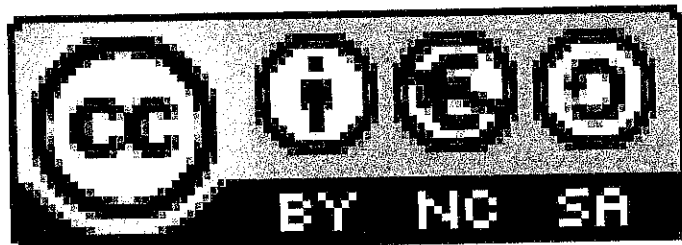
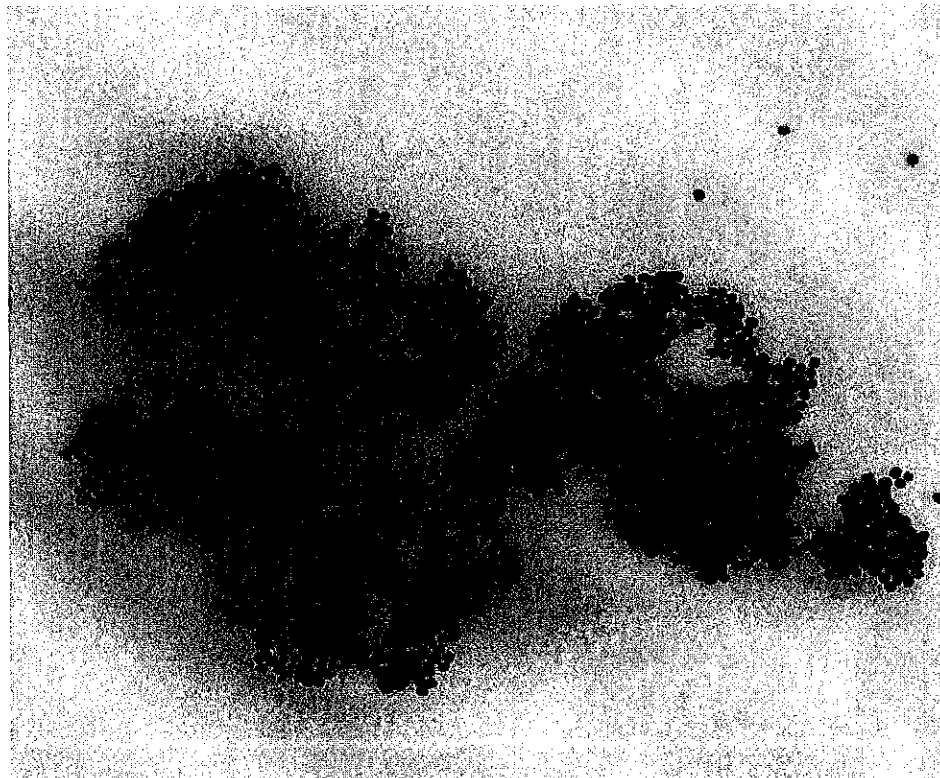


# Síntesi de nanopartícules i la seva aplicació en sensors biològics



Nom: Genís Rabost Garcia  
14/1/13  
2n de Batxillerat  
INS Vilamajor  
Tutor: Albert Navarro



# ÍNDIX

1. Introducció.....	4
2. Introducció a la nanociència.....	6
2.1 Orígens de la nanociència.....	7
2.2 Bases científiques.....	8
2.3 Aplicacions generals.....	10
2.4 Impacte social i tendències.....	15
3. Tipus de nanopartícules.....	18
3.1 Nanopartícules d'or.....	18
3.2 Quantum dots.....	20
3.3 Nanoestructures de carboni.....	21
4. Aparells de microscopia atòmica.....	24
5. Manipulació atòmica i nanofabricació.....	27
6. Nanobiologia i nanobiotecnologia.....	30
6.1 Sensors biològics.....	32
7. Part experimental.....	35
7.1 Síntesi de nanopartícules d'or.....	36
7.2 Immunoassaig amb quantum dots per la detecció d'una proteïna .....	39
7.3 Detecció de Quantum Dots en l'interior d'una cèl·lula.....	42
7.4 Valoració de la part experimental.....	45
8. Conclusions generals.....	46
9. Bibliografia.....	47
10. Agraïments.....	50
11. Annexos.....	51

## **1. INTRODUCCIÓ**

L'inici del meu treball de recerca es remunta a l'abril de 2011. Llavors, vaig ser escollit per formar part d'una beca anomenada "Joves i Ciència" proposada per l'Obra Social de Catalunya Caixa. L'estiu d'aquell mateix any, vaig poder viure una experiència científica de quinze dies al Centre Natura de Catalunya Caixa a Planes de Son ( Pallars Sobirà ) amb cinquanta alumnes més. Gràcies a aquesta beca, aquest estiu he pogut fer una estada a l'Institut Català de la Nanociència ( Universitat Autònoma de Bellaterra ), dins del grup d'investigació de *Nanobioelectronics & Biosensors*.

El meu treball de recerca va sorgir d'aquesta estada a l'Institut Català de la Nanociència on hi vaig realitzar uns experiments molt interessants i vaig adquirir uns coneixements incials sobre nanotecnologia. Abans d'aquesta experiència, la nanotecnologia era un món desconegut per mi, però m'atreia d'una manera especial. Durant la setmana que va durar el projecte, vaig aprendre i disfrutar a parts iguals, a més a més, vaig tenir la oportunitat d'introduir-me en la recerca ja que vaig treballar amb investigadors d'alt nivell.

Ara bé, passada aquesta setmana d'experiències inolvidables, les meves preguntes no van quedar resoltes, al contrari, em va suscitar noves preguntes que em van mostrar la complexitat del món nanomètric. Aquesta motivació va ser la que em va impulsar a realitzar aquest treball de recerca. Així doncs, el meu objectiu és estudiar la nanociència i la nanotecnologia, les seves aplicacions al món quotidià i valorar les seves possibilitats reals en l'àmbit dels sensors. Però, sobretot, aquest treball ha servit per resoldre nombrosos dubtes i inquietuds i hagi pogut comprendre completament els procediments realitzats a l'ICN.

En primer lloc, i amb l'objectiu de conceptualitzar tots els coneixements de la nanotecnologia, he fet una introducció teòrica dels orígens, bases científiques, aplicacions i tendències d'aquesta branca de la ciència. Seguidament, he anat focalitzant la meua investigació teòrica, tocant temes com els tipus de nanopartícules i la microscopia i tècniques de síntesi i manipulació que s'utilitzen en nanociència, fins centrar-me en la nanobiologia i, especialment, en els sensors biològics.

Després d'aquesta aproximació teòrica, he sintetitzat els experiments més rellevants que vaig realitzar a l'ICN entre el 9 de juliol i el 13 de juliol de 2012. La primera experiència va consistir en la síntesi de nanopartícules d'or, d'una mida aproximada de 5 i 20 nanòmetres, per la seva posterior caracterització

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

amb espectrofotometria i el microscopi de transmissió elèctronica. En segon lloc, vaig realitzar una detecció d'una proteïna endosomal mitjançant l'ús d'unes nanopartícules especials, els "quantum dots", i un microscopi confocal. Finalment, vam estudiar la penetració a l'interior de la cèl·lula dels "quantum dots" amb l'ajut d'un anàlisi electroquímic.

Els resultats obtinguts van ser prou satisfactoris, tot i que, repeteixo, l'objectiu, tant del treball com de l'experiència en general, és aprendre i prendre contacte amb el món de la nanociència i de la recerca en general.

Espero que els lectors d'aquest treball el facin servir com una introducció al món de la nanotecnologia, especialment, en l'àmbit biològic i dels sensors.

## 2. INTRODUCCIÓ A LA NANOCIÈNCIA

La nanociència consisteix en l'estudi de sistemes i partícules el tamany dels quals és nanomètric, entre 1 i 100 nanòmetres. Amb la nanociència es pretén conèixer com funciona el món en aquestes dimensions i, així poder aplicar-ho a la nostra vida quotidiana. Així doncs, gràcies als estudis de la nanociència, ha nascut la nanotecnologia, una novedosa branca que ha creat un munt d'expectatives i ha obert un nou món de possibilitats.

Encara que pugui semblar impossible, les nanopartícules han estat utilitzades molt abans de l'aparició de les tecnologies tan avançades que utilitzem actualment. S'ha constatat que ja eren utilitzades per colorejar el vidre i la ceràmica fa dos mil anys. Ara bé, les noves tècniques de microscòpia, les quals permeten l'observació del món nanomètric, han permès descobrir propietats totalment noves degudes a la magnitud d'aquesta escala. Aquestes propietats úniques, només observables en el món nanomètric, són la raó fonamental de la nanociència. D'aquesta manera, l'objectiu de la nanotecnologia és aplicar aquestes propietats úniques en tots els camps imaginables de la vida quotidiana. És a dir, importem les nanocaracterístiques al nostre món macroscòpic.

Ara bé, com és aquest món nanomètric i de què està format? Per fer-nos una idea de l'escala de la que estem parlant, 10 àtoms d'hidrogen representen més o menys un nanòmetre, és a dir,  $10^{-9}$  m. A aquesta escala trobem l'ADN, els àtoms que formen la matèria i la majoria dels processos biològics cel·lulars. Així doncs, poder manipular la matèria a aquesta escala ens permet aprofitar els mecanismes propis de les cèl·lules. Fins i tot, la longitud d'ona de la llum visible ( entre 380 nm i 780 nm ) és més gran que aquests elements. Degut a aquest fet, no es poden identificar els àtoms d'una molècula mitjançant un microscopi òptic, el qual utilitza la llum. En canvi, l'ús de microscopis com el microscopi de forces atòmiques o el d'efecte túnel sí que ho permeten i, per aquest motiu, la seva invenció va esdevenir un avenç cabdal pel desenvolupament actual de la nanociència.

D'aquesta manera, una molècula d'aigua és més petita que un nanòmetre ( formada per dos àtoms d'hidrògen i un d'oxigen ), el diàmetre de la molècula d'ADN és de, aproximadament, 2,5 nanòmetres i el gruix d'una fulla de paper és d'uns 100.000 nanòmetres. Les relacions entre el món nanomètric i el macroscòpic, el nostre, són mostrades en la figura 1.

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

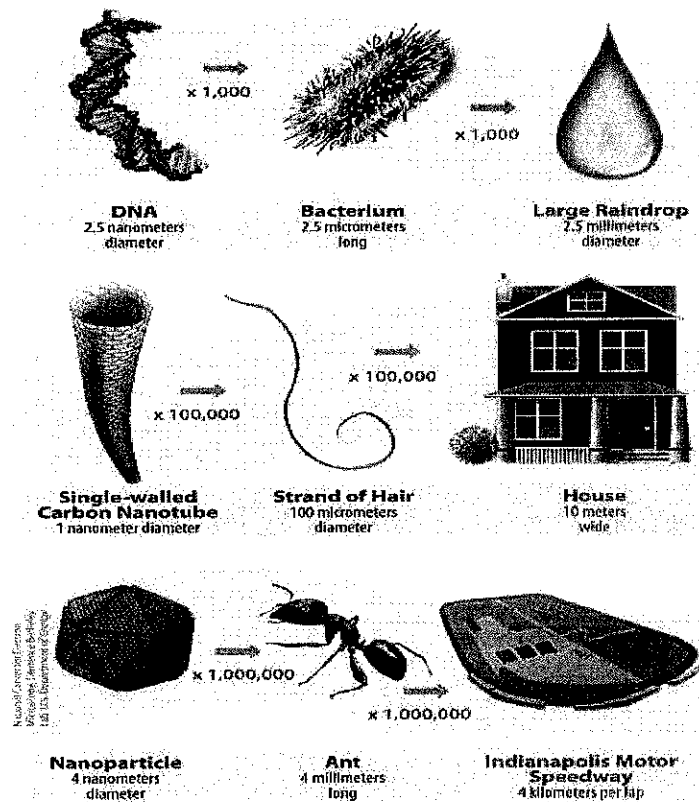


Fig. 1. Proporcions escalars entre el món macroscòpic i el nanomètric (U.S. Departament d'Energia, [nano.gov/html/facts/nanoscale.html](http://nano.gov/html/facts/nanoscale.html) )

### 2.1 ORÍGENS DE LA NANOCIÈNCIA

La nanociència i, per tant, també la nanotecnologia es van iniciar el 1959 a l'Institut de Tecnologia de Califòrnia amb una conferència del famós físic R. Feynman<sup>1</sup> el qual va introduir el fet de manipular els objectes des de l'escala molecular i les interessants oportunitats científicotecnològiques que s'obrien. Tot i això, no va ser fins el 1974 que va aparèixer el terme “nanotecnologia” en l'article *On the Basic Concept of “Nanotechnology”* del professor japonès N. Taniguchi.

La conferència de Feynman, amb el títol *There is plenty of room at the bottom* (Hi ha molt espai al fons), va fonamentar les bases del que, més tard, seria la nanociència. Feynman ja destacava les noves propietats que tindrien els materials realitzats a partir de la col·locació àtom per àtom ja que, segons ell, estarien

1 Richard Phillips Feynman ( 1918 – 1988 ) va ser un físic nord-americà considerat un dels més importants del segle XX. Per el seu treball en electrodinàmica quàntica, va guanyar el premi Nobel de Física l'any 1965. En la seva joventut va participar en el projecte *Manhattan*. Va fer altres contribucions com la nanotecnologia o la computació quàntica.

## SÍNTESE DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

sota el domini de les lleis quàntiques. A més a més, Feynman va demanar l'orientació dels esforços científics a construir els diferents materials a partir de la manipulació dels àtoms i les molècules.

Per tant, Feynman va proposar un canvi de paradigma tecnològic. Actualment, i des de fa molts anys, el model de fabricació ha estat el *Top-down* ( de dalt a baix ) el qual es basa en la reducció d'un material més gran a el que desitgem mitjançant diferents eines de modelar. Podriem fer un símil amb la tècnica dels escultors que amb les seves diferents eines redueixen un bloc de pedra a una figura extraordinària. En canvi, el model proposat per la nanociència és el *Bottom-up* ( de baix a dalt ) del qual partim d'uns components bàsics ( molècules, àtoms, nanopartícules,... ) i nosaltres “construïm” l'objecte. Aquest tipus de fabricació podria ser comparada a la feina d'un mestre d'obra que partint de maons i ciment forma una casa.

Però, les encertades conclusions de Feynman no van poder ser contrastades ja que la possibilitat de manipular els àtoms era impensable en aquella època a causa de la precarietat tecnològica. Així doncs, no va ser fins el 1981, dos dècades més tard, quan dos investigadors del IBM ( Zuric ), G. Binnig i H. Rohrer, van inventar el microscopi d'efecte túnel el qual permetia veure i manipular els àtoms.

Llavors, el 1986, E. Drexler va definir les idees de Feynman en el seu llibre “*Engines of Creation*” on es descriuen les nanomàquines, capaces de construir ordinadors i aparells acoblant molècula per molècula, amb un funcionament similar a estructures cel·lulars com els ribosomes. A més a més, també descriu nano-submarins que recorren les venes en recerca d'antígens i altres dispositius fantàstics. Tot i que moltes de les aplicacions proposades són de ciència-ficció, E. Drexler va fer veure al món les diferents possibilitats que es creaven amb l'estudi de la nanociència.

D'aquesta manera, en aquests últims anys, la ciència ha estat avaluant si totes aquestes fantasies poden fer-se realitat en un futur i quins són els nostres límits en aquest camp. Per aquest motiu és diu que la nanociència i la nanotecnologia són disciplines obertes les quals es defineixen dia a dia, descobrint rere descobriment.

### 2.2 BASES CIENTÍFIQUES

Ara bé, quines són aquestes propietats de les nanopartícules que les fan tan especials? Com ja hem dit anteriorment, aquestes propietats ja eren usades en èpoques antigues, però és ara quan hem pogut estudiar-les i manipular-les i, per tant, utilitzar tot el seu potencial.



## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

En primer lloc, cal destacar les noves propietats que adquireixen els materials en el món nanomètric depenent de la mida de les partícules, de la seva naturalesa i de com són els enllaços entre àtoms. Per demostrar la importància de la mida i la forma en les propietats de les nanopartícules podem observar la variació de color de les diferents mostres de la figura 2.

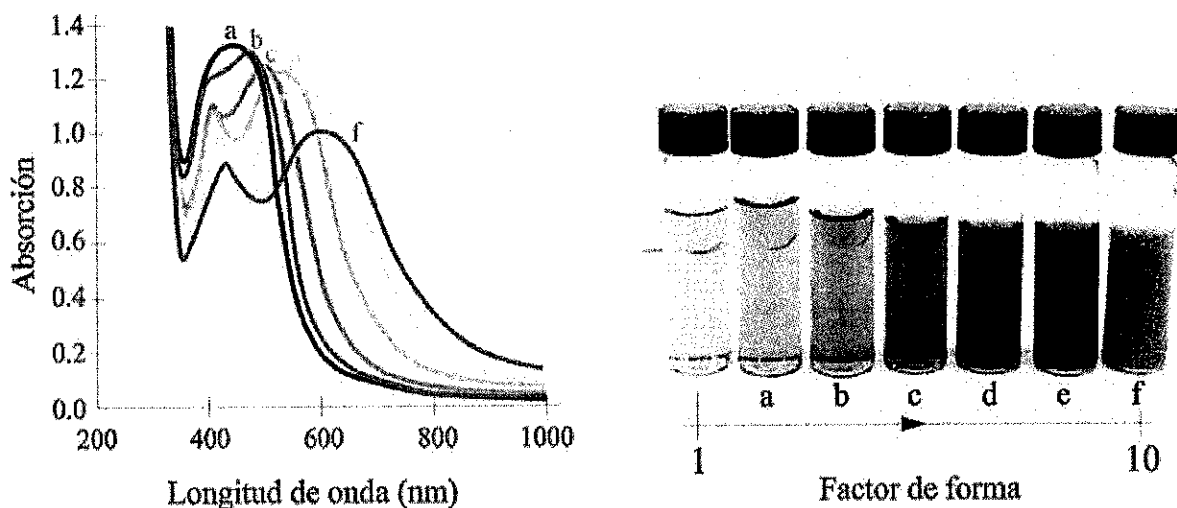


Figura 2. La longitud d'ona de radiació electromagnètica absorbida per les diferents solucions de nanocilindres de plata, excepte el recipient de l'esquerra que conté esferes de 4 nm, varia segons la forma. La forma està en funció de la longitud i el diàmetre fins arribar al valor 10. ( *Murphy, Jana 2002* ).

Per tant, aquest fet ens obre un món de noves propietats que no només depèn de la naturalesa del material sinó que també de la seva mida i forma. Així doncs, característiques com la temperatura de fusió, la fluorescència, la conductivitat elèctrica, permeabilitat electromagnètica i la reactivitat química d'una molècula o element poden ser diferents en una escala nanomètrica. Per exemple, la temperatura de fusió de l'or en estat normal és de 1338 K mentre que la de nanopartícules d'or és 700 K ( *P. Buffat i J. Borel, 1976* ). Això és degut al comportament, en mides de 1 a 100 nanòmetres, de les partícules com un punt quàntic, és a dir, sota l'efecte de les lleis quàntiques. D'aquesta manera, una nanopartícula es comporta com un sol àtom.

A més a més, també influeix la quantitat d'àtoms que ocupen la superfície del material. En partícules de mida molt petita el percentatge d'àtoms superficials, els que interaccionen amb el medi, és major que en els objectes més grans. Per tant, els nanomaterials presenten una major superfície en relació al volum que els materials macroscòpics i, en conseqüència, una major quantitat del material pot reaccionar amb el medi, com s'observa en la figura 3. Aquesta millora de la reactivitat pot aplicar-se en la millora dels

catalitzadors, en produir energia més neta i segura i en processos de tractament d'aigües i dessalinització.

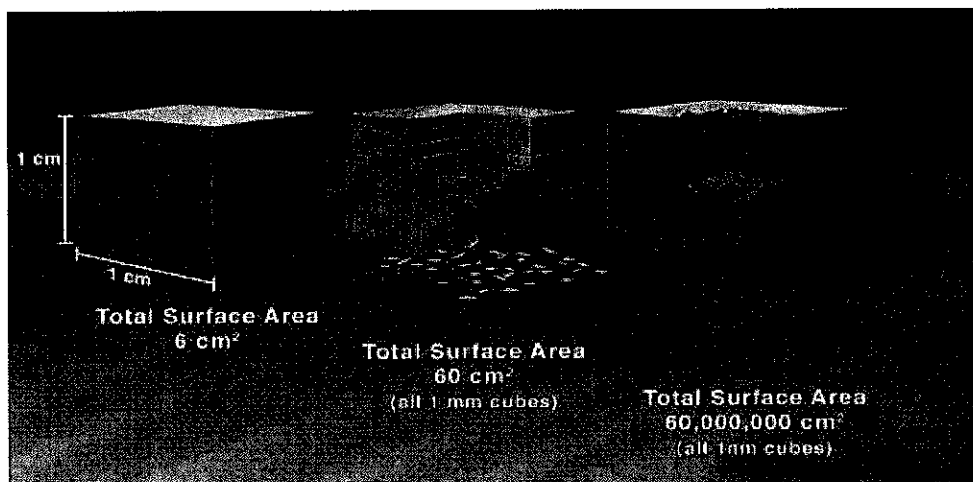


Figura 3. Imatge que demostra l'augment de la superfície gràcies a l'ús de nanomaterials. (<http://www.nano.gov/nanotech-101/special>)

### 2.3 APLICACIONS GENERALS

La nanotecnologia és un camp obert i interdisciplinari, per tant, és lògic que els seus avenços també afectin a una multitud de branques totalment diverses de la tecnologia amb l'objectiu de repercutir favorablement en la societat. Els beneficis en la societat els podem classificar segons l'àmbit d'aplicació.

#### **MATERIALS I PROCESSOS QUOTIDIANS**

Una de les grans finalitats de la nanotecnologia és millorar les característiques dels productes; fer-los més durs, lleugers, duraders, millorar la seva conductivitat o reactivitat,..., tot això gràcies a les propietats intrínseques de les nanopartícules. Així doncs, actualment, es comercialitzen més de 800 productes que han estat millorats gràcies als processos nanotecnològics. En són exemple d'això:

- Alguns bats de bàisbol, raquetes de tennis, cascos de motocicleta, para-xocs d'automòbils, equipatges i caixes d'eines porten incorporades nanopartícules les quals els fan més lleugers, rígids i resistents.
- Tractaments de superfície a nanoescala o l'addició de nanopartícules en teixits poden evitar l'aparició d'arrugues, taques, del creixement bacterià i millorar la resistència de les cuirasses antibales.
- Pel·lícules primes de nanopartícules aplicades sobre finestres, vidres d'ulleres, pantalles d'aparells o altres superfícies poden convertir-les en hidrofòbes, anti-reflectants, autonetejable, conductors elèctrics o protegir-la de raigs ultraviolats o infrarojos.

## SÍNTESE DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

- En la indústria alimentària, la nano-enginyeria pot ajudar a preservar amb millor qualitat els aliments, per exemple, evitant l'oxidació dels aliments. A més a més, s'estan introduïnt nanosensors que detecten aliments en mal estat o determinats grups de bacteries nocives pels aliments com la salmonel·la.
- Nano-enginyeria aplicada a aparells automotrius on s'inclouen sistemes de bateria recargable, materials termoelèctrics pel control de la temperatura i, bàsicament, per la millora de l'eficiència d'aquests aparells.
- Millorar els productes de neteja o desengreixants domèstics mitjançant nanopartícules.
- Nanoestructures de ceràmica utilitzades com a recobriment de peces de màquinaria diversa augmenten la duresa del material i, per tant, la seva resistència i durabilitat. Com a exemple, podem posar la Marina dels EUA que utilitzant aquesta tecnologia en els engranatges dels aires acondicionats dels seus vaixells s'ha estalviat 20 milions de dòlars en manteniment. Així doncs, l'ús d'aquests recobriments poden allargar la vida útil dels components mòbils de tot tipus de màquinaria.
- Les nanopartícules també són extensament usades en catàlisi de reaccions estalviant quantitat de catalitzadors i, en conseqüència, diners i contaminants.

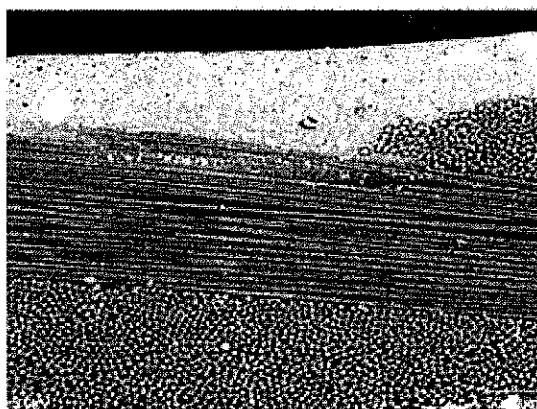


Figura 4. Imatge d'una nanoestructura de silici amb unes propietats termals i mecàniques molt interessants per l'aplicació com a material d'emmagatzematge de aliments i combustibles.

## ELECTRÒNICA I LA TECNOLOGIA DE LA INFORMACIÓ

Actualment, la nanotecnologia ja és usada en computació, comunicació i aparells electrònics per tal de ser més ràpids, més petits i manejables. És evident el constant desenvolupament d'aquest camp en els últims anys i la seva evolució ha estat definida per l'ús d'aquestes tecnologies.

- Transistors nanomètrics més potents i més eficients energèticament.

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

- Memòria d'accés aleatori magnètic ( MRAM ) realitzat per unions magnètiques a nanoescala que pot recuperar dades xifrades després del tancament del sistema o d'un accident amb l'objectiu de poder recopilar dades.
- Una gran part de les pantalles de televisions, ordinadors i altres aparells electrònics disposen d'una pel·lícula de un polímer nanoestructurat anomenat OLED. Aquest material proporciona unes imatges més brillants, angles de visió més amplis, un pes més lleuger, major densitat d'imatge i més vida útil.
- Altres productes com xips de memòria flash, materials repel·lents als bacteris i virus, tintes d'impressora o videojocs realistes també presenten nanoestructures.

## ENERGIES SOSTENIBLES

Avui dia, hi ha una demanda energètica creixent degut a l'augment de la població i de necessitats. Tanmateix, les energies del futur han de ser respectuoses amb el medi ambient i ser el màxim d'eficients. Per aconseguir aquest propòsit s'estan desenvolupant noves tecnologies.

- Els prototips de panells solars, utilitzant nanopartícules, són més eficients que els estàndard en convertir la llum solar en energia i creen la possibilitat d'una energia il·limitada i de baix cost en un futur. Les cèl·lules solars nanoestructurades són fabricades mitjançant processos d'impressió i poden ser materials flexibles fet que les converteix en productes més barats i fàcils d'instal·lar que els panells solar sòlids, com en la figura 5. Fins i tot, s'ha estudiat la possibilitat de crear convertidors d'energia solar mitjançant unes pintures especials.



Figura 5. Imatge d'una cèl·lula solar flexible i lleugera amb nanopartícules. (Nanosys).

- L'ús de la nanotecnologia està millorant l'eficiència de la producció de combustible a partir del petroli. A més a més, de la millora de la producció en les centrals elèctriques i en els automòbils disminuint la fricció.
- La conversió de la cel·lulosa de les estelles de fusta, de les tiges de blat de moro o de les grasses perennes no fertilitzades,... a etanol utilitzat com a combustible gràcies a enzims creats per la nano-bio-enginyeria.
- La nanotecnologia és ja utilitzada en diverses bateries per fer-les menys inflamables, amb menys temps de càrrega, més lleugeres i, sobretot, més duraderes.

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

- Els científics també estan desenvolupant nous materials per tal de emmagatzemar l'hidrogen en les piles de combustible alternatives i nous catalitzadors per millorar la reacció duta a terme.
- S'estan desenvolupant tecnologies relacionades amb les nanoestructures per convertir la calor despresada per diferents aparells com els ordinadors o la televisió en energia elèctrica profitosa.
- Les pales dels aerogeneradors estan fetes amb resina epoxi, un polímer orgànic termoestable, que conté nanotubs de carboni que el converteixen en un material més llarg, fort i lleuger que altres tipus de pales i, en conseqüència, s'augmenta el rendiment dels aerogeneradors.
- L'ús dels nanotubs de carboni com substituents dels cables actuals d'alta tensió de la xarxa elèctrica ha estat estudiada per els investigadors degut a la menor resistència dels nanotubs que reduiria la pèrdua de potència.
- Per recarregar aparells electrònics mòbils, els investigadors han desenvolupat fines pel·lícules que són cèl·lules solars que recarguen els dispositius i nanocables piezoelèctrics (materials que al ser sotmesos a forces mecàniques es crea una polarització elèctrica i, per tant, càrregues elèctriques en la seva superfície ) teixits a la roba que generen electricitat mitjançant la calor corporal o la fricció.
- En definitiva, han aparegut un seguit de productes eficients energèticament. Entre ells destaquen lubricants creats a partir de la nano-enginyeria per tal de reduir al mínim les friccions en els engranatges de la màquinaria i, així, evitar pèrdues energètiques.

## MEDI AMBIENT

A més a més de l'estalvi energètic que suposa l'ús de la nanotecnologia en diversos sectors, també s'han desenvolupat materials que contribueixen a cuidar el medi ambient.

- Per mitjà de la nanotecnologia, en un futur no molt llunyà s'haurà aconseguit potabilitzar aigua amb un mètode senzill i eficaç. Per exemple, s'ha descobert una interacció magnètica entre petitíssims agregats d'òxid i elements tòxics com el arsènic i el tetracolor de carboni que podria ajudar a separar-los de l'aigua.
- També s'està estudiant la possibilitat d'utilitzar les nanopartícules com a netejadors del contaminants tòxics de l'aigua subterrànea gràcies a reaccions químiques que podrien evitar l'elevat cost actual del tractament.
- S'ha desenvolupat un material, teixit a partir de nanocables d'òxid de manganès-potassi, que absorbeix 20 vegades més d'oli, en relació al seu pes, per funcions de neteja.
- Els filtres d'aire de molts vehicles estan basats en la nanotecnologia. El material presenta uns

## SÍNTESE DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

- porus nanomètrics que atrapen les partícules majors que ells mitjançant la filtració mecànica.
- Nous sensors seran capaços de detectar, identificar i eliminar o neutralitzar elements químics o agents biològics nocius amb una eficàcia major que l'actual.

## MEDICINA I SALUT

La nanobiotecnologia ens permet crear un seguit de noves tècniques i processos que ajudarien a facilitar els tractaments sobre determinades malalties, a més a més de convertir-los en més personalitzables i segurs.

- Els “quantum dots” poden ser utilitzats, gràcies a les seves propietats fotòniques, per crear les imatges biològiques que, més tard, s'estudiaran per realitzar el diagnòstic. Aquestes nanopartícules, que absorbeixen llum ultraviolada i emeten llum de diferents freqüències, s'utilitzen com a localitzadors de cèl·lules específiques o elements particulars amb una detecció òptica molt major que els tints convencionals. Aquesta aplicació de la nanobiotecnologia serà la que utilitzarem en la pràctica central en la qual detectarem una proteïna endosomal mitjançant “quantum dots”.
- Gràcies a una combinació d'anticòs-nanopartícula que s'uneix a les plaques d'ateroma formades per l'arteriosclerosi, podem detectar precoçment l'aparició d'aquesta malaltia.
- Ús de les nanopartícules per dirigir específicament els tractaments a les cèl·lules diana com, per exemple, cancerígenes, evitant l'acció nociva sobre altres teixits.
- S'està estudiant l'aplicació de nanopartícules com a estimulants de la regeneració de teixits nerviosos que han patit danys. Per exemple, l'ús d'un gel nanoestructurat que s'introdueix en l'espai intracel·lular i afavoreix el creixement de noves cèl·lules.

## TRANSPORT

Ja hem parlat de la necessitat de millorar l'eficiència dels vehicles i de les fonts d'energia, però també cal un avenç pel que fa a les infraestructures relatives al transport.

- La nano-enginyeria aplicada a l'acer, el ciment, i altres materials pot conferir a aquests elements una resistència i durabilitat major que els materials usats actualment en les vies de transport.
- Si apliquem els nanosensors al manteniment de les infraestructures, aquests podrien proporcionar informació sobre l'estat dels materials de forma més fiable i senzilla. A més a més, també es podrien aplicar en sistemes de conducció automàtica del vehicle per tal de minimitzar els riscos d'accidents.

Com hem pogut veure, la nanotecnologia és oberta a qualsevol àmbit de la tecnologia i es poden aprofitar de les propietats úniques que proporciona el fet d'utilitzar nanopartícules.

### 2.4 IMPACTE SOCIAL I TENDÈNCIES

La nanotecnologia ha creat un gran impacte sobre la societat i, com a prometedora nova via d'explotació industrial, s'han generat grans expectatives sobre les seves possibilitats. És més, hi ha molta gent, investigadors, empresaris i polítics, que estan molt interessats amb l'expansió de la nanotecnologia com a mitjà de proporcionar grans beneficis econòmics.

Ara bé, de la mateixa manera, també han sorgit veus que alerten dels possibles riscos de l'ús de nanopartícules en la nostra vida quotidiana. Els seus arguments es basen en què no hem arribat a conèixer els veritables efectes de les nanopartícules en el nostre cos i al medi ambient. Aquest fet es podria comparar amb les crítiques a moviments científics anteriors com l'energia nuclear o la biotecnologia agrícola. Actualment, l'opinió sobre les centrals nuclears és molt controvertida, a Estats Units el desenvolupament d'aquest tipus de font d'energia ha estat frenat i gairebé eliminat. Així doncs, podem concloure que si una nova ciència vol triunfar també ha de convèncer a la societat dels seus beneficis. Aquest cas també s'ha donat amb la preocupant alarma que, en els últims anys, s'ha produït davant la producció d'aliments transgènics i la seves conseqüències sobre l'organisme. Per tal de combatre aquest rebuig, cal informar a la població sobre les noves tecnologies, dels seus beneficis, però també dels seus riscos.

Per exemple, un dels perills de les nanopartícules és l'ús de pel·lícules que les recobreixen amb la finalitat d'evitar l'aglomeració i formar partícules més grans. Per tant, aquestes nanopartícules i la seva alta reactivitat poden mantenir-se durant llargs períodes en el medi ambient.

De la mateixa manera, un estudi recent ( *Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells* Shvedova, A.A, 2003 ) ha demostrat els efectes nocius en cèl·lules de la pell davant de l'exposició a certs nanotubs de carboni, amb resultats més tòxics que el quars. Fins i tot, de l'exposició prolongada en deriva necrosis, la mort de les cèl·lules.

Tot i els nous descobriments sobre els potencials efectes nocius dels productes relacionats amb la nanotecnologia, la tendència d'aquesta branca és molt esperançadora. Sense cap mena de dubte, és el

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

camp més innovador i el que presenta un índex d'evolució major. Hi ha estudis que comparen la nanotecnologia amb avenços tan fonamentals per la societat actual com l'aparició del automòbil i del tren o dels ordinadors, com es pot veure en la figura 6.

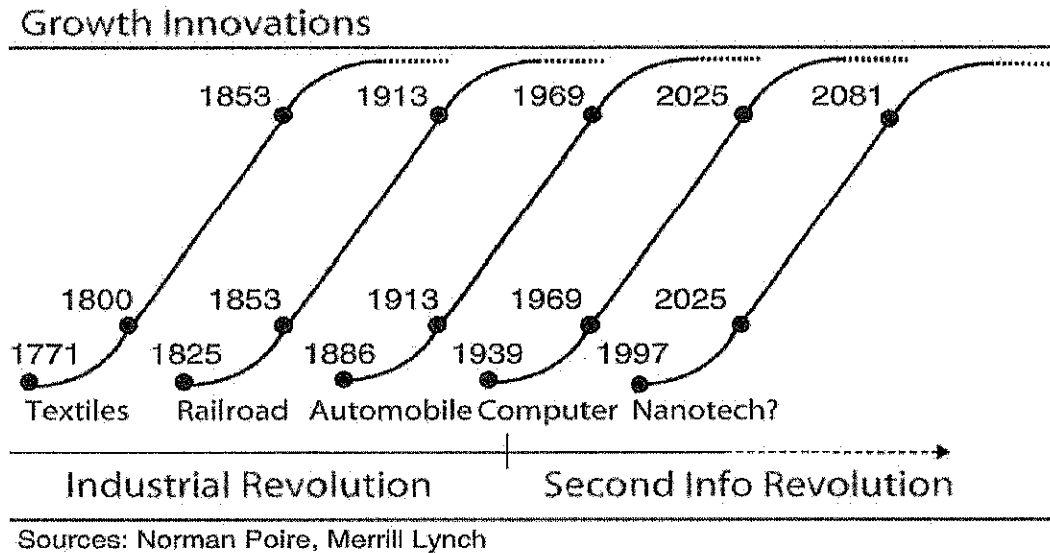


Figura 6. Esquema que ens mostra els diferents descobriments que han revolucionat la societat. És el cas de la nanotecnologia?

Per quantitzar l'impacte econòmic que ha generat la nanotecnologia, ens podem fixar en la despesa global pública que s'ha realitzat des del 2004, observable en la figura 7. Com podem veure, hi ha present un creixement molt important, aproximadament del 130%, entre 2004 i 2008. Ara bé, el creixement registrat entre 2008 i 2012 no supera el 10%. Cal esmentar la profunda crisi econòmica que, malauradament, ha frenat aquest desenvolupament tan accelerat. A més a més, d'un canvi d'orientació de la nanotecnologia de la investigació cap a l'aplicació dels coneixements adquirits en solucions viables pels problemes globals com el canvi climàtic. Tot i això, s'espera un increment de la inversió en nanotecnologia en els pròxims anys.



### Global Government Funding of Nanotechnologies

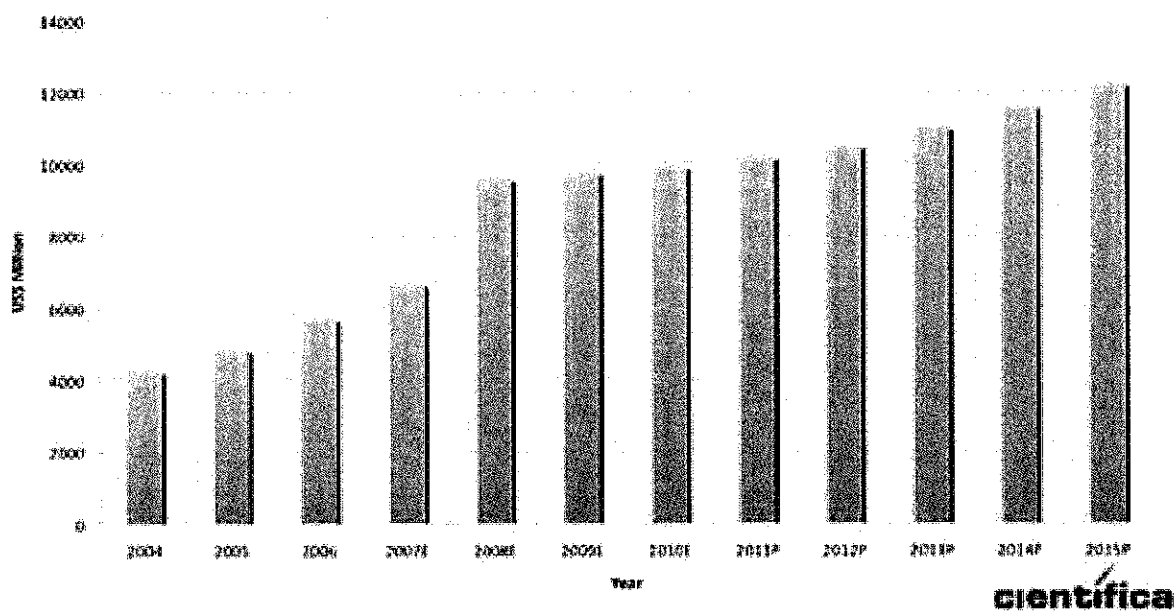


Figura 7. Gràfica de l'evolució de la despesa global anual en nanotecnologia per part dels governs dels diferents països entre 2004 i 2015.

### 3. TIPUS DE NANOPARTÍCULES

Com s'ha dit anteriorment, la nanotecnologia utilitza les propietats exclusives de les nanopartícules ( partícules amb, com a mínim, una dimensió menor de 100 nanòmetres ) per aplicar-les al món macroscòpic formant nous materials. Aquestes nanopartícules, que poden estar formades per només uns milers d'àtoms, també són caracteritzades per la seva naturalesa, com les nanopartícules d'or o de bismut. A continuació, es detallen les característiques de les nanopartícules amb unes aplicacions més prometedores.

#### 3.1 NANOPARTÍCULES D'OR

Les nanopartícules d'or ( AuNPs ), i en general les nanopartícules de metalls nobles, presenten unes propietats físiques, químiques i biològiques inesperades. En el cas de les AuNPs, cal destacar les seves propietats fototèrmiques, la possibilitat de produir partícules de diferents mides i formes i la facilitat per conjugar-les amb lligands com anticossos, polímers, fàrmacs, material genètic,... A més a més, cal mencionar la seva biocompatibilitat i baixa toxicitat, encara que s'ha observat que els efectes tòxics de les AuNPs poden estar lligats a determinades formes i mides de les partícules. D'aquesta manera, les AuNPs es converteixen en una eina molt interessant en el camp de la biomedicina.

Les propietats fototèrmiques de les AuNPs es deuen a les oscil·lacions ressonants dels seus electrons lliures, que o bé poden radiar llum o bé absorbir-la i transformar-la en calor. La irradiació de les AuNPs s'utilitza en l'obtenció d'imatges. En canvi, la conversió de radiació electromagnètica d'una determinada freqüència a radiació calorífica s'està estudiant àmpliament per tal de tractar selectivament cèl·lules tumorals, alliberar molècules a voluntat, eliminar bacteris i virus o desnaturalitzar proteïnes o àcids nucleics. La funcionalització de les AuNPs amb diferents elements es sol produir mitjançant enllaços tiol, encara que també es pot enllaçar amb grups amino, fosfit i bisulfit. Utilitzant aquestes característiques especials, les aplicacions més prometedores de les AuNPs en el camp terapèutic són la terapia gènica, la terapia fototèrmica, la vectorització de fàrmacs i l'alliberament de macromolècules.

Les AuNPs poden ser utilitzades com a nanotransportadores de fàrmacs i diferents molècules, però també sistemes que alliberen la seva carga en funció d'estímul intern ( canvi de pH o la concentració de

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

glutatió ) o externs ( aplicació de radiació electromagnètica ). Un cas de l'ús de les nanopartícules d'or en aquest àmbit, és l'estudi proposat per Bhumkar<sup>1</sup> per tal d'efectuar el transport transmucosal de l'insulina. Les AuNPs són recobertes amb un polímer quitosà al qual s'hi adhireixen les molècules d'insulina i administrades per via nasal o oral. Aquest mètode obté uns resultats d'eficiència comparables a l'insulina injectada directament a la sang.

Fins i tot, la propietat fototèrmica també pot ser utilitzada per alliberar molècules a voluntat. Així doncs, si recobrim l'element a alliberar amb AuNPs podrem eliminar aquesta recoberta gràcies a l'escalfor produïda per l'aplicació de llum làser.

Per poder dur a terme la terapia gènica cal transportar els àcids nucleics fins el nucli de les cèl·lules i, per tant, hem d'utilitzar un transportador que eviti la degradació del àcid nucleic per l'acció de diferents enzims i que, alhora, favoreixi la seva introducció en el nucli cel·lular i el seu alliberament. Per realitzar aquesta funció, s'han utilitzat diversos elements ( virus, materials sintètics,... ), però, últimament, les AuNPs han demostrat ser unes transportadores de gran eficàcia.

En la terapia del càncer, les nanopartícules d'or també han resultat ser una opció viable. En primer lloc, les AuNPs permeten la vectorització dels fàrmacs en les cèl·lules tumorals, millorant la seva eficàcia i evitant possibles efectes secundaris a la resta de l'organisme. Així doncs, una nanopartícula d'or associada a un anticòs específic, que s'uneix a les cèl·lules cancerígenes, i a un fàrmac antitumoral, que podria ser alliberat mitjançant la irradiació d'un determinat tipus de radiació electromagnètica, seria un sistema terapèutic prou eficaç. A més a més, la propietat fototèrmica de les AuNPs, que al ser irradiades amb llum làser d'una freqüència aproximada d'entre 10 i 50 nanòmetres desprenen calor ( entre 40 i 80° ), provoca un dany irreversible a l'estructura de les cèl·lules tumorals que desencadena la seva mort. Aquest procés no es dona en les cèl·lules sanes, les quals requereixen una major potència, i s'anomena fototerapia o tractament del càncer per hipertèmia.

Degut a totes aquestes propietats i aplicacions, les nanopartícules d'or tenen unes grans perspectives de futur en nombrosos camps, però, sobretot, en la biomedicina.

---

<sup>1</sup> Joshi, H.M., Bhumkar, D.R., Joshi, K., Pokharkar, V & Sastry, M. (2006) Gold nanoparticles as carriers for efficient transmucosal insulin delivery. *Langmuir*. 22: 300-305.

### 3.2 QUANTUM DOTS

Els “quantum dots” o punts quàntics són estructures molt petites, d'un diàmetre d'entre 2 i 10 nanòmetres, d'un material semiconductor i que formen un nanocristall que es comporta com un sol àtom. En general, solen estar formats per seleniurs o sulfurs d'un metall com el cadmi o el zinc ( CdSe o ZnS ). Els punts quàntics presenten un espectre discret d'energia quantitzada.

A causa de la seva petita mida, els punts quàntics presenten unes propietats òptiques i electròniques diferents que en un estat normal. Aquestes partícules, al absorbir fotons d'una energia determinada, emeten radiació electromagnètica d'una determinada freqüència. A més a més, aquesta freqüència depèn de la grandària del punt quàntic, no de la naturalesa del material, i és molt específica. Com més petit és el punt quàntic, la seva freqüència d'emissió és més alta i, a mesura que la grandària augmenta, aquesta disminueix. Per tant, mitjançant diversos mètodes de síntesi podem aconseguir partícules amb unes propietats pròpies i que, per exemple, emetin el tipus de llum que volem. En els últims anys, els “quantum dots” han estat introduïts en nombrosos camps com la biomedicina o la electrònica. En primer lloc, el seu ús com a transistors electrònics permetrà la miniaturització dels circuits electrònics i, alhora, incrementar la seva eficàcia.

Gràcies a la seva fluorescència, fàcil de modificar i de gran rendiment, els punts quàntics són útils en biologia i medicina per la detecció de diferents elements. Els punts quàntics, com les nanopartícules d'or, es poden unir a altres molècules com anticossos que, a la vegada, s'enllaçen amb proteïnes. Així doncs, trobem que el “quantum dot” ha estat unit a una proteïna determinada ( cada anticòs és específic a una proteïna ) i, si irradiem el sistema amb llum, podem detectar la llum emesa pel “quantum dot” i certificar la presència de la proteïna. Alguns “quantum dots” estan recoberts per una membrana protectora per tal de protegir l'organisme de la seva toxicitat. Aquest mateix procediment pot ser utilitzat amb altres elements intracel·lulars i, per tant, pot ser un substitut viable dels clàssics colorants utilitzats en biologia molecular. Gràcies a aquest senzill mètode podem detectar, per exemple, una proteïna essencial en el inici d'una malaltia i, en conseqüència, diagnosticar-la.

Una altra branca on els punts quàntics tenen una gran perspectiva de futur són les energies renovables. El rendiment de les plaques solars amb una superfície de punts quàntics és molt major que les actuals, el qual és el principal problema d'aquestes. D'aquesta manera, millorant aquest aspecte, l'energia solar seria equiparable a altres fonts d'energia com el carbó i impulsaria l'ús de les energies renovables.

### 3.3 NANOESTRUCTURES DE CARBONI

Fins l'any 1985, les úniques formes alotròpiques conegudes del carboni eren el grafit i el diamant. Harold Kroto ( Universitat de Sussex ) i altres investigadors van observar, en experiments d'espectroscopia molecular, molècules amb exactament 60, 70 o més àtoms de carboni. Mitjançant la irradiació làser d'un tros de grafit, van descobrir els ful·lerens, molècules de carboni formades per anells hexagonals i pentagonals, que conformen estructures esfèriques i cilíndriques. El nombre d'àtoms que conformen els ful·lerens pot variar, essent el més conegut el format per 60 àtoms ( $C_{60}$ ). De la mateixa manera, la forma geomètrica dels ful·lerens pot ésser diferent. Els ful·lerens amb forma esfèrica reben el nom de "buckyballs" mentre que els cilíndrics, "buckytubes" o nanotubs. El 1990 ja van aparèixer els primers mètodes de síntesi de ful·lerens, per tant, es va produir una notable expansió en el seu estudi.

La paret monoatòmica que conforma l'estructura dels ful·lerens és el grafè, una xarxa cristal·lina de forma laminar formada per àtoms de carboni enllaçats amb hibridació  $sp^2$ . El grafè és la unitat bàsica de tots els compostos grafitics: pot conformar ful·lerens esfèrics, nanotubs i, fins i tot, el grafit, que és el resultat de la superposició de moltes làmines de grafè gràcies a les forces de Van der Waals. La relació entre aquests materials es pot distingir en la figura 8.

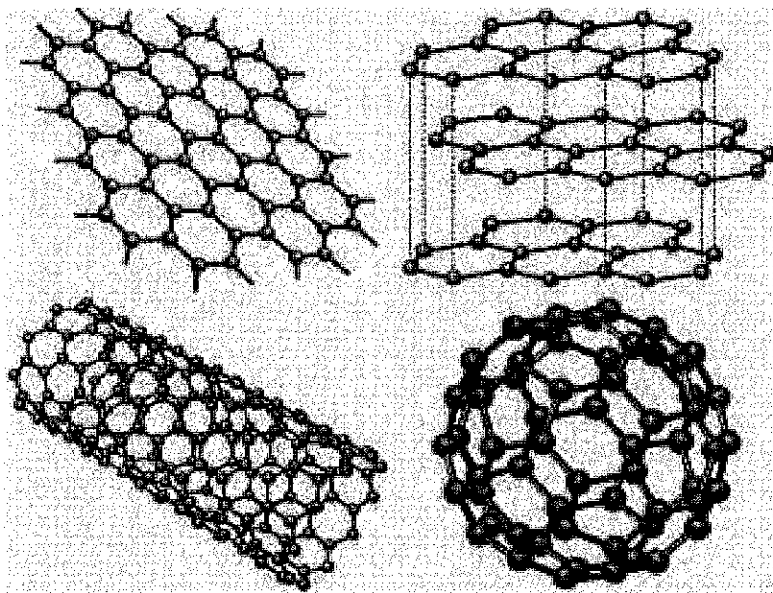


Figura 8. El grafè ( a dalt, esquerra ) és una xarxa cristal·lina d'àtoms de carboni enllaçats formant hexàgons. El grafit ( a dalt, dreta ) és una superposició de capes de grafè. En canvi, els nanotubs de carboni ( a baix, esquerra ) es formen enrotllant el grafè. Finalment, en els ful·lerens esfèrics ( a baix, dreta ),  $C_{60}$ , s'introdueixen pentàgons en la capa de grafè que proporciona aquesta forma.

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

El grafè no va ser aïllat fins el 2004, quan Andre Geim i Kostya Novoselov van aconseguir-ho mitjançant la dissecció del grafit amb un element adhesiu. Actualment, és possible detectar el grafè amb un simple microscopi òptic gràcies a l'efecte òptic que produeix en un substrat de  $\text{SiO}_2$ .

El grafè és un semi-metall, és a dir, presenta característiques semblants als semiconductors i als metalls, per tant, és un conductor elèctric i tèrmic. A més a més, presenta una gran resistència i duresa, alhora que també una gran flexibilitat deguda a la naturalesa dels seus enllaços. Cal destacar la seva lleugeresa, un metre quadrat de grafè pesa només 0,77 mg. Encara que el grafè no és un material molt reactiu, és a dir, en condicions normals és pràcticament inert, permet la seva conjugació amb altres molècules ( F-, OH-,... ) i, en conseqüència, obtenir compostos amb propietats úniques. En l'àmbit elèctric, el grafè presenta un menor Efecte Joule ( pèrdua d'energia dels electrons al xocar amb les molècules conductores que es transforma en calor ) que altres materials com el silici, per tant, la seva resistència elèctrica també és menor, fet que el converteix en un eficaç conductor. Tot i que el grafè és el material més prim que es coneix, el seu gruix és d'aproximadament 0,33 nm, és visible a ull nu ja que absorbeix un 2,3% de la llum, un percentatge extremadament alt per un material amb una sola capa d'àtoms.

Degut a les seves condicions electròniques, l'aplicació potencial més prometedora del grafè és el seu ús com a transistor en circuits integrats. El grafè té una alta mobilitat d'electrons i poc soroll, però presenta la impossibilitat, de moment, de produir-lo en el substrat adient. A més a més, les seves propietats mecàniques obren la possibilitat de produir aparells electrònics flexibles. Gràcies a aquestes interessants propietats mecàniques, el grafè també es conjuga amb altres materials com plàstics per millorar les seves condicions com la lleugeresa i resistència. Així doncs, el grafè és un nou material d'estudi en tots els camps de la tecnologia.

Les interessants propietats dels ful·lerens esfèrics rau en la seva singular estructura que ens permet utilitzar-los, principalment, com a transportadors de molècules, ja sigui unides a la superfície o bé tancades al seu interior. Tot i això, els camps d'aplicació d'aquestes molècules esfèriques són molt diversos i, encara, estan en procés d'investigació.

Un altra molècula de carboni que ha demostrat ser una eina viable són els nanotubs de carboni. Primerament, cal remarcar les propietats físiques dels nanotubs de carboni: molt més lleuger i resistent que l'acer i amb una mida molt inferior. D'aquesta manera, són estudiats com una alternativa com a

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

material de construcció. Les seves condicions electròniques són rellevants, pot actuar com a conductor, semiconductor o aïllant. La variació de les propietats elèctriques depèn de com formem l'estructura, de manera recta o amb un cert angle. Així, aquests filaments, amb un diàmetre nanomètric i una longitud variable, seran capaços de conformar els circuits integrats i reduir les seves dimensions, o bé formar els díodes o transistors mitjançant la creació de defectes en la molècula ( convertint-la en semiconductor ). Els nanotubs de carboni poden ser aplicats, no només a l'electrònica, sinó que també en el de l'electricitat, formant els cables d'alta tensió ja que, a temperatura ambient, poden transportar grans quantitats de càrrega.

En conclusió, les diferents molècules que pot formar el carboni representen una branca d'estudi en el camp de la nanotecnologia de molt interès per les seves propietats mecàniques i electròniques. Però, i aquest és el causant de les il·limitades aplicacions de la nanotecnologia, existeixen moltes més tipus de nanopartícules, de diferents elements, formes i mides, que proporcionen als investigadors noves propietats amb les quals jugar.

## 4. APARELLS DE MICROSCOPIA ATÒMICA

L'expansió actual que ha desenvolupat la nanotecnologia és deu, en gran part, en els avenços significatius que s'han produït en el camp de la microscopia. Com ja sabem, els àtoms no es veuen a simple vista i, sense les capacitats tecnològiques actuals, la possibilitat de manipular els materials a escala atòmica, com proposava Feynman, semblava una quimera.

Pels volts de la dècada de 1930, van aparèixer un nou tipus de microscopis, els electrònics, que presentaven una resolució molt major que els òptics ( en els quals es pot observar fins, aproximadament, un micròmetre ), de fins a 100 nanòmetres. Els microscopis electrònics es basen en focalitzar un feix d'electrons a la mostra i, llavors, mitjançant uns detectors analitzar tots els processos resultants ( creació d'electrons secundaris, electrons estàtics, raigs X o catodeluminiscència ) per crear la imatge. El microscopi electrònic de rastreig o SEM és un microscopi electrònic en el qual el feix d'electrons és produït per un filament incandescent i la imatge és formada per la superposició de les diferents interaccions entre el material i els electrons. A més a més del SEM, existeix el microscopi electrònic de transmissió o TEM que, basant-se en el mateix concepte que el de rastreig, forma la imatge a partir de les senyals detectades pels electrons que han travessat la mostra. Com que no hi ha una gran freqüència de pas d'electrons a través de la mostra, cal que el feix d'electrons tingui una gran energia ( entre 80 i 400 keV, mentres que en el SEM es troba entre 1 i 40 keV ) i reduir el gruix de la mostra, entre 100 i 200 Å (  $10^{-10}$ m ).

Ara bé, la revolució significativa en el camp de la microscopia que va tenir un gran impacte en la nanotecnologia van ser els microscopis de sonda de rastreig. El 1981, Gerd Binig i Heinrich Rohrer van desenvolupar el microscopi d'efecte túnel i, cinc anys

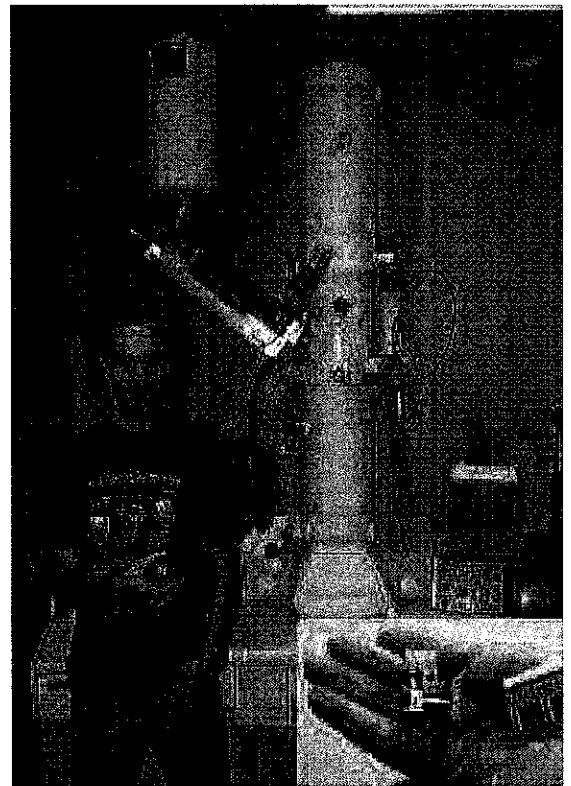


Figura 9. Fotografia on es mostren el microscopi electrònic de transmissió ( al fons ) i el microscopi d'efecte túnel ( mà del investigador ). Es pot observar la diferència de mida.



## SÍNTESE DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

Gerber van presentar el microscopi de forces atòmiques, una millora de l'anterior. Amb aquests tipus de microscopis podem observar els àtoms amb una gran resolució, obtenir imatges tridimensionals i estudiar mostres en tot tipus d'ambients ( al buit, aire, líquids,... ). A més a més, no malmetem el material a analitzar fet pel qual són una gran eina en l'estudi de mostres biològiques. Fins i tot, aquests microscopis són significativament més petits i barats. La resolució dels microscopis de sonda de rastreig depèn de la mida de la punta, per tant, si volem veure àtoms, l'extrem de la punta ha d'estar format per un sol àtom.

La tecnologia del microscopi d'efecte túnel es basa en l'efecte túnel, una propietat quàntica dels materials. Aquesta propietat consisteix en que una partícula pot atravesar una barrera de potencial major que la seva pròpia energia, una situació impossible sota els principis de la física clàssica. Però, en l'escala nanomètrica, sota els efectes quàntics, hi ha una possibilitat petita, és a dir, no nul·la de que aquest fenomen es dugui a terme. Gràcies a aquest raonament, un electró situat en la superfície d'un material té una possibilitat no nul·la d'escapar de la força d'atracció del nucli. I si li apropem un material metàl·lic a una distància molt petita i degut a l'efecte túnel es pot crear una petita corrent d'electrons entre la punta metàl·lica i la mostra que es pot calcular. La corrent generada depèn de la distància entre els dos materials, de la diferència de voltatge aplicada i de la seva densitat. Com que la corrent generada depèn exponencialment de la distància, si mantenim la intensitat de corrent constant, la punta haurà de variar la distància ( augmentant-la o bé disminuint-la ) per tal de mantenir el valor constant. Els diferents moviments que realitza la punta al llarg de la mostra conformen la imatge de la mostra, que és una representació de la densitat dels estats electrònics de la mostra. Els moviments de la punta, els quals han de ser d'una precisió i exactitud nanomètrica, són controlats per un sistema de materials piezoelèctrics unit a la sonda ( els materials piezoelèctrics es deformen al aplicar una diferència de potencial ).

Ara bé, cal remarcar que aquest tipus de microscopia només és vàlid per l'estudi de mostres metàl·liques o semiconductoras ja que és necessari que la mostra sigui conductora. Aquesta limitació va ser resolta amb l'aparició del microscopi de forces atòmiques. En aquest cas, es mesuren les forces d'interacció ( de repulsió o bé d'atracció ) entre la punta i la mostra. Per mantenir aquesta força entre la punta i la mostra constant, la punta ha de variar la distància amb la mostra ( les forces depenen, de la mateixa manera que el corrent, de la distància a la mostra ) i és mesurada gràcies a una estructura de micro-palanca, acoblada a la punta, que es flexiona proporcionalment amb l'altura. Llavors, amb un feix de llum làser es pot mesurar aquesta flexió i formar la imatge. El resultat es pot observar en la figura 10.

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

A més a més del microscopi d'efecte túnel i el de forces atòmiques, existeixen altres tipus que estudien diferents interaccions entre la punta i la mostra. Així, el microscopi de forces magnètiques i el microscopi òptic de sonda de rastreig permeten estudiar les propietats magnètiques o òptiques d'una mostra.

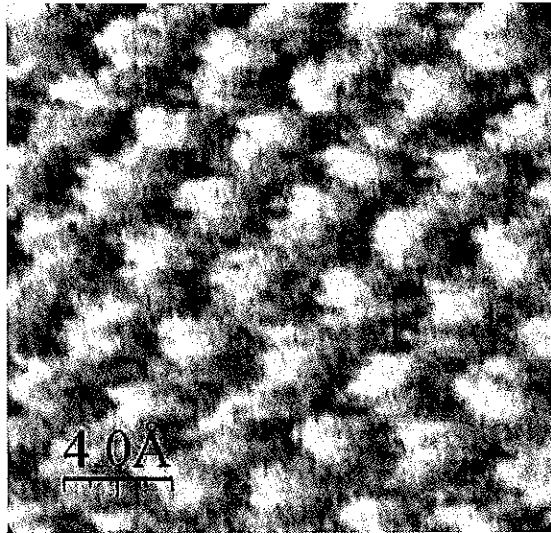


Figura 10. Imatge capturada per un microscopi de forces atòmiques d'una làmina de grafè a condicions ambientals.

## 5. MANIPULACIÓ ATÒMICA I NANOFABRICACIÓ

Hi ha diversos mètodes de síntesi de nanopartícules amb els quals podem aconseguir solucions col·loïdals que contenen aquests elements o substrats on hi estan enganxats. No obstant, el desenvolupament real de la nanotecnologia es deu a la possibilitat de manipular aquestes molècules nanomètriques, tant orgàniques com inorgàniques, per formar estructures i aparells més complexos, la coneguda tecnologia de *bottom-up* (formant els productes a partir dels seus components bàsics). Aquest tipus de tecnologia és clau per continuar reduint la mida dels actuals aparells, com per exemple en microelectrònica.

Des de la invenció dels microscopis de sonda de rastreig, es va observar el seu potencial en la modificació de la superfície de la mostra estudiada, gràcies a la interacció entre punta i material. Aquestes interaccions poden ser de diferents tipus: de contacte (amb la formació d'un pont), de interacció (elèctrica o bé mecànica) o químiques (oxidació o polimerització). En un primer moment, es va comprovar com, amb el microscopi d'efecte túnel, es podia moure els àtoms a voluntat, només en materials conductors i semiconductors, aplicant una diferència de potencial entre l'extrem de la punta i l'àtom. El microscopi de forces atòmiques superava aquesta limitació ja que utilitza les forces d'interacció, l'electrostàtica o de Van der Waals, per desplaçar els àtoms o les molècules, per tallar nanotubs o per tombar molècules al substrat, per exemple. Tot i això, portar a terme la formació d'un sistema polimolecular a partir de la col·locació individual de cada unitat molecular és complicat. Per construir un  $\text{mm}^3$ , molècula a molècula, trigariem anys.

D'aquesta manera, existeixen altres formes més ràpides i eficaces de nanofabricació (Taula 1) com l'ús de patrons o plantilles sobre una superfície o l'auto-acoblament, capacitat de les molècules per formar estructures en la superfície d'un material espontàniament, que permeten obtenir nombroses estructures nanomètriques.

<b>Taula 1. Procediments més comuns de nanofabricació</b>	
<b>Tècnica de nanofabricació</b>	<b>Descripció del procediment</b>
<b>Deposició química de vapor</b>	Procés químic per el qual podem aconseguir depositar materials en diverses formes sobre una superfície. El substrat és exposat a un reactiu volàtil que reacciona o es descompon formant el producte desitjat gràcies a excitació tèrmica o lluminica.
<b>Deposició física de vapor</b>	Presenta el mateix mètode que la deposició química de vapor, però la unió es realitza mitjançant processos físics com l'evaporació al buit o la pulverització catòdica.
<b>Creixement epitaxial mitjançant</b>	Escalfant el substrat cristal·lí fins a, gairebé, la temperatura de fusió i aplicant-li un feix

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

<b>feixos moleculars</b>	molecular, aconseguim formar una capa cristal·lina la formació de la qual la podem controlar.
<b>Creixement epitaxial de capa atòmica</b>	Controlant l'exposició de la substància al substrat cristal·lí, podem formar capes amb un gruix d'un àtom. A més a més, alternant aquesta exposició de dos o més substàncies podem formar capes diferents superposades.
<b>Nanolitografia</b>	<p>La nanolitografia es basa en la extracció selectiva de parts d'una pel·lícula fina o del substrat per formar patrons. En la fotolitografia, la litografia de raigs X i litografia ultraviolada utilitzen la llum per crear diferents patrons geomètrics. La llum passa a través d'una fotomascàra, capa que permet el pas de la llum en un determinat patró, i arriba a la pel·lícula la qual, mitjançant una sèrie de reaccions químiques, és sensible a l'exposició a la llum.</p> <p>En canvi, en la litografia de feix d'electrons i de ions els elements que formen la plantilla són, respectivament, els electrons i els ions, que solen ser de gal·li, un exemple és el de la figura 11. Aquest tipus de tècniques solen estar acoblades a microscopis electrònics que permeten visualitzar la imatge de l'estructura.</p>
<b>Litografia de sonda de rastreig</b>	En aquest tipus especial de litografia, s'utilitzen els microscopis de sonda de rastreig per formar els patrons. Aquest procés pot ser constructiu o destructiu. En el mètode constructiu ( Nanolitografia Dip-pen ) s'afegeixen molècules, unides a les puntes dels microscopis, al substrat per formar el patró. En canvi, en els processos destructius es deforma la superfície del substrat de manera mecànica, física, electrònica o química, com en la figura 12.
<b>Litografia de nanoimpressió</b>	És un procés específic de nanolitografia que realitza els patrons mitjançant deformacions mecàniques del material a estudiar.
<b>Auto-acoblament</b>	<p>Aprofitant la capacitat de certes molècules de organitzar-se espontàniament d'una determinada manera, podem aconseguir monocapes autoacoblades, que presenten un gruix d'una molècula. Aquest procediment ens permet aconseguir unir un gran nombre de molècules en un espai de temps relativament petit.</p> <p>Les molècules utilitzades solen presentar tres parts: el cap, que serveix d'anclatge al substrat, l'esquelet orgànic, proporciona estabilitat a l'estructura, i el grup funcional, que determina la funció i propietats de l'estructura. Els alcanotols, hidrocarburs saturats enllaçats a un grup tiol ( SH- ), són unes molècules extensament utilitzades en aquesta tècnica. D'aquesta manera, el grup funcional tiol serveix de cap d'anclatge al substrat, el sofre presenta una gran afinitat química amb elements metàl·lics com l'Au, Ag, Cu, Pt. La cadena hidrocarbonada estabilitza l'estructura mitjançant interaccions amb altres esquelets. Finalment, el grup terminal pot ser molt variat: nanopartícules magnètiques, material biològic,...</p> <p>L'auto-acoblament permet, jugant amb els grups funcionals, crear superfícies amb propietats específiques ( afegint un grup metil a alcanotols que recobreixen un material, la seva hidrofobicitat ) o bé funcionalitzant una superfície, com els biosensors.</p>

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

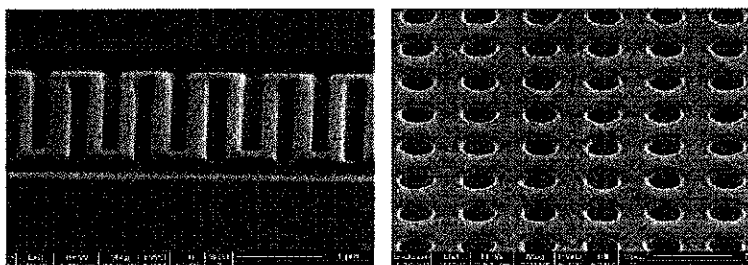


Figura 11. Estructures nanomètriques realitzades mitjançant la litografia de feix iònic. La imatge de l'esquerra consisteix en una sèrie d'elèctrodes interdigitalitzats i, la de la dreta, en una xarxa de forats ordenats.

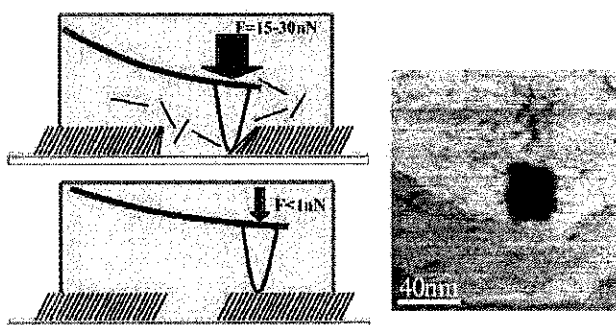


Figura 12. Modificació d'un substrat d'or (cobert per una capa homogènia de alcanotols) mitjançant el microscopi de forces atòmiques. En la primera imatge podem observar com, aplicant una força major que la necessària per obtenir la imatge, podem arrencar els alcanotols del substrat. No obstant, si reduïm la força aplicada podem tornar a obtenir imatges de la mostra (segona imatge). Per últim, en la tercera imatge podem observar el resultat del mètode anterior en una capa de C18.

L'ús apropiat i combinat de les diverses tècniques de nanofabricació i de síntesi de nanopartícules ha de permetre la creació de tot tipus d'estructures que puguin dur a terme les funcions desitjades. És a dir, la funció de l'estructura determina la seva composició i forma.

Un clar exemple d'aquest fet és la possible estructura d'una nanopartícula la funció de la qual sigui arribar a una zona específica del organisme, com una cèl·lula cancerígena. L'estructura d'aquesta suposada nanopartícula es troba definida en la figura 13.

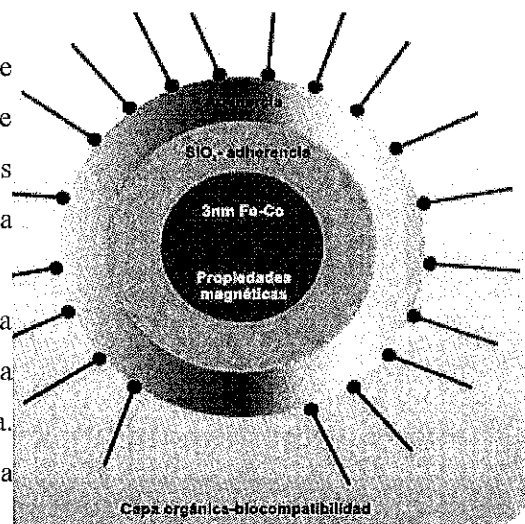


Figura 13. Esquema de l'estructura de la nanopartícula detallada anteriorment. El cor de la nanopartícula és magnètic per poder moure-la a voluntat. La capa intermitja serveix d'adherència entre el cor i la capa d'or, la qual protegeix l'organisme dels efectes tòxics d'alguns elements. Aprofitant les propietats de l'or i dels alcanotols, podríem associar-ho amb els fàrmacs anticancerígens i amb biomolècules que compatibilitzen la nanopartícula amb el sistema immunitari del organisme.

## **6. NANOBIOLOGIA I NANOBIOOTECNOLOGIA**

Observant els múltiples avenços en aquest camp, la biologia sembla ser el camp amb més projecció de la nanotecnologia i, sobretot, les seves aplicacions biomèdiques. Darrerament, una gran part de la recerca científica té com a objectiu final la detecció i tractament de malalties. S'han realitzat i s'estan realitzant grans esforços per erradicar patologies com el càncer o el sida. Amb aquesta finalitat, en els últims anys noves tècniques, com la terapia gènica, s'han afegit a la medicina tradicional mitjançant els nous estudis realitzats pels investigadors.

En un primer moment, la combinació de nanotecnologia i biologia pot semblar estranya. Però, ben pensat, la gran majoria dels processos biològics, concretament en biologia molecular, es produeixen a escala nanomètrica ( a l'interior d'una cèl·lula ) i les molècules que ens constitueixen ( proteïnes, ADN,...) són també d'aquesta mida. Reduint-ho a la mínima expressió, els organismes vius són un conjunt de nanomàquines que són capaces de replicar-se. Així doncs, la biologia molecular és el camp idoni per conèixer noves possibilitats de la nanotecnologia, l'anomenada bionanotecnologia, i per aplicar-hi les últimes investigacions, coneguda com nanobiotecnologia. Per tant, la biologia i la nanotecnologia es retroalimenten, és a dir, la nanociència aporta a la biologia, però aquest procés també és dóna a l'inversa.

Els avenços de la nanotecnologia en la manipulació i observació de molècules i àtoms han permès estudiar i treballar amb una única biomolècula aïllada, fet que ha impulsat el coneixement actual de molècules com l'ADN. Fins llavors, els estudis es realitzaven sobre mostres formades per un gran nombre de molècules, per tant, els resultats obtinguts eren la resposta promig de totes les molècules, l'aproximació a la realitat és molt menor. L'estudi de l'ADN, per exemple, ha permès descobrir la capacitat d'aquesta molècula d'unir-se amb seqüències complementàries, és a dir, són capaces d'hibridar-se. Aquesta característica és utilitzada per construir nanoestructures i, principalment, en biosensors. Un altre aspecte clau és la manipulació d'aquestes biomolècules. La manipulació de les biomolècules és facilitada mitjançant la conjugació de la biomolècula amb una nanopartícula, més estable i amb major mida, i l'ús de tècniques com el microscopi de forces atòmiques o les novedoses pinces òptiques.

Gràcies a totes les innovacions descrites, ens hem apropat al món nanomètric que regeix tots els processos moleculars, fins i tot, els relatius a malalties. Aquest coneixement, desconegut fins l'aparició de la nanotecnologia, ha iniciat el camp de la nanomedicina mitjançant la fabricació de nanodispositius que

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

són capaços d'introduir-se a les cèl·lules i dur a terme les reparacions necessàries. Destaquen la nanomedicina regenerativa i l'alliberament selectiu de fàrmacs, en l'àmbit del tractament, i la millora dels actuals mètodes de diagnosi amb l'introducció d'elements com els nanobiosensors.

La nanomedicina regenerativa ha sofert una gran expansió ja que s'han començat a fabricar teixits alternant molècules biològiques amb materials inorgànics nanoestructurats. Aquests teixits són molt útils per produir pròtesis i implants que no siguin rebutjats per l'organisme o per organitzar la matriu extracel·lular dels teixits. Una altra via d'investigació, relacionada amb la terapia gènica, consisteix en crear nanopartícules capaces d'actuar com a interruptors en l'expressió d'un o més gens i, en conseqüència, activar o evitar la síntesi de determinades proteïnes. D'aquesta manera, es podrien alentar i, fins i tot, anul·lar processos relatius a una determinada malaltia.

No obstant, formar nanodispositius capaços de dirigir-se a un teixit concret i, allà, alliberar els fàrmacs necessaris és, potser, l'aplicació més prometedora en nanomedicina. A més a més d'augmentar l'eficàcia del fàrmac, els possibles efectes secundaris a la resta de l'organisme són evitats. Aquesta tecnologia, utilitzant nanovehicles que circulen pel nostre organisme, ja és comercialitzada per empreses, amb més de 150 fàrmacs nanoestructurats comercialitzats. Per assolir aquests objectius es poden aprofitar estructures pròpiament biològiques com els lisosomes o els virus, unides a proteïnes de reconeixement, els quals s'encapsulen els fàrmacs. D'altra manera, els ful·lerens, comentats anteriorment, són una altra possible càpsula i estudis indiquen la possibilitat de fer migrar els fàrmacs a partir de nanotubs de carboni. Una altra línia d'investigació és la síntesi de nanopartícules (normalment de metalls nobles per la seva baixa toxicitat) o dendrímers, conjunt de molècules disposades de forma arbòrea. Tot i això, prèviament a la comercialització d'aquest tipus d'estructures, és necessari estudiar intensament els efectes que poden tenir l'ús de nanodispositius en el nostre organisme.

Una altra funció que poden realitzar els nanodispositius dins de la cèl·lula, a més a més de reparar elements diversos, és substituir els propis elements que conformen l'estructura cel·lular. Investigadors de l'Institut de Fabricació Molecular de Califòrnia han desenvolupat una mena de nanorobot<sup>1</sup>, d'aproximadament un micròmetre, capaç d'emmagatzemar i alliberar oxigen. Aquests glòbuls vermells artificials, o "respirocytes", tenen una capacitat 236 vegades major que un glòbul vermell natural gràcies a unes bombes moleculars que omplen i desomplen uns tancs pressuritzats, un per cada gas ( $\text{CO}_2$  i  $\text{O}_2$ ),

<sup>1</sup> Robert A. Freitas Jr., "Respirocytes: High Performance Artificial Nanotechnology Red Blood Cells," NanoTechnology Magazine 2 (October 1996):1, 8-13 (11)

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

com es pot veure en la figura 14. Mitjançant sensors de temperatura, pressió i concentració, els investigadors poden conèixer la localització del dispositiu i modificar la operació que estigui realitzant. L'ús de nanorobots com a màquinaria cel·lular permetria millorar les nostres capacitats, per exemple, amb l'ús dels mencionats glòbuls vermells artificials es podria bucejar durant hores sense oxigen. Tot i això, és indispensable analitzar els efectes secundaris abans de convertir-se en una opció real.

Com hem pogut veure, les possibilitats de la nanobiotecnologia semblen ser il·limitades i, de moment, només es regeixen per l'imaginació dels investigadors. El temps i els nous estudis que es realitzin determinaran les aplicacions reals de la nanotecnologia en l'àmbit biològic.

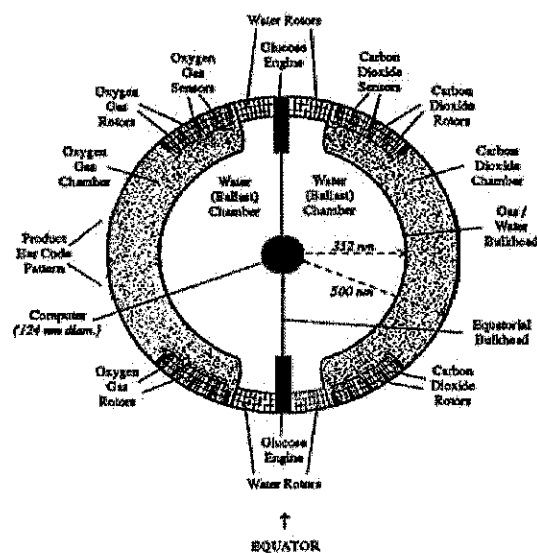


Figura 14. Tall equatorial de l'anomenat "respirocyte". Com es pot observar, la cambra de l'oxigen ( esquerra ) i la del diòxid de carboni ( dreta ) es troben separades per un dipòsit d'aigua que permet regular la flotabilitat del dispositiu. El punt negre central és l'ordinador de bord que controla tots els processos.

### 6.1 SENSORS BIOLÒGICS

Un sensor biològic és qualsevol dispositiu capaç de detectar específicament una substància, normalment biològica, determinada. La part principal d'aquests aparells és l'element de reconeixement biològic, el qual és capaç d'unir-se a la substància a detectar. Alhora, l'element de reconeixement està acoblat a un sistema transductor que permet processar la senyal produïda per l'interacció entre substància i l'element de reconeixement. Aquesta interacció pot ser òptica ( per exemple, emissió de fluorescència ), elèctrica ( com una generació d'electrons ), mecànica,...



## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

Els “microarrays” o xips, un dels tipus de biosensors més utilitzats, consisteixen en un superfície sòlida ( formada per materials com el silici, el vidre o el or ) en la qual s'hi dipositen, de forma organitzada, un gran nombre de biomolècules ( proteïnes, àcids nucleics, teixits o altres molècules orgàniques ). La separació entre molècules és d'uns 100 o 150 micròmetres. Al passar la mostra, prèviament marcada ( fluorescència, isòtops radioactius, marcatge mitjançant enzimes,... ) pel bioxip aquesta s'enganxarà a certes parts d'aquest corresponent a l'element amb el qual té afinitat. Coneixent les posicions de cada element de reconeixement i observant els punts marcats obtinguts, podem reconèixer la naturalesa de la mostra. Aquest procediment es caracteritza per ser ràpid i acurat. Les aplicacions d'aquest tipus de dispositius són prou importants: detecció de presència bacteriana contaminant en nombrosos medis, diagnòstic de malalties per la presència de determinades biomolècules,...

No obstant, gràcies a les noves tècniques de nanofabricació que disposem en l'actualitat, podem construir xips molt més petits ( reduint la distància entre els elements de reconeixement de centenars de micròmetres a pocs nanòmetres ) i, alhora, més potents. Així doncs, reduïm la mida dels sensors a l'escala real on les molècules interactuen, per tant, la sensibilitat dels resultats millora. Lògicament, com el sensor és significativament més petit, la quantitat de mostra requerida és també menor. A més a més, l'ús de marcadors no és necessari en els nanoxips, fet que incrementa la sensibilitat al no modificar-se la molècula diana. Fins i tot, és possible realitzar elements de reconeixement formats per una sola molècula. Els procediments de fabricació d'aquests dispositius comprenen, de forma majoritària, tècniques nanolitogràfiques ( a partir de la superfície sòlida, esculpir-hi la forma desitjada ), processos d'auto-acoblament i manipulacions moleculars mitjançant microscopis com el de forces atòmiques.

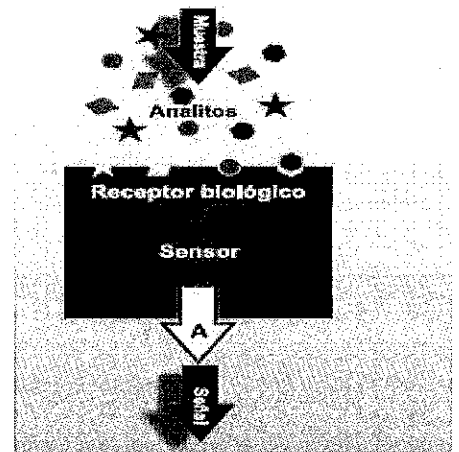


Figura 15. Esquema de l'estructura d'un biosensor.

**Nanoarrays for Antigen-Based Detection of HIV**

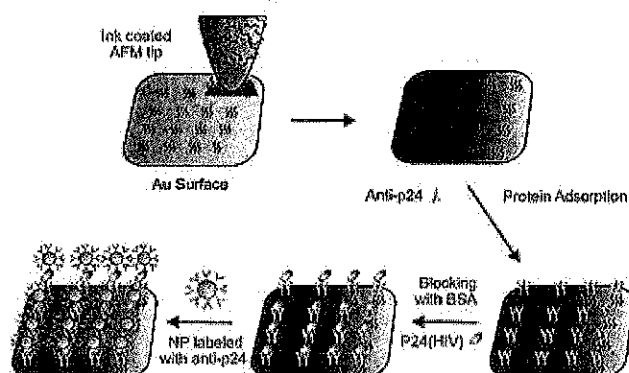


Figura 16. Esquema de la detecció del virus de la immunodeficiència humana mitjançant un nanoarray. En primer lloc, es col·loquen alcanotiols, amb l'ajut d'un microscopi de forces atòmiques, el quals, gràcies a la seva càrrega negativa, atrauen l'anticòs p-24. Aquest anticòs és específic de la proteïna p-24, relativa al desenvolupament del VIH. Així doncs, si la mostra conté p-24, aquesta s'enganxarà a aquesta estructura. A continuació, afegim nanopartícules d'or conjugades amb l'anticòs p-24, que permetran la seva unió. La detecció de la unió es realitza observant l'estructura amb un microscopi de forces atòmiques i analitzant l'altura del complex. Aquesta detecció es podria haver realitzat d'una altra manera, per exemple, utilitzant una nanopartícula fluorescent. En el cas de que la proteïna p-24 no estigui present en la mostra, les nanopartícules no s'adheriran a l'estructura i, en conseqüència, l'altura no es veurà afectada. Aquest tipus de sensors utilitzen el complex "sandvitx" ja que es forma una superposició de diferents elements.

Ara bé, els nanoxips són una eina més dins del món dels nanosensors. A més a més, el fet d'estar adherits a un xip redueix molt els seus àmbits d'aplicació. Per tant, l'ús de nanopartícules que, funcionalitzades amb diverses molècules, realitzin la funció de sensors és interessant ja que permetria introduir-les, per exemple, dins d'una cèl·lula. En aquest àmbit, les nanopartícules han demostrat ser una tecnologia amb futur i han començat a ser utilitzades en l'estudi de cèl·lules i microorganismes i en la detecció d'elements intracel·lulars ( veure 4.2 ). En teoria, les nanopartícules presenten diversos avantatges davant dels actuals tints fluorescents utilitzats en immunocitoquímica. Primerament, les nanopartícules, com els "quantum dots", són més estables , presenten una major intensitat de fluorescència, emeten durant un temps més prolongat i en la seva banda d'emissió és molt concreta, permetent que els estudis amb microscopia confocal siguin més sensibles.

Així doncs, tots aquests sistemes formen el concepte *lab on a chip*, que consisteix en reduir tota la feina d'un equip de laboratori a un dispositiu nanomètric que ens proporciona totes les dades necessàries.

## 7. PART EXPERIMENTAL

Per tal de realitzar la part experimental d'aquest treball de recerca i comprovar les aplicacions de la nanociència, vaig fer una estada d'una setmana de duració ( del 9 al 13 de juliol de 2012 ) en l'Institut Català de la Nanociència (ICN), gràcies a una beca de Catalunya Caixa del programa Joves i Ciència.

Durant aquesta setmana, vaig participar en un grup de recerca amb investigadors del propi centre, l'Helena Montón i en Miquel Cadevall. A més a més, vaig compartir l'experiència amb dos estudiants més del propi programa. Sense cap mena de dubte, va ser una experiència enriquidora ja que em va permetre conèixer de primera mà com està la situació actual de la nanobiologia i per quins camins s'estan centrant els esforços.

Al llarg del projecte, vaig realitzar tres pràctiques diferents, i d'altres activitats que també em van proporcionar altres coneixements necessaris, però totes elles relacionades amb el camp de la nanociència i, més concretament, en la nanobiologia i els sensors biològics.

En primer lloc, vam sintetitzar nanopartícules d'or ( AuNPs ) de diferents mides mitjançant dos mètodes diferents. Aquest experiment va servir d'introducció ja que no vam utilitzar les nanopartícules creades per més coses, sense tenir en compte la seva caracterització. Tot i això, les nanopartícules d'or tenen propietats molt importants com ja hem detallat anteriorment. Seguidament, vam utilitzar els “quantum dots” en un immunoassaig per la detecció d'una proteïna, en aquest cas era una endosomal, mitjançant el model “sandvitx” gràcies a anticossos específics. D'aquesta manera, en aquesta segona pràctica intentem calibrar la resposta de les nanopartícules ( “quantum dots” en aquest cas ) com a detectors de proteïnes i, alhora, la compararem amb la dels tints orgànics usats habitualment en la citoquímica. Posteriorment, vam analitzar els resultats en microscopi confocal per poder obtenir conclusions pròpies.

Finalment, i com a continuació dels experiments amb “quantum dots”, vam observar la captació cel·lular, és a dir, la quantitat de partícules que entraven dins de la cèl·lula. Aquest procés el vam realitzar en cèl·lules HeLa i els “quantum dots” estaven funcionalitzats amb un pèptid ( SAP ) que facilita el pas per la membrana citoplasmàtica. Els resultats d'aquest experiment són importants ja que, si volem detectar elements intracel·lulars ( com en la segona pràctica ), les partícules han de ser capaces d'introduir-se a l'interior de la cèl·lula.



## SÍNTESE DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

L'objectiu principal de totes aquestes pràctiques és demostrar que l'ús de les nanopartícules en la detecció de diferents elements de la cèl·lula i en sensors biològics és una eina eficaç i viable en un futur.

### 7.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULES D'OR

#### **HIPÒTESI**

La hipòtesi que vam formular per aquesta pràctica és que seguint dos mètodes relativament senzills, el mètode de Brust i el mètode de Turkevich, seríem capaços de sintetitzar nanopartícules d'or d'una mida de 5 nm i de 20 nm. El mètode de Brust s'utilitza per aconseguir nanopartícules d'or de 5 nm mentre que el de Turkevich per 20 nm.

#### **PROCEDIMENT**

El mètode de Brust té els següents passos:

- Vam afegir en un erlenmeyer 1 mL de  $\text{HAuCl}_4$  (àcid tetracloroàuric) a l'1% i vam ajustar el volum a 30 mL amb aigua.
- Vam posar la barra magnètica en l'erlenmeyer i el vam deixar en un plat sacsejador.
- Tot seguit, vam afegir 2 mL de citrat de sodi al 38 mM.
- Ràpidament, vam introduir 1 mL  $\text{NaBH}_4$  (hidruir de bor-sodi) al 0,075% i vam remenar durant 5 minuts.
- Després, vam escalfar a 35° durant un temps ( en el mètode no el determinava ).
- Quan ja no surt més vapor de la mostra, la vam deixar d'escalfar però vam seguir remenant. També, cal readjustar el volum a 30 mL amb aigua.
- Finalment, vam guardar la solució a 4° i la vam protegir de la llum.

El mètode de Turkevich presenta el següent procediment:

- Vam afegir en un erlenmeyer 0,5 mL de  $\text{HAuCl}_4$  a l'1% i vam ajustar el volum a 50 mL amb aigua.
- Vam posar la barra magnètica a l'erlenmeyer i, alhora, en un escalfador.
- Quan va bullir, vam afegir 1,25 mL de citrat de sodi a l'1%.
- Ho vam deixar bullir durant 10 minuts i vam observar com la solució passa de blau a vermell.

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

- Vam deixar d'escalfar però vam seguir remenant i vam tornar a readjustar el volum a 50 mL.
- Al cap d'una estona, vam deixar reposar la solució a 4° i la vam protegir de la llum.



Figura 17. Mostres de les solucions obtingudes de AuNPs. La imatge de l'esquerra pertany a les partícules de 20 nm (Turkevich) i la de la dreta de 5 nm (Burst). La diferent mida de les partícules fa que el color de les mostres també sigui diferent.

### RESULTATS

Els resultats d'aquest experiment van ser la posterior caracterització que vam realitzar de les nanopartícules i que ens va permetre conèixer l'estat d'aquestes.

Cal mencionar que la primera vegada que vam dur a terme el mètode de Turkevich no ens va convèncer la dissolució resultant i vam fer una altra mostra. Tot i així, vam caracteritzar les tres mostres de nanopartícules: 5 nm, 20 nm (1) i 20 nm (2).

En primer lloc, vam realitzar una prova d'espectrofotometria per tal d'aconseguir un anàlisi químic i poder determinar què hi teníem mitjançant la mesura de la radiació absorbida per la mostra. En teoria i si totes les partícules tenen una mida més o menys semblant, el màxim d'absorbància ha de ser un "pic" dins del gràfic i que totes les altres bandes presentin una absorció mínima.

MOSTRA A CARACTERITZAR	MÀXIM D'ABSORBÀNCIA
5 nm	584 nm
20 nm (1)	582 nm*
20 nm (2)	534 nm

En aquesta taula podem observar els màxims d'absorbància corresponents a cada mostra. Com podeu veure, les mostres de 5 nm i de 20 nm (2) mostraven un cert "pic" que semblava indicar el correcte funcionament dels mètodes. Tot i així, encara no podíem determinar la mida de les partícules amb

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

exactitud. Només sabíem que, de manera aproximada, responien a una longitud uniforme.

El resultat obtingut en la mostra de 20 nm (1) ens indicava, com ja pensàvem anteriorment, que no havia funcionat el mètode. A més a més de la diferència en el màxim d'absorbància amb l'altra mostra de 20 nm, el gràfic resultant era una espècie de campana, i no els pics de les altres gràfiques. Aquest fet ens va fer intuir que hi havia nanopartícules de diferents tamanyes ja que la mostra havia absorbit radiació en diferents punts.

Posteriorment, vam observar les mostres al microscopi electrònic de transmissió ( TEM ). Les nanopartícules no es poden veure en un microscopi òptic ja que la seva longitud nanomètrica és més petita que la longitud d'ona de la llum, per tant, hem d'utilitzar un feix d'electrons com en el TEM. Amb aquesta tècnica, doncs, podem observar les nanopartícules tal i com són en realitat.

Els resultats obtinguts en les diferents mostres van ser prou esperats. En la mostra de 5 nm van sortir resultats bons, vam poder observar un bon nombre de nanopartícules que s'apropaven força als 5 nm, tot i que també vam veure partícules d'altres mides totalment diferents.

La mostra de 20 nm (1) va proporcionar uns resultats extranyes. Vam poder distingir algunes nanopartícules de 20 nm però la gran majoria eren formes molt diverses que no s'escauen en les aproximades esferes que s'havien de crear.

En canvi, les de 20 nm (2), tot i estar molt agregades cosa que comporta que es formin estructures més grans, tenen una mida que s'assembla prou a l'esperat.

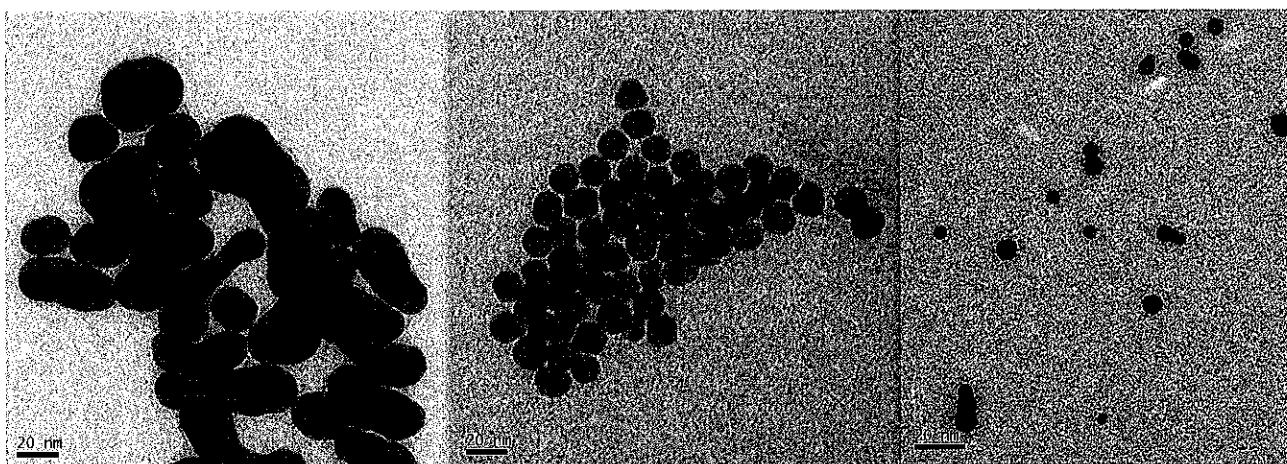


Figura 18. Fotografies obtingudes de les diferents mostres amb el microscopi electrònic de transmissió. En primer lloc, observem les partícules dels 20 nm (1), força irregulars. En segon lloc, trobem la mostra de les partícules de 20 nm (2), amb una forma més uniforme. Per últim, amb una mida més reduïda, les partícules de 5 nm encara que trobem algunes formes agregades.

## CONCLUSIONS

Vistos els resultats obtinguts d'aquesta pràctica, jo crec que la hipòtesi formulada és pot confirmar ja que mitjançant aquests dos mètodes hem pogut sintetitzar partícules d'or nanomètriques. Tot i així, podem dir que les nanopartícules sintetitzades no són perfectes ja que o bé tenen formes estranyes i estan molt agregades o la seva longitud no escau a l'esperada. També cal remarcar la elevada dificultat tècnica d'aquests mètodes, que, encara que el procés sembli senzill, aconseguir que totes les partícules siguin uniformes i individuals depèn de molts factors.

## 7.2 IMMUNOASSAIG AMB “QUANTUM DOTS” I ALEXA PER A LA DETECCIÓ D'UNA PROTEÏNA ENDOSOMAL

### HIPÒTESI

En aquesta pràctica central, ens vam proposar demostrar la validesa dels “quantum dots”, nanocristalls formats de materials semiconductors, com a marcadors de determinats elements de l'estructura cel·lular. En aquest cas, el nostre objectiu és realitzar un anàlisi quantitatiu de una proteïna endosomal, EEA1, mitjançant un sistema comprès per “quantum dots”, formats per un nucli de seleniur de cadmi i una recoberta externa de sulfur de zinc, i anticossos específics de la proteïna esmentada. A més a més, ho compararem amb els resultats de un tint sintètic, Alexa 488, dels quals volem observar els avantatges dels “quantum dots” davant d'aquests marcadors habituals. Els “quantum dots”, i l'Alexa 488, emeten fluorescència al ser irradiats amb una determinada radiació, per tant, les mostres seran analitzades amb un microscopi confocal<sup>1</sup> del qual obtindrem imatges que ens mostraran els diferents punts de la mostra que emeten fluorescència.

### PROCEDIMENT

El procediment va ser el següent:

- En un principi, nosaltres disposàvem d'un cultiu cel·lular adherit a un portaobjectes. Hi vam realitzar un rentat amb el tampó PBS (dissolució salina que conté clorur de sodi, fosfat de sodi, clorur de potassi i fosfat de potassi que manté el pH estable i té una osmolaritat semblant a la del cos humà) i, tot seguit, vam afegir el fixador paraformaldehid durant 15 minuts.

---

<sup>1</sup> El microscopi confocal és un microscopi òptic que dirigeix a un punt determinat un raig de llum, variant la longitud d'ona, que va resseguint tota la mostra i, amb l'ajuda de detectors, es capta la llum emesa per la mostra i es forma la imatge.

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

- Després de dos rentats més amb PBS, hi vam afegir un permeabilitzador de membrana ( amb la finalitat d'obrir els porus de les membranes cel·lulars i permetre el pas a les nostres partícules ) i ho el vam deixar treballar 10 minuts.
- Seguim rentant amb PBS, i deixem aquesta dissolució com a medi de les cèl·lules.
- Més tard, afegim BSA, un bloquejador de proteïnes que evitarà que el nostre sensor s'uneixi a altres proteïnes no desitjades.
- Hi afegim l'anticòs primari, de la proteïna EEA1, que s'unirà a la proteïna endosomal.
- Més endavant, hi afegim els QD 655 (“quantum dots”) i l'Alexa 488 en cultius cel·lulars diferents que ja porten enganxats un anticòs secundari que propiciarà l'unió amb el primari. Aquest procediment s'anomena model “sandvitx”.
- Ho incubem a 37° durant una hora. Finalment hi afegim un marcador de nucli.



Figura 19. Fotografia dels portaobjectes on vam dur a terme l'experiment. Com es pot observar a l'imatge, hi ha sis mostres, les quals han seguit el mateix procediment, excepte l'últim pas. En el primer cas, hi vam afegir el QD655 amb l'anticòs secundari. En canvi, en les mostres del segon portaobjecte, hi vam posar l'Alexa488, també unit a l'anticòs secundari. Finalment, en l'últim cas no s'hi va realitzar res, és el grup control que, en teoria, no hauria de mostrar senyal.

## RESULTATS

Els resultats esperats de l'anàlisi amb microscopi confocal són que els “quantum dots”, QD655, presentin un major rendiment ( intensitat i quantitat de senyal ) que l'Alexa488. En canvi, en el grup control no s'hauria de veure res, només el marcador de nucli.



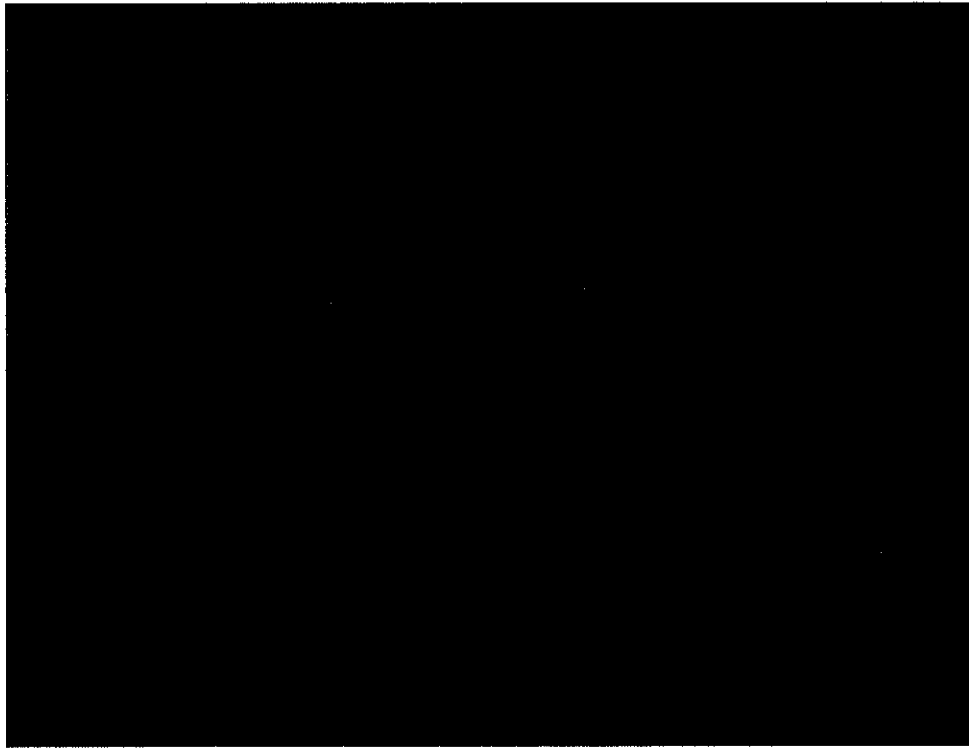


Figura 20. Captura de la mostra amb QD655 realitzada pel microscopi confocal. Es pot observar el nucli marcat de color blau, corresponent a cada cèl·lula. Tots els punts vermells són la resposta dels QD655 que s'han unit a la proteïna endosomal. Com es pot veure, la imatge també presenta un cert soroll de fons.



Figura 21. Captura de la mostra amb Alexa488 realitzada pel microscopi confocal. Com en l'anterior imatge, el nucli està marcat en blau mentre que l'Alexa488, en verd.

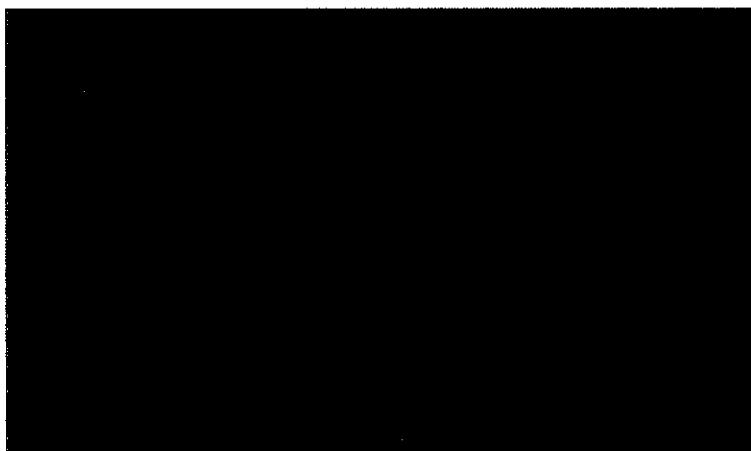


Figura 22. Captura de la mostra de grup control realitzada pel microscopi confocal. Tot i que, en teoria, no s'hauria d'observar cap senyal, es mostra prou soroll de fons, potser causat per interferències en el propi microscopi.

### CONCLUSIONS

Amb els resultats d'aquest experiment, podem concloure que els “quantum dots” són una opció viable en citoquímica per la estabilitat i la seva gran emissió de fluorescència. No obstant, la seva eficàcia cal ser estudiada més profundament i intentar millorar els procediments per tal de que els resultats siguin més precisos. Tot i això, sembla que la resposta dels “quantum dots” és major que l'Alexa488 i els tints habituals. Els resultats del grup control demostren que la precisió del procediment és pot millorar.

### 7.3 DETECCIÓ DE QUANTUM DOTS EN L'INTERIOR D'UNA CÈL·LULA

#### HIPÒTESI

L'objectiu d'aquest experiment és estudiar l'índex d'absorció cel·lular dels “quantum dots”, conjugats amb pèptids que afavoreixen aquesta inserció, mitjançant un tècnica electroanalítica. Aquesta tècnica és la voltamperometria d'ona quadrada la qual, aplicant un cert potencial a la mostra, mesura la corrent generada per l'oxidació-reducció de les espècies químiques. Així doncs, una major intensitat de corrent correspon a un major nombre de partícules. En aquest cas, els “quantum dots” estan formats per sulfur de cadmi i estudiarem la seva reducció a  $\text{Cd}^0$  i la seva posterior oxidació, seguint la reacció següent:



## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

D'aquesta manera, analitzarem les diferents mostres per tal de concretar si els “quantum dots” penetren a l'interior de la cèl·lula o, contràriament, resten a l'exterior.

### PROCEDIMENT

En primer lloc, un cultiu de cèl·lules HeLa van ser incubades durant dues hores i a  $37^{\circ}$  amb un medi que contenia CdS-QDs. Seguidament, es va separar en un tub Eppendorf una petita quantitat de sobrenedant, líquid on es troben les cèl·lules en suspensió, per al seu posterior estudi. D'altra banda, la suspensió de cèl·lules va ser tractada amb rentats de PBS i 1 mL de DMEM, una solució aquosa que manté les cèl·lules vives. Vam extreure el sobrenedant sobrant mitjançant una centrifugació. De l'anomenat pellet, material sedimentat d'una centrifugació i que correspon a les nostres cèl·lules, en vam obtenir dues mostres. La primera va servir per estudiar les interaccions dels “quantum dots” amb la membrana, per tant, no hi vam realitzar cap procediment més. En canvi, en la segona, en la qual volem estudiar si les nostres partícules han entrat dins la cèl·lula, vam realitzar una lisi cel·lular afegint-hi 0,1 mL d'aigua destil·lada. Finalment, amb les tres mostres diferents realitzarem l'anàlisi electroquímica i quantificarem les partícules presents en cada mostra. El procés a seguir va ser el descrit a continuació.

Primer, una càrrega de 20  $\mu\text{L}$  es col·loca en l'elèctrode, el circuit on es produirà l'anàlisi. El segon pas consisteix en l'aplicació d'un potencial de  $-1,1\text{ V}$  durant 120 segons que provocarà la reducció del  $\text{Cd}^{2+}$  a  $\text{Cd}^0$ . Seguidament, el potencial es redueix de  $-1,1\text{ V}$  a  $-0,5\text{ V}$  i es realitza la reacció inversa, l'oxidació del Cd, del qual en resulta un pic mesurat per l'ordinador específic d'aquesta espècie. Aquest procediment es va dur a terme per les diferents mostres. El procediment general de l'experiment es pot observar en la figura 23.

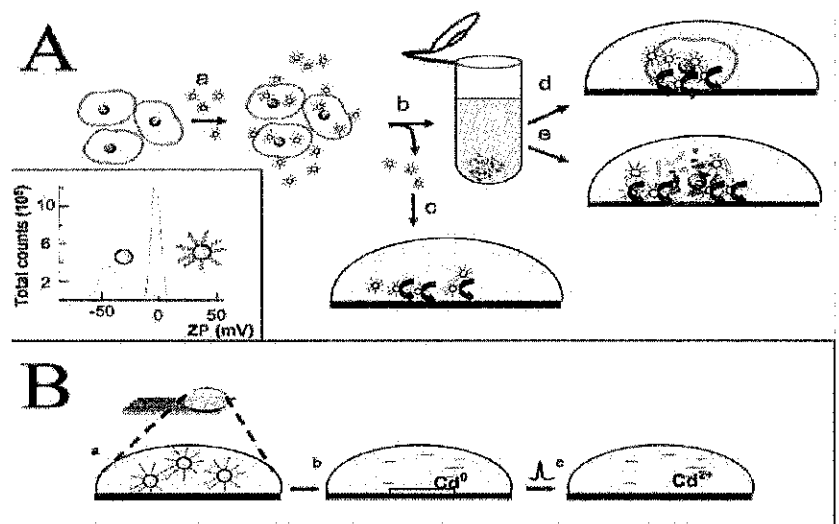


Figura 23. Esquema del procediment de la detecció de “quantum dots” en l'interior d'una cèl·lula. En A, es mostra el procediment de decantació, centrifugació i lisi per aconseguir les diferents mostres ( sobrenedant, a baix, cèl·lules, a dalt, i cèl·lules que han sofert la lisi, al mig. En B, el procediment d'anàlisi electroquímica mitjançant el potencial d'oxidació-reducció del cadmi.

## RESULTATS

Gràcies a la digitalització del procés, els resultats eren directament processats per un ordinador, a partir del qual vam extreure diferents gràfiques que mostren els resultats obtinguts.

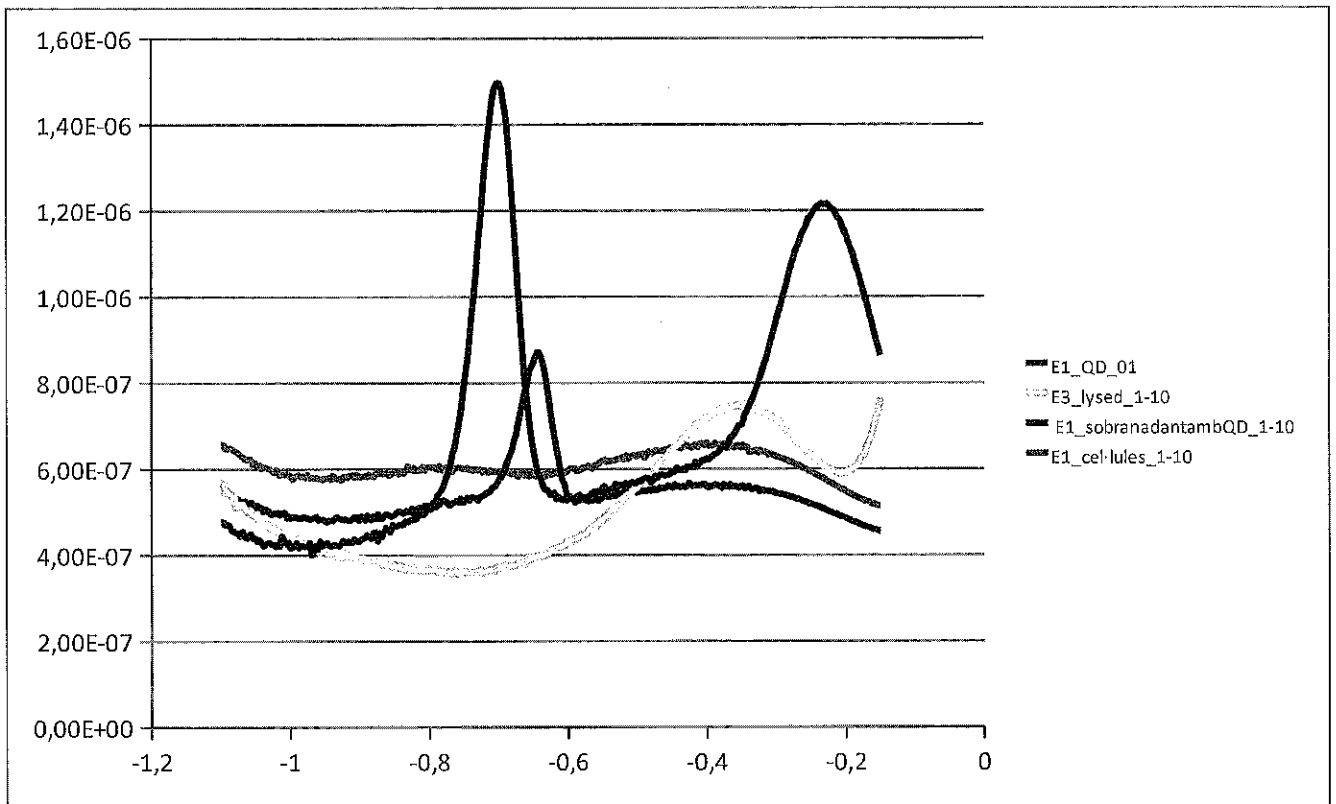


Figura 24. Gràfic que representa l'intensitat respecte el voltatge aplicat en diferents mostres cel·lulars. Els resultats blavosos corresponen a l'anàlisi d'una mostra de solució de QDs com a grup control. Com es pot veure, és un pic molt més important i es troba situat, aproximadament, a uns -0,75 V. En canvi, els resultats marcats de color verd, pertanyents a les cèl·lules, no mostra cap signe de presència de QDs. A més a més, els resultats de les cèl·lules que han sofert la lisi tampoc són gens reveladors, tampoc s'han introduït QDs a l'interior de les cèl·lules. Finalment, els resultats del sobrenadant ( color vermell ) indiquen que hi ha una certa quantitat de nanopartícules amb una espècie química prou semblant al cadmi.

## CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts no han estat els esperats, els "quantum dots" no han penetrat dins de la cèl·lula. S'hauria d'intentar amb diferents elements que facilitin, encara més, l'absorció cel·lular. També cal remarcar que aquests resultats es poden deure a un error en el procés experimental o del propi elèctrode.

És important millorar aquests resultats ja que la inserció de nanopartícules a l'interior de les cèl·lules està esdevenint un pas crucial per el correcte desenvolupament de la nanobiologia.

### 7.4 VALORACIÓ DE LA PART EXPERIMENTAL

El balanç de l'experiència viscuda a l'ICN és immillorable. Els experiments realitzats, encara que algunes parts no han sortit com s'esperava, han complert la seva funció principal: ensenyar-me el potencial de la nanotecnologia i les nombroses aplicacions que pot arribar a desenvolupar.

No obstant, els resultats dels experiments han estat prou positius i s'ajustaven prou a les hipòtesis inicials. En el primer cas, vam aconseguir sintetitzar nanopartícules d'or de diferents mides, encara que la forma era una mica irregular, amb uns mètodes relativament senzills. En el segon cas, s'ha demostrat que els “quantum dots” poden ser utilitzats com a detectors cel·lulars amb un rendiment considerable. Tot i això, només s'ha iniciat el camí, és necessari millorar la seva especificitat i sensibilitat. En canvi, els resultats de la tercera experiència no han coincidit amb les expectatives inicials ja que l'índex d'absorció dels “quantum dots” ha estat gairebé nul. Malgrat tot, millorant certs aspectes del procediment, seria possible aconseguir resultats més alts.

Els articles de recerca en el qual es basen els experiments 7.2 i 7.3 ( immunodetecció d'una proteïna endosomal mitjançant “quantum dots” i la detecció d'aquests a l'interior de la cèl·lula ) es poden consultar en els annexos.

## **8. CONCLUSIONS GENERALS**

Finalitzat el treball, és necessari valorar els coneixements adquirits i les conclusions extretes. Crec que la part teòrica ha complert el seu objectiu: fer conèixer els misteris de la nanociència, i la part experimental ha permès, sobretot, visualitzar aplicacions reals de la nanotecnologia en àmbits biològics. Així doncs, la valoració és clarament positiva.

No obstant, en un procés tan llarg i feixuc, com ho és el treball de recerca, les valoracions no es poden centrar únicament en els resultats finals. Des del meu punt de vista, són tan importants, o més, l'aprenentatge realitzat al llarg de tot el camí, iniciat fa gairebé un any, i altres valors que es forgen en projectes d'aquest estil com la constància i la rigurositat.

Per altra banda, també cal valorar l'estada a l'ICN i, més generalment, la beca "Joves i Ciència" de Catalunya Caixa. Aquesta oportunitat m'ha estat de gran ajuda per introduir-me dins del món científic, gairebé desconegut per mi des de l'institut. Aquesta estada ha estat imprescindible per la realització d'aquest treball ja que m'hagués mancat la part experimental i bona part dels coneixements teòrics.

Sense cap mena de dubte, aquest treball m'ha ajudat de manera científica, gràcies a ell he incorporat coneixements de nombrosos camps desconeguts per mi com l'electrònica, però, també ha millorat les meves capacitats lingüístiques i de comprensió.

En conclusió, el treball de recerca ha estat una eina per aprofundir en la nanociència i que m'ha permès adonar-me'n de les grans possibilitats de futur que té. Per tant, la considero una opció molt prometedora per dedicar-hi les meves investigacions futures.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- A.L. JONES, Richard. *Soft Machines: nanotechnology and life*. Oxford, Oxford University Press, 2007.
- MARTÍN PALMA, Raúl J. i LAKHTAKIA, Akhlesh. *Nanotechnology: A crash course*. Bellingham, Spie Press, 2010.
- BOISSEAU, Partick; HOUDY, Philippe; LAHMANI, Marcel. *Nanoscience: Nanobiotechnology and nanobiology*. Berlin, Springer, 2010.
- MARTÍN GAGO, José Ángel et al. *Nanociencia y nanotecnología. Entre la ciencia ficción del presente y la tecnología del futuro*. Madrid, Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología, 2009.
- MARTÍN GAGO, José Ángel. *¿Se pueden ver los átomos? De la entelequia a la realidad*. Apuntes de Ciencia i Tecnología, 2003, N°6.
- AL-QADI, Sonia i REMUÑÁN-LÓPEZ, Carmen. *Nanopartículas metálicas:oro*. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela.
- MARTÍN GAGO, José Ángel i MÉNDEZ, J. *Nanotecnología, macromoléculas y manipulación molecular*. Temas de Física.
- [http://www.icmm.csic.es/grupos/wp-content/uploads/2009/02/gago\\_cap19.pdf](http://www.icmm.csic.es/grupos/wp-content/uploads/2009/02/gago_cap19.pdf)
- <http://www.febiotec.es/noticias/eurobarometro-2010-tecnologias-emergentes>
- <http://todoanimaldesign.blogspot.com.es/2010/11/nanotecnologia.html>
- <http://blogs.creamoselfuturo.com/nano-tecnologia/2007/05/17/nanotecnologia-una-ciencia-para-la-humanidad/>
- <http://intcarlos.blogspot.com.es/2011/09/nanotecnologia.html>
- <http://www.nano.gov/>
- <http://www.recercat.cat/bitstream/handle/2072/4164/Projecte%20sencer.pdf?sequence=1>
- [http://www.cientifica.com/WhitePapers/054\\_Nanotechnology%20Takes%20a%20Deep%20Breath.pdf](http://www.cientifica.com/WhitePapers/054_Nanotechnology%20Takes%20a%20Deep%20Breath.pdf)
- <http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n1/full/nprot.2006.51.html>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19841273>
- <http://nanohub.org/resources/4940/about>
- <http://nanohub.org/resources/4945#series>
- <http://newscenter.lbl.gov/feature-stories/2010/05/10/untangling-quantum-entanglement/>
- <http://www.nano.gov/nanotech-101/special>
- <http://www.nano.gov/you/nanotechnology-benefits>
- [http://www.nano.gov/sites/default/files/pub\\_resource/nanotechnology\\_bigthingsfromatinyworld-print.pdf](http://www.nano.gov/sites/default/files/pub_resource/nanotechnology_bigthingsfromatinyworld-print.pdf)

## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

[http://es.wikipedia.org/wiki/Resina\\_epoxi](http://es.wikipedia.org/wiki/Resina_epoxi)

<http://es.wikipedia.org/wiki/Piezoelectricidad>

<http://www.madrimasd.org/blogs/ingenieriamateriales/2012/04/20/380/>

<http://www.nanooze.org/main/Nanooze/Articles.html>

[http://www.diaridegirona.cat/secciones/noticia.jsp?pRef=2008041600\\_9\\_260058\\_Cultura-Punts-quntics](http://www.diaridegirona.cat/secciones/noticia.jsp?pRef=2008041600_9_260058_Cultura-Punts-quntics)

<http://www.nanocotechnologies.com/content/AboutUs/AboutQuantumDots.aspx>

[http://es.wikipedia.org/wiki/Punto\\_cu%C3%A1ntico](http://es.wikipedia.org/wiki/Punto_cu%C3%A1ntico)

<http://www.qudev.phys.ethz.ch/content/courses/phys4/studentpresentations/afm/Atomic%20force%20microscopy.pdf>

<http://www.fisica.uh.cu/bibvirtual/vida%20y%20tierra/microscopiofuerza%20atomica/index.htm>

[http://es.wikipedia.org/wiki/Efecto\\_t%C3%BAnel](http://es.wikipedia.org/wiki/Efecto_t%C3%BAnel)

[http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio\\_de\\_efecto\\_t%C3%BAnel](http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_de_efecto_t%C3%BAnel)

[http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio\\_de\\_fuerza\\_at%C3%B3mica](http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_de_fuerza_at%C3%B3mica)

<http://ssti.ua.es/va/instrumentacio-cientifica/unitat-de-microscopia/microscopi-de-forca-atomica-i-efecte-tunel-afm-stm.html>

<http://www.qudev.phys.ethz.ch/content/courses/phys4/studentpresentations/afm/Atomic%20force%20microscopy.pdf>

<http://www.graphene.manchester.ac.uk/story/properties/>

<http://es.wikipedia.org/wiki/Fullereno>

<http://nanotubosdecarbono.com/>

<http://www.portalciencia.net/nanotecno/nanotubos.html>

<http://ca.wikipedia.org/wiki/Graf%C3%A8>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Graphene>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Ballistic\\_transistor](http://en.wikipedia.org/wiki/Ballistic_transistor)

<http://arxiv.org/pdf/0709.1163.pdf>

<http://ca.wikipedia.org/wiki/Transistor>

<http://www.graphene.manchester.ac.uk/future/>

<http://www.graphene.manchester.ac.uk/story/making-graphene/>

<http://www.nano.gov/nanotech-101/what/manufacturing>

[http://en.wikipedia.org/wiki/Physical\\_vapor\\_deposition](http://en.wikipedia.org/wiki/Physical_vapor_deposition)

[http://en.wikipedia.org/wiki/Chemical\\_vapor\\_deposition](http://en.wikipedia.org/wiki/Chemical_vapor_deposition)

[http://en.wikipedia.org/wiki/Atomic\\_layer\\_deposition](http://en.wikipedia.org/wiki/Atomic_layer_deposition)



## SÍNTESI DE NANOPARTÍCULES I LA SEVA APLICACIÓ EN SENSORS BIOLÒGICS

[http://en.wikipedia.org/wiki/Dip-Pen\\_Nanolithography](http://en.wikipedia.org/wiki/Dip-Pen_Nanolithography)

[http://en.wikipedia.org/wiki/Nanoimprint\\_lithography](http://en.wikipedia.org/wiki/Nanoimprint_lithography)

[http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning\\_probe\\_lithography](http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_probe_lithography)

[http://en.wikipedia.org/wiki/Roll-to-roll\\_processing](http://en.wikipedia.org/wiki/Roll-to-roll_processing)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Self-assembly>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Nanolithography>

<http://versionextropiana.blogspot.com.es/2012/08/nanomedicina-la-busqueda-de-una.html>

<http://www.foresight.org/Nanomedicine/Gallery/Captions/Image124.html>

<http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1825>

<http://www.windsorscientific.co.uk/Nano-eNabler-Nanoarrays-vs--Microarrays.html>

[http://www.ub.edu/stat/docencia/bioinformatica/microarrays/ADM/slides/complements/Genoma\\_Espanya-Aplicaciones\\_de\\_los\\_microarrays.pdf](http://www.ub.edu/stat/docencia/bioinformatica/microarrays/ADM/slides/complements/Genoma_Espanya-Aplicaciones_de_los_microarrays.pdf)

<http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1825>

<http://www.sensorsmag.com/sensors/chemical-gas/nanotechnology-enabled-sensors-possibilities-realities-and-a-1074>

<http://www.zdnet.com/blog/emergingtech/a-nanosensor-to-predict-asthma-attacks/672>

[http://es.wikipedia.org/wiki/Tamp%C3%B3n\\_fosfato\\_salino](http://es.wikipedia.org/wiki/Tamp%C3%B3n_fosfato_salino)

[http://en.wikipedia.org/wiki/Squarewave\\_voltammetry](http://en.wikipedia.org/wiki/Squarewave_voltammetry)

[http://ca.wikipedia.org/wiki/M%C3%A8tode\\_electroanal%C3%ADtic](http://ca.wikipedia.org/wiki/M%C3%A8tode_electroanal%C3%ADtic)

<http://www.nanotec.es/applications/gallery/detalle.php?cat=miscelaneous&f=2&c=detalle>

## **10. AGRAÏMENTS**

En primer lloc, vull agrair a Catalunya Caixa per la inestimable feina que estan realitzant des del Programa Joves i Ciència on es donen oportunitats a estudiants de secundària i batxillerat de conèixer el món científic de primera mà i, sobretot, a l'Eva i la Maria, sense les quals el Programa no seria igual. De la mateixa manera, vull mencionar a tot l'equip de l'ICN que em va acollir i tractar com un més. Especialment, m'agradaria donar les gràcies als investigadors amb els quals vaig treballar, l'Helena Montón i en Miquel Cadevall, i l'investigador líder del meu grup de recerca, l'Arben Merkoçi.

Més enllà del programa, agraeixo al meu tutor del treball, l'Albert Navarro, la seva feina i atenció en la meva recerca, els seus consells han estat de gran ajuda. En general, dono les gràcies a l'INS Vilamajor per confiar en mi i presentar-me a optar per la beca.

Finalment, dono les gràcies a tots aquells que m'han ajudat a fer el treball i, particularment, a la meva família.

## **11. ANNEXOS**

A continuació, s'exposen els articles de recerca a partir dels quals vaig realitzar el meu treball experimental. Aquests articles em van ser disposats per part dels investigadors de l'ICN per realitzar les experiències detallades en la part experimental. Així doncs, són documents que els he treballat a fons i, per tant, és necessari incloure'ls en la memòria per mostrar la feina realitzada.

El primer article ( *Qds versus Alexa: reality of promising tools for immunocytochemistry* ) em va servir de gran ajuda per: primer, dur a terme correctament l'experiment i, segon, comprendre, amb tota mena de detalls, el procediment i els resultats obtinguts.

En segon lloc, l'article *Electrochemical investigation of Cellular Uptake of Quantum Dots decorated with a Proline-Rich Cell penetrating peptide* fou la base de la tercera pràctica. En aquest cas, l'article em va servir de referència, però, sobretot, de font d'informació ja que els seus fonaments no van ser tractats pels investigadors.

Cal mencionar que tots aquests articles de recerca han estat realitzats per investigadors de l'ICN, amb els quals vaig treballar-hi.

Research

Open Access

## QDs versus Alexa: reality of promising tools for immunocytochemistry

Helena Montón<sup>1</sup>, Carme Nogués<sup>2</sup>, Emma Rossinyol<sup>1</sup>, Onofre Castell<sup>1</sup> and Mònica Roldán\*<sup>1</sup>

Address: <sup>1</sup>Servei de Microscòpia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra Campus, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain and <sup>2</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Patologia i Immunologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra Campus, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Email: Helena Montón - [helena.monton@campus.uab.cat](mailto:helena.monton@campus.uab.cat); Carme Nogués - [carme.nogues@uab.cat](mailto:carme.nogues@uab.cat)

Emma Rossinyol - [emma.rossinyol@uab.cat](mailto:emma.rossinyol@uab.cat); Onofre Castell - [onofre.castell@uab.cat](mailto:onofre.castell@uab.cat); Mònica Roldán\* - [monica.roldan@uab.cat](mailto:monica.roldan@uab.cat)

\* Corresponding author

Published: 27 May 2009

Received: 5 March 2009

Journal of Nanobiotechnology 2009, 7:4 doi:10.1186/1477-2875-7-4

Accepted: 27 May 2009

This article is available from: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/7/1/4>

© 2009 Montón et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** The unique photonic properties of the recently developed fluorescent semiconductor nanocrystals (QDs) have made them a potential tool in biological research. However, QDs are not yet a part of routine laboratory techniques. Double and triple immunocytochemistries were performed in HeLa cell cultures with commercial CdSe QDs conjugated to antibodies. The optical characteristics, due to which QDs can be used as immunolabels, were evaluated in terms of emission spectra, photostability and specificity.

**Results:** QDs were used as secondary and tertiary antibodies to detect  $\beta$ -tubulin (microtubule network), GM130 (Golgi complex) and EEA1 (endosomal system). The data obtained were compared to homologous Alexa Fluor 594 organic dyes. It was found that QDs are excellent fluorochromes with higher intensity, narrower bandwidth values and higher photostability than Alexa dyes in an immunocytochemical process. In terms of specificity, QDs showed high specificity against GM130 and EEA1 primary antibodies, but poor specificity against  $\beta$ -tubulin. Alexa dyes showed good specificity for all the targets tested.

**Conclusion:** This study demonstrates the great potential of QDs, as they are shown to have superior properties to Alexa dyes. Although their specificity still needs to be improved in some cases, QDs conjugated to antibodies can be used instead of organic molecules in routine immunocytochemistry.

### Background

Semiconductor nanocrystals called Quantum Dots (QDs) are fluorochromes with many advantages compared to the organic fluorescent dyes habitually used in immunocytochemistry procedures [1]. Their water solubility and capacity to be conjugated with different biomolecules have only recently been established [2]; therefore, their

application in both the biological and medical research fields is still scarce.

Since the first microscope appeared up to the present day, different kinds of dyes (fluorescent proteins, small fluorescent molecules, etc.) have been used to detect or localize different biomolecules within an intracellular context.

Page 1 of 10

(page number not for citation purposes)

In the last decade, when nanotechnology became relevant, QDs were introduced as a promising methodological tool due to their intrinsic brightness, high photostability, high molar extinction coefficient, narrow emission band, and excitability with several wavelengths [3]. These qualities opened the possibility to handle samples labeled with different colors, preventing fluorescent signal crossing-over, using a single laser line to excite different QDs at the same time [4].

QDs are aggregates of atoms (from hundreds to tens of thousands) that behave as one- of semiconductor materials that produce a crystalline matrix (nanocrystal). Composition, size and shape of this matrix determine their physical characteristics. The properties of nanocrystals vary according to their size, which ranges generally from 1 to 10 nm in diameter [5]; whereas smaller QDs emit in shorter wavelengths, bigger QDs emit in longer wavelengths. The crystalline core of QDs is composed of cadmium selenide and covered with a zinc sulfide shell. Moreover, some QDs are coated with different kinds of polymers and molecules in order to make them water-soluble and to facilitate their conjugation to different biomolecules, providing a specific functionality [6-9].

QDs can be linked to many molecules, such as DNA, proteins and antibodies, and therefore they have a wide range of applications in the biosciences. To date, QDs have been used to localize proteins [10,11] and mRNA within the cell [12], to label cancer markers [13], to follow in vivo metastatic cells during extravasation [14] or to track embryonic stem cells in deep tissues [15].

The aim of this study was to use QDs as secondary and tertiary antibodies in a routine immunocytochemistry procedure in which organic dyes are currently used. Therefore, we characterized the shape, size and optical properties of QD 655 (IgG or streptavidin conjugated) in order to develop a standard protocol for protein immunodetection using QDs. We have made a comparative study of fluorescence intensity, bandwidth, photostability, specificity and the quality of QD 655 versus its homologous organic fluorophore, Alexa 594 (IgG or streptavidin conjugated), to evaluate the possibility of replacing Alexa with QDs in this protein detection procedure.

## Results

### QDs characterization by HRTEM

QD 655 showed a cone-like shape (Figure 1) with no differences in shape between QDs conjugated to streptavidin or to IgG. However, when comparing the size of the QDs conjugated to IgG with those conjugated to streptavidin, significant differences ( $p < 0.05$ ) were found. QD 655-IgG is bigger ( $15.4 \pm 0.2 \times 6.4 \pm 0.1$  nm) than QD 655-strep ( $13.1 \pm 2.8 \times 6.3 \pm 0.9$  nm).

### QDs characterization by CLSM

QDs have been reported to present several optical advantages in fluorescence detection regarding conventional organic fluorophores. QD 655 has been compared to Alexa 594 to evaluate differences in fluorescence intensity, bandwidth, photostability and specificity.

#### Spectro emission

First, the maximum fluorescence emission peak ( $\lambda_{em}$ ) of both fluorophores was assessed using the lamblastan function of the CLSM. QD 655 presented its maximum at 651 nm, whereas Alexa 594 had its peak at 615 nm (Figure 2, Table 1). The  $\lambda_{em}$  value recorded was identical for the same fluorophore independently of its conjugation (IgG or strep).

Second, the fluorescence intensity (FI) level of QD 655 (Ig or Strep) and Alexa 594 (Ig or strep) was calculated. The FI level of QD 655 was higher than that of Alexa 594 (Table 1).

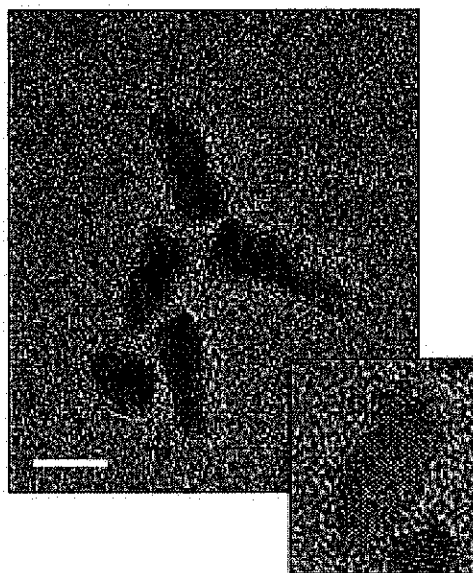
Differences in bandwidth, calculated from the emission profiles (Figure 2), were also found when both kinds of fluorophores were compared. QDs had narrower values of bandwidth than the homologous Alexas (Table 1).

#### Photostability

Photostability was assessed by exposing immunolabeled cultures for eight minutes at the maximum power laser line of 561 nm. For the first 90 seconds, the initial fluorescence intensity of  $\beta$ -tubulin labeled with QD 655s was reduced by about 5%. The same laser incidence produced an intensity reduction of 90% in cultures labeled with Alexa 594s. At the end of the irradiation period, no  $\beta$ -tubulin was detected in cultures labeled with Alexa 594s, whereas in cultures labeled with QD 655s,  $\beta$ -tubulin still kept up to 10%-40% of the initial fluorescence intensity (Figure 3 and 4).

#### Staining specificity

Staining specificity was analyzed on cell cultures labeled with primary antibody against the microtubule network ( $\beta$ -tubulin), Golgi complex (GM130) or endosomal system (EEA1). Brightness of both fluorophores conjugated to IgG was similar (Figure 5). Differences in specificity were detected when QD 655-IgG was used as a secondary antibody against  $\beta$ -tubulin. The network of microtubules was not well defined, with background and QD aggregates that had not selectively linked to  $\beta$ -tubulin. In contrast, Alexa 594-IgG was very specific and the microtubule network was definitely detectable. When QDs and Alexas were used as tertiary antibodies, the tubulin network was clearly detected by both fluorophores, but Alexa fluorochromes were more specific in pinpointing the tubulin filament structure. No differences in specificity were



**Figure 1**  
**HRTEM QD characterization.** The large image shows a general view of QD 655 dispersion. The small image shows a detail of a single QD 655 cone-like nanocrystal. Its crystalline structure core can be seen. Scale bar = 10 nm.

detected when QD 655 or Alexa 594 was used as a secondary or tertiary antibody against GM130 or HEAT. Both types of fluorophores showed similar specificity (Figure 6).

### Discussion

In this work inorganic QDs were used to demonstrate their feasibility and advantages as a basic research technique in routine immunocytochemistry, as compared to Alexa organic dyes. To our knowledge, commercial QDs are not yet standardized; neither are they completely characterized to be used without further evaluation [16,17].

HRTEM characterization of QDs demonstrated differences in core size between the two types of QDs. In theory, these differences should be due to QD manufacturing, but the current methods used to produce QD allow particle size and particle size distribution to be controlled accurately [18]. Moreover, according to the Quantum Dot Corporation [2], there are only slight size differences in a given batch of QDs. However, other authors have found some variability in CdSe QDs size distribution [19].

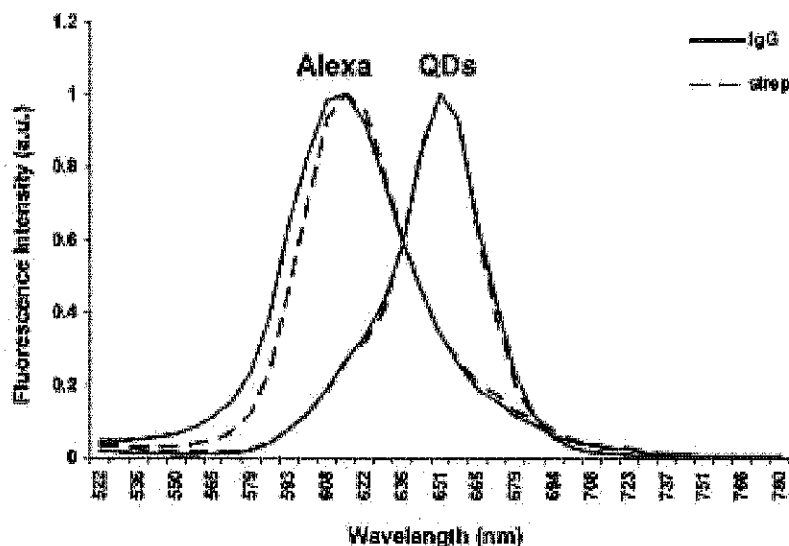
One of the optical properties measured was the emission spectrum, which in QDs is related to their size. QD 655 conjugated to IgG or streptavidin displays a higher emission peak and a narrower bandwidth than its Alexa homologue. These advantageous characteristics have been well documented previously by different authors [4,13,20] and offer the possibility of using different QDs simultaneously without overlapping emission bands. The bandwidth of our batch of QD 655 (IgG and strep) was similar to that described in the literature [18,20].

Slight differences in size result in slight variations in the emission wavelength. As a consequence, the emission spectrum of a certain nanocrystal ensemble will be broader than an individual QD spectrum [21]. A variation in size distribution of 5% translates into a bandwidth of approximately 25-30 nm, a narrow value compared to the bandwidth of many fluorescent dyes [21]. Since the size distribution of each QD analyzed in this study was about 10%, it was expected that the bandwidth would be greater (ca. 35 nm).

Another optical characteristic analyzed was the intrinsic brightness of both fluorophores. The fluorescence intensity (FI) was higher in QDs than in Alexas. Most authors agree that QDs have superior brightness than organic fluorophores [1,13,20,22]. However, other studies have found that QDs are not as bright as expected [23]. Slight differences in FI (ca. 8%) were detected between both QDs, while in Alexas these differences were inappreciable. Other authors have found that the FI of QD 525-IgG was nearly one-third that of QD 525-streptavidin [24].

Photostability was the third optical property analyzed, and the entire scientific community agrees that this is the best advantage of QDs, as compared to other fluorescent dyes [3,5]. Our study confirms that QDs have the highest photostability. This characteristic is very important when *in vivo* analyses are carried out and long-term experiments are necessary and use multiple targets [25]. But photostability is also a determining factor in fixed samples in which some magnification is needed to find the best resolution to observe subcellular structures. Before QDs came out, Alexa dyes were considered to be the most photostable fluorophores [26]. Nowadays, this reality has changed: Alexa fluorophores lose almost all of their fluorescence in only 90 seconds of laser exposure, while we have demonstrated that QDs can be exposed to laser light for eight consecutive minutes and less than 40% of their initial fluorescence is lost.

All of these characteristics confirm that QDs have unique optical properties that make them powerful fluorescent dyes. In addition to the increasing interest in QDs in fluorescence techniques, their electron-dense core has poten-



**Figure 2**  
Fluorescence emission spectra. Spectral profile representing fluorescence intensity versus emission wavelength (500–780 nm) for QD 655-IgG, QD 655-Streptavidin and their Alexa homologues. Excitation wavelength = 488 nm.

tical to carry out correlated studies between CLSM and TEM, which would allow protein localization inside cells on a nanometric scale [11]. However, there is some controversy regarding the specificity of QDs as immunolabels. While some authors argue that QDs have comparable or even superior specificity in relation to organic fluorophores [27], others consider that QDs are appropriate fluorophores to be used as immunolabels, although without increasing sensitivity, and with higher, non-specific binding and aggregation than Alexa dyes [18,23]. Low specificity could be due to different reasons: i) a non-optimal concentration of QDs that could lead to

a non-specific signal [1], or ii) a non-optimal surface chemistry of QDs that would affect their spectroscopic properties and colloidal stability as well as their biomolecular function or size, which could sterically hamper access to cellular targets [20]. Several authors have pointed out the importance of QD concentration for improving the sensitivity of detecting water pathogens [22], as well as improving specific immunostaining [1]. Before starting the QD characterization, we tested three different concentrations of QD 655 in order to use the most appropriate in which to perform this study (data not shown). The optimal concentration was 30 nM because there were scarce aggregates and the QD concentration was high enough to label the tubulin network.

**Table 1: Spectral properties.**

	Emission peak (nm)	F <sup>a</sup>	Bandwidth (nm) <sup>b</sup>
Q655-IgG	651	200	35.5
Q655-strep	615	180	37
A594-IgG	615	75	48
A594-strep	615	75	53

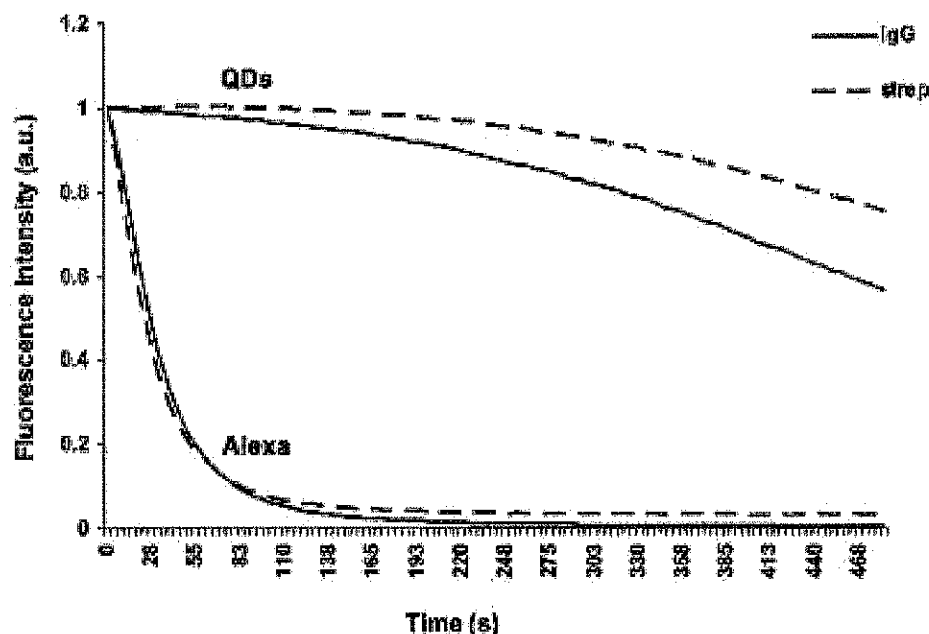
Emission peak, fluorescence intensity (F) and bandwidth for QD 655 and Alexa 594 analyzed at 488 nm excitation wavelength

(a) Values in gray level (0–255).

(b) Calculated as the full width at 50% maximum of the emission spectrum (FWHM) in the F profile.

On the other hand, specificity was higher when QDs were used as a tertiary antibody, but still lower compared to their Alexa homologue. Other authors have reported that QD sensibility is improved when they are used as tertiary antibodies [24]; this increase in sensibility is probably due to the high affinity between streptavidin and biotin, and to the signal amplification.

Finally, the specificity of QDs in detecting  $\beta$ -tubulin, GM130 and ERA1 proteins was tested. While specificity



**Figure 1**  
Photostability profile. Fluorescence intensity changes of QDs and Alexas during the irradiation period with the 541 nm laser line at maximum power.

against  $\beta$ -tubulin was lower than Alexa, no differences were observed when QDs were used to stain the Golgi complex (GM130 protein) or endosomes (EEA1). Specificity of QDs was higher for primary antibodies against proteins like GM130 and EEA1, which are scarce in the cell and are not involved in the composition of thin structures. Specificity was lower for proteins such as  $\beta$ -tubulin which is an abundant protein in the cell and that polymerizes producing an extremely well organized thin structure. QD 655 is one of the largest QDs commercialized, and it is possible that its size could sterically obstruct its access to its target [20].

#### Conclusion

QDs are excellent fluorophores for labeling cellular targets, as they display higher intensity, an enhanced signal to noise ratio, a narrower bandwidth and higher photostability than organic dyes. However, the specificity of QDs depends on the target they have to bind to. More studies

are needed to improve the specificity of QDs so they can be used routinely, alone or in combination with organic fluorescent dyes, in all biological applications. In this study we were able to use QDs as secondary and tertiary antibodies to clearly detect discrete localized proteins. Therefore, in these cases, they can replace fluorescent organic molecules in routine immunocytochemistry procedures.

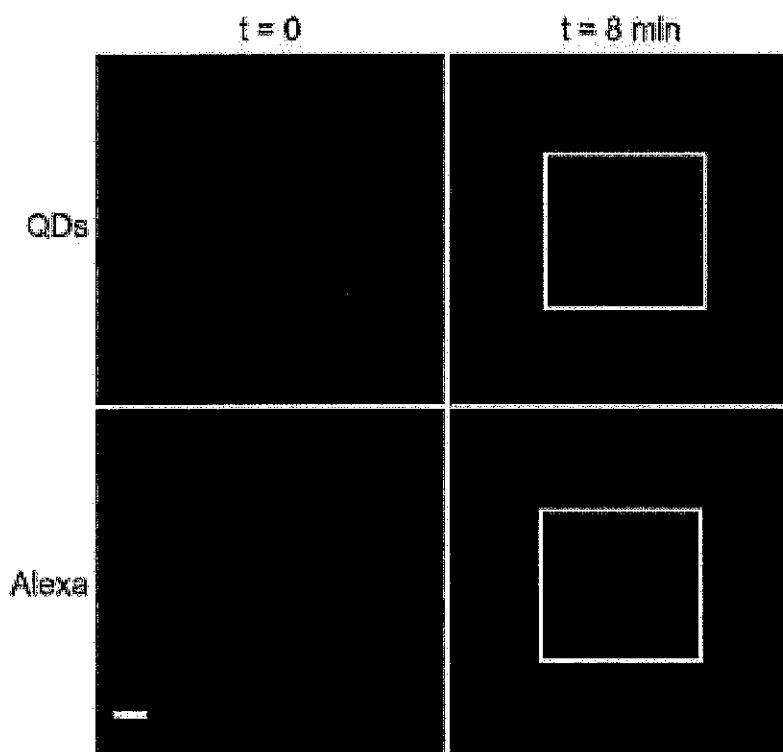
In the future, when better control of the synthesis and functionalization of QDs is possible, the range of biological applications of these fluorophores can be extended and they can become part of basic research techniques.

#### Materials and methods

##### Material

Two types of red emission spectra QDs were used as secondary and tertiary antibodies: QD 655 Goat F(ab)<sub>2</sub>, anti-mouse IgG conjugate (QD 655-IgG) and QD 655 strepta-





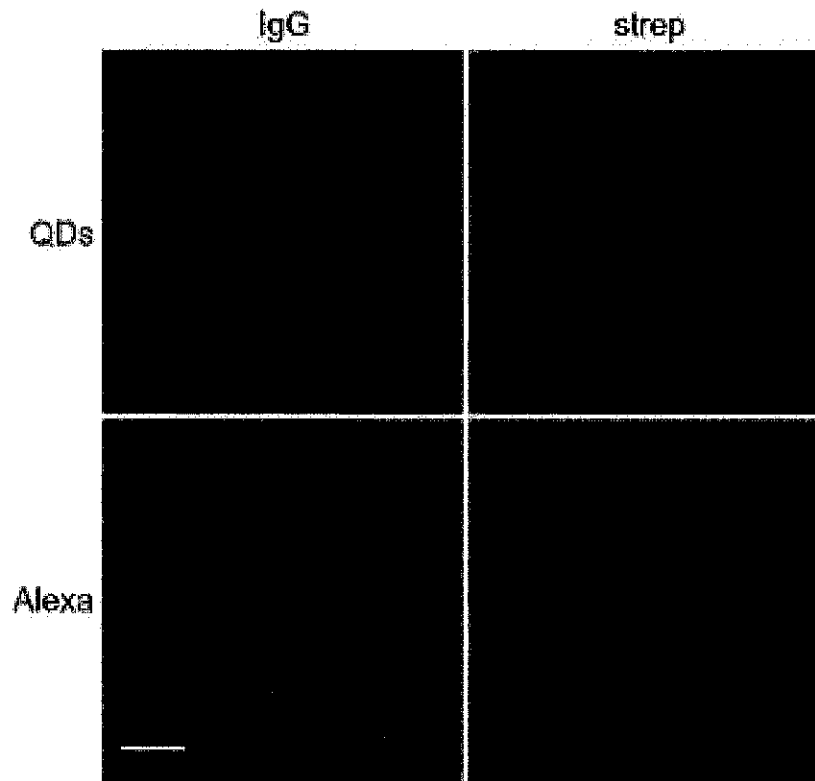
**Figure 4**  
**CLSM photostability images.** Left-hand images correspond to the emission signal of QDs and Alexas conjugated to streptavidin before the irradiation period ( $t = 0$  min) with the 561 nm laser line at its maximum power. Right-hand images show the emission signal of QDs and Alexas at the end of the irradiation period ( $t = 8$  min). Note the loss of fluorescence intensity in the delimited area. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .

vidin conjugate (QD 655-strep). Two homologous red emission Alexa Fluor Dyes: Alexa 594 Goat F(ab)<sub>2</sub> anti-mouse IgG conjugate (Alexa 594-IgG) and Alexa 594 streptavidin conjugate (Alexa 594-strep) were used to compare to QD antibodies. Secondary antibodies QD 655-IgG and Alexa 594-IgG were purchased from Molecular Probes (Invitrogen Corp; Eugene, Oregon, USA), and Anti-Ms IgG hsein from Boehringer (Mannheim; Indianapolis, USA). Primary antibody monoclonal anti- $\beta$ -tubulin was purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). CM13D and IEA1 primary antibodies were purchased from BD Biosciences (San Jose, California, USA).

#### High Resolution Transmission Electron Microscopy (HRTEM)

To carry out a HRTEM analysis, 0.5  $\mu\text{l}$  of each QD was diluted in 500  $\mu\text{l}$  of MilliQ water and centrifuged for 10 minutes at 6000 rpm to eliminate all organic precipitates. A drop of each diluted QD was deposited on a carbon layer copper grid and air-dried.

Images of each type of QD were obtained with a HRTEM, using a JEOL/EM 2011 transmission electron microscope (Jeol Ltd; Tokyo, Japan) operating at 200 kV. The sizes of the QDs were determined with Digital Micrograph software (Gatan Inc; Warrendale, Pennsylvania, USA) and data obtained were processed with statistics software Origin 8 (OriginLab Corporation; Northampton, Massachusetts, USA).



**Figure 5**  
**CLSM specificity analysis of  $\beta$ -tubulin labeling.** Maximum intensity projections of the distribution of the tubulin network labeled with QDs (top images) show lower specificity than their organic Alexa homologue labeling (bottom images). Scale bar = 10  $\mu$ m.

#### Cell cultures

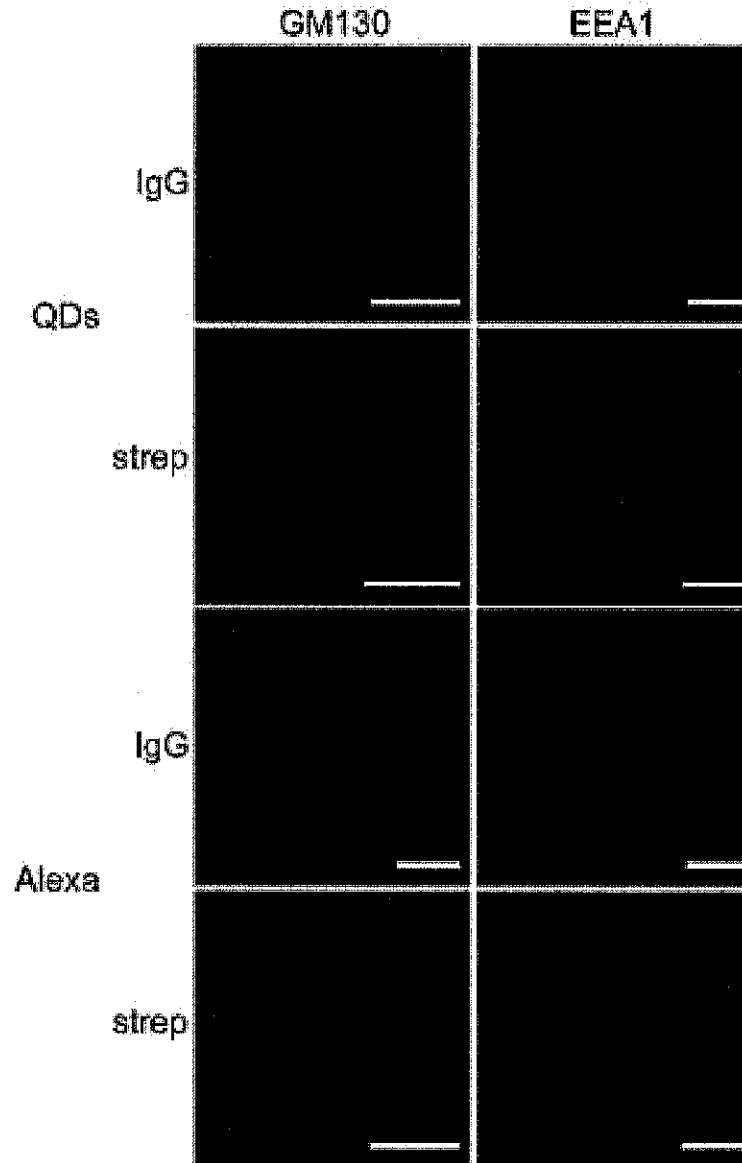
Two different culture cell lines, Vero (ATCC-CCL-81) and HeLa (ATCC-CCL-2), were used. Cells were maintained in MEM (GIBCO, Rockville, Maryland, USA) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (GIBCO) and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere.

#### Immunocytochemistry

For immunocytochemistry analysis, cells were seeded onto glass coverslips and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, until confluence was reached. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pennsylvania, USA) in 0.1 M phosphate buffer saline (Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Germany) for 15 min, permeabilized in 0.25% Triton X-100

(Fluka Chemie AG; Buchs, Switzerland) for 15 min and blocked in 6% bovine serum albumin (Sigma Aldrich Chemie GmbH; Steinheim, Germany) for 40 min. Finally, cells were incubated with the anti- $\beta$ -tubulin monoclonal antibody (4  $\mu$ g/ml) to detect the microtubule network, with the GM130 antibody (10  $\mu$ g/ml) to detect the Golgi complex or with the BEA1 antibody (2.5  $\mu$ g/ml) to detect the endosomal system. In all cases the primary antibody was incubated for 1 h at 37°C.

To perform secondary immunodetection, anti-Ms IgG antibody conjugated to Alexa or QDs (4  $\mu$ g/ml and 30 nM final concentration, respectively) was used. For tertiary immunodetection, cells were first incubated with Anti-Ms IgG Biotin (1  $\mu$ g/ml) for 1 h at 37°C, and then with



**Figure 6**  
**CLSM specificity analysis of GM130 and EEA1 labeling.** Isosurface representation of the cell shows the nucleus (blue) labeled with Hoechst 33342, Golgi complex (GM130) and endosomal system (EEA1) (red) within a three-dimensional volumetric x-y-z data field. Scale bar = 10 µm.

streptavidin conjugated to Alexa or QDs (4 µg/ml and 20 nM final concentration, respectively). Coverslips were mounted onto glass slides using Fluorprep mounting media (bioMérieux SA, Marcy l'Étoile, France) to preserve fluorescence.

#### Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

Images were captured with a CLSM Leica TCS-SP5 AOBS spectral (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) using a Plan-Apochromatic 63× objective (NA 1.4, oil).

Series of images (xyz), called lambedastacks, were taken to determine the spectra emission of QDs and Alexas and to establish their bandwidth. The excitation wavelength used was the 488 nm line of an Ar laser. The AOTF was set at 40% and 80% for QDs and Alexas, respectively.

The emission detection was set from 500 to 780 nm. The confocal pinhole for each lambedastack was fixed at 2 Airy units. For each xy focal plane, confocal microscopy measured the emission variation every 10 nm (lambda step size = 7 nm). The emission spectra analysis was processed using the CLSM software (Leica LAS AF). A Region of Interest (ROI) was delimited to determine the fluorescence intensity (FI) in the selected area in relation to the wavelength. To analyze immunolabeled cells, 45 ROIs of 2 µm<sup>2</sup> were selected near cell nuclei; FI and bandwidth were calculated in the selected ROIs.

Photostability experiments were performed using the Live Data Mode function of the CLSM, which permits monitoring long time-lapse experiments. Each type of fluorophore was illuminated with a 561 nm excitation laser line for 8 minutes (100% power, zoom = 6). Images were taken at 1 second intervals, in 512 × 512 pixels with 8 bits of dynamic range. In the area where the laser was at its maximum illumination power, 45 ROIs of 2 µm<sup>2</sup> were selected to show the FI in the region in relation to time.

Secondary or tertiary antibody specificity was evaluated using the xyz mode of the CLSM, which permits one to scan the xy plane along the z axis. Images were captured every 0.2 µm along 3 µm of thickness, with 1 Airy confocal pinhole. From the xyz series obtained by CLSM, maximum intensity projections were achieved with Leica LAS AF software, and three-dimensional models were generated using Inaria software (Biplane; Zürich, Switzerland).

#### Statistical analysis

To determine if there were significant differences in size between QDs conjugated to IgG or to streptavidin, a two-sample T-Student's test (T-test) for comparison of means, with 95% confidence, was carried out. Previously, a F-

Fisher test was performed and equal variances were assumed due to the returned p-value of 0.388. The equality of means hypothesis was rejected when the p-value was lower than 0.05 (p < 0.05).

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

EM performed the majority of the experiments and wrote the manuscript with MH and CN. ER contributed with the characterization by HRTEM and helped with data analysis. MR, CN and CG designed the overall project, helped with interpretation of data and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

The authors would like to extend special thanks to Maria Barba for her support in the laboratory, Maria Mascon for her contributions to statistical calculations and Maria Dolores Baró for her general support. The English of this manuscript has been read and corrected by Mr. Chuck Simmons, a native English-speaking University instructor of English.

#### References

1. Nees JM, Alkhatir BS, Latham CB, Roth KA: Combined tyramide signal amplification and quantum dots for sensitive and photostable immunofluorescence detection. *J Histochem Cytochem* 2003, 51:981-987.
2. Watson A, Wu XY, Brucher M: Lighting up cells with quantum dots. *Biotechniques* 2003, 34(2):296-300.
3. Alivisatos AP: Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* 1996, 271:123-137.
4. Chaitopadhyay PK, Pritz DA, Harper TF, Bodo MR, Yu J, Gostick E, Portillo SP, Goepfert P, Koop RA, De Rosa SC, Brucher MP, Koehler PE: Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. *Acc Mater* 2004, 1:2572-977.
5. Murray CB, Kagan CR, Saward MG: Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. *Annu Rev Mater Sci* 2000, 30:545-610.
6. Madani L, Lyda HT, Goldman ER, Mardoussi H: Quantum dot bioconjugates for imaging, labeling and sensing. *Nat Mater* 2005, 4:433-444.
7. Yu WW, Chang E, Drorok R, Cohen YG: Water-soluble quantum dots for biomedical applications. *Seminophy Res Commun* 2004, 348:751-784.
8. Jamison T, Sakthi R, Petrova D, Rocco R, Inami M, Seibler AM: Biological applications of quantum dots. *Seminophy Res Commun* 2007, 37:477-493.
9. Iga AM, Robertson JI, Winslet MC, Seibler AM: Clinical potential of quantum dots. *J Mater Sci Mater Med* 2007, 18:767-768.
10. Neman R, Delbecq G, Ren Y, Li R, Szallasi-Zones DP: Application of quantum dots as probes for correlative fluorescence, conventional, and energy-filtered transmission electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 2004, 52:13-18.
11. Gopman BNG, Dierckx J, Smay BC, Jones YZ, Elman M-H: Correlated light and electron microscopic imaging of multiple endogenous proteins using Quantum dots. *Nat Mater* 2005, 4:743-748.
12. Matsuno A, Itoh J, Takahashi S, Nagahara T, Ozawa RY: Three-dimensional imaging of the intracellular localization of growth hormone and prolactin and their mRNA using nanocrystal (quantum dot) and confocal laser scanning microscopy techniques. *J Histochem Cytochem* 2005, 53:803-808.
13. Wu XY, Liu H, Liu JQ, Haber KM, Treadway JA, Larson JF, Ge NF, Fazio F, Brucher MP: Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 2003, 21:41-46.

14. Youn EB, Jiwon JK, Mitsuaki H, Simon SP: Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum-dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nat Med* 2004, 10:991-998.
15. Lin S, Xie XJ, Patel MR, Yang YH, Li ZJ, Cao F, Ghysens O, Zhang Y, Gambhir SS, Rao JH, Wu JC: Quantum dot imaging for embryonic stem cells. *Acc Chem Res* 2007, 40:67.
16. Tonti D, van Mourik F, Chorghji M: On the excitation wavelength dependence of the luminescence yield of colloidal CdSe quantum dots. *Nano Lett* 2004, 4:2483-2487.
17. Wu Y, Campos SK, Lopez GP, Orban MA, Sklar LA, Borada T: The development of quantum dot calibration beads and quantitative multicolor bioassays in flow cytometry and microscopy. *Anal Biochem* 2007, 364:180-192.
18. Bailey RE, Smith AM, Nie SP: Quantum dots in biology and medicine. *Physica E* 2004, 25:1-17.
19. Li LS, Hu JT, Yang WD, Avizator AP: Band gap variation of size- and shape-controlled colloidal CdSe quantum rods. *Nano Lett* 2003, 3:349-354.
20. Rasch-Genger U, Grubbe M, Cavaliere-Jankol S, Nitschke R, Nann T: Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Mater* 2008, 7:761-773.
21. Jorge PAS, Martins MA, Trindade T, Santos J, Fuzati F: Optical fiber sensing using quantum dots. *Sensors* 2007, 7:3489-3534.
22. Lee JY, Cho SL, Hu JT, He WW, Feng YJ, Tan XL, Wong SW: Use of semiconductor quantum dots for photo-stable immunofluorescence labeling of *Cryptosporidium parvum*. *Appl Environ Microbiol* 2004, 70:5712-5736.
23. Ferraz BC, Bergquist PL: Quantum dots as alternatives to organic fluorophores for *Cryptosporidium* detection using conventional flow cytometry and specific monoclonal antibodies: Lessons learned. *Quant Part a* 2007, 71A:365-371.
24. Fontaine TJ, Wincovitch SM, Goto DM, Gerfield SH, Pittsburg S: Multispectral imaging of clinically relevant cellular targets in renal and lymphoid tissue using semiconductor quantum dots. *Mol Pathol* 2006, 19:1181-1191.
25. Fu AH, Gu WW, Lambert C, Avizator AP: Semiconductor nanocrystals for biological imaging. *Curr Opin Neurobiol* 2005, 15:548-573.
26. Panichuk-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Stewart J, Ehrig MK, Milard F, Mao F, Liang YF, Haugland RP: Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photo-stable conjugates. *J Histochem Cytochem* 1999, 47:1179-1188.
27. Hahn MA, Taha JS, Krauss TD: Detection of single bacterial pathogens with semiconductor quantum dots. *Anal Chem* 2005, 77:4881-4889.

**Publish with BioMed Central and every scientist can read your work free of charge**


"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Dr Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



## Electrochemical Investigation of Cellular Uptake of Quantum Dots Decorated with a Proline-Rich Cell Penetrating Peptide

Sergio Manly,<sup>1,†</sup> Silvia Pujals,<sup>5</sup> Ernest Giralt,<sup>5,¶</sup> and Arben Merkoçi<sup>1,\*,†,||</sup>

<sup>1</sup>Nanoelectronics & Biosensors Group, CIN2 (ICM-CSIC) Institut Català de Nanotecnologia, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>Department of Chemistry, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

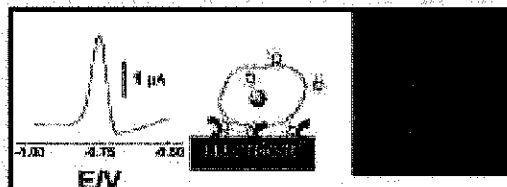
<sup>3</sup>Institute for Research in Biomedicine, Barcelona Scientific Park, Barcelona, Spain

<sup>4</sup>Department of Organic Chemistry, University of Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>5</sup>ICREA, Barcelona, Spain

Supporting Information

**ABSTRACT:** The use of square wave voltammetry to monitor the cellular uptake, in HeLa cells, of quantum dots (QDs) decorated with sweet arrow peptide (SAP) is reported. A SAP derivative containing an additional N-terminal cysteine residue (C-SAP) was synthesized using the solid-phase method and conjugated to QDs. The obtained results show that QDs-SAP either interact with the extracellular cell membrane matrix or translocate the bilayer. The first situation, membrane adsorption, is probably a transient state before cellular uptake. Both confocal microscopy and SWV results support the detection of this cellular internalization process. The developed electrochemical investigation technique can provide valuable insights into the study of peptide-mediated delivery, as well as the design and development of nanoparticle probes for intracellular imaging, diagnostic, and therapeutic applications. In addition, the described electrochemical interrogation is low cost, is easy to use, and offers future interest for diagnostics including cell analysis.



### INTRODUCTION

Quantum dots (QDs) are emerging as a new class of fluorescent labels for molecular, cellular, and *in vivo* imaging applications, due to their special optical properties such as a narrow and size-tunable emission spectra, broad absorption profiles, superior photostability, and excellent resistance to chemical degradation or photodegradation with respect to fluorescent dyes.<sup>1–3</sup> QDs decorated with different types of biomolecules, for example, antibodies,<sup>4–6</sup> peptides,<sup>7</sup> and DNA<sup>8,9</sup> able to interact with cells and provide biological compatibility have been used. The use of QDs and other nanoparticles as tags for electrochemical detection of DNA<sup>10,11</sup> (including codified technology)<sup>12,13</sup> and proteins<sup>14,15</sup> has been extensively studied. An ICP-MS-linked DNA assay based on gold nanoparticles immunocoupled through a peptide sequence has also been developed by our group.<sup>16</sup>

Cell-penetrating peptides (CPPs) have been conceived as potential vectors to carry drugs that have low bioavailability across cell membranes.<sup>17–20</sup> Different CPPs have been described to efficiently deliver various types of cargo to the inside of cells from low-molecular-weight drugs to liposomes and plasmids. Among CPPs, the so-called SAP (sweet arrow peptide) combines the ability to translocate the plasma membrane with a virtually complete lack of cytotoxicity.<sup>17–21</sup> SAP shares with other CPPs the presence of positively charged guanidinium groups, a feature that is considered very important for cellular uptake.<sup>22</sup>

In addition, in aqueous medium, SAP adopts a strongly amphipathic helical conformation.<sup>23</sup>

We are particularly interested in electrochemical investigation of the QD cellular uptake, because (I) previously reported methods based either on imaging techniques or on flow cytometry are both time-consuming and usually related to more sophisticated and larger setups; (II) the electrochemical methods are simpler and lower cost and offer additional opportunities in relation to parallel monitoring of several other parameters where the electron transfer can be measured.<sup>25</sup>

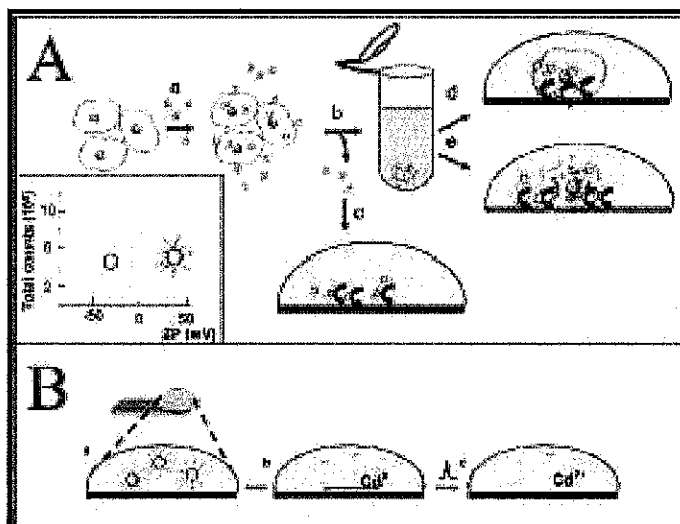
Following electrochemical methods, the effect of antitumor drugs on the growth of immobilized tumor cells was performed by an irreversible voltammetric response related to the oxidation of guanine.<sup>26</sup> Ding et al. immobilized living cells on glassy carbon electrode, and the proliferation of cells was measured by an electrochemical impedimetric technique due to the increase in the electron-transfer resistance by the growth of cells.<sup>27</sup>

In the present manuscript, we report on the use of square wave voltammetry to monitor the cellular uptake, in HeLa cells, of QDs decorated with SAP (QD-SAP). Given the interest in QDs interaction with the cells for either biosensing/imaging or drug delivery, QD-SAP is used as a model system so as to be studied

Received: April 23, 2010

Revised: December 23, 2010

Published: January 19, 2011



**Figure 1.** (A) Schematic of the assay steps followed for CdS QDs-SAP interaction with HeLa cells: incubation with QDs (a); separation of the supernatant (b); supernatant (contains the CdS-QDs-SAP that have not interacted with the cells) detection (c); HeLa cell detection according to the adhesion of QDs onto the membrane surface (d) and after the cell lysis (in the case of QDs-SAP that include the adsorbed and the internalized ones) (e). Inset graph: ZP potential diagram of CdS QDs (red) and CdS QDs-SAP (green). Other experimental details see as described in the text. (B) Schematic representation of electrochemical detection of CdS QDs-SAP sample. (a) A drop of 20  $\mu\text{L}$  CdS QDs-SAP suspension was introduced onto the top of the SPE surface, and a potential of 0 V vs Ag/AgCl was maintained for 60 s. (b) A deposition potential of  $-1.1$  V for 120 s was applied during which the cadmium ions are reduced. (c) The reduced cadmium is oxidized back to cadmium ions by SWV scanning from  $-1.1$  to  $-0.5$  V (step potential 10 mV, modulation amplitude 30 mV, and frequency 15 Hz).

from both optical and electrochemical points of view while interacting with HeLa cells.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Apparatus.** Confocal laser scanning microscopy (CLSM) images were obtained using a Leica SPI microscope with a 63 $\times$  objective. The  $\zeta$ -potential measurements were performed using a zetasizer nano zs (Malvern). All voltammetric experiments were performed using a PalmSens (Palm Instrument BV, Hoofden, The Netherlands) that consists of a portable potentiostat interfaced with a palmtop PC (155 mm  $\times$  85 mm  $\times$  35 mm). Electrochemical experiments were carried out using a screen-printed electrode (SPE) (Palm Instrument BV, Hoofden, The Netherlands). The screen-printed electrochemical cell consists of a graphite working electrode (diameter 3 mm), a graphite counter electrode, and a silver pseudoreference electrode.

**Reagents.** Fmoc-NH-protected amino acids were obtained from IRIS Isotech GmbH (Münchendorf, Germany). The 2-chlorotrityl chloride resin was purchased from CBL PATRAS (Patras, Greece). Coupling reagents were as follows: 7-azabenzotriazol-1-yl-1-oxo-1H-pyridin-3-ylphosphonium hexafluorophosphate, PyAOP, was obtained from Applied Biosystems (Foster City, CA); benzotriazol-1-yl-1H-pyridin-3-ylphosphonium hexafluorophosphate, PyBOP, from Novoshochem (Luzern, Switzerland); 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) from GL Biochem (Shanghai, China); and 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) from Abnova Chemical (Montréal, Canada). Trifluoroacetic acid (TFA) was

purchased from Scherlab S.L. (Barcelona, Spain). Piperidine, dimethylformamide (DMF), dichloromethane (DCM), and acetonitrile were obtained from SDS (Pyypn, France). *N,N*-Diisopropylethylamine (DIEA) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Triisopropylsilane (TIS) was obtained from Pfaltz (Roche, Switzerland).

CdS QDs modified with glutathione have been prepared using the arrested precipitation method as described previously<sup>20</sup> (see Supporting Information for more details on the synthesis and TEM image in Figure S1). A SAP derivative containing an additional N-terminal cysteine residue (C-SAP) was synthesized using the solid-phase method<sup>21</sup> and conjugated to QDs. QDs-SAP conjugation was carried out by mixing C-SAP with CdS QDs (see Supporting Information for more details). The  $\zeta$ -potential measurements of CdS QDs before and after the modification with C-SAP (Figure 1) have been performed prior their applications in the cell studies.

**QDs-SAP Conjugation.** C-SAP was added at a final concentration of 200  $\mu\text{M}$  to a 24 mM CdS-QD solution in deionized water and allowed to react under rapid stirring for 24 h at room temperature. Dialysis (MWCO 6–8000) over deionized water for 3 days was performed to remove peptide excess.

**CLSM Studies.** HeLa cells were incubated with a CdS-QD or CdS-QD-C-SAP solution at 288  $\mu\text{M}$  for 2 h; they were then washed three times with DMEM/10%FCS without phenol red. Then, 1  $\mu\text{L}$  of TRITC-WGA was added to stain the cell membrane (and ensure the necessary contrast for CdS QD imaging), and CLSM was performed using a Leica SPI microscope with a 63 $\times$  lens under 364 nm excitation, acquiring 0.25- $\mu\text{m}$ -thick optical sections.





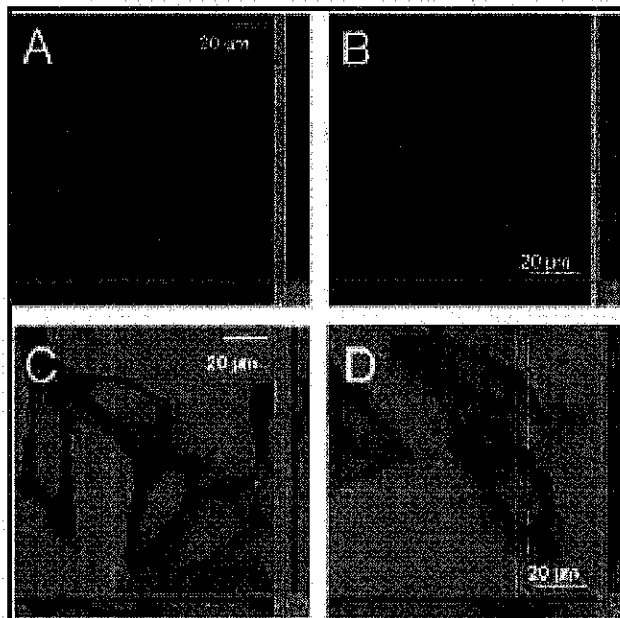


Figure 2. CLSM images of HeLa cells incubated with CdS QD (A,C) and HeLa cells incubated with CdS QD-SAP (B,D). Black contrast (A,B) and white contrast (C,D).

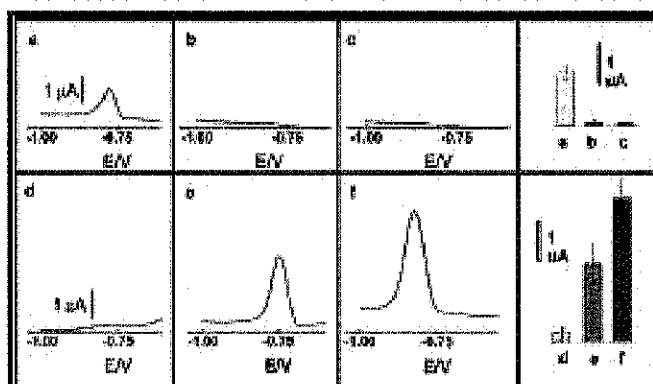


Figure 3. Typical SWV curves of cells incubated with QDs (a,b,c) and with QDs-SAP (d,e,f). Curves a and d correspond to experiments, b and e to cells, and c and f to lysed solution. Diagrams bars corresponding to those parallel measurements for each of the mentioned curves are also shown in the right side.

corresponding cadmium ions. The formed Cd metal and hydrogen sulfide produced (following the possible reactions 1 and 2) during the deposition step are of a very low level. Only few CdS QDs can be destroyed and the corresponding electrochemical signal will be used for measurements. Nevertheless, the minute Cd metal formed, and the released hydrogen sulfide, being an *in vivo* analysis, does not affect the obtained electrochemical signals that will be described below.

HeLa cells incubated with QDs nonfunctionalized with SAP do not interact with the cell membrane, nor are they internalized,

and consequently, the SWV did not show a pronounced peak. On the contrary, the current peak of around 2.4  $\mu$ A is obtained for HeLa cells interacting with CdS QDs-SAP.

In addition, the results obtained show that SWV can also investigate the interaction between SAP decorated CdS QDs with HeLa cells. This is due to the fact that SWV is produced only when CdS QDs are in contact with the surface of the SPEs. This is possible for both free CdS QDs in supernatant and those released after HeLa cell lysis. The CdS QDs inside the HeLa cell (nonlysed) (Figure 1 Ad) cannot be detected by the SWV



