

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 965**

21 Número de solicitud: 201231506

51 Int. Cl.:

C01B 19/04 (2006.01)

C09K 11/88 (2006.01)

B82Y 30/00 (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.09.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.03.2014

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (100.0%)
Patio de Escuelas, 1
37008 Salamanca ES

72 Inventor/es:

ALMENDRAL PARRA, María Jesús;
ALONSO MATEOS, Ángel;
BOYERO BENITO, Juan Francisco y
SÁNCHEZ PARADINAS, Sara

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Procedimiento de síntesis de quantum dots de CdSe en solución acuosa**

57 Resumen:

Procedimiento de síntesis de quantum dots de CdSe en solución acuosa.

La presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis de quantum dots de CdSe en medio acuoso a partir de sales de Cd y Se en presencia de un mercaptoácido, de manera que controlando las condiciones de la reacción se obtienen quantum dots con mayor fluorescencia y mayor estabilidad que los obtenidos mediante métodos en medios orgánicos. Asimismo, la presente invención se refiere a los quantum dots obtenibles por este procedimiento que presentan una nanocorteza de un compuesto de Cd que contribuye a las propiedades ventajosas de estas partículas. Estos quantum dots, son idóneos para usar como marcadores fluorescentes en aplicaciones biológicas y biomédicas.

ES 2 451 965 A1

PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS DE QUANTUM DOTS DE CdSe EN SOLUCIÓN ACUOSA**DESCRIPCIÓN**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis de quantum dots de CdSe en medio acuoso a partir de sales de Cd y Se en presencia de un mercaptoácido, de manera que controlando las condiciones de la reacción se obtienen quantum dots con mayor fluorescencia y mayor estabilidad que los obtenidos mediante métodos en medios orgánicos. Asimismo, la presente invención se refiere a los quantum dots obtenibles por este procedimiento que presentan una nanocorteza de un compuesto de Cd que contribuye a las propiedades ventajosas de estas partículas. Estos quantum dots, son idóneos para usar como marcadores fluorescentes en aplicaciones biológicas y biomédicas.

Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de los materiales y la nanotecnología.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los Quantum Dots (QDs) son nanopartículas (NPs) semiconductoras caracterizados por tener un diámetro de entre 2 y 10 nm, que recientemente han atraído mucho interés en investigaciones biológicas porque exhiben unas propiedades ópticas y electrónicas únicas basadas en el fuerte confinamiento de los electrones excitados en sus estructuras. Una de sus propiedades extraordinarias es que el tamaño de partícula determina la mayoría de las propiedades de los QDs, principalmente, la longitud de onda de emisión fluorescente, que puede ser alterada manipulando su tamaño [Vinayaka AC, Thakur MS (2010) Anal Bioanal Chem 397:1445–1455].

25 Durante los últimos años se ha realizado un intenso trabajo dirigido al desarrollo de numerosos procedimientos de síntesis y al uso de QDs fotoluminiscentes para aplicaciones bioquímicas como marcadores en bioanálisis y diagnóstico o como marcadores biocompatibles para estudios de imagen in vivo. La síntesis de nanocristales de CdSe aún permanece como la más ampliamente investigada entre las diferentes NPs semiconductoras, debido principalmente a que el método de síntesis permite un control excepcional sobre el tamaño y la forma de los nanocristales obtenidos.

Los QDs de mayor calidad son preparados normalmente a elevadas temperaturas en disolventes orgánicos, tales como óxido de trioctilfosfina (TOPO) o disolventes coordinantes compuestos de una mezcla de TOPO y trioctilfosfina (TOP). Las superficies de los QDs preparados en fase orgánica están recubiertas por TOP o TOPO, y forman una capa hidrofóbica que hace que no puedan ser utilizados directamente en biosistemas. Generalmente se ha de reemplazar el recubrimiento del QD utilizando laboriosos métodos de intercambio de ligandos que disminuyen considerablemente el rendimiento cuántico de los QDs. Adicionalmente, se ha descubierto que estos QDs, ya hidrofílicos, no son lo suficientemente estables en solución acuosa después del intercambio de ligandos, por lo que se han desarrollado técnicas de modificación de superficie para aumentar aún más el carácter hidrofílico y la estabilidad de los QDs en solución acuosa. La consecuencia de esta modificación es un aumento significativo, no deseado, del diámetro de los QDs. Otras técnicas de modificación de las superficies de los QDs reportadas son el recubrimiento de los mismos con una concha inorgánica protectora, la modificación de su superficie para alcanzar estabilidad coloidal y la unión directa a moléculas biológicamente activas.

A diferencia de la síntesis orgánica, la síntesis acuosa exhibe una buena reproducibilidad, baja toxicidad, bajo coste y, especialmente, los productos preparados en fase acuosa tienen excelente solubilidad en agua, estabilidad y compatibilidad biológica. Hasta hace poco los QDs preparados en fase acuosa presentaban, por lo general, bajo rendimiento cuántico (QY) de entre un 3 y un 10%, sin embargo, en los últimos años, los métodos para preparar QDs luminiscentes en solución acuosa están siendo incrementados sustancialmente [Suk Young Choi, Jong Pil Shim, Dong Sun Kim, TaeYoung Kim, and Kwang S. Suh (2012) Journal of Nanomaterials Volume 2012, Article ID 519458, doi:10.1155/2012/519458]. Aunque pocos estudios profundizan en las estructuras y el comportamiento químico de los QDs sintetizados en solución acuosa con el fin de optimizar los procesos de bioconjugación.

Por tanto, es de interés encontrar un procedimiento de fácil síntesis de QDs en fase acuosa que permita el control de las variables implicadas en el proceso para modular los tamaños, las estabilidades y los rendimientos cuánticos según requiera su aplicación posterior.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los inventores han encontrado sorprendentemente un procedimiento de síntesis de QDs de CdSe en fase acuosa homogénea mediante el cual se puede modular fácilmente propiedades como la intensidad de fluorescencia o la estabilidad en el tiempo de estos QDs. De esta forma, se pueden diseñar QDs con unas propiedades adaptadas a la aplicación para la que vayan a emplearse.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de QDs de CdSe en medio acuoso que comprende las siguientes etapas:

- a) Preparación de una disolución acuosa de CdCl_2 , preferiblemente anhidro.
- b) Adición de una disolución de un mercaptoácido a la disolución obtenida en la etapa a).
- c) Ajuste del pH de la disolución obtenida en el paso (b) mediante la adición de una base.
- d) Ajuste de la temperatura de la disolución obtenida en el paso (c) por calentamiento o enfriamiento controlado y posterior burbujeo con un gas inerte.
- e) Adición de la disolución de selenosulfato a la disolución obtenida en el paso (d).

En la presente invención se entiende como mercaptoácido un compuesto que comprende una cadena carbonada, preferiblemente $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, y que contiene al menos un grupo $-\text{SH}$ y al menos un grupo $-\text{COOH}$.

En una realización preferida, la concentración de CdCl_2 en la disolución preparada en la etapa a) tiene un valor de entre 10^{-3} y 10^{-1} M.

En otra realización preferida, el mercaptoácido de la etapa b) se selecciona de la siguiente lista: ácido mercaptoacético, mercaptopropiónico, mercaptosuccínico. En una realización más preferida, el mercaptoácido es ácido mercaptoacético.

En una realización preferida, la concentración de la disolución de mercaptoácido utilizado en la etapa b) tiene un valor de 1 a 2 M.

En otra realización preferida, la adición de la etapa b) se lleva a cabo entre 1 y 6 minutos.

En otra realización preferida, la adición de la etapa b) se realiza a una temperatura de -20°C a 100°C . En una realización más preferida, la adición de la etapa b) se realiza a una temperatura de 0°C a 30°C .

En una realización preferida, la base utilizada en la etapa c) se selecciona de la lista que comprende hidróxido sódico e hidróxido potásico.

En otra realización preferida, el pH obtenido en la etapa c) varía entre 4,0 y 7,0.

En otra realización preferida, la temperatura en la etapa d) tiene un valor de entre 0°C a 200°C . En una realización más preferida, la temperatura en la etapa d) tiene un valor de entre 0°C a 30°C .

En otra realización preferida, el burbujeo con el gas inerte de la etapa d) se lleva a cabo entre 15 y 30 minutos.

En otra realización preferida, el gas inerte de la etapa d) se selecciona de la lista que comprende helio, neón, argón, kriptón, xenón y nitrógeno.

En otra realización preferida, la disolución de selenosulfato de la etapa e) se obtiene a partir de selenio en polvo y sulfito sódico.

En otra realización preferida, la disolución de selenosulfato de la etapa e) se prepara a una temperatura de 20°C a 200°C . En una realización más preferida, la disolución de selenosulfato de la etapa e) se prepara a una temperatura de 50°C a 100°C .

En otra realización preferida, la preparación de la disolución de selenosulfato de la etapa e) se lleva a cabo entre 1 y 24 horas. En una realización más preferida, la preparación de la disolución de selenosulfato de la etapa e) se lleva a cabo entre 3 y 12 horas.

En otra realización preferida, la concentración de la disolución de selenosulfato de la etapa e) tiene un valor de entre 0,01 y 1 M.

En otra realización preferida, la adición de la etapa e) se lleva a cabo en menos de 10 minutos.

En otra realización preferida, las concentraciones analíticas finales de los iones $[Cd^{2+}]$ y $[Se^{2-}]$ de las nanopartículas en disolución tienen una relación molar de entre 0,5 y 20. En una realización más preferida, las concentraciones analíticas finales de los iones $[Cd^{2+}]$ y $[Se^{2-}]$ de las nanopartículas en disolución tienen una relación molar de entre 1 y 10.

En una realización preferida, las concentraciones analíticas finales de los iones $[Cd^{2+}]$ de las nanopartículas en disolución y el mercaptoácido [MA] tienen unas relaciones molares de entre 0,5 y 5. En una realización más preferida, las concentraciones analíticas finales de los iones $[Cd^{2+}]$ de las nanopartículas en disolución y el mercaptoácido [MA] tienen unas relaciones molares de entre 1 y 2.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a unos QDs que comprenden agregados de nanocristales de CdSe obtenibles por el procedimiento según descrito anteriormente, caracterizados por tener una nanocorteza que comprende un compuesto de Cd^{2+} e hidróxido.

En una realización preferida, el compuesto de Cd^{2+} es un complejo hidroxilado de Cd^{2+} de fórmula general $Cd(OH)_{n-2}$, donde $4 \leq n \leq 1$. En una realización más preferida, el complejo hidroxilado de Cd^{2+} es $Cd(OH)_2$.

En otra realización preferida, los QDs tienen un diámetro medio de entre 0,5 nm y 10 nm. En una realización más preferida, los QDs tienen un diámetro medio de entre 1 nm y 7 nm.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de los QDs descritos anteriormente para marcaje biológico.

El procedimiento para obtener nanopartículas de CdSe de la presente invención transcurre en medio acuoso, lo que solventa una de las incomodidades de la obtención en medio orgánico, su etapa posterior de solubilización en medio acuoso que a veces altera no sólo su tamaño, sino también sus propiedades luminiscentes.

En las condiciones de realización del procedimiento descritas en los ejemplos, una fracción de Cd^{2+} se encuentra complejado con el mercaptoácido. Alcanzada la temperatura de termostatación se adiciona el contraión del Cd^{2+} en forma de $SeSO_3^{2-}$. Esta adición tiene que ser lenta y con agitación constante para evitar sobresaturaciones locales y formación no controlada de núcleos cristalinos. Tras la adición de $SeSO_3^{2-}$ el pH final se encuentra entre 4 y 7.

Tras la adición de $SeSO_3^{2-}$ la velocidad de nucleación conduce a la formación de un número de núcleos constante, que se mantiene posteriormente, y siguen creciendo según el modelo de Oswald formando nanocristales que lentamente crecen con el tiempo y por lo tanto es muy fácil aislarlos por precipitación con una cetona, a diferencia de lo que ocurre en los métodos de obtención en medio orgánico que antes de su separación de la disolución es necesario esperar a que la disolución se enfríe hasta temperatura ambiente, lo que afecta a la selección del tamaño.

La velocidad de crecimiento de los nanocristales cuánticos es tan lenta por estar controlada cinéticamente por la temperatura tan baja que controla la hidrólisis del $SeSO_3^{2-}$ para generar Se^{2-} , de forma que puede afirmarse en gran medida que se trata de una generación in situ y en fase homogénea de una de las especies formadoras del nanocristal: Se^{2-} .

En las condiciones experimentales óptimas, los QDs de CdSe mantenidos en la propia disolución de obtención, aunque creciendo de tamaño ligeramente, permanecen dispersos durante más de cuatro meses, si bien transcurrido un tiempo superior se van aglomerando ó ensamblando formando un conjunto de nanocristales que pueden alcanzar el tamaño coloidal o incluso superarlo, depositándose como sólido amarillo en el fondo del recipiente.

Los estudios de difracción de Rayos X y las micrografías obtenidas por TEM, muestran que incluso en las condiciones coloidales y de sólido depositado lo que se obtiene es un conjunto encadenado de nanocristales de CdSe. Este hecho confirma la posibilidad de poder ensamblar este conjunto de nanocristales de CdSe sobre una membrana adecuada, simplemente por evaporación del disolvente, para la construcción de un sensor.

Una característica fundamental de los QDs de CdSe son sus propiedades luminiscentes, características de un semiconductor. Tras el registro a diferentes instantes de su proceso de crecimiento y en diferentes condiciones experimentales, se han registrado los espectros de excitación y emisión, obteniéndose las siguientes conclusiones: tanto la λ_{exc} óptima como la λ_{em} óptima son dependientes del tamaño, más la segunda que la primera, por lo que es posible obtener, manejando el tiempo de obtención en la misma experiencia, QDs que emiten desde tonalidad verde-azulada hasta roja, pasando por el verde, amarillo y naranja, y fijando si es necesario la misma longitud de onda de excitación.

Escogiendo las condiciones experimentales adecuadas, es posible obtener en medio acuoso QDs de CdSe que a partir del día 20 (hasta el 37) muestran una fluorescencia elevada, aspecto importante para su aplicación.

5 Es una consecuencia de que la eficacia cuántica de los QDs de CdSe obtenidos en medio acuoso es elevada, (debido a la nanocorteza de Cd(OH)₂), alcanzándose valores del 60 %.

10 La distribución de tamaños de las nanopartículas alrededor del diámetro medio, medida a partir de los espectros de emisión de fluorescencia es ligeramente mayor en el caso de obtención de nanopartículas de CdSe en medio acuoso ($\Delta \approx$ entre 90 y 110 nm) que los métodos orgánicos ($\Delta \approx$ entre 30 y 60 nm, ver Kui Yu, Badruz Zaman, Remon Taal, John A. Ripmeester. Colloidal CdSe nanocrystals from tri-n-octylphosphine with various Cd sources: Control of a slow growth for high-quality and large-scale production. Journal of Crystal Growth 283 (2005) 115–123).

15 Se entiende por “**quantum dots**” (QDs) nanopartículas (NPs) semiconductoras, caracterizados por tener un diámetro de entre 2 y 10 nm, que exhiben unas propiedades ópticas y electrónicas únicas, basadas en el fuerte confinamiento de los electrones excitados en sus estructuras. Por ello, estos puntos cuánticos son conocidos como transistores de un sólo electrón.

El término “**nanopartícula**” (NP) en la presente invención se refiere a aquella partícula cuyo tamaño es nanométrico, con, por lo menos, una dimensión menor que 100 nm.

20 La invención recoge un procedimiento de fácil obtención de QDs de CdSe con un rendimiento cuántico alto. La síntesis de QDs de CdSe se lleva a cabo en medio acuoso, en fase homogénea, y se realiza a baja temperatura.

25 El término “**rendimiento cuántico**” (QY) de un determinado proceso se refiere a la fracción del total de moléculas excitadas que sufren ese proceso. Así, por ejemplo, el QY de fluorescencia ($\Phi_{\text{fluorescencia}}$) de una sustancia viene dado por:

$$\Phi_{\text{fluorescencia}} = \frac{n^{\circ} \text{moléculas que emiten fluorescencia}}{n^{\circ} \text{moléculas excitadas}}$$

30 Se entiende por “**sistema homogéneo**” aquel sistema que está formado por una sola fase, es decir, que tiene igual valor de propiedades intensivas en todos sus puntos.

35 Además, la síntesis permite controlar la formación de los núcleos de los QDs y su crecimiento, de modo que se pueden optimizar las propiedades ópticas y electrónicas y los tamaños de los mismos en función de la aplicación deseada.

El término “**nanocrystal**” en la presente invención se refiere a aquel cristal cuyo tamaño es nanométrico, con, por lo menos, una dimensión menor que 100 nm.

40 Se entiende por “**marcador biológico**” en la invención como cualquier compuesto que proporciona, al sistema donde se expresa, características identificables visualmente, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, fluorescencia o luminiscencia.

45 La estabilidad de los QDs de CdSe obtenidos en solución acuosa por el procedimiento descrito en la presente invención es extraordinaria, la estabilidad de tamaño en el tiempo y la estabilidad en disolución alcanzan valores no descritos hasta la actualidad, superiores a los tres meses.

50 Los QY de fluorescencia y luminiscencia logrados para los QDs obtenidos mediante el procedimiento descrito en la presente invención son muy altos, duraderos (estables en el tiempo) y estables tanto en atmósferas ricas en oxígeno como a distintos pHs. Estas características se pueden modular controlando el tamaño y la relación de tamaños QD de CdSe/nanocorteza Cd(OH)₂ que se forma al finalizar el procedimiento descrito en la presente invención.

55 Los QDs obtenidos en solución acuosa, controlando el tamaño y las propiedades ópticas (fluorescencia y absorción), encuentran aplicación como marcadores biológicos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en

parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

5

Figura 1. Fenómenos observados en el proceso de obtención de nanopartículas de CdSe. MAA: ácido mercaptoacético

Figura 2. Obtención de los valores de λ_e para el cálculo de λ . t: tiempo; A: absorbancia.

10

Figura 3. Espectros de absorción de disoluciones conteniendo sólo SeSO_3^{2-} (a) ó también nanopartículas de CdSe (b). $[\text{SeSO}_3^{2-}] = 1,58 \times 10^{-3} \text{ M}$; pH= 9,90.

15

Figura 4. Comportamiento luminiscente de las nanopartículas de CdSe a los 8 minutos. a) Multiespectro. b) Espectro de excitación. c) Espectro de emisión. Rendijas de 3 nm ($R = 3 \text{ nm}$); A-V: Fluorescencia Amarillo-Verdosa.

20

Figura 5. Obtención de nanopartículas de CdSe altamente estables en el tiempo. Evolución de los espectros de absorción. $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{Se}^{2-}]_F = 1,79$; $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{MAA}]_F = 1,77$; pH inicial 4,6; $T^a = 4^\circ\text{C}$; $[\text{Cd}^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3} \text{ M}$. t: tiempo, expresado en minutos, horas o días. El color de la disolución, amarillo de diferente intensidad, se muestra como fondo sombreado de los espectros.

25

Figura 6. Obtención de nanopartículas de CdSe altamente estables en el tiempo. Evolución del tamaño medio. $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{Se}^{2-}]_F = 1,79$; $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{MAA}]_F = 1,77$; pH inicial 4,6; $T^a = 4^\circ\text{C}$; $[\text{Cd}^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3} \text{ M}$.

30

Figura 7. Obtención de nanopartículas de CdSe altamente estables con el tiempo. Evolución del espectro de excitación. $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{Se}^{2-}]_F = 1,79$; $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{MAA}]_F = 1,77$; pH inicial= 4,6; $T = 4^\circ\text{C}$; $[\text{Cd}^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3} \text{ M}$.

35

Figura 8. Obtención de nanopartículas de CdSe altamente estables con el tiempo. Evolución del valor de I_F de las NPs. $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{Se}^{2-}]_F = 1,79$; $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{MAA}]_F = 1,77$; pH inicial= 4,6; $T = 4^\circ\text{C}$; $[\text{Cd}^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3} \text{ M}$.

40

Figura 9. Obtención de nanopartículas de CdSe altamente fluorescentes. Evolución de los espectros de absorción. $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{Se}^{2-}]_F = 3,74$; $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{MAA}]_F = 1,77$; pH inicial= 4,6; $T^a = 4^\circ\text{C}$; $[\text{Cd}^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3} \text{ M}$. T: turbidez. El color que adquiere la disolución, amarillo de diferente intensidad, se muestra como fondo sombreado de los espectros.

45

Figura 10. Obtención de nanopartículas de CdSe altamente fluorescentes. Evolución del espectro de excitación con el tiempo. $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{Se}^{2-}]_F = 3,74$; $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{MAA}]_F = 1,77$; pH inicial= 4,6; $T^a = 4^\circ\text{C}$; $[\text{Cd}^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3} \text{ M}$.

50

Figura 11. Obtención de nanopartículas de CdSe altamente fluorescentes. Evolución del valor de I_F con el tiempo. $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{Se}^{2-}]_F = 3,74$; $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{MAA}]_F = 1,77$; pH inicial= 4,6; $T^a = 4^\circ\text{C}$; $[\text{Cd}^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3} \text{ M}$.

55

Figura 12. Obtención de nanopartículas de CdSe de tamaño lo más pequeño posible. Evolución de los espectros de absorción con el tiempo. $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{Se}^{2-}]_F = 5,60$; $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{MAA}]_F = 1,77$; pH inicial= 4,6; $T^a = 4^\circ\text{C}$; $[\text{Cd}^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{SeSO}_3^{2-}]_F = 0,71 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{MAA}]_F = 2,2 \times 10^{-3} \text{ M}$. T: Turbidez. El color que adquiere la disolución se muestra como fondo de los espectros.

60

Figura 13. Obtención de nanopartículas de CdSe de tamaño lo más pequeño posible. Evolución del diámetro medio con el tiempo. $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{Se}^{2-}]_F = 5,60$; $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{MAA}]_F = 1,77$; pH inicial= 4,6; $T^a = 4^\circ\text{C}$; $[\text{Cd}^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3} \text{ M}$.

65

Figura 14. Obtención de nanopartículas de CdSe de tamaño lo más pequeño posible. Evolución del espectro de excitación con el tiempo. $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{Se}^{2-}]_F = 5,60$; $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{MAA}]_F = 1,77$; pH inicial= 4,6; $T^a = 4^\circ\text{C}$; $[\text{Cd}^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3} \text{ M}$.

70

Figura 15. Obtención de nanopartículas de CdSe de tamaño lo más pequeño posible. Evolución del valor de I_F con el tiempo. $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{Se}^{2-}]_F = 5,60$; $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{MAA}]_F = 1,77$; pH inicial= 4,6; $T^a = 4^\circ\text{C}$; $[\text{Cd}^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3} \text{ M}$.

75

Figura 16. Reproducibilidad del método de obtención de nanopartículas de CdSe en fase acuosa. Evolución de los espectros de absorción. $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{Se}^{2-}]_F = 1,25$; $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{MAA}]_F = 1,77$. pH inicial : 4,58; T^a : 4°C . El color que adquiere la disolución se muestra como fondo de los espectros.

Figura 17. Reproducibilidad del método de obtención de nanopartículas de CdSe en fase acuosa. Evolución de los espectros de excitación. $[Cd^{2+}]_F/[Se^{2-}]_F = 1,25$; $[Cd^{2+}]_F/[MAA]_F = 1,77$. R=3 nm.

Figura 18. Reproducibilidad del método de obtención de nanopartículas de CdSe en fase acuosa. Evolución de los espectros de emisión. $[Cd^{2+}]_F/[Se^{2-}]_F = 1,25$; $[Cd^{2+}]_F/[MAA]_F = 1,77$. A: Fluorescencia Amarilla

Figura 19. Estabilidad de las nanopartículas de CdSe en medios ricos en oxígeno. Paso de aire durante 30 minutos sobre una alícuota de la disolución B a los 47 días de su síntesis. a-1) Espectros de absorción y emisión antes del borboteo de aire. a-2) Espectros de absorción y emisión después del borboteo de aire. El color de la disolución se muestra como fondo de los espectros de absorción. R=3nm. A: Fluorescencia Amarilla.

Figura 20. Estabilidad de las nanopartículas de CdSe en medios ricos en oxígeno. Paso de aire durante 1 hora sobre una alícuota de la disolución B a los 48 días de su síntesis. b-1) Espectros de absorción y emisión antes del borboteo de aire. b-2) Espectros de absorción y emisión después del borboteo de aire. El color de la disolución se muestra como fondo de los espectros de absorción. R=3nm. A: Fluorescencia Amarilla.

Figura 21. Estabilidad de las nanopartículas de CdSe a pHs diferentes a los de su conservación (pH=8,7). Espectros de absorción de las disoluciones finales a diferentes valores de pH. El color que adquiere la disolución se muestra como fondo de los espectros.

Figura 22. Estabilidad de las nanopartículas de CdSe a pHs diferentes a los de su conservación (pH=8,7). Espectros de emisión de las disoluciones finales a diferentes valores de pH. A: Fluorescencia Amarilla.

Figura 23. Estabilidad de las nanopartículas de CdSe a pHs diferentes a los de su conservación (pH=8,7). Valores de I_F de las disoluciones finales a diferentes valores de pH.

Figura 24. Difractograma de Rayos X de las nanopartículas de CdSe (porta de vidrio). a) Nanopartículas altamente estables. b) Nanopartículas altamente fluorescentes. c) Nanopartículas de tamaño lo más pequeño posible.

EJEMPLOS:

1. PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS DE QDs DE CdSe EN MEDIO ACUOSO

Reactivos y disoluciones

Todos los reactivos químicos usados son de grado analítico y se preparan con agua desionizada de alta calidad. Disoluciones de cloruro de cadmio, preparadas por pesada directa de $CdCl_2$, anhidro, 99% (Acros Organics) y disolución en agua. Disoluciones acuosas de sulfito sódico anhidro, Na_2SO_3 , (Acros Organics) de diferentes concentraciones, preparadas en el momento de su utilización. Selenio (Se) en polvo (Aldrich), 99,99% de contenido metálico. Disolución de hidróxido sódico 1 M, NaOH (Scharlau). Disolución 10^{-5} M de sulfato de quinina (Acros Organics), preparada por pesada directa y disolución en 0,5 M H_2SO_4 . Soluciones tampón de pH= 4,00 y pH= 7,00 (Scharlau)

Instrumentación

Los espectros de fluorescencia se miden utilizando un Espectrofluorómetro Shimadzu modelo RF-5000, equipado con una unidad de control Modelo DR-15 y una lámpara de xenón de 150W como fuente de luz. Las medidas de absorción de las muestras se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Shimadzu UV/Vis-160. Los valores de pH de las disoluciones se midieron con un pHmetro Crison 501. La toma de imágenes por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) se llevó a cabo con un dispositivo ZEISS EM-900. Para los estudios de Rayos X (XRD) se ha utilizado un difractómetro para muestras en polvo Siemens D500, dotado con un filtro de níquel y monocromador de grafito, lo que le da una eficacia para la radiación Cu-K α , ($\lambda = 154,050$ pm) superior al 90%. Se dispone también de un sistema DIFRACC AT para control y adquisición de datos, con microprocesador DACO MP, e impresora gráfica con software específicamente desarrollado para el tratamiento de los datos de difracción de Rayos X. El voltaje empleado fue de 40 kV y la intensidad de 30 mA, lo que supone una potencia total de 1200 vatios. El índice de refracción de las muestras fue determinado con un refractómetro Abbé. Se utilizó agitador termostatado IKA RCT basic, estufa Heraeus y balanza electrónica ER-182.

Preparación de disoluciones de selenosulfato sódico y determinación de su concentración.

Como fuente de iones Se^{2-} se utilizan disoluciones de selenosulfato (SeSO_3^{2-}) preparadas a partir de selenio en polvo y disolución de sulfito sódico (Na_2SO_3), de acuerdo al procedimiento siguiente:

Sobre 100 mL de H_2O , previamente desoxigenada se añaden 2,5 g de Na_2SO_3 hasta su disolución total, posteriormente se agregan del orden de 0,4 g de Se metálico en polvo y se deja transcurrir la reacción a 80°C , en recipiente cerrado, durante toda una noche ($\approx 10\text{h}$). Transcurrido dicho tiempo y una vez que la disolución alcanza la temperatura ambiente, se filtra, a través de papel o placa filtrante, y se obtiene la disolución madre de trabajo de color rojizo.

Las concentraciones iniciales de SO_3^{2-} y selenio se encuentran en relación 4:1, pero no reacciona todo el Se en polvo, razón por la que es necesario filtrar.

La concentración final de la disolución de SeSO_3^{2-} se determina gravimétricamente. El método se basa en el hecho químico por el cual las sales de selenio en medio ácido ($\text{pH} < 2$), se descomponen precipitando Se metálico hidratado.

Se toma una alícuota de 10 mL de la disolución madre de SeSO_3^{2-} , se le añaden 2-3 mL de H_2SO_4 1 M con lo que, con la ayuda de agitación, precipita selenio metálico coposo, que es filtrado sobre placa filtrante del n° 3 y desecado en estufa a 120°C , hasta peso constante.

A partir del peso de Se obtenido se determina la concentración de SeSO_3^{2-} , que en la primera de las disoluciones obtenidas fue de $(0,0426 \pm 0,0001)$ M, lo que supone un rendimiento, a partir del Se inicialmente puesto del 85,4%.

La estabilidad de las disoluciones de SeSO_3^{2-} es periódicamente contrastada mediante el método gravimétrico antes comentado, comprobándose que al menos durante un mes su concentración permanece inalterada. Transcurrido este tiempo, se observa la aparición de un precipitado de color muy oscuro que se puede atribuir a Se metálico aunque no puede descartarse un posible sulfuro.

En las experiencias realizadas a lo largo del trabajo, cuando la disolución de SeSO_3^{2-} de que se dispone alcanza el mes de vida, se prepara otra nueva y se determina su concentración.

Procedimiento general para la obtención de QDs de CdSe en medio acuoso.

El procedimiento general para la obtención de nanopartículas de CdSe en medio acuoso, sin especificar los valores de las variables fijados en cada estudio experimental, ha seguido siempre los mismos pasos:

Se parte de 100 mL de disolución acuosa que contiene el ión Cd^{2+} en concentración conocida, tomando alícuotas de la disolución madre ($5,0 \times 10^{-2}$) M y enrasando con agua bidestilada hasta el volumen final. Esta disolución inicial es trasvasada a un erlenmeyer topacio, para evitar procesos de fotosensibilización.

Con agitación, se añaden con micropipeta los microlitros necesarios de disolución de ácido mercaptoacético 1,41 M para alcanzar la concentración deseada. En este momento el pH de la disolución es del orden de 2,8-3,0 (dependiendo de la concentración añadida de ácido mercaptoacético: $K_1=2,1 \times 10^{-4}$) y siempre en presencia de Cd^{2+} , aparece una turbidez blanca de naturaleza coloidal, que puede atribuirse a la formación de mercaptoacetato de cadmio moderadamente insoluble.

A continuación se ajusta el pH al valor deseado con disolución de NaOH 1 M. La turbidez blanquecina desaparece.

Quando se vaya a trabajar a temperatura diferente a la del ambiente, es en este momento cuando por calentamiento controlado se ajusta dicha variable. Las temperaturas inferiores se alcanzan introduciendo el erlenmeyer con la disolución en un baño de hielo (4°C) y se mantiene mientras dure el procedimiento. A la vez que se alcanza la temperatura de trabajo se burbujea N_2 en la disolución para evitar la oxidación del ácido mercaptoacético así como la posible formación posterior de CdO sobre la nanopartícula.

Alcanzada la temperatura de trabajo y siempre burbujeando N_2 , se añade muy lentamente y con agitación la cantidad deseada de SeSO_3^{2-} para controlar la concentración de Se^{2-} en disolución. Es necesario añadir en estas condiciones el SeSO_3^{2-} para evitar al máximo las sobresaturaciones locales. El tiempo de adición del reactivo oscila entre 8 y 10 minutos. Cuando se acaba de añadir el SeSO_3^{2-} , se anota la hora y se considera en este momento el tiempo $t = 0$, como tiempo de partida para los estudios cinéticos. La disolución madre de SeSO_3^{2-} tiene un pH próximo a 10 por lo que al añadir una alícuota sobre la

disolución anterior que contiene Cd^{2+} y MAA se modifica el pH de la misma, razón por la cual se mide de nuevo. Dependiendo de las condiciones experimentales, en este momento la disolución es incolora o amarilla, transparente o turbia debida a la formación de nanopartículas de diferente tamaño.

5 Terminado el proceso de obtención de las nanopartículas de CdSe ($t = 0$) y manteniendo la temperatura inicialmente fijada durante al menos 12 horas, se registran periódicamente los espectros de absorción, de excitación y de emisión de fluorescencia.

En la Figura 1 se han plasmado los diferentes pasos del procedimiento.

10

Descripción de los fenómenos observados durante el proceso de obtención de QDs y explicación de los mismos.

15

La disolución inicial de Cd^{2+} de color rosa pálido (Fig. 1) presenta una ligera turbidez blanquecina al añadir sobre ésta el MAA a la vez que adquiere un pH de 2,9 ($K_a = 2,1 \times 10^{-4} \text{ M}$). Dado que dicho ácido es soluble en agua, la turbidez hay que atribuirla a la formación de un compuesto insoluble entre Cd^{2+} y la especie ácida pues desaparece instantáneamente al ajustar el pH a 11, donde predomina la forma básica, quedando la disolución incolora.

20

Desde un punto de vista de los equilibrios ácido-base, para estas concentraciones de Cd^{2+} ($1,94 \times 10^{-3} \text{ M}$) y a este valor de $\text{pH} = 11$, este catión debería de estar precipitado como $\downarrow \text{Cd}(\text{OH})_2$. El hecho de no observar este proceso indica que el Cd^{2+} se encuentra formando un compuesto covalente poco disociado por enlace con el átomo de azufre del mercaptoacetato ($\text{HSCH}_2\text{-COO}^-$). Como la relación molar Cd/MAA es superior a la unidad, el cadmio no enlazado se encontrará en disolución en forma de los diferentes hidroxocomplejos posibles.

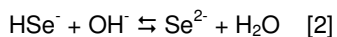
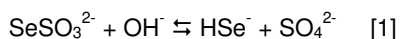
25

30

Tras el burbujeo con N_2 al añadir, en estas condiciones experimentales, la disolución de SeSO_3^{2-} aparece una nueva turbidez pero distinta a la primera, ahora de tonalidad gris oscura, siendo la disolución incolora. Esta turbidez desaparece con el tiempo, en las condiciones experimentales actuales, pasados los 95 minutos.

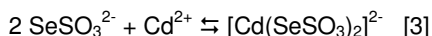
El selenosulfato en medio básico, en presencia de iones hidroxilo OH^- se descompone hasta Se^{2-} en dos etapas:

35



40

Si bien parece ser que la formación de nanopartículas puede también transcurrir a través de la formación previa de un complejo entre Cd^{2+} y selenosulfato:



45

La turbidez grisáceo-oscuro que se observa inicialmente puede atribuirse a la formación de una especie intermedia insoluble $(\text{HSe})_2\text{Cd}$ o bien CdSeSO_3 .

50

Con el tiempo, la turbidez desaparece y la disolución remanente comienza a amarillear, al principio con tonalidad suave que posteriormente se intensifica. La coloración amarilla como veremos posteriormente se debe a la presencia de nanopartículas de CdSe y la intensificación del color amarillo se debe a la evolución del tamaño de las mismas, lo que indica que en las condiciones experimentales actuales y a pesar de la sobresaturación, predomina la velocidad de nucleación sobre la velocidad de crecimiento.

55

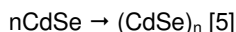
El aporte de iones Se^{2-} para la formación de nanopartículas de CdSe puede provenir de las reacciones [1] y [2] o de la posterior hidrólisis, en medio básico del complejo formado en la reacción [4]:



60

Sea por un camino u otro, o por ambos, el hecho es que el proceso de formación de nanopartículas está controlado por un proceso químico de cinética lenta similar a los procesos de precipitación en fase homogénea.

Los monómeros de CdSe se agruparían, posteriormente para formar el nanocristal $(\text{CdSe})_n$:



La disolución turbia que se forma inicialmente al añadir el SeSO_3^{2-} , desaparece con el tiempo, a la vez que se forman las nanopartículas de CdSe que en presencia del dispersante, MAA, y debido a su tamaño nano, generan disoluciones transparentes.

El anión mercaptoacético se enlaza a los iones Cd^{2+} de la superficie de las nanopartículas a través del grupo que contiene el átomo de azufre, quedando el conjunto cargado negativamente a través del grupo acetato, lo que hace que las NPs se mantengan dispersas en la disolución, se impida su reagrupamiento y se minimice su crecimiento. En realidad la presencia de mercaptoacetato inhibe considerablemente el crecimiento de las nanopartículas de CdSe dejándolas en el tamaño nano. No se puede obviar que puede afectar también a la velocidad de nucleación.

Este dispersante, entre otros grupos mercaptoácidos y otras agrupaciones orgánicas e inorgánicas, fue escogido para los estudios experimentales por obtener con él los mejores resultados.

Espectros de Absorción

- Cálculo del diámetro de los QDs

Es posible obtener el valor medio del diámetro de las nanopartículas aplicando la ecuación deducida por HENGLEIN, que lo relaciona con la longitud de onda extrapolada, λ_e , y obtenida en el corte entre la tangente a la curva de absorción en la parte ascendente y claramente diferenciada del valor cero de absorbancia y la línea base:

$$2\bar{R} = d = \frac{0.1}{(0.138 - 0.0002345 \cdot \lambda_e)} \text{ [6]}$$

En la Figura 2 podemos observar el procedimiento seguido. La obtención del valor de λ_e es sencilla para tiempos superiores a los 95 minutos (Fig. 2b) en los que en la disolución no hay turbidez y por encima de los 500 nm la línea base coincide con $A = 0$, pero para tiempos inferiores la turbidez altera la línea base por lo que el valor de λ_e se obtiene a partir del corte entre la línea tangente de la parte ascendente del espectro y la línea base constante trazada por el valor de absorbancia a 600 nm como puede observarse en la Figura 2a.

- Cálculo de la concentración de QDs C_{CdSe}

Existe un procedimiento para calcular la concentración de nanopartículas a partir de los datos del espectro de absorción. Consiste en obtener datos en la zona de longitudes donde las nanopartículas no absorben radiación para sus procesos excitónicos y sólo se comportan como los coloides, dispersando la radiación en función de su tamaño. En esa zona del espectro el coeficiente de absorptividad molar de las nanopartículas, ϵ_{CdSe} , es independiente de su tamaño.

Se ha podido comprobar que la inflexión o pico de absorción que corresponde a los procesos excitónicos, salvo en el espectro inicial correspondiente a $t = 0$, aparecen a longitudes de onda superiores a los 350 nm (Fig. 3b). Por otra parte, el espectro correspondiente al SeSO_3^{2-} muestra que incluso para disoluciones concentradas solo comienza a dar valores de absorbancia diferentes a cero para longitudes de onda menores a 340 nm (Fig. 3a). Por esta razón se ha escogido el valor de $\lambda = 350$ nm para la medida de la absorbancia correspondiente sólo al proceso de dispersión de radiación (Efecto Tyndall). La concentración de partículas coloidales y por tanto de nanopartículas puede ser determinada midiendo la absorbancia de radiación a 350 nm (o longitudes de onda inferiores) como medida indirecta de la luz dispersada mediante una relación entre ambas variables que es dependiente del tamaño.

Dicha relación, deducida empíricamente y relacionada con la expresión de Rayleigh (intensidad de luz dispersada por partículas coloidales con diámetro menor a la λ de luz incidente), para 350 nm es:

$$C_{\text{CdSe}} = \frac{A_{350}}{1.438 \times 10^{22} \cdot (2R)^2} \text{ [9]}$$

donde C_{CdSe} es la concentración de nanopartículas, en moles de estas por unidad de volumen L^{-1} ; A_{350} es el valor de absorbancia medido a 350 nm y R es el radio de la nanopartícula considerando que tiene forma esférica.

- 5 • Cálculo del número de moléculas por QD

Si consideramos que las nanopartículas de CdSe tienen forma esférica es posible calcular, teniendo en cuenta su diámetro, el número de moléculas de CdSe que constituyen en cada instante los nanocristales:

$$N_{CdSe} = \frac{4\pi R^3}{3} \cdot \frac{\rho_{CdSe} \cdot N_0}{M_{CdSe}} \quad [10]$$

- 10 donde N_{CdSe} es el número de moléculas de CdSe en cada nanopartícula; R es el radio de las mismas en centímetros; ρ_{CdSe} es la densidad del CdSe en $g \cdot cm^{-3}$; N_0 es la constante ó número de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$) y M el peso de la molécula de CdSe ($191,36 g \cdot mol^{-1}$).

Multiplicando las expresiones [9] y [10] es posible obtener una ecuación para calcular la concentración molar de CdSe formando parte de las nanopartículas:

$$15 \quad C_{CdSe} \quad N_{CdSe} = [CdSe] = \frac{A_{350}}{1.438 \times 10^4 \cdot R^2} \cdot \frac{4\pi R^3}{3} \cdot \frac{\rho_{CdSe} \cdot N_0}{M_{CdSe}} = 0,667 \times 10^{-4} M \quad A_{350} \quad [11]$$

Espectro de Luminiscencia

- 20 • Cálculo de la distribución de tamaño de los QDs alrededor del diámetro medio

Un aspecto importante de las nanopartículas es su comportamiento luminiscente. Para su estudio una vez terminada la adición de Na_2SeSO_3 , se toman alícuotas que se introducen en la cubeta del espectrofluorímetro.

- 25 En primer lugar en todos los casos, se realiza un barrido de emisión para cinco longitudes de onda de excitación (Fig. 4-a) con lo que se selecciona de manera aproximada la longitud de onda de emisión óptima.

- 30 Conocida esta longitud de onda de emisión, se fija y registra el espectro de excitación (Fig. 4-b) para conocer la longitud de onda óptima de excitación. Conocida ésta, que en el presente estudio es 395 nm, se registra con esta longitud de onda de excitación el espectro de emisión (Fig. 4-c) a partir del cual se selecciona la longitud de onda óptima de emisión (en este caso 476,8 nm).

- 35 La forma del espectro de excitación nos aporta información sobre la modificación de la superficie de las nanopartículas y si ésta cambia en el proceso de evolución. El espectro de emisión nos aporta como información la intensidad de emisión de fluorescencia de la nanopartícula, así como la distribución de tamaño de las nanopartículas alrededor del diámetro medio, Δ , midiendo en unidades de nm la anchura del espectro de emisión, Δ , justo a la mitad de la altura máxima del pico ($I_F/2$). En el caso presentado es de 108 nm, (cuanto mayor sea Δ mayor es la distribución de tamaños alrededor del diámetro medio)

- 40 En base a la medida de los parámetros anteriormente citados en las diferentes experiencias realizadas fueron comprobados los siguientes extremos:

- 45 El borboteo de N_2 sobre la disolución debe ser previo a la adición de $SeSO_3^{2-}$.

El hacerlo a la vez que se forman las nanopartículas de CdSe incrementa el tamaño de las mismas y por lo tanto disminuye su concentración en disolución y como consecuencia de ello la intensidad de emisión de fluorescencia.

La velocidad de adición de la disolución de SeSO_3^{2-} también afecta al tamaño de las nanopartículas incrementándolo cuanto mayor es esta velocidad.

5 Mantener la agitación después de terminar la adición de SeSO_3^{2-} , si bien no afecta de manera apreciable a la evolución del tamaño de las nanopartículas, sí lo hace modificando el estado y composición de su superficie afectando negativamente a sus propiedades luminiscentes.

10 La intensidad de emisión de fluorescencia, además de depender de la concentración de nanopartículas, C_{CdSe} , depende de un proceso que simultáneamente está ocurriendo en su superficie, bien formación de complejos hidroxilados de Cd^{2+} , bien formación de una película o nanocorteza de hidróxido de cadmio, o bien ambas, que afecta al rendimiento cuántico del proceso de luminiscencia.

15 El tamaño inicialmente pequeño de la nanocorteza, que parece crecer con el tiempo, beneficia al rendimiento cuántico de luminiscencia (crece la intensidad de fluorescencia); cuando el tamaño de la nanocorteza aumenta considerablemente afecta negativamente sobre el rendimiento cuántico (disminuye la intensidad de fluorescencia). Esto hace que exista un valor máximo de fluorescencia que se alcanza cuando el tamaño de la nanocorteza alcanza un valor concreto pero que está relacionado con el diámetro medio de las nanopartículas como lo demuestra el hecho de que el máximo de fluorescencia se alcanza más tarde en el tiempo cuanto mayor es el tamaño de las nanopartículas

20 La agitación afecta a la velocidad de formación del nanodepósito.

La intensidad de emisión de fluorescencia depende de la concentración de nanopartículas en disolución y de la relación diámetro o tamaño de la nanopartícula/tamaño de nanocorteza.

25 2. CONTROL DE LAS PROPIEDADES DE LOS QDs DE CdSe SINTETIZADOS EN MEDIO ACUOSO

Obtención de nanopartículas de CdSe altamente estables en la propia disolución en que se obtuvieron.

30 Se prepara una disolución acuosa a partir de 8 mL de CdCl_2 5×10^{-2} M que se diluyen con agua bidestilada hasta 100 mL. Se añaden a continuación 160 μL de disolución de ácido mercaptoacético, MAA, 1,41 M. El pH de la disolución se ajusta con NaOH hasta 4,6 y el erlenmeyer se coloca en un baño de hielo hasta que la disolución alcanza los 4 °C.

35 Llegado este momento y ya con agitación constante se burbujea corriente de N_2 durante 15 minutos y posteriormente durante otros 15 minutos se añaden 2,5 mL de disolución de SeSO_3^{2-} 0,0892 M. Terminado el proceso de obtención la disolución se guarda en frigorífico a 4 °C.

40 En estas condiciones las concentraciones analíticas finales son:

$$[\text{Cd}^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3} \text{ M}; \quad [\text{SeSO}_3^{2-}]_F = 2,2 \times 10^{-3} \text{ M}; \quad [\text{MAA}]_F = 2,2 \times 10^{-3} \text{ M};$$

45 y las relaciones molares resultan:

$$[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{Se}^{2-}]_F = 1,79 \quad [\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{MAA}]_F = 1,77$$

50 Se sacan periódicamente alícuotas, se espera a que se alcance la temperatura ambiente y se registran a continuación tanto los espectros de absorción como los de luminiscencia. En la Figura 5 se muestran algunos de los espectros de absorción registrados a lo largo del tiempo donde también se indican las características espectroscópicas que permiten obtener los datos deducidos y calculados mostrados en la Tabla 1.

55 **Tabla 1.** Obtención de nanopartículas de CdSe altamente estables en el tiempo. Datos medidos y deducidos a partir de los espectros de absorción. $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{Se}^{2-}]_F = 1,79$; $[\text{Cd}^{2+}]_F/[\text{MAA}]_F = 1,77$; pH inicial 4,6; $T^a = 4$ °C; $[\text{Cd}^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3}$ M.

t / min	λ / nm	R / nm	A ₃₅₀	$C_{\text{CdSe}} \times 10^{-6}$ M	N	$[\text{CdSe}] \times 10^{-4}$ M	λ_{max}	A _{max}	$\epsilon_{\text{CdSe}} \lambda_{\text{max}} \times 10^6$
0	2,1	1,05			89				
68	2,3	1,15	2,548	1,4	116	1,7	374,0	2,596	1,8
139	2,4	1,20	2,857	1,4	132	1,9	382,0	2,743	1,9

t / horas									
5,4	2,5	1,25	3,298	1,5	150	2,2	390,0	3,039	2,1
8,0	2,6	1,30	3,358	1,3	168	2,2	391,5	3,068	2,3
t / días									
1	2,7	1,35	3,598	1,3	189	2,4	406,5	3,215	2,5
6	2,9	1,45	4,551	1,3	234	3,0	413,0	3,263	2,7
29	3,1	1,55	4,648	1,1	285	3,1	414,5	3,283	3,2
75	3,1	1,55	4,794	1,2	285	3,2	414,5	3,293	3,2
92	3,1	1,55	4,653	1,1	285	3,1	415,0	3,283	3,2
114	3,2	1,60	4,267	0,9	314	2,8	419,0	3,263	3,6

$$* \epsilon_{\text{CdSe } \lambda_{\text{max}}} = \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$$

El dato que ahora interesa es la evolución del tamaño de las nanopartículas. Puede verse en dicha Figura 5 y en la Tabla 1 comentada, cómo el diámetro medio, $\bar{d}$, evoluciona desde 2,1 nm a t=0 hasta 2,9 nm a

los 6 días. Esta evolución tan lenta se debe fundamentalmente al control cinético de la velocidad de crecimiento por la hidrólisis lenta a 4 °C.

Este control de la velocidad de crecimiento hace que entre el día 6 y el día 29 las nanopartículas solo crezcan en 0,2 nm (Fig. 6), manteniéndose posteriormente en un tamaño medio constante de 3,1 nm hasta el día 103. Existe por lo tanto un periodo de más de 70 días en el cual las nanopartículas de Cd^{2+} mantienen un tamaño prácticamente constante. A partir del día 92 y más claramente desde el día 103 se observa la presencia de un pequeño precipitado de color amarillo, que si se homogeniza la disolución genera en el espectro un incremento del valor de la absorbancia en la línea base. Este fenómeno se debe al reagrupamiento de las nanopartículas para generar "agregados" insolubles, proceso que conduce a un incremento en el tamaño de las nanopartículas como paso intermedio.

Características luminiscentes

El espectro de excitación en los momentos iniciales de evolución (Fig. 7) corresponde a una nanopartícula pequeña 2,2 nm que presenta su λ_{exc} óptima a 386 nm con un pico de excitación prácticamente simétrico sin la presencia apreciable de hombros de excitación indicativos de procesos de contaminación superficial.

A este espectro de excitación le corresponde un espectro de emisión con una λ_{em} óptima a longitud de onda de 464 nm que corresponde a una luz emitida de color azul (morina) si bien las nanopartículas, en este instante, presentan una intensidad de emisión de fluorescencia relativamente baja (Fig. 8). La distribución de tamaños alrededor del $\bar{d}$ es de 94 nm.

A medida que evolucionan las nanopartículas con el tiempo incrementa muy ligeramente su tamaño aunque en mayor medida hasta el 6 ó 7 día razón por la cual la λ_{exc} lo hace desde 386 nm hasta 442 nm (Fig. 7 y Tabla 2). A partir del día 29 la λ_{exc} permanece prácticamente constante como corresponde a nanopartículas que mantienen su tamaño en 3,1 nm.

Quizás el dato más importante estriba en que el pequeño hombro que aparece visible a las 26 horas para longitudes de onda próximas a 350 nm, no aumenta con el tiempo, lo que indica que la nanocorteza de $\text{Cd}(\text{OH})_2$ depositada sobre la superficie, permanece prácticamente constante.

En la Tabla 2 se indican los valores de I_F y Δ , obtenidos a partir de los espectros de emisión de la disolución acuosa que contiene las nanopartículas, a medida que evolucionan con el tiempo. Los valores de I_F frente al tiempo se representan, para una mejor visualización, en la Figura 8.

Puede comprobarse como a partir del día 29, cuando las nanopartículas alcanzan el tamaño de 3,1 nm, se alcanza el valor máximo de la fluorescencia manteniéndose prácticamente constante aproximadamente hasta el día 90 que comienza ya a disminuir.

Es necesario hacer notar, que a pesar de no ser el objetivo, las nanopartículas de CdSe obtenidas en estas condiciones experimentales, además de su estabilidad en un amplio periodo de tiempo, tienen una fluorescencia relativamente alta ($R = 3$ nm) y perfectamente medible.

En cuanto a la distribución de tamaños alrededor del valor de λ (valor de Δ), éste se mantiene prácticamente constante.

Tabla 2. Obtención de nanopartículas de CdSe altamente estables con el tiempo. Valores de I_F y Δ obtenidos a partir del espectro de emisión. $[Cd^{2+}]_F/[Se^{2-}]_F = 1,79$; $[Cd^{2+}]_F/[MAA]_F = 1,77$; pH inicial= 4,6; T = 4 °C; $[Cd^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3}$ M.

t min	λ nm		I_F u.a.	Δ nm
	λ_{exc}	λ_{emi}		
8	385,0	464,0	73,40	94
138	406,0	486,0	136,35	96
t días				
1	435,0	514,0	209,60	96
7	442,0	517,0	283,32	93
13	442,0	517,0	303,80	94
29	443,0	517,0	365,24	92
34	445,0	515,0	402,11	93
42	445,0	517,0	389,82	94
69	445,0	518,0	395,62	94
94	445,0	518,0	328,17	96
115	448,0	522,0	209,60	96

Obtención de QDs de CdSe altamente fluorescentes.

Una de las posibles aplicaciones prácticas de las nanopartículas de CdSe se encuentra en los estudios in vivo como transportador de moléculas de interés bioquímico, en cuyo caso su eficacia tiene que ser seguida a través de sus características luminiscentes. Para estos casos, y para garantizar la sensibilidad de la medida, es interesante disponer de nanopartículas altamente fluorescentes.

En este caso, las nanopartículas de CdSe se obtendrían mediante el procedimiento descrito en 1 (experiencia anterior), con la única diferencia de que en este caso la concentración de $SeSO_3^{2-}$ añadida es diferente. Se añaden lentamente 1,2 mL de disolución de $SeSO_3^{2-}$ 0,0892 M con lo que la concentración de dicho reactivo es:

$[SeSO_3^{2-}]_F = 1,06 \times 10^{-3}$ M

como las concentraciones de $[Cd^{2+}]_F$ y $[MAA]_F$, se mantienen en los valores indicados en la experiencia 1, las relaciones molares son:

$[Cd^{2+}]_F/[Se^{2-}]_F = 3,74$; $[Cd^{2+}]_F/[MAA]_F = 1,77$

En la Figura 9 se muestran los espectros de absorción de la disolución original que contiene las nanopartículas de CdSe a medida que evoluciona con el tiempo. Al existir en disolución un exceso de Cd^{2+} (frente a Se) la velocidad de nucleación es mayor mientras que la velocidad de crecimiento es menor si se compara con la experiencia 1.

Como consecuencia, las nanopartículas tienen ya a $t=0$ un tamaño mucho menor (2,1 nm) y crecen con el tiempo mucho menos, de modo que a los 114 días su tamaño medio es 3,2 nm. Esto explica que los espectros de absorción y su evolución sean diferentes en esta experiencia (comparar con la Fig. 5).

Inicialmente el tamaño de las nanopartículas es tan pequeño que absorben a longitud de onda próximas al $SeSO_3^{2-}$ por lo que no se detecta ni máximo ni punto de inflexión hasta los 2 días.

Existe otra diferencia con la experiencia 1. A partir del día 42 se observa una ligera turbidez en la disolución que desde el día 63 es perfectamente visible en el fondo del recipiente en forma de sólido amarillo: son los agregados de nanopartículas, ya observados en otras experiencias, cuando se pierde capacidad dispersante.

El cálculo de concentraciones a partir del máximo correspondiente al proceso de transferencia electrónica en los niveles S conduce a partir de los datos del espectro del día 4, a valores de $C_{CdSe} = 1,2 \times 10^{-6}$ M y

[CdSe] = $1,4 \times 10^{-4}$ M, manteniéndose prácticamente constante hasta el día 42 en que ambos valores comienzan a disminuir por la formación paulatina de agregados que se separan de la disolución.

El objetivo de esta experiencia era obtener nanopartículas de CdSe lo más fluorescentes que fuera posible y con la mayor duración de dicha característica. Por esta razón vamos a centrar nuestros comentarios sobre las propiedades luminiscentes que muestran las nanopartículas obtenidas.

Como puede comprobarse en la Figura 10 y en la Tabla 3, los espectros y datos de excitación y emisión a tiempos iniciales son morfológicamente muy similares a los que mostraban las nanopartículas obtenidas en la experiencia 1 si bien al tener las actuales un tamaño ligeramente menor las longitudes de onda óptimas de excitación y emisión son más cortas; en el presente caso son $\lambda_{exc} = 370$ nm y $\lambda_{em} = 460$ nm.

En la Figura 10 se muestra la evolución del espectro de excitación de las nanopartículas, con el tiempo. Si se comparan dichos espectros con los obtenidos en la experiencia 1 (Fig.7 se encuentran diferencias de interés.

Al ser el tamaño de las nanopartículas menor en la presente experiencia el hombro que aparece debido al depósito de $Cd(OH)_2$ se junta al espectro de excitación propio de las nanopartículas, distorsionándolo. Por otra parte el hombro comentado tiene mayor altura en la presente experiencia que en la anterior, lo que indica que la cantidad de $Cd(OH)_2$ que forma parte de la nanocorteza es mayor por serlo la relación de $Cd^{2+}/SeSO_3^{2-}$ en disolución.

Además de la diferencia mencionada cabe destacar en el presente caso que el depósito de la nanocorteza llega a ser tan importante que altera a partir del día 51 el pico de excitación, lo que es más evidente a partir del día 56.

En cuanto a la intensidad del proceso de excitación en general es mayor que en la experiencia 1; aumenta inicialmente con el tiempo hasta alcanzar un valor máximo alrededor del día 10 (tanto que supera el máximo de la escala con $R = 3$ nm) que se mantiene elevado, aproximadamente hasta el día 37 y disminuye posteriormente.

Un reflejo del comportamiento en el proceso de excitación es el comportamiento de las nanopartículas de CdSe en cuanto a la emisión de luz fluorescente.

En la Tabla 3 se muestran los datos de emisión de las nanopartículas de CdSe a lo largo del tiempo de evolución. Como puede observarse una vez más, a medida que se incrementa el tamaño de las nanopartículas de CdSe existe un desplazamiento batocrómico en la λ_{exc} así como en la λ_{em} , pasando la luz emitida desde el verde a tiempos iniciales hasta el amarillo a los 99 días.

En relación con el valor de I_F (intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión) inicialmente aumenta a medida que lo hace el tamaño de las nanopartículas (Tabla 3) de modo que a partir del día 10 éste se mantiene entre 2,40 y 2,45 nm y el valor de la intensidad de fluorescencia alcanza un valor máximo y prácticamente constante (~ 1800 u.a) hasta el día 37.

La evolución de los valores de I_F con el tiempo se ha representado gráficamente en la Figura 11 para que se compruebe de manera visual que entre el día 10 y el 45 las nanopartículas tienen una fluorescencia alta, superior a 900 u.a. siendo mayor y prácticamente constante entre el día 22 y el 37 (~ 1800 u.a). Es en este periodo de tiempo cuando se alcanza la relación óptima tamaño de nanopartícula/tamaño de nanocorteza de $Cd(OH)_2$ en la que la eficacia cuántica del proceso luminiscente es máxima.

A partir del día 37 aumenta la relación antes mencionada por hacerlo el tamaño de las nanopartículas y comienza a aumentar la pérdida de energía dispersiva y disminuir el valor de I_F .

Tabla 3. Obtención de nanopartículas de CdSe altamente fluorescentes. Evolución del valor de I_F de las nanopartículas. $[Cd^{2+}]_F/[Se^{2-}]_F = 3,74$; $[Cd^{2+}]_F/[MAA]_F = 1,77$; pH inicial= 4,6; $T = 4$ °C; $[Cd^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3}$ M.

t min	λ nm		I_F u.a.	Δ nm
	λ_{exc}	λ_{emi}		
13	370,0	461,0	41,66	86
t días				
1	381,0	464,0	250,56	88
4	394,0	467,0	590,52	93
7	395,0	469,0	774,84	86

8	395,0	467,0	799,42	91
9	395,0	466,0	856,76	91
10	395,0	470,0	1060,2	99
22	397,0	470,0	1780,5	108
29	397,0	470,0	1786,2	110
37	398,0	470,0	1786,2	106
43	398,0	469,0	869,05	90
49	410,0	486,0	565,95	98
56	414,0	490,0	348,86	98

5 A partir del día 55, aproximadamente, comienza a desdoblarse el pico de emisión apareciendo una variación importante en la λ_{exc} y λ_{em} óptimas por lo que la variación de I_F depende de la manera de ser medida, pero no tiene más importancia por tratarse ya de valores más pequeños de I_F . No obstante el día 99 las nanopartículas tienen aún una fluorescencia de 193 u.a.

Obtención de QDs de tamaño lo más pequeño posible.

10 El tamaño puede ser un factor importante para la aplicación de las nanopartículas de CdSe en su capacidad para atravesar la membrana celular y poder ser eficaces en su papel de transporte de fármacos.

15 Cuando esto sea necesario es posible obtener, controlando las condiciones experimentales, nanopartículas de tamaño pequeño durante un buen periodo de tiempo.

20 La velocidad de crecimiento, como ya hemos comprobado, se puede controlar cinéticamente obteniendo las nanopartículas a 4 °C y fijando previamente el pH de la disolución a 4,6. Por otra parte cuanto mayor sea el exceso de Cd^{2+} en solución, respecto a $SeSO_3^{2-}$, mayor es la velocidad de nucleación y menor es la velocidad de crecimiento.

25 Con el fin de comprobar estos aspectos teóricos se obtienen nanopartículas de CdSe en las condiciones experimentales de las dos experiencias anteriores pero con la diferencia de añadir sobre la disolución de Cd^{2+} una menor concentración de $SeSO_3^{2-}$. Se añaden lentamente 0,8 mL de $SeSO_3^{2-}$ 0,0892 M. La concentración de Cd^{2+} y MAA se mantiene en los valores ya indicados, por lo que en el presente caso las relaciones molares son:

$$[Cd^{2+}]_F/[Se^{2-}]_F = 5,60; \quad [Cd^{2+}]_F/[MAA]_F = 1,77$$

30 En la Figura 12 se muestran los espectros de absorción registrados durante diferentes momentos de la evolución de las nanopartículas de CdSe.

35 Puede comprobarse cómo morfológicamente son en general, completamente diferentes a los obtenidos en las dos experiencias anteriores, sin obtener un hombro de absorción claro hasta los 86 días. En la evolución hasta ese momento solo se obtiene una pequeña inflexión entre los 350 nm y los 365 nm propia de nanopartículas de tamaño pequeño con longitudes de onda de absorción muy próximas a la del $SeSO_3^{2-}$ en exceso.

40 No ha sido posible calcular con exactitud la concentración de nanopartículas en disolución, C_{CdSe} , pero comparando los valores de absorbancia del punto de inflexión (cuando es posible) con los de la experiencia 2, se llega a la conclusión de que son muy similares.

No obstante la concentración de nanopartículas en disolución, C_{CdSe} , disminuye con el tiempo, claramente desde el día 72 por aparición de aglomerados de nanopartículas que generan un sólido insoluble amarillo.

45 Desde el primer instante de terminarse la adición de $SeSO_3^{2-}$, en la disolución coexisten nanopartículas de CdSe y una ligera turbidez blanquecina que se debe a la presencia de $Cd(OH)_2$ debido a que la concentración inicial de Cd^{2+} en relación con la de $SeSO_3^{2-}$ es en esta experiencia muy elevada.

50 El tamaño de las nanopartículas de CdSe, que era el objetivo buscado, evoluciona desde 1,95 nm para $t=0$ hasta 2,2 nm a los 5 días (Fig. 13) pero posteriormente hasta el día 68 se mantiene en un tamaño inferior a 2,35 nm.

Al ser una nanopartícula de tamaño muy pequeño, las λ_{exc} y λ_{em} óptimas a $t = 0$ (Fig. 14 y Tabla 4) se encuentran a valores más pequeños que los correspondientes a las nanopartículas obtenidas en las dos experiencias anteriores.

5 En la Figura 14 se muestra la evolución de los espectros de excitación de las nanopartículas de CdSe obtenidas en las condiciones experimentales actuales. Puede comprobarse como la λ_{exc} sufre un efecto batocrómico, pero pequeño al ser también pequeña la variación de tamaño.

10 En todos los espectros aparece el típico hombro atribuido a la presencia de la nanocorteza de $Cd(OH)_2$ y para tiempos superiores a los 68 días el pico de excitación comienza a deformarse por hacerlo también las nanopartículas en el proceso de agregación.

La intensidad del proceso de excitación se incrementa con el tiempo y alcanza valores que sobrepasan la escala desde el día 20 hasta el día 68 (periodo en el que el valor de Δ se mantiene prácticamente

15 constante entre 2,2 y 2,3 nm). Un fiel reflejo de la eficacia en el proceso de excitación de las nanopartículas es su comportamiento en el proceso de emisión de fluorescencia.

20 En la Tabla 4 se muestran los datos de emisión a lo largo del tiempo. Puede comprobarse que la λ_{em} sufre un efecto batocrómico como corresponde con el incremento de tamaño razón por la que se mantiene prácticamente constante desde el día 22 al 68. Como consecuencia de ello la luz emitida pasa de una intensidad azulada (casi imperceptible) a los 14 minutos hasta el amarillo a los 97 días.

El valor de la intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión, I_F , se incrementa con el tiempo (Fig. 15) de modo que entre los días 22 y 68 ya supera el valor máximo de la escala, razón por la cual los valores para estos días son calculados con $R = 1,5$ nm y transformados con el factor de 30 (Tabla 4).

25 **Tabla 4.** Obtención de nanopartículas de CdSe de tamaño lo más pequeño posible. Evolución del valor de I_F de las nanopartículas. $[Cd^{2+}]_F/[Se^{2-}]_F = 5,60$; $[Cd^{2+}]_F/[MAA]_F = 1,77$; pH inicial = 4,6; $T^a = 4^\circ C$; $[Cd^{2+}]_F = 3,9 \times 10^{-3} M$

t min	λ nm		I_F u.a.	Δ nm
	λ_{exc}	λ_{emi}		
14	368,0	—	37,56	—
129	368,0	445,0	41,66	—
327	371,	459,0	75,45	—
t días				
1	378,0	459,0	128,00	97
2	381,0	459,0	275,13	90
5	387,0	466,0	422,59	88
7	389,0	464,0	537,28	90
22	392,0	467,0	1062,5	91
26	392,0	466,0	1398,6	93
34	394,0	466,0	1410,8	102
44	394,0	466,0	1407,3	100
47	394,0	466,0	1399,4	99
63	395,0	466,0	1403,2	98
68	395,0	466,0	1385,2	96
72	398,0	469,0	836,26	104
86	399,0	475,0	336,57	93
97	410,0	494,0	172,73	102

30 Tras el día 68 el valor de I_F decae por haberse superado la relación óptima tamaño de nanopartícula/tamaño de nanocorteza que en este caso se alcanza el día 22 cuando el Δ tiene un valor de 2,2 nm.

35 Si se comparan los valores de intensidad de fluorescencia en función del tiempo de evolución (Fig. 15) con los obtenidos en la experiencia 2 (Fig. 11), se comprueba que la relación óptima, esto es el valor de I_F máximo se alcanza prácticamente al mismo tiempo si bien en la experiencia 3 el valor de fluorescencia máxima que se alcanza es ligeramente menor que en la experiencia 2, pero en el primer caso el valor

prácticamente constante de fluorescencia permanece durante más tiempo que en la experiencia 2. Esta diferencia hay que encontrarla en el papel que desempeña el mercaptoacetato que rodea a las nanopartículas, según su tamaño, y que afecta a la estabilidad del sistema coloidal. Parece ser que este número es mayor en las nanopartículas obtenidas en la experiencia 3 (por ser menor el λ_{exc}).

5 Reproducibilidad en el método de obtención de QDs de CdSe

Una de las mayores críticas que se suelen realizar sobre los métodos de obtención de cristales, coloides y nanopartículas, es la falta de reproducibilidad por la cantidad de variables que influyen, alguna de ellas incontrolada.

Con el fin de comprobar la reproducibilidad del método de obtención de nanopartículas de CdSe en medio acuoso que estamos proponiendo, se preparan dos experiencias (A y B) que se realizan con las mismas condiciones pero individualmente con un tiempo de separación de 23 horas.

En ambos casos se parte de 4 mL de la misma disolución de $CdCl_2$ $5,0 \times 10^{-2}$ M que se colocan en un matraz aforado y se enrasan a 100 mL. Dichas disoluciones se vierten en matraces erlenmeyer, se colocan en baño de hielo a $4^\circ C$ y se añaden en ambos casos con micropipeta 80 μL de disolución de MAA 1,41 M, manteniendo la agitación constante en 1300 r.p.m. Se ajusta a continuación el pH, en ambos casos a 4,58 con NaOH y cuando se alcanza en la disolución la temperatura de $4^\circ C$ se burbujea corriente de N_2 durante 15 minutos. Terminado este proceso y manteniendo constante la agitación se añaden 1,9 mL de disolución de $SeSO_3^{2-}$ 0,0846 M (con micropipeta) y procurando que el ritmo de adición sea similar a lo largo de 15 minutos y siempre sin tocar las paredes del recipiente.

Terminada la adición del $SeSO_3^{2-}$ se toma una alícuota, en cada experiencia, para realizar la primera medida y la disolución se guarda en nevera a $4^\circ C$.

En ambas disoluciones las concentraciones de reactivos y sus relaciones molares son:

$$[Cd^{2+}]_F = 1,96 \times 10^{-3} \text{ M}; [SeSO_3^{2-}]_F = 1,57 \times 10^{-3} \text{ M}; [MAA]_F = 1,10 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$[Cd^{2+}]_F/[Se^{2-}]_F = 1,25; \quad [Cd^{2+}]_F/[MAA]_F = 1,77$$

En la Figura 16 se muestran de manera paralela, los espectros de absorción de ambas disoluciones, A y B a medida que las nanopartículas evolucionan con el tiempo.

En las condiciones experimentales en las que se obtienen las nanopartículas la velocidad de crecimiento de las mismas está controlada por la cinética de la hidrólisis del $SeSO_3^{2-}$ a $4^\circ C$. Se obtienen nanopartículas que crecen desde 1,95 nm para $t = 0$ hasta 2,85 nm a los 109 días.

Pero lo importante del estudio es comprobar que no existen diferencias significativas entre los espectros de ambas experiencias para tiempos similares. El tamaño de las nanopartículas, λ_{exc} , la longitud de onda a la que aparecen los puntos de inflexión o el máximo de absorción y el valor de A_{max} son similares para tiempos parecidos.

La reproducibilidad en el tamaño, y concentración de nanopartículas, C_{CdSe} , obtenidas en dos experiencias similares y paralelas, no es suficiente para demostrar la reproducibilidad en el método de obtención.

Como ha quedado demostrado el estado de la superficie de las nanopartículas es crítico para explicar las propiedades luminiscentes.

La única manera de comprobar que la superficie se reproduce es registrar las propiedades luminiscentes de las nanopartículas.

Esta es la razón por la cual se registran los espectros de excitación (Fig. 17) y los espectros de emisión (Fig. 18) de las nanopartículas obtenidas en ambas experiencias.

Puede comprobarse en la Figura 17 cómo en ambas experiencias la morfología de los espectros de excitación así como las λ_{exc} óptimas (dentro del error experimental) son similares para las nanopartículas de CdSe a tiempos similares.

Que la superficie se reproduce se comprueba definitivamente comparando los espectros de emisión de las nanopartículas para tiempos similares (Fig. 18), tanto la λ_{emi} óptima como el valor de I_F no difieren significativamente.

- 5 El método de obtención de nanopartículas de CdSe en medio acuoso, por el procedimiento indicado, presenta una buena reproducibilidad.

APLICACIÓN DE LOS QDs DE CdSe SINTETIZADOS EN MEDIO ACUOSO

10 Estabilidad de los QDs de CdSe

Algunos autores han dado a conocer que las nanopartículas obtenidas a base de S^{2-} o Se^{2-} sufren un proceso de oxidación en su superficie, ante la presencia de O_2 , modificando la naturaleza de ésta y sus propiedades luminiscentes.

- 15 En las numerosas experiencias realizadas, tras conservar las disoluciones acuosas en las que se han obtenido las nanopartículas de CdSe tanto en nevera a 4°C como a temperatura ambiente, en algunos casos durante tres días, no se ha observado en ningún caso la influencia de la presencia de oxígeno.

- 20 Para descartar esta influencia se lleva a cabo un estudio experimental borboteando aire sobre una disolución acuosa que contiene nanopartículas de CdSe con una "vida", desde su obtención, suficiente para considerar que han alcanzado su máximo desarrollo.

En medios ricos en oxígeno

- 25 De la disolución acuosa donde se encuentran las nanopartículas de CdSe obtenidas en la experiencia B anterior y conservada en nevera a 4°C, se extraen 10 mL transcurridos los días 47 y 48 y se someten a burbujeo de aire durante 30 minutos y 1 hora respectivamente.

- 30 En las Figuras 19 y 20 se muestran los espectros de absorción y emisión de la disolución acuosa antes y después del borboteo con aire, en ambas experiencias. Puede comprobarse como tras sufrir dicho proceso las nanopartículas no han experimentado cambios ni en su tamaño ni en sus propiedades luminiscentes como lo demuestra el hecho de que sus espectros de absorción y de emisión, antes de pasar aire a-1 y b-1 y después de pasarlo a-2 y b-2, presentan las mismas λ_{abs} y λ_{em} así como el valor de I_F .

Este estudio por lo tanto demuestra que las nanopartículas de CdSe obtenidas en medio acuoso y en las condiciones experimentales consideradas óptimas son estables ante la presencia de oxígeno.

- 40 A pHs diferentes a los de su conservación

Como ya se ha comentado en estudios anteriores, el método de obtención de nanopartículas de CdSe en medio acuoso implica la utilización de los reactivos $CdCl_2$ y $SeSO_3^{2-}$ junto con MAA como dispersante.

- 45 En las condiciones experimentales óptimas y una vez añadido el $SeSO_3^{2-}$ el pH final de la disolución es de 8,7. Es en esta disolución en la que se dejan evolucionar y donde se conservan las nanopartículas guardadas con nevera a 4°C.

- 50 La disolución de conservación además de contener las nanopartículas estabilizadas y dispersadas, contiene en disolución iones Cd^{2+} y el anión $SeSO_3^{2-}$ que no se haya hidrolizado.

Ante la posibilidad futura de utilizar las nanopartículas en otros medios biológicos o no, caben dos opciones: una, utilizar directamente una alícuota de la disolución donde se conservan (junto con los iones en exceso) o bien, una segunda consistente en separarlas previamente de su disolución de conservación para eliminar los iones en exceso.

- 55 Esta segunda posibilidad ya ha sido ensayada en nuestro trabajo y consiste en separar las nanopartículas en medio acuoso tras añadir MIK (metil isobutil cetona), insolubilizándolas y posteriormente separar mediante centrifugación durante cinco minutos a 4000-5000 rpm. Tras la eliminación del líquido sobrante, el sólido se lava repetidamente con agua bidestilada y posteriormente se vuelve a dispersar en disolución acuosa conteniendo MAA u otros dispersantes.
- 60

La primera de las posibilidades plantea ventajas de comodidad al no tener que separar previamente las nanopartículas pero tiene el inconveniente ya mencionado, de que además de añadir las NPs se añaden iones Cd^{2+} y aniones SeSO_3^{2-} .

5 Al añadir una alícuota de la disolución que contiene las nanopartículas sobre otro medio que se encuentra a otro pH diferente a 8,7, estas podrían sufrir reacciones parásitas en su superficie o posteriores evoluciones de tamaño por lo que es necesario conocer cómo afecta el pH del medio sobre sus propiedades para no atribuirlo a procesos diferentes a su autoevolución.

10 Para comprobar si existe o no variación en las nanopartículas ante su utilización sobre otros medios a diferente pH de su propia disolución, se prepara la siguiente experiencia:

15 De la disolución B de la experiencia anterior, se toman alícuotas de 6mL que se colocan en pequeños vasos (siete en total). Salvo en una de las alícuotas, en el resto se modifica el pH con disolución de HCl o NaOH desde 6,5 hasta 11,82. Ajustado el pH, todas las disoluciones se enrasan con agua bidestilada en matraces aforados de 10 mL. Se registran inmediatamente los espectros de absorción y luminiscencia de las disoluciones finales.

20 En la Figura 21 se muestran los espectros de absorción de la disolución original diluida (en el centro, pH=8,7) y de las disoluciones ajustadas a pH entre 6,5 y 11,82. Puede comprobarse cómo la morfología de los espectros solo cambia claramente para valores de pH superiores a 9,5. El diámetro de las nanopartículas varía desde 2,75 nm de la disolución original, hasta 2,85 nm para los valores de pH más alcalinos y más ácidos.

25 El cambio en la morfología y en el valor de absorbancia del máximo puede estar relacionado con la desaparición por dilución de la nanocorteza de $\text{Cd}(\text{OH})_2$ a pH inferior a 8,7 y a su incremento a pH mayor de 8,7 (recuérdese que en disolución existen iones Cd^{2+}).

30 En definitiva el cambio de pH provoca en las nanopartículas de CdSe (en el margen estudiado) un ligero cambio de tamaño, pero cambios que pueden ser importantes en su superficie.

35 Estos cambios en su superficie son los responsables de que las propiedades luminiscentes se modifiquen fundamentalmente a pH superior a 9,5. En la Figura 22 se muestran los espectros de emisión, registrados a las correspondientes λ_{exc} óptimas, de las diferentes disoluciones. No existen grandes diferencias en los valores de λ_{exc} y sólo diferencias claras para la λ_{em} a pH=11,82. La luz emitida en todos los casos es de tonalidad amarilla salvo para pH=11,82 que tiene un tinte naranja.

40 Como conclusión del estudio realizado se puede afirmar que al utilizar las nanopartículas en medios con valores de pH entre 7,0 y 9,5 (partiendo de su disolución de conservación de pH=8,7) no se altera prácticamente su tamaño y se mantiene su capacidad fluorescente.

Caracterización final de los QDs de CdSe

45 La morfología de las nanopartículas de CdSe ha sido estudiada, tras la correspondiente evaporación del disolvente, mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

50 Las nanopartículas de CdSe que denominamos altamente estables al día 50 desde que terminó su proceso de obtención, son nanopartículas esféricas con tamaños inferiores a 5 nm. Recordemos (Fig. 6) que estas nanopartículas en este preciso instante tienen un diámetro medio de 3 nm, según se pudo deducir a partir de los datos del espectro de absorción.

55 Pasados los 90 días, las nanopartículas esféricas se agrupan en lo que hemos denominado aglomerados, de mayor tamaño que observadas con mayor detalle son agrupaciones a su vez esféricas de nanopartículas individuales.

Los aglomerados, con el tiempo, se van agrupando en estructuras cristalinas perfectamente orientadas en el espacio, lo que es de interés de cara a sus aplicaciones en el diseño de sensores ó transductores ópticos.

60 El difractograma de Rayos X de las nanopartículas de CdSe obtenidas en los tres casos descritos,, utilizando porta de vidrio, se muestra en la Figura 24.

Los difractogramas en los tres casos indicados muestran solo tres picos de ruptura entre 20-28°, entre 42-45° y a 50°. Estos tres picos son consecuencia del solapamiento de otros que corresponden a planos cristalinos (100) (002) (101), 24°, 25° y 27°; (110) (103) 42° y 46°, respectivamente, así como (112) a 49° que presentan los cristales puros de CdSe tipo wurtzita, según bibliografía.

5

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de quantum dots de CdSe en medio acuoso que comprende las siguientes etapas:
 - a) Preparación de una disolución acuosa de CdCl₂.
 - b) Adición de una disolución de un mercaptoácido a la disolución obtenida en la etapa (a).
 - c) Ajuste del pH de la disolución obtenida en la etapa (b) mediante la adición de una base.
 - d) Ajuste de la temperatura de la disolución obtenida en la etapa (c) por calentamiento o enfriamiento controlado y posterior burbujeo con un gas inerte.
 - e) Adición de la disolución de selenosulfato a la disolución obtenida en (d).
2. Procedimiento, según la reivindicación anterior, donde la concentración de CdCl₂ en la disolución obtenida en la etapa a) tiene un valor de entre 10⁻³ y 10⁻¹ M.
3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el mercaptoácido de la etapa b) se selecciona de la siguiente lista: ácido mercaptoacético, mercaptopropiónico, mercaptosuccínico,
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la concentración de la disolución de mercaptoácido utilizado en la etapa b) tiene un valor de 1 a 2 M.
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la adición de la etapa b) se lleva a cabo entre 1 y 6 minutos.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la adición de la etapa b) se realiza a una temperatura de -20°C a 100°C.
7. Procedimiento, según la reivindicación anterior, donde la adición de la etapa b) se realiza a una temperatura de 0°C a 30°C.
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la base utilizada en la etapa c) se selecciona de la lista que comprende hidróxido sódico e hidróxido potásico.
9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el pH obtenido en la etapa c) varía entre 4,0 y 7,0.
10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la temperatura en la etapa d) tiene un valor de entre 0°C a 200°C.
11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la temperatura en la etapa d) tiene un valor de entre 0°C a 30°C.
12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el burbujeo con el gas inerte de la etapa d) se lleva a cabo entre 15 y 30 minutos.
13. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el gas inerte de la etapa d) se selecciona de la lista que comprende helio, neón, argón, kriptón, xenón y nitrógeno.
14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la disolución de selenosulfato de la etapa e) se obtiene a partir de selenio en polvo y sulfito sódico.
15. Procedimiento, según la reivindicación anterior, donde la disolución selenosulfato de la etapa e) se prepara a una temperatura de 20°C a 200°C.
16. Procedimiento, según la reivindicación anterior, donde la disolución selenosulfato de la etapa e) se prepara a una temperatura de 50°C a 100°C.
17. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la preparación de la disolución de selenosulfato de la etapa e) se lleva a cabo entre 1 y 24 horas.
18. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la preparación de la disolución de selenosulfato de la etapa e) se lleva a cabo entre 3 y 12 horas.

19. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la concentración de la disolución de selenosulfato de la etapa e) tiene un valor de entre 0,01 y 1 M.
- 5 20. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la adición de la etapa e) se lleva a cabo en menos de 10 minutos.
- 10 21. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las concentraciones analíticas finales de los iones $[Cd^{2+}]$ y $[Se^{2-}]$ de las nanopartículas en disolución tienen unas relaciones molares de entre 0,5 y 20
22. Procedimiento, según la reivindicación anterior, donde las concentraciones analíticas finales de los iones $[Cd^{2+}]$ y $[Se^{2-}]$ de las nanopartículas en disolución tienen unas relaciones molares de entre 1 y 10.
- 15 23. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las concentraciones analíticas finales de los iones $[Cd^{2+}]$ de las nanopartículas en disolución y el mercaptoácido tienen unas relaciones molares de entre 0,5 y 5.
- 20 24. Procedimiento, según la reivindicación anterior, donde las concentraciones analíticas finales de los iones $[Cd^{2+}]$ de las nanopartículas en disolución y el mercaptoácido tienen unas relaciones molares de entre 1 y 2.
- 25 25. Quantum dots obtenibles por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprenden agregados de nanocristales de CdSe, caracterizados por tener una nanocorteza que comprende un compuesto de Cd^{2+} e hidróxido.
26. Quantum dots, según la reivindicación anterior, donde el compuesto de Cd^{2+} es un complejo hidroxilado de Cd^{2+} de fórmula general $Cd(OH)_n^{2-n}$, donde $4 \leq n \leq 1$.
27. Quantum dots, según cualquiera de las reivindicaciones 25 ó 26, donde el compuesto de Cd^{2+} es $Cd(OH)_2$.
28. Quantum dots, según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, caracterizados por tener un diámetro medio de entre 0,5 nm y 10 nm.
- 30 29. Quantum dots, según la reivindicación anterior, caracterizados por tener un diámetro medio de entre 1 nm y 7 nm.
30. Uso de los QDs, según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, para marcaje biológico.

FIGURA 1

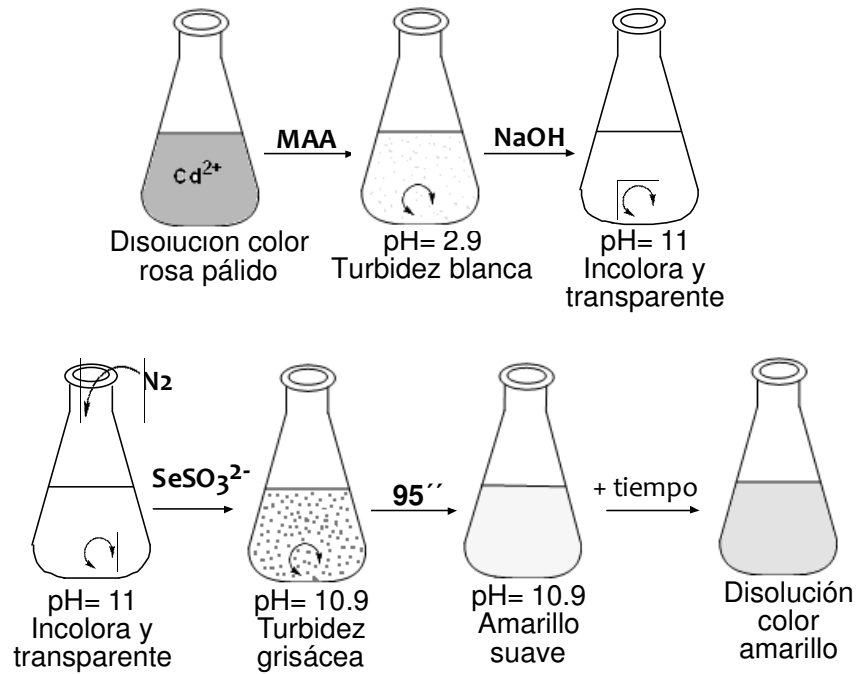


FIGURA 2

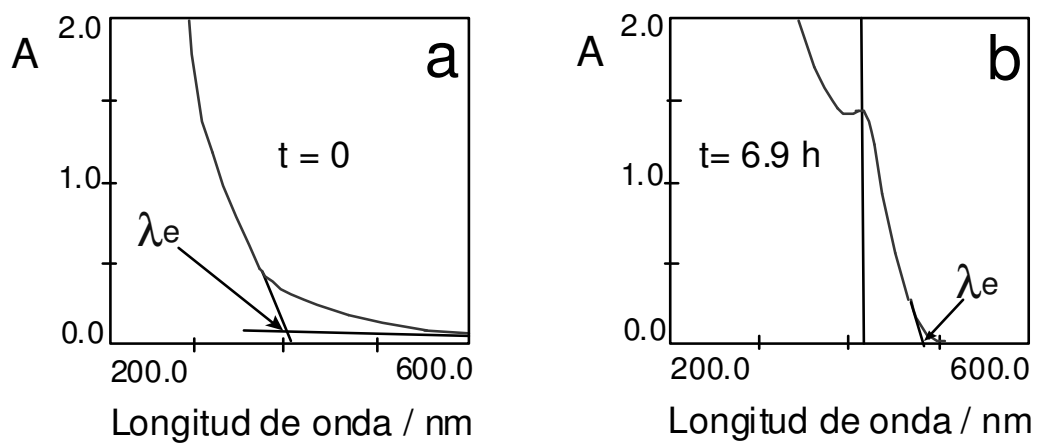


FIGURA 3

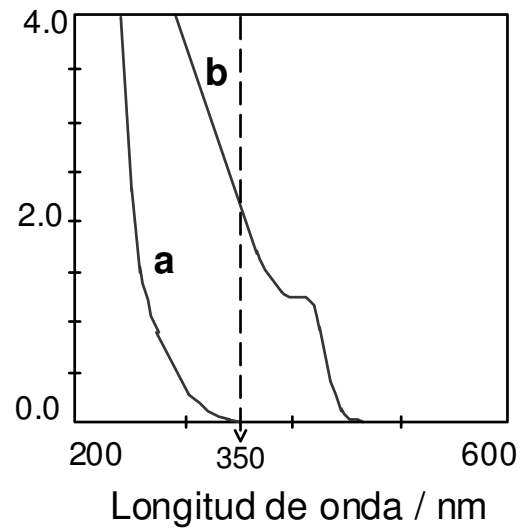


FIGURA 4

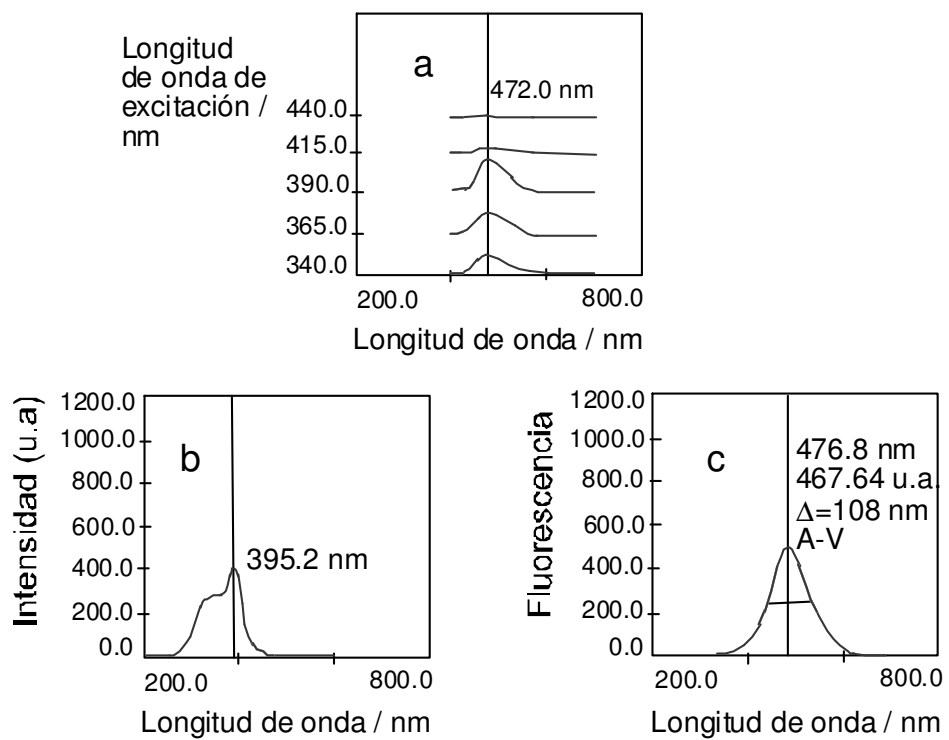


FIGURA 5

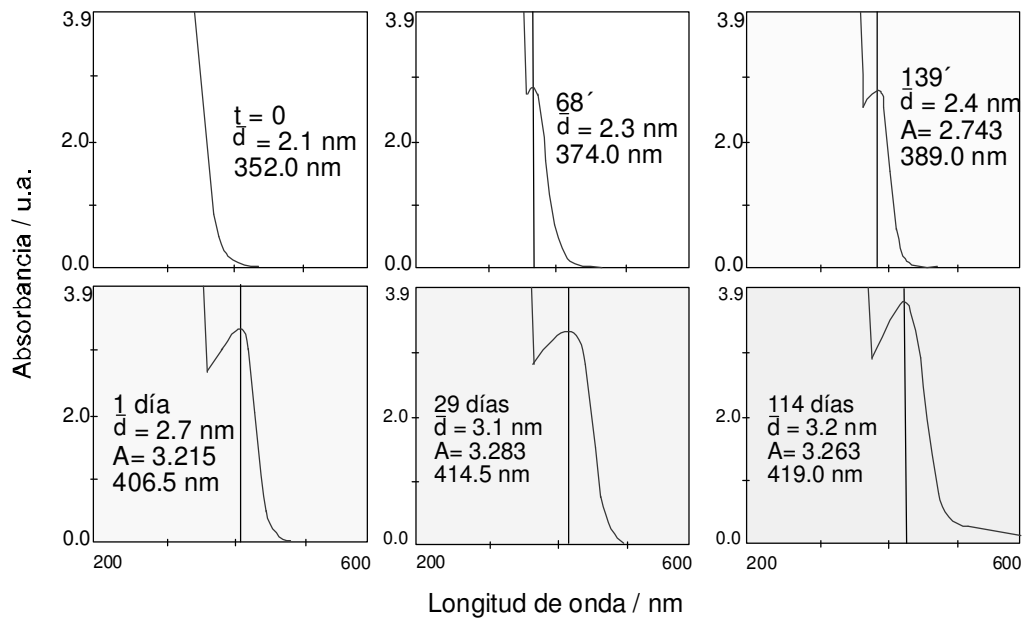


FIGURA 6

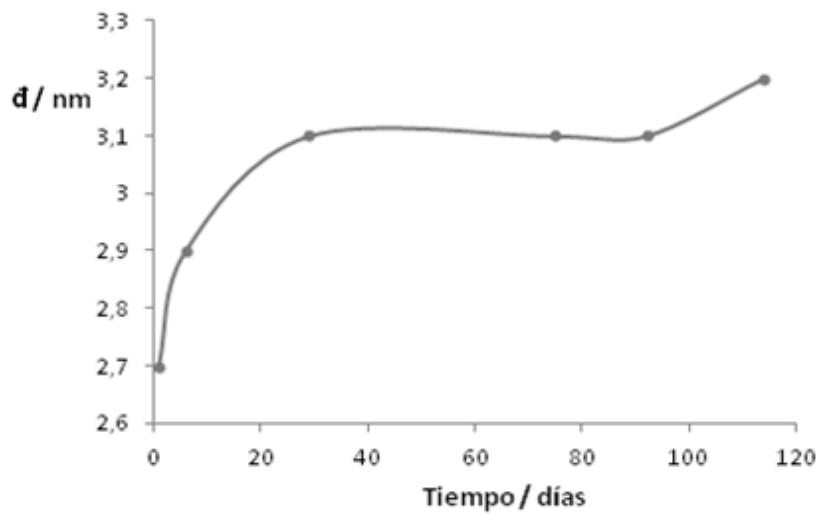


FIGURA 7

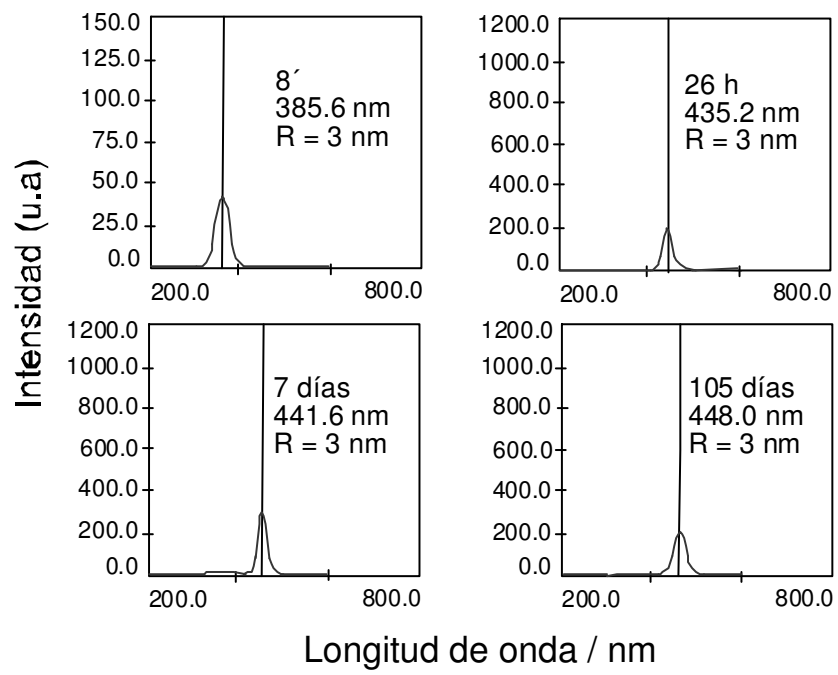


FIGURA 8

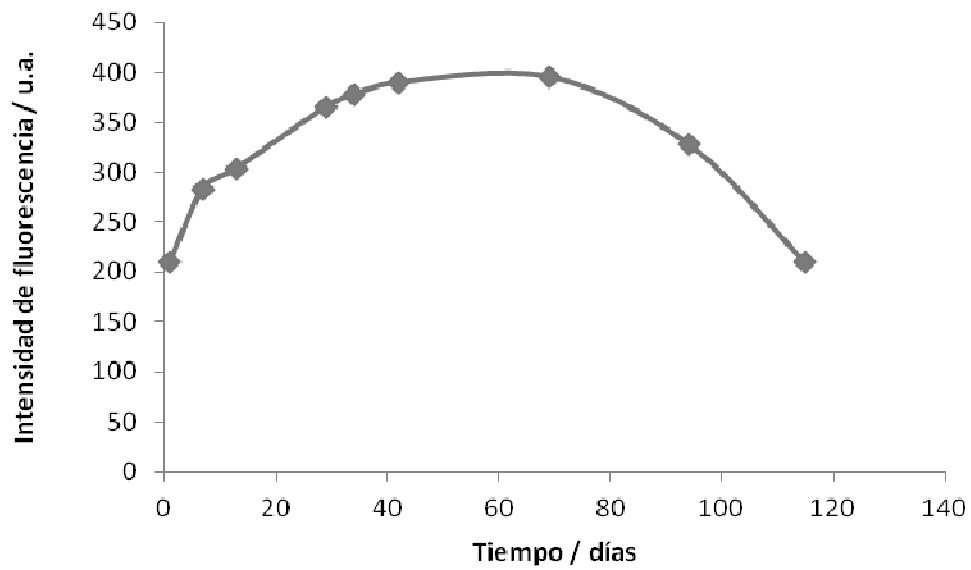


FIGURA 9

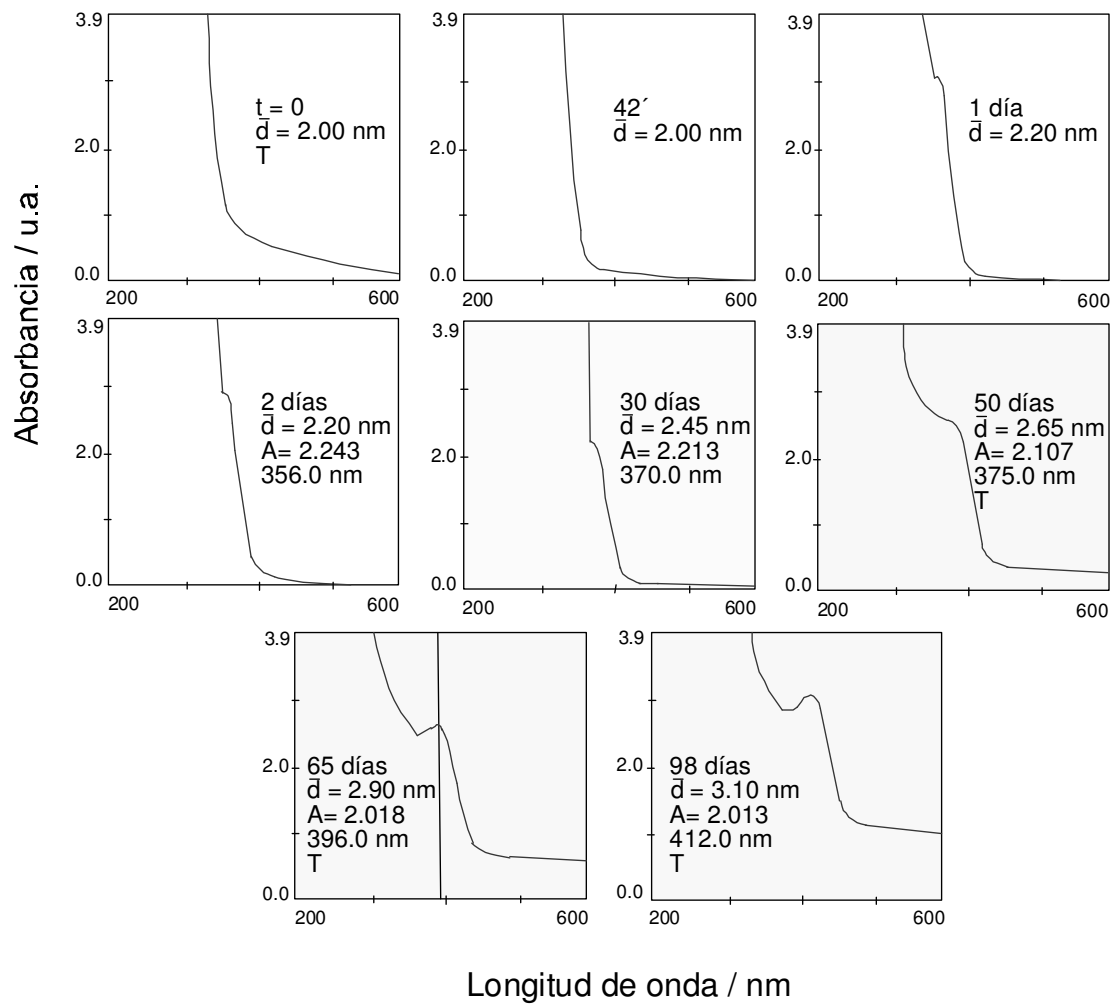


FIGURA 10

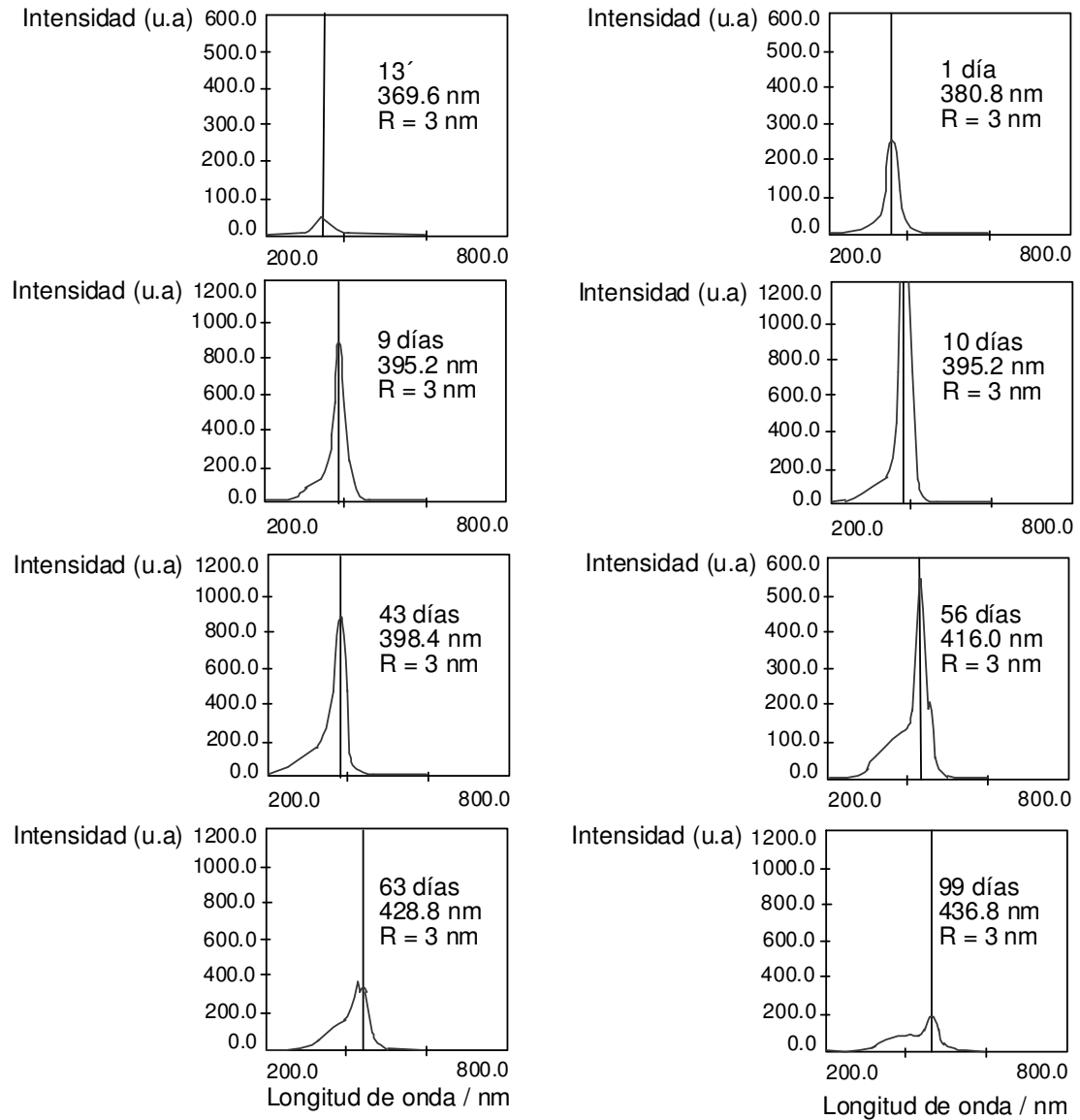


FIGURA 11

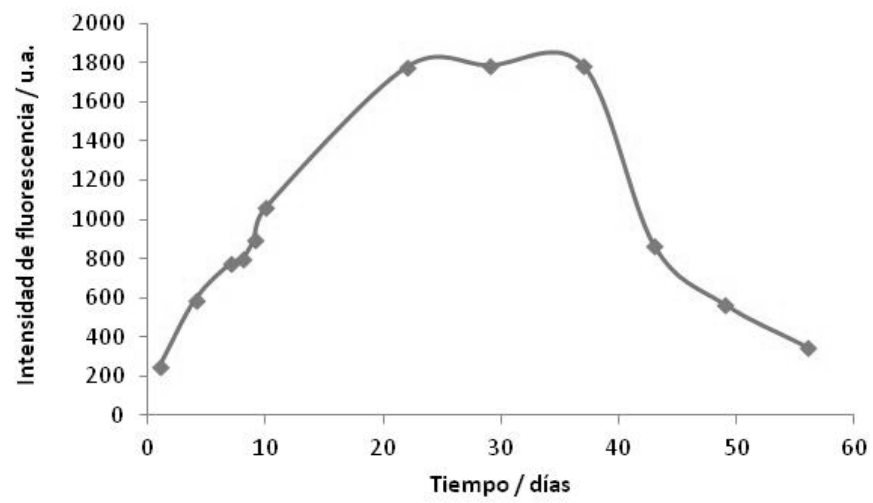


FIGURA 12

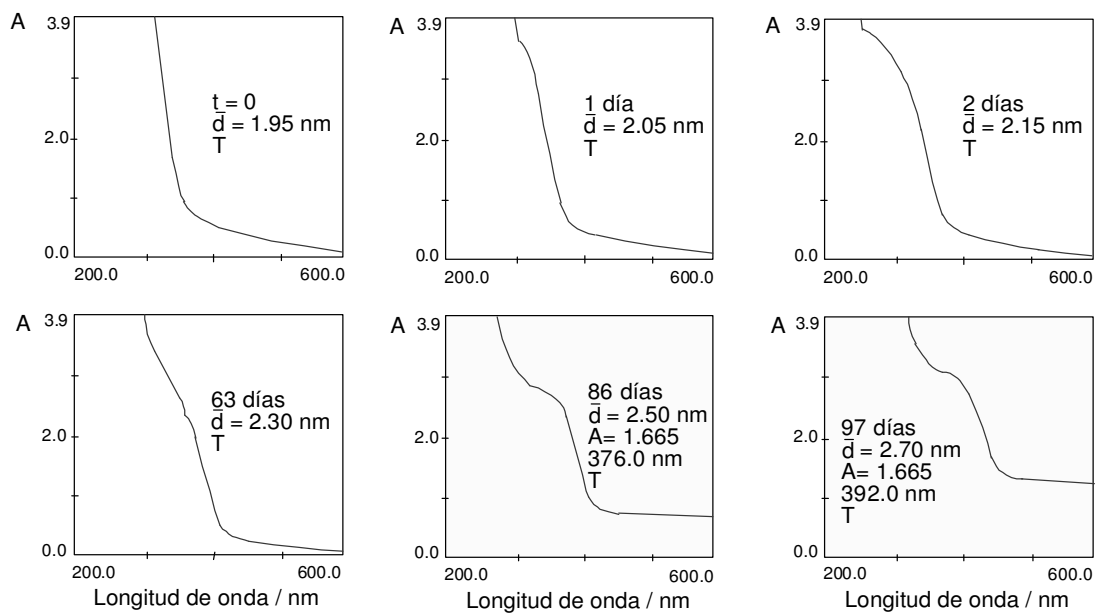


FIGURA 13

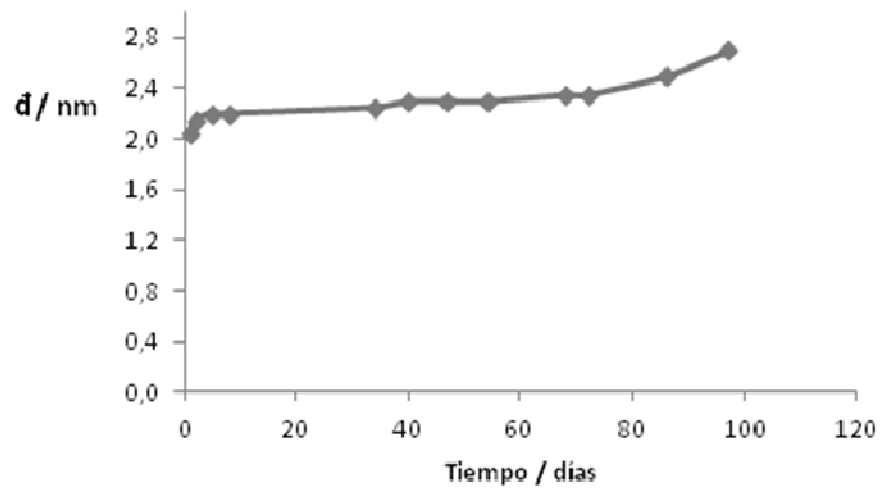


FIGURA 14

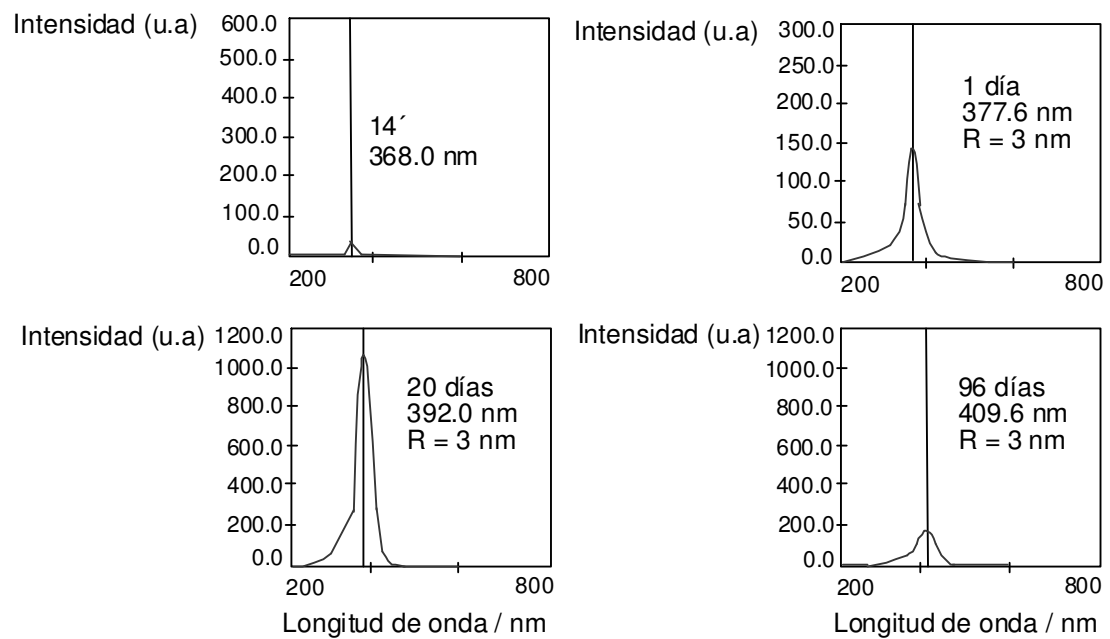


FIGURA 15

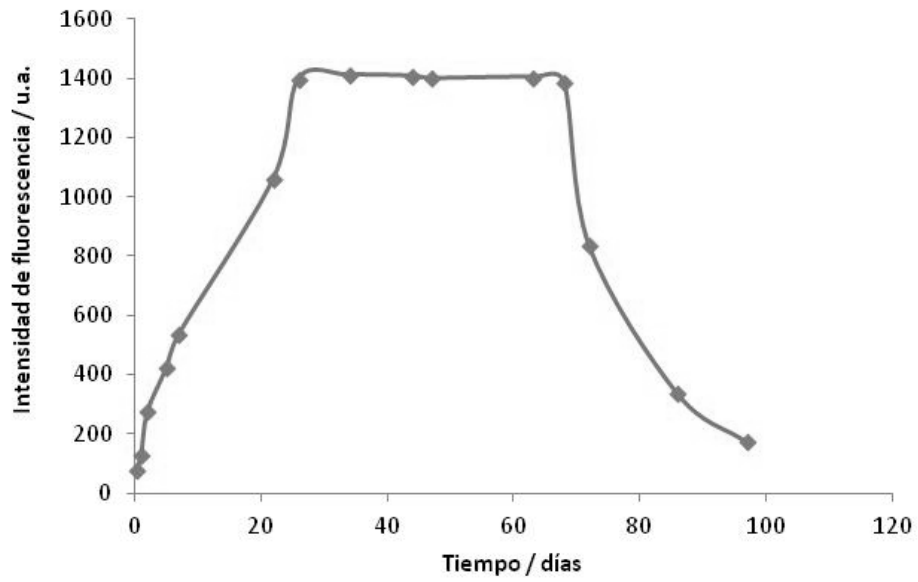


FIGURA 16

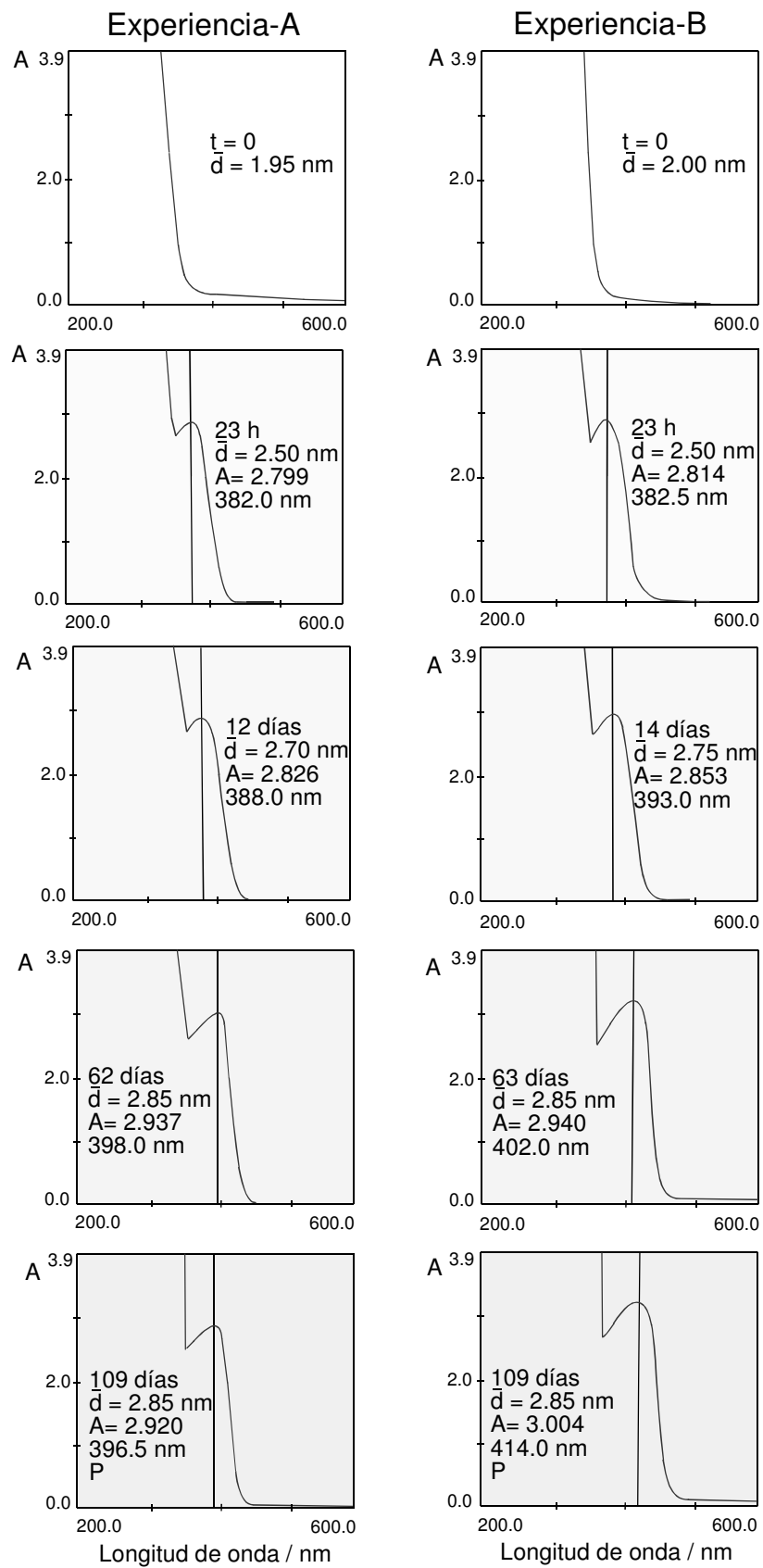


FIGURA 17

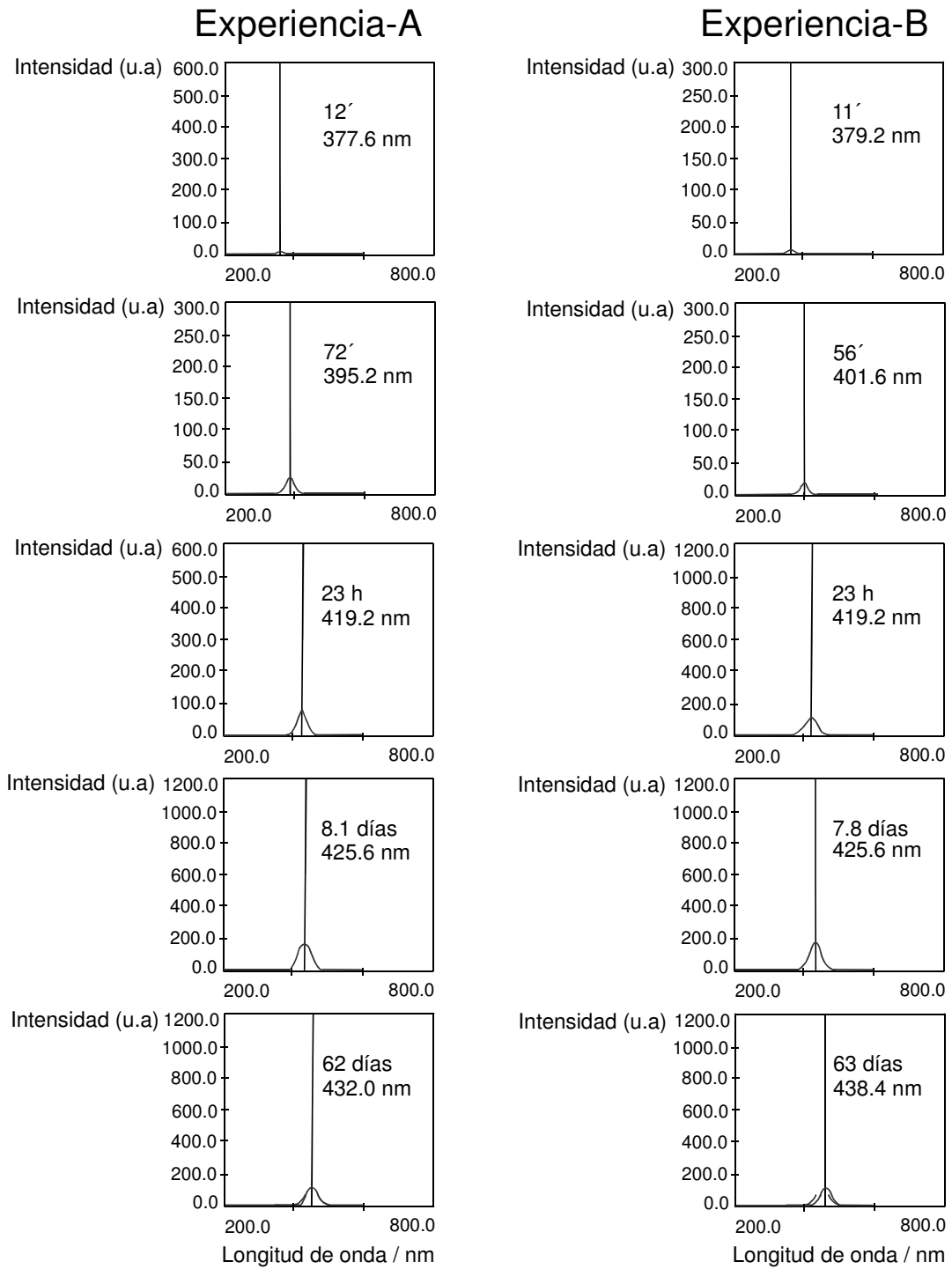


FIGURA 18

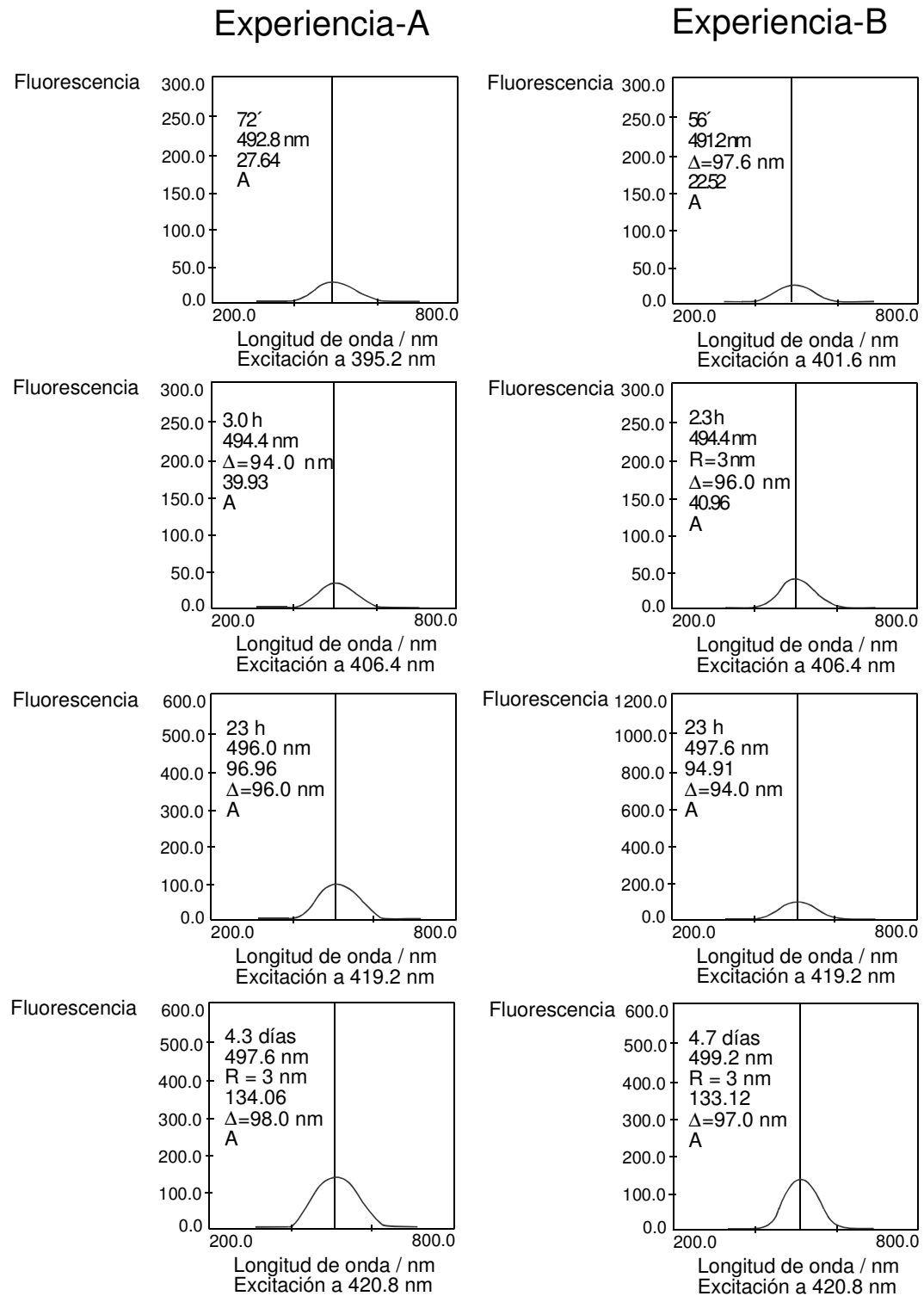


FIGURA 19

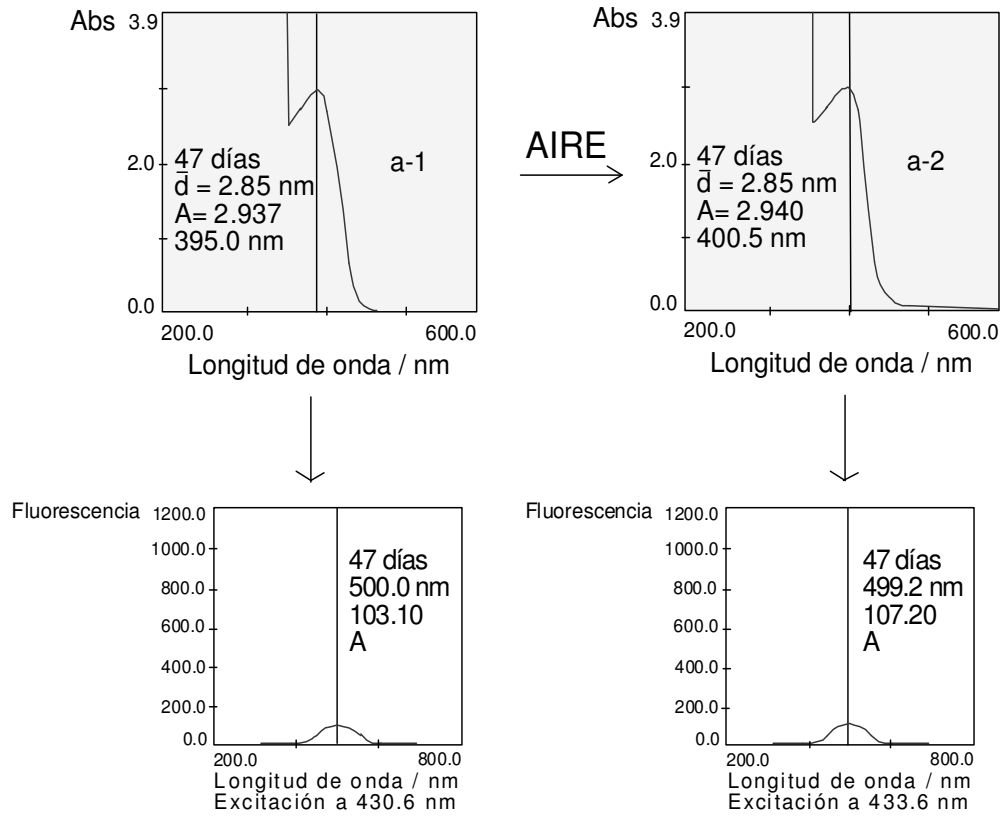


FIGURA 20

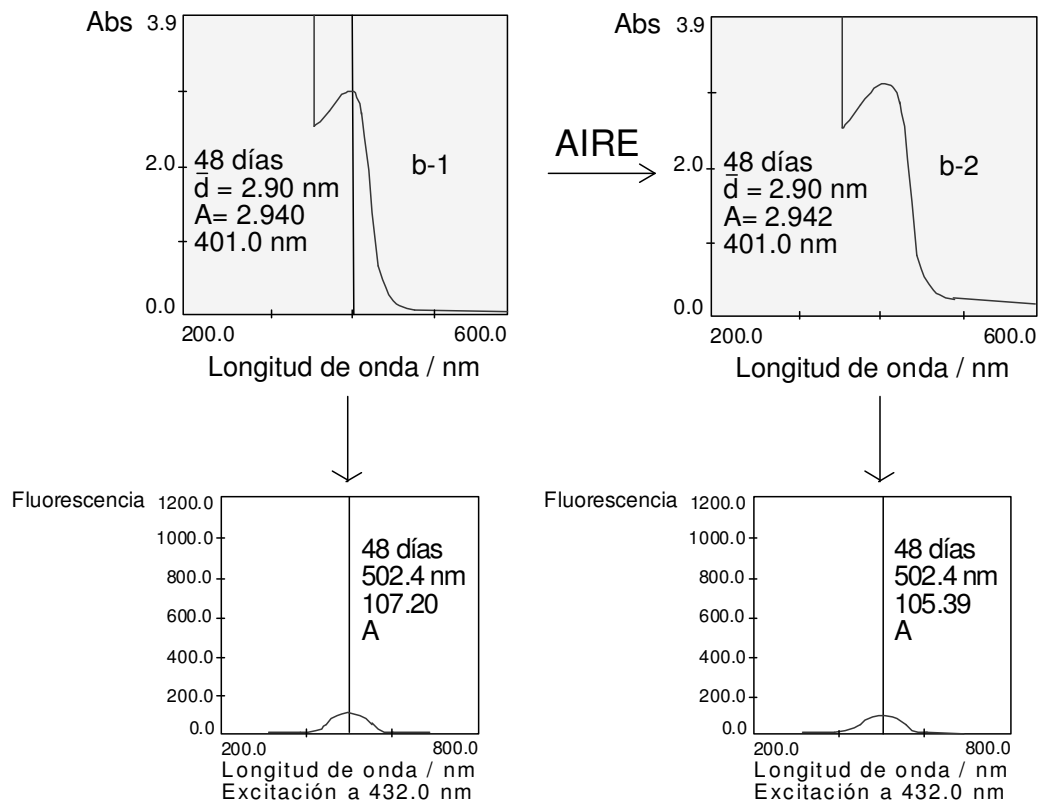


FIGURA 21

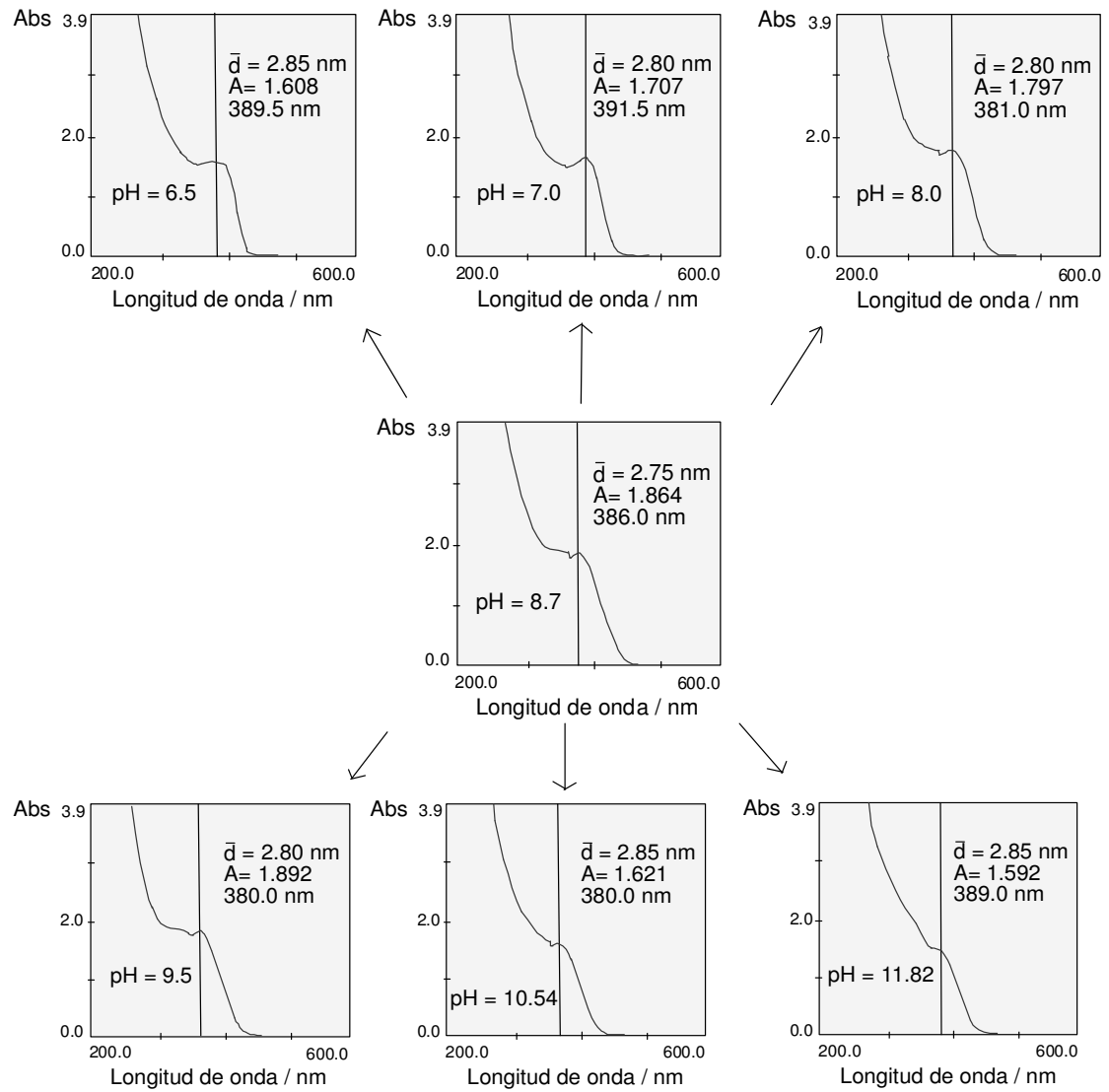


FIGURA 22

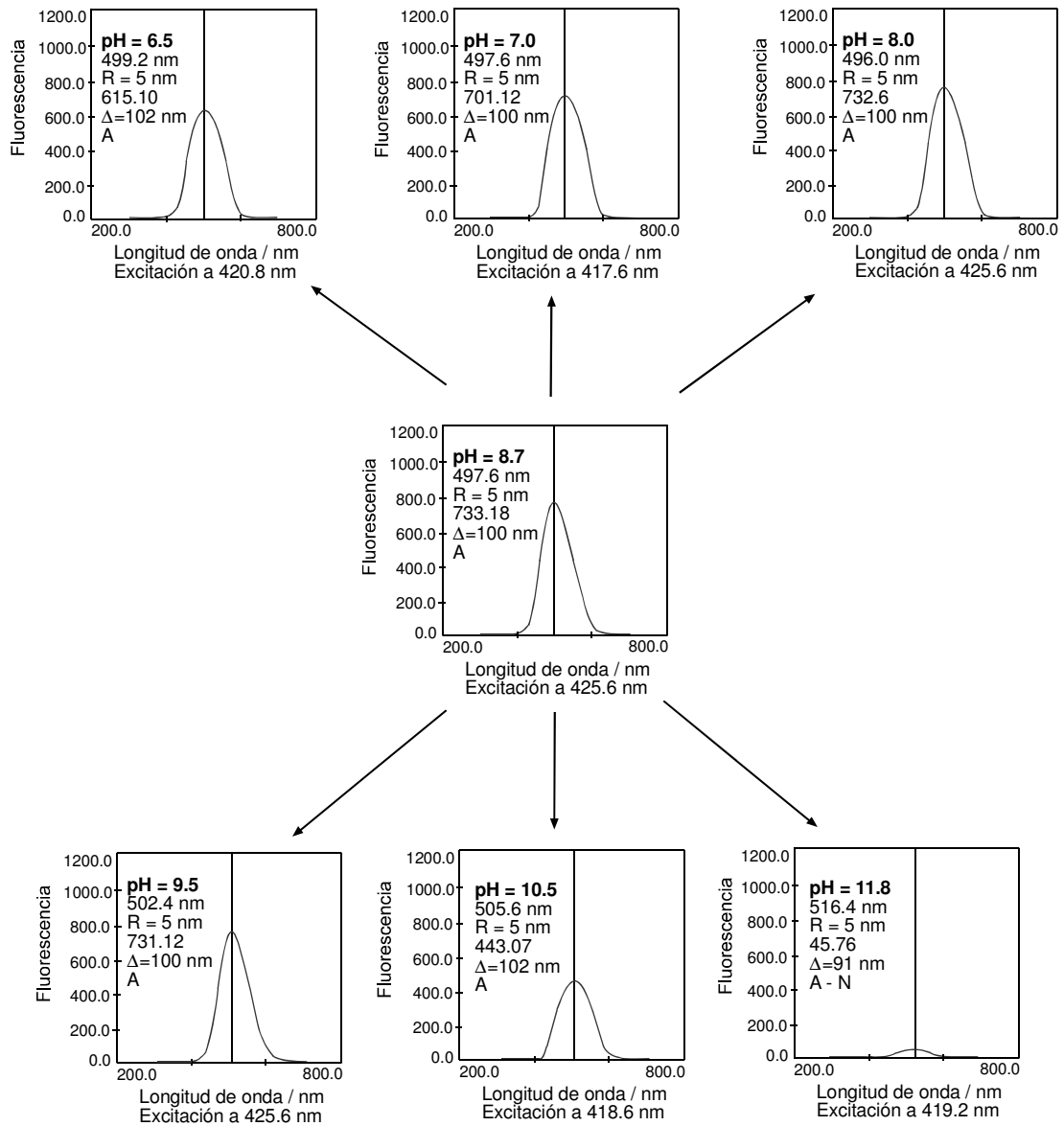


FIGURA 23

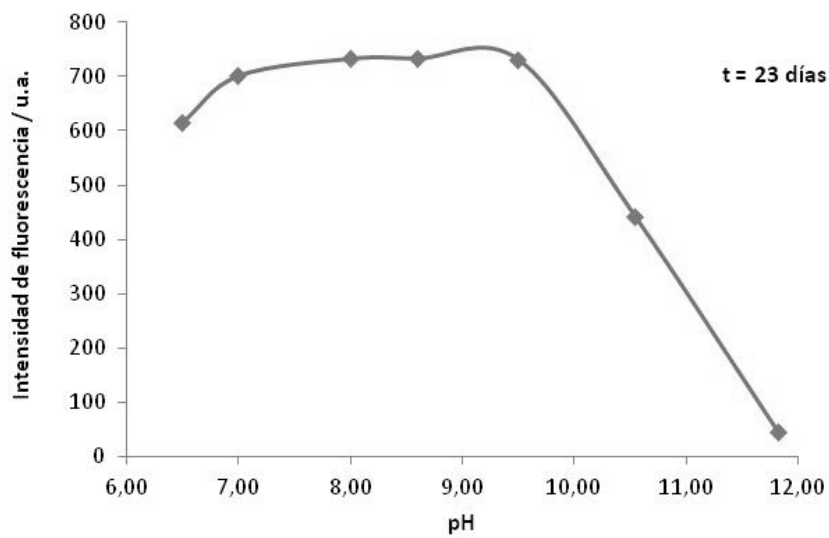
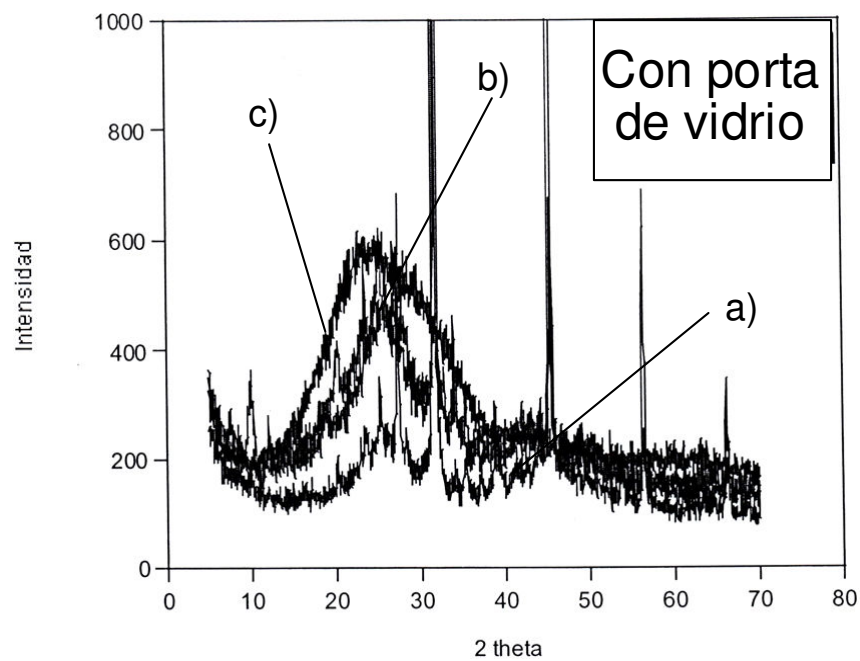


FIGURA 24





- ②① N.º solicitud: 201231506
②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.09.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ANDREY L.ROGACH et al. "Synthesis and Characterization of a Series of Extremely Small Thiol-Stabilized CdSe Nanocrystals" J. Phys.Chem. B 1999 Vol. 103 páginas 3065-3069; apartado Results and Discussion.	1-3,12,13,17,18, 28,29
X	FANG, Tan, et al. "Assemblies of CdSe and polyethylene glycol derivatives for fluorescent hybrid microspheres." Nanoelectronics Conference (INEC), 2010 3rd International. IEEE, 2010. p. 310-311.	1-3,13,14,19
A	PING ZHONG et al. "Preparation and application of functionalized nanoparticles of CdSe capped with 11-mercaptoundecanoic acid as fluorescence probe" Talanta 2006 Vol. 70 páginas 902-906; apartados 1, 2.3.	1-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
07.08.2013

Examinador
V. Balmaseda Valencia

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C01B19/04 (2006.01)**C09K11/88** (2006.01)**B82Y30/00** (2011.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C01B, C09K, B82Y

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, NPL, HCPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.08.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4-11,15,16,19-27	SI
	Reivindicaciones 1-3,13,14,17,18,28-30	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 4-11,15,16,19-27	SI
	Reivindicaciones 1-3,13,14,17,18,28-30	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ANDREY L.ROGACH et al. J. Phys.Chem. B Vol. 103 páginas 3065-3069.	1999
D02	FANG, Tan, et al. Nanoelectronics Conference (INEC), 3rd International. IEEE, p. 310-311.	2010

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la presente invención es un procedimiento de obtención de quantum dots de CdSe en un medio acuoso, los quantum dots resultantes de dicho procedimiento y su uso para marcaje biológico.

El documento D01 describe la síntesis de nanopartículas de CdSe en medio acuoso basado en el uso de mercaptoácidos como estabilizantes. Dicha síntesis comprende la mezcla de 4.7mmol de $\text{Cd}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ con 11.54mmol de mercaptoácido (ácido tioglicólico y tioláctico en agua y el ajuste con NaOH (1M) a 11.2. A continuación, el burbujeo con N_2 durante 30min y la adición de NaHSe (0.05M). Las nanopartículas resultantes tienen un diámetro comprendido entre 2.1nm-3.2 nm (apartados Results and Discussion).

El documento D02 divulga un procedimiento de obtención de microesferas híbridas fluorescentes para su uso en aplicaciones médicas y biotecnológicas partir de quantum dots CdSe. Dichos quantum dots se obtienen a partir de la mezcla de 10mL 4.0×10^{-4} mol/L de CdCl_2 con 1.6×10^{-2} mol/L con ácido mercaptoacético em atmósfera de nitrógeno y el ajuste de pH con NaOH a 11, la adición de 1.6mL 2×10^{-2} mol/L de Na_2SeSO_3 y enfriar la mezcla resultante a temperatura ambiente. Finalmente, se precipitan las nanopartículas de CdSe con acetona, se centrifugan y se realiza una evaporación a vacío (todo el documento).

Así por tanto, las características técnicas recogidas en las reivindicaciones 1-3, 13, 14, 17, 18 y 28-30 son conocidas de los documentos D01-D02.

En consecuencia, se considera que el objeto de dichas reivindicaciones carece de novedad y actividad inventiva (Artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.)

La diferencia entre el objeto de las reivindicaciones 4-12,15,16 y 19-27 y los documentos D01-D02 radica en que ninguno de dichos documentos divulga un procedimiento de obtención de quantum dots CdSe en medio acuoso que comprenda las condiciones experimentales recogidas en dichas reivindicaciones (mercaptoácido en concentraciones comprendidas entre 1M-2M, temperatura de adición del selenosulfato de entre 50°C-100°C, pH comprendido entre 4-7, concentraciones analíticas finales de los iones $[\text{Cd}^{2+}]$ y $[\text{Se}^{2-}]$ en una relación molar de entre 0.5 y 5, etc.)

Además, dichas condiciones experimentales no serían obvias, para un experto en la materia, a partir de los documentos citados.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones 4-12, 15, 16 y 19-27 es nuevo e implica actividad inventiva conforme establecen los Artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.