo más probable, se deben a las variaciones de la concentración de partículas depositadas sobre el sustrato de silicio: con mayor número de partículas la intensidad es mayor.

3.4 Análisis de los espectros de fotoluminiscencia de puntos cuánticos con emisión de 655nm sin biomoléculas a temperatura de 300K

A los puntos cuánticos de emisión de 655nm les corresponde la energía de aproximadamente 1.8931 eV. La emisión observada en los espectros obtenidos resulto de 1.8931eV para las primeras graficas (B) y (C) y 1.8816 eV para la gráfica (A) (Fig. 59).

En las graficas B y C se aprecias unos pequeños hombros en 1.8562 eV, con una diferencia que en grafica B este es de menor intensidad.

En la grafica A el máximo del pico experimental se encuentra en 1.8816eV. Sin embargo, para este tamaño de los PC este debía estar en aproximadamente 1.8931 eV. Esta pequeña discordancia puede ser atribuida a la discrepancia en el tamaño de los puntos.

Se realizó la comparación entre los espectros de PL de los Kits no conjugados y bioconjugados por medio de las intensidades máximas normalizados.

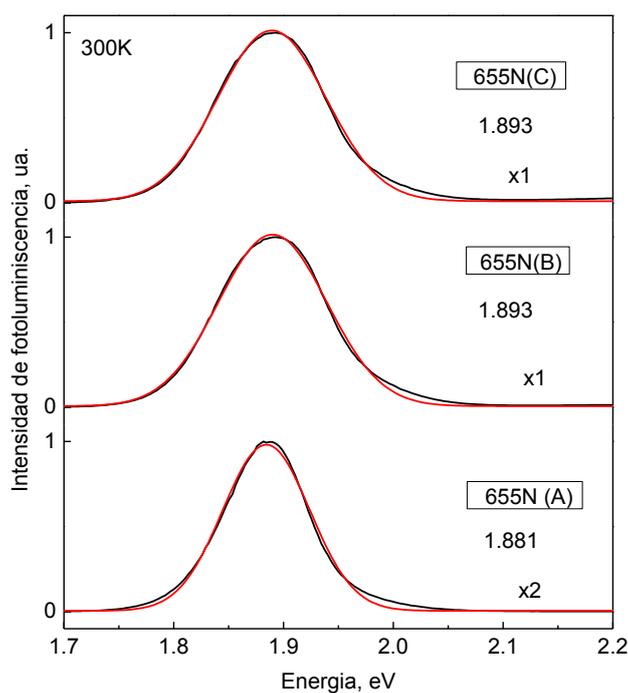


Figura 3.6. Ajuste con curvas Gaussianas de la muestra de 655nm sin biomoléculas.

Tabla 3.6 Los datos de las tres mediciones de los espectros de la figura 3.6.

	655N (A)	655N (B)	655N (C)
Intensidad Integrada (ua)	0.096	0.124	0.123
FWHM	0.093	0.116	0.115
hV(eV)	1.881	1.893	1.893
Intensidad máxima (ua)	6.440E6	1.107E7	1.089E7
Normalización	X2	x1	x1

En la figura 3.6 se muestran los espectros de la muestra de 655nm. Se realizaron los ajustes con Gaussianas para asegurarnos de ausencia de bandas extras presentes en el espectro. Se observa que los parámetros de la curva con respecto al algoritmo gaussiano ajustan perfectamente sin producir las diferencias sustanciales en la forma de la curva.

Además, se realizó la comparación de las muestras de los dos diferentes kits de bioconjugación 655N comercialmente adquiridos para validar si existen diferencias entre estos. En este apartado se normalizaran las curvas de acuerdo con las intensidades máximas de los dos kits.

Primera comparación entre kits de 655nm. Las muestras de los kits se nombraron: 655N Kit 1 y 655N Kit 2. Como se puede observar en la tabla 3.7 y en la figura 3.7, la muestra 655N Kit 2 tiene mayor intensidad máxima y ancho a la mitad de la altura y mayor intensidad integrada. Sin embargo la diferencia energética entre los picos de emisión máxima no es muy grande teniendo como diferencia aproximadamente 0.02eV.

Tabla 3.7. Comparación de los parámetros de la figura 3.7

	655N kit 2(A)	655N Kit1(A)
Intensidad Integrada (ua)	0.187	0.096
FWHM (eV)	0.173	0.093
hV(eV)	1.904	1.881
Intensidad máxima (ua)	1.678E7	6.440E6
Normalización	X1	X3

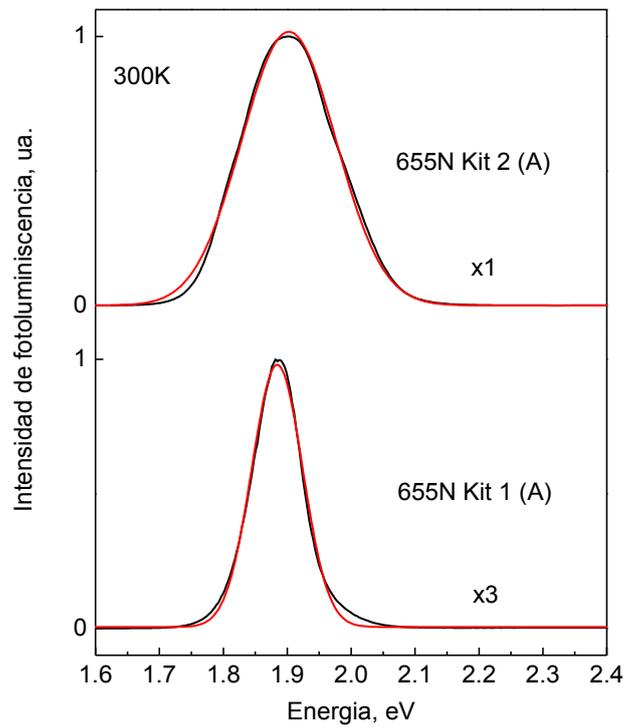


Figura 3.7. Espectros de PL de los Kits 655-1 y 655-2.

Segunda comparación entre kits de 655nm

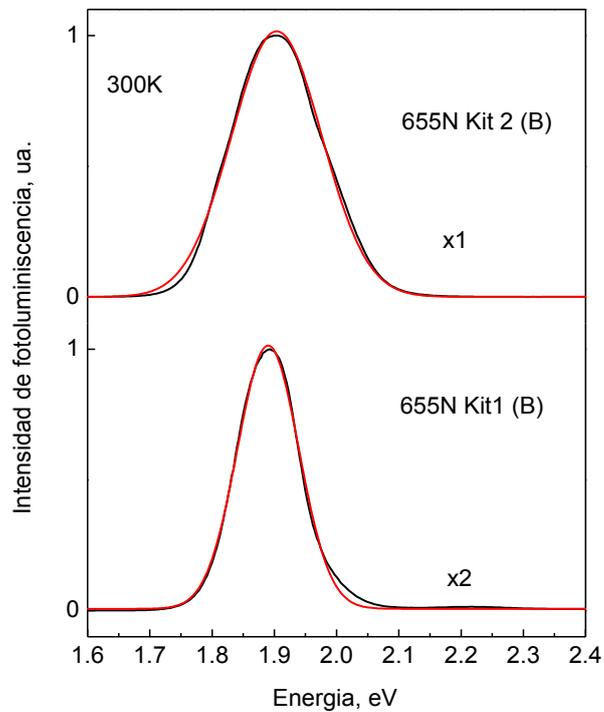


Figura 3.8. Espectros de PL de los dos Kits de 655nm.

Tabla 3.8. Comparación de los parámetros de cada espectro de los Kits 655nm.

	655N kit 2(B)	655N kit 1(B)
Intensidad Integrada (ua)	0.184	0.124
FWHM (eV)	0.170	0.116
hv(eV)	1.901	1.893
Intensidad máxima (ua)	1.673E7	1.107E7
Normalización	x1	X2

En este espectro (Fig. 3.8 tabla 3.8) se puede observar una mayor intensidad de emisión máxima y por consiguiente de ancho medio y de intensidad integrada en el espectro de 655N kit 2. Sin embargo el orden de las intensidades de ambos kits es similar, así como en la energía de emisión teniendo una diferencia sumamente pequeña de aproximadamente 0.01 eV.

Tercera comparación entre kits de 655nm.

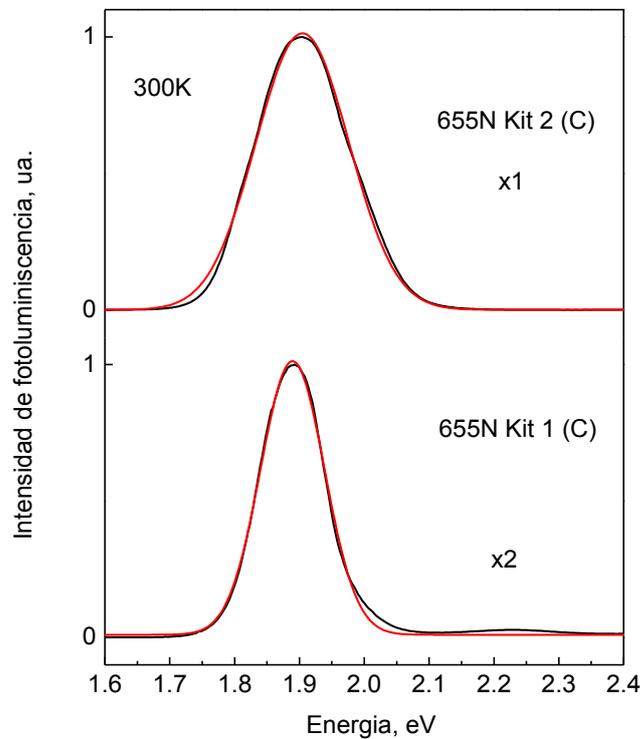


Figura 3.9. Comparación de espectros de 655nm

Tabla 3.9. Comparación de datos de los dos kits de 655N.

	655N kit 2(C)	655N kit 1(C)
Intensidad Integrada (ua)	0.181	0.123
FWHM (eV)	0.168	0.115
hv(eV)	1.904	1.893
Intensidad máxima (ua)	1.671E7	1.089E7
Normalización	x1	X2

En esta tercera comparación (Fig. 3.9 Tabla 3.9) se observa nuevamente la tendencia de mayor intensidad máxima así como de intensidad integrada y de ancho medio en el kit 2 de 655nm. Sin embargo también se debe observar que la emisión máxima se ubica en valores muy cercanos de energía en 1.90 y en 1.89 con una diferencia aproximada de 0.01 eV lo que es una cantidad muy pequeña para concluir que hay un cambio sustancial.

3.5 Análisis de los espectros de fotoluminiscencia de puntos cuánticos de emisión de 655nm con biomoléculas.

En la figura 3.10 se presentan los espectros de fotoluminiscencia de los PCs de 655nm bioconjugados, enfatizando la emisión máxima. En los espectros (C) y (B) la emisión máxima es de 1.933 eV y en la grafica (A) se tiene un máximo de 1.937 eV; lo que indica un cambio hacia energías de emisión más altas en comparación con los espectros sin biomoléculas.

Tabla 3.10 Comparación de datos entre mediciones de la muestra bioconjugada de 655P

	655P(A)	655P(B)	655P(C)
Intensidad Integrada (ua)	0.091	0.098	0.096
FWHM (eV)	0.090	0.094	0.093
hv(eV)	1.937	1.933	1.933
Intensidad máxima	6.882E5	6.453E5	4.419E5
Normalización	x16	x17	x25

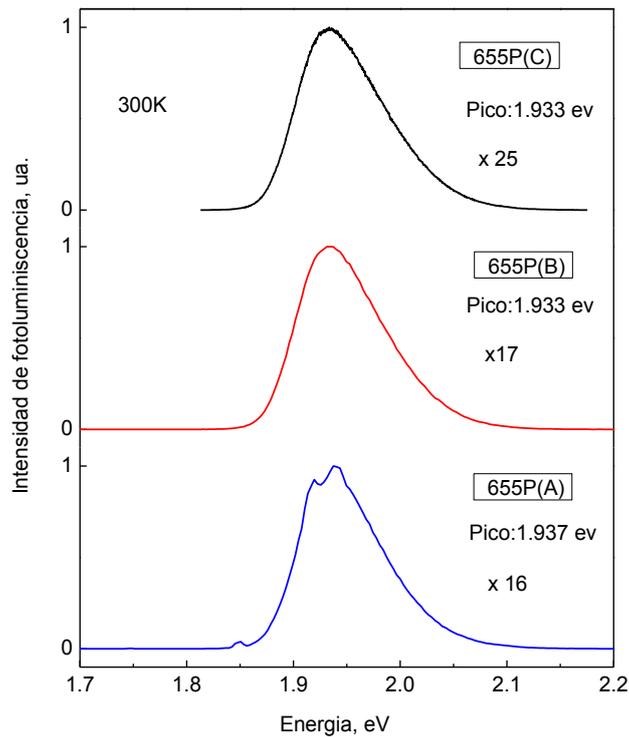


Figura 3.10. Los máximos de emisión de los espectros de la muestra 655P.

En la figura 3.10 se aprecia a diferencia en los máximos de emisión de los espectros de PC con bioconjugación. La grafica presenta un espectro asimétrico, con una diferencia de pendientes. Se observa un pico más pronunciado con mayores energías y va decayendo con una pendiente menor. Esto se debe al proceso de bioconjugación, que genera una carga extra en la superficie de los puntos cuánticos, y al efecto stark, esto se explica en la sección de discusión de resultados.

3.6 Comparación de puntos cuánticos de 655nm de emisión con y sin biomoléculas.

Para hacer la comparación entre los espectros de PL de los PCs con y sin bioconjugación se agruparon en pares los espectros respectivos. En la Figura 3.14 se observa el desplazamiento que experimenta la muestra bioconjugada 655P La muestra sin bioconjugación tiene su emisión máxima en 1.8816 eV y después de la bioconjugación la emisión máxima se desplaza hacia 1.9375 eV teniendo como diferencia 0.0559 eV hacia energías más altas.

Primera comparación

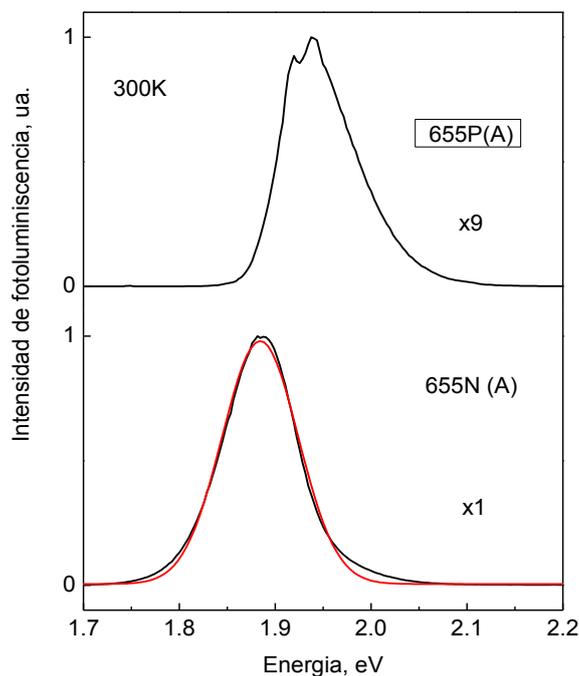


Figura 3.11. Comparación entre espectros de 655nm con y sin bioconjugación.

Tabla 3.11. Parámetros de espectros de 655 con y sin bioconjugación

	655P(A)	655N(A)
Intensidad Integrada (ua)	0.091	0.096
FWHM (eV)	0.090	0.093
h ν (eV)	1.937	1.881
Intensidad máxima	6.882E5	6.440E6
Normalización	x16	x1
ΔE (eV)	0.038	

En la figura 3.11 tabla 3.11 se observan las características relativas a la intensidad integrada, ancho medio, e intensidad máximas siendo mayores en nuestra muestra sin bioconjugación; sin embargo en la muestra 655+IL 10 el pico de emisión máxima corresponde a una energía de 1.9375eV y el pico correspondiente a la muestra sin bioconjugación se encuentra en 1.88eV. De esta manera, podemos observar, como la bioconjugación agrega al espectro unas características particulares.

Segunda comparación de 655nm con y sin biomoléculas.

En la figura 3.12 se observa nuevamente como el ancho medio de nuestro espectro bioconjugado con anticuerpo IL 10 es más pequeño además ocurre un cambio en la forma de la curva y el pico se recorre hacia altas energías.

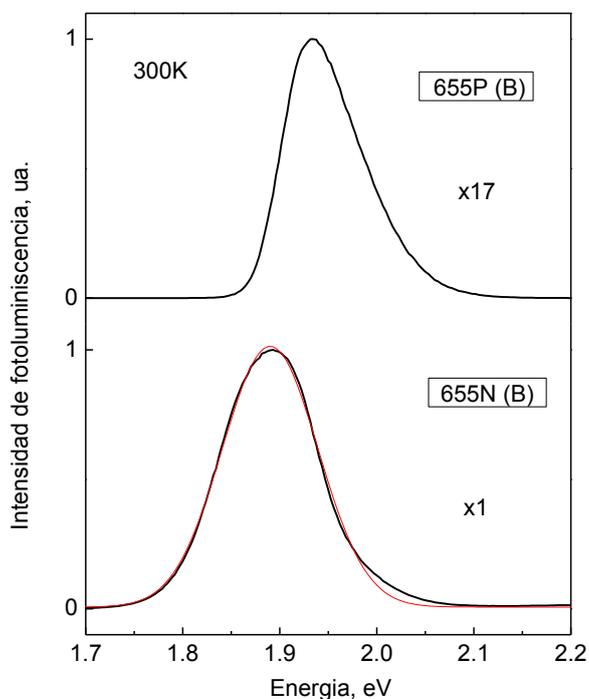


Figura 3.12. Comparación entre espectros de puntos cuánticos conjugados y no conjugados.

Tabla 3.12. Comparación de datos entre espectros de 655nm con y sin biomoléculas.

	655P(B)	655N(B)
Intensidad Integrada (ua)	0.098	0.124
FWHM (eV)	0.094	0.116
Hv(eV)	1.933	1.893
Intensidad máxima	6.453E5	1.107E7
Normalizacion	x17	x1
ΔE (eV)	0.04	

De la misma forma se visualiza que la intensidad máxima, el ancho medio e intensidad integrada (Fig. 3.12 y Tabla 3.12) son menores en la muestra bioconjugada. Además, observamos el desplazamiento del máximo del pico 655P(B) hacia energías mayores (en aproximadamente 0.04 eV) y un espectro asimétrico (con pendientes diferentes a ambos lados de la curva).

Tercera comparación de muestras de 655nm con y sin biomoléculas.

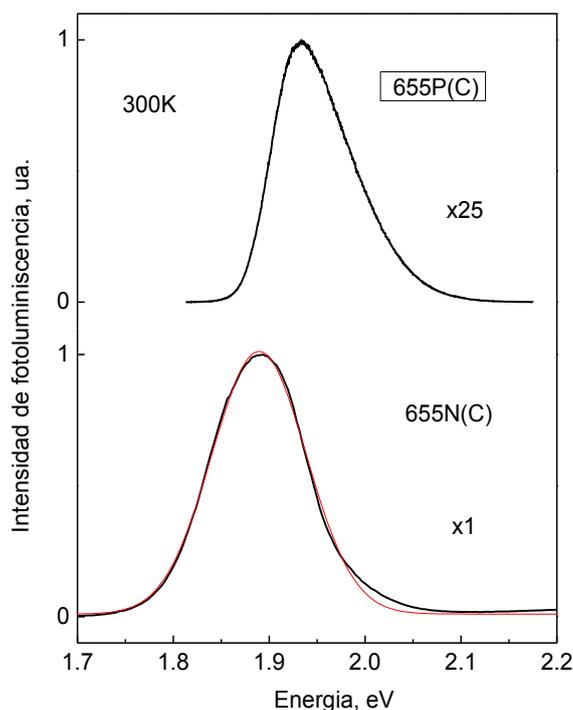


Figura 3.13. Comparación entre espectros de 655nm con y sin biomoléculas.

Tabla 3.13. Comparación de datos entre espectros de 655nm con y sin biomoléculas.

	655P(C)	655N(C)
Intensidad Integrada (ua)	0.096	0.123
FWHM (eV)	0.093	0.115
h ν (eV)	1.933	1.893
Intensidad máxima.	4.419E5	1.089E7
Normalización	x25	X1
ΔE (eV)	0.04	

En la figura 3.13 y tabla 3.13 se observan nuevamente las características presentes en la muestra con biomoléculas semejantes a los casos presentados anteriormente: ancho medio menor y un desplazamiento hacia mayores energías de la muestra con biomoléculas; una diferencia 0.04 eV con un desplazamiento del valor pico máximo hacia mayores energías de la muestra con biomoléculas.

Para poder determinar si algún agente químico está influyendo en los resultados de las mediciones de PL en las muestras estudiadas, se realizó el análisis con la técnica de fotoluminiscencia de uno de los principales componentes utilizados en el proceso de bioconjugación.

Comparación de sustancia PBS

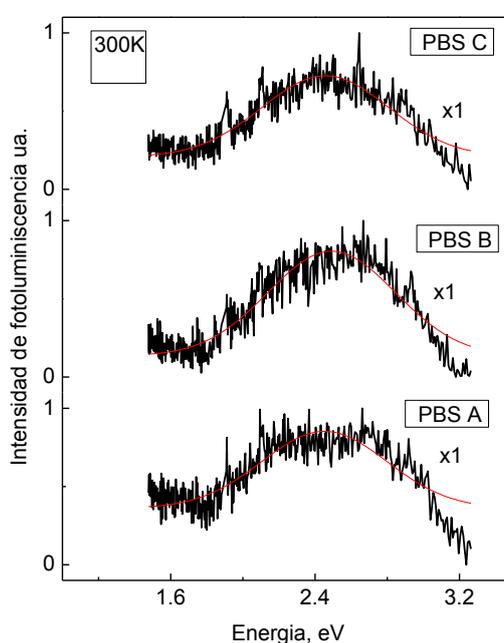


Figura 3.14. Espectros de fotoluminiscencia de PBS

Tabla 3.14 Parámetros de Fotoluminiscencia

	PBS A	PBS B	PBS C
Intensidad Integrada (ua)	0.457	0.591	0.042
FWHM (eV)	0.829	0.830	0.817
h ν (eV)	2.660	2.660	2.640
Intensidad máxima	1650	2110	2260
Normalización	X1.36	X1.07	X1

Esta curva (figura 3.14))presenta un ancho muy grande y la emisión máxima de esta curva se presenta en 2.66 eV (lejos de la emisión de nuestra muestra con biomoléculas). Además la intensidad de los picos de esta sustancia es relativamente baja, con lo que podemos descartar una contribución importante de este solvente en los espectros de PL de la muestra con biomoléculas.

Observaciones:

Se ha observado que en las muestras de 655 conjugadas con biomoléculas existe un cambio en la emisión, que pueden ser atribuidos a dos fenómenos particulares: el primero el efecto Stark y el segundo a la forma en la cual los fragmentos de anticuerpo se unen a nuestro punto cuántico. Se descartan los efectos debidos al solvente utilizado, ya que la intensidad de los picos debidos a este es muy baja para tener una contribución en los efectos observados de las curvas.

Se observan características de un ancho medio mucho menor y un desplazamiento hacia altas energías; que puede ser originada por el efecto Stark, debido al campo eléctrico incidente. Estas pequeñas estructuras (PCs) al estar interactuando con moléculas orgánicas que poseen dipolos, inducen una carga extra, que con el campo eléctrico externo aplicado, modifican la banda prohibida, produciendo un desplazamiento hacia energías más altas.

De las diferentes sustancias presentes en el proceso de bioconjugación, al secarse a temperatura ambiente, algunas llegan a formar pequeños cristales en los cuales se encuentran embebidos los PCs bioconjugados. El proceso de formación de estos pequeños cristales ejerce en los puntos cuánticos una fuerza compresiva, que hace que el confinamiento sea aún mayor, provocando también un desplazamiento hacia altas energías en su espectro de emisión.

3.7 Comparación de puntos cuánticos de 705nm sin biomoléculas.

Presentamos el estudio de las muestras de 705nm sin biomoléculas medidas a una temperatura de 300K. Se puede observar en la figura 3.15 la emisión características de la muestra de 705nm. La emisión teórica de 705nm debería encontrarse en 1.7588eV, se observa que la emisión de las muestras se encuentra en 1.77 en promedio, lo cual indica que está emitiendo en 700nm aproximadamente; esto representa una diferencia muy pequeña de solo 5nm con respecto a la emisión teórica. No se observan hombros ni picos adyacentes a la emisión máxima; por lo cual descartamos defectos

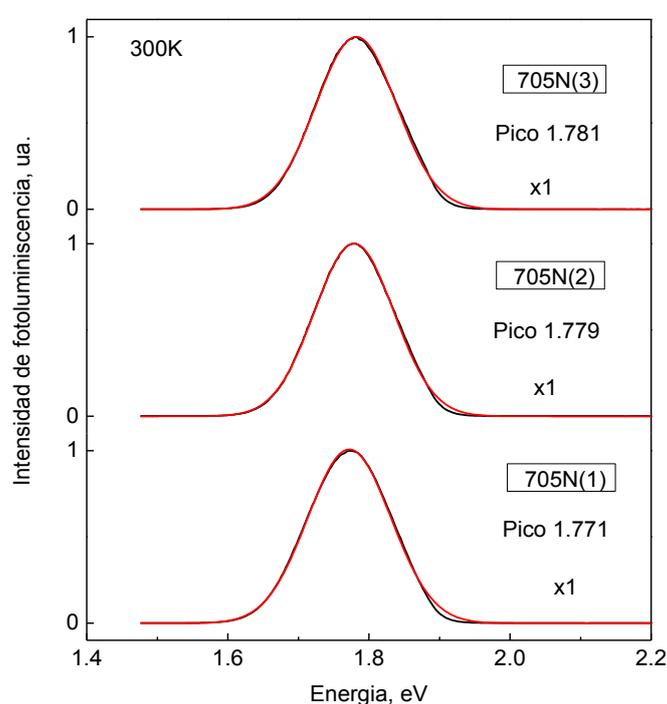


Figura 3.15. Espectros de fotoluminiscencia de las muestras de 705nm sin biomoléculas con ajuste gaussiano.

Tabla 3.15. Parámetros de fotoluminiscencia de la figura 3.15.

	705N(1)	705N(2)	705N(3)
Intensidad Integrada (ua)	0.1492	0.141	0.143
FWHM (eV)	0.138	0.132	0.134
hv(eV)	1.771	1.779	1.781
Intensidad máxima	5.323E6	4.040E6	4.062E6
Normalización	x1	x1	x1

Una vez realizado el ajuste gaussiano se puede extraer y analizar estas intensidades en la tabla número 3.15, donde se tienen las intensidades máximas de cada medición, estas intensidades están en el mismo orden de 10^6 y el pico de emisión máxima se encuentra en promedio en 1.77eV. El ancho medio de cada curva que es en promedio de las tres curvas de 0.13 en electrón Volt.

3.8 Comparación de puntos cuánticos de 705nm con biomoléculas.

Analizando la muestra de 705P se observan ciertas características que comparten cada una de las tres mediciones mostradas.

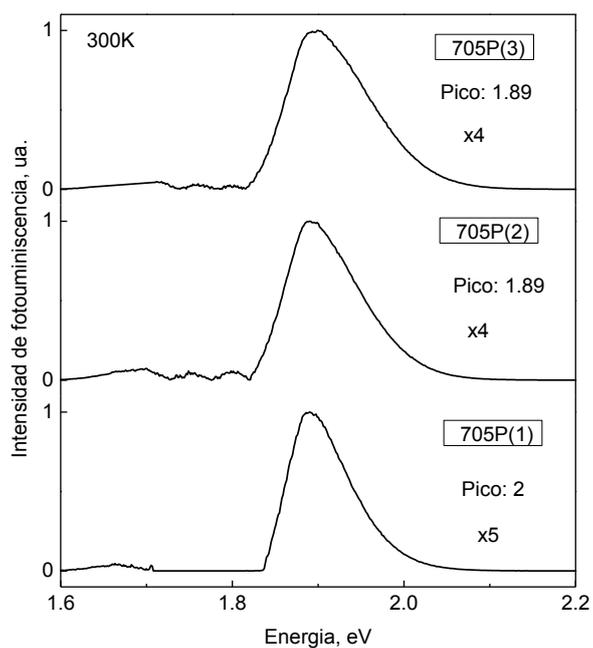


Figura 3.16. Espectros de fotoluminiscencia de las muestras de 705nm con biomoléculas.

Tabla 3.16 Parámetros de la figura 3.16.

	705P(1)	705P(2)	705P(3)
Intensidad Integrada (ua)	0.087	0.100	0.087
FWHM (eV)	0.087	0.099	0.087
h ν (eV)	1.890	1.890	1.890
Intensidad máxima (ua)	1.111E6	1.310E6	1.407E6
Normalización	X5	x4	X4

En la figura 3.16 y la tabla 3.16 se puede observar que el pico máximo de emisión no varía de su posición en 1.89 eV. Esto indica una alta reproductibilidad de los espectros en esta muestra. También se ve que las intensidades máximas están en el mismo orden de magnitud 10^6 . Además se observa que el ancho medio se encuentra en promedio en 0.09 unidades arbitrarias para las tres mediciones. El aspecto más característico es la forma asimétrica de las curvas, este fenómeno se presentó en las tres y se atribuye al efecto de la bioconjugación sobre los puntos cuánticos.

3.9 Comparación de puntos cuánticos de 705nm con y sin biomoléculas.

En esta sección comparamos las muestras de 705nm con y sin biomoléculas, en pares para de esta forma poder visualizar mejor los cambios existentes en sus parámetros.

Tabla 3.17. Parámetros de la figura 3.17.

	705N(1)	705P(1)
Intensidad Integrada (ua)	0.149	0.110
FWHM (eV)	0.138	0.104
h ν (eV)	1.771	1.880
Intensidad máxima (ua)	5.323E6	1.228E6
Normalización	x1	x4
ΔE (eV)	0.111	

Primera comparación de muestras de 705nm con y sin biomoléculas.

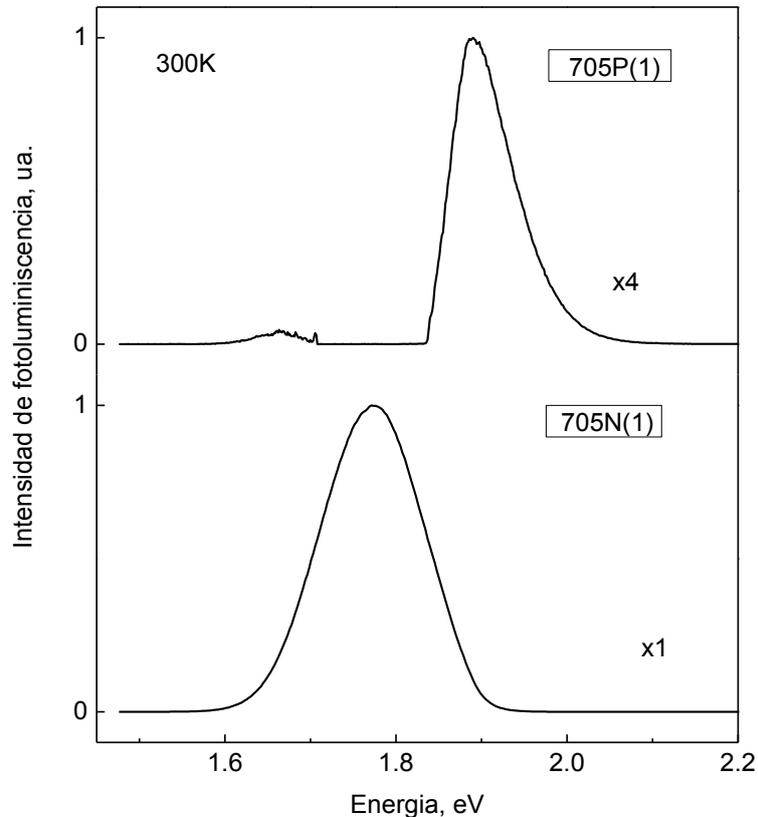


Figura 3.17. Espectros de fotoluminiscencia de las muestras de 705nm con (705P) y sin (705N) biomoléculas.

En la figura 3.17 se observa que los espectros de las muestras analizadas (primera comparación) difieren tanto en morfología como en emisión máxima, esta última se encuentra a mayores energías. Para la muestra bioconjugada 705P(1); al mismo tiempo para la muestra sin bioconjugación 705N(1), esta se encuentra en la emisión característica de puntos cuánticos de 705nm y mantiene una forma Gaussiana, sin observar hombros ni alguna otra característica que pudiera denotar defectos o características previas que debieran ser consideradas.

Analizando los datos de la tabla 3.17, se observa que la intensidad disminuye aproximadamente en 4 veces para la muestra 705P(1) en comparación con la muestra no bioconjugada 705N(1). El ancho medio también disminuye, y la emisión máxima del aumenta aproximadamente 0.11 eV. También se observan los cambios de morfología de las curvas: que la curva de la muestra 705P(1) es claramente asimétrica, con un ancho medio más pequeño y con una menor intensidad. Todas estas diferencias se atribuyen al proceso de bioconjugación.

Segunda comparación de muestras de 705nm con y sin biomoléculas.

Tabla 3.18 Parámetros de la figura 3.18.

	705N(2)	705P(2)
Intensidad Integrada (ua)	0.141	0.110
FWHM (eV)	0.132	0.104
hv(eV)	1.779	1.880
Intensidad máxima (ua)	4.040E6	1.228E6
Normalización	x1	x4
ΔE (eV)	0.117	

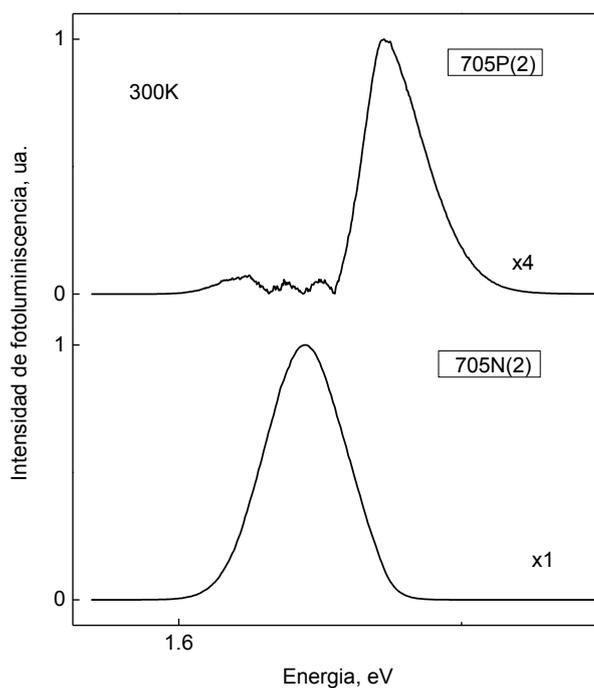


Figura 3.18. Espectros de Fotoluminiscencia de las muestras de 705nm con (705P) y sin (705N) biomoléculas

Analizando las características de ambas curvas, presentes en la tabla 3.18 se pueden observar los cambios de intensidad, ancho medio y emisión máxima del pico. Para la muestra bioconjugada 705P(2) disminuyen en intensidad y en ancho medio, sin embargo se observa un desplazamiento de la emisión máxima del pico hacia energías más altas de aproximadamente 0.117eV, obteniendo además una forma asimétrica después del proceso de bioconjugación.

Tercera comparación de muestras de 705nm con y sin biomoléculas.

Tabla 3.19. Parámetros de la figura 3.19.

	705N(3)	705P(3)
Intensidad Integrada (ua)	0.143	0.116
FWHM (eV)	0.134	0.109
hv(eV)	1.781	1.880
Intensidad máxima	4.062E6	1.364E6
Normalización	x1	X4
ΔE (eV)	0.118	

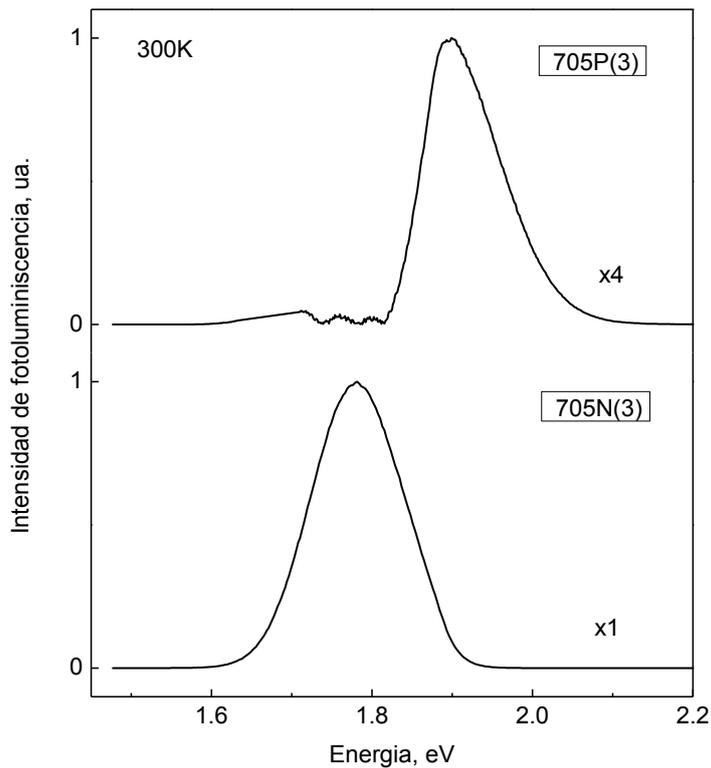


Figura 3.19. Espectros de Fotoluminiscencia de las muestras de 705nm con (705P) y sin (705N) biomoléculas.

En esta tercera comparación se repiten los patrones observados en las anteriores mediciones. Para la muestra bioconjugada 705P(3) se muestra menor intensidad, así como menores ancho medio e intensidad integrada de la curva. Sin embargo se observa cómo se desplaza hacia

mayores energías la emisión pico máxima. Además se presenta la asimetría observada en las mediciones anteriores para las muestras bioconjugada. Esto indica que el efecto es independiente del tamaño de PCs.

Análisis:

En esta sección se observaron los cambios individuales, para la muestra sin y con bioconjugación. Así como se han obtenido algunas características de las curvas, los cambios de intensidad, y el desplazamiento hacia mayores energías que experimenta la muestra bioconjugada. Además observamos la asimetría de la curva, un patrón que se observó también en la muestra de 655nm, esto indica que es un fenómeno que puede repetirse en otros tamaños de puntos cuánticos.

3.10 Comparación de puntos cuánticos de 800nm sin biomoléculas.

En esta sección se analizó la muestra de puntos cuánticos de 800nm en sus mediciones, y después se analizaron las características de estas.

En la figura 3.20 se observan las características de los máximos de picos de emisión, que varían muy poco en las tres mediciones (con diferencias de aproximadamente 0.01eV). También, aplicando la normalización, observamos que la primera medición fue de una mayor intensidad.

Tabla 3.20. Parametros de la figura 3.20.

	800N(1)	800N(2)	800N(3)
Intensidad Integrada (ua)	0.132	0.132	0.134
FWHM (eV)	0.125	0.127	0.128
hv(eV)	1.597	1.600	1.606
Intensidad máxima	3.644E5	2.285E5	1.861E5
Normalización	x1	x2	x2

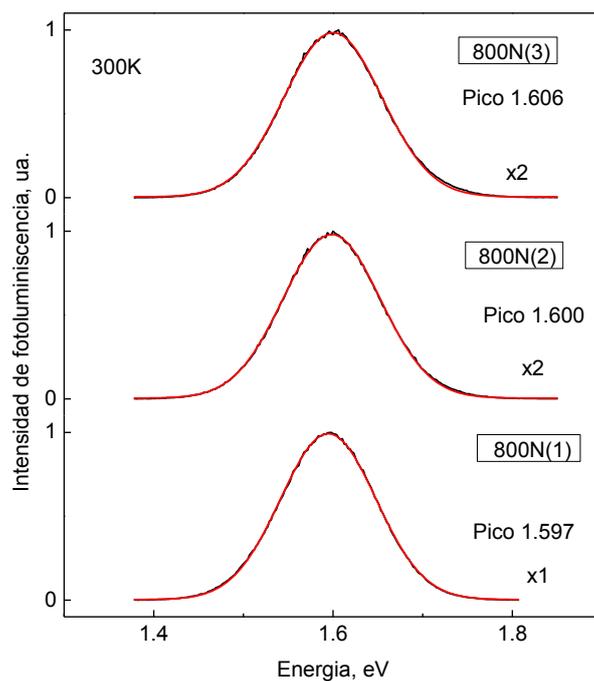


Figura 3.20. Espectros de fotoluminiscencia de la muestra de 800nm con ajuste gaussiano.

Analizando la figura 3.20 y la tabla 3.20 se observa que con el ajuste gaussiano no se presentan hombros ni picos adicionales. Teóricamente el pico de máxima emisión de este tamaño de PCs se debería encontrar en 1.55eV. Sin embargo para las tres mediciones la emisión máxima se encuentra alrededor de 1.60eV, lo que presenta una diferencia de aproximadamente 0.05eV. Así mismo se observa que la intensidad integrada de las curvas no varía mucho, situándose en 0.13 (unidades arbitrarias), también se observa que su ancho medio que se ubica en aproximadamente 0.12 (eV) para todos los picos analizados.

3.11 Comparación de puntos cuánticos de 800nm con biomoléculas.

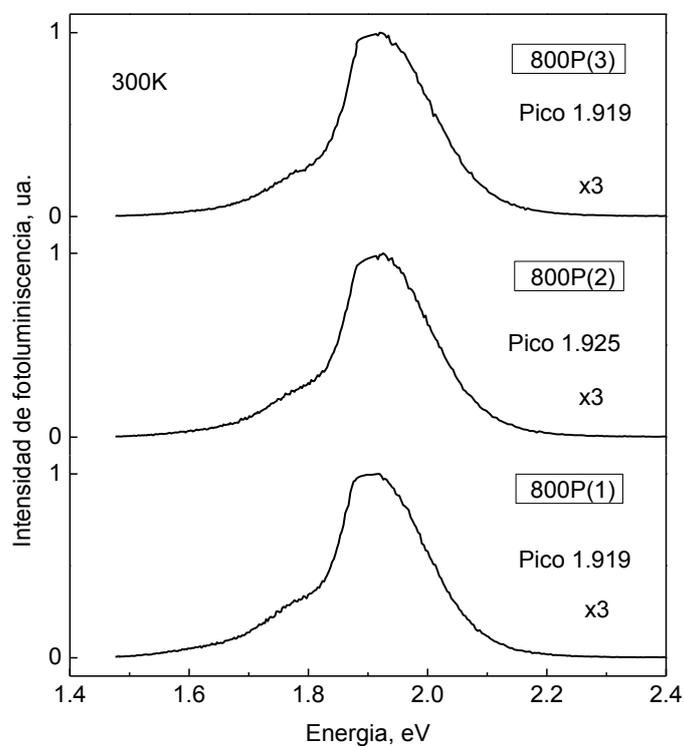


Figura 3.21. Espectros de fotoluminiscencia

Tabla 3.21. Parámetros de la figura 3.21.

	800P(1)	800P(2)	800P(3)
Intensidad Integrada (ua)	0.198	0.193	0.194
FWHM (eV)	0.200	0.193	0.191
h ν (eV)	1.919	1.925	1.919
Intensidad máxima	1.093E5	1.115E5	1.068E5
Normalización	X3	X3	X3

Analizando los espectros de la figura 3.21 observamos que desde la primera medición la morfología de la gráfica es asimétrica con un máximo de emisión en promedio de 1.92 eV. También el ancho medio de aproximadamente 0.2 (eV) se conserva para las tres mediciones. Además, las intensidades de los picos están en el mismo orden de magnitud.

Se observa un pequeño hombro en la pendiente izquierda de todos los picos, la cual tiene una pendiente baja al principio y después aumenta. Para la pendiente derecha se observa una caída suave sin ningún hombro. No se realiza el ajuste gaussiano debido a que después de la bioconjugación los picos presentan otra distribución, haciendo este ajuste innecesario. En todos estos picos se observa la misma tendencia de modificación de la morfología después del proceso de bioconjugación, así como desplazamiento de los máximos de los picos hacia energías más altas.

3.12 Comparación de puntos cuánticos de 800nm con y sin biomoléculas.

Se realizaron las tres comparaciones correspondientes a las mediciones de las muestras de 800nm con y sin biomoléculas. Se observaron cambios sustanciales antes y después de la bioconjugación.

Primera comparación de puntos cuánticos de 800nm con y sin biomoléculas.

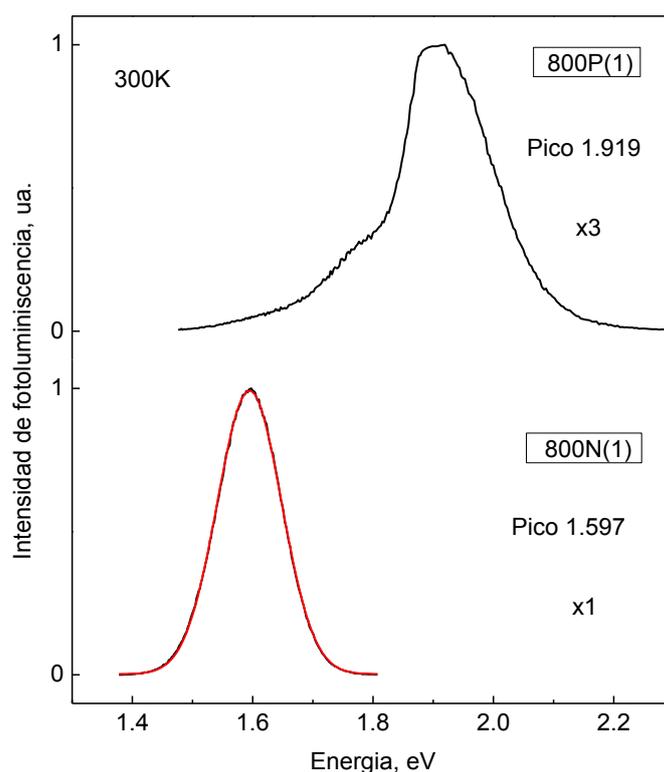


Figura 3.22. Espectros de Fotoluminiscencia de las muestras sin (800N) y con (800P) biomoléculas.

Tabla 3.22. Parámetros de la figura 3.22.

	800N(1)	800P(1)
Intensidad Integrada (ua)	0.132	0.198
FWHM (eV)	0.125	0.200
hV(eV)	1.597	1.919
Intensidad máxima	3.644E5	1.093E5
Normalización	x1	x3
ΔE (eV)	0.321	

Analizando la figura 3.22 y la tabla 3.22 se observan las diferencias de emisiones entre los dos espectros. La muestra bioconjugada presenta un desplazamiento a aproximadamente 0.32 eV hacia energías más altas. Sin embargo su intensidad disminuye, comparando con la muestra sin bioconjugación. Esto podría deberse a una concentración diferente de partículas bioconjugadas en la muestra. Además se observa que el ancho medio y la intensidad integrada del pico son mayores en la muestra con biomoléculas. Llama atención la morfología de la muestra con biomoléculas: el pico resulta ser asimétrico y presenta un hombro pequeño en la pendiente izquierda. Esta modificación del espectro se debe a la bioconjugación.

Segunda comparación de puntos cuánticos de 800nm con y sin biomoléculas.

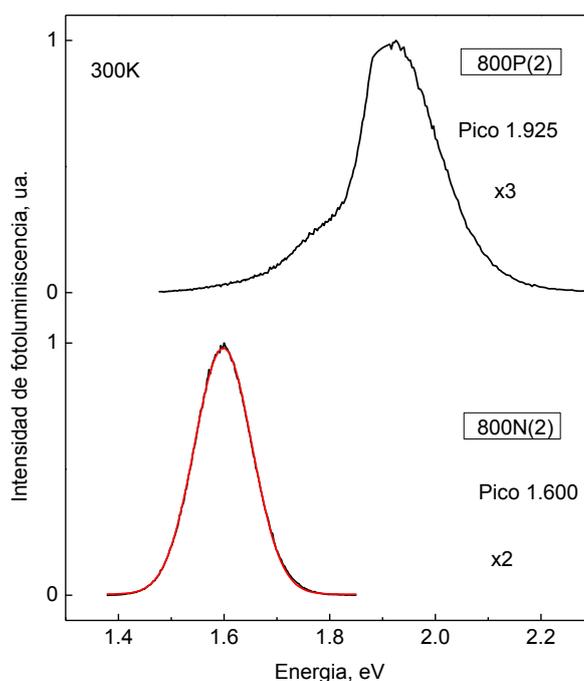


Figura 3.23. Espectros de fotoluminiscencia de 800nm con (800N(2)) y sin (800P(2)) biomoléculas.

En esta comparación se observa (figura 3.23) el desplazamiento que experimenta la muestra con biomoléculas 800P (de aproximadamente 0.32 eV) resultando en un valor considerable. La muestra conjugada nuevamente presenta una menor intensidad (aproximadamente 1.6 veces) comparando con la muestra sin biomoléculas. También se observan menor ancho e intensidad integrada de las curva en la muestra sin biomoléculas.

Tabla 3.23. Parámetros de la figura 3.23.

	800N(2)	800P(2)
Intensidad Integrada (ua)	0.132	0.193
FWHM (eV)	0.127	0.193
hv(eV)	1.600	1.925
Intensidad máxima	2.285E5	1.115E5
Normalización	X2	X3
ΔE (eV)	0.325	

Tercera comparación de puntos cuánticos de 800nm con y sin biomoléculas.

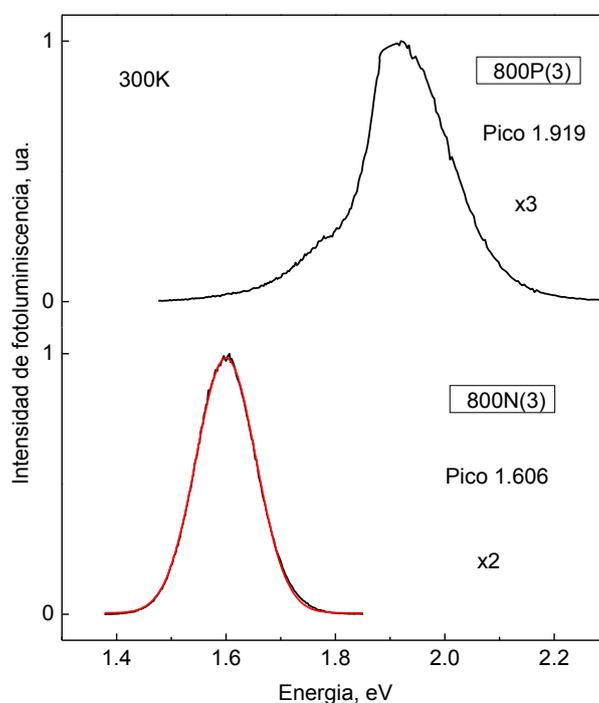


Figura 3.24. Espectros de fotoluminiscencia de las muestras de 800nm con (800P (3)) y sin (800N (3)) biomoléculas.

Tabla 3.24. Parámetros de la figura 3.24.

	800N(3)	800P(3)
Intensidad Integrada (ua)	0.134	0.194
FWHM (eV)	0.128	0.191
hv(eV)	1.6062	1.919
Intensidad máxima	1.861E5	1.068E5
Normalización	X2	x3

Analizando la figura 3.24 y la tabla 3.24 se observa nuevamente el desplazamiento (aproximadamente 0.31eV) hacia energías más altas del máximo de emisión del pico de la muestra bioconjugada 800P (3). Así mismo observamos que posee una menor intensidad (aproximadamente 1.45 veces) que la muestra sin biomoléculas. Nuevamente destacamos la morfología de la curva con biomoléculas la cual es asimétrica y posee un ancho medio mayor que la curva sin biomoléculas.

Observaciones: Al realizar el análisis de ambas muestras 800N y 800P se observa el desplazamiento hacia energías mayores de la emisión de la muestra 800P. Este comportamiento se observó también en las demás muestras analizadas de 605, 655 y 705nm. Sin embargo con este tamaño de partículas se observa que el cambio experimentado fue mucho mayor, presentándose también la asimetría más pronunciada de los picos (figuras 3.22-3.24).

Se asume que el cambio experimentado es debido al efecto Stark, por la carga que poseen los puntos cuánticos bioconjugados. Debido a este efecto ocurre un cambio en el momento dipolar que hace que se desplace energéticamente el máximo de la emisión de las muestras después de la bioconjugación. Este hallazgo permite asegurarnos, que el proceso de bioconjugación se refleja en los espectros de PL de las muestras bioconjugadas lo suficientemente para identificación de proceso de bioconjugación, sin embargo el análisis más detallado de este hallazgo se presenta en el siguiente párrafo.

3.13 Análisis de Resultados:

Se presentan las comparaciones de los espectros más representativos de cada muestra la figura 3.25 es parte de esa comparación.

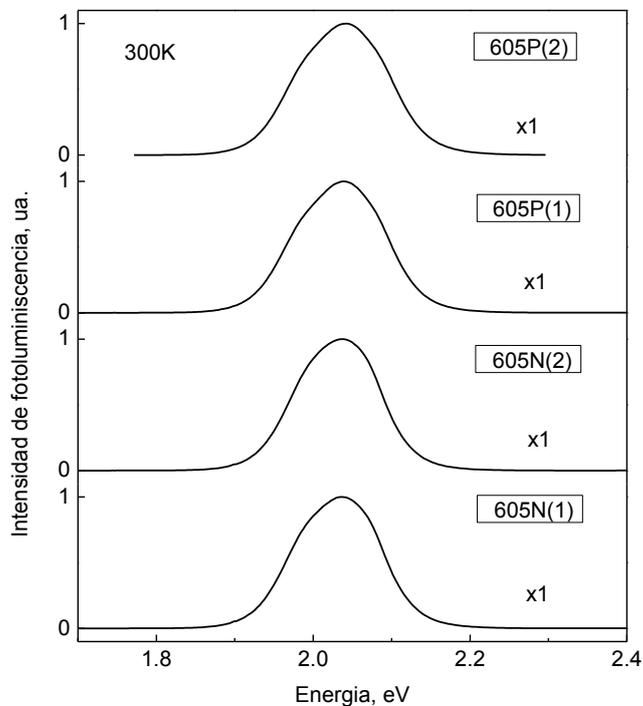


Figura 3.25. Espectros de fotoluminiscencia de 605nm con y sin bioconjugación.

Tabla 3.25. Parámetros de la figura 3.25.

	605N(1)	605N(2)	605P(1)	605P(2)
Intensidad Integrada (ua)	0.138	0.133	0.142	0.145
FWHM (eV)	0.126	0.122	0.132	0.135
h ν (eV)	2.036	2.039	2.039	2.042
Intensidad máxima (ua)	1.258E7	1.189E7	1.320E7	1.297E7
Normalización	x1	x1	x1	x1
E $_{g_{nano}}$	2.03eV	2.03eV	2.03eV	2.04eV
	605m	605nm	603nm	603nm

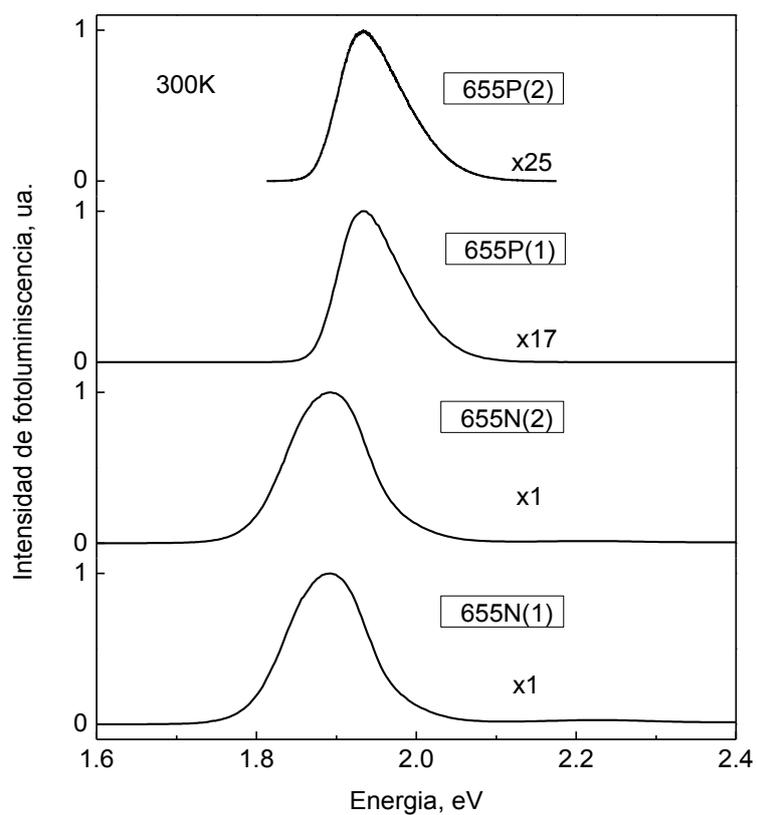


Figura 3.26. Espectros de fotoluminiscencia de las muestras de 655nm con y sin bioconjugación.

Tabla 3.26. Parámetros de la figura 3.26.

	655N(1)	655N(2)	655P(1)	655P(2)
Intensidad Integrada (ua)	0.123	0.124	0.098	0.096
FWHM (eV)	0.115	0.116	0.094	0.093
h ν (eV)	1.893	1.893	1.931	1.933
Intensidad máxima (ua)	1.089E7	1.107E7	6.453E5	4.419E5
Normalización	x1	x1	x17	x25
E $_{g_{nano}}$	1.89eV	1.89eV	1.93eV	1.93eV
	655nm	655nm	642nm	642nm

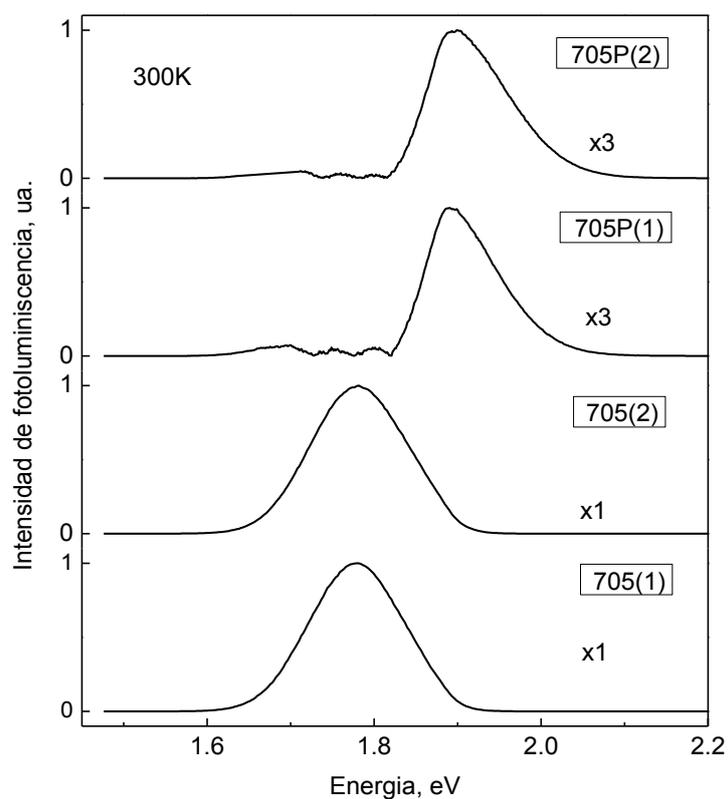


Figura 3.27. Espectros de fotoluminiscencia de 705nm con y sin bioconjugación.

Tabla 3.27. Parámetros de la figura 3.27.

	705N(1)	705N(2)	705P(1)	705P(2)
Intensidad Integrada (ua)	0.141	0.143	0.100	0.087
FWHM (eV)	0.132	0.134	0.099	0.087
h ν (eV)	1.779	1.781	1.890	1.890
Intensidad máxima (ua)	4.040E6	4.062E6	1.310E6	1.407E6
Normalización	x1	x1	X3	X3
E g_{nano}	1.7790eV	1.781eV	1.890eV	1.890eV
	705nm	705eV	656nm	656nm

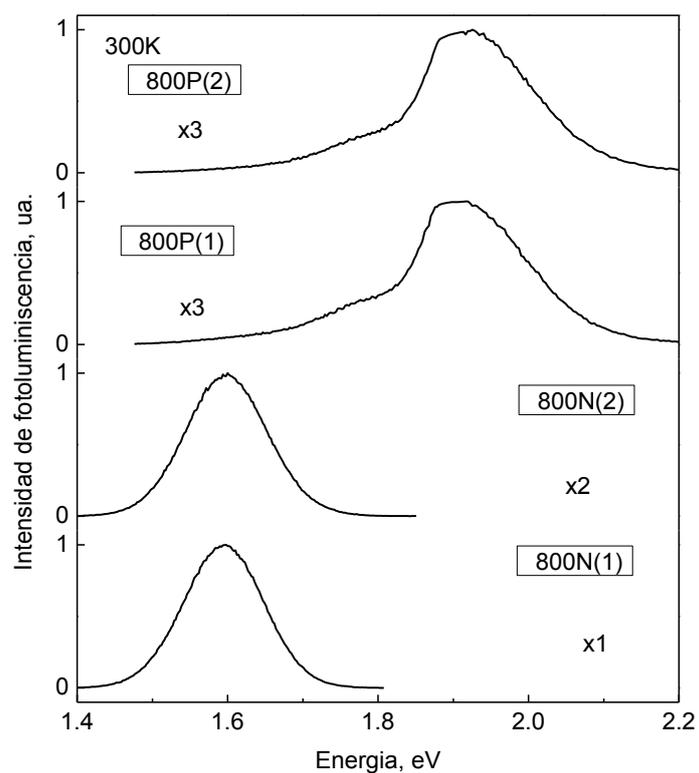


Figura 3.28. Espectros de fotoluminiscencia de la muestra de 800nm con y sin bioconjugación.

Tabla 3.28. Parámetros de la figura 3.28.

	800N(1)	800N(2)	800P(1)	800P(2)
Intensidad Integrada (ua)	0.132	0.132	0.198	0.193
FWHM (eV)	0.125	0.127	0.200	0.193
h ν (eV)	1.597	1.600	1.919	1.925
Intensidad máxima (ua)	3.644E5	2.285E5	1.093E5	1.115E5
Normalización	x1	X2	x3	x3
E $_{g_{nano}}$	1.59eV	1.6eV	1.91eV	1.92eV
	800nm	800nm	649nm	645nm

Para el análisis final se comparan las muestras en pares no bioconjugadas, y bioconjugadas, de tal forma que pueda ser claramente apreciable la diferencia entre el antes y después del proceso de bioconjugación; se puede observar cómo cambia la forma de los espectros después de la bioconjugación, una vez realizado el proceso las muestras de 655nm, 705nm y 800nm adquieren una forma claramente asimétrica. Además se observa un incremento en el desplazamiento hacia altas energías. Todo lo mencionado nos da la pauta de establecer una relación entre el desplazamiento energético y los tamaños de partículas utilizando relaciones matemáticas que veremos en la sección de cálculo y análisis de efectos.

Debemos tener en cuenta algunos factores como la composición química de los puntos cuánticos utilizados; como se ha mencionado anteriormente, estos son de una estructura núcleo/coraza de CdSe/ZnS. Sin embargo esta composición solo aplica para las muestras de 605nm y de 655nm; para las muestras de 705nm y de 800nm esta composición varía según la literatura [109,110] para estas longitudes de onda. Para ello se debe agregar un elemento más como el Telurio, de esta forma la composición del núcleo es CdSeTe en cantidades diferentes de este último elemento para conseguir la emisión deseada del punto cuántico, esto se puede comprobar mediante espectroscopia Raman en el capítulo 4. No fue posible adquirir esta información por medio de la empresa (Invitrogen) debido a las políticas de confidencialidad, así que se estimaron por medio de los espectros de fotoluminiscencia.

Enseguida agrupamos los espectros de la composición de CdSe/ZnS en la figura 3.34.

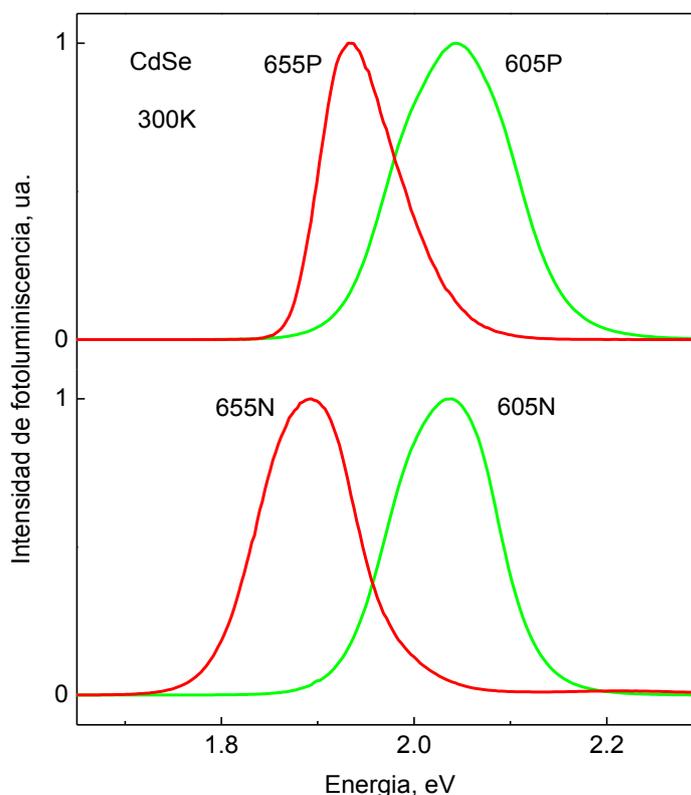


Figura 3.29 Espectros fotoluminiscencia de núcleo CdSe.

Tabla 3.29. Parametros de la figura 3.29.

	655N	605N	655P	605P
Intensidad Integrada (ua)	0.120	0.130	0.090	0.140
FWHM (eV)	0.110	0.120	0.090	0.130
hv(eV)	1.890	2.030	1.930	2.040
Intensidad máxima (ua)	1.100E7	1.100E7	6.400E5	1.200E7
Normalización	x1	x1	X19	x1
E_{gnano}	1.890eV	2.030eV	1.930eV	2.040eV
	655nm	655nm	642nm	607nm

Se agruparon los datos de las mediciones que presentan una mayor emisión y una morfología más uniforme. Se hace hincapié que el desplazamiento se observa más claramente en la muestra de 655nm. En la muestra de 605nm muestra un cambio muy pequeño en el desplazamiento energético, y no se observan cambios en morfología, ya que se conserva la forma asimétrica en las tres mediciones.

También se agruparon las muestras de composición CdSeTe de 705nm y de 800nm; se observa claramente que el desplazamiento que experimentan es mayor comparado con el desplazamiento de la muestra de 655nm. Esto es debido a que al ser cristales nanométricos de mayor tamaño que los de la muestra de 605nm y de 655nm, pueden contener mayor número de fragmentos en su superficie, por lo que el efecto experimentado así como el desplazamiento energético es de un orden mayor.

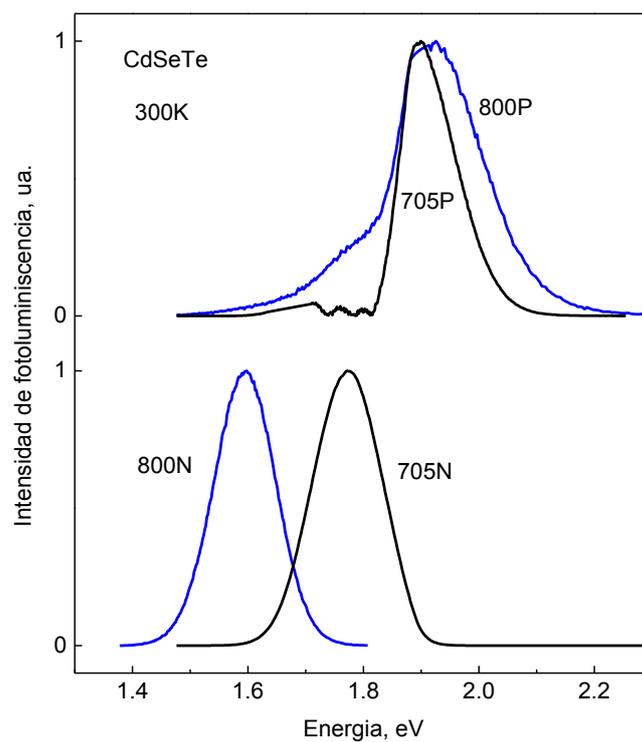


Figura3.30. Espectros de Fotoluminiscencia de las muestras de núcleo con composición CdSeTe.

Tabla 3.30. Parámetros de la figura 3.30.

	800N	705N	800P	705P
Intensidad Integrada (ua)	0.130	0.149	0.190	0.080
FWHM (eV)	0.120	0.130	0.190	0.080
hν(eV)	1.590	1.770	1.920	1.890
Intensidad máxima (ua)	3.600E5	5.300E6	1.100E5	1.400E6
Normalización	x15	x1	x48	X4
E_gnano	1.590eV	1.770eV	1.920eV	1.890eV
	800nm	800nm	645nm	656nm

3.14 Cálculo y análisis de Efectos

Podemos calcular el diámetro de las partículas usando las siguientes formulas que describen los efectos del confinamiento cuántico del cual podemos obtener la relación de parámetros entre la banda prohibida y su diámetro [111, 112]:

$$Eg_{nano} = Eg_{Bulk} + \frac{\hbar^2 \pi^2}{2\mu d^2} (n^2) - 1.786 \frac{e^2}{\epsilon_r \epsilon_0 d} - 0.248 \frac{\mu e^4}{2\hbar^2 \epsilon_r^2 \epsilon_0^2} \quad (3.1)$$

$$n^2 = n_1^2 + n_2^2 + n_3^2$$

Donde:

n_1, n_2, n_3 = Números cuánticos = 1, 2, 3,

Eg_{Bulk} = Banda prohibida del material semiconductor en bulto.

$\frac{\hbar^2 \pi^2}{2\mu a^2} (n^2)$ = Término que relaciona al confinamiento cuántico de una partícula en una caja de potencial de 3 dimensiones.

$1.786 \frac{e^2}{\epsilon_r \epsilon_0 d}$ = Atracción de Coulomb entre electrones y huecos.

$0.248 \frac{\mu e^4}{2\hbar^2 \epsilon_r^2 \epsilon_0^2}$ = Constante de Rydberg para un material semiconductor

Para estado base tenemos a los números cuánticos $n_1 = 1, n_2 = 1, n_3 = 1$, de esta forma obtenemos lo siguiente:

$$Eg_{nano} = Eg_{Bulk} + \frac{3\hbar^2 \pi^2}{2\mu d^2} - 1.786 \frac{e^2}{\epsilon_r \epsilon_0 d} - 0.248 \frac{\mu e^4}{2\hbar^2 \epsilon_r^2 \epsilon_0^2} \quad (3.2)$$

Resolviendo la ecuación cuadrática y despejando obtenemos lo siguiente:

$$d = \frac{-\frac{1.786e^2}{\epsilon_r \epsilon_0} + \sqrt{\left(\frac{1.786e^2}{\epsilon_r \epsilon_0}\right)^2 + 4\left(Eg_{nano} - Eg_{Bulk} + 0.248 \frac{\mu e^4}{2\hbar^2 \epsilon_r^2 \epsilon_0^2}\right)\left(\frac{\hbar^2 \pi^2}{2\mu}\right)(n^2)}}{2\left(Eg_{nano} - Eg_{Bulk} + \frac{0.248\mu e^4}{2\hbar^2 \epsilon_r^2 \epsilon_0^2}\right)} \quad (3.3)$$

Donde [115]:

$$e = 1.602 \times 10^{-19} C$$

$$\hbar = 1.054 \times 10^{-34} J.s$$

$$m_0 = 9.11 \times 10^{-31} Kg$$

$$\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12} \frac{C^2}{Nm^2}$$

Para el CdSe[113] :

Para CdTe[114]:

$$\epsilon_r = 8.2$$

$$\epsilon_r = 7.15$$

$$m_e^* = 0.13$$

$$m_e^* = 0.11$$

$$m_h^* = 0.45$$

$$m_h^* = 0.35$$

$$\mu = 0.1008 m_0$$

$$\mu = 0.083 m_0$$

$$E_{g_{Bulk}} = 1.73 eV \text{ a } 300K$$

$$E_{g_{Bulk}} = 1.50 eV \text{ a } 300K$$

Para determinar la composición química se usaran valores de fonones de diferentes estructuras en espectroscopia Raman reportados anteriormente [118]

Tabla 3.31. Valores de fonones en diferentes estructuras semiconductoras.

	CdTe cúbico	CdSe wurtzita	ZnS wurtzita	ZnS cúbico
$\lambda (cm^{-1})$	139 (TO)	168 (TO(A_1)) 171 (TO(E_1))	274 (TO(A_1)) 274 TO(E_1))	273 (TO)
	167 (LO)	213 (LO(A_1)) 211 (LO(E_1)) 183-180 (SP)	352 LO(A_1) 352 LO(E_1)	249 (LO)
$E_g (eV) \text{ a } 300K$	1.5	1.73	3.74	3.66

Los valores obtenidos experimentalmente en este trabajo son los siguientes, y se podrán apreciar mejor en el capítulo 4, sin embargo, son necesarios para la estimación de la composición química de los PCs utilizados.

Tabla 3.32. Picos Raman obtenidos experimentalmente.

Muestra	Material	Pico Raman (cm ⁻¹)	Energía fonónica $\hbar\omega_{ph}$ (meV)
605nm	CdSe	212	26.41
655nm	CdSe	213	26.41
705nm	CdSe ₈₅ Te ₁₅	206	25.54
800nm	CdSe ₇₀ Te ₃₀	200	25.05
		202	24.08
	CdSe ₅₀ Te ₅₀	191	23.69

Una vez que se ha obtenido la composición química mediante espectroscopia Raman se pueden determinar los diámetros mediante la fórmula 3.2 y así obtener el siguiente grafico en el cual nos muestra la dependencia de la banda prohibida versus el diámetro.

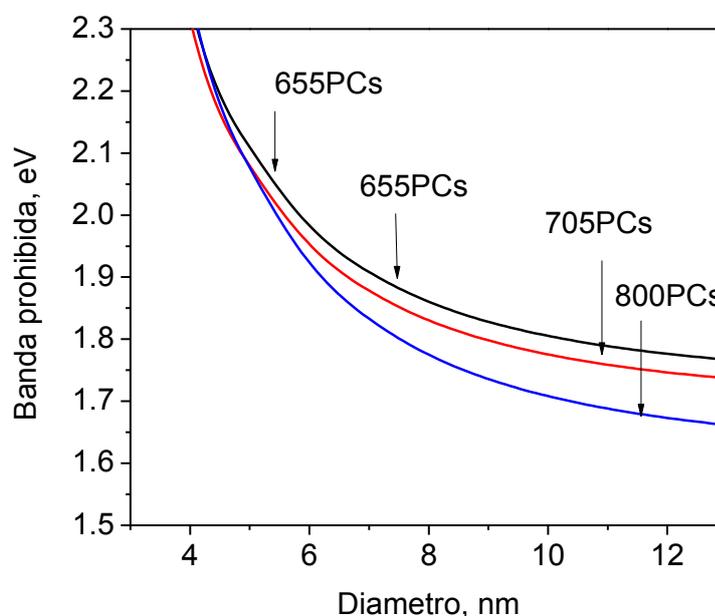


Figura 3.31. Grafica de diámetro del núcleo vs Banda prohibida de las distintas composiciones químicas del núcleo usando la ecuación 3.1.

De las ecuaciones y de la figura 3.31 se obtienen los diámetros de los núcleos de las diferentes muestras, sin embargo se debe considerar la coraza con la que están recubiertos, por regla general se agregar un espesor de 3 nanómetros de coraza, consideramos 3 nanómetros mas para la muestra de 800nm, ya que se encuentra compuesta por tres aleaciones, y aproximamos cada aleación con 1 nm aproximadamente para cada una, aumentando en 3 el diámetro del núcleo. [109, 110]:

Tabla 3.33. Diámetros de las diferentes muestras.

QD	hV	Eg en bulto (eV).	Diámetro (nm). núcleo	Diámetro (nm). núcleo/coraza
605nm CdSe	2.049eV	1.73	5.44	8.44
655nm CdSe	1.89eV	1.73	7.32	10.32
705nm CdSe ₈₅ Te ₁₅	1.76eV	1.70	10.9	13.9
800nm CdSe ₇₀ Te ₃₀ CdSe ₅₀ Te ₅₀	1.55eV	1.664 1.615	~14.42	~17.42

De la tabla 3.33 se pueden obtener los datos de diámetro aproximado para cada tipo de aleación. De esta forma se deben de obtener los datos de los cambios energéticos que se producen al momento de realizar la bioconjugación. Para esto se dispone de tres mediciones para cada muestra, así que se obtendrá el promedio de los cambios energéticos de cada muestra.

Tabla 3.34. Calculo de cambios energéticos de los picos de emisión máxima de las diferentes muestras con y sin bioconjugación.

	$\Delta E(1)$		$\Delta E(2)$		$\Delta E(3)$	d^{CdSe} (nm).	$d^{CdSe85Te25}$ (nm).	$d^{CdSe50Te50}$ (nm).
605P(1)- 605N(1)	2.039- 2.036=0.003	605P(2)- 605N(2)	2.042- 2.039=0.003	605P(3)- 605N(3)	2.042- 2.036=0.006	5.44		
655P(1)- 655N(1)	1.931- 1.893=0.038	655P(2)- 655N(2)	1.933- 1.893=0.040	655P(3)- 655N(3)	1.937- 1.881=0.040	7.32		
705P(1)- 705N(1)	1.890- 1.779=0.111	705P(2)- 705N(2)	1.8989- 1.7816=0.117	705P(3)- 705N(3)	1.8902- 1.7714=.118		10.9	
800P(1)- 800N(1)	1.9195- 1.597=0.321	800P(2)- 800N(2)	1.925- 1.6=0.325	800P(3)- 800N(3)	1.919- 1.606=0.313			~14.42

Se puede obtener la dependencia de los efectos del confinamiento que se experimenta. Esto se relaciona el tamaño de las partículas (en este caso del diámetro d^n y del cambio energético medido ΔE). Con la siguiente relación:

$$\Delta E \sim d^n \quad (3.4)$$

$$\log \Delta E \sim n \log d \quad (3.5)$$

$$n = \frac{\log \Delta E}{\log d} \quad (3.6)$$

Se supondrá que el núcleo de los puntos cuánticos de 800nm tiene la composición siguiente $\text{CdSe}_{50}\text{Te}_{50}$. Esto ya se comprobó en el capítulo 4 y en la tabla 3.32

De la tabla 3.34 se obtienen los valores del cambio energético experimentado por las muestras, aunque no sabemos con exactitud el grosor de la coraza de la muestra de 800nm por sus distintas composiciones químicas, se supondrá de 3nm también, sin embargo para fines de ajuste no se tomara en cuenta.

Tabla 3.35. Parámetros obtenidos para cada tamaño de PCs.

Muestra	Diámetro núcleo	Diámetro Núcleo/coraza	$\Delta E(1)$	$\Delta E(2)$	$\Delta E(3)$	Promedio	Sd(yEr±)(Desviación estándar)
605nm	5.44	8.44	0.003	0.003	0.006	0.004	0.001
655nm	7.32	10.32	0.038	0.040	0.040	0.039	0.001
705nm	10.90	13.90	0.111	0.117	0.118	0.115	0.003
800nm	14.42	17.42	0.321	0.325	0.313	0.319	0.006

Una vez calculado el valor promedio del cambio energético experimentado por cada una de las muestras, se puede obtener la relación antes descrita del valor de n, que es la dependencia del cambio con respecto al diámetro de las partículas. El resultado del ajuste por medio del programa Origin se observa en la grafica siguiente:

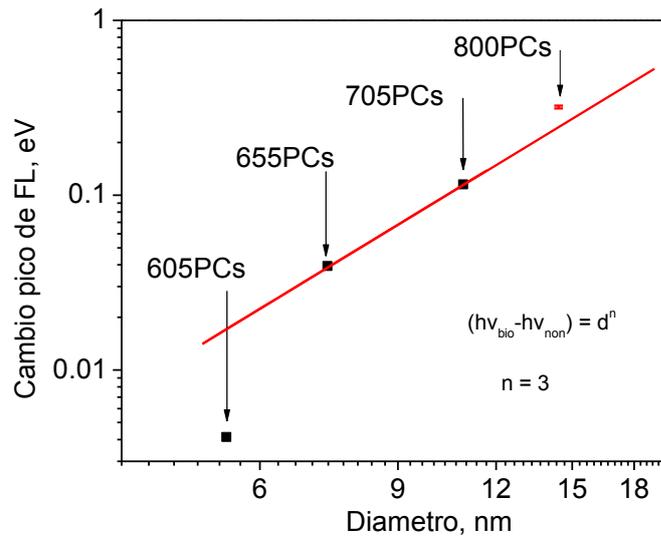


Figura 3.32. Diámetro de las partículas vs el cambio energético de la emisión máxima de las muestras en el proceso de bioconjugación, con barras de error obtenidas mediante la desviación estándar, línea roja: ajuste con datos del núcleo de las partículas; línea negra: ajuste con datos del núcleo/coraza.

De esta forma mediante un ajuste lineal obtenemos la pendiente $n = 3$

Solo se toma en consideración al núcleo se puede atribuir el cambio energético experimentado por las partículas bioconjugadas al efecto Stark. Este efecto se crea a partir de un campo eléctrico incidente, debido a que tenemos compuestos orgánicos de anticuerpos en las muestras bioconjugadas, esto representa un exceso de carga, lo cual, a su vez provoca que haya un momento dipolar. Así que el efecto Stark está definido de la siguiente forma:

$$\Delta E = (hv_{\text{bio}} - hv_{\text{non}}) \sim d^n$$

$$\Delta E = \mu \cdot \xi \tag{3.7}$$

Donde:

ΔE es el cambio energético del pico máximo de las muestras bioconjugadas;

μ es el momento dipolar;

ξ es el campo eléctrico aplicado;

Esto demuestra que se provoca un confinamiento al momento de incidir el campo eléctrico, que se refleja en el desplazamiento energético que hemos observado en las muestras bioconjugadas.

Una vez que se ha descrito el efecto Stark se puede retomar la formula 3.4 donde la n ya ha sido encontrada y relacionarla con el efecto Stark

$$\Delta E \sim d^n$$

Relacionando las formulas 3.4 y 3.8

$$d^3 = \mu \cdot \xi \quad (3.8)$$

De esta fórmula se encuentra la dependencia del cambio, de donde analizando los datos presentados se obtiene que el momento dipolar y el campo eléctrico aplicado se relacionan con el diámetro de los puntos cuánticos de la siguiente forma:

$$\mu = d * q \sim d \quad (3.9)$$

De donde el momento dipolar está definido como el producto de la carga por la distancia que los separa. De esta forma se encuentra el primer factor que involucra al diámetro de las partículas. El siguiente factor está determinado por el campo eléctrico incidente, el cual hará que se produzca el cambio energético del máximo pico en la siguiente forma:

$$\xi \sim N_{IL10} \sim S \sim d^2 \quad (3.10)$$

Básicamente se observa (la ecuación 3.10) que el campo eléctrico incidente provoca el incremento del cambio en relación a la superficie o a el diámetro al cuadrado. Esto demuestra con esto que se provoca un confinamiento al momento de incidir el campo eléctrico; con lo que se provoca provocando el desplazamiento energético que hemos observado en las muestras bioconjugadas. De acuerdo al ajuste que realizamos encontramos el factor que relaciona estos parámetros con el efecto Stark. Para que exista un momento dipolar que pueda ser contrario al campo eléctrico incidente debe existir una diferencia entre los tamaños de partículas (PCs) provocando con esto una diferencia de cargas entre la totalidad de la muestra (figura 3.39). Se observa que la asimetría nos muestra la existencia de una distribución distinta de tamaños de fragmentos de anticuerpo ligados a los puntos cuánticos. De esta forma se provoca un efecto de asimetría en los espectros de fotoluminiscencia.

Se debe hacer un análisis para determinar la forma en la cual ocurren las transiciones energéticas, a fin de poder comprender de mejor forma las propiedades ópticas de las muestras estudiadas. Por esto, se comienza con el análisis de las heteroestructuras se necesita conocer la afinidad electrónica de cada uno de los materiales.

Tabla 3.36. Afinidad electrónica de materiales en bulto [119].

CdSe	CdTe	ZnS	CdSe ₈₅ Te ₁₅	CdSe ₇₀ Te ₃₀	CdSe ₅₀ Te ₅₀
χ (eV)	χ (eV)	χ (eV)	χ (eV)	χ (eV)	χ (eV)
4.95	4.28	3.9	4.85	4.75	4.62

Ahora tomando los datos de las bandas prohibidas de los materiales en bulto de la tabla 3.31 y los datos de la afinidad electrónica de la tabla 3.36, se puede, realizar los diagramas energéticos de las heteroestructuras.

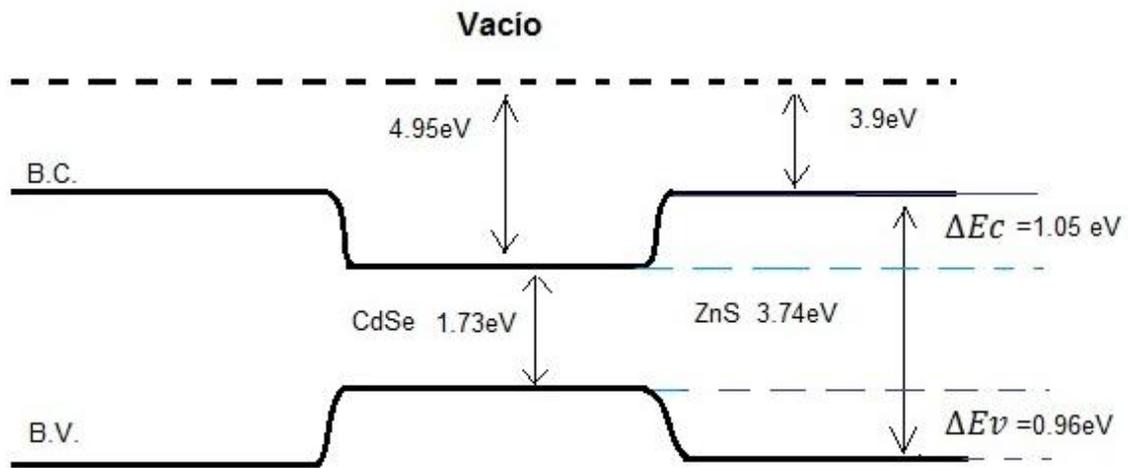


Figura 3.33. Diagrama energético de la heteroestructura de CdSe/ZnS en bulto.

La figura 3.33 muestra como se formaría la heteroestructura con materiales en bulto, utilizando un diagrama de bandas podemos observar el núcleo semiconductor y su banda prohibida así mismo se obtienen las barreras de potencial de cada una de las bandas.

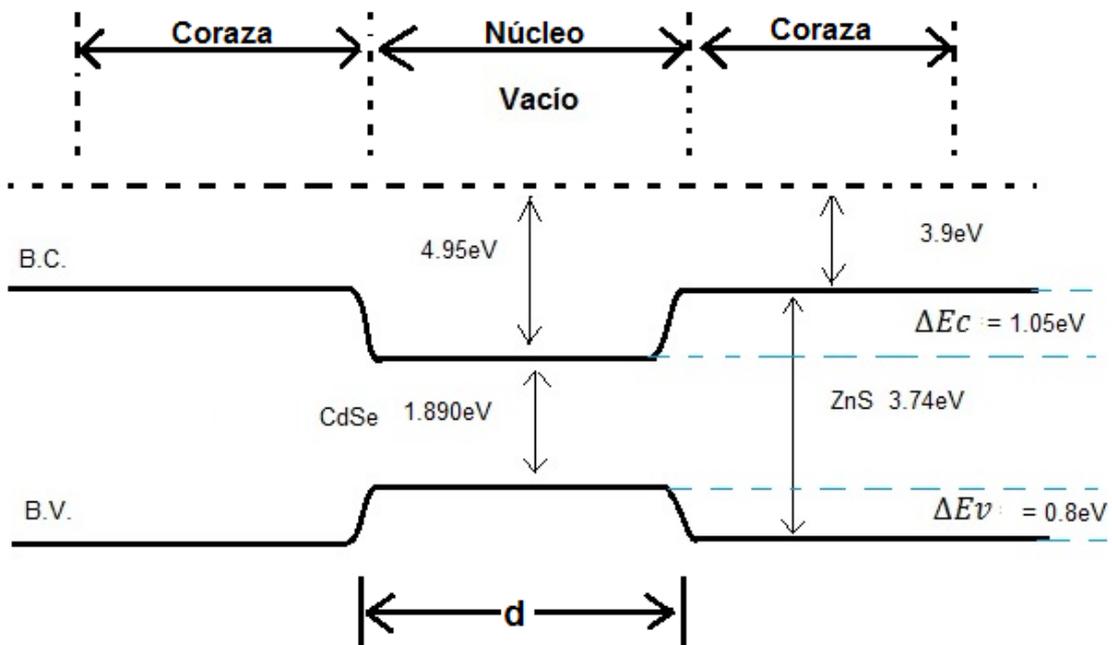


Figura 3.34. Diagrama energético de la heteroestructura de CdSe/ZnS para la muestra de 655nm.

En la figura 3.34 se observa como varia la barrera de potencial de la banda de valencia al modificarse la banda prohibida, esta última es la perteneciente a la muestra de 655nm por efectos de confinamiento cuántico se modifica su banda prohibida, de tal forma que tenemos una emisión de 1.890 eV.

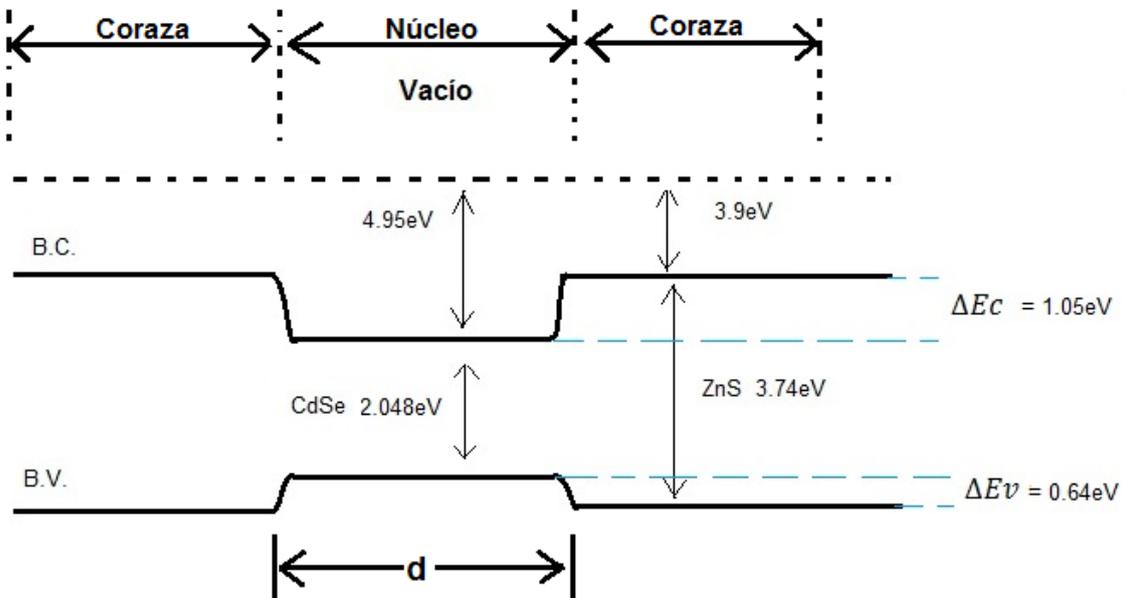


Figura 3.35. Diagrama energético de la heteroestructura de CdSe/ZnS para la muestra de 605nm.

En la figura 3.35 se aprecia el cambio que ocurre en el diagrama de bandas para la muestra de 605nm disminuyendo la barrera de potencial de la banda de valencia al aumentar la banda prohibida del núcleo de CdSe.

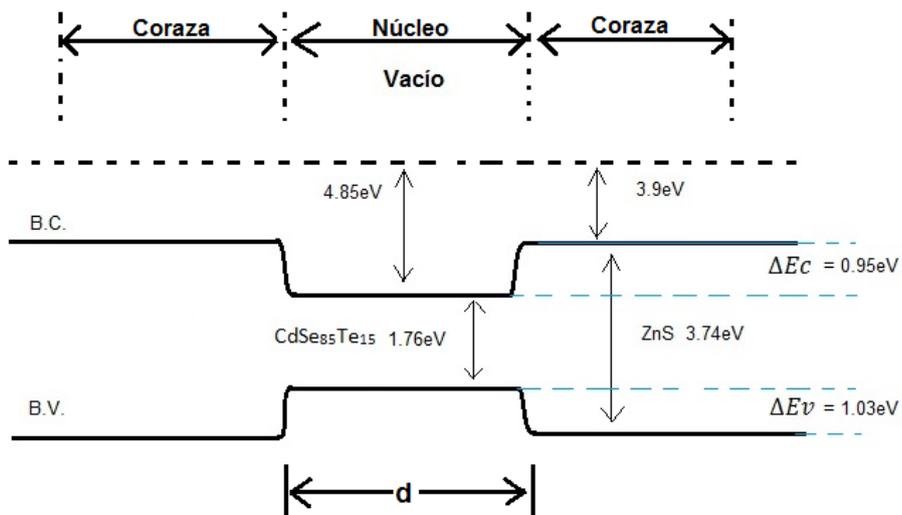


Figura 3.36. Diagrama energético de la heteroestructura de CdSe₈₅Te₁₅/ZnS para la muestra de 705nm.

Ahora se observa en la figura 3.36 el diagrama energético para la heteroestructura de $\text{CdSe}_{85}\text{Te}_{15} / \text{ZnS}$ ahora con esta composición química podemos observar como la barrera de potencial de la banda de conductividad y la de la banda de valencia cambian en valor, ya que se modifican la afinidad electrónica y la banda prohibida de el núcleo semiconductor.

Ahora para el caso de la muestra de 800nm se tiene un diagrama distinto de los anteriores, ya que se presentan fonones de dos composiciones diferentes $\text{CdSe}_{70}\text{Te}_{30}$ y de $\text{CdSe}_{50}\text{Te}_{50}$ debemos considerarlas en nuestro diagrama energético de la siguiente forma en el caso de material en bulto.

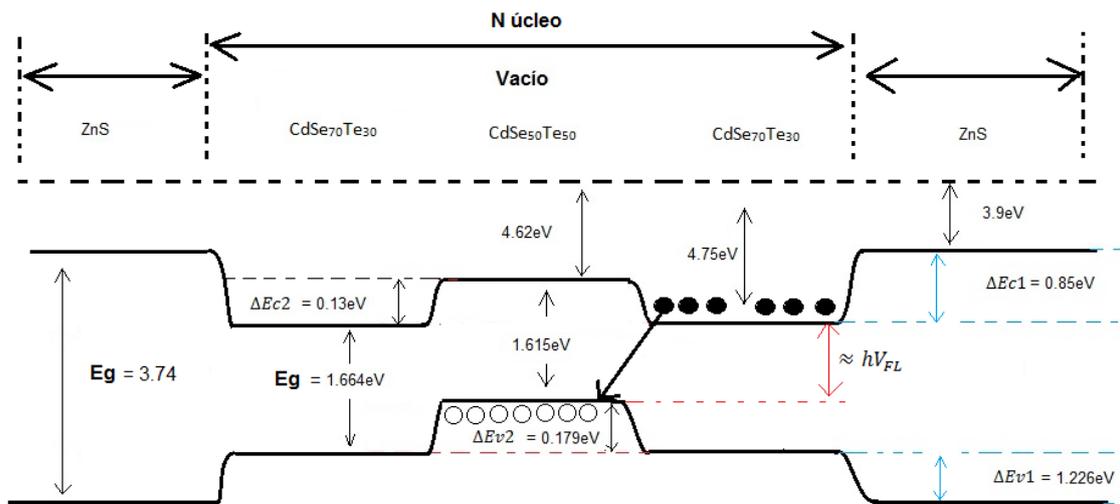


Figura 3.37. Diagrama energético de la heteroestructura de $\text{CdSe}_{50}\text{Te}_{50} / \text{CdSe}_{70}\text{Te}_{30} / \text{ZnS}$ para material en bulto.

En la figura 3.37 se observa como el diagrama presenta tres interfaces dos relativas al núcleo, las cuales son las composiciones de CdSeTe y la relativa a la coraza de ZnS, la recombinación para este modelo se produce en la zona que va de la banda de conductividad de la aleación de $\text{CdSe}_{70}\text{Te}_{30}$ a la banda de valencia de la aleación de $\text{CdSe}_{50}\text{Te}_{50}$ por consiguiente podemos obtener la emisión del núcleo semiconductor del material en bulto que es de 1.485eV.

Ahora analizamos en otra figura como se obtiene la emisión característica de las muestras de PCs de 800nm en la siguiente figura.

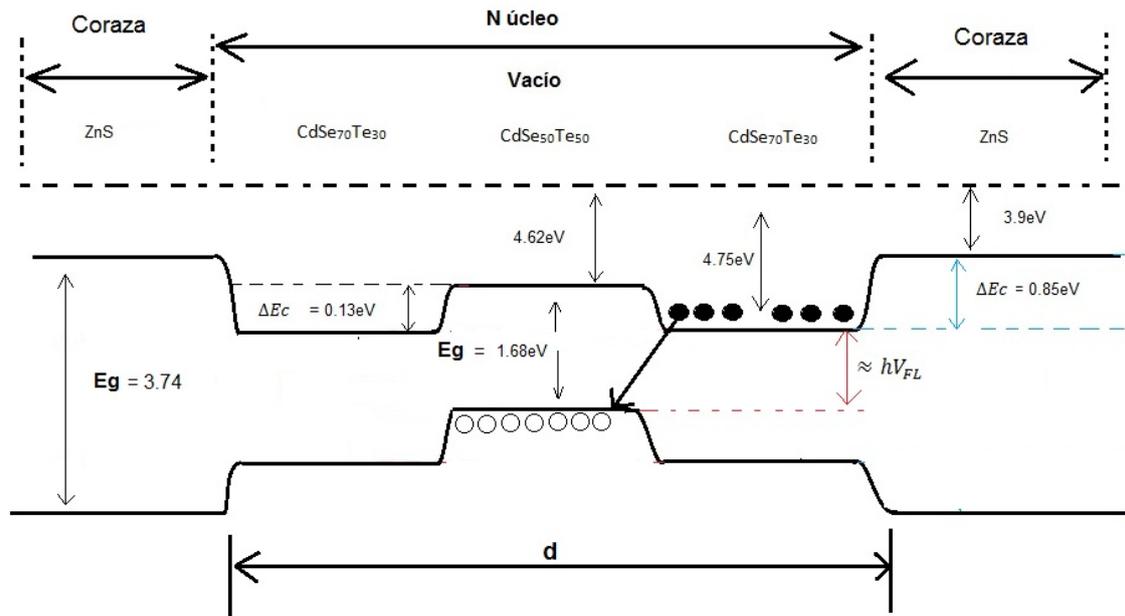


Figura 3.38. Diagrama energético de la heteroestructura de CdSe₅₀Te₅₀/ CdSe₇₀Te₃₀ /ZnS para la muestra de PCs de 800nm.

Como se observa en la figura 3.38 la banda prohibida del núcleo semiconductor CdSe₅₀Te₅₀ se modifica por efectos de confinamiento cuántico de tal forma que la recombinación producida entre la banda de conductividad de la aleación CdSe₇₀Te₃₀ y la banda de valencia de la aleación CdSe₅₀Te₅₀ produce una emisión de 1.55eV que es la emisión que obtenemos experimentalmente.

Con estos modelos propuestos se puede aclarar el efecto producido por las diferentes composiciones químicas de la muestra de 800nm, y así podemos aclarar también el efecto visto en la fotoluminiscencia.

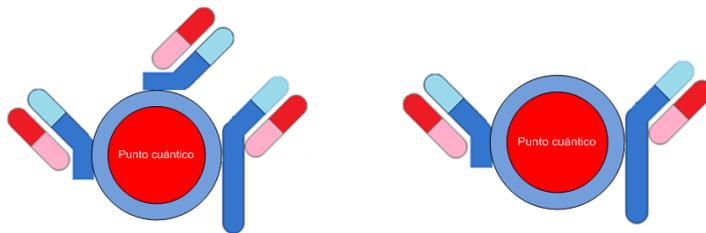
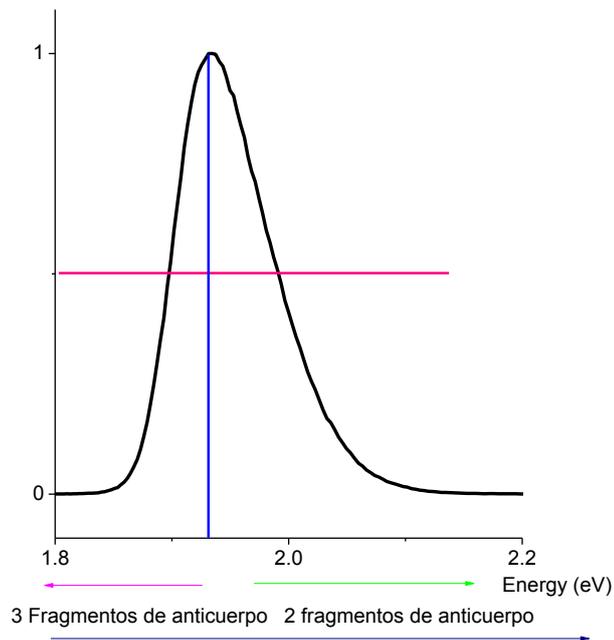


Figura 3.39. Esquema que muestra la forma en la que los PCs cambian la distribución en el espectro de fotoluminiscencia de acuerdo a la cantidad de fragmentos de anticuerpos que se unen a ellos.

En la figura 3.39 se observa cómo se produce el efecto Stark en los puntos cuánticos bioconjugados. En la figura 3.40(a) se ve que el punto cuántico se encuentra en estado neutro al no existir excesos de carga de ningún tipo. Por lo cual en sus espectros de fotoluminiscencia se muestra solamente el patrón característico de curvas Gaussianas. Sin embargo observando el esquema 3.40 (b) se muestra un exceso de carga debido a los anticuerpos que se encuentran ligados a su superficie. Por lo tanto, esta será mayor y tendrá más contribución en los espectros de fotoluminiscencia. También se puede observar que se produce el momento dipolar al existir cargas contrarias, relacionándose con una distancia que los separa, en este caso será el diámetro de nuestra partícula, además del campo eléctrico incidente.

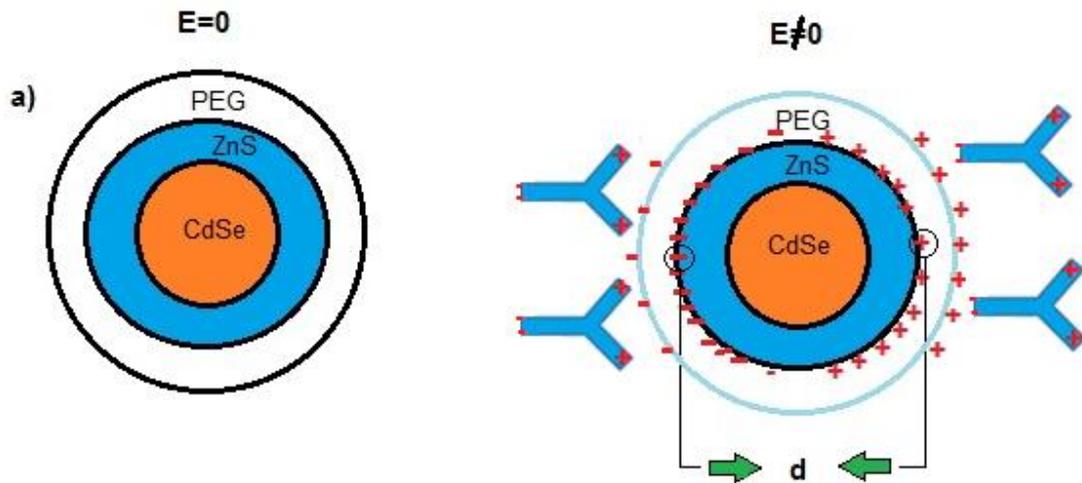


Figura 3.40. Esquema que muestra el efecto Stark en los puntos cuánticos bioconjugados.

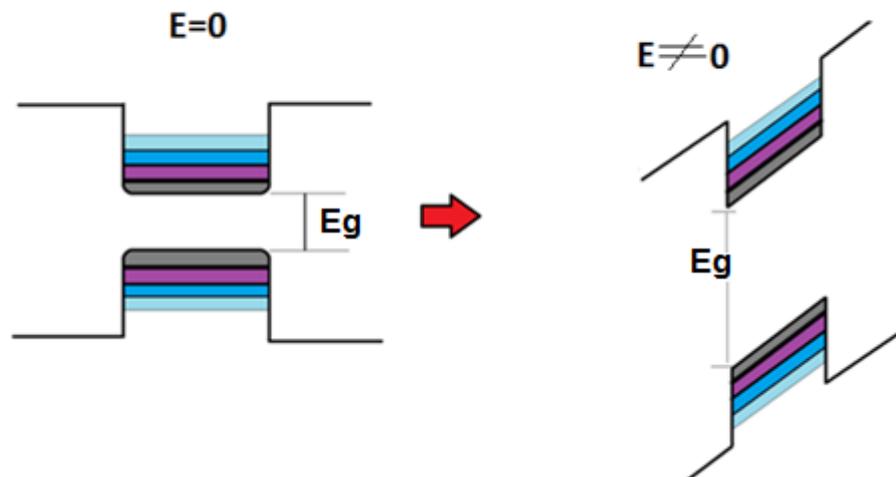


Figura 3.41. Efecto Stark en diagrama de bandas.

El efecto Stark que se produce, provoca un confinamiento en los puntos cuánticos bioconjugados. Al desplazarse los niveles energéticos, traen consigo un aumento de la banda prohibida y por consecuencia, los espectros de emisión en fotoluminiscencia se ven afectados, observándose un desplazamiento energético del máximo del pico.

Conclusiones:

Se ha determinado mediante la técnica de fotoluminiscencia varios patrones que demuestran la existencia de un cambio en el comportamiento de las muestras antes y después del proceso de bioconjugación. Este cambio es debido a las cargas que poseen los anticuerpos añadidos a la superficie, que, debido a la presencia de un campo eléctrico, provoca la variación de los estados energéticos del núcleo semiconductor (efecto Stark). Podemos relacionar al efecto Stark con el comportamiento observado en los espectros de fotoluminiscencia, de tal forma que se observa una relación que involucra al efecto de confinamiento con el efecto Stark.

En esta sección se toma una determinada composición química para las muestras de 705nm y de 800nm, sin embargo es posible determinar si se está en lo correcto mediante espectroscopia Raman, en la siguiente sección.

Capítulo 4: Estudio de espectroscopia Raman de los puntos cuánticos.

Para poder hacer un análisis de estas muestras se necesita también conocer el espectro Raman del silicio y de esta forma, discernir las diferencias entre la señal de la muestra y la señal del sustrato.

4.1 Estudio de Espectros Raman de las muestras de 605nm.

Para un mejor análisis del espectro Raman este se dividió en tres secciones. La primera sección es en la región de 100 a 600 cm^{-1} .

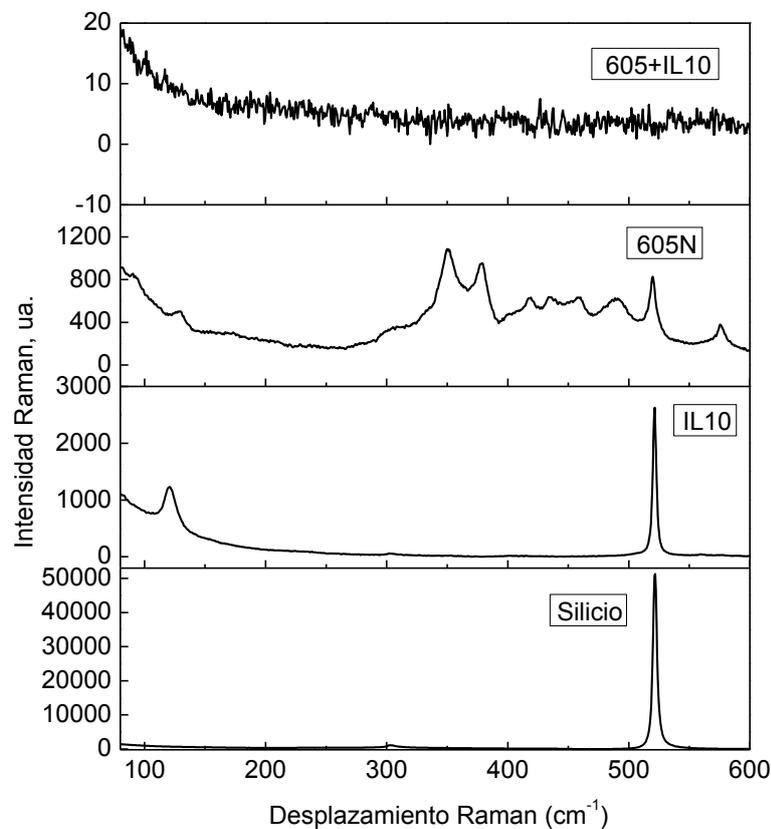


Figura 4.1. Espectros Raman de la muestra de 605nm con (605+IL10) y sin bioconjugación (605N), de anticuerpo solo (IL 10) depositado sobre el sustrato y del sustrato solo (Silicio), se muestran los espectros en escala completa.

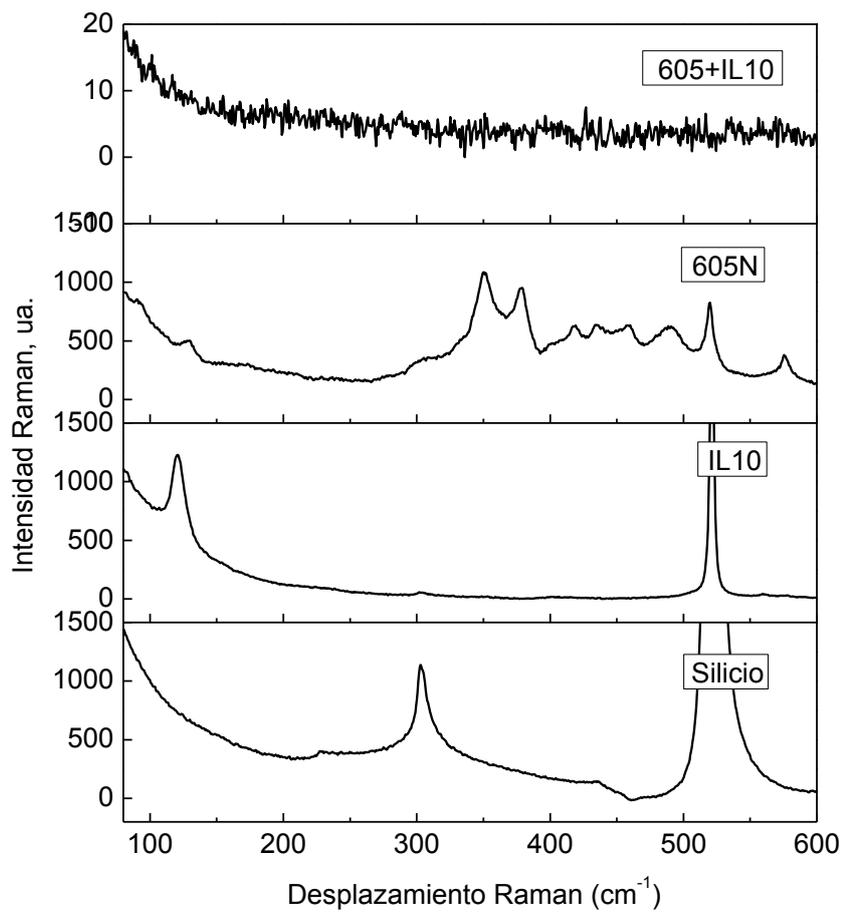


Figura 4.2. Espectros Raman de la muestra de 605nm con (605+IL10) y sin bioconjugación (605N), de anticuerpo solo depositado el mismo sustrato (IL 10) y del sustrato solo de silicio (Silicio), se muestran en una escala más pequeña.

Tabla 4.1. Asignación de picos Raman de la figura 4.2.

Rango (cm ⁻¹)	100-200	200-400				400-600					
Línea Raman	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Muestra 605+IL10	Las señales se presentan con mucho ruido, y no se pueden discernir con claridad ya que andan en promedio en las 5 cuentas										
Intensidad											
Probable origen											
Muestra 605N	129		305	350	379	419	435	458	486	519	575
Intensidad	501		354	1085	952	633	634	631	610	827	379
Probable origen	129 cadenas alifáticas(CC)	305 debido al Fonon de Silicio(TA) en L Y X 350 debido a la coraza de ZnS 379 debido a cadenas alifáticas (CC)				419 armónico del núcleo de CdSe 2LO 435 Dispersión del fonon del silicio en dirección X(TA) 458 486 podrían ser disulfuros (S-S) 519 Fonon de silicio en el punto de alta simetría Γ (0)					
Muestra IL 10	121		302							521	
Intensidad	1227		57							2626	
Probable origen	Cadenas alifáticas (CC)	Debido a cadena alifáticas (CC) o al fonon del silicio (TA) en L y X				Fonon de silicio en el punto de alta simetría Γ (0)					
Muestra Silicio		227	302				435			521	
Intensidad		440	1137				145			51310	
Probable origen		227 Dispersión del Fonon en dirección X(TA) 302 Fonon de Silicio(TA) en L Y X				435 Dispersión del fonon del silicio en dirección X(TA) 521 Fonon de silicio en el punto de alta simetría Γ (0)					

En la figura 4.2 y tabla 4.1 se observa que la muestra de 605+IL 10 (bioconjugada) no presenta señal en el intervalo estudiado. Esto puede ser debido a que la cantidad de muestra es demasiado pequeña para producir la señal. El espectro Raman de la muestra 605N muestra una señal débil, que se debe a la coraza de ZnS. Esto coincide con los datos de la literatura [68], que se reporta esta señal a 347 cm^{-1} , y que en el espectro está ubicada a 350 cm^{-1} . También se observa que en la muestra de 605N aparecen picos que podrían deberse a cadenas de carbono, las cuales se presentan debido al recubrimiento de los puntos cuánticos con polímero PEG-PE. Por otro lado, observamos los picos propios del sustrato de silicio, sobre el cual se depositan todas las muestras analizadas en este estudio. Estos picos inevitablemente aparecen en las señales de los puntos cuánticos.

En el espectro Raman del anticuerpo las señales del sustrato de silicio son las que predominan. Sin embargo la intensidad de los picos debidos al silicio disminuye para los picos en 302 cm^{-1} y 521 cm^{-1} . Esto se puede asignar a que la región seleccionada tiene la suficiente cantidad de la muestra para atenuar la señal del silicio. Además en este espectro se puede apreciar una señal a 121 cm^{-1} que corresponde a cadenas de carbonos. Estas cadenas deben estar presentes, ya que el anticuerpo es un compuesto orgánico, por lo cual, contiene estas cadenas.

4.1.1 Estudio de picos Raman en la región 600-1500 cm^{-1}

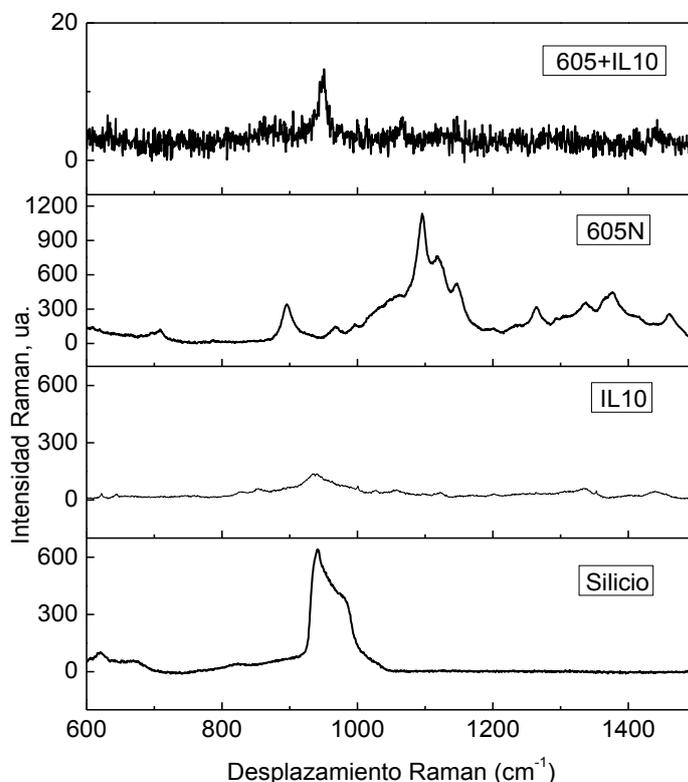


Figura 4.3. Espectros Raman de las muestras bioconjugadas (605+IL10) y sin bioconjugación (605N) de 605nm, de anticuerpo IL 10 depositado sobre el sustrato de silicio, y de sustrato de Silicio solo.

En la figura 4.3 se observa que para la muestra bioconjugada 605+IL 10 la señal es de baja calidad, por lo que solo se pueden observar dos picos que sobresalen del ruido. El primer pico corresponde a un fonón de silicio y está ubicada a 948cm^{-1} . El segundo pico a 1066cm^{-1} corresponde a cadenas de carbono las cuales están presentes tanto en el polímero, como en las biomoléculas con las que se hizo la reacción de bioconjugación. Además, se observa menor número de picos Raman que en la muestra sin bioconjugación. Esto se debe a que parte de los grupos funcionales presentes en el polímero se usaron para unirse al crosslinker y posteriormente al anticuerpo.

En la muestra 605N observamos picos correspondientes a cadenas de carbono (CC) e interacciones de oxígeno y carbono (C-O-C): los picos respectivos a $708, 896, 967, 1058\text{cm}^{-1}$, etc. Estos picos son debidos al polímero PEG-PE con el cual están recubiertas las muestras de los PCs. También podemos observar que el fonón del silicio se ve atenuado y ligeramente desfasado (a 948cm^{-1}) en comparación con la línea característica indicada en literatura [68] (a 941cm^{-1}).

El espectro del anticuerpo de IL 10, presenta pocos picos característicos, entre los cuales predomina uno a 935cm^{-1} que corresponde a la superposición del fonón del silicio y de los grupos orgánicos de éteres (O-C-O). Otros picos que se observan a 708, 1118 y 1147 cm^{-1} , corresponden a los grupos de tioeteres (C-S), tionas (C=S), sulfonas (C-)SO₂(C-) respectivamente. La presencia de estos grupos se debe a las moléculas de anticuerpo, que están formadas de las llamadas cadenas pesadas y ligeras.

El ultimo espectro corresponde al silicio cristalino y solo presenta sus fonones característicos, sirviéndonos de línea base para descartar contribuciones del mismo en los demás espectros.

Tabla 4.2. Asignación de picos Raman de la figura 4.3.

Region (cm ⁻¹)	600-900				900-1200								
Pico Raman	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Muestra 605+IL10					948					1066			
Intensidad ua.					10					6			
Probable origen					948 debido a la dispersión de los fonones de silicio en las direcciones X , L y W; 1066 debido a alicíclicos y alifáticos (CC) a éteres (C-O-C) a sulfoxidos (C-)SO(C-) o a siloxanos (Si-O-Si)								
Muestra 605N			708	896		967		995	1058		1095	1118	1147
Intensidad ua.			123	341		147		170	414		1134	762	522
Probable origen	708 debido a tioeteres (C-S) a alicíclicos y alifáticos (CC) o a cloro carbonos (C-Cl) 896 debido a alicíclicos y alifáticos (CC) a éteres (C-O-C)				967 debido a la dispersión de los fonones de silicio en las direcciones X , L y W o a alicíclicos y alifáticos (CC) éteres (C-O-C) 995 debido a alicíclicos y alifáticos (CC) y éteres (C-O-C) 1058 1095 debidos a Siloxanos (Si-O-Si) a éteres (C-O-C) y a tionas (C=S) a alicíclicos y alifáticos (CC) 1056 a sulfoxidos (C-)SO(C-) 1118 1147 a éteres (C-O-C) a sulfonas (C-)SO ₂ (C-) a tionas (C=S) y a alicíclicos y alifáticos (CC)								
Muestra IL 10					935								
Intensidad					136								
Probable origen					935 debido a la dispersión de los fonones del silicio en las direcciones X , L y W								
Muestra Silicio	620	669			941		974 Hombro						
Intensidad	101	56			641		411						
Probable origen	620 Dispersión del fonon del silicio en dirección X(TA+TO) 669 Fonon del silicio en dirección Σ(TA+TO)				Armónico de los fonones en las direcciones X , L y W								

Tabla 4.3. Asignación de picos Raman de la figura 4.3.

Region (cm ⁻¹)	1200-1500										
Pico Raman	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Muestra 605+IL10										1439	
Intensidad ua.										5	
Probable origen	1439 debida a Diazo- (N=N) y a metilos (CH ₃ ,CH ₂)										
Muestra 605N	1201	1234	1265	1291	1308	1337	1367 Hombro	1377	1412		1460
Intensidad ua.	133	161	312	217	243	355		447	233		257
Probable origen	1201 1234 1265 1291 debidos alicíclicos y alifáticos (CC) y a tionas (C=S) 1308 1337 debidos a sulfonas (C-)SO ₂ (C-) 1367 1377 Debidos a Nitrilos (C-)NO ₂ 1412 1460 debidos a metilos (CH ₃ ,CH ₂) a diazo- (N=N) y a aromáticos (CC)										
Muestra IL 10						1336				1440	
Intensidad						60				45	
Probable origen	1336 debido a sulfonas (C-)SO ₂ (C-) 1440 debido a metilos (CH ₃ ,CH ₂) a diazo- (N=N) y a aromáticos (CC)										
Muestra Silicio											
Intensidad											
Probable origen											

4.1.2 Estudio de picos Raman en la región 1500 a 3500 cm^{-1} .

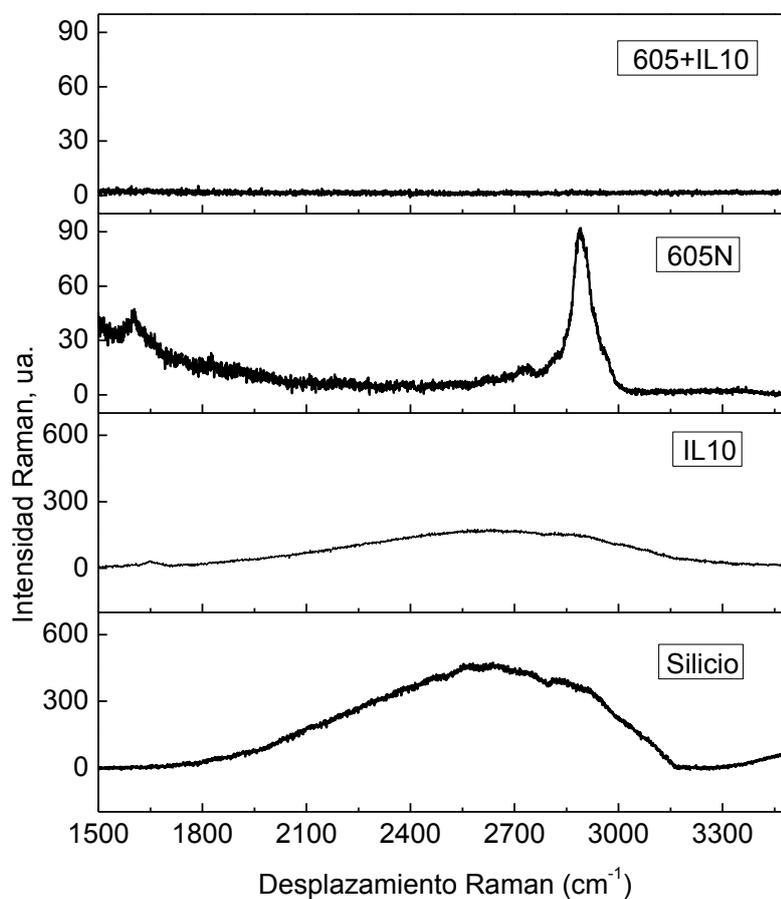


Figura 4.4. Espectros de las muestras de puntos cuánticos bioconjugados y sin bioconjugar, de anticuerpo IL 10 y de Silicio solo.

En la figura 4.4 se puede observar que prácticamente no hay señal en la muestra de 605+IL 10 lo cual se puede ser debido a baja cantidad de muestra depositada. Por el contrario, en la muestra de PCs sin bioconjugación, los tres picos que corresponden a grupos aromáticos, alquilo, y mercapto-, en los picos a 1596, 2725, y 2887 cm^{-1} respectivamente, se pueden apreciar fácilmente sin contribución predominante de los fonones del silicio.

En la muestra de anticuerpo IL 10 observamos un pequeño pico ubicado a 1646 cm^{-1} , que se puede asignar a la presencia de los grupos amino, y además, otro pico debido a las dispersiones fonónicas del silicio a 2500 cm^{-1} .

Se agrega, como en las figuras anteriores, la señal de silicio puro para marcar con esta la línea base.

Tabla 4.4. Asignación de picos Raman de la figura 4.4.

Region (cm ⁻¹)	1500-3500			
Pico Raman	1	2	3	4
Muestra 605+IL10				Ruido con componentes muy pequeñas
Intensidad ua.				
Probable origen				
Muestra 605N	1596		2725	2887
Intensidad ua.	46		15	90
Probable origen	1596 Debido a aromáticos (CC) 2725 2887 debidos a alquilo (-C-H) y mercapto- (-S-H)			
Muestra IL 10		1646		Armónico del silicio disminuye en todo el rango de 1800 hasta 3190
Intensidad		32		
Probable origen	1646 debido a aminos (C=N)			
Muestra Silicio				Armónico desde 1800 hasta aprox. 3190 cm ⁻¹
Intensidad				
Probable origen				

Los picos Raman del silicio han sido caracterizadas varios años atrás por distintos investigadores. Estos datos sirvieron de referencia para asignación de los picos en esta tesis (tabla 4.5).

Tabla 4.5. Picos Raman característicos del silicio

Puntos críticos	Frecuencias de fonones [75]	Frecuencias de fonones [76]	Frecuencias de fonones [77]	Frecuencias de fonones [78]
$\Gamma(0)$	522	517 ± 2	518 ± 3	519 ± 1
$X\left\{\begin{matrix} TA \\ TO \end{matrix}\right\}$	$\begin{cases} 463 \\ 149 \end{cases}$	$\begin{cases} 449 \pm 3 \\ 155 \pm 5 \end{cases}$	$\begin{cases} 464 \pm 10 \\ 150 \pm 2 \end{cases}$	$\begin{cases} 460 \pm 2 \\ 151 \pm 2 \end{cases}$
$L\left\{\begin{matrix} TA \\ TO \end{matrix}\right\}$	$\begin{cases} 491 \\ 114 \end{cases}$	$\begin{cases} 493 \pm 2 \\ 113 \pm 2 \end{cases}$	$\begin{cases} 490 \pm 10 \\ 114 \pm 2 \end{cases}$	$\begin{cases} 490 \pm 2 \\ 113 \pm 2 \end{cases}$
$W\{TO\}$		478 ± 13	481 ± 13	470 ± 2
$X\{TA + TO\}$				610
$\Sigma\{TA + TO\}$				670

Conclusiones parciales:

En este capítulo se observa que las señales de la muestra de 605+IL 10 son claramente más débiles, debido a la cantidad de muestra depositada y a la interacción débil entre la fuente de excitación y la muestra. De esta forma no aporta mucha información acerca de los grupos presentes después de la bioconjugación. Los resultados no se presentaron de acuerdo a lo esperado (mayor intensidad, grupos característicos en la muestra bioconjugada, y poca señal de silicio).

Además este método permite visualizar de forma clara los compuestos presentes de nuestras muestras y comprobar lo que la teoría nos dice, de una forma eficiente y no destructiva.

4.2 Estudio de espectroscopia Raman de las muestras de 655nm.

Se realizó la espectroscopia Raman de las muestras de 655nm sin y con bioconjugación, añadiendo también los espectros de anticuerpo de IL 10 y del sustrato de Silicio. Se realiza nuevamente la división de los espectros en 3 regiones para visualizar de mejor manera los picos representativos de cada muestra.

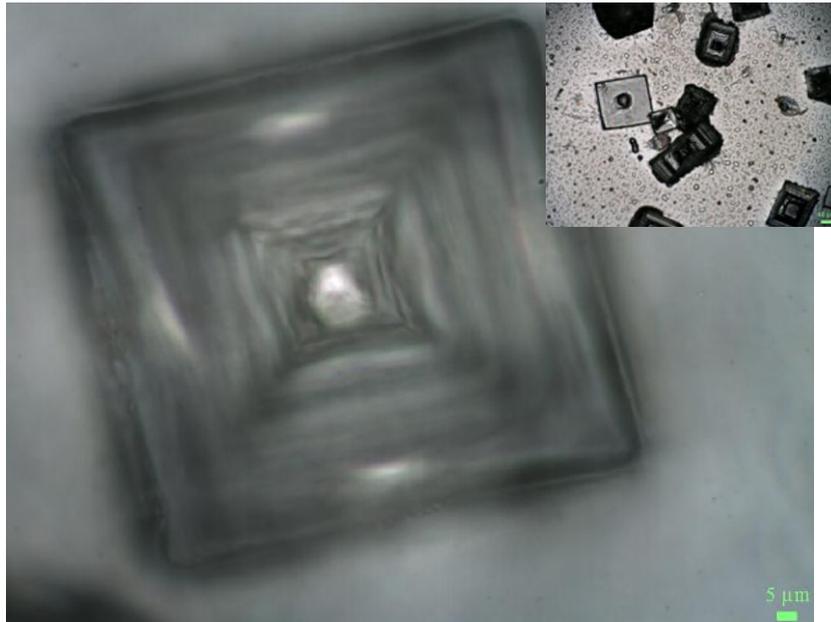


Figura 4.5. Fotografía tomada a la muestra de 655nm bioconjugada con anticuerpo de IL 10 aumento de x10 (pequeña) y de x50 (grande).

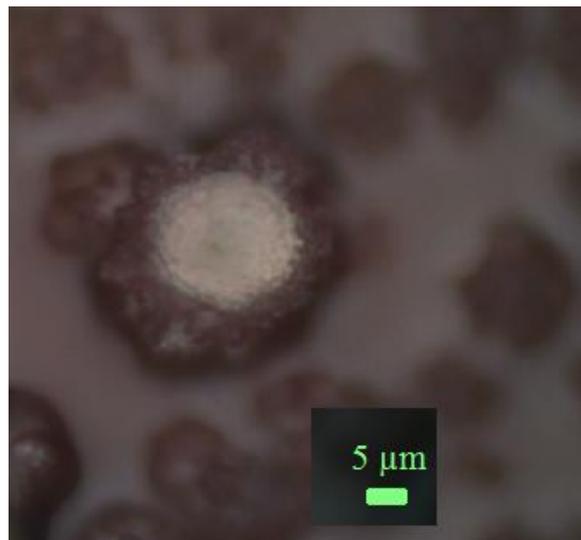


Figura 4.6. Fotografía de la muestra de 655nm sin biomoléculas aumento de x50.

4.2.1 Estudio de picos Raman de muestras de 655nm en la región 100-600 cm^{-1} .

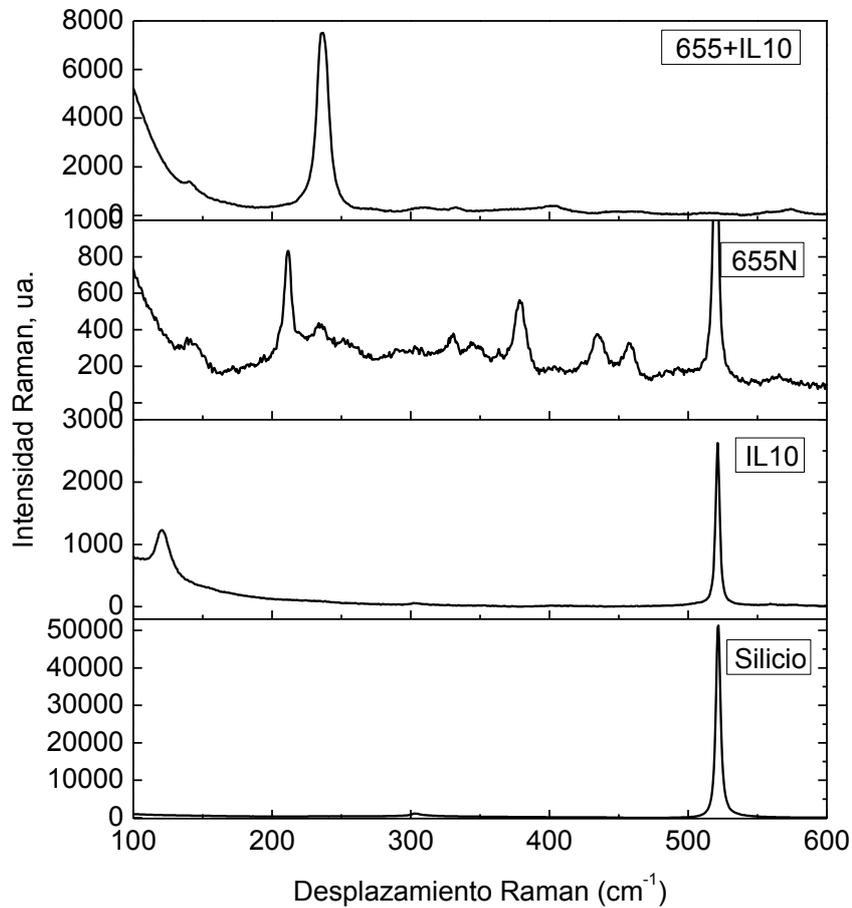


Figura 4.7. Espectros Raman de las muestras de 655nm bioconjugadas y sin bioconjugación, de anticuerpo de IL 10 y de Silicio solo; se muestra escala completa.

Se muestran en la figura 4.7 los espectros de las muestras bioconjugada y sin bioconjugación, así como del anticuerpo depositado en el sustrato de silicio, y al silicio solamente en escala completa, para apreciar las intensidades de la señal de cada muestra para posteriormente hacer un análisis más detallado con una escala diferente en la figura 4.8.

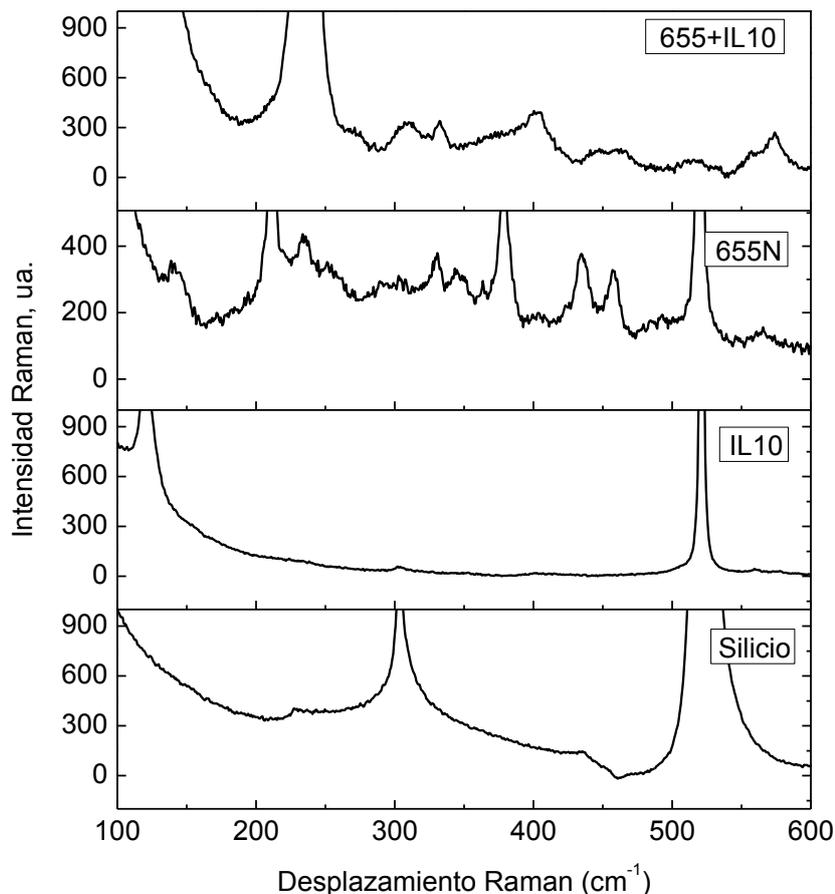


Figura 4.8. Espectros Raman de las muestras de 655nm bioconjugadas y sin bioconjugación, de anticuerpo de IL 10 y de Silicio solo, se muestran detalles de picos pequeños.

En la figura 4.8 se observa como la muestra de 655+IL 10 presenta una intensidad mucho mayor que la muestra 655N. Esto se debe a las interacciones de las moléculas tanto del polímero como de los anticuerpos con los PCs lo que provoca el efecto de Dispersión Raman Aumentado en Superficie, (SERS, Surface Enhanced Raman Scattering). Se destacan los picos pertenecientes a las cadenas alifáticas (CC) que son cadenas de carbono correspondientes tanto al recubrimiento de polímero como al anticuerpo. Se observa que los fonones del silicio presentan poca contribución, con lo que se puede añadir que la muestra de 655+IL 10 es la que proporciona la mayor información de sus compuestos. El pico de 236cm^{-1} que tiene una intensidad muy grande. Esto podría deberse al efecto SERS provocado por las cadenas alifáticas (CC) y una contribución de la dispersión de un fonón de silicio en la dirección X(TA) (TA=transversal acústica). También observamos que la contribución del sustrato de silicio para la muestra fue muy baja por lo que las señales podemos atribuir en mayoría a los compuestos de la muestra.

Se puede observar en nuestra tabla 4.6 que en esta región hay correspondencia de picos Raman de las muestras sin bioconjugación y bioconjugada, las cuales en su mayoría son debidas a las cadenas alifáticas (CC). Estas cadenas son características de compuestos

orgánicos tanto del polímero como del anticuerpo con los que están recubiertos. La diferencia más notable entre los picos de estos dos compuestos se basa en su intensidad, lo que permite confirmar que la bioconjugación atribuye a la intensificación de la señal.

Para la muestra de 655N, se pueden observar los picos correspondientes al núcleo de CdSe en 211 cm^{-1} y a la coraza ubicada en 348 cm^{-1} . En esta muestra observamos la contribución del fonón característico de silicio en 515 cm^{-1} , y numerosos picos en la región de $200\text{ a }500\text{ cm}^{-1}$ que en su mayor parte corresponden a cadenas alifáticas (CC). Estas cadenas pertenecen al polímero PEG-PE con el cual están recubiertos nuestros PCs.

Tabla 4.6 Asignación de los picos Raman de la figura 4.8.

Región (cm ⁻¹)	80-200	200-400												400-600							
Línea Raman	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18			
Muestra 655+IL10	139	236			271		306	332					402		447	463		515	531	557	573
Intensidad ua.	1402	7503			300		333	340					391		172	172		107	67	158	270
Probable origen	Cadenas alifáticas (CC)	236 debido a cadenas alifáticas (CC) y a la dispersión del fonon del silicio en dirección X(TA) 271 debido a cadenas alifáticas (CC) 306 debido al fonon del silicio (TA) en L y X 332 debido a diselenuros Se-Se y a cadenas alifáticas (CC)												402 desconocido quizá debido a cadenas alifáticas (CC) 447 debido a un armonico del nucleo 2LO 463 debido a disulfuros (S-S) 515 podría deberse al fonon del silicio en el punto de alta simetría Γ (0) 531 puede ser debido a disulfuros (S-S) 557 573 debido a cloro carbonos (C-Cl)							
Muestra 655N	141	211	233	251	259	289	302	330	343	348	363	379	403	434	457	492	519	565			
Intensidad ua.	348	832	436	352	307	294	310	379	333	311	293	547	199	376	324	194	2275	155			
Probable origen	Cadenas alifáticas (CC)	211 Debido al nucleo de CdSe 233 debido a cadenas alifáticas (CC) y a la dispersión del fonon del silicio en dirección X(TA) 251 259 289 Debido a cadenas alifáticas (CC) 302 debido al fonon del silicio (TA) en L y X o a cadenas alifáticas (CC) 330 343 348 363 379 debido a cadenas alifáticas (CC) 348 también podría deberse a la coraza de ZnS ubicada en 350												403 debido a cadenas alifáticas (CC) 434 debido a un armonico del nucleo 2LO 457 492 debido a disulfuros (S-S) 519 podría deberse al fonon del silicio en el punto de alta simetría Γ (0) 565 debido a cloro carbonos (C-Cl)							
Muestra IL 10	121						302										521				
Intensidad ua.	1227						57										2626				
Probable origen	Cadenas alifáticas (CC)	Debido a cadena alifáticas (CC) o al fonon del silicio (TA) en L y X												Fonon de silicio en el punto de alta simetría Γ (0)							
Muestra Silicio		227					302							435			521				
Intensidad		404					1137							145			51310				
Probable origen		227 Dispersion del Fonon en direccion X(TA) 302 Fonon de Silicio(TA) en L Y X												435 Dispersion del fonon del silicio en direccion X(TA) 521 Fonon de silicio en el punto de alta simetría Γ (0)							

4.2.2 Estudio de picos Raman de muestras de 655nm en la región 600-1500 cm^{-1} .

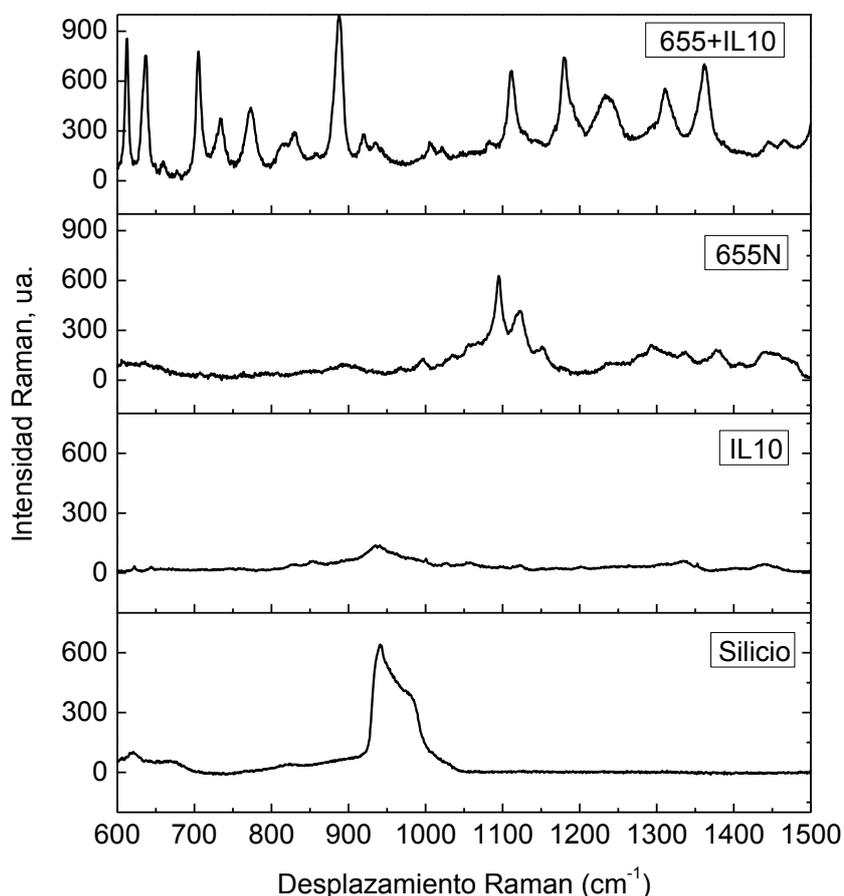


Figura 4.9. Espectros Raman para las muestras de 655nm bioconjugadas, sin bioconjugador, de anticuerpo IL 10 y de Silicio solo.

En la figura 4.9 se puede observar que se encuentra un mayor número de picos en la muestra de 655+IL 10 que en la de 655N. Esto se puede relacionar de forma directa con la bioconjugación, aunque en el espectro de la muestra de anticuerpo no visualizamos un número muy grande de picos Raman que pudieran corresponder con los picos de la muestra bioconjugada, y de esta forma asignarlo de forma directa al anticuerpo. Aun así es posible afirmar que son debidas al mismo; ya que el proceso de bioconjugación comprende una etapa de reducción (fragmentación del anticuerpo), y posteriormente su unión vía el crosslinker. Durante estos procesos se forman nuevos compuestos, y esto se ve claramente reflejado en el espectro 655+IL 10. En el pico 2 que está ubicada en 636cm^{-1} podemos observar que se puede deber a un grupo funcional de tioéteres (C-S) que se pudo haber formado después del proceso de bioconjugación.

Se observa (tabla 4.7) que los picos 1 al 10 se deben a compuestos alicíclicos (CC) y del 10 al 20 se deben a compuestos más complejos como las sulfonas (C-)SO₂(-C) (picos 16, 17, y 20) y los sulfoxidos (C-)SO(-C) (pico 13), que deben provenir del anticuerpo, los picos 22, 23 y 27 se deben a sulfonas (C-)SO₂(C-), aromaticos (CC) y a Metilos (CH₂,CH₃).

Para la muestra de 655N se observa que hay menor número de picos Raman y de menor intensidad comparado con la muestra bioconjugada. Los picos presentes en el espectro los podemos asignar al polímero con el cual están recubiertos los puntos cuánticos PEG-PE. De esta manera los picos 2, 14, 15, 16, 21 y 22 corresponden a cadenas de grupos alicíclicos y alifáticos (CC) así como a éteres (C-O-C), moléculas que están presentes en el polímero.

En la muestra de anticuerpo de IL 10 están presentes también compuestos como cadenas de alifáticos y alicíclicos (CC) (picos 2, 14, 15, 18, y 19) teniendo además grupos de sulfonas (C-)SO₂(C-) y metilos (CH₂,CH₃) (picos 23 y 26) en su estructura también. Con lo cual se confirma que el anticuerpo proporciona estos grupos a nuestra molécula de PCs después de la bioconjugación.

Tabla 4.7. Asignación de picos Raman de la figura 4.9.

Región (cm ⁻¹)	600-900									900-1200										
Pico Raman	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Muestra 655+IL10	612	636	659	705	733	773	814	831	887	918	935	1005	1020			1083	1111			1179
Intensidad ua.	855	755	116	777	374	440	225	289	998	278	230	234	204			240	661			741
Probable origen	612, 632, 705, 733, 773, Pueden deberse a tioeteres (C-S) a Cloro carbonos (C-Cl) o a Alicíclicos y alifáticos (CC) 659 Parte de la señal podría deberse a la dispersión del fonón del silicio en 669 o a tioeteres (C-S) a Cloro carbonos (C-Cl) o a Alicíclicos y alifáticos (CC); 636, Parte de la señal podría deberse a la dispersión del fonón del silicio en 620 o a tioeteres (C-S) a Cloro carbonos (C-Cl) o a Alicíclicos y alifáticos (CC); 814, 831, 887 Pueden deberse a Alicíclicos y alifáticos (CC) o a éteres (C-O-C)									918 935 Pueden deberse a Eteres (C-O-C) y a alicíclicos y alifáticos 1005 Puede ser debido a siloxanos (Si-O-Si) o a tionas (C=S) y a alicíclicos y alifáticos (CC); 1020 debido a Sulfoxidos (C-)SO(-C) a tionas C=S o a Eteres (C-O-C) y a alicíclicos y alifáticos (CC) 1083 1111 1179 Debidos a Tionas (C=S) a sulfonas (C-)SO ₂ (-C) y a alicíclicos y alifáticos (CC) 1083 y 1111 también podrían deberse a tioeteres (C-S) y a alicíclicos y alifáticos (CC)										
Muestra 655N		636							890			997		1034	1056	1095		1121	1151	
Intensidad ua.		113							99			128		153	217	628		417	203	
Probable origen	636, Parte de la señal podría deberse a la dispersión del fonón del silicio en 620 o a tioeteres (C-S) a Cloro carbonos (C-Cl) o a Alicíclicos y alifáticos (CC);									997 podría deberse a la dispersión del armónico del silicio en las direcciones X, L y W o a Silixanos Si-O-Si 1034 1056 debidos a Tionas (C=S) a sulfoxidos (C-)SO(C-) y a eteres (C-O-C) y a alicíclicos y alifáticos (CC) 1095 1121 1151 Debidos a a Eteres (C-O-C) a tionas (C=S) y a sulfonas (C-)SO ₂ (C-) y a alicíclicos y alifáticos (CC) 1095 también podría deberse a tioeteres (C-S)										
Muestra IL 10											935									
Intensidad											136									
Probable origen										Podría deberse al armónico de los fonoes en las direcciones X, L y W										
Muestra Silicio		620	669								941	974 Hombro								
Intensidad		101	56								641	411								
Probable origen	620 Dispersión del fonon del silicio en dirección X(TA+TO) 669 Fonon del silicio en dirección Σ(TA+TO)									Armónico de los fonoes en las direcciones X, L y W										

Tabla 4.8. Asignación de Picos Raman de la figura 4.9.

Region (cm ⁻¹)	1200-1500						
Pico Raman	21	22	23	24	25	26	27
Muestra 655+IL10	1233	1310		1362		1445	1456
Intensidad ua.	516	553		701		236	246
Probable origen	1233 1310 debidos a tionas (C=S) y a alicíclicos y alifáticos (CC) 1310 también debido a sulfonas (C-)SO ₂ (C-) 1362 debido a Nitrilos (C-)NO ₂ 1445 1456 Debidos a aromáticos (CC) y a Metilos (CH ₂ ,CH ₃)						
Muestra 655N	1239	1294	1335		1378	1442	
Intensidad ua.	108	211	157		176	170	
Probable origen	1239 1294 debidos a alicíclicos ya alifáticos (CC) y tionas (C=S)						
Muestra IL 10			1336			1440	
Intensidad			60			45	
Probable origen	1336 debido a sulfonas (C-)SO ₂ (C-) 1440 debido a diazos N=N y a metilos (CH ₂ ,CH ₃)						
Muestra Silicio							
Intensidad							
Probable origen							

4.2.3 Estudio de Picos Raman de muestras de 655nm en la región 1500-3500 cm^{-1}

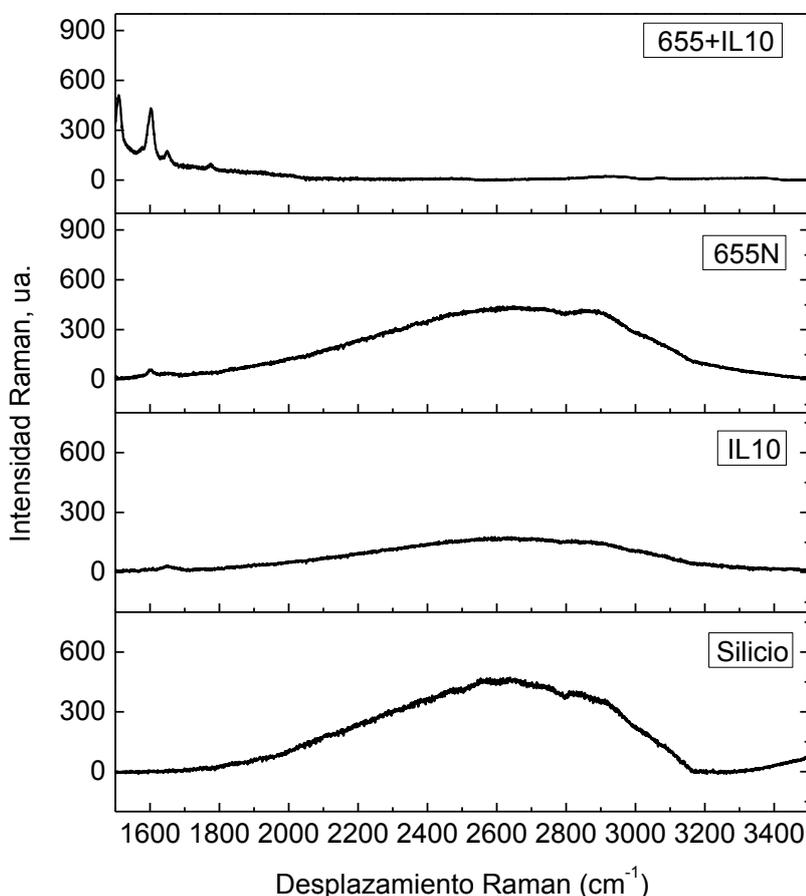


Figura 4.10. Espectros Raman de las muestras de 655nm bioconjugada y sin bioconjugar, de anticuerpo IL 10 y de Silicio solo.

En la figura 4.10 se observa que prácticamente no hay picos Raman para la muestra de 655+ IL 10. La excepción son los picos 1-3, originados por los grupos alqueno y amino presentes en el anticuerpo, crosslinker y en el polímero. Sin embargo los picos Raman correspondientes al grupo amino son de mayor intensidad en la muestra 655N. Esto nos habla de la contribución de los compuestos del anticuerpo IL 10. Sin embargo los picos Raman correspondiente al grupo amino son incluso más grandes apareciendo dos picos más que en la muestra 655N. Esto permite observar lo que nos habla de que la contribución de los compuestos del anticuerpo IL 10 está presente.

En la muestra 655N para el pico 1 es debido a compuestos amino presentes en el polímero PEG-PE. Sin embargo las señales que se presentan en el rango estudiado, son enmascaradas por el armónico de silicio que abarca la mayor parte. Podemos mencionar que hay una contribución en 2890cm^{-1} que hace que aumente un borde del armónico. Esto se puede atribuir a los grupos alquilo (-CH) presentes en el polímero.

En la muestra de anticuerpo de IL 10 podemos observar el pico 3 que corresponde a los grupos amino, también presente en el pico 3 de la muestra 655+IL10 con lo cual presenta la contribución del anticuerpo.

Por último se presenta el análisis de la señal de silicio la cual ya ha sido estudiada y de la cual presentamos sus características en la tabla 4.9.

Tabla 4.9 Asignación de Picos Raman de la figura 4.10.

Region (cm ⁻¹)	1500-3500			
Pico Raman	1	2	3	4
Muestra 655+IL10	1509	1604	1650	No hay señal del armónico del silicio
Intensidad ua.	511	422	173	
Probable origen	1509 debido a alquenos (C=C) 1604 1650 debido a Aminos (C=N) y a alquenos (C=C)			
Muestra 655N	1601			Armónico del silicio aumenta en el rango de 1800 hasta 3190 hay especial contribución al aumento de señal en 2890
Intensidad ua.	55			414 en 2890
Probable origen	1601 debido a Aminos (C=N) y a alquenos (C=C) Contribución en 2890 debida a grupos alquilo (-C-H)			
Muestra IL 10			1646	Armónico del silicio disminuye en todo el rango de 1800 hasta 3190
Intensidad			32	173 amplitud máxima en 2647
Probable origen	1646 debido a Aminos (C=N) y a alquenos (C=C)			
Muestra Silicio				Armónico desde 1800 hasta aprox. 3190 cm ⁻¹
Intensidad				462 amplitud máxima del armonico en 2587
Probable origen	Armonico del Silicio			

Conclusiones parciales:

En esta sección se observa que el proceso de bioconjugación efectivamente aporta nuevas características a los espectros de los PCs. Esto se comprueba al apreciar nuevos picos Raman, que reflejan la presencia de nuevos compuestos debidos a la reacción de la molécula de PCs con recubrimiento de polímero con la molécula de anticuerpo. Además observamos el incremento en la intensidad de la señal debido al efecto SERS. Esta característica se atribuye a los dipolos de las moléculas orgánicas y su interacción con los PCs. Se puede confirmar que para el caso de bioconjugación, los cambios observados eran los esperados (aumento de intensidad, aparición de nuevos picos Raman relacionado con nuevos compuestos).

Por lo tanto se recomienda el análisis de Raman para confirmar el proceso de bioconjugación. Por ejemplo, en el caso de la muestra de 655nm se presenta un realce de las señales, lo que demuestra que existe una interacción del campo eléctrico con los compuestos orgánicos. Por lo tanto, los momentos dipolares eléctricos en las partículas, se indujeron por este campo eléctrico. Otra ventaja de la técnica Raman es que no resulta destructiva; una ventaja para el trabajo con las muestras biológicas, que son altamente sensibles a la temperatura.

4.3 Estudio de los espectros Raman de las muestras de 800, 655 y 605 sin biomoléculas

En esta sección se analizan las características de los puntos cuánticos utilizados. Se estudia la composición química que poseen las muestras de 705nm y de 800nm. Se propone una determinada composición química con base en la estimación de diámetros obtenidos de los espectros de fotoluminiscencia. Sin embargo la aplicación de la espectroscopia Raman permite estimar la composición química de los PCs esto resulta en una gran ventaja para comprobar los resultados.

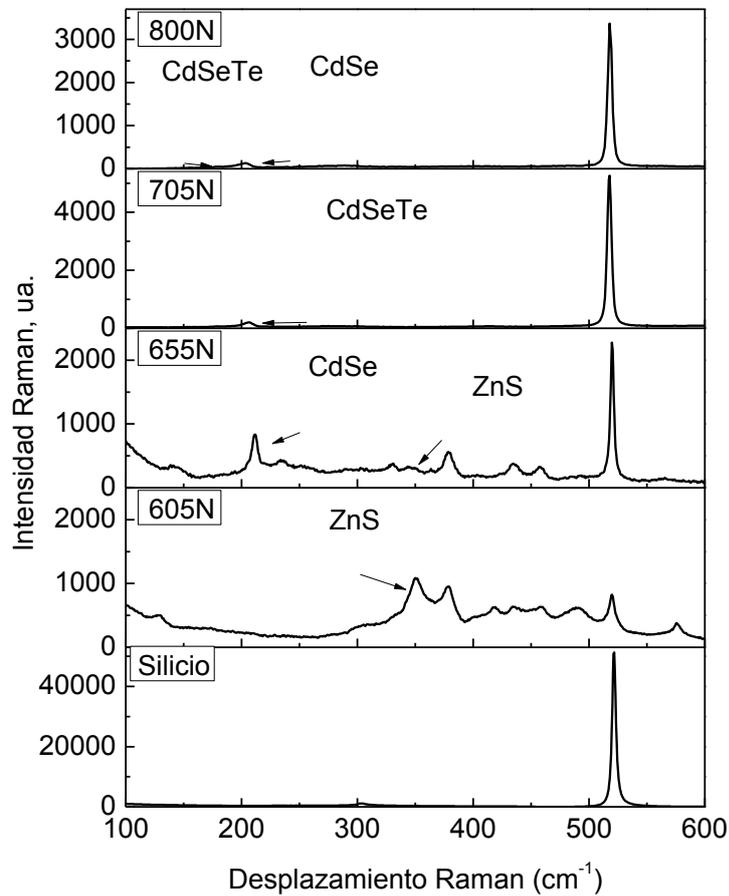


Figura 4.11. Espectros de muestras de puntos cuánticos no bioconjugados y sustrato de silicio, se muestran los picos en escala completa.

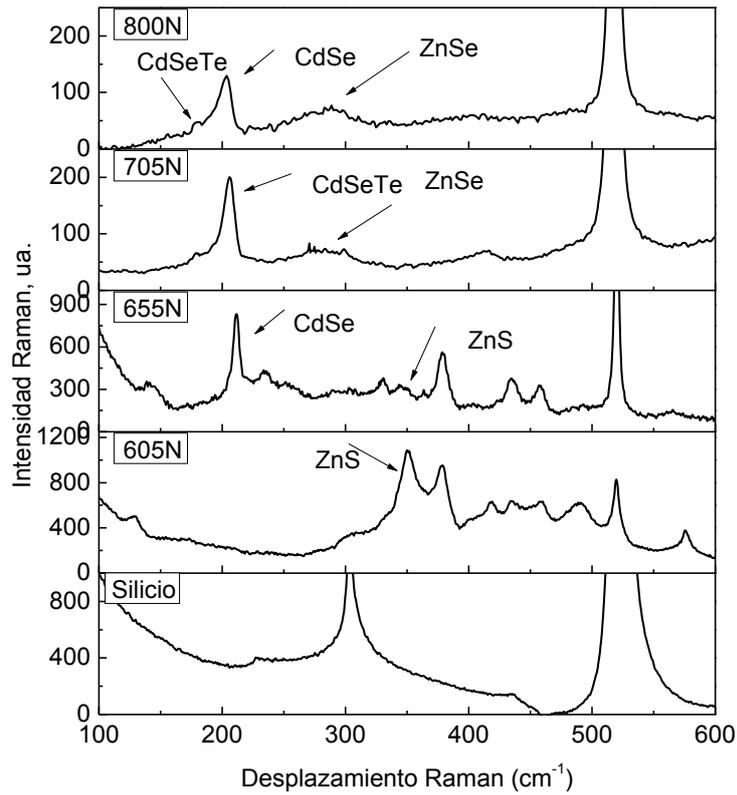


Figura 4.12. Espectros de muestras de puntos cuánticos no bioconjugados y sustrato de silicio, se muestran los picos en escala reducida.

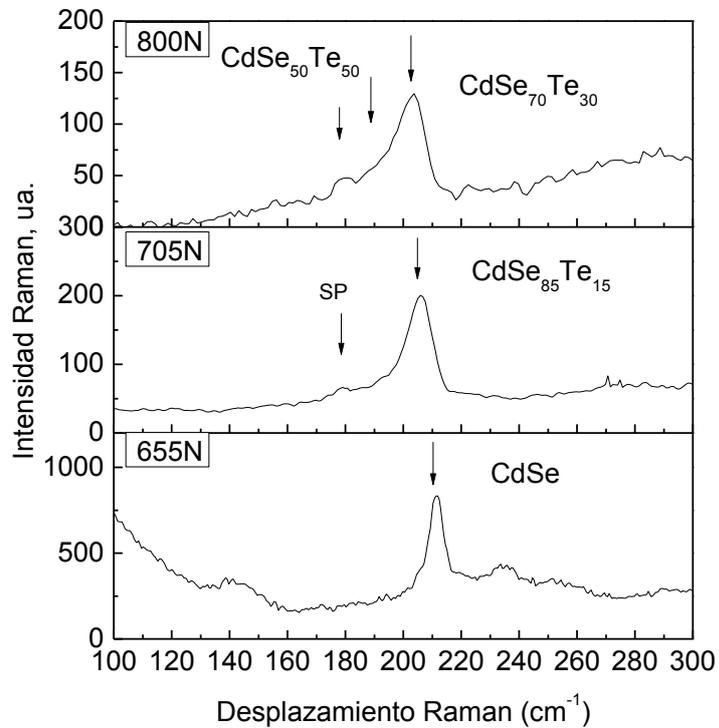


Figura 4.13. Espectros de muestras de puntos cuánticos no bioconjugados

En las figuras 4.12 y 4.13 se observa que las muestras de CdSe (605nm, 655nm) poseen en el caso de la muestra de 655nm los picos correspondientes al núcleo y la coraza en 311 y 350 cm^{-1} respectivamente. En el caso de la muestra de 605nm solo es posible observar el pico correspondiente a la coraza en 350 cm^{-1} . Sin embargo en las muestras de 705nm y de 800nm observamos que aparecen picos correspondientes a otros compuestos. De los datos proporcionados para el CdTe [116] el pico está en 171 cm^{-1} . De esta forma se realizaron los cálculos para determinar la composición del núcleo por la ubicación de los picos Raman mediante una sencilla relación de tres.

Se debe mencionar que las muestras de silicio, IL10, 605N Y 655N fueron medidas con una línea láser de 785nm, las muestras de 705N Y 800N fueron medidas con una línea láser de 532nm.

De esta forma se obtuvieron los valores que a continuación se adjuntan en tablas presentadas en el capítulo anterior

Tabla 3.31. Valores de fonones en diferentes estructuras semiconductoras.

	CdTe cúbico	CdSe wurtzita	ZnS wurtzita	ZnS cúbico
$\lambda(\text{cm}^{-1})$	139 (TO)	168 (TO(A_1)) 171 (TO(E_1))	274 (TO(A_1)) 274 TO(E_1))	273 (TO)
	167 (LO)	213 (LO(A_1)) 211 (LO(E_1)) 183-180 (SP)	352 LO(A_1) 352 LO(E_1)	249 (LO)
	Eg(eV) a 300K	1.5	1.73	3.74

Se analizó a que equivale el valor del pico Raman para una composición de CdSe al 100% y lo que obtenemos de la literatura [68] es de 211 cm^{-1} . Por otro lado se tiene la composición química de CdTe al 100% que es de 171 cm^{-1} . Se obtienen sus valores correspondientes en eV mediante esta fórmula

$$E = 1.24 \times 10^{-4} * \lambda(\text{cm}^{-1})$$

$$\text{CdSe } 213\text{cm}^{-1} = 26.41\text{eV}$$

$$\text{CdTe } 171\text{cm}^{-1} = 21.948\text{eV}$$

De tal forma se calculó el equivalente en eV de los picos de 206, 191, 200 y 202 cm^{-1} ; que son los que aparecen en los espectros

705nm

$$206\text{cm}^{-1} = 25.544\text{eV}$$

800nm

$$191\text{cm}^{-1} = 23.69\text{eV}$$

$$200\text{cm}^{-1} = 25.05\text{eV}$$

$$203\text{cm}^{-1} = 25.048\text{eV}$$

Y aplicando una regla de tres se obtienen las composiciones químicas que adjuntamos en la tabla 3.32

Tabla 3.32. Picos Raman obtenidos experimentalmente.

Muestra	Material	Pico Raman (cm^{-1})	Energía fonónica $\hbar\omega_{ph}$ (meV)
605nm	CdSe	212	26.41
655nm	CdSe	213	26.41
705nm	$\text{CdSe}_{85}\text{Te}_{15}$	206	25.54
800nm	$\text{CdSe}_{70}\text{Te}_{30}$	200 } 202 }	25.05 } 24.08 }
	$\text{CdSe}_{50}\text{Te}_{50}$	191	23.69

Una vez obtenidas las relaciones y determinadas las composiciones químicas se puede comprobar que efectivamente la técnica de espectroscopia Raman es una herramienta poderosa que ha servido para determinar la naturaleza química de los puntos cuánticos. Esto a su vez permitió comprobar y cimentar los resultados obtenidos con los espectros de fotoluminiscencia.

Capítulo 5: Conclusiones Generales

1. Se puso de manifiesto la variación de los espectros de fotoluminiscencia de puntos cuánticos de CdSe/ZnS (605nm y 655nm), y CdSeTe/ZnS (705nm y 800nm) bioconjugados con anticuerpos de IL-10. Esta variación se atribuye al efecto Stark de confinamiento cuántico, que se produce cuando un campo eléctrico se aplica a los puntos cuánticos bioconjugados. El campo eléctrico está relacionado con los momentos dipolares eléctricos de las moléculas de anticuerpo de IL-10. El efecto Stark de confinamiento cuántico provoca el incremento de la banda prohibida, lo que lleva al cambio del pico de FL de los puntos cuánticos bioconjugados hacia energía más alta acompañado por la asimetría de las bandas FL.
2. Se mostro que el efecto Stark de confinamiento cuántico es proporcional a tres grados del tamaño de los PCs. El mínimo de cambio de energía en el efecto Stark se revela para los PCs de 605nm con un tamaño de núcleo de 5.44nm y el máximo cambio de energía en el efecto Stark se detecta en los PCs de 800nm con un tamaño de núcleo de 14.42nm.
3. La Espectroscopia Raman fue utilizada para la estimación de la composición de las aleaciones en los PCs de CdSeTe / ZnS y para la confirmación de la existencia de momentos dipolares eléctricos en los puntos cuánticos conjugado con anticuerpos de IL 10. También fueron identificados en los puntos cuánticos no conjugados los picos característicos Raman de los núcleos de CdSe y CdSeTe, las corazas de ZnS, y polímero amino PEG. En los puntos cuánticos bioconjugados se identificaron nuevas líneas de compuestos orgánicos relacionados con el anticuerpo de IL-10.

Recomendaciones y trabajos futuros

Para la continuación de este trabajo en el futuro, es necesario unir las investigaciones ópticas (FL y Raman) con estudios biomédicos detallados, así como el investigar la variación de las características ópticas de puntos cuánticos bioconjugados con anticuerpos, conjugados en segunda etapa con los antígenos correspondientes.

Referencias:

1. T. Itho and K. Kirihara, *J. Lumin* 31/32, 120 (1984).
2. T. Itho, Iwabuchi, and T. Kirihara, *Phys. Stat Solids B*, 146, 531 (1988).
3. Al. L. Efros and A. L. Efros, *Sov. Phys. Semiconductors nanocrystals* 16, 772 (1982).
4. T.V. Torchynska and Yu. V. Vorobiev, *Nanocrystals and Quantum Dots of Group IV semiconductors*, 1-3 (2010).
5. R. Rossetti, S. Nakahara, & Brus, L.E. Quantum size effects in the redox potentials, resonance Raman spectra, and electronic spectra of CdS crystallites in aqueous solution. *J. Chem. Phys.* 79, 1086-1088 (1983).
6. G.C. Papavassiliou, Luminescence spectra and Raman excitation profiles in small CdS particles. *J. Solid State Chem.* 40, 330-335 (1981).
7. A.L. Efros, Interband absorption of light in a semiconductor sphere. *Soviet Physics Semiconductors-Ussr* 16, 772-775 (1982).
8. L.E. Brus, Electron--electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. *J. Chem. Phys.* 80, 4403-4409 (1984).
9. L. Brus, Quantum crystallites and nonlinear optics. *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* 53,465-474 (1991).
10. P. Sharma, S. Brown, G. Walter, S. Santra, B. Moudgil, *Adv. Colloid. Interface Sci.*, 123-126, 471(2006)
11. X. Gao, W.C.V. Chan, S. Nie, *Journal of Biomedical Optics*, 7(4), 532(2002).
12. A. Alaiya, M. Al-Mohanna, and S. Linder, *J. of Proteome Research*, 4, 1213(2005).
13. M.P. Pileni, *Structure and reactivity in reverse micelles*. Amsterdam: Elsevier, 1989.
14. H.L. Rosano, M. Clausse, *Microemulsion systems*. New York, NY.; M. Dekker, 1987.
15. J.H. Fendler, *Membrane mimetic chemistry: characterizations and applications of micelles, microemulsions, monolayers, bilayers, vesicles, host-guestsystems, and polyions*, New York, Wiley, 1982.
16. J.G. Brennan, T. Siegrist, P.J. Carrol, S.M. Stuczynski, P. Reynders, L.E. Brus, M.L. Steigerwald, *Chem. Mater.*, 2, 403(1990).
17. C.B. Murray, D.J. Norris, M.G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 8706(1993).
18. Q. Liu, X. Liu, Y. Zhu, D. Tang, *J. Colloid and Interface Science* 307, 563(2007).
19. L. Qu, Z. Peng, X. Peng, *Nano Lett.*, 1, 333(2001).
20. Z. Peng, X. Peng, *J. Am. Chem Soc.*, 123, 183(2001).
21. H. Li, W.Y. Shih, and W.H. Shih, *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 2013(2007).
22. T. Sugimoto, G.E. Dirige, A. Muramatsu, *J. Colloid and Interface Science*, 173, 257(1995).
23. A.R. Loukanov, C.D. Dushkin, K.I. Papazova, A.V.Kirov, M.V. Abrashev, E. Adachi, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 245, 9(2004).
24. M.J. Murcia, D.L. Shaw, H. Woodruff, C.A. Naumann, B.A. Young, and E.C. Long, *Chem. Mater.*, 18, 2219(2006).
25. T. Nakanishi, B. Ohtani, K. Uosaki, *J. Phys. Chem B.*, 102, 1571(1998).
26. B.H. Robinson, T.F. Towey, S. Zourab, A.J.V.G. Visser, A. Vanhoek, *Colloids Surf.* 61, 175(1991).
27. M. Tata, S. Banerjee, V.T. John, Y. Waguespack, G.L. McPeterson, *Colloids Surs A Physicochem Eng Asp.* 127, 39(1997).
28. D.L. Ou, A.N. Seddon, *Phys Chem Glasses* 39, 154(1998).

29. Q. Pang, B.C. Guo, C.L. Yang, S.H. Yang, M.L. Gong, W.K. Ge, et al., *J Cryst Growth*, 269, 213(2004).
30. F.T. Quidlan, J. Kuther, W. Tremel, W. Knoll, S. Risbud, P. Stroeve, *Langmuir* 16, 4049(2000).
31. C.F. Hoener, K.A. Allan, A.J. Bard, A. Campion, M.A. Fox, T.E. Mallouk, et al, *J Phys Chem*, 96, 3812(1992).
32. A. Kortan, R. Hull, R. Opila, M. Bawendi, M. Steigerwald, P. Carroll, L. Brus, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 1327(1990).
33. B. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. Miculec, J. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. Jensen, M. Bawendi, *J. Phys. Chem. B.*, 101, 9463(1997).
34. R. Kho, Torres-Martínez, and R. Mehra, *J. Colloid and Interface Science* 227, 561(2000).
35. S. Santra, H. Yang, P.H. Holloway, J.T. Stanley, R.A. Mericle, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 1656(2005).
36. H.S. Yang, P.H. Holloway, S. Santra, *J. Chem. Phys.* 121, 7421(2004).
37. S. Kim, M.G. Bawendi, *Science* 281, 2013(1998).
38. J. Douda, P.A. Calva, T. V. Torchyska, R. Peña. Sierra, J. M. de la Rosa Vázquez, *Superficies y vacío* 21(4) 10-17, diciembre de 2008.
39. B. Dubertret, P. Skourides, D.J. Norris, V. Noireaux, A.H. Brivanlou, A. Libchaber, *Science*, 298 (5599), 1759(2002).
40. S. Pathak, S.K. Choi, N. Arnhiem, M.E. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 4103(2001).
41. W.Z. Guo, Y.A. Wang, X.G. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 2293(2002).
42. S. Kim, M.G. Bawendi, *Science* 281, 2013(1998).
43. D. Gerion, F. Pinaud, S.C. Williams, W.J. Parak, D. Zanchet, S. Weiss, et. al., *J. Phys. Chem. B*, 105, 8861(2001).
44. M.A. Correa-Duarte, M. Giersig, L.M. Liz-Marzan, *Chem. Phys. Lett* 286, 497(1998).
45. W.C. Chan, S. Nie, *Science* 281, 2016(1998)
46. H. Mattoussi, J.M. Mauro, E.R. Goldman, G.P. Anderson, V.C. Sundar, F.V. Mikulec, M.G. Bawendi, *J. Am Chem. Soc.* 122, 12142(2000).
47. M.A. Correa-Duarte, M. Giersig, L.M. Liz-Marzan, *Chem. Phys. Lett* 286, 497(1998).
48. A. Kortan, R. Hull, R. Opila, M. Bawendi, M. Steigerwald, P. Carroll, L. Brus, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 1327(1990).
49. C.B. Murray, D.J. Norris, M.G. Bawendi, *J. Am. Chem.Soc.*, 115, 8706(1993).
50. S. Miyasaki, H. Yamaguchi, M. Takada, W.M. Hou, Y.Takeichi, H. Yasubuchi, *Acta Farm. Nordica* 2, 401(1990).
51. M. Hines, P. Guyot-Sionnest, *J. Phys. Chem.*, 100,468(1996).X.Y. Wu, H.J. Liu, J.Q. Liu, et al., *Nature Biotechnol.*, 21 (1), 41(2003).
52. X.Y. Wu, H.J. Liu, J.Q. Liu, et al., *Nature Biotechnol.*, 21 (1), 41(2003).
53. X.H. Gao, Y.Y. Cui, R.M. Levenson, L.V.K. Chung,S.M. Nie, *Nature Biotechnol.* 22 (8), 969(2004).
54. C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, et al., *Nano Lett.*, 4(4), 703(2004).
55. P. Sonar, K.P. Sreenivasan, T. Maddanimath, K. Vijayamohanam, *Materials Research Bull.*, 41, 198(2006).
56. Y. Jin, Y. Zhu, X. Yang, H. Jiang, C. Li, *J. Colloid and Interface Science*, 301, 130(2006).
57. T.G. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Chap 8, Academic Press, London, 1996.
58. H. Mattoussi, J.M. Mauro, E.R. Goldman, T.M. Green, G.P. Anderson, V.C. Sundar, and M.G. Bawendi, *Phys. Stat. Sol. B*, 224, 277(2001).

59. E.R. Goldman, H. Mattoussi, P.T. Tran, G.P. Anderson, and J.M. Mauro, Semiconductor Quantum Dots, Eds. Fafard S, Huffaker D, Leon R, and Noetzel, Materials Research Society Proc., Vol. 642, J2.8.1-J2.8.6, Pittsburgh 2001.
60. E.L. Wolf, Nanophysics and Nanotechnology, WileyVCH Verlag GmbH & Co. KgaA, 2004.
61. <http://www.invitrogen.com>
62. X Michalet, F.F Pinaud, L.A Bentolia, Tsay, J.M, Doose, S., Li, J.J., Sundaresan, G., Wu, A.M., Gambhir, S.S & Weiss, S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics Science 307, 538-544 (2005).
63. E.L. Bentzen, F. House, T.J. Utley, J.E. Crowe, D.W. Wright, Nano Lett. 5 (4) (2005) 591–595.
64. J. Douda, P. A. Calva, T. V. Torchynska, R. Peña Sierra, J. M. de la Rosa Vázquez, Marcadores Cuánticos para la Detección de Cáncer, Superficies y Vacío 21(4) 10-17, diciembre de 2008X.
65. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir and S. Weiss, Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics, Science 307 (2005), 538–544.
66. H. Mattoussi, J.M. Mauro, E.R. Goldman, A.P. Anderson, V.C. Sunder, F.V. Mikulec and M.G. Bawendi, Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dots bioconjugates using an engineered recombinant protein, J Am Chem Soc 122 (2000), 12142–12150.
67. Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Second edition 2008.
68. A Diaz Cano¹, S Jimenez Sandoval, Y Vorobiev, F Rodriguez Melgarejo¹ and T V Torchynska Peculiarities of Raman scattering in bioconjugated CdSe/ZnS quantum dots, Nanotechnology 21 (2010) 134016 (4pp).
69. L. V. Borkovskaa, N. E. Korsunskaa[^], T. G. Kryshtabb, L. P. Germashc, E. Yu. Pecherskac, S. Ostapenkod, and G. Chornokurd, Effect of Conjugation with Biomolecules on Photoluminescence and Structural Characteristics of CdSe/ZnS Quantum Dots, ISSN 1063_7826, Semiconductors, 2009, Vol. 43, No. 6, pp. 775–781. Pleiades Publishing, Ltd., 2009.
70. T. V. Torchynska¹, J. Douda, and R. Peña Sierra, Photoluminescence of core-shell CdSe/ZnS quantum dots of different sizes, Phys. Status Solidi C 6, No. S1, S143–S145 (2009) / DOI 10.1002/pssc.200881286.
71. Fundamentals of Photonics Bahaa E. A. Saleh, Malvin Carl Teich, 1991 John Wiley & Sons, Inc. 465-466
72. Raman spectroscopy for chemical analysis / by Richard L. McCreery. "A Wiley-interscience publication, 2000, pp 38-40
73. <http://probes.invitrogen.com/media/spectra/QD655SA.jpg>
74. <http://probes.invitrogen.com/media/spectra/QD605SA.jpg>
75. J. S Abrams, M.-G. Roncarolo, H. Yssel, U. Andersson, G. J. Gleich, and J. Silver. 1992. Immunol. Rev. 127: 5.
76. W. H. Gotlieb, J. S. Abrams, J. M. Watson, T. Velu, J. S. Berek, and O. Martinez-Maza. 1992. Cytokine 4: 385.
77. P. Salgame, J. S. Abrams, C. Clayberger, H. Goldstein, R. L. Modlin, and B. R. Bloom. 1991. Science 254: 279.
78. O. Dominic Ansaric, Raman Encoded Nanoparticles for biomolecular detections and cancer Diagnostics, 2008. Pp 65-66

79. I Sergei et al, Light Emission from Quantum Dots Stabilized by Sugars; 2009
80. T. V. Torchynska, Raman scattering and SEM study of bio-conjugated core-shell CdSe/ZnS QDs, 2007.
81. Dybiec ,Photoluminescence spectroscopy of bioconjugated CdSe/ZnS quantum dots, 2007
82. G Chornokur, Spectroscopic behavior of bioconjugated quantum dots, 2008.
83. Capitulo 03 Inmunoglobulinas F. García-Cozar, E. Aguado y J. Peña, http://www.vi.cl/foro/topic/5698-enfermedades-autoinmunes-capitulos-de-inmunologia-apuntes-entendiendo-al-sistema-inmunolgico/page__st__40__s__5198010a822b5f613c5345e80d3e052c__s__7b9bcffca6102d86a16f23ae8e095908 ; <http://es.scribd.com/doc/50331027/Inmunoglobulinas>
84. S. A. Empedocles and M. G. Bawendi, Quantum-Confined Stark Effect in Single CdSe Nanocrystallite Quantum Dots, *Science*, vol. 278, 1997.
85. C.F Klingshirn, *Semiconductor Optics*, Springer, pp-260-262, 2005
86. A.P. Alivisatos, Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* 271, 933-937 (1996).
87. A.P. Alivisatos, Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. *J. Phys. Chem.* 100, 13226-13239 (1996).
88. S.I. Yoon, Logsdon, N.J., Sheikh, F., Donnelly, R.P., Walter, M.R. Conformational changes mediate IL-10R2 binding to IL-10 and assembly of the signaling complex. *J.Biol.Chem.* , 2006.
89. <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/562/56230205.pdf>
90. H. Fleischmann, P. J. Hendra y A. J. MacQuillan, *Chem. Phys. Lett.* 26, 163 (1974).
91. R.K. Chang y T. Furtak, *Surface Enhanced Raman Scattering*, Plenum Press, New York, (1982).
92. H. Metiu y P. Das, *Ann. Rev. Phys. Chem.* 35, 507 (1984).
93. Furtak D. Roy, *Surf. Sci.* 158, 126 (1985).
94. I. Gersten, R.L. Birke y J.R. Lombardi, *Phys. Rev. Lett.* 43, 147 (1979).
95. S.S. Jha, *Surf. Sci.* 158, 190 (1985).
96. H. Baltruschat y J. Heitbaum, *Surf. Sci.* 166, 113 (1986)
97. H. Baltruschat y J. Heitbaum, *Surf. Sci.* 166, 113 (1986).
98. Q. Feng y T.M. Cotton, *J. Chem. Phys.* 90, 983 (1986).
99. H. Ishida y A. Ishitani, *Appl. Spectrosc.* 37, 450 (1983).
100. T. Watanabe, O. Kawanabi, H. Katoh y K. Honda, *Surf. Sci.* 158, 341 (1985).
101. T. Vo-Dinh, M.Y.K. Hiromoto, G.M. Begun y R.L. Moody, *Anal. Chem.* 56, 1667 (1984).
102. G. Mie, *Ann. Physik* 25, 377 (1905).
103. M. Kerker, D. S. Wang y H. Chew, *Appl. Opt.* 19, 3373 (1980).
104. D. S. Wang, H. Chew y M. Kerker, *Appl. Opt.* 19, 3373 (1980).
105. M. Moskovits, *Rev. Mod. Phys.* 57, 783 (1985).
106. M. Kerker, *J. Colloid Interface Sci.* 105, 297 (1985).
107. J. V. García Ramos, *Opt. Pur. y Apl.*, Vol. 37, Núm. 2, 2004
108. <http://www.uco.es/hbarra/index.php/fc/apuntesfc/264-fc1005>
109. <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/Q22061MP>
110. <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/Q22071MP>
111. Y.Kayanuma, *Phy. Rev B* 38, 9797 (1988).
112. Y. Kayanuma. *Solid State Commun.* 59, 405 (1986).

113. Bosang S. Kim, Mohammad A. Islam, Louis E. Brus, and Irving P. Herman, Interdot interactions and band gap changes in CdSe nanocrystal arrays at elevated pressure, JOURNAL OF APPLIED PHYSICS, VOLUME 89, NUMBER 12 15 JUNE 2001
114. Albert A. Ruth *, John A. Young Generation of CdSe and CdTe nanoparticles by laser ablation in liquids Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 279 (2006) 121–127.
115. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 2006.
116. P. T. C. Freire and M. A. Araújo Silva, V. C. S. Reynoso, A. R. Vaz, and V. Lemos, Pressure Raman scattering of CdTe quantum dots, PHYSICAL REVIEW B, VOLUME 55, NUMBER 11, 15 MARCH 1997
117. Nakamoto, 1997, Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part A (New York: Wiley).
118. S.E. Ralph, J. Opt. Soc. Am. B, 11, N12, 1994, 2528.
119. Sadao Adachi, Properties of Group-IV, III-V and II-VI Semiconductors (Wiley Series in Materials for Electronic & Optoelectronic Applications).

Trabajos y participaciones derivados de este proyecto de investigación

7th International Conference on Low Dimensional Structures and Devices, Telchac (Mexico), May 22-27, 2011

Tue-P20

18:30 - 20:30

TRANSFORMATION OF PHOTOLUMINESCENCE AND RAMAN SCATTERING SPECTRA AT THE CONJUGATION OF CdSe/ZnS QUANTUM DOTS TO ANTIBODIES

J. L. Casas Espinola¹⁺, T. V. Torchynska¹, G. Polupan², O. S. López de la Luz³, A.I. Diaz Cano³ and Ye. Shcherbyna⁴

¹ESFM, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., 07738, México

²ESIME, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., 07738, México

³UPIITA, Instituto Politécnico Nacional, México D. F. 07738, México

⁴National Technical University – “KPI”, Kiev, Ukraine

Semiconductor CdSe/ZnS core/shell quantum dots (QDs) have unique optical properties such as QD-size tunable photoluminescence (PL) with narrow emission bandwidths and sufficiently high quantum efficiency. The ability to cover these QDs with biomolecules is a critical step in producing efficient bio-luminescent markers. Spectroscopic confirmation of bioconjugation with the detection not only the variation of PL intensity but also the spectral transformation of emission spectra or the changes in a peak full width at half maximum (FWHM) is highly important. This paper presents the results of the analysis of PL spectra of CdSe/ZnS QDs covered by polymer without and with bioconjugation to bio-molecules: mouse anti Interleukin -10 (IL-10) antibody (mab). Commercial CdSe/ZnS QDs used in the study are characterized by the color emission with the maximum at 605 nm (2.05 eV) at 300K. It is shown that PL spectra of nonconjugated QDs can be presented as a superposition of PL bands related to exciton emission in the CdSe core (2.05 eV) and some high energy PL bands (in the peak ranges 2.37 – 3.00 eV). The study of PL spectrum at low temperature (10K) has testified that high energy PL bands deal with electron-hole emission via interface state at the CdSe/ZnS or ZnS/polymer interfaces. It is revealed that the QD bioconjugation to the anti IL-10 mab is accompanied by the change dramatically in PL and Raman scattering spectra. Main features of PL spectrum transformations deal with the decrease of PL intensity of interface related PL bands and the rise of intensity of CdSe core related PL bands. The bioconjugation of QDs is accompanied to stimulation of Raman scattering peaks related to the CdSe phonons and Si substrate. The explanation of mentioned effects has been proposed on the base of re-charging of interface related states and the SERS effect at the bioconjugation of QDs.

This work was partially supported by CONACYT (the project 000130387) as well as by the SIP-IPN, Mexico.

+ Author for correspondence: Email: jlcasas@esfm.ipn.mx

A TRANSFORMATION OF RAMAN SCATTERING SPECTRA AT THE CONJUGATION OF CDSE/ZNS QUANTUM DOTS TO IL-10 ANTIBODIES

A.J. Díaz Cano¹, J. Douda¹, O. S. López de la Luz¹ and T. V. Torchynska².

¹UPIITA – Instituto Politécnico Nacional, México D. F. 07738, México

²ESFM– Instituto Politécnico Nacional, México D. F. 07738, México E-mail aldiaz@ipn.mx

Fluorescent quantum dots (QDs) are important systems for bioimaging applications. The ability to linking these QDs with biomolecules is a critical step in producing efficient bio-luminescent markers. The spectroscopic confirmation of bioconjugation with the detection not only the variation of photoluminescence (PL) intensity but also the transformation of PL and Raman spectra is highly important. This paper focuses on the study of Raman scattering spectra of CdSe/ZnS Qds of different sizes nonconjugated and bioconjugated to anti Interleukin 10 (anti IL-10) antibodies (mAb). We observe some measurable variation of Raman spectra induced at binding of antibodies to QDs. This Raman light scattering study permits to develop the ultrasensitive method of antibody detection for the application in the life science field.

This work was partially supported by CONACYT (the project 000130387) as well as by the SIP-IPN, Mexico.
Key words: photoluminescence spectra, Raman spectroscopy, quantum dots, IL10 antibody, bioconjugation.