



CENTRO DE INVESTIGACIONES  
EN OPTICA, A.C.

# “CLÚSTERES LUMINISCENTES DE PLATA CONFINADOS EN ZEOLITAS PARA BIOSENSADO ”



Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias (Óptica)

*Presenta: Cecilia García Guzmán*

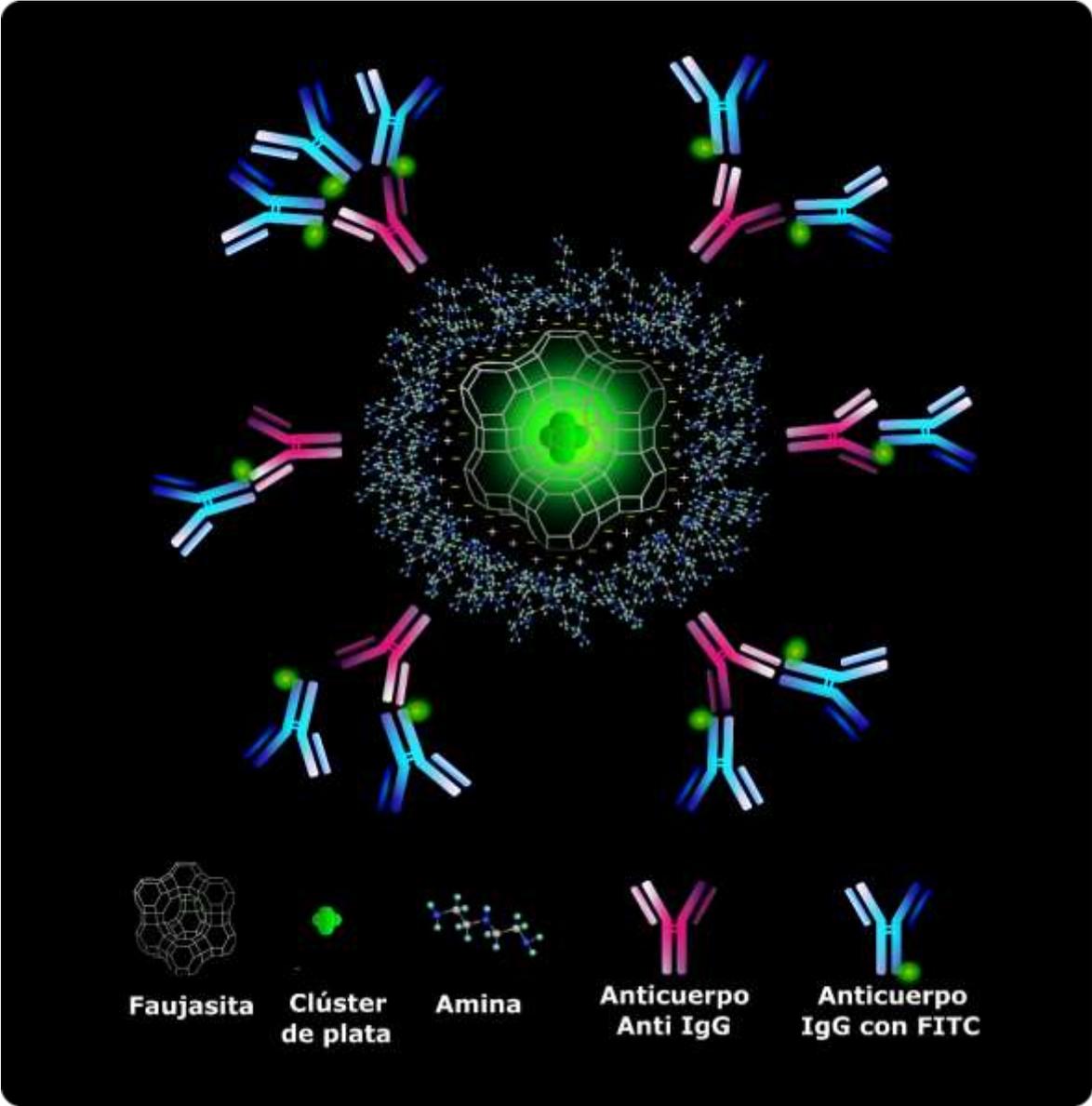
*Director de Tesis: Dr. Eden Morales Narváez*

*Versión final*

*(Incluye cambios sugeridos por los revisores)*

*León · Guanajuato · México*

*Octubre de 2021*



## AGRADECIMIENTOS

---

A Dios y a mi familia por todo el cariño y apoyo brindado.

A Carlos Ángel por hacerme feliz.

A Miguel Ángel H. por su apoyo, tiempo y cariño.

A mis compañeros de generación y de laboratorio, así como a mis amigos, por hacer amenos mis días en el CIO.

Al Conacyt por la beca otorgada durante estos 2 años.

Al CIO y a sus profesores, por su acogimiento y por el valioso conocimiento adquirido durante estos dos años de maestría.

A los laboratorios Biophotonic nanosensors y Nanophotonic and Functional Materials del Centro de Investigaciones en Óptica (CIO) por permitirme realizar este trabajo. A los Doctores Eden Morales Narváez y Eduardo de Jesús Coutiño González por dirigirme a lo largo de este trabajo.

Al doctor Gabriel Ramos, por su valiosa aportación en la revisión de este trabajo

Al laboratorio de Microscopía Electrónica y al Laboratorio de Caracterización de Materiales, así como a María Christian Albor, por permitirme realizar la caracterización de mis materiales.

# ÍNDICE

---

## CONTENIDO

---

<b>Agradecimientos .....</b>	<b>2</b>
<b>Índice .....</b>	<b>3</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>5</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>7</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>8</b>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>9</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>9</b>
<b>1 Marco teórico.....</b>	<b>10</b>
1.1 Fenómeno de emisión.....	11
1.2 Plantillas estabilizadoras .....	12
1.2.1 Tioles, péptidos y proteínas .....	12
1.2.2 Ácido desoxirribonucleico .....	13
1.2.3 Zeolitas .....	14
1.3 Aplicaciones de los clústeres como biosensores .....	15
1.3.1 Métodos de detección .....	15
1.3.2 Detección de metales y otras sustancias .....	19
1.3.3 Clústeres para inmunoensayos .....	21
1.4 Bioconjugación de nanopartículas .....	22
1.5 Funcionalización de zeolitas con grupos amino .....	24
1.5.1 Grafting o silanización .....	25
1.5.2 Impregnación húmeda .....	26
<b>2 Metodología.....</b>	<b>28</b>
2.1 Materiales .....	28
2.2 Reactivos .....	28
2.3 Equipos utilizados.....	28
2.4 Equipos para caracterización .....	28
2.5 Molienda de zeolitas .....	29
2.6 Síntesis de clústeres de plata .....	29

2.7	Funcionalización: Impregnación con aminas .....	31
2.8	Bioconjugación con anticuerpos anti IgG.....	33
2.9	Detección del analito: anticuerpo IgG marcado con FITC.....	34
2.9.1	Corroboración de la unión de IgG-FITC a la sonda de biosensado.....	34
2.9.2	Evaluación de la sonda de biosensado.....	35
<b>3</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>36</b>
3.1	Molienda de zeolitas .....	36
3.2	Formación de clústeres luminiscentes de plata.....	39
3.3	Funcionalización: Impregnación con aminas .....	42
3.4	Bioconjugación con anticuerpos anti IgG humano .....	54
3.5	Detección de anticuerpos IgG marcados con FITC (analito) .....	58
<b>4</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>trabajo a futuro .....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>perspectivas .....</b>	<b>69</b>
	<b>Referencias .....</b>	<b>70</b>

## RESUMEN

---

En este trabajo se propone un sistema de biosensado basado en la detección de anticuerpos IgG marcados con fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) mediante emisión de clústeres de plata sintetizados dentro de zeolitas (FAUX Ag<sub>6</sub>) impregnadas con diferentes aminas: polietilenimina (PEI) ramificada de 2 longitudes de cadena diferentes (Mw 750,000 y Mw 25,000), tetraetilenepentamina (TEPA) y dietilenetriamina (DETA). Se caracterizaron y compararon las muestras impregnadas con las diversas aminas utilizadas, observándose un corrimiento en la longitud de onda de emisión hacia longitudes de onda menores al impregnar las aminas. Posteriormente, se llevó a cabo la bioconjugación de estas partículas con anticuerpos anti IgG, obteniéndose un corrimiento en la emisión hacia longitudes de onda mayores. Finalmente se evaluó la detección de anticuerpos IgG-FITC en concentraciones menores a 10 ng/mL utilizando estas zeolitas luminiscentes como sonda de biosensado mediante dos mecanismos de detección: incremento en la intensidad de emisión con FAUX Ag<sub>6</sub> sin aminas y con PEI ramificado de Mw 750,000 y apagamiento de la emisión con DETA y TEPA, mientras que para PEI ramificado de Mw 25,000 no se observó ningún comportamiento asociado a la concentración del analito detectado. Demostrando así, como prueba de concepto, un sistema de biosensado innovador, sensible y específico que permite la detección del analito en pocos minutos.

## ABSTRACT

---

In this work we propose a biosensing system based on the detection of IgG antibodies labeled with fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) by emission of silver clusters synthesized within zeolites (FAUX Ag<sub>6</sub>) impregnated with different amines: branched polyethyleneimine (PEI) of 2 chain lengths (Mw 750,000 and Mw 25,000), tetraethylenepentamine (TEPA) and diethylenetriamine (DETA). Samples impregnated with amines were characterized and compared, obtaining a blue emission shift when the amines were impregnated. Subsequently, the bioconjugation of the particles with anti-IgG antibodies was carried out, obtaining a red emission shift. Finally, detection of IgG-FITC antibodies in concentrations lower than 10 ng/mL was evaluated using these luminescent zeolites as biosensing probe using two mechanisms: increase in emission intensity with FAUX Ag<sub>6</sub> without amines and with

branched PEI of Mw 750,000; and emission quenching with DETA and TEPA, while for branched PEI of Mw 25,000 no behavior was observed associated with the concentration of the analyte detected. Thus demonstrating, as proof of concept, an innovative, sensitive and specific biosensing system that allows detection in few minutes.

## INTRODUCCIÓN

---

El presente trabajo fue realizado en conjunto en los laboratorios Biophotonic nanosensors y Nanophotonic and Functional materials del Centro de Investigaciones en Óptica (CIO), bajo la dirección de los doctores Eden Morales Narváez y Eduardo de Jesús Coutiño Gonzalez.

En la actualidad es de suma importancia mejorar los sistemas de detección de sustancias de relevancia clínica posibilitando la detección de cantidades en el orden de los ng/mL o menores para así poder diagnosticar a tiempo alguna enfermedad presente y tratarla.

Las principales condiciones que debe cumplir una partícula para poder ser utilizada como sonda de biosensado son: biocompatibilidad, nula o baja toxicidad, especificidad y respuesta al analito a detectar, ya sea electroquímica, óptica, entre otras.

Los clústeres metálicos son un tipo de estructuras sub-nanométricas que presentan niveles energéticos discretos capaces de emitir en el espectro visible al ser excitados con luz ultravioleta, siendo posible sintonizar la longitud de onda de emisión de diversas maneras, como variaciones en la estructura de la platilla estabilizadora utilizada. Es por esto, además de sus propiedades ópticas prometedoras, como eficiencias cuánticas mayores a 90%,<sup>1</sup> tiempos de decaimiento de nano y microsegundos<sup>2</sup> y corrimientos de Stokes de más de 100 nm que han sido utilizados para diversas aplicaciones como biosensado, LEDs, entre otras<sup>3</sup>.

En el campo del biosensado recientemente se han utilizado clústeres luminiscentes sintetizados en diversas plantillas estabilizadoras, principalmente orgánicas, como ADN<sup>4</sup> y proteínas,<sup>5</sup> permitiendo la detección de sustancias de importancia clínica como metales,<sup>6</sup> glucosa y colesterol,<sup>7</sup> entre otros, no siendo así para los clústeres luminiscentes sintetizados dentro de zeolitas, los cuales no han sido explorados en este campo.

Es por esto, que en este trabajo se propone el uso de clústeres luminiscentes de plata sintetizados dentro de zeolitas funcionalizadas para la detección de anticuerpos anti IgG marcados con FITC.

Primeramente, se presenta un breve resumen acerca de los clústeres luminiscentes, sus propiedades fisicoquímicas, las plantillas en las cuales han sido sintetizados y sus aplicaciones en el campo de la biodetección.

Posteriormente, se propone una metodología para la funcionalización con aminas, mediante impregnación húmeda, su bioconjugación con anticuerpos a través de atracciones electrostáticas, así como la evaluación de este material como sonda de biosensado en la detección de IgG-FITC.

Más adelante se muestran los resultados obtenidos de la caracterización realizada tanto a las partículas funcionalizadas con aminas, como a las partículas bioconjugadas con anticuerpos, haciendo una breve discusión de estos. Así mismo se presentan y discuten los resultados de la evaluación de la sonda de biosensado para la detección del analito antes mencionado.

Por último, se presentan las conclusiones del trabajo y las expectativas para trabajos futuros.

## JUSTIFICACIÓN

---

Recientemente se han desarrollado trabajos de investigación en los que se utilizan clústeres luminiscentes sintetizados en plantillas orgánicas como proteínas y ácido desoxirribonucleico para biodetección.<sup>8</sup> Sin embargo, estas platillas orgánicas no son estables en el medio ambiente a través del tiempo. Es por esto, que es necesario utilizar clústeres luminiscentes dentro de plantillas que aporten estabilidad al sistema, además de ser biocompatibles, tales como las zeolitas.<sup>9</sup>

Los clústeres de plata sintetizados dentro de las zeolitas por si solos no son específicos para biodetección, es por ello, que es necesario desarrollar una metodología para su bioconjugación, proponiéndose en este caso funcionalizar primeramente las partículas con aminas y posteriormente añadir los anticuerpos.

El método de impregnación húmeda para la unión de aminas a la superficie de zeolitas ha sido muy utilizado para captación de CO<sub>2</sub>,<sup>10</sup> obteniéndose muy buenos resultados de la incorporación de las

aminas al sistema, sin embargo, hasta el momento no han habido reportes de su uso para biofuncionalización, por lo que se propone el uso de este como método innovador, rápido y eficiente de funcionalización de zeolitas con clústeres luminiscentes para biosensado.

## HIPÓTESIS

---

Debido a la gran luminiscencia y estabilidad que presentan los clústeres luminiscentes de plata sintetizados dentro de zeolitas, se cree que es posible utilizar estos materiales para la biodetección en sistema coloidal.

Funcionalizando con aminas la superficie de la zeolita en la cual se encuentran los clústeres luminiscentes, se espera facilitar la unión de anticuerpos a la superficie de la zeolita y formar así una sonda de biosensado.

Se espera que en el momento en que esta sonda de biosensado, en sistema coloidal, detecte la unión del antígeno (anticuerpos IgG-FITC) se provoque un cambio en la emisión de dichos clústeres, ya sea corrimiento en la longitud de onda, incremento o disminución de la intensidad de emisión.

## OBJETIVOS

---

- Funcionalizar, bioconjuguar y caracterizar clústeres luminiscentes de plata sintetizados dentro de zeolitas.
- Demostrar la detección de anticuerpos IgG marcados con FITC utilizando el material propuesto como sonda de biosensado.

# 1 MARCO TEÓRICO

---

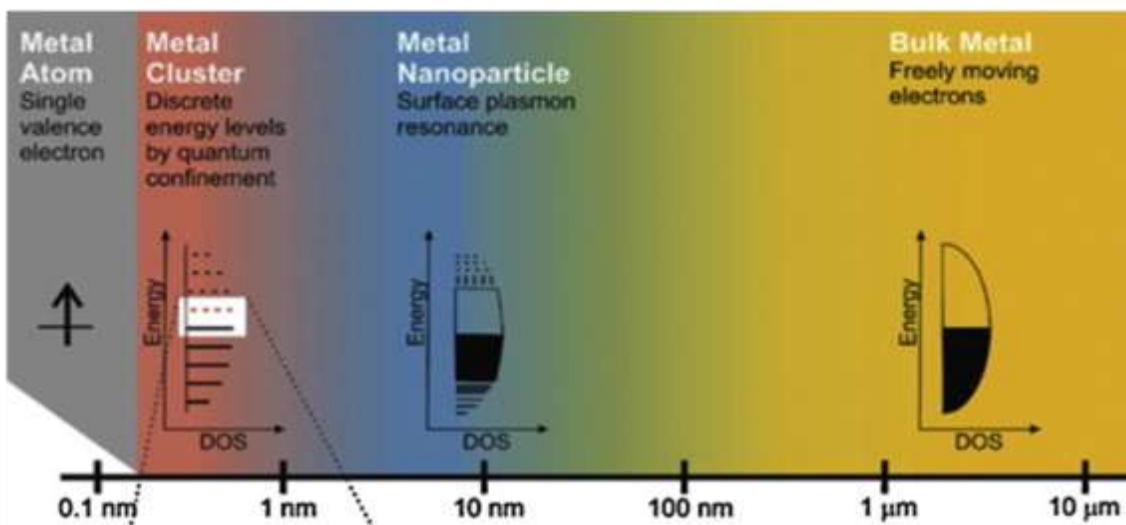
Los clústeres metálicos son partículas sub-nanométricas compuestas por un pequeño número de átomos metálicos como oro, plata, cobre, paladio o platino con un tamaño menor a 2 nm;<sup>11</sup> o en algunos casos por la combinación de dos de estos metales <sup>12,13</sup> confinados en una estructura cristalina que le confieren propiedades físicoquímicas específicas.<sup>14</sup>

Los metales en bulto presentan ciertas características como conducción eléctrica y térmica debido a la cercanía de sus bandas de conducción y de valencia y a la falta de la banda prohibida entre ellas. Por otra parte, las nanopartículas metálicas presentan scattering y propiedades térmicas diferentes a los metales en bulto debido a su resonancia de plasmón superficial.<sup>15</sup> Sin embargo, al reducir aún más el tamaño de la partícula hasta unos cuantos átomos, los niveles electrónicos se separan tanto, que se asemejan a los de las moléculas, observándose un incremento en la energía de la banda prohibida (**Figura 1a**), lo que provee a los clústeres de propiedades electrónicas y ópticas interesantes <sup>16,17</sup> que nos permiten usarlos en algunas aplicaciones como, por ejemplo en sustratos SERS, LEDs, imagenología, sensores de metales, de humedad y otras sustancias como nitrofenol,<sup>18</sup> para FRET,<sup>19,20</sup> e incluso para hidrogenación catalítica de algunos compuestos orgánicos.<sup>21</sup>

El ordenamiento de los átomos metálicos que conforman el clúster cambiará dependiendo de la cantidad de átomos metálicos que forman los clústeres, variando desde estructuras planas con bajo contenido de átomos metálicos, hasta estructuras más complicadas para partículas con alto contenido de átomos metálicos (**Figura 1b**).<sup>22,23,24</sup>

El uso de este tipo de clústeres es principalmente debido a sus propiedades ópticas, ya que presentan absorción en el rango del UV-visible y emisión intensa en el visible.<sup>11</sup>

a)



b)

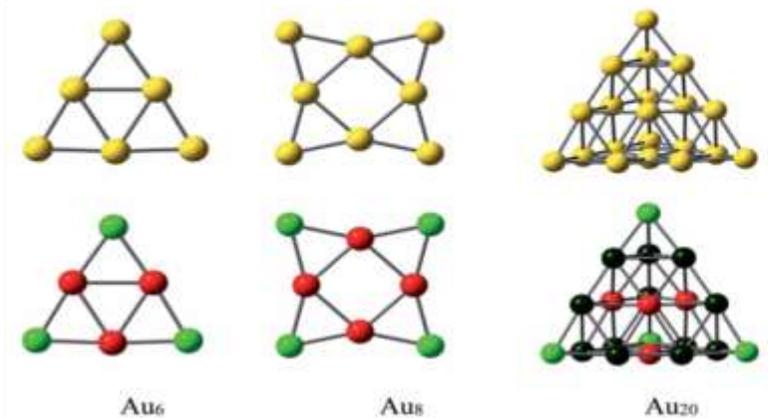


Figura 1.1 a) Band gap de metales en bulto, nanopartículas y clústeres metálicos, b) estructuras de clústeres metálicos. Reproducido con permiso de [25], 2014, Elsevier y [26], 2021, The Royal Society of Chemistry.

## 1.1 FENÓMENO DE EMISIÓN

Para generar emisión, ya sea fluorescencia o fosforescencia, es necesario que un electrón obtenga la energía necesaria para pasar del estado singulete basal ( $S_0$ ) al estado singulete excitado ( $S_1$ ) manteniendo su espín y posteriormente decaiga al estado singulete basal emitiendo un fotón (fluorescencia) o que, gracias a un cruce de intersistemas y un cambio de espín, sea promovido a un

estado triplete ( $T_1$ ), desde el cual, regrese al estado  $S_1$  con su espín original y de ahí al estado singulete basal ( $S_0$ ), emitiendo un fotón (fluorescencia retardada); o bien, que del estado triplete ( $T_1$ ) decaiga directamente al estado singulete basal ( $S_0$ ) regresando a su espín original, emitiendo un fotón (fosforescencia) como se muestra en el diagrama de Jablonski de la **Figura 1.2**.<sup>27</sup> El paso de un estado singulete a un estado triplete y viceversa es conocido como un cruce de intersistemas y es más probable cuando los niveles vibracionales de estos dos estados excitados tienen valores de energía cercanos. El tiempo de decaimiento de una partícula fosforescente es mucho mayor ( $\geq 10^{-6}$  s) que el tiempo de decaimiento de una partícula fluorescente ( $\leq 10^{-9}$  s).

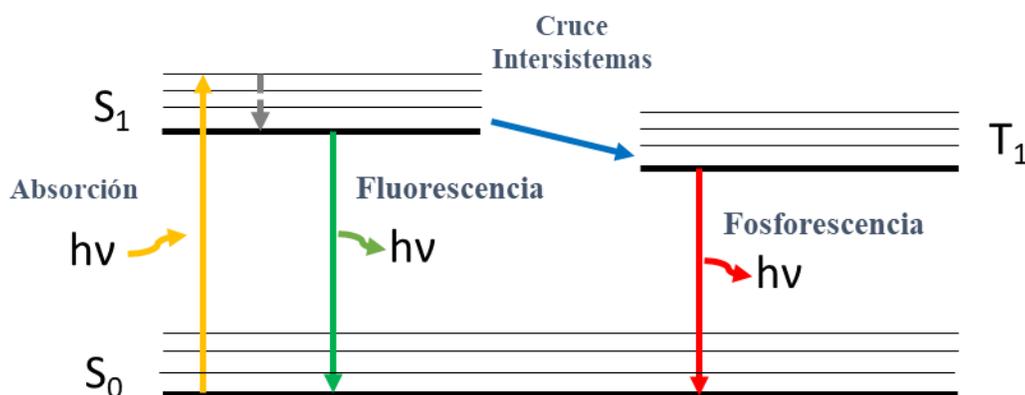


Figura 1.2 Diagrama de Jablonski.

## 1.2 PLANTILLAS ESTABILIZADORAS

Debido a la aglomeración de los clústeres metálicos desnudos, lo cual provoca un apagamiento en su emisión y la subsecuente formación de nanopartículas metálicas, ha sido necesario utilizar diversas platillas para encapsular o cubrir estas especies subnanométricas, ya sea orgánicas, como péptidos,<sup>12</sup> DNA y tioles, o inorgánicas como polímeros o zeolitas<sup>28</sup>, disminuyendo así la agregación de estos clústeres y mejorando sus propiedades ópticas.

### 1.2.1 Tioles, péptidos y proteínas

Los péptidos tienen grupos funcionales como tioles, aminos y carboxilos que proporcionan una gran estabilidad a los clústeres debido a su enlace covalente. El péptido más utilizado es el glutatión, que es un tripéptido constituido por glutamato, cisteína y glicina y que se utiliza de forma habitual por su grupo funcional tiol libre.<sup>29,30</sup> También se han utilizado otros tioles, como el 1,3-propaneditiol,<sup>30</sup> la cisteamina<sup>31</sup> y el tiol- $\beta$ -ciclodextrina como plantilla y agente reductor para la formación de clústeres de Au.<sup>18</sup>

Recientemente, algunos grupos han investigado el uso de nuevas plantillas, como por ejemplo, el uso de la albúmina de suero, una proteína plasmática, como plantilla para nanoclústeres de oro-plata con emisión en 650 nm;<sup>32</sup> la cisteamina,<sup>31</sup> que permiten interactuar de forma específica con el analito; o proteínas como la hemoglobina como fuente de hierro y agente protector de los clústeres de cobre.<sup>33</sup>

La mayoría de los clústeres metálicos sintetizados en péptidos, tanto los de oro, como los de plata, presentan una emisión roja. Sin embargo, es posible sintonizar la emisión de los clústeres en las plantillas de péptidos desde la región azul a la roja cambiando el tamaño del clúster mediante el uso de diferentes condiciones de reacción.<sup>5</sup> Los rendimientos cuánticos de los clústeres sintetizados dentro de péptidos son muy bajos, 1.53% para los clústeres de Au con emisión roja y 6.47% para los clústeres de Ag/Au.<sup>12</sup>

Recientemente se ha reportado síntesis de clústeres metálicos utilizando anticuerpos como plantillas estabilizadoras con propiedades (foto)catalíticas y de fotocatalisis.<sup>34</sup>

### 1.2.2 Ácido desoxirribonucleico

El ácido desoxirribonucleico, conocido como ADN, es un ácido nucleico presente en todos los organismos vivos. La síntesis de clústeres metálicos dentro de plantillas de ADN es muy utilizada para bioaplicaciones debido a su biocompatibilidad.

Trabajos recientes han demostrado que la formación de los clústeres de plata dentro de las hebras de ADN se encuentra directamente relacionada con la secuencia de nucleótidos que conformen la hebra de ADN, ya que los clústeres interactúan sólo con algunos sitios específicos de las hebras de

ADN.<sup>23,35,36</sup> Uno de los sitios preferenciales para la unión de los clústeres metálicos son los sitios ricos en citosinas, donde el átomo de plata interactúa con el N<sub>3</sub> del anillo de pirimidina de cada citosina.<sup>23,37</sup> Por otro lado, en los sitios de timidina, al igual que en los sitios abásicos, no hay unión de iones plata, pero favorecen el plegamiento del ADN cuando los clústeres están presentes dentro de la estructura del ADN. Mientras tanto, los sitios de adenina y guanina cercanos a los sitios ricos en citosina ayudan a incrementar la emisión debido a la transferencia de electrones entre los clústeres y las nucleobases.<sup>23,35,38</sup>

El rendimiento cuántico de fluorescencia reportado para los clústeres encapsulados en la plantilla de ADN está fuertemente relacionado con la secuencia de ADN, obteniendo rendimientos cuánticos de hasta el 93% para los clústeres de Ag<sub>14</sub> con emisión en 630 nm.<sup>1,3</sup> Del mismo modo, la emisión puede ser sintonizable desde la región visible hasta el infrarrojo cercano, variando el número de átomos de clústeres metálicos, siendo que a un número específico de átomos de clústeres metálicos corresponde una longitud de onda específica.<sup>22,39,40</sup>

A pesar de las ventajas del uso del ADN como plantilla de clústeres en biosensores, es bien sabido que el ADN no es muy estable en determinadas condiciones o durante periodos superiores a un mes,<sup>41</sup> por lo que, para algunas aplicaciones es preferible utilizar otra plantilla más estable.

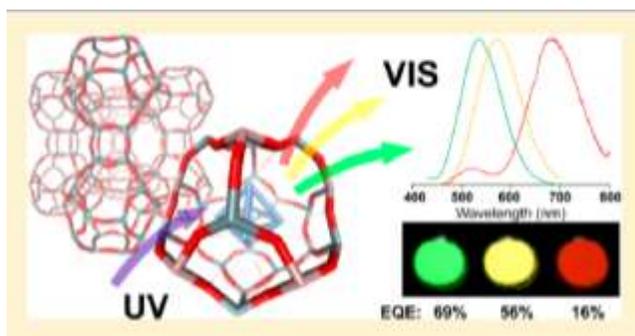
### 1.2.3 Zeolitas

Las zeolitas son materiales micro(meso)porosos formados por aluminosilicatos que pueden adoptar diversas estructuras en función de su relación Si/Al.<sup>42</sup> Estas estructuras regulan el tamaño de los clústeres que se forman en su interior. A diferencia de otras plantillas, las zeolitas aportan estabilidad al medio ambiente durante mucho tiempo.

En general, la síntesis de los clústeres dentro de las zeolitas implica dos pasos principales: el intercambio de metales alcalinos (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) por Ag<sup>+</sup> y la activación, que consiste en la reducción parcial de Ag<sup>+</sup> y la formación de clústeres estables dentro de las zeolitas. Algunas síntesis implican un paso más que consiste en la agregación de un agente estabilizador como el Li<sup>+</sup> para evitar la internalización de las moléculas de agua y la disminución de la intensidad de la emisión.<sup>43</sup>

La emisión reportada usando esta plataforma depende de la estructura de las zeolitas.<sup>44</sup> Se han reportado emisiones alrededor de 550nm<sup>45</sup> con eficiencias cuánticas externas de 97.4% para las

zeolitas FAUY[Ag<sub>0.5</sub>], alrededor del 50% para FAUX[Ag<sub>5</sub>],<sup>42</sup> una emisión sintonizable entre 550 y 690 nm para clústeres de plata en zeolitas LTA<sup>46,47</sup> dependiendo del contenido de plata, (verde y amarillo para bajo contenido de plata y rojo para alto contenido de plata) con eficiencias cuánticas externas de hasta el 89% para clústeres de Ag<sub>1</sub> en zeolitas Li-LTA con una disminución gradual al aumentar el contenido de plata<sup>43</sup> y una emisión azul con eficiencias cuánticas externas de hasta el 69% para clústeres de plomo en zeolitas LTA.<sup>9</sup>



**Figura 1.3 Clústeres de plata luminiscentes utilizando zeolitas como plantilla estabilizadora y su versatilidad en la emisión de colores. Reproducido con permiso de [45], 2013, American Chemical Society.**

### 1.3 APLICACIONES DE LOS CLÚSTERES COMO BIOSENSORES

Debido a su tamaño de angstroms, a su intensa emisión, a su corrimiento de Stokes mayor de 100 nm<sup>48</sup> y a la facilidad para biofuncionalizar algunas de sus plantillas estabilizadoras, los clústeres metálicos han sido muy utilizados para detección de metales y otras sustancias de importancia clínica y toxicológica, incluyendo nitrofenol, glucosa, colesterol, dopamina y formaldehído, entre otras, por lo que se han desarrollado varias metodologías para la detección, basadas en la emisión de estos clústeres metálicos.<sup>25,49</sup> ver **tabla 1.1**.

#### 1.3.1 Métodos de detección

Algunas de las estrategias comúnmente utilizadas para la detección de moléculas o iones metálicos son:

**Encendido de emisión.** Este método de detección se utiliza para la detección de metales y se basa en la síntesis de clústeres luminiscentes metálicos. En presencia de iones del metal a detectar, este se reducirá formando los clústeres luminiscentes.<sup>50,6</sup> **Figura 1.4a.**

**Mejoramiento de la emisión por agregación inducida**<sup>51</sup> Estos clústeres presentan una plantilla estabilizadora con algunos grupos funcionales, que al agregar algún solvente, catión polivalente o anión monovalente, generan inter- o intra-complejos que rompen los enlaces clúster-plantilla, permitiendo la agregación. Dentro de estos agregados se genera transferencia de carga, ya sea ligante-metal (LMCT) o ligante-metal-metal (LMMCT) generalmente vía estado triplete centrado en el metal, incrementando el tiempo de vida de emisión, así como el rendimiento cuántico.<sup>52,53,54,55</sup> **Figura 1.4b.**

**Apagamiento de fluorescencia por transferencia de energía.**<sup>33</sup> En esta, al unirse una molécula específica, como por ejemplo un metal paramagnético ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ) se genera una transferencia de energía que se cree es debida a una transferencia de electrones foto-inducida desde el estado de excitación de la partícula luminiscente a los centros metálicos paramagnéticos, lo que se traduce en un apagamiento de la emisión de los clústeres.<sup>31,56</sup> Generalmente esta unión se lleva a cabo en regiones de la plantilla estabilizadora donde se encuentran los clústeres. **Figura 1.4c.**

**Apagamiento de fluorescencia inducido por agregación,**<sup>57</sup> en el que, el analito a detectar induce una agregación de clústeres al formar enlaces o por medio de atracciones electrostáticas, lo que provoca un crecimiento neto de la partícula, haciéndola perder sus propiedades ópticas debidas a su tamaño y confinamiento cuántico. **Figura 1.4d.**

**Corrimiento en la longitud de onda de luminiscencia.** Por medio de este fenómeno se pueden detectar metales, haciendo que el metal a detectar se una a los clústeres, provocando un crecimiento del clúster y con ello, corrimiento de la emisión hacia longitudes de onda mayores.<sup>58</sup> También se puede dar que el analito a detectar sea un no metal y se formen enlaces de coordinación entre el clúster y el analito a detectar, obteniéndose un cambio en la longitud de onda de emisión de dicho clúster.<sup>32</sup> **Figura 1.4e.**

**Ensayo radiométrico.** Se produce un apagamiento del pico de emisión del clúster y al mismo tiempo la formación de otro pico de emisión en otra longitud de onda, siendo ambos picos proporcionales a la concentración del analito presente. En este caso, es posible evaluar la relación entre ambos picos.<sup>59,60</sup>

**Apagamiento por oxidación de los átomos metálicos que conforman los clústeres.** Ha sido reportado en clústeres de plata sintetizados dentro de zeolitas, en los que la plata pasa de  $\text{Ag}^0$  a  $\text{Ag}^+$  al agregar el analito a detectar, en presencia de ciertos catalizadores.<sup>61</sup>

**Anisotropía luminiscente.** Es un fenómeno en el que la intensidad de emisión cambia conforme se cambia el eje de polarización del campo incidente. La detección se basa en la diferencia de polarización entre el analito y la polarización de este una vez unido a la sonda de detección.<sup>62</sup>

En algunos casos también se han hecho detecciones de analitos por medio de cambios en la absorción, ya que al unirse el analito a detectar, se genera un cambio en la superficie de la partícula, interactuando con el clúster luminiscente, pudiéndose detectar algunas veces como un cambio en el espectro de absorción, traducido como un cambio de coloración de la muestra y otras veces como un incremento o disminución de la intensidad de absorción.<sup>18,33</sup>

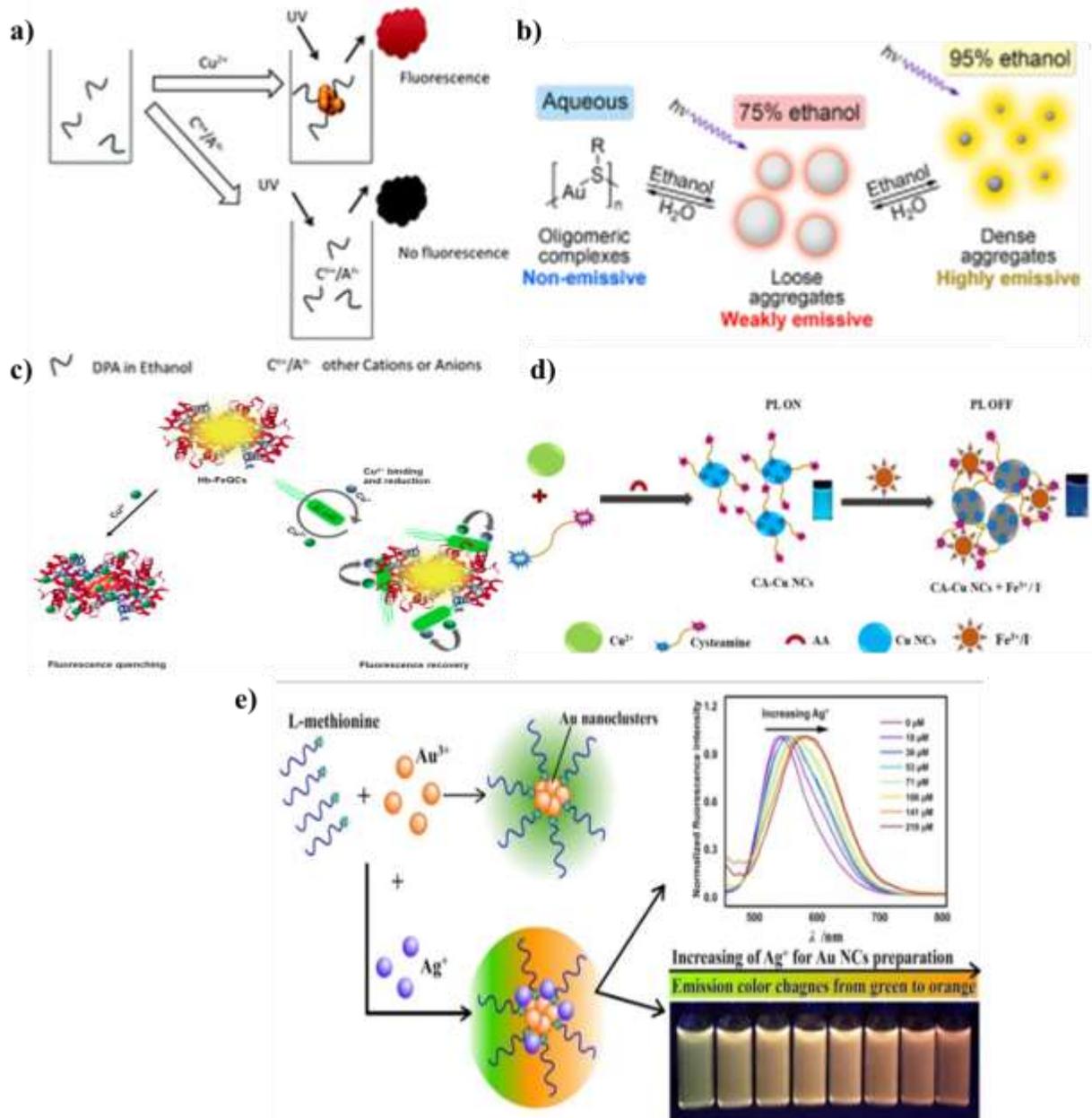


Figura 1.4 Diferentes mecanismos utilizados para la detección de metales y otras sustancias por medio de clústeres metálicos luminiscentes a) encendido de emisión, b) mejoramiento de la emisión por agregación inducida, c) apagamiento de la emisión por transferencia de carga, d) apagamiento de fluorescencia inducido por agregación, e) corrimiento en la longitud de onda de luminiscencia. Reproducido con permiso de [6], 2015, The Royal Society of Chemistry, [52], 2012, American Chemical Society, [33], 2020, Elsevier, [57], 2020, Elsevier y [58], 2021, Elsevier, respectivamente.

### 1.3.2 Detección de metales y otras sustancias

Debido a la toxicidad de grandes cantidades de algunos metales presentes en el medio ambiente, se han explorado diferentes estrategias para su detección, tanto en solución acuosa, como en medio biológico. Así mismo, ha sido importante la detección de otras sustancias que pueden ser tóxicas o que pueden ser marcadores para la detección de alguna enfermedad. Los clústeres metálicos han sido ampliamente aplicados en este campo, pudiendo enunciar algunos muy recientes en la **Tabla 1.1**, donde se comparan el clúster, la platilla estabilizadora utilizada, el analito a detectar y el método por el cual se lleva a cabo la detección.

**Tabla 1.1 Algunos trabajos reportados recientemente sobre detección de metales y otras sustancias por medio de clústeres en diferentes platillas estabilizadoras y su método de detección. Los recuadros se encuentran agrupados por colores con base al mecanismo de detección utilizado: azul encendido de emisión al formar clústeres, rojo encendido de emisión por agregación inducida, verde apagamiento de emisión por transferencia de energía, amarillo apagamiento de emisión inducido por agregación, morado apagamiento de emisión y cambio en la absorbancia, azul marino apagamiento de emisión por formación de enlace, azul cielo corrimiento en la longitud de onda de emisión, gris ensayo radiométrico.**

Plantilla	Clúster	Analito	Método de detección	Rango de detección lineal	Límite de detección	Ref
Citidina	Cu	Cu <sup>2+</sup> Hemina	Encendido de emisión al formar los clústeres de Cu. Apagamiento de emisión por la hemina.	0.05-2.0 µM (Cu <sup>2+</sup> ) 0.05-4.0 µM (hemina)	0.032 µM (Cu <sup>2+</sup> ) 0.045 µM (hemina)	50
D-penicilamina	Cu	Cu <sup>2+</sup>	Encendido de emisión al formar clústeres luminiscentes de Cu.	0.95-6.35 ppm	--	6
Glutatión	Cu	Pb <sup>2+</sup> Zr <sup>4+</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Glucosa Colesterol	Encendido de la emisión por agregación inducida en presencia de Pb <sup>2+</sup> y Zr <sup>4+</sup> . Apagamiento por impedimento de agregación inducida al agregar H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , glucosa y colesterol.	60-250 µmol/L (Zr <sup>4+</sup> ) 40-105 µmol/L (Pb <sup>2+</sup> ) 1-60 µmol/L (glucosa) 0.8-50 µmol/L (glucosa) 6-80 µmol/L (colesterol)	40 µmol/L (Zr <sup>4+</sup> ) 0.37 µmol/L (glucosa) 2.7 µmol/L (colesterol)	7

D-Penicilamina	Ag/Cu	Ag <sup>+</sup>	Encendido de la emisión por agregación inducida al agregar Cu y su posterior apagamiento al agregar Ag <sup>+</sup> .	0.05-800 μM	0.03 μM	63
Glutación	Ag	Hg <sup>2+</sup>	Apagamiento de la emisión en 620nm por transferencia de energía.	0.1 nM – 10 μM	0.02 ppb (10 <sup>-10</sup> M)	29
Péptido	Au	Hg <sup>2+</sup>	Apagamiento de la emisión en 650nm por transferencia de energía.	5nmol/L - 1μmol/L	7.5 nmol/L	64
Albúmina de Suero Bovino (BSA)/ Ácido Tiosalicílico (TSA)	Au Ag Cu	Hg <sup>2+</sup> As <sup>3+</sup> Cr <sup>6+</sup>	Apagamiento de la emisión en 700 nm (Au), 624 nm (Ag) y 430 nm (Cu) por transferencia de energía.	1-350nM (Hg <sup>2+</sup> ) 1-20 nM (As <sup>3+</sup> ) 50-400 nM (Cr <sup>6+</sup> )	0.25 nM (Hg <sup>2+</sup> ) 0.34 nM (As <sup>3+</sup> ) 3.54 nM (Cr <sup>6+</sup> )	65
ADN	Cu/Ag	Hg <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup>	Apagamiento de la fluorescencia en 583nm por transferencia de energía mediante bloqueo directo y mediante bloqueo de nucleótidos específicos.	0.01-5 μM (Cu <sup>2+</sup> ) 5-40 nM (Hg <sup>2+</sup> )	5 nM (Cu <sup>2+</sup> ) 1 nM (Hg <sup>2+</sup> )	4
Cisteína	Cu	Fe <sup>3+</sup> Dopamina	Sistema “Encendido-Apagado-Encendido” en el que el Fe <sup>3+</sup> es apagador para la fluorescencia roja del clúster por transferencia de carga y se recupera la emisión al detectar dopamina	1-500 μM (Fe <sup>3+</sup> ) 1-20 μM (dopamina)	0.7 μ (Fe <sup>3+</sup> )	31
Cisteamina	Cu	Fe <sup>3+</sup> I <sup>-</sup>	Apagamiento de emisión inducido por agregación.	0-1000 μM (Fe <sup>3+</sup> ) 0-10 mM (I <sup>-</sup> )	423 nM (Fe <sup>3+</sup> ) 2.02 μM (I <sup>-</sup> )	57
Ditiotreitol (DTT)	Cu	Co <sup>2+</sup>	Apagamiento de fluorescencia inducido por agregación	--	25 nM	48
Tiol-β-ciclodextrina	Au	4-Nitrofenol	Apagamiento de la emisión a 502nm, así como un incremento en la intensidad de absorción.	0.1-100μM	90 nM	18
FAUY (zeolita)	Ag	Formaldehído	Apagamiento de la emisión en 530nm y cambio de color de la muestra de blanco a negro.	80-2560 ppb	32.8 ppb (emisión) 80 ppb (colorimetría)	61
Glutación	Cu	Cisteína (en orina)	Disminución de la intensidad de emisión en 613 nm al formarse enlace tiol-Cu.	3x10 <sup>-8</sup> -42x10 <sup>-8</sup> mol/dm <sup>3</sup>	8.63 x 10 <sup>-9</sup> mol/dm <sup>3</sup>	66
DNA	Cu	Tiocianato (SCN <sup>-</sup> )	Apagamiento de la emisión debido a una quelación entre el SCN <sup>-</sup> y el Cu, impidiendo la formación de los clústeres.	10-100 μM	4.94 μM	67
L-metionina	Au	Ag <sup>+</sup>	Corrimiento de la emisión de 538 a 590 nm.	18-210 μM	8.54 μM	58

Albúmina de suero bovino	Au/Ag	Cisteína	Corrimiento en la longitud de onda de emisión de 650 nm a 670 nm, al unirse los clústeres con el grupo tiol de la cisteína así como una disminución en la intensidad.	2-100 $\mu$ M	1.1 $\mu$ M	32
8-hidroxiquinolina	Ag	Ag <sup>+</sup>	Sensor radiométrico. Relación entre el encendido de la emisión en 386nm y el apagamiento de la emisión en 462nm.	0-80 $\mu$ M	--	59
Albúmina de suero bovino	Cu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sensor radiométrico. Relación entre el encendido de la emisión en 450nm y el apagamiento de la emisión en 620nm.	0-100 $\mu$ M	0.082 $\mu$ M	55

### 1.3.3 Clústeres para inmunoensayos

**Uso de clústeres para pruebas de inmunosensado** en el que un anticuerpo se encuentra marcado con los clústeres luminiscentes. Al estar presente el analito a detectar, este lleva a cabo una reacción enzimática obteniéndose como producto un compuesto o ion metálico, que provoca un apagamiento en la fluorescencia de los clústeres y en algunos casos, genera un nuevo pico de emisión, con lo cual es posible hacer un sensor luminiscente o un sensor radiométrico, dependiendo del caso ver **Figura 1.5**. Utilizando este tipo de partículas luminiscentes se ha reportado un límite de detección menor que el de una prueba ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) convencional.<sup>60,68</sup>

Además de las 2 estrategias antes mencionadas, se han hecho pruebas ELISA utilizando anisotropía fluorescente como método de detección.<sup>62</sup>

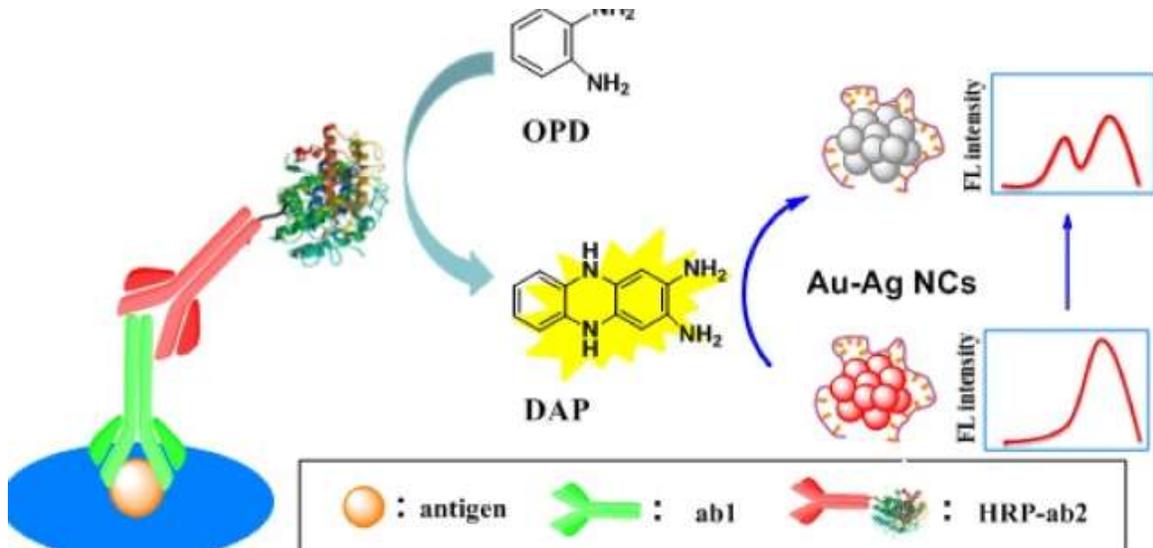


Figura 1.5. Uso de clústeres para ensayo inmuno-enzimático. Reproducido con permiso de [60], 2021, Elsevier.

Además, nanoclústeres de oro embebidos en ácido lipoico con emisión en 710 nm han sido utilizados para ensayos inmunológicos, tanto competitivos, como en sándwich para la determinación de inmunoglobulinas IgE y se han comparado ambas metodologías, siendo que el ensayo competitivo tiene un menor límite de detección.<sup>69</sup>

#### 1.4 BIOCONJUGACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

La bioconjugación consiste en la modificación de la superficie de la nanopartícula con una biomolécula, con el fin de que dicha partícula tenga una función biológica, generalmente reconocimiento de un antígeno, anticuerpo o analito. Existen varias metodologías para llevar a cabo este procedimiento, entre las que destacan:<sup>70,71</sup>

- **Interacciones electrostáticas:** Atracción entre la nanopartícula y la biomolécula debido a las cargas de ambas. Es una interacción débil comparada con un enlace covalente y su estabilidad está directamente relacionada con la constante de disociación de equilibrio. Esta unión es conocida como “Self-assembly”. **Figura 1.6a.**

- **Conjugación directa:** formación de enlace, ya sea covalente o iónico directamente entre la nanopartícula y la biomolécula sin necesidad de añadir otro ligante. Ejemplos de eso son la quelación de iones metálicos y quimisorción Au-tiol. **Figura 1.6b.**

- **Interacciones secundarias:** Consiste en la incorporación de una molécula conocida tanto a la nanopartícula, como a la biomolécula, las cuales formen enlaces entre ellas mediante un mecanismo conocido. La más común es la formación del enlace biotina-avidina, que es el enlace no covalente más fuerte que se conoce hasta el momento. **Figura 1.6c.**

- **Unión covalente a ligantes de superficie:** Se funcionaliza la superficie de la nanopartícula con un grupo funcional, generalmente hidroxilo, amino, tiol o carboxilo para permitir la unión a la biomolécula por medio de la formación de enlaces covalentes entre el grupo funcional de superficie de la partícula y el grupo funcional de un extremo de la biomolécula **Figura 1.6d.**

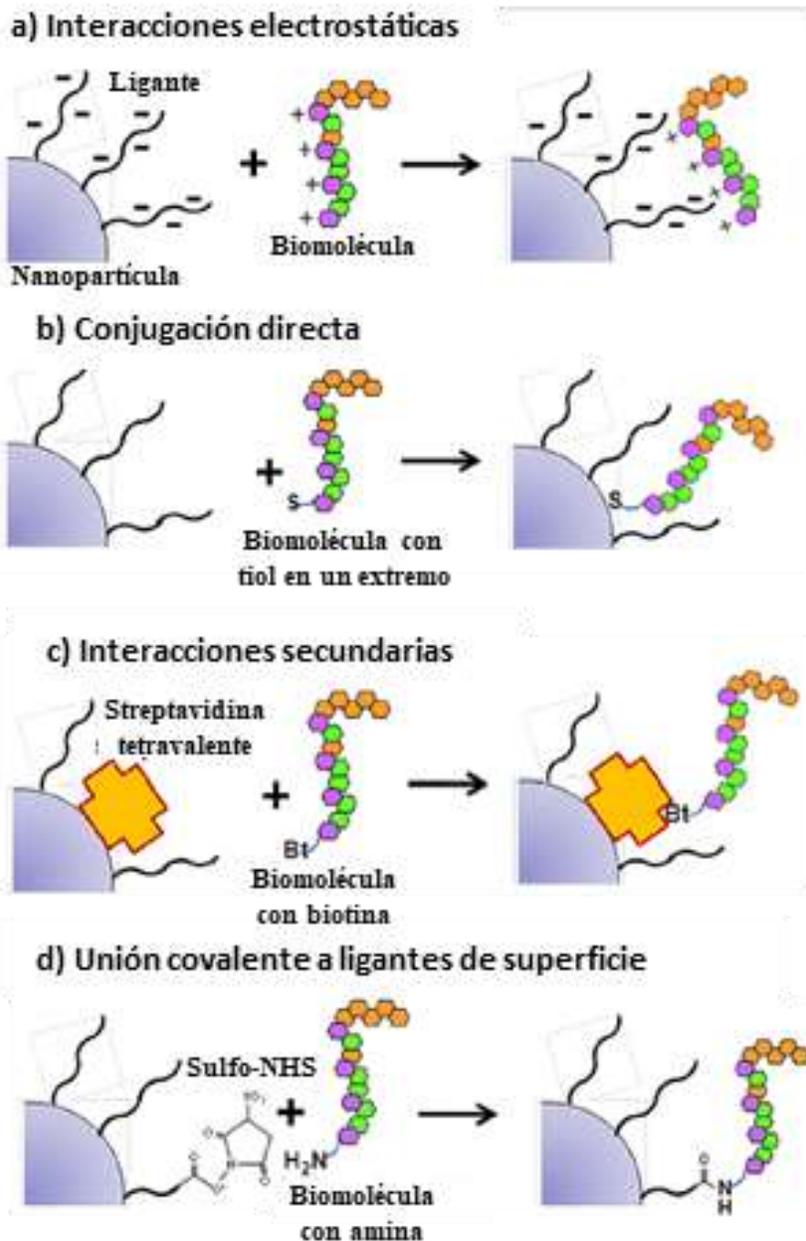


Figura 1.6. Estrategias para llevar a cabo la bioconjugación de nanopartículas: a) interacciones electrostáticas, b) conjugación directa, c) interacciones secundarias, d) unión covalente a ligantes de superficie. Adaptado con permiso de [70], 2013, American Chemical Society y [72], 2008, Biomedical Materials.

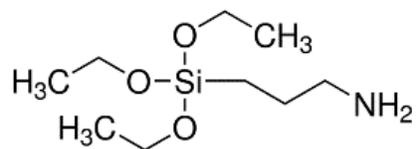
## 1.5 FUNCIONALIZACIÓN DE ZEOLITAS CON GRUPOS AMINO

Como se mencionó anteriormente, la funcionalización es la incorporación de un grupo funcional a la superficie de la nanopartícula (hidroxilo, amino, tiol, carboxilo, entre otros) que permita la posterior unión de una biomolécula. En el caso de las zeolitas y otros silicatos, los métodos post-sintéticos para llevar a cabo la funcionalización con grupos amino se pueden dividir en grafting e impregnación húmeda.

### 1.5.1 Grafting o silanización

Este método consiste en la unión de aminosilanos, molécula con un grupo amino en un extremo, que permitirán la unión a una biomolécula y un silano que se unirán a los grupos silanoles de la zeolita por medio de enlaces covalentes.<sup>73</sup> El más utilizado es 3-aminopropiltriétoxisilano (APTES).

**Figura 1.7.**



**Figura 1.7. Estructura química 3-aminopropiltriétoxisilano (APTES).**

Para poder llevar a cabo la silanización es necesario que las nanopartículas tengan grupos hidroxilos en la superficie y generalmente involucra un pretratamiento, ya sea térmico, ácido o químico. APTES reacciona con los grupos hidroxilo del sustrato mediante una reacción de condensación formando siloxanos. Sin embargo, puede tener diferentes orientaciones o formar puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la nanopartícula y el grupo amino de APTES.<sup>74</sup>

Algunas de las ventajas del uso de este método son que, al formarse enlaces covalentes, las uniones entre ellos son fuertes y estables a temperaturas de aproximadamente 200°C y presentan una buena dispersión de las aminas. Entre las desventajas se encuentran que la carga de amina depende de la cantidad de grupos silanoles disponibles y la necesidad de un pretratamiento.<sup>75</sup>

Este método ha sido ampliamente utilizado para funcionalización de zeolitas con diferentes aplicaciones, como lo son zeolitas con actividad antibacteriana,<sup>76</sup> zeolitas unidas a membranas para filtración y separación de gases,<sup>77</sup> zeolitas con fluoróforos bioconjugados con anticuerpos para inmunoensayos,<sup>78</sup> zeolitas que capturan nanopartículas de oro en inmunoensayos,<sup>79</sup> zeolitas unidas a nanopartículas de oro con actividad antifúngica<sup>80</sup> y zeolitas para captura de CO<sub>2</sub>.<sup>81</sup>

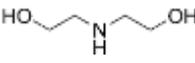
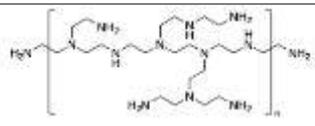
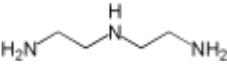
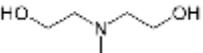
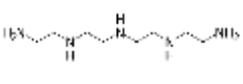
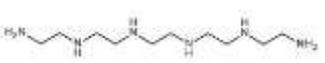
### 1.5.2 Impregnación húmeda

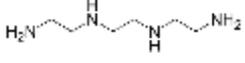
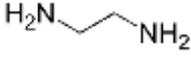
Consiste en colocar a la zeolita dentro de una solución con aminos y agitar para conseguir la internalización de las aminos en los poros de la zeolita, formándose interacciones electrostáticas entre los grupos hidroxilo superficiales de la zeolita y los grupos amino de la molécula impregnada.<sup>82,83</sup>

Este método ha sido reportando tanto para aminos lineales, como aminos ramificados, con grupos amino primarios, secundarios y/o terciarios,<sup>10,84,85,86</sup> ver **Tabla 1.2**. Es necesario tener en cuenta que la unión de las aminos por este método dependerá en gran medida del tamaño y volumen de poro, así como del área superficial de la partícula,<sup>87</sup> lo que significa que, dependiendo del tamaño de la amina, esta se depositará ya sea en los poros o en la superficie de la zeolita. Las moléculas más pequeñas entrarán fácilmente en los poros, hasta saturarlos, mientras que las moléculas más grandes se depositarán en la superficie o solo entrarán una parte de ellas a los poros.<sup>88,89,90,91</sup>

Entre las ventajas de este método se encuentran la unión de una gran cantidad de aminos, método repetible y condiciones de síntesis muy sencillas.<sup>87</sup> Entre las desventajas de este método se encuentran una débil unión a la zeolita, baja estabilidad térmica y que al agregar una gran cantidad de aminos, estas se aglomeran en la superficie.<sup>75</sup>

**Tabla 1.2. Nombre y estructura química de algunos compuestos con grupos amino utilizados para impregnación húmeda.**

Compuesto	Estructura química	Compuesto	Estructura química
Monoetanolamina (MEA) (ETA)		Polietilenimina (PEI) lineal	
Dietanolamina (DEA)		Polietilenimina (PEI) ramificado	
Dietilenetriamina (DETA)		Metildietanolamina (MDEA)	
Tetraetilenehexamina (TEPA)		Pentaetilenehexamina (PEHA)	

Trietilenetetramina (TETA)		Etilenediamina (EDA)	
-------------------------------	---	-------------------------	---

A pesar de las grandes ventajas que ofrece este método para funcionalización de zeolitas y otras nanopartículas con grupos amino, su uso se ha extendido a la captura de  $\text{CO}_2$ <sup>87</sup> y algunas otras sustancias,<sup>92</sup> siendo que no ha sido utilizado para biofuncionalización.

En este trabajo se muestran los resultados de clústeres de plata luminiscentes sintetizados dentro de Faujasita X, la modificación de su superficie con aminas PEI ramificadas de dos longitudes de cadena, DETA y TEPA, utilizando la técnica de impregnación húmeda. Su bioconjugación con anticuerpos anti IgG humano por medio de atracciones electrostáticas, así como la evaluación de su aplicación como biosensor luminiscente para la detección de anticuerpos IgG marcados con FITC.

## 2 METODOLOGÍA

---

### 2.1 MATERIALES

Jarra de molienda de alúmina de 100 mL EQ-AJ-80, MTI CORP Intercilab, bolas de alúmina de 2mm de diámetro, viales ámbar de 20 mL, tubos de plástico de 15 mL para centrifuga, frascos de polipropileno de 500, 200 y 100 mL, agitadores magnéticos, tubos eppendorf de 2 mL, placa negra de 96 pocillos de poliestireno de fondo transparente con tapa Corning Incorporated Costar.

### 2.2 REACTIVOS

Nitrato de plata  $\text{AgNO}_3$  99.9999%, metanol absoluto libre de acetona, dietilenetriamina (DETA) reagentplus 99%, tetraetilenepentamina (TEPA) grado técnico, polietilenimina (PEI) ramificado de  $M_w$  25,000 y  $M_n$  10,000, solución estándar analítica de polietilenimina (PEI) de  $M_w$  750,000 y  $M_n$  60,000 50% peso/volumen en agua, anticuerpos anti IgG de suero humano  $\geq 95\%$  (HPLC) en buffer, anticuerpos IgG marcados con FITC. Todos estos reactivos fueron obtenidos de sigma-aldrich. Tabletas para solución salina de buffer de fosfatos (PBS) Gibco, suero de albúmina bovino (BSA) Tocris Bioscience, Faujasita X (FAUX) relación Si/Al = 1.3 donada por Clariant y agua ultrapura.

### 2.3 EQUIPOS UTILIZADOS

Molino de alta vibración High Speed 3D MTI Cooperation, centrifuga Benchmark Z206-A Labnet, mufla Binder, horno PID de plataforma levadiza Sentro Tech Corp, agitador térmico Multi-Therm H Benchmark, baño ultrasónico con frecuencia de operación de 40 KHz y potencia de 300 Watts capacidad 10 L VelaQuin 8893.

### 2.4 EQUIPOS PARA CARACTERIZACIÓN

Difractómetro de rayos X D2 Phaser Bruker, espectrofotómetro FTIR Cary 670 acoplado con un Cary 620 Agilent Technologies, microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL JSM-7800F, fluorómetro

conformado por lámpara de xenón, monocromador ActonPro 2150i para seleccionar la longitud de onda de excitación, monocromador Acton SpectraPro 2300i para seleccionar el intervalo de longitudes de onda de emisión, tubo fotomultiplicador (PMT) Hamamatsu R955, software SpectraSense versión 5.0.0; espectrofluorómetro de múltiples funciones Cytation 5 Biotek.

Este trabajo se dividió en 6 etapas, las cuales se mencionan a continuación.

## 2.5 MOLIENDA DE ZEOLITAS

Dado que el tamaño de la zeolita comercial no permite mantenerlas en suspensión durante tiempos prolongados, se evaluaron diferentes tiempos de molienda.

1. Se colocaron 4g de Faujasita X, 4g de bolas de 2mm de diámetro y 30 mL de agua ultra pura en una jarra de molienda de alúmina de 100 mL.
2. Se colocó en el molino de alta vibración y se molió durante 60 minutos, en intervalos de 10 minutos de molienda y 5 minutos de descanso para evitar el sobrecalentamiento de la jarra.
3. Se tomaron 2mL de la suspensión de zeolita a los 20, 40 y 60 minutos de molienda y se colocaron en un tubo de plástico para centrifuga, aforándose a 15 mL con agua ultrapura.
4. Se dejó reposar la zeolita en solución toda la noche y se tomó el sobrenadante.
5. Se sonicó el sobrenadante en un baño de ultrasonido durante 30 minutos.
6. Se centrifugó 30 minutos a 6000 rpm y se retiró el sobrenadante. Se etiquetó como fase II.
7. El sobrenadante se colocó en otros tubos de plástico para centrifuga y se centrifugó 30 minutos a 6000 rpm, desechando el sobrenadante. Se etiquetó como fase III.
8. Ambas fases se secaron en la mufla a 110°C durante 1h y 150°C por 3h.
9. Se observaron las diferentes fases en el microscopio electrónico de barrido (SEM) y se realizaron mediciones de difracción de rayos X (XRD).

## 2.6 SÍNTESIS DE CLÚSTERES DE PLATA



Se sintetizaron clústeres luminiscentes de plata  $Ag_6$  en faujasita X (FAUX) utilizando una metodología basada en síntesis reportadas anteriormente.<sup>45</sup> Ver **Figura 2.1.**



**Figura 2.1.** Esquema de la metodología utilizada para la síntesis de los clústeres luminiscentes de plata.

1. Se pesaron 0.702g de  $AgNO_3$  en la oscuridad y se colocaron, junto con 200mL de agua ultra pura en un frasco de polipropileno de 500 mL recubierto con papel aluminio. Se comenzó la agitación con un agitador magnético.
2. Se agregaron 1.5 g de FAUX molida y se aforó a 500 mL con agua ultrapura. Se continuó la agitación durante toda la noche. **Figura 2.1a.**
3. Se realizaron 2 lavados con agua ultrapura centrifugando a 6000 rpm durante 30 min. **Figura 2.1b.**
4. Se secó la muestra en estufa a  $80^\circ C$  durante 2 horas. **Figura 2.1c.**
5. Para la **activación de la muestra a través de tratamiento térmico**, esta se colocó en un crisol cerámico y se metió al horno realizando una rampa de  $5^\circ C/min$  hasta  $110^\circ C$ , se mantuvo en  $110^\circ C$  durante 2h, se realizó una nueva rampa para llegar a  $450^\circ C$  y se mantuvo en  $450^\circ C$  durante 2h. Se apagó y se dejó enfriar dentro del horno. **Figura 2.1c.**

6. La muestra obtenida se observó en el microscopio electrónico de barrido (SEM) y se realizaron mediciones de EDS, XRD, FTIR, emisión y excitación. **Figura 2.1d.**
7. Se prepararon suspensiones de la muestra en agua ultra pura y se realizaron espectros de absorción, excitación y emisión.

Nota: Antes de la activación de los clústeres no se puede utilizar material de laboratorio metálico para manipular las muestras.

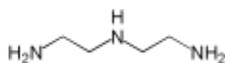
## 2.7 FUNCIONALIZACIÓN: IMPREGNACIÓN CON AMINAS



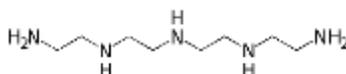
Para la funcionalización se utilizó el método de impregnación húmeda, el cual une las aminas a los poros y superficie de la zeolita mediante atracciones electrostáticas.

Como se mencionó anteriormente, existen muchas moléculas con grupos amino que se pueden utilizar para este procedimiento. En este caso, se escogieron 4 aminas diferentes con base a la longitud y ramificación de su cadena y al tipo de aminas que tiene: primarias, secundarias o terciarias.

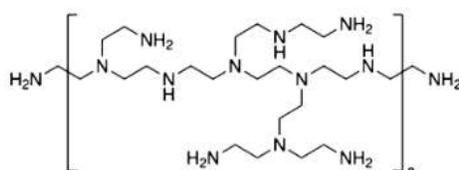
**DETA** – Cadena lineal corta con aminas primarias en los extremos y una amina secundaria al centro de la cadena.



**TEPA** – Cadena lineal un poco más larga con aminas primarias en los extremos y 3 aminas secundarias intercaladas en la cadena.



**PEI ramificado** – Polímero de cadena ramificada con aminas primarias en los extremos de cada ramificación y múltiples aminas secundarias y terciarias intercaladas en la cadena.



Se utilizaron 2 PEIs ramificados de diferente longitud de cadena, medidas por su peso molecular promedio numérico ( $M_n$ ) y su peso molecular promedio en peso ( $M_w$ ):

- **PEI ramificado de  $M_w$  25,000 y  $M_n$  10,000** (muestras etiquetadas como PEI).
- **PEI ramificado de  $M_w$  750,000 y  $M_n$  60,000 en solución con agua 50% peso/volumen** (muestras etiquetadas como PEI/H<sub>2</sub>O).



**Figura 2.2** Esquema de la metodología utilizada para la impregnación de las aminas a las zeolitas con clústeres luminiscentes de plata.

1. Se prepararon soluciones 1:50 en peso de las diferentes aminas en metanol.
2. En viales ámbar se colocó el volumen necesario de la solución de aminas de tal forma que quedaran relaciones 40, 60 y 80 % en peso amina-zeolita.
3. Se agregó la zeolita con clústeres y se agitó durante toda la noche. **Figura 2.2a.**
4. Se realizaron 2 lavados, centrifugando a 6000 rpm durante 30 min y resuspendiendo en metanol con el fin de remover las aminas que no se hayan unido a la zeolita. **Figura 2.2b.**
5. Se secaron a 60 °C durante 2 horas. **Figura 2.2c.**
6. Se midió FTIR, XRD y se observaron imágenes de SEM.

7. Se prepararon suspensiones de partículas en agua y se realizaron mediciones de absorción, excitación y emisión. **Figura 2.2d.**

## 2.8 BIOCONJUGACIÓN CON ANTICUERPOS ANTI IgG



La metodología utilizada para la unión de los anticuerpos anti IgG a la zeolita con aminas fue mediante atracciones electrostáticas entre el grupo amino de la superficie de la zeolita y el grupo carboxilo del anticuerpo.

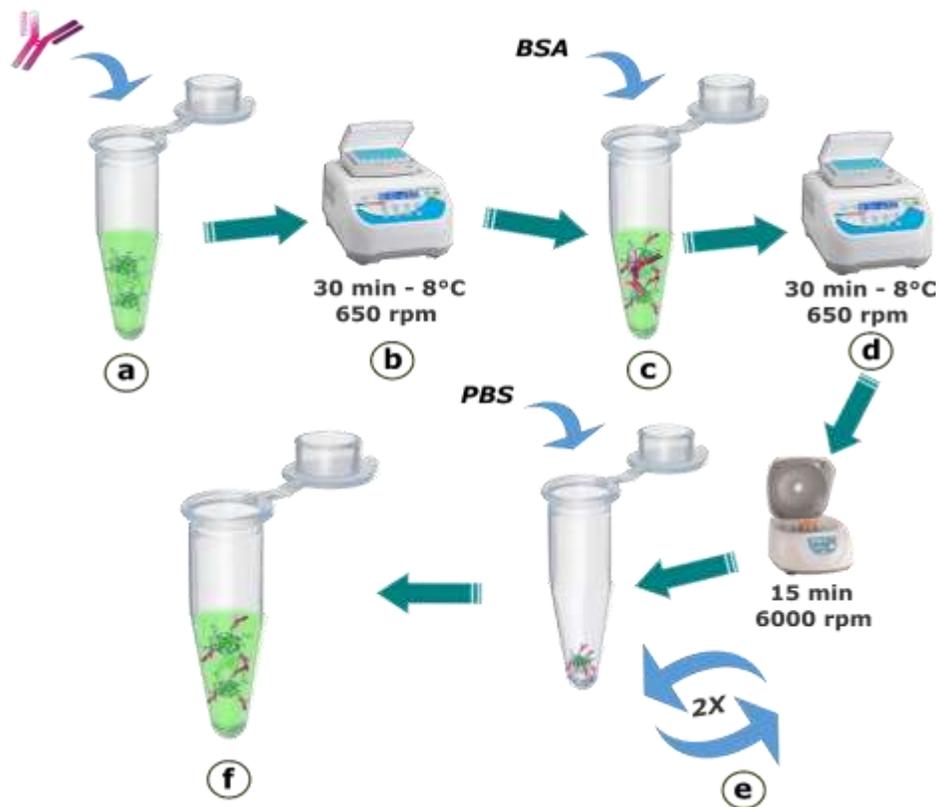
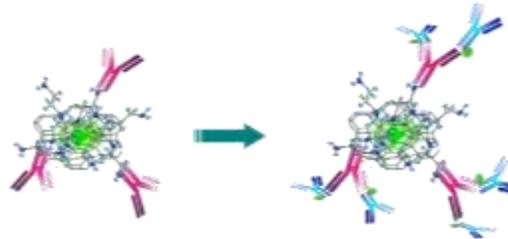


Figura 2.3 Esquema de la metodología utilizada para la bioconjugación con anticuerpos anti IgG humano.

1. Se preparó una dilución 100 µg/mL de anticuerpos en PBS.
2. Se prepararon diluciones 2, 1 y 0.5 mg/mL de zeolita con aminas en agua.
3. Se colocaron 150 µL de la solución de zeolitas en un tubo eppendorf y se agregaron 150 µL de dilución de anticuerpos anti IgG humano en agua. **Figura 2.3a.**
4. Se incubó durante 30 minutos a 650 rpm y 8 °C durante 30 min. **Figura 2.3b.**
5. Se agregaron 20 µL de 1 mg/mL de BSA en agua ultra pura y se incubó 20 minutos a 650 rpm y 8°C. **Figura 2.3c y d.**
6. Se realizaron 2 lavados centrifugando a 6000 rpm durante 15 minutos, removiendo el sobrenadante y resuspendiendo en PBS. **Figura 2.3e.**
7. Se resuspendió en 100 µL de PBS y se midió absorción, excitación y emisión. **Figura 2.3f.**

## 2.9 DETECCIÓN DEL ANALITO: ANTICUERPO IgG MARCADO CON FITC



### 2.9.1 Corroboración de la unión de IgG-FITC a la sonda de biosensado

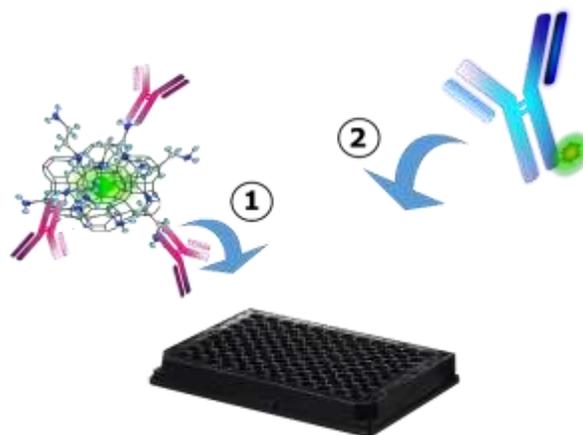
Para corroborar que los anticuerpos se unen a la sonda de detección se interrogó la emisión de FITC en muestras incubadas y lavadas.



**Figura 2.4** Diagrama de la metodología utilizada para la unión de IgG-FITC y la medición de su emisión como herramienta de doble chequeo.

1. En tubos eppendorf se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de solución de la sonda de detección y se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de dilución IgG-FITC 500 ng/mL. **Figura 2.4a.**
2. Se incubó durante 2 horas a 8°C y 650 rpm. **Figura 2.4b.**
3. Se realizaron 2 lavados centrifugando a 6000 rpm y resuspendiendo en PBS. **Figura 2.4c.**
4. Se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de PBS y se midió emisión para interrogar la presencia de FITC. **Figura 2.4d.**

### 2.9.2 Evaluación de la sonda de biosensado



**Figura 2.5 Esquema de la metodología utilizada para la detección del analito en placa negra de 96 pocillos.**

1. Se prepararon diluciones de anticuerpos IgG marcados con FITC (IgG-FITC) en PBS a diferentes concentraciones: 0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10 ng/mL.
2. En una placa negra de 96 pocillos se colocaron 50  $\mu$ L de 2mg/mL de la sonda y se agregaron 50  $\mu$ L de dilución de IgG-FITC (**Figura 2.5**) y se midió la intensidad en el punto más alto de emisión cada 5 minutos durante 2 horas.

## 3 RESULTADOS

---

### 3.1 MOLIENDA DE ZEOLITAS

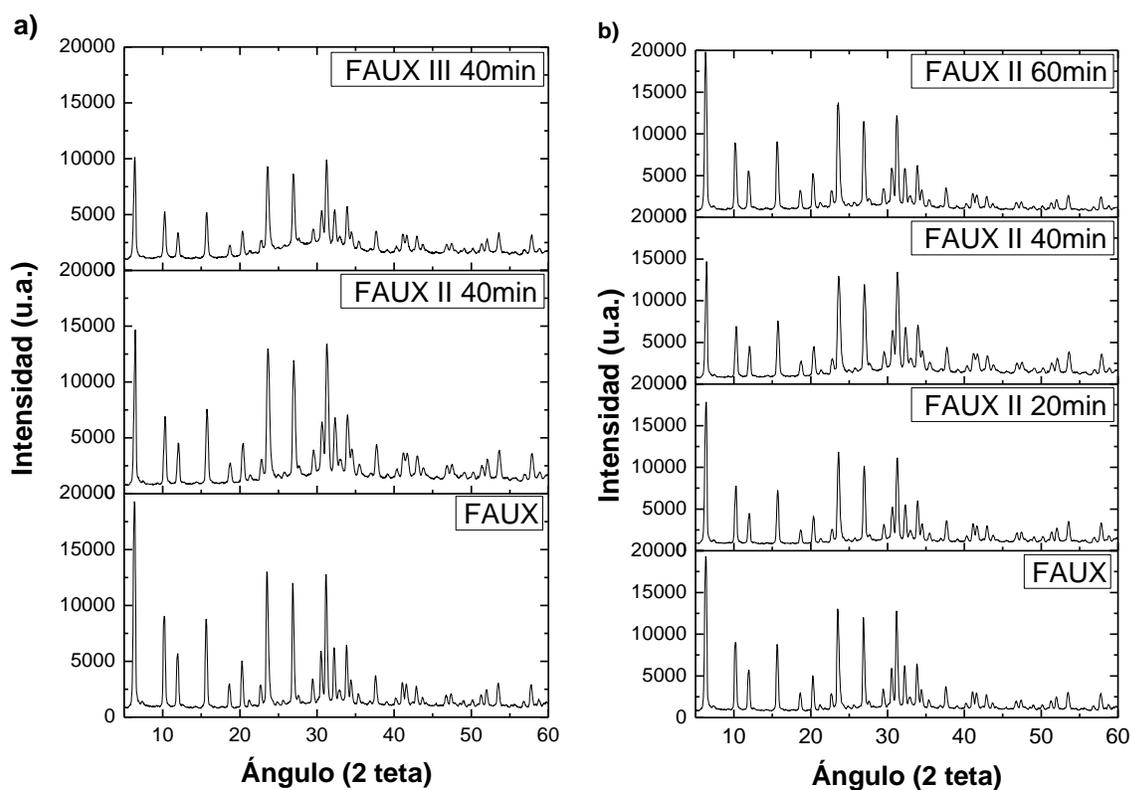
El tamaño de las zeolitas reportado por el proveedor (Clariant) es de entre 2 y 5  $\mu$ m, sin embargo, estos tamaños son relativamente grandes para poder mantener el sistema coloidal en suspensión durante el tiempo de biosensado, es por ello que se estudió la molienda de estas partículas con el fin de obtener zeolitas cuyo tamaño permita la detección en sistema coloidal.

Una vez separadas y secadas las fases II y III molidas a los diferentes tiempos (20, 40 y 60 min), se les realizaron difractogramas de rayos X (**Figura 3.1**) para analizar la pérdida de la cristalinidad y se observaron imágenes de estas en SEM para observar el tamaño de partícula obtenido (**Figura 3.2**).

Primeramente, se compararon los difractogramas de rayos X y las micrografías de SEM de las muestras molidas a 40 min fase II y fase III con respecto a la muestra original. Tanto para la fase II, como para la fase III se observó una disminución de la intensidad en los picos de difracción de rayos X (**Figura 3.1a**) comparada con la muestra original, siendo esta disminución en intensidad mayor para la fase III que para la fase II. Sin embargo, ningún pico del difractograma desaparece ni sufre ensanchamiento notorio, lo cual significa que no se han formado nuevas estructuras cristalinas, ni ha cambiado la estructura cristalina del material, pero si ha habido pérdida de la cristalinidad al momento de la molienda. Así mismo, de las imágenes de SEM de estas muestras se observa que la

fase III (**Figura 3.2 c**) ha sufrido una pérdida de su morfología comparada con la morfología de la muestra original (**Figura 3.2a**) y presenta tamaños del orden de nanómetros que no fue posible medir en las micrografías de SEM debido a su gran aglomeración. Mientras tanto, el histograma de tamaños de la fase II molida 40 min (ver **Figura 3.2h**) presenta una curva gaussiana centrada en 1  $\mu\text{m}$ , como se observa en la micrografía de SEM de la **Figura 3.2 e**. Lo mencionado anteriormente nos indica que este tipo de molienda genera tamaños de partículas no homogéneos y pérdida de la cristalinidad proporcional al tamaño de partícula obtenido.

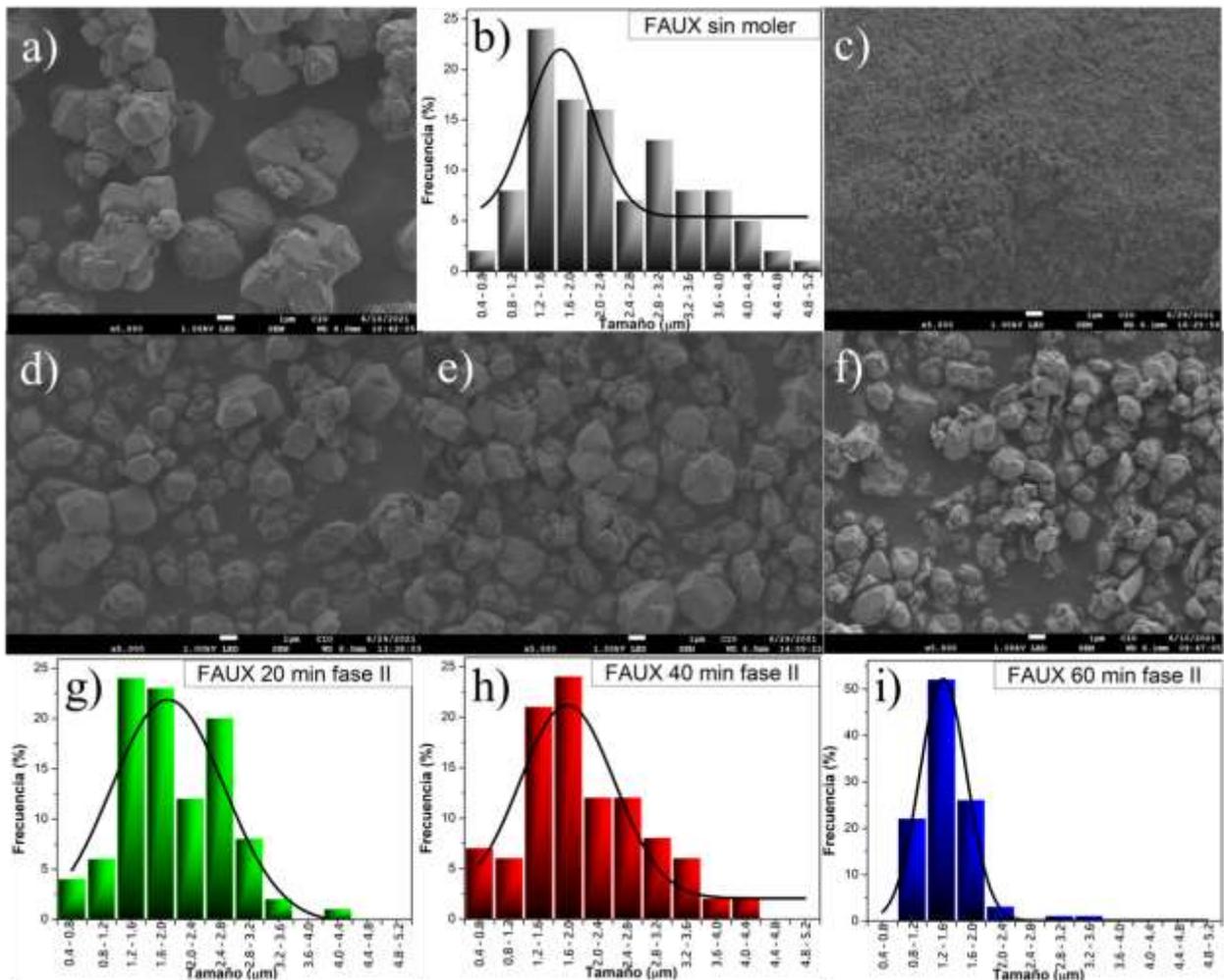
Debido a la pérdida de cristalinidad, morfología y gran aglomeración de la fase III molida 40 min, se descartó el uso de la fase más ligera y se procedió a la evaluación de diferentes tiempos de molienda para la fase II.



**Figura 3.1** Difractogramas de rayos X de FAUX sin moler comparado con FAUX molida. a) FAUX sin moler comparada con fase II y fase III de 40 minutos de molienda. b) FAUX sin moler comparado con FAUX fase II molido 20, 40 y 60 min.

Al comparar las muestras molidas a 20, 40 y 60 minutos con la original, se observó una ligera disminución en la intensidad de los picos del difractograma (**Figura 3.1b**), pudiendo ser debida a la forma de colocar la muestra para la medición, ya que se coloca una línea sobre el portamuestras, quedando orientados los cristales de forma aleatoria.

Por otro lado, las micrográficas de SEM nos indican que el tamaño de partícula de la muestra original se encuentra centrado en  $1.7 \mu\text{m}$  según su ajuste gaussiano (ver **Figura 3.2b**), con una amplia distribución de tamaños que presenta un segundo incremento en cantidad de muestras alrededor de  $3 \mu\text{m}$ . La fase II molida 20 minutos sigue presentando una amplia distribución de tamaños desde 1 hasta 3 micras, con el centro de su gaussiana en  $1.9 \mu\text{m}$  (ver **Figuras 3.2 d y g**). Por su parte, la fase II molida 40 minutos presenta una distribución de tamaños aún amplia, con su centro en  $1.8 \mu\text{m}$  (ver **Figuras 3.2 e y h**), siendo que para la fase II molida 60 minutos, se obtiene un histograma con tamaños mucho más homogéneos centrados en  $1.4 \mu\text{m}$  (ver **Figuras 3.2 f e i**).



**Figura 3.2** Micrografías obtenidas con SEM y su respectivo histograma de distribución de tamaños de FAUX sin moler comparadas con FAUX molidas a diferentes tiempos. a) FAUX sin moler, b) histograma de distribución de tamaños de FAUX sin moler, c) fase III 40 min de molienda, d) fase II 20 min de molienda, e) fase II 40 minutos de molienda, f) fase II 60 minutos de molienda, g) histograma de distribución de tamaños de fase II 20 min de molienda, h) histograma de distribución de tamaños de fase II 40 min de molienda, g) histograma de distribución de tamaños de fase II 60 min de molienda. Histogramas realizados midiendo el tamaño de 100 partículas por muestra mediante el software Image J.

Dado que la fase II molida 60 minutos presenta una mayor homogeneidad en el tamaño de partícula comparada con la muestra original y las otras muestras molidas, así como una reducción de tamaño significativa con una pérdida de cristalinidad casi nula, se escogió esta muestra como plantilla para la estabilización de clústeres fotoluminiscentes de plata.

## 3.2 FORMACIÓN DE CLÚSTERES LUMINISCENTES DE PLATA

Se analizaron los difractogramas de rayos X (**Figura 3.3a**). Se observó que los picos del espectro se mantienen con una disminución en la intensidad, lo que significa que no ha habido cambios en la estructura cristalina de la zeolita, solamente ha habido disminución en la cristalinidad. Además, de los EDS se puede observar que la plata se ha introducido de manera efectiva en la estructura de la zeolita intercambiándose por los iones sodio que tenía inicialmente (**Tabla 3.1**), formándose clústeres luminiscentes con emisión en el verde-amarillo ( $562 \pm 0.5774$  nm) al excitar con 314nm, como se observa en el espectro de emisión de la **Figura 3.3b** y la fotografía de la figura **3.3c**, así mismo, en el espectro de excitación de la **Figura 3.3b** también se observa que la longitud de onda óptima de excitación es de  $314 \pm 0.5774$  nm al detectar luminiscencia a 562nm, coincidiendo así, con los materiales reportados anteriormente en la literatura.<sup>45</sup>

**Tabla 3.1** Porcentaje atómico de los elementos presentes en FAUX y FAUX Ag<sub>6</sub> medidos mediante EDS (mediciones realizadas por triplicado).

	<b>FAUX (% atómico)</b>	<b>FAUX Ag<sub>6</sub> (% atómico)</b>
<b>O</b>	50.83	39.30
<b>Si</b>	19.53	15.33
<b>Al</b>	15.70	12.47
<b>Na</b>	13.93	4.73
<b>Ag</b>	0.00	28.17

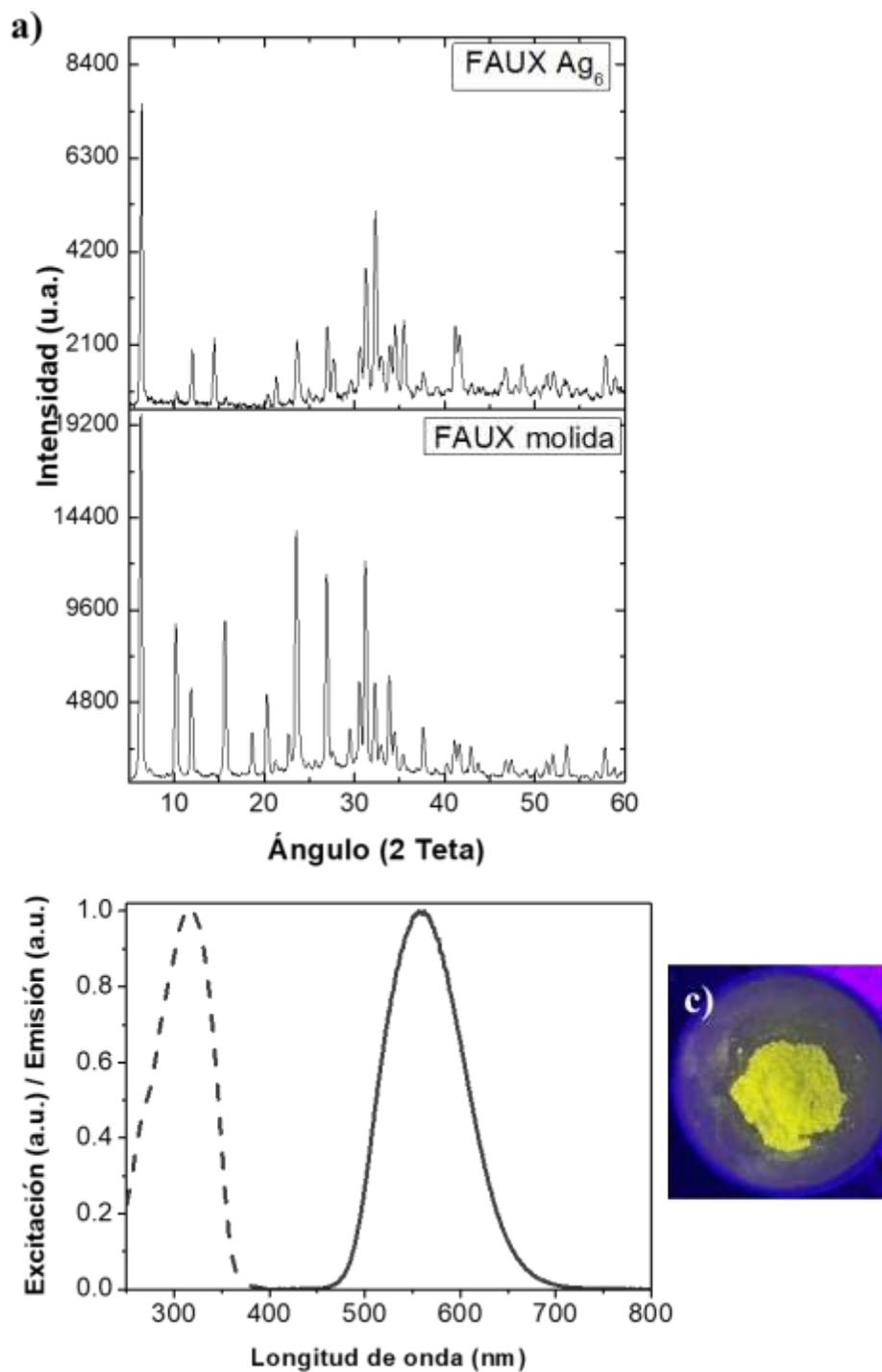


Figura 3.3 a) Difractograma de rayos X de FAUX Ag<sub>6</sub> y FAUX molida, b) espectros de excitación (emisión 562nm) y emisión (excitación 314nm) de FAUX Ag<sub>6</sub> en polvo, c) fotografía de FAUX Ag<sub>6</sub> iluminada con lámpara ultravioleta (360nm).

### 3.3 FUNCIONALIZACIÓN: IMPREGNACIÓN CON AMINAS

A continuación, se muestran los difractogramas de rayos X de FAUX Ag<sub>6</sub> antes (negro) y después de la impregnación con aminas a 40, 60 y 80 por ciento en peso (verde, rosa y azul, respectivamente). Para las cuatro aminas, PEI (**Figura 3.4**), PEI/H<sub>2</sub>O (**Figura 3.5**), DETA (**Figura 3.6**) y TEPA (**Figura 3.7**). En los cuatro casos se observan difractogramas similares al de FAUX Ag<sub>6</sub> con intensidades diferentes debido a la orientación aleatoria de la muestra en el portamuestras. Con esto se confirma que la estructura cristalina de la zeolita no sufrió cambios al ser impregnada con las diferentes aminas.

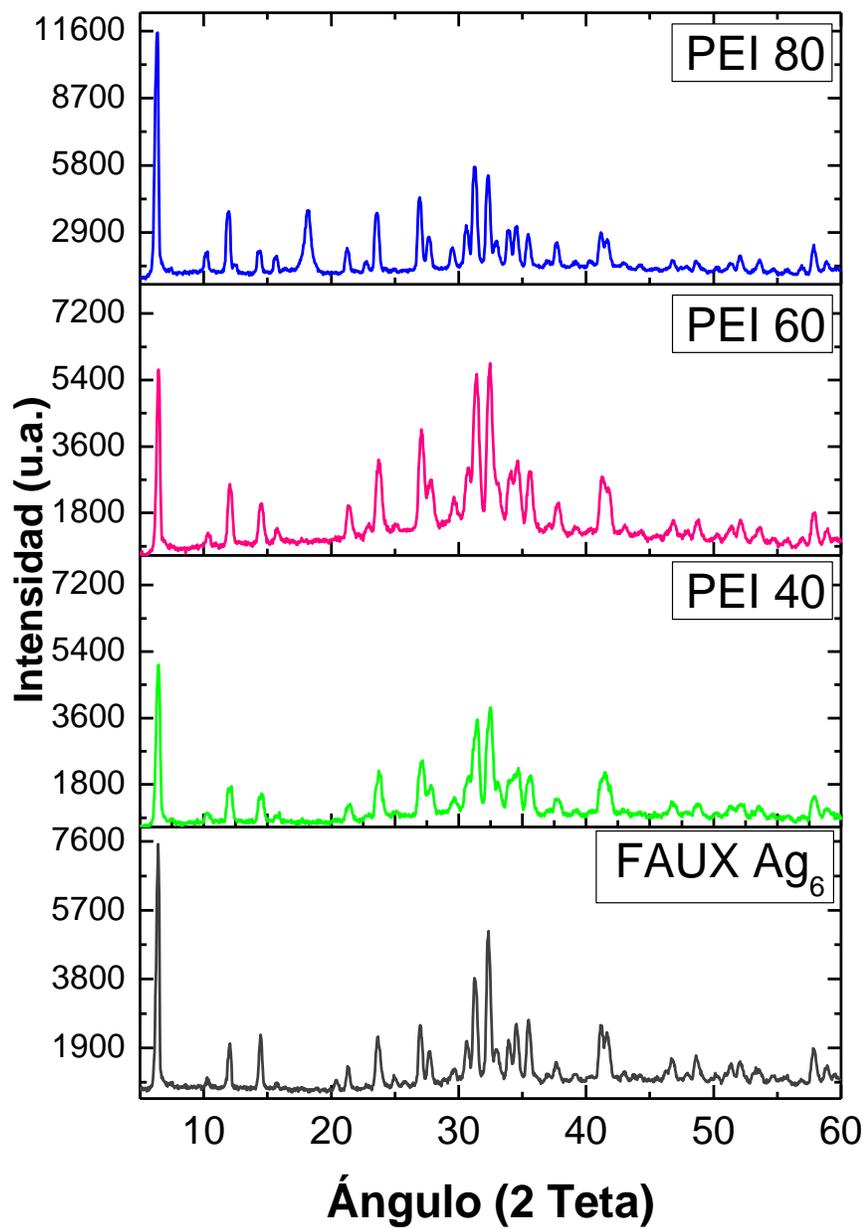


Figura 3.4 Difractogramas de rayos X de FAUX Ag<sub>6</sub> impregnada con PEI a diferentes concentraciones (40%, 60% y 80% en peso) comparados con FAUX Ag<sub>6</sub> sin aminos.

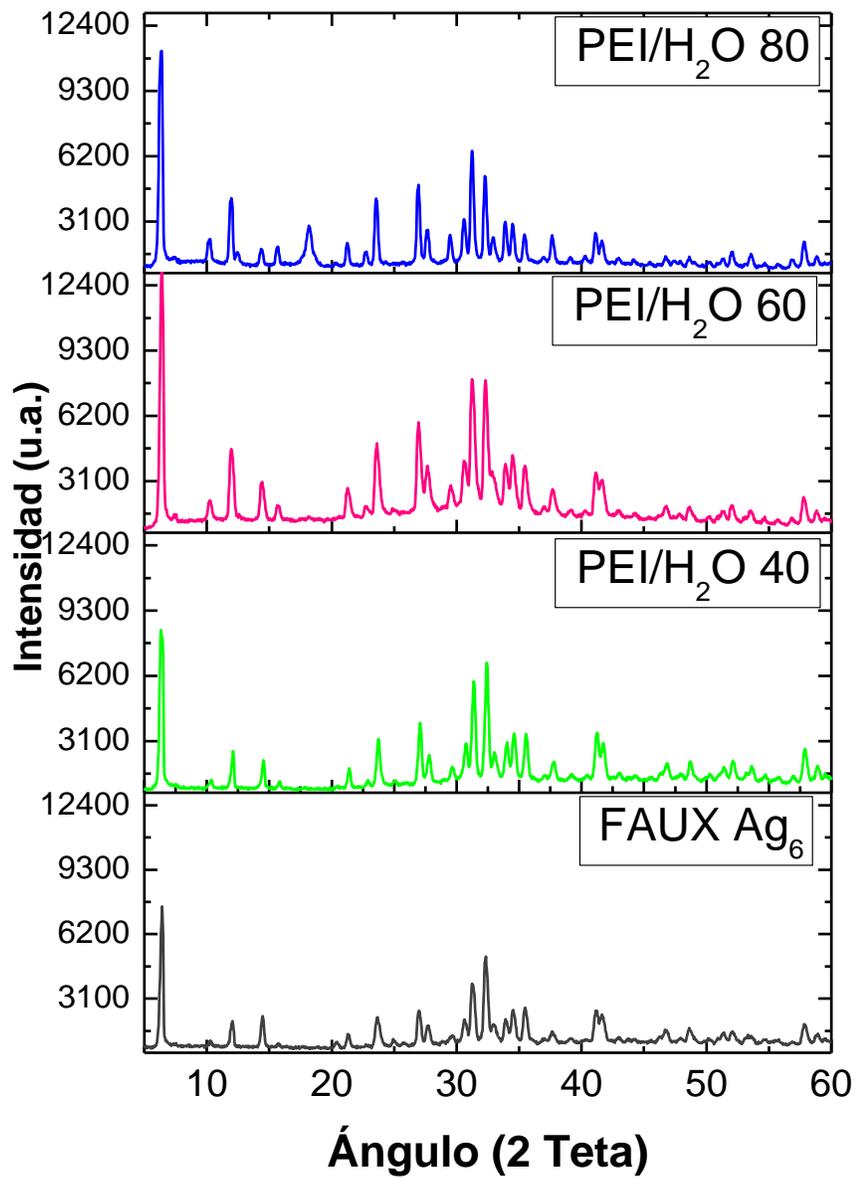


Figura 3.5 Difractogramas de rayos X de FAUX Ag<sub>6</sub> impregnada con PEI/H<sub>2</sub>O a diferentes concentraciones (40%, 60% y 80% en peso) comparados con FAUX Ag<sub>6</sub> sin aminas.

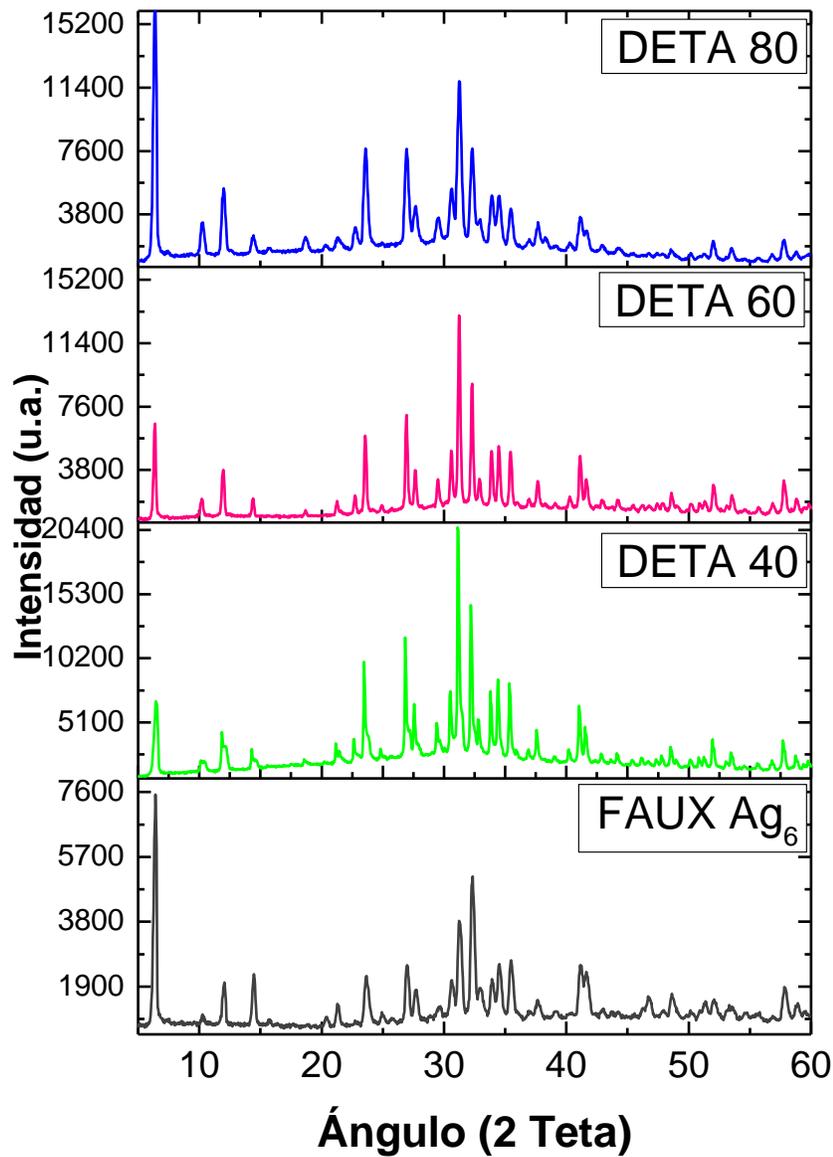
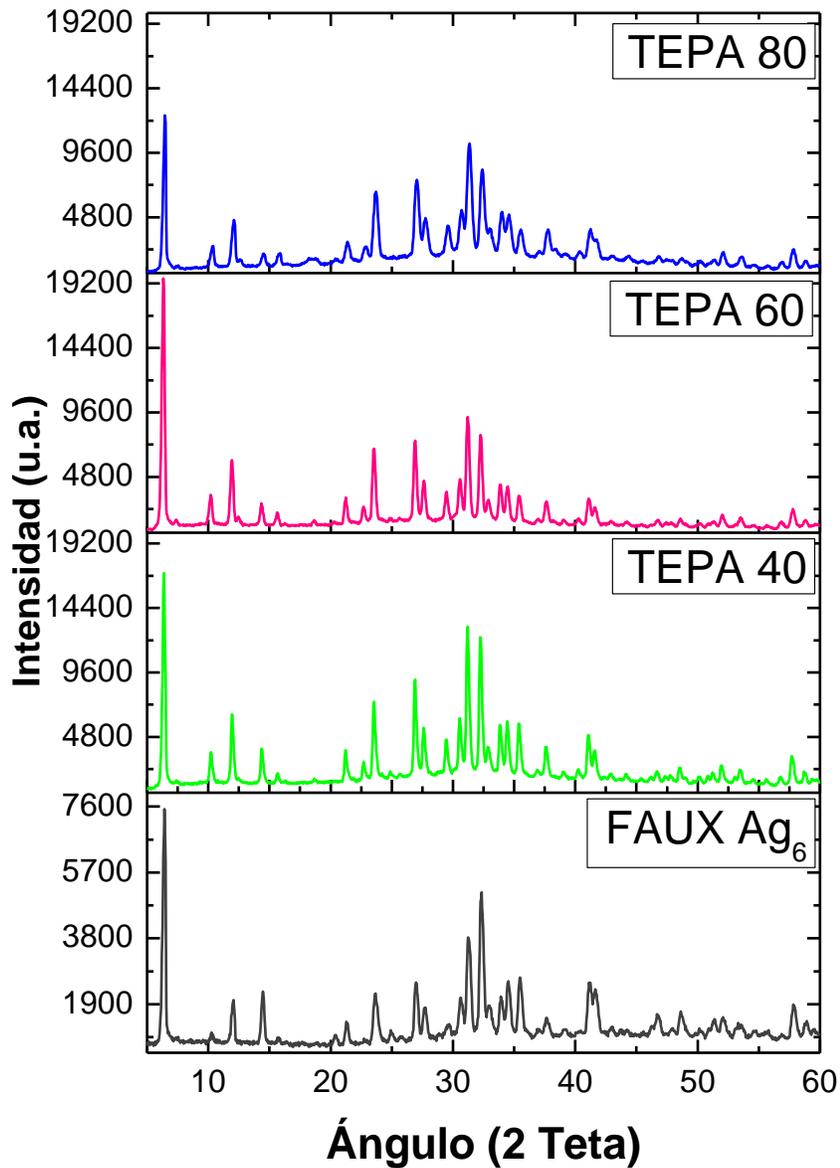


Figura 3.6 Difractogramas de rayos X de FAUX Ag<sub>6</sub> impregnada con DETA a diferentes concentraciones (40%, 60% y 80% en peso) comparados con FAUX Ag<sub>6</sub> sin aminas.



**Figura 3.7** Difractogramas de rayos X de FAUX Ag<sub>6</sub> impregnada con TEPA a diferentes concentraciones (40%, 60% y 80% en peso) comparados con FAUX Ag<sub>6</sub> sin aminos.

Para demostrar que la impregnación de las aminos se ha llevado a cabo correctamente, se realizaron mediciones de FTIR a la muestra sin aminos y a las muestras impregnadas con los diferentes porcentajes (40%, 60% y 80% en peso) de PEI (**Figura 3.8**), PEI/H<sub>2</sub>O (**Figura 3.9**), DETA (**Figura 3.10**) y TEPA (**Figura 3.11**). Las estructuras químicas de cada amina utilizada se muestran en la **Tabla 3.2**.

La muestra sin aminas (FAUX Ag<sub>6</sub>) presenta dos bandas en 560 y 671 cm<sup>-1</sup> correspondientes a estiramientos de los enlaces Si-O y Al-O de la estructura tetraédrica de las zeolitas,<sup>93</sup> y una banda intensa en 957 cm<sup>-1</sup> que se asocia a vibración de estiramiento del enlace O-Si-O.<sup>94,91</sup> Así mismo, presenta un pico en 1639 cm<sup>-1</sup> y una banda ancha en 3357 cm<sup>-1</sup>, correspondientes ambas a vibraciones de estiramiento de enlaces O-H de moléculas de agua internalizadas en la estructura de la zeolita y a grupos hidroxilo presentes en la superficie de la zeolita.<sup>84</sup>

Las muestras impregnadas con aminas a las diferentes concentraciones (40%, 60% y 80% en peso) mantienen las bandas en 560, 671 y 957 cm<sup>-1</sup> indicando que los enlaces Si-O y Al-O siguen presentes en la zeolita, sin embargo, desaparecen las bandas en 1639 cm<sup>-1</sup>, presentándose una nueva en 1595 cm<sup>-1</sup> correspondiente a vibraciones de flexión de tijera del enlace N-H en aminas primarias y secundarias<sup>94</sup> y la banda de 3350 sufre un desplazamiento hacia 3200 cm<sup>-1</sup> correspondiente también a vibraciones de aminas, manteniéndose este segundo pico ensanchado por la presencia de agua en la partícula.

Dos picos con intensidad baja se observan en 2920 y 2847 cm<sup>-1</sup>, correspondientes a vibraciones de estiramiento simétrico y asimétrico de los enlaces C-H de DETA, TEPA y PEI.<sup>94</sup> Para DETA se observan bandas correspondientes a vibraciones de estiramiento del enlace N-H en 3316 cm<sup>-1</sup> y en 3266 cm<sup>-1</sup>, siendo que para TEPA, esta última banda se encuentra en 3262 cm<sup>-1</sup>,<sup>94</sup> mientras que, para altas concentraciones de PEI y PEI/H<sub>2</sub>O (80%) presentan dos señales en 1208 y 1147 cm<sup>-1</sup> de intensidad media correspondientes a vibraciones de estiramiento del enlace C-N para aminas terciarias.<sup>95</sup>

Con los resultados antes discutidos podemos decir que tanto PEI, como PEI/H<sub>2</sub>O, DETA y TEPA, se han impregnado correctamente en la zeolita.

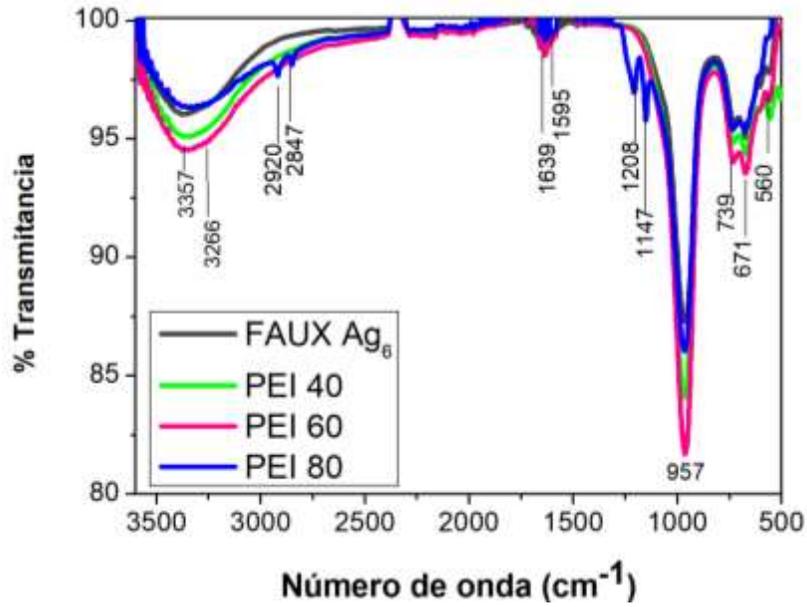


Figura 3.8 Espectros FTIR de FAUX Ag<sub>6</sub> impregnada con PEI a diferentes concentraciones (40%, 60% y 80% en peso) comparados con FAUX Ag<sub>6</sub> sin aminas.

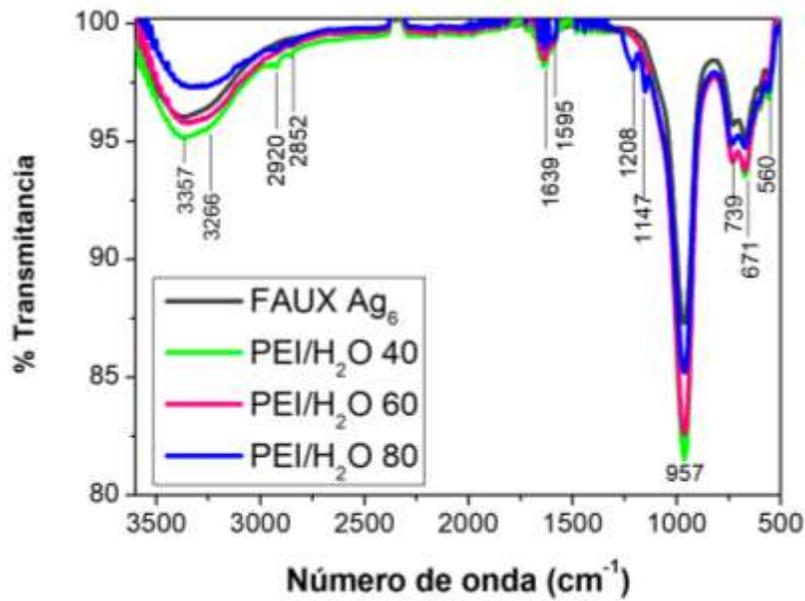


Figura 3.9 Espectros FTIR de FAUX Ag<sub>6</sub> impregnada con PEI/H<sub>2</sub>O a diferentes concentraciones (40%, 60% y 80% en peso) comparados con FAUX Ag<sub>6</sub> sin aminas.

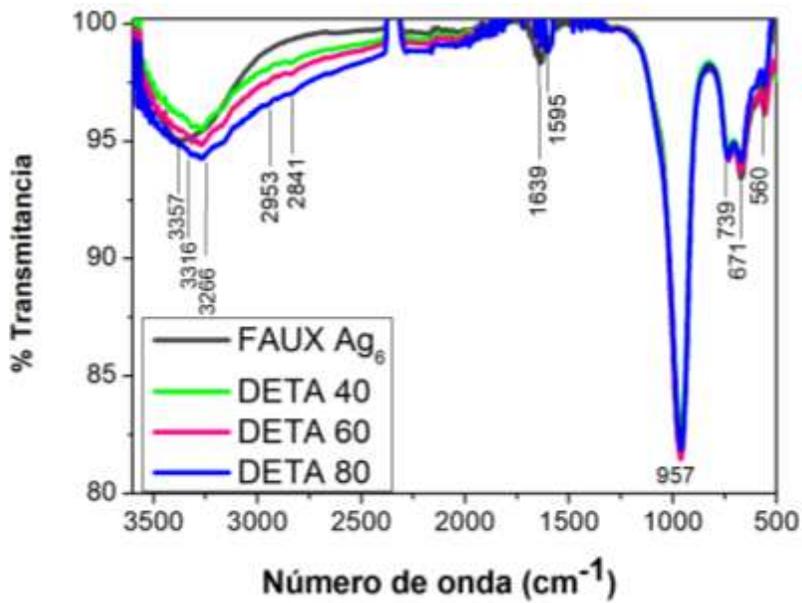


Figura 3.10 Espectros FTIR de FAUX Ag<sub>6</sub> impregnada con DETA a diferentes concentraciones (40%, 60% y 80% en peso) comparados con FAUX Ag<sub>6</sub> sin aminas.

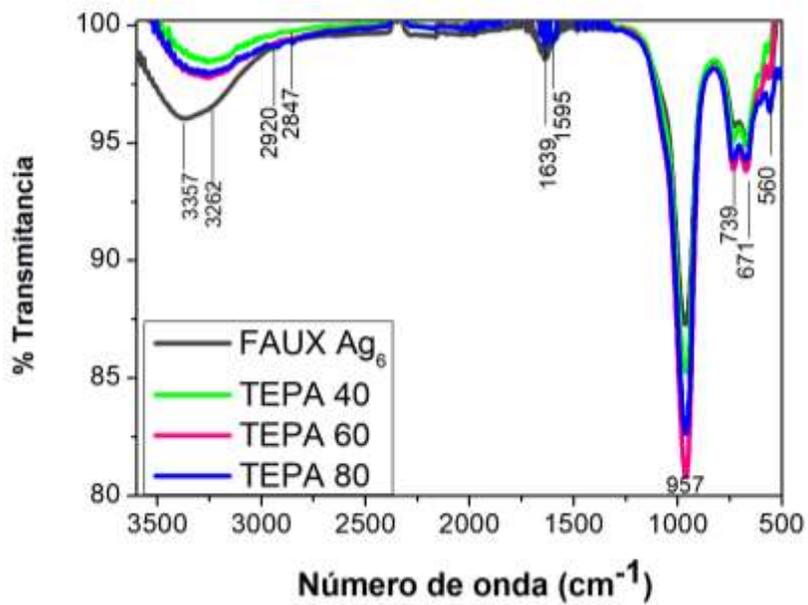
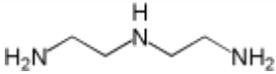
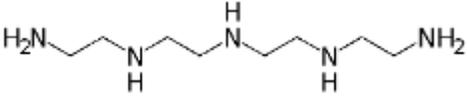
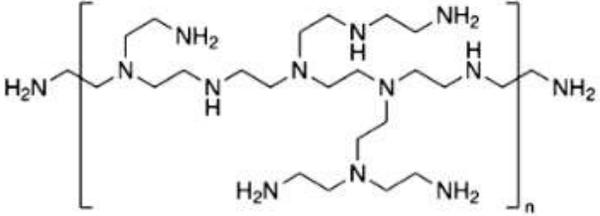


Figura 3.11 Espectros FTIR de FAUX Ag<sub>6</sub> impregnada con TEPA a diferentes concentraciones (40%, 60% y 80% en peso) comparados con FAUX Ag<sub>6</sub> sin aminas.

Tabla 3.2 Estructuras químicas de las aminas utilizadas para la impregnación.

Compuesto	Estructura química
Dietilenetriamina (DETA)	
Tetraetilenepentamina (TEPA)	
Polietilenimina (PEI) ramificada	

La **Figura 3.12** muestra los espectros de absorción, excitación y emisión y la **Tabla 3.3** muestra los parámetros de excitación y emisión de FAUX Ag<sub>6</sub> y FAUX Ag<sub>6</sub> impregnada con PEI, PEI/H<sub>2</sub>O, DETA y TEPA 40, 60 y 80% en peso en una suspensión de 2 mg/mL en agua. En todos los casos, el espectro de absorción presenta un hombro en la longitud de onda óptima de excitación y otro en 350nm que se incrementa conforme se incrementa la cantidad de amina, viéndose más pronunciada en DETA y TEPA que en PEI y PEI/H<sub>2</sub>O. En cuanto al espectro de excitación, este sufre una disminución de su ancho a la altura media de pico (FWHM) de aproximadamente 15 nm al impregnarle PEI, PEI/H<sub>2</sub>O y TEPA y aproximadamente 20nm al impregnarle DETA. Así mismo, la longitud de onda óptima de excitación presenta un corrimiento ligero, de entre 1 y 6 nm, a longitudes de onda menores al incrementar el porcentaje de la amina impregnada, observándose un cambio ligeramente más pronunciado con DETA y TEPA. Por otro lado, el espectro de emisión muestra un corrimiento hacia longitudes de onda menores conforme se incrementa la cantidad de amina de aproximadamente 5, 30 y 20 nm con los dos PEI, DETA y TEPA, respectivamente conservándose el FWHM para PEI, PEI/H<sub>2</sub>O y TEPA, no siendo así para DETA, el cual disminuye 15 nm aproximadamente. Otro cambio que se observa más notablemente para DETA y TEPA es una disminución en el corrimiento de Stokes.

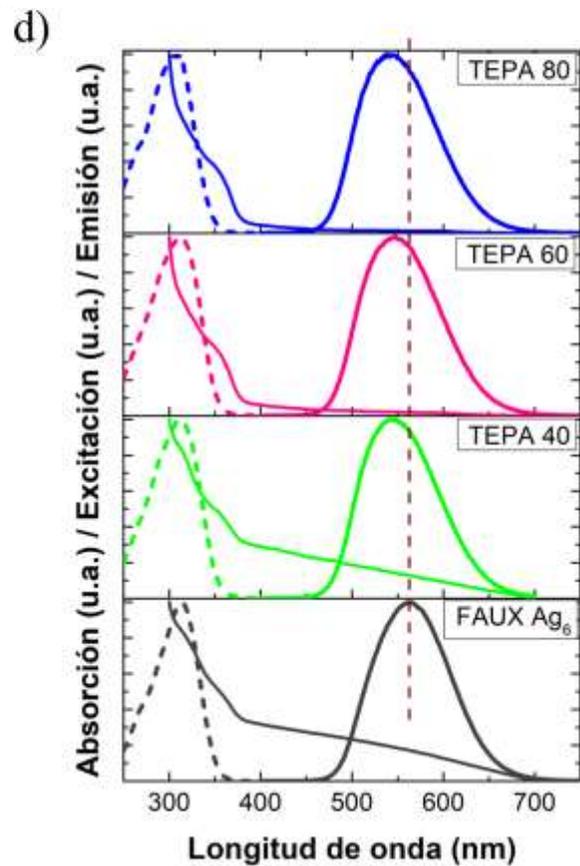
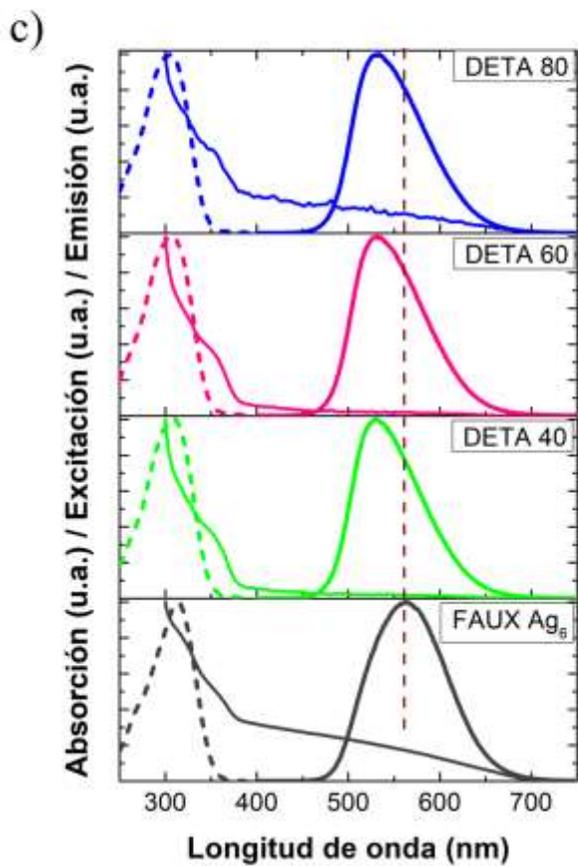
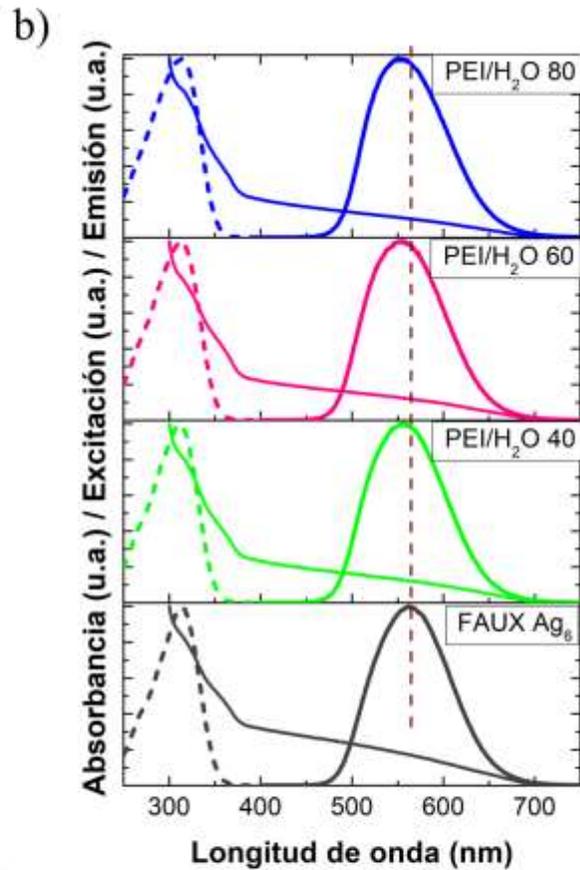
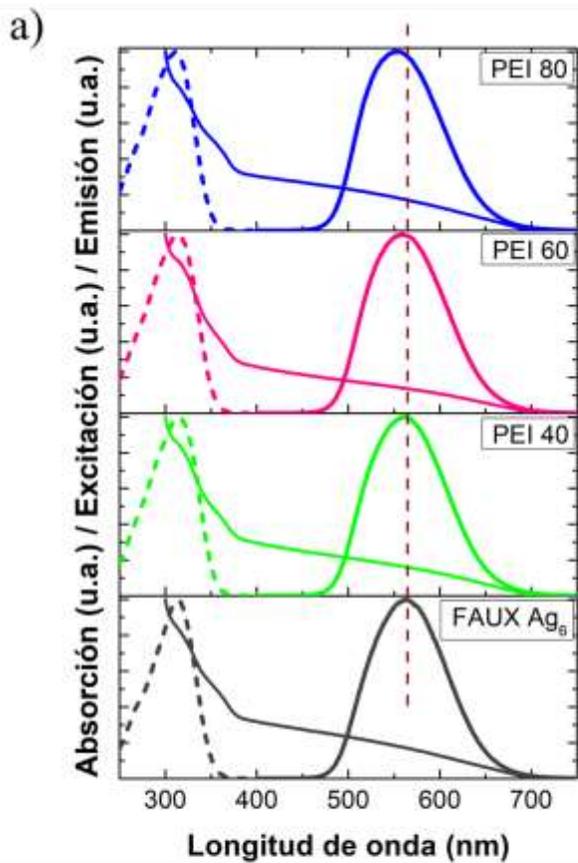


Figura 3.12 Espectros de absorción (línea delgada), excitación (línea punteada) (longitud de onda de emisión pico máximo de cada espectro) y emisión (línea gruesa) (excitación 311nm) de FAUX Ag<sub>6</sub> y FAUX Ag<sub>6</sub> impregnada con aminas a diferentes concentraciones (40%, 60% y 80% en peso) 2mg/mL en agua, a)PEI, b) PEI/H<sub>2</sub>O, c) DETA, d) TEPA.

Tabla 3.3 Parámetros de emisión y excitación de FAUX Ag<sub>6</sub> y FAUX Ag<sub>6</sub> impregnado con aminas.

	$\lambda$ excitación (nm)	FWHM excitación (nm)	$\lambda$ emisión (nm)	FWHM emisión (nm)	$\Delta\lambda$ (Stokes) (nm)
<b>FAUX Ag<sub>6</sub></b>	314 ± 0.5774	57 ± 0.0000	562 ± 0.5774	102 ± 0.5774	248 ± 0.5774
<b>PEI 40</b>	314 ± 0.5774	65 ± 0.0000	560 ± 2.7538	104 ± 0.0000	246 ± 0.0577
<b>PEI 60</b>	313 ± 2.3805	64 ± 1.0000	558 ± 2.7749	104 ± 3.2016	245 ± 2.6458
<b>PEI 80</b>	312 ± 0.5774	63 ± 0.5774	554 ± 3.5000	103 ± 0.5000	242 ± 2.5106
<b>PEI/H<sub>2</sub>O 40</b>	311 ± 1.6432	60 ± 2.1369	557 ± 1.5119	102 ± 1.2724	246 ± 2.0976
<b>PEI/H<sub>2</sub>O 60</b>	314 ± 1.2910	63 ± 0.5000	555 ± 2.7386	102 ± 0.4082	241 ± 1.9148
<b>PEI/H<sub>2</sub>O 80</b>	314 ± 2.3629	65 ± 2.7080	554 ± 1.5055	102 ± 1.3784	240 ± 2.3629
<b>DETA 40</b>	311 ± 2.0817	58 ± 1.1547	529 ± 1.4832	86 ± 1.5811	218 ± 2.3805
<b>DETA 60</b>	308 ± 1.0000	60 ± 0.0000	532 ± 3.5000	89 ± 0.5000	224 ± 1.1547
<b>DETA 80</b>	306 ± 3.6056	58 ± 0.0000	533 ± 1.1547	90 ± 0.0000	227 ± 3.6061
<b>TEPA 40</b>	312 ± 0.5774	64 ± 0.5774	541 ± 3.5119	101 ± 0.0000	229 ± 1.1547
<b>TEPA 60</b>	313 ± 1.7321	65 ± 0.0000	548 ± 2.0000	103 ± 0.0000	235 ± 2.0817
<b>TEPA 80</b>	310 ± 1.0000	62 ± 1.0000	539 ± 3.7859	102 ± 1.1547	229 ± 1.0000

Estos cambios en los espectros de absorción, excitación y emisión de FAUX Ag<sub>6</sub> al impregnarla con aminas pueden ser explicados basándose en el estudio reportado recientemente por Bun Chan.<sup>96</sup>

Según este estudio y otro reportado por Bacakoba,<sup>2</sup> la emisión de los clústeres luminiscentes es debida no solamente a los átomos de plata del clúster, sino también al ambiente que lo rodea, como las moléculas de agua que se encuentran en las cavidades de la zeolita y los átomos de Si, Al y O, que conforman la zeolita, así como su ordenamiento en la estructura cristalina. Según ambos estudios, para un clúster de plata que se encuentre aislado, la energía del estado singlete excitado y la del estado triplete son tan diferentes, que sería muy poco probable un cruce de intersistemas. Sin embargo, la cercanía de los clústeres de plata a moléculas como agua y átomos como el aluminio provocan un cambio en la estructura electrónica de su entorno que hace que los estados singlete excitado y triplete se traslapen, permitiendo así el cruce de intersistemas del estado singlete excitado al estado triplete y su posterior relajación al estado singlete basal. Lo cual ha sido corroborado en estudios recientes mediante espectroscopía en tiempo resuelto.<sup>97</sup>

En el artículo reportado por Chan se propone un sistema teórico en el que se sustituyen las moléculas de agua de las cavidades de la zeolita con moléculas como  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{PH}_3$ . Se estudian las energías de enlace de estas moléculas con los clústeres luminiscentes de plata, encontrando que las moléculas de amoníaco son las que forman enlaces no covalentes más fuertes y más estables termodinámicamente con los clústeres de plata, superando el enlace de los clústeres con las moléculas de agua. Además, se estudiaron las energías de los estados singlete excitado y triplete para clústeres de plata rodeados por estas moléculas, observándose, en todos los casos traslapes entre los estados singlete excitado y triplete con valores de energía diferentes para cada molécula dentro del rango del visible (2-3 eV), lo que significaría un cambio en la longitud de onda de emisión.

En nuestro caso impregnamos aminas a la zeolita con clústeres, las cuales son derivadas del amonio con 1, 2 o 3 radicales de diferente longitud y ramificación que sustituyen los hidrógenos enlazantes del N, lo que facilita o dificulta el ingreso de estas moléculas a los poros de la zeolita, quedando más cerca o lejos del ambiente de los clústeres de plata.

Debido a que la amina lineal más pequeña utilizada es DETA (ver estructura en **Tabla 3.2**), la cual tiene una mayor facilidad para introducirse en los poros de la zeolita, quedando más cerca de los clústeres luminiscentes de plata y afectando más su ambiente electrónico, se espera que esta provoque un cambio más notorio en su absorción, excitación y emisión que las otras aminas de cadena más grande, tal como se observa en los espectros de la **Figura 3.12**. La siguiente molécula en tamaño es TEPA (ver estructura en **Tabla 3.2**), la cual aún tiene cierta facilidad para introducirse en los poros de la zeolita, sin embargo, debido a su tamaño un poco más grande que DETA, se espera que TEPA quede un poco más alejada o la cantidad de moléculas de TEPA que entren en los poros sea un poco menor, teniendo una interacción con el ambiente electrónico de los clústeres luminiscentes menor a la que tiene DETA, provocando cambios menos pronunciados en la absorción, excitación y emisión, tal como se observó en los espectros de la **Figura 3.12**. Por último, ambos PEI son estructuras ramificadas de un tamaño mucho mayor que las anteriores, por lo cual se espera que se impregnen principalmente en la superficie de la zeolita y no en los poros, quedando más lejos de los clústeres de plata y afectando en menor grado la estructura electrónica de los clústeres, por lo que los cambios en la absorción, excitación y emisión se espera que sean mucho menores que con DETA y TEPA, concordando con los espectros de la **Figura 3.12**.

Con los resultados anteriormente descritos se comprueba la teoría planteada por Chan de una posible sintonización de la longitud de onda de emisión al cambiar las moléculas que rodean a los

clústeres y se verifica que las aminas PEI, PEI/H<sub>2</sub>O, DETA y TEPA han sido impregnadas, ya sea en los poros o en la superficie de las zeolitas dejando grupos funcionales amino disponibles para la bioconjugación con anticuerpos. Sin embargo, pese a las técnicas de caracterización utilizadas no es posible determinar la cantidad de amina impregnada, ni la cantidad de grupos funcionales amino disponibles para la unión con los anticuerpos, así como la distancia entre estos, por lo que, para la siguiente etapa de bioconjugación se utilizaron todas las muestras impregnadas con diferentes porcentajes de aminas y la muestra sin aminas.

### 3.4 BIOCONJUGACIÓN CON ANTICUERPOS ANTI IgG HUMANO

Las gráficas de la **Figura 3.13** muestran los espectros de absorción, excitación y emisión y la **Tabla 3.4** los parámetros de excitación y emisión de las muestras bioconjugadas con anticuerpos anti IgG por medio de atracciones electrostáticas con las aminas o directamente con la superficie de la zeolita. En general, para todas las muestras se observa que, al unirse los anticuerpos, el espectro de absorción mantiene su forma con una desaparición del hombro en 315nm, manteniéndose el hombro en 350nm. Por otra parte, los espectros de excitación de las muestras bioconjugadas con anticuerpos muestran un ligero cambio en la longitud de onda óptima de excitación hacia longitudes de onda menores, comparados con los espectros de excitación de la misma muestra sin anticuerpos, así como una disminución en el FWHM de aproximadamente 30nm.

Es importante recalcar que, tanto para las muestras impregnadas con aminas en su superficie, como para las muestras bioconjugadas con anticuerpos anti IgG, se observa que los espectros de excitación y absorción presentan grandes diferencias ya que el espectro de excitación presenta solamente las transiciones involucradas en el fenómeno excitación-emisión de la partícula fluorescente, mientras que, el espectro de absorción engloba todas las transiciones electrónicas que se llevan a cabo en el sistema, ya sea debidas a fenómenos fotónicos o fonónicos que se llevan a cabo tanto en el clúster, como en la zeolita, las aminas y los anticuerpos.

Además de los cambios antes mencionados, los espectros de emisión de las muestras bioconjugadas con anticuerpos muestran un cambio hacia longitudes de onda mayores de aproximadamente 5 nm con PEI, PEI/H<sub>2</sub>O, 20 nm con TEPA y de poco más de 30 nm con DETA

comparados con los espectros de la misma muestra sin anticuerpos, así como un incremento en el FWHM de aproximadamente 20 nm para PEI, PEI/H<sub>2</sub>O y TEPA y 30 nm para DETA. Estos cambios en la emisión es posible observarlos a simple vista, como lo muestran las fotografías de la **Figura 3.14**. Por otro lado, se observa que las muestras impregnadas con PEI y PEI/H<sub>2</sub>O mantienen un corrimiento de Stokes muy similar al de la muestra sin aminos impregnadas en su superficie, sufriendo solamente un cambio de unos cuantos nm tanto para la muestra sin anticuerpos, como para la muestra con anticuerpos; mientras que, las muestras impregnadas con DETA y TEPA sufren una disminución en el corrimiento de Stokes de aproximadamente 30 y 20 nm, respectivamente, que, al unirse anticuerpos a su superficie se asemeja al corrimiento de Stokes de la muestra sin aminos impregnadas bioconjugada con anticuerpos.

Nuevamente se observa que los cambios más notorios en los espectros los presentan las muestras impregnadas con DETA, ya que, como se mencionó anteriormente, debido a su pequeño tamaño pueden penetrar más los poros de la zeolita y quedar más cerca de los clústeres de plata que las otras aminos. Por lo tanto, los anticuerpos que se unan a la zeolita por medio de enlaces no covalentes con DETA quedarán más cerca de los clústeres de plata que los anticuerpos que se unan a PEI y TEPA, teniendo una mayor interacción con su ambiente electrónico y provocando cambios más bruscos en los estados electrónicos del sistema.

Por otro lado, se observa un ensanchamiento de pico en los espectros de las muestras con anticuerpos anti IgG, lo cual puede ser debido a que al unirse los anticuerpos y formar un complejo más grande, se genera una mayor cantidad de estados electrónicos donde es posible que ocurran transiciones, por lo que la contribución de los decaimientos de estos estados de diferentes energías da como resultado el ensanchamiento del pico de emisión obtenido. Además, el corrimiento hacia longitudes de onda mayores es característico de la unión de anticuerpos a clústeres y otras nanopartículas.<sup>69</sup>

Todos los cambios antes mencionados en los espectros de excitación, absorción y emisión se presentan también en la muestra sin aminos bioconjugadas con anticuerpos, lo que nos indica una unión de anticuerpos mediante atracciones electrostáticas entre los grupos hidroxilo de la superficie de la zeolita y los grupos carboxilo de los anticuerpos probablemente facilitado por una captación física de los anticuerpos dentro de los poros de la zeolita.

Hasta este punto aún no ha sido posible escoger una muestra óptima, por lo que se procedió a la detección del analito utilizando todas las muestras.

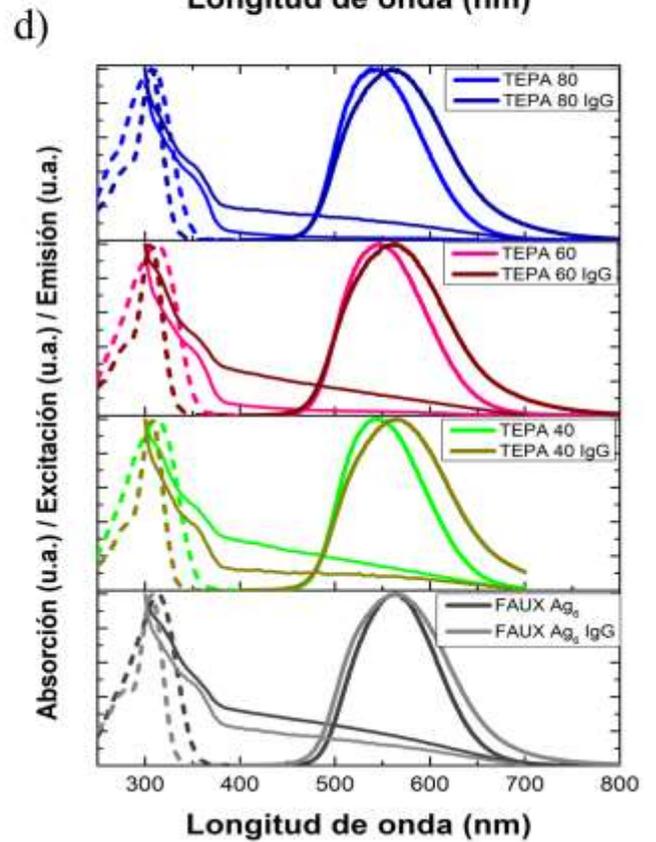
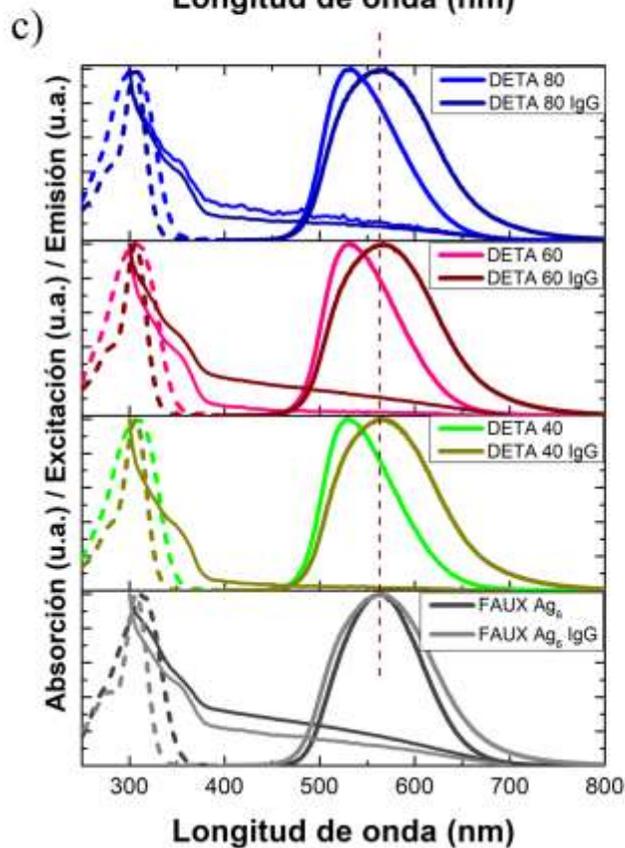
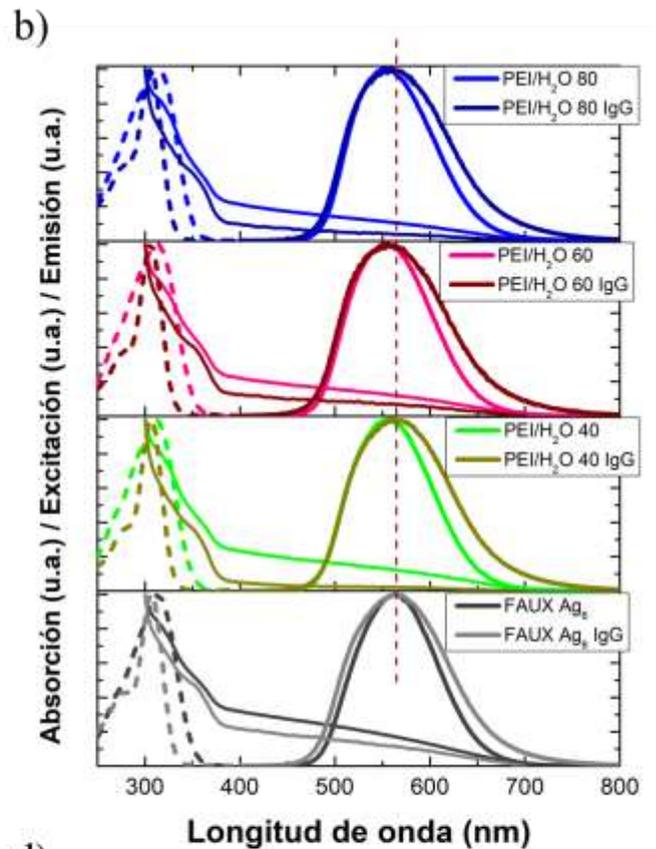
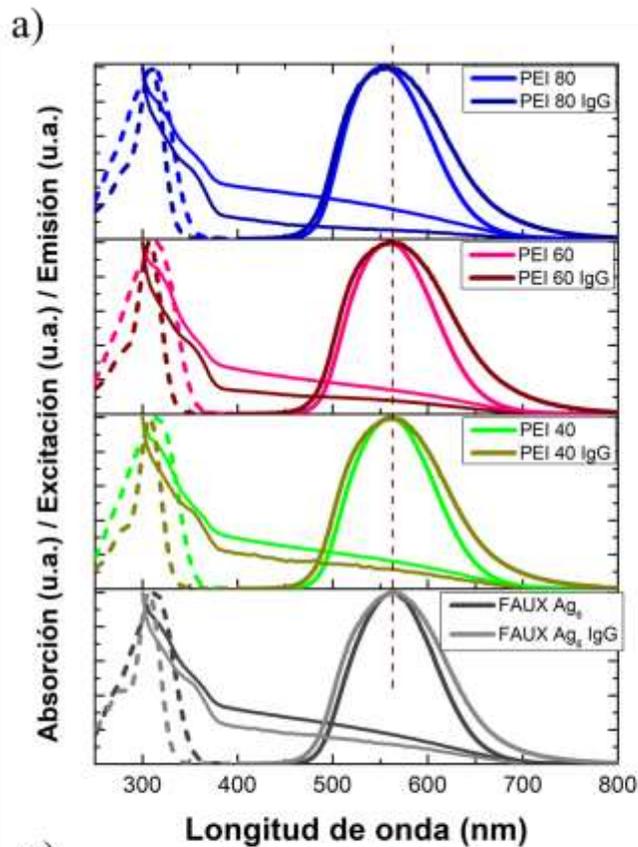


Figura 3.13 Espectros de absorción (línea delgada), excitación (línea punteada) y emisión (línea gruesa) de FAUX Ag<sub>6</sub> impregnado con aminas y bioconjugado con anticuerpos anti IgG humano en solución en agua las muestras sin anticuerpos y en PBS las muestras con anticuerpos, a) PEI, b) PEI/H<sub>2</sub>O, c) DETA, d) TEPA. Longitud de onda de excitación 311 nm muestras sin anticuerpos y 307nm muestras con anticuerpos. Longitud de onda de emisión pico máximo de cada espectro.

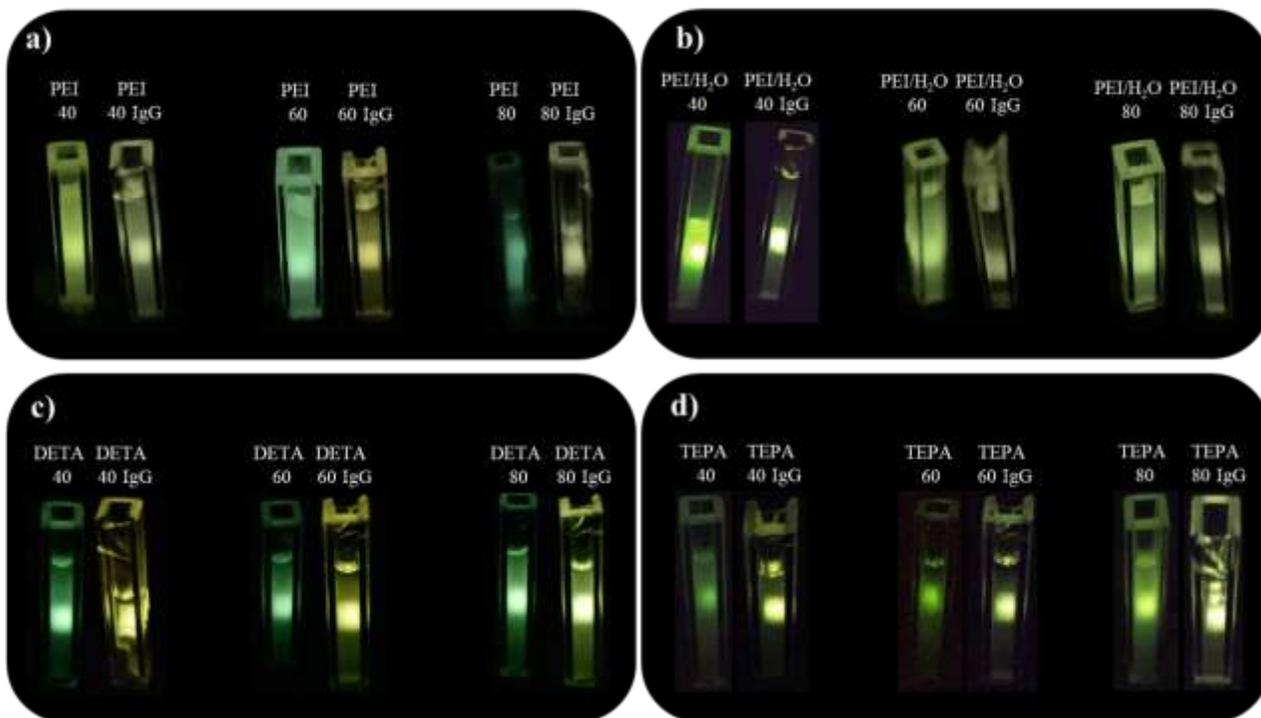


Figura 3.14 Fotografías de muestras excitadas con lámpara de xenón monocromatizada en 311 nm a) PEI y PEI-IgG, b) PEI/H<sub>2</sub>O y PEI/H<sub>2</sub>O-IgG, c) DETA y DETA-IgG, d) TEPA y TEPA-IgG.

Tabla 3.4 Parámetros de excitación y emisión de FAUX Ag<sub>6</sub> impregnado con aminas y bioconjugado con anticuerpos anti IgG.

	$\lambda$ excitación (nm)		FWHM excitación (nm)		$\lambda$ emisión (nm)		FWHM emisión (nm)		$\Delta\lambda$ (Stokes) (nm)	
	Sin IgG	Con IgG	Sin IgG	Con IgG	Sin IgG	Con IgG	Sin IgG	Con IgG	Sin IgG	Con IgG
<b>FAUX Ag6</b>	314 ± 0.5774	307 ± 0.0000	57 ± 0.0000	29 ± 0.7071	562 ± 0.5774	566 ± 2.0616	102 ± 0.5774	123 ± 1.2583	248 ± 0.5774	259 ± 0.5774
<b>PEI 40</b>	314 ± 0.5774	307 ± 0.0000	65 ± 0.0000	28 ± 1.1547	560 ± 2.7538	563 ± 4.3243	104 ± 0.0000	124 ± 0.9832	246 ± 0.0577	256 ± 2.7538
<b>PEI 60</b>	313 ± 2.3805	307 ± 1.1547	64 ± 1.0000	29 ± 1.5000	558 ± 2.7749	563 ± 1.8348	104 ± 3.2016	129 ± 2.3381	245 ± 2.6458	256 ± 3.0056
<b>PEI 80</b>	312 ± 0.5774	310 ± 2.5099	63 ± 0.5774	34 ± 1.7512	554 ± 3.5000	560 ± 3.0496	103 ± 0.5000	126 ± 1.7078	242 ± 2.5106	250 ± 4.3069
<b>PEI/H<sub>2</sub>O 40</b>	311 ± 1.6432	307 ± 1.3038	60 ± 2.1369	28 ± 0.5477	557 ± 1.5119	562 ± 5.5205	102 ± 1.2724	123 ± 1.9149	246 ± 2.0976	255 ± 1.9964
<b>PEI/H<sub>2</sub>O 60</b>	314 ± 1.2910	305 ± 1.4142	63 ± 0.5000	28 ± 0.5000	555 ± 2.7386	558 ± 6.6558	102 ± 0.4082	121 ± 0.7528	241 ± 1.9148	253 ± 3.0822
<b>PEI/H<sub>2</sub>O 80</b>	314 ± 2.3629	307 ± 0.0000	65 ± 2.7080	31 ± 0.5000	554 ± 1.5055	551 ± 9.6902	102 ± 1.3784	122 ± 4.5350	240 ± 2.3629	244 ± 1.5055
<b>DETA 40</b>	311 ± 2.0817	307 ± 1.1547	58 ± 1.1547	29 ± 0.0000	529 ± 1.4832	566 ± 5.6862	86 ± 1.5811	121 ± 0.5774	218 ± 2.3805	259 ± 1.8797
<b>DETA 60</b>	308 ± 1.0000	305 ± 0.5774	60 ± 0.0000	29 ± 0.5774	532 ± 3.5000	567 ± 0.0000	89 ± 0.5000	124 ± 0.5774	224 ± 1.1547	262 ± 3.5473
<b>DETA 80</b>	306 ± 3.6056	306 ± 0.5774	58 ± 0.0000	29 ± 0.5774	533 ± 1.1547	569 ± 4.0415	90 ± 0.0000	122 ± 0.5774	227 ± 3.6061	263 ± 1.1561
<b>TEPA 40</b>	312 ± 0.5774	308 ± 1.0000	64 ± 0.5774	29 ± 0.0000	541 ± 3.5119	564 ± 2.7080	101 ± 0.0000	124 ± 0.9574	229 ± 1.1547	256 ± 3.6515
<b>TEPA 60</b>	313 ± 1.7321	307 ± 1.1547	65 ± 0.0000	30 ± 0.0000	548 ± 2.0000	562 ± 5.0000	103 ± 0.0000	124 ± 0.5774	235 ± 2.0817	255 ± 2.3094
<b>TEPA 80</b>	310 ± 1.0000	306 ± 0.0000	62 ± 1.0000	30 ± 0.5774	539 ± 3.7859	561 ± 3.0000	102 ± 1.1547	122 ± 0.5774	229 ± 1.0000	255 ± 3.7859

### 3.5 DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG MARCADOS CON FITC (ANALITO)

Para corroborar que los anticuerpos IgG marcados con FITC (IgG-FITC) se hayan unido a la sonda de biosensado se interrogó la presencia de FITC en muestras incubadas y lavadas (**Figura 3.15**), ya que se sabe que este fluoróforo presenta emisión en 520 nm al ser excitado con 480 nm. A pesar de la baja concentración de IgG-FITC utilizada y a los lavados realizados, es posible detectar la emisión de FITC en 520 nm al excitar con 480 nm tanto en la muestra que se unen directamente los anticuerpos anti IgG a la zeolita, como en las muestras que contienen aminas. Con lo anterior podemos decir que la sonda de biosensado detecta correctamente el analito IgG-FITC.

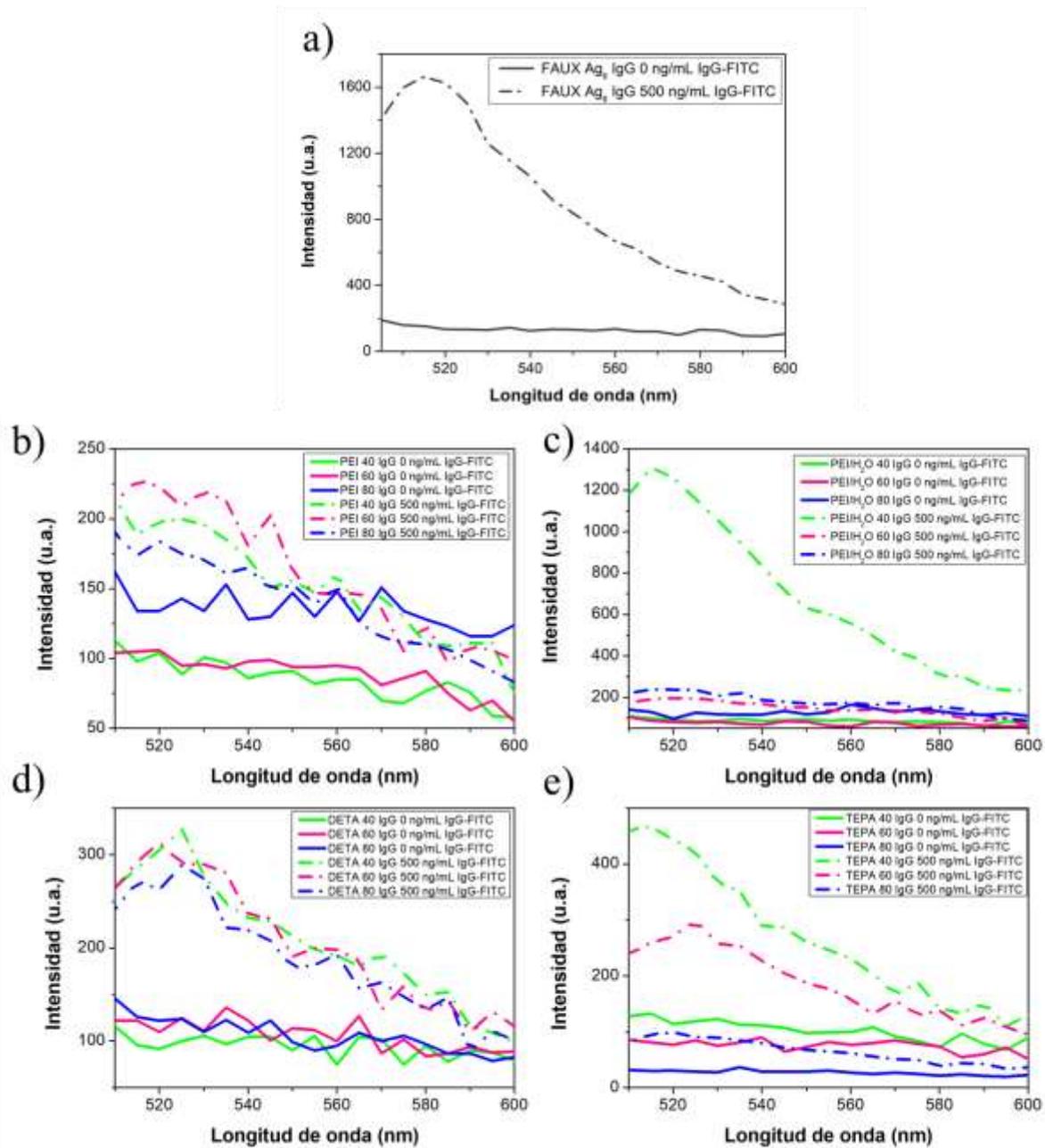
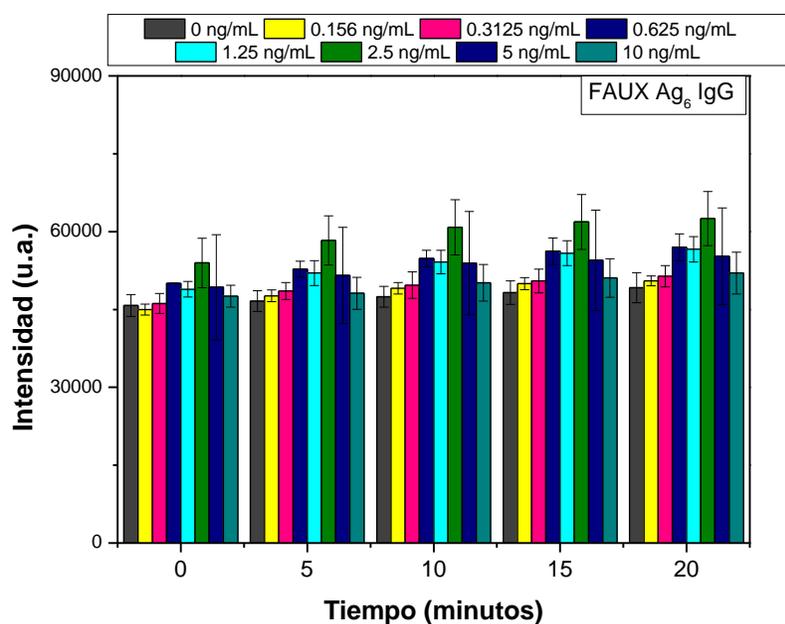


Figura 3.15 Espectros de emisión de FITC en muestras incubadas y lavadas medidas en equipo Cytation 5. Excitación 480nm, a) FAUX Ag<sub>6</sub>-IgG, b) PEI- IgG, c) PEI/H<sub>2</sub>O-IgG, d) DETA-IgG, e) TEPA-IgG.

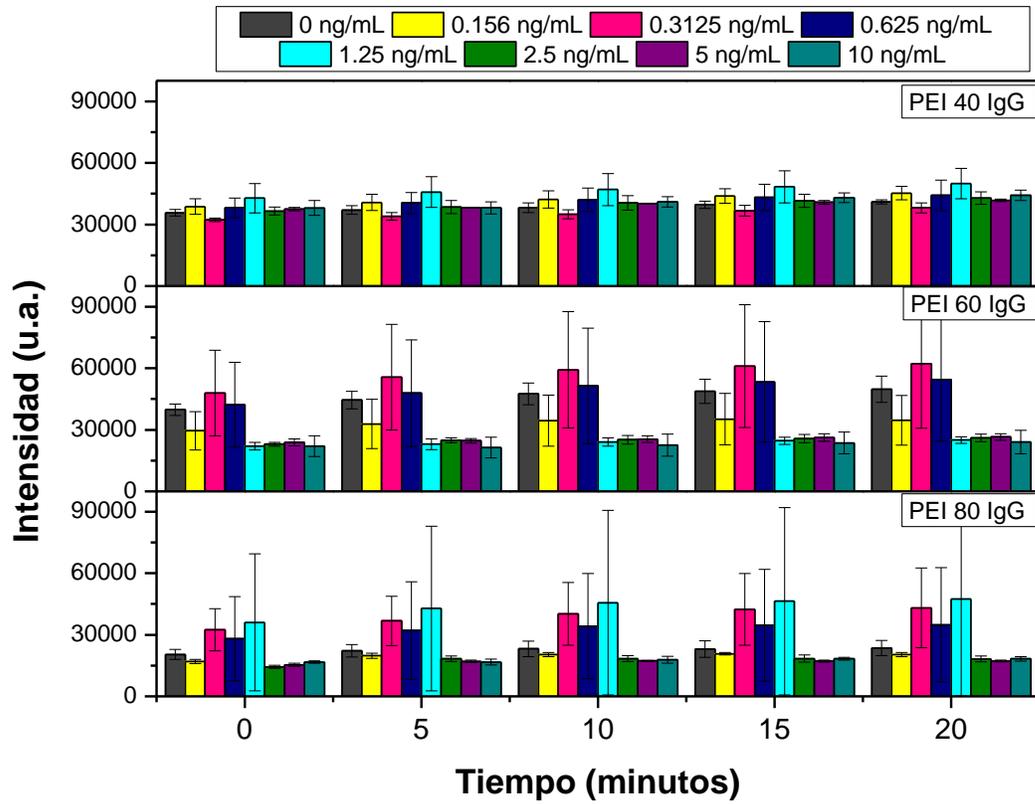
Una vez que se observó que la sonda de biosensado detecta al analito deseado procedemos a evaluar un rango de concentraciones menores (0.156 – 10 ng/mL) en una placa de 96 pocillos, realizando cinéticas de intensidad de emisión en la longitud de onda máxima de emisión medida a través del tiempo, evaluando en todos los casos una muestra control de PBS sin analito (es decir, un

blanco), ver **Figuras 3.16** (cinética de FAUX Ag<sub>6</sub> sin aminas), **3.17** (cinética de partículas con PEI), **3.18** (cinética de partículas con PEI/H<sub>2</sub>O), **3.19** (cinética de partículas con DETA) y **3.20** (cinética de partículas con TEPA). En todos los casos se observó que la intensidad de emisión no cambia después de los 20 minutos, debido a que la interacción entre la sonda de biosensado y el analito se lleva a cabo principalmente en los primeros 15 minutos del fenómeno de biosensado propuesto.

Entre las muestras que presentan un patrón, ya sea de incremento o disminución de la intensidad de emisión en un rango de concentraciones del analito se encuentran FAUX Ag<sub>6</sub>, PEI/H<sub>2</sub>O 40, PEI/H<sub>2</sub>O 80, DETA 60 y TEPA 40, siendo que todas las demás presentan incrementos y disminuciones en la intensidad de emisión sin seguir ningún patrón que pueda relacionar la intensidad de emisión con la concentración del analito, por lo que por el momento se han descartado.



**Figura 3.16** Cinética de los primeros 20 min de interacción de la sonda de biosensado FAUX Ag<sub>6</sub>-IgG (0.5 mg/mL) con diferentes concentraciones de IgG-FITC en sistema coloidal de PBS medida con equipo Cytation 5. Longitud de onda de excitación 320nm, longitud de onda de detección 565nm (parámetros optimizados con equipo Cytation 5).



**Figura 3.17** Cinética de los primeros 20 min de interacción de la sonda de biosensado PEI-IgG (0.5 mg/mL) con diferentes concentraciones de IgG-FITC en sistema coloidal de PBS medida con equipo Cytation 5. Longitud de onda de excitación 320nm, longitud de onda de detección 565nm (parámetros optimizados con equipo Cytation 5).

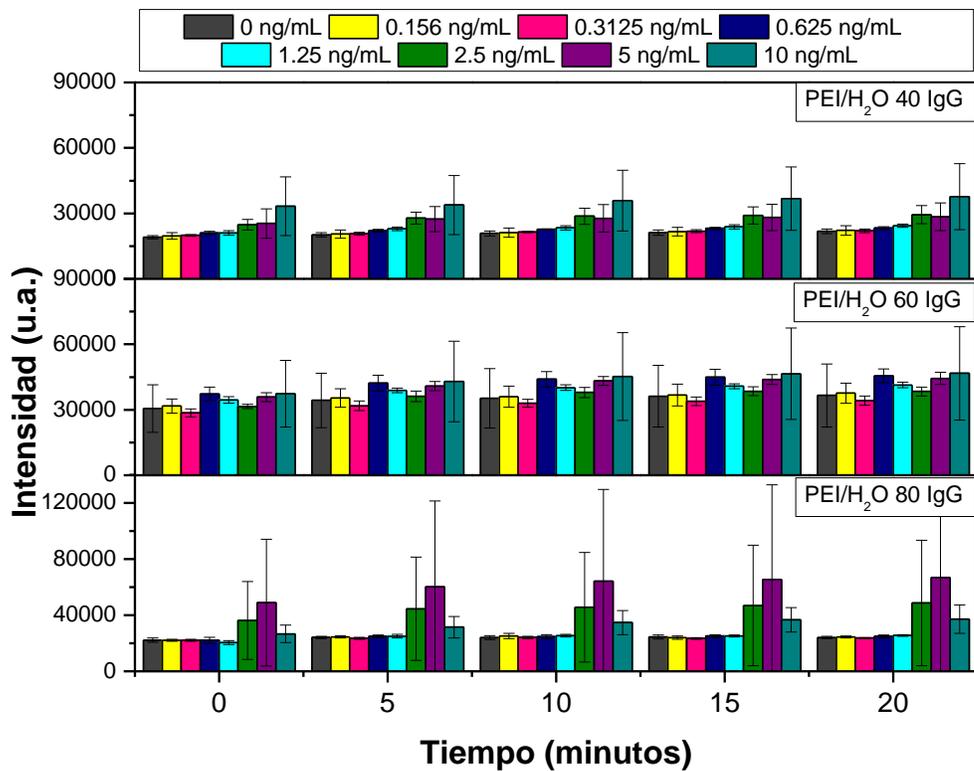


Figura 3.18 Cinética de los primeros 20 min de interacción de la sonda de biosensado PEI/H<sub>2</sub>O-IgG (0.5 mg/mL) con diferentes concentraciones de IgG-FITC en sistema coloidal de PBS medida con equipo Cytation 5. Longitud de onda de excitación 320nm, longitud de onda de detección 565nm (parámetros optimizados con equipo Cytation 5).

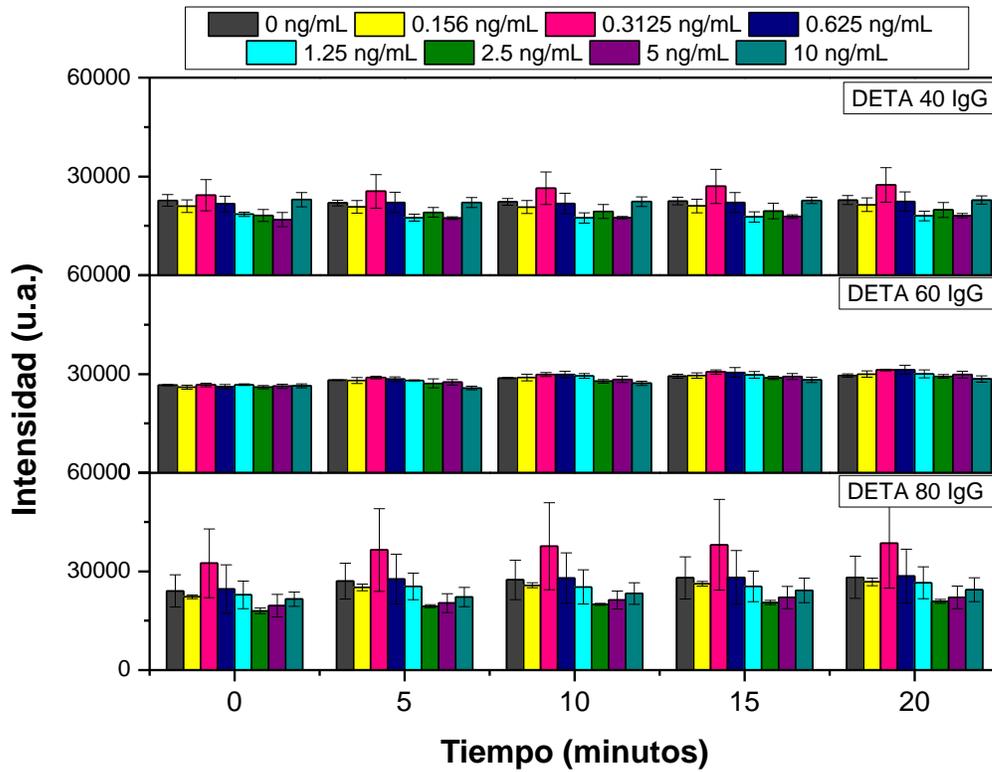
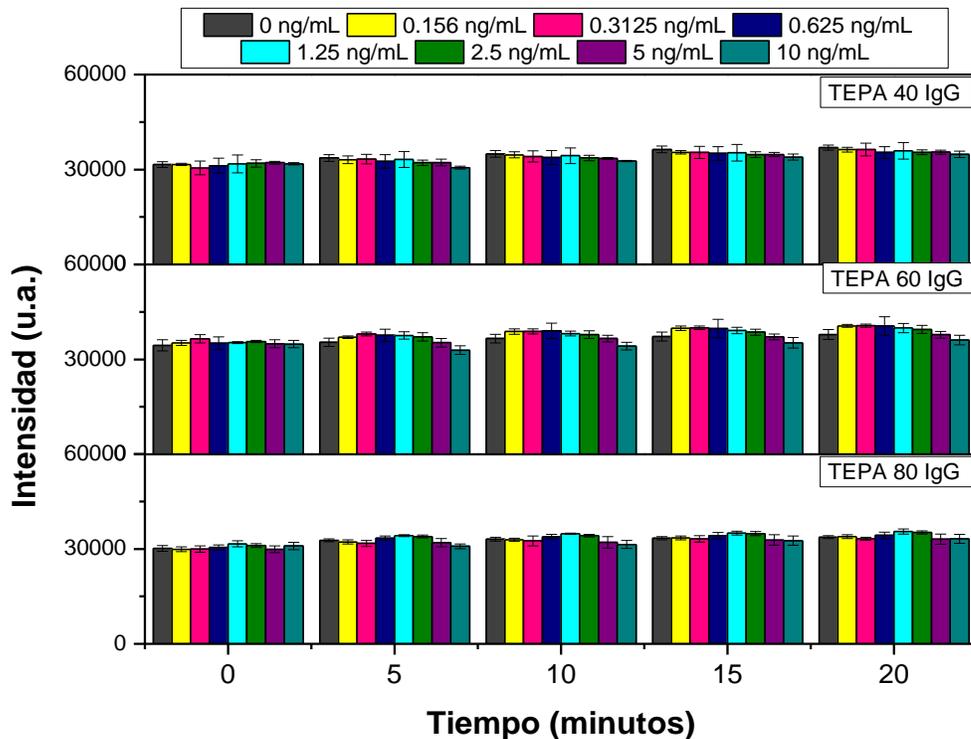


Figura 3.19 Cinética de los primeros 20 min de interacción de la sonda de biosensado DETA-IgG (0.5 mg/mL) con diferentes concentraciones de IgG-FITC en sistema coloidal de PBS medida con equipo Cytation 5. Longitud de onda de excitación 320nm, longitud de onda de detección 565nm (parámetros optimizados con equipo Cytation 5).



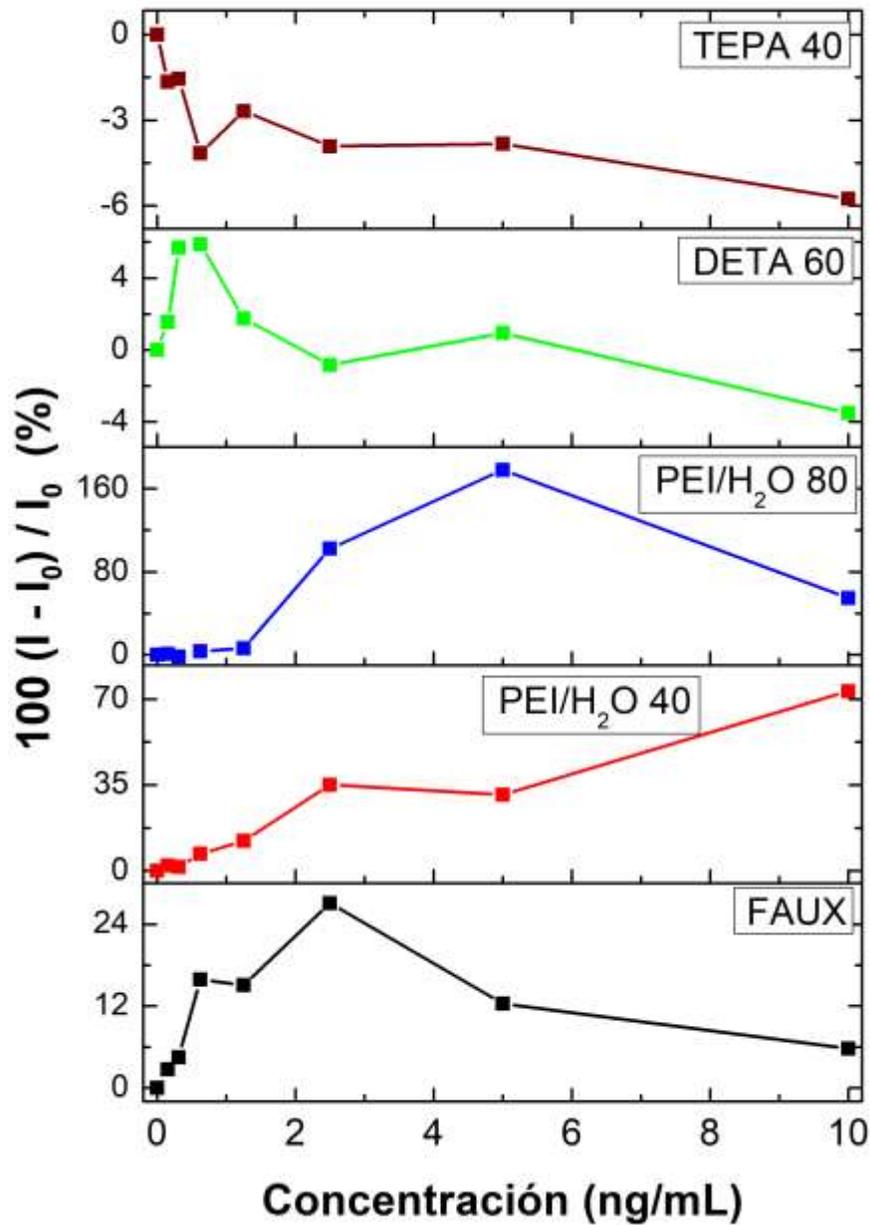
**Figura 3.20** Cinética de los primeros 20 min de interacción de la sonda de biosensado TEPA-IgG (0.5 mg/mL) con diferentes concentraciones de IgG-FITC en sistema coloidal de PBS medida con equipo Cytation 5. Longitud de onda de excitación 320nm, longitud de onda de detección 565nm (parámetros optimizados con equipo Cytation 5).

En cuanto a las muestras con posibles patrones lineales, se les realizó un análisis de las concentraciones en las que siguen un rango lineal graficándose la concentración de analito contra diferencia de intensidad de emisión de la muestra con analito, menos la muestra con PBS sin analito  $100(I - I_0)/I_0$ , medidas ambas a los 20 minutos, como se observa en la **Figura 3.21**.

Se puede observar que FAUX Ag<sub>6</sub> IgG presenta un incremento en la intensidad de emisión con las primeras 5 concentraciones (0.156 ng/mL, 0.3125 ng/mL, 0.625 ng/mL, 1.25 ng/mL y 2.5 ng/mL) sin embargo, a partir de 5 ng/mL sufre una disminución en la intensidad de emisión que puede ser asociada a una saturación debido a la concentración del analito. PEI/H<sub>2</sub>O 40 y PEI/H<sub>2</sub>O 80 muestran un incremento en la intensidad de emisión conforme se incrementa la concentración de IgG-FITC, siendo 10 ng/mL la máxima evaluada y la que presenta intensidad de emisión máxima con PEI/H<sub>2</sub>O 40 IgG, mientras que PEI/H<sub>2</sub>O 80 IgG presenta intensidad de emisión máxima con 5 ng/mL y una posterior disminución con 10 ng/mL que también puede atribuirse a una saturación. Sin embargo,

el error que presenta esta última muestra con las 2 concentraciones de mayor intensidad de emisión es más grande que la magnitud de la intensidad misma (**Figura 3.18**), por lo que esta segunda muestra fue descartada.

Por otro lado, DETA 60 IgG y TEPA 40 IgG presentan una ligera disminución en la intensidad de emisión que pudiera ser atribuible a una relación concentración de analito-intensidad de emisión, siendo en el caso de DETA 60 IgG a partir de 1.25 ng/mL.

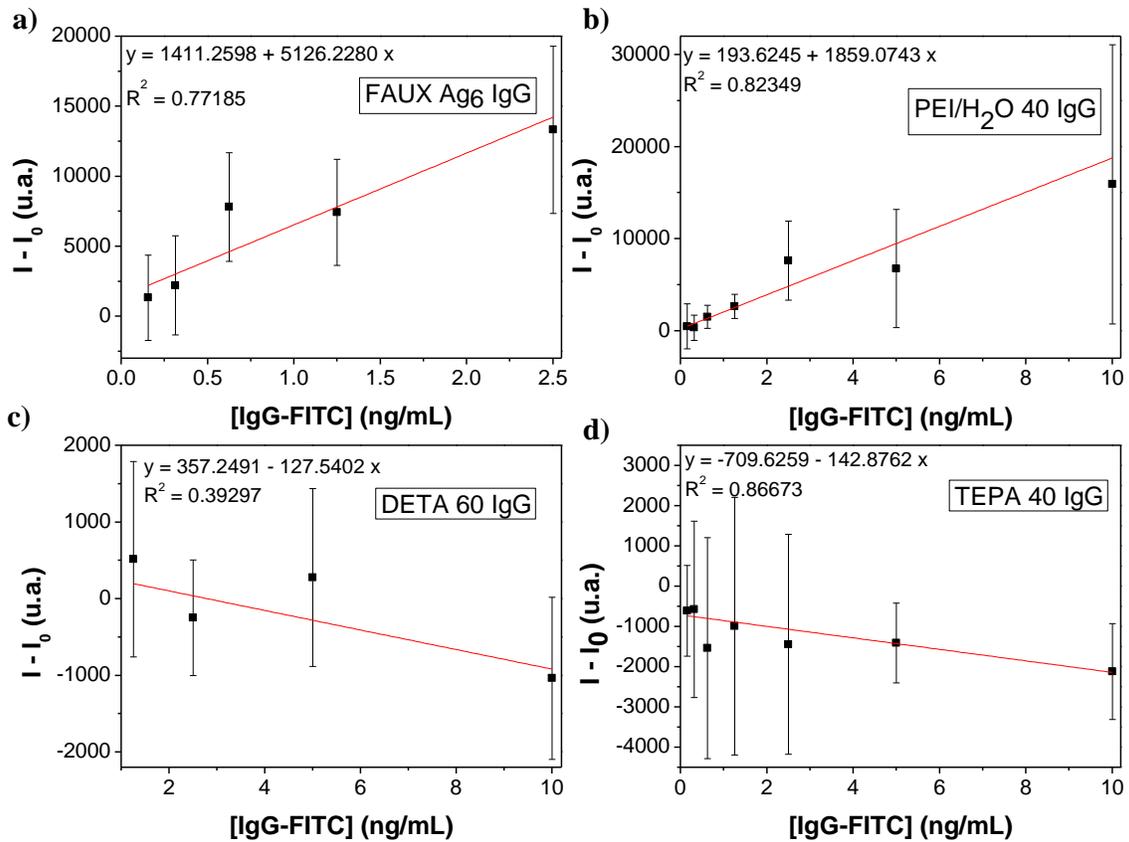


**Figura 3.21 Gráfica de concentración de IgG-FITC contra relación  $100(I - I_0)/I_0$ , donde I es la emisión de la sonda con IgG-FITC a diferentes concentraciones,  $I_0$  es la emisión de la sonda con 0 ng/mL de IgG-FITC ambas medidas a los 20 minutos de reacción.**

En los rangos antes mencionados, en los que se cree existe una linealidad en la relación concentración de analito-intensidad de emisión se realizó un ajuste de mínimos cuadrados para evaluar la linealidad del sistema, presentándose los resultados en la **Figura 3.22**, así como una tabla con los rangos de detección lineal y límite de detección ( $3\sigma$  de 0ng/mL IgG-FITC) obtenido con cada muestra (**Tabla 3.5**).

El  $R^2$  de FAUX Ag<sub>6</sub> de 0.77185 se encuentra lejos de la linealidad, pero su límite de detección es el menor de todos de 0.9454 ng/mL, mientras que PEI/H<sub>2</sub>O 40 IgG presenta un  $R^2$  de 0.82349 con un límite de detección de 1.1242 ng/mL. Por otro lado, para las dos muestras que presentan disminución en la intensidad de emisión (DETA 60 IgG y TEPA 40 IgG) se obtienen  $R^2$  de 0.39297 y 0.86673, respectivamente, sin embargo, el límite de detección de presenta valores negativos para ambas muestras, por lo que sabemos que el sistema aún no está optimizado para la detección del analito.

Si bien los resultados obtenidos para el biosensado no son los esperados y el sistema aún no está optimizado, se han determinado los dos mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la detección del analito: incremento en la intensidad de emisión y apagamiento de la emisión. Así mismo, se han seleccionado las concentraciones de cada amina que permiten la detección del analito para poder continuar la optimización del sistema en trabajos futuros.



**Figura 3.22** Ajuste lineal de las gráficas de concentración de IgG-FITC contra diferencia de intensidades de emisión de la muestra con el analito menos la muestra con 0 ng/mL de IgG-FITC ( $I - I_0$ ), a) FAUX Ag<sub>6</sub> IgG, b) PEI/H<sub>2</sub>O 40-IgG, c) DETA 60-IgG, d) TEPA 40-IgG.

**Tabla 3.5** Rango de detección lineal y límite de detección calculados a partir del ajuste lineal de FAUX Ag<sub>6</sub> IgG, PEI/H<sub>2</sub>O 40-IgG, DETA 60-IgG y TEPA 40-IgG.

	Rango de detección lineal (ng/mL)	Límite de detección $3\sigma$ (ng/mL)
FAUX Ag <sub>6</sub> IgG	0.156 - 2.5	0.9454
PEI/H <sub>2</sub> O 40 IgG	0.156 - 10	1.1242
DETA 60 IgG	1.25 - 10	-1.9534
TEPA 40 IgG	0.156 - 10	-23.8445

## 4 CONCLUSIONES

---

La disminución de tamaño de las zeolitas fue óptima para mantener el sistema coloidal en suspensión durante el tiempo de biosensado, además de mantener la estructura cristalina necesaria para la formación de los clústeres luminiscentes de plata.

La metodología utilizada para la impregnación de aminas en la superficie de las zeolitas fue exitosa, permitiendo la unión por atracciones electrostáticas entre los grupos amino positivos y los grupos carboxilo negativos de los anticuerpos anti IgG humano. Además de que, la unión de estas aminas de diferente longitud y ramificación de cadena permite llevar a cabo una sintonización en la longitud de onda de emisión del sistema.

Por último, podemos concluir que los clústeres de plata confinados en zeolitas son especies fotoluminiscentes que permiten la detección de biomoléculas (IgG) en concentraciones bajas (ng/mL) en un tiempo muy corto (5 minutos). Sin embargo, aún falta explorar la optimización del sistema analítico en términos de límite de detección, especificidad, exactitud y precisión.

## 5 TRABAJO A FUTURO

---

Evaluar la cantidad de cada amina (PEI, PEI/H<sub>2</sub>O, DETA y TEPA) impregnada en la zeolita con las diferentes concentraciones utilizadas, así como su localización, ya sea en los poros o en la superficie de esta.

Estudiar el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo el desplazamiento en la longitud de onda de excitación y emisión de los clústeres de plata tanto al impregnar la zeolita con las diferentes aminas, como al incorporar los anticuerpos, basándose en el artículo teórico reportado por Chan.<sup>96</sup> Así como hacer un estudio sistemático que permita descartar que estos cambios en la longitud de onda de emisión sean debidos a esparcimiento de la luz dentro del sistema coloidal.

Optimizar el sistema de biosensado para la detección de anticuerpos IgG-FITC utilizando las muestras determinadas como las mejores tanto mediante el mecanismo de incremento en la señal de emisión, como mediante el mecanismo de apagamiento de la emisión.

Utilizar este sistema de biosensado para detección de algún otro analito de importancia clínica o biológica, evaluando las concentraciones adecuadas para esto.

## 6 PERSPECTIVAS

---

Se espera que este sistema de biosensado sea optimizado, de tal forma que la relación lineal entre la concentración de analito y la intensidad de emisión tenga un comportamiento lineal con más del 90% de confiabilidad.

Una vez optimizado, se espera que tenga la sensibilidad necesaria para detectar analitos en concentraciones inferiores a los ng/mL con una alta especificidad.

Se espera también, que debido a la facilidad de su síntesis y funcionalización, tenga un impacto positivo en la detección de biomoléculas y sea probado para la detección de otro tipo de analitos de importancia clínica.

## REFERENCIAS

---

1. Copp, S. M., Faris, A., Swasey, S. M. & Gwinn, E. G. Heterogeneous Solvatochromism of Fluorescent DNA-Stabilized Silver Clusters Precludes Use of Simple Onsager-Based Stokes Shift Models. *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 698–703 (2016).
2. Bacakova, L., Vandrovцова, M., Kopova, I. & Jirka, I. Applications of zeolites in biotechnology and medicine – a review. *Biomater. Sci.* **6**, 974–989 (2018).
3. Schultz, D. *et al.* Evidence for rod-shaped DNA-stabilized silver nanocluster emitters. *Adv. Mater.* **25**, 2797–2803 (2013).
4. Huang, X.-F., Ren, B.-X., Peng, C.-F., Wei, X.-L. & Xie, Z.-J. Fluorescent sensing of mercury (II) and copper (II) ions based on DNA-templated Cu/Ag nanoclusters. *Microchem. J.* **158**, 105214 (2020).
5. Roy, S., Baral, A. & Banerjee, A. Tuning of Silver Cluster Emission from Blue to Red Using a Bio-Active Peptide in Water. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 4050–4056 (2014).
6. Li, D., Li, B. & Yang, S. I. A selective fluorescence turn-on sensing system for evaluation of Cu<sup>2+</sup> polluted water based on ultra-fast formation of fluorescent copper nanoclusters. *Anal. Methods* **7**, 2278–2282 (2015).
7. Qu, F., Yang, Q., Wang, B. & You, J. Aggregation-induced emission of copper nanoclusters triggered by synergistic effect of dual metal ions and the application in the detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and related biomolecules. *Talanta* **207**, 120289 (2020).
8. Khandelwal, P. & Poddar, P. Fluorescent metal quantum clusters: an updated overview of the synthesis, properties, and biological applications. *J. Mater. Chem. B* **5**, 9055–9084 (2017).
9. Baekelant, W. *et al.* Confinement of Highly Luminescent Lead Clusters in Zeolite A. *J. Phys. Chem. C* **122**, 13953–13961 (2018).
10. Karka, S., Kodukula, S., Nandury, S. V & Pal, U. Polyethylenimine-Modified Zeolite 13X for CO<sub>2</sub> Capture: Adsorption and Kinetic Studies. *ACS Omega* **4**, 16441–16449 (2019).
11. Chai, Y. *et al.* Noble Metal Particles Confined in Zeolites: Synthesis, Characterization, and Applications. *Adv. Sci.* **6**, 1900299 (2019).
12. Jia, M. *et al.* Peptide-capped functionalized Ag/Au bimetal nanoclusters with enhanced red

- fluorescence for lysosome-targeted imaging of hypochlorite in living cells. *Talanta* **216**, 120926 (2020).
13. Ganguly, M., Jana, J., Pal, A. & Pal, T. Synergism of gold and silver invites enhanced fluorescence for practical applications. *RSC Adv.* **6**, 17683–17703 (2016).
  14. Jin, R., Zeng, C., Zhou, M. & Chen, Y. Atomically Precise Colloidal Metal Nanoclusters and Nanoparticles: Fundamentals and Opportunities. *Chem. Rev.* **116**, 10346–10413 (2016).
  15. Lee, K.-S. & El-Sayed, M. A. Gold and Silver Nanoparticles in Sensing and Imaging: Sensitivity of Plasmon Response to Size, Shape, and Metal Composition. *J. Phys. Chem. B* **110**, 19220–19225 (2006).
  16. Petty, J. T., Story, S. P., Hsiang, J.-C. & Dickson, R. M. DNA-Templated Molecular Silver Fluorophores. *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 1148–1155 (2013).
  17. Harb, M. *et al.* Optical absorption of small silver clusters: Ag<sub>n</sub> (n=4–22). *J. Chem. Phys.* **129**, 194108 (2008).
  18. Li, Y. *et al.* One-pot synthesis of green-emitting gold nanoclusters as a fluorescent probe for determination of 4-nitrophenol. *Microchim. Acta* **187**, 106 (2020).
  19. Wang, Z.-G., Liu, Q., Li, N. & Ding, B. DNA-Based Nanotemplate Directed In Situ Synthesis of Silver Nanoclusters with Specific Fluorescent Emission: Surface-Guided Chemical Reactions. *Chem. Mater.* **28**, 8834–8841 (2016).
  20. Schultz, D. *et al.* Dual-Color Nanoscale Assemblies of Structurally Stable, Few-Atom Silver Clusters, As Reported by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *ACS Nano* **7**, 9798–9807 (2013).
  21. Goel, S., Zones, S. I. & Iglesia, E. Encapsulation of Metal Clusters within MFI via Interzeolite Transformations and Direct Hydrothermal Syntheses and Catalytic Consequences of Their Confinement. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 15280–15290 (2014).
  22. Petty, J. T., Ganguly, M., Rankine, I. J., Chevrier, D. M. & Zhang, P. A DNA-Encapsulated and Fluorescent Ag<sub>106+</sub> Cluster with a Distinct Metal-Like Core. *J. Phys. Chem. C* **121**, 14936–14945 (2017).
  23. Ramazanov, R. R. & Kononov, A. I. Excitation Spectra Argue for Threadlike Shape of DNA-Stabilized Silver Fluorescent Clusters. *J. Phys. Chem. C* **117**, 18681–18687 (2013).
  24. Kulesza, A., Mitrić, R. & Bonačić-Koutecký, V. Silver Cluster Chromophores for Absorption Enhancement of Peptides. *J. Phys. Chem. A* **113**, 3783–3788 (2009).

25. Zhang, L. & Wang, E. Metal nanoclusters: New fluorescent probes for sensors and bioimaging. *Nano Today* **9**, 132–157 (2014).
26. Si, N. T., Nhung, N. T. A., Bui, T. Q., Nguyen, M. T. & Nhat, P. V. Gold nanoclusters as prospective carriers and detectors of pramipexole. *RSC Adv.* **11**, 16619–16632 (2021).
27. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer, 1983).
28. Coutiño-Gonzalez, E., Roeffaers, M. & Hofkens, J. Highly Luminescent Metal Clusters Confined in Zeolites. in *Dyes and Photoactive Molecules in Microporous Systems* (eds. Martínez, V. & Arbeloa, F. L.) 75–103 (Springer International Publishing, 2020).
29. Wang, C. *et al.* Fluorescent silver nanoclusters as effective probes for highly selective detection of mercury(II) at parts-per-billion levels. *Chem. Asian J.* **7**, 1652–1656 (2012).
30. Nain, A. *et al.* Capping 1,3-propanedithiol to boost the antibacterial activity of protein-templated copper nanoclusters. *J. Hazard. Mater.* **389**, 121821 (2020).
31. Huang, Z. *et al.* The exploration of novel fluorescent copper–cysteamine nanosheets for sequential detection of Fe<sup>3+</sup> and dopamine and fabrication of molecular logic circuits. *J. Mater. Chem. C* **8**, 12935–12942 (2020).
32. Feng, T., Chen, Y., Feng, B., Yan, J. & Di, J. Fluorescence red-shift of gold-silver nanoclusters upon interaction with cysteine and its application. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **206**, 97–103 (2019).
33. Vaezi, Z., Azizi, M., Sadeghi Mohammadi, S., Hashemi, N. & Naderi-Manesh, H. A novel iron quantum cluster confined in hemoglobin as fluorescent sensor for rapid detection of Escherichia coli. *Talanta* **218**, 121137 (2020).
34. Mora-Sanz, V., Saa, L., Briz, N., Möller, M. & Pavlov, V. Antibody-Directed Synthesis of Catalytic Nanoclusters for Bioanalytical Assays. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**, 28993–28999 (2020).
35. Petty, J. T. *et al.* A DNA-Encapsulated Silver Cluster and the Roles of Its Nucleobase Ligands. *J. Phys. Chem. C* **122**, 28382–28392 (2018).
36. Zhang, Y., He, C., Petty, J. T. & Kohler, B. Time-Resolved Vibrational Fingerprints for Two Silver Cluster-DNA Fluorophores. *J. Phys. Chem. Lett.* **11**, 8958–8963 (2020).
37. Soto-Verdugo, V., Metiu, H. & Gwinn, E. The properties of small Ag clusters bound to DNA bases. *J. Chem. Phys.* **132**, 195102 (2010).
38. Li, C. *et al.* Guanine-Lighting-Up Fluorescence Biosensing of Silver Nanoclusters Populated in

- Functional DNA Constructs by a pH-Triggered Switch. *Anal. Chem.* **92**, 13369–13377 (2020).
39. Copp, S. M. *et al.* Magic Numbers in DNA-Stabilized Fluorescent Silver Clusters Lead to Magic Colors. *J. Phys. Chem. Lett.* **5**, 959–963 (2014).
  40. Yeh, H.-C. *et al.* A Fluorescence Light-Up Ag Nanocluster Probe That Discriminates Single-Nucleotide Variants by Emission Color. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11550–11558 (2012).
  41. Nagda, R., Shah, P., Lee, C. S., Park, S. & Yang, S. W. Structural Influence on the Post-Clustering Stability of DNA/AgNCs Fluorescence. *Nanomater. (Basel, Switzerland)* **9**, 667 (2019).
  42. Fenwick, O. *et al.* Tuning the energetics and tailoring the optical properties of silver clusters confined in zeolites. *Nat. Mater.* **15**, 1017–1022 (2016).
  43. Coutino-Gonzalez, E. *et al.* Thermally activated LTA(Li)–Ag zeolites with water-responsive photoluminescence properties. *J. Mater. Chem. C* **3**, 11857–11867 (2015).
  44. De Cremer, G. *et al.* Characterization of Fluorescence in Heat-Treated Silver-Exchanged Zeolites. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 3049–3056 (2009).
  45. Coutino-Gonzalez, E. *et al.* Determination and Optimization of the Luminescence External Quantum Efficiency of Silver-Clusters Zeolite Composites. *J. Phys. Chem. C* **117**, 6998–7004 (2013).
  46. Coutino-Gonzalez, E., Baekelant, W., Dieu, B., Roeyfaers, M. B. J. & Hofkens, J. Nanostructured Ag-zeolite Composites as Luminescence-based Humidity Sensors. *J. Vis. Exp.* 54674 (2016).  
doi:10.3791/54674
  47. Baekelant, W. *et al.* Shaping the Optical Properties of Silver Clusters Inside Zeolite A via Guest–Host–Guest Interactions. *J. Phys. Chem. Lett.* **9**, 5344–5350 (2018).
  48. Shao, C. *et al.* Dithiothreitol-capped red emitting copper nanoclusters as highly effective fluorescent nanoprobe for cobalt (II) ions sensing. *Microchem. J.* **163**, 105922 (2021).
  49. Chen, P.-C., Periasamy, A. P., Harroun, S. G., Wu, W.-P. & Chang, H.-T. Photoluminescence sensing systems based on copper, gold and silver nanomaterials. *Coord. Chem. Rev.* **320–321**, 129–138 (2016).
  50. Wang, Y., Chen, T., Zhang, Z. & Ni, Y. Cytidine-stabilized copper nanoclusters as a fluorescent probe for sensing of copper ions and hemin. *RSC Adv.* **8**, 9057–9062 (2018).
  51. Li, D. *et al.* One-pot development of water soluble copper nanoclusters with red emission and aggregation induced fluorescence enhancement. *RSC Adv.* **6**, 34090–34095 (2016).

52. Luo, Z. *et al.* From Aggregation-Induced Emission of Au(I)–Thiolate Complexes to Ultrabright Au(0)@Au(I)–Thiolate Core–Shell Nanoclusters. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 16662–16670 (2012).
53. Ouyang, X. *et al.* DNA Nanoribbon-Templated Self-Assembly of Ultrasmall Fluorescent Copper Nanoclusters with Enhanced Luminescence. *Angew. Chemie Int. Ed.* **59**, 11836–11844 (2020).
54. Zhang, H. *et al.* Clusterization-triggered emission: Uncommon luminescence from common materials. *Mater. Today* **32**, 275–292 (2020).
55. Wang, C. *et al.* Dual-emission fluorescence sensor based on biocompatible bovine serum albumin stabilized copper nanoclusters for ratio and visualization detection of hydrogen peroxide. *Dye. Pigment.* **190**, 109312 (2021).
56. Su, Y., Qi, L., Mu, X. & Wang, M. A fluorescent probe for sensing ferric ions in bean sprouts based on l-histidine-stabilized gold nanoclusters. *Anal. Methods* **7**, 684–689 (2015).
57. Tai, Y.-T., Simon, T., Chu, Y.-Y. & Ko, F.-H. One-pot synthesis of copper nanoconjugate materials as luminescent sensor for Fe<sup>3+</sup> and I<sup>-</sup> detection in human urine sample. *Sens. Bio-Sensing Res.* **27**, 100319 (2020).
58. Hu, Y.-L. *et al.* Modulating fluorescence emission of l-methionine-stabilized Au nanoclusters from green to red and its application for visual detection of silver ion. *Microchem. J.* **166**, 106198 (2021).
59. Qiu, Q., Gao, R.-R., Xie, A., Jiao, Y. & Dong, W. A ratiometric fluorescent sensor with different DNA-templated Ag NCs as signals for ATP detection. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **400**, 112725 (2020).
60. Liu, Z. *et al.* Novel fluorescence immunoassay for the detection of zearalenone using HRP-mediated fluorescence quenching of gold-silver bimetallic nanoclusters. *Food Chem.* **355**, 129633 (2021).
61. Yao, D., Wang, Y. & Li, H. Silver clusters based sensor for Low content formaldehyde detection in colorimetric and fluorometric dual Mode. *Sensors Actuators B Chem.* **305**, 127451 (2020).
62. Shokri, E. *et al.* Virus-directed synthesis of emitting copper nanoclusters as an approach to simple tracer preparation for the detection of Citrus Tristeza Virus through the fluorescence anisotropy immunoassay. *Sensors Actuators B Chem.* **321**, 128634 (2020).
63. An, M. *et al.* Cu<sup>2+</sup> enhanced fluorescent Ag nanoclusters with tunable emission from red to yellow and the application for Ag<sup>+</sup> sensing. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **252**, 119484 (2021).
64. Wang, Y. *et al.* Bio-inspired peptide-Au cluster applied for mercury (II) ions detection. *Sci. China*

*Chem.* **58**, 819–824 (2015).

65. Nain, A. *et al.* Tuning the photoluminescence of metal nanoclusters for selective detection of multiple heavy metal ions. *Sensors Actuators B Chem.* **321**, 128539 (2020).
66. Rajamanikandan, R., Aazaad, B., Lakshmipathi, S. & Ilanchelian, M. Glutathione functionalized copper nanoclusters as a fluorescence platform for specific biosensing of cysteine and application in cellular imaging. *Microchem. J.* **158**, 105253 (2020).
67. Lei, T. *et al.* Nano-fluorescent probes based on DNA-templated copper nanoclusters for fast sensing of thiocyanate. *New J. Chem.* **44**, 17296–17301 (2020).
68. Zhu, N. *et al.* A novel fluorescence immunoassay based on AgNCs and ALP for ultrasensitive detection of sulfamethazine (SMZ) in environmental and biological samples. *Talanta* **199**, 72–79 (2019).
69. Alonso, M. C., Trapiella-Alfonso, L., Fernández, J. M. C., Pereiro, R. & Sanz-Medel, A. Functionalized gold nanoclusters as fluorescent labels for immunoassays: Application to human serum immunoglobulin E determination. *Biosens. Bioelectron.* **77**, 1055–1061 (2016).
70. Sapsford, K. E. *et al.* Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *Chem. Rev.* **113**, 1904–2074 (2013).
71. Bagwe, R. P., Zhao, X. & Tan, W. Bioconjugated Luminescent Nanoparticles for Biological Applications. *J. Dispers. Sci. Technol.* **24**, 453–464 (2003).
72. Aubin-Tam, M.-E. & Hamad-Schifferli, K. Structure and function of nanoparticle-protein conjugates. *Biomed. Mater.* **3**, 34001 (2008).
73. Vashist, S. K., Lam, E., Hrapovic, S., Male, K. B. & Luong, J. H. T. Immobilization of Antibodies and Enzymes on 3-Aminopropyltriethoxysilane-Functionalized Bioanalytical Platforms for Biosensors and Diagnostics. *Chem. Rev.* **114**, 11083–11130 (2014).
74. Acres, R. G. *et al.* Molecular Structure of 3-Aminopropyltriethoxysilane Layers Formed on Silanol-Terminated Silicon Surfaces. *J. Phys. Chem. C* **116**, 6289–6297 (2012).
75. Hu, X. (Eric) *et al.* A review of N-functionalized solid adsorbents for post-combustion CO<sub>2</sub> capture. *Appl. Energy* **260**, 114244 (2020).
76. Hanim, S. A. M., Malek, N. A. N. N. & Ibrahim, Z. Amine-functionalized, silver-exchanged zeolite NaY: Preparation, characterization and antibacterial activity. *Appl. Surf. Sci.* **360**, 121–130 (2016).
77. Huang, A., Wang, N. & Caro, J. Seeding-free synthesis of dense zeolite FAU membranes on 3-

- aminopropyltriethoxysilane-functionalized alumina supports. *J. Memb. Sci.* **389**, 272–279 (2012).
78. Li, Z., Luppi, G., Geiger, A., Josel, H.-P. & De Cola, L. Bioconjugated fluorescent zeolite L nanocrystals as labels in protein microarrays. *Small* **7**, 3193–3201 (2011).
  79. Mukhopadhyay, K. *et al.* Gold Nanoparticles Assembled on Amine-Functionalized Na–Y Zeolite: A Biocompatible Surface for Enzyme Immobilization. *Langmuir* **19**, 3858–3863 (2003).
  80. Phadtare, S. *et al.* Immobilization and biocatalytic activity of fungal protease on gold nanoparticle-loaded zeolite microspheres. *Biotechnol. Bioeng.* **85**, 629–637 (2004).
  81. Liu, L. *et al.* Alkyl-functionalization of (3-Aminopropyl)triethoxysilane-grafted zeolite beta for carbon dioxide capture in temperature swing adsorption. *Chem. Eng. J.* **382**, 122834 (2020).
  82. Gelles, T., Lawson, S., Rownaghi, A. A. & Rezaei, F. Recent advances in development of amine functionalized adsorbents for CO<sub>2</sub> capture. *Adsorption* **26**, 5–50 (2020).
  83. Zhao, A., Samanta, A., Sarkar, P. & Gupta, R. Carbon Dioxide Adsorption on Amine-Impregnated Mesoporous SBA-15 Sorbents: Experimental and Kinetics Study. *Ind. Eng. Chem. Res.* **52**, 6480–6491 (2013).
  84. Subagyono, D. J. N., Marshall, M., Knowles, G. P. & Chaffee, A. L. CO<sub>2</sub> adsorption by amine modified siliceous mesostructured cellular foam (MCF) in humidified gas. *Microporous Mesoporous Mater.* **186**, 84–93 (2014).
  85. Kishor, R. & Ghoshal, A. K. Polyethylenimine Functionalized As-Synthesized KIT-6 Adsorbent for Highly CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> Selective Separation. *Energy & Fuels* **30**, 9635–9644 (2016).
  86. Babaei, M., Anbia, M. & Kazemipour, M. Improving CO<sub>2</sub> adsorption with new amine-functionalized Y-type zeolite. *J. Adv. Environ. Heal. Res.* **5**, 70–77 (2017).
  87. Zhang, G., Zhao, P. & Xu, Y. Development of amine-functionalized hierarchically porous silica for CO<sub>2</sub> capture. *J. Ind. Eng. Chem.* **54**, 59–68 (2017).
  88. Li, X. *et al.* Non-aqueous energy-efficient absorbents for CO<sub>2</sub> capture based on porous silica nanospheres impregnated with amine. *Energy* **171**, 109–119 (2019).
  89. Hahn, M. W., Steib, M., Jentys, A. & Lercher, J. A. Mechanism and Kinetics of CO<sub>2</sub> Adsorption on Surface Bonded Amines. *J. Phys. Chem. C* **119**, 4126–4135 (2015).
  90. Murge, P., Dinda, S. & Roy, S. Zeolite-Based Sorbent for CO<sub>2</sub> Capture: Preparation and Performance Evaluation. *Langmuir* **35**, 14751–14760 (2019).

91. Li, K., Jiang, J., Tian, S., Yan, F. & Chen, X. Polyethyleneimine–nano silica composites: a low-cost and promising adsorbent for CO<sub>2</sub> capture. *J. Mater. Chem. A* **3**, 2166–2175 (2015).
92. Guan, Q. *et al.* Preparation of Tetraethylenepentamine-Functionalized 4A Zeolite for effective removal of phosphate in water. *Appl. Organomet. Chem.* **34**, e5861 (2020).
93. Fashi, F., Ghaemi, A. & Behroozi, A. H. Piperazine impregnation on Zeolite 13X as a novel adsorbent for CO<sub>2</sub> capture: experimental and modeling. *Chem. Eng. Commun.* 1–17 (2020).  
doi:10.1080/00986445.2020.1746657
94. Pyo, S. W., Maniunglung, C. & Ko, Y. S. In-situ IR study on stability of amine-impregnated CO<sub>2</sub> adsorbents to acidic gases. *Catal. Today* **352**, 198–203 (2020).
95. Kang, J. H. *et al.* Extraordinarily selective adsorption of CO<sub>2</sub> over N<sub>2</sub> in a polyethyleneimine-impregnated NU-1000 material. *Microporous Mesoporous Mater.* **281**, 84–91 (2019).
96. Chan, B. Re-examining the electronic structure of fluorescent tetra-silver clusters in zeolites. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **23**, 1984–1993 (2021).
97. Fron, E. *et al.* Structural and Photophysical Characterization of Ag Clusters in LTA Zeolites. *J. Phys. Chem. C* **123**, 10630–10638 (2019).