

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Ciencias



MÁSTER EN NUEVOS MATERIALES

Caracterización del NaYF_4 impurificado con Yb^{3+} y Tm^{3+}
y sus potenciales aplicaciones en biomedicina

Pedro Villanueva Delgado

Director: Rafael Valiente Barroso

Santander, 2011/2012

Índice general

1. Introducción	4
1.1. Motivación del trabajo	4
1.2. Luminiscencia y espectroscopía	5
1.2.1. La estructura electrónica de las tierras raras	7
1.2.2. Fenómenos de upconversion	12
1.2.3. El β -NaYF ₄	15
1.3. Aplicación al campo de la biomedicina	16
2. Método experimental	18
2.1. Síntesis del NaYF ₄ :Yb ³⁺ , Tm ³⁺	18
2.1.1. Obtención de nanopartículas a partir del <i>bulk</i>	18
2.2. Caracterización estructural	19
2.3. Técnicas espectroscópicas	20
2.3.1. Absorción óptica	20
2.3.2. Emisión y excitación	21
2.4. Biocompatibilidad y asimilación celular	24
2.5. Microscopía confocal	25
3. Resultados y análisis	28
3.1. Difracción de rayos X	28
3.2. Espectroscopía	28
3.2.1. Espectroscopía Raman	29
3.2.2. Espectro de reflectancia difusa	30
3.2.3. Emisión y excitación	31
3.2.4. Variación con la potencia de excitación	40
3.2.5. Tiempos de vida	42
3.3. Biocompatibilidad, asimilación celular y microscopía confocal	44
4. Conclusiones	47
5. Bibliografía	48

Resumen

Se ha caracterizado estructural y ópticamente el material NaYF_4 impurificado con Yb^{3+} y Tm^{3+} mediante diversas técnicas espectroscópicas. Se ha obtenido el espectro de reflectancia y asignado las transiciones observadas. También se ha estudiado el fenómeno de upconversion, particularmente intenso en este material, por el cual la excitación con fotones de baja energía (infrarrojo) genera emisión de fotones más energéticos (visible y ultravioleta). Por último, se ha realizado ensayos con este material en células vivas y se ha investigado su localización celular y posible aplicación en la observación de procesos celulares al tener mayor poder de penetración que las técnicas estándar y sin dos de sus inconvenientes como el *photobleaching* y la fototoxicidad.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Motivación del trabajo

El estudio de los sistemas biológicos esta lleno de dificultades asociadas a su gran complejidad [1, 2]. Estos sistemas están compuestos por multitud de células bañadas en medio extracelular que se comunican entre sí y se coordinan para realizar ciertas funciones. Las células a su vez contienen miles de tipos de moléculas, pequeñas como los iones (que junto con el agua forman el 80 % del volumen) y grandes como las proteínas (el 20 % restante). Todas estas moléculas juegan un papel en las reacciones químicas presentes en las células [3]. Es posible observar algunos de estos procesos directamente bajo el microscopio (como la división celular), pero resulta más conveniente si alguna de estas moléculas ha sido marcada de tal forma que se pueda distinguir del resto de componentes.

Una forma de marcado consiste en enlazar a una molécula de interés otra molécula que emita luz de un color determinado al ser iluminada con luz de otro color. Por ejemplo: la rodamina emite en rojo al ser iluminada con luz verde. Estas moléculas se denominan fluoróforos y son habitualmente orgánicas.

Sin embargo, si las células son sometidas a dosis de luz demasiado elevadas, especialmente en longitudes de onda cortas, sufren un proceso llamado fototoxicidad que puede llevar a la muerte celular por apoptosis (muerte celular programada). Además, los fluoróforos orgánicos pueden saturarse, y dejar de emitir, si se excitan durante demasiado tiempo, proceso conocido como *photobleaching* [4].

Existe una clase de materiales inorgánicos con propiedades ópticas adecuadas para sustituir, o complementar, a los fluoróforos convencionales. Su propiedad fundamental consiste en la absorción de radiación roja o infrarroja y su posterior emisión a menor longitud de onda (mayor energía), al contrario que los colorantes habituales. Este proceso se denomina *upconversion* [5]. Esta característica permite solucionar los dos grandes problemas de los fluoróforos tradicionales: la fototoxicidad y el blanqueado, además de reducir la autofluorescencia de los tejidos [6, 7, 8].

En este trabajo se va a caracterizar las propiedades ópticas del material con upconversion más prometedor hasta la fecha: el NaYF_4 impurificado con Yb^{3+} , Tm^{3+} y Er^{3+} [9] y se va estudiar su aplicación como fluoróforo en células humanas procedentes de un carcinoma de útero (células

HeLa). Este compuesto, además de las características anteriormente mencionadas, es especialmente útil para trabajar con sistemas biológicos ya que la luz empleada para su excitación es de una longitud de onda para la cual el tejido biológico es muy transparente, alcanzando penetraciones de hasta 1 cm.

1.2. Luminiscencia y espectroscopía

Las propiedades ópticas de un material están determinadas por su estructura electrónica, esto es, por los distintos niveles de energía permitidos a los electrones, y por el tipo de estructura cristalina del material [10].

Los niveles de los átomos aislados cambian al agregarse para formar sólidos. Aunque en general no es posible obtener analíticamente dichos niveles, existen teorías que permiten obtener soluciones semi-cuantitativas e interpretar el resultado de la interacción entre la luz y el material.

Si el compuesto con propiedades ópticas se encuentra como impureza en otro material, la estructura cristalina del segundo influye en las propiedades ópticas del primero. De esta manera es posible diseñar materiales con distintas características usando el mismo ión ópticamente activo.

Pero para poder diseñar estos materiales primero es necesario entender la interacción entre la luz y la materia y poder cuantificar esta interacción. La espectroscopía comprende una serie de técnicas que permiten lograr este objetivo.

Cuando un haz de luz incide sobre un material sufre varios procesos: transmisión, reflexión, dispersión y emisión, Fig. 1.1 izquierda. Si la longitud de onda de la luz incidente coincide con la diferencia entre dos niveles energéticos del material, esta es absorbida y posteriormente puede ser emitida en forma de luz o de calor. Este proceso de emisión de luz se denomina fotoluminiscencia, que puede ser dividido en dos tipos: fluorescencia, si la luz es emitida en menos de un milisegundo (habitual cuando ambos niveles de energía son singletes), y fosforescencia, si tarda un tiempo mayor (habitual si un nivel es singlete y el otro triplete). La emisión de calor sucede mediante la creación de fonones: vibraciones colectivas de la red cristalina. Este proceso se conoce como desexcitación no radiativa (o relajación multifonónica) y provoca un aumento de la temperatura del material.

En general se produce una mezcla de ambos procesos, Fig. 1.1 derecha. Si N es la población de un nivel (el número de iones excitados en ese nivel) su evolución con el tiempo es $N(t) = N_0 \exp(-kt)$, donde $k = k_R + k_{NR}$ es la constante de desexcitación, suma de la radiativa y la no radiativa. El tiempo de vida medio de la desexcitación es $\tau = \frac{1}{k}$.

En iones de tierras raras, la constante de desexcitación no radiativa k_{NR} depende de la diferencia de energía entre niveles próximos, ΔE , según la llamada ley del gap [11]:

$$k_{NR} = \beta \exp(-\alpha \Delta E) = \beta \exp(-\alpha' n),$$

donde α y β son constantes para un mismo material y n es el número de fonones (de energía $\hbar\omega_{max}$) necesarios para cubrir la diferencia de energía $\Delta E = n\hbar\omega_{max}$ entre los estados electrónicos.

La desexcitación radiativa aumenta al incrementarse la diferencia de energía entre niveles:

$$k_R \propto (\Delta E)^3.$$

En general para las tierras raras, k_R compite con k_{NR} si $n > 6$ fonones, mientras que las transiciones no radiativas son más probables que las radiativas (3-4 órdenes de magnitud) para estados muy próximos. En general, cuando hay estados cercanos en energía, la emisión siempre ocurre desde el estado de menor energía (regla de Kasha). En sólidos la emisión siempre tiene lugar a menor energía que la absorción (ley de Stokes). La diferencia de energía entre los máximos de la absorción y emisión se denomina desplazamiento de Stokes.

En resumen, si la diferencia de energía entre dos niveles es menor que 6 fonones se produce la desexcitación no radiativa, y si es mayor existe una competición entre ambas desexcitaciones.

La temperatura también juega un papel en la población de estados próximos en energía. En el equilibrio térmico, la relación de poblaciones entre dos estados cercanos A_1 y A_2 (con $E_2 > E_1$) viene dado por el factor de población de Boltzmann:

$$\frac{A_2}{A_1} = \frac{g_2}{g_1} \exp\left(\frac{-\Delta E}{kT}\right),$$

donde $\Delta E = E_2 - E_1$, g_i es la degeneración del nivel i , k es la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta. A temperatura ambiente $kT \approx 25 \text{ meV} \approx 200 \text{ cm}^{-1}$, por lo que dos estados separados una energía de ese orden tendrán una cierta población y mantendrán un equilibrio, o acoplamiento, térmico entre ambos estados.

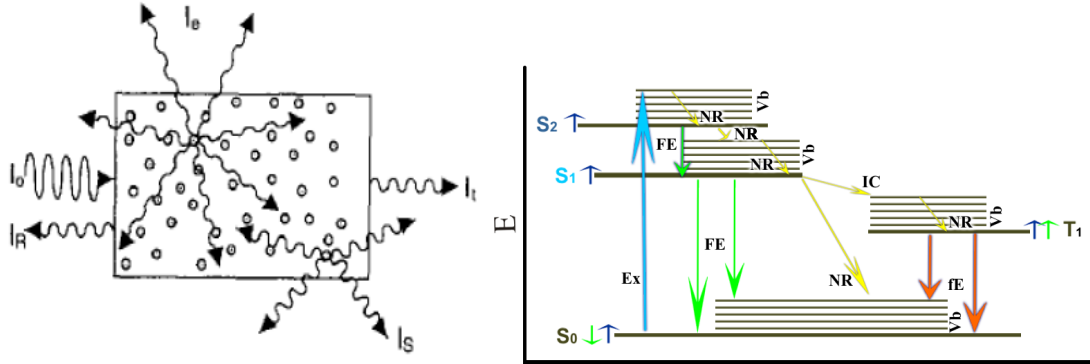


Figura 1.1: **Izquierda:** Interacción de la radiación electromagnética con la materia. Intensidad incidente I_0 , reflejada I_R , transmitida I_t , emitida I_e y dispersada I_s . **Derecha:** Diagrama de Jablonski con las diferentes transiciones entre estados electrónicos de una molécula: Excitación Ex , fluorescencia FE , fosforescencia fE , transición no radiativa NR , conversión interna IC , estados singlete $S_{0,1,2}$, estado triplete T_1 y niveles vibracionales Vb .

Probabilidad de transición entre estados

La probabilidad de transición entre el estado inicial $\langle i |$ y el estado final $\langle f |$ debido a la interacción con un campo electromagnético $\vec{E}$ viene dado por la regla de oro de Fermi, que en la aproximación dipolar eléctrica viene dada por [11, 12]:

$$W_{if} = \frac{2\pi}{\hbar} \left| \langle f | e\vec{r} \cdot \vec{E} | i \rangle \right|^2 \rho(\nu),$$

e es la carga del electrón, $\vec{r}$ es su posición y $\rho(\nu)$ es la densidad de modos de la radiación. Esta magnitud se puede determinar si se conoce las funciones de onda de los estados inicial y final. Para comparar los experimentos con la teoría se suele emplear la fuerza de oscilador, que es una medida de la intensidad de la transición. Se puede calcular teóricamente [13]:

$$f_{if} = \frac{2}{3} \frac{m_e}{\hbar^2} (E_f - E_i) \sum_{m_f}^N |\langle f, m_f | \vec{r} | i \rangle|^2,$$

y determinar experimentalmente:

$$f_{if} = \frac{1}{g_f} \frac{36m_e c \varepsilon_0 n}{e^2 (n^2 + 2)^2} \int \alpha(\nu) d\nu,$$

donde $\alpha(\nu)$ es el coeficiente de absorción en función de la frecuencia ν , n el índice de refracción del material y el estado final $\langle f |$ tiene una degeneración g_f . Este parámetro adimensional es del orden de la unidad para transiciones muy intensas. Como puede verse en la definición, f_{if} se puede calcular si se conocen las funciones de onda de los estados o se puede determinar experimentalmente con medidas de absorción óptica.

Espectro de absorción

En un gas atómico a baja presión, los niveles electrónicos de los átomos están bien definidos y se observan líneas muy finas (anchuras en energía del orden de 10^{-8} eV) en el espectro de absorción, que se corresponden con transiciones desde el estado fundamental a un estado excitado de mayor energía. Sin embargo, en sólidos las vibraciones aumentan el ancho de las líneas. Además, las pequeñas variaciones en la estructura cristalina provoca cambios en las posiciones de los picos, lo que promediado a todo el sólido se traduce en un ensanchamiento inhomogéneo de los mismos. La temperatura también ensancha los picos, ya que se pueden poblar estados próximos en energía.

Estos efectos son mayores en metales de transición y menos importantes para las tierras raras (como se va a ver a continuación), por lo que no se van a estudiar en detalle.

1.2.1. La estructura electrónica de las tierras raras

Primero se va considerar la estructura electrónica de un ion libre (gas a baja presión) de una tierra rara, y a continuación cómo varía esta al introducir el ion en una red cristalina.

Las tierras raras¹ consisten en 17 elementos químicos: los 15 lantánidos (con números atómicos del 51 al 71), el itrio ($Z = 39$) y el escandio ($Z = 21$). Su valencia habitual es 3+. La configuración electrónica de los lantánidos trivalentes es $[\text{Xe}]6s^2 4f^n$, con $n = 0$ para el lantano y 14 para el lutecio, la del itrio es $[\text{Kr}]4d^1 5s^2$ y la del escandio $[\text{Ar}]3d^1 4s^2$. Todos estos elementos tienen en común el hecho de que sus electrones de valencia no son los más externos, sino que están apantallados por la capa xs^2 ($x = 6$ para los lantánidos, 5 para el Y y 4 para el Sc), Fig. 1.2 izquierda.

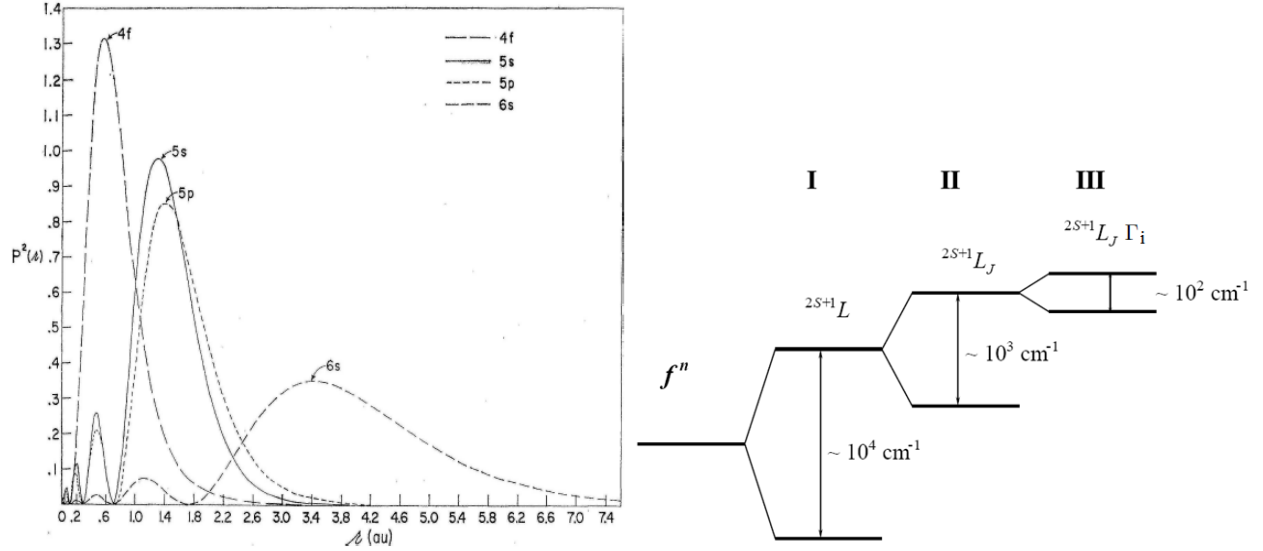


Figura 1.2: **Izquierda:** Distribución radial de carga de los orbitales 4f, 5s, 5p y 6s para el Gd^{3+} . Ref. [14]. **Derecha:** Diferentes contribuciones a la energía de los niveles de los lantánidos. I: Interacción de Coulomb, II: Spin-órbita, III: Campo cristalino. Ref. [15].

Para describir la estructura electrónica se va a usar el formalismo de la mecánica cuántica. El hamiltoniano H es el objeto fundamental, ya que una vez conocido es posible resolver la ecuación de Schrödinger y obtener las energías y funciones de onda. Se divide el hamiltoniano en varias partes independientes.

La primera parte se corresponde con la atracción H_0 de los electrones por el núcleo y su energía cinética, la segunda con la interacción de Coulomb entre ellos H_{ee} y tercera con la interacción spin-órbita H_{so} . Se puede considerar que estas interacciones son independientes, y por tanto, el Hamiltoniano del ion libre se puede separar en una primera aproximación, Fig. 1.2 derecha:

$$H_{FI} = H_0 + H_{ee} + H_{so}.$$

¹En realidad son relativamente abundantes (tanto como el cobre, por ejemplo), excepto el prometio, que es radiactivo.

Para las tierras raras la importancia relativa de los tres términos es $H_0 \gg H_{ee}, H_{so}$.²

En primer lugar, el ion puede ser tratado como un átomo de hidrógeno con un núcleo mayor y más electrones, además, como el resto de capas están completas y solo contribuyen a la energía con una constante vamos a tratar solo los electrones $4f^n$. En esta aproximación todos los electrones tienen la misma energía [16, 10]. Los números cuánticos relevantes de cada electrón son $n = 4$, $l = 3$, $0 \leq m_l \leq 3$ y $s = \pm \frac{1}{2}$. La degeneración del nivel es 14 ($2l + 1 = 7$ orbital por 2 de espín). La capa se llena cumpliendo las reglas de Hund y el principio de Pauli: dos electrones no pueden tener los mismos números cuánticos.

Después se trata la repulsión entre electrones, H_{ee} que introduce los números cuánticos L y S . Los estados electrónicos se etiquetan según estos números usando la notación ^{2S+1}L , donde $L = 0, 1, 2, 3$, etc. se representa por S, P, D, F, etc., $L = |\vec{L}| = |\sum \vec{l}_i|$ y $S = |\sum \vec{s}_i|$, donde $\vec{l}_i$ y $\vec{s}_i$ son el momento angular y de espín de cada electrón. Para obtener los valores posibles de L y S se suman los momentos de cada electrón, donde L toma los valores:

$$L = l_1 + l_2, l_1 + l_2 - 1, \dots, |l_1 - l_2| \quad (1.1)$$

Por ejemplo, para la configuración $4f^2$ del Pr^{3+} los términos posibles para la función de onda espacial son: $l_1 = l_2 = 3$, $L = 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0$ y para la parte de espín: $s_1 = s_2 = \frac{1}{2}$, $S = 1, 0$. La parte orbital simétrica debe ir acompañada de una parte de espín antisimétrica. Por tanto los términos posibles son: 1I , 1G , 1D , 1S , 3H , 3F y 3P . La diferencia de energía entre términos es del orden de 1 eV.

A continuación se considera el spin-órbita, que clásicamente se puede interpretar como una interacción electromagnética entre el espín del electrón y el campo magnético producido al orbitar alrededor del núcleo, por lo que intervienen el espín S y el momento angular L . Este efecto desdobra los términos anteriores e introduce el número cuántico $J = L + S$. Los estados se representan ahora mediante mutipletes $^{2S+1}L_J$, con $J = L + S, L + S - 1, \dots, |L - S|$. La separación entre los diferentes J de un multiplete es del orden de 0.1 eV. La degeneración de cada nivel es $2J + 1$. Para el praseodimio, el término 3H ($S = 1$, $L = 5$) tiene $J = 6, 5, 4$. El estado electrónico de un ion aislado de una tierra rara se puede describir completamente usando la notación $^{2S+1}L_J$.

Este tratamiento permite obtener los estados posibles del ion, pero no informa sobre el orden en energías ni sobre la energía de cada nivel. Esta información se obtiene mediante cálculos numéricos y medidas experimentales. Para los iones trivalentes de tierras raras todo esto se recoge en el diagrama de Dieke, Fig. 1.3. No se muestra el lantano ni el lutecio ya que tienen la última capa completa.

²Se asume que $H_{ee} > H_{so}$, esto es, que las condiciones del acoplamiento LS de Russell-Saunders son válidas. Siendo más exactos se está en el caso de acoplamiento intermedio entre LS y jj.

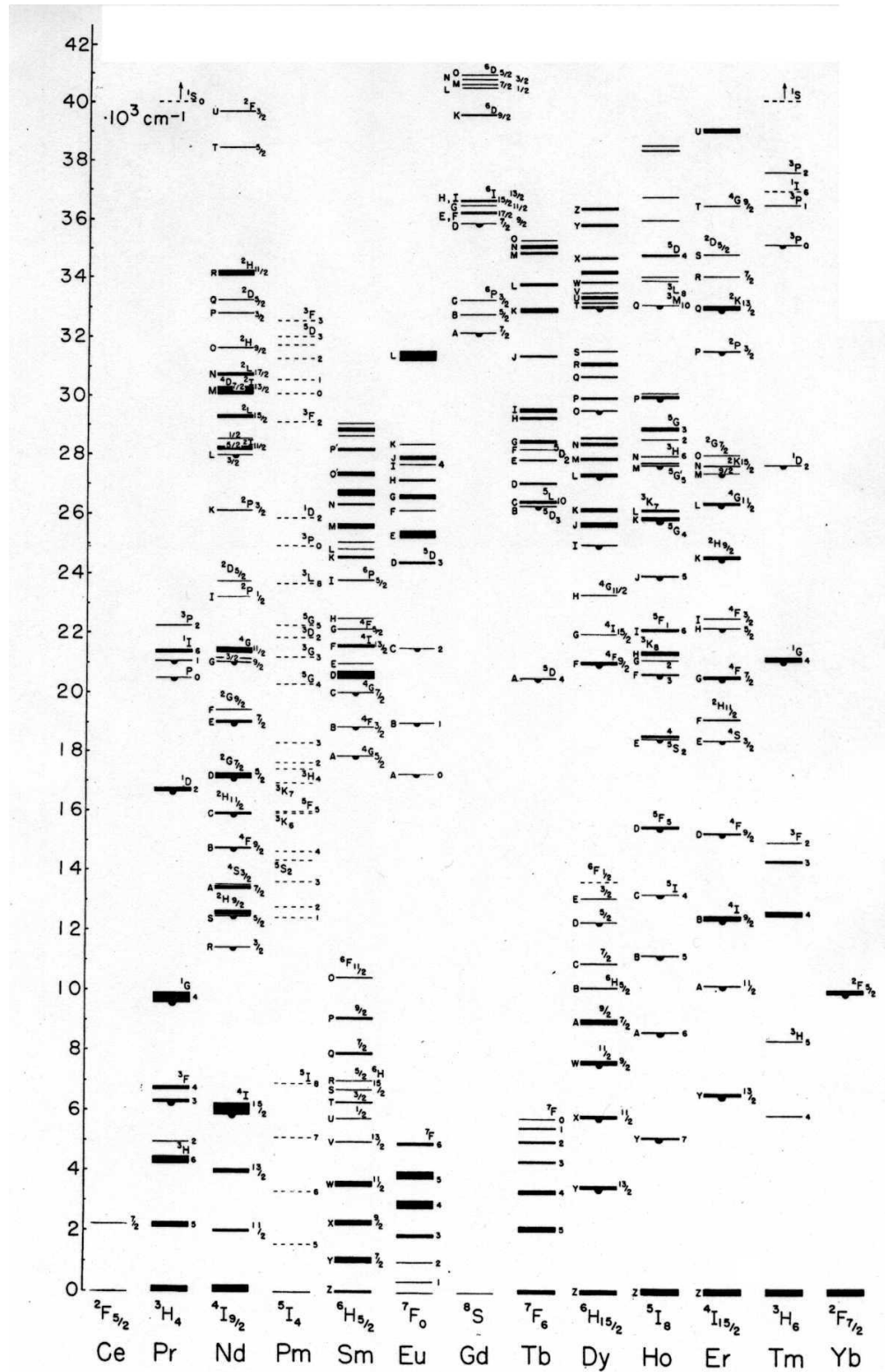


Figura 1.3: Diagrama de Dieke. Energía de cada multiplete $^{2S+1}L_J$ en unidades de 10^3 cm^{-1} para los iones trivalentes de tierras raras. Se ha obtenido para el $\text{LaCl}_3:\text{RE}^{3+}$. Los estados con un semicírculo en su parte inferior presentan luminiscencia. Ref. [17].

Ahora se va a considerar el efecto de la red cristalina en la que se encuentra el ion cuando este es introducido en un material, H_{CF} . Se parte de la base de que este efecto es mucho más pequeño que los tres anteriores (debido al anteriormente citado apantallamiento de los electrones 4f por los 6s y 6p, Fig. 1.2), esto es, $H_0 \gg H_{ee}$, $H_{so} \gg H_{CF}$, también llamado régimen de campo débil.

El ion está rodeado por átomos situados en distintas posiciones, esto significa que ya no hay simetría esférica y, por tanto, los estados $^{2S+1}L_J$ ya no describen correctamente el sistema. Para determinar los nuevos estados electrónicos es necesario conocer el grupo de simetría del campo cristalino que siente el ion fluoróforo. La degeneración de cada nivel es $2J + 1$ y el efecto del campo consiste en levantar parte de esta degeneración, por tanto de cada nivel aparecerán nuevos niveles, con una separación del orden de 0.01 eV. Estos niveles se denominan estados Stark (por el efecto Stark) y se etiquetan como las representaciones irreducibles (irreps) del grupo de simetría del campo cristalino, aunque con la nomenclatura de los llamados grupos dobles: Γ^i , $i = 1, 2, \dots$

Para el $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}(\text{Er}^{3+})$, los iones se sitúan en posiciones con simetría C_1 , que es la menor posible [18]. Esto implica que la degeneración se levanta del todo y por tanto aparecen $2J + 1$ niveles en cada estado $^{2S+1}L_J$. Este grupo solo tiene dos irreps Γ^1 y Γ^2 , la primera se usa para los iones con J entero y la segunda para aquellos con J semientero. Además, para estos segundos iones todos los estados están doblemente degenerados (por el teorema de Krammers) por lo que el número de niveles con energía distinta es $\frac{2J+1}{2}$.

Transiciones entre estados electrónicos

Para que se produzca emisión de luz debe producirse primero una absorción desde el estado fundamental a un estado excitado y a continuación, una emisión desde ese estado a otro estado excitado o al fundamental. No todas las transiciones entre estados están permitidas, sino que existen unas reglas de selección que limitan el número de transiciones.

Hay varios mecanismos para que se produzca una transición: dipolar eléctrico, dipolar magnético y cuadrupolar eléctrico, siendo la segunda y tercera del orden de 10^5 y 10^8 veces menos intensas que la primera.

Las reglas de selección para una transición dipolar eléctrica son:

- $\Delta J = 0, \pm 1$.
- La paridad $\pi = (-1)^L$ debe ser la misma.
- El espín no puede cambiar: $\Delta S = 0$.

Esto significa que en principio las transiciones en tierras raras, que son del tipo f-f, no pueden ser dipolares eléctricas, y por tanto su intensidad debería ser muy pequeña. Sin embargo, como se muestra en este trabajo, estas transiciones sí tienen lugar. Además de violar la regla de la paridad, se incumplen también la regla de conservación de espín y del cambio en el momento angular total.

Para explicar estos fenómenos se usa la teoría de Judd y Ofelt [19], cuyo resultado principal es que el campo cristalino mezcla las funciones de onda $4f^n$ con paridad $\pi = -1$ con una pequeña parte de estados $4f^{n-1}5d^1$, que tiene la paridad inversa, $\pi = 1$. Para que esto ocurra el grupo de simetría

del campo no debe tener centro de inversión, o en caso de que lo tenga, los fonones de la red con paridad impar (modos u) pueden mezclar también las funciones de onda de niveles f-f con niveles f-d, aunque de forma menos intensa, ya que es un efecto de perturbación de segundo orden. De esta manera la paridad de los estados inicial y final de una transición f-f es la opuesta, y la transición se produce por el mecanismo dipolar eléctrico. La energía de los niveles no cambia apenas, ya que los estados $4f^{n-1}5d^1$ están situados a una energía del orden de 50.000 cm^{-1} .

La única regla de selección es:

- $\Delta J \leq 6$, pero $J = 0 \rightarrow J' = 0$ prohibida.

1.2.2. Fenómenos de upconversion

Como se ha explicado anteriormente, cuando un ion es excitado a un estado de mayor energía acaba decayendo a otro de menor energía. Al decaimiento contribuyen los procesos radiativos k_R y los no radiativos k_{NR} .

Existen dos tipos básicos de fenómenos de upconversion: procesos a un ion, y procesos a dos o más iones suficientemente cerca para interaccionar. Estos iones pueden ser del mismo tipo o no [20], Fig. 1.4.

El proceso a un ion más importante es el llamado GSA/ESA: cuando un nivel excitado tiene un tiempo de vida suficientemente largo ($\tau = 1/k$) es posible que absorba otro fotón y se excite a un estado de mayor energía. Este mecanismo se denomina GSA/ESA (*ground state absorption/excited state absorption*), Fig 1.4 A. Si el ion decae al estado fundamental desde ese estado excitado habrá emitido un fotón de energía igual a la suma de los dos absorbidos, se ha producido *upconversion*.

Hay varios mecanismos a dos iones, se va a considerar los más relevantes para este material: el primero consiste en la absorción de un fotón por un ión, llegando a un estado excitado, a continuación otro ion absorbe otro fotón y éste transfiere su energía al primero, excitándolo a un nivel más alto. Este es el proceso GSA/ETU (*ground state absorption/energy transfer upconversion*), Fig 1.4 B. Si los iones son de distinto tipo es posible que los niveles electrónicos involucrados no resuenen completamente (no tengan exactamente la misma energía), así que puede haber emisión o absorción de fonones (proceso asistido por fonones), Fig 1.4 C. El segundo mecanismo de transferencia de energía es la relajación cruzada, Fig 1.4 D: es posible que una desexcitación de un estado excitado a un estado inferior que no es el fundamental tenga la misma energía que una absorción desde el fundamental a otro estado. Se parte de un ion excitado en un nivel alto y otro no excitado a tener dos iones excitados en niveles intermedios. Es el proceso inverso al ETU. Otro mecanismo es la sensibilización cooperativa, Fig 1.4 E, por el cual dos iones “S” transfieren su energía de forma cooperativa a un tercero “A”, excitándolo a un nivel de energía igual al doble de la del ion S . Un cuarto mecanismo relevante es la migración de energía entre iones del mismo tipo. En este proceso un ion se desexcita a su estado fundamental y transfiere su energía a otro ion cercano. Dependiendo de las concentraciones, distancias y tiempos de vida, es posible que la energía recorra una gran distancia antes de emitirse como un fotón o transferirse a otro tipo de átomo, que puede actuar como trampa e impedir la luminiscencia.

Es posible distinguir los distintos mecanismos: el GSA/ESA es un proceso a un único ion y no requiere la presencia de dos iones cercanos entre sí para tener lugar, por lo que domina a bajas concentraciones. A concentraciones altas domina el GSA/ETU, pero la relajación cruzada también aumenta, desexcitando el nivel superior. El proceso ETU consiste en una transferencia de energía de forma no radiativa, debida a la interacción dipolar entre los dos iones. Este mecanismo es muy sensible a la distancia R entre iones (varía como R^{-6}) y puede involucrar la creación o destrucción de fonones, Fig 1.4 C. La probabilidad de absorber (destruir) N fonones es proporcional a $\left(\exp\left(\frac{N\hbar\omega_{max.}}{kT}\right) - 1\right)^{-1}$, por lo que cuando el número de fonones requeridos aumenta, la probabilidad disminuye. Como $kT \approx 200 \text{ cm}^{-1}$ y, como se verá más adelante, $\hbar\omega_{max.} \approx 500 \text{ cm}^{-1}$ para el NaYF_4 , se tiene que a temperatura ambiente la probabilidad de absorber un fonón es del orden del 10 % y la de dos fonones es menor del 1 %. Si es necesario emitir N fonones para que la transición tenga lugar, éstos serán emitidos con probabilidad proporcional a $\exp(-\beta N)$. Esta dependencia es similar a la ley del gap, y ambas constantes estan relacionadas entre sí. Por tanto una diferencia de energía mayor de 6 fonones es poco probable que pueda ser cubierta mediante la emisión de fonones y la transición no tendrá lugar.

Los tiempos de vida de la luminiscencia permiten distinguir los procesos ESA y ETU, como puede observarse en la Fig 1.4 A, B. Cuando la excitación desaparece el mecanismo GSA/ESA cesa de poblar el nivel superior, sin embargo, para el GSA/ETU aún se produce transferencia de energía entre los iones, ya que el tiempo de vida del estado intermedio puede ser largo.

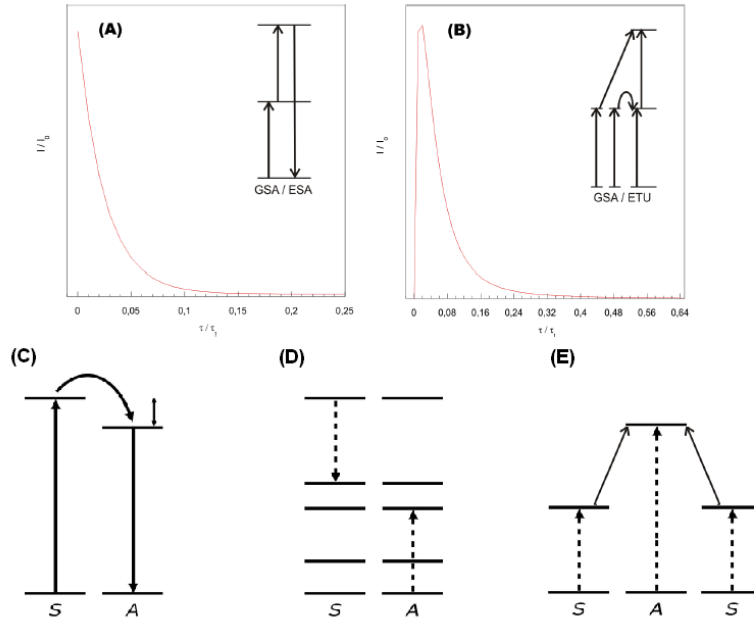


Figura 1.4: Procesos de upconversion. **A)** Absorción desde el estado fundamental (GSA) y posterior absorción desde el estado excitado (ESA). **B)** GSA y upconversion por transferencia de energía (ETU), el donador “S” (*sensitizer*) es excitado a un nivel superior y cede su energía al aceptor “A”. **C)** Transferencia asistida por fonones, en este caso emisión de fonones, pero puede darse la absorción también. **D)** Relajación cruzada. **E)** Sensibilización cooperativa.

Es habitual usar un ion como donador de la radiación (*sensitizer*) y que este transfiera la energía a un aceptor. En este trabajo el donador es el Yb^{3+} , mientras que el aceptor es el Tm^{3+} o el Er^{3+} . La razón fundamental de esto es que el Yb^{3+} tiene un mayor coeficiente de absorción que los otros iones ya que solo tiene un estado electrónico excitado, este estado además es resonante en energía con el $^4\text{I}_{11/2}$ del Er^{3+} y el $^3\text{H}_5$ del Tm^{3+} .

Una característica de los materiales con upconversion es que la relación entre la luminiscencia y la potencia de excitación no es lineal. Para un proceso que involucra n fotones, la intensidad I de la emisión depende la potencia P como [21]:

$$I \propto P^n$$

Aunque, cuando la potencia aumenta, la relación se vuelve lineal ya que los procesos de upconversion dominan sobre los de desexcitación.

1.2.3. El β -NaYF₄

Este material puede cristalizar en dos fases distintas, la fase α (cúbica) y la fase β (hexagonal) [22].

La fase α presenta una estructura cúbica con grupo espacial Fm3m y es poco eficiente para los procesos de upconversion.

El β -NaYF₄ presenta una estructura hexagonal con grupo espacial P6̄, la celda unidad se muestra en la Fig. 1.5. El sitio (1a) está ocupado por Y, el (1f) está ocupado a medias entre Y y Na, el sitio (2h) está ocupado por Na y vacantes a partes iguales. Los sitios (3k) y (3j) están ocupados por F. Cuando el sitio (1f) está ocupado por Na, los F en los sitios (3j) se alejan y cuando el (1f) está ocupado por Y se acercan. Esto supone que la estructura está más desordenada de lo que la imagen muestra. Los iones trivalentes (Yb³⁺, Tm³⁺) sustituyen al Y en los sitios (1a) y (1f), tienen en principio una simetría C_{3h}, aunque en la práctica, debido a los desplazamientos anteriormente mencionados, su grupo puntual es C₁ (y en un porcentaje mucho menor, C₃) [18].

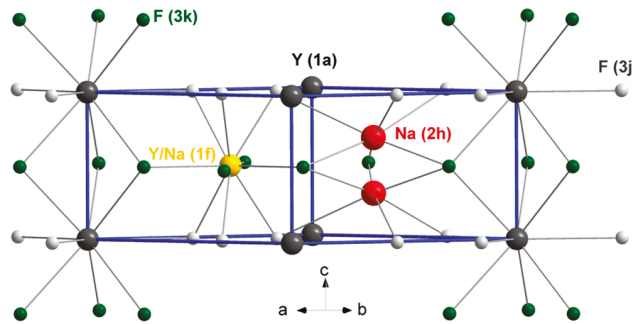


Figura 1.5: Celda unidad del NaYF₄.

El material caracterizado ha sido sintetizado por el grupo del Prof. Güdel en la Universidad de Berna, este material ha sido impurificado con un 25 % de Yb³⁺ y un 0.3 % de Tm³⁺. Además también se dispone de otra muestra impurificado con un 20 % de Yb³⁺ y un 2 % de Er³⁺, sintetizada por el mismo grupo [9]. Estas concentraciones de impurezas para este material producen la mayor eficiencia de upconversion hasta la fecha.

Estado del arte en la espectroscopía del NaYF₄

El mecanismo de upconversion aceptado en la literatura para el NaYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺ solo considera procesos ETU desde el Yb³⁺ al Tm³⁺ [23, 9]. En este trabajo se propone otro mecanismo que permite explicar la dependencia de la luminiscencia con la temperatura, su variación con la potencia de excitación y con la concentración de los iones. Además se ha determinado, por primera vez, el desdoblamiento de los multipletes del Yb³⁺ debido al campo cristalino.

El uso de este material como marcador celular ha sido investigado extensivamente [7, 24, 25]. En estos trabajos se sintetizan nanopartículas de α - o β -NaYF₄, se recubren de alguna molécula

(como ácido oleico) para solubilizarlas en agua y se añaden al medio de cultivo. Sin embargo las micrografías tomadas suelen ser en un microscopio de epifluorescencia normal y no en uno confocal, con lo que no se ha estudiado la localización de las nanopartículas dentro de la célula ni su mecanismo de entrada.

1.3. Aplicación al campo de la biomedicina

Aunque existen muchos tipos de células animales, solo unos pocos tienen la propiedad de dividirse indefinidamente. La clase de célula humana más común es la HeLa (código ATTC: CCL-2) [26]. Las HeLa son células epiteliales provenientes de un carcinoma cervical (cuello uterino) de una mujer llamada Henrietta Lacks (de ahí su nombre) que presentan la útil propiedad de poder dividirse indefinidamente, a diferencia de las células procedentes de cultivos primarios, que suelen morir al cabo de pocas divisiones. Esta capacidad de división ilimitada es una de las características de un cáncer. Las células HeLa se usan desde los años 50 para la investigación. Su tamaño promedio es de unas $50\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro y $5\text{ }\mu\text{m}$ de espesor.

Es posible marcar distintas partes de la célula mediante colorantes con afinidad por diferentes componentes celulares, para que bajo una excitación adecuada emitan en una longitud de onda específica. Para resaltar el núcleo se puede usar el colorante Hoechst 33258, que se une a la doble hélice de ADN y emite en azul al excitarse en UV (Fig. 1.6). Una proteína que se localiza en la corteza celular es la actina (forma parte del citoesqueleto) y otra proteína, la faloidina unida covalentemente a un tipo de rodamina, se une a la actina y emite luz roja al ser excitada con radiación verde.

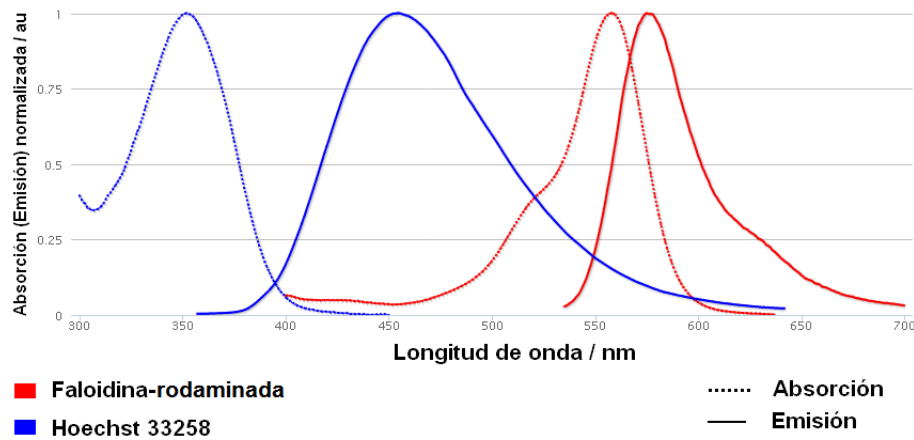


Figura 1.6: Espectros de excitación (líneas de puntos) y emisión (líneas continuas) del Hoechst 33258 y un tipo de rodamina[27].

La absorción de luz por parte de los tejidos biológicos presenta un mínimo en el infrarrojo cercano (NIR), entre 700 nm y 1300 nm, como puede observarse en la Fig. 1.7

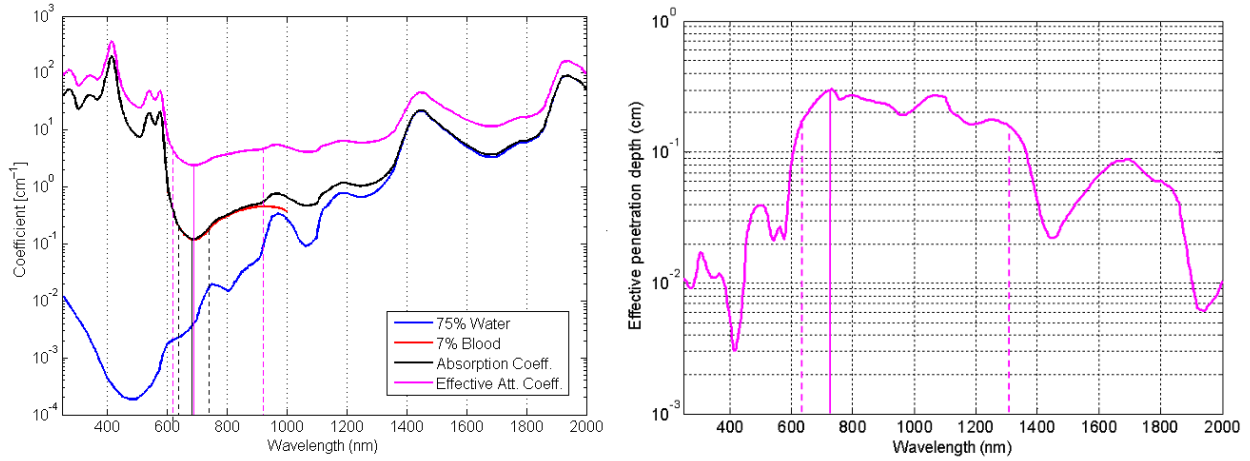


Figura 1.7: **Izquierda:** Coeficiente de absorción del tejido biológico debido al agua y a la sangre. **Derecha:** Profundidad de penetración de la luz en el tejido en función de la longitud de onda. Ref. [28]

El interés de las nanopartículas de NaYF_4 es que su espectro de absorción presenta un máximo en $\lambda = 980 \text{ nm}$, donde existen láseres de estado sólido muy eficientes, y emiten luz verde y roja (impurificadas con Yb^{3+} y Er^{3+}) o bien luz azul, verde, roja e infrarroja (en torno a $\lambda = 800 \text{ nm}$) para el $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Tm}^{3+}$.

Capítulo 2

Método experimental

2.1. Síntesis del $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$

Es posible sintetizar el $\beta\text{-NaYF}_4$ impurificado con tierras raras por diferentes procedimientos. La mayoría de ellos requieren el uso de autoclaves o atmósferas controladas. Debido a la complejidad de la síntesis se ha caracterizado dos muestras en forma de polvo policristalino de tamaño 2-5 μm .

A continuación se describe alguna de las estrategias de síntesis más comunes:

- Descomposición térmica de RECl_3 : $\text{RECl}_3 + \text{Ác. oleico} + \text{NaOH} + \text{NH}_4\text{F}$. Desgasificar en vacío a 100 °C y calentar a 280 °C con atmósfera de N_2 durante 1 h. Precipitar con alcohol y agua [29].
- Molino planetario: Se parte de cantidades estequiométricas de NaF , YF_3 , REF_3 . Se muele en atmósfera inerte 10 h a 300 rpm, obteniendo nanopartículas de entre 35 y 50 nm [30, 31].
- Atmósfera controlada: Se calienta la mezcla NaF y YF_3 a 650 °C en una atmósfera de HF [22].

2.1.1. Obtención de nanopartículas a partir del *bulk*

Una vez sintetizado un material en *bulk* es posible reducir su tamaño y obtener así nanopartículas. El método más sencillo consiste en moler el material en un molino planetario. Este proceso consiste en introducir el material ya en polvo en un contenedor cilíndrico de acero con el interior recubierto de ZrO_2 junto con bolas también de zirconia. Los cilindros rotan en un sentido mientras que la base en la que están sujetos rota en sentido contrario.

Los parámetros que se pueden variar son la velocidad angular de rotación, la relación entre la masa de las bolas y la del material y el tiempo, que incluye la duración total del proceso y la cantidad y duración de las pausas. También se puede modificar la atmósfera y se puede utilizar líquidos orgánicos para disolver parte del material.

En el interior del cilindro se producen choques entre las bolas, el cilindro y el material. En el punto de choque se alcanzan temperaturas elevadas, capaces de fundir el compuesto. Debido a esto es posible que aparezcan otras fases cristalinas o que el material se amorfice.

Se ha reducido el tamaño de las partículas de β -NaYF₄ del profesor Güdel, usando los parámetros de la Ref. [32]: velocidad angular $\omega = 300$ rpm, masa de bolas:masa de material 20:1, tiempo de molienda $t = 30$ min, 1 h, 1.30 h y con 5 min de parada por cada 10 min de molienda.

2.2. Caracterización estructural

La difracción de rayos X se basa en el cambio de dirección de la radiación electromagnética al interaccionar con los planos atómicos de un material. Para que esta interacción sea importante es necesario que la longitud de onda de la radiación sea similar al espacio entre los planos cristalográficos, $\lambda \approx 1$ Å. Esta longitud de onda se corresponde con la de los rayos X, aunque también es posible utilizar difracción de electrones acelerados a través de una gran diferencia de potencial.

La relación entre la distancia entre planos cristalinos d y el ángulo θ respecto al cual la radiación de longitud de onda λ es difractada se conoce como la ley de Bragg:

$$2d \sin \theta = n\lambda,$$

donde n es el orden de difracción (un entero), Fig. 2.1 izquierda.

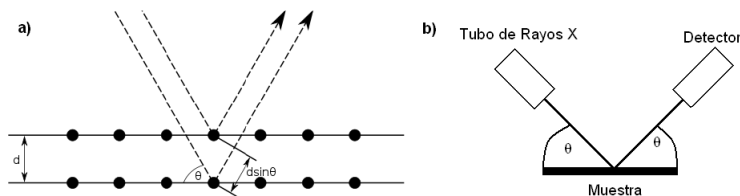


Figura 2.1: a) Esquema de la Ley de Bragg. b) Geometría $\theta - \theta$ de un difractómetro de rayos X.

Esta técnica permite caracterizar estructuralmente un material, obtener información sobre la celda unidad, determinar el número de fases presentes y su proporción y también estimar el tamaño medio de los cristales que forman el material.

El tamaño L de los cristales está relacionado con la anchura B_c de los picos del difractograma:

$$B_c = \frac{k\lambda}{L \cos \theta},$$

donde $k \approx 1$ y θ es la posición del centro del pico.

Las tensiones internas η del material también afectan al ancho de los picos:

$$B_s = \eta \tan \theta.$$

Combinando ambas expresiones (y teniendo en cuenta la anchura instrumental) se puede determinar el tamaño del cristal a partir del ancho total del pico B_t :

$$B_t \cos \theta = \frac{k\lambda}{L} + \eta \sin \theta.$$

Conociendo la posición y anchura de varios picos del difractograma es posible obtener tanto el tamaño de los cristales como la magnitud de las tensiones internas de los mismos.

El equipo empleado ha sido un Bruker D8 con geometría $\theta - \theta$, lo que significa que mientras la muestra permanece fija, la fuente de rayos X y el detector se mueven un ángulo θ respecto a esta, Fig. 2.1 derecha.

2.3. Técnicas espectroscópicas

Todas las técnicas espectroscópicas se basan en la absorción de fotones de una energía por parte de la muestra y su posterior emisión a distinta energía.

Respecto a las unidades empleadas en los espectros de absorción, emisión o excitación, no existe un consenso: el nanómetro (λ/nm) es una unidad de longitud de onda, el inverso de centímetro (ν/cm^{-1}) es proporcional a la energía y el electrón-voltio (E/eV) es una unidad de energía. En este trabajo se emplean los dos primeros, los nanómetros son útiles debido a su amplia implantación en el campo de la espectroscopía, el inverso de centímetro es útil debido a que es proporcional a la energía y por tanto para obtener diferencias de energía en un espectro solo es necesario restar los valores, mientras que si se usa nanómetros es necesario restar sus inversos. Los factores de conversión son los siguientes: $\nu(\text{cm}^{-1}) = \frac{10^7}{\lambda(\text{nm})} = 1,24 \cdot 10^4 E(\text{eV})$.

A continuación se detallan las técnicas espectroscópicas específicas empleadas en este trabajo.

2.3.1. Absorción óptica

La espectroscopía de absorción es la técnica básica para la caracterización óptica de un material. Consiste en la medida de la atenuación de luz al pasar a través del material en función de la longitud de onda de la luz incidente. Esta atenuación es debida a transiciones desde el estado fundamental a estados excitados del material, como se explica en la Introducción.

La absorbancia se determina como el logaritmo del cociente entre la luz incidente I_0 y la transmitida I :

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Las medidas de absorción han sido realizadas con un espectrofotómetro de absorción Cary 6000i de la marca Varian. Este aparato dispone de dos lámparas (una halógena para el VIS/IR y una de deuterio para el UV) como fuente de luz, un doble monocromador y dos detectores (un fotomultiplicador para el UV/VIS y un detector de InGaAs para el IR), Fig. 2.2 izquierda. Con este montaje es posible medir entre 170 y 1800 nm.

Ya que las muestras no son monocristales, sino polvo policristalino, es necesario introducir la muestra en una esfera integradora que concentre la luz reflejada por la muestra en todas las direcciones y la dirija al detector, Fig. 2.2 derecha. De esta manera se mide la reflectancia del material, y mediante las relaciones de Krammers-Krönig se obtiene la absorbancia [33].

El procedimiento consiste en introducir primero una muestra patrón de un material reflectante (teflón o barita) en la esfera integradora (recubierta también de teflón o barita) y medir la reflectancia base. A continuación se introduce la muestra en polvo con el portamuestras y se mide la reflectancia. El software convierte automáticamente la reflectancia a absorbancia. Como no se conoce el espesor del material ni la penetración de la luz, no es posible obtener el coeficiente de absorción.

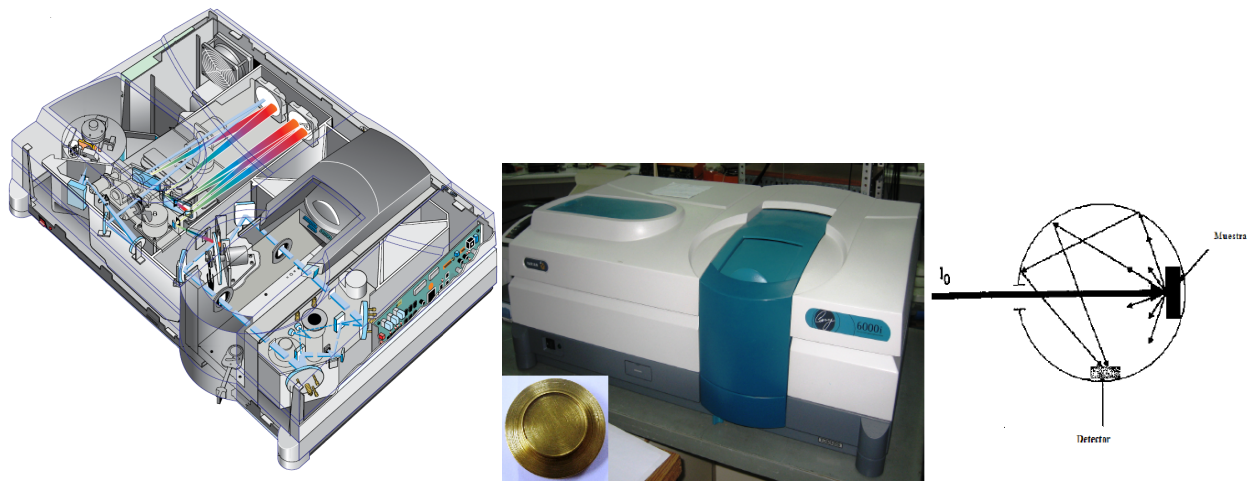


Figura 2.2: **Izquierda y centro:** Fotospectrómetro de absorción Cary 6000i, recuadro: Porta-muestras de la esfera integradora para medidas en polvo. **Derecha:** Esquema del funcionamiento de la esfera integradora.

2.3.2. Emisión y excitación

La fotoluminiscencia es una técnica que permite medir la intensidad de la luz emitida por una muestra para cada longitud de onda $I(\lambda)$ cuando la muestra es excitada con luz de longitud de onda fija λ_{exc} . La excitación, sin embargo, consiste en observar la emisión $I(\lambda_{em})$ en una longitud de onda fija λ_{em} mientras se excita la muestra con luz de distintas longitudes de onda. La absorción y la excitación están relacionadas, aunque esta última es selectiva, ya que si la muestra contiene centros ópticos diferentes es posible distinguirlos si emiten a longitudes de onda distintas. Esto es, si un centro emite en rojo y otro en verde, es posible medir solo la emisión roja (por ejemplo) y realizar el espectro de excitación del primer centro, en lugar del de absorción al que contribuyen ambos centros.

El dispositivo experimental empleado es un fluorímetro FLS920 de Edimburgh Instruments (Fig.

2.3). Como fuente de excitación se dispone de una lámpara de xenón de 450 W, una lámpara pulsada de microsegundo de 60 W y varios diodos láser. La luz pasa a través de un doble monocromador (excepto en el caso de los láseres) e incide sobre la muestra. La luz emitida pasa nuevamente por un doble monocromador y llega a uno de los tres detectores: un fotomultiplicador centrado en 500 nm, otro fotomultiplicador centrado en 750 nm y un InGaAs para el infrarrojo. Cada detector tiene asociado una red de difracción distinta, que esta situada en la torreta de cada monocromador.

La eficiencia de los detectores varía con la longitud de onda, al igual que la potencia de la lámpara (de forma similar al espectro de un cuerpo negro), por eso es necesario corregir los espectros de tal manera que la misma intensidad mostrada a dos longitudes de onda distintas refleje una emisión del mismo número de fotones. El software del fluorímetro permite realizar este tipo de correcciones de forma automática. Todos los espectros mostrados en este trabajo están corregidos tanto para la sensibilidad del sistema de detección (emisión) como para la diferente respuesta de la lámpara a cada longitud de onda (excitación).

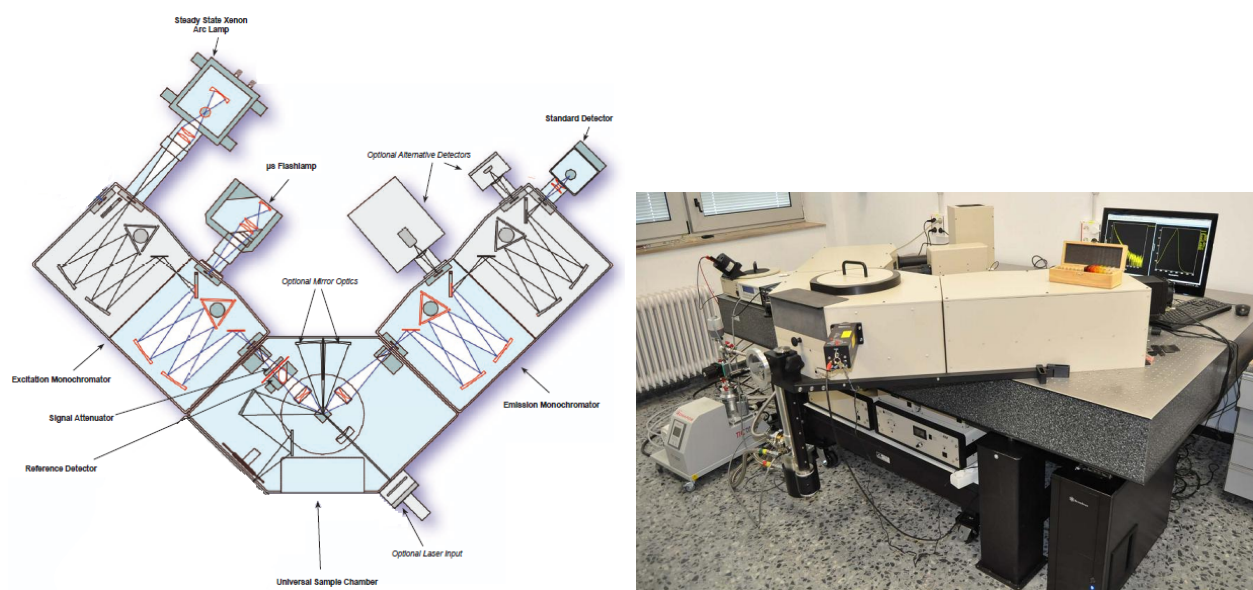


Figura 2.3: **Izquierda:** Esquema del fluorímetro FLS920. Los triángulos con un círculo en el medio son las torretas con las redes de difracción, tres como máximo. **Derecha:** Fotografía del fluorímetro empleado.

Tiempos de vida

La medida de tiempos de vida se ha realizado de dos maneras. La primera, con el mismo equipo pero usando la lámpara pulsada de microsegundos. Para ello se emite un pulso corto de luz y se mide los fotones emitidos a continuación de haber sido excitada la muestra. El rango de tiempos

de vida que se pueden medir esta entre $1 \mu\text{s}$ y 10 s . La segunda, mediante un generador de ondas se modula un diodo láser ($\lambda = 980 \text{ nm}$). Se puede seleccionar la frecuencia de modulación y su duración, de tal manera que se puede pasar de excitación modulada que se asemejan a la excitación en continuo a pulsos muy cortos.

Variación con la potencia de excitación

En un fluoróforo normal, donde la emisión se produce a menor energía que la excitación debido a relajaciones internas mediante fonones, la variación de la intensidad de la emisión con la potencia de excitación es lineal. Sin embargo, los materiales con propiedades de upconversion presentan una variación no lineal que depende del mecanismo de excitación (ESA o ETU) y del número de fotones necesarios para llegar al nivel desde donde se produce la emisión.

Para determinar esta relación se dispone de un diodo láser de 980 nm de potencia regulable entre los 80 mW y 5 W , que se concentra en un foco, de área aproximada 1 mm^2 , sobre la muestra.

Medidas a baja temperatura

Es posible medir el espectro de absorción, emisión y excitación en función de la temperatura entre 9 K y 300 K . Para ello se ha empleado un criostato de ciclo cerrado de helio. La muestra en polvo se pega a una plaquita de cobre con una resina y la placa se atornilla a una pieza de cobre en contacto con el dedo frío. Todo el sistema se encuentra en vacío ($P \approx 10^{-5} \text{ mbar} \approx 10^{-8} \text{ atm}$).

Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman se basa en un fenómeno de segundo orden en la absorción y emisión de luz. Cuando un haz de luz interacciona con un material la mayor parte de la luz es dispersada mediante el mecanismo de Rayleigh, lo que significa que cambia su dirección pero no su energía (aunque el cambio en la dirección si depende de la energía de la luz, siendo mayor para mayores energías). Una pequeña parte de la luz, sin embargo, es absorbida y emitida prácticamente instantáneamente con un cambio en su energía. Este cambio de energía se corresponde con una excitación fundamental del material, generalmente un nivel vibracional, y puede ser tanto positivo (la luz dispersada es de mayor energía que la incidente, dispersión anti-Stokes) como negativo (dispersión Stokes) (Fig. 2.4). Con un láser como fuente de excitación y un espectrómetro, es posible detectar esta luz y por tanto determinar los niveles vibracionales de un material (sus fonones) que sean Raman activos. Para ello es indispensable bloquear de alguna manera la luz que solo sufre dispersión Rayleigh para que no sature el detector.

La diferencia de energía de la luz dispersada Raman respecto a la incidente está habitualmente entre los 100 cm^{-1} y los 5000 cm^{-1} .

El espectro Raman de las muestras ha sido medido con un espectrómetro Raman Jobin-Yvon, modelo T64000 equipado con una cámara CCD enfriada con nitrógeno líquido y con un láser de Ar-Kr. La longitud de onda de excitación es $\lambda_{exc} = 647 \text{ nm}$, otras longitudes de onda generan emisión de luz en el material y enmascaran el fenómeno Raman, que es mucho más débil.

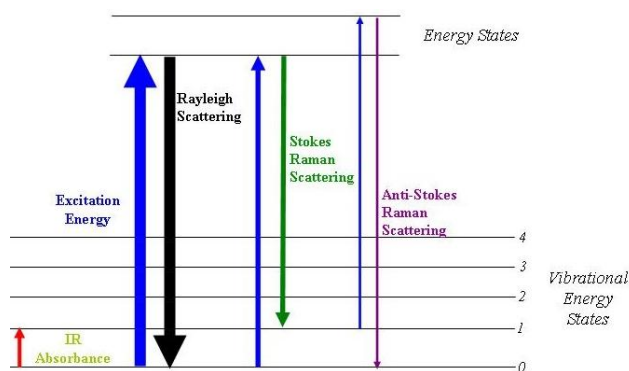


Figura 2.4: Esquema de niveles del efecto Raman.

2.4. Biocompatibilidad y asimilación celular

Las células HeLa se encuentran en una placa de plástico de 24 pocillos inmersas en medio de cultivo, una solución salina fisiológica con un alto contenido en proteínas y aminoácidos. Esta placa cuenta a su vez con varios cubreobjetos de 12 mm de diámetro de borosilicato sobre los cuales se crecen las células y que pueden ser extraídos posteriormente para su estudio.

Las células HeLa crecen en un medio adecuado a una temperatura de 37 °C en una atmósfera con una concentración de CO₂ del 5 % (usada para controlar el pH del medio). Una vez hayan crecido y se hayan multiplicado lo suficiente es necesario añadir al medio de cultivo las nanopartículas en suspensión acuosa y esperar aproximadamente 24h en las mismas condiciones para que las ingieran por endocitosis o para que atraviesen la membrana celular.

Para conseguir que las células ingieran las nanopartículas es necesario primero suspenderlas en medio de cultivo. El NaYF₄ no es resuspendible en agua, ya que precipita en muy poco tiempo. El medio biológico está compuesto de suero bovino y contiene muchos tipos de proteínas, lípidos, moléculas cargadas e iones presentes en el cuerpo de los animales. Debido a la presencia de cargas en la superficie de las proteínas y otras moléculas es más sencillo resuspender las nanopartículas directamente en este medio (su potencial ζ aumenta en valor absoluto). La estabilidad de la solución se comprueba al añadir las partículas al medio, agitar mediante ultrasonidos y centrifugar unos minutos. Para controlar el pH y que se ajuste a su valor en el cuerpo (pH $\approx$ 7,4) se añade además dos soluciones buffer: PBS (*phosphate buffered saline*) y HEPES (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*). La concentración de nanopartículas resultante es de $c = 25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Tras la incubación se trasladan los cubreobjetos con las células a un portamuestras de 24 huecos (4x6), Fig. 2.5. Cuatro de ellos se dejan como control, sin añadir ninguna partícula a las células. Los restantes 4x5 se distribuyen de la siguiente manera: En dos filas de 6 huecos se añade las NP impurificadas con Yb y Er, en las otras dos las impurificadas con Yb y Tm. En tres columnas se añaden con concentraciones de 25, 50 y 100 μL y en las otras dos columnas se añade la solución suspendida otra vez después de reposar durante 20 minutos con concentraciones 25 y 100 μL , de tal

manera que en total hay cuatro controles, y para cada concentración hay dos huecos de cada tipo de partícula.

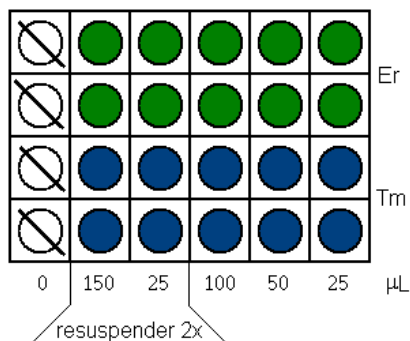


Figura 2.5: Esquema del portamuestras para crecer las células con las NP. Los círculos verdes indican las placas crecidas con $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ y las azules con $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$. La solución de NP de las dos columnas marcadas como “resuspender 2x” fue resuspendida una vez más después de dejar reposar 20 minutos.

Una vez las células crecieron lo suficiente (de 24 a 48h después) fueron fijadas mediante soluciones que enlazan las proteínas entre sí (*crosslink*) y las protegen de la degradación para poder observarlas al microscopio. Este paso supone por tanto la muerte de las células. Para ello primero se limpió el medio extracelular de nanopartículas añadiendo más medio y aspirando a continuación. Este procedimiento se repitió tres veces, de esta manera sólo las nanopartículas dentro de las células permanecen y que las que no fueron ingeridas son limpiadas. A continuación se fijó con glutaraldehído (al 1 % en volumen), se esperó 10 minutos y se añadió una solución con los fluoróforos deseados, en este caso Hoechst y Faloidina rodaminada. Después se lavó repetidamente los cubreobjetos con las células para eliminar las moléculas y nanopartículas que no hayan sido absorbidas.

Una vez pasadas 24 horas se añadió glicerol y un polímero de montaje para preservar y coagular y conseguir que no se despeguen las células de los cubreobjetos. Finalmente ya se dispone de células fijadas con las nanopartículas y los fluoróforos deseados.

2.5. Microscopía confocal

Un microscopio confocal se diferencia de un microscopio normal en la existencia de un filtro espacial con una pequeña apertura circular llamada habitualmente *pinhole*, Fig. 2.6 izquierda.

En un microscopio normal el objetivo y el ocular enfocan una pequeña región en el detector, esta región se extiende tanto en el plano x/y como en el z, y por tanto la imagen tiene contribuciones de varios planos al mismo tiempo. El microscopio confocal enfoca un punto de la muestra en el detector de tal manera que los rayos de luz procedentes de los puntos que no están en foco no pasan a través del pinhole y por tanto no llegan al detector, Fig. 2.6 derecha. El nombre “confocal” tiene

su origen en que los planos del pinhole y el foco del objetivo están conjugados (*conjugated focal planes*), esto es, un objeto situado en el foco de la lente objetivo tiene su imagen en el plano del pinhole.

Una mejora añadida al microscopio confocal es la utilización de láseres como fuente de luz. Es posible usar varios a la vez para simular la luz blanca usada habitualmente en imagen, pero también se pueden emplear de otra manera: como fuente de excitación de moléculas fluoróforas. De esta manera un láser de una longitud de onda excita a un tipo de moléculas introducidas en la muestra y que se encuentran en una parte concreta de ella. La emisión proveniente de estos marcadores se recoge en el detector. Los espejos X/Y móviles mediante piezoeléctricos permiten escanear toda la muestra y formar una imagen punto a punto. El espejo dicróico deja pasar la luz del láser en la dirección hacia la muestra, y la luz emitida por la muestra hacia el detector.

El microscopio empleado en este trabajo es un Nikon A1R del Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV). Cuenta con varias líneas láser de excitación (405, 488, 514, 561 y 638 nm) y dos modos de detección: uno por filtros, seleccionando qué rango de longitudes de onda se quiere detectar en 4 fotomultiplicadores independientes y otro mediante redes de difracción y 32 fotomultiplicadores que permite detectar un amplio rango del espectro, con resoluciones de 2.5, 5 ó 10 nm, según la amplitud del rango a detectar. El microscopio tiene objetivos de 10x (NA 0.45), 20x (NA 0.75), 40x (NA 1.3), 60x (NA 1.4) y 100x (NA 1.49), donde NA es la apertura numérica, inversamente proporcional a la distancia mínima que se puede resolver.

Para detectar las nanopartículas dentro de las células se ha usado un láser con salida de fibra óptica de $\lambda = 980$ nm colocado sobre el portamuestras. Como la excitación se realiza sobre toda la muestra a la vez, y por tanto la emisión proviene de todos los puntos, la imagen obtenida en este canal no es confocal, sino similar a la de un microscopio de epifluorescencia normal. La emisión de las nanopartículas impurificadas con Yb^{3+} y Er^{3+} se detecta entre 500 y 550 nm. Para observar el núcleo se excita el Hoechst en 405 nm y se observa entre 425 y 475 nm. La faloidina rodaminada (unida a la actina) se excita en 561.6 nm y se observa entre 570 y 620 nm. Tanto la excitación como la emisión se realiza de forma simultánea en los tres canales, ya que ninguna emisión se filtra en otro canal (*crosstalk*).

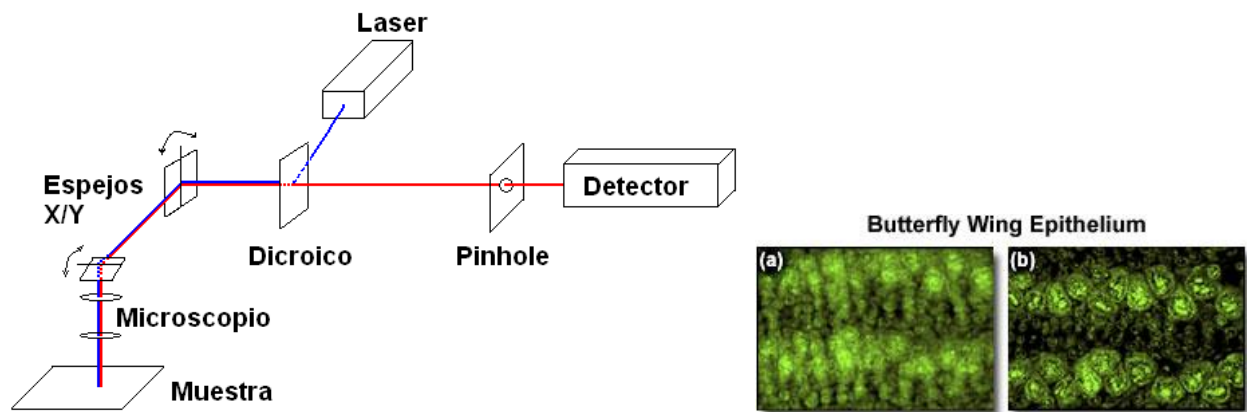


Figura 2.6: **Izquierda:** Esquema de un microscopio confocal. **Derecha:** Células epiteliales de un ala de mariposa vistas con un microscopio normal (a) y con un confocal (b).

Capítulo 3

Resultados y análisis

3.1. Difracción de rayos X

Se ha obtenido el difractograma de rayos X del $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ en *bulk* y en nanopartícula (NP), Fig. 3.1. Tanto el *bulk* como las nanopartículas se ajustan perfectamente a la estructura β - NaYF_4 (JCPDS 16-0334), aunque las intensidades relativas de los picos no coinciden ni entre sí ni con el patrón. Esto indica la presencia de textura y una orientación preferencial en la muestra. Las nanopartículas presentan un ensanchamiento en los picos, mediante la ecuación de Scherrer es posible estimar su diámetro, $d_{NP} \approx 50 \text{ nm}$.

Una molienda demasiado larga o intensa puede provocar la aparición de la fase α del NaYF_4 , pero esta no ha sido observada en el diagrama, por lo que los parámetros utilizados fueron los adecuados.

3.2. Espectroscopía

Se ha llevado a cabo un estudio espectroscópico de las muestras empleando distintas técnicas para obtener información relevante a su estructura electrónica y propiedades ópticas.

Se ha obtenido el espectro Raman para obtener información sobre las vibraciones de la red, se ha medido el espectro de absorción, que permite determinar a qué longitudes de onda absorbe radiación la muestra.

A continuación la muestra se excitó con luz de energía correspondiente a los picos del espectro de absorción, con lo que se obtuvieron varios espectros de emisión. Después de identificar los picos de emisión más intensos se realizaron varios espectros de excitación para averiguar de qué manera se produce cada emisión, esto es, que proceso de desexcitación sigue el ion hasta llegar de nuevo al estado fundamental.

Una vez conocida esa información a temperatura ambiente, se realizaron estudios en función de la temperatura desde 300 K a 10 K, para conocer la evolución de las propiedades ópticas con la misma.

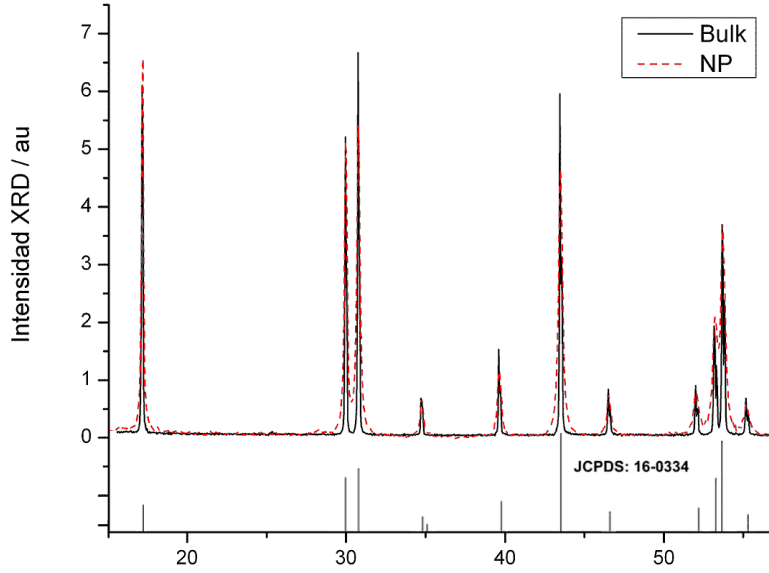


Figura 3.1: Difractograma de rayos X (XRD) del $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ en *bulk* (línea continua negra), en NP (línea de puntos roja) y el patrón de referencia de la estructura $\beta\text{-NaYF}_4$: JCPDS 16-0334.

Para finalizar, se estudió la variación en la emisión al aumentar la potencia de la excitación, una característica de estos materiales.

3.2.1. Espectroscopía Raman

El espectro Raman de la muestra en *bulk* y en nanopartícula ha sido medido a temperatura ambiente (Fig. 3.2). Ambos espectros son similares, lo que indica que reducir el tamaño de las partículas no influye en su estructura cristalina, aunque las nanopartículas tengan una mayor relación superficie/volumen.

El fonón de mayor energía tiene $\nu_{max.} \approx 500 \text{ cm}^{-1}$, sin embargo es poco intenso. La energía efectiva de un fonón, calculada promediando la posición de cada fonón ponderada con su intensidad es de $\nu_{eff.} = 292 \text{ cm}^{-1}$, esto indica que este material tiene fonones de baja energía, lo que facilita la desexcitación radiativa frente a la no radiativa. Para las probabilidades de desexcitación no-radiativa se toma el valor menos favorable, $\nu_{max.}$.

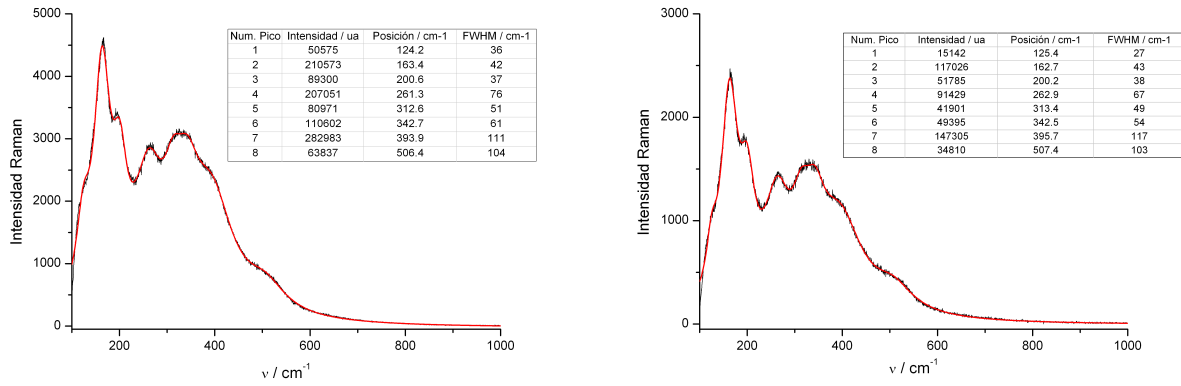


Figura 3.2: Espectro Raman del $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ y tabla con la intensidad, posición y anchura de los picos. **Izquierda:** en *bulk*. **Derecha:** en nanopartícula.

3.2.2. Espectro de reflectancia difusa

El espectro de absorción (determinado a partir de la reflectancia) del $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ se muestra en la Fig. 3.3.

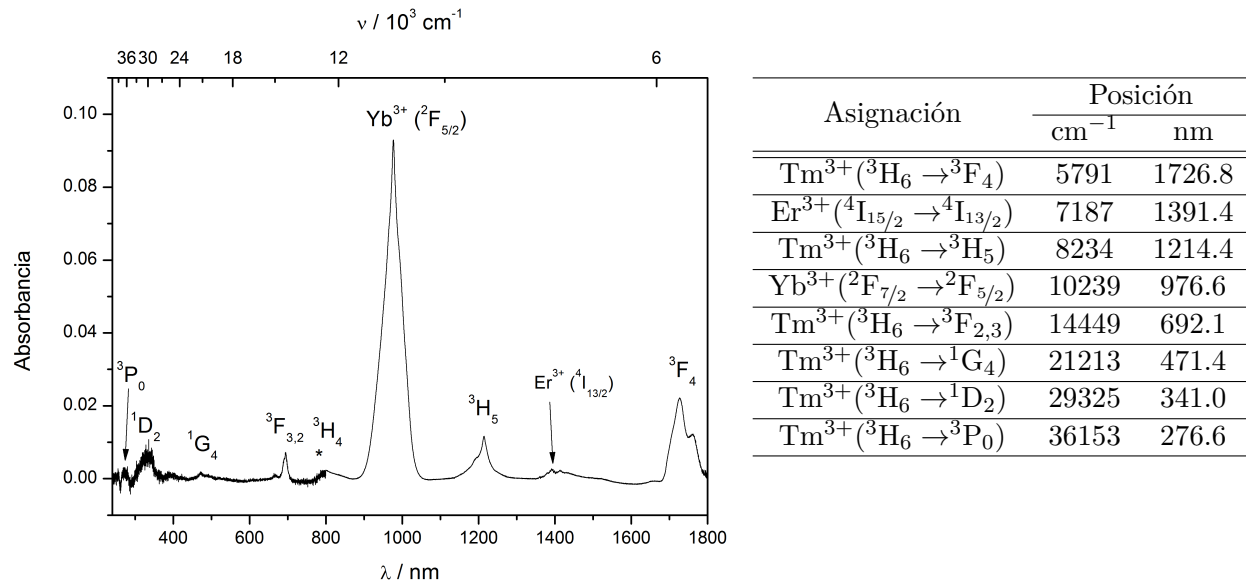


Figura 3.3: **Izquierda:** Espectro de absorción del NaYF₄:25 %Yb³⁺, 0.3 %Tm³⁺ obtenido a partir de una medida de reflectancia. Los estados fundamentales son el ²F_{7/2} del Yb³⁺, el ³H₆ del Tm³⁺ y el ⁴I_{15/2} del Er³⁺. Los picos sin etiqueta de ion corresponden al Tm³⁺. **Derecha:** Asignación y posición de cada pico de absorción

Los picos se han asignado a transiciones electrónicas entre el estado fundamental del Yb³⁺(²F_{7/2}), Tm³⁺(³H₆) y Er³⁺(⁴I_{15/2}) y estados excitados y se ha obtenido sus posiciones. En el NaYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺, el Er³⁺ está presente como impureza no deseada, ya que es técnicamente muy complicado separar el Er³⁺ del Yb³⁺, debido a que sus masas y propiedades químicas son muy similares.

Como la absorbancia ha sido determinada a partir de una medida de reflectancia no es posible determinar la fuerza de oscilador de cada transición, aunque la relación entre áreas para las transiciones de un mismo ion aportan información sobre la fuerza de oscilador relativa.

El asterisco de la figura marca un cambio de detector, que aunque esté situado cerca de un pico permite observarlo sin problemas.

3.2.3. Emisión y excitación

Se ha medido la emisión de la muestra a temperatura de ambiente (RT) excitándola en niveles electrónicos de alta energía (UV), correspondientes a las transiciones electrónicas observadas en el espectro de absorción de la Fig. 3.3 y observando la emisión tras varios procesos de relajación (Fig. 3.4 izquierda). También se ha excitado niveles electrónicos de baja energía y mediante los distintos procesos de upconversion se ha observado emisión a mayores energías (Fig. 3.4). Además de medir el espectro entre 300 y 850 nm, se ha medido la emisión en el infrarrojo, desde 990 hasta 1550 nm, Fig. 3.4 inferior.

En la Fig. 3.5 se muestra el esquema de los niveles electrónicos relevantes del Yb^{3+} y Tm^{3+} y la asignación de las transiciones y sus posiciones.

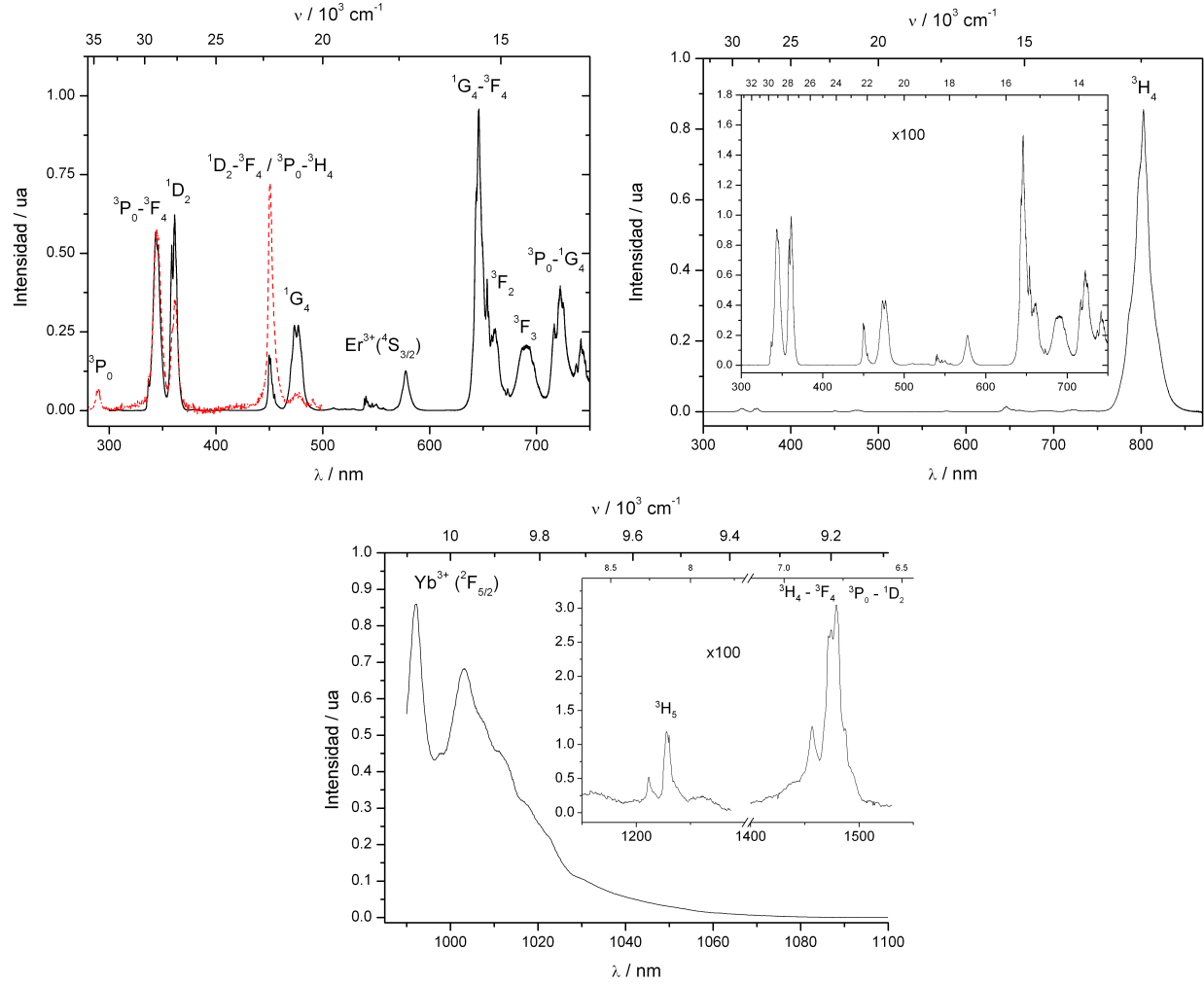


Figura 3.4: Espectros de emisión a diferentes excitaciones. **Izquierda:** Espectros de emisión a RT (rojo, línea punteada) excitando a $\lambda_{exc} = 262 \text{ nm}$ (38170 cm^{-1}) y de upconversion (negro, línea continua) con $\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$ (10200 cm^{-1}). **Derecha:** Espectro completo de upconversion a RT excitando a 980 nm y potencia del láser 74 mW. **Debajo:** Espectro a 10 K en la región infrarroja excitando a 980 nm.

La excitación con la lámpara de Xenón en 262 nm (38170 cm^{-1}) puebla el nivel $^3\text{P}_2$, que rápidamente mediante emisión multifonónica se relaja al estado $^3\text{P}_0$. Desde ahí existe emisión al estado fundamental y emisiones a los estados excitados $^3\text{F}_4$ y $^3\text{H}_4$, además se observan emisiones desde

los estados 1D_2 y 1G_4 al fundamental y del 1D_2 al 3F_4 . Estos estados han sido poblados desde el 3P_0 emitiéndose fotones con energía 6800 cm^{-1} y 14000 cm^{-1} , aunque estas transiciones no han sido observadas ya que se ha medido solo hasta 20000 cm^{-1} .

La excitación con el diodo láser en $\lambda_{exc} = 980\text{ nm}$ (10200 cm^{-1}) provoca la emisión desde niveles electrónicos de mayor energía, lo que evidencia la existencia de procesos de upconversion. La emisión más intensa se produce desde el nivel 3H_4 , que es casi dos órdenes de magnitud mayor que la emisión desde el 1G_4 , la segunda más intensa.

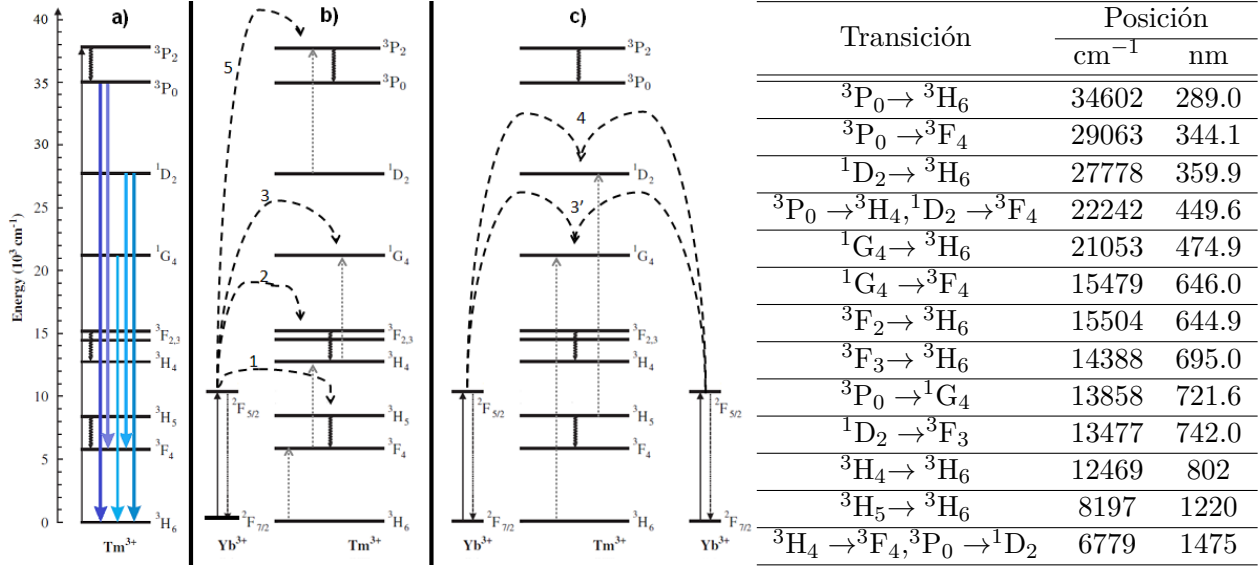


Figura 3.5: **Izquierda:** Esquema de niveles del Yb^{3+} y Tm^{3+} . Las líneas curvas son relajaciones multifonónicas, las lisas emisiones/absorciones de fotones, las de rayas transferencia de energía entre el Yb^{3+} y el Tm^{3+} y las de puntos indican el estado inicial y final de en cada paso. **a)** emisiones al excitar el nivel 3P_2 del Tm^{3+} . **b)** y **c)** emisiones al excitar el nivel $^2F_{5/2}$ del Yb^{3+} . Los pasos están numerados del 1 al 5, el tercer paso se produce de dos maneras distintas (3 y 3'). **Derecha:** Asignación de las líneas de emisión y posición en energía correspondientes a los picos de la Fig. 3.4.

El proceso de upconversion en el $\text{NaYF}_4:25\%\text{Yb}^{3+},0.3\%\text{Tm}^{3+}$ al ser excitado con $\lambda = 980\text{ nm}$ consiste en varios pasos (numerados en la Fig. 3.5 izquierda): el primero de todos ellos se produce desde el nivel $^2F_{5/2}$ del Yb^{3+} al 3H_5 del Tm^{3+} , con emisión de $n \approx 4$ fonones con energía total $n \cdot \nu_{max.} \approx 1850\text{ cm}^{-1}$. A continuación el ion se relaja al nivel 3F_4 . Una nueva transferencia del Yb^{3+} excita el sistema al nivel 3F_2 (emisión de $n \approx 2$ fonones), y desde ahí se relaja rápidamente al nivel 3H_4 , desde el cual se produce la emisión más intensa.

Desde el propio nivel 3H_4 puede producirse otra transferencia al nivel 1G_4 del Tm^{3+} , con la creación de otros $n \approx 3$ fonones. Otro mecanismo para poblar el nivel 1G_4 consisten en la transferencia simultánea de energía de dos iones Yb^{3+} a un ion Tm^{3+} de forma cooperativa, necesitando la absorción de unos 2 fonones. Es posible que este mecanismo sea débil en comparación con el

anterior, ya que involucra un proceso a tres iones (dos Yb^{3+} y un Tm^{3+}) y la existencia previa de 2 fonones (con lo que dependerá fuertemente de la temperatura). El primer mecanismo de población del nivel $^1\text{G}_4$ necesita 3 fotones en total, mientras que el segundo solo dos. La dependencia de la luminiscencia de este nivel respecto a la potencia de excitación da información sobre cual de los dos mecanismos predomina a una cierta temperatura.

El nivel $^1\text{D}_2$ es alcanzado mediante otro proceso cooperativo de dos Yb^{3+} a un Tm^{3+} en el nivel $^3\text{H}_5$, con la emisión de un fonón. Medidas realizadas variando la concentración de impurezas [34] muestran que para una concentración fija de Tm^{3+} , aumentar la de Yb^{3+} amplifica la intensidad de la transición $^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{H}_6$, lo que indica que el mecaniso propuesto es correcto.

Finalmente, un proceso ETU del Yb^{3+} puebla el estado $^3\text{P}_2$, que se desexcita no radiativamente al estado $^3\text{P}_0$. La emisión desde el mismo existe, aunque es muy débil y no se aprecia en la Fig. 3.4. El número de fotones necesario para llegar a cada estado se muestra en la Tab. 3.1.

Nivel electrónico	Nº fotones
$^3\text{F}_4, ^3\text{H}_5$	1
$^3\text{F}_{2,3}, ^3\text{H}_4$	2
$^1\text{G}_4$	2, 3
$^1\text{D}_2$	3
$^3\text{P}_{0,2}$	4

Tabla 3.1: Número mínimo de fotones necesario para alcanzar cada estado del Tm^{3+} al excitar con radiación de 980 nm según los mecanismo propuestos en este trabajo.

El paso crítico para obtener emisión azul o ultravioleta es poblar el nivel $^1\text{D}_2$, que se produce por mecanismos más débiles que los que pueblan otros niveles y por tanto limita la población de los niveles superiores como el $^3\text{P}_0$.

Se ha medido también el espectro de excitación para varias de las emisiones observadas: En el caso de la emisión más intensa del material ($^3\text{H}_4 \rightarrow ^3\text{H}_6$, $\lambda_{em} = 802 \text{ nm}$) se ha medido la excitación en torno a los niveles del Yb^{3+} (transición $^2\text{F}_{7/2} \rightarrow ^2\text{F}_{5/2}$, cerca de los 980 nm) y el correspondiente a las transiciones desde el propio Tm^{3+} ($^3\text{H}_6 \rightarrow ^3\text{F}_{2,3}$, en torno a 690 nm), Fig. 3.6 izquierda. Los espectros han sido tomados en las mismas condiciones (aunque cada uno con una red de difracción distinta) y las intensidades relativas dan información sobre la fuerza de oscilador relativa para cada excitación. El espectro a temperatura ambiente está desplazado a menores energías debido a que se pueblan estados Stark de mayor energía dentro del nivel fundamental, con lo que la excitación se produce a mayor longitud de onda que a bajas temperaturas.

En la Fig. 3.6 derecha se muestra el espectro completo de excitación. Se observa que los niveles electrónicos superiores ($^1\text{D}_2$ y $^1\text{G}_4$) tienen una baja intensidad respecto al nivel $^3\text{F}_3$, esto es debido a los otros mecanismos de desexcitación que tienen lugar: decaer al estado fundamental o a un estado intermedio que no sea el $^3\text{H}_4$ como el $^3\text{F}_4$, que como se observa en la Fig. 3.4 son transiciones intensas.

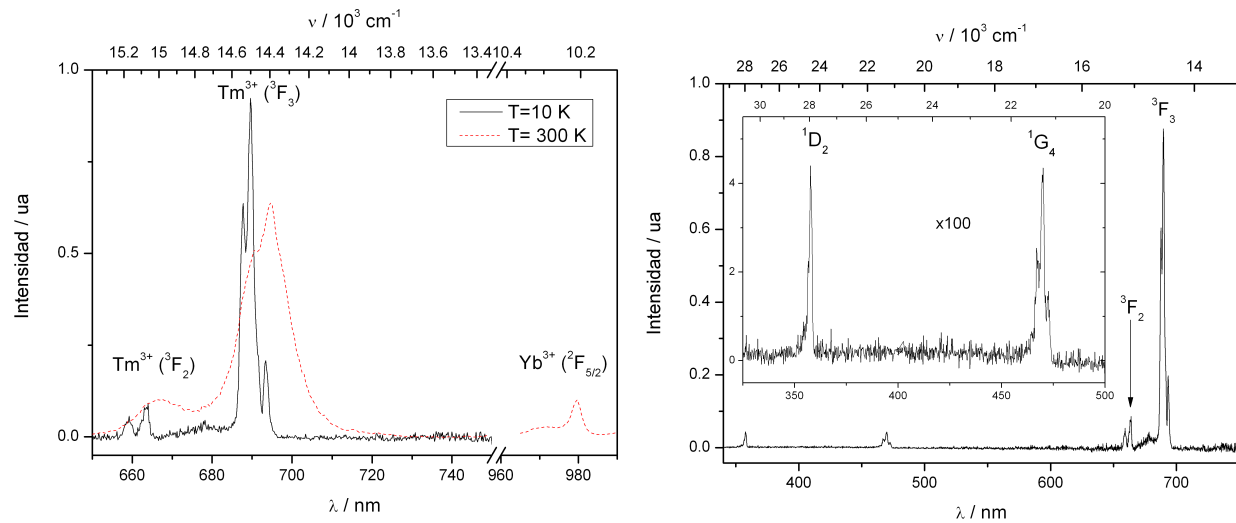


Figura 3.6: Espectros de excitación correspondiente a la emisión de 802 nm, asignada a la transición ${}^3\text{H}_4 \rightarrow {}^3\text{H}_6$ del Tm^{3+} . Las excitaciones proceden de transiciones desde el estado fundamental del Tm^{3+} (${}^3\text{H}_6$) y del Yb^{3+} (${}^2\text{F}_{7/2}$) a los distintos estados excitados indicados en la figura. **Izquierda:** Ampliación y comparativa entre los espectros tomados a 300 K y 10 K. **Derecha:** A 10 K en todo el rango visible.

En los espectros a 10 K es posible distinguir detalles en los picos, ya que se estrechan, Fig. 3.6 izquierda. Se distinguen varios picos en cada transición, evidenciando la estructura fina debida al desdoblamiento provocado por el campo cristalino (niveles Stark).

Se ha medido la emisión de la transición ${}^3\text{H}_4 \rightarrow {}^3\text{H}_6$ en torno a 800 nm, excitando con la lámpara de xenón en 980 nm y 689 nm (los dos máximos de la Fig. 3.6 izquierda), Fig. 3.7. Se puede observar la estructura fina del pico, que a temperatura ambiente apenas se intuye. Esta estructura muestra el desdoblamiento del estado fundamental (ya que la emisión se produce desde el nivel más bajo dentro del estado ${}^3\text{H}_4$) debido al campo cristalino. Como el ion se encuentra en una posición con simetría C_1 cada estado se divide en $2J + 1$ estados, por tanto en esta transición se espera observar hasta 13 picos (en esta simetría todas las transiciones están permitidas), sin embargo, solo se observa 8 picos, ya que la separación entre algunos es demasiado pequeña para ser resuelta por el equipo. Los espectros a 10 K excitando en 689 nm y 980 nm presentan diferencias en la intensidad relativa de los picos. Esto es debido a que en el primer caso (excitación 689 nm) se está excitando directamente a todos los iones Tm^{3+} presentes en la muestra, mientras que en el segundo caso (excitación 980 nm) se excita solo a los que están cerca de un ion Yb^{3+} . Como la concentración de Yb^{3+} es de 25 % (y por tanto la de Y^{3+} es casi del 75 %), es más probable que los iones Tm^{3+} estén cerca de Y^{3+} que de Yb^{3+} . Los pequeños cambios en el campo cristalino de estos dos entornos (ya que ambos iones tienen radios iónicos ligeramente distintos, Y^{3+} : 1.075 Å y Yb^{3+} : 1.042 Å) pueden explicar la diferencia en los espectros. La diferencia principal entre los espectros a 10 K y a 300 K es que éste último parece estar desplazado hacia mayores energías. Esto puede explicarse con el diagrama de

niveles de la Fig. 3.7: al aumentar la temperatura se pueblan niveles Stark de mayor energía dentro del nivel 3H_4 , la emisión desde estos niveles se produce a longitudes de onda más cortas que desde el nivel más bajo, con lo que parece que el pico se desplaza a mayores energías.

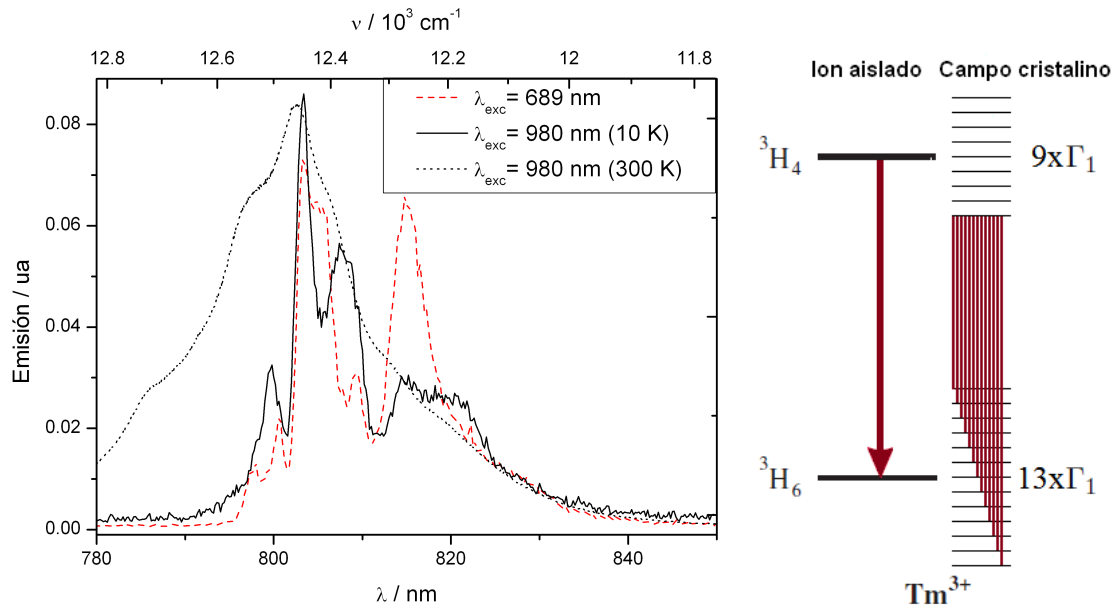


Figura 3.7: **Izquierda:** Emisión correspondiente a la transición ${}^3H_4 \rightarrow {}^3H_6$ al excitar con la lámpara de xenón en 980 nm a 10 K (línea continua negra), a 300 K con el diodo láser (línea de puntos negra) y a 10 K excitando con la lámpara en 689 nm (línea de rayas roja). **Derecha:** Esquema de los niveles electrónicos de la transición. Se muestran los niveles electrónicos sin y con el efecto del campo cristalino (de simetría C_1). Las flechas indican las transiciones permitidas, que en esta simetría son todas.

Evolución con la temperatura

En la Fig. 3.8 se muestra el espectro de emisión para una longitud de onda de excitación de 980 nm a 10 K. La posición de los picos es idéntica respecto al espectro a temperatura ambiente, sin embargo sus intensidades relativas han cambiado. Esto es debido mayoritariamente al efecto de la temperatura sobre la población de los distintos niveles electrónicos. Al descender la temperatura, el número de fonones en cada modo (esto es, de cada energía) disminuye. Como los procesos ETU están mediados por fonones, la intensidad de cada transición se ve afectada. En la Fig. 3.8 derecha se representan los espectros de emisión a 10, 50, 100, 150, 200 y 250 K.

En la Fig. 3.9 se representa el área de cada pico de cada transición en función de la temperatura, normalizada a su valor a 250 K.

Se observa que la variación de la intensidad de los picos con la temperatura es distinta para

cada transición: algunas alcanzan su intensidad máxima en torno a 100 K mientras que otras siguen aumentando hasta temperatura ambiente. Comparando las dos clases de transiciones se observa que aquellas que parten de estado 1G_4 aumentan su intensidad hasta llegar a 250 K, sin mostrar ningún máximo local anterior (Fig. 3.9 derecha). Esto puede ser debido a que la transferencia cooperativa requerida para alcanzar este nivel necesita absorber 2 fonones. El número de fonones de cada energía depende fuertemente de la temperatura, de tal manera que a bajas temperaturas la probabilidad de absorber un fonón es muy baja para que tenga lugar este proceso.

Las transiciones que tienen su máximo a 250 K pero que tienen un máximo local en torno a 100 K y las que tienen su máximo absoluto en 100 K son transiciones que parten de estados excitados de alta energía como el 3P_0 y el 1D_2 . Para estas transiciones, al descender la temperatura su intensidad alcanza un máximo, lo que indica que existe alguna relajación cruzada que necesita fonones y que a mayores temperaturas impide que el ión llegue a estados excitados superiores.

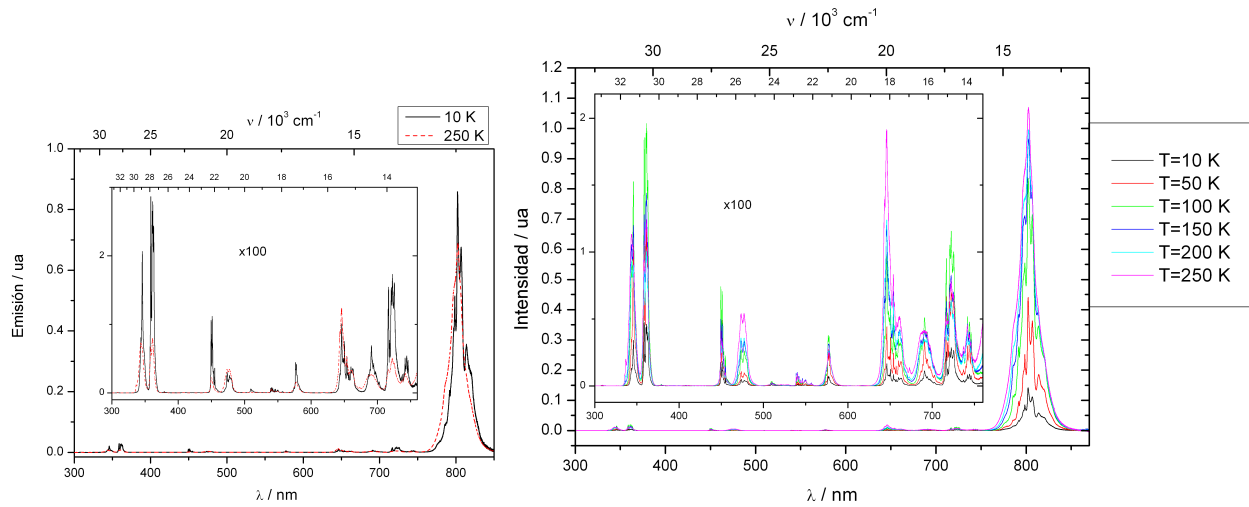


Figura 3.8: **Izquierda:** Espectros de emisión del $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$ con excitación $\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$ (10200 cm^{-1}) a 10 K y 250 K en la región UV/VIS, ambos normalizados al área del pico más intenso. **Derecha:** Emisión excitando en 980 nm para varias temperaturas, sin normalizar.

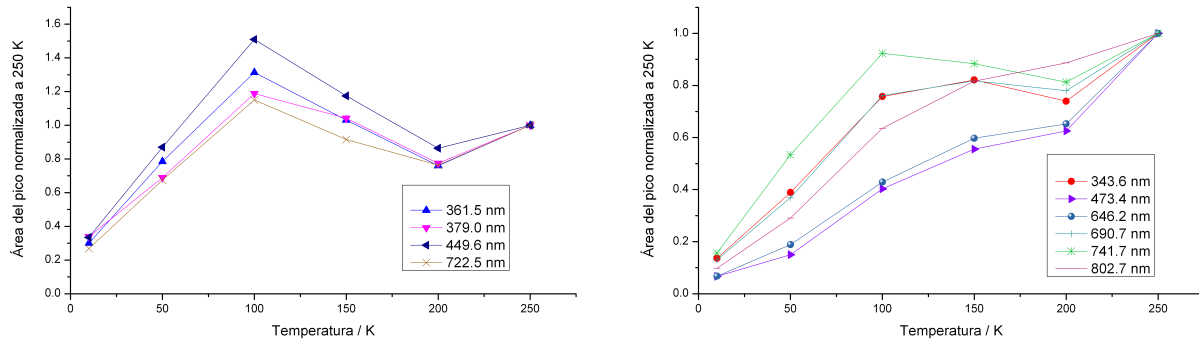


Figura 3.9: **Izquierda y derecha:** Área bajo el pico de cada transición en función de la temperatura y normalizada a su valor a 250 K. Se representa las transiciones cuya máxima área se produce a 100 K en la izquierda y a 250 K en la derecha.

Emisión y excitación del Yb^{3+}

Se ha estudiado la emisión y excitación del Yb^{3+} , que solo tiene un multiplete electrónico excitado en la configuración $4f^{13}$. En la Fig. 3.10 se muestra su evolución con la temperatura. Se observa como las intensidades de cada transición varían con la temperatura y como aparecen picos que no se observan a 10 K. Estos picos se deben a la población de los niveles de Stark superiores más cercanos, ya que la relación de poblaciones varía con un factor de Boltzmann y la separación entre niveles es pequeña, como se va a comprobar a continuación.

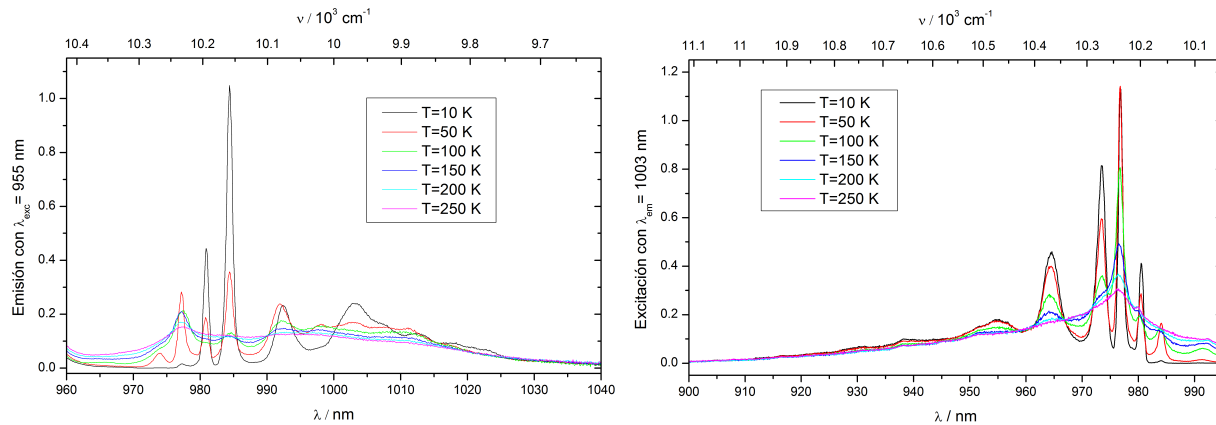


Figura 3.10: **Izquierda:** Emisión del Yb^{3+} al ser excitado a 955 nm en función de la temperatura. **Derecha:** Espectro de excitación del Yb^{3+} detectando en 1003 nm en función de la temperatura. Todos los espectros (emisión y excitación) están normalizados al área.

Este ion solo tiene un multiplete excitado, como se muestra en la Fig. 3.11 inferior. Este estado y el fundamental sufren un desdoblamiento debido al campo cristalino, lo que da lugar a varios estados con etiqueta de simetría Γ_2 . El número de niveles en los que se desdobra cada estado es $\frac{2J+1}{2}$, por lo que el estado fundamental tiene ahora 4 niveles (numerados 1-4) y el excitado 3 (1'-3'). Además, las vibraciones de la red contribuyen a la estructura de niveles. Estas vibraciones deben ser similares para cada estado Γ_2 , ya que el acoplamiento ion-fonón es muy débil. Por este motivo se superpone el espectro Raman (que muestra estas vibraciones) sobre los espectros de emisión en la Fig. 3.11 derecha, tomando como origen los dos niveles electrónicos más intensos. Este espectro Raman ha sido tomado a temperatura ambiente, por lo que no refleja exactamente las vibraciones a temperaturas bajas, sin embargo es una buena aproximación. Al pasar de 10 K a 50 K la contribución vibracional aumenta y la intensidad de los picos electrónicos se mantiene o disminuye, ya que aparecen otros orígenes electrónicos y la parte vibrónica crece a expensas de ellos.

En la Fig. 3.11 izquierda se muestra la emisión y excitación a 10 y 50 K correspondientes a las transiciones de campo cristalino comparadas y asignadas según el esquema de niveles de energía mostrados en la Fig. 3.11 inferior. El pico 1-1' (y el 1'-1) se corresponde con la transición del nivel inferior del estado fundamental al nivel inferior del estado excitado. Este es el único pico en común entre la emisión y la excitación en el cero absoluto. A 10 K ya se empieza a observar la línea 2'-1, y al aumentar más la temperatura se observan más transiciones termalizadas.

Con estas medidas no es posible confirmar con seguridad si la transición marcada en la figura como 1'-4 es electrónica o vibrónica, ya que los niveles vibracionales asignados al nivel 1 coinciden en la misma región espectral (Fig. 3.11 derecha). Un método para distinguir entre estos dos casos consiste en medir el espectro de emisión para un monocristal inmerso en un campo magnético. Al aumentar la intensidad del campo magnético los picos electrónicos se desplazan hacia mayores energías (y sus niveles vibracionales con ellos) de tal manera que es posible determinar si una transición es electrónica. No se dispone de un monocristal ni del dispositivo experimental necesario para realizar este experimento.

Una vez asignados los picos a las transiciones es posible determinar la separación entre los niveles, como se muestra en la Fig. 3.11 inferior. Este desdoblamiento es $\Delta E_f = 224 \text{ cm}^{-1}$ para el fundamental y $\Delta E_e = 74 \text{ cm}^{-1}$ para el estado excitado. Ambos valores son menores que para otras redes cristalinas [35], lo que indica que el campo cristalino del NaYF_4 es más débil que en otros materiales, y explica en parte su gran eficiencia de upconversion. Hasta la fecha no se ha encontrado en la bibliografía ningún otro trabajo en el que se haya determinado estos valores, siendo por tanto éste el primero en hacerlo.

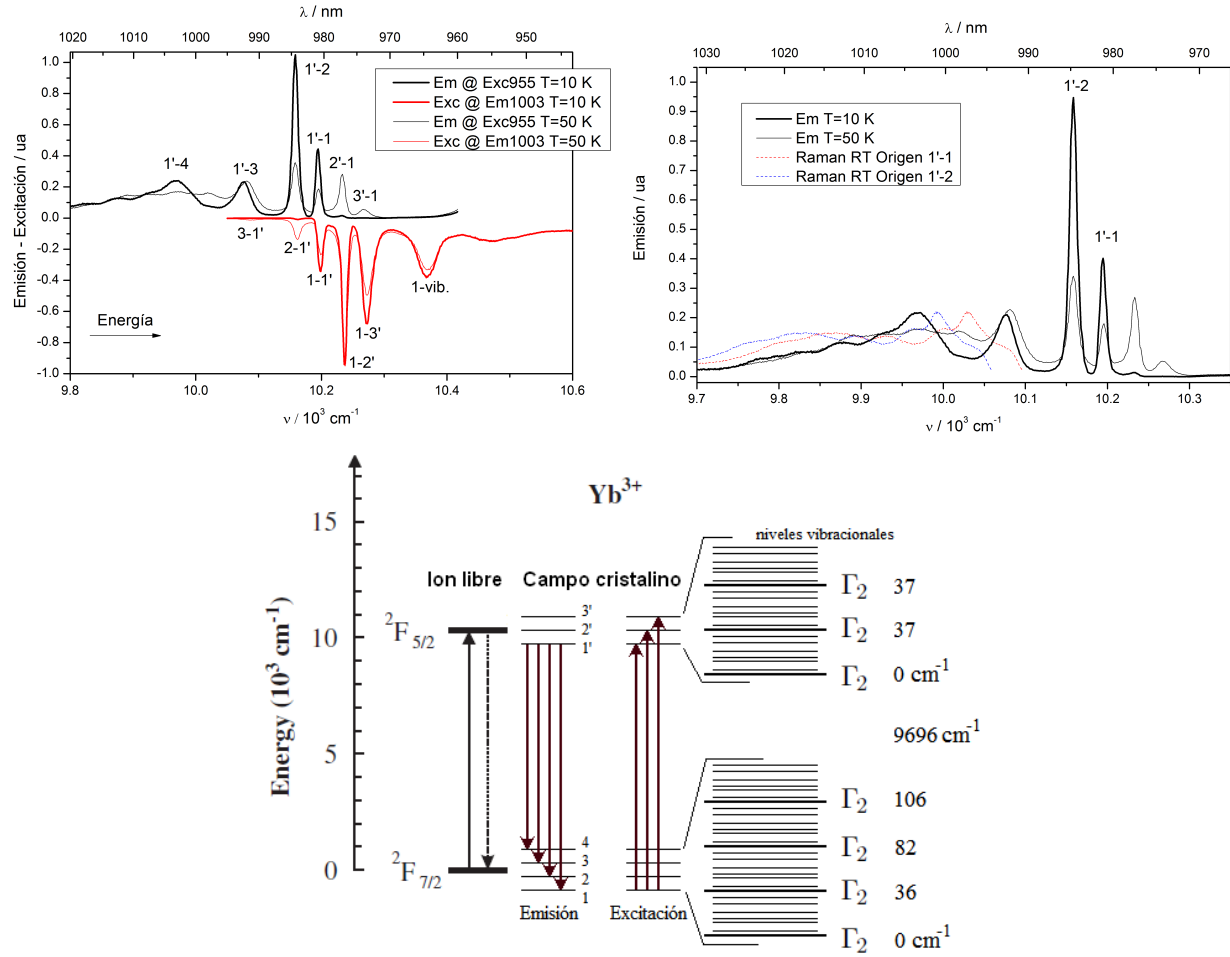


Figura 3.11: **Izquierda:** Comparativa de la emisión (negro, superior) y excitación (rojo, inferior) del Yb^{3+} a 10 K (líneas gruesas) y 50 K (líneas finas). **Derecha:** Comparativa entre la emisión a 10 y 50 K y el espectro Raman tomado a RT tomando como origen las dos transiciones electrónicas más intensas. Las dos emisiones han sido normalizadas al área. **Inferior:** Diagrama de los niveles de energía para el ion libre y con campo cristalino, indicando las transiciones a baja temperatura. Se muestra una ampliación con los niveles vibracionales (no está a escala) y las energías de cada estado determinadas a partir de los espectros de emisión y excitación.

3.2.4. Variación con la potencia de excitación

En la Fig. 3.12 se representa la dependencia de la intensidad (área integrada) de cada pico con la potencia de excitación para el material en *bulk* y en nanopartícula. Las pendientes de cada pico se muestran en la Tab. 3.2.

El hecho más destacable es que las pendientes disminuyen mucho al pasar de bulk a nanopartícula. Esto significa que para cada potencia hay una menor intensidad en la emisión, o lo que es lo mismo, para cada potencia se necesitan más fotones para llegar a la misma intensidad de emisión que en bulk, esto indica que la eficiencia de upconversion ha disminuido al disminuir el tamaño del material. La razón principal es que al aumentar la relación superficie/volumen el número de iones en la superficie aumenta. Estos iones no pueden participar de los mecanismos de upconversion al tener menos iones vecinos que en el centro de la partícula. Otra razón es que en la superficie del material hay grupos -OH, -CO, etc. que introducen fonones locales de muy alta energía, lo que dificulta la luminiscencia y el upconversion.

Las pendientes en *bulk* se ajustan bien a los valores teóricos (dados anteriormente también en la Tab. 3.1). Las transiciones cuyo origen es el nivel 3P_0 (picos 1, 2, 4 y 9) tienen en general una pendiente menor a lo esperado. Una posible explicación es que el último proceso ETU sea muy eficiente, de tal manera que para las potencias empleadas la pendiente empieza a tender a la unidad, como se ha explicado en la introducción. Debido a esto no es posible distinguir qué transición se corresponde con el cuarto pico, en torno a 450 nm, ya que su valor parece indicar que se trata de la $^1D_2 \rightarrow ^3F_4$, pero la transición $^3P_0 \rightarrow ^3H_6$ tiene la misma pendiente.

Las pendientes de las transiciones desde el estado 1G_4 (5 y 7) pueden tener pendiente 2 ó 3, según el mecanismo utilizado para alcanzar este nivel (Fig. 3.5), el valor determinado es intermedio entre estos dos, lo que parece indicar que ambos procesos tienen lugar con aproximadamente la misma intensidad. Esta pendiente debe aumentar hasta su valor máximo al disminuir la temperatura, como ya se ha comentado anteriormente.

La transición $^3H_4 \rightarrow ^3H_6$ en torno a 800 nm (pico 10 en la tabla) tiene una pendiente prácticamente la unidad, por lo que el proceso de upconversion que da lugar a ella (los dos primeros procesos ETU) es especialmente intenso. Es necesario usar el láser con menor potencia para observar la pendiente predicha. Como no es posible utilizar el láser con menos potencia de forma estable es necesario emplear filtros neutros. El único nivel que tiene una pendiente superior a la teórica es el 3F_3 , que es de 2.9 en lugar de 2. Esto puede indicar que este nivel se puebla mayoritariamente debido a la relajación desde el 1G_4 o el 1D_2 además de ser poblado por el segundo proceso ETU desde el Yb^{3+} .

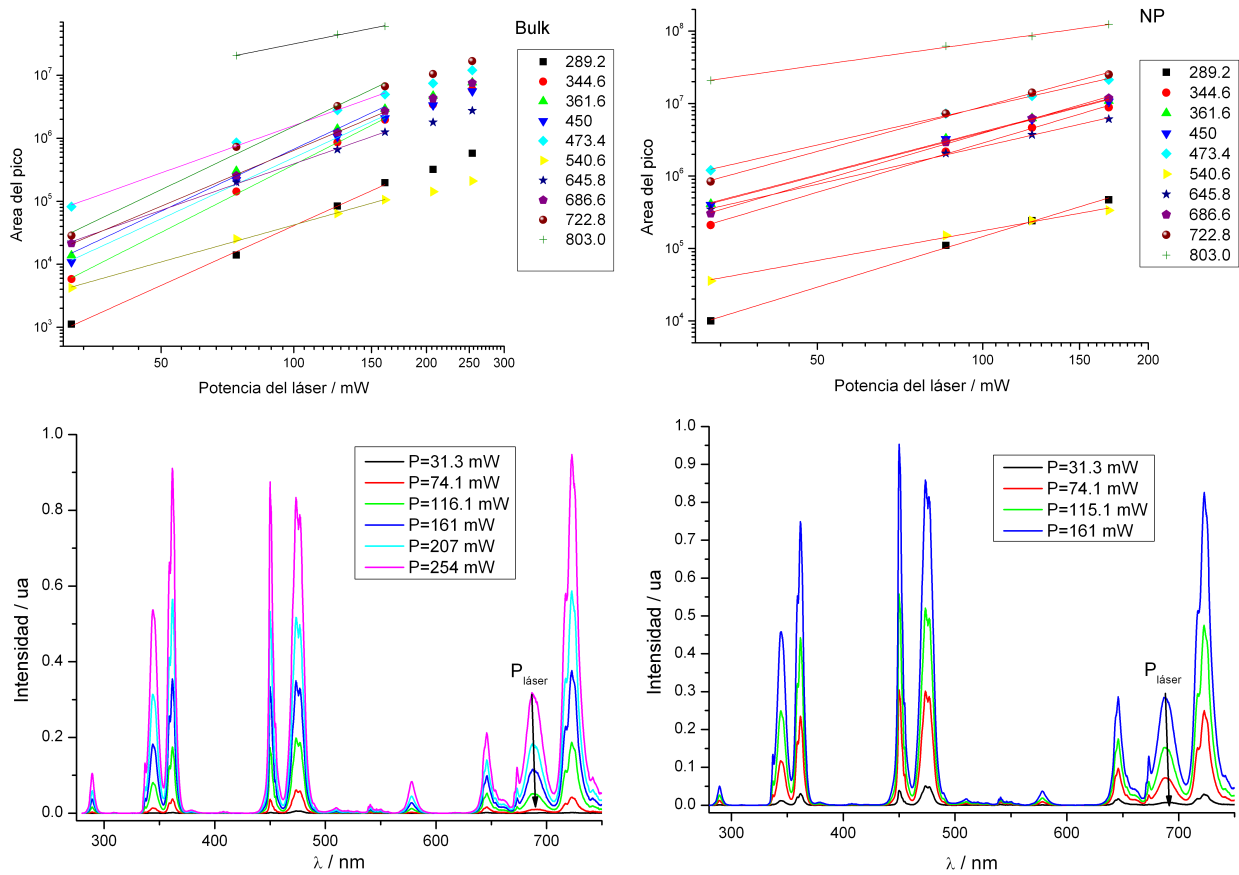


Figura 3.12: **Superior:** Dependencia de la intensidad integrada de los picos de emisión con la potencia de excitación del láser. El ajuste lineal se ha realizado solo con los cuatro primeros datos. **Inferior:** Espectros de emisión con excitación a 980 nm para varias potencias. **Izquierda:** para el *bulk*. **Derecha:** para las NP.

3.2.5. Tiempos de vida

Se ha determinado los tiempos de vida de tres niveles electrónicos del Tm^{3+} ($^1\text{G}_4$, $^3\text{F}_3$ y $^3\text{H}_4$) excitando al Yb^{3+} con un láser OPO pulsado en torno a 976 nm (anchura del pulso 10 ns), Fig. 3.13 izquierda. Los tres niveles tienen comportamientos similares, compatibles con un mecanismo ETU o cooperativo, ya que cuando el pulso láser ha cesado, los niveles siguen poblándose (ver Fig. 1.4 B). El tiempo que tarda en subir la intensidad está relacionado con el tiempo de vida de los estados intermedios (en el caso ETU) o del nivel excitado del Yb^{3+} (en el caso cooperativo). La bajada está relacionada con el tiempo de vida de cada nivel. La ampliación de la figura muestra ésta bajada en escala logarítmica. El tiempo de vida de cada nivel es la pendiente del ajuste lineal. Se

Transición	λ_{max}/nm	Pendiente bulk	Pendiente NP	Pendiente teórica	Nº Pico
$^3\text{P}_0 \rightarrow ^3\text{H}_6$	289.2	3.2	2.3	4	1
$^3\text{P}_0 \rightarrow ^3\text{F}_4$	344.6	3.6	2.3	4	2
$^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{H}_6$	361.6	3.3	2.0	3	3
$^3\text{P}_0 \rightarrow ^3\text{H}_4, ^1\text{D}_2 \rightarrow ^3\text{F}_4$	450	3.2	2.0	4, 3	4
$^1\text{G}_4 \rightarrow ^3\text{H}_6$	473.4	2.5	1.7	2 ó 3	5
$\text{Er}^{3+} (^4\text{S}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2})$	540.6	2.0	1.4	2	6
$^1\text{G}_4 \rightarrow ^3\text{F}_4$	645.8	2.4	1.7	2 ó 3	7
$^3\text{F}_3 \rightarrow ^3\text{H}_6$	686.6	2.9	2.2	2	8
$^3\text{P}_0 \rightarrow ^1\text{G}_4$	722.8	3.3	2.1	4	9
$^3\text{H}_4 \rightarrow ^3\text{H}_6$	803.0	1.4	1.1	2	10

Tabla 3.2: Pendientes de la Fig. 3.12 para cada pico en bulk y en NP.

ha determinado también el tiempo de vida del nivel $^2\text{F}_{7/2}$ del Yb^{3+} , Fig. 3.13 derecha. Este tiempo de vida es muy largo, lo que evidencia procesos de migración de energía entre iones Yb^{3+} .

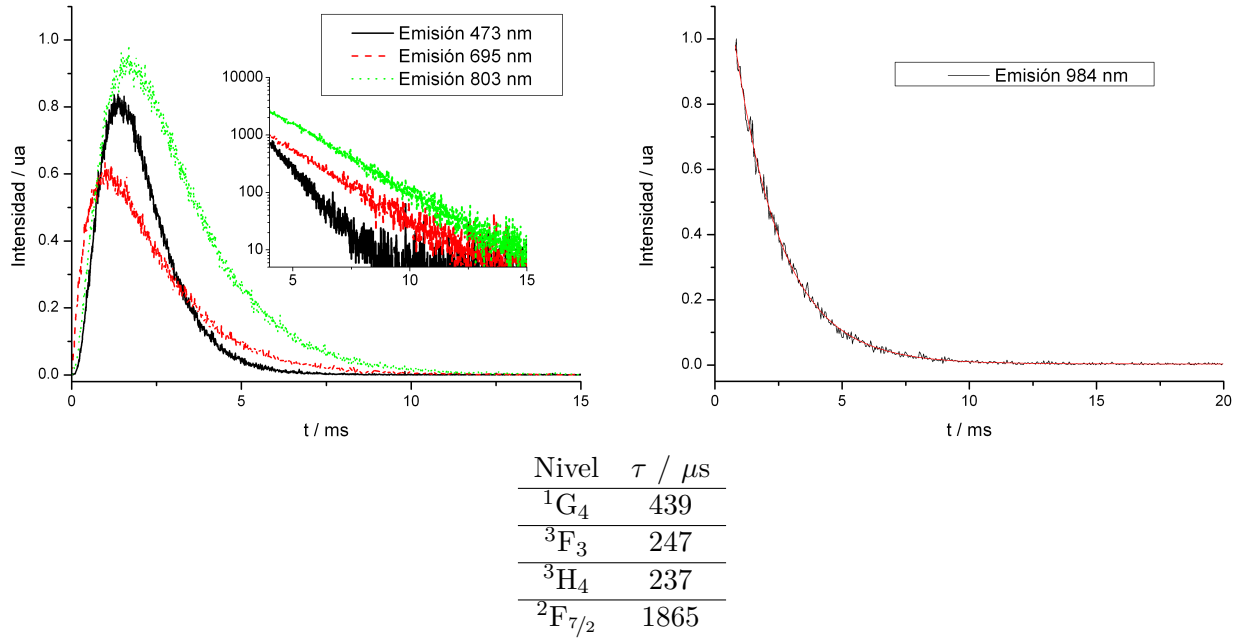


Figura 3.13: **Izquierda:** variación temporal de la intensidad de la luminiscencia después de un pulso láser para tres niveles electrónicos del Tm^{3+} : $^1\text{G}_4$ (473 nm), $^3\text{F}_3$ (695 nm) y $^3\text{H}_4$ (803 nm). **Derecha:** medida para el estado $^2\text{F}_{7/2}$ del Yb^{3+} . **Debajo:** tiempo de vida τ de cada nivel electrónico.

3.3. Biocompatibilidad, asimilación celular y microscopía confocal

Las células incubadas con las nanopartículas tanto de Yb/Er como de Yb/Tm no muestran cambios morfológicos asociados con la muerte celular, por ejemplo la condensación del ADN y la rotura nuclear, respecto a los controles al cabo de 24 horas. A pesar de que este tipo de célula tiene una limitada capacidad de fagocitosis, se ha observado que las células han incorporado las nanopartículas, las cuales se encuentran habitualmente agrupadas en el interior de vacuolas, Fig. 3.14. Esto sugiere que este material no es tóxico y que es reconocido y fagocitado por las células. Otros estudios realizados durante más tiempo tampoco muestran un aumento de la muerte celular debida a las nanopartículas de este tipo de materiales para concentraciones de hasta 5mg/mL [7].

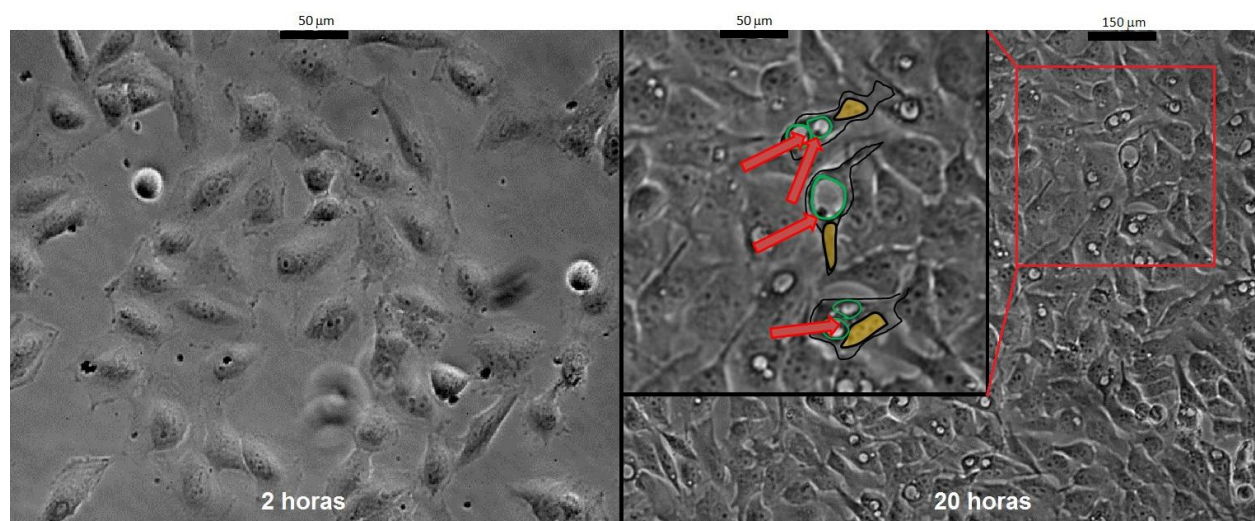


Figura 3.14: **Izquierda:** Micrografía de células HeLa incubadas durante 2 horas con nanopartículas de NaYF_4 . **Derecha:** Micrografía tras 20 horas de incubación y ampliación de la zona marcada en rojo. Ampliación: acumulación de nanopartículas visibles (flechas rojas) dentro de las células en grandes vacuolas (en verde se marca el borde de las membranas de las vacuolas). Los perímetro de algunas células se han marcado en negro.

En el futuro se realizarán estudios de videomicroscopía (*time-lapse*) con célula viva para determinar el método de entrada en las células, así como estudiar su interferencia con los procesos celulares básicos y toxicidad.

Debido al uso de un láser externo para excitar las NP no ha sido posible tomar micrografías confocales de las nanopartículas, además de que su tamaño está por debajo de la resolución óptica del microscopio ($500 \times 200 \text{ nm}$). Por ello se ha estudiado las partículas más grandes, debidas a la agrupación de muchas nanopartículas en vesículas celulares.

Microscopía confocal

Se ha tomado varias micrografías de células HeLa, Fig. 3.15. Se ha observado nanopartículas con emisión verde situadas dentro de las células, cuyos núcleos han sido marcados de color azul y su actina de rojo. En a) se muestra la proyección sobre los ejes X e Y, que demuestra que la partícula esta dentro de la célula. En b) se muestra una ampliación de a), donde se observa que hay otra pequeña partícula en el interior. En c) se puede comprobar que las partículas han sido ingeridas por muchas células, y en ocasiones se observa varias nanopartículas por célula. En d) y e) se compara la misma célula con y sin la emisión del $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$, Er. Se puede observar el hueco en la actina (en rojo) que rodea a la nanopartícula. La actina recubre la NP desde el momento que esta entra a la célula. El mecanismo de entrada es probablemente endocitosis mediada por un receptor. Este receptor “confunde” a la NP con otra molécula que la célula reconoce y permite que la NP entre en la célula dentro de una vacuola. Después, las paredes de la vacuola desaparecen, dejando a la NP en el interior de la célula.

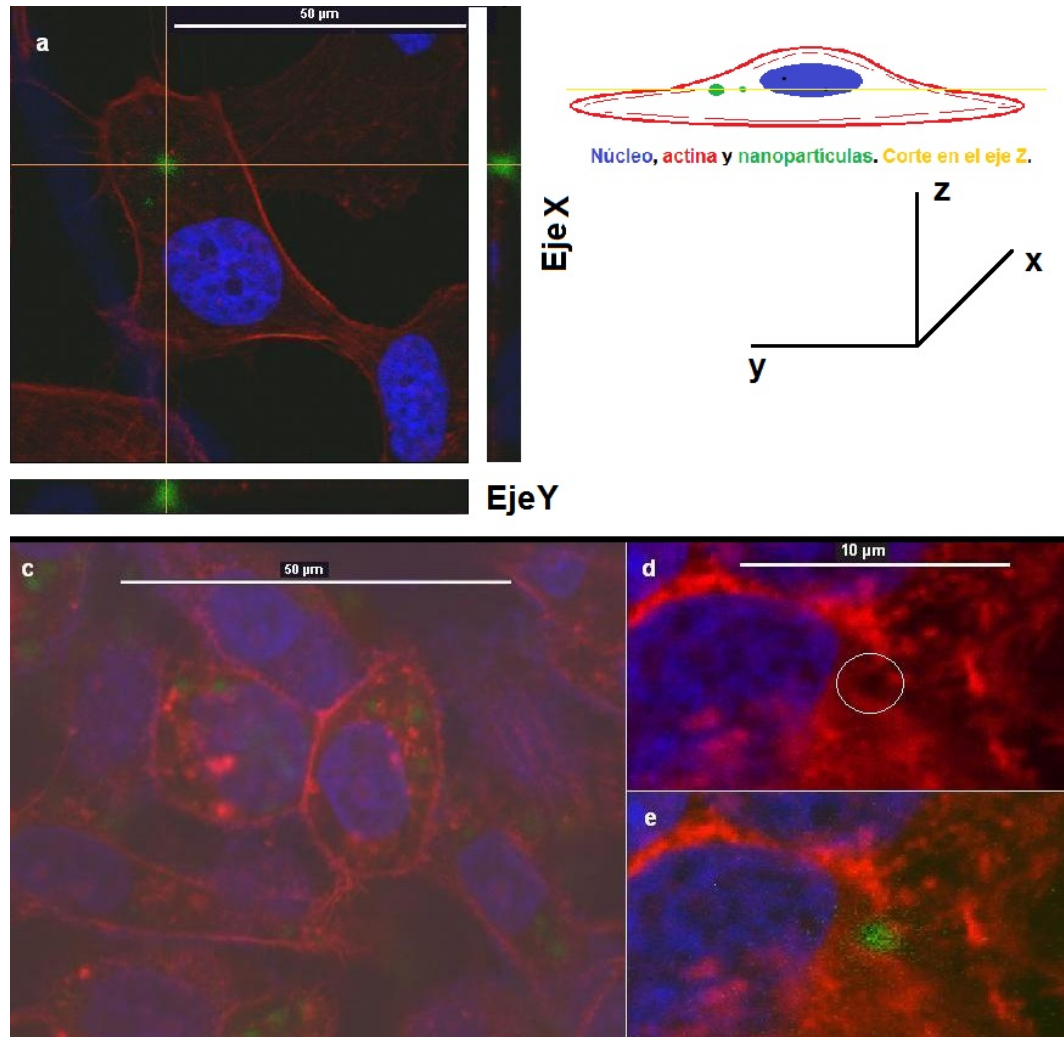


Figura 3.15: Micrografía confocal de células HeLa con nanopartículas en su interior. En azul el ADN, en verde las nanopartículas de NaYF_4 y en rojo la actina. **a)** Célula con dos NP en su interior y proyección sobre los ejes X e Y de una de ellas. **b)** Dibujo esquemático de una célula mostrando un corte en el eje Z similar al de a). **c)** Varias células con NP en su interior. **d)** y **e)** Hueco dejado en la actina por la NP.

Capítulo 4

Conclusiones

Las conclusiones más relevantes alcanzadas en este trabajo son las siguientes:

- Se ha reducido el tamaño de los micro-cristales de NaYF_4 impurificados con $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ y $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ desde los 2-5 μm hasta los 50 nm aproximadamente empleando el molino planetario. La información obtenida de los rayos X permite comprobar que se mantiene la fase hexagonal y no hay trazas de la fase cúbica del material.
- Se ha determinado la energía máxima de los fonones de la red $\nu_{max.} \approx 500 \text{ cm}^{-1}$ mediante el espectro Raman en *bulk* y en nanopartícula.
- Los picos presentes en los espectros de absorción, emisión y excitación se han asignado de acuerdo con el diagrama de Dieke. Se ha comprobado que los iones no se ven afectados significativamente por el campo cristalino de la red y por ello sus espectros ópticos presentan líneas relativamente finas (del orden de 10 cm^{-1}).
- Se ha determinado, por primera vez para este material, el desdoblamiento debido al campo cristalino en los dos multipletes del Yb^{3+} , $^2\text{F}_{7/2}$ y $^2\text{F}_{5/2}$, que es de $\Delta E_f = 224 \text{ cm}^{-1}$ para el fundamental y $\Delta E_e = 74 \text{ cm}^{-1}$ para el estado excitado.
- Se ha observado el proceso de upconversion al excitar las muestras con radiación 980 nm, tanto en bulk como en nanopartícula. Para las muestras con Tm^{3+} , la emisión más intensa se produce en torno a $\lambda = 800 \text{ nm}$. Se ha obtenido experimentalmente el número de fotones necesario para lograr una emisión mediante upconversion y se ha propuesto un mecanismo para cada emisión que permite explicar las medidas a diferente temperatura, potencia y concentración.
- La eficiencia de upconversion disminuye al pasar del bulk a nanopartículas.
- Se ha incubado varios cultivos de células HeLa con nanopartículas impurificadas con $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ y $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$. Al cabo de 24h no se ha hallado muestras obvias de toxicidad que provocaran la muerte celular. Se ha detectado de forma concluyente nanopartículas de $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ en el interior de numerosas células y se ha observado la capa de actina que las recubre.

Capítulo 5

Bibliografía

- [1] C. Adami, C. Ofria, and T. C. Collier. Evolution of biological complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97 (9):4463 – 8, 2000.
- [2] C. Furusawa and K. Kaneko. Origin of Complexity in Multicellular Organisms. *Phys. Rev. Lett.*, 84:6130 – 6133, 2000.
- [3] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, et al. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 4th edition, 2002.
- [4] R. Y. Tsien and A. Waggoner. *Fluorophores for confocal microscopy. Handbook of biological confocal microscopy*. New York: Plenum Press, 1995.
- [5] F. Auzel. Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids. *Chem. Rev.*, 104:139 – 173, 2004.
- [6] R. S. Niedbala, H. Feindt, K. Kardos, T. Vail, J. Burton, B. Bielska, S. Li, D. Milunic, P. Bourdelle, and R. Vallejo. Detection of Analytes by Immunoassay Using Up-Converting Phosphor Technology. *Anal. Biochem.*, 293:22 – 30, 2001.
- [7] J-C. Zhou, Z-L. Yang, W. Dong, R-J. Tang, L-D. Sun, and C-H. Yan. Bioimaging and toxicity assessments of near-infrared upconversion luminescent $\text{NaYF}_4\text{:Yb,Tm}$ nanocrystals. *Biomaterials*, 32:9059 – 9067, 2011.
- [8] M. Nyk, R. Kumar, T.Y. Ohulchanskyy, E.J. Bergey, and P.N. Prasad. High contrast in vitro and in vivo Photoluminescence bioimaging using Near Infrared to Near Infrared Up-Conversion in Tm^{3+} , Yb^{3+} doped Fluoride Nanophosphors. *Nano Lett.*, 8 (11):3834–3838, 2008.
- [9] S. Heer, K. Kömpe, H. U. Güdel, and M. Haase. Highly Efficient Multicolour Upconversion Emission in Transparent Colloids of Lanthanide-Doped NaYF_4 Nanocrystals. *Adv. Mater.*, 16:2102, 2004.

- [10] J. García Solé, L. E. Bausá, and D. Jaque. *An Introduction to the Optical Spectroscopy of Inorganic Solids*. John Wiley & Sons, 2005.
- [11] B. Henderson and G. F. Imbusch. *Optical Spectroscopy of Inorganic Solids*. Clarendon press, Oxford, 1989.
- [12] G. F. Imbusch and R. Kopelman. Topics in Applied Physics: Optical Spectroscopy of Electronic Centers in Solids. *Laser spectroscopy of solids*, 49:1–37, 1986.
- [13] A. Bednarkiewicz, D. Wawrzynczyk, M. Nyk, and W. Strek. Synthesis and spectral properties of colloidal Nd^{3+} doped NaYF_4 nanocrystals. *Opt. Mater.*, 33(10):1481 – 1486, 2011.
- [14] A. J. Freeman and R. E. Watson. Theoretical Investigation of Some Magnetic and Spectroscopic Properties of Rare-Earth Ions. *Phys. Rev.*, 127:2058–2075, 1962.
- [15] V.N. Makhov. VUV spectroscopy of rare earth ions in solids: recent studies and possible applications, 2008.
- [16] P. W. Atkins. *Molecular quantum mechanics*. Oxford University Press, 1983.
- [17] G. H. Dieke and H. M. Crosswhite. The Spectra of the Doubly and Triply Ionized Rare Earths. *Applied Optics*, 2 (7):675–686, 1963.
- [18] C. Renero-Lecuna, R. Martín-Rodríguez, R. Valiente, J. González, F. Rodríguez, K. W. Krämer, and H. U. Güdel. Origin of the High Upconversion Green Luminescence Efficiency in $\beta\text{-NaYF}_4\text{:2 \%Er}^{3+}, 20 \% \text{Yb}^{3+}$. *Chem. Mater.*, 23:3442–3448, 2001.
- [19] Brian G. Wybourne. The fascination of the rare earths - then, now and in the future. *Journal of Alloys and Compounds*, 380:96 – 100, 2004.
- [20] D. R. Gamelin and H. U. Güdel. *Upconversion Processes in Transition Metal and Rare Earth Metal Systems*. Springer-Verlag, Berlin, 2001.
- [21] M. Pollnau, D. R. Gamelin, S. R. Lüthi, and H. U. Güdel. Power dependence of upconversion luminescence in lanthanide and transition-metal-ion systems. *Phys. Rev. B*, 61:3337, 2000.
- [22] R. E. Thoma. Phase Equilibria in the System Sodium Fluoride-Yttrium Fluoride. *Inorg. Chem.*, 2:1005, 1963.
- [23] J. F. Suyver, J. Grimm, M. K. van Veen, D. Biner, K. W. Krämer, and H. U. Güdel. Upconversion spectroscopy and properties of NaYF_4 doped with Er^{3+} , Tm^{3+} and/or Yb^{3+} . *J. Lumin.*, 117:1 – 12, 2006.
- [24] Can T. Xu, Pontus Svenmarker, Haichun Liu, Xia Wu, Maria E. Messing, L. Reine Wallenberg, and Stefan Andersson-Engels. High-Resolution Fluorescence Diffuse Optical Tomography Developed with Nonlinear Upconverting Nanoparticles. *ACS Nano*, 6:4788–4795, 2012.

- [25] Guicheng Jiang, Jothirmayanantham Pichaandi, Noah J. J. Johnson, Robert D. Burke, and Frank C. J. M. van Veggel. An Effective Polymer Cross-Linking Strategy To Obtain Stable Dispersions of Upconverting NaYF₄ Nanoparticles in Buffers and Biological Growth Media for Biolabeling Applications. *Langmuir*, 28:3239–3247, 2012.
- [26] ATCC LGC Standards. LGC: Advanced Catalogue Search, ATTC CCL-2, <http://lgcstandards-atcc.org/Default.aspx?base> , accedido el 15/09/2012.
- [27] Applied Sensor Group of the Institute of Analytical Chemistry at the Graz University of Technology in Austria. Database of Fluorescent Dyes and Applications, <http://www.fluorophores.tugraz.at/> , accedido el 2/04/2012.
- [28] Wikipedia. Arteries absorption y Effective penetration depth. <http://en.wikipedia.org/wiki/>, 2012. Accedido el 2/04/2012.
- [29] Sen Liang, Yi Liu, Yue Tang, Yue Xie, Haizhu Sun, Hao Zhang, and Bai Yang. A User-Friendly Method for Synthesizing High-Quality NaYF₄:Yb,Er(Tm) Nanocrystals in Liquid Paraffin. *J. Nanomater.*, 2011:7, 2011.
- [30] Jinfeng Lu, Qiwu Zhang, and Fumio Saito. Mechanochemical Synthesis of Nano-sized Complex Fluorides from Pair of Different Constituent Fluoride Compounds. *Chem. Lett.*, 31:1176–1177, 2002.
- [31] N. Martin, P. Boutinaud, R. Mahiou, J. C. Cousseins, and M. Bouderbala. Preparation of fluorides at 80 °C in the NaF-(Y, Yb, Pr)F₃ system. *J. Mater. Chem.*, 9:124, 1999.
- [32] Rosa Martín-Rodríguez. *Síntesis, caracterización estructural y estudio espectroscópico de materiales nanocristalinos y microcristalinos*. PhD thesis, Departamento de Física Aplicada, Universidad de Cantabria, 2011.
- [33] M. Fox. *Optical Properties of Solids*. Oxford University Press, 2001.
- [34] Marta Quintanilla Morales. *Caracterización espectroscópica y aplicaciones de la conversión infrarrojo-visible en LiNbO₃ y YF₃ activados con iones Tm³⁺ y Er³⁺*. PhD thesis, Departamento de física de materiales, Universidad Autónoma de Madrid, 2010.
- [35] F. Auzel. A relationship for crystal field strength along the lanthanide series; application to the prediction of the maximum splitting. *Optical Materials (2002)*, 19:89 – 94, 2002.