



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Instituto Interuniversitario de Investigación  
de Reconocimiento Molecular y Desarrollo  
Tecnológico

Departamento de Química

---

**TESIS DOCTORAL**

Síntesis, estabilización y funcionalización de nanocristales de perovskita de haluros metálicos para su empleo como reveladores y marcadores en histoquímica, cultivos celulares y biosensado

**Cynthia Collantes Pablo**

Directores

---

Dra. Victoria González Pedro

**Profesora Permanente Laboral de  
Universidad**

Dra. M<sup>a</sup> José Bañuls Polo

**Catedrática de Universidad**

Dr. Ángel Maquieira Catalá

**Catedrático de Universidad**

València, Noviembre, 2023



Dra. Victoria González Pedro, Profesora Permanente Laboral de Universidad del Departamento de Química de la Universitat Politècnica de València.

Dra. M<sup>a</sup> José Bañuls Polo, Catedrática de Universidad del Departamento de Química de la Universitat Politècnica de València.

Dr. Ángel Maquieira Catalá, Catedrático de Universidad del Departamento de Química de la Universitat Politècnica de València.

CERTIFICAN:

Que el trabajo que presenta Cynthia Collantes Pablo en esta memoria, con título “Síntesis, estabilización y funcionalización de nanocristales de perovskita de haluros metálicos para su empleo como reveladores y marcadores en histoquímica, cultivos celulares y biosensado” ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) para optar al grado de Doctor en Técnicas Experimentales en Química por la Universitat Politècnica de València.

Para que así conste, firman el presente certificado en València, 17 de noviembre de 2023.

MARIA  
VICTORIA|  
GONZALEZ|  
PEDRO

Firmado digitalmente  
por MARIA VICTORIA|  
GONZALEZ|PEDRO  
Fecha: 2023.11.20  
11:22:35 +01'00'

Victoria González Pedro

MARIA JOSE  
BAÑULS POLO - BAÑULS POLO -  
NIF:48306517P

Firmado  
digitalmente por  
MARIA JOSE  
BAÑULS POLO -  
NIF:48306517P  
Fecha: 2023.11.20  
11:27:24 +01'00'

M<sup>a</sup> José Bañuls Polo

ANGEL|  
MAQUIEIRA|  
CATALA

Firmado digitalmente  
por ANGEL|  
MAQUIEIRA|CATALA  
Fecha: 2023.11.17  
11:23:52 +01'00'

Ángel Maquieira Catalá



# Estancia en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA – CSIC)



Paterna, Valencia 3<sup>rd</sup> December 2020

**Re: Cynthia Collantes Pablo**

To whom it may concern:

Cynthia Collantes Pablo, PhD student from the Polytechnical University of Valencia, Spain, has been doing a research stay at the Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA-CSIC) in Valencia from the February to October 2020, in the framework of a collaboration to encapsulate perovskite nanocrystals using an electrospraying technique. During these months, she has been working in optimizing the electrospraying conditions to encapsulate and protect the optoelectronic properties of the perovskites developed in the context of her PhD thesis. Apart from the development of the structures, she also evaluated their optical, structural and compositional characteristics, as well as their ability to be used as fluorescent markers in cells. Cynthia has shown an excellent attitude, willingness to learn, very good working abilities and high motivation. She has spent long hours, showing a great commitment in the activities carried out, demonstrating maturity and sense of responsibility. Apart from that, she also showed team working abilities, interacting with other group members and also carrying out a thorough literature review of the different research topics she was dealing with. Overall, she has demonstrated excellent research abilities, outstanding attitude and I can state that she would be a tremendous asset for any research facility.

Please, do not hesitate to contact me if you need any further information.

Sincerely,

LOPEZ RUBIO MARIA  
DESAMPARADOS - DNI 24375702A  
Firmado digitalmente por LOPEZ RUBIO MARIA DESAMPARADOS - DNI 24375702A

Dr. Amparo Lopez-Rubio

CSIC Researcher

IATA-CSIC

[amparo.lopez@iata.csic.es](mailto:amparo.lopez@iata.csic.es)

info@iata.csic.es

C/ CATEDRÁTICO AGUSTÍN ESCARDINO BENLLOCH, 7  
46980 PATERNA (VALENCIA) ESPAÑA  
Tel. (+34) 963 900022  
Fax. (+34) 963 636301



## Estancia en el Instituto Italiano di Tecnologia (IIT)



Genova,  
16/10/2023

To whom it may concern,

This document certifies that **Cynthia Collantes Pablo** was a member of the Nanochemistry Research Line of IIT, from **April 4<sup>th</sup> to July 5<sup>th</sup> 2022**, carrying out her scientific research on **“Synthesis of polymeric beads loaded with perovskite nanocrystals and magnetic nanoparticles for their use in hyperthermia”**.

Sincerely,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Liberato Manna', is written in a cursive style.

Liberato Manna  
Principal Investigator of Nanochemistry Research Line

Via Morego 30  
16163 Genova Italy  
Tel +39 010.71781

[www.iit.it](http://www.iit.it)





## Agradecimientos

Quiero expresar mi gratitud a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta tesis.

A M<sup>a</sup> José Bañuls y Ángel Maquieira, por concederme la beca de formación predoctoral FPI (BES-2017-080242), asociada al proyecto de *Biosensores holográficos. Prueba de concepto y demostración en aplicaciones clínicas* (CTQ2016-75749-R), financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad.

A mis directores, Victoria González, M<sup>a</sup> José Bañuls y Ángel Maquieira, por el tiempo invertido y darme las herramientas necesarias para sacar adelante esta investigación, sus sugerencias y correcciones a lo largo de este proceso, así como su mediación para entablar posibles colaboraciones con otros grupos.

En esta tesis he tenido la oportunidad de realizar dos estancias:

- En el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA – CSIC), València
- En el Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Génova

Sin duda, ambas han sido experiencias enriquecedoras, tanto en lo personal como en lo profesional, que han contribuido al desarrollo de esta investigación y a establecer un vínculo de colaboración con ambas instituciones. Ante la oportunidad brindada, agradezco a la dirección de los centros, a los grupos y supervisores correspondientes:

- Al grupo de *Envases* del IATA – CSIC, bajo la supervisión de Amparo López y M<sup>a</sup> José Fabra, por el acceso a sus instalaciones para utilizar su equipo de *electrospraying* y formarme en esta técnica
- Al grupo de *Elementos Traza* del IATA – CSIC, bajo la supervisión de Vicenta Devesa, por proporcionar los medios necesarios para que pudiera realizar ensayos en cultivos celulares y analizar los resultados. Especial mención a Pepe Coll, por las imágenes de microscopía de fluorescencia
- Al grupo de *Nanoquímica* del IIT, bajo la supervisión de Dmitry Baranov, Milena Arciniegas y Liberato Manna, por su accesibilidad e interés en que mi estancia fuera fructífera en todos los aspectos
- Al grupo de *Nanomateriales para Aplicaciones Biomédicas*, bajo la supervisión de Teresa Pellegrino. Me llevo un gran aprendizaje de Niccolò Silvestri y Sahitya Avuggada, por su metodológica forma de trabajar y criterio en el diseño experimental

En lo que respecta a esta tesis, debo reconocer la labor de Amadeo Sena y Javier Carrascosa, quienes han dedicado parte de su tiempo en formarme, diseñar y proporcionar el equipo de medida necesario para realizar los inmunoensayos en formato de tira reactiva. También mencionar a William Teixiera, con quien he tenido oportunidad de compartir en múltiples ocasiones reflexiones, ideas y experimentos.

Por otro lado, destacar a los técnicos del Servicio de Microscopía de la Universitat Politècnica de València, quienes me han acompañado a lo largo de toda la etapa experimental, facilitándome el trabajo de caracterización. Valoro su profesionalidad, buen trato y disposición.

A todos mis compañeros del IDM, por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, las aportaciones en lo científico y en lo personal, la colaboración durante estos años y los ánimos durante la etapa final.

A los profesores del Dpto. de Química, por su accesibilidad para compartir su experiencia y consejos.

A Pilar Aragón, por su implicación como tutora durante mi colaboración como docente.

Y por supuesto a mi familia, que se merece mucho más de lo que pueda decir en estas líneas.

## Resumen

Los nanocristales de perovskita de haluros metálicos, cuya fórmula general es  $ABX_3$  ( $A = Cs^+$ ,  $CH_3NH_3^+$ ,  $CH(NH_2)_2^+$ ;  $B = Pb^{+2}$ ,  $Sn^{+2}$ ; y  $X = Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ) son una clase de nanomateriales semiconductores que han tenido un gran impacto en fotovoltaica y en la fabricación de dispositivos emisores de luz debido a sus excelentes propiedades optoelectrónicas, entre ellas, la capacidad para transportar cargas, generar electricidad y producir luz.

Aunque se trata de un área menos explorada, tienen potencial para convertirse en marcadores luminiscentes en aplicaciones biológicas por sus dimensiones nanométricas (4-15 nm) y por exhibir propiedades ópticas únicas, entre ellas: alto rendimiento cuántico de fluorescencia, espectro de emisión estrecho y posibilidad de modular su emisión en función de su tamaño y composición para obtener una amplia gama de colores en la región visible (410-700 nm), lo que los convierte en candidatos prometedores en multiplexado.

Además, presentan absorción multifotónica en el cercano infrarrojo y emisión *upconversion*, siendo una ventaja en diagnóstico por imagen, ya que se emplea una radiación que es inocua para los tejidos, tiene mayor penetración, reduce la autofluorescencia celular y mejora la relación señal-ruido.

A pesar de las excelentes propiedades ópticas de estos materiales, tienden a degradarse frente a la humedad, oxígeno, luz y alta temperatura, lo que supone una clara limitación para el desarrollo de sus aplicaciones en biosensado y diagnóstico por imagen.

Durante los últimos años, los avances en los métodos de encapsulación han permitido mejorar su estabilidad frente a agentes externos, generando estructuras *core-shell* o integrándose en matrices de una gran variedad de materiales, entre los que se incluyen óxidos inorgánicos, polímeros u otros semiconductores.

Esta tesis se ha centrado en el desarrollo de diferentes nanopartículas de perovskita estables en medio acuoso para su utilización como marcadores luminiscentes en biosensado o bioimagen *in vitro*. En todas las metodologías propuestas se ha pretendido que las partículas resultantes cumplan con una serie de requisitos, principalmente: tamaño nanométrico (< 200 nm), elevado rendimiento cuántico de fluorescencia, estabilidad química y estructural en tampón salino o medios de cultivo, y fácil conjugación a biorreceptores específicos.

La primera estrategia consiste en la preparación de nanopartículas *core-shell* mediante la adaptación del método Stöber, una metodología sol-gel que permite generar un recubrimiento de sílice que protege al material encapsulado de disolventes polares y otros factores externos. La principal dificultad es compatibilizar las condiciones de reacción sin comprometer la integridad y propiedades ópticas de los nanocristales, ya que el proceso pasa por una etapa hidrolítica que desencadena la degradación de los nanocristales. Esta estrategia se ha llevado a cabo mediante dos aproximaciones diferentes.

En una primera aproximación, se ha obtenido una población monodispersa de nanopartículas de  $\text{CsPb}_2\text{Br}_5@\text{SiO}_2$  de 32 nm mediante una metodología de adición lenta de la fuente precursora de sílice y el catalizador sobre los nanocristales de  $\text{CsPbBr}_3$  previamente sintetizados. Si bien, su principal limitación es la baja emisión de fluorescencia, se ha demostrado en una prueba de concepto su potencial como marcadores luminiscentes en un inmunoensayo directo con un sistema modelo (anti-BSA y BSA).

En una segunda aproximación, se han obtenido nanopartículas multicolores (azul, verde y rojo) *core-shell* de  $\text{CsPbX}_3@\text{SiO}_2$  ( $X = \text{Cl}/\text{Br}, \text{Br}$  y  $\text{I}$ ) con tamaños de 20-30 nm mediante un proceso de transformación estructural combinado con la metodología sol-gel. Tras una etapa de estabilización térmica que confiere estabilidad en medio acuoso, se ha demostrado su viabilidad como marcadores luminiscentes en un ensayo directo entre el anticuerpo Omalizumab y su receptor.

La segunda estrategia consiste en la incorporación de los nanocristales en partículas poliméricas mediante la técnica de coprecipitación. Se basa en la capacidad que tienen los copolímeros anfifílicos para autoensamblarse en medios selectivos y permite atrapar a los nanocristales de perovskita en el interior de micelas poliméricas, las cuales ofrecen una barrera física eficaz por su elevado grado de entrecruzamiento. Concretamente se han encapsulado nanocristales de  $\text{CsPbBr}_3$  en micelas compuestas por un copolímero de poliestireno y ácido poliacrílico, alcanzando un tamaño medio de 200 nm. Finalmente, se han utilizado para la puesta a punto de ensayos en tira reactiva para la detección de inmunoglobulinas G de suero humano.

La tercera estrategia recurre a la técnica denominada *electrospraying/electrospinning*, una técnica de atomización que permite generar partículas o fibras poliméricas en las cuales quedan embebidos los nanocristales. En este caso, los nanocristales se han encapsulado en partículas de poli(estireno-co-anhídrido maleico) y se han incubado en cultivo celular para analizar su potencial en bioimagen por microscopía de fluorescencia.

En resumen, esta tesis contribuye al avance en el desarrollo de nanomateriales luminiscentes basados en perovskitas de haluros metálicos, abordando el desafío que supone su estabilización en medio acuoso y demostrando su viabilidad en medios biológicos.

Se prevé que, en un futuro, sea posible su implantación en el desarrollo de plataformas analíticas de alto rendimiento que permitan la detección y/o cuantificación óptica de analitos de interés clínico, medioambiental o alimentario en el punto de atención, cumpliendo con los criterios de rapidez, fiabilidad, facilidad de manejo y bajo coste, superando en sensibilidad y capacidad de multiplexado a los sistemas actuales, la mayoría de ellos basados en nanopartículas de oro, colorantes orgánicos o sistemas quimioluminiscentes.



## Abstract

Metal halide perovskite nanocrystals, with the general formula  $ABX_3$  ( $A = Cs^+$ ,  $CH_3NH_3^+$ ,  $CH(NH_2)_2^+$ ;  $B = Pb^{+2}$ ,  $Sn^{+2}$ ;  $Y X = Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ), constitute a new class of semiconductor nanomaterials with a significant impact on photovoltaic industry and fabrication of light-emitting devices due to their excellent optoelectronic properties, including the ability to transport charges, generate electricity and produce light.

While it has not been deeply explored yet, they have the potential to become luminescent labels in biological applications, given their nanometric size (4-15 nm) and unique optical properties, such as high photoluminescence quantum yield, narrow emission spectra, and the possibility to tune their emission based on size and composition. This enables a wide color gamut in the visible region (410-700 nm), making them promising candidates in multiplexing.

Moreover, perovskite nanocrystals exhibit strong multi-photon absorption properties in the near-infrared region and upconversion emission, which are an advantage for bioimaging applications since near-infrared radiation is less hazardous to living organisms, has deeper tissue penetration, reduces cellular autofluorescence and enhances signal-to-noise ratio.

Despite the exceptional optical properties of perovskite nanocrystals, their potential in biosensing and bioimaging applications is hindered by their poor stability against moisture, oxygen, light and heat.

To overcome these issues, in the last years, several strategies have been developed to improve their stability through the encapsulation of perovskite nanocrystals in a wide variety of protective materials, such as inorganic oxides, polymers, or semiconductors, in the form of core-shell nanoparticles or embedded in a matrix.

This thesis focuses on the synthesis and stabilization of perovskite nanocrystals in aqueous environments with the aim of using them as luminescent labels in biosensing or in vitro bioimaging. Different methodologies have been employed to yield particles that meet specific requirements: nanometric size (< 200 nm), high photoluminescence quantum yield, robust chemical and structural stability in saline buffers or culture media, and facile conjugation with bioreceptors.

The first strategy produces core-shell nanoparticles by adapting the Stöber method, a sol-gel reaction that generates a silica coating around the core, thus protecting it from polar solvents and other external factors. The critical aspect here is to establish the reaction conditions for silica growth without compromising the integrity and optical properties of perovskite nanocrystals during the hydrolytic step. This strategy has been carried out through two different approaches.

In a first approach, a monodisperse population of CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>@SiO<sub>2</sub> nanoparticles (32 nm) was obtained through a methodology where the silica precursor source and catalyst are slowly added onto a solution containing previously synthesized CsPbBr<sub>3</sub> nanocrystals. Although the main limitation is the low fluorescence emission, their potential as luminescent markers was demonstrated in a direct immunoassay with a model system (anti-BSA and BSA), as a proof-of-concept.

In a second approach, multicolored CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> (X = Cl/Br, Br y I) core-shell nanoparticles were produced by exploiting the structural transformative features of perovskite nanocrystals in combination with a sol-gel process. The resulting nanoparticles, with sizes ranging between 20-30 nm, emit blue, green, and red light, respectively. After a thermal treatment were stabilized in aqueous media and used as luminescent labels in a direct immunoassay, involving Omalizumab antibody and its receptor.

The second strategy incorporates perovskite nanocrystals within polymeric particles through a coprecipitation technique, which relies on the self-assembling behavior of amphiphilic polymers in selective solvents. As a result, perovskite nanocrystals are entrapped inside polymeric micelles which offer an effective physical barrier due to the high crosslinking degree of the polymer matrix. In this case, the resulting micelles, composed by a polystyrene-block-polyacrylic acid copolymer, reached a size of 200 nm and were used as fluorescent reporters in lateral flow immunoassay for human IgG detection.

The third strategy makes use of electrospraying/electrospinning method, an atomization technique which enables embedding perovskite nanocrystals inside polymeric particles or fibers. In this case, perovskite nanocrystals were encapsulated inside poly(styrene-co-maleic anhydride) particles and were incubated in a cell culture to explore their potential in bioimaging by using fluorescence microscopy.

To sum up, this thesis contributes to the development of luminescent nanomaterials based on metal halide perovskite nanocrystals, facing the

challenge of stabilizing them in aqueous media and testing their viability in biologic media.

We envision that, in the near future, it will be possible to incorporate perovskite nanoparticles in the development of high-throughput analytical platforms for the optical detection and/or quantification of clinically, environmentally or food-related analytes at the point of care, meeting the criteria of speed, reliability, ease of use, and low cost, surpassing current systems in sensitivity and multiplexing, most of them based on gold nanoparticles, organic dyes or chemiluminescent systems.



## Resum

Els nanocristalls de perovskita d'halurs metàl·lics, amb fórmula general  $ABX_3$  ( $A = Cs^+$ ,  $CH_3NH_3^+$ ,  $CH(NH_2)_2^+$ ;  $B = Pb^{+2}$ ,  $Sn^{+2}$ ;  $Y X = Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ), són una classe de nanomaterials semiconductors que han tingut un gran impacte en fotovoltaica i en la fabricació de dispositius emissors de llum a causa de les seues excel·lents propietats optoelectròniques, entre elles, la capacitat per a transportar càrregues, generar electricitat i produir llum.

Encara que es tracta d'una àrea menys explorada, tenen potencial per a convertir-se en marcadors luminescents en aplicacions biològiques per les seues dimensions nanomètriques (4-15 nm) i per exhibir propietats òptiques úniques, entre elles: alt rendiment quàntic de fluorescència, espectre d'emissió estret i possibilitat de modular la seua emissió en funció de les seues dimensions i composició, de manera que es pot obtenir una àmplia gamma de colors a la regió visible (410-700 nm), la qual cosa els converteix en candidats prometedors en multiplexatge.

A més, presenten absorció multifotònica en el pròxim infraroig i emissió upconversion, sent un avantatge en diagnòstic per imatge, ja que s'empra una radiació que és innòcua per als teixits, té major penetració, redueix l'autofluorescència cel·lular i millora la relació senyal-soroll.

Malgrat les excel·lents propietats òptiques d'aquests materials, tendeixen a degradar-se enfront de la humitat, oxigen, llum i alta temperatura, la qual cosa suposa una clara limitació per al desenvolupament de les seues aplicacions en biosensat i diagnòstic per imatge.

Durant els últims anys, els avanços en els mètodes d'encapsulació han permès millorar la seua estabilitat enfront d'agents externs, generant estructures *core-shell* o integrant-se en matrius d'una gran varietat de materials, entre els quals s'inclouen òxids inorgànics, polímers o altres semiconductors.

Aquesta tesi s'ha centrat en el desenvolupament de diferents nanopartícules de perovskita estables al mig aquós per a la seua utilització com a marcadors luminescents en biosensat o bioimatge in vitro. En totes les metodologies proposades s'ha pretés que les partícules resultants complisquen amb una sèrie de requisits, principalment: grandària nanomètrica ( $< 200$  nm), elevat rendiment quàntic de fluorescència, estabilitat química i estructural en tampó salí o medis de cultiu, i fàcil conjugació a biorreceptors específics.

La primera estratègia consisteix en la preparació de nanopartícules *core-shell* mitjançant l'adaptació del mètode Stöber, una metodologia sol-gel que permet generar un recobriment de sílice que protegeix el material encapsulat de dissolvents polars i altres factors externs. La principal dificultat és compatibilitzar les condicions de reacció sense comprometre la integritat i propietats òptiques dels nanocrystals, ja que el procés passa per una etapa hidrolítica que desencadena la degradació dels nanocrystals. Aquesta estratègia s'ha dut a terme mitjançant dues aproximacions diferents.

En una primera aproximació, s'ha obtingut una població monodispersa de nanopartícules de  $\text{CsPb}_2\text{Br}_5@\text{SiO}_2$  de 32 nm mitjançant una metodologia d'addició lenta de la font precursora de sílice i el catalitzador sobre els nanocrystals de  $\text{CsPbBr}_3$  prèviament sintetitzats. Si bé, la seua principal limitació és la baixa emissió de fluorescència, s'ha demostrat en una prova de concepte el seu potencial com a marcadors luminescents en un immunoassaig directe amb un sistema model (anti-BSA i BSA).

En una segona aproximació, s'han obtingut nanopartícules multicolors (blava, verda i roig) *core-shell* de  $\text{CsPbX}_3@\text{SiO}_2$  ( $X = \text{Cl}/\text{Br}$ ,  $\text{Br}$  i  $\text{I}$ ) amb dimensions de 20-30 nm mitjançant un procés de transformació estructural combinat amb la metodologia sol-gel. Després d'una etapa d'estabilització tèrmica que confereix estabilitat al mig aquós, s'ha demostrat la seua viabilitat com a marcadors luminescents en un assaig directe entre l'anticòs Omalizumab i el seu receptor.

La segona estratègia consisteix en la incorporació dels nanocrystals en partícules polimèriques mitjançant la tècnica de coprecipitació. Es basa en la capacitat que tenen els copolímers amfifílics per a autoassemblar-se en mitjans selectius i permet atrapar als nanocrystals de perovskita a l'interior de micel·les polimèriques, les quals ofereixen una barrera física eficaç pel seu elevat grau d'entrecreuament. Concretament s'han encapsulat nanocrystals de  $\text{CsPbBr}_3$  en micel·les compostes per un copolímer de poliestiré i àcid poliacrílic, aconseguint una grandària mitjana de 200 nm. Finalment, s'han utilitzat per a la posada a punt d'assajos en tira reactiva per a la detecció d'immunoglobulines G de sèrum humà.

La tercera estratègia recorre a la tècnica denominada *electrospraying/electrospinning*, una tècnica d'atomització que permet generar partícules o fibres polimèriques en les quals queden embeguts els nanocrystals. En aquest cas, els nanocrystals s'han encapsulat en partícules de poli(estiré-co-anhídrid maleic) i s'han incubat en cultiu cel·lular per a analitzar el seu potencial en bioimatge per microscòpia de fluorescència.

En resum, aquesta tesi contribueix a l'avanç en el desenvolupament de nanomaterials luminescents basats en perovskitas d'halurs metàl·lics, abordant el desafiament que suposa la seua estabilització al mig aquós i demostrant la seua viabilitat en mitjans biològics.

Es preveu que, en un futur, siga possible la seua implantació en el desenvolupament de plataformes analítiques d'alt rendiment que permeten la detecció i/o quantificació òptica d'anàlits d'interés clínic, mediambiental o alimentari en el punt d'atenció, complint amb els criteris de rapidesa, fiabilitat, facilitat de maneig i baix cost, superant en sensibilitat i capacitat de multiplexatge als sistemes actuals, la majoria d'ells basats en nanopartícules d'or, colorants orgànics o sistemes quimioluminescents.



## Diseminación de resultados

### Artículos publicados en revistas científicas indexadas

**Título:** Monodispersed CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>@SiO<sub>2</sub> Core–Shell Nanoparticles as Luminescent Labels for Biosensing

**Autores:** Cynthia Collantes, Victoria González Pedro\*, Maria-José Bañuls and Ángel Maquieira

**Revista:** ACS Applied Nano Materials

**IF<sub>2021</sub>:** 5,097

**Referencia:** ACS Appl. Nano Mater. 2021, 4, 2, 2011–2018.  
<https://doi.org/10.1021/acsanm.0c03340>

**Título:** Highly Emitting Perovskite Nanocrystals with 2-Year Stability in Water through an Automated Polymer Encapsulation for Bioimaging

**Autores:** Sahitya Kumar Avugadda, Andrea Castelli, Balaji Dhanabalan, Tamara Fernandez, Niccolo Silvestri, Cynthia Collantes, Dmitry Baranov, Muhammad Imran, Liberato Manna, Teresa Pellegrino\*, Milena P Arciniegas\*

**Revista:** ACS Nano

**IF<sub>2022</sub>:** 18,027

**Referencia:** ACS Nano. 2022, 16 (9), 13657-13666.  
<https://doi.org/10.1021/acsnano.2c01556>

**Título:** Designing stable lead halide perovskite nanocrystals: From a single particle to nanocomposites

**Autores:** Cynthia Collantes, William Teixeira, Victoria González Pedro\*, Maria-José Bañuls and Ángel Maquieira

**Revista:** Applied Materials Today

**IF<sub>2023</sub>:** 8,663

**Referencia:** Appl. Mat. Today. 2023, 31, 101775.  
<https://doi.org/10.1016/j.apmt.2023.101775>

**Título:** Water-assisted synthesis of stable and multicolored CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticles as fluorescent probes for biosensing

**Autores:** Cynthia Collantes, William Teixeira, Victoria González Pedro\*, María-José Bañuls and Ángel Maquieira

**Revista:** Dalton Transactions

**IF<sub>2023</sub>:** 4,0

**Referencia:** Dalton Trans., 2023, Accepted Manuscript.

<https://doi.org/10.1039/D3DT02593D>

### **Comunicaciones en congresos nacionales e internacionales**

**Título:** CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Nanoparticles Synthesis Approaches Towards Biosensing Applications

**Autores:** Cynthia Collantes, Victoria González Pedro, María-José Bañuls and Ángel Maquieira

**Congreso:** XIII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition

**Tipo:** Internacional

**Lugar:** València (España)

**Fecha:** Del 04 al 05 de Julio de **2019**

**Contribución:** Póster

**Título:** Monodispersed CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>@SiO<sub>2</sub> Core-Shell Nanoparticles as Luminescent Labels for Biosensing

**Autores:** Cynthia Collantes, Victoria González Pedro, María-José Bañuls and Ángel Maquieira

**Congreso:** XIV International Workshop on Sensors and Molecular Recognition

**Tipo:** Internacional

**Lugar:** València (España)

**Fecha:** Del 08 al 09 de Julio de **2021**

**Contribución:** Póster

**Título:** CsPbBr<sub>3</sub> NCs encapsulation into a polystyrene-based polymer by electrospaying

**Autores:** Cynthia Collantes, Victoria González Pedro, M<sup>a</sup> José Fabra, Amparo López, Vicenta Devesa, María-José Bañuls and Ángel Maquieira

**Congreso:** XIV International Workshop on Sensors and Molecular Recognition

**Tipo:** Internacional

**Lugar:** València (España)

**Fecha:** Del 08 al 09 de Julio de **2021**

**Contribución:** Póster

**Título:** Designing Water-Stable Metal Halide Perovskite Nanoparticles for Biosensing and Bioimaging Applications

**Autores:** Cynthia Collantes, William Teixeira, Victoria González Pedro, María-José Bañuls and Ángel Maquieira

**Congreso:** MATSUS23 & Sustainable Technology Forum València (STECH23)

**Tipo:** Internacional

**Lugar:** València (España)

**Fecha:** Del 06 al 10 de Marzo de **2023**

**Contribución:** Póster



## Listado de abreviaturas

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>APTES</b>    | <i>3-Aminopropyl)triethoxysilane</i>   3-aminopropiltrietoxisilano  |
| <b>ATR-FTIR</b> | <i>Attenuated total reflectance fourier-transform infrared</i>   Infrarrojo con transformada de Fourier y reflectancia total atenuada |
| <b>BSA</b>      | <i>Bovine serum albumin</i>   albúmina de suero bovino  |
| <b>Cs-OA</b>    | Cesium oleate   oleato de cesio   |
| <b>CTL</b>      | Control   |
| <b>CUP</b>      | Concentración umbral de polímero  |
| <b>D.O.</b>     | Densidad óptica   |
| <b>fwhm</b>     | <i>Full width at half maximum</i>   anchura a media altura  |
| <b>HRFESEM</b>  | <i>High resolution field emission scanning electron microscopy</i>   microscopía electrónica de barrido de alta resolución            |
| <b>ICP-MS</b>   | <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>   Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente                      |
| <b>LARP</b>     | <i>Ligand-assisted re-precipitation</i>   reprecipitación asistida por ligando  |
| <b>LHP</b>      | Lead halide perovskite   perovskita de haluros de plomo   |
| <b>MHP</b>      | <i>Metal halide perovskite</i>   perovskita de haluros metálicos  |
| <b>NCs</b>      | <i>Nanocrystals</i>   nanocristales   |
| <b>N.D.</b>     | No descrito   |
| <b>NIR</b>      | <i>Near infrared</i>   Infrarrojo cercano   |
| <b>NPLs</b>     | <i>Nanoplatelets</i>   nanoplaquetas  |
| <b>NPs</b>      | <i>Nanoparticles</i>   nanopartículas   |
| <b>OA</b>       | <i>Oleic acid</i>   ácido oleico  |
| <b>OAm</b>      | <i>Oleylamine</i>   oleilamina  |
| <b>ODE</b>      | <i>Octadecene</i>   octadeceno  |
| <b>PAA</b>      | <i>Polyacrylic acid</i>   ácido poliacrílico  |
| <b>PBS</b>      | <i>Phosphate buffered saline</i>   tampón fosfato salino  |
| <b>PBS-T</b>    | phosphate buffered saline with Tween 20   tampón fosfato salino con Tween 20  |
| <b>PL</b>       | <i>Photoluminescence</i>   fotoluminiscencia  |

|               |  |
|---------------|--|
| <b>PLQY</b>   | <i>Photoluminescence quantum yield</i>   Rendimiento cuántico de fotoluminiscencia |
| <b>PS</b>     | <i>Polystyrene</i>   poliestireno  |
| <b>PSMA</b>   | <i>Poly(styrene-co-maleic anhydride)</i>   poli(estireno-co-anhídrido maleico)     |
| <b>QDs</b>    | <i>Quantum dots</i>   punto cuánticos  |
| <b>TEM</b>    | <i>Transmission electron microscopy</i>   microscopía de transmisión electrónica   |
| <b>TEOS</b>   | <i>Tetraethyl orthosilicate</i>   tetraetilortosilicato                            |
| <b>TMOS</b>   | <i>Tetramethyl orthosilicate</i>   tetrametilortosilicato                          |
| <b>UV</b>     | Ultraviolet   ultravioleta   |
| <b>UV-vis</b> | <i>Ultraviolet – visible</i>   Ultravioleta-visible                                |

# Índice

|   |     |
|---|-----|
| Capítulo 1. Introducción .....  | 31  |
| 1.1. Estado del arte de marcadores luminiscentes .....  | 33  |
| 1.2. Perovskitas de haluros plomo (LHP) .....   | 41  |
| 1.2.1 Descubrimiento y breve historia.....  | 41  |
| 1.2.2 Estructura .....  | 42  |
| 1.2.3 Composición y propiedades ópticas.....  | 44  |
| 1.2.4 Métodos de síntesis de nanocristales de perovskita .....  | 46  |
| 1.2.5 Estrategias de estabilización .....   | 50  |
| 1.2.6 Aplicaciones.....   | 81  |
| 1.3. Bibliografía .....   | 90  |
| Capítulo 2. Objetivos .....   | 107 |
| Capítulo 3. Estabilización de NCs de perovskita con<br>recubrimientos de sílice mediante la adaptación<br>del proceso gel ..... | 111 |
| 3.1. Introducción .....   | 113 |
| 3.2. Resultados .....   | 118 |
| 3.3. Conclusiones.....  | 145 |
| 3.4. Materiales y Métodos .....   | 148 |
| 3.5. Bibliografía .....   | 154 |
| Capítulo 4. Estabilización de NCs de CsPbBr <sub>3</sub> en micelas<br>poliméricas para su utilización en tira reactiva ...     | 161 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.1. Introducción .....   | 163 |
| 4.2. Resultados .....   | 169 |
| 4.3. Conclusiones .....   | 187 |
| 4.4. Materiales y métodos.....  | 189 |
| 4.5. Bibliografía .....   | 195 |
| <br>  |     |
| Capítulo 5. Estabilización de NCs de perovskita en partículas<br>poliméricas mediante electrospraying ..... | 201 |
| 5.1. Introducción .....   | 203 |
| 5.2. Resultados .....   | 206 |
| 5.3. Conclusiones .....   | 212 |
| 5.4. Materiales y métodos.....  | 214 |
| 5.5. Bibliografía .....   | 217 |
| <br>  |     |
| Capítulo 6. Conclusiones.....   | 221 |

# Capítulo 1

## Introducción



## 1.1. Estado del arte de marcadores luminiscentes

La utilización de técnicas fotoluminiscentes proporciona una herramienta fundamental en investigación biomédica para el estudio de interacciones biomoleculares y procesos biológicos. Estas técnicas se basan en la capacidad que tienen ciertas moléculas o materiales de emitir luz tras ser excitadas por una fuente de luz externa. Al marcar biomoléculas específicas con estos fluoróforos, es posible rastrear su ubicación *in vivo* o *in vitro* dentro de la célula (bioimagen) o utilizarlas para la detección y/o cuantificación de analitos en muestras biológicas (sistemas analíticos y biosensado).

Idealmente, un fluoróforo debe reunir las siguientes características para su utilización en marcaje (1) tener un tamaño que no afecte a la función de la biomolécula o impida su internalización celular ( $< 200$  nm),<sup>1,2</sup> (2) presentar alto rendimiento cuántico de fluorescencia para poder detectarlo mediante técnicas de análisis de fluorescencia convencionales, (3) ser soluble y estable en tampones salinos, medios de cultivo o fluidos biológicos, (4) ofrecer la posibilidad de multiplexado (detección de múltiples señales simultáneamente), (5) ser fácil de conjugar a biorreceptores de interés, (6) excitarse preferiblemente con longitudes de excitación que reduzcan la autofluorescencia celular y (7) presentar baja toxicidad, en el caso de utilizarse en marcaje celular *in vitro* o *in vivo*.<sup>3</sup>

Los agentes de marcaje de uso más extendido son los **colorantes orgánicos**, por ejemplo: rodaminas, fluoresceínas, cianinas ... Entre sus principales ventajas destaca su pequeño tamaño (1 kDa), baja toxicidad y disponibilidad comercial.<sup>4</sup> Se caracterizan por tener un espectro de absorción estrecho, lo que limita el rango de longitudes de onda de excitación, presentan un desplazamiento de Stokes corto y un espectro de emisión asimétrico que se ensancha hacia longitudes de onda más largas (**Figura 1a**).<sup>5</sup> Exhiben altos coeficientes de absorción molar ( $\epsilon$ ), rendimientos cuánticos de fluorescencia (PLQY) moderados y tiempos de vida de fluorescencia de unos pocos nanosegundos ( $< 5$  ns en la región visible y 1 ns en el infrarrojo cercano (NIR)).

Su aplicación en bioimagen y detección multicolor está limitada por el solapamiento de los espectros de emisión y susceptibilidad a sufrir fotoblanqueamiento, es decir, se descomponen cuando se exponen a una fuente de excitación de forma prolongada.

Por otro lado, las **proteínas fluorescentes** se expresan de forma recombinante dentro de la célula, lo que permite estudiar procesos biológicos

*in situ*.<sup>6</sup> Han demostrado ser un recurso esencial para el estudio de procesos celulares, como por ejemplo la función de una proteína, la actividad de un promotor o la eficiencia en la transfección de un gen.<sup>7</sup>

La más conocida es la proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*), cuya secuencia pertenece originalmente a la medusa *Aequorea victoria*. Actualmente existen múltiples variantes obtenidas por mutagénesis que abarcan todo el espectro visible, por ejemplo, con emisión en el azul (EBFP), amarillo (YFP) o rojo (RFP). En general, todas ellas tienen un tamaño de  $\sim 25$  kDa y una estructura en barril beta que mide 4,2 nm de largo y 2,4 nm de diámetro. Aunque es un tamaño relativamente grande en comparación con los colorantes orgánicos, generalmente no interfiere en las funciones biológicas.

Su espectro de absorción es estrecho y el espectro de emisión es ancho y asimétrico (**Figura 1a**), tienen coeficientes de extinción molar inferiores a los de los colorantes orgánicos, su PLQY es variable y presentan tiempos de vida de fluorescencia cortos ( $< 5$  ns). En ocasiones, su señal solo es detectable cuando la proteína se expresa en concentraciones altas, lo que a su vez puede causar problemas de agregación e inducir toxicidad celular.

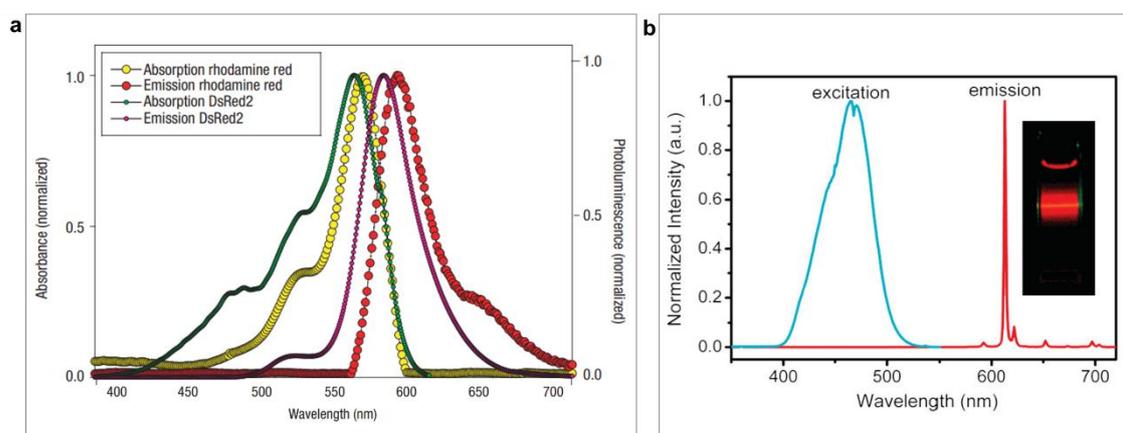


Figura 1. (a) Espectros de absorción y emisión de un ejemplo de colorante orgánico (rodamina) y de proteína fluorescente (DsRed2). (b) Espectro de excitación y de emisión de un complejo de Eu. Imágenes reproducidas de (a) *Nature Materials*, 2005, 4, 435–446 y (b) *Inorg. Chem.* 2008, 47, 7, 2507-2513

De la misma forma que sucede con los colorantes orgánicos, sufren fotodegradación y en experimentos de multiplexado, donde se requieren más de dos fluoróforos para poder detectar múltiples señales simultáneamente, su uso está limitado, debido a que tienen espectros de excitación estrechos, espectros de emisión anchos que solapan entre sí y desplazamientos de Stokes cortos.

Los **quelatos de lantánidos** son compuestos constituidos por un cromóforo orgánico que actúa como antena o sensibilizador, absorbiendo luz y transfiriendo la energía a los iones de lantánido, los cuales emiten luz. Los complejos de lantánido más utilizados son los de  $\text{Eu}^{+3}$  y  $\text{Tb}^{+3}$ . Estos exhiben bandas de emisión estrechas, con una anchura a media altura (*fwhm*) de 1-20 nm en la región espectral del rojo (590, 610 y 720 nm) (**Figura 1b**) y del verde (490, 540 y 580 nm), respectivamente.

Ofrecen propiedades fotofísicas que los hacen interesantes para su utilización como luminóforo en medios biológicos, por ejemplo, exhiben un gran desplazamiento de Stokes ( $> 150$  nm), lo que permite separar claramente la señal de excitación de la de emisión. Además, son fotoestables y se caracterizan por tiempos de vida de fluorescencia largos (del orden de nanosegundos hasta milisegundos), lo que permite eliminar el *scattering* de la fuente de excitación y la autofluorescencia de las muestras biológicas.<sup>8,9</sup>

La principal desventaja de estos complejos es que la luminiscencia es generalmente baja en medio acuoso.<sup>4</sup> En cuanto a toxicidad, únicamente se produce si el ión lantánido se disocia del complejo, ya que al tener un radio iónico similar al del  $\text{Ca}^{+2}$ , puede interferir en algunas funciones biológicas. Sin embargo, la utilización de ligandos macrocíclicos no dentados con donantes carboxilato es suficiente para prevenir que esto ocurra.<sup>10</sup>

Los **quantum dots** (QDs) son nanocristales de semiconductores de entre 2-10 nm que poseen propiedades ópticas y electrónicas distintas al mismo material en la macroescala (*bulk*). Entre ellas, la capacidad de ajustar la absorción y emisión en función del tamaño de la partícula.<sup>11</sup> Es decir, es posible obtener una amplia gama de colores del espectro visible modificando únicamente este parámetro. A medida que disminuye el tamaño de los QDs, incrementa el *bandgap*, llevando a un desplazamiento de la absorción y emisión hacia el azul. Mientras que se desplaza hacia el rojo cuando aumenta el tamaño de la partícula.

La primera vez que se observaron estos efectos fue a principios de la década de los 80, a partir de inclusiones de NCs de CuCl en una matriz de vidrio o de nanocristales de CdS crecidos en suspensiones coloidales.<sup>12</sup> En 1993, el grupo de Bawendi demostró cómo sintetizar de forma controlada QDs de CdE (E = S, Se, Te) coloidales con un tamaño definido y alta calidad óptica mediante el método *hot-injection*, que consiste en mezclar rápidamente los precursores químicos en una mezcla de surfactantes a alta temperatura.<sup>13</sup> Esta metodología supuso un antes y un después en la obtención de QDs monodispersos (con una variación del tamaño  $< 5\%$ ) de forma reproducible para una gran variedad de

materiales semiconductores de los grupos II-VI (CdS, CdSe, CdTe...), III-V (InP, InAs...) o IV-VI (PbS, PbSe...), aunque inicialmente presentaban una baja eficiencia de emisión (PLQY < 10%).

Posteriormente, la metodología se modificó para sintetizar QDs como heteroestructuras *core-shell*, donde el núcleo queda recubierto por una capa adicional de otro material semiconductor de mayor *bandgap*, generalmente de ZnS o CdS.<sup>14</sup> Esta capa protege al núcleo de la oxidación, previene su degradación e incrementa significativamente el valor de PLQY. A lo largo de los años, se ha logrado incrementar este valor desde el 50% hasta prácticamente el 100%.<sup>15</sup>

La capacidad para producir QDs con estas características ha permitido explorar sus aplicaciones con fines comerciales, fundamentalmente en la fabricación de pantallas con una definición excepcional de los colores o diodos emisores de luz (LEDs).

Por otro lado, su utilización como marcadores en sistemas biológicos fue posible a partir de 1998, una vez se desarrollaron estrategias que permitieron su transferencia al medio acuoso. Entre ellas, la generación de un recubrimiento de sílice sobre la superficie de los QDs.<sup>16</sup> o el reemplazo de los ligandos originales por ligandos bifuncionales, como el ácido mercaptoacético.<sup>17</sup> Estas estrategias promovieron su dispersión en medios fisiológicos y permitieron su conjugación a biomoléculas (proteínas, péptidos, ácidos nucleicos) para utilizarlos por primera vez como alternativa a los colorantes orgánicos en aplicaciones de bioimagen.

Entre sus ventajas, los QDs destacan por presentar amplios espectros de excitación, lo que permite alcanzar desplazamientos de Stokes más largos (~ 250 nm) (**Figura 2a**). Además, se caracterizan por tener elevados coeficientes de absorción, un espectro de emisión simétrico y estrecho (*fwhm* de 25-40 nm),<sup>18</sup> y sintonizable en función de su tamaño (**Figura 2b**) y composición (**Figura 2c**), pudiendo obtener una amplia gama de colores desde el ultravioleta al infrarrojo.<sup>4</sup>

A diferencia de los fluoróforos tradicionales, los QDs son 10-20 veces más brillantes (por sus altos valores de PLQY y coeficiente de extinción molar), son 100-200 veces más fotoestables (**Figura 2d**),<sup>19</sup> y pueden excitarse simultáneamente distintos colores utilizando una misma longitud de onda, lo que los convierte en marcadores ideales para multiplexado.<sup>4</sup>

Los QDs más utilizados en bioanálisis *in vitro* son los basados en CdSe, capaces de emitir en todo el espectro visible, pero también existen otras opciones menos tóxicas que emiten en el NIR, como por ejemplo los QDs de InAs. Esta región espectral proporciona mayor resolución de imagen, tiene alta penetración en los tejidos biológicos, es inocua y no produce autofluorescencia celular, lo que hace que sea interesante en estudios de imagen *in vivo*.<sup>19</sup>

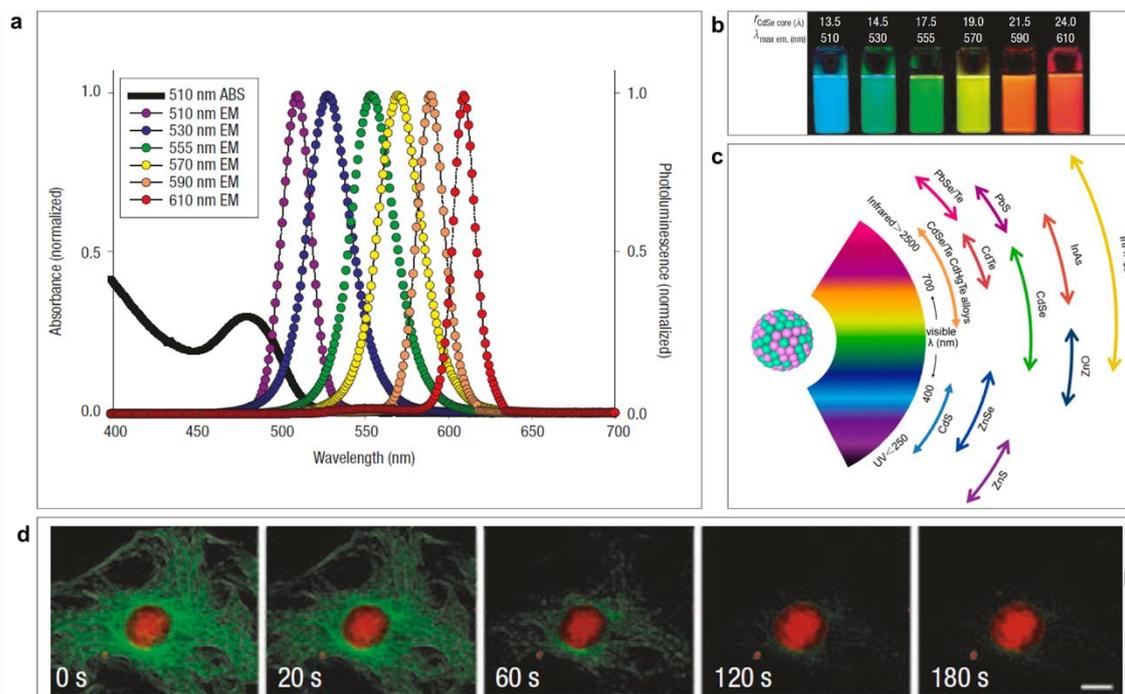


Figura 2. Propiedades ópticas de los QDs. (a) Espectro de absorción ancho y un espectro de emisión estrecho, (b) Emisión sintonizable en función del tamaño, desplazándose hacia longitudes de onda más largas a medida que aumenta su tamaño. (c) Emisión sintonizable en función de la composición del nanocristal. Por ejemplo, los QDs de CdSe pueden abarcar todo el espectro visible (400 – 700 nm), mientras que los de InAs emiten en el infrarrojo cercano (NIR). (d) Comparación de la resistencia a la fotodegradación en un cultivo celular. En rojo, el núcleo marcado con QD630 y en verde los microtúbulos marcados con AlexaFluor 488. Imágenes reproducidas de (a y b) Nature Materials, 2005, 4, 435–446, (c) Ind. Eng. Chem. Res. 2018, 57, 6, 1790–1802, (d) Nature Biotechnology, 2003, 21, 41–46

Por otro lado, los **nanocristales coloidales (NCs) de perovskita de haluros metálicos (MHPs)** son una clase de nanomateriales semiconductores más reciente que surgió partir de 2014,<sup>20,21</sup> y tienen potencial para superar las limitaciones de los QDs tradicionales.

Tienen fórmula general  $ABX_3$ , donde A representa el catión monovalente y puede ser  $Cs^+$ , metilamonio ( $CH_3NH_3^+$ , MA) o formamidinio ( $CH(NH_2)_2^+$ , FA), B está constituido por un catión metálico divalente ( $Pb^{+2}$ ,  $Sn^{+2}$ ...), y X representa al haluro ( $Cl^-$ ,  $Br^-$  o  $I^-$ ).<sup>22</sup> Se organizan en una estructura cúbica tridimensional, que consiste en una red de octaedros  $BX_6^{-4}$  que comparten sus esquinas, mientras que el catión A se localiza en el centro de la cavidad formada por 8 octaedros (**Figura 3a**).<sup>23</sup> Los más populares son los NCs de perovskita de haluros de plomo (LHP).

Coinciden con los QDs clásicos en que exhiben excelentes propiedades optoelectrónicas: amplio espectro de absorción, emisión estrecha y sintonizable en función de su tamaño y composición (**Figura 3b-c**),<sup>21</sup> alto coeficiente de absorción y PLQY, capacidad de multiplexado,<sup>24</sup> y emisión *upconversion* desencadenada por absorción multifotónica a partir de una fuente de luz infrarroja (**Figura 3d**).<sup>25,26</sup>

Respecto a los QDs, tienen la ventaja de que pueden ser sintetizados en condiciones suaves de temperatura, de una forma rápida, sencilla y barata. Además, los defectos que se forman son benignos (generalmente son vacantes en los sitios A y X) y se localizan en las bandas de valencia (VB) y de conducción (CB), por lo que alcanzan altos valores de PLQY sin necesidad de pasivar su superficie (**Figura 3e**). Esto marca una diferencia importante con lo que ocurre en los QDs, donde las trampas se localizan en el *bandgap*, lo que induce la recombinación no radiativa y por tanto supone una pérdida de la eficiencia de fotoluminiscencia, haciendo necesario recurrir a una etapa de pasivación de los defectos para incrementar el valor de PLQY.<sup>27</sup>

Los NCs de LHP han demostrado su gran potencial en aplicaciones en fotovoltaica (celdas solares),<sup>28</sup> dispositivos emisores de luz (LEDs, pantallas),<sup>29</sup> fotodetectores...<sup>30</sup> Sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas que ofrece, su utilización como marcador fluorescente en aplicaciones biológicas está poco explorada, principalmente por su baja estabilidad en disolventes polares y toxicidad asociada a la liberación de Pb.

De la misma forma que ocurre con los QDs, es posible hacer frente a sus limitaciones recurriendo a estrategias que permitan su estabilización en condiciones fisiológicas mediante la modificación química de su superficie y faciliten su conjugación a biomoléculas para su utilización en bioimagen o biosensado.

La **Tabla 1** reúne las principales características de los marcadores luminiscentes mencionados en esta sección.

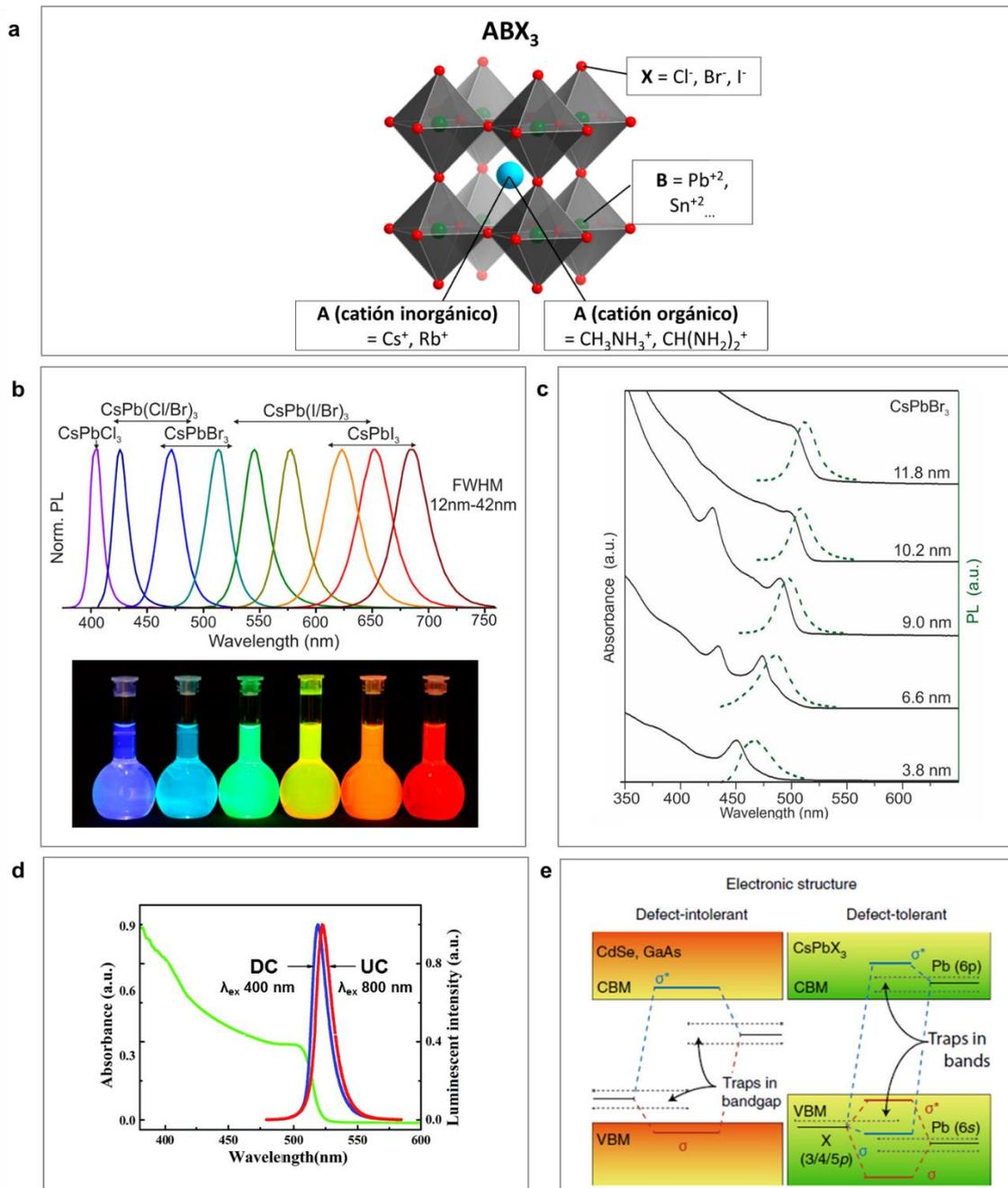
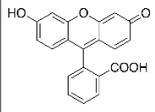
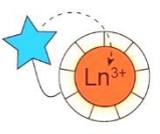
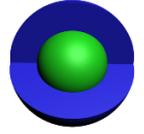


Figura 3. (a) Estructura tridimensional de los NCs de perovskita de haluros metálicos (MHPs). (b) Emisión estrecha (*fwhm* 12-42 nm) y sintonizable en función de la composición del haluro ( $X = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$ , o de las combinaciones mixtas  $\text{Cl}/\text{Br}$  o  $\text{Br}/\text{I}$ ) y (c) del tamaño del nanocristal. (d) Espectro de absorción ancho (línea verde), espectro de emisión a una  $\lambda_{\text{ex}}$  400 nm (línea roja) y emisión *upconversion* (línea azul) a una  $\lambda_{\text{ex}}$  800 nm). (e) Estructura electrónica de QDs y NCs de  $\text{CsPbX}_3$ . En los QDs las trampas originadas por los defectos en la estructura se localizan en el *bandgap*, lo que conlleva a la pérdida de su eficiencia de emisión, mientras que en los NCs de  $\text{CsPbX}_3$  se localizan en las bandas de valencia (VBM) y de conducción (CBM). Imágenes reproducidas de (a) Crystals 2021, 11(3), 295, (b y c) Nano Letters, 2015, 15(6), 3692–3696, (d) Nano Lett. 2016, 16, 1, 448–453, (e) Nature Materials 2018, 17, 394–405

Tabla 1. Características de los marcadores luminiscentes

|   |  |  |  |  |  |
|---|---|---|--|---|---|
| <i>Fluoróforo</i>   | Colorantes orgánicos  | Proteínas fluorescentes   | Quelatos de lantánido  | QDs clásicos  | NCs de LHP  |
| <i>Tamaño</i>   | 0,5 nm (1 kDa)  | 4 nm (27 kDa)   | < 1 nm   | 2-10 nm   | 4-15 nm   |
| <i>Espectro de absorción</i>  | Estrecho  | Estrecho  | Ancho  | Ancho   | Ancho   |
| <i>Coefficiente de absorción molar (M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)</i> | 10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>  | 10 <sup>3</sup>   | 10 <sup>4</sup>  | 10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>  | 10 <sup>5</sup>   |
| <i>Espectro de emisión</i>  | Ancho ( <i>fwhm</i> de 35-100 nm) y asimétrico                                    | Ancho, <i>fwhm</i> (40-150 nm) y asimétrico                                       | Estrecho ( <i>fwhm</i> < 10 nm)  | Estrecho ( <i>fwhm</i> de 25-40 nm) y simétrico                                     | Estrecho ( <i>fwhm</i> de 12-42 nm) y simétrico                                     |
| <i>PLQY (%)</i>   | 50-90   | 20-80   | 20-50  | 10-80   | 50-90   |
| <i>Tiempo de vida de fluorescencia</i>                                  | < 5 ns  | < 5 ns  | 0,5 – 2,5 ms   | 10-20 ns  | 1-29 ns   |
| <i>Fotoestabilidad</i>  | Baja  | Baja  | Alta   | Alta  | Alta  |
| <i>Toxicidad</i>  | Baja  | Baja  | Baja   | Alta (Cd)   | Alta (Pb)   |
| <i>Refs.</i>  | 3,4   | 7,31,32   | 4,8  | 18,33   | 21,34   |

---

## 1.2. Perovskitas de haluros plomo (LHP)

---

### 1.2.1 Descubrimiento y breve historia

El término “perovskita” se refiere a cualquier material con fórmula  $ABX_3$  que comparte la estructura cristalina del titanato de calcio ( $CaTiO_3$ ), mineral que fue descubierto en los Montes Urales de Rusia por Gustav Rose en 1893 y bautizado en honor al mineralista y político ruso Lev Perovski.<sup>35</sup>

Las perovskitas de haluros metálicos (MHPs) adoptan la fórmula general  $ABX_3$ , donde A es un catión monovalente y puede ser inorgánico, como el  $Cs^+$  o el  $Rb^+$ , u orgánico como el metilamonio (MA,  $CH_3NH_3^+$ ) o formamidinio ( $CH(NH_2)_2^+$ , FA). B es un catión metálico divalente ( $Pb^{+2}$ ,  $Sn^{+2}$ ,  $Ge^{+2}$ ...) y X es un anión de haluro ( $Cl^-$ ,  $Br^-$  o  $I^-$ ).

Esta clase de materiales ha experimentado un importante crecimiento en la última década, especialmente aquellos en los que el sitio B está ocupado por Pb, es decir, perovskitas de haluros de plomo (LHPs). Son materiales versátiles, sus precursores sintéticos son abundantes y de bajo coste, su preparación es sencilla, presentan excelentes propiedades optoelectrónicas (absorber luz, transportar cargas, generar electricidad y emitir luz) y son tolerantes a los defectos.<sup>36</sup>

Inicialmente, el interés por las LHPs se centró en su implantación en fotovoltaica, como sensibilizador en células solares, por su capacidad para absorber luz y transportar cargas. En sus comienzos, la metodología consistía en recurrir a *síntesis de plantilla (template synthesis)* para preparar material nanoparticulado de perovskita en matrices porosas de óxidos metálicos ( $TiO_2$  o  $Al_2O_3$ ).<sup>37</sup>

Sin embargo, el desarrollo de metodologías de síntesis de NCs coloidales de LHPs permitió ampliar el abanico de posibilidades, tanto en la procesabilidad de finas películas de perovskita para células solares, como en su integración en dispositivos optoelectrónicos (diodos emisores de luz, fotodetectores...) utilización en fotocatalisis, biosensado/sensado y bioimagen.

En este sentido, cabe destacar el año 2014, cuando Schmidt *et al* demostraron la primera síntesis coloidal de nanopartículas de perovskita, concretamente de  $MAPbBr_3$ , por el método de microemulsión inversa, alcanzando un PLQY del 20%.<sup>20</sup> El papel de los ligandos orgánicos de cadena

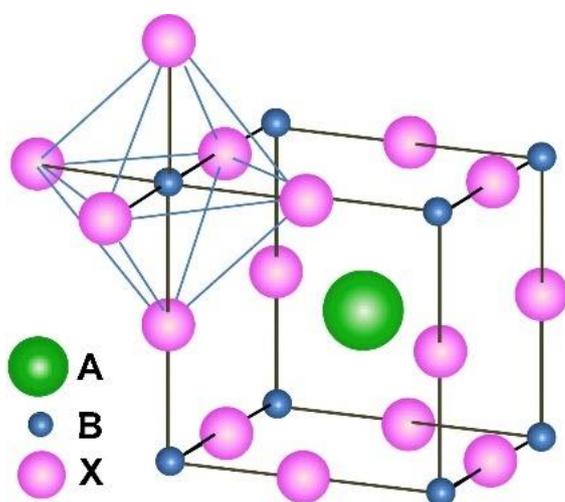
larga demostró ser crítico para limitar el crecimiento y evitar el colapso generando cristales más grandes.

Posteriormente, en 2015 Protesescu *et al* adaptaron la metodología *hot-injection*, tradicionalmente utilizada para sintetizar QDs tradicionales de CdSe,<sup>21</sup> y obtuvieron NCs coloidales monodispersos de perovskita inorgánica para todas las composiciones, es decir,  $\text{CsPbX}_3$  ( $X = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$  y composiciones mixtas de Cl/Br y Br/I). Se trata de uno de los trabajos más relevantes de la última década (con más de 6.000 citas). Con esta metodología es posible controlar el tamaño de los NCs en función de la temperatura de reacción y permite explorar sus excelentes propiedades ópticas, entre ellas: alto PLQY (50-90%) y emisión estrecha (*fwhm* de 12-42 nm) y ajustable en todo el espectro visible (400-700 nm) en función de la composición del haluro y el tamaño del nanocristal.

Estos resultados despertaron un gran interés en la comunidad científica por los NCs de LHPs, debido a que su síntesis podía producirse en condiciones más suaves, empleaba precursores sintéticos más económicos y los NCs exhibían altos PLQY sin la necesidad de pasivar los defectos de su superficie, haciéndolos más competitivos frente a los QDs de CdSe.<sup>38</sup>

El impacto de este trabajo, se tradujo en múltiples adaptaciones de la metodología *hot-injection* que permitieron obtener nanoestructuras de LHPs de diferentes tamaños y morfologías, como nanoplaquetas (NPLs), nanohojas (NSs), nanocables (NWs) y *quantum dots* (QDs).<sup>36</sup>

### 1.2.2 Estructura



La estructura perovskita tridimensional está formada por una combinación de 3 iones que cumplen con la estequiometría  $\text{ABX}_3$ . En estos compuestos, los cationes B se coordinan con 6 aniones para formar un octaedro ( $\text{BX}_6$ ) y los cationes A se coordinan con 12 aniones para formar un cuboctaedro (**Figura 4**).<sup>39</sup>

Figura 4. Estructura perovskita  $\text{ABX}_3$ , donde los cationes B se coordinan con 6 aniones formando un octaedro ( $\text{BX}_6$ ) y los cationes A ocupan el sitio central del cuboctaedro. Imagen reproducida de *Materials Today*, 2015, 18(2), 65–72

El trío de iones en las MHPs debe cumplir con la neutralidad de carga ( $A^+$ ,  $B^{+2}$ ,  $X^-$ ) para adoptar la fórmula  $ABX_3$ .<sup>40</sup> Sin embargo, esto no implica necesariamente que adquieran la estructura cristalina perovskita. Existe una combinación de dos parámetros que permite predecir la estabilidad de la estructura. Estos son el factor de tolerancia ( $t$ ) de Goldschmidt y el factor octaédrico ( $\mu$ ).

El **factor de tolerancia** ( $t$ ) de Goldschmidt permite evaluar los desajustes relativos al tamaño de los iones para formar la estructura perovskita y se define como:

$$t = \frac{(r_A + r_B)}{\sqrt{2}(r_B + r_X)}$$

donde  $r_A$ ,  $r_B$  y  $r_X$  son los radios iónicos de A, B y X, respectivamente.

En una estructura perovskita cúbica ideal, el factor de tolerancia equivale a 1, aunque experimentalmente, el valor de  $t$  oscila entre 0,8 y 1 en la mayor parte de las perovskitas.<sup>41</sup> En el caso de las perovskitas de haluros de plomo (LHPs),  $t \geq 0,89$ , lo que implica que A solo pueda ser ocupado por Cs, MA o FA. Las LHPs que se encuentran en los límites de este rango, p.ej:  $FAPbI_3$  ( $t=1$ ) y  $CsPbI_3$  ( $t=0,8$ ), se transforman con facilidad en otras fases fotoinactivas a temperatura ambiente, conocidas como fases amarillas.<sup>36</sup>

El **factor octaédrico** ( $\mu$ ) permite estimar la estabilidad de los octaedros  $BX_6$  y se define como:

$$\mu = \frac{r_B}{r_X}$$

donde  $r_B$  y  $r_X$  son los radios iónicos de B y X, respectivamente. El rango de estabilidad se encuentra entre 0,4 y 0,89.

El factor de tolerancia ( $t$ ) junto con el factor octaédrico ( $\mu$ ) permiten predecir si una determinada combinación de iones puede adoptar la estructura perovskita 3D y, por tanto, constituye una herramienta clave para predecir y diseñar nuevos materiales de perovskita (**Figura 5**).

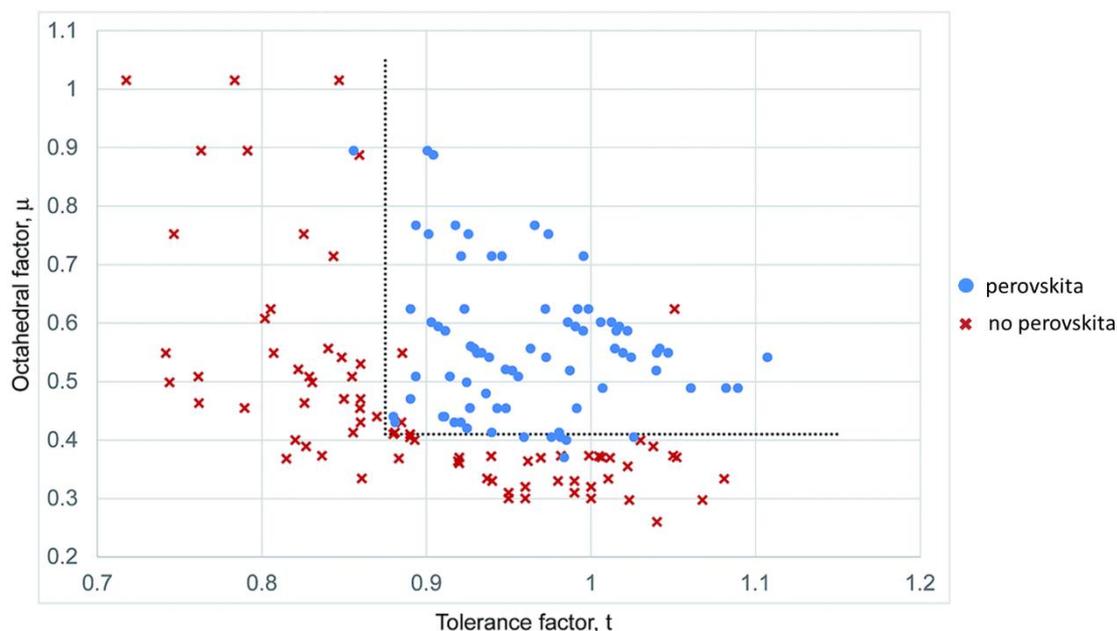


Figura 5. Mapa que determina la región en que la estructura perovskita se forma (puntos en azul), delimitada por el valor del factor octaédrico situado entre 0,4 – 0,89 y el factor de tolerancia, entre 0,8 y 1. Imagen reproducida de Chem. Sci., 2016,7, 4548-4556

### 1.2.3 Composición y propiedades ópticas

Como ya se ha mencionado, las perovskitas de haluros plomo adoptan la fórmula general  $APbX_3$ , donde A es un catión monovalente y puede ser inorgánico, como el  $Cs^+$ , u orgánico como el metilamonio ( $MA$ ,  $CH_3NH_3^+$ ) o formamidinio ( $CH(NH_2)_2^+$ ,  $FA$ ). B está ocupado por  $Pb^{+2}$  y X es un halógeno ( $Cl^-$ ,  $Br^-$  o  $I^-$ ).

En función de la naturaleza del catión, se puede distinguir entre perovskitas puramente inorgánicas o híbridas orgánico-inorgánicas. Entre ellas, las puramente inorgánicas se caracterizan por una mayor estabilidad frente a temperaturas elevadas.<sup>42</sup>

La preocupación por la toxicidad del Pb ha llevado a buscar sustitutos que ocupen el sitio B, como otros elementos del grupo 14 (Sn, Ge), elementos del grupo 15 (Bi, Sb) o tierras raras (Yb, Eu).<sup>43</sup>

Los nanocristales de perovskita de LHPs reúnen propiedades fotofísicas de especial interés, ya que combinan las propiedades optoelectrónicas de perovskita en *bulk* junto con efectos de confinamiento cuántico en la

nanoescala. Entre ellas: amplio espectro de absorción, banda de emisión estrecha, posibilidad de modular el *bandgap* en función de la composición y el tamaño del nanocrystal,<sup>21</sup> alto coeficiente de absorción, PLQY cercano a la unidad y posibilidad de presentar fenómenos de emisión *upconversion*, pudiendo convertir energía infrarroja en visible.

Una de las mayores ventajas de estos materiales es la facilidad de modular sus propiedades ópticas en función de la composición, especialmente la del haluro. Por ejemplo, Protesescu *et al* demostraron cómo en función de las sales precursoras de  $PbX_2$  es posible sintetizar  $CsPbX_3$  cuya emisión cubre el espectro visible (400-700), a partir de composiciones puras de  $CsPbCl_3$  ( $\lambda_{em}$  410 nm),  $CsPbBr_3$  ( $\lambda_{em}$  512 nm) y  $CsPbI_3$  ( $\lambda_{em}$  685 nm) y mixtas ( $X = Cl/Br$  y  $Br/I$ ), cuya emisión adquiere los valores intermedios del espectro en función de los ratios de las sales precursoras (**Figura 6a**).<sup>21</sup> Los grupos de Manna y Kovalenko demostraron al mismo tiempo que la composición del haluro también puede modularse postsintéticamente de  $Br \rightarrow Cl$  o  $Br \rightarrow I$  (y viceversa) a partir de reacciones de intercambio aniónico añadiendo una fuente de aniones ( $PbX_2$ ,  $OAmX...$ ) (**Figura 6b**).<sup>44,45</sup>

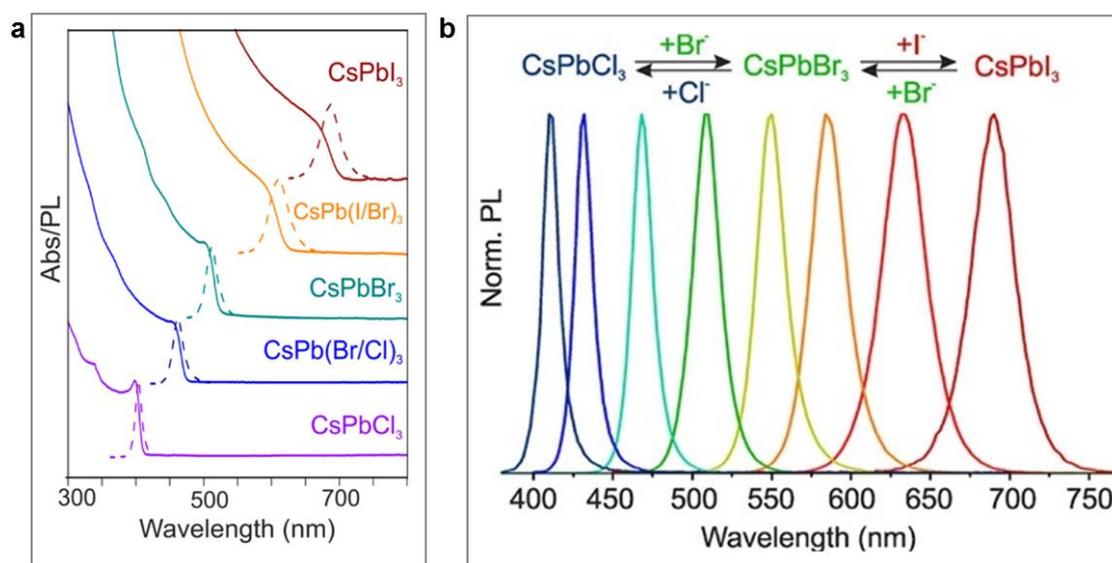


Figura 6. (a) Comparación de los espectros de absorción y emisión de los NCs de  $CsPbX_3$  en función de su composición ( $X = Cl, Br, I$  y de las composiciones mixtas de  $Cl/Br$  y  $Br/I$ ). (b) Modulación del espectro de emisión a partir de reacciones de intercambio aniónico de los NCs de  $CsPbBr_3$  previamente sintetizados. Imágenes reproducidas de (a) *Nano Letters*, 2015, 15(6), 3692–3696 y (b) *Nano Lett.* 2015, 15, 8, 5635-5640

Otra de las ventajas de este material es la tolerancia a los defectos, lo que implica que es relativamente sencillo obtener altos valores de PLQY. La estructura perovskita tiene una baja densidad de defectos estructurales de alta energía y aquellos de baja energía (vacantes) crean estados electrónicos superficiales localizados en las bandas de valencia o de conducción. Esto implica que son benignos y por tanto la eficiencia de emisión no se ve afectada de forma significativa. Por el contrario, en los QDs tradicionales, las trampas se localizan en el *bandgap*, lo que induce procesos de recombinación no radiativa que producen una pérdida de la eficiencia de fotoluminiscencia, haciendo necesario recurrir a una etapa adicional de pasivación para incrementar el valor de PLQY.<sup>27</sup>

Además de las ventajas mencionadas, una de sus propiedades más atractivas radica en la no linealidad de su óptica. Es decir, en la emisión *upconversion*, donde la absorción simultánea de hasta cinco fotones de una fuente de luz infrarroja produce la emisión de un fotón de mayor energía.<sup>23,24</sup> El elevado grado de absorción no lineal ofrece ventajas significativas, ya que permite eliminar autofluorescencia de fondo de las muestras biológicas, mejora de la resolución de la imagen y, reduce el daño biológico de la muestra, al requerir irradiaciones menos energéticas que tienen alta penetración en los tejidos.

#### 1.2.4 Métodos de síntesis de nanocristales de perovskita

Existe una gran variedad de métodos de síntesis de nanocristales de perovskita (PNCs). En función del material de partida pueden clasificarse en métodos *top-down* o *bottom-up*. La **Figura 7** ilustra algunos ejemplos de síntesis *top-down* y *bottom-up*.

Los métodos ***top-down*** son aquellos en los que los NCs se obtienen a partir de perovskita en *bulk* empleando métodos mecánicos como por ejemplo, la utilización de un molino de bolas,<sup>46,47</sup> ultrasonidos,<sup>48,49</sup> o métodos fotoinducidos, como la ablación láser.<sup>50,51</sup> Estas técnicas implican la fragmentación y reducción de tamaño de los cristales hasta alcanzar dimensiones nanométricas. Por lo general, son estrategias que permiten la producción a gran escala, pueden llevarse a cabo en condiciones ambientales y son más sostenibles, ya que reducen el consumo de disolventes orgánicos. Sin embargo, generalmente dan lugar a una población polidispersa de NCs.

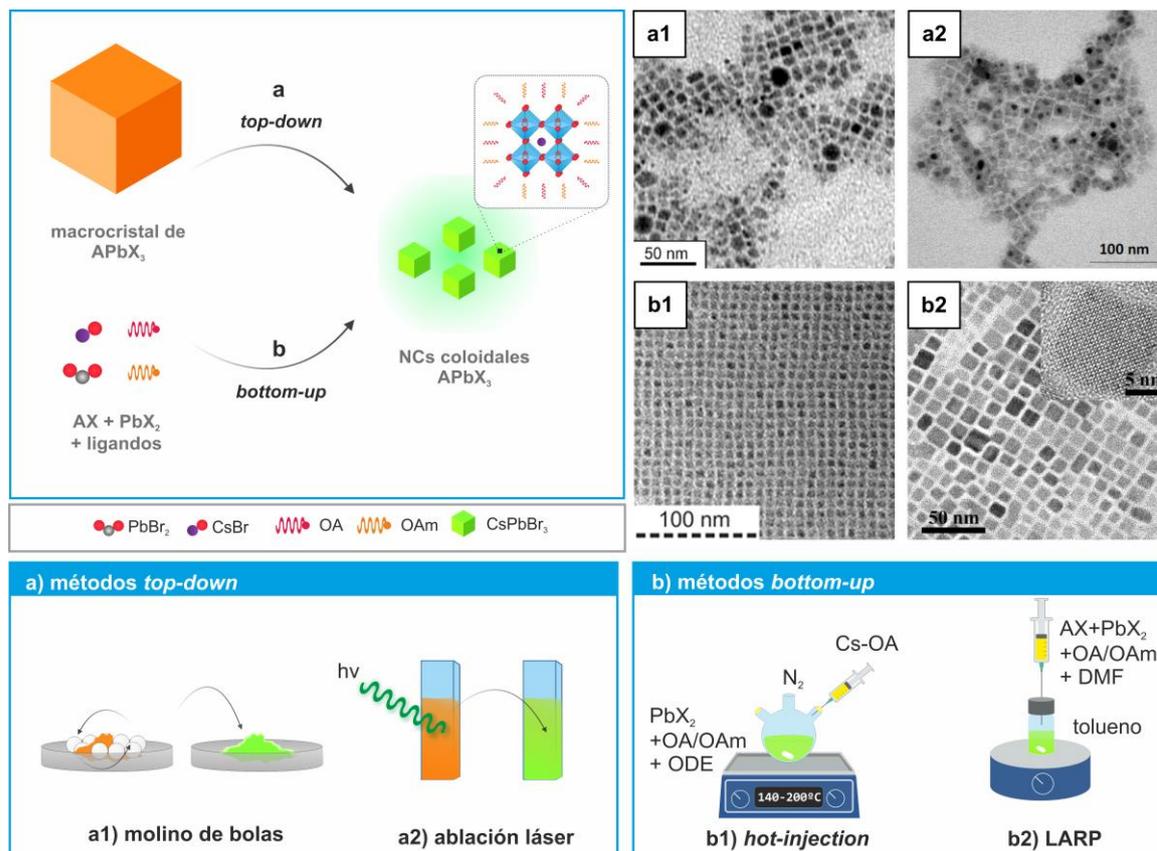


Figura 7. Clasificación de los métodos de síntesis de NCs coloidales de LHP. (a) *Top-down*, cuando el material de partida son macro- o microcristales que someten a disrupción mecánica (a1) molino de bolas, o fotoinducida (a2) ablación láser. (b) *Bottom-up*, cuando se parte de los precursores sintéticos (sales y ligandos). Los métodos bottom-up más representativos son (b1) *hot-injection*, y (b2) LARP. Imágenes de TEM reproducidas de (a1) ACS Appl. Nano Mater. 2018, 1, 3, 1300–1308, (a2) Chem Phys Chem, 2017, 8,9, 1047–1054, (b1) Nano Letters, 2015, 15(6), 3692–3696, (b2) Advanced Functional Materials, 2016, 26, 15, 2435–2445

En los métodos **bottom-up**, los NCs se obtienen a partir de sus precursores sintéticos, entre los que se incluyen la fuente de iones ( $A^+$ ,  $Pb^{+2}$  y  $X^-$ ) junto con otras moléculas estabilizantes o ligandos que permiten dirigir el crecimiento del nanocristal para que se produzca de forma confinada. La principal ventaja de los métodos bottom-up es que tienen un control más preciso sobre el tamaño y morfología del nanocristal. Como desventaja, cabe destacar que son procesos más difíciles de escalar y requieren un mayor consumo de disolventes orgánicos. Algunos ejemplos son la microemulsión inversa, la síntesis de inyección en caliente (*hot-injection*) y la reprecipitación asistida por ligando (LARP, *ligand-assisted reprecipitation*).

## — Microemulsión inversa

La microemulsión inversa fue la metodología con la cual Schmidt *et al* demostraron en 2014, la primera síntesis coloidal de nanopartículas de LHPs, concretamente de  $\text{MAPbBr}_3$ .<sup>20</sup>

En ella, las sales precursoras ( $\text{MABr}$  y  $\text{PbBr}_2$ ) se disuelven previamente en dimetilformamida (DMF) y posteriormente se añaden a una mezcla de los ligandos bromuro de octilamonio ( $\text{OABr}$ ) y ácido oleico (OA) en octadeceno (ODE). La adición de acetona produce la precipitación de los NCs, los cuales posteriormente pueden dispersarse en disolventes apolares como el tolueno, manteniendo una estabilidad coloidal de 3 meses (**Figura 8a**).

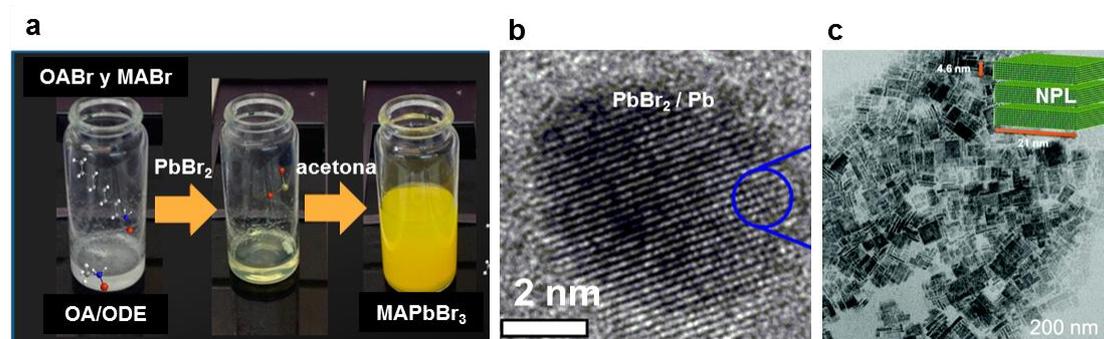


Figura 8. (a) Síntesis coloidal de  $\text{MAPbBr}_3$  mediante la metodología de microemulsión inversa. Caracterización por TEM de las (b) NPs esféricas y de las (c) NPLs. Imágenes reproducidas de (a y b) J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 3, 850–853 y (c) Nanoscale, 2022,14, 1160-1164

En un principio, las NPs de  $\text{MAPbBr}_3$  se caracterizaron por tener morfología esférica, un tamaño de 6 nm y un PLQY del 20% (**Figura 8b**). Poco después, González-Carrero *et al*, publicaron un segundo trabajo donde optimizaron la proporción de los precursores sintéticos y obtuvieron una población mixta de nanopartículas esféricas y nanoplaquetas (NPLs), con un PLQY del 83%.<sup>52</sup>

Finalmente, en su trabajo más reciente, Rosa-Pardo *et al* resolvieron algunas de las cuestiones sobre las que se ha debatido durante estos últimos años.<sup>53</sup> En primer lugar, concluyeron que la metodología de microemulsión reversa genera NPLs (**Figura 8c**), cuyo valor de PLQY asciende hasta el 93% tras mejorar el proceso de purificación. En segundo lugar, aclararon que las NPs esféricas observadas en los trabajos anteriores son resultado del proceso de degradación de las NPLs de  $\text{MAPbBr}_3$  causado por la exposición al haz de electrones durante la caracterización del material por TEM. Según Sichert *et al*, las NPs esféricas se componen de Pb o  $\text{PbBr}_2$ .<sup>54</sup>

## — Hot-injection

La metodología de inyección en caliente o *hot-injection* fue desarrollada por Protesescu *et al* en 2015,<sup>21</sup> basándose en la metodología empleada tradicionalmente para obtener QDs de CdSe.

El método consiste en la obtención de NCs de CsPbX<sub>3</sub> coloidales por medio de la inyección rápida a alta temperatura (140-200 °C) y bajo atmósfera inerte de oleato de cesio (Cs-OA) en una disolución que contiene la sal de plomo (PbX<sub>2</sub>) en presencia de los ligandos ácido oleico (OA) y oleilamina (OAm) en octadeceno (ODE). En el momento de la inyección, se produce rápidamente la nucleación y crecimiento de los NCs.

Los NCs obtenidos por *hot-injection* se caracterizan por tener morfología cúbica y un tamaño que puede ajustarse de 4 a 15 nm en función de la T<sup>a</sup> de inyección. Generalmente, el tamaño disminuye al aplicar temperaturas más bajas, aunque cuando es inferior a 130 °C, se obtienen nanoestructuras 2D conocidas como nanoplaquetas (NPLs), cuya emisión se desplaza hacia el azul.<sup>57</sup>

La emisión de los NCs es estrecha, con *fwhm* de 12-42 nm y altos valores de PLQY (50-90%) para las composiciones de CsPbBr<sub>3</sub> y CsPbI<sub>3</sub>.<sup>44,55,56</sup> Sin embargo, los NCs de CsPbCl<sub>3</sub> presentan un PLQY relativamente bajo (< 5%).<sup>57-59</sup> Esto se debe al pequeño tamaño del anión de Cl, que resulta en la reducción de la distancia interplanar y distorsión de la estructura del cristal y a la presencia de defectos que inducen recombinación no radiativa, lo que disminuye la eficiencia de emisión de fluorescencia.

Esta metodología ha tenido un gran impacto. Actualmente cuenta con más de 6.000 citas y permite sintetizar otras nanoestructuras con tamaño y morfología uniforme, entre ellas: nanocables, nanoplaquetas, *quantum dots* y *nanorods*.

## — Reprecipitación asistida por ligando (LARP)

El método LARP también permite obtener NCs de CsPbX<sub>3</sub> de forma más económica, sencilla y fácil de escalar, donde la cristalización se desencadena al reducir la solubilidad de las sales en el medio de reacción.<sup>60</sup>

Para ello, inicialmente las sales precursoras (CsBr y PbX<sub>2</sub>) y los ligandos (OA/OAm) se mezclan en un disolvente donde estos componentes presentan una buena solubilidad (p.ej: DMF o DMSO). Cuando esta disolución se añade a

un disolvente donde son poco solubles, también conocido como antidisolvente (p.ej: tolueno), precipitan y cristalizan. Los ligandos (ácido oleico y oleilamina) controlan el tamaño de los cristales y facilitan su dispersión.

A diferencia del método de *hot-injection*, esta reacción ocurre a temperatura y atmósfera ambiental. Los NCs se caracterizan por espectros de emisión estrechos, con *fwhm* de 18-35 nm y valores de PLQY generalmente altos para la emisión verde de CsPbBr<sub>3</sub> (95%) y las composiciones mixtas de Cl/Br (70%) y Br/I (80%). De la misma forma que con el método *hot-injection*, se registran valores bajos de PLQY para la composición de CsPbCl<sub>3</sub> (10%).

Aunque el método LARP está bien establecido para la obtención de nanocubos, a menudo su población puede incluir otras nanoestructuras (NPLs y nanocables). Mientras que el método *hot-injection* ofrece mejor control de la forma y distribución de los NCs.<sup>61</sup>

En esta tesis, cuyo objetivo principal es obtener partículas uniformes de pequeño tamaño para su utilización como marcadores en sistemas analíticos, biosensado o bioimagen, se recurre a la metodología *hot-injection*, ya que es la más extendida para obtener NCs monodispersos de forma reproducible y con una morfología controlada.

### 1.2.5 Estrategias de estabilización

La principal limitación de estos materiales es la baja estabilidad que presentan frente a factores ambientales (humedad, oxidación, luz y alta temperatura), lo cual dificulta el desarrollo de sus aplicaciones. Por ello, múltiples estrategias se han centrado en solventar este problema por medio de la pasivación de su superficie con ligandos alternativos a los utilizados en la etapa sintética o mediante recubrimientos basados en sílice o poliméricos para dotarlos de una barrera física que los proteja frente a factores externos, de modo que sea posible desarrollar sus aplicaciones.

## ► Modificación de los ligandos de superficie

Los ligandos juegan un papel esencial en la preparación de nanocristales de perovskita, ya que proporcionan estabilidad estructural y coloidal. Son necesarios para solubilizar las sales, controlar el tamaño del nanocristal, pasivar su superficie y prevenir que los NCs se aglomeren entre sí.

Para la síntesis de los NCs de perovskita, generalmente se emplean ligandos orgánicos de cadena larga, como la oleilamina (OAm) y el ácido oleico (OA). Existen múltiples mecanismos que explican cómo se unen y estabilizan la superficie de los NCs (**Figura 9**). La amina en su forma protonada (oleilamonio) puede unirse a la superficie del NC ocupando las vacantes de A o uniéndose a los aniones X (por interacción electrostática o formando puentes de hidrógeno). Mientras que el oleato puede ocupar las vacantes de X o unirse a los cationes A por interacción electrostática.<sup>27,62</sup>

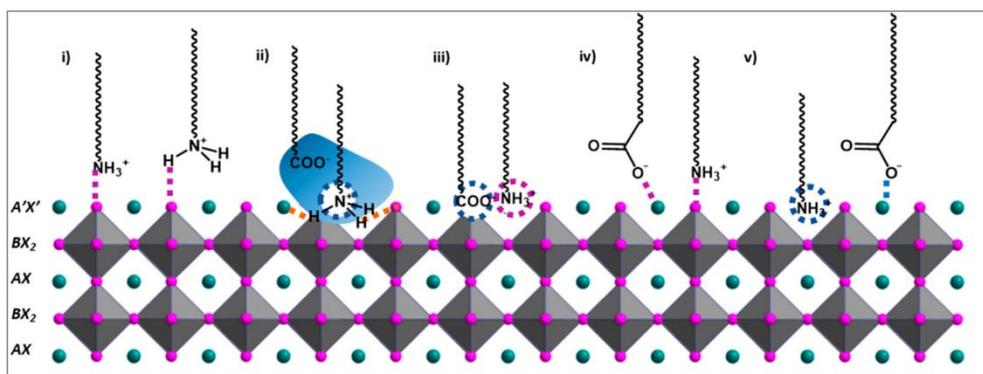


Figura 9. Mecanismos de unión de los ligandos convencionales (ácido oleico y oleilamina) a la superficie de los NCs de  $APbX_3$ . (i) La oleilamina en su forma protonada (oleilamonio) se une a los haluros ( $X^-$ ) por interacción electrostática o formando puentes de hidrógeno. (ii) Los iones de oleato no se unen a la superficie, sino que neutralizan la carga de los ligandos de oleilamonio unidos a la superficie. (iii) El oleato ocupa las vacantes de las posiciones de X de la superficie. (iv) El oleato y los iones de oleilamonio interactúan electrostáticamente con los iones de  $A^+$  y  $X^-$ , respectivamente. (v) El oleilamonio ocupa las vacantes de A y los iones de oleato interactúan con  $A^+$ . Imagen reproducida de ACS Energy Lett. 2023, 8, 2, 1152–1191

Sin embargo, la labilidad de su química de superficies, favorecida por la reacción de neutralización entre ambos ligandos, resulta en la pérdida de los mismos, favoreciendo la coalescencia de los NCs y/o la degradación causada por agentes externos, lo que conlleva a la pérdida de su estabilidad estructural y propiedades ópticas.

Una estrategia para mejorar la estabilidad de los NCs de perovskita consiste en sustituir estos ligandos por otros que proporcionen mayor estabilidad, bien por efectos estéricos o por mayor estabilidad del enlace. A continuación, se muestran algunos ejemplos descritos en la bibliografía. La **Tabla 2** resume los resultados.

Tabla 2. NCs de LHP estabilizados mediante reemplazo de ligando

|   | Ligando      | NCs                 | Tamaño (nm) | PLQY (%) | Estabilidad en agua | Aplicación    | Ref. |
|---|--------------|---------------------|-------------|----------|---------------------|---------------|------|
| a | APTES        | MAPbBr <sub>3</sub> | 2,5 - 100   | 2 - 55   | N.D.                | N.D.          | 63   |
| b | PFOTES       | CsPbBr <sub>3</sub> | 20-100      | 80       | 8 días              | Inmunotinción | 64   |
| c | TDPA         | CsPbBr <sub>3</sub> | 5           | 68       | 5 h                 | LEDs          | 65   |
| d | OPA          | CsPbBr <sub>3</sub> | 11          | 90       | N.D.                | LEDs          | 66   |
| e | DBSA         | CsPbBr <sub>3</sub> | 8           | 90       | N.D.                | N.D.          | 67   |
| f | Sulfobetaína | CsPbBr <sub>3</sub> | 15          | 80       | N.D.                | N.D.          | 68   |
| g | TOP/TBP/DPP  | CsPbBr <sub>3</sub> | 9           | 75 - 83  | 2 días              | N.D.          | 69   |
| h | TOPO         | CsPbBr <sub>3</sub> | 11,2        | N.D.     | N.D.                | N.D.          | 70   |

**APTES:** 3-aminopropiltriethoxisilano · **DBSA:** ácido dodecibenceno sulfónico · **DPP:** difenilfosfina · **PFOTES:** perfluorooctiltriethoxisilano · **TDPA:** ácido tetradecilfosfónico · **TBP:** tributilfosfina · **TOP:** trioctilfosfina · **TOPO:** óxido de trioctilfosfina

#### a) Sustitución de uno o ambos ligandos por:

- Ligandos ramificados, como el 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) o silsesquioxanos oligoméricos poliédricos con terminación de grupo amino (NH<sub>2</sub>-POSS).<sup>63</sup> Estos permiten sintetizar NCs con tamaños más pequeños (< 5 nm) (**Figura 10a**) y, por efecto estérico, restringen el acceso de moléculas de disolventes polares a la superficie del NC, principalmente de isopropanol y en menor medida de moléculas más pequeñas como etanol o metanol.
- Agentes fluorocarbonados, como el perfluorooctiltriethoxisilano (PFOTES),<sup>64</sup> se han utilizado en combinación con la OAm para sintetizar NCs directamente resistentes en agua. El PFOTES posee una cadena fluorocarbonada que interacciona hidrofóticamente con las cadenas de la OAm, contribuyendo a la estabilización del NC. Por otro lado, las cabezas polares (Si-OH) facilitan su dispersión en agua. Aunque la población de NCs es polidispersa (20-100 nm), mantienen su fluorescencia en agua 8 días (**Figura 10b**).

- Ácidos fosfónicos (ácido tetradecilfosfónico, ácido octilfosfónico)<sup>65,66,71</sup> y ácidos sulfónicos (ácido dodecilbenceno sulfónico)<sup>67</sup> ambos con cadenas apolares largas (**Figura 10c-e**). Haciendo uso de esta estrategia, los NCs resisten a varios ciclos de purificación con disolventes orgánicos polares y pueden alcanzar una larga estabilidad coloidal (5 meses).
  - Moléculas zwitteriónicas (sulfobetainas, fosfocolinas,  $\gamma$ -aminoácidos), permiten sustituir directamente a ambos ligandos, ya que pueden coordinarse simultáneamente a los cationes y aniones de la superficie.<sup>68</sup> Son menos lábiles, ya que no se produce la reacción de neutralización como con la pareja convencional de ligandos. Los NCs resultantes son capaces de retener el 70-90% de su PLQY hasta 50 días después de haber sido lavados con disolventes orgánicos polares durante la etapa de purificación (**Figura 10f**).
- b) **Incorporación de otros ligandos al sistema de reacción**, como fosfinas (trioctilfosfina, tributilfosfina o difenilfosfina) u óxido de trioctilfosfina (TOPO), que confieren estabilidad en presencia de etanol (**Figura 10g-h**).<sup>69,70,72</sup>

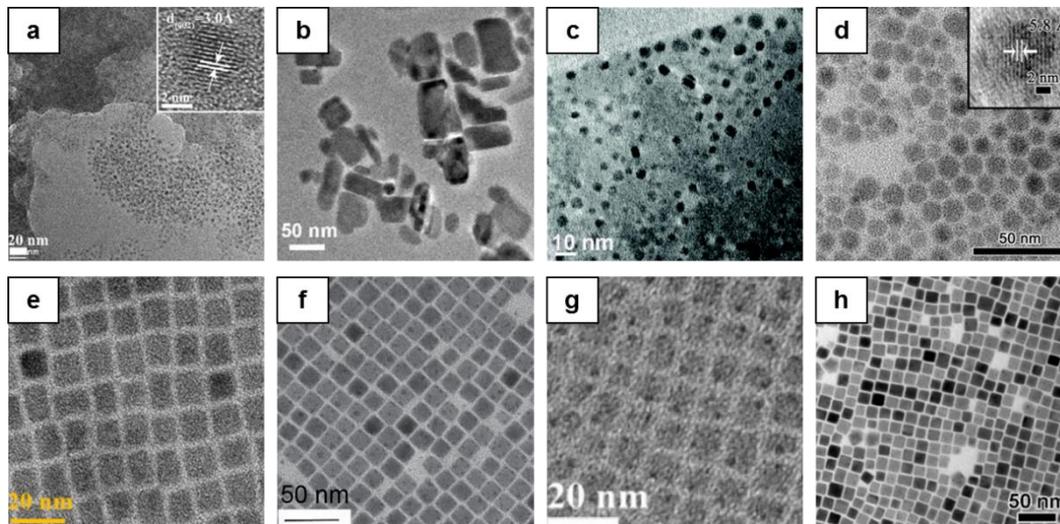


Figura 10. Imágenes de TEM de los NCs de LHPs estabilizados mediante el reemplazo de ligandos. (a) *Angewandte*. 2016, 70005, 9010–9014, (b) *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018, 10, 50, 43915–43922, (c) *Nanoscale*, 2017,9, 15286–15290, (d) *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2018, 10, 4, 3784–3792, (e) *Advanced Materials*. 2019, 3130, 1–8, (f) *ACS Energy Lett.* 2018, 3, 3, 641–646, (g) *Nano Research*. 2019, 785–789, (h) *Langmuir* 2017, 33, 44, 12689–12696

En general, la modificación de los ligandos de superficie contribuye a mejorar la estabilidad coloidal de los NCs durante su almacenaje y a resistir frente a algunos disolventes polares. Sin embargo, las aplicaciones que se busca desarrollar en esta tesis implican que las partículas puedan dispersarse completamente en agua y en tampones salinos sin perder su estructura, por lo que es necesario recurrir a estrategias que proporcionen una barrera física que pueda asegurar una mayor estabilidad de las propiedades ópticas de los NCs de perovskita.

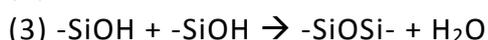
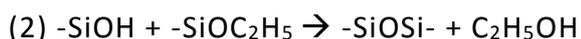
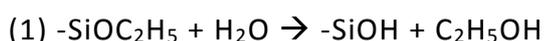
## ► Recubrimientos basados en sílice

La sílice (SiO<sub>2</sub>) es un material inorgánico, transparente, biocompatible, con una química ampliamente estudiada y fácil de funcionalizar. Se utiliza con frecuencia como recubrimiento de otros nanomateriales para mejorar su estabilidad estructural frente a agentes externos (humedad, oxidación...).

La estabilización de los NCs de perovskita en una matriz de sílice puede llevarse a cabo mediante dos estrategias: crecimiento de una envoltura de sílice mediante el proceso sol-gel o cristalización *in situ* en materiales silíceos porosos.

### I. Crecimiento de una envoltura de SiO<sub>2</sub>

Las nanoesferas de sílice se sintetizan generalmente por el método de Stöber,<sup>73</sup> un proceso sol-gel que implica la hidrólisis y condensación de un alcoxilano como fuente precursora de sílice (p.ej: tetraetilortosilicato, TEOS). La hidrólisis del grupo alcoxilano (-Si-OR) (ec. 1), genera grupos silanol (-Si-OH), que condensan formando un enlace -Si-O-Si- liberando alcohol (ec. 2) o agua (ec. 3).



La principal limitación a la hora de crecer una capa de sílice alrededor de los NCs de perovskita es la rápida degradación que estos sufren en las condiciones de reacción del método de Stöber, lo que conlleva a la pérdida de su integridad estructural y capacidad de emisión.

Las estrategias que han logrado adaptar el proceso sol-gel para estabilizar a los NCs de LHP mediante un recubrimiento de sílice se dividen en tres categorías, atendiendo al material de partida: (A) mezcla de las sales CsBr y PbBr<sub>2</sub>, (B) NCs de CsPbBr<sub>3</sub> o (C) NCs de Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>6</sub> (**Figura 11**).

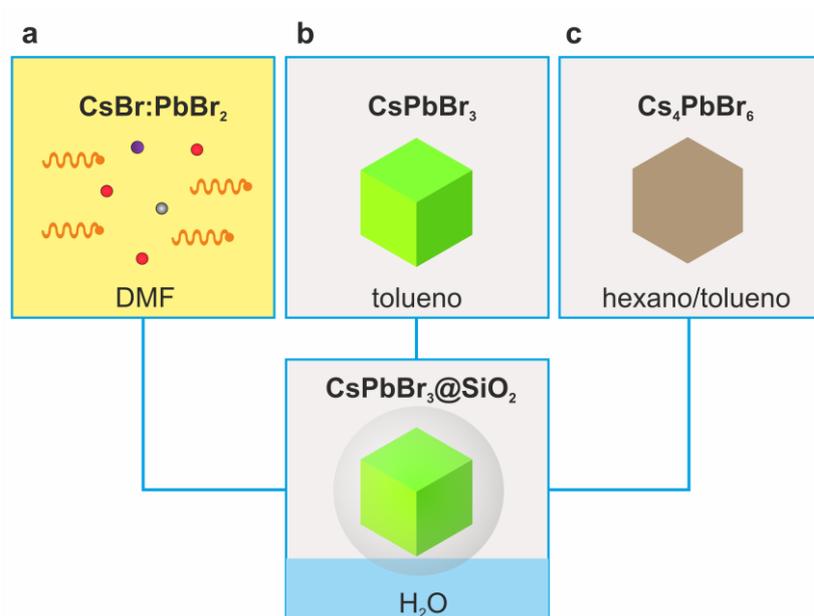


Figura 11. Crecimiento de una envoltura de SiO<sub>2</sub> a partir de (a) las sales precursoras, (b) los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> o (c) Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>6</sub>

### A. Adaptación de la metodología LARP

Esta aproximación consiste en sincronizar el método sintético LARP con el proceso sol-gel de crecimiento de la envoltura de sílice. En primer lugar, las sales precursoras (CsBr y PbBr<sub>2</sub>) y los ligandos (OA/OAm), se disuelven en DMF o DMSO. Posteriormente, esta disolución se inyecta rápidamente y bajo agitación vigorosa en otra disolución que contiene el alcoxisilano en tolueno y se deja incubar hasta completar el proceso de hidrólisis y condensación de los grupos silanoles.

El ejemplo más representativo de esta estrategia es el trabajo de Zhong *et al* (**Figura 12**), donde obtienen NPs monodispersas *core-shell* de CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> con un solo núcleo de 10,5 nm y una capa de sílice de un grosor de 7,7 nm.<sup>74</sup> En su metodología utilizan TMOS como fuente precursora de sílice en presencia de NH<sub>4</sub>OH como catalizador básico de la reacción. Las NPs resultantes alcanzan un valor de PLQY alto (90%) en tolueno y muestran mayor estabilidad en agua frente a los NCs sin encapsular (al menos durante los primeros 40 min).

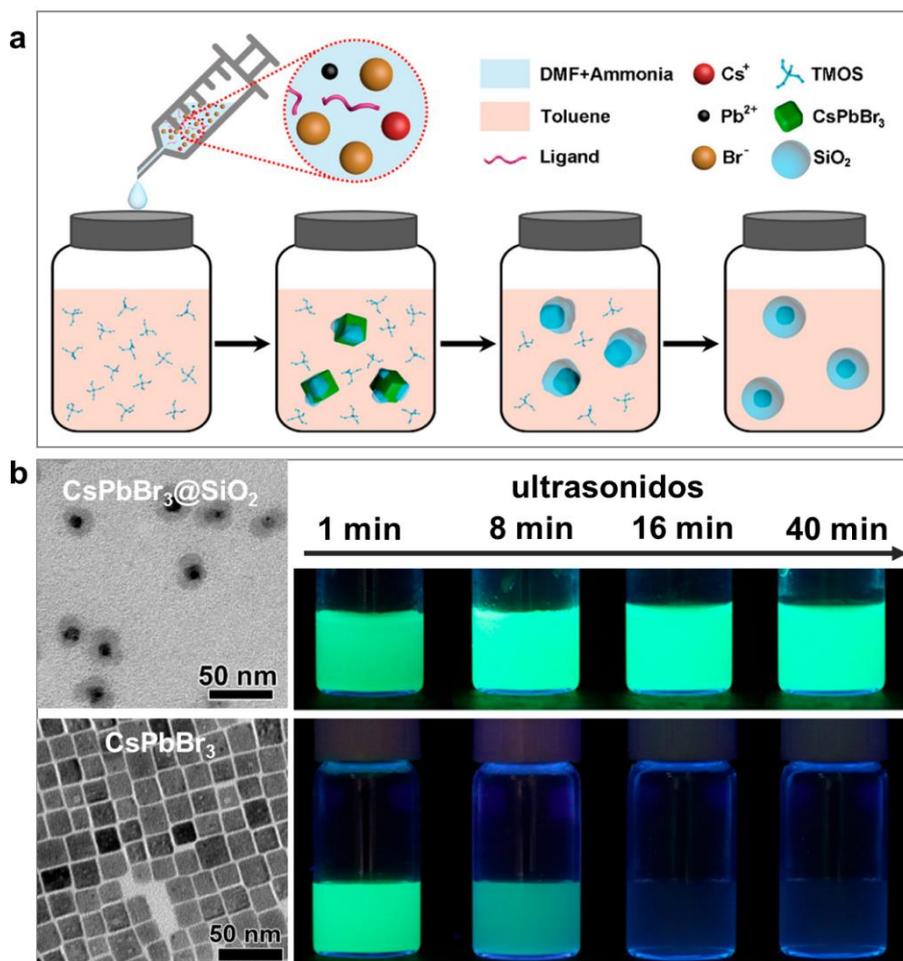


Figura 12. (a) Mecanismo de síntesis de NPs *core-shell* de  $\text{CsPbBr}_3@SiO_2$  basado en la adaptación del método LARP de Zhong *et al.* La disolución de DMF que contiene las sales precursoras ( $\text{CsBr}$ ,  $\text{PbBr}_2$ ), los ligandos (OA/OAm) y el amoníaco, se inyecta en una disolución que contiene tolueno y TMOS. La reacción transcurre a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  en condiciones de agitación durante un tiempo de incubación de 2 h. (b) Caracterización por TEM de las NPs *core-shell* de  $\text{CsPbBr}_3@SiO_2$  (18,2 nm) y de los NCs de  $\text{CsPbBr}_3$  (17,2 nm). Seguimiento de la fluorescencia durante los primeros 40 minutos en agua aplicando condiciones de ultrasonidos. Imágenes reproducidas de ACS Nano 2018, 12, 8, 8579-8587

También hay otros trabajos donde el recubrimiento de sílice se genera a partir una fuente alternativa de sílice, por ejemplo silanos aminados como el (3-aminopropil)trimetoxisilano (APTMS),<sup>75</sup> o el (3-aminopropil)triétoxisilano (APTES).<sup>76</sup> A la vez que se unen a la superficie de los NCs, proporcionan grupos silanoles libres tras hidrolizarse. Sin embargo, como resultado se obtienen compuestos de gran tamaño.

Por ejemplo, Xu *et al* sustituyeron el TMOS por APTES y produjeron NPs de sílice con un tamaño de 200 nm, en cuyo interior coexisten NCs de CsPbBr<sub>3</sub> y de Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>6</sub> y alcanzan un PLQY del 48%.<sup>76</sup> Estas NPs pueden dispersarse en PDMS y utilizarse como tintas fluorescentes que resisten temperaturas hasta 120 °C. Los resultados de este trabajo se incluyen en la **Figura 13**.

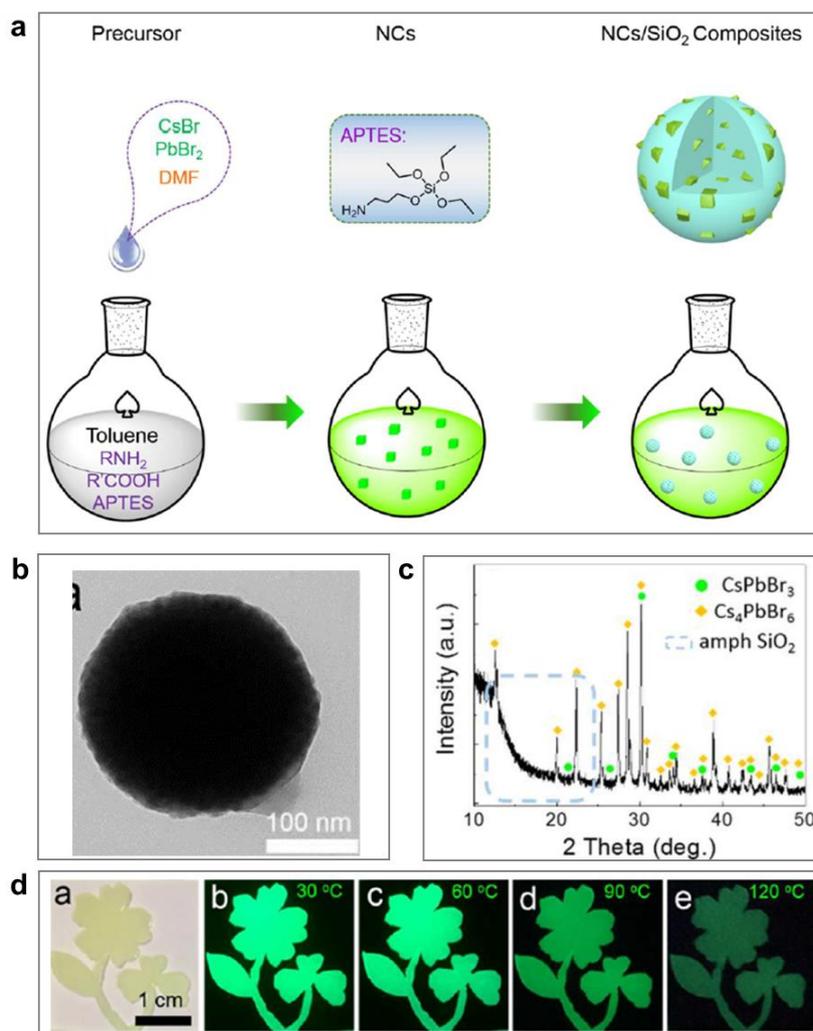


Figura 13. (a) Mecanismo de síntesis de compuestos de CsPbBr<sub>3</sub>/Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> basado en la adaptación del método LARP de Xu *et al*. Las sales precursoras (CsBr, PbBr<sub>2</sub>) disueltas en DMSO se inyectan en una disolución de tolueno que contiene los ligandos (OA/OAm) y APTES. La reacción transcurre en condiciones de agitación y temperatura ambiente durante 12 h. (b) TEM de una partícula de CsPbBr<sub>3</sub>/Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> (~200 nm). (c) XRD que confirma la coexistencia de NCs de CsPbBr<sub>3</sub> y Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>3</sub> en las NPs de SiO<sub>2</sub>. (d) Resistencia térmica de 30-120 °C) de la tinta fluorescente. Imágenes reproducidas de ACS Appl. Mater. Interfaces 2017, 9, 31, 26556–26564

## B. Encapsulación de los NCs de CsPbBr<sub>3</sub>

En este caso, el proceso sol-gel se aplica directamente sobre los NCs CsPbBr<sub>3</sub> en condiciones de reacción más suaves para evitar su degradación. Estas condiciones contemplan:

- La sustitución del medio de reacción (mezcla agua/etanol) por un disolvente compatible con los NCs (p.ej: tolueno) en presencia de un volumen mínimo de agua,<sup>77-79</sup> o bajo un entorno húmedo (H.R. 40-75%),<sup>80-82</sup> que permita inducir la hidrólisis y condensación del alcoxisilano.
- La selección de una fuente precursora de sílice alternativa al tetraetilortosilicato (TEOS), por ejemplo, tetrametilortosilicato (TMOS) que, al hidrolizar más rápido, permite reducir el tiempo de exposición de los NCs frente al daño causado en contacto con el agua.<sup>77,80</sup>

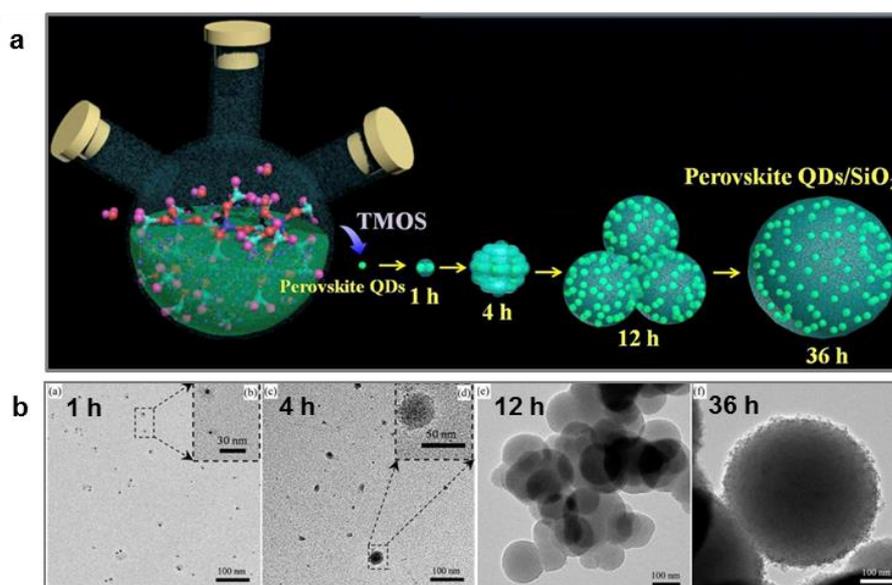


Figura 14. (a) Esquema de la metodología de síntesis de NPs MAPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> descrita por Huang *et al.* (b) TEM de NPs MAPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> preparadas con distintos tiempos de reacción: 1 h (10 nm), 4 h (45 nm), 12 h (150 nm) y 36 h (450 nm). Imágenes reproducidas de J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 18, 5749–5752

Un ejemplo es el trabajo de Huang *et al.*<sup>80</sup> En su metodología, los NCs de MAPbBr<sub>3</sub> se sintetizan previamente por la metodología LARP y, una vez dispersos en tolueno, se tratan con tetrametilortosilicato (TMOS). El tolueno de grado analítico, al contener trazas de agua, permite que se lleve a cabo la

hidrólisis del TMOS. La reacción transcurre a una temperatura de 25 °C, bajo una humedad relativa del 60% y distintos tiempos de incubación (1, 4, 12 y 36 h), con los que consiguen modular el tamaño final de la partícula de sílice de 10 a 450 nm. Los resultados de este trabajo se incluyen en la **Figura 14**.

- c) La funcionalización de la superficie de los NCs con silanos aminados capaces de unirse a la superficie de los NCs a través del grupo amino y, al mismo tiempo, proporcionar la fuente precursora de sílice. Como por ejemplo el (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (MPTMS),<sup>78</sup> o el 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES).<sup>79,81–83</sup>

En la metodología de Li *et al* los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> se producen por *hot-injection* y posteriormente se silanizan añadiendo MPTMS, el cual se une como ligando a la superficie de los NCs, mediante la formación del enlace de coordinación S-Pb.<sup>78</sup> Tras un tiempo de incubación, se añade de nuevo MPTMS y un volumen mínimo de agua, lo que produce que se inicie lentamente el proceso de hidrólisis y condensación. La reacción se produce a 45 °C, durante un tiempo de incubación de 32 h. Las NPs resultantes alcanzan un tamaño de 170 nm, exhiben un PLQY alto (78%) y mantienen el 60% de la fluorescencia inicial durante 20 días en agua. Los resultados de este trabajo se muestran en la **Figura 15**.

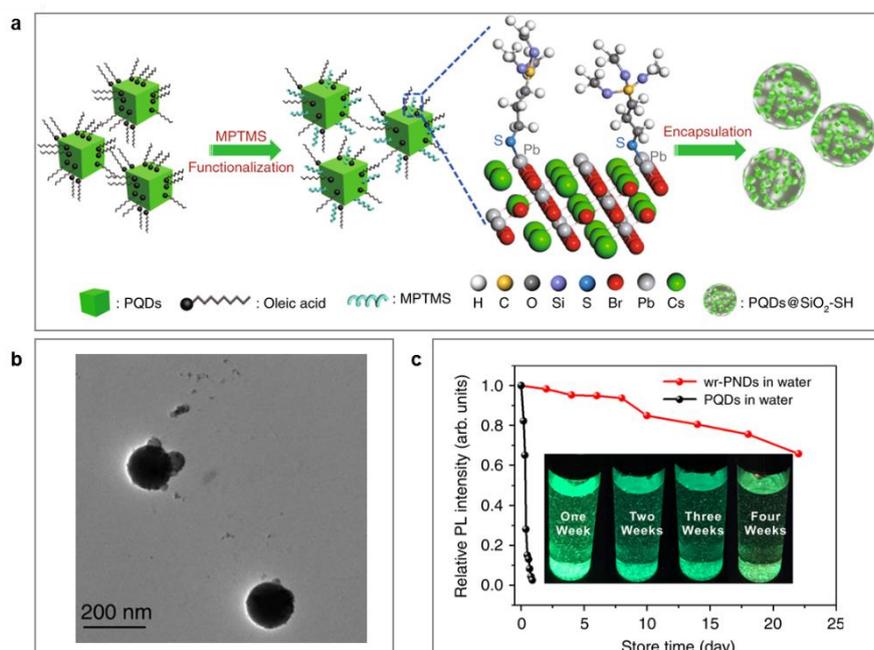


Figura 15. (a) Esquema de la metodología de síntesis de partículas de CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> descrita por Li *et al*. (b) TEM de las partículas de CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> (170 nm). (c) Estabilidad óptica de las NPs dispersas en agua durante 20 días. Imágenes reproducidas de Nat Commun. 2020 11, 1192

Por otro lado, en la metodología de Song *et al* se sustituye OAm por APTES durante la síntesis de NCs de CsPbBr<sub>3</sub> por *hot-injection*.<sup>79</sup> Posteriormente, a los NCs silanizados se le añade un volumen mínimo de agua y tras un tiempo de incubación de 30 min se generan NPs *core-shell* de CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> de tamaño nanométrico (~ 20 nm) que pueden utilizarse como marcador fluorescente en bioimagen de cultivos celulares, con tiempos de incubación de 2 a 24 h. Los resultados de este trabajo se incluyen en la **Figura 16**.

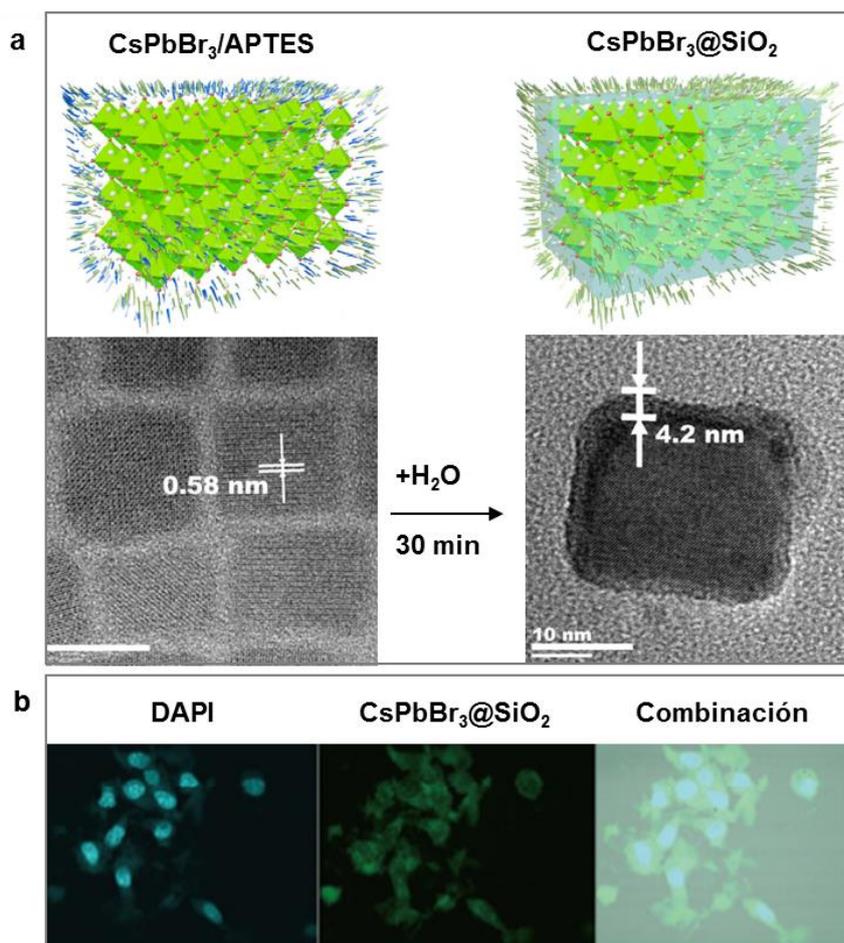


Figura 16. (a) Esquema de la metodología de síntesis de las NPs *core-shell* CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> producidas por Song *et al*. Los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> silanizados se producen mediante *hot-injection*, sustituyendo la OAm por APTES. Posteriormente, se añade un volumen mínimo de agua y tras un tiempo de incubación de 30 min se generan las NPs *core-shell* CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> (20 nm). (b) Imagen de microscopía confocal que muestra la localización de las células tumorales CT26 (en azul se muestran los núcleos teñidos con DAPI) y las NPs *core-shell* (en verde) tras un tiempo de incubación de 4 h. Imágenes reproducidas de Nano Res. 2020, 13, 795–801

### C. Transformación de fase combinada con la metodología sol-gel

Esta alternativa consiste en aprovechar los cambios de fase de los NCs en combinación con la metodología sol-gel. De modo que, simultáneamente a la formación del cristal, tiene lugar el crecimiento de la sílice, evitando de este modo que se degraden los NCs.

El ejemplo más extendido es la utilización de NCs de  $\text{Cs}_4\text{PbBr}_6$  como material precursor. Estos se caracterizan por tener una estructura de dimensión 0 (0D), donde los octaedros de  $\text{PbX}_6^{-4}$  están completamente separados los unos de los otros.<sup>84</sup>

Estos NCs carecen de propiedades luminiscentes. Sin embargo, son capaces de adquirir la estructura tridimensional (3D) en determinadas condiciones y así recuperar las propiedades ópticas propias de los NCs de  $\text{CsPbBr}_3$ .

Las condiciones que promueven la transformación de NCs  $\text{Cs}_4\text{PbBr}_6$  a  $\text{CsPbBr}_3$  (**Figura 17**), consisten básicamente en producir un exceso  $\text{PbBr}_2$ , un déficit de cesio en la estructura del NC o un desequilibrio en la relación de los ligandos de la superficie. Entre ellas:

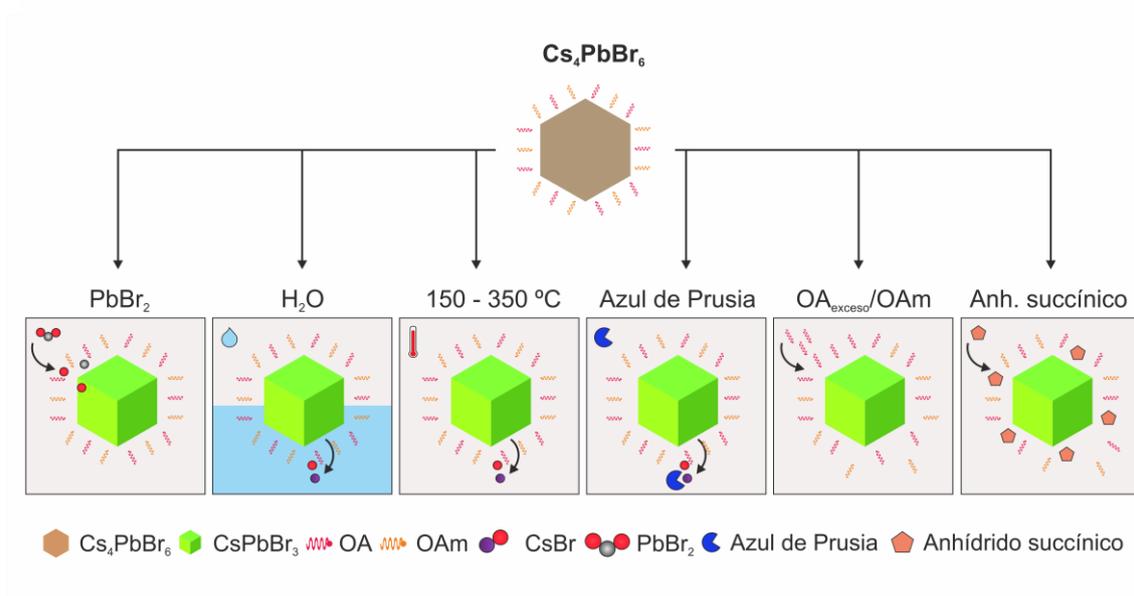


Figura 17. Condiciones que desencadenan la transformación de los NCs de  $\text{Cs}_4\text{PbBr}_6$  a los NCs de  $\text{CsPbBr}_3$

- a) La inserción de  $\text{PbBr}_2$  en la estructura se produce cuando el entorno se enriquece con un **exceso de la sal de plomo**, lo que genera la transformación de  $\text{Cs}_4\text{PbBr}_6$  en  $\text{CsPbBr}_3$ .<sup>84</sup> Los NCs resultantes exhiben un PLQY bajo (26%) en comparación con los NCs sintetizados directamente, lo que sugiere que durante esta transformación se generan defectos estructurales.
- b) La presencia de **agua** en un disolvente no polar desencadena el desprendimiento de CsBr de la estructura  $\text{Cs}_4\text{PbBr}_6$ , convirtiéndose a la fase cúbica. Esta transformación se produce debido a la alta solubilidad del CsBr en agua, la naturaleza iónica del NC y alta difusión de los iones.<sup>85</sup> Los NCs de  $\text{CsPbBr}_3$  resultantes presentan un PLQY del 75% y mayor estabilidad a la humedad que los producidos por los métodos convencionales.
- c) La extracción química de CsBr también ocurre al reaccionar con hexacianoferrato férrico de potasio, también conocido como **azul de Prusia**.<sup>86</sup> Se trata de un pigmento artificial y un excelente absorbente de iones  $\text{Cs}^+$ . Aunque el azul de Prusia es poco soluble en disolventes orgánicos, la extracción de CsBr puede producirse lentamente (24 h) en la interfase entre ambos disolventes. Los NCs transformados no sufren más cambios en presencia del colorante, manteniéndose estables incluso 3 días después.
- d) El **proceso térmico** (en inglés, *thermal annealing*) promueve la extracción física de CsBr de la estructura.<sup>87</sup> A partir de los 150 °C comienza a formarse la fase cúbica, debido a la extracción de iones  $\text{Cs}^+$  y  $\text{Br}^-$  que quedan acumulados en pequeños *clusters* junto con otros residuos orgánicos. Esta transformación no es completa, ya que ambas fases llegan a coexistir hasta los 350 °C. Excepto a partir de los 400 °C, donde ya solo permanece la fase  $\text{Cs}_4\text{PbBr}_6$ , lo que indicaría la reinserción de CsBr o extracción de  $\text{PbBr}_2$  de la estructura  $\text{CsPbBr}_3$ .
- e) El **exceso de ácido oleico** desestabiliza la relación de los ligandos de superficie del NC (OA/OAm), induciendo su conversión en  $\text{CsPbBr}_3$  mediante un proceso de exfoliación y recristalización.<sup>88</sup> Esta transformación puede revertirse añadiendo OAm hasta alcanzar de nuevo la relación inicial. El mecanismo está controlado por el equilibrio ácido-base Brønsted, de forma que pequeños cambios en la concentración de

ambas especies, desencadena la desestabilización de la superficie con el consiguiente cambio en la estequiometría del NC.

- f) La reacción de las unidades de **anhídrido succínico** del copolímero poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO) con las especies de oleilamina, da lugar a ácido polisuccinámico. Este desplaza a los ligandos de amina y oleato y acidifica el medio de reacción, desencadenando la transformación de  $\text{Cs}_4\text{PbBr}_6$  a  $\text{CsPbBr}_3$ .<sup>89</sup> Los NCs resultantes pueden llegar a alcanzar un PLQY del 69% (si la transformación ocurre bajo atmósfera inerte) y presentan estabilidad coloidal durante al menos un mes.

De las transformaciones descritas, la más recurrente a la hora de combinarla con el proceso sol-gel es la desencadenada en la interfase hexano-agua. Hu *et al.* obtuvieron heteroestructuras Janus de  $\text{CsPbX}_3$  (X = Cl/Br, Br, Br/I and I) y  $\text{SiO}_2$ , con un tamaño de unos 24 nm y un PLQY del 80% (**Figura 18a**).<sup>90</sup> El seguimiento de la fluorescencia sobre esta interfase demostró una estabilidad mejorada con respecto al control, alcanzando un total de 7 días.

Li *et al.* incorporaron un paso previo de silanización con tetrametil ortosilicato (TMOS) parcialmente hidrolizado (PH-TMOS) para generar semillas de silanización distribuidas por toda la superficie del NC precursor, logrando una deposición simétrica de la capa de sílice y dando lugar a NPs de tipo *core-shell*  $\text{CsPbBr}_3@ \text{SiO}_2$  con un tamaño de 60 nm y PLQY de 65% (**Figura 18b**).<sup>91</sup> En este caso, la prueba de estabilidad se realizó en presencia de un 10% de etanol, demostrando cierta estabilidad (al menos durante 30 min), frente al control, que decayó prácticamente al minuto.

Rossi *et al.* optaron por la transformación mediada por PMAO, aunque utilizando solo el fragmento reactivo del polímero: el anhídrido maleico (MANH).<sup>92</sup> Además de desencadenar la conversión, acidifica el medio de reacción y, por tanto, contribuye a catalizar el crecimiento de la sílice. El resultado fueron NPs  $\text{CsPbBr}_3@ \text{SiO}_2$  con un tamaño de 17 nm y un PLQY de 1-4% (**Figura 18c**). Sin embargo, esta envoltura resultó poco compacta, ya que la fluorescencia desapareció a los 15 min en presencia de etanol. En un tratamiento posterior de pasivación con  $\text{PbBr}_2$ , el PLQY se incrementó hasta un 8% y, en combinación con una segunda etapa de crecimiento de la sílice, se generó una capa más densa contribuyendo al sellado de los poros.

La **Figura 18** resume las metodologías que combinan la transformación de fase  $\text{Cs}_4\text{PbBr}_6$  en  $\text{CsPbBr}_3$  con el proceso sol-gel para el crecimiento de una envoltura de sílice.

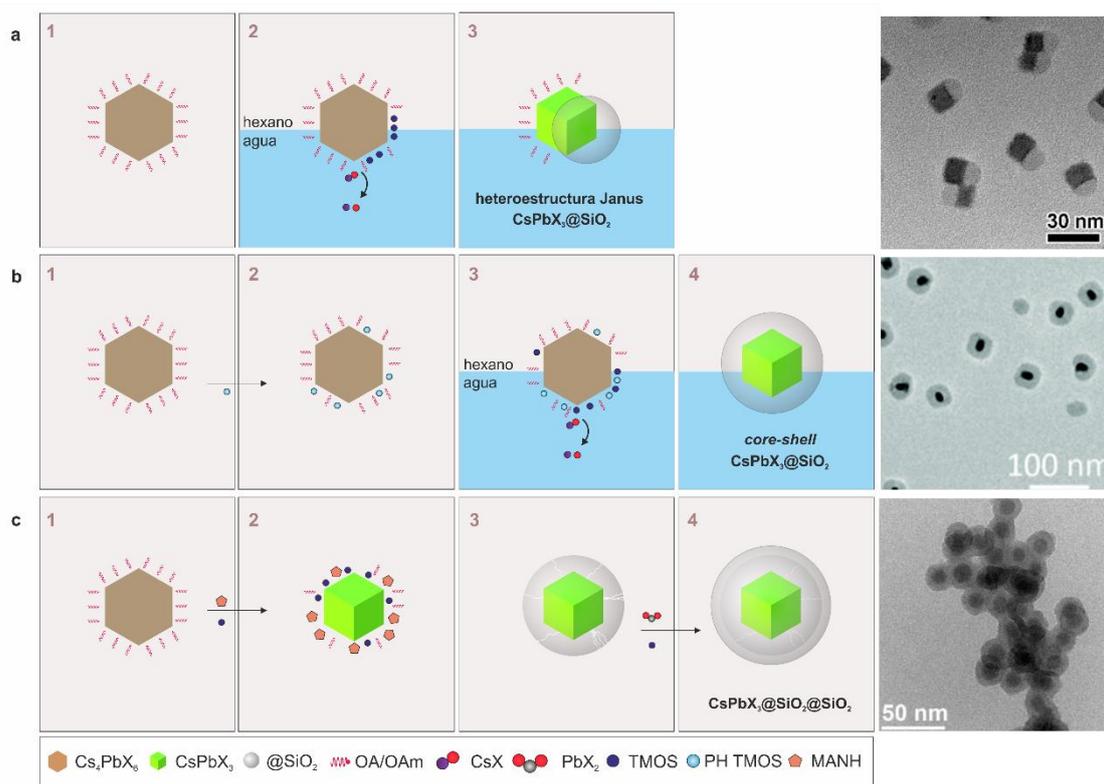


Figura 18. Metodologías de estabilización de NCs de  $\text{CsPbBr}_3$  por un recubrimiento de sílice mediante la adaptación del proceso sol-gel aprovechando el cambio de fase de los NCs de  $\text{Cs}_4\text{PbBr}_6$ . Imágenes de TEM reproducidas de (a) *J. Am. Chem. Soc.* 2018, 140, 1, 406-412. (b) *Nanoscale*, 2021, 13, 3860, (c) *Chem. Mater.* 2022, 34, 1, 405-413

## II. Cristalización *in situ* en materiales silíceos porosos

La cristalización *in situ* de NCs de perovskita en materiales porosos constituye una estrategia alternativa para su estabilización. Estas matrices cuentan con una estructura interna idónea que permite el crecimiento de los nanocristales a partir de sus sales precursoras confinando su tamaño a las dimensiones del poro. Además, al aislarlos del medio, la matriz previene su degradación frente a factores ambientales como el oxígeno, la humedad o la temperatura.

Entre los materiales porosos silíceos más utilizados para el crecimiento *in situ* de NCs de perovskita se encuentran las zeolitas, la sílice mesoporosa y rocas sedimentarias como la diatomita (**Figura 19**).

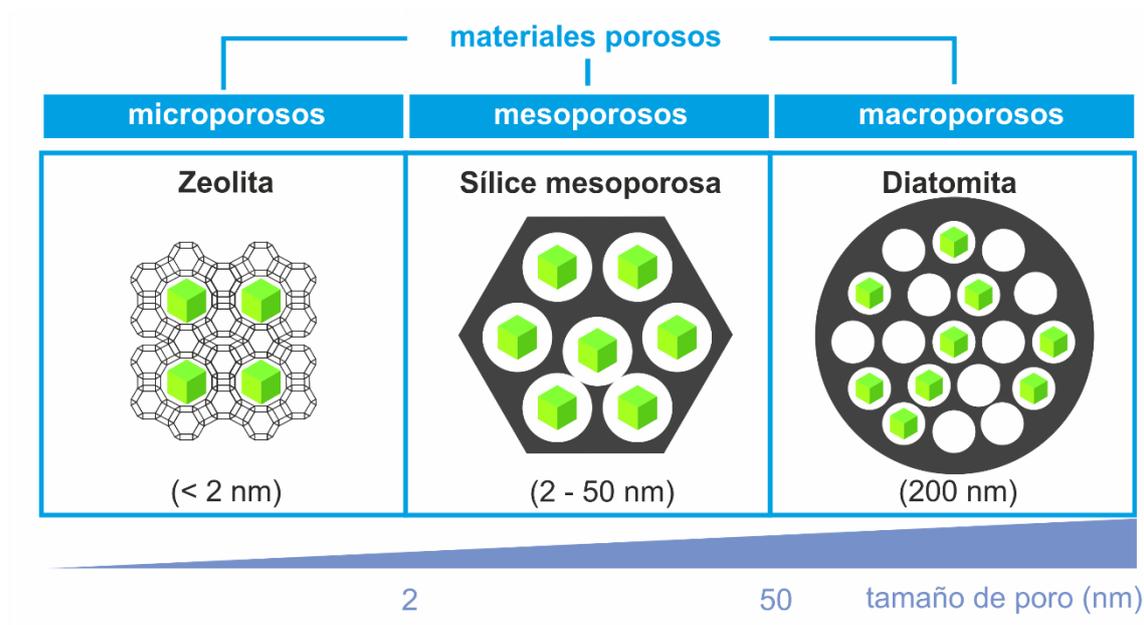


Figura 19. Materiales porosos basados en sílice utilizados para la estabilización de NCs de  $\text{CsPbBr}_3$

La metodología consiste en poner en contacto el material poroso con los precursores de perovskita, en estado sólido o en disolución, y lograr que sus iones difundan al interior a través de los poros. Posteriormente, bajo determinadas condiciones de temperatura, tiene lugar la nucleación y crecimiento de los NCs.

La **Figura 20** ilustra las aproximaciones más frecuentes para el crecimiento de NCs de LHP en materiales porosos. A continuación, se detalla en qué consiste cada una de ellas:

#### — Impregnación:

Consiste en empapar las partículas con un volumen mínimo de la disolución que contiene las sales precursoras. Posteriormente, se aplican condiciones de secado térmico que desencadenan la cristalización. Se trata de una de las aproximaciones más rápidas y utilizadas para el crecimiento de NCs en sílice mesoporosa. Dirin *et al* y Malgras *et al* fueron los primeros en aplicar esta metodología para un amplio abanico de partículas de sílice mesoporosa con dimensiones de diámetro de poro desde 2,5 hasta 50 nm.<sup>93,94</sup>

## — Remojo:

El material poroso se sumerge en un volumen mayor de la disolución que contiene las sales precursoras y se aplican condiciones de agitación o ultrasonidos para facilitar su difusión a través de los poros. En este caso, el tiempo de incubación puede ser de hasta varias horas, lo que permite maximizar la adsorción de precursores en el interior del material. Posteriormente, se somete a un proceso de secado para que tenga lugar la cristalización. Esta aproximación se ha aplicado en zeolitas,<sup>95</sup> y en partículas de sílice mesoporosa.<sup>96</sup>

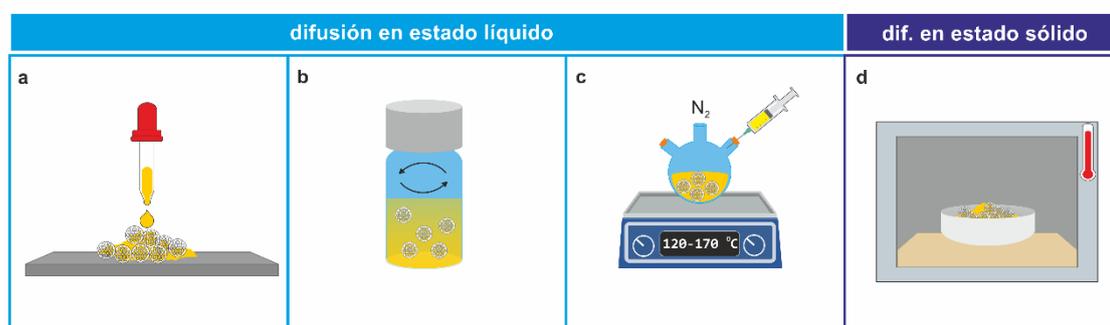


Figura 20. Metodologías para el crecimiento *in situ* de NCs de LHP en materiales porosos: a) impregnación, b) remojo, c) inyección en caliente y d) calcificación

## — Inyección en caliente:

Se trata de una variante de la metodología de *hot-injection*. En un matraz se añade el material poroso junto con una de las sales precursoras en octadeceno. Posteriormente, bajo atmósfera inerte y alta temperatura (120-170 °C) se inyecta el ion precursor necesario para desencadenar la cristalización. En el caso de las zeolitas, es la sal de plomo ( $PbX_2$ ) la que se inyecta en último lugar.<sup>97,98</sup> Mientras que en la sílice mesoporosa,<sup>99</sup> y en la diatomita,<sup>100</sup> se inyecta el oleato de cesio. Finalmente, se atempera en baño de hielo para detener rápidamente el crecimiento del cristal.

## — Calcinación:

Esta estrategia consiste en someter a una alta temperatura el material poroso junto con las sales precursoras en estado sólido para que difundan a través de los poros. Al eliminar la necesidad de utilizar disolventes orgánicos, resulta en una alternativa simple, escalable y ecológica. En zeolitas se aplica una temperatura de 650 °C.<sup>101–103</sup>

### A. Zeolitas

Las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos microporosos (diámetro de poro < 2 nm), compuestos por óxido de aluminio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) y sílice ( $\text{SiO}_2$ ). Se utilizan principalmente en la preparación de catalizadores en procesos relacionados con la petroquímica, pero también sirven para el crecimiento *in situ* de NCs de perovskita mediante la metodología de remojo,<sup>95</sup> inyección en caliente,<sup>97,98</sup> o calcinación.<sup>101–103</sup>

Los NCs de LHP que crecen en el interior de zeolitas se caracterizan por ser resistentes a estrés térmico.<sup>95,101</sup> Además, al disponer de poros tan pequeños, dota a los NCs de una excelente estabilidad a largo plazo en agua.<sup>101,103</sup>

Han demostrado ser útiles como indicadores de  $\text{NH}_3$  en aire,<sup>98</sup> humedad,<sup>104</sup> o temperatura,<sup>103</sup> e incluso como tintas fluorescentes con aplicación en medidas anti-falsificación.<sup>101–103</sup>

La **Figura 21** recopila la caracterización por TEM de los materiales más representativos de la estabilización de NCs de LHPs en zeolitas.

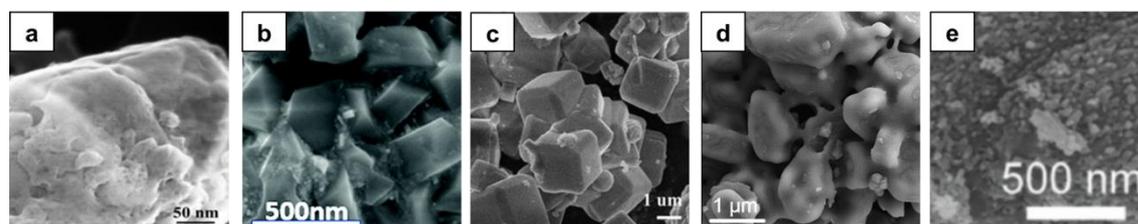


Figura 21. NCs de LHP estabilizados en zeolitas: a)  $\text{MAPbX}_3@ \text{AIPO-5}$ , b)  $\text{CsPbBr}_3\text{-Y}$ , c)  $\text{CsPbBr}_3@ \text{LTA}$ , d)  $\text{CsPbBr}_3@ \text{HSZ ZSM-5}$ , e)  $\text{CsPbBr}_3@ \text{ZSM-5}$ . Imágenes reproducidas de (a) *Angewandte Chemie*. 2020, 59, 51, 23100–23106, (b) *RSC Adv.*, 2021, 11, 2866–2871, (c) *Materials Today Physics*, 2021, 18, 100374, (d) *NPG Asia Materials*. 2022, 14, 87, (e) *Chemical Engineering Journal*, 2022, 437, 135290.

## B. Sílice mesoporosa

La sílice mesoporosa está constituida por dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ) en una estructura tridimensional, donde los poros se ordenan en una de sus dimensiones. Existe un amplio abanico de posibilidades en cuanto a su morfología, dimensiones de poro o tamaño de partícula, y tiene la ventaja de que están comercialmente disponibles.

El diámetro de poro es un factor importante porque influye en tamaño de los nanocristales que crecen en su interior y, en función de ello, es posible sintonizar el color de la emisión. Por otro lado, el tamaño de partícula puede reducirse hasta los 100 nm, siendo ya más adecuado para su utilización en biosensado o bioimagen.

Las estrategias que permiten crecer NCs de LHP en el interior de partículas de sílice mesoporosa son: impregnación,<sup>93,94</sup> remojo,<sup>96</sup> inyección en caliente,<sup>99</sup> y calcinación.<sup>105</sup> Desgraciadamente, los compuestos resultantes son poco estables en agua. Aun así, es posible utilizarlos en la fabricación de LEDs,<sup>96,99,105</sup> o en fotocatalisis.<sup>106</sup>

Para poder explorar aplicaciones en disolventes polares es necesario combinar la estrategia sintética con algún mecanismo que contribuya al sellado de los poros. Las opciones que permiten estabilizar estos compuestos son las siguientes:

### — Calcinación:

La aplicación de calor por encima de los 600 °C induce el colapso parcial de la estructura mesoporosa, produciéndose el cierre de los poros y atrapamiento de los nanocristales de LHP en su interior.<sup>105</sup> Sin embargo, las partículas mesoporosas pierden su identidad individual y pasan a formar parte de agregados de tamaño micrométrico.

Para prevenir la fusión de las partículas de sílice, una opción es añadir una combinación de sales inorgánicas ( $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{KBr}$ ) que contribuyen al sellado de los poros a una temperatura de calcinación inferior (320-350 °C).<sup>107,108</sup> Otra opción consiste en utilizar  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , seguido de un tratamiento de calcinación a 600 °C.<sup>109</sup> Como resultado se obtienen partículas de 200 nm de diámetro que se dispersan homogéneamente en agua y mantienen su fluorescencia estable durante 150 días. Estas partículas han demostrado su utilidad tanto en LEDs,<sup>109</sup> como en radioterapia.<sup>110</sup>

## — Recubrimiento polimérico:

Tapizar las partículas con un polímero hidrófobo, como el PMMA,<sup>111,112</sup> ofrece una solución alternativa al problema de estabilidad que sufren los NCs de LHP crecidos en el interior de partículas de sílice mesoporosa.

La **Figura 22** recopila la caracterización por TEM de los materiales más representativos de crecimiento y estabilización de NCs de LHP en partículas de sílice mesoporosas.

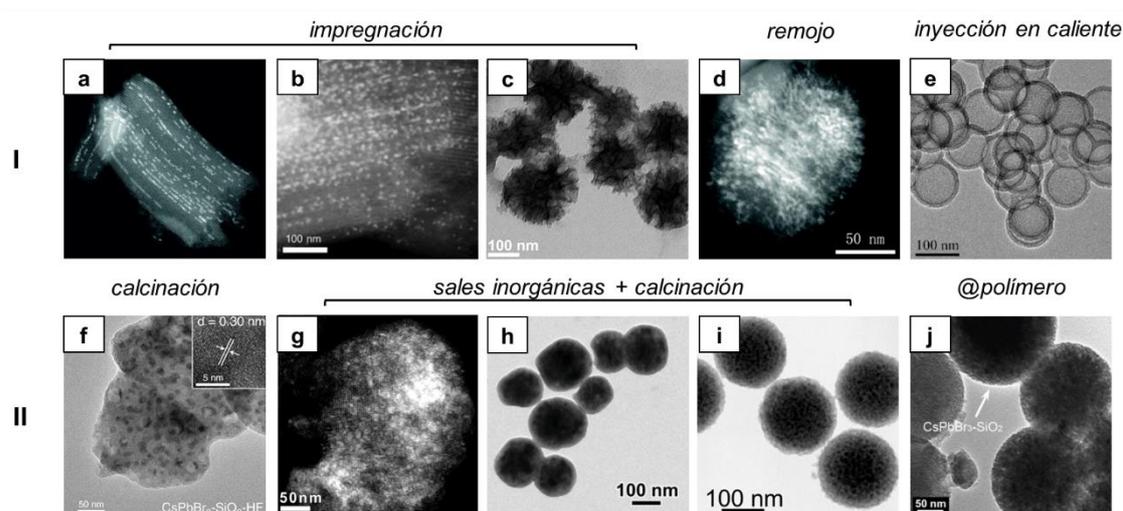


Figura 22. Panel I. NCs de LHP crecidos en el interior de sílice mesoporosa por (a-c) impregnación, (d) remojo, (e) inyección en caliente. Panel II. NCs de LHP estabilizados en meso-SiO<sub>2</sub> mediante (f) calcinación, (g-i) tratamiento combinado con sales inorgánicas y calcinación, (j) recubrimiento polimérico. Imágenes reproducidas de (a) Nano Lett. 2016, 16, 9, 5866–5874, (b) J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 42, 13874–13881, (c) ACS Energy Lett. 2022, 7, 12, 4389–4397, (d) New J. Chem., 2020,44, 2980-2985, (e) Inorg. Chem. Front., 2020,7, 2060-2071, (f) Nat Com. 2020, 11, 31 (g) ACS Energy Lett. 2021, 6, 3, 900–907, (h) Advanced Energy Materials. 2022, 12, 38, (i) ACS Energy Lett. 2023, 8, 4, 1795–1802 (j) Composites Part B: Engineering. 2022, 239, 109956

### C. Diatomita

La diatomita es una roca sedimentaria silíceosa, formada por microfósiles de diatomeas, las cuales son microalgas acuáticas unicelulares que secretan un esqueleto silíceo. Presenta una morfología circular de  $\sim 17 \mu\text{m}$  de diámetro y 500 nm de grosor, y una estructura jerárquica de poros de 200 nm de diámetro, por lo que entra dentro de la categoría de materiales macroporosos.

Hao *et al* crecieron NCs de  $\text{CsPbBr}_3$  en el interior de los poros del material y en su superficie (**Figura 23**) mediante la funcionalización previa de la diatomita con ácido poliacrílico (PAA) como sitios activos de nucleación.<sup>100</sup> La prueba de estabilidad en agua la realizaron en formato de película, logrando un incremento de 100 h respecto al control.

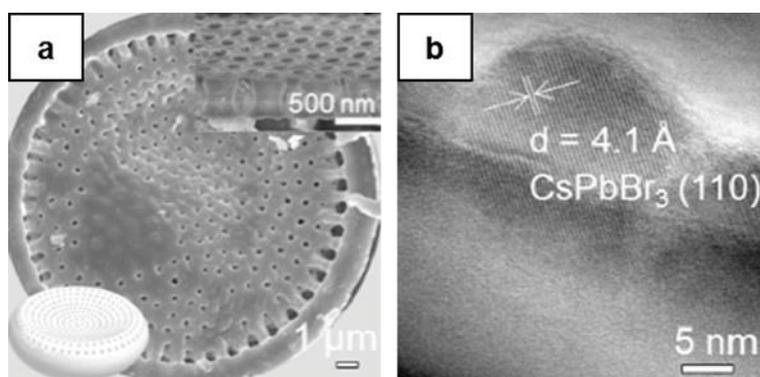


Figura 23. NCs de  $\text{CsPbBr}_3$  estabilizados en diatomita. (a) Estructura de la diatomita y (b) detalle de la estructura cristalina en el interior de uno de los poros. Imágenes reproducidas de *Chemical Engineering Journal*. 2021, 417, 128056

La **Tabla 3** resume los resultados más representativos de la estabilización de NCs de perovskita en materiales porosos.

Tabla 3. NCs de LHP estabilizados mediante su cristalización en materiales porosos

| Material poroso                      | Composición   | Tamaño (nm) | PLQY (%) | Estabilidad en agua | Aplicación                       | Ref.    |
|--------------------------------------|---|-------------|----------|---------------------|----------------------------------|---------|
| Zeolita /<br>Figura 21               | a MAPbBr <sub>3</sub> @AIPO-5                                 | N.D.        | 18,2     | 14 días             | N.D.                             | 95      |
|                                      | b CsPbBr <sub>3</sub> @zeolita-Y                              | N.D. (μm)   | N.D.     | 10 días             | N.D.                             | 97      |
|                                      | c CsPbBr <sub>3</sub> @LTA                                    | N.D. (μm)   | 66       | 554 días            | Tintas                           | 101     |
|                                      | d CsPbBr <sub>3</sub> @HSZ ZSM-5                              | N.D. (μm)   | 92,5     | 30 días             | Tintas                           | 102     |
|                                      | e CsPbBr <sub>3</sub> @ZSM-5                                  | N.D. (μm)   | 62       | 100 días            | Tintas, sensor de T <sup>a</sup> | 103     |
| Meso-SiO <sub>2</sub> /<br>Figura 22 | a APbBr <sub>3</sub> @meso-SiO <sub>2</sub>                   | 200-1000    | 50       | N.D.                | N.D.                             | 93      |
|                                      | b MAPbBr <sub>3</sub> I <sub>3-x</sub> @meso-SiO <sub>2</sub> | N.D.        | 5,5      | N.D.                | N.D.                             | 94      |
|                                      | c CsPbBr <sub>3</sub> @ meso-SiO <sub>2</sub>                 | 200         | 62       | N.D.                | Fotocatálisis                    | 106     |
|                                      | d CsPb <sub>1-x</sub> Mn <sub>x</sub> Br <sub>3</sub> @MCM-41 | 100         | N.D.     | N.D.                | LEDs                             | 96      |
|                                      | e CsPbBr <sub>3</sub> @meso-SiO <sub>2</sub>                  | 110         | 89       | N.D.                | LEDs                             | 99      |
|                                      | f CsPbBr <sub>3</sub> @MCM-41                                 | 500-1000    | 71       | 50 días             | LEDs                             | 105     |
|                                      | g CsPbBr <sub>3</sub> @MCM-41                                 | 600         | 89       | 30 días             | LEDs                             | 107     |
|                                      | h CsPbBr <sub>3</sub> @MCM-41                                 | 100         | 77       | N.D.                | LEDs                             | 108     |
|                                      | i CsPbBr <sub>3</sub> @ meso-SiO <sub>2</sub>                 | 200         | 87       | 150 días            | LEDs, radioterapia               | 109,110 |
|                                      | j CsPbBr <sub>3</sub> @ meso-SiO <sub>2</sub> @PMMA           | 200         | 20       | 5 meses             | LEDs                             | 111     |
| Diatomita /<br>Figura 23             | a CsPbBr <sub>3</sub> @diatomita-g-PAA                        | D = 17 μm   | 76,4     | N.D.                | LEDs                             | 100     |

## ► Recubrimientos poliméricos

### I. Micelas poliméricas

Las micelas poliméricas son estructuras que se forman como resultado del proceso de autoensamblaje de polímeros anfifílicos en un disolvente selectivo.

Un polímero anfifílico dibloque está constituido por un bloque hidrofóbico y un bloque hidrofílico y, junto con otras moléculas estabilizantes, es capaz de

organizarse para formar micelas, donde el dominio compatible con el disolvente se expone hacia el exterior. En un disolvente polar, el bloque hidrofílico queda en contacto con el disolvente, mientras que el bloque hidrofóbico conforma el núcleo de la micela. Por el contrario, en un disolvente apolar, el dominio hidrofóbico se expone hacia el exterior, dando lugar a lo que se conoce como micela inversa.

Estas estructuras micelares proporcionan un núcleo idóneo donde atrapar a los NCs de perovskita o confinar su crecimiento a partir de sus sales precursoras, confiriéndoles una barrera de protección más estable que la que ofrecen los ligandos de superficie convencionales (OA/OAm).

Las estrategias pueden agruparse en tres aproximaciones (**Figura 24**).

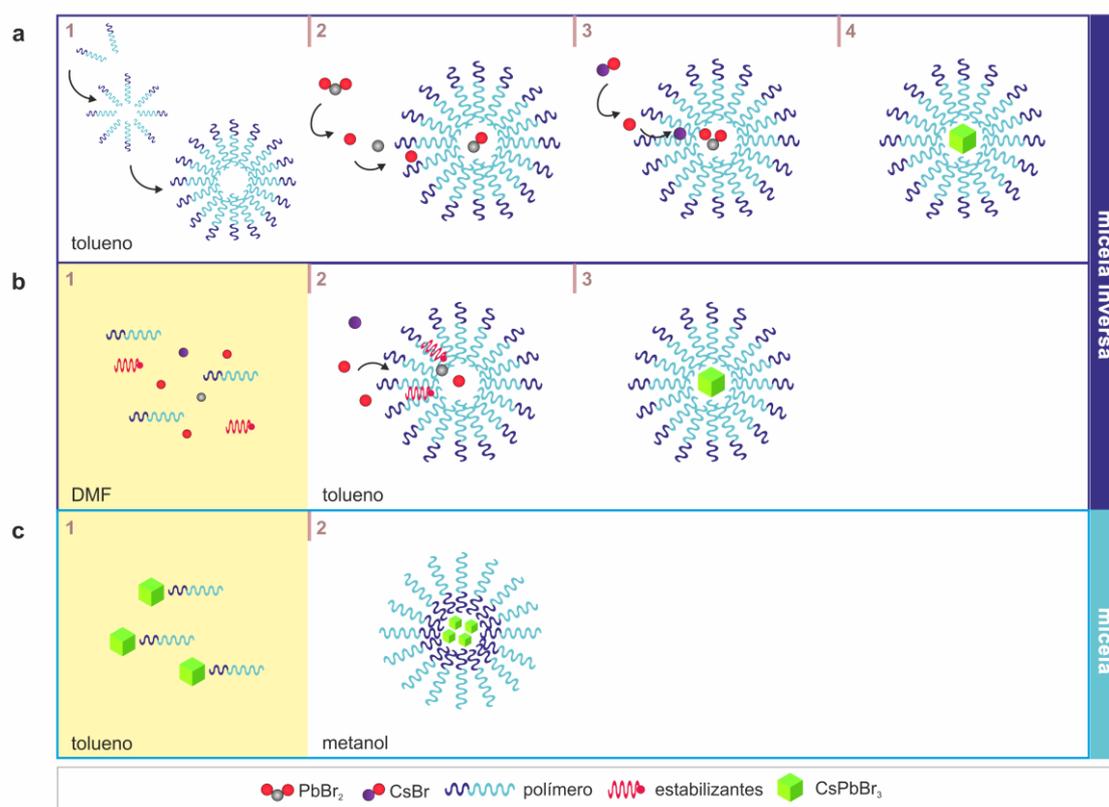


Figura 24. Estrategias de estabilización de NCs de LHP en micelas poliméricas: (a) cristalización en micelas inversas a partir de la difusión de las sales precursoras, (b) cristalización en micelas inversas mediante la adaptación de la metodología LARP, (c) coprecipitación de los NCs previamente sintetizados

### — Cristalización en micelas inversas a partir de la difusión de las sales precursoras

Esta metodología contempla tres etapas. Inicialmente, tiene lugar la formación de micelas inversas del copolímero anfifílico en tolueno. Posteriormente, se añade la primera sal precursora ( $\text{PbBr}_2$ ) que, dada su baja solubilidad en este medio, difunde lentamente hasta impregnar el núcleo de la micela. Finalmente, se añade la segunda sal precursora ( $\text{CsBr}$ ) y, cuando ésta alcanza el núcleo de la micela inversa, desencadena el proceso de cristalización (**Figura 24a**). En función del polímero utilizado, es posible modular el tamaño del NC. Hou *et al* y Hintermayr *et al* obtuvieron NCs de 6-27 nm con poliestireno-bloque-poli(2-vinilpiridina) (PS-b-P2VP),<sup>113,114</sup> mientras que Pan *et al* alcanzaron dimensiones de 50-60 nm con N-fenilaminopropil silsesquioxanos oligoméricos poliédricos, polimetilmetacrilato-bloque- poli(2-(dimetilamino)etil metacrilato (ap-POSS-PMMA-b-PDMAEMA) (**Figura 25a-c**).<sup>115</sup>

La principal desventaja de esta estrategia es que se trata de un proceso lento, debido a la baja solubilidad de las sales precursoras en el medio de reacción, pudiendo alcanzar tiempos de incubación de hasta 2 semanas.

### — Cristalización en micelas inversas mediante adaptación de la metodología LARP

Se trata de un proceso más rápido, ya que la mezcla de las sales precursoras se prepara previamente en un disolvente donde su solubilidad es buena (p.ej: DMF). A esta disolución se añaden los ligandos OA/OAm,<sup>116</sup> u otros estabilizantes.<sup>117</sup>

A diferencia del método LARP, en esta variante se incluye un copolímero anfifílico. Este puede añadirse en el primer disolvente,<sup>116,117</sup> o en el antidisolvente (p.ej: tolueno).<sup>1,75</sup>

Cuando la mezcla que contiene las sales precursoras se inyecta en el antidisolvente, la solubilidad de las sales disminuye y desencadena el proceso de cristalización (**Figura 24b**). Sin embargo, esta vez el crecimiento de los NCs queda confinado en el núcleo de la micela inversa polimérica (**Figura 25d-f**), mientras que en el método LARP los NCs solo quedan estabilizados por los ligandos convencionales.

Adicionalmente, otros trabajos refuerzan el recubrimiento polimérico con una capa de sílice, generada a partir del proceso sol-gel (**Figura 25g-h**), o con un

recubrimiento basado en silanos que incrementa su estabilidad y mejora su dispersión en agua.<sup>1,118,119</sup>

### — Coprecipitación de NCs presintetizados

Esta estrategia consiste en inducir a través de un cambio de solubilidad el proceso de autoensamblaje del polímero para que forme micelas, en cuyo interior quedan atrapados los NCs previamente sintetizados que se encuentran en la disolución (**Figura 24c**).<sup>120</sup>

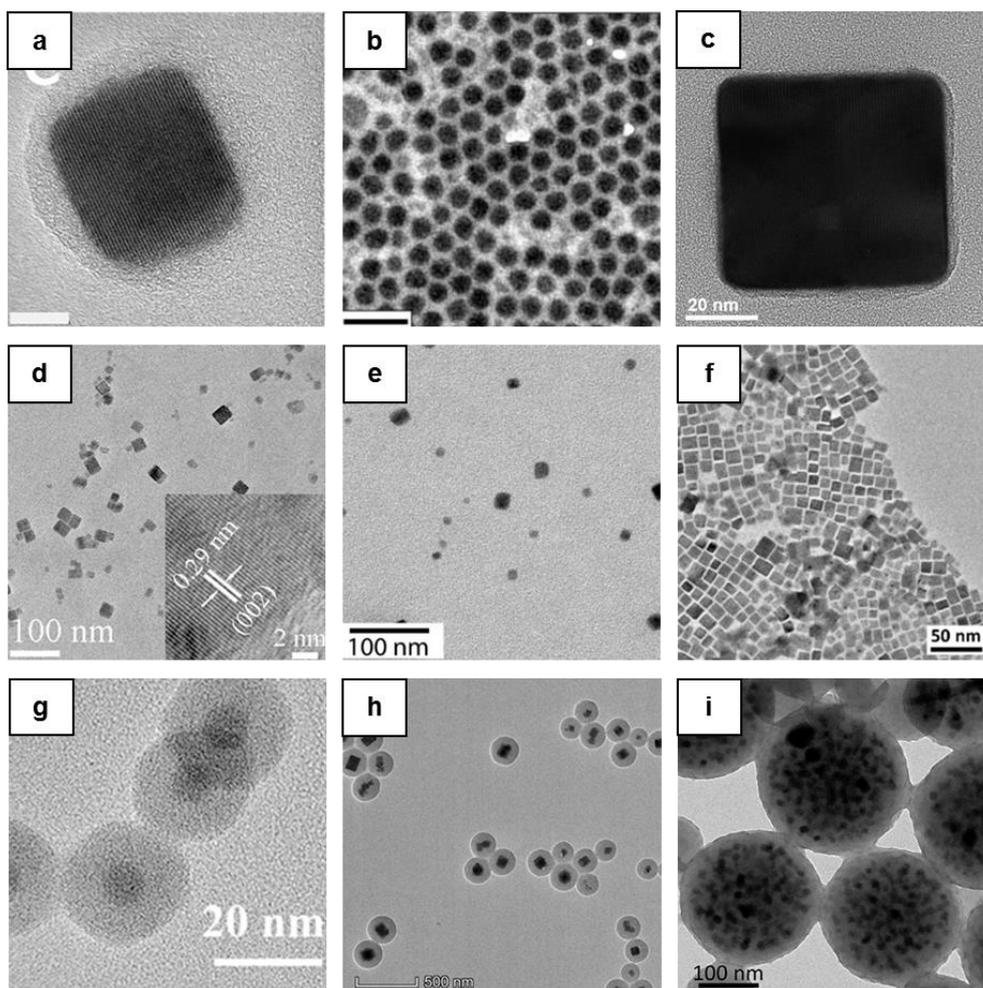


Figura 25. Cristalización de LHP en micelas poliméricas a partir de (a-c) la difusión de las sales precursoras o (d-f) de la variante del método LARP, (g-h) incluyendo un recubrimiento adicional de SiO<sub>2</sub>. (i) NCs de CsPbBr<sub>3</sub> presintetizados atrapados en micelas poliméricas. Imágenes reproducidas de (a) ACS Appl. Mater. Interfaces 2017, 9, 22, 18417–18422 (b) Nano Lett. 2019, 19, 8, 4928–4933, (c) Journal of Alloys and Compounds. 2020, 844, 156102, (d) ACS Appl. Mater. Interfaces 2020, 12, 2, 3080–3085, (e) ACS Energy Lett. 2021, 6, 8, 2844–2853 (f) RSC Adv., 2023,13, 5946–5956 (g) Sci. Adv. 2019, 5, eaax442 (h) ACS Appl. Nano Mater. 2021, 4, 11, 11791–11800 (i) ACS Nano 2022, 16, 9, 13657–13666

La **Tabla 4** resume los resultados de los trabajos más representativos de la estabilización de NCs de perovskita en micelas poliméricas.

Tabla 4. Características del resultado de la cristalización asistida por nanorreactores poliméricos

| Técnica  | Composición                                      | Tamaño (nm)            | PLQY (%) | Estabilidad en agua | Aplicación | Ref. |
|--|--|------------------------|----------|---------------------|------------|------|
| Difusión de sales precursoras   <b>Figura 25</b> | a CsPbBr <sub>3</sub> @PS-b-P2VP                 | 20                     | 51       | 10 h                | N.D.       | 113  |
|  | b MAPbBr <sub>3</sub> @PS-b-P2VP                 | 6-27                   | 63       | N.D.                | N.D.       | 114  |
|  | c CsPbBr <sub>3</sub> @ap-POSS-PMMA-b-PDMAEMA    | 50-60                  | 60       | 12 h                | N.D.       | 115  |
| Variante de LARP   <b>Figura 25</b>              | d CsPbBr <sub>3</sub> @PI                        | D <sub>H</sub> = 132,5 | 88,1     | 1 h                 | LEDs       | 116  |
|  | e CsPbBr <sub>3</sub> @PS-b-PAA                  | D <sub>H</sub> = 69    | 30       | 23 días             | LEDs       | 117  |
|  | f CsPbBr <sub>3</sub> @PVP/NIPAM                 | 12                     | 84       | 3 días              | Bioimagen  | 75   |
|  | g MAPbBr <sub>3</sub> @PAA-b-PS@SiO <sub>2</sub> | 15                     | 88       | 24 h                | N.D.       | 118  |
|  | h CsPbBr <sub>3</sub> @PVP@SiO <sub>2</sub>      | 170                    | 41,6     | 10 días             | Bioimagen  | 1    |
| Coprecipitación   <b>Figura 25</b>               | i CsPbBr <sub>3</sub> @PS-b-PAA                  | 200                    | 60       | 2 años              | Bioimagen  | 120  |

**DFTHS:** dodecafluoroheptil-propil.trihidroxisilano · **NIPAM:** N-isopropilacrilamida · **P2VP:** poli(2-vinilpiridina) · **PAA:** ácido poliacrílico · **PDMAEMA:** poli(2-(dimetilamino)etil metacrilato) · **PEO:** polietilenglicol · **PI:** poliiimida · **PMMA:** polimetilmetacrilato · **POSS:** silsesquioxanos oligoméricos poliédricos · **PS:** poliestireno · **PVP:** polivinilpirrolidona

## II. Fotopolimerización

Las propiedades fotocatalíticas de los NCs de LHP pueden aprovecharse para desencadenar reacciones de fotopolimerización que permitan el crecimiento de recubrimientos poliméricos para su propia estabilización.

En esta estrategia los NCs actúan a la vez como fotocatalizadores y sustratos. Es decir, la excitación de los NCs de LHP desencadena la polimerización de los monómeros que se encuentran anclados a su superficie, logrando un recubrimiento polimérico que se limita a las inmediaciones de cada nanocrystal por separado.

Esta metodología *graft-from* permite crecer cadenas poliméricas directamente en la superficie del NC. Wong *et al* consiguieron estabilizar NCs de

perovskita con un recubrimiento de poliestireno mediante la excitación de los NCs con luz blanca.<sup>121</sup>

Por otro lado, el grupo de Haifeng Gao desarrolló otra estrategia donde los NCs excitados ( $\lambda_{\text{ex}}$  420 nm), activan a los fotoiniciadores que se encuentran adheridos a su superficie, lo que desencadena la polimerización radicalica de los monómeros acrilato.<sup>122</sup> El nivel de entrecruzamiento, y por tanto, la permeabilidad del recubrimiento polimérico puede regularse en función del disolvente. Por ejemplo, en un disolvente donde el polímero es soluble, las cadenas de polímero se encuentran extendidas, permitiendo que se produzca intercambio iónico y así sintonizar el color de la emisión en base a la composición del haluro. Mientras que en un disolvente polar las cadenas poliméricas colapsan, generando una barrera densa que confiere estabilidad a largo plazo (**Figura 26**). Este mecanismo permite la coexistencia de las diferentes composiciones para generar luz blanca en agua, manteniéndose estable durante al menos 1 día.<sup>123</sup>

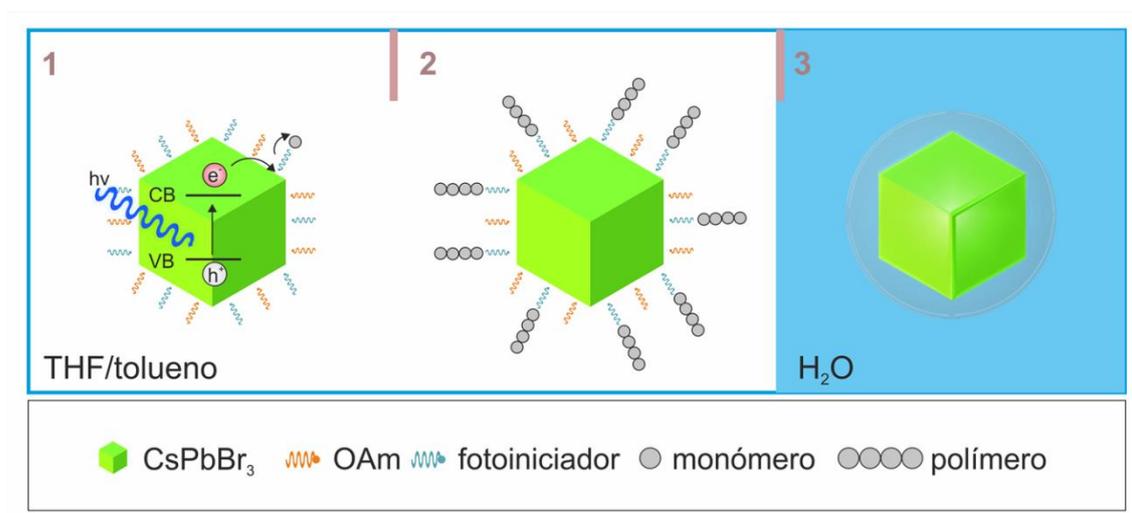


Figura 26. Recubrimiento polimérico obtenido por fotopolimerización

La estabilización basada en la fotopolimerización inducida por los propios NCs de LHP es una estrategia que también ha sido reproducida con éxito en *Upconverting nanoparticles* (UCNPs).<sup>124</sup> Sin embargo, la realidad es que son muy pocos los resultados que lo consiguen a nivel de partícula individual, obteniéndose generalmente grandes compuestos poliméricos que integran múltiples NCs.<sup>125,126</sup>

Los resultados de los trabajos de estabilización de NCs de perovskita mediante la estrategia de fotopolimerización pueden consultarse en la **Figura 27** y en la **Tabla 5**.

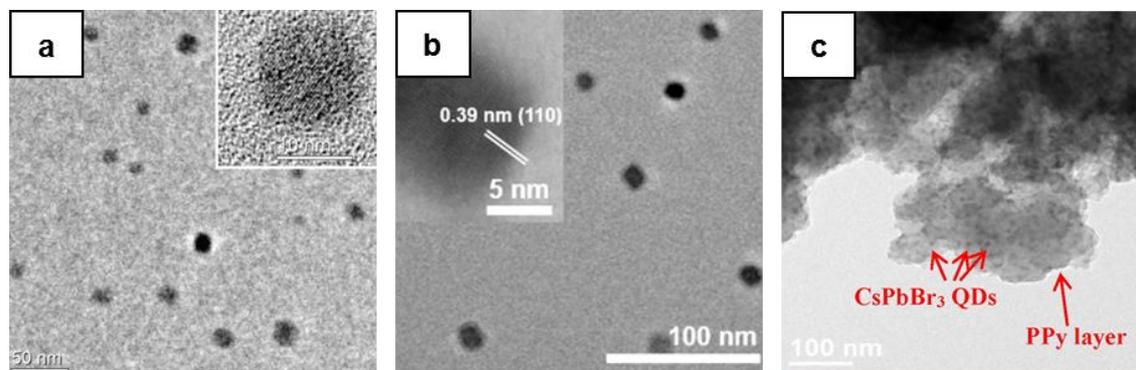


Figura 27. NCs de CsPbBr<sub>3</sub> estabilizados mediante la estrategia de fotopolimerización. Imágenes reproducidas de (a) *Advanced Materials*. 2018, 30, 21, 1–6, (b) *ACS Energy Lett.* 2022, 7, 2, 610–616, (c) *Applied Surface Science*. 2020, 526, 146735

Tabla 5. Características de los NCs de LHP estabilizados mediante fotopolimerización

| Figura 27 | Composición              | Tamaño (nm) | PLQY (%) | Estabilidad en agua | Aplicación | Ref.    |
|-----------|--------------------------|-------------|----------|---------------------|------------|---------|
| a         | CsPbBr <sub>3</sub> @PS  | ~ 15 nm     | 42       | N.D.                | LEDs       | 121     |
| b         | CsPbBr <sub>3</sub> @PMA | ~ 14 nm     | 48       | 1 día               | N.D.       | 122,123 |
| c         | CsPbBr <sub>3</sub> @PPy | N.D.        | N.D.     | 30 días             | N.D.       | 125     |

PMA: polimetilacrilato · PPy: polipirrol · PS: poliestireno

### III. Técnicas de atomización

Las técnicas de atomización se basan en generar un aerosol a partir de una disolución que, al secarse rápidamente, dan lugar a un producto sólido.<sup>127,128</sup> En función del mecanismo por el que se produce la atomización, pueden distinguirse varias técnicas: *electrospraying/electrospinning*, *spray-drying* y *spray-pyrolysis*.<sup>129</sup>

## D. Electrospaying/electrospinning

La técnica de *electrospraying/electrospinning* genera gotas muy pequeñas al someter una disolución a alto voltaje. Según el producto generado, se utiliza un nombre u otro para referirse a esta técnica. Cuando se obtienen partículas de aspecto esférico, recibe el nombre de *electrospraying*, mientras que cuando son fibras, se denomina *electrospinning*.<sup>130,131</sup>

El resultado depende de los parámetros fisicoquímicos implicados en el proceso. Normalmente, a partir de disoluciones con baja viscosidad se generan partículas esféricas, mientras que cuando la viscosidad es alta se generan fibras.<sup>132</sup> Controlando otros factores como: voltaje, velocidad de inyección, condiciones ambientales, conductividad eléctrica y las propiedades reológicas de la disolución, es posible modificar el tamaño y morfología.<sup>133</sup>

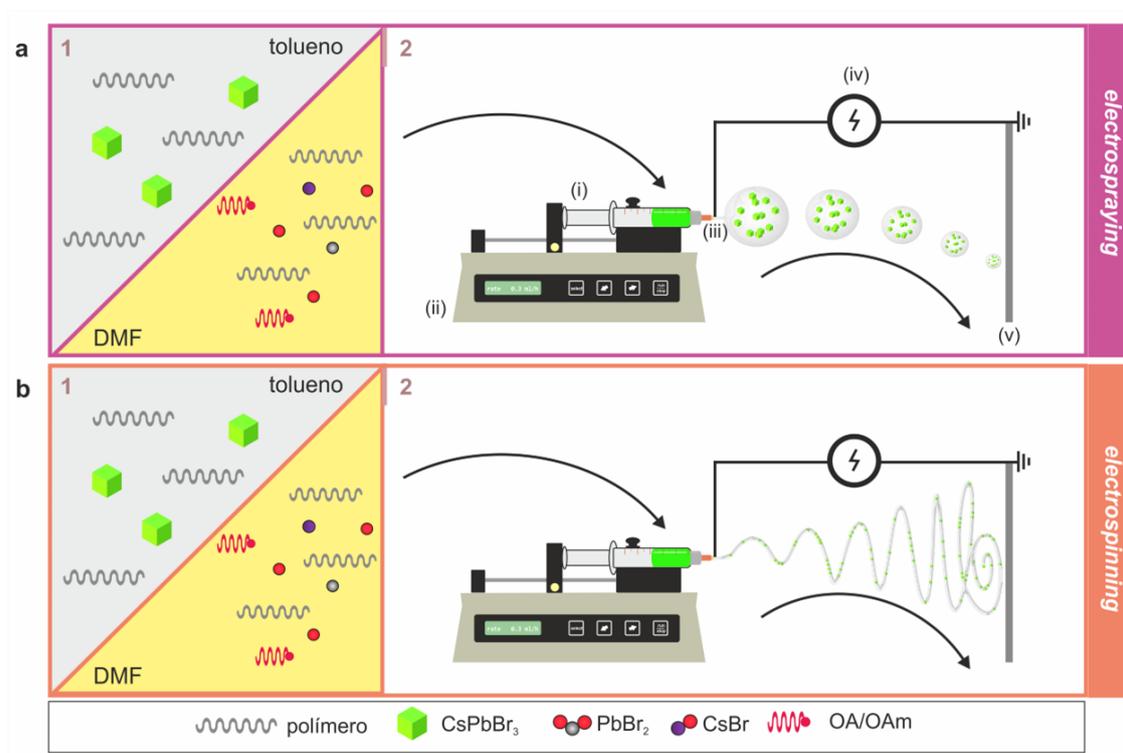


Figura 28. Metodología para la estabilización de NCs de LHP en (a) partículas (*electrospraying*) o (b) fibras (*electrospinning*) poliméricas

El montaje típico del equipo de *electrospraying/electrospinning* se ilustra en la **Figura 28** y consiste generalmente en: (i) una jeringa cargada con la disolución, (ii) una bomba de jeringa que controla la velocidad a la que se inyecta, (iii) una aguja metálica que se coloca en la punta de la jeringa y se

conecta a (iv) la fuente de alto voltaje. (v) El colector es una superficie conductora que se coloca a una determinada distancia de la aguja y es donde se recoge el producto final.<sup>134</sup>

Ambas técnicas se han empleado para encapsular NCs de LHP en partículas o fibras de polímeros hidrófobos como poliestireno (PS),<sup>135–139</sup> fluoruro de polivinilideno (PVDF),<sup>140</sup> polimetilmetacrilato (PMMA),<sup>141,142</sup> poli(estireno-butadieno-estireno) (SBS),<sup>143</sup> o poli(acrilonitrilo) (PAN).<sup>144</sup> La **Tabla 6** resume los resultados de los trabajos más representativos de la estabilización de los NCs de perovskita mediante técnicas de atomización.

Hasta la fecha, los trabajos que recurren a la estrategia de *electrospraying* para la encapsulación de NCs de LHP, someten a alto voltaje una disolución que contiene un polímero de naturaleza hidrófoba en una mezcla con los NCs de LHP. El resultado son partículas poliméricas de tamaño micrométrico (5-17  $\mu\text{m}$ ) (**Figura 29a-c**),<sup>136,138,141</sup> cargadas de NCs en su interior. Otra alternativa, consiste en utilizar la mezcla de las sales precursoras junto con el polímero disueltos en DMF. De esta manera, Wang *et al* obtuvieron partículas por debajo de 1  $\mu\text{m}$ , con las que demostraron su aplicación como marcadores fluorescentes en cultivos celulares (**Figura 29d**).<sup>140</sup>

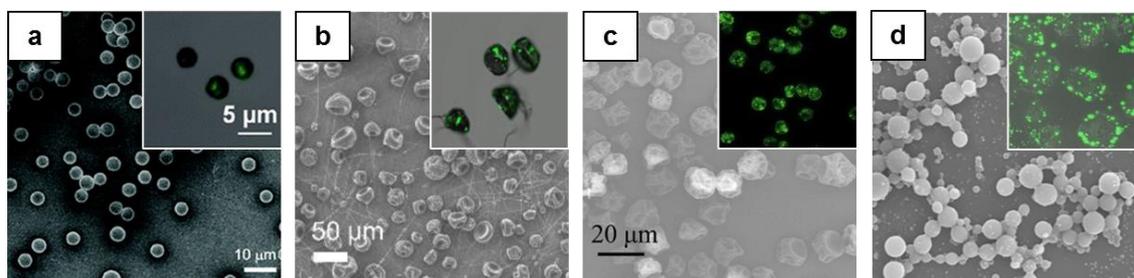


Figura 29. NCs de LHP estabilizados en partículas poliméricas mediante la estrategia de *electrospraying*. Imágenes reproducidas de (a) J. Mater. Chem. C, 2018,6, 7971-7975, (b) Chemistry - A European Journal. 2020, 26, 46, 10528–10533, (c) Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2022, 634, 127909, (d) Inorganic Chemistry Communications. 2019, 106, 99–103

De la misma manera, en la modalidad de *electrospinning* la metodología habitual consiste en producir las fibras a partir de una disolución que contiene los NCs de LHP presintetizados en una mezcla con el polímero disuelto (**Figura 30**). Paralelamente, también hay trabajos donde en lugar de los NCs se parte de las sales precursoras tanto de cesio,<sup>137</sup> como de metilamonio.<sup>144</sup>

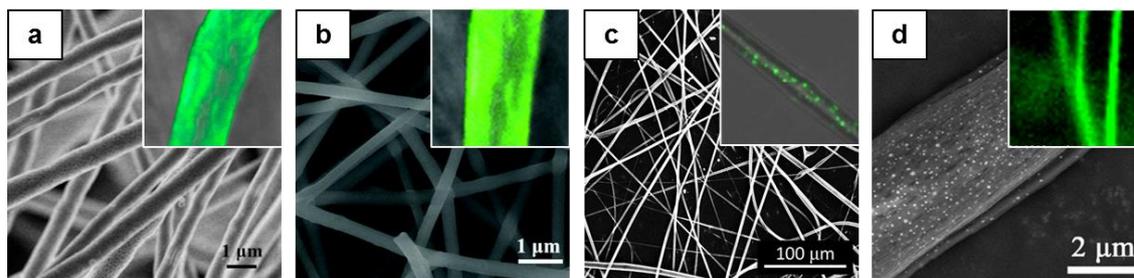


Figura 30. NCs estabilizados en fibras poliméricas mediante la estrategia de *electrospinning*. Imágenes reproducidas de (a) J. Phys. Chem. Lett. 2016, 7, 21, 4253–4258 (b) Nanoscale Horiz., 2017, 2, 225–232, (c) ACS Appl. Mater. Interfaces 2018, 10, 3, 2210–2215, (d) Nature Communications. 2021, 14, 234

## E. Spray-drying

La técnica de *spray-drying* es un método donde la disolución se atomiza al pasar a través de un nebulizador que genera un aerosol de pequeñas gotas que al entrar en contacto con un gas se secan de forma instantánea, dando lugar a un polvo muy fino (**Figura 31**).<sup>128,145</sup>

El tamaño y morfología de las partículas puede ajustarse a través de las condiciones de atomización, temperatura de secado, flujo del gas de secado, concentración de la disolución y presión.<sup>146</sup>

El único trabajo que ha utilizado esta técnica para la encapsulación de NCs de LHP es el de *Boussoufi et al*, logrando una población polidispersa de partículas, con un tamaño medio de 400 nm.<sup>147</sup>

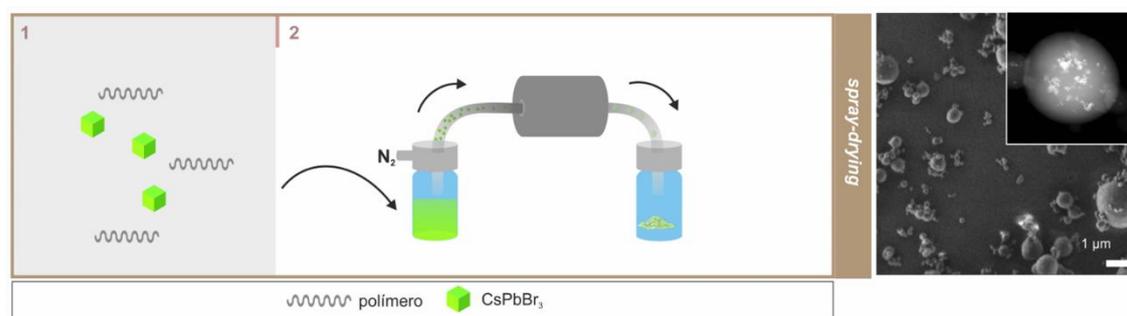


Figura 31. NCs de LHP estabilizados en partículas poliméricas mediante la estrategia de *spray-drying*. Imagen reproducida de ACS Appl. Nano Mater. 2021, 4, 7, 7502–7512

Tabla 6. Características de los NCs de LHP estabilizados mediante técnicas de atomización

| Técnica                        | Composición                                  | Tamaño ( $\mu\text{m}$ ) | PLQY (%) | Estabilidad en agua | Aplicación                                  | Ref. |
|--------------------------------|--|--------------------------|----------|---------------------|---|------|
| Electrospraying<br>  Figura 29 | a CsPbBr <sub>3</sub> @PS                    | 4-5                      | 52       | 30 días             | LEDs  | 136  |
|                                | b CsPbBr <sub>3</sub> @PS                    | 10-15                    | 43       | N.D.                | N.D.  | 138  |
|                                | c CsPbBr <sub>3</sub> @PMMA                  | 17                       | N.D.     | 20 días             | Sensor de fosfatasa alcalina                | 141  |
|                                | d *CsPbBr <sub>3</sub> @PVDF                 | 0,6                      | N.D.     | 3 días              | Bioimagen                                   | 140  |
| Electrospinning<br>  Figura 30 | a CsPbBr <sub>3</sub> @PS                    | 0,8                      | 91       | 4h                  | Sensor de rodamina 6G                       | 135  |
|                                | b CsPbBr <sub>3</sub> @PMMA                  | 3                        | 88       | 30 días             | Sensores de tripsina, Cu <sup>+2</sup> y pH | 142  |
|                                | c CsPbBr <sub>3</sub> @SBS                   | 0,8                      | 23       | 1h                  | LEDs  | 143  |
|                                | d CsPbBr <sub>3</sub> @HP $\beta$ CD@PS@PFOS | 3                        | 49,7     | 138 días            | Tinta, WLEDs y textil                       | 139  |
|                                | - *CsPbBr <sub>3</sub> @PS                   | 0,8                      | 48       | 8 días              | LEDs  | 137  |
|                                | - *MAPbBr <sub>3</sub> @PAN                  | 0,2                      | 30,9     | 2 días              | N.D.  | 144  |
| Spray-drying<br>  Figura 31    | CsPbBr <sub>3</sub> @PMMA/PBMA               | 0,4                      | 65       | N.D.                | LEDs  | 147  |

\*Casos en los cuales la disolución de partida contiene la mezcla de las sales precursoras (ABr:PbBr<sub>2</sub>), en lugar de los NCs presintetizados

**HP $\beta$ CD**: hidroxipropil-beta-ciclodextrina · **PAN**: poli(acrilonitrilo) · **PBMA**: poli(butil metacrilato-co-metil metacrilato) · **PFOS**: perfluorooctiltrióxido de silano · **PMMA**: poli(metil metacrilato) · **PS**: poliestireno · **PVDF**: fluoruro de polivinilideno · **SBS**: poli(estireno-butadieno-estireno)

## 1.2.6 Aplicaciones

Los NCs de perovskita son una clase de materiales luminiscentes con capacidad para superar a los fluoróforos tradicionales en bioaplicaciones, principalmente por la sencillez de su síntesis, fotoestabilidad, alto PLQY, emisión estrecha y posibilidad de obtener una amplia gama de colores en función de su composición.

Además, pueden excitarse simultáneamente sin que sus espectros solapen, por lo que son ideales para multiplexado. Por ejemplo, Zhang *et al*, produjeron partículas de hasta 7 colores distintos, las cuales pueden distinguirse simultáneamente por microscopía confocal de fluorescencia bajo una excitación de 325-375 nm sin que sus espectros solapen (**Figura 32**).<sup>24</sup>

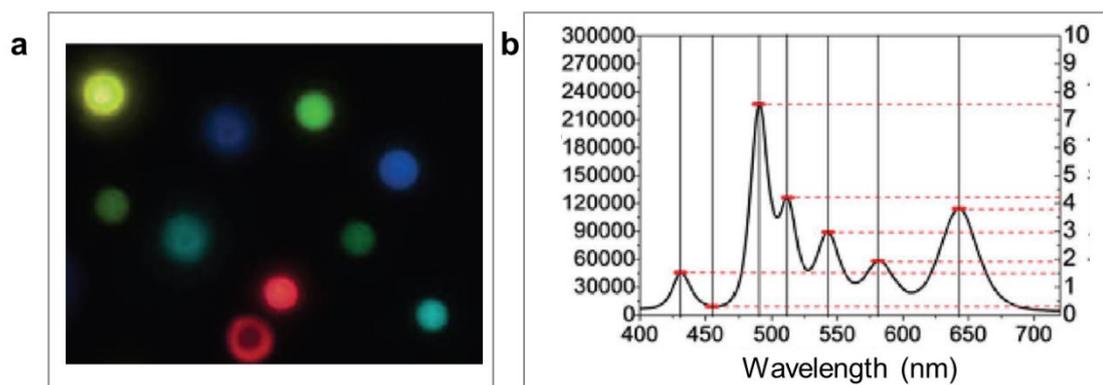


Figura 32. (a) Fluorescencia de las micropartículas CsPbX<sub>3</sub>@PS producidas por Zhang *et al* multicolores bajo una misma fuente de excitación a 325-375 nm. (b) Espectro de la emisión multiplex. Imágenes reproducidas de Adv. Funct. Mater. 2017, 1604382

Una de las aplicaciones más exitosas de los NCs de perovskita en el área biomédica es en biología celular (**Figura 33**). En ese caso, pueden utilizarse para la visualización de las células, marcaje de células tumorales o seguimiento de la dinámica celular. En la **Tabla 7** se muestran algunos ejemplos de partículas de perovskita estabilizadas que han sido utilizadas como agentes de contraste en cultivos celulares.

Tabla 7. Ejemplos de NCs de LHP aplicados en bioimagen

| Composición                            | Tamaño | PLQY (%) | Estabilidad en agua | Viabilidad celular | Cultivo celular | Ref |
|--|--------|----------|---------------------|--------------------|-----------------|-----|
| CsPbBr <sub>3</sub> @SiO <sub>2</sub>  | 170 nm | 44,2     | 10 días             | 89% a 100 µg/mL    | MCF-7           | 1   |
| CsPbBr <sub>3</sub> @PS- <i>b</i> -PAA | 200 nm | 60       | 2 años              | 90% a 200 µgPb/mL  | U87-MG          | 120 |
| CsPbBr <sub>3</sub> @PMMA              | 112 nm | 73       | 80 días             | 92% a 60 µg/mL     | HeLa            | 2   |
| CsPbBr <sub>3</sub> @SiO <sub>2</sub>  | 55 nm  | 10       | 24 h                | 96,21% a 16 µg/mL  | HepG2           | 148 |

En función de las dimensiones y naturaleza de las partículas, estas pueden adherirse a la membrana o ser endocitadas por las células. Esta información puede completarse recurriendo a procesos de tinción convencionales que permiten localizar el núcleo u otros orgánulos celulares y, por tanto, determinar si la señal de las NPs colocaliza con alguna de estas señales.

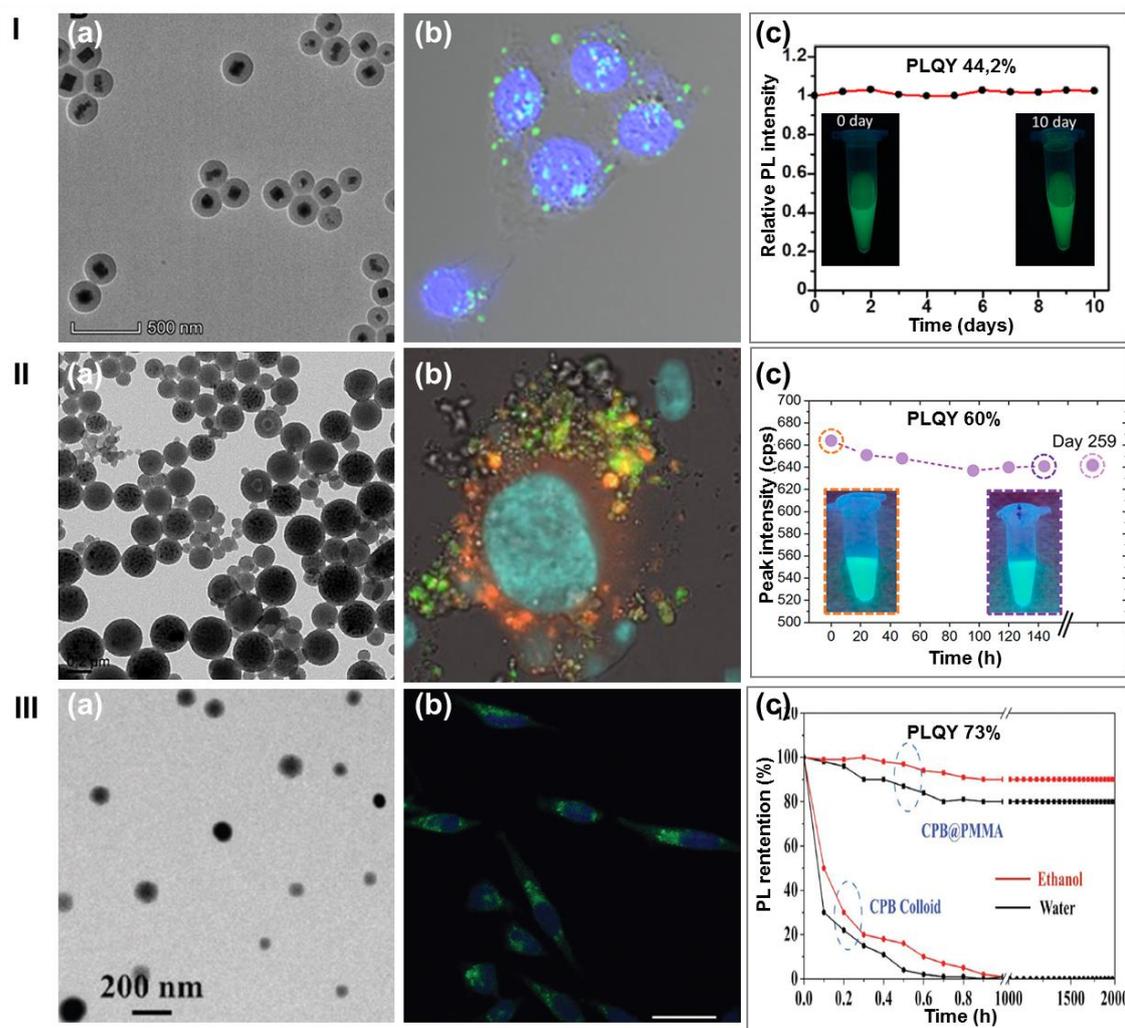


Figura 33. Panel I, resultados de las NPs de CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> producidas por Wu *et al.* Panel II, resultados de las NPs de CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA producidas por Avugadda *et al.* Panel III, resultados de las NPs producidas por Wang *et al.* (a) Imagen de TEM de las partículas (b) Imagen de microscopía confocal que permite visualizar la localización de las NPs en cultivo celular (en azul núcleos de las células teñidos con DAPI, en verde la fluorescencia emitida por las NPs y en rojo, los lisosomas de la célula). (c) Seguimiento de la intensidad de fluorescencia de las NPs dispersas en agua como medida de estabilidad óptica de los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> encapsulados. Imágenes reproducidas de (I) ACS Appl. Nano Mater. 2021, 4, 11, 11791–11800. (II) ACS Nano 2022, 16, 9, 13657–13666. (III) Small. 2018, 14, 51, 1-8

Una de las propiedades que convierte a los NCs de perovskita en marcadores luminiscentes prometedores en bioimagen celular es su capacidad de absorción multifotónica y emisión *upconversion*, es decir, pueden absorber varios fotones de la región del infrarrojo cercano (NIR) y emitir luz en la región visible. Esto permite sustituir una fuente de excitación UV por NIR, la cual ofrece buena resolución espacial, tiene alta penetración en los tejidos sin producir daño celular y reduce la autofluorescencia celular.

El trabajo de Zhong *et al* es un ejemplo donde exploran el potencial en bioimagen de NPs *core-shell* de CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> de 100 nm utilizando una fuente de excitación NIR (800 nm) (**Figura 34**).<sup>148</sup> La cuantificación de la señal emitida a 526 nm muestra que las células incubadas en presencia de las NPs alcanzan una intensidad que es 5 veces mayor a la del grupo control, de modo que la fuente NIR permite reducir la autofluorescencia celular y adquirir una buena calidad de imagen.

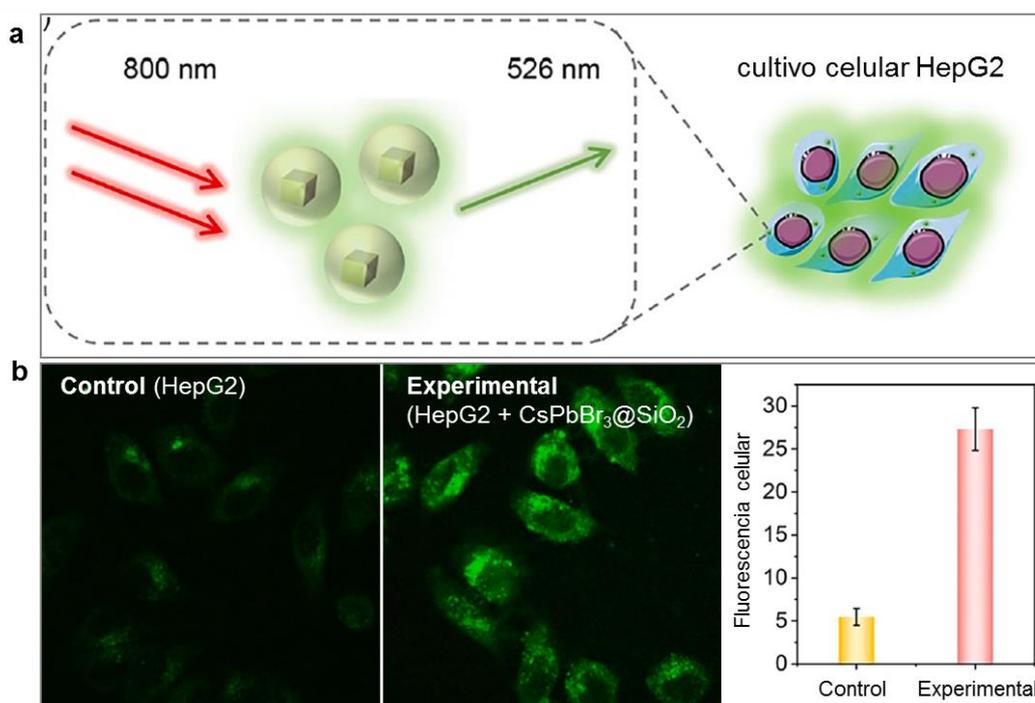


Figura 34. (a) Las NPs *core-shell* de CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> producidas por Zhong *et al* pueden absorber dos fotones de una fuente de excitación láser a 800 nm y emisión de un fotón a 526 nm. (b) Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia y cuantificación de la intensidad emitida por las células HepG2 en ausencia (control) y en presencia (experimental) de las NPs *core-shell* de CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> bajo una fuente de excitación láser de 800 nm. Imágenes reproducidas de Chemical Engineering Journal (2022) 431, 3, 134110

En algunos ensayos biológicos, donde la observación de las células puede requerir tiempos largos, los fluoróforos orgánicos no resultan útiles, ya que son susceptibles a fotoblanqueamiento y como consecuencia dejan de emitir fluorescencia. En cambio, los NCs de perovskita tienen tiempos de vida de fluorescencia más largos, por lo que se convierten en una alternativa eficiente en estudios de bioimagen celular de larga duración, como por ejemplo estudios *in vivo* realizados en modelos animales.

Por ejemplo, Luo *et al*, confirmaron la estabilidad y biocompatibilidad de los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> estabilizados en nanomicelas de polietilenglicon-policaprolactona (PEG-PCL) en un estudio realizado en pez cebra, lo que confirma la posibilidad de realizar estudios *in vivo* sin aparecer indicios de toxicidad (Figura 35).<sup>149</sup>

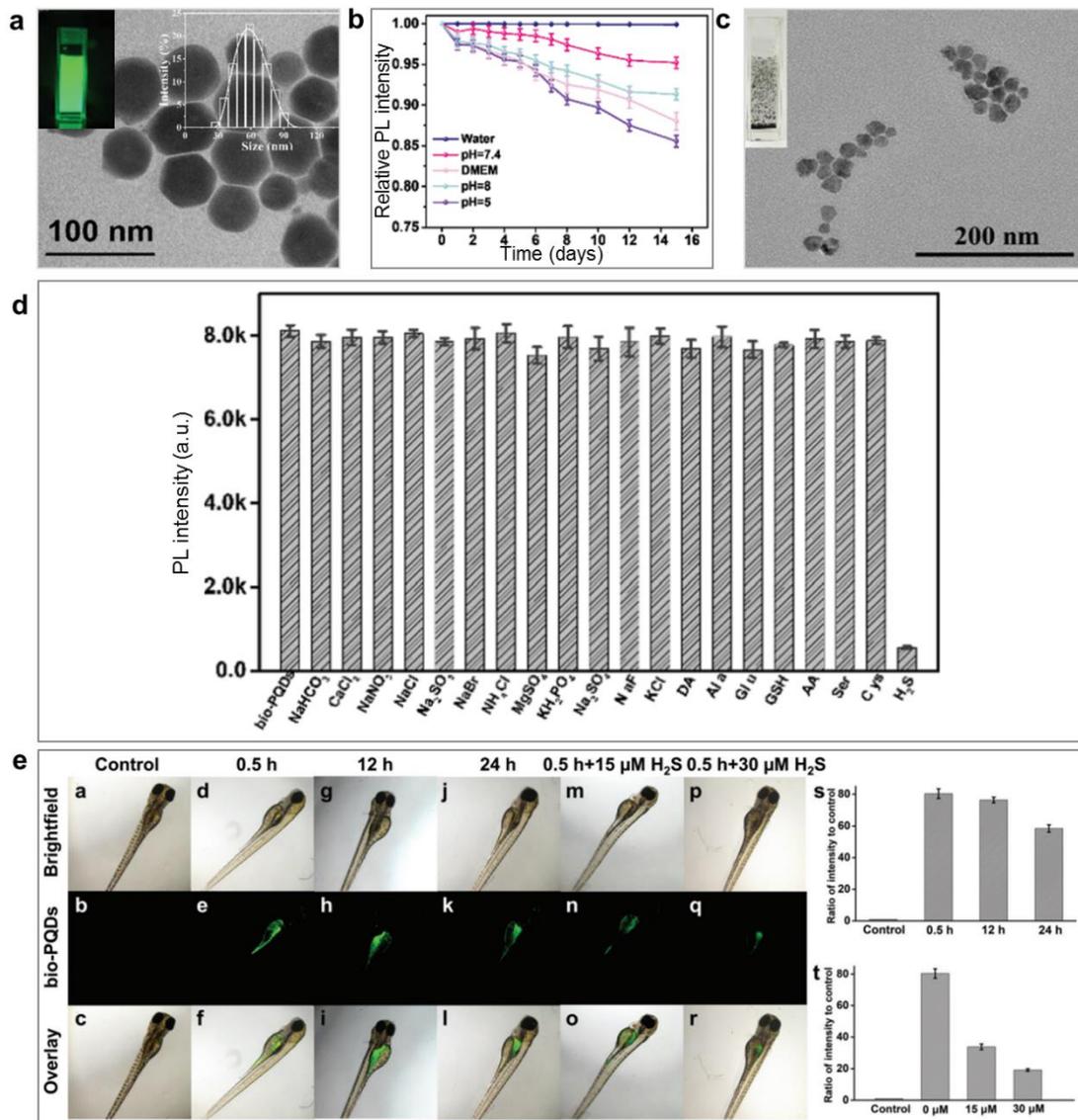


Figura 35. (a) TEM e imagen de fluorescencia de las NPs de CsPbBr<sub>3</sub>@PEG-PCL producidas por Luo *et al*. (b) Medida de la estabilidad de las NPs en agua, PBS a pH 5, 8 y 7,5 y medio de cultivo DMEM. (c) TEM de las NPs de CsPbBr<sub>3</sub>@PEG-PCL tras reaccionar con H<sub>2</sub>S. En la fotografía adjunta se puede ver el precipitado negro resultante de la formación de PbS. (d) Comparación de la respuesta fluorescente de las NPs tras exponerse a biomoléculas, aniones, cationes y H<sub>2</sub>S. (e) Seguimiento de la fluorescencia *in vivo* en pez cebra y comparación de su intensidad en presencia de 15 y 30 μM de H<sub>2</sub>S. Imágenes reproducidas de Nanoscale, 2021, 13, 14297–14303

Además, estos autores mostraron la respuesta de los NCs de perovskita frente a la presencia de sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), una molécula de señalización que juega un papel fisiológico importante en el sistema nervioso, cardiovascular e inmune. En presencia de  $\text{H}_2\text{S}$ , los iones de sulfuro eran capaces de reaccionar con los iones de Pb, dando lugar a un precipitado negro ( $\text{PbS}$ ) que producía una drástica caída de la fluorescencia emitida por los NCs de perovskita. Por otro lado, comprobaron que otras biomoléculas (serina, alanina, glutatión, cisteína, ácido úrico, ácido ascórbico, dopamina), cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cs}^{+2}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) o aniones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{SO}_3^{-2}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ) no interferían en la fluorescencia emitida por los NCs de perovskita. Por tanto, estos resultados convierten a los NCs de perovskita en una herramienta para la monitorización de los niveles de  $\text{H}_2\text{S}$  y detección del desequilibrio que se produce en enfermedades como síndrome de Down, Alzheimer, diabetes y cirrosis.

Otros autores han desarrollado sistemas de detección biomolecular donde la presencia del analito induce la transición de un estado apagado a encendido de la fluorescencia (sistemas *off-on*). Por ejemplo, Wang *et al* encapsularon NCs de  $\text{CsPbBr}_3$  en fibras de PMMA mediante la estrategia de *electrospinning* y las utilizaron para la detección de tripsina, que desde el punto de vista diagnóstico es interesante porque se considera un biomarcador de múltiples enfermedades cardiovasculares.<sup>142</sup> El sistema se basa en Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) entre los NCs de perovskita (donante) y la rodamina 6G (aceptor), que está conjugada a una secuencia peptídica. En presencia de tripsina, la enzima cataliza la ruptura de los enlaces peptídicos lo que permite la separación de ambos fluoróforos, resultando en el incremento de la fluorescencia del donante y en la disminución de la fluorescencia del aceptor. De este modo es posible determinar la concentración de tripsina en función de la relación entre la fluorescencia del donante y el aceptor.

Otro ejemplo es el sistema desarrollado por Wang *et al*, que tiene como fin la detección de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) en suero.<sup>141</sup> En este sistema se emplean nanohojas de dióxido de manganeso que *quenchean* la fluorescencia de los NCs de perovskita estabilizados en microesferas de PMMA. En presencia del sustrato y de la enzima ALP, se produce una reacción química que reduce a las nanohojas en iones de manganeso ( $\text{Mn}^{+2}$ ), las cuales pierden su capacidad para seguir *quencheando* la fluorescencia de los NCs y, por tanto, el sistema pasa del estado apagado a encendido (**Figura 36**).

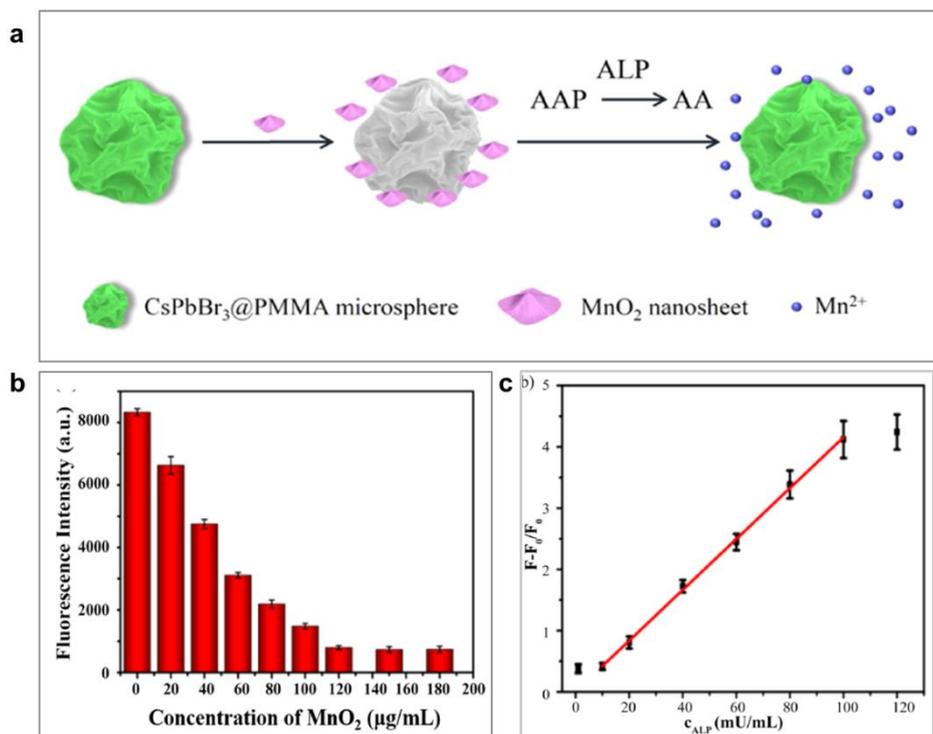


Figura 36. Ilustración del principio de detección del sistema desarrollado por Wang *et al.* (b) Demostración del efecto *quenching* que producen las nanofojas de  $\text{MnO}_2$  sobre la intensidad de fluorescencia emitida por los NCs de perovskita. (c) Incremento de la intensidad de fluorescencia con concentraciones crecientes de la enzima ALP. Imágenes reproducidas de *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2022, 634, 127909

Además de biomoléculas, también se han diseñado sistemas para la detección de bacterias basados en FRET. El sistema de Jiang *et al* permite la detección de *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>150</sup> En él, los NCs de perovskita actúan como aceptor y están funcionalizados con una sonda de DNA que reconoce la secuencia complementaria del DNA de la bacteria, mientras que como *quencher* utilizan nanofojas de  $\text{MoS}_2$ . Cuando la sonda de DNA marcada se une a las nanofojas de  $\text{MoS}_2$ , induce el estado de apagado. Mientras que, en presencia de la secuencia complementaria de la bacteria, ambas hibridan, evitando así que la sonda se adsorba en la superficie de las nanofojas, por lo que en estas condiciones se pasa al estado encendido de la fluorescencia.

Por otro lado, la combinación de NCs de perovskita estables con anticuerpos específicos también ha permitido obtener conjugados fluorescentes para la detección cuantitativa de biomoléculas específicas de interés clínico, alimentario o medioambiental. Por ejemplo, Dong *et al* desarrollaron un inmunoensayo en formato sándwich, donde el anticuerpo de captura se conjuga

con NCs de perovskita para la detección de pequeñas moléculas, como la aflatoxina, y macromoléculas, como el antígeno carcinoembrionario, alcanzando límites de detección (LOD) de 0,02 ng/mL y 0,482 ng/mL, respectivamente.<sup>151</sup>

También es interesante citar el trabajo de Li *et al*, donde los NCs de perovskita están estabilizados por un recubrimiento fosfolipídico biotinilado y los emplean como marcadores fluorescentes para desarrollar un inmunoensayo en formato sándwich para la detección del antígeno prostático específico (PSA) un biomarcador de diagnóstico en cáncer de próstata.<sup>152</sup> Cabe destacar que atribuyen a los NCs de perovskita capacidad catalítica que simula la actividad peroxidasa y por tanto pueden convertir los sustratos (TMB y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en un producto coloreado, de modo que permite una detección dual. Alcanzan un LOD: 0,29 ng/mL mediante detección colorimétrica y un LOD: 0,081 ng/mL mediante detección fluorimétrica (**Figura 37**).

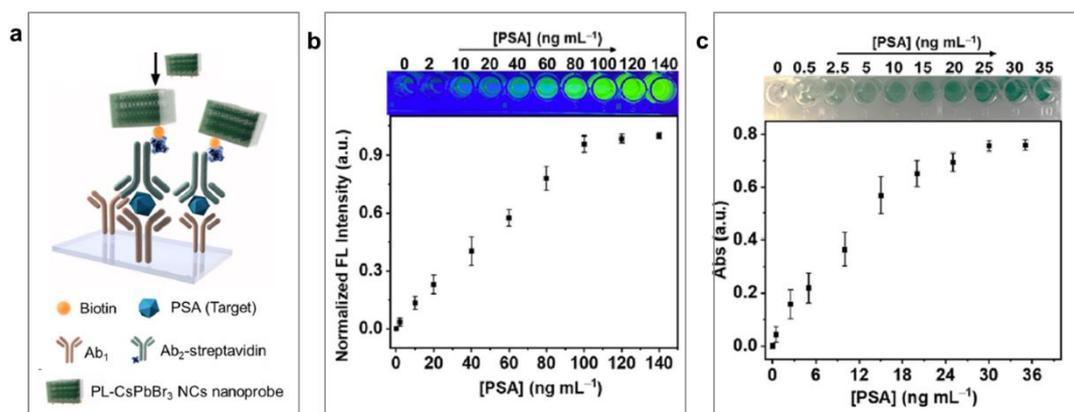


Figura 37. (a) Esquema del inmunoensayo en formato sándwich para la detección de PSA desarrollado por Li *et al*. (b) Intensidad de fluorescencia a 521 nm alcanzada para diferentes concentraciones del analito (PSA) (c) Absorbancia a 652 nm obtenida para diferentes concentraciones de PSA. Imágenes reproducidas a partir de Biosensors and Bioelectronics 2022, 203, 113979

En conclusión, los avances de los últimos años en encapsulación de NCs de perovskita hacen que cada vez esté más cerca su implantación como marcadores luminiscentes. La mayor parte de los ejemplos descritos se centran en aplicaciones de diagnóstico por imagen, aunque hasta ahora generalmente se ciñen únicamente a demostrar la biocompatibilidad de las partículas en un cultivo celular. El paso siguiente debe ser su conjugación a biorreceptores para que reconozcan de forma específica determinados tipos celulares o estructuras internas, ya que respaldaría su versatilidad en histoquímica o citoquímica, respectivamente.

Por otro lado, aun hay pocos ejemplos que demuestren la utilización de NCs de perovskita como marcadores en sistemas analíticos. Ante la creciente necesidad de monitorizar biomarcadores de interés clínico, medioambiental o alimentario,<sup>153</sup> consideramos relevante aportar estrategias de estabilización que resulten en partículas monodispersas, de tamaño nanométrico, exhiban alto PLQY, con capacidad para dispersarse homogéneamente en tampón salino o medios biológicos y se mantengan ópticamente estables que contribuyan al desarrollo de los nanocristales de perovskita en esta dirección.

### 1.3. Bibliografía

- (1) Wu, H.; Chen, Y.; Zhang, W.; Khan, M. S.; Chi, Y. Water-Dispersed Perovskite Nanocube@SiO<sub>2</sub>-C18-PC Core–Shell Nanoparticles for Cell Imaging. *ACS Appl. Nano Mater.* **2021**, *4* (11), 11791–11800. <https://doi.org/10.1021/acsnm.1c02376>.
- (2) Wang, Y.; Varadi, L.; Trinchi, A.; Shen, J.; Zhu, Y.; Wei, G.; Li, C. Spray-Assisted Coil–Globule Transition for Scalable Preparation of Water-Resistant CsPbBr<sub>3</sub>@PMMA Perovskite Nanospheres with Application in Live Cell Imaging. *Small* **2018**, *14* (51), 1803156. <https://doi.org/10.1002/sml.201803156>.
- (3) Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. Quantum Dots versus Organic Dyes as Fluorescent Labels. *Nat. Methods* **2008**, *5* (9), 763–775. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1248>.
- (4) Wang, F.; Tan, W. B.; Zhang, Y.; Fan, X.; Wang, M. Luminescent Nanomaterials for Biological Labelling. *Nanotechnology* **2005**, *17* (1), R1. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/1/R01>.
- (5) Alivisatos, A. P.; Gu, W.; Larabell, C. Quantum Dots as Cellular Probes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2005**, *7* (1), 55–76. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.7.060804.100432>.
- (6) *Introduction to Fluorescence Sensing*; Demchenko, A. P., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2009. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9003-5>.
- (7) Chudakov, D. M.; Matz, M. V.; Lukyanov, S.; Lukyanov, K. A. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiol. Rev.* **2010**, *90* (3), 1103–1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>.
- (8) Cho, U.; Chen, J. K. Lanthanide-Based Optical Probes of Biological Systems. *Cell Chem. Biol.* **2020**, *27* (8), 921–936. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.07.009>.
- (9) Oliveira, A. C.; Costa, T.; Justino, L. L. G.; Fausto, R.; Morfin, J.-F.; Tóth, É.; Geraldés, C. F. G. C.; Burrows, H. D. Photophysical Studies on Lanthanide(III) Chelates Conjugated to Pittsburgh Compound B as Luminescent Probes Targeted to A $\beta$  Amyloid Aggregates. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2020**, *19* (11), 1522–1537. <https://doi.org/10.1039/d0pp00214c>.
- (10) Wheeler, S.; Butler, S. J. Exploiting the Unique Properties of Lanthanide Complexes as FRET Probes: From Quantitation to Protein Dynamics. *Anal. Sens.* **2023**, *3* (1), e202200036. <https://doi.org/10.1002/anse.202200036>.

- (11) García de Arquer, F. P.; Talapin, D. V.; Klimov, V. I.; Arakawa, Y.; Bayer, M.; Sargent, E. H. Semiconductor Quantum Dots: Technological Progress and Future Challenges. *Science* **2021**, *373* (6555), eaaz8541. <https://doi.org/10.1126/science.aaz8541>.
- (12) Manna, L. The Bright and Enlightening Science of Quantum Dots. *Nano Lett.* **2023**, *23* (21), 9673–9676. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.3c03904>.
- (13) Murray, C. B.; Norris, D. J.; Bawendi, M. G. Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = Sulfur, Selenium, Tellurium) Semiconductor Nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (19), 8706–8715. <https://doi.org/10.1021/ja00072a025>.
- (14) Akkerman, Q. A.; Rainò, G.; Kovalenko, M. V.; Manna, L. Genesis, Challenges and Opportunities for Colloidal Lead Halide Perovskite Nanocrystals. *Nat. Mater.* **2018**, *17* (5), 394–405. <https://doi.org/10.1038/s41563-018-0018-4>.
- (15) Owen, J.; Brus, L. Chemical Synthesis and Luminescence Applications of Colloidal Semiconductor Quantum Dots. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (32), 10939–10943. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b05267>.
- (16) *Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels | Science*. [https://www.science.org/doi/10.1126/science.281.5385.2013?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://www.science.org/doi/10.1126/science.281.5385.2013?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed) (accessed 2023-11-13).
- (17) Chan, W. C. W.; Nie, S. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science* **1998**, *281* (5385), 2016–2018. <https://doi.org/10.1126/science.281.5385.2016>.
- (18) Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. Quantum Dot Bioconjugates for Imaging, Labelling and Sensing. *Nat. Mater.* **2005**, *4* (6), 435–446. <https://doi.org/10.1038/nmat1390>.
- (19) Pu, Y.; Cai, F.; Wang, D.; Wang, J.-X.; Chen, J.-F. Colloidal Synthesis of Semiconductor Quantum Dots toward Large-Scale Production: A Review. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2018**, *57* (6), 1790–1802. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b04836>.
- (20) Schmidt, L. C.; Pertegás, A.; González-Carrero, S.; Malinkiewicz, O.; Agouram, S.; Mínguez Espallargas, G.; Bolink, H. J.; Galian, R. E.; Pérez-Prieto, J. Nontemplate Synthesis of CH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub>PbBr<sub>3</sub> Perovskite Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (3), 850–853. <https://doi.org/10.1021/ja4109209>.
- (21) Protesescu, L.; Yakunin, S.; Bodnarchuk, M. I.; Krieg, F.; Caputo, R.; Hendon, C. H.; Yang, R. X.; Walsh, A.; Kovalenko, M. V. Nanocrystals of Cesium Lead Halide Perovskites (CsPbX<sub>3</sub>, X = Cl, Br, and I): Novel

- Optoelectronic Materials Showing Bright Emission with Wide Color Gamut. *Nano Lett.* **2015**, *15* (6), 3692–3696.  
<https://doi.org/10.1021/nl5048779>.
- (22) Dey, A.; Ye, J.; De, A.; Debroye, E.; Ha, S. K.; Bladt, E.; Kshirsagar, A. S.; Wang, Z.; Yin, J.; Wang, Y.; Quan, L. N.; Yan, F.; Gao, M.; Li, X.; Shamsi, J.; Debnath, T.; Cao, M.; Scheel, M. A.; Kumar, S.; Steele, J. A.; Gerhard, M.; Chouhan, L.; Xu, K.; Wu, X.; Li, Y.; Zhang, Y.; Dutta, A.; Han, C.; Vincon, I.; Rogach, A. L.; Nag, A.; Samanta, A.; Korgel, B. A.; Shih, C.-J.; Gamelin, D. R.; Son, D. H.; Zeng, H.; Zhong, H.; Sun, H.; Demir, H. V.; Scheblykin, I. G.; Mora-Seró, I.; Stolarczyk, J. K.; Zhang, J. Z.; Feldmann, J.; Hofkens, J.; Luther, J. M.; Pérez-Prieto, J.; Li, L.; Manna, L.; Bodnarchuk, M. I.; Kovalenko, M. V.; Roeffaers, M. B. J.; Pradhan, N.; Mohammed, O. F.; Bakr, O. M.; Yang, P.; Müller-Buschbaum, P.; Kamat, P. V.; Bao, Q.; Zhang, Q.; Krahne, R.; Galian, R. E.; Stranks, S. D.; Bals, S.; Biju, V.; Tisdale, W. A.; Yan, Y.; Hoyer, R. L. Z.; Polavarapu, L. State of the Art and Prospects for Halide Perovskite Nanocrystals. *ACS Nano* **2021**, *15* (7), 10775–10981.  
<https://doi.org/10.1021/acsnano.0c08903>.
- (23) Jin, S. Can We Find the Perfect A-Cations for Halide Perovskites? *ACS Energy Lett.* **2021**, *6* (9), 3386–3389.  
<https://doi.org/10.1021/acsenerylett.1c01806>.
- (24) Zhang, H.; Wang, X.; Liao, Q.; Xu, Z.; Li, H.; Zheng, L.; Fu, H. Embedding Perovskite Nanocrystals into a Polymer Matrix for Tunable Luminescence Probes in Cell Imaging. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27* (7), 1604382.  
<https://doi.org/10.1002/adfm.201604382>.
- (25) Wang, Y.; Li, X.; Zhao, X.; Xiao, L.; Zeng, H.; Sun, H. Nonlinear Absorption and Low-Threshold Multiphoton Pumped Stimulated Emission from All-Inorganic Perovskite Nanocrystals. *Nano Lett.* **2016**, *16* (1), 448–453.  
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b04110>.
- (26) Chen, W.; Bhaumik, S.; Veldhuis, S. A.; Xing, G.; Xu, Q.; Grätzel, M.; Mhaisalkar, S.; Mathews, N.; Sum, T. C. Giant Five-Photon Absorption from Multidimensional Core-Shell Halide Perovskite Colloidal Nanocrystals. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 15198.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms15198>.
- (27) Fiuza-Maneiro, N.; Sun, K.; López-Fernández, I.; Gómez-Graña, S.; Müller-Buschbaum, P.; Polavarapu, L. Ligand Chemistry of Inorganic Lead Halide Perovskite Nanocrystals. *ACS Energy Lett.* **2023**, *8* (2), 1152–1191.  
<https://doi.org/10.1021/acsenerylett.2c02363>.
- (28) Liu, C.; Zeng, Q.; Wei, H.; Yu, Y.; Zhao, Y.; Feng, T.; Yang, B. Metal Halide Perovskite Nanocrystal Solar Cells: Progress and Challenges. *Small Methods* **2020**, *4* (10), 2000419.  
<https://doi.org/10.1002/smt.202000419>.

- (29) Yan, F.; Demir, H. V. LEDs Using Halide Perovskite Nanocrystal Emitters. *Nanoscale* **2019**, *11* (24), 11402–11412. <https://doi.org/10.1039/C9NR03533H>.
- (30) Kang, C. H.; Dursun, I.; Liu, G.; Sinatra, L.; Sun, X.; Kong, M.; Pan, J.; Maity, P.; Ooi, E.-N.; Ng, T. K.; Mohammed, O. F.; Bakr, O. M.; Ooi, B. S. High-Speed Colour-Converting Photodetector with All-Inorganic CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Nanocrystals for Ultraviolet Light Communication. *Light Sci. Appl.* **2019**, *8* (1), 94. <https://doi.org/10.1038/s41377-019-0204-4>.
- (31) Mamontova, A. V.; Solovyev, I. D.; Savitsky, A. P.; Shakhov, A. M.; Lukyanov, K. A.; Bogdanov, A. M. Bright GFP with Subnanosecond Fluorescence Lifetime. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 13224. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31687-w>.
- (32) Zimmer, M. Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (3), 759–782. <https://doi.org/10.1021/cr010142r>.
- (33) Hao, J.; Liu, H.; Miao, J.; Lu, R.; Zhou, Z.; Zhao, B.; Xie, B.; Cheng, J.; Wang, K.; Delville, M.-H. A Facile Route to Synthesize CdSe/ZnS Thick-Shell Quantum Dots with Precisely Controlled Green Emission Properties: Towards QDs Based LED Applications. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 12048. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48469-7>.
- (34) Maes, J.; Balcaen, L.; Drijvers, E.; Zhao, Q.; De Roo, J.; Vantomme, A.; Vanhaecke, F.; Geiregat, P.; Hens, Z. Light Absorption Coefficient of CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Nanocrystals. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9* (11), 3093–3097. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.8b01065>.
- (35) Katz, E. A. Perovskite: Name Puzzle and German-Russian Odyssey of Discovery. *Helv. Chim. Acta* **2020**, *103* (6), e2000061. <https://doi.org/10.1002/hlca.202000061>.
- (36) Shamsi, J.; Urban, A. S.; Imran, M.; De Trizio, L.; Manna, L. Metal Halide Perovskite Nanocrystals: Synthesis, Post-Synthesis Modifications, and Their Optical Properties. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (5), 3296–3348. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00644>.
- (37) Kojima, A.; Teshima, K.; Shirai, Y.; Miyasaka, T. Organometal Halide Perovskites as Visible-Light Sensitizers for Photovoltaic Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (17), 6050–6051. <https://doi.org/10.1021/ja809598r>.
- (38) Clasen Hames, B.; Sánchez Sánchez, R.; Fakharuddin, A.; Mora-Seró, I. A Comparative Study of Light-Emitting Diodes Based on All-Inorganic Perovskite Nanoparticles (CsPbBr<sub>3</sub>) Synthesized at Room Temperature and by a Hot-Injection Method. *ChemPlusChem* **2018**, *83* (4), 294–299. <https://doi.org/10.1002/cplu.201800014>.

- (39) Park, N.-G. Perovskite Solar Cells: An Emerging Photovoltaic Technology. *Mater. Today* **2015**, *18* (2), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2014.07.007>.
- (40) Garoufalidis, C. S.; Galanakis, I.; Zeng, Z.; Hayrapetyan, D. B.; Baskoutas, S. Structural and Electronic Properties of Small Perovskite Nanoparticles of the Form ABX<sub>3</sub> (A = MA, DEA, FA, GA, B = Pb, Sn, X = Cl, Br, I). *Electron. Mater.* **2021**, *2* (3), 382–393. <https://doi.org/10.3390/electronicmat2030026>.
- (41) Travis, W.; Glover, E. N. K.; Bronstein, H.; Scanlon, D. O.; Palgrave, R. G. On the Application of the Tolerance Factor to Inorganic and Hybrid Halide Perovskites: A Revised System. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (7), 4548–4556. <https://doi.org/10.1039/C5SC04845A>.
- (42) Xiang, W.; Liu, S. (Frank); Tress, W. A Review on the Stability of Inorganic Metal Halide Perovskites: Challenges and Opportunities for Stable Solar Cells. *Energy Environ. Sci.* **2021**, *14* (4), 2090–2113. <https://doi.org/10.1039/D1EE00157D>.
- (43) Fan, Q.; Biesold-McGee, G. V.; Ma, J.; Xu, Q.; Pan, S.; Peng, J.; Lin, Z. Lead-Free Halide Perovskite Nanocrystals: Crystal Structures, Synthesis, Stabilities, and Optical Properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (3), 1030–1046. <https://doi.org/10.1002/anie.201904862>.
- (44) Akkerman, Q. A.; D’Innocenzo, V.; Accornero, S.; Scarpellini, A.; Petrozza, A.; Prato, M.; Manna, L. Tuning the Optical Properties of Cesium Lead Halide Perovskite Nanocrystals by Anion Exchange Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (32), 10276–10281. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b05602>.
- (45) Nedelcu, G.; Protesescu, L.; Yakunin, S.; Bodnarchuk, M. I.; Grotevent, M. J.; Kovalenko, M. V. Fast Anion-Exchange in Highly Luminescent Nanocrystals of Cesium Lead Halide Perovskites (CsPbX<sub>3</sub>, X = Cl, Br, I). *Nano Lett.* **2015**, *15* (8), 5635–5640. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b02404>.
- (46) Protesescu, L.; Yakunin, S.; Nazarenko, O.; Dirin, D. N.; Kovalenko, M. V. Low-Cost Synthesis of Highly Luminescent Colloidal Lead Halide Perovskite Nanocrystals by Wet Ball Milling. *ACS Appl. Nano Mater.* **2018**, *1* (3), 1300–1308. <https://doi.org/10.1021/acsanm.8b00038>.
- (47) Yun, S.; Kirakosyan, A.; Yoon, S.-G.; Choi, J. Scalable Synthesis of Exfoliated Organometal Halide Perovskite Nanocrystals by Ligand-Assisted Ball Milling. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6* (3), 3733–3738. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04092>.
- (48) Xie, M.; Liu, H.; Chun, F.; Deng, W.; Luo, C.; Zhu, Z.; Yang, M.; Li, Y.; Li, W.; Yan, W.; Yang, W. Aqueous Phase Exfoliating Quasi-2D CsPbBr<sub>3</sub>

- Nanosheets with Ultrahigh Intrinsic Water Stability. *Small* **2019**, *15* (34), 1901994. <https://doi.org/10.1002/smll.201901994>.
- (49) Hintermayr, V. A.; Richter, A. F.; Ehrat, F.; Döblinger, M.; Vanderlinden, W.; Sichert, J. A.; Tong, Y.; Polavarapu, L.; Feldmann, J.; Urban, A. S. Tuning the Optical Properties of Perovskite Nanoplatelets through Composition and Thickness by Ligand-Assisted Exfoliation. *Adv. Mater.* **2016**, *28* (43), 9478–9485. <https://doi.org/10.1002/adma.201602897>.
- (50) Rosa-Pardo, I.; Rando-Brotons, M.; Pocoví-Martínez, S.; Galian, R. E.; Pérez Prieto, J. Laser Ablation of Hybrid Perovskite Bulks into Nanoparticles: Adamantylammonium Halides as Ligands and Halide Sources. *ChemNanoMat* **2019**, *5* (3), 328–333. <https://doi.org/10.1002/cnma.201800621>.
- (51) Amendola, V.; Fortunati, I.; Marega, C.; Abdelhady, A. L.; Saidaminov, M. I.; Bakr, O. M. High-Purity Hybrid Organolead Halide Perovskite Nanoparticles Obtained by Pulsed-Laser Irradiation in Liquid. *ChemPhysChem* **2017**, *18* (9), 1047–1054. <https://doi.org/10.1002/cphc.201600863>.
- (52) Gonzalez-Carrero, S.; Galian, R. E.; Pérez-Prieto, J. Maximizing the Emissive Properties of CH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub>PbBr<sub>3</sub> Perovskite Nanoparticles. *J. Mater. Chem. A* **2015**, *3* (17), 9187–9193. <https://doi.org/10.1039/C4TA05878J>.
- (53) Rosa-Pardo, I.; Cevallos-Toledo, R. B.; Polavarapu, L.; Arenal, R.; Galian, R. E.; Pérez-Prieto, J. Revisiting the Nontemplate Approach for the Synthesis of Highly Green Emissive Hybrid Perovskite Nanocrystals: Platelets or Spheres? *Nanoscale* **2022**, *14* (4), 1160–1164. <https://doi.org/10.1039/D1NR07806B>.
- (54) Sichert, J. A.; Tong, Y.; Mutz, N.; Vollmer, M.; Fischer, S.; Milowska, K. Z.; García Cortadella, R.; Nickel, B.; Cardenas-Daw, C.; Stolarczyk, J. K.; Urban, A. S.; Feldmann, J. Quantum Size Effect in Organometal Halide Perovskite Nanoplatelets. *Nano Lett.* **2015**, *15* (10), 6521–6527. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b02985>.
- (55) Vighnesh, K.; Wang, S.; Liu, H.; Rogach, A. L. Hot-Injection Synthesis Protocol for Green-Emitting Cesium Lead Bromide Perovskite Nanocrystals. *ACS Nano* **2022**, *16* (12), 19618–19625. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c11689>.
- (56) Ji, Y.; Zhang, J.-B.; Shen, H.-R.; Su, Z.; Cui, H.; Lan, T.; Wang, J.-Q.; Chen, Y.-H.; Liu, L.; Cao, K.; Shen, W.; Chen, S. Improving the Stability of  $\alpha$ -CsPbI<sub>3</sub> Nanocrystals in Extreme Conditions Facilitated by Mn<sup>2+</sup> Doping. *ACS Omega* **2021**, *6* (21), 13831–13838. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c01383>.

- (57) Parobek, D.; Roman, B. J.; Dong, Y.; Jin, H.; Lee, E.; Sheldon, M.; Son, D. H. Exciton-to-Dopant Energy Transfer in Mn-Doped Cesium Lead Halide Perovskite Nanocrystals. *Nano Lett.* **2016**, *16* (12), 7376–7380. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b02772>.
- (58) Ahmed, T.; Seth, S.; Samanta, A. Boosting the Photoluminescence of CsPbX<sub>3</sub> (X = Cl, Br, I) Perovskite Nanocrystals Covering a Wide Wavelength Range by Postsynthetic Treatment with Tetrafluoroborate Salts. *Chem. Mater.* **2018**, *30* (11), 3633–3637. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.8b01235>.
- (59) Liu, H.; Wu, Z.; Shao, J.; Yao, D.; Gao, H.; Liu, Y.; Yu, W.; Zhang, H.; Yang, B. CsPbxMn<sub>1-x</sub>Cl<sub>3</sub> Perovskite Quantum Dots with High Mn Substitution Ratio. *ACS Nano* **2017**, *11* (2), 2239–2247. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b08747>.
- (60) Li, X.; Wu, Y.; Zhang, S.; Cai, B.; Gu, Y.; Song, J.; Zeng, H. CsPbX<sub>3</sub> Quantum Dots for Lighting and Displays: Room-Temperature Synthesis, Photoluminescence Superiorities, Underlying Origins and White Light-Emitting Diodes. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26* (15), 2435–2445. <https://doi.org/10.1002/adfm.201600109>.
- (61) Otero-Martínez, C.; García-Lojo, D.; Pastoriza-Santos, I.; Pérez-Juste, J.; Polavarapu, L. Dimensionality Control of Inorganic and Hybrid Perovskite Nanocrystals by Reaction Temperature: From No-Confinement to 3D and 1D Quantum Confinement. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (51), 26677–26684. <https://doi.org/10.1002/anie.202109308>.
- (62) Ijaz, P.; Imran, M.; Soares, M. M.; Tolentino, H. C. N.; Martín-García, B.; Giannini, C.; Moreels, I.; Manna, L.; Krahne, R. Composition-, Size-, and Surface Functionalization-Dependent Optical Properties of Lead Bromide Perovskite Nanocrystals. *J. Phys. Chem. Lett.* **2020**, *11* (6), 2079–2085. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.0c00266>.
- (63) Luo, B.; Pu, Y.-C.; Lindley, S. A.; Yang, Y.; Lu, L.; Li, Y.; Li, X.; Zhang, J. Z. Organolead Halide Perovskite Nanocrystals: Branched Capping Ligands Control Crystal Size and Stability. *Angew. Chem.* **2016**, *128* (31), 9010–9014. <https://doi.org/10.1002/ange.201602236>.
- (64) Li, Z.; Hu, Q.; Tan, Z.; Yang, Y.; Leng, M.; Liu, X.; Ge, C.; Niu, G.; Tang, J. Aqueous Synthesis of Lead Halide Perovskite Nanocrystals with High Water Stability and Bright Photoluminescence. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (50), 43915–43922. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b16471>.
- (65) Xuan, T.; Yang, X.; Lou, S.; Huang, J.; Liu, Y.; Yu, J.; Li, H.; Wong, K.-L.; Wang, C.; Wang, J. Highly Stable CsPbBr<sub>3</sub> Quantum Dots Coated with Alkyl Phosphate for White Light-Emitting Diodes. *Nanoscale* **2017**, *9* (40), 15286–15290. <https://doi.org/10.1039/C7NR04179A>.

- (66) Tan, Y.; Zou, Y.; Wu, L.; Huang, Q.; Yang, D.; Chen, M.; Ban, M.; Wu, C.; Wu, T.; Bai, S.; Song, T.; Zhang, Q.; Sun, B. Highly Luminescent and Stable Perovskite Nanocrystals with Octylphosphonic Acid as a Ligand for Efficient Light-Emitting Diodes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (4), 3784–3792. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b17166>.
- (67) Yang, D.; Li, X.; Zhou, W.; Zhang, S.; Meng, C.; Wu, Y.; Wang, Y.; Zeng, H. CsPbBr<sub>3</sub> Quantum Dots 2.0: Benzenesulfonic Acid Equivalent Ligand Awakens Complete Purification. *Adv. Mater.* **2019**, *31* (30), 1900767. <https://doi.org/10.1002/adma.201900767>.
- (68) Krieg, F.; Ochsenbein, S. T.; Yakunin, S.; ten Brinck, S.; Aellen, P.; Süess, A.; Clerc, B.; Guggisberg, D.; Nazarenko, O.; Shynkarenko, Y.; Kumar, S.; Shih, C.-J.; Infante, I.; Kovalenko, M. V. Colloidal CsPbX<sub>3</sub> (X = Cl, Br, I) Nanocrystals 2.0: Zwitterionic Capping Ligands for Improved Durability and Stability. *ACS Energy Lett.* **2018**, *3* (3), 641–646. <https://doi.org/10.1021/acsenenergylett.8b00035>.
- (69) Li, Y.; Wang, X.; Xue, W.; Wang, W.; Zhu, W.; Zhao, L. Highly Luminescent and Stable CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Quantum Dots Modified by Phosphine Ligands. *Nano Res.* **2019**, *12* (4), 785–789. <https://doi.org/10.1007/s12274-019-2289-8>.
- (70) Wu, L.; Zhong, Q.; Yang, D.; Chen, M.; Hu, H.; Pan, Q.; Liu, H.; Cao, M.; Xu, Y.; Sun, B.; Zhang, Q. Improving the Stability and Size Tunability of Cesium Lead Halide Perovskite Nanocrystals Using Trioctylphosphine Oxide as the Capping Ligand. *Langmuir* **2017**, *33* (44), 12689–12696. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b02963>.
- (71) Zhang, B.; Goldoni, L.; Zito, J.; Dang, Z.; Almeida, G.; Zaccaria, F.; de Wit, J.; Infante, I.; De Trizio, L.; Manna, L. Alkyl Phosphonic Acids Deliver CsPbBr<sub>3</sub> Nanocrystals with High Photoluminescence Quantum Yield and Truncated Octahedron Shape. *Chem. Mater.* **2019**, *31* (21), 9140–9147. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.9b03529>.
- (72) Liu, Y.; Li, D.; Zhang, L.; Chen, Y.; Geng, C.; Shi, S.; Zhang, Z.; Bi, W.; Xu, S. Amine- and Acid-Free Synthesis of Stable CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Nanocrystals. *Chem. Mater.* **2020**, *32* (5), 1904–1913. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.9b04558>.
- (73) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26* (1), 62–69. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5).
- (74) Zhong, Q.; Cao, M.; Hu, H.; Yang, D.; Chen, M.; Li, P.; Wu, L.; Zhang, Q. One-Pot Synthesis of Highly Stable CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> Core–Shell Nanoparticles. *ACS Nano* **2018**, *12* (8), 8579–8587. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b04209>.

- (75) Kar, M. R.; Kumar, S.; Acharya, T. K.; Goswami, C.; Bhaumik, S. Highly Water-Stable, Luminescent, and Monodisperse Polymer-Coated CsPbBr<sub>3</sub> Nanocrystals for Imaging in Living Cells with Better Sensitivity. *RSC Adv.* **2023**, *13* (9), 5946–5956. <https://doi.org/10.1039/D2RA07019G>.
- (76) Xu, L.; Chen, J.; Song, J.; Li, J.; Xue, J.; Dong, Y.; Cai, B.; Shan, Q.; Han, B.; Zeng, H. Double-Protected All-Inorganic Perovskite Nanocrystals by Crystalline Matrix and Silica for Triple-Modal Anti-Counterfeiting Codes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (31), 26556–26564. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b06436>.
- (77) Wang, W.; Li, J.; Ni, P.; Liu, B.; Chen, Q.; Lu, Y.; Wu, H.; Cao, B.; Liu, Z. Improved Synthesis of Perovskite CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> (X = Cl, Br, and I) Quantum Dots with Enhanced Stability and Excellent Optical Properties. *ES Mater. Manuf.* **2019**, *4*, 66–73. <https://doi.org/10.30919/esmm5f219>.
- (78) Li, S.; Lei, D.; Ren, W.; Guo, X.; Wu, S.; Zhu, Y.; Rogach, A. L.; Chhowalla, M.; Jen, A. K.-Y. Water-Resistant Perovskite Nanodots Enable Robust Two-Photon Lasing in Aqueous Environment. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 1192. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15016-2>.
- (79) Song, W.; Wang, Y.; Wang, B.; Yao, Y.; Wang, W.; Wu, J.; Shen, Q.; Luo, W.; Zou, Z. Super Stable CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> Tumor Imaging Reagent by Stress-Response Encapsulation. *Nano Res.* **2020**, *13* (3), 795–801. <https://doi.org/10.1007/s12274-020-2697-9>.
- (80) Huang, S.; Li, Z.; Kong, L.; Zhu, N.; Shan, A.; Li, L. Enhancing the Stability of CH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub>PbBr<sub>3</sub> Quantum Dots by Embedding in Silica Spheres Derived from Tetramethyl Orthosilicate in “Waterless” Toluene. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (18), 5749–5752. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b13101>.
- (81) Sun, C.; Zhang, Y.; Ruan, C.; Yin, C.; Wang, X.; Wang, Y.; Yu, W. W. Efficient and Stable White LEDs with Silica-Coated Inorganic Perovskite Quantum Dots. *Adv. Mater.* **2016**, *28* (45), 10088–10094. <https://doi.org/10.1002/adma.201603081>.
- (82) Meng, C.; Yang, D.; Wu, Y.; Zhang, X.; Zeng, H.; Li, X. Synthesis of Single CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> Core–Shell Particles via Surface Activation. *J. Mater. Chem. C* **2020**, *8* (48), 17403–17409. <https://doi.org/10.1039/D0TC03932B>.
- (83) Zhao, H.; Wei, L.; Zeng, P.; Liu, M. Formation of Highly Uniform Thinly-Wrapped CsPbX<sub>3</sub>@silicone Nanocrystals via Self-Hydrolysis: Suppressed Anion Exchange and Superior Stability in Polar Solvents. *J. Mater. Chem. C* **2019**, *7* (32), 9813–9819. <https://doi.org/10.1039/C9TC01216H>.
- (84) Akkerman, Q. A.; Park, S.; Radicchi, E.; Nunzi, F.; Mosconi, E.; De Angelis, F.; Brescia, R.; Rastogi, P.; Prato, M.; Manna, L. Nearly Monodisperse Insulator Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub> (X = Cl, Br, I) Nanocrystals, Their Mixed Halide

- Compositions, and Their Transformation into CsPbX<sub>3</sub> Nanocrystals. *Nano Lett.* **2017**, *17* (3), 1924–1930.  
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b05262>.
- (85) Wu, L.; Hu, H.; Xu, Y.; Jiang, S.; Chen, M.; Zhong, Q.; Yang, D.; Liu, Q.; Zhao, Y.; Sun, B.; Zhang, Q.; Yin, Y. From Nonluminescent Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub> (X = Cl, Br, I) Nanocrystals to Highly Luminescent CsPbX<sub>3</sub> Nanocrystals: Water-Triggered Transformation through a CsX-Stripping Mechanism. *Nano Lett.* **2017**, *17* (9), 5799–5804.  
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b02896>.
- (86) Palazon, F.; Urso, C.; De Trizio, L.; Akkerman, Q.; Marras, S.; Locardi, F.; Nelli, I.; Ferretti, M.; Prato, M.; Manna, L. Postsynthesis Transformation of Insulating Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>6</sub> Nanocrystals into Bright Perovskite CsPbBr<sub>3</sub> through Physical and Chemical Extraction of CsBr. *ACS Energy Lett.* **2017**, *2* (10), 2445–2448. <https://doi.org/10.1021/acsenerylett.7b00842>.
- (87) Palazon, F.; Almeida, G.; Akkerman, Q. A.; De Trizio, L.; Dang, Z.; Prato, M.; Manna, L. Changing the Dimensionality of Cesium Lead Bromide Nanocrystals by Reversible Postsynthesis Transformations with Amines. *Chem. Mater.* **2017**, *29* (10), 4167–4171.  
<https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b00895>.
- (88) Udayabhaskararao, T.; Houben, L.; Cohen, H.; Menahem, M.; Pinkas, I.; Avram, L.; Wolf, T.; Teitelboim, A.; Leskes, M.; Yaffe, O.; Oron, D.; Kazes, M. A Mechanistic Study of Phase Transformation in Perovskite Nanocrystals Driven by Ligand Passivation. *Chem. Mater.* **2018**, *30* (1), 84–93. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b02425>.
- (89) Baranov, D.; Caputo, G.; Goldoni, L.; Dang, Z.; Scarfiello, R.; Trizio, L. D.; Portone, A.; Fabbri, F.; Camposeo, A.; Pisignano, D.; Manna, L. Transforming Colloidal Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>6</sub> Nanocrystals with Poly(Maleic Anhydride-Alt-1-Octadecene) into Stable CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Emitters through Intermediate Heterostructures. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (15), 3986–3995. <https://doi.org/10.1039/D0SC00738B>.
- (90) Hu, H.; Wu, L.; Tan, Y.; Zhong, Q.; Chen, M.; Qiu, Y.; Yang, D.; Sun, B.; Zhang, Q.; Yin, Y. Interfacial Synthesis of Highly Stable CsPbX<sub>3</sub>/Oxide Janus Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (1), 406–412.  
<https://doi.org/10.1021/jacs.7b11003>.
- (91) Li, M.; Zhang, X.; Yang, P. Controlling the Growth of a SiO<sub>2</sub> Coating on Hydrophobic CsPbBr<sub>3</sub> Nanocrystals towards Aqueous Transfer and High Luminescence. *Nanoscale* **2021**, *13* (6), 3860–3867.  
<https://doi.org/10.1039/D0NR08325A>.
- (92) Rossi, C.; Scarfiello, R.; Brescia, R.; Goldoni, L.; Caputo, G.; Carbone, L.; Colombara, D.; De Trizio, L.; Manna, L.; Baranov, D. Exploiting the Transformative Features of Metal Halides for the Synthesis of

- CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> Core–Shell Nanocrystals. *Chem. Mater.* **2022**, *34* (1), 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.1c03749>.
- (93) Dirin, D. N.; Protesescu, L.; Trummer, D.; Kochetygov, I. V.; Yakunin, S.; Krumeich, F.; Stadie, N. P.; Kovalenko, M. V. Harnessing Defect-Tolerance at the Nanoscale: Highly Luminescent Lead Halide Perovskite Nanocrystals in Mesoporous Silica Matrixes. *Nano Lett.* **2016**, *16* (9), 5866–5874. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b02688>.
- (94) Malgras, V.; Tominaka, S.; Ryan, J. W.; Henzie, J.; Takeji, T.; Ohara, K.; Yamauchi, Y. Observation of Quantum Confinement in Monodisperse Methylammonium Lead Halide Perovskite Nanocrystals Embedded in Mesoporous Silica. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (42), 13874–13881. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b05608>.
- (95) Wang, P.; Wang, B.; Liu, Y.; Li, L.; Zhao, H.; Chen, Y.; Li, J.; Liu, S. (Frank); Zhao, K. Ultrastable Perovskite–Zeolite Composite Enabled by Encapsulation and In Situ Passivation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (51), 23100–23106. <https://doi.org/10.1002/anie.202011203>.
- (96) Li, Z.; Li, L.; Liu, H.; Li, F.; Zhao, J.; Wang, Y. Strongly Quantum-Confined Mn<sup>2+</sup>-Doped CsPbBr<sub>3</sub> Nanocrystals in MCM-41 with Pure Blue Emission. *New J. Chem.* **2020**, *44* (7), 2980–2985. <https://doi.org/10.1039/C9NJ06053G>.
- (97) Cheng, H.; Yin, Y.; Tang, J.; Fan, D.; Huang, J. J.; Jin, S. Water-Assisted Synthesis of Highly Stable CsPbX<sub>3</sub> Perovskite Quantum Dots Embedded in Zeolite-Y. *RSC Adv.* **2021**, *11* (5), 2866–2871. <https://doi.org/10.1039/D0RA08311A>.
- (98) Wu, W.; Zhao, C.; Hu, M.; Pan, A.; Xiong, W.; Chen, Y. CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Quantum Dots Grown within Fe-Doped Zeolite X with Improved Stability for Sensitive NH<sub>3</sub> Detection. *Nanoscale* **2023**, *15* (12), 5705–5711. <https://doi.org/10.1039/D2NR06923G>.
- (99) Qiu, L.; Yang, H.; Dai, Z.; Sun, F.; Hao, J.; Guan, M.; Dang, P.; Yan, C.; Lin, J.; Li, G. Highly Efficient and Stable CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Quantum Dots by Encapsulation in Dual-Shell Hollow Silica Spheres for WLEDs. *Inorg. Chem. Front.* **2020**, *7* (10), 2060–2071. <https://doi.org/10.1039/D0QI00208A>.
- (100) Hao, J.; Dai, Z.; Guan, M.; Dang, P.; Wang, H.; Yan, C.; Lin, J.; Li, G. Simultaneous Enhancement of Luminescence and Stability of Lead Halide Perovskites by a Diatomite Microcavity for Light-Emitting Diodes. *Chem. Eng. J.* **2021**, *417*, 128056. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.128056>.
- (101) Wang, W.; Guo, R.; Xiong, X.; Liu, H.; Chen, W.; Hu, S.; Amador, E.; Chen, B.; Zhang, X.; Wang, L. Improved Stability and Efficiency of Perovskite via

- a Simple Solid Diffusion Method. *Mater. Today Phys.* **2021**, *18*, 100374. <https://doi.org/10.1016/j.mtphys.2021.100374>.
- (102) Shi, T.; Chen, X.; Deng, Y.; Huang, H.; Wang, J.; He, R.; Liu, Y.; He, X.; Li, J.; Chu, P. K.; Yu, X.-F. Scalable Synthesis of Ultrastable Lead Halide Perovskite-Zeolite Composites via a Chemical Vapor Method in Air. *NPG Asia Mater.* **2022**, *14* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41427-022-00433-0>.
- (103) Zhang, Y.; Han, L.; Li, B.; Xu, Y. Improved Stability of All-Inorganic Perovskite Nanocrystals in Hierarchical ZSM-5 Zeolites for Multimodal Applications. *Chem. Eng. J.* **2022**, *437*, 135290. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135290>.
- (104) Gao, Y.-J.; Romolini, G.; Huang, H.; Jin, H.; Saha, R. A.; Ghosh, B.; Ras, M. D.; Wang, C.; Steele, J. A.; Debroye, E.; Hofkens, J.; Roeffaers, M. B. J. Ultrasensitive Turn-on Luminescence Humidity Sensor Based on a Perovskite/Zeolite Composite. *J. Mater. Chem. C* **2022**, *10* (34), 12191–12196. <https://doi.org/10.1039/D2TC02498E>.
- (105) Zhang, Q.; Wang, B.; Zheng, W.; Kong, L.; Wan, Q.; Zhang, C.; Li, Z.; Cao, X.; Liu, M.; Li, L. Ceramic-like Stable CsPbBr<sub>3</sub> Nanocrystals Encapsulated in Silica Derived from Molecular Sieve Templates. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 31. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13881-0>.
- (106) Zhao, C.; Song, H.; Chen, Y.; Xiong, W.; Hu, M.; Wu, Y.; Zhang, Y.; He, L.; Liu, Y.; Pan, A. Stable and Recyclable Photocatalysts of CsPbBr<sub>3</sub>@MSNs Nanocomposites for Photoinduced Electron Transfer RAFT Polymerization. *ACS Energy Lett.* **2022**, *7* (12), 4389–4397. <https://doi.org/10.1021/acscenergylett.2c02293>.
- (107) An, M. N.; Park, S.; Brescia, R.; Lutfullin, M.; Sinatra, L.; Bakr, O. M.; De Trizio, L.; Manna, L. Low-Temperature Molten Salts Synthesis: CsPbBr<sub>3</sub> Nanocrystals with High Photoluminescence Emission Buried in Mesoporous SiO<sub>2</sub>. *ACS Energy Lett.* **2021**, *6* (3), 900–907. <https://doi.org/10.1021/acscenergylett.1c00052>.
- (108) Liu, Z.; Sinatra, L.; Lutfullin, M.; Ivanov, Y. P.; Divitini, G.; De Trizio, L.; Manna, L. One Hundred-Nanometer-Sized CsPbBr<sub>3</sub>/m-SiO<sub>2</sub> Composites Prepared via Molten-Salts Synthesis Are Optimal Green Phosphors for LCD Display Devices. *Adv. Energy Mater.* **2022**, *12* (38), 2201948. <https://doi.org/10.1002/aenm.202201948>.
- (109) He, M.; Zhang, Q.; Carulli, F.; Erroi, A.; Wei, W.; Kong, L.; Yuan, C.; Wan, Q.; Liu, M.; Liao, X.; Zhan, W.; Han, L.; Guo, X.; Brovelli, S.; Li, L. Ultra-Stable, Solution-Processable CsPbBr<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> Nanospheres for Highly Efficient Color Conversion in Micro Light-Emitting Diodes. *ACS Energy Lett.* **2023**, *8* (1), 151–158. <https://doi.org/10.1021/acscenergylett.2c02062>.

- (110) Carulli, F.; He, M.; Cova, F.; Erroi, A.; Li, L.; Brovelli, S. Silica-Encapsulated Perovskite Nanocrystals for X-Ray-Activated Singlet Oxygen Production and Radiotherapy Application. *ACS Energy Lett.* **2023**, *8* (4), 1795–1802. <https://doi.org/10.1021/acsenenergylett.3c00234>.
- (111) Jeon, M.-G.; Kabir, R. MD.; Kim, S.; Kirakosyan, A.; Kim, C.-Y.; Lee, S. M.; Lee, D.-H.; Kim, Y.; Choi, J. Highly Processable and Stable PMMA-Grafted CsPbBr<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> Nanoparticles for down-Conversion Photoluminescence. *Compos. Part B Eng.* **2022**, *239*, 109956. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2022.109956>.
- (112) Liu, X.; Chen, W.; Yang, J.; Liang, X.; Fang, X.; Xiang, W. Stable CsPbBr<sub>3</sub> Nanocrystals Embedded in SiO<sub>2</sub> for Backlight Display Applications. *ACS Appl. Electron. Mater.* **2023**, *5* (4), 2309–2317. <https://doi.org/10.1021/acsaelm.3c00128>.
- (113) Hou, S.; Guo, Y.; Tang, Y.; Quan, Q. Synthesis and Stabilization of Colloidal Perovskite Nanocrystals by Multidentate Polymer Micelles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (22), 18417–18422. <https://doi.org/10.1021/acsaami.7b03445>.
- (114) Hintermayr, V. A.; Lampe, C.; Löw, M.; Roemer, J.; Vanderlinden, W.; Gramlich, M.; Böhm, A. X.; Sattler, C.; Nickel, B.; Lohmüller, T.; Urban, A. S. Polymer Nanoreactors Shield Perovskite Nanocrystals from Degradation. *Nano Lett.* **2019**, *19* (8), 4928–4933. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b00982>.
- (115) Pan, A.; Yan, L.; Ma, X.; Wu, Y.; Zhang, Y.; Zhou, G.; He, L. Strongly Luminescent and Highly Stable Core-Shell Suprastructures from in-Situ Growth of CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Nanocrystals in Multidentate Copolymer Micelles. *J. Alloys Compd.* **2020**, *844*, 156102. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2020.156102>.
- (116) Zhang, J.; Jiang, P.; Wang, Y.; Liu, X.; Ma, J.; Tu, G. In Situ Synthesis of Ultrastable CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Nanocrystals Coated with Polyimide in a CSTR System. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12* (2), 3080–3085. <https://doi.org/10.1021/acsaami.9b20880>.
- (117) Imran, M.; Mai, B. T.; Goldoni, L.; Cirignano, M.; Jalali, H. B.; Di Stasio, F.; Pellegrino, T.; Manna, L. Switchable Anion Exchange in Polymer-Encapsulated APbX<sub>3</sub> Nanocrystals Delivers Stable All-Perovskite White Emitters. *ACS Energy Lett.* **2021**, *6* (8), 2844–2853. <https://doi.org/10.1021/acsenenergylett.1c01232>.
- (118) He, Y.; Yoon, Y. J.; Harn, Y. W.; Biesold-McGee, G. V.; Liang, S.; Lin, C. H.; Tsukruk, V. V.; Thadhani, N.; Kang, Z.; Lin, Z. Unconventional Route to Dual-Shelled Organolead Halide Perovskite Nanocrystals with Controlled Dimensions, Surface Chemistry, and Stabilities. *Sci. Adv.* **2019**, *5* (11), eaax4424. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax4424>.

- (119) Lu, Z.; Li, Y.; Xue, Y.; Zhou, W.; Bayer, S.; Williams, I. D.; Rogach, A. L.; Nagl, S. Water-Stable CsPbBr<sub>3</sub>/Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>6</sub> Nanocrystals with a Mixed Fluoropolymer Shell for Optical Temperature Sensing. *ACS Appl. Nano Mater.* **2022**, *5* (4), 5025–5034.  
<https://doi.org/10.1021/acsnm.2c00050>.
- (120) Avugadda, S. K.; Castelli, A.; Dhanabalan, B.; Fernandez, T.; Silvestri, N.; Collantes, C.; Baranov, D.; Imran, M.; Manna, L.; Pellegrino, T.; Arciniegas, M. P. Highly Emitting Perovskite Nanocrystals with 2-Year Stability in Water through an Automated Polymer Encapsulation for Bioimaging. *ACS Nano* **2022**, *16* (9), 13657–13666.  
<https://doi.org/10.1021/acsnano.2c01556>.
- (121) Wong, Y.-C.; De Andrew Ng, J.; Tan, Z.-K. Perovskite-Initiated Photopolymerization for Singly Dispersed Luminescent Nanocomposites. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (21), 1800774.  
<https://doi.org/10.1002/adma.201800774>.
- (122) Jin, X.; Ma, K.; Chakkamalayath, J.; Morsby, J.; Gao, H. In Situ Photocatalyzed Polymerization to Stabilize Perovskite Nanocrystals in Protic Solvents. *ACS Energy Lett.* **2022**, *7* (2), 610–616.  
<https://doi.org/10.1021/acsenerylett.1c02660>.
- (123) Jin, X.; Ma, K.; Gao, H. Tunable Luminescence and Enhanced Polar Solvent Resistance of Perovskite Nanocrystals Achieved by Surface-Initiated Photopolymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144* (44), 20411–20420. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c08622>.
- (124) Beyazit, S.; Ambrosini, S.; Marchyk, N.; Palo, E.; Kale, V.; Soukka, T.; Tse Sum Bui, B.; Haupt, K. Versatile Synthetic Strategy for Coating Upconverting Nanoparticles with Polymer Shells through Localized Photopolymerization by Using the Particles as Internal Light Sources. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (34), 8919–8923.  
<https://doi.org/10.1002/anie.201403576>.
- (125) Zhang, Z.; Liu, L.; Huang, H.; Li, L.; Wang, Y.; Xu, J.; Xu, J. Encapsulation of CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Quantum Dots into PPy Conducting Polymer: Exceptional Water Stability and Enhanced Charge Transport Property. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, *526*, 146735.  
<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.146735>.
- (126) Peng, X.; Hu, L.; Sun, X.; Lu, Y.; Chu, D.; Xiao, P. Fabrication of High-Performance CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Quantum Dots/Polymer Composites via Photopolymerization: Implications for Luminescent Displays and Lighting. *ACS Appl. Nano Mater.* **2023**, *6* (1), 646–655.  
<https://doi.org/10.1021/acsnm.2c04773>.

- (127) Boda, S. K.; Li, X.; Xie, J. Electro spraying an Enabling Technology for Pharmaceutical and Biomedical Applications: A Review. *J. Aerosol Sci.* **2018**, *125*, 164–181. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2018.04.002>.
- (128) Sverdlov Arzi, R.; Sosnik, A. Electrohydrodynamic Atomization and Spray-Drying for the Production of Pure Drug Nanocrystals and Co-Crystals. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *131*, 79–100. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.012>.
- (129) Eslamian, M.; Ahmed, M.; Ashgriz, N. Modelling of Nanoparticle Formation during Spray Pyrolysis. *Nanotechnology* **2006**, *17* (6), 1674. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/6/023>.
- (130) Nguyen, D. N.; Clasen, C.; Mooter, G. V. den. Pharmaceutical Applications of Electro spraying. *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105* (9), 2601–2620. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.024>.
- (131) Jacobsen, C.; García-Moreno, P. J.; Mendes, A. C.; Mateiu, R. V.; Chronakis, I. S. Use of Electrohydrodynamic Processing for Encapsulation of Sensitive Bioactive Compounds and Applications in Food. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2018**, *9* (1), 525–549. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012348>.
- (132) Qi, S.; Craig, D. Recent Developments in Micro- and Nanofabrication Techniques for the Preparation of Amorphous Pharmaceutical Dosage Forms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *100*, 67–84. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.003>.
- (133) Jayaraman, P.; Gandhimathi, C.; Venugopal, J. R.; Becker, D. L.; Ramakrishna, S.; Srinivasan, D. K. Controlled Release of Drugs in Electro sprayed Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *94*, 77–95. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.007>.
- (134) Nikolaou, M.; Krasia-Christoforou, T. Electrohydrodynamic Methods for the Development of Pulmonary Drug Delivery Systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2018**, *113*, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.08.032>.
- (135) Wang, Y.; Zhu, Y.; Huang, J.; Cai, J.; Zhu, J.; Yang, X.; Shen, J.; Jiang, H.; Li, C. CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Quantum Dots-Based Monolithic Electro spun Fiber Membrane as an Ultrastable and Ultrasensitive Fluorescent Sensor in Aqueous Medium. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7* (21), 4253–4258. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.6b02045>.
- (136) Yang, X.; Xu, T.; Zhu, Y.; Cai, J.; Gu, K.; Zhu, J.; Wang, Y.; Shen, J.; Li, C. Preparation of CsPbBr<sub>3</sub>@PS Composite Microspheres with High Stability by Electro spraying. *J. Mater. Chem. C* **2018**, *6* (30), 7971–7975. <https://doi.org/10.1039/C8TC01408F>.
- (137) Liao, H.; Guo, S.; Cao, S.; Wang, L.; Gao, F.; Yang, Z.; Zheng, J.; Yang, W. A General Strategy for In Situ Growth of All-Inorganic CsPbX<sub>3</sub> (X = Br, I, and

- Cl) Perovskite Nanocrystals in Polymer Fibers toward Significantly Enhanced Water/Thermal Stabilities. *Adv. Opt. Mater.* **2018**, *6* (15), 1800346. <https://doi.org/10.1002/adom.201800346>.
- (138) Zhou, J.; Lin, H.; Yu, Y.; Zuo, S.; Li, B.; Liu, J. Bright Luminous and Stable CsPbBr<sub>3</sub>@PS Microspheres Prepared via Facile Anti-Solvent Method Using CTAB as Double Modifier. *Chem. – Eur. J.* **2020**, *26* (46), 10528–10533. <https://doi.org/10.1002/chem.202000835>.
- (139) Tian, T.; Yang, M.; Fang, Y.; Zhang, S.; Chen, Y.; Wang, L.; Wu, W.-Q. Large-Area Waterproof and Durable Perovskite Luminescent Textiles. *Nat. Commun.* **2023**, *14* (1), 234. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-35830-8>.
- (140) Wang, F.; Wang, H.; Ali, A.; Zhang, Y.; Cui, X.; Liu, Y. In-Situ One-Step Electro Spray Fabrication of Polyvinylidene Fluoride Encapsulated CsPbBr<sub>3</sub> Spheres with High Stability and Cell Imaging Application. *Inorg. Chem. Commun.* **2019**, *106*, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2019.05.032>.
- (141) Wang, A.-L.; Teng, J.-X.; Yang, C.-G.; Xu, Z.-R. Rapid and Facile Electro spray Preparation of CsPbBr<sub>3</sub>@PMMA Fluorescent Microspheres for Fluorescent Detection of ALP in Biological Samples. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2022**, *634*, 127909. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127909>.
- (142) Wang, Y.; Zhu, Y.; Huang, J.; Cai, J.; Zhu, J.; Yang, X.; Shen, J.; Li, C. Perovskite Quantum Dots Encapsulated in Electrospun Fiber Membranes as Multifunctional Supersensitive Sensors for Biomolecules, Metal Ions and pH. *Nanoscale Horiz.* **2017**, *2* (4), 225–232. <https://doi.org/10.1039/C7NH00057J>.
- (143) Lin, C. C.; Jiang, D.-H.; Kuo, C.-C.; Cho, C.-J.; Tsai, Y.-H.; Satoh, T.; Su, C. Water-Resistant Efficient Stretchable Perovskite-Embedded Fiber Membranes for Light-Emitting Diodes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (3), 2210–2215. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b15989>.
- (144) Tsai, P.-C.; Chen, J.-Y.; Ercan, E.; Chueh, C.-C.; Tung, S.-H.; Chen, W.-C. Uniform Luminous Perovskite Nanofibers with Color-Tunability and Improved Stability Prepared by One-Step Core/Shell Electrospinning. *Small* **2018**, *14* (22), 1704379. <https://doi.org/10.1002/sml.201704379>.
- (145) Singh, A.; Van den Mooter, G. Spray Drying Formulation of Amorphous Solid Dispersions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *100*, 27–50. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.010>.
- (146) Peltonen, L.; Valo, H.; Kolakovic, R.; Laaksonen, T.; Hirvonen, J. Electro spraying, Spray Drying and Related Techniques for Production and

- Formulation of Drug Nanoparticles. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, *7* (6), 705–719. <https://doi.org/10.1517/17425241003716802>.
- (147) Boussoufi, F.; Pousthomis, M.; Kuntzmann, A.; D'Amico, M.; Patriarche, G.; Dubertret, B. Spray-Drying Polymer Encapsulation of CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Nanocrystals with Enhanced Photostability for LED Downconverters. *ACS Appl. Nano Mater.* **2021**, *4* (7), 7502–7512. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c01552>.
- (148) Zhong, C.-Y.; Xiao, L.; Zhou, J.; Chen, Z.; Chen, Y.; Liu, Z.-Q.; Zhang, J. Z. Two-Photon Photoluminescence and Bio-Imaging Application of Monodispersed Perovskite-in-Silica Nanocrystals with High Biocompatibility. *Chem. Eng. J.* **2022**, *431*, 134110. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.134110>.
- (149) Luo, F.; Li, S.; Cui, L.; Zu, Y.; Chen, Y.; Huang, D.; Weng, Z.; Lin, Z. Biocompatible Perovskite Quantum Dots with Superior Water Resistance Enable Long-Term Monitoring of the H<sub>2</sub>S Level in Vivo. *Nanoscale* **2021**, *13* (34), 14297–14303. <https://doi.org/10.1039/D1NR02248B>.
- (150) Jiang, X.; Zeng, H.; Duan, C.; Hu, Q.; Wu, Q.; Yu, Y.; Yang, X. One-Pot Synthesis of Stable and Functional Hydrophilic CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Quantum Dots for “Turn-on” Fluorescence Detection of Mycobacterium Tuberculosis. *Dalton Trans.* **2022**, *51* (9), 3581–3589. <https://doi.org/10.1039/D1DT03624F>.
- (151) Dong, Y.; Tang, X.; Zhang, Z.; Song, J.; Niu, T.; Shan, D.; Zeng, H. Perovskite Nanocrystal Fluorescence-Linked Immunosorbent Assay Methodology for Sensitive Point-of-Care Biological Test. *Matter* **2020**, *3* (1), 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.matt.2020.05.004>.
- (152) Li, M.; Wang, Y.; Hu, H.; Feng, Y.; Zhu, S.; Li, C.; Feng, N. A Dual-Readout Sandwich Immunoassay Based on Biocatalytic Perovskite Nanocrystals for Detection of Prostate Specific Antigen. *Biosens. Bioelectron.* **2022**, *203*, 113979. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.113979>.
- (153) Cheng, L.; Chi, J.; Su, M.; Song, Y. Interface Engineering of Perovskite Nanocrystals: Challenges and Opportunities for Biological Imaging and Detection. *J. Mater. Chem. C* **2023**, *11* (24), 7970–7981. <https://doi.org/10.1039/D2TC04967H>.

# Capítulo 2

## Objetivos



Los nanocristales de perovskita tienen potencial para convertirse en marcadores fluorescentes en aplicaciones biológicas por sus excelentes propiedades ópticas, fotoestabilidad y simplicidad de su síntesis.

Entre sus características destaca su amplio espectro de absorción, emisión estrecha y sintonizable en función de su tamaño y composición, alto rendimiento cuántico de fluorescencia y emisión *upconversion* desencadenada por absorción multifotónica a partir de una fuente de luz infrarroja.

En base a estas propiedades, consideramos que estos materiales pueden llegar a competir con otros marcadores habitualmente utilizados en *kits* comerciales basados en nanopartículas de oro, enzimas, colorantes orgánicos o *quantum dots*, por su sensibilidad, capacidad de multiplexado y bajo coste, siempre y cuando se resuelva su compatibilidad en medio acuoso, donde tienen lugar las aplicaciones biológicas.

Por tanto, el objetivo principal en el que se basa esta tesis es la estabilización de nanocristales de perovskita de haluros metálicos para que mantengan sus propiedades ópticas en medio acuoso y puedan ser utilizados como marcadores luminiscentes en sistemas analíticos, biosensado o bioimagen.

Para alcanzar este fin, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Obtención de nanocristales de perovskita de haluros metálicos mediante metodologías de síntesis coloidal que proporcionen, de forma reproducible, una población de partículas monodispersas de tamaño nanométrico, que exhiban un espectro de emisión estrecho y presenten un alto rendimiento cuántico de fluorescencia.
- Encapsulación de los nanocristales de perovskita en materiales que permitan su transferencia al medio acuoso mediante las siguientes estrategias:
  - a) Adaptación del proceso sol-gel para generar partículas *core-shell* con un recubrimiento de sílice
  - b) Coprecipitación de los nanocristales de perovskita en micelas poliméricas basadas en un copolímero de poliestireno y ácido poliacrílico
  - c) Atomización mediante *electrospraying* para producir partículas poliméricas de poli(estireno-co-anhídrido maleico) que contengan a los nanocristales de perovskita en su interior

- Caracterización óptica y morfológica de las partículas resultantes y estudio de su estabilidad química y estructural en medio acuoso.
- Demostración del potencial de los nanocristales de perovskita estabilizados en bioaplicaciones mediante su incubación en cultivos celulares o mediante su conjugación a biorreceptores para la detección de analitos de interés en inmunoensayos *in vitro*.

# Capítulo 3

Estabilización de NCs de perovskita  
con recubrimiento de sílice mediante  
la adaptación del proceso sol-gel



### 3.1. Introducción

---

Los nanocristales (NCs) de perovskita de haluros de plomo (LHP) son extremadamente sensibles en presencia de disolventes polares, medios ácidos o alcalinos y de otros factores externos, como largos tiempos de exposición a la luz o elevadas temperaturas.<sup>1,2</sup> Estos factores desencadenan rápidamente la descomposición del nanocristal, lo que conlleva a la pérdida de su estructura y excelentes propiedades ópticas intrínsecas.

En este contexto, la sílice ( $\text{SiO}_2$ ) es un material transparente, robusto, químicamente inerte y de fácil funcionalización. Se trata de uno de los más utilizados para obtener nanomateriales biocompatibles, ya que permite estabilizar a las nanopartículas inorgánicas en estructuras de tipo *core-shell* o mesoporosas.<sup>3</sup>

La encapsulación de los NCs de LHP en  $\text{SiO}_2$  puede llevarse a cabo a través de dos estrategias principales: el método sol-gel, que genera un recubrimiento de  $\text{SiO}_2$  sobre la superficie de los NCs, o la cristalización *in situ* en los poros de nanopartículas (NPs) de sílice mesoporosa (meso- $\text{SiO}_2$ ).<sup>4</sup>

El método sol-gel permite sintetizar NPs de tipo *core-shell* donde un solo nanocristal queda envuelto por una capa de sílice. El control de las variables durante la etapa de crecimiento permite modular el grosor de la envoltura y por tanto respetar el tamaño nanométrico de la nanopartícula pudiendo oscilar entre 20-30 nm.<sup>1,5,6</sup>

Por otro lado, la cristalización *in situ* en los poros de nanopartículas (NPs) de sílice mesoporosa (meso- $\text{SiO}_2$ ) es una estrategia que ha demostrado ser igualmente válida para la estabilización de los NCs de LHP. Según los trabajos de la bibliografía, las NPs de meso- $\text{SiO}_2$  que se han utilizado para estabilizar NCs de LHP tienen un tamaño superior a 100 nm, donde múltiples NCs crecen en su interior.<sup>7-9</sup>

El objetivo principal que motiva esta investigación es estabilizar NCs de LHP para su utilización como marcadores fluorescentes en diferentes sistemas analíticos, biosensado, o bioimagen, ya que poseen propiedades ópticas muy interesantes: amplia absorción, emisión estrecha, gran gama de color capaz de cubrir el espectro visible en función de su composición y alto rendimiento cuántico de fluorescencia (PLQY ~ 90%).<sup>10</sup>

Teniendo en cuenta que uno de los principales requisitos que demandan estas aplicaciones es que el tamaño de partícula sea pequeño para que no afecte a la función de la biomolécula o impida su internalización celular, las estrategias de estabilización que generan grandes aglomerados son inviables.

En este sentido, el crecimiento de una envoltura de sílice mediante el método sol-gel se considera una estrategia adecuada para alcanzar este fin, con potencial de proporcionar NPs versátiles y universales que puedan utilizarse como biomarcadores luminiscentes en diferentes sistemas analíticos, biosensado o bioimagen.

En general, se pueden distinguir entre tres aproximaciones en función del material de partida: (A) NCs de  $\text{CsPbX}_3$ , (B) NCs de  $\text{Cs}_4\text{PbX}_6$  y (C) sales precursoras. Este capítulo se centra en las dos primeras aproximaciones, ya que son las más extendidas para obtener NPs *core-shell*.

En todas ellas, la metodología implica el crecimiento de una envoltura de sílice mediante un proceso sol-gel (método Stöber) que conlleva la hidrólisis de un alcoxisilano y condensación en una red de sílice. La rápida degradación de los NCs de LHP en las condiciones de reacción (presencia de agua, alcohol o aminas), ha llevado a desarrollar variantes del proceso en condiciones de reacción menos agresivas.<sup>11</sup>

En definitiva, el objetivo de las estrategias de estabilización consiste en alcanzar un equilibrio entre la tasa de degradación de los NCs y la formación de la envoltura de sílice.<sup>12</sup>

Las estrategias que se engloban dentro de la primera aproximación (A), en las que se utilizan NCs presintetizados de perovskita como material de partida, básicamente buscan suavizar las condiciones de reacción del método Stöber para ajustar la velocidad del proceso hidrolítico y minimizar el tiempo de exposición de los NCs con el agua o evitar que entren en contacto directo.

Por ejemplo, Huang *et al* desarrollaron una metodología sencilla, donde los NCs de  $\text{MAPbBr}_3$  dispersos en tolueno se tratan con tetrametilortosilicato (TMOS).<sup>13</sup> La hidrólisis a partir de las trazas de agua que contiene el tolueno cuando la reacción se lleva a cabo bajo una humedad controlada del 60%. En función del tiempo de incubación, señalan que es posible modular el tamaño de partícula de sílice desde unos pocos nanómetros hasta alcanzar tamaños de 150-500 nm.

De forma similar, Wang *et al* generaron un recubrimiento de sílice en NCs de  $\text{CsPbX}_3$  a partir de TMOS y un volumen mínimo de agua.<sup>14</sup> Al tratarse de un alcoxisilano con una rápida tasa hidrolítica, en un corto período de tiempo es capaz de consumir gran parte del agua, disminuyendo el riesgo de degradación de los NCs. Una de las desventajas de utilizar TMOS es que no tiene ningún grupo funcional con el que pueda unirse a la superficie del NC, por lo que la sílice se deposita aleatoriamente sobre la superficie del nanocrystal.<sup>5</sup> Como consecuencia, los NCs se aglomeran debido a la desorción de los ligandos de la superficie, y la sílice se entrecruza, dando lugar a partículas de sílice relativamente grandes (1,2  $\mu\text{m}$ ), por lo que su aplicación se ve limitada.

Li *et al* utilizaron (3-mercaptopropil)trimetoxisilano (MPTMS).<sup>15</sup> Este silano puede unirse como ligando a la superficie de los NCs, mediante la formación del enlace de coordinación S-Pb,<sup>16</sup> y a la vez, actúa como fuente precursora de sílice. En su metodología, los NCs de  $\text{CsPbBr}_3$  se silanizan inicialmente mediante su incubación con MPTMS. Posteriormente, en presencia de mayor cantidad de MPTMS y un volumen mínimo de agua, se inicia lentamente el proceso de hidrólisis y condensación. En comparación con los trabajos anteriores, las NPs resultantes alcanzan un tamaño inferior (170 nm). Además, exhiben un PLQY alto (78%) y mantienen el 60% de la fluorescencia inicial durante 20 días en agua.

El 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) es otro ejemplo de silano capaz de unirse a la superficie del NC a través de su grupo amino y, al mismo tiempo, proporcionar grupos silanoles libres tras hidrolizarse. Es altamente reactivo y participa en reacciones de homo-condensación que pueden generar problemas de agregación,<sup>17</sup> por lo que algunos trabajos proponen que la reacción de hidrólisis transcurra a partir de la humedad ambiental. Sin embargo, un tiempo de incubación excesivo puede generar agregación entre partículas,<sup>18</sup> mientras que tiempos cortos proporcionan una fina capa de sílice insuficiente para preservar los NCs íntegros en condiciones de humedad.<sup>19</sup> En este sentido, cabe destacar el trabajo de Song *et al* por ser uno de los pocos ejemplos que, utilizando APTES y un volumen mínimo de agua, ha conseguido NPs *core-shell* de  $\text{CsPbBr}_3@SiO_2$  de tamaño nanométrico ( $\sim 20$  nm) compatibles con aplicaciones de diagnóstico por imagen, aunque no indican qué valor de PLQY alcanzan.<sup>20</sup>

Por otro lado, Meng *et al* combinaron la funcionalización con APTES, con la hidrólisis/condensación de los alcoxisilanos TMOS y tetraetilortosilicato (TEOS), en una segunda y tercera etapa, respectivamente, obteniendo partículas *core-shell* de 18 nm estables en un ambiente con una humedad del 70%.<sup>5</sup> En este caso tampoco proporcionan el valor de PLQY de los NCs estabilizados.

Otra estrategia prometedora para estabilizar los NCs de perovskita (B) aprovecha la transformación estructural de los NCs de  $\text{Cs}_4\text{PbX}_6$  para llevar a cabo el proceso sol-gel en presencia de agua sin afectar significativamente a las propiedades ópticas de los NCs.

Los NCs de  $\text{Cs}_4\text{PbX}_6$  se caracterizan por tener una estructura de dimensión 0 (0D), donde los octaedros de  $\text{PbX}_6^{-4}$  están completamente separados los unos de los otros.<sup>21</sup> Estos NCs carecen de propiedades luminiscentes. Sin embargo, en presencia de un exceso de  $\text{PbBr}_2$ ,<sup>21</sup> agua,<sup>22</sup> azul de prusia,<sup>23</sup> ácido oleico,<sup>24</sup> anhídrido succínico,<sup>25</sup> o al someterse a un proceso térmico (150-350 °C),<sup>26</sup> son capaces de reorganizar su estructura y transformarse en NCs de  $\text{CsPbX}_3$  luminiscentes.

En presencia de una interfase hexano-agua, el CsX se desprende, dada su alta solubilidad y naturaleza iónica del NC, desencadenando la transformación estructural:  $\text{Cs}_4\text{PbX}_6$  (hexano)  $\rightarrow$   $\text{CsPbX}_3$  (hexano) + 3 CsX (agua)

Los NCs de  $\text{CsPbX}_3$  recién transformados son monodispersos, tienen emisión estrecha (13-34 nm) y alto PLQY (75%). Además, son más estables frente a la humedad que aquellos obtenidos por los métodos convencionales,<sup>22</sup> lo que ofrece una oportunidad idónea para utilizarlos como material precursor durante el proceso sol-gel para la obtención de nanopartículas *core-shell*  $\text{CsPbBr}_3@ \text{SiO}_2$ .

Hasta ahora, la bibliografía cuenta con pocos trabajos. Hu *et al* fueron pioneros en combinar la transformación desencadenada por agua con el crecimiento de una envoltura de sílice a partir de TMOS. Como resultado, obtuvieron heteroestructuras de 24 nm y un PLQY del 80%,<sup>27</sup> donde la  $\text{SiO}_2$  se deposita asimétricamente sobre la superficie de los NCs de  $\text{CsPbX}_3$  (X = Cl/Br, Br, Br/I and I).

Posteriormente, Li *et al* continuaron con la metodología, incorporando un paso previo de silanización, que permitió sintetizar NPs de tipo *core-shell*  $\text{CsPbBr}_3@ \text{SiO}_2$  con un tamaño de 60 nm y un PLQY de 65%.<sup>28</sup>

Park *et al* utilizaron TEOS como fuente precursora de la sílice en presencia de una disolución acuosa de ácido nítrico 65% (v/v), sin embargo, con esta metodología se genera un compuesto donde la sílice se aglomera y múltiples NCs quedan embebidos en su interior.<sup>29</sup>

Paralelamente, Rossi *et al* optaron por una vía alternativa de transformación de NCs de  $\text{Cs}_4\text{PbX}_6$  a  $\text{CsPbX}_3$ . mediada por PMAO, utilizando solo

el fragmento reactivo del polímero: el anhídrido maleico (MANH).<sup>1</sup> El resultado fueron NPs CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> con un tamaño de 17 nm y un PLQY de 1-4%.

El primer trabajo que se presenta en el Capítulo 1 “**MÉTODO A. Nanopartículas *core-shell* monodispersas de CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> como marcadores fluorescentes en inmunosensado**” persigue desarrollar una nueva metodología de síntesis de nanopartículas *core-shell* a partir de los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> como material precursor. En ella, el alcoxisilano (TEOS) y el catalizador (NH<sub>4</sub>OH) se incorporan lentamente al medio de reacción, lo que permite retrasar la degradación de los NCs a la vez que se deposita a su alrededor una capa de sílice.

El segundo trabajo del Capítulo 1 “**MÉTODO B. Síntesis de nanopartículas multicolores *core-shell* de CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> estables en agua para su utilización como marcadores fluorescentes en inmunosensado**”, utiliza NCs de Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>6</sub> como material de partida ya que, atendiendo a los trabajos descritos en la bibliografía, se considera una estrategia prometedora para la obtención de NPs de perovskita con propiedades adecuadas para su uso como marcadores fluorescentes en biosensado y sistemas analíticos.

## 3.2. Resultados

### ► MÉTODO A. Nanopartículas *core-shell* monodispersas de CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> como marcadores fluorescentes en inmunosensado

Los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> se sintetizaron según la metodología de *hot-injection* descrita por Protesescu *et al.*<sup>10</sup> Como resultado se obtuvo una disolución coloidal de NCs dispersos en tolueno a una concentración de ~ 52,5 nM. La caracterización estructural y óptica de los NCs se resume en la **Figura 38**. Tienen morfología cúbica, tamaño medio de 11 nm, emisión a 515 nm y *fwhm* de 35 nm.

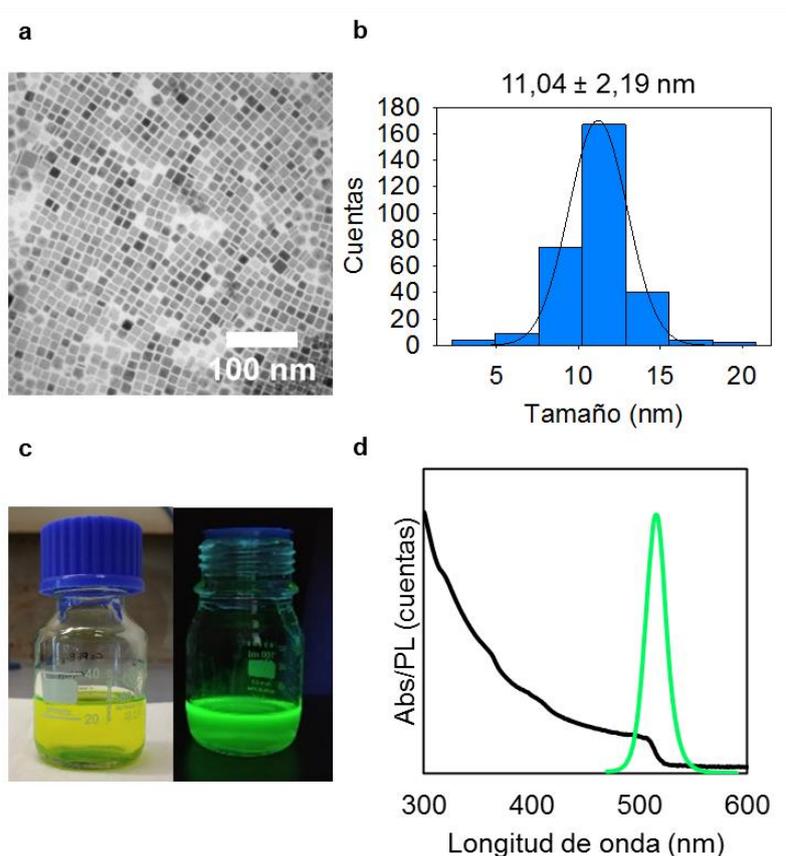


Figura 38. Caracterización de los NCs coloidales de CsPbBr<sub>3</sub> producidos por la metodología de *hot-injection*. (a y b) imagen de TEM e histograma con la distribución del tamaño de partícula de los NCs. (c) Imágenes tomadas bajo luz visible y ultravioleta (λ<sub>ex</sub> 254 nm). (d) Espectros de absorción (línea negra) y emisión bajo una λ<sub>ex</sub> 480 nm (línea verde)

La concentración del alcoxisilano juega un papel importante en el crecimiento de la sílice, por tanto, fue el primer parámetro a evaluar. Para ello, inicialmente, se prepararon cinco muestras (A-E) en viales de vidrio, a los que se añadieron 0,5 mL de NCs de CsPbBr<sub>3</sub> y un volumen variable de TEOS (60, 310, 480, 960 y 1440  $\mu$ L, respectivamente). Como catalizador básico de la reacción se añadió amoníaco al 25% en pequeña cantidad (2  $\mu$ L), ya que grandes volúmenes desencadenan rápidamente la degradación de los NCs. Las muestras se incubaron durante toda la noche en condiciones de agitación magnética (300 rpm) y tras su purificación, se analizaron por TEM. Los resultados se muestran en la **Figura 39**.

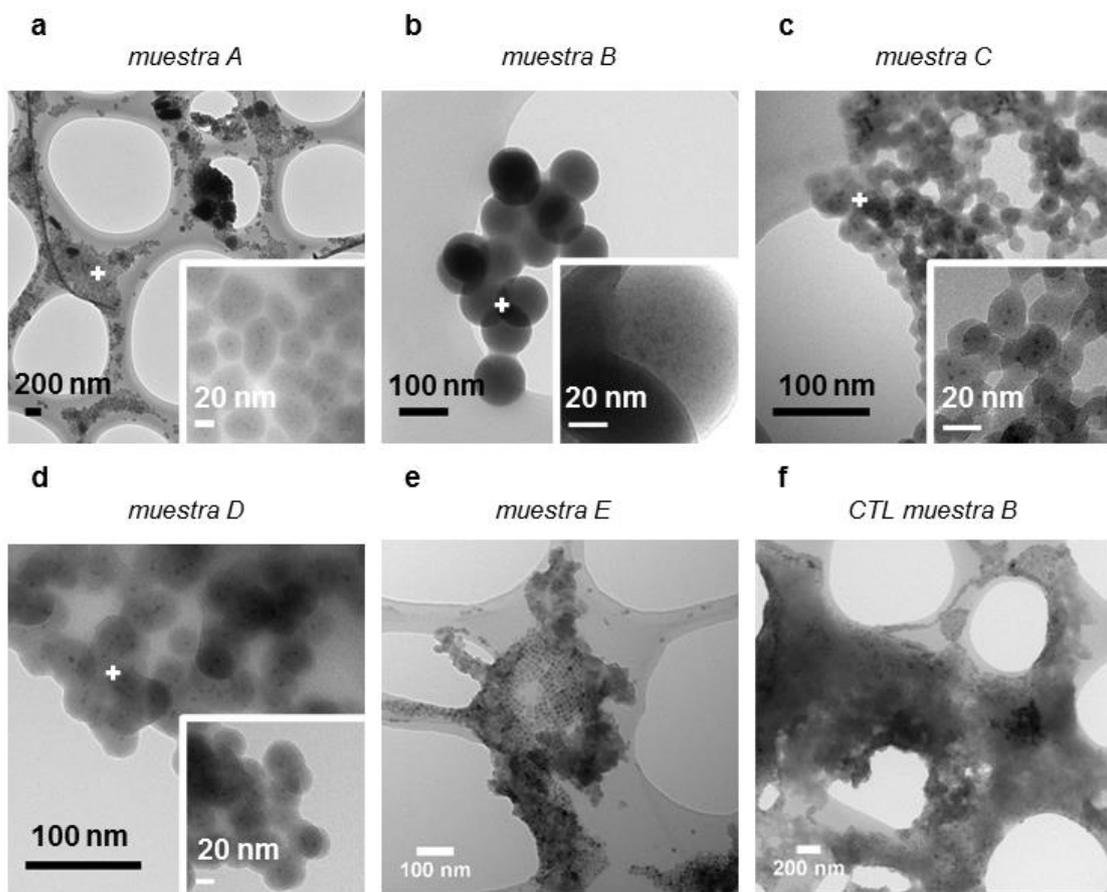


Figura 39. Caracterización por TEM de las muestras tratadas con 2  $\mu$ L de NH<sub>4</sub>OH 25% como catalizador y concentraciones crecientes de TEOS (60, 310, 480, 960 y 1440  $\mu$ L). Se incluye el control de la muestra B (sin catalizador)

Todas las muestras contienen NCs de 2-3 nm, embebidos en NPs de sílice de diferentes tamaños y morfologías. La muestra A presenta NCs encapsulados en nanopartículas de SiO<sub>2</sub> con forma de elipse y diámetros de  $35,5 \pm 8,4$  nm y  $20,7 \pm 3,4$  nm, respectivamente. Además, exhibe una población minoritaria de NCs de gran tamaño ( $162 \pm 38$  nm) y nanocables ( $56 \pm 14$  nm de grosor). Esto puede atribuirse a la descomposición y reorganización de los NCs de perovskita en estructuras de mayor tamaño.<sup>30-32</sup>

La muestra B evoluciona hacia la formación de NPs de SiO<sub>2</sub> esféricas de  $101,4 \pm 6,5$  nm. Sin embargo, las muestras C y D, dan lugar a NPs de SiO<sub>2</sub> encadenadas, con tamaños de  $19,7 \pm 2,4$  y  $33,8 \pm 4$  nm, respectivamente.

La muestra E produce la agregación de NCs en un compuesto de gran tamaño, como resultado de la polimerización aleatoria de los monómeros de alcoxisilano cuando éste se encuentra en exceso. El control de la muestra B (sin catalizador) produce un resultado similar, lo que indica el papel importante que juega el NH<sub>4</sub>OH en el mecanismo de nucleación.

Otro parámetro importante en el crecimiento de la envoltura de sílice es el contenido de agua, ya que marca la velocidad de hidrólisis del alcoxisilano. Para evaluar su influencia, se prepararon 3 muestras (F-H) donde 0,5 mL de CsPbBr<sub>3</sub> se trataron con 310 µL de TEOS y 2 µL de NH<sub>4</sub>OH 25% diluidos en los siguientes volúmenes de agua: 0, 28 y 90 µL. Como los NCs de perovskita se descomponen rápidamente, la adición se llevó a cabo de forma lenta para retrasar el proceso de degradación (TEOS a 0,74 µL/min y NH<sub>4</sub>OH a 0,07 µL/min). Los resultados se muestran en la **Figura 40**.

En ausencia de agua (muestra F), las nanopartículas aparecen encadenadas unas a las otras, mientras que cuando aumenta el contenido en agua, se obtienen nanopartículas *core-shell* monodispersas con un tamaño de unos 30 nm (muestra G). Por otro lado, el exceso de agua desencadena la descomposición de los NCs en los precursores iónicos, resultando en NPs de sílice vacías (muestra H). Las diferencias encontradas en la caracterización de las muestras B y F por TEM, se atribuyen al procedimiento de adición fraccionada, ya que las condiciones utilizadas son las mismas (2 µL NH<sub>4</sub>OH 25% + 310 µL TEOS).

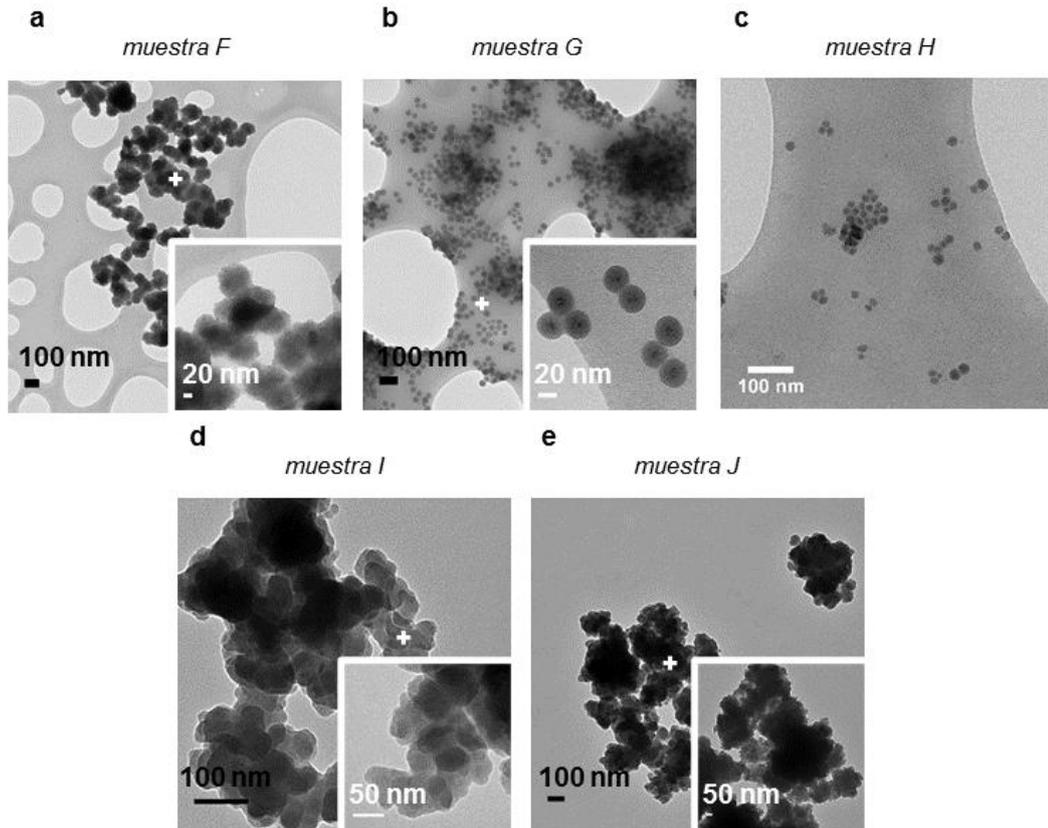


Figura 40. Caracterización por TEM de las muestras sometidas al proceso de adición fraccionada. Muestras F-H tratadas con volúmenes crecientes de agua (0, 28 y 90  $\mu\text{L}$ ) y muestras I-J tratadas con 28  $\mu\text{L}$  y concentraciones crecientes de TEOS (480 y 960  $\mu\text{L}$ , respectivamente)

Una vez ajustada la cantidad de agua, se procedió a determinar si era posible controlar el grosor de la capa de sílice con concentraciones crecientes de TEOS. De modo que en las muestras I y J se repitieron las condiciones de la muestra G, para volúmenes de TEOS de 480 y 960  $\mu\text{L}$ , respectivamente. Sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios, en ambos casos dieron lugar a la aglomeración de la sílice.

Detrás del proceso químico implicado en la nucleación de la sílice se dan las reacciones de hidrólisis y condensación del TEOS. Cuando la cantidad de agua no es suficiente, hay una mayor proporción de monómeros de TEOS sin hidrolizar, lo que lleva a un proceso de policondensación aleatorio, resultando en nanopartículas de sílice que se encadenan unas a otras (muestras B-E). Mientras que, cuando aumenta el contenido de agua, la proporción de monómeros de TEOS hidrolizados aumenta. Debido al alto valor de pH (10,5), los monómeros se desprotonan y se unen a la superficie de los NCs a través de la interacción con los átomos de Pb, lo que da lugar a un crecimiento uniforme y localizado de la envoltura de sílice (muestra G).

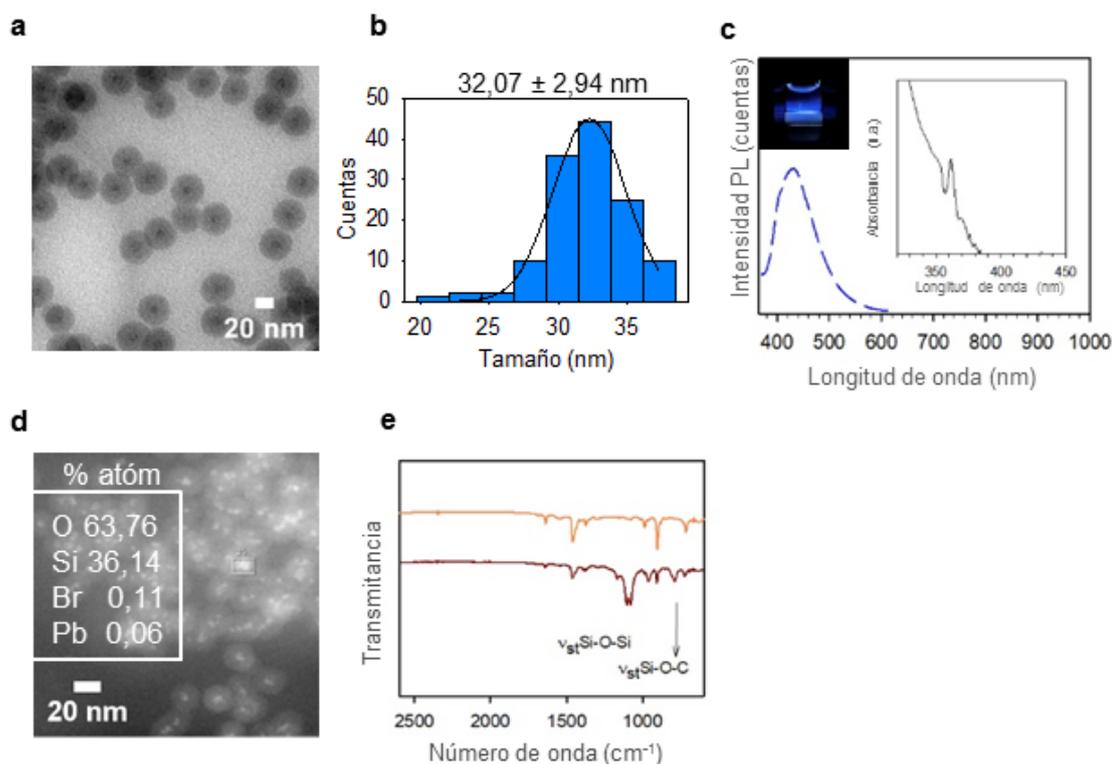


Figura 41. Caracterización de las NPs *core-shell* de la muestra G. (a-b) TEM e histograma de la distribución del tamaño de partícula. (c) Espectro de emisión (línea azul) obtenido a  $\lambda_{ex}$  355 nm y espectro de absorción UV-vis (línea negra). (d) Análisis elemental por EDX-TEM. (e) Espectro ATR-FTIR de los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> (línea naranja) y las NPs *core-shell* (línea marrón)

Las propiedades estructurales y ópticas de las nanopartículas *core-shell* de la muestra G se resumen en la **Figura 41a-c**. Se observa que exhiben fluorescencia azul ( $\lambda_{em}$  432 nm) y un PLQY de  $\sim$  5%. El diámetro de partícula es  $32,07 \pm 2,94$  nm y por cada NP se localizan 2-3 nanocristales de unos 2 nm de diámetro.

El análisis elemental EDX-TEM (**Figura 41d**) proporciona la distribución atómica de los elementos, guardando una relación Si:O cercana al valor teórico (1:2). La red de sílice también se confirma al comparar el espectro ATR-FTIR de los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> con el de las NPs *core-shell* (**Figura 41e**). El pico a  $1.050\text{ cm}^{-1}$  se corresponde con la banda de tensión asimétrica del enlace Si-O-Si y el pico a  $790\text{ cm}^{-1}$  se corresponde con el la banda de tensión simétrica de Si-O-C de los grupos de TEOS que no han reaccionado.

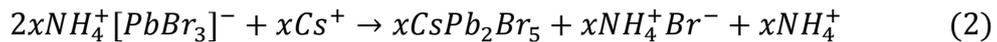
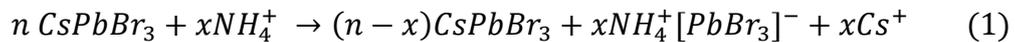
La densa envoltura de sílice y el pequeño tamaño de los nanocristales dificultan la detección de los elementos Cs, Pb y Br por EDX-TEM. Tampoco fue posible determinar la estructura cristalina utilizando HR-TEM o difracción de

rayos X (XDR), por lo que para determinar la estequiometría de los NCs se llevó a cabo un análisis por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) para la cuantificación de estos elementos, que resultaron ser de 0,557 mmol/g Br, 0,0227 mmol/g Cs y 0,0405 mmol/g Pb, respectivamente. Los resultados muestran una relación Pb:Cs cercana a 2 (0,04 mmol/g y 0,023 mmol/g) lo que podría sugerir que la composición de los NCs es CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>. En cuanto a la relación Br:Pb, la gran proporción de Br con respecto a Pb, puede atribuirse a la dificultad técnica para determinar las especies de bromo por ICP-MS, ya que la señal interfiere con el dímero de Ar del gas plasmógeno y por tanto lleva a una sobreestimación de la cantidad de Br.<sup>33</sup>

Los NCs CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> se caracterizan por tener una estructura tetragonal 2D, donde las capas de Pb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub><sup>-</sup> están separadas por cationes Cs<sup>+</sup>.<sup>34</sup> Las propiedades ópticas intrínsecas de estos NCs han sido objeto de debate durante los últimos años. Algunos autores descartan emisión de fluorescencia en cristales de tamaño milimétrico,<sup>35</sup> o nanohojas,<sup>36</sup> mientras que otros trabajos con nanoplaquetas,<sup>37</sup> y microplacas,<sup>38</sup> atribuyen una fuerte emisión en el verde. Incluso también se ha registrado emisión azul en microplacas, con un PLQY del 11%.<sup>39</sup> Por otro lado, Li *et al* sugieren que la fluorescencia verde de las nanoplaquetas se debe a la coexistencia de NCs de CsPbBr<sub>3</sub> y, en su lugar, atribuyen a las nanoplaquetas dos picos de emisión a 385 y 460 nm.<sup>40</sup>

En base a los resultados obtenidos por ICP-MS puede asumirse que probablemente se trata de esta estructura, lo que permite proponer el siguiente mecanismo de formación.

El proceso de transformación está controlado por la intercalación de los cationes NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en la estructura, el desplazamiento de los cationes Cs<sup>+</sup> y de las especies de oleilamina y la variación del número de coordinación de Pb<sup>+2</sup> en presencia de agua.<sup>41</sup> La **Figura 42** y las ecuaciones 1 y 2, ilustran el posible mecanismo de la evolución de la estructura del nanocristal.



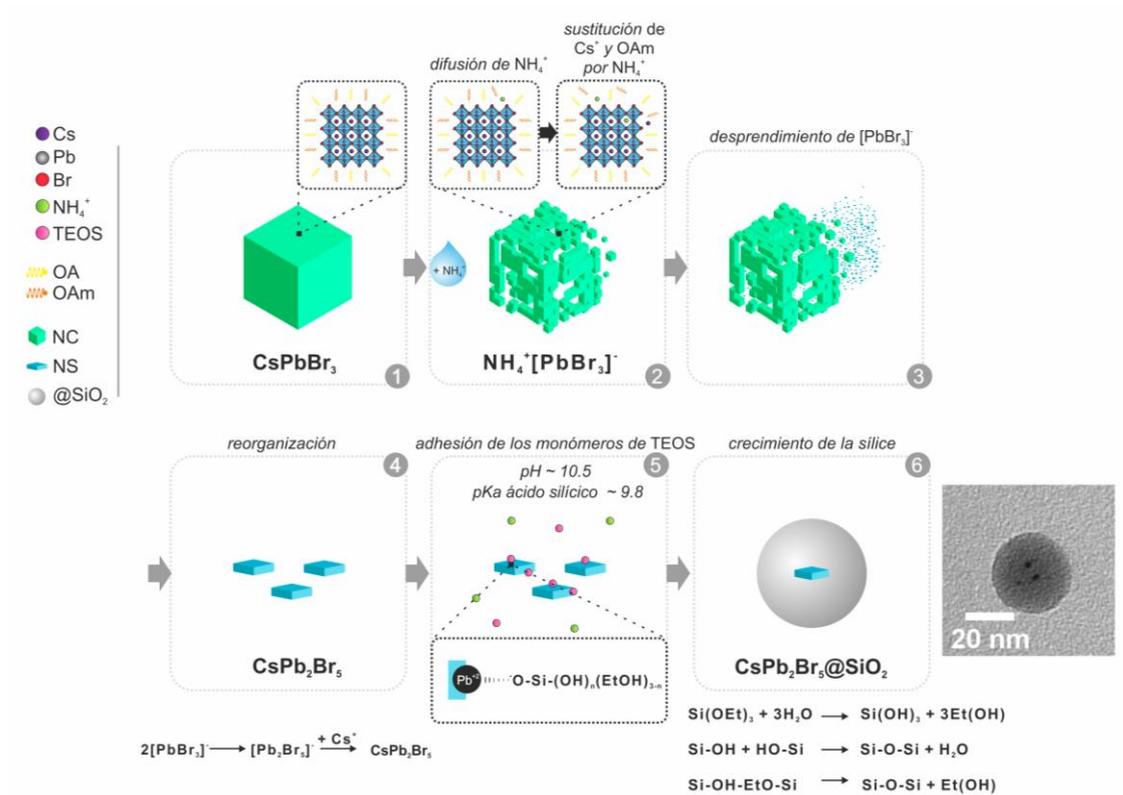


Figura 42. Esquema del mecanismo de formación de las NPs *core-shell* (CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>@SiO<sub>2</sub>). El mecanismo implica la difusión e intercalación de los cationes de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en la estructura nativa de CsPbBr<sub>3</sub> (pasos 1-2), exfoliación de [PbBr<sub>3</sub>]<sup>-</sup> en pequeños *nanoclusters* a través de la interfase tolueno-agua (paso 3), reorganización en NCs CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> (paso 4) y crecimiento de la envoltura de sílice (pasos 5 y 6)

En un primer paso, los cationes NH<sub>4</sub><sup>+</sup> difunden y pasan a ocupar las posiciones de los cationes Cs<sup>+</sup> de la estructura perovskita, dando lugar a NH<sub>4</sub>PbBr<sub>3</sub>, lo que desencadena cambios en la estructura cristalina. Paralelamente los cationes NH<sub>4</sub><sup>+</sup> desplazan a las especies de oleilamina de la superficie del NC y, en presencia de moléculas de agua, se desencadena un proceso de exfoliación de xNH<sub>4</sub><sup>+</sup>[PbBr<sub>3</sub>]<sup>-</sup> dando lugar a *nanoclusters* más pequeños que probablemente se reorganizan en la estructura CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>. Después, los monómeros de TEOS desprotonados se unen a la superficie del NC por coordinación con el Pb<sup>+2</sup> y condensan en una red uniforme de sílice alrededor de los NCs de CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>.<sup>42</sup>

En un experimento adicional se incrementó el tiempo de reacción de 24 a 48 h (**Figura 43**). Como resultado se formaron *core-shell* aglomeradas, en cuyo interior pudieron detectarse, mediante HR-TEM, algunos NCs más grandes ( $\sim 7,5$  nm) con una distancia entre planos de  $\sim 0,3$  nm, que coincide con el plano cristalino (220) asociado a la estructura  $\text{CsPb}_2\text{Br}_5$ ,<sup>39,43</sup> lo que nos permitió confirmar la formación de esta estructura. El mayor tamaño de los NCs obtenidos en este último experimento puede ser debido a una etapa de maduración, en la cual se produce la difusión de los clústeres de  $\text{NH}_4^+[\text{PbBr}_3]^-$  en el interior de la envolvente de sílice, y su integración en los NCs de  $\text{CsPb}_2\text{Br}_5$ , generando núcleos de mayor tamaño.

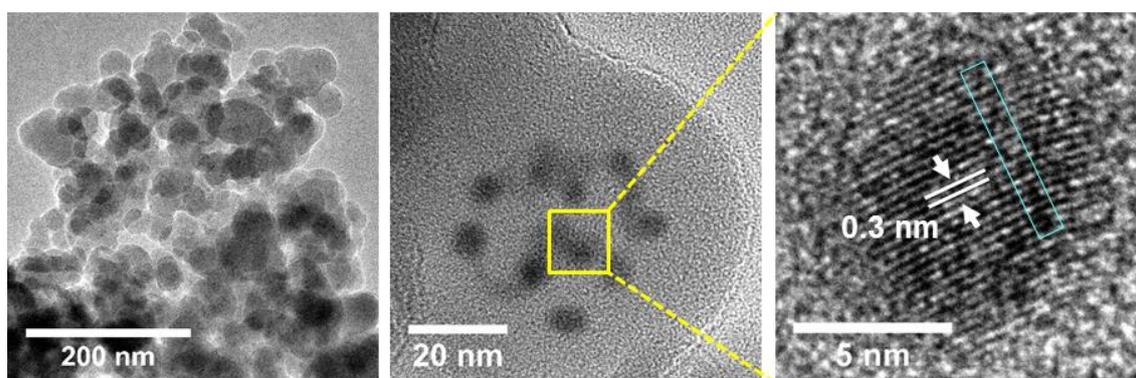


Figura 43. HR-TEM de NPs *core-shell* preparadas con 310  $\mu\text{L}$  TEOS, 2  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_4\text{OH}$  y 28  $\mu\text{L}$  agua y un tiempo de reacción de 48 h.

Para analizar la estabilidad de las NPs *core-shell* se dispersaron 5 mg en 5 mL de agua destilada y se sonicaron durante 2 min. Las NPs se mantuvieron coloidalmente estables tras dispersarse y posteriormente, se midió la PL durante los primeros 20 minutos y al cabo de 3 días (**Figura 44**). Con estos resultados se puede concluir que esta metodología de síntesis da lugar a NPs *core-shell* que se mantienen estables en agua, llegando a retener el 90% de su PL inicial.

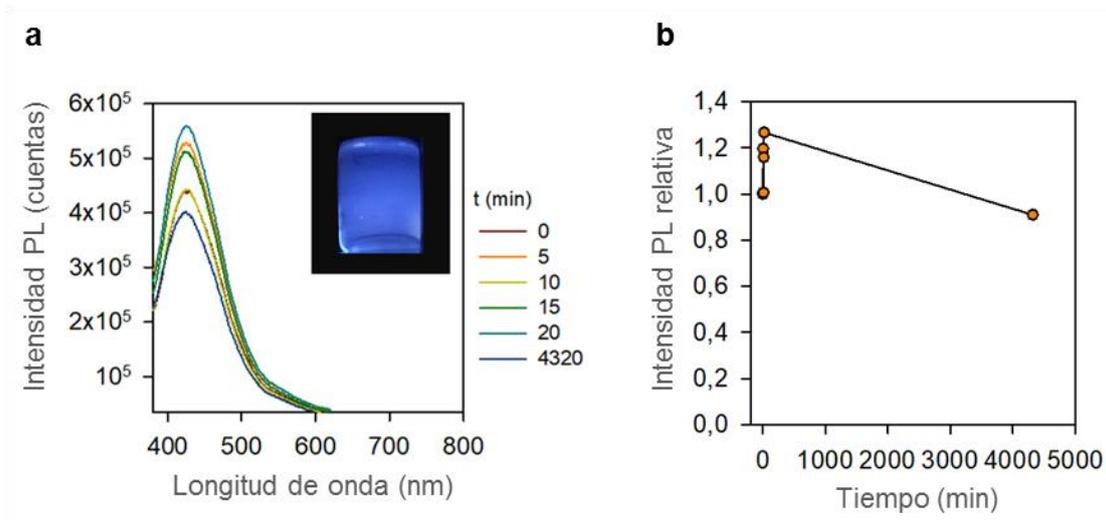


Figura 44. (a) Evolución de la intensidad de PL de las NPs *core-shell* en agua. La imagen de la esquina demuestra que las NPs se mantienen coloidalmente estables durante la medida. (b) Variación de la PL relativa con el tiempo

La funcionalización de las NPs de sílice puede llevarse a cabo de forma sencilla mediante la utilización de organosilanos que contengan los grupos funcionales deseados. Estos son capaces de anclarse a la superficie mediante la formación del enlace covalente siloxano (Si-O-Si), producto de la reacción de hetero-condensación con los grupos silanoles (Si-OH) terminales de la superficie de las NPs de sílice.<sup>44</sup>

Con el fin de funcionalizar las NPs *core-shell* previamente sintetizadas, se trataron con (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES), un silano caracterizado por su alta reactividad promovida por la acción catalítica de su grupo amino (-NH<sub>2</sub>) terminal. Por otro lado, las NPs se funcionalizaron con viniltrietoxissilano (VTES), un silano con grupo vinilo (-CH=CH<sub>2</sub>). Los resultados de espectroscopía ATR-FTIR confirman la correcta funcionalización de las NPs *core-shell* (**Figura 45**).

Las NPs *core-shell* funcionalizadas con (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES) presentan la banda de tensión característica de Si-O-Si (1.050 cm<sup>-1</sup>) y Si-O-C (780 cm<sup>-1</sup>), así como las bandas de tensión simétrica y asimétrica de CH<sub>2</sub> (2.923 cm<sup>-1</sup> y 2.854 cm<sup>-1</sup>, respectivamente). La funcionalización de las NPs con APTES también queda respaldada por la presencia de bandas específicas de los enlaces N-H (1.579 cm<sup>-1</sup>), C-N (1.590 cm<sup>-1</sup>) y C-N (1.315 cm<sup>-1</sup>).<sup>45,46</sup> La ausencia de la banda de tensión de NH<sub>2</sub> (3.300-3.400 cm<sup>-1</sup>) puede atribuirse a la formación de puentes de hidrógeno que resulta en un ensanchamiento del pico, como ya se observa en el espectro de referencia del APTES. Por otro lado, las NPs *core-shell* funcionalizadas con viniltrietoxissilano (VTES) exhiben los rasgos característicos del grupo vinilo: (ν<sub>st</sub> (C=C): 1.629 cm<sup>-1</sup>; δ (CH<sub>2</sub>=CH): 1.503 cm<sup>-1</sup>; δ (=CH<sub>2</sub>): 1.382 cm<sup>-1</sup>).<sup>47</sup>

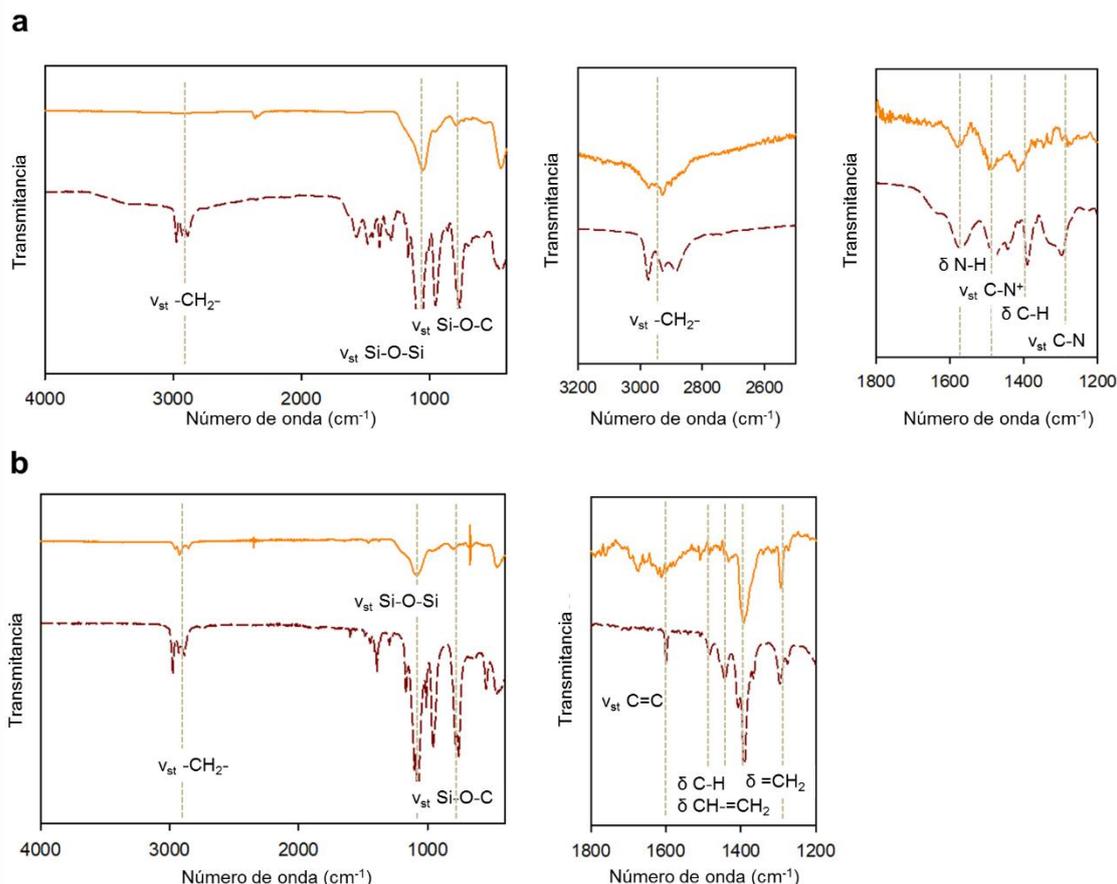


Figura 45. Espectro ATR-FTIR de los alcoxisilanos de referencia (línea marrón) y de las NPs *core-shell* funcionalizadas (línea naranja) con (a) APTES y (b) VTES

Por último, como prueba de concepto de su aplicabilidad, se demostró el potencial de las NPs *core-shell* como marcadores fluorescentes en un inmunoensayo directo.

En primer lugar, se prepararon los conjugados de NP con anticuerpos anti-BSA inmovilizados por adsorción pasiva. Para ello, se incubaron durante toda la noche una determinada concentración de NPs con anti-BSA en concentraciones crecientes de (0, 10, 20, 50 y 100 µg/mL). Después, la disolución del conjugado se añadió a las cubetas de policarbonato previamente tapizadas con proteína BSA. Tras un período de incubación de 2 h, se lavaron, se añadió 1 mL de agua destilada y se registró la fluorescencia.

La **Figura 46** muestra la señal de PL y la relación señal-ruido para cubetas incubadas con los conjugados NP/anti-BSA. Los resultados confirman que se produce el reconocimiento específico del anticuerpo anti-BSA con su diana (BSA), logrando en el mejor de los resultados una relación señal-ruido de 25

frente a una señal prácticamente nula del blanco, que contiene las NPs sin conjugar. La disminución de la señal para NPs conjugadas con concentraciones de anticuerpo anti-BSA superiores a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  posiblemente se deba al impedimento estérico causado por un exceso de anticuerpos inmovilizados en la superficie de la nanopartícula. Esto dificulta la accesibilidad de la proteína, dificultando el biorreconocimiento.<sup>48,49</sup>

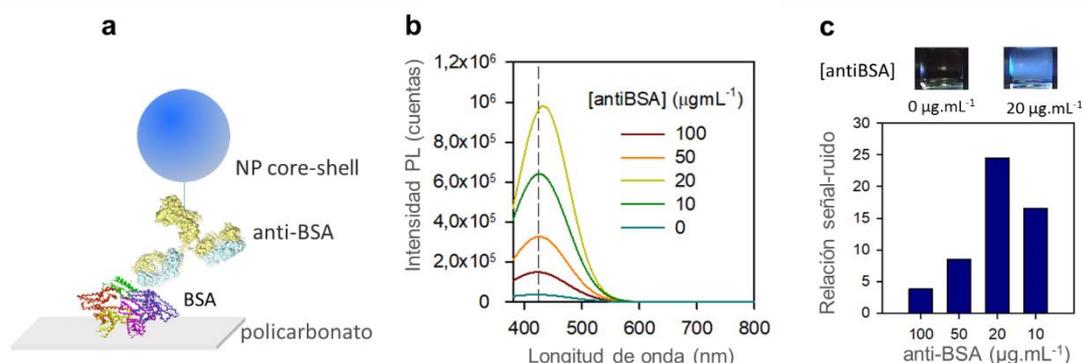


Figura 46. (a) Esquema del inmunoensayo directo. (b-c) Intensidad de PL y relación señal-ruido de los conjugados preparados con diferentes relaciones NP *core-shell*/anticuerpo. La imagen superior muestra imágenes de las muestras tratadas con 0 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anti-BSA

Actualmente, existen múltiples trabajos en la bibliografía que adaptan el proceso sol-gel sobre los NCs de  $\text{CsPbBr}_3$  presintetizados. Sin embargo, este trabajo se diferencia de los anteriores en varios aspectos interesantes.

En primer lugar, cabe resaltar el pequeño tamaño de partícula obtenido (32 nm), ya que otras aproximaciones generan partículas de mayor diámetro (170 nm – 1,2  $\mu\text{m}$ ) como consecuencia de la agregación de la sílice (**Figura 47a-c1**).<sup>13-15</sup> En este caso, al apostar por un procedimiento donde la fuente precursora de sílice y el catalizador se añaden de forma fraccionada, se favorece que la deposición de la sílice ocurra de forma más lenta y controlada, dando lugar a partículas de 32 nm donde solo se encapsulan un par de núcleos de perovskita (**Figura 47d1**).

Es cierto que Huang *et al* tienen control del tamaño de partícula, pudiendo alcanzar dimensiones similares o incluso inferiores en función del tiempo de reacción, por ejemplo 10 nm (1h) y 45 nm (4 h) (**Figura 47a1**).<sup>13</sup> Sin embargo, los resultados de estabilidad demuestran que el recubrimiento no produce una mejora sustancial de la estabilidad óptica de los NCs de  $\text{MAPbBr}_3$ . En este caso,

la prueba se realiza en condiciones de humedad relativa del 80% (en lugar de llevarse a cabo en un medio acuoso) y, aun así, la muestra MAPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> tan solo mejora en un 20% con respecto a su control (MAPbBr<sub>3</sub>) durante las 3 primeras horas (Figura 47a2). En ambos casos, la fluorescencia decae por completo a las 11 h, por lo que el recubrimiento que genera esta metodología es poco eficiente de cara a obtener NPs estables en medios acuosos.

Por otro lado, la medida de estabilidad de las micropartículas CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> producidas por Wang *et al.*,<sup>14</sup> (Figura 47b2) sugiere cierta mejora en comparación con los resultados de Huang *et al.*, ya que se mantienen fluorescentes 12 h en una mezcla 4:1 de tolueno y agua. Sin embargo, el tamaño micrométrico (1,2 μm) de estas partículas (Figura 47b1) se aleja de las dimensiones que se consideran adecuadas en bioaplicaciones.

Li *et al* reducen el tamaño a 150 nm (Figura 47c1), sin embargo, las imágenes de su dispersión en agua indican que, aunque se mantienen ópticamente estables, tienden a sedimentar, posiblemente debido a la agregación de las partículas (Figura 47c2).<sup>15</sup> En este sentido, otro de los aspectos a destacar de este trabajo es que las NPs se dispersan de forma homogénea y mantienen una buena estabilidad coloidal en agua (Figura 47d2).

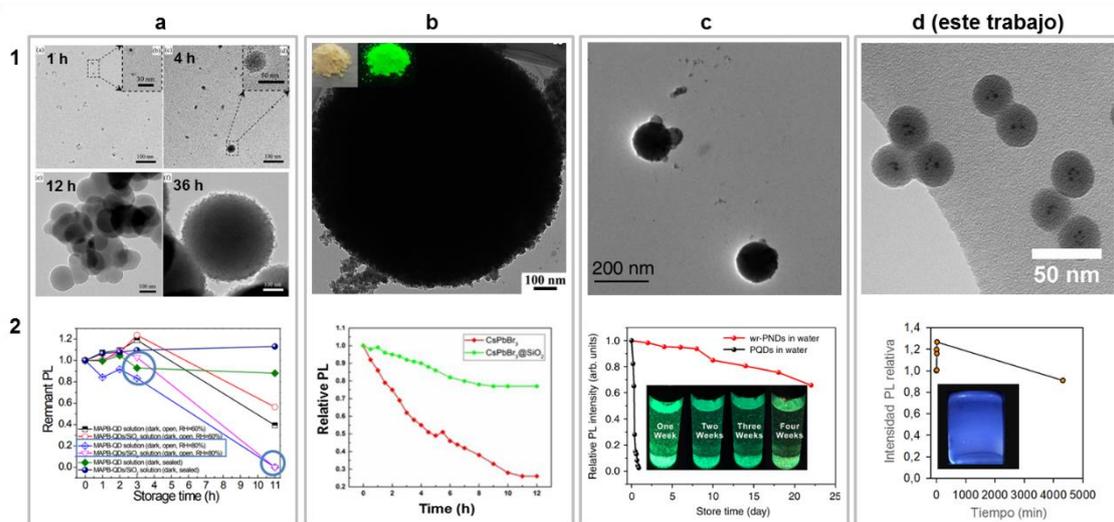


Figura 47. Comparativa con los resultados de la bibliografía que llevan a cabo adaptaciones del proceso sol-gel para la estabilización de los NCs de perovskita en SiO<sub>2</sub>. (1) Imágenes de TEM de las partículas. (2) Medida de estabilidad. Imágenes reproducidas de (a) Huang *et al.* J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 18, 5749–5752. (b) Wang *et al.* ES Materials & Manufacturing, 2019, 4, 66-73, (c) Li *et al* Nat Commun. 2020, 11, 1192, (d) Este trabajo

También hay trabajos que logran un tamaño de partícula pequeño. Por ejemplo, Meng *et al* obtienen una población de NPs de 18 nm, donde el grosor de sílice es de tan solo 2,6 nm (**Figura 48a1**).<sup>5</sup> Mientras que las NPs obtenidas en este trabajo se caracterizan por ser de 32 nm donde un par de núcleos se encuentran envueltos por una capa de sílice de 12,5 nm (**Figura 48c1**). Sin embargo, la medida de estabilidad de las NPs de Meng *et al* no se realiza en un medio completamente acuoso, sino en condiciones de humedad del 70% y solo durante 6 h (**Figura 48a2**). Tampoco llegan a probar su utilidad en alguna aplicación, por lo que se queda sin definir el potencial de estas NPs.

Por otro lado, destaca el trabajo de Song *et al*, donde obtienen NPs similares mediante la sustitución de oleilamina por APTES durante la síntesis de *hot-injection* de NCs de CsPbBr<sub>3</sub>.<sup>20</sup> En comparación con otras metodologías, ésta es la más rápida, ya que la reacción de hidrólisis y condensación transcurre en tan solo 30 min, dando lugar a NPs con un grosor de sílice de 4,2 nm (**Figura 48b1**). Sin embargo, la homogeneidad de la población no queda demostrada, ya que la imagen de TEM tan solo muestra una partícula y tampoco se presenta el análisis de la distribución de tamaños. En este caso, la medida de estabilidad de las NPs se realiza en una mezcla de tolueno:agua y experimentan una disminución de la fluorescencia del 50% en las primeras 12 h (**Figura 48b2**), frente a una variación de apenas un 10% en 3 días en un medio completamente acuoso de las NPs producidas en este trabajo (**Figura 48c2**). Aun así, ambas han demostrado ser viables en medio de cultivo y en tampón salino, respectivamente (**Figura 48b3 y 48c3**).

Según la bibliografía, los NCs de perovskita estabilizados se han utilizado de forma recurrente en bioimagen.<sup>20,50,51</sup> Sin embargo, hasta ahora, muy pocos trabajos aportan la estabilidad en tampón salino o demuestran su conjugación a anticuerpos para su futura implantación como marcadores luminiscentes en sistemas analíticos o técnicas de bioimagen basadas en inmunotinción. Por tanto, este trabajo supone un primer avance en lo que se refiere a NCs estabilizados en sílice, al demostrar su funcionalización y conjugación a anticuerpos anti-BSA en tampón fosfato salino pH 7 PBS 10 mM (PBS 1X).

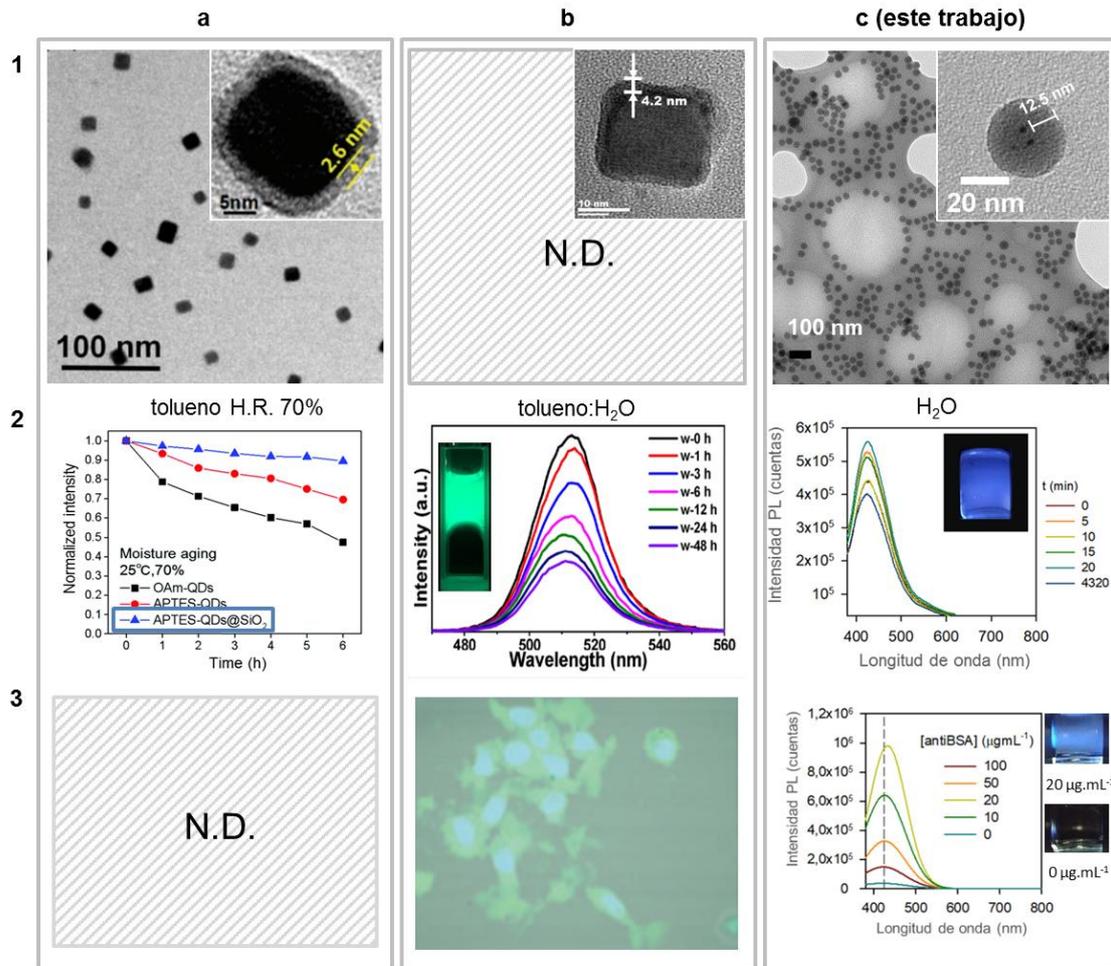


Figura 48. Comparativa con los resultados de la bibliografía que llevan a cabo adaptaciones del proceso sol-gel para la estabilización de los NCs de perovskita en SiO<sub>2</sub>. (1) Imágenes de TEM de las partículas. (2) Medida de estabilidad. (3) Compatibilidad con bioaplicaciones. Imágenes reproducidas de (a) Meng *et al.* J. Mater. Chem. C, 2020,8, 17403-17409, (b) Song *et al.* Nano Res. 2020, 13, 795–801, (c) Este trabajo

► **MÉTODO B. “Síntesis de nanopartículas multicolores core-shell de  $\text{CsPbX}_3@SiO_2$  estables en agua para su utilización como marcadores fluorescentes en inmunosensado”**

Para esta aproximación, se sintetizaron NCs de  $\text{Cs}_4\text{PbX}_6$  ( $X = \text{Cl}/\text{Br}$ ,  $\text{Br}$  y  $\text{I}$ ) en un ambiente enriquecido en cesio mediante el método *hot-injection* descrito por Akkerman *et al.*,<sup>21</sup> con algunas modificaciones. Como resultado, se obtuvo una disolución transparente de NCs de  $\text{Cs}_4\text{PbX}_6$  dispersos en hexano. El espectro de absorción UV-Vis (**Figura 49a**) coincide con el descrito en la bibliografía para cada composición, con picos característicos a 305, 314 y 367 nm para las composiciones de  $\text{Cl}/\text{Br}$ ,  $\text{Br}$  y  $\text{I}$ , respectivamente. La **Figura 49b** incluye la caracterización morfológica obtenida por TEM, junto con la distribución del tamaño de los NCs, que resultó ser de  $18,97 \pm 2,84$  nm,  $14,83 \pm 1,62$  nm y  $17,59 \pm 2,99$  nm, respectivamente.

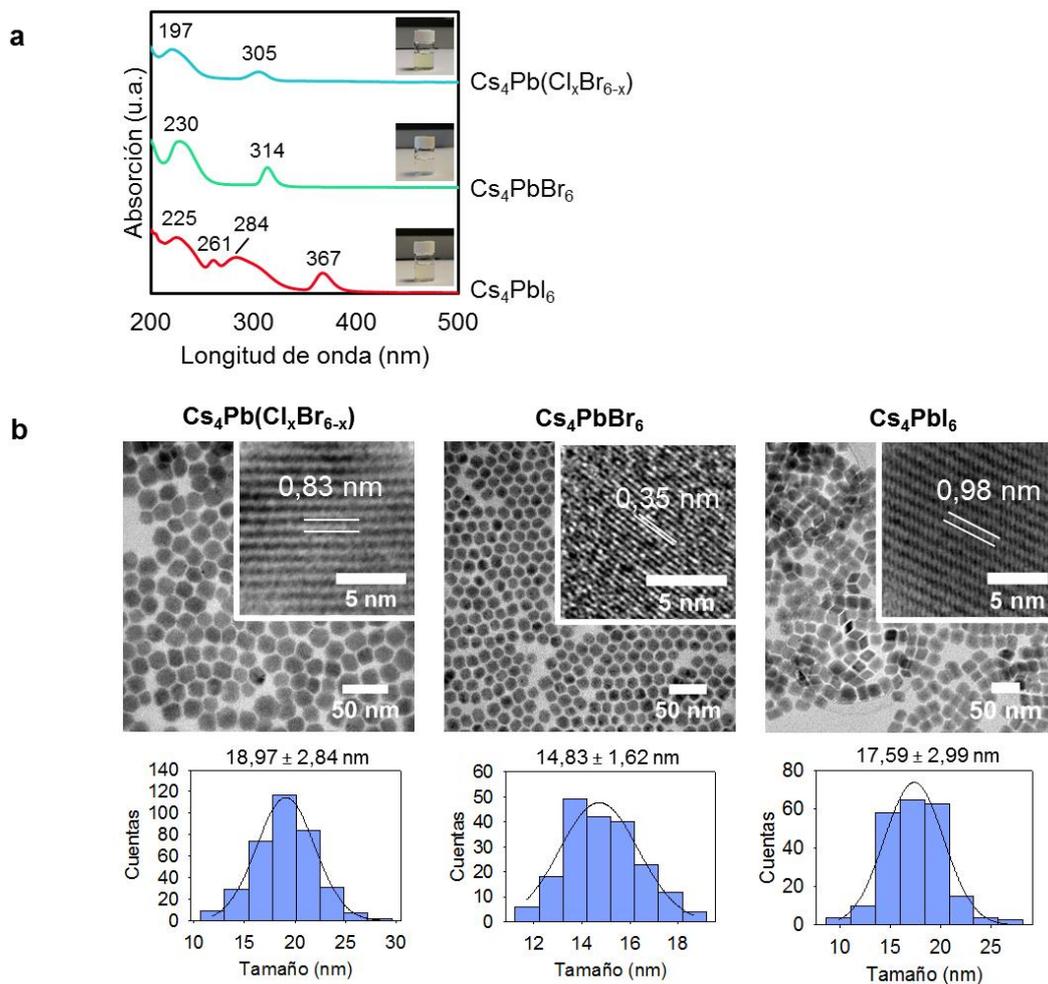


Figura 49. (a) Espectro de absorción UV-Vis de los NCs  $\text{Cs}_4\text{PbX}_6$  ( $X = \text{Cl}/\text{Br}$ ,  $\text{Br}$  y  $\text{I}$ ). (b) Imágenes de TEM de los NCs  $\text{Cs}_4\text{PbX}_6$  ( $X = \text{Cl}/\text{Br}$ ,  $\text{Br}$  y  $\text{I}$ ) e histogramas de la distribución del tamaño de partícula.

Para la preparación de las NPs *core-shell* de  $\text{CsPbX}_3@SiO_2$  se procedió según la metodología descrita por Li *et al* (**Figura 50**).<sup>28</sup> Los NCs de  $\text{Cs}_4\text{PbX}_6$  se silanizaron utilizando TMOS parcialmente hidrolizado (PH TMOS). Los grupos silanoles se adhieren a la superficie de los NCs, reemplazando a los ligandos nativos de la superficie, de forma que en este punto ya introducen semillas de crecimiento para la red de  $\text{SiO}_2$ . En un segundo paso, se añadió TMOS y agua para desencadenar simultáneamente la transformación de los NCs OD de  $\text{Cs}_4\text{PbX}_6$  a 3D de  $\text{CsPbX}_3$  mediante el desprendimiento de  $\text{CsX}$  y el proceso de condensación de la sílice sobre la superficie de los NCs transformados, dando lugar a NPs de  $\text{CsPbX}_3@SiO_2$ .

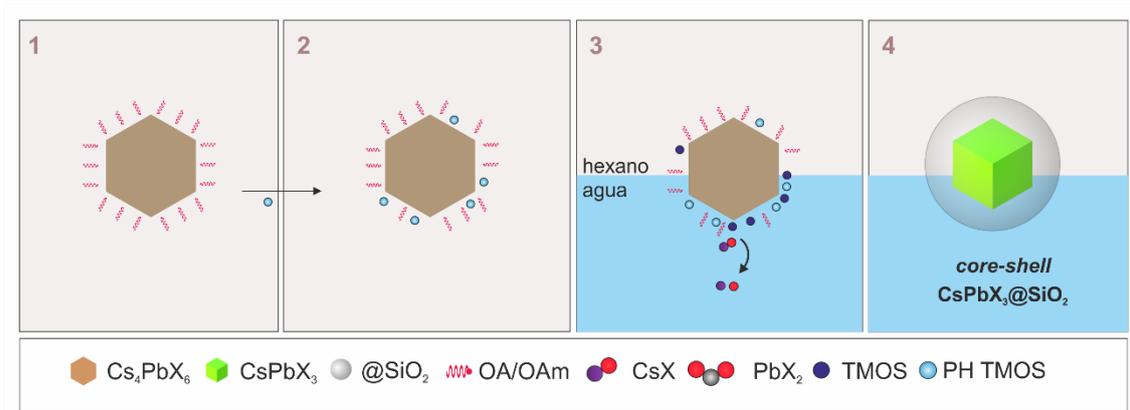


Figura 50. Mecanismo de formación de las NPs *core-shell*  $\text{CsPbX}_3@SiO_2$  a partir de la transformación de NCs de  $\text{Cs}_4\text{PbX}_6$  en presencia de una interfase hexano-agua

Considerando que la concentración de partida de los NCs de  $\text{Cs}_4\text{PbX}_6$  es un parámetro clave para poder reproducir la metodología, se procedió a determinar su concentración óptima probando diluciones seriadas a partir de las siguientes concentraciones: 14,4 mg/mL, 25,7 mg/mL y 17,6 mg/mL  $\text{Cs}_4\text{PbX}_6$  ( $X = \text{Cl}/\text{Br}$ ,  $\text{Br}$  y  $\text{I}$ ), respectivamente.

La **Tabla 8** resume las características de las partículas *core-shell* producidas a partir de distintas concentraciones del material precursor. En ella no se incluyen las concentraciones más altas, ya que se trata de poblaciones muy heterogéneas. Por ejemplo, la muestra más concentrada de  $\text{Cs}_4\text{Pb}(\text{Cl}_x\text{Br}_{6-x})$  (14,4 mg/mL) contiene cubos de 9 nm, cristales hexagonales de 60 nm y esferas de 8 nm con núcleo inapreciable. En el caso de  $\text{Cs}_4\text{PbBr}_6$  (25,7 mg/mL) ocurre lo mismo, incluso a una concentración de 6,4 mg/mL, se generan nanoplaquetas de 23 nm de largo y esferas de 23 nm sin un núcleo apreciable. Finalmente, en el caso de  $\text{Cs}_4\text{PbI}_6$  es necesario reducir aún más la concentración para aproximarse a muestras más homogéneas (2,2 mg/mL).

Tabla 8. Características de las NPs core-shell  $CsPbX_3@SiO_2$  obtenidas a partir de distintas concentraciones de NCs de  $Cs_4PbX_6$

|                        | [NCs]<br>(mg/mL) | $\lambda_{em}$<br>(nm) | Fwhm<br>(nm) | Tamaño<br>de<br>partícula<br>(nm) | Tamaño<br>del<br>núcleo<br>(nm) | Núcleos/partícula |
|------------------------|------------------|------------------------|--------------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| $Cs_4Pb(Cl_xBr_{6-x})$ | 7.2              | 483                    | 26           | 30                                | 11                              | 1                 |
|                        | 3.6              | 486                    | 20           | 32                                | 3                               | 1                 |
|                        | 1.8              | 486                    | 19           | 32                                | 3                               | 1                 |
|                        | 0.9              | 490                    | 19           | 32                                | -                               | -                 |
| $Cs_4PbBr_6$           | 3.2              | 506                    | 22           | 22                                | 4                               | 1                 |
|                        | 1.6              | 509                    | 22           | 25                                | 2                               | 2                 |
| $Cs_4PbI_6$            | 2.2              | 689                    | 33           | 33                                | 2                               | 5                 |
|                        | 1.1              | 692                    | 38           | 15                                | -                               | -                 |

Las imágenes de la izquierda de la **Figura 51** muestran los resultados de TEM para tres concentraciones representativas de cada composición, mientras que a la derecha se muestra la intensidad de fluorescencia (PL) para la longitud de emisión máxima alcanzada para diferentes concentraciones de cada composición.

De los resultados de TEM, se puede concluir que, independientemente de la composición del haluro, cuando la concentración de los NCs de  $Cs_4PbX_6$  es alta se obtiene una población heterogénea, entre la que se incluyen cristales de diferentes tamaños y formas sin un recubrimiento apreciable. Esta población desaparece a medida que la concentración de NCs precursores disminuye, aproximándose a las condiciones que mejoran la eficiencia de recubrimiento, dando lugar a NPs donde los NCs  $CsPbX_3$  se localizan en el núcleo de las esferas de sílice. Sin embargo, cuando la concentración es crítica, estas NPs son minoritarias frente a la prevalencia de nanoesferas de sílice vacías.

Los resultados de PL muestran una tendencia similar, el pico de emisión de fluorescencia de la concentración más alta está desplazado hacia la izquierda, mientras que se mantiene estable en concentraciones inferiores, pudiendo ser indicativo de una mayor homogeneidad en las muestras.

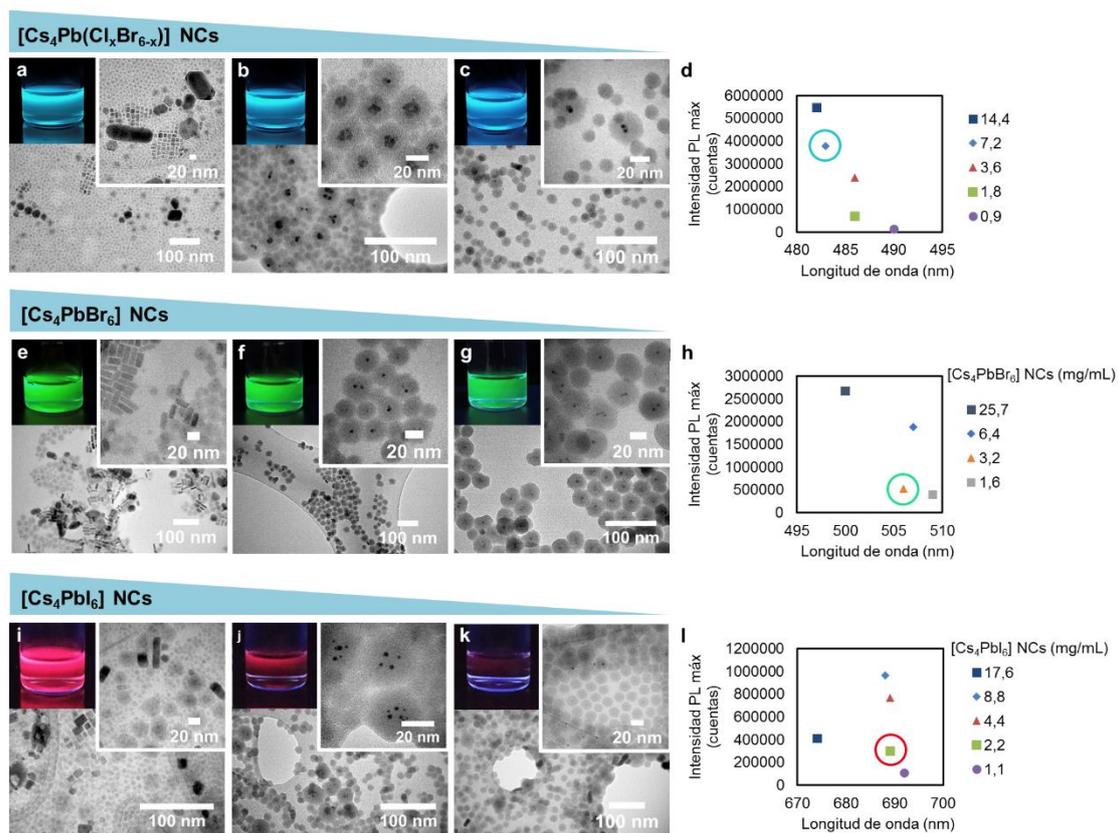


Figura 51. Caracterización por TEM de las NPs CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> a partir de las siguientes concentraciones de NCs de Cs<sub>4</sub>Pb(Cl<sub>x</sub>Br<sub>6-x</sub>): a) 14,4, b) 7,2, c) 3,6 mg/mL; Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>6</sub>: d) 6,4, f) 3,2 y g) 1,6 mg/mL; Cs<sub>4</sub>PbI<sub>6</sub>: i) 8,8, j) 2,2 y k) 1,1 mg/mL. Intensidad de fluorescencia para el máximo de emisión para diferentes concentraciones de NCs precusores (d, h y l)

Como concentraciones óptimas se seleccionaron aquellas con las que se obtuvieron NPs *core-shell* más uniformes y en mayor proporción, siendo 7,2 mg/mL, 3,2 mg/mL y 2,2 mg/mL Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub> (X = Cl/Br, Br y I), respectivamente. La **Figura 52** muestra los espectros de absorción/emisión y las imágenes de TEM de las NPs resultantes. La **Tabla 9** aporta información sobre el máximo de emisión, *fwhm*, PLQY, tamaño medio de partícula, tamaño del núcleo y número de núcleos/partícula.

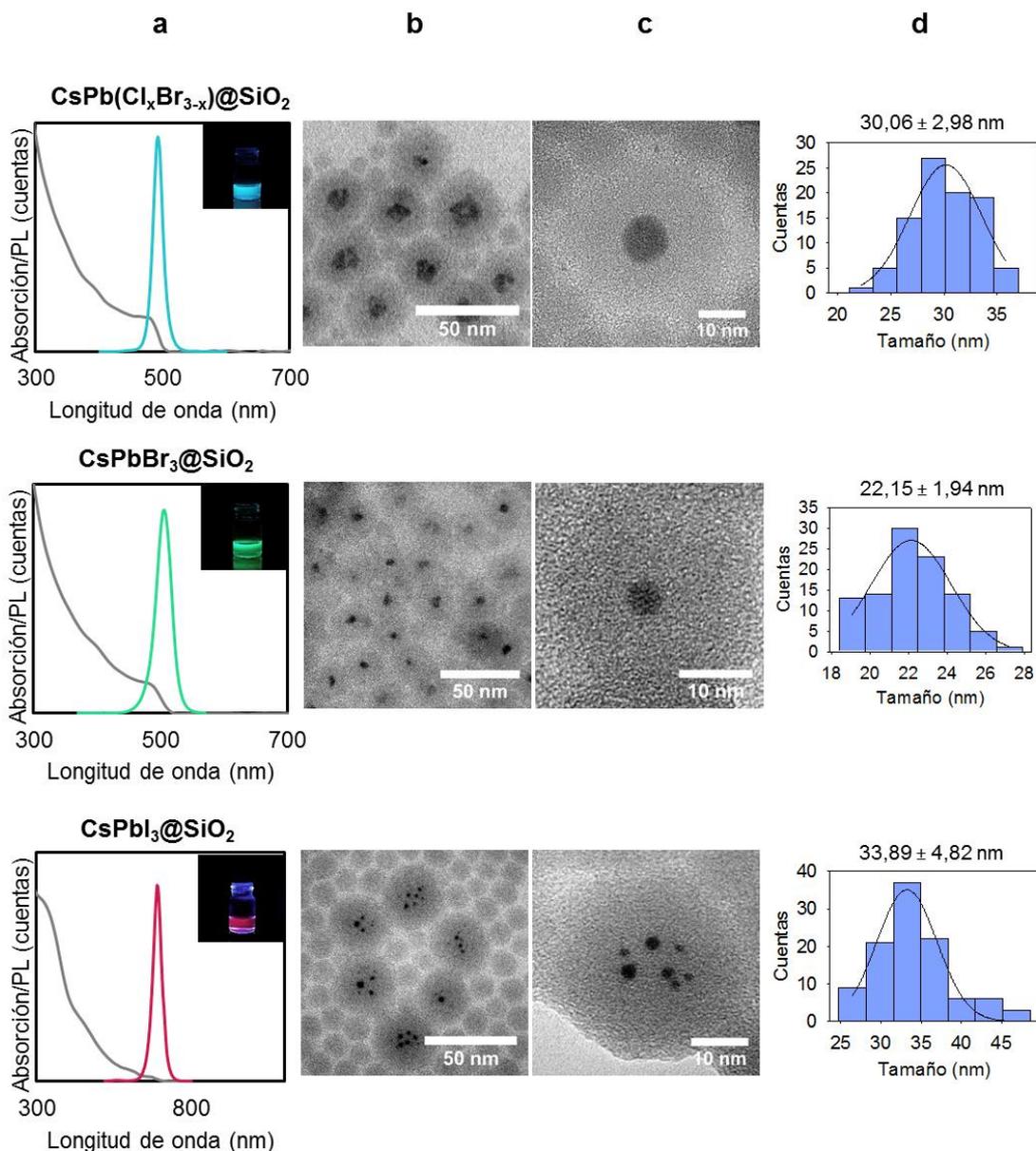


Figura 52. Caracterización óptica y estructura de las NPs de CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>. (a) Espectro de absorción UV-Vis y de emisión de PL ( $\lambda_{ex}$  355 nm). Imágenes de TEM a (b) menor y (c) mayor resolución e (d) histograma de la distribución del tamaño de partícula

De esta información, cabe destacar que las NPs *core-shell* tienen un tamaño de partícula pequeño (20-30 nm), su emisión es estrecha (*fwhm* de 26-33 nm) y el PLQY alcanza valores moderados: 18% para CsPb(Cl<sub>x</sub>Br<sub>3-x</sub>)@SiO<sub>2</sub> y 57% para CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>. Estos valores son ligeramente superiores frente a los de sus análogos sin recubrir (10% y 43%, respectivamente), lo que indica que la sílice puede estar contribuyendo a pasivar los defectos de superficie. Jiang *et al* también describieron un aumento del PLQY (de 53% a 84%) en NCs de CsPbBr<sub>3</sub> tras su encapsulación en NPs de SiO<sub>2</sub>.<sup>52</sup>

En la **Tabla 9** pueden compararse estos resultados con otros trabajos de síntesis de NPs *core-shell* basados en la transformación de  $Cs_4PbX_6$ . No se incluye el trabajo de Hu *et al*, por tratarse de heteroestructuras Janus,<sup>27</sup> ni tampoco el de Park *et al*,<sup>29</sup> porque se trata de un gran aglomerado de sílice. Por tanto, este es el único trabajo que explora composiciones más allá de la habitual composición de bromo, lo que permite obtener NPs de varios colores, que emiten en el azul, verde y rojo. De la comparativa recogida en la **Tabla 9**, el trabajo de Rossi *et al*, genera partículas *core-shell* de menor tamaño (17 nm), sin embargo, su PLQY es inferior (8%).<sup>1</sup> Por otro lado, Li *et al* alcanzan un valor de PLQY más alto (65%), pero el tamaño de la partícula es superior (60 nm).<sup>28</sup>

Tabla 9. *Propiedades de las NPs core-shell CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> (X = Cl/Br, Br y I) a partir de las concentraciones seleccionadas: 7,2, 3,2 y 2,2 mg/mL de NCs de Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub>, respectivamente. Comparación con otros trabajos de la bibliografía basados en la transformación de Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub>.*

| NPs                        | Emisión máx (nm) | Fwhm (nm) | PLQY (%) | Tamaño de partícula (nm) | Tamaño del núcleo (nm) | Núcleos/partícula | Ref.          |
|----------------------------|------------------|-----------|----------|--------------------------|------------------------|-------------------|---------------|
| $CsPb(Cl_xBr_{3-x})@SiO_2$ | 492              | 26        | 18       | 30,06 ± 2,98             | 11,62 ± 2,1            | 1                 | Este trabajo  |
| $CsPbBr_3@SiO_2$           | 506              | 22        | 57       | 22,15 ± 1,94             | 4,26 ± 0,9             | 1                 | Este trabajo  |
| $CsPbI_3@SiO_2$            | 689              | 33        | N.D*     | 33,89 ± 4,82             | 2,05 ± 0,46            | 5                 | Este trabajo  |
| $CsPbBr_3@SiO_2$           | 521              | 16        | 65       | 60                       | 12,25                  | 1                 | <sup>28</sup> |
| $CsPbBr_3@SiO_2$           | 507              | 20        | 8        | 17                       | 10                     | 1                 | 1             |

\*No se describe. El PLQY no se determinó debido a la baja estabilidad de la composición de yodo.

Una de las principales consecuencias del proceso de la transformación desencadenada en presencia de agua es la reducción del tamaño del NC original debido al desprendimiento de CsX.<sup>22,27,28</sup> En el trabajo de Li *et al*, los NCs pasan de 14,5 nm ( $Cs_4PbBr_6$ ) a 12,25 nm ( $CsPbBr_3$ ), mientras que, en nuestro caso sufren una reducción de 10 nm, aun partiendo de un tamaño de cristal similar (14,8 nm).<sup>28</sup> Esta diferencia significativa sugiere que, en nuestra metodología, aun siendo una adaptación del método de Li *et al*, el proceso de degradación de los NCs ocurre en mayor extensión.

Es también relevante la correlación entre la naturaleza del haluro y el tamaño del núcleo. Por ejemplo, asumiendo que no hay grandes diferencias en

el tamaño de los NCs precursores ( $\sim 17$  nm) los núcleos en la composición de yodo son más pequeños que los de la composición de bromo y la composición mixta (2, 4 y 8 nm, respectivamente).

Este comportamiento señala que los NCs son susceptibles a la degradación, y en consecuencia este proceso afecta en mayor medida a la composición de yodo, que por defecto es la menos estable debido a su tendencia a transformarse en la fase amarilla a temperatura ambiente.<sup>18,53</sup>

Para evaluar la estabilidad estructural, se midió la PL de las NPs *core-shell* y de su respectivo control (NCs transformados sin recubrir) durante 4 días. Para que fueran comparables, se prepararon disoluciones en hexano a una misma concentración tomando como referencia el mismo valor de absorbancia a 310 nm (**Figura 53**).

La intensidad de PL disminuye más rápido para los NCs control que para los NCs encapsulados. Los NCs de  $\text{CsPb}(\text{Cl}_x\text{Br}_{3-x})$  sufren una caída del 75% y su emisión se desplaza desde 488 nm a 458 nm 4 días después, lo que sugiere que durante este tiempo la estructura continúa sufriendo cambios hasta que se enriquece la proporción de Cl frente a la de Br. Sin embargo, las NPs de  $\text{CsPb}(\text{Cl}_x\text{Br}_{3-x})@\text{SiO}_2$ , mantienen su emisión prácticamente constante (solo se desplaza 7 nm), lo que indica que la envoltura ofrece mayor estabilidad estructural al nanocristal.

De forma análoga, en los NCs de  $\text{CsPbBr}_3$ , la PL desaparece prácticamente al día siguiente, mientras que las NPs de  $\text{CsPbBr}_3@\text{SiO}_2$  mantienen intacta su fluorescencia 4 días después. Estos resultados confirman de nuevo el papel beneficioso del recubrimiento de  $\text{SiO}_2$ , que dota a los NCs de cierta estabilidad estructural frente a las condiciones ambientales, excepto en el caso de las muestras compuestas por yodo, donde ambas muestras se degradan rápidamente.

A pesar de que las NPs de  $\text{CsPbX}_3@\text{SiO}_2$  tienen cierta estabilidad estructural en el medio de reacción (hexano y trazas de agua), al añadir etanol la fluorescencia desaparece rápidamente. Esto implica que el recubrimiento aun es permeable a la difusión de moléculas polares que desencadenan la descomposición de los NCs.

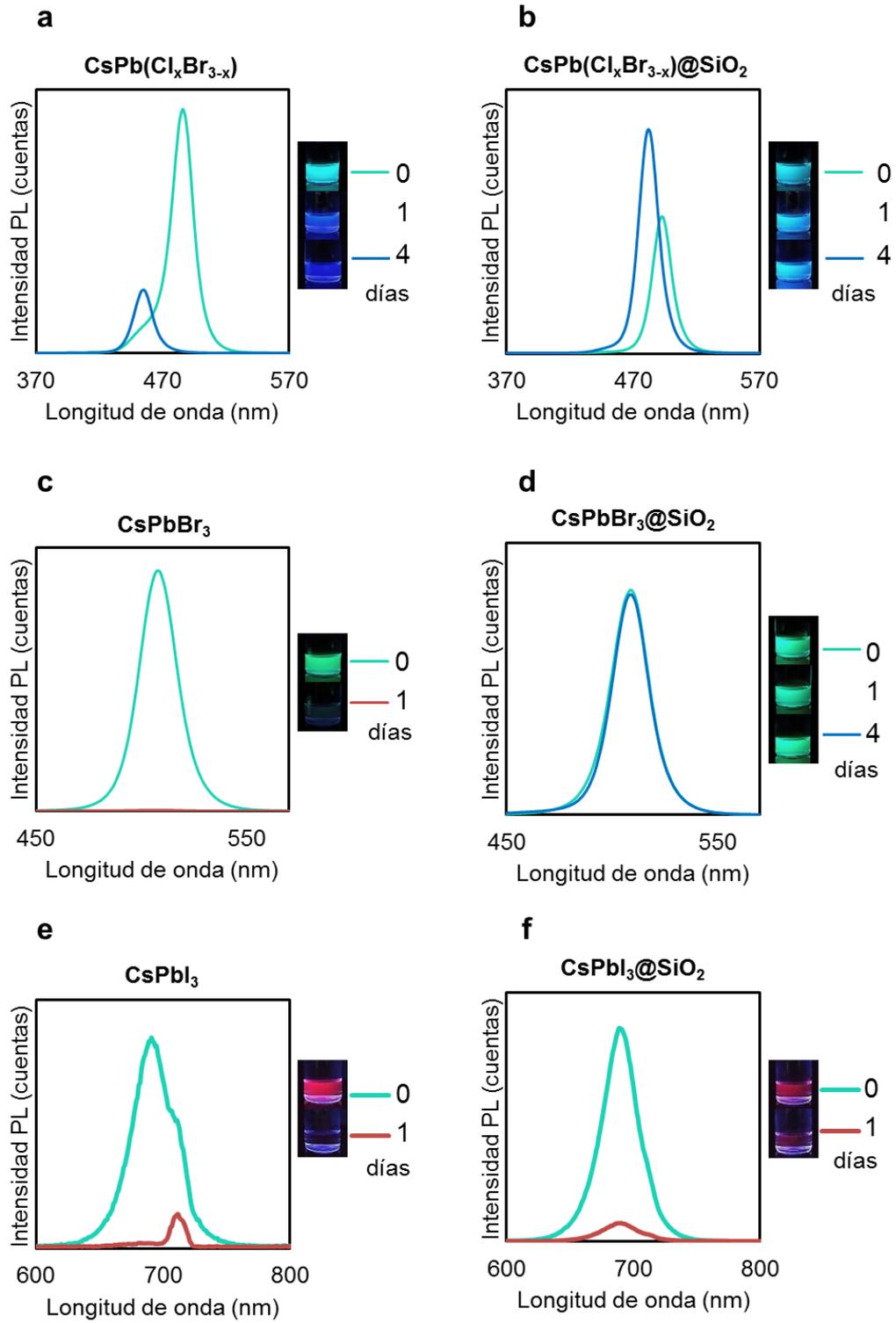


Figura 53. Espectro de emisión ( $\lambda_{\text{ex}}$  355 nm) de (a,c,e) los NCs control y (b, d, f) las NPs core-shell. Las muestras se prepararon a una misma concentración, tomando como referencia el valor de absorbancia a 310 nm.

Esta es una cuestión donde los trabajos de referencia no profundizan. Por ejemplo, Hu *et al* realizan un seguimiento de la PL en el medio de reacción (hexano/agua), pero esto no determina cómo se comportan directamente en agua.<sup>27</sup> Li *et al* llevan a cabo la medida en presencia de un 10% de etanol.<sup>28</sup> Sus resultados indican que son estables, al contrario que en este caso, posiblemente porque su envoltura de sílice es más gruesa. Aun así, el seguimiento de la PL solo se registra durante los primeros 30 min, tiempo que es insuficiente para determinar cómo de estables son las NPs de cara a utilizarlas en bioaplicaciones.

Por otro lado, Rossi *et al*,<sup>1</sup> claramente señalan que el recubrimiento de SiO<sub>2</sub> que generan no es lo suficientemente compacto para estabilizar a los NCs. En su lugar, recurren a un tratamiento adicional de pasivación con PbBr<sub>2</sub> que combinan con una segunda etapa de deposición de sílice para aumentar el grado de entrecruzamiento de la sílice.

En nuestro caso, para aumentar la resistencia al agua, se optó por un tratamiento térmico hasta alcanzar los 565 °C para cerrar los poros en partículas de sílice mesoporosa.<sup>54</sup> En estas condiciones, los poros comienzan a colapsar y dan lugar a una red compacta de sílice.

La **Figura 54** muestra los resultados de la caracterización de las partículas tras el tratamiento térmico y su estabilidad al dispersarlas completamente en agua.

A pesar de que en ambos casos se obtienen partículas fluorescentes y estables en agua durante 3-4 días, la caracterización de las muestras señala que las NPs sufren importantes cambios durante este proceso.

En primer lugar, su morfología pasa de una población monodispersa de NPs a grandes aglomerados de sílice con múltiples núcleos embebidos, especialmente en la composición mixta de Cl/Br, donde no es posible distinguir una partícula de otra.

En segundo lugar, cambian sus propiedades ópticas tras el tratamiento térmico. En el caso de la composición mixta, su espectro de emisión es un pico ancho centrado en 500 nm, que con el tiempo evoluciona hacia un pico más intenso y asimétrico, localizado a 513 nm. Esto puede indicar que la estructura se reorganiza hacia una composición enriquecida en Br como consecuencia de la difusión de los iones Cl. Por otro lado, el espectro de emisión de la composición de Br muestra un pico asimétrico centrado en 480 nm, que se aleja de su emisión original a 506 nm.

Es necesario un estudio en mayor profundidad del proceso para poder dar una explicación a todos los cambios producidos como consecuencia del tratamiento térmico. Como alternativa, sería interesante probar una combinación de sales inorgánicas ( $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{KBr}$ ) que selle los poros a una temperatura de calcinación inferior ( $320\text{-}350\text{ }^\circ\text{C}$ ), ya que posiblemente conserve la individualidad de las partículas y propiedades ópticas originales.<sup>55,56</sup>

Finalmente, con el fin de determinar la viabilidad de estas partículas como marcadores fluorescentes, se desarrolló, como prueba de concepto, un inmunoensayo directo (**Figura 55**), para el reconocimiento de Omalizumab ( $\alpha\text{IgE}$ ), un anticuerpo utilizado para el tratamiento de asma severa.

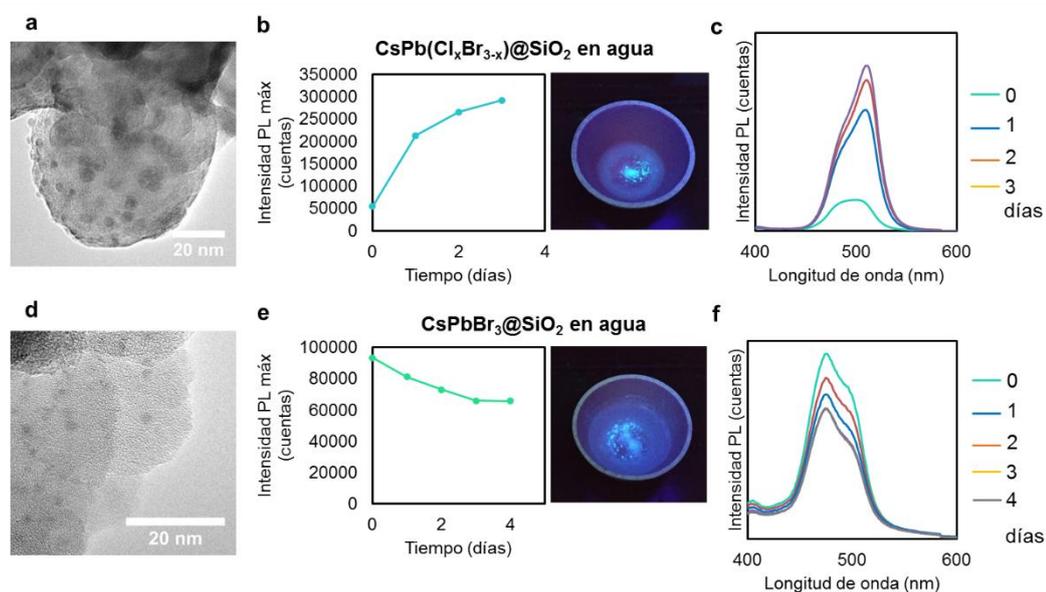


Figura 54. (a y d) Imágenes de TEM de las muestras calcinadas de  $\text{CsPb}(\text{Cl}_x/\text{Br}_{3-x})\text{@SiO}_2$  y  $\text{CsPbBr}_3\text{@SiO}_2$ , respectivamente. (b y e) Seguimiento de la intensidad máxima de PL con el tiempo de las muestras calcinadas dispersas en agua. (c y f) Evolución de los espectros de emisión de fluorescencia con el tiempo.

Para ello, las NPs se conjugaron al  $\alpha\text{IgE}$  mediante adsorción pasiva. Por otro lado, en una placa multipocillo negra se tapizó el receptor específico del omalizumab ( $5\text{ mg/L}$ ). Como control negativo, los pocillos se tapizaron con ovoalbúmina ( $5\text{ mg/L}$ ). Posteriormente, se añadió el conjugado (NPs- $\alpha\text{IgE}$ ) y se dejó incubar durante  $1\text{ h}$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . Tras realizar varios lavados, se obtuvo el espectro de PL con un lector de placas.

La **Figura 55** muestra la relación señal-ruido y los espectros de PL. Estos resultados confirman el reconocimiento específico del anticuerpo con su receptor, con una relación señal-ruido de 10.000 y 30.000 para los anticuerpos marcados con las NPs estabilizadas de  $\text{CsPb}(\text{Cl}_x\text{Br}_{3-x})$  y  $\text{CsPbBr}_3$ , respectivamente. Los controles, muestran una señal de PL prácticamente nula, lo que revela la excelente selectividad del ensayo.

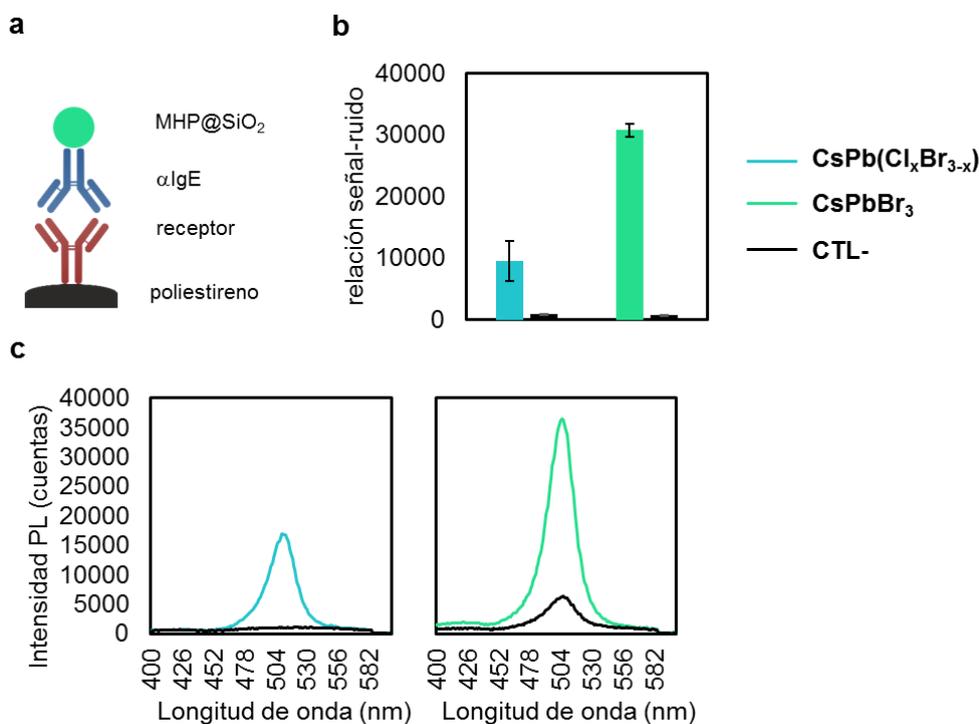


Figura 55. (a) Esquema del evento de inmunoreconocimiento fluorogénico (b) Relación señal-ruido y (c) espectro de PL. En negro, la señal del Control negativo

Como se ha mencionado en la introducción de este capítulo, el número de publicaciones que aprovecha la transformación de los NCs de  $\text{Cs}_4\text{PbBr}_6$  en combinación con el proceso sol-gel es limitado, por lo que este trabajo constituye una valiosa aportación a este campo.

Por ejemplo, las metodologías desarrolladas para la obtención de NPs *core-shell* únicamente se centran en la composición de Br, por ser la más estable. Sin embargo, teniendo en cuenta que hay un gran interés en el desarrollo de marcadores de perovskita multicolores para su implantación en multiplexado, es necesario comprobar si las metodologías de síntesis de NPs *core-shell* actuales son compatibles con otras composiciones de haluro, permitiendo así ampliar la gama de colores.

Precisamente, este trabajo extiende la metodología de Li *et al.*,<sup>28</sup> para obtener NPs basadas en Br, I y Cl/Br (**Figura 56a**). Además, profundiza en el estudio de optimización para cada composición, a partir de su caracterización óptica y morfológica, análisis de dispersión de tamaños y seguimiento de su estabilidad estructural.

Es cierto que Hu *et al.*,<sup>27</sup> incluyen hasta cuatro composiciones: Br, I, Cl/Br y Br/I. Sin embargo, se trata de heteroestructuras de tipo Janus, donde la sílice se deposita de forma asimétrica (**Figura 56b**) y solo ofrecen información acerca de la estabilidad estructural de la composición de bromo en una mezcla de hexano y agua. Por otro lado, Park *et al.*,<sup>29</sup> también aplican su metodología con composiciones mixtas de Cl/Br y de Br/I dopada con Mn, pero obtienen grandes aglomerados de escasa utilidad para las aplicaciones que se persiguen en esta tesis (**Figura 56c**).

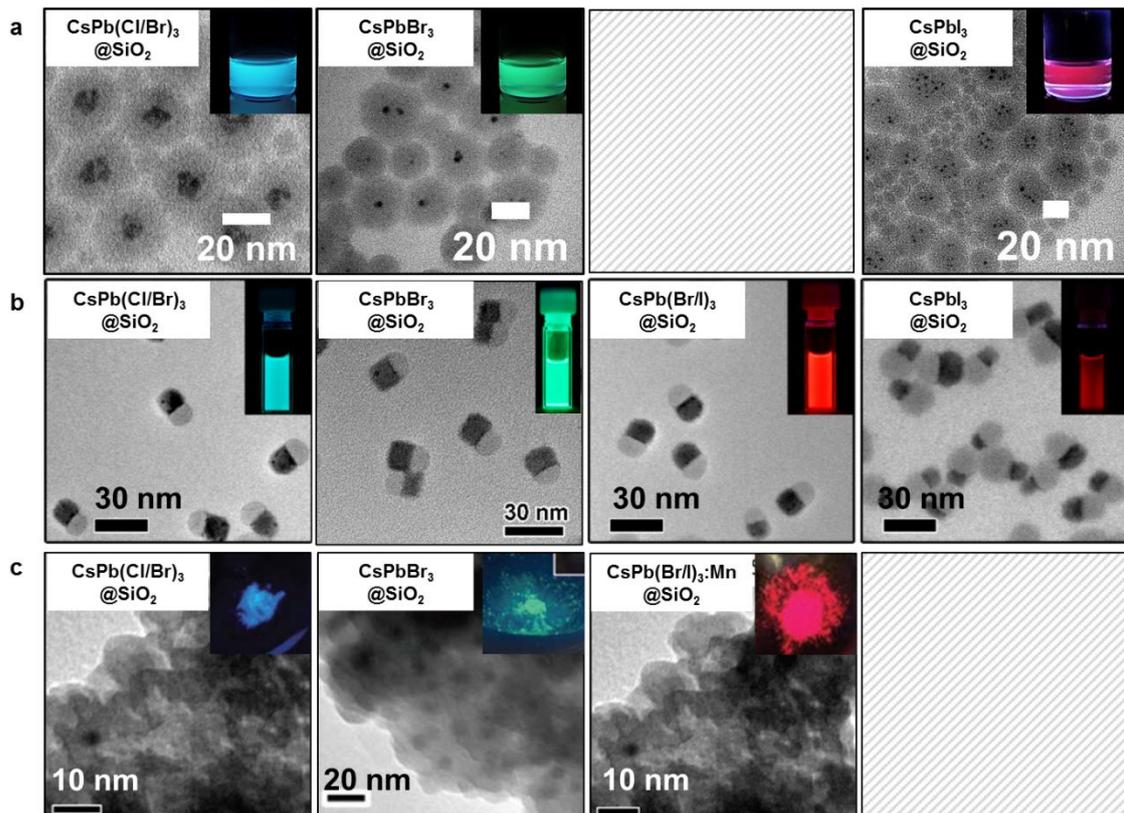


Figura 56. NPs multicolores de  $\text{CsPbX}_3@SiO_2$  producidas a partir de la transformación de  $\text{Cs}_4\text{PbX}_6$  en combinación con el proceso sol-gel según (a) este trabajo (b) Huang *et al.* J. Am. Chem. Soc. 2018, 140, 406–412 (c) Park *et al.* Nanoscale, 2019,11, 18739-18745

Otro de los aspectos interesantes de este trabajo es que, en comparación con los otros dos trabajos de obtención de NPs *core-shell* basados en la transformación de  $\text{Cs}_4\text{PbBr}_6$ ,<sup>1,28</sup> obtiene un balance adecuado entre tamaño de partícula pequeño (22 nm) y alto valor de PLQY (57%). Además, proporciona una medida de la estabilidad de las partículas completamente dispersas en agua de la composición de Br y Cl/Br durante 3-4 días tras la aplicación de un tratamiento térmico (**Figura 57a1**). Mientras que en los trabajos de Li *et al.*,<sup>28</sup> (**Figura 57b1**) y Rossi *et al.*,<sup>1</sup> (**Figura 57c1**) la prueba de estabilidad se lleva a cabo en una mezcla de tolueno o hexano con etanol y no se llega a demostrar su compatibilidad con bioaplicaciones.

Finalmente, este trabajo busca evidenciar el potencial de las NPs de perovskita como marcadores fluorescentes para el desarrollo de test basados en inmunoensayos mediante una prueba de concepto. En concreto, se lleva a cabo un ensayo directo que demuestra la posibilidad de marcar el anticuerpo Omalizumab ( $\alpha\text{IgE}$ ) con las NPs de Cl/Br o de Br (**Figura 57a2**). El conjugado es estable en tampón salino e informa de la interacción específica entre el anticuerpo y su receptor. Esto supone un primer paso hacia el marcaje multicolor para ensayos multiplex, los cuales demandan NPs con tamaño reducido, alto PLQY, emisión estrecha y sintonizable en la región visible sin que sus espectros solapen entre sí.

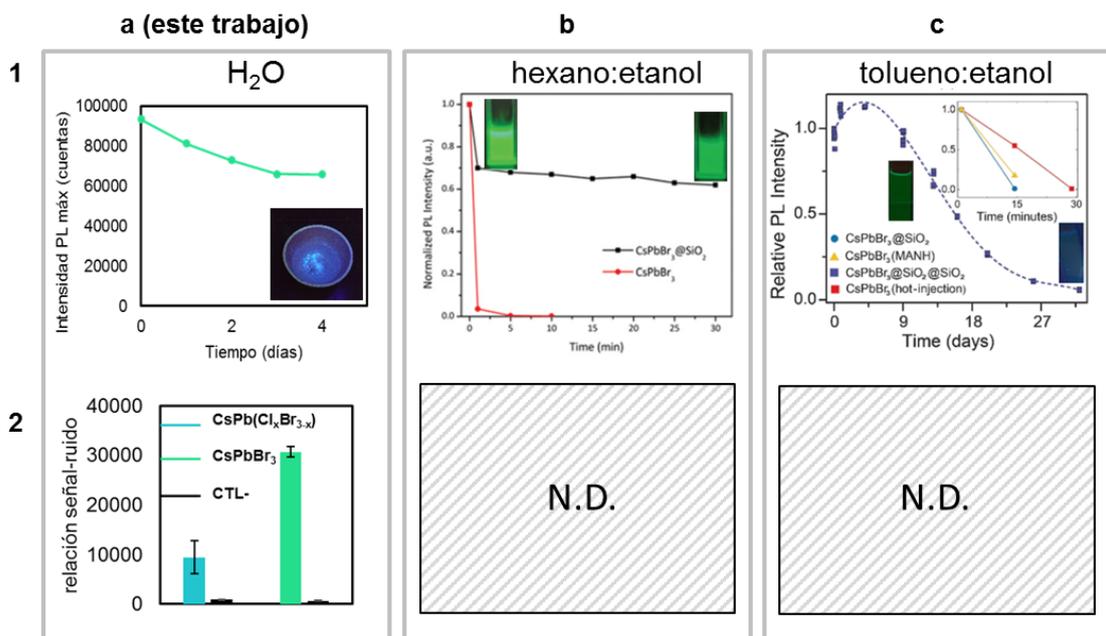


Figura 57. NPs *core-shell* de  $\text{CsPbBr}_3@SiO_2$  producidas por la transformación de  $\text{Cs}_4\text{PbBr}_6$ . (1) Prueba de estabilidad de las NPs en agua o mezclas de disolvente orgánico y disolvente polar (2) Compatibilidad con bioaplicaciones. (a) Este trabajo). (b) Li *et al.* Nanoscale, 2021, 13, 3860. (c) Rossi *et al.* Chem. Mater. 2022, 34, 1, 405–413

### 3.3. Conclusiones

---

En este capítulo se han desarrollado dos metodologías de síntesis de NPs *core-shell* para la estabilización de NCs de perovskita con un recubrimiento de sílice.

La primera estrategia (MÉTODO A) proporciona una metodología que busca suavizar las condiciones del proceso sol-gel mediante la adición fraccionada de TEOS, amoníaco y agua a una disolución que contiene los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> en tolueno.

Este método permite retrasar la descomposición de los NCs de CsPbBr<sub>3</sub>, sin embargo, induce un proceso de transformación estructural que altera las propiedades ópticas del nanocrystal. En su lugar, el material encapsulado en las NPs de sílice consiste en núcleos de 2-3 nm de CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> que emiten una tenue fluorescencia azul ( $\lambda_{em}$  430 nm y PLQY 5%).

Una de las ventajas de esta metodología es la reproducibilidad con que se genera una población monodispersa y luminiscente de NPs *core-shell* (32,07 ± 2,94 nm) que pueden dispersarse homogéneamente en agua y en tampón salino, exhibiendo una buena estabilidad coloidal y óptica durante al menos 3 días, reteniendo cerca de un 90% de la intensidad de fluorescencia inicial.

Además, las NPs *core-shell* pueden funcionalizarse de forma sencilla mediante un tratamiento post-sintético con alcoxisilanos con grupos amino y vinilo. Por otro lado, como prueba de concepto se ha explorado el potencial de las NPs en inmunomarcaje, concretamente a partir de un ensayo directo con la proteína diana inmovilizada (BSA) demostrando que el anticuerpo anti-BSA puede marcarse fluorescentemente con las NPs por adsorción pasiva, lo que constituye un primer paso hacia la utilización de los NCs de perovskita en inmunosensado.

Siendo conscientes del bajo PLQY (5%), es necesario continuar optimizando el proceso para preparar NPs que mantengan la estructura nativa del nanocrystal y con ello sus propiedades ópticas intactas, ya que la baja eficiencia de emisión limitaría la sensibilidad en el caso de implantarse como marcadores luminiscentes en un sistema analítico.

Asumiendo que el amoníaco es el detonante del proceso de transformación, una posibilidad es sustituirlo por L-lisina o L-arginina, ya que

estos aminoácidos son capaces de catalizar la hidrólisis del TEOS,<sup>57</sup> y a la vez actuar como ligandos que estabilizan los NCs de CsPbBr<sub>3</sub>.<sup>58,59</sup>

La segunda estrategia (MÉTODO B) emplea la transformación de NCs Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub> en CsPbX<sub>3</sub> en presencia de agua en combinación con el proceso sol-gel para la síntesis de NPs *core-shell*.

Este trabajo se suma a la metodología descrita por Li *et al*,<sup>28</sup> aportando algunas novedades. Entre ellas, la expansión a otras composiciones, lo que permite sintonizar el color de la emisión desde 480 a 690 nm, en función de la composición del haluro.

Además, evalúa el efecto que tiene la concentración inicial de los NCs de Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub>, concluyendo que juega un papel crucial a la hora de conseguir una distribución monodispersa de NPs *core-shell*.

Se han determinado las concentraciones óptimas para cada una de las composiciones Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub> (X = Cl/Br, Br y I), resultando en NPs *core-shell* que exhiben un tamaño de partícula pequeño (20-30 nm), un PLQY moderado (18-57%) y una emisión estrecha (*fwhm* 20-30 nm), siendo características adecuadas para su conjugación a biomoléculas y utilización como marcadores para detección fluorescente en ensayos de multiplexado.

El recubrimiento de sílice sobre los NCs de la composición mixta y la de bromo confiere estabilidad estructural en el medio de reacción (hexano y trazas de agua) al menos durante 4 días.

Adicionalmente, se demuestra que, mediante un tratamiento térmico es posible estabilizar completamente las NPs en agua y tampón salino, lo que permite su conjugación a Omalizumab ( $\alpha$ IgE). En el inmunoensayo directo, la señal fluorescente del anticuerpo marcado informa del reconocimiento específico con su receptor, siendo un resultado preliminar que demuestra el potencial que pueden tener los NCs de perovskita en el desarrollo de ensayos multiplex basados en detección simultánea multicolor.

La continuidad de esta investigación debe pasar necesariamente por dos cuestiones para perfeccionar la metodología. Primero, reducir el contenido de nanoesferas vacías, ya que disminuyen la eficiencia de marcaje y por tanto la sensibilidad del ensayo. Segundo, buscar alternativas al tratamiento térmico como solución para asegurar la completa estabilidad de las NPs en agua, ya que promueve su agregación y posiblemente cambios estructurales que afectan a sus propiedades ópticas. Una posibilidad es generar un recubrimiento de sílice adicional, pero esto aumentaría las dimensiones de la partícula. Otra posibilidad

es combinar un tratamiento térmico con sales, ya que esta estrategia ha funcionado con anterioridad en trabajos previos encontrados en la bibliografía para el sellado de los poros de partículas mesoporosas sin producir cambios en su morfología o propiedades ópticas.<sup>55,56</sup>

En resumen, en este capítulo se han desarrollado dos metodologías distintas que contribuyen al estado del arte centrado en la generación de recubrimientos de sílice a partir de NCs de CsPbBr<sub>3</sub> y de la transformación de los NCs de Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub> durante el proceso sol-gel. El objetivo del proceso de optimización en ambos casos ha sido el mismo, desarrollar nanopartículas basadas en perovskita de pequeño tamaño (20-30 nm), coloidalmente estables en agua y en tampón salino, siendo estos los requisitos previos para implantarlas en un futuro como marcadores luminiscentes en sistemas analíticos.

La **Tabla 10** muestra los resultados obtenidos en esta tesis frente a los trabajos más representativos de estabilización de NCs de perovskita con un recubrimiento de sílice mediante la adaptación del proceso sol-gel.

Tabla 10. Resultados de estabilización de NCs de LHP por un recubrimiento de sílice mediante la adaptación del proceso sol-gel

| Material precursor                                      | Composición  | Tamaño (nm)                           | PLQY (%) | Estabilidad en agua  | Aplicación    | Alcoxisilano | Tiempo de silanización | Ref.     |    |
|---|--|---------------------------------------|----------|----------------------|---------------|--------------|------------------------|----------|----|
| Sales precursoras                                       | CsPbBr <sub>3</sub> /Cs <sub>4</sub> PbBr <sub>6</sub> @SiO <sub>2</sub> | 200                                   | 84,5     | N.D.                 | Tintas        | APTES        | 12 h                   | 60       |    |
|   | CsPbBr <sub>3</sub> @SiO <sub>2</sub>                                    | 16,8                                  | 90       | 40 min               | N.D.          | TMOS         | 2 h                    | 6        |    |
|   | CsPbBr <sub>3</sub> @SiO <sub>2</sub>                                    | 100                                   | 10       | N.D.                 | Bioimagen     | TMOS         | 2 h                    | 50       |    |
|   | CsPbBr <sub>3</sub> @SiO <sub>2</sub>                                    | 20-40                                 | 72       | N.D.                 | Bioimagen     | APTMS        | 4 h                    | 51       |    |
| NCs CsPbBr <sub>3</sub>                                 | MAPbBr <sub>3</sub> @SiO <sub>2</sub>                                    | 10-450                                | 89       | N.D.                 | N.D.          | TMOS         | 1-36 h                 | 13       |    |
|   | CsPbBr <sub>3</sub> @SiO <sub>2</sub>                                    | 1,2 μm                                | N.D.     | N.D.                 | N.D.          | TMOS         | 48 h                   | 14       |    |
|   | CsPbBr <sub>3</sub> @SiO <sub>2</sub>                                    | 170                                   | 78       | 20 días              | Láser         | MPTMS        | 32 h                   | 15       |    |
|   | CsPbBr <sub>3</sub> @SiO <sub>2</sub>                                    | 18                                    | 82       | N.D.                 | N.D.          | TMOS/TEOS    | 5 h                    | 5        |    |
|   | CsPbBr <sub>3</sub> @SiO <sub>2</sub>                                    | 20                                    | N.D.     | N.D.                 | Bioimagen     | APTES        | 30 min                 | 20       |    |
|   | CsPb <sub>2</sub> Br <sub>5</sub> @SiO <sub>2</sub>                      | 36,1                                  | 5        | 3 días               | Inmunomarcaje | TEOS         | 32 h                   | MÉTODO A |    |
|   | CsPbBr <sub>3</sub> @SiO <sub>2</sub>                                    | 20                                    | 84       | 4 días               | LEDs          | TEOS         | 30 min                 | 52       |    |
|   | NCs Cs <sub>4</sub> PbBr <sub>6</sub>                                    | CsPbBr <sub>3</sub> @SiO <sub>2</sub> | 23,9     | 80                   | N.D.          | LEDs         | TMOS                   | 12 h     | 27 |
|   |  | CsPbBr <sub>3</sub> @SiO <sub>2</sub> | 60       | 65                   | N.D.          | N.D.         | TMOS                   | 15 h     | 28 |
| CsPbBr <sub>3</sub> @SiO <sub>2</sub> @SiO <sub>2</sub> |  | 17                                    | 8        | N.D.                 | N.D.          | TMOS         | 40 h                   | 1        |    |
| CsPbBr <sub>3</sub> @SiO <sub>2</sub>                   |  | 22                                    | 57       | 3 días* tto. térmico | Inmunomarcaje | TMOS         | 15 h                   | MÉTODO B |    |

**APTES:** 3-aminopropiltriethoxisilano · **MPTMS:** (3-mercaptopropil)trimetoxisilano · **TEOS:** tetraetilortosilicato · **TMOS:** tetrametilortosilicato

### 3.4. Materiales y Métodos

---

#### ► **MÉTODO A. Nanopartículas core-shell monodispersas de CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> como marcadores fluorescentes en inmunosensado**

##### Reactivos

Carbonato de cesio (Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 99,9%, Sigma Aldrich), Bromuro de plomo (PbBr<sub>2</sub>, ≥98%, Sigma Aldrich), 1-octadeceno (ODE, 90% grado técnico, Sigma Aldrich), Ácido oleico (OA, grado técnico 90 %, Alfa Aesar), Oleilamina (OAm, contenido C18 80-90%, Sigma Aldrich) Tolueno (Scharlab), Tetraetil ortosilicato (TEOS, 98%, Scharlab), (3-aminopropil) trimetoxisilano (APTES, 95%, Fisher), viniltrietoxisilano (VTES, 97%, Sigma-Aldrich). Anticuerpo IgG anti-albúmina de suero bovino (αBSA) producido en conejo (SAB4301142, Sigma-Aldrich).

##### Síntesis de NCs CsPbBr<sub>3</sub>

Preparación del oleato de cesio. En un matraz de 50 mL de dos bocas se añadieron 205 mg de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se aplicaron condiciones de vacío durante 10 min. Posteriormente, se añadieron 10 mL de octadeceno (ODE) y 0,62 mL de ácido oleico (OA) y se aplicaron condiciones de vacío, agitación magnética y temperatura de 120 °C. Cuando el Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> se disolvió completamente, se subió la temperatura a 150 °C y, tras alcanzar esta temperatura, se atemperó la reacción hasta temperatura ambiente.

Síntesis de NCs de CsPbBr<sub>3</sub>. Los NCs se sintetizaron según Protesescu *et al.*<sup>10</sup> En un matraz de 4 bocas de 100 mL se añadieron 138 mg de PbBr<sub>2</sub>, 10 mL de ODE y 1 mL de OA. Se aplicó vacío y se subió la temperatura a 120 °C durante 45 min. Después, bajo atmósfera inerte (Ar), se inyectó 1 mL de oleilamina y se incrementó la temperatura a 170 °C. Al alcanzar los 165 °C se inyectó rápidamente el Cs-OA previamente calentado (> 100 °C). Tras 10 s, se detuvo la reacción colocando el matraz en un baño de hielo.

Para la purificación de los NCs, se añadieron 25 mL de tolueno y la disolución se centrifugó a 6.654 rcf durante 10 min. El sedimento se dispersó en 25 mL de tolueno y se centrifugó de nuevo a 10.397 rcf durante 10 min y finalmente, se recolectó el sobrenadante conteniendo los NCs de CsPbBr<sub>3</sub>. La concentración de NCs de CsPbBr<sub>3</sub> de la disolución *stock* se calculó de acuerdo al trabajo de Maes *et al.*<sup>61</sup>

### Síntesis de NPs *core-shell*

Las muestras se prepararon en viales de vidrio. A cada una se le añadieron 0,5 mL de la disolución stock de NCs de CsPbBr<sub>3</sub>, 2 µL de NH<sub>4</sub>OH 25% (diluido en un determinado volumen de agua) y TEOS, agitando la mezcla a 300 rpm. En el caso de las muestras F-J la adición se realizó de forma fraccionada a una velocidad de 0,74 µL/min y 0,07 µL/min para TEOS y NH<sub>4</sub>OH, respectivamente. Las muestras se incubaron durante toda la noche en condiciones de agitación magnética. Posteriormente se sonicaron con Sonorex Super, (Bandelin Co. Germany) a una frecuencia de 50/60 Hz durante 15 min y se centrifugaron a 7.500 rcf durante 5 min. El sedimento se dispersó en 1 mL de tolueno y se sonicaron una vez más durante 30 min. La **Tabla 11** detalla las condiciones de preparación de las distintas muestras (A-J).

Tabla 11. Preparación de las muestras A-J

| Muestra | TEOS (µL) | NH <sub>4</sub> OH (25%) (µL) | H <sub>2</sub> O (µL) | Velocidad de adición TEOS (µL/min) | Velocidad de adición NH <sub>4</sub> OH (µL/min) |
|---------|-----------|-------------------------------|-----------------------|------------------------------------|--|
| A       | 60        | 2                             | 0                     | -                                  | -  |
| B       | 310       | 2                             | 0                     | -                                  | -  |
| C       | 480       | 2                             | 0                     | -                                  | -  |
| D       | 960       | 2                             | 0                     | -                                  | -  |
| E       | 1440      | 2                             | 0                     | -                                  | -  |
| F       | 310       | 2                             | 0                     | 0,74                               | 0,07   |
| G       | 310       | 2                             | 28                    | 0,74                               | 0,07   |
| H       | 310       | 2                             | 90                    | 0,74                               | 0,07   |
| I       | 480       | 2                             | 28                    | 0,74                               | 0,07   |
| J       | 960       | 2                             | 28                    | 0,74                               | 0,07   |

### Funcionalización de NPs *core-shell*

Para obtener NPs funcionalizadas, se trataron con 20 µL de (3-amonopropil) trietoxisilano (APTES) o viniltrietoxisilano(VTES). Después de lavar y eliminar el exceso de reactivos por centrifugación a 7.500 rcf durante 5 min, se realizó el análisis de las muestras y de los controles (APTES/VTES) por espectroscopía ATR-FTIR.

## Inmunoensayo

Preparación de los conjugados (NP core-shell/anticuerpo). El anticuerpo IgG anti-albúmina de suero bovino ( $\alpha$ BSA) se conjugó con las NPs *core-shell* por adsorción pasiva. Para ello, 5 mg de las NPs se dispersaron en 1 mL de concentraciones crecientes de  $\alpha$ BSA (0-100  $\mu$ g/mL) y se incubó durante toda la noche en condiciones de agitación magnética a 4 °C.

Inmunoensayo directo. Este ensayo se llevó a cabo utilizando cubetas de policarbonato. Para ello, se tapizaron previamente con 1 mL de proteína BSA (500  $\mu$ g/mL) en tampón fosfato salino (pH = 7) y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Después, se lavaron las cubetas con tampón fosfato salino 10 mM, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20%, pH 7 (PBS-T) y agua y se incubaron durante 2 h con el conjugado. Por último, las cubetas se lavaron con PBS-T y agua y se registró la fluorescencia con el espectrofluorímetro.

## Métodos de caracterización

El espectro de absorción UV-vis se registró con un espectrofotómetro Agilent 8453 (Agilent Technologies) y un espectro de emisión de fluorescencia con el espectrofluorímetro PTI QMA4 (Horiba) ( $\lambda_{ex}$  = 480 nm). El PLQY de las NPs *core-shell* se determinó utilizando como estándar sulfato de quinina en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M ( $\Phi$  = 0,54) para una longitud de onda de excitación de 310 nm.

Las imágenes de TEM se tomaron con los microscopios electrónicos de transmisión de 100 kV (JEM-1400, Flash) y 200 kV con detector de rayos-X (JEM 2100F, JEOL). La distribución del tamaño de partícula se representó con formato de histograma a partir de las medidas del tamaño de partícula, obtenidas con el programa ImageJ sobre las imágenes de TEM. Las fotografías de los viales se tomaron bajo lámpara UV (VL-4.C  $\lambda_{ex}$  254nm, Vilber Lourmat).

Los espectros infrarrojos (4.000-600  $cm^{-1}$ ) se obtuvieron con un espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier y reflectancia total atenuada ATR-FTIR Tensor-27 (Bruker). El análisis elemental se realizó con un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) Agilent 7900. Para la preparación de la muestra, 1 mg de las NPs *core-shell* se llevó a un volumen final de 5 mL con agua mili-Q. La digestión se llevó a cabo en un horno de microondas de alta presión Milestone Ethos Easy a una temperatura máxima de 220 °C. Para la determinación de Cs y Pb se realizó una digestión ácida con una mezcla de HNO<sub>3</sub>:HF (5:1). Para la detección de Br se llevó a cabo una digestión básica con hidróxido de tetraetilamonio.

## ► MÉTODO B. Síntesis de nanopartículas multicolores core-shell de CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> estables en agua para su utilización como marcadores fluorescentes en inmunosensado

### Reactivos

Carbonato de cesio (Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 99,9%, Sigma Aldrich), bromuro de plomo (PbBr<sub>2</sub>, ≥98%, Sigma Aldrich), ioduro de plomo (PbI<sub>2</sub>, 98,5%, Alfa Aesar), cloruro de plomo (PbCl<sub>2</sub>, 99%, Alfa Aesar), 1-octadeceno (ODE, 90% grado técnico, Sigma Aldrich), ácido oleico (OA, grado técnico 90%, Alfa Aesar), oleilamina (OAm, contenido C18 80-90%, Sigma Aldrich) tetrametil ortosilicato (TMOS, 99%, ACROS Organics), tolueno y hexano, adquiridos de Scharlab.

### Síntesis de NCs de Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub> (X = Br, I y composición mixta de Cl/Br)

Los NCs de Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub> se prepararon por el método *hot-injection* descrito por Akkerman *et al.*,<sup>21</sup> con algunas modificaciones.

Preparación del oleato de Cs (Cs-OA). Se disolvieron 400 mg de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 8 mL de OA en condiciones de vacío a 100 °C.

Preparación de los NCs de Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub>. En un matraz de 3 bocas de 100 mL, se añadieron 0,2 mmol PbX<sub>2</sub> (0,1 mmol de cada sal de plomo en el caso de la composición mixta), 5 mL de ODE y 0,2 mL de OA. El matraz se sumergió en un baño de aceite de silicona, se aplicaron condiciones de vacío y agitación, y la temperatura se fijó en 120 °C. Una vez alcanzada la temperatura, se mantuvieron estas condiciones durante 30 min más. Después, se inyectó 1,5 mL de OAm bajo atmósfera inerte hasta que la disolución se volvió clara, indicando la completa disolución del PbX<sub>2</sub>, y el matraz se sacó del baño de aceite para dejarlo atemperar.

Posteriormente, el matraz se introdujo de nuevo en el baño de aceite y se aplicaron condiciones de vacío y agitación. La temperatura se fijó en 60 °C en el caso de PbI<sub>2</sub>, 80 °C para PbBr<sub>2</sub> y 100 °C para la mezcla PbCl<sub>2</sub>+PbBr<sub>2</sub>. Alcanzada esta temperatura, se inyectaron 0,5 mL de Cs-OA y la disolución se volvió turbia a los 15-30 s. Acto seguido, el matraz se dejó atemperar y su volumen se distribuyó en 4 microtubos. Se centrifugaron a 4.000 rpm durante 5 min y el sedimento se dispersó en aproximadamente 5 mL de hexano anhidro.

La dilución 1/200 de cada disolución stock dio los siguientes valores de densidad óptica: D.O.<sub>314</sub> Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>6</sub> = 0,50 ± 0,03, D.O.<sub>367</sub> Cs<sub>4</sub>PbI<sub>6</sub> = 0,53 ± 0,07 y D.O.<sub>343</sub> Cs<sub>4</sub>Pb(Cl<sub>x</sub>Br<sub>6-x</sub>) = 0,29 ± 0,01. La concentración de NCs se determinó midiendo la masa del sedimento, a partir de la diferencia en peso tras eliminar el disolvente durante su purificación, obteniendo los siguientes valores: 25,74 ± 3,38 mg/mL para Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>6</sub>, 35,19 ± 1.07 mg/mL para Cs<sub>4</sub>PbI<sub>6</sub> y 28,75 ± 1,54 mg/mL para Cs<sub>4</sub>Pb(Cl<sub>x</sub>Br<sub>6-x</sub>).

### Síntesis de NPs *core-shell* de CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> (X = Br, I y la composición mixta Cl/Br)

Preparación de TMOS parcialmente hidrolizado (PH TMOS). En un vial de vidrio, se mezclaron 2 mL de tolueno, 12 µL de H<sub>2</sub>O milli-Q y 198 µL de TMOS manteniéndose en agitación magnética (500 rpm) durante 18 h.

Preparación de las NPs *core-shell* CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>. En un vial de vidrio, se añadieron 2 mL de la disolución de NCs de Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub> y 2 µL de PH TMOS y se dejó agitando a 500 rpm durante 5 h. Después, se añadieron 10 µL de TMOS agitando a 900 rpm durante 1 min. Acto seguido, se añadieron 300 µL de H<sub>2</sub>O milli-Q bajo agitación a 1.200 rpm durante 2 min. El vial se mantuvo en reposo durante toda la noche y las NPs *core-shell* se recuperaron del sobrenadante tras centrifugar a 9.000 rpm durante 5 min.

### Tratamiento térmico

En un recipiente de porcelana, se añadieron 5 mL de las NPs y se calcinaron en un horno de mufla a 565 °C durante 10 min con una rampa de temperatura de 1 °C/min. Después de atemperarse, la muestra se dispersó en agua y se sonicó durante 30 min antes de preparar la muestra para TEM.

### Inmunoensayo

Funcionalización de NPs *core-shell* con grupos amino (CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>). En un vial de vidrio, se añadieron 10,5 mg de las NPs CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>, 6 µL de (3-aminopropil) trietoxisilano y 1 mL de tolueno anhidro y la mezcla se agitó durante 5 h. Las NPs funcionalizadas se purificaron por centrifugación a 9.000 rpm y se dispersaron primero en etanol y, tras un segundo lavado, en 3,75 mL de PBS.

**Preparación del conjugado.** Se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de Omalizumab (anticuerpo  $\alpha\text{IgE}$ ) a 1.5 mg/mL a las NPs  $\text{CsPbX}_3\text{@SiO}_2\text{-NH}_2$  y se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Las NPs conjugadas, se centrifugaron a 9.000 rpm y el sedimento se dispersó en 250  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato salino 10 mM, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20%, pH 7 (PBS-T).

**Inmunoensayo directo.** Se tapizó una placa opaca de poliestireno de alta afinidad con 5 mg/L de anticuerpo IgE específico para el alérgeno de Penicilina G (100  $\mu\text{L}$ /pocillo) en tampón bicarbonato/carbonato salino 50 mM pH 9,6 y se incubó durante toda la noche a 4°C. Como control negativo, los pocillos se incubaron con ovoalbúmina a 5 mg/mL. La placa se lavó 4 veces con PBS-T. Después, se añadieron 100  $\mu\text{L}$ /pocillo del conjugado y se incubó durante 1 h. a temperatura ambiente. Después de un lavado exhaustivo con PBS-T (6 lavados) y se midió la fluorescencia utilizando el lector de placas multimodo EnSpire (PerkinElmer).

## Métodos de caracterización

El espectro de absorción UV-vis se obtuvo con un espectrofotómetro Agilent 8453 (Agilent Technologies) y el espectro de emisión de fluorescencia con un espectrofluorímetro PTI QMA4 (Horiba) con una  $\lambda_{\text{ex}}$  fija a 355 nm. El PLQY de  $\text{CsPb}(\text{Cl}_x\text{Br}_{3-x})$  y  $\text{CsPbBr}_3$  NPs se determinó utilizando como estándar sulfato de quinina en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M ( $\Phi = 0,54$ ) para una longitud de onda de excitación de 310 nm.

Las imágenes de TEM se tomaron con los microscopios electrónicos de transmisión de 120 kV (JEM-1400, Flash) y 200 kV (JEM 2100F, JEOL). La distribución del tamaño de partícula se representó con formato de histograma a partir de las medidas del tamaño de partícula, obtenidas con el programa ImageJ sobre las imágenes de TEM. Las fotografías de los viales se tomaron bajo lámpara UV (VL-4.C  $\lambda_{\text{ex}}$  254nm, Vilber Lourmat).

### 3.5. Bibliografía

---

- (1) Rossi, C.; Scarfiello, R.; Brescia, R.; Goldoni, L.; Caputo, G.; Carbone, L.; Colombara, D.; De Trizio, L.; Manna, L.; Baranov, D. Exploiting the Transformative Features of Metal Halides for the Synthesis of CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> Core–Shell Nanocrystals. *Chem. Mater.* **2022**, *34* (1), 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.1c03749>.
- (2) Hu, Y.; Kareem, S.; Dong, H.; Xiong, W.; Tian, S.; Shamsi, J.; Li, L.; Zhao, X.; Xie, Y. CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> Core–Shell Nanoparticle Films for Superhydrophobic Coatings. *ACS Appl. Nano Mater.* **2021**, *4* (6), 6306–6315. <https://doi.org/10.1021/acsanm.1c01199>.
- (3) Yang, S.-A.; Choi, S.; Jeon, S. M.; Yu, J. Silica Nanoparticle Stability in Biological Media Revisited. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 185. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18502-8>.
- (4) Collantes, C.; Teixeira, W.; González Pedro, V.; Bañuls, M.-J.; Maquieira, Á. Designing Stable Lead Halide Perovskite Nanocrystals: From a Single Particle to Nanocomposites. *Appl. Mater. Today* **2023**, *31*, 101775. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2023.101775>.
- (5) Meng, C.; Yang, D.; Wu, Y.; Zhang, X.; Zeng, H.; Li, X. Synthesis of Single CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> Core–Shell Particles via Surface Activation. *J. Mater. Chem. C* **2020**, *8* (48), 17403–17409. <https://doi.org/10.1039/D0TC03932B>.
- (6) Zhong, Q.; Cao, M.; Hu, H.; Yang, D.; Chen, M.; Li, P.; Wu, L.; Zhang, Q. One-Pot Synthesis of Highly Stable CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> Core–Shell Nanoparticles. *ACS Nano* **2018**, *12* (8), 8579–8587. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b04209>.
- (7) Carulli, F.; He, M.; Cova, F.; Erroi, A.; Li, L.; Brovelli, S. Silica-Encapsulated Perovskite Nanocrystals for X-Ray-Activated Singlet Oxygen Production and Radiotherapy Application. *ACS Energy Lett.* **2023**, *8* (4), 1795–1802. <https://doi.org/10.1021/acsenenergylett.3c00234>.
- (8) He, M.; Zhang, Q.; Carulli, F.; Erroi, A.; Wei, W.; Kong, L.; Yuan, C.; Wan, Q.; Liu, M.; Liao, X.; Zhan, W.; Han, L.; Guo, X.; Brovelli, S.; Li, L. Ultra-Stable, Solution-Processable CsPbBr<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> Nanospheres for Highly Efficient Color Conversion in Micro Light-Emitting Diodes. *ACS Energy Lett.* **2023**, *8* (1), 151–158. <https://doi.org/10.1021/acsenenergylett.2c02062>.
- (9) Jeon, M.-G.; Kabir, R. MD.; Kim, S.; Kirakosyan, A.; Kim, C.-Y.; Lee, S. M.; Lee, D.-H.; Kim, Y.; Choi, J. Highly Processable and Stable PMMA-Grafted CsPbBr<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> Nanoparticles for down-Conversion Photoluminescence.

- Compos. Part B Eng.* **2022**, *239*, 109956.  
<https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2022.109956>.
- (10) Protesescu, L.; Yakunin, S.; Bodnarchuk, M. I.; Krieg, F.; Caputo, R.; Hendon, C. H.; Yang, R. X.; Walsh, A.; Kovalenko, M. V. Nanocrystals of Cesium Lead Halide Perovskites (CsPbX<sub>3</sub>, X = Cl, Br, and I): Novel Optoelectronic Materials Showing Bright Emission with Wide Color Gamut. *Nano Lett.* **2015**, *15* (6), 3692–3696.  
<https://doi.org/10.1021/nl5048779>.
- (11) Getachew, G.; Wibrianto, A.; Rasal, A. S.; Batu Dirersa, W.; Chang, J.-Y. Metal Halide Perovskite Nanocrystals for Biomedical Engineering: Recent Advances, Challenges, and Future Perspectives. *Coord. Chem. Rev.* **2023**, *482*, 215073. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215073>.
- (12) Guggisberg, D.; Yakunin, S.; Neff, C.; Aebli, M.; Günther, D.; Kovalenko, M. V.; Dirin, D. N. Colloidal CsPbX<sub>3</sub> Nanocrystals with Thin Metal Oxide Gel Coatings. *Chem. Mater.* **2023**, *35* (7), 2827–2834.  
<https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.2c03562>.
- (13) Huang, S.; Li, Z.; Kong, L.; Zhu, N.; Shan, A.; Li, L. Enhancing the Stability of CH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub>PbBr<sub>3</sub> Quantum Dots by Embedding in Silica Spheres Derived from Tetramethyl Orthosilicate in “Waterless” Toluene. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (18), 5749–5752. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b13101>.
- (14) Wang, W.; Li, J.; Ni, P.; Liu, B.; Chen, Q.; Lu, Y.; Wu, H.; Cao, B.; Liu, Z. Improved Synthesis of Perovskite CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> (X = Cl, Br, and I) Quantum Dots with Enhanced Stability and Excellent Optical Properties. *ES Mater. Manuf.* **2019**, *4*, 66–73. <https://doi.org/10.30919/esmm5f219>.
- (15) Li, S.; Lei, D.; Ren, W.; Guo, X.; Wu, S.; Zhu, Y.; Rogach, A. L.; Chhowalla, M.; Jen, A. K.-Y. Water-Resistant Perovskite Nanodots Enable Robust Two-Photon Lasing in Aqueous Environment. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 1192. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15016-2>.
- (16) Wang, X.; Zhuo, S.; Fu, J.; Li, X.; Zhao, X.; Jiang, H.; Lv, G.; Li, P.; Li, J.; Zhang, W.-H.; Ma, W. Hybrid Ligand Polymerization for Weakly Confined Lead Halide Perovskite Quantum Dots. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, *15* (16), 20208–20218. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c21464>.
- (17) Duan, Y.; Wang, D.-Y.; Costa, R. D. Recent Progress on Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Halide Perovskites@Metal Oxide. *Adv. Funct. Mater.* **2021**, *31* (49), 2104634.  
<https://doi.org/10.1002/adfm.202104634>.
- (18) Sun, C.; Zhang, Y.; Ruan, C.; Yin, C.; Wang, X.; Wang, Y.; Yu, W. W. Efficient and Stable White LEDs with Silica-Coated Inorganic Perovskite Quantum Dots. *Adv. Mater.* **2016**, *28* (45), 10088–10094.  
<https://doi.org/10.1002/adma.201603081>.

- (19) Zhao, H.; Wei, L.; Zeng, P.; Liu, M. Formation of Highly Uniform Thinly-Wrapped CsPbX<sub>3</sub>@silicone Nanocrystals via Self-Hydrolysis: Suppressed Anion Exchange and Superior Stability in Polar Solvents. *J. Mater. Chem. C* **2019**, *7* (32), 9813–9819. <https://doi.org/10.1039/C9TC01216H>.
- (20) Song, W.; Wang, Y.; Wang, B.; Yao, Y.; Wang, W.; Wu, J.; Shen, Q.; Luo, W.; Zou, Z. Super Stable CsPbBr<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> Tumor Imaging Reagent by Stress-Response Encapsulation. *Nano Res.* **2020**, *13* (3), 795–801. <https://doi.org/10.1007/s12274-020-2697-9>.
- (21) Akkerman, Q. A.; Park, S.; Radicchi, E.; Nunzi, F.; Mosconi, E.; De Angelis, F.; Brescia, R.; Rastogi, P.; Prato, M.; Manna, L. Nearly Monodisperse Insulator Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub> (X = Cl, Br, I) Nanocrystals, Their Mixed Halide Compositions, and Their Transformation into CsPbX<sub>3</sub> Nanocrystals. *Nano Lett.* **2017**, *17* (3), 1924–1930. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b05262>.
- (22) Wu, L.; Hu, H.; Xu, Y.; Jiang, S.; Chen, M.; Zhong, Q.; Yang, D.; Liu, Q.; Zhao, Y.; Sun, B.; Zhang, Q.; Yin, Y. From Nonluminescent Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub> (X = Cl, Br, I) Nanocrystals to Highly Luminescent CsPbX<sub>3</sub> Nanocrystals: Water-Triggered Transformation through a CsX-Stripping Mechanism. *Nano Lett.* **2017**, *17* (9), 5799–5804. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b02896>.
- (23) Palazon, F.; Urso, C.; De Trizio, L.; Akkerman, Q.; Marras, S.; Locardi, F.; Nelli, I.; Ferretti, M.; Prato, M.; Manna, L. Postsynthesis Transformation of Insulating Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>6</sub> Nanocrystals into Bright Perovskite CsPbBr<sub>3</sub> through Physical and Chemical Extraction of CsBr. *ACS Energy Lett.* **2017**, *2* (10), 2445–2448. <https://doi.org/10.1021/acsenergylett.7b00842>.
- (24) Udayabhaskararao, T.; Houben, L.; Cohen, H.; Menahem, M.; Pinkas, I.; Avram, L.; Wolf, T.; Teitelboim, A.; Leskes, M.; Yaffe, O.; Oron, D.; Kazes, M. A Mechanistic Study of Phase Transformation in Perovskite Nanocrystals Driven by Ligand Passivation. *Chem. Mater.* **2018**, *30* (1), 84–93. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b02425>.
- (25) Baranov, D.; Caputo, G.; Goldoni, L.; Dang, Z.; Scarfiello, R.; Trizio, L. D.; Portone, A.; Fabbri, F.; Camposeo, A.; Pisignano, D.; Manna, L. Transforming Colloidal Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>6</sub> Nanocrystals with Poly(Maleic Anhydride-Alt-1-Octadecene) into Stable CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Emitters through Intermediate Heterostructures. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (15), 3986–3995. <https://doi.org/10.1039/D0SC00738B>.
- (26) Palazon, F.; Almeida, G.; Akkerman, Q. A.; De Trizio, L.; Dang, Z.; Prato, M.; Manna, L. Changing the Dimensionality of Cesium Lead Bromide Nanocrystals by Reversible Postsynthesis Transformations with Amines. *Chem. Mater.* **2017**, *29* (10), 4167–4171. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b00895>.

- (27) Hu, H.; Wu, L.; Tan, Y.; Zhong, Q.; Chen, M.; Qiu, Y.; Yang, D.; Sun, B.; Zhang, Q.; Yin, Y. Interfacial Synthesis of Highly Stable CsPbX<sub>3</sub>/Oxide Janus Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (1), 406–412. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b11003>.
- (28) Li, M.; Zhang, X.; Yang, P. Controlling the Growth of a SiO<sub>2</sub> Coating on Hydrophobic CsPbBr<sub>3</sub> Nanocrystals towards Aqueous Transfer and High Luminescence. *Nanoscale* **2021**, *13* (6), 3860–3867. <https://doi.org/10.1039/D0NR08325A>.
- (29) Park, S.; An, M. N.; Almeida, G.; Palazon, F.; Spirito, D.; Krahne, R.; Dang, Z.; Trizio, L. D.; Manna, L. CsPbX<sub>3</sub>/SiO<sub>x</sub> (X = Cl, Br, I) Monoliths Prepared via a Novel Sol–Gel Route Starting from Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub> Nanocrystals. *Nanoscale* **2019**, *11* (40), 18739–18745. <https://doi.org/10.1039/C9NR07766A>.
- (30) Li, P.; Yang, D.; Tan, Y.; Cao, M.; Zhong, Q.; Chen, M.; Hu, H.; Sun, B.; Xu, Y.; Zhang, Q. Consecutive Interfacial Transformation of Cesium Lead Halide Nanocubes to Ultrathin Nanowires with Improved Stability. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (3), 3351–3359. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b19219>.
- (31) Liu, Z.; Bekenstein, Y.; Ye, X.; Nguyen, S. C.; Swabeck, J.; Zhang, D.; Lee, S.-T.; Yang, P.; Ma, W.; Alivisatos, A. P. Ligand Mediated Transformation of Cesium Lead Bromide Perovskite Nanocrystals to Lead Depleted Cs<sub>4</sub>PbBr<sub>6</sub> Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (15), 5309–5312. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b01409>.
- (32) Hintermayr, V. A.; Richter, A. F.; Ehrat, F.; Döblinger, M.; Vanderlinden, W.; Sichert, J. A.; Tong, Y.; Polavarapu, L.; Feldmann, J.; Urban, A. S. Tuning the Optical Properties of Perovskite Nanoplatelets through Composition and Thickness by Ligand-Assisted Exfoliation. *Adv. Mater.* **2016**, *28* (43), 9478–9485. <https://doi.org/10.1002/adma.201602897>.
- (33) May W., T.; Wiedmeyer H., R. A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. *At. Spectrosc.* **1998**, *19* (5), 150–155.
- (34) Zhou, Y.; Zhang, Y.; Ye, Y.; Hu, Y.; Zhang, W.; Li, K.; Liu, C. Effects of Ion-Exchange and Post-Thermal Annealing on the Precipitation of Cesium Lead Halide Nanocrystals in Glasses. *Ceram. Int.* **2023**, *49* (13), 21363–21369. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.03.265>.
- (35) Dursun, I.; De Bastiani, M.; Turedi, B.; Alamer, B.; Shkurenko, A.; Yin, J.; El-Zohry, A. M.; Gereige, I.; AlSaggaf, A.; Mohammed, O. F.; Eddaoudi, M.; Bakr, O. M. CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> Single Crystals: Synthesis and Characterization. *ChemSusChem* **2017**, *10* (19), 3746–3749. <https://doi.org/10.1002/cssc.201701131>.
- (36) Li, G.; Wang, H.; Zhu, Z.; Chang, Y.; Zhang, T.; Song, Z.; Jiang, Y. Shape and Phase Evolution from CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Nanocubes to Tetragonal

- CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> Nanosheets with an Indirect Bandgap. *Chem. Commun.* **2016**, 52 (75), 11296–11299. <https://doi.org/10.1039/C6CC05877A>.
- (37) Wang, K.-H.; Wu, L.; Li, L.; Yao, H.-B.; Qian, H.-S.; Yu, S.-H. Large-Scale Synthesis of Highly Luminescent Perovskite-Related CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> Nanoplatelets and Their Fast Anion Exchange. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55 (29), 8328–8332. <https://doi.org/10.1002/anie.201602787>.
- (38) Tang, X.; Hu, Z.; Yuan, W.; Hu, W.; Shao, H.; Han, D.; Zheng, J.; Hao, J.; Zang, Z.; Du, J.; Leng, Y.; Fang, L.; Zhou, M. Perovskite CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> Microplate Laser with Enhanced Stability and Tunable Properties. *Adv. Opt. Mater.* **2017**, 5 (3), 1600788. <https://doi.org/10.1002/adom.201600788>.
- (39) Han, C.; Li, C.; Zang, Z.; Wang, M.; Sun, K.; Tang, X.; Du, J. Tunable Luminescent CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> Nanoplatelets: Applications in Light-Emitting Diodes and Photodetectors. *Photonics Res.* **2017**, 5 (5), 473–480. <https://doi.org/10.1364/PRJ.5.000473>.
- (40) Li, J.; Zhang, H.; Wang, S.; Long, D.; Li, M.; Guo, Y.; Zhong, Z.; Wu, K.; Wang, D.; Zhang, T. Synthesis of All-Inorganic CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> Perovskite and Determination of Its Luminescence Mechanism. *RSC Adv.* **2017**, 7 (85), 54002–54007. <https://doi.org/10.1039/C7RA10693A>.
- (41) Liu, M.; Zhao, J.; Luo, Z.; Sun, Z.; Pan, N.; Ding, H.; Wang, X. Unveiling Solvent-Related Effect on Phase Transformations in CsBr–PbBr<sub>2</sub> System: Coordination and Ratio of Precursors. *Chem. Mater.* **2018**, 30 (17), 5846–5852. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.8b00537>.
- (42) Liu, Y.; Cai, L.; Xu, Y.; Li, J.; Qin, Y.; Song, T.; Wang, L.; Li, Y.; Ono, L. K.; Qi, Y.; Sun, B. In-Situ Passivation Perovskite Targeting Efficient Light-Emitting Diodes via Spontaneously Formed Silica Network. *Nano Energy* **2020**, 78, 105134. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2020.105134>.
- (43) Balakrishnan, S. K.; Kamat, P. V. Ligand Assisted Transformation of Cubic CsPbBr<sub>3</sub> Nanocrystals into Two-Dimensional CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> Nanosheets. *Chem. Mater.* **2018**, 30 (1), 74–78. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b04142>.
- (44) Millot, Y.; Hervier, A.; Ayari, J.; Hmili, N.; Blanchard, J.; Boujday, S. Revisiting Alkoxysilane Assembly on Silica Surfaces: Grafting versus Homo-Condensation in Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, 145 (12), 6671–6681. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c11390>.
- (45) Aneja, K. S.; Bohm, S.; Khanna, A. S.; Bohm, H. L. M. Graphene Based Anticorrosive Coatings for Cr(VI) Replacement. *Nanoscale* **2015**, 7 (42), 17879–17888. <https://doi.org/10.1039/C5NR04702A>.
- (46) Hou, Z.; Qu, W.; Kan, C. Synthesis and Properties of Triethoxysilane-Terminated Anionic Polyurethane and Its Waterborne Dispersions. *J.*

- Polym. Res.* **2015**, 22 (6), 111. <https://doi.org/10.1007/s10965-015-0757-8>.
- (47) Peng, S.; Zeng, Z.; Zhao, W.; Li, H.; Chen, J.; Han, J.; Wu, X. Novel Functional Hybrid Silica Sol–Gel Coating for Copper Protection via in Situ Thiol–Ene Click Reaction. *RSC Adv.* **2014**, 4 (30), 15776–15781. <https://doi.org/10.1039/C4RA00142G>.
- (48) Dobosz, P.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, A. Nanogold Bioconjugates for Direct and Sensitive Multiplexed Immunosensing. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 69, 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.007>.
- (49) Tripathi, K.; Driskell, J. D. Quantifying Bound and Active Antibodies Conjugated to Gold Nanoparticles: A Comprehensive and Robust Approach To Evaluate Immobilization Chemistry. *ACS Omega* **2018**, 3 (7), 8253–8259. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00591>.
- (50) Zhong, C.-Y.; Xiao, L.; Zhou, J.; Chen, Z.; Chen, Y.; Liu, Z.-Q.; Zhang, J. Z. Two-Photon Photoluminescence and Bio-Imaging Application of Monodispersed Perovskite-in-Silica Nanocrystals with High Biocompatibility. *Chem. Eng. J.* **2022**, 431, 134110. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.134110>.
- (51) Kar, M. R.; Kumar, S.; Acharya, T. K.; Goswami, C.; Bhaumik, S. Highly Water-Stable, Luminescent, and Monodisperse Polymer-Coated CsPbBr<sub>3</sub> Nanocrystals for Imaging in Living Cells with Better Sensitivity. *RSC Adv.* **2023**, 13 (9), 5946–5956. <https://doi.org/10.1039/D2RA07019G>.
- (52) Jiang, M.-C.; Lin, C.-Q.; Yang, Z.; Pan, C.-Y. Silica-Coated CsPbBr<sub>3</sub> Nanocrystals with High Stability for Bright White-Emitting Displays. *J. Solid State Chem.* **2023**, 318, 123724. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2022.123724>.
- (53) Liu, X.; Li, J.; Cui, X.; Wang, X.; Yang, D. Strategies for the Preparation of High-Performance Inorganic Mixed-Halide Perovskite Solar Cells. *RSC Adv.* **2022**, 12 (51), 32925–32948. <https://doi.org/10.1039/D2RA05535J>.
- (54) Zhang, Q.; Wang, B.; Zheng, W.; Kong, L.; Wan, Q.; Zhang, C.; Li, Z.; Cao, X.; Liu, M.; Li, L. Ceramic-like Stable CsPbBr<sub>3</sub> Nanocrystals Encapsulated in Silica Derived from Molecular Sieve Templates. *Nat. Commun.* **2020**, 11 (1), 31. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13881-0>.
- (55) An, M. N.; Park, S.; Brescia, R.; Lutfullin, M.; Sinatra, L.; Bakr, O. M.; De Trizio, L.; Manna, L. Low-Temperature Molten Salts Synthesis: CsPbBr<sub>3</sub> Nanocrystals with High Photoluminescence Emission Buried in Mesoporous SiO<sub>2</sub>. *ACS Energy Lett.* **2021**, 6 (3), 900–907. <https://doi.org/10.1021/acsenerylett.1c00052>.

- (56) Liu, Z.; Sinatra, L.; Lutfullin, M.; Ivanov, Y. P.; Divitini, G.; De Trizio, L.; Manna, L. One Hundred-Nanometer-Sized CsPbBr<sub>3</sub>/m-SiO<sub>2</sub> Composites Prepared via Molten-Salts Synthesis Are Optimal Green Phosphors for LCD Display Devices. *Adv. Energy Mater.* **2022**, *12* (38), 2201948. <https://doi.org/10.1002/aenm.202201948>.
- (57) Xia, L.; Yao, B.; Shi, H.; Shi, Z.; Wang, W.; Kan, Z. Fundamental Method for Controlling Monodisperse Silica Nanoparticles Dimension Assisted by Lysine. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2019**, *92* (1), 134–145. <https://doi.org/10.1007/s10971-019-05087-z>.
- (58) Jancik Prochazkova, A.; Demchyshyn, S.; Yumusak, C.; Másilko, J.; Brüggemann, O.; Weiter, M.; Kaltenbrunner, M.; Sariciftci, N. S.; Krajcovic, J.; Salinas, Y.; Kovalenko, A. Proteinogenic Amino Acid Assisted Preparation of Highly Luminescent Hybrid Perovskite Nanoparticles. *ACS Appl. Nano Mater.* **2019**, *2* (7), 4267–4274. <https://doi.org/10.1021/acsnm.9b00725>.
- (59) Hu, Y.-L.; Wen, Q.-L.; Pu, Z.-F.; Liu, A.-Y.; Wang, J.; Ling, J.; Xie, X.-G.; Cao, Q.-E. Rapid Synthesis of Cesium Lead Halide Perovskite Nanocrystals by L-Lysine Assisted Solid-Phase Reaction at Room Temperature. *RSC Adv.* **2020**, *10* (56), 34215–34224. <https://doi.org/10.1039/D0RA07589B>.
- (60) Xu, L.; Chen, J.; Song, J.; Li, J.; Xue, J.; Dong, Y.; Cai, B.; Shan, Q.; Han, B.; Zeng, H. Double-Protected All-Inorganic Perovskite Nanocrystals by Crystalline Matrix and Silica for Triple-Modal Anti-Counterfeiting Codes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (31), 26556–26564. <https://doi.org/10.1021/acсами.7b06436>.
- (61) Maes, J.; Balcaen, L.; Drijvers, E.; Zhao, Q.; De Roo, J.; Vantomme, A.; Vanhaecke, F.; Geiregat, P.; Hens, Z. Light Absorption Coefficient of CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Nanocrystals. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9* (11), 3093–3097. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.8b01065>.

# Capítulo 4

Estabilización de NCs de CsPbBr<sub>3</sub> en micelas poliméricas para su utilización en tira reactiva



## 4.1. Introducción

---

Existe una creciente demanda por métodos de detección rápidos que permitan el diagnóstico clínico y la monitorización de la seguridad alimentaria y medioambiental, sin la necesidad de recurrir a instrumentos sofisticados manejados por personal altamente cualificado.

El ejemplo más claro ha sido el escenario en sanidad en los últimos años que, marcado por la pandemia de la COVID-19, ha hecho necesario un cambio hacia una medicina más descentralizada, acompañado del desarrollo de dispositivos baratos, rápidos y de fácil manejo que permiten el diagnóstico en el punto de atención sanitaria o en el punto de necesidad, como es caso de los tests de antígenos frente al SARS-CoV-2.

Estas pruebas se han convertido en una herramienta clave para la identificación y aislamiento de los casos positivos de la población mediante rastreos masivos, en una situación desesperada por liberar la carga de pruebas RT-PCR y ELISAs, las cuales, a pesar de su gran sensibilidad y reproducibilidad, suponen un coste importante en tiempo, personal y equipamiento especializado.<sup>1</sup> Además, los tests de antígenos han demostrado ser útiles en el seguimiento de la infección por parte de la población general, por la sencillez y rapidez del ensayo (15 min), la facilidad para interpretar los resultados sin necesidad de instrumentación adicional y su bajo coste.

Estos ensayos inmunocromatográficos (*lateral flow immunoassays*, LFIA) permiten detectar la presencia o ausencia del analito mediante la formación de un inmunocomplejo en la línea de test (TL), visualizándose como una línea de color rojo intenso que proviene de las nanopartículas (NPs) de oro coloidal con las que se marca el anticuerpo de detección (**Figura 58**).

Los marcadores más extendidos en LFIA son las NPs de Au coloidal, ya que pueden sintetizarse con diferentes tamaños y formas, conjugarse de forma sencilla a anticuerpos, son relativamente estables y generan una señal que puede distinguirse a simple vista. En algunas aplicaciones la detección cualitativa es suficiente, por ejemplo, para determinar si una mujer está o no embarazada (*test de la hormona gonadotropina coriónica humana*). Sin embargo, en otras situaciones se requiere información cuantitativa que permita controlar los niveles de determinados biomarcadores. En ese caso, se puede recurrir a lectores basados en smartphones, los cuales permiten capturar imágenes de la tira reactiva y procesarlas para calcular la concentración del analito en base a una curva de calibrado previamente almacenada.<sup>2</sup>

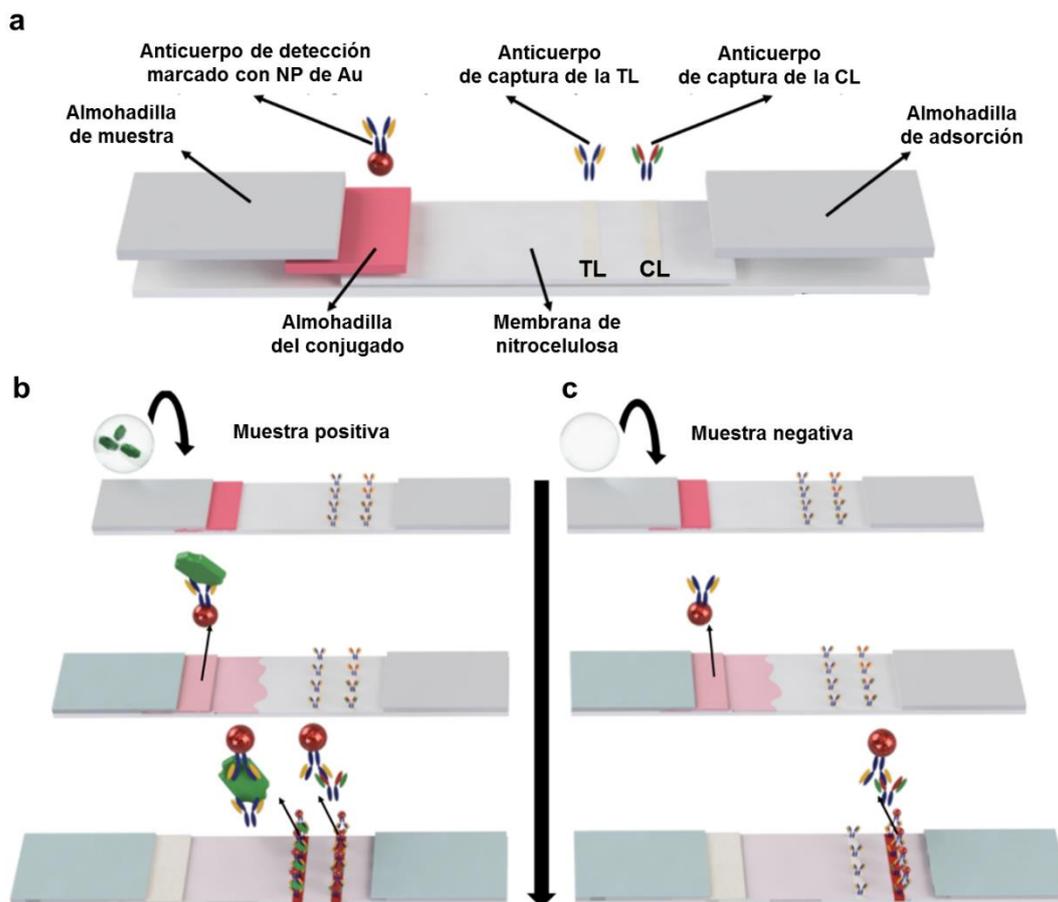


Figura 58. (a) La tira reactiva se compone de almohadilla de muestra, almohadilla del conjugado, membrana y almohadilla de adsorción. El anticuerpo de detección marcado con Au (conjugado), se inmoviliza en la almohadilla del conjugado. Los dos anticuerpos de captura se inmovilizan sobre las líneas de test (TL) y control (CL). Cuando la muestra se deposita en la almohadilla de muestra, fluye por capilaridad junto con el conjugado hasta la almohadilla de adsorción, atravesando la TL y CL. (b) En presencia de analito, éste es reconocido por el conjugado, formando un inmunocomplejo que queda retenido en la línea TL al interactuar con el anticuerpo de captura inmovilizado, por tanto, la TL se marca de rojo. A su vez, el exceso de conjugado que no ha interactuado con el analito, queda retenido en la CL, marcándose también de rojo. (c) En ausencia de analito, el conjugado solo se acumula en la CL. Imagen reproducida de Nature Protocols 2020, 15, 3788–3816

No obstante, los ensayos basados en la utilización de NPs de Au alcanzan una baja sensibilidad, pudiendo dar lugar a falsos negativos cuando la concentración del analito es baja. En este sentido, una de las estrategias para mejorar la sensibilidad de estos sistemas consiste en sustituir las NPs de Au por marcadores fluorescentes, ya que permite alcanzar una mayor relación señal-ruido al reducir la interferencia del fondo.<sup>3</sup>

Hasta ahora, se han utilizado diferentes tipos de marcadores fluorescentes para el desarrollo de LFIA: colorantes orgánicos (rojo Nilo,<sup>4</sup> Alexa Fluor 647,<sup>5</sup> Cy5,<sup>6</sup>), nanopartículas upconversion (UCNPs),<sup>7,8</sup> quantum dots (QDs)...

Los colorantes orgánicos son solubles en agua y fáciles de conjugar directamente a anticuerpos, aunque generalmente se cargan en NPs de poliestireno o de sílice para proporcionar una señal de fluorescencia más intensa. Sin embargo, tienen desplazamientos de Stokes cortos, que hacen que la señal interfiera con el ruido de fondo y tienen el inconveniente de que son susceptibles a degradarse frente a la exposición prolongada de la fuente de excitación.

Por otro lado, las UCNPs son nanomateriales dopados con iones de lantánido que se excitan en la región NIR (800-1.000 nm) y emiten en el UV o visible. Son fotoestables a largo plazo e incrementan la relación señal-ruido al utilizar una fuente NIR. Sin embargo, los métodos sintéticos son complicados y pueden implicar un alto coste de producción.<sup>9</sup>

Los QDs superan a los colorantes orgánicos debido a una mayor fotoestabilidad, alto PLQY, picos de emisión más estrechos y menor interferencia con el ruido de fondo. Se puede obtener una amplia gama de colores en función de su tamaño y excitarse simultáneamente utilizando una misma fuente de excitación, por lo que son ideales para detectar múltiples biomarcadores en una misma tira reactiva, en distintas líneas de detección,<sup>10,11</sup> o midiendo la intensidad de los picos correspondientes en una misma línea de detección.<sup>12</sup>

Los QDs más utilizados en LFIA son los del grupo II-VI, como por ejemplo los QDs de CdSe/ZnS,<sup>13,14</sup> aunque también hay trabajos desarrollados con los basados en InP, siendo una alternativa menos tóxica.<sup>3</sup>

Considerando la necesidad de desarrollar *kits* robustos, sensibles y económicos que puedan utilizarse en el punto de atención, es necesario tener en cuenta el coste de producción del marcador. En este sentido, los NCs de perovskita requieren condiciones más suaves de reacción, su síntesis es más sencilla y es posible alcanzar altos valores de PLQY sin necesidad de pasivar su superficie porque presentan mayor tolerancia frente a los defectos que los QDs. Además, reúnen propiedades ópticas similares: emisión estrecha, posibilidad de sintonizar su emisión para una amplia gama de colores en función de su composición y pueden excitarse bajo una misma longitud de onda. De modo que, en principio, la idea de implementarlos como marcadores en tira reactiva parece más apropiada.

Para ello, primero es necesario dar con metodologías sencillas y escalables que permitan sintetizar de forma reproducible partículas que contengan NCs de perovskita y se mantengan estables en medio acuoso y tampón salino sin deteriorar sus propiedades ópticas.

En el caso de los QDs, donde también es necesario recurrir a estrategias que permitan su transferencia a la fase acuosa, una de las opciones más extendidas consiste en funcionalizarlos con ácido 3-mercaptopropiónico (MPA), ya que facilita su dispersión en medio acuoso y proporciona un grupo carboxílico disponible para su conjugación a biomoléculas.<sup>15,16</sup> Para generar una señal lo suficientemente intensa, generalmente se recurre a una estrategia que consiste en adsorber múltiples QDs carboxilados en la superficie de nanopartículas de sílice mediante la intercalación de una fina capa de un polímero catiónico como la polietilenimida (PEI).<sup>10,14,17,18</sup>

También hay variaciones de este procedimiento donde, en lugar de depositar los QDs sobre NPs de SiO<sub>2</sub>, se realiza sobre NPs magnéticas, las cuales permiten incluir un previo tratamiento de la muestra para aislar y preconcentrar el analito en muestras complejas mediante la exposición frente a un campo magnético externo.<sup>19-22</sup> En algunos casos, otros diseños incorporan capas intermedias con NPs de Au de 3 nm o 20 nm, con lo que se consigue una detección dual (fluorimétrica y colorimétrica).<sup>13,23,24</sup>

En general, esta estrategia se caracteriza por generar nanoestructuras de 180-200 nm que tienen una buena dispersión y están cargadas por múltiples QDs, produciendo un aumento de la señal de fluorescencia y mejorando la sensibilidad del ensayo. En el caso de los NCs de perovskita, las estrategias de adsorción superficial no resultan viables, ya que los NCs quedan expuestos al contacto directo con el medio acuoso, lo que induce rápidamente su degradación.

Otra estrategia utilizada con QDs consiste en cargarlos en partículas de poliestireno (PS) mediante *swelling*.<sup>3</sup> Se trata de una metodología sencilla que consiste en incubar los QDs junto con las partículas de PS en un disolvente que produce que el polímero se hinche y permita la difusión de las NPs al interior. De esta forma, Wei et al incorporaron NCs de perovskita en micropartículas de 3 μm de PS (**Figura 59a**) y demostraron su estabilidad en agua, medios ácidos, alcalinos, tampón salino y medio de cultivo.<sup>25</sup> Sin embargo, determinaron que no resultaba efectivo al aplicarse con partículas de PS menor tamaño (400 y 800 nm) porque los NCs se distribuían de forma superficial y, por tanto, la fluorescencia desaparecía rápidamente al dispersarse en agua.

Por otro lado, las estrategias de atomización ofrecen la posibilidad de incorporar a los NCs de perovskita en el interior de partículas polímeros como PS,<sup>26,27</sup> PMMA,<sup>28,29</sup> policarbonato (PC),<sup>30</sup> fluoruro de polivinilideno (PVDF).<sup>31</sup> Sin embargo, salvo algunas excepciones, el tamaño de partícula resulta relativamente grande (del orden de varias micras) (**Figura 59b**). Además, como la superficie de la partícula tiene un fuerte carácter hidrófobo, al dispersarlas en medio acuoso es posible que tiendan a interaccionar y formar agregados.

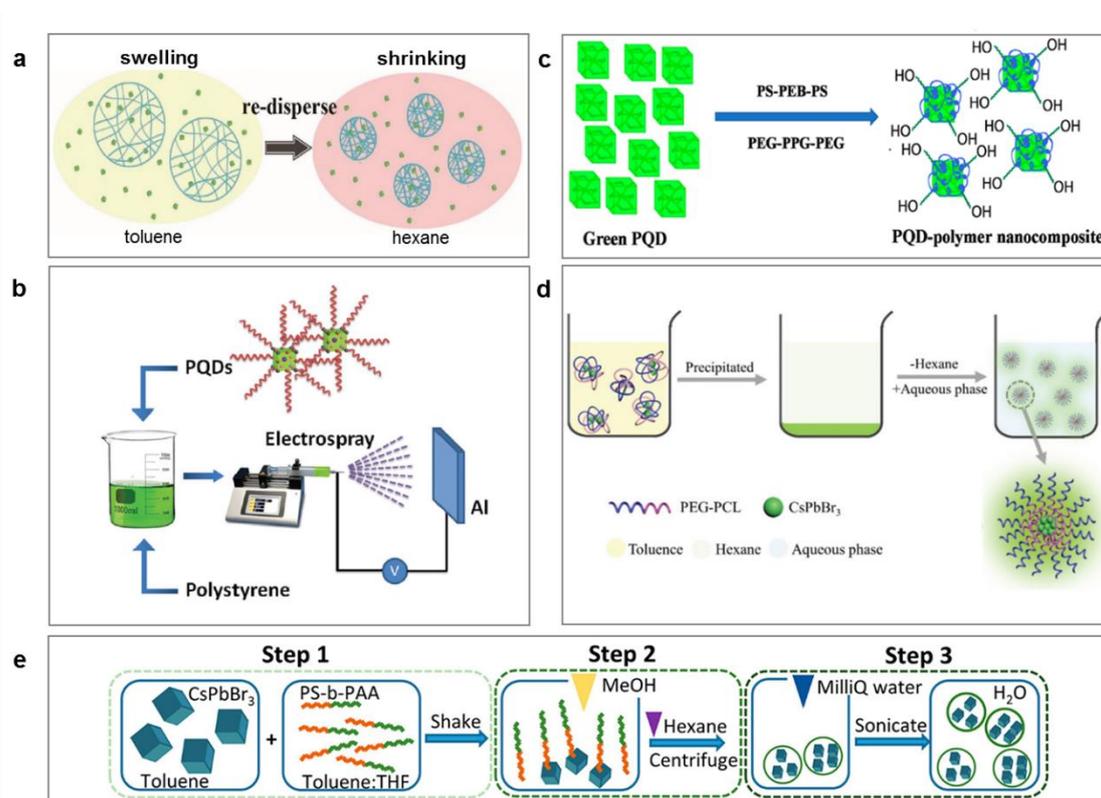


Figura 59. Estabilización de los NCs de perovskita en partículas poliméricas mediante varias metodologías (a) *swelling-shrinking*, (b) *electrospraying*, (c) combinación de polímeros hidrofóbicos e hidrofílicos, (d y e) coprecipitación mediante copolímeros anfifílicos. Imágenes reproducidas de (a) *Adv Funct Mat.* 2017, 1703535, 1–8, (b) *J. Mater. Chem. C*, 2018, 6, 7971, (c) *ACS Appl. Bio Mater.* 2019, 2, 5872–5879, (d) *Nanoscale*, 2021, 13, 14297, (e) *ACS Nano* 2022, 16, 9, 13657–13666

Una forma de mejorar la solubilidad de las partículas es recurrir a la combinación de polímeros hidrofóbicos e hidrofílicos. Por ejemplo, Pramanik *et al*, obtuvieron NCs de perovskita recubiertos por un polímero tribloque de poliestireno-polietilen brasilato-poliestireno (PS-PEB-PS) y posteriormente incorporaron otro polímero tribloque de polietilenglicol-polipropilenglicol-

polietilenglicol (PEG-PPG-PEG) para mejorar su dispersión en agua (**Figura 59c**).<sup>32</sup> Los nanocompuestos resultantes son biocompatibles, tienen un tamaño de 20 nm, exhiben alto PLQY (86%) y son estables en agua durante 8 días. Además, pueden conjugarse por adsorción pasiva a anticuerpos anti-CD63 para detectar específicamente exosomas derivados de cáncer de mama triple negativo.

También hay opciones más sencillas donde, en lugar de combinar varios polímeros, se utilizan directamente polímeros anfifílicos. Estos se caracterizan por tener un dominio hidrofóbico, que interacciona con los ligandos de los NCs y un dominio hidrofílico, que mejora su dispersión en agua y estabilidad coloidal.

Por ejemplo, Luo *et al* encapsularon NCs de perovskita en micelas constituidas por un copolímero de polietilenglicol y poliε-caprolactona (PEG-PCL) (**Figura 59d**).<sup>33</sup> En su metodología, inicialmente los NCs de perovskita y el polímero se dispersan en tolueno, posteriormente se induce su coprecipitación tras añadir hexano y finalmente, tras eliminar el hexano, se dispersan en agua. Como resultado se obtienen nanomicelas que tienen un tamaño de 50 nm, son biocompatibles, exhiben un PLQY del 54% y se mantienen óptica y coloidalmente estables en agua durante 15 días, permitiendo explorar su potencial en bioimagen intracelular e *in vivo*.

Por otro lado, Avugadda *et al* encapsularon NCs de perovskita en el interior de micelas poliméricas de un copolímero de poliestireno y ácido poliacrílico (PS-b-PAA) (**Figura 59e**).<sup>34</sup> De forma similar, los NCs se dispersan previamente en una mezcla de tolueno y THF y posteriormente se añade metanol y hexano para inducir la formación de las micelas y su precipitación, respectivamente. Las NPs resultantes han demostrado gran potencial para utilizarse como marcadores fluorescentes en bioimagen, puesto que tienen un PLQY relativamente alto (60%), son extremadamente estables durante 2 años y biocompatibles.

En base a estos resultados, se planteó la posibilidad de recurrir a esta estrategia para explorar su utilización como marcadores fluorescentes en sistemas analíticos. Para ello se plantearon los siguientes objetivos:

1. Síntesis de nanocápsulas de CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA mediante la metodología de coprecipitación descrita por Avugadda *et al*.<sup>34</sup>
2. Estudio de las variables de la metodología para optimizar las condiciones de síntesis.
3. Utilización de las nanocápsulas como marcadores fluorescentes en tira reactiva como plataforma de ensayo.

## 4.2. Resultados

### I. Síntesis de nanocápsulas de CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA

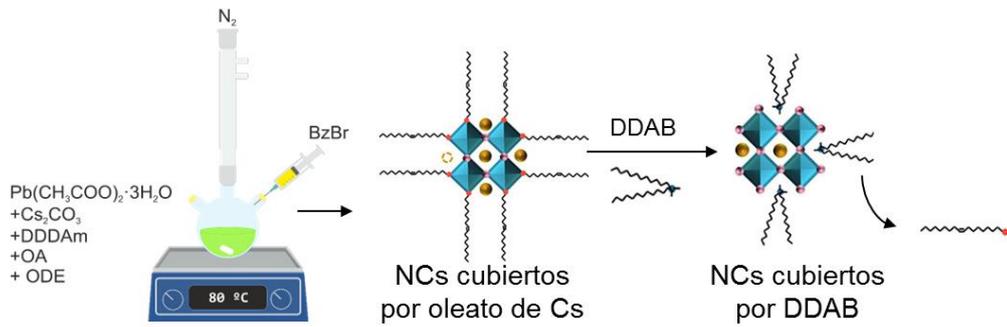
Los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> se sintetizaron según la metodología de Imran *et al*,<sup>35</sup> ya que permite obtener una población uniforme de NCs cúbicos sin contaminación con otras nanoestructuras, como las nanoplaquetas (NPLs).

Se trata de una síntesis alternativa a la metodología convencional en la cual se emplea ácido oleico (OA) como único surfactante para el crecimiento de los NCs. La oleilamina es sustituida por una amina secundaria que, en su forma de ion de amonio protonado, no es capaz de unirse a la superficie del NC de forma tan efectiva a como lo hacen las aminas primarias. Por tanto, al no competir con los iones Cs<sup>+</sup> por la pasivación de la superficie del NC, se inhibe el crecimiento de NPLs. Estas nanoestructuras 2D, se caracterizan por tener un grosor de unos pocos nanómetros y una emisión desplazada hacia el azul.<sup>36</sup> Se generan cuando el OA se encuentra en exceso o cuando la inyección de oleato de cesio (Cs-OA) se hace a una temperatura inferior a 150 °C.<sup>37</sup>

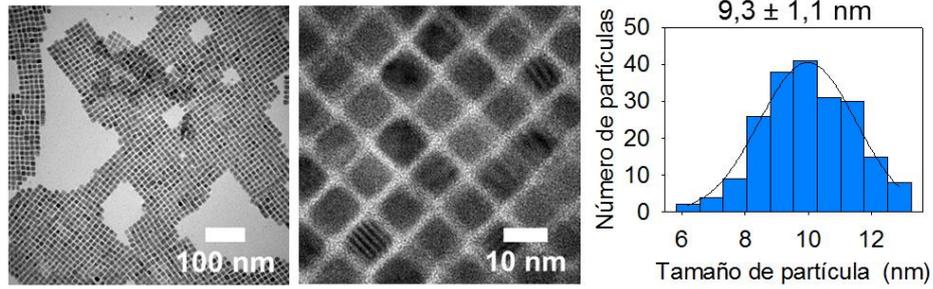
La caracterización de los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> sintetizados se incluye en la **Figura 60a**. Las imágenes de TEM demuestran que con esta metodología se obtiene una población monodispersa de NCs cúbicos ( $9,3 \pm 1,1$  nm). La emisión es estrecha (*fwhm* de 19 nm) y el máximo se localiza a 514 nm.

Uno de los inconvenientes de la síntesis de Imran *et al* es la baja estabilidad coloidal de los NCs resultantes.<sup>35</sup> En menos de 2 días tienden a agregarse. Como alternativa, se recurrió a un tratamiento postsintético sobre la superficie del NC que consiste en la sustitución del ligando nativo (Cs-OA) por bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB), una sal de amonio cuaternario. Con este tratamiento es posible intercambiar prácticamente el 90% de las especies de oleato de la superficie del NC en un solo ciclo.<sup>38</sup> No solo mejora la estabilidad coloidal (al menos 3 semanas), sino que además incrementa el PLQY hasta ~ 100% al pasivar casi por completo la superficie del NC original.

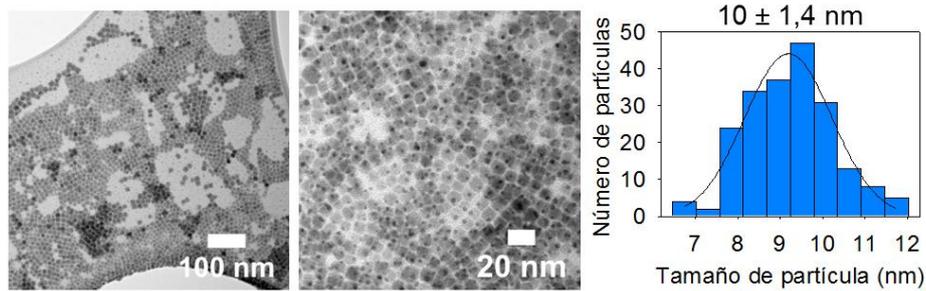
El intercambio de Cs-OA por DDAB no afectó a la morfología o al tamaño del NC ( $10 \pm 1,4$  nm) (**Figura 60b**). Únicamente se produjo un ligero desplazamiento del máximo de emisión de fluorescencia de 514 a 510 nm, pero el *fwhm* se mantuvo constante.



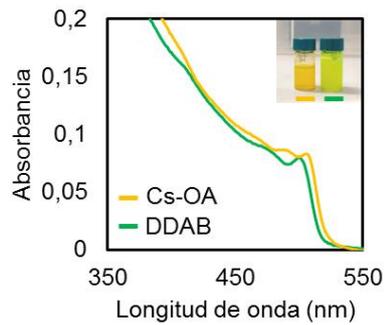
**a** NCs de CsPbBr<sub>3</sub> cubiertos por Cs-OA



**b** NCs de CsPbBr<sub>3</sub> cubiertos por DDAB



**c**



**d**

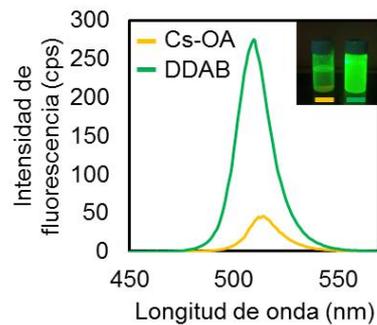


Figura 60. Esquema del procedimiento de síntesis de los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> e intercambio del ligando nativo (Cs-OA) por DDAB. (a y b) Caracterización de los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> cubiertos por Cs-OA y DDAB, respectivamente. Se muestran imágenes a bajos y altos aumentos junto con el histograma de la distribución de tamaños de partícula. Caracterización de las propiedades ópticas mediante los espectros de (c) absorción y (d) emisión de fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}}$  355 nm). En el recuadro superior de ambos espectros se incluye la imagen de los NCs bajo luz Vis y UV ( $\lambda_{\text{ex}}$  254 nm).

Posteriormente, se procedió a reproducir la metodología de síntesis de nanocápsulas de CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA,<sup>34</sup> con los dos tipos de NCs, cubiertos por Cs-OA o por DDAB, respectivamente.

El procedimiento (**Figura 61**) se resume en los siguientes pasos: (1) Inicialmente el copolímero anfifílico PS-b-PAA se disuelve en una mezcla de tolueno y tetrahidrofurano (THF) y se le añaden los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> en tolueno. (2) Posteriormente, se inyecta gradualmente metanol, que actúa como antidisolvente para el bloque hidrofóbico, induciendo la formación de micelas. Los NCs que no han sido atrapados en su interior se degradan, al ser incompatibles con el antidisolvente. (3) Finalmente, las nanocápsulas se purifican y se dispersan en agua.

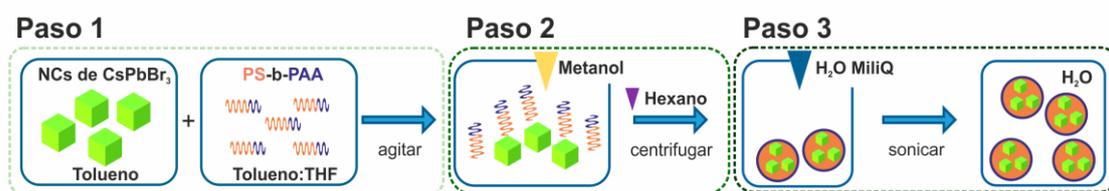


Figura 61. Esquema de la metodología de síntesis de nanocápsulas de CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA estables en agua. (1) La disolución precursora contiene los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> y el copolímero PS-b-PAA en una mezcla tolueno:THF. (2) Al inyectar el antidisolvente (metanol), se desencadena la formación de las nanocápsulas de CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA. (3) Dispersión de las cápsulas en agua. Imagen reproducida de ACS Nano 2022, 16, 9, 13657-13666.

Los resultados de la síntesis de nanocápsulas de CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA se muestran en la **Figura 62**. En ningún caso se obtuvieron partículas, sino un gran aglomerado de polímero. La única diferencia es que la muestra preparada con los NCs cubiertos por Cs-OA (M1\*) es más fluorescente, lo que indica que un mayor porcentaje de NCs queda atrapado en la matriz polimérica. Esto se atribuye a que el bloque de poliestireno se intercala mejor en la superficie de los NCs sin tratar, al presentar un mayor número de vacantes.

Este resultado resalta la importancia de considerar la naturaleza de los ligandos que cubren la superficie de los NCs, ya que la internalización y ubicación de los NCs en el interior de las micelas poliméricas depende en gran medida de la química de su superficie.<sup>39,40</sup>

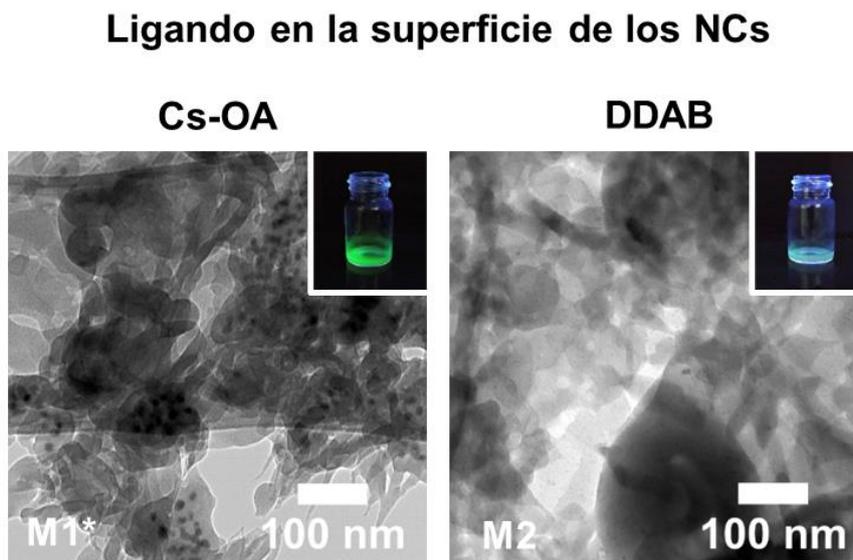


Figura 62. Ligando de superficie del NC: Cs-OA y DDAB. Se corresponden con las muestras 1 y 2 de la Tabla 12 (apartado “Materiales y métodos”). La condición seleccionada se resalta con (\*)

En base a los resultados obtenidos se procedió a estudiar las variables de la metodología para tener un mejor control del proceso. Pese a la baja estabilidad coloidal de los NCs cubiertos por Cs-OA (M1\*), se seleccionaron como material de partida por su mayor compatibilidad con el proceso de coprecipitación. Para evitar que la coalescencia de los NCs se convirtiera en una variable más, se optó por trabajar siempre con material recién sintetizado.

## II. Estudio de las variables de la metodología

### A. Efecto del antidisolvente (metanol)

#### Velocidad de adición

Con intención de resolver el problema de agregación del polímero, se incrementó la velocidad de inyección de metanol, ya que velocidades más rápidas permiten generar partículas más pequeñas.<sup>34</sup> Las condiciones fueron las siguientes: 250  $\mu\text{L}/\text{min}$  (control), 1.500  $\mu\text{L}/\text{min}$  y una inyección rápida.

En la **Figura 63**, se muestran las imágenes de TEM acompañadas con una fotografía bajo luz visible (izquierda) y luz UV  $\lambda_{ex}$  254 nm (derecha).

A simple vista, pudo comprobarse que la inyección de metanol a 250 y 1.500  $\mu\text{L}/\text{min}$  generaba agregados que se depositaban por las paredes del vial, mientras que cuando la inyección se realizaba de forma rápida la disolución adquiría un aspecto más uniforme.

La intensidad de fluorescencia también fue más alta al compararla bajo la lámpara UV con las dos primeras muestras, lo que confirma que la inyección rápida mejora la eficiencia de la encapsulación.

La caracterización de las muestras por TEM corrobora la aglomeración del polímero en condiciones de inyección lentas. Sus dimensiones disminuyen cuando la inyección se hace de forma rápida, e incluso ocasionalmente se distingue alguna partícula aislada de aspecto similar al deseado, esférica y con múltiples NCs en su interior.

Por tanto, los mejores resultados se obtuvieron para la inyección rápida de metanol (M5\*).

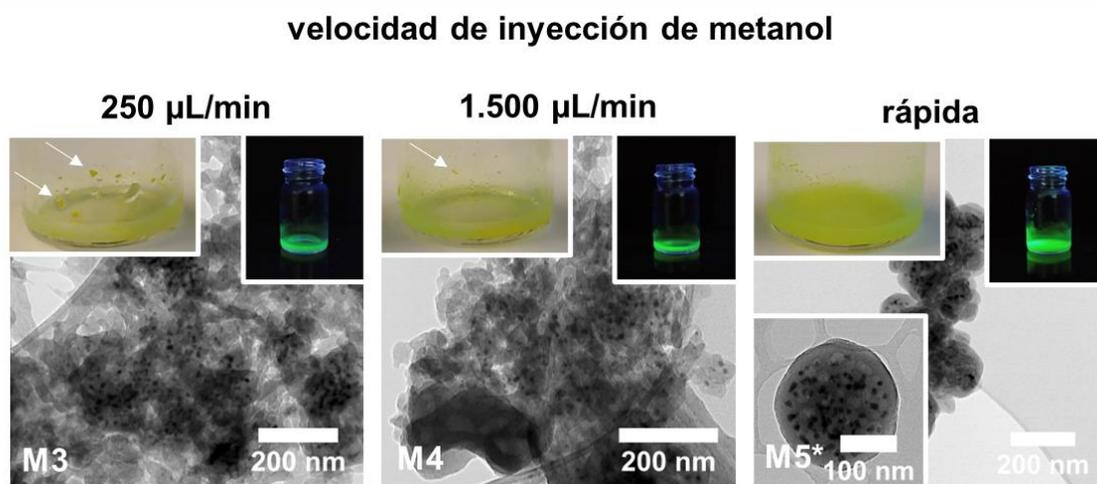


Figura 63. Velocidad de inyección de metanol: 250  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 1.500  $\mu\text{L}/\text{min}$  e inyección rápida. Muestras 3-5 de la Tabla 12 (apartado "Materiales y métodos"). La condición seleccionada se resalta con (\*)

### Volumen de antidisolvente

Además de la velocidad de inyección, también es importante determinar el volumen y el número de inyecciones a realizar para añadir la totalidad del antidisolvente.

De acuerdo con la metodología de referencia, el volumen total de metanol (850  $\mu\text{L}$ ) se añade en tres pasos, primero 150  $\mu\text{L}$  (a 250  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), después 400  $\mu\text{L}$  y por último 300  $\mu\text{L}$ . A partir de estos datos se probaron distintas combinaciones para analizar el efecto del volumen total (550 ó 850  $\mu\text{L}$ ) y el número de adiciones (una, dos o tres) en la formación de partículas poliméricas.

Los resultados de estas condiciones se muestran en la **Figura 64**.

En primer lugar, se observa que independientemente del volumen total de antidisolvente (550 ó 850  $\mu\text{L}$ ), la intensidad de fluorescencia es mayor cuando la inyección se realiza de forma gradual (en dos o tres adiciones) (M7, M9\* y M10). Mientras que cuando se añade directamente (M6 y M8), la fluorescencia es muy tenue. Esto indica que cuando se añade un volumen relativamente grande de metanol en un solo paso, los NCs se degradan antes de ser atrapados en el interior de las micelas, por tanto, el cambio de solubilidad debe hacerse de forma progresiva.

También se observan diferencias al comparar la inyección gradual de un volumen total de 550  $\mu\text{L}$  frente a un volumen de 850  $\mu\text{L}$ , obteniendo una intensidad de fluorescencia ligeramente superior cuando el volumen de inyección es mayor, a la vez que el tamaño de partícula disminuye de 800 nm cuando se inyectan 550  $\mu\text{L}$  (M7) a 500 nm cuando se inyectan 850  $\mu\text{L}$  (M9\* y M10).

Por último, se procedió a replicar las condiciones de inyección, en este caso sumergiendo los viales en un baño de ultrasonidos, con intención de reducir el tamaño de las partículas. Los resultados obtenidos fueron muy similares a las condiciones iniciales (M11-M15).

Como no había grandes diferencias entre la inyección de 850  $\mu\text{L}$  en dos (M9\*) o tres adiciones (M10), se optó por seleccionar las condiciones más simples de trabajo, resultando en la condición óptima de un volumen de inyección de 850  $\mu\text{L}$  en dos adiciones sin agitación (M9\*).

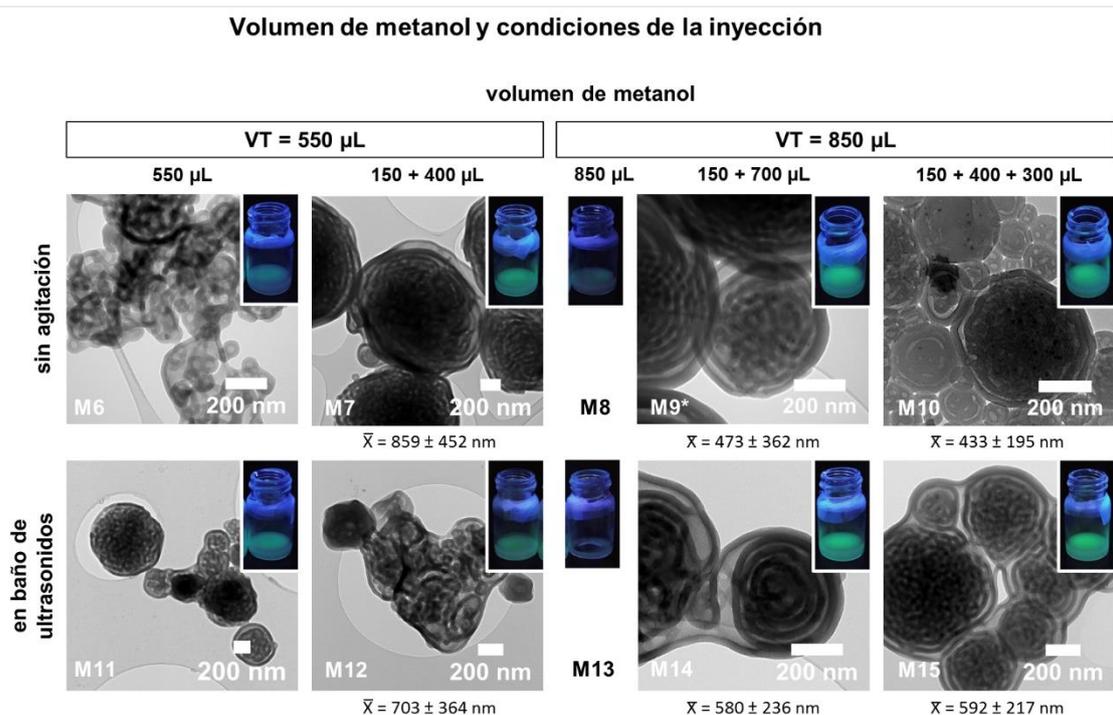


Figura 64. Volumen de metanol como antidisolvente. Volumen total de 550  $\mu$ L en una y dos adiciones (150 + 400  $\mu$ L) y de 850  $\mu$ L en una, dos (150 + 700  $\mu$ L) y tres adiciones (150 + 400 + 700  $\mu$ L). En condiciones sin agitación y en baño de ultrasonidos. Muestras 6-15 de la Tabla 12 (apartado “Materiales y métodos”). La condición seleccionada se resalta con (\*)

## B. Efecto del polímero

### Concentración de polímero

Hasta el momento, las partículas resultantes difieren de las partículas de referencia, tanto en tamaño como en morfología. Se trata de partículas de gran tamaño que presentan cavidades internas, dispuestas aleatoriamente (M9\*) o de forma concéntrica con interespaciado entre las paredes (M14).

La aparición de estas estructuras se asocia con una concentración alta de polímero,<sup>41,42</sup> por lo que el siguiente parámetro a optimizar fue su concentración. Para ello, se establecieron tres concentraciones decrecientes de PS<sub>29</sub>-b-PAA<sub>5</sub> en la mezcla de reacción: 25,6, 12,8 y 6,4 mg/mL.

En los resultados de TEM (**Figura 65**), se puede apreciar cómo se reduce el tamaño de las partículas a medida que disminuye la concentración de polímero y evolucionan de una organización multilaminar (M16) a una morfología esférica (M18\*). Por tanto, se optó por la concentración más baja de las tres (6,4 mg/mL).

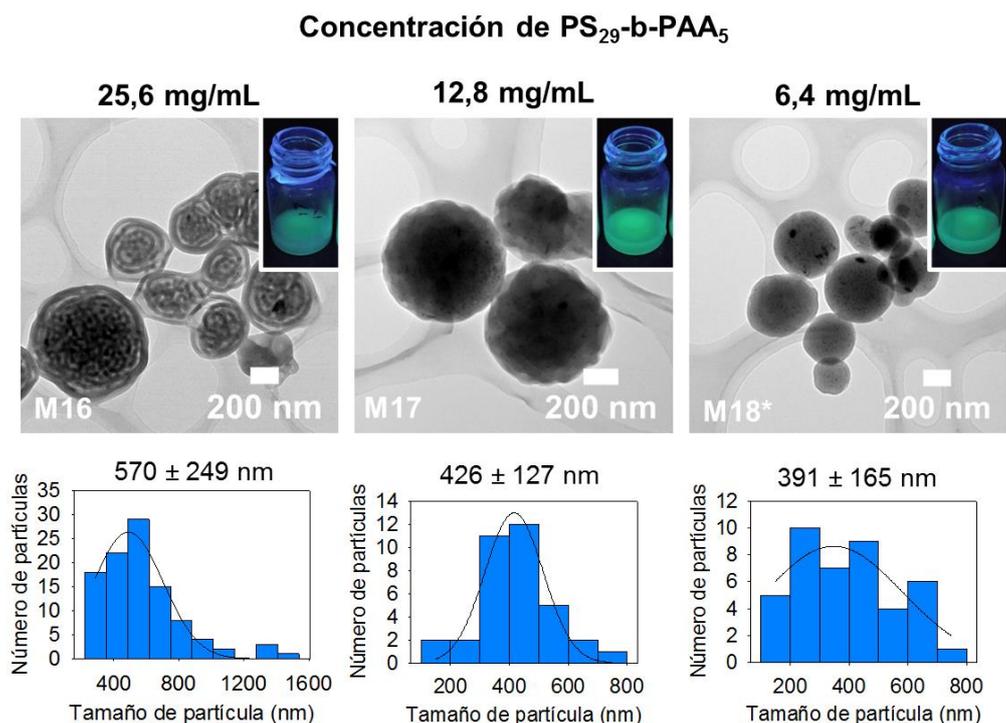


Figura 65. Concentración final de polímero PS<sub>29</sub>-b-PAA<sub>5</sub> en tolueno: 25,6 mg/mL 12,8 mg/mL y 6,4 mg/mL. Muestras 16-18 de la Tabla 12 (apartado “Materiales y métodos”). La condición seleccionada se resalta con (\*)

#### Relación entre la concentración de NCs y de polímero

En este apartado se estudia el efecto de la combinación de dos variables: concentración de NCs de CsPbBr<sub>3</sub> y concentración del copolímero PS<sub>29</sub>-b-PAA<sub>5</sub>. Para ello, se diseñó un ensayo 3x4, donde se establecieron 3 concentraciones de NCs y 4 concentraciones de polímero. En ambos casos, la concentración máxima se diluyó seriadamente a la mitad.

La **Tabla 12** (apartado “Materiales y métodos”) indica cómo se prepararon cada una de las muestras. La concentración de los NCs en el volumen total de reacción (Vt =125 µL) varía de 0,42 a 1,68 µM. Mientras que la concentración de polímero varía desde 1,6 hasta 12,8 mg/mL (equivalente a 47,06 y 376,47 µM). Los resultados de la caracterización de todas las combinaciones de la matriz se muestran en la **Figura 66**.

En todos los casos se observa que, para una concentración fija de NCs, la intensidad de fluorescencia decae drásticamente al traspasar una determinada concentración de polímero, a la que denominaremos *concentración umbral de polímero* (CUP). Este valor varía proporcionalmente respecto a la concentración

de NCs, lo que refleja la importancia de mantener una relación determinada entre ambos componentes. Cuanto mayor es la concentración de NCs, mayor es su valor de CUP. (**Figura 66-I-II**).

Cuando la relación  $\mu\text{M}$  de NCs CsPbBr<sub>3</sub>/PS<sub>29</sub>-b-PAA<sub>5</sub> en la mezcla de reacción es óptima (= 0,002), las micelas están cargadas con nanopartículas de 9,5 nm, correspondientes con NCs de CsPbBr<sub>3</sub> (**Figura 67a**). Por debajo de esta relación aparecen micelas mixtas, donde una segunda población de partículas de tamaño inferior (~ 2,5 nm) compite con la de NCs nativos (**Figura 67b**). A medida que disminuye la concentración de polímero, aumenta su prevalencia hasta ser la mayoritaria (**Figura 67c**), hecho que coincide con la pérdida de la fluorescencia emitida. Por tanto, lo lógico es que esta segunda población derive de la degradación de los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> que han entrado en contacto con el antidisolvente durante el proceso de encapsulación.

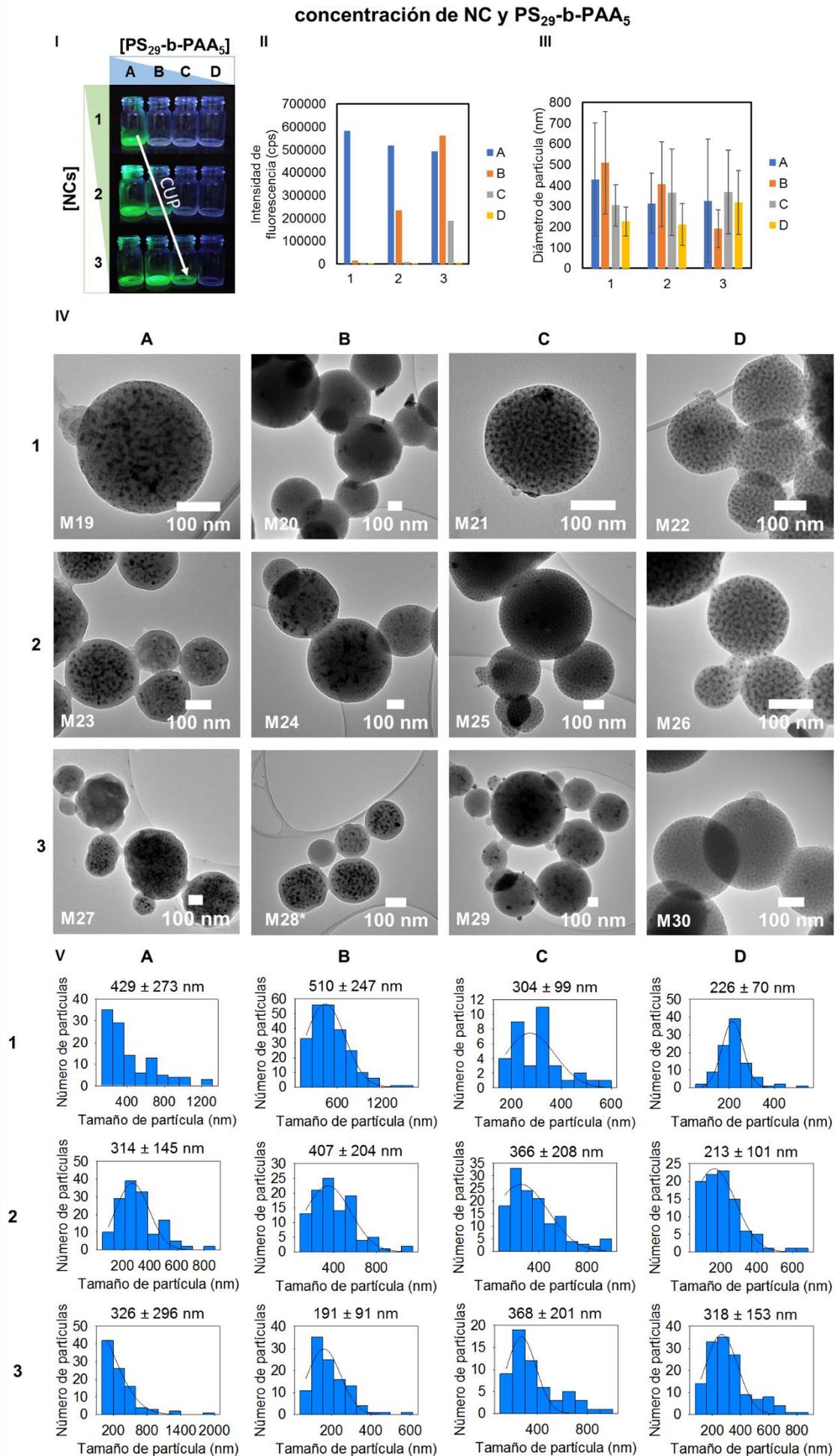


Figura 66. Concentración de NCs y de polímero PS<sub>29</sub>-b-PAA<sub>5</sub>. Para esta matriz, los números 1-3 representan la concentración de NCs en la mezcla de reacción en orden decreciente, 1,68, 0,84 y 0,42  $\mu$ M. Por otro lado, las letras A-D representan la concentración de polímero en la mezcla de reacción en orden decreciente, siendo A = 12,8 mg/mL (376,5  $\mu$ M), B = 6,4 mg/mL (188,2  $\mu$ M), C = 3,2 mg/mL (94,1  $\mu$ M) y D = 1,6 mg/mL (47  $\mu$ M). Las condiciones de cada muestra se pueden consultar en la Tabla 12 (apartado "Materiales y métodos"), 1A-D (muestras 19-22), 2A-D (muestras 23-26) y 3A-D (muestras 27-30). La condición seleccionada se resalta con (\*)

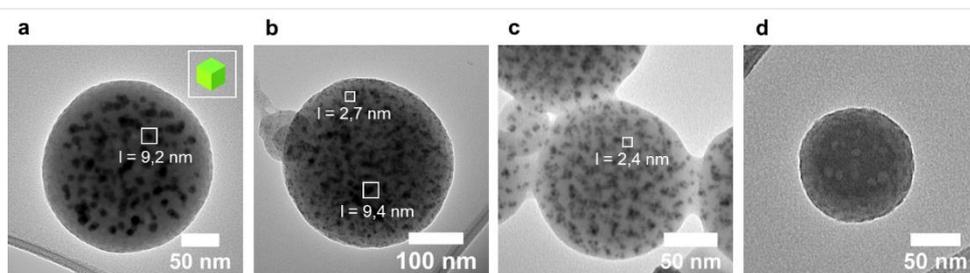


Figura 67. Imágenes de TEM de los tipos de micelas poliméricas en función de su contenido: a) NCs de CsPbBr<sub>3</sub> (~ 9,5 nm), b) mixtas (NCs de CsPbBr<sub>3</sub> y NPs no fluorescentes de ~ 2,5 nm), c) NPs de ~ 2,5 nm y d) vacías

La relación óptima de NCs CsPbBr<sub>3</sub>/PS<sub>29</sub>-b-PAA<sub>5</sub> se cumple en las muestras M23 (posición 2A de la matriz: 0,84  $\mu$ M NCs y 376,47  $\mu$ M polímero) y M28\* (posición 3B de la matriz: 0,42  $\mu$ M NCs y 188,2  $\mu$ M polímero). A pesar de que la relación es la misma, en M23 se obtienen partículas más polidispersas ( $314 \pm 145$  nm) que en M28\* disminuye la variación ( $191 \pm 91$  nm), posiblemente debido a que la concentración de polímero en la disolución es mayor.

Llegados a este punto, las condiciones de la muestra M28\* (posición 3B en la matriz) reprodujeron resultados similares a los descritos por la metodología de referencia, por lo que se dio por finalizada la optimización de la síntesis.

No obstante, sería interesante comprobar si la tendencia que reflejan los resultados sigue cumpliéndose al desplazarse diagonalmente en la matriz hacia concentraciones más bajas de NCs y de polímero, con lo que se conseguiría seguir disminuyendo el tamaño de la micela. Por ejemplo, las siguientes proporciones a analizar serían las siguientes: 4C (0,21  $\mu$ M de NCs y 3,2 mg/mL PS-b-PAA), 5D (0,1  $\mu$ M de NCs y 1,6 mg/mL de PS-b-PAA) y 6E (0,05  $\mu$ M de NCs y 0,8 mg/mL de PS-b-PAA).

Según la bibliografía, la concentración de polímero PS<sub>250</sub>-b-PAA<sub>13</sub> en la mezcla de reacción para encapsular otro tipo de nanopartículas de tamaño similar, como QDs de CdSe@ZnS (6 nm),<sup>43</sup>  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (11 nm),<sup>44</sup> y Au (12 nm),<sup>45</sup>

oscila entre 0,1 y 1 mg/mL. Trabajando en este rango es posible obtener micelas con un tamaño inferior a 50 nm y modular la carga en función de la concentración de NPs y de la velocidad de inyección de antidisolvente. La adición lenta desencadena encapsulación a nivel de una sola partícula, mientras que la adición rápida genera micelas cargadas con múltiples partículas.

### C. Aumento de la producción y purificación

Por último, con el fin de incrementar la producción de partículas con las mismas prestaciones, se planteó la posibilidad de aumentar proporcionalmente el volumen de reacción (x20 y x40).

Los resultados (**Figura 68**) muestran que en los tres casos (M31-M33) se obtienen NPs esféricas similares, de tamaño medio de 240 nm, cargadas con múltiples NCs en su interior, lo que demuestra la sencillez, robustez y reproducibilidad de la estrategia.

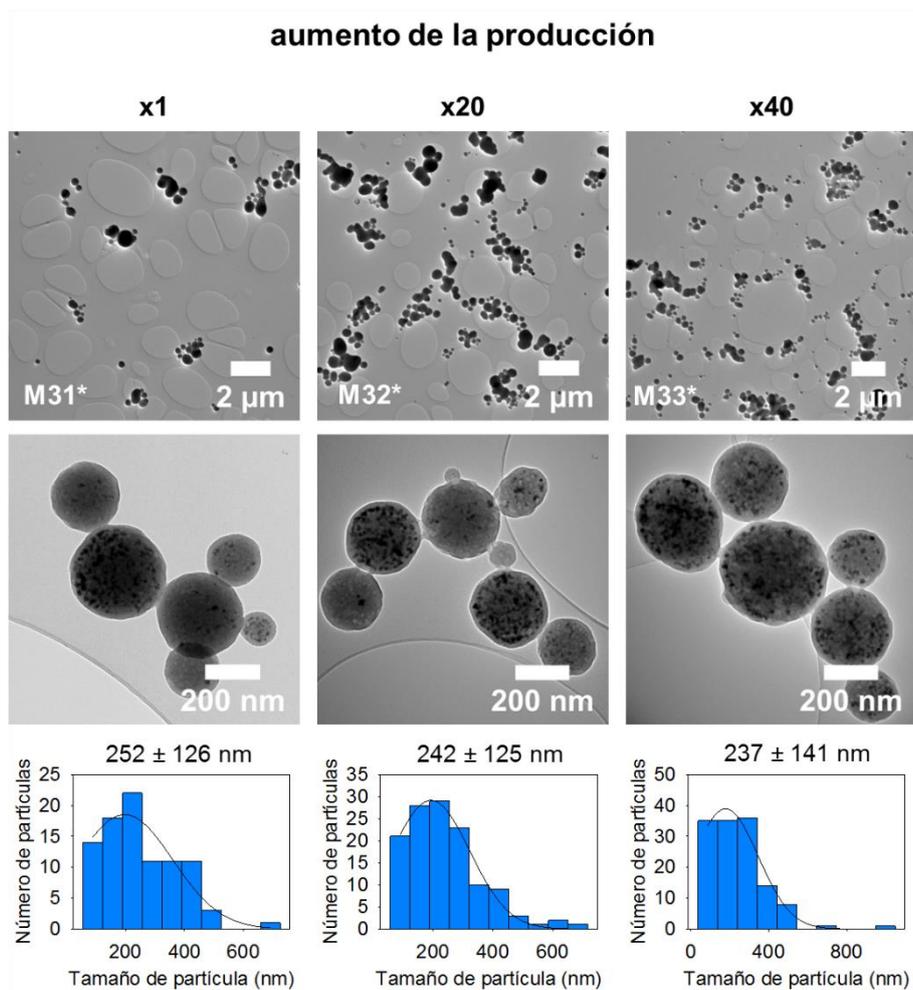


Figura 68. Aumento de la producción de partículas: x1, x20 y x40. Muestras 31-33 de la Tabla 12 (apartado "Materiales y métodos"). La condición seleccionada se resalta con (\*)

Ocasionalmente, aparecen partículas que se agregan dando lugar a estructuras de gran tamaño (> 600 nm) (**Figura 69**, aparecen recuadrados en blanco)

Para separarlas de la muestra se probaron varias condiciones de centrifugado: revoluciones bajas o intermedias durante 15 min y revoluciones altas durante menos tiempo (1 min). La única condición que consiguió separar estos agregados fue la de 661 rcf durante 15 min.

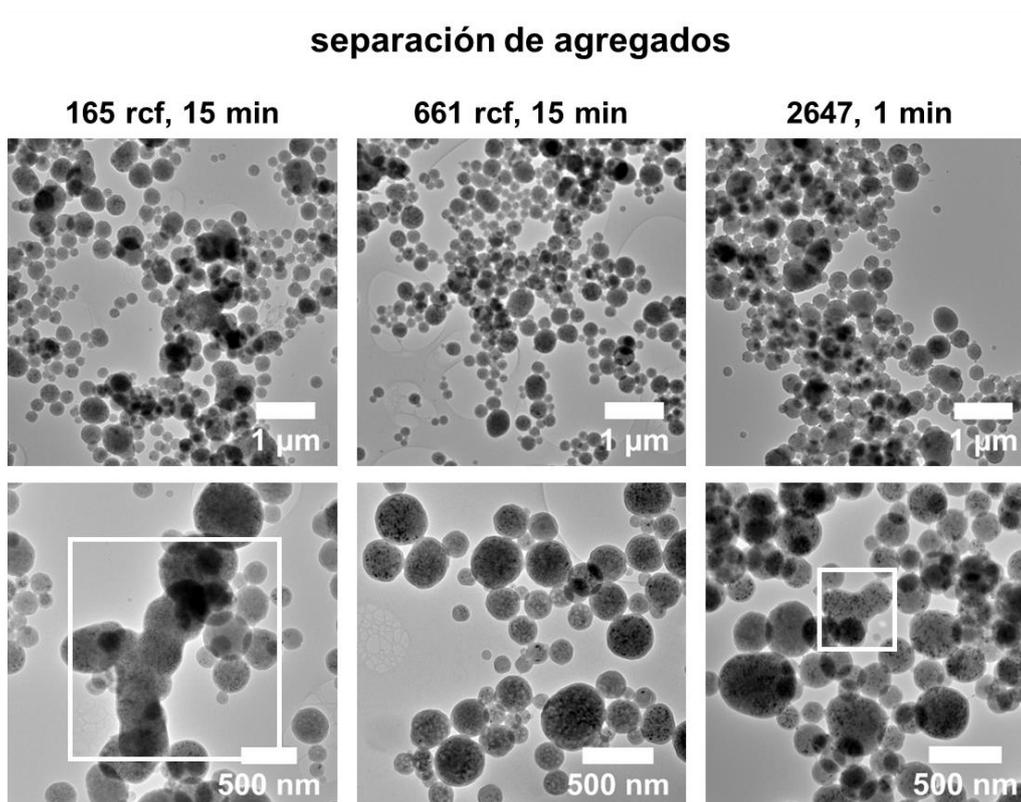


Figura 69. Condiciones para la separación de los agregados de mayor tamaño: 165 rcf 15 min, 661 rcf 15 min, 2647 rcf 1 min. En la fila superior se muestra una imagen representativa de TEM a bajos aumentos, mientras que en la fila inferior se muestra una región con más detalle. El recuadro con contorno en blanco resalta la presencia de los agregados

La **Figura 70** resume las características de las nanopartículas obtenidas a partir de la optimización de la estrategia de coprecipitación de los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> en micelas de PS<sub>29</sub>-b-PAA<sub>5</sub>. Se consiguen NPs con un tamaño de 209 ± 77 nm que contienen múltiples NCs en su interior y cuya emisión máxima a 517 nm se mantiene estable en metanol.

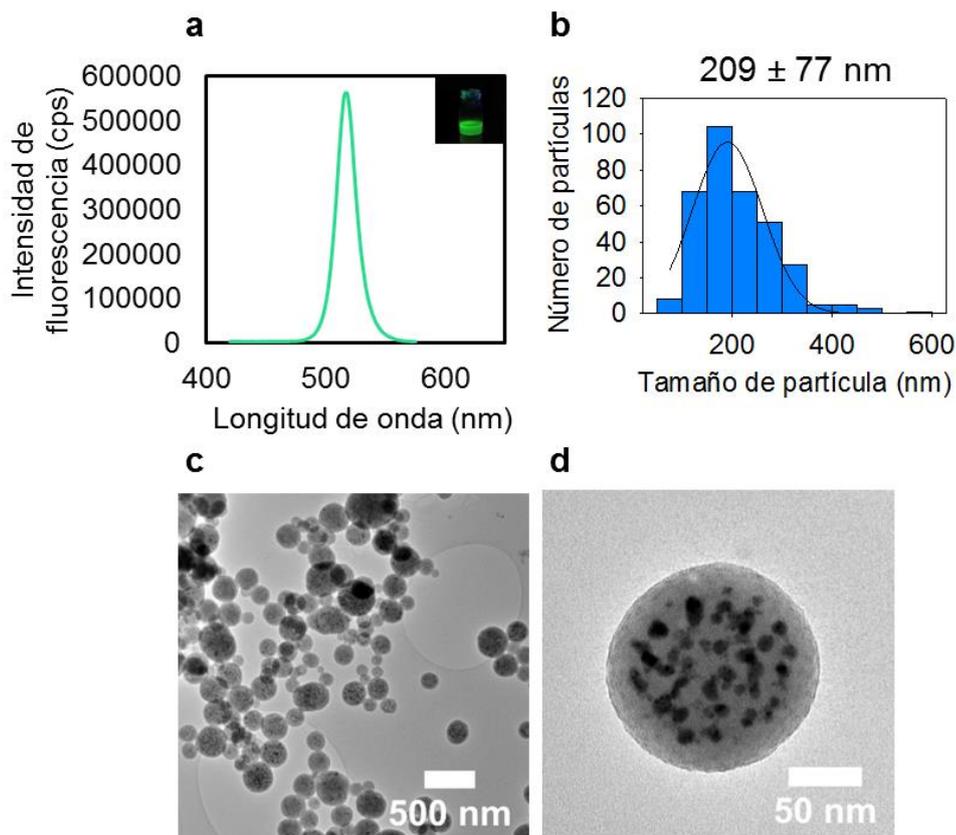


Figura 70. Caracterización de las nanocápsulas optimizadas de CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA (a) espectro de emisión de fluorescencia en metanol ( $\lambda_{ex}$  355 nm), (b) histograma de la distribución de tamaños de partícula, (c) y (d) TEM a bajos y altos aumentos, respectivamente

### III. Utilización de las nanocápsulas de CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA como marcadores en plataformas de ensayo basadas en tira reactiva

La metodología de coprecipitación optimizada permite generar de forma reproducible nanocápsulas de CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA que reúnen las características deseadas para demostrar su utilización como etiquetas de marcaje.

Como plataforma de ensayo se seleccionó la tira reactiva, por tratarse de una de las plataformas analíticas más utilizadas como dispositivo *point-of-care* (POC). Estas pruebas se caracterizan por ser económicas, sencillas y rápidas,<sup>46</sup> y son ampliamente conocidas por su aplicación en diagnóstico (embarazo, COVID-19), salud alimentaria (alérgenos, patógenos) y medioambiental (pesticidas, metales pesados, bacterias).<sup>2</sup>

En formato de tira reactiva, se lleva a cabo un ensayo inmunocromatográfico, donde la muestra fluye por capilaridad a través de una serie de almohadillas donde se han inmovilizado previamente determinados biorreceptores. Como resultado de la interacción se genera una señal que indica la presencia o ausencia de analito.

El primer objetivo fue demostrar que las nanocápsulas de CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA pueden conjugarse por adsorción pasiva a un anticuerpo de detección y fluir a través de la tira reactiva. Para ello se planteó un ensayo directo, donde se inmovilizó la proteína diana (albúmina de suero bovino, BSA) en la línea de prueba (TL, *test line*) y ovoalbúmina (OVA, 1 mg/mL), como control negativo en la línea control. La **Figura 71a** muestra el esquema del ensayo.

Las nanocápsulas se conjugaron por adsorción pasiva con anticuerpos IgG policlonales anti-BSA (45,2 µg/mL en PBS 10 mM pH 7,4). El mantenimiento de la fluorescencia durante la etapa de incubación demostró que las propiedades ópticas de los NCs atrapados en el interior de las micelas poliméricas de PS-b-PAA se mantienen estables en tampón salino.

Posteriormente la tira reactiva se incubó durante 10 min en un pocillo de placa ELISA conteniendo la disolución del conjugado, sumergiendo solo un extremo, como se indica en la **Figura 71a**. Los resultados se muestran en la **Figura 71b**. La señal fluorescente de la TL, bajo luz UV ( $\lambda_{ex}$  254 nm), confirma la interacción del conjugado con la proteína BSA inmovilizada. Mientras que la ausencia de señal en el control negativo indica que el conjugado es específico y solo se une en el lugar donde el analito (BSA) se encuentra inmovilizado.

Por tanto, el ensayo directo permitió confirmar que las nanocápsulas son estables, pueden conjugarse por adsorción al anticuerpo de detección sin perder sus propiedades de emisión, fluir a lo largo de la tira reactiva y proporcionar una señal específica.

El siguiente objetivo fue diseñar y desarrollar una prueba de concepto con un inmunoensayo en formato sándwich. El formato sándwich es el formato convencional en investigación y aplicaciones comerciales, ya que es fácil de optimizar en comparación con el ensayo en formato competitivo y proporciona una lectura intuitiva para el usuario, donde la señal es directamente dependiente de la concentración de analito presente en la muestra.

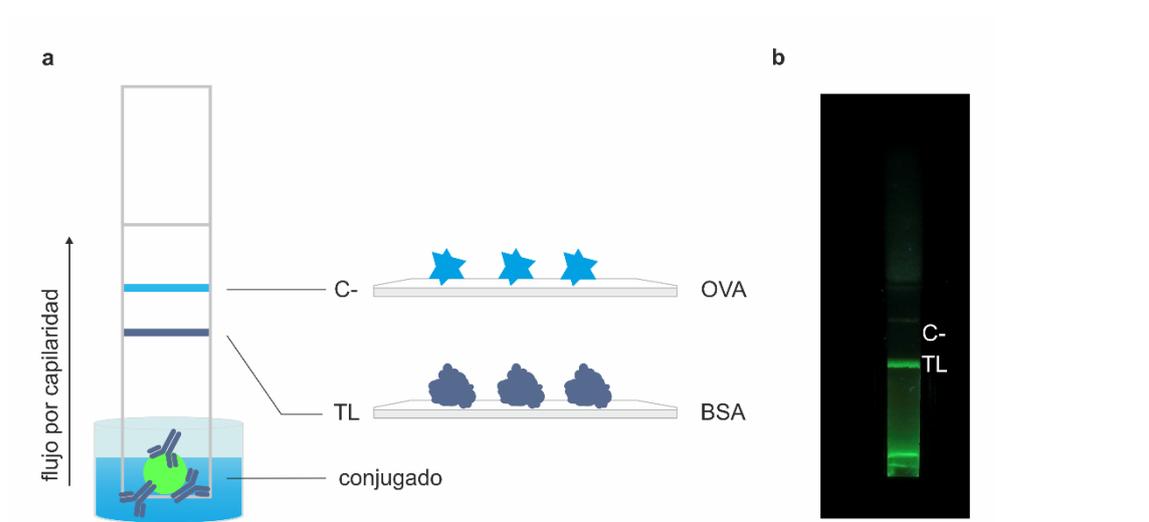


Figura 71. Ensayo directo para confirmar la conjugación de  $\alpha$ BSA con las nanocápsulas de CsPbBr<sub>3</sub>@PS-*b*-PAA y su especificidad. (a) Esquema del ensayo directo. TL es la línea de prueba, donde la proteína diana (BSA) se encuentra inmovilizada (1 mg/mL) y C- es la línea de control negativo inmovilizada con la proteína OVA (1 mg/mL). La tira se sumerge en un pocillo que contiene la disolución del conjugado. (b) Fluorescencia emitida por el conjugado tras realizar el ensayo.

Como prueba de concepto se diseñó un inmunoensayo para la detección de inmunoglobulina G humana (H-IgG). Utilizando como anticuerpo de captura y detección un anticuerpo  $\alpha$ H-IgG policlonal de conejo, capaz de reconocer diferentes epítopos del analito diana.

Con el fin de proporcionar fiabilidad al inmunoensayo en tira reactiva, se incluyó un control positivo y un control negativo. La señal de estos controles debe permanecer constante e independiente de la concentración de analito diana en la muestra.

En el control positivo (C+) se inmovilizó IgG anti-cabra producida en conejo. Se trata de un anticuerpo secundario que reconoce la fracción constante de la  $\alpha$ H-IgG. Esta línea siempre debe aparecer, en este caso como una señal verde fluorescente, independientemente de si el analito está o no en la muestra, ya que indica que el conjugado ha fluido por capilaridad hasta el final de la tira.

En el control negativo (C-) se inmovilizó proteína BSA. Como el conjugado no tiene afinidad por esta proteína, esta línea no debe emitir señal fluorescente.

Por último, en la línea de prueba (TL) se inmovilizó  $\alpha$ H-IgG, que se une a un epítipo del analito, formando un sándwich con el conjugado.

La **Figura 72** muestra el diseño del inmunoensayo en formato de tira reactiva.

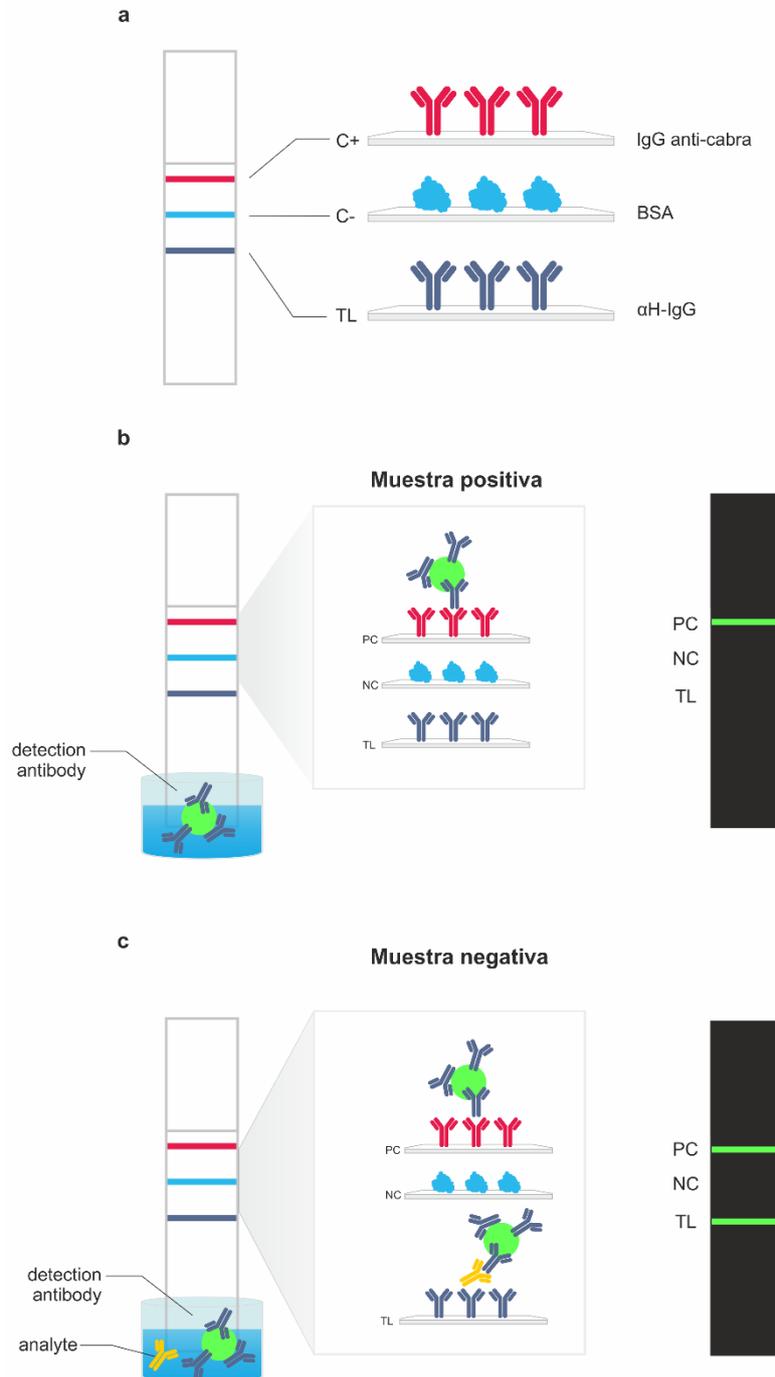


Figura 72. (a) Esquema del inmunoensayo en formato sándwich. En el control positivo (C+) está inmovilizado con IgG anti-cabra producida en conejo, el control negativo (C-) con proteína BSA y la línea de test (TL) con αH-IgG. (b y c) representan los resultados de una muestra positiva y negativa al sumergir la tira reactiva por un extremo en un pocillo que contiene el anticuerpo de detección junto con la muestra, en presencia y ausencia de analito, respectivamente.

El paso siguiente consistió en llevar a cabo una curva de calibrado a partir de diluciones seriadas de la disolución de analito (H-IgG) de concentración conocida (0, 1.000, 3.000 y 15.000 ng/mL).

Los resultados (**Figura 73a**) muestran una señal alta en el control positivo y una señal indistinguible respecto al fondo en el control negativo. En cuanto a la TL, las señales son difíciles de distinguir visualmente. Para obtener información cuantitativa de las señales, se utilizó el programa de análisis de imagen ImageJ, observándose que la señal del control positivo y negativo permanecen constantes independientemente de la concentración de analito (**Figura 73b**), siendo la intensidad media de la señal del control positivo de  $76,7 \pm 10,9$  mientras que la del negativo es de  $8,1 \pm 1,6$ .

La intensidad de la TL normalizada es 9,5 veces más alta al comparar la de 1.000 ng/mL respecto a 0 ng/mL (**Figura 73c**). Este incremento decrece para 3.000 y 15.000 ng/mL de H-IgG, debido al efecto *hook*, que es un fenómeno que ocurre cuando el analito se encuentra en exceso, lo cual dificulta la generación del inmunosandwich. Este efecto *hook* también se observó cuando se realizó el mismo ensayo con revelado colorimétrico con NPs de Au.

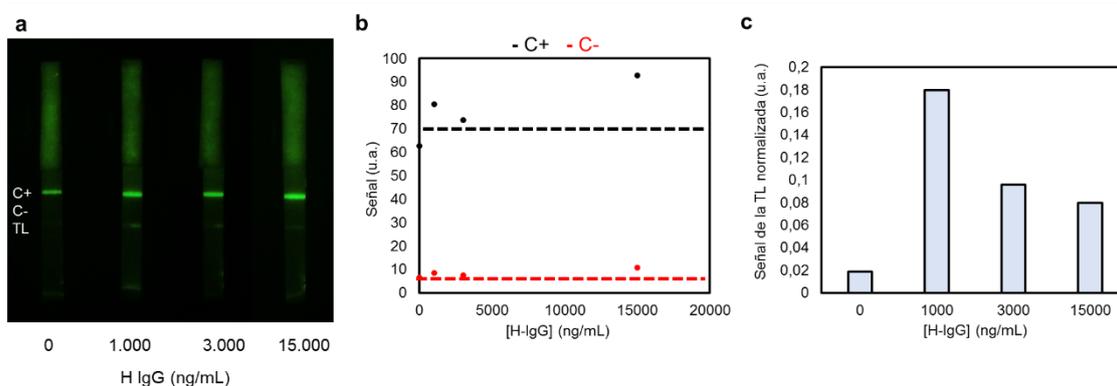


Figura 73. (a) Curva de calibrado a partir de disoluciones con concentración conocida de analito. (b) Señal de los controles (c) Señal normalizada de la TL

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir que es posible que haya una relación dosis-respuesta entre 0 y 1.000 ng/mL, demostrativo del potencial de los marcadores de perovskita en inmunoensayo preparados en esta tesis. Al tratarse de una prueba preliminar, la continuación de esta investigación debe pasar por la optimización del ensayo para aumentar la señal de la TL, realizar el calibrado con al menos 5 réplicas por punto, determinar las propiedades analíticas del ensayo (límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, rango dinámico y desviación estándar relativa) y compararlas con el ensayo colorimétrico estándar (utilizando NPs de Au de 20 nm).

### 4.3. Conclusiones

---

La encapsulación de nanocristales de LHP en micelas poliméricas de PS-b-PAA permite su estabilización y funcionalización para su posterior conjugación a biomoléculas. El bloque hidrofóbico de PS previene la disociación de los ligandos de superficie y crea una barrera hidrofóbica que dificulta la interacción de las nanopartículas con el disolvente, mientras que el bloque hidrofílico de PAA facilita su dispersión en disolventes polares.

El estudio de las variables más relevantes del proceso (tipo de ligando en la superficie del nanocrystal, velocidad y volumen de metanol, concentración de polímero y de NCs...) ha permitido controlar el proceso de coprecipitación y lograr resultados similares a los de la metodología de referencia, realizando algunos cambios significativos (tal y como se muestra en la **Figura 74**, apartado “Materiales y métodos”).

La adaptación de la metodología es el resultado de un proceso iterativo, en el cual se ha seleccionado la mejor condición en base a la variable estudiada siguiendo un orden determinado. Es posible que, de haber escogido otro orden, las condiciones finales fueran distintas, por lo que no conviene descartar la posibilidad de revisar los parámetros fijados al principio del proceso e incluso seguir perfeccionando el método para disminuir aún más el tamaño de partícula.

Finalmente, otra de las alternativas que se ofrece en este capítulo es la de aumentar la producción de partículas de forma sencilla. El trabajo de referencia consta de numerosos pasos y, aunque algunos de ellos están automatizados por un robot de dispensación de líquidos, la estrategia consiste básicamente en reproducir réplicas de las condiciones de reacción.

En la adaptación de la metodología se ha reducido el número de pasos y comprobado que es posible escalar la producción aumentando los volúmenes de reacción de forma proporcional (**Tabla 12**, apartado “Materiales y métodos”). Según la metodología de referencia, para el volumen total de síntesis (4 mL) se necesita producir un total 160 réplicas. Considerando que el sistema de automatización puede contener hasta 24 viales de reacción, entonces se requieren 7 ciclos. En cambio, según la metodología adaptada, para 4 mL basta con 4 réplicas de las condiciones de escalado x40. El paso siguiente sería comprobar si es posible llevar a cabo el escalado x80 en un solo recipiente, para lo que habría que tener en cuenta que debe abarcar un volumen total de 156 mL.

Por último, se ha confirmado que las nanocápsulas de CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA son estables en tampón salino y pueden conjugarse por adsorción pasiva con anticuerpos y, por extensión también con otras proteínas. Los ensayos preliminares realizados en tira reactiva, han demostrado que el conjugado es capaz de fluir a través de ella e interactuar específicamente con el analito diana.

De cara a implantar estos nanomateriales como marcadores en sistemas analíticos basados en tira reactiva, primero es necesario determinar las condiciones óptimas de preparación del conjugado, concentración de los biorreceptores inmovilizados, evaluación del blanco (ausencia de analito)... y posteriormente realizar un calibrado que permita evaluar las propiedades analíticas del ensayo (límite de detección, límite de cuantificación, sensibilidad, rango dinámico y desviación estándar relativa) y compararlas con un sistema estándar.

## 4.4. Materiales y métodos

---

### Reactivos

Acetato de plomo (II) trihidratado  $\geq 99.99\%$ , Carbonato de cesio 99%, 1-Octadeceno grado técnico 90%, Didodecilamina (DDDAm), Bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB) y Poliestireno-b-ácido(poliacrílico) (PS<sub>29</sub>-b-PAA<sub>5</sub>) con MM de 34.000 g/mol de Sigma-Aldrich. Ácido oleico grado técnico 90%, y Bromuro de benzoilo 97% de Thermo Scientific™. Tolueno anhidro 99,8%, Acetato de etilo 99,8%, Tetrahidrofurano (THF) y Metanol adquiridos en Scharlab.

Anticuerpo IgG anti-cabra producido en conejo (ab6697, Abcam), anticuerpo policlonal IgG anti H-IgG (1011-2ML, Sigma) purificado utilizando una columna de purificación HiTrap™ Protein G HP (H4522, Sigma), Fracción V de albúmina bovina (Acros Organics). Membrana de nitrocelulosa Hi-Flow Plus 90 (Sigma).

### Síntesis de NCs de CsPbBr<sub>3</sub> Cs-OA

Los nanocristales de CsPbBr<sub>3</sub> se prepararon siguiendo la metodología descrita por Imran *et al*<sup>17</sup> con algunas modificaciones. En un matraz de 25 mL de 2 bocas y un termopozo se añadieron 76 mg de acetato de plomo (II) trihidratado, 16 mg de carbonato de cesio, 10 mL de 1-octadeceno y 1,5 mL de ácido oleico. El termopozo se rellenó con 0,2 mL de octadeceno y se introdujo una sonda para el seguimiento de la temperatura. El matraz se colocó encima de una manta calefactora y se aplicó vacío y agitación magnética (400 rpm) hasta que la temperatura alcanzó 115 °C.

Después, se inyectó bajo flujo de Ar la disolución de DDDAm (443 mg previamente disueltos en 1 mL de tolueno anhidro a una temperatura de 150 °C). Seguidamente, se disminuyó la temperatura hasta 80 °C y se inyectó rápidamente una disolución de bromuro de benzoilo (50  $\mu$ L en 500  $\mu$ L de tolueno anhidro). Tras 15 s, se introdujo el matraz en un baño de agua para detener la reacción. Cuando la temperatura disminuyó a 40 °C, la mezcla se distribuyó en dos tubos de 50 mL y se añadieron 15 mL de acetato de etilo a cada tubo para desestabilizar los coloides. Finalmente, los nanocristales se centrifugaron a 13.580 rcf durante 20 min y el sedimento se dispersó en un volumen final de 4 mL de tolueno.

La concentración de NCs de CsPbBr<sub>3</sub> de la disolución stock (2,1 μM) se determinó según Maes *et al.*,<sup>47</sup> tomando el valor medio calculado a partir de los ε<sub>355</sub> y ε<sub>400</sub> en tolueno, considerando un tamaño medio de NC de 9,3 nm.

### Intercambio de ligando de superficie (oleato de Cs por DDAB)

El intercambio de ligando se llevó a cabo según Imran *et al.*,<sup>38</sup> con la diferencia de que se realizó para un solo ciclo (en lugar de tres) durante la etapa de purificación de la síntesis previamente descrita (y no al final del proceso). Para ello, por cada tubo del crudo de reacción se añadieron 4 mL DDAB 0,025 M en tolueno, junto con los 15 mL de acetato de etilo. La mezcla se centrifugó a 13.580 rcf durante 10 min y el sedimento se dispersó en un volumen total de 4 mL de tolueno.

### Síntesis de nanocápsulas CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA

La siguiente metodología ha sido adaptada a partir de Avugadda *et al.*<sup>34</sup>

La **Tabla 12** indica las condiciones de preparación de cada muestra durante el proceso de optimización. Cada muestra se preparó añadiendo 25 μL de la disolución stock de NCs (pudiendo ser 2,1, 4,2 u 8,4 μM, que se corresponde con los siguientes valores de D.O.<sub>480</sub> de una dilución 1/200 = 0,1, 0,2 y 0,4, respectivamente), determinado volumen de PS-b-PAA (32 mg/mL en THF/tolueno 1:9 v/v, lo que equivale a 941,17 μM) y el resto de tolueno hasta completar un volumen total de 125 μL. Posteriormente, se añadió un determinado volumen de antidisolvente (metanol), según las indicaciones de la tabla. Las muestras se centrifugaron a 3.743 rcf durante 10 min y el sedimento se dispersó en metanol. Posteriormente, se sonicaron y se prepararon para analizar por TEM.

A continuación, se describe la metodología óptima para la síntesis de las nanocápsulas. En un tubo de 50 mL se añadieron 3 mL de tolueno, 1 mL de PS-b-PAA (32 mg/mL en THF/tolueno 1:9 v/v), 1 mL de CsPbBr<sub>3</sub> NCs (2,1 μM). La mezcla se introdujo en baño de ultrasonidos durante 5 min. La adición del antidisolvente (metanol) se hizo de forma rápida por las paredes del tubo en dos pasos, primero 6 mL y después 28 mL.

El volumen total (39 mL) se alicuotó en viales de vidrio (6,5 mL/vial) y se centrifugó a 3.743 rcf durante 10 min. El sedimento se dispersó en metanol (2 mL/vial) y se introdujo en baño de ultrasonidos durante ~ 10 min. Las nanocápsulas se recolectaron a partir del sobrenadante tras centrifugar a 661 rcf durante 15 min.

## Fabricación de la tira reactiva

Los siguientes reactivos se inmovilizaron formando una línea en la membrana de nitrocelulosa utilizando el dispensador AD1500 BioDot (dispensando un volumen de 25 nL por punto en PBS 10 mM, pH 7,4. IgG anti-cabra (2 mg/mL) producido en conejo como control positivo, BSA (1 mg/mL) como control negativo y anticuerpo IgG anti-HIgG ( $\alpha$ H-IgG) (1 mg/mL) en la línea de prueba.

Los biorreceptores se fijaron a la membrana mediante incubación en estufa 37 °C durante 2 h. Después, la membrana se bloqueó utilizando un spray cargado con la disolución de BSA 1% en PBS 10 mM, pH 7,4. Después de 5 min, se lavó con PBS 10 mM, pH 7,4 y SDS 0,05% durante 20 min y se incubó durante toda la noche en estufa a 37 °C. Posteriormente, se montó la almohadilla absorbente y la membrana se cortó en tiras de 3 mm de ancho.

## Preparación del conjugado

En un microtubo se añadieron 4,52  $\mu$ L de  $\alpha$ H-IgG (1 mg/mL) y 10  $\mu$ L de las nanocápsulas en PBS 10 mM pH 7,4 (volumen total 100  $\mu$ L). La mezcla se incubó en un agitador orbital a 500 rpm durante 2 h. El conjugado se centrifugó a 661 rcf durante 15 min y el sedimento se dispersó en 100  $\mu$ L de tampón borato 20 mM, pH 7,4, 5% azúcar y 0,5% Tween 20.

## Inmunoensayo en tira reactiva

Cada tira se incubó durante 10 min en un pocillo de placa ELISA, conteniendo la disolución de conjugado (dilución 1/4) y la muestra en PBST en un volumen total de 50  $\mu$ L. Después se procedió a lavar cada tira. Para ello se introdujeron por el extremo en pocillos conteniendo 50  $\mu$ L de PBST durante 10 min.

Posteriormente se procedió a capturar la imagen de la tira con un móvil (modo manual, ISO 800). Para asegurar que todas las imágenes cumplieran con la misma iluminación, se utilizó un dispositivo propio, que consiste en una caja opaca con una ranura para ubicar la tira en una misma posición, iluminada a una distancia de 9 cm por un LED  $\lambda_{ex}$  365 nm.

El análisis de la imagen se realizó con el programa ImageJ, obteniendo el valor medio de intensidad de las líneas de prueba (TL), control positivo (CP), control negativo y fondo (BK). La señal de la TL se normalizó  $(TL - BK / CP - BK)$ .

### Métodos de caracterización

La caracterización óptica de las partículas se llevó a cabo a partir de diluciones 1/200 de las muestras. El espectro de absorción de la región UV-Vis se obtuvo con el espectrofotómetro Agilent 8453 (Agilent Technologies) y el espectro de emisión de fluorescencia con el espectrofluorímetro PTI QMA4 (Horiba) con una  $\lambda_{ex}$  fija a 355 nm.

Las imágenes de TEM se tomaron con un microscopio electrónico de transmisión de 120 kV (JEM-1400, Flash). La distribución del tamaño de partícula se representó con formato de histograma a partir de las medidas del tamaño de partícula, obtenidas con el programa ImageJ sobre las imágenes de TEM. Las fotografías de los viales se tomaron bajo lámpara UV (VL-4.C  $\lambda_{ex}$  254nm, Vilber Lourmat).

Tabla 12. Matriz con todas las variables de trabajo para la síntesis de NPs de CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA

| Muestra                                  | Disolvente: tolueno                     |          |                        |              | Antidisolvente: metanol  |                     |                     |                     |
|--|---|----------|------------------------|--------------|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|  | D.O. <sub>480</sub> de NCs de dil 1/200 | NCs (μL) | PS-b-PAA 32 mg/mL (μL) | Tolueno (μL) | VI <sub>1</sub> (μL/min) | V <sub>1</sub> (μL) | V <sub>2</sub> (μL) | V <sub>3</sub> (mL) |
| M1 <sub>Cs-OA</sub> y M2 <sub>DDAB</sub> | 0,2                                     | 25       | 100                    | 0            | 250                      | 150                 | 400                 | -                   |
| M3                                       | 0,4                                     | 25       | 100                    | 0            | 250                      | 150                 | 400                 | -                   |
| M4                                       | 0,4                                     | 25       | 100                    | 0            | 1500                     | 150                 | 400                 | -                   |
| M5                                       | 0,4                                     | 25       | 100                    | 0            | rápida                   | 150                 | 400                 | -                   |
| M6 y M11 <sub>US</sub>                   | 0,04                                    | 25       | 100                    | 0            | rápida                   | 550                 | -                   | -                   |
| M7 y M12 <sub>US</sub>                   | 0,04                                    | 25       | 100                    | 0            | rápida                   | 150                 | 400                 | -                   |
| M8 y M13 <sub>US</sub>                   | 0,04                                    | 25       | 100                    | 0            | rápida                   | 850                 | -                   | -                   |
| M9 y M14 <sub>US</sub>                   | 0,04                                    | 25       | 100                    | 0            | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M10 y M15 <sub>US</sub>                  | 0,04                                    | 25       | 100                    | 0            | rápida                   | 150                 | 400                 | 300                 |
| M16                                      | 0,04                                    | 25       | 100                    | 0            | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M17                                      | 0,04                                    | 25       | 50                     | 50           | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M18                                      | 0,04                                    | 25       | 25                     | 75           | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M19                                      | 0,4                                     | 25       | 50                     | 50           | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M20                                      | 0,4                                     | 25       | 25                     | 75           | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M21                                      | 0,4                                     | 25       | 12,5                   | 87,5         | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M22                                      | 0,4                                     | 25       | 6,25                   | 93,75        | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M23                                      | 0,2                                     | 25       | 50                     | 50           | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M24                                      | 0,2                                     | 25       | 25                     | 75           | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M25                                      | 0,2                                     | 25       | 12,5                   | 87,5         | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M26                                      | 0,2                                     | 25       | 6,25                   | 93,75        | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M27                                      | 0,1                                     | 25       | 50                     | 50           | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M28                                      | 0,1                                     | 25       | 25                     | 75           | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M29                                      | 0,1                                     | 25       | 12,5                   | 87,5         | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M30                                      | 0,1                                     | 25       | 6,25                   | 93,75        | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M31                                      | 0,1                                     | 25       | 25                     | 75           | rápida                   | 150                 | 700                 | -                   |
| M32                                      | 0,1                                     | 500      | 500                    | 1.500        | rápida                   | 3.000               | 14.000              | -                   |
| M33                                      | 0,1                                     | 1.000    | 1.000                  | 3.000        | rápida                   | 6.000               | 28.000              | -                   |

Los subíndices en M1 y M2 indican el tipo de ligando de superficie del NC: Cs-OA y DDAB, respectivamente. Para el resto de las muestras (M3-M31) se trabaja con los cubiertos por Cs-OA. VI = velocidad de inyección. V = volumen. El subíndice en V indica el número de la adición. Para V<sub>2</sub> y V<sub>3</sub>, la inyección se hace de forma rápida. M10-M13<sub>US</sub> se diferencian de sus homólogas (M6-M9) en que la inyección se ha realizado en baño de ultrasonidos (US). Como indicador de la concentración de NCs, se incluye el valor de D.O.<sub>480 nm</sub> de una dilución 1/200 de la disolución stock. En naranja se resaltan las condiciones seleccionadas durante la optimización.

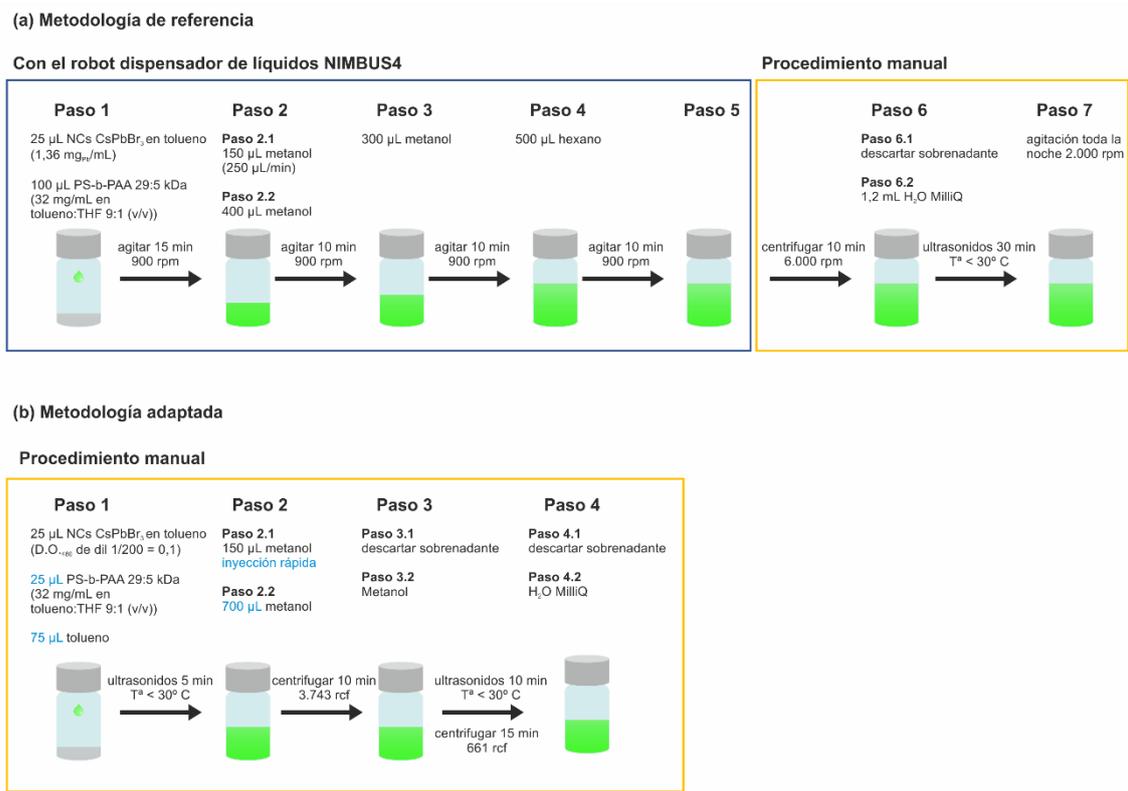


Figura 74. Comparación del flujo de trabajo en (a) la metodología de referencia y (b) en la metodología adaptada.

## 4.5. Bibliografía

---

- (1) Ahmad Najib, M.; Selvam, K.; Khalid, M. F.; Ozsoz, M.; Aziah, I. Quantum Dot-Based Lateral Flow Immunoassay as Point-of-Care Testing for Infectious Diseases: A Narrative Review of Its Principle and Performance. *Diagnostics* **2022**, *12* (9), 2158. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12092158>.
- (2) Sena-Torralba, A.; Álvarez-Diduk, R.; Parolo, C.; Piper, A.; Merkoçi, A. Toward Next Generation Lateral Flow Assays: Integration of Nanomaterials. *Chem. Rev.* **2022**, *122* (18), 14881–14910. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c01012>.
- (3) Li, H.; Dong, B.; Dou, L.; Yu, W.; Yu, X.; Wen, K.; Ke, Y.; Shen, J.; Wang, Z. Fluorescent Lateral Flow Immunoassay for Highly Sensitive Detection of Eight Anticoagulant Rodenticides Based on Cadmium-Free Quantum Dot-Encapsulated Nanospheres. *Sens. Actuators B Chem.* **2020**, *324*, 128771. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128771>.
- (4) Cai, Y.; Kang, K.; Liu, Y.; Wang, Y.; He, X. Development of a Lateral Flow Immunoassay of C-Reactive Protein Detection Based on Red Fluorescent Nanoparticles. *Anal. Biochem.* **2018**, *556*, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.06.017>.
- (5) Natarajan, S.; Su, F.; Jayaraj, J.; Shah, M. I. I.; Huang, Y. A Paper Microfluidics-Based Fluorescent Lateral Flow Immunoassay for Point-of-Care Diagnostics of Non-Communicable Diseases. *Analyst* **2019**, *144* (21), 6291–6303. <https://doi.org/10.1039/C9AN01382B>.
- (6) Zhang, B.; Ma, W.; Li, F.; Gao, W.; Zhao, Q.; Peng, W.; Piao, J.; Wu, X.; Wang, H.; Gong, X.; Chang, J. Fluorescence Quenching-Based Signal Amplification on Immunochromatography Test Strips for Dual-Mode Sensing of Two Biomarkers of Breast Cancer. *Nanoscale* **2017**, *9* (47), 18711–18722. <https://doi.org/10.1039/C7NR06781J>.
- (7) Kim, J.; Kwon, J. H.; Jang, J.; Lee, H.; Kim, S.; Hahn, Y. K.; Kim, S. K.; Lee, K. H.; Lee, S.; Pyo, H.; Song, C.-S.; Lee, J. Rapid and Background-Free Detection of Avian Influenza Virus in Opaque Sample Using NIR-to-NIR Upconversion Nanoparticle-Based Lateral Flow Immunoassay Platform. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *112*, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.04.047>.
- (8) Gong, Y.; Zheng, Y.; Jin, B.; You, M.; Wang, J.; Li, X.; Lin, M.; Xu, F.; Li, F. A Portable and Universal Upconversion Nanoparticle-Based Lateral Flow Assay Platform for Point-of-Care Testing. *Talanta* **2019**, *201*, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.105>.

- (9) Wang, M.; Abbineni, G.; Clevenger, A.; Mao, C.; Xu, S. Upconversion Nanoparticles: Synthesis, Surface Modification, and Biological Applications. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2011**, *7* (6), 710–729. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.02.013>.
- (10) Yang, X.; Liu, X.; Gu, B.; Liu, H.; Xiao, R.; Wang, C.; Wang, S. Quantitative and Simultaneous Detection of Two Inflammation Biomarkers via a Fluorescent Lateral Flow Immunoassay Using Dual-Color SiO<sub>2</sub>@QD Nanotags. *Microchim. Acta* **2020**, *187* (10), 570. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04555-6>.
- (11) Foubert, A.; Beloglazova, N. V.; Gordienko, A.; Tessier, M. D.; Drijvers, E.; Hens, Z.; De Saeger, S. Development of a Rainbow Lateral Flow Immunoassay for the Simultaneous Detection of Four Mycotoxins. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65* (33), 7121–7130. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04157>.
- (12) Wang, J.; Jiang, C.; Yuan, J.; Tong, L.; Wang, Y.; Zhuo, D.; Huang, L.; Ni, W.; Zhang, J.; Huang, M.; Li, D.; Su, B.; Hu, J. Hue Recognition Competitive Fluorescent Lateral Flow Immunoassay for Aflatoxin M1 Detection with Improved Visual and Quantitative Performance. *Anal. Chem.* **2022**, *94* (30), 10865–10873. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02020>.
- (13) Wang, S.; Shen, W.; Zheng, S.; Li, Z.; Wang, C.; Zhang, L.; Liu, Y. Dual-Signal Lateral Flow Assay Using Vancomycin-Modified Nanotags for Rapid and Sensitive Detection of Staphylococcus Aureus. *RSC Adv.* **2021**, *11* (22), 13297–13303. <https://doi.org/10.1039/D1RA01085A>.
- (14) Zhang, B.; Yang, X.; Liu, X.; Li, J.; Wang, C.; Wang, S. Polyethyleneimine-Interlayered Silica-Core Quantum Dot-Shell Nanocomposites for Sensitive Detection of Salmonella Typhimurium via a Lateral Flow Immunoassay. *RSC Adv.* **2020**, *10* (5), 2483–2489. <https://doi.org/10.1039/C9RA09252H>.
- (15) Wang, Q.; Xu, Y.; Zhao, X.; Chang, Y.; Liu, Y.; Jiang, L.; Sharma, J.; Seo, D.-K.; Yan, H. A Facile One-Step in Situ Functionalization of Quantum Dots with Preserved Photoluminescence for Bioconjugation. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (20), 6380–6381. <https://doi.org/10.1021/ja071434y>.
- (16) Wang, J.; Meng, H.-M.; Chen, J.; Liu, J.; Zhang, L.; Qu, L.; Li, Z.; Lin, Y. Quantum Dot-Based Lateral Flow Test Strips for Highly Sensitive Detection of the Tetanus Antibody. *ACS Omega* **2019**, *4* (4), 6789–6795. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00657>.
- (17) Wang, Z.; Zheng, S.; Zhang, C.; Wang, W.; Wang, Q.; Li, Z.; Wang, S.; Zhang, L.; Liu, Y. Introduction of Multilayered Quantum Dot Nanobeads into Competitive Lateral Flow Assays for Ultrasensitive and Quantitative Monitoring of Pesticides in Complex Samples. *Microchim. Acta* **2023**, *190* (9), 361. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05913-w>.

- (18) Wang, C.; Shi, D.; Wan, N.; Yang, X.; Liu, H.; Gao, H.; Zhang, M.; Bai, Z.; Li, D.; Dai, E.; Rong, Z.; Wang, S. Development of Spike Protein-Based Fluorescence Lateral Flow Assay for the Simultaneous Detection of SARS-CoV-2 Specific IgM and IgG. *Analyst* **2021**, *146* (12), 3908–3917. <https://doi.org/10.1039/D1AN00304F>.
- (19) Wang, C.; Xiao, R.; Wang, S.; Yang, X.; Bai, Z.; Li, X.; Rong, Z.; Shen, B.; Wang, S. Magnetic Quantum Dot Based Lateral Flow Assay Biosensor for Multiplex and Sensitive Detection of Protein Toxins in Food Samples. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *146*, 111754. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111754>.
- (20) Xie, Z.; Feng, S.; Pei, F.; Xia, M.; Hao, Q.; Liu, B.; Tong, Z.; Wang, J.; Lei, W.; Mu, X. Magnetic/Fluorescent Dual-Modal Lateral Flow Immunoassay Based on Multifunctional Nanobeads for Rapid and Accurate SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Detection. *Anal. Chim. Acta* **2022**, *1233*, 340486. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340486>.
- (21) Wang, C.; Shen, W.; Rong, Z.; Liu, X.; Gu, B.; Xiao, R.; Wang, S. Layer-by-Layer Assembly of Magnetic-Core Dual Quantum Dot-Shell Nanocomposites for Fluorescence Lateral Flow Detection of Bacteria. *Nanoscale* **2020**, *12* (2), 795–807. <https://doi.org/10.1039/C9NR08509B>.
- (22) Tu, Z.; Yang, X.; Dong, H.; Yu, Q.; Zheng, S.; Cheng, X.; Wang, C.; Rong, Z.; Wang, S. Ultrasensitive Fluorescence Lateral Flow Assay for Simultaneous Detection of *Pseudomonas Aeruginosa* and *Salmonella Typhimurium* via Wheat Germ Agglutinin-Functionalized Magnetic Quantum Dot Nanoprobe. *Biosensors* **2022**, *12* (11), 942. <https://doi.org/10.3390/bios12110942>.
- (23) Wang, C.; Yang, X.; Gu, B.; Liu, H.; Zhou, Z.; Shi, L.; Cheng, X.; Wang, S. Sensitive and Simultaneous Detection of SARS-CoV-2-Specific IgM/IgG Using Lateral Flow Immunoassay Based on Dual-Mode Quantum Dot Nanobeads. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (23), 15542–15549. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03484>.
- (24) Han, H.; Wang, C.; Yang, X.; Zheng, S.; Cheng, X.; Liu, Z.; Zhao, B.; Xiao, R. Rapid Field Determination of SARS-CoV-2 by a Colorimetric and Fluorescent Dual-Functional Lateral Flow Immunoassay Biosensor. *Sens. Actuators B Chem.* **2022**, *351*, 130897. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130897>.
- (25) Wei, Y.; Deng, X.; Xie, Z.; Cai, X.; Liang, S.; Ma, P.; Hou, Z.; Cheng, Z.; Lin, J. Enhancing the Stability of Perovskite Quantum Dots by Encapsulation in Crosslinked Polystyrene Beads via a Swelling–Shrinking Strategy toward Superior Water Resistance. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27* (39), 1703535. <https://doi.org/10.1002/adfm.201703535>.

- (26) Yang, X.; Xu, T.; Zhu, Y.; Cai, J.; Gu, K.; Zhu, J.; Wang, Y.; Shen, J.; Li, C. Preparation of CsPbBr<sub>3</sub>@PS Composite Microspheres with High Stability by Electrospraying. *J. Mater. Chem. C* **2018**, *6* (30), 7971–7975. <https://doi.org/10.1039/C8TC01408F>.
- (27) Zhou, J.; Lin, H.; Yu, Y.; Zuo, S.; Li, B.; Liu, J. Bright Luminous and Stable CsPbBr<sub>3</sub>@PS Microspheres Prepared via Facile Anti-Solvent Method Using CTAB as Double Modifier. *Chem. – Eur. J.* **2020**, *26* (46), 10528–10533. <https://doi.org/10.1002/chem.202000835>.
- (28) Wang, Y.; Varadi, L.; Trinchì, A.; Shen, J.; Zhu, Y.; Wei, G.; Li, C. Spray-Assisted Coil–Globule Transition for Scalable Preparation of Water-Resistant CsPbBr<sub>3</sub>@PMMA Perovskite Nanospheres with Application in Live Cell Imaging. *Small* **2018**, *14* (51), 1803156. <https://doi.org/10.1002/smll.201803156>.
- (29) Wang, A.-L.; Teng, J.-X.; Yang, C.-G.; Xu, Z.-R. Rapid and Facile Electro Spray Preparation of CsPbBr<sub>3</sub>@PMMA Fluorescent Microspheres for Fluorescent Detection of ALP in Biological Samples. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2022**, *634*, 127909. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127909>.
- (30) Long, Z.; Wang, Y.; Fu, Q.; Ouyang, J.; He, L.; Na, N. Accelerated Crystallization and Encapsulation for the Synthesis of Water- and Oxygen-Resistant Perovskite Nanoparticles in Micro-Droplets. *Nanoscale* **2019**, *11* (23), 11093–11098. <https://doi.org/10.1039/C9NR03647D>.
- (31) Wang, F.; Wang, H.; Ali, A.; Zhang, Y.; Cui, X.; Liu, Y. In-Situ One-Step Electro spray Fabrication of Polyvinylidene Fluoride Encapsulated CsPbBr<sub>3</sub> Spheres with High Stability and Cell Imaging Application. *Inorg. Chem. Commun.* **2019**, *106*, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2019.05.032>.
- (32) Pramanik, A.; Gates, K.; Patibandla, S.; Davis, D.; Begum, S.; Iftekhar, R.; Alamgir, S.; Paige, S.; Porter, M. M.; Ray, P. C. Water-Soluble and Bright Luminescent Cesium–Lead–Bromide Perovskite Quantum Dot–Polymer Composites for Tumor-Derived Exosome Imaging. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2* (12), 5872–5879. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00837>.
- (33) Luo, F.; Li, S.; Cui, L.; Zu, Y.; Chen, Y.; Huang, D.; Weng, Z.; Lin, Z. Biocompatible Perovskite Quantum Dots with Superior Water Resistance Enable Long-Term Monitoring of the H<sub>2</sub>S Level in Vivo. *Nanoscale* **2021**, *13* (34), 14297–14303. <https://doi.org/10.1039/D1NR02248B>.
- (34) Avugadda, S. K.; Castelli, A.; Dhanabalan, B.; Fernandez, T.; Silvestri, N.; Collantes, C.; Baranov, D.; Imran, M.; Manna, L.; Pellegrino, T.; Arciniegas, M. P. Highly Emitting Perovskite Nanocrystals with 2-Year Stability in Water through an Automated Polymer Encapsulation for

- Bioimaging. *ACS Nano* **2022**, *16* (9), 13657–13666.  
<https://doi.org/10.1021/acsnano.2c01556>.
- (35) Imran, M.; Ijaz, P.; Baranov, D.; Goldoni, L.; Petralanda, U.; Akkerman, Q.; Abdelhady, A. L.; Prato, M.; Bianchini, P.; Infante, I.; Manna, L. Shape-Pure, Nearly Monodispersed CsPbBr<sub>3</sub> Nanocubes Prepared Using Secondary Aliphatic Amines. *Nano Lett.* **2018**, *18* (12), 7822–7831.  
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b03598>.
- (36) Otero-Martínez, C.; Ye, J.; Sung, J.; Pastoriza-Santos, I.; Pérez-Juste, J.; Xia, Z.; Rao, A.; Hoye, R. L. Z.; Polavarapu, L. Colloidal Metal-Halide Perovskite Nanoplatelets: Thickness-Controlled Synthesis, Properties, and Application in Light-Emitting Diodes. *Adv. Mater.* **2022**, *34* (10), 2107105. <https://doi.org/10.1002/adma.202107105>.
- (37) Almeida, G.; Goldoni, L.; Akkerman, Q.; Dang, Z.; Khan, A. H.; Marras, S.; Moreels, I.; Manna, L. Role of Acid–Base Equilibria in the Size, Shape, and Phase Control of Cesium Lead Bromide Nanocrystals. *ACS Nano* **2018**, *12* (2), 1704–1711. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08357>.
- (38) Imran, M.; Ijaz, P.; Goldoni, L.; Maggioni, D.; Petralanda, U.; Prato, M.; Almeida, G.; Infante, I.; Manna, L. Simultaneous Cationic and Anionic Ligand Exchange For Colloidally Stable CsPbBr<sub>3</sub> Nanocrystals. *ACS Energy Lett.* **2019**, *4* (4), 819–824.  
<https://doi.org/10.1021/acsenerylett.9b00140>.
- (39) Luo, Q.; Hickey, R. J.; Park, S.-J. Controlling the Location of Nanoparticles in Colloidal Assemblies of Amphiphilic Polymers by Tuning Nanoparticle Surface Chemistry. *ACS Macro Lett.* **2013**, *2* (2), 107–111.  
<https://doi.org/10.1021/mz3006044>.
- (40) Hickey, R. J.; Meng, X.; Zhang, P.; Park, S.-J. Low-Dimensional Nanoparticle Clustering in Polymer Micelles and Their Transverse Relaxivity Rates. *ACS Nano* **2013**, *7* (7), 5824–5833.  
<https://doi.org/10.1021/nn400824b>.
- (41) Liu, W.; Chen, H.; Pan, D.; Ji, X. Electrostatic Interaction Mediates the Formation of Vesicular Structures from Coassembly of PS-*b*-PAA with Quantum Dots. *Langmuir* **2019**, *35* (38), 12501–12508.  
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02254>.
- (42) Kita-Tokarczyk, K.; Grumelard, J.; Haefele, T.; Meier, W. Block Copolymer Vesicles—Using Concepts from Polymer Chemistry to Mimic Biomembranes. *Polymer* **2005**, *46* (11), 3540–3563.  
<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.02.083>.
- (43) Shibasaki, Y.; Kim, B.-S.; Young, A. J.; McLoon, A. L.; Ekker, S. C.; Taton, T. A. Crosslinked, Glassy Styrenic Surfactants Stabilize Quantum Dots

- against Environmental Extremes. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (35), 6324–6327. <https://doi.org/10.1039/B902275A>.
- (44) Kim, B.-S.; Qiu, J.-M.; Wang, J.-P.; Taton, T. A. Magnetomicelles: Composite Nanostructures from Magnetic Nanoparticles and Cross-Linked Amphiphilic Block Copolymers. *Nano Lett.* **2005**, *5* (10), 1987–1991. <https://doi.org/10.1021/nl0513939>.
- (45) Kang, Y.; Taton, T. A. Core/Shell Gold Nanoparticles by Self-Assembly and Crosslinking of Micellar, Block-Copolymer Shells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (3), 409–412. <https://doi.org/10.1002/anie.200461119>.
- (46) Parolo, C.; Sena-Torralba, A.; Bergua, J. F.; Calucho, E.; Fuentes-Chust, C.; Hu, L.; Rivas, L.; Álvarez-Diduk, R.; Nguyen, E. P.; Cinti, S.; Quesada-González, D.; Merkoçi, A. Tutorial: Design and Fabrication of Nanoparticle-Based Lateral-Flow Immunoassays. *Nat. Protoc.* **2020**, *15* (12), 3788–3816. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0357-x>.
- (47) Maes, J.; Balcaen, L.; Drijvers, E.; Zhao, Q.; De Roo, J.; Vantomme, A.; Vanhaecke, F.; Geiregat, P.; Hens, Z. Light Absorption Coefficient of CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Nanocrystals. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9* (11), 3093–3097. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.8b01065>.

# Capítulo 5

Estabilización de NCs de perovskita  
en partículas poliméricas mediante  
electrospraying



## 5.1. Introducción

La técnica de *electrospraying* de atomización de líquidos, genera gotas muy pequeñas al someter una disolución a alto voltaje. Estas se evaporan rápidamente dando lugar a nano- o micro- partículas ya secas.<sup>1,2</sup>

El *electrospraying* es una variante de otra técnica conocida con el nombre de *electrospinning*. Si bien el principio es el mismo, en *electrospraying* se producen partículas, mientras que en *electrospinning* se generan fibras.<sup>3,4</sup> Esto depende de los parámetros fisicoquímicos implicados en el proceso. Generalmente a partir de disoluciones con baja viscosidad se generan partículas, mientras que cuando la viscosidad es alta se generan fibras.<sup>5</sup> Controlando otros factores como: voltaje, velocidad de inyección, conductividad eléctrica y propiedades del disolvente, es posible modificar el tamaño y morfología.<sup>6</sup>

Tanto el *electrospraying* como el *electrospinning* se han empleado para encapsular nanocristales (NCs) de perovskita de haluros metálicos en partículas o fibras de polímeros especialmente hidrófobos como poliestireno (PS),<sup>7-11</sup> fluoruro de polivinilideno (PVDF),<sup>12</sup> polimetilmetacrilato (PMMA),<sup>13,14</sup> poli(estireno-butadieno-estireno) (PSBS),<sup>15</sup> poliacrilonitrilo (PAN),<sup>16</sup> y policarbonato (PC).<sup>17</sup>

Las aplicaciones de los materiales obtenidos por esta técnica se enmarcan en múltiples áreas (**Figura 75**):

- a) En bioimagen, como agentes de contraste en cultivos celulares. Por ejemplo, Wang *et al* produjeron nanopartículas de CsPbBr<sub>3</sub>@PVDF de 600 nm que marcan la membrana de células MCF-7 debido a la interacción hidrofóbica del PVDF con los fosfolípidos de la membrana.<sup>12</sup> De forma similar, Long *et al* obtuvieron MAPbBr<sub>3</sub>@PC de entre 80-160 nm que son internalizadas por la célula al cabo de 4 h de incubación.<sup>17</sup>
- b) En detección biomolecular. Wang *et al* produjeron microesferas de CsPbBr<sub>3</sub>@PMMA de 17 μm que utilizaron para detectar la enzima fosfatasa alcalina (ALP) en muestras biológicas.<sup>13</sup> El modo de detección se basa en un sistema *off-on* de la fluorescencia, donde las nanohojas de MnO<sub>2</sub> actúan como *quencher* de la fluorescencia. Cuando la enzima ALP está presente, cataliza una reacción cuyo producto desencadena la reducción de MnO<sub>2</sub> a Mn<sup>+2</sup>, y por tanto deja de interferir con la fluorescencia emitida por las microesferas.

- c) En la fabricación de LEDs. Yang *et al* integraron microesferas de CsPbBr<sub>3</sub>@PS de 4-5 μm como capa de conversión de color en un UV-LED (405 nm).<sup>8</sup> Otros autores han producido simultáneamente fibras con emisión azul, verde y roja y posteriormente las ha integrado para fabricar emisores de luz blanca (WLEDs).<sup>9,11</sup>
- d) Diseño de patrones e integración en tejidos. Tian *et al* recurrieron a la estrategia de *electrospinning* para generar tejidos luminiscentes funcionales, concretamente destinados a uniformes de rescate marino.<sup>11</sup>

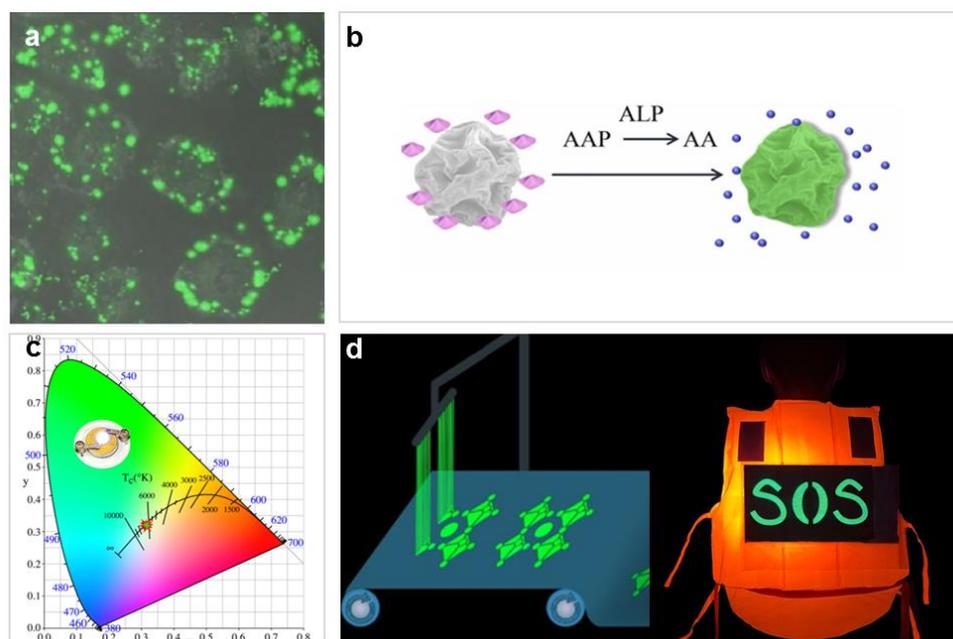


Figura 75. Aplicaciones en (a) bioimagen, (b) sensado, (c) WLEDs, (d) tintas y tejidos. Imágenes reproducidas de (a) *Inorg Chem Comm.* 2019, 106, 99–103, (b) *Coll and Surf A: Phys and Eng Aspects* 2022, 634, 127909. (c-d) *Nat Comm.* 2023, 14, 234.

En este capítulo se plantea la encapsulación de NCs de perovskita mediante electrospinning, con el fin de explorar sus aplicaciones en bioimagen celular.

Concretamente, se centra en la utilización del copolímero poli(estireno-co-anhídrido maleico) (PSMA). Se trata de un polímero que no ha sido utilizado hasta ahora para la estabilización de los NCs de perovskita, pero puede ser una opción viable, ya que el bloque de PS proporciona una excelente resistencia en agua, mientras que el anillo del anhídrido maleico se abre en agua, poniendo a disposición grupos carboxilo, los cuales permiten su conjugación a biomoléculas a través de sus grupos amina, mediante la formación de enlace amida (**Figura 76**).

De modo que ofrece la posibilidad de conjugarse con anticuerpos de forma covalente, siendo un recurso útil en el caso de plantearse la opción de llevar a cabo un marcaje específico.

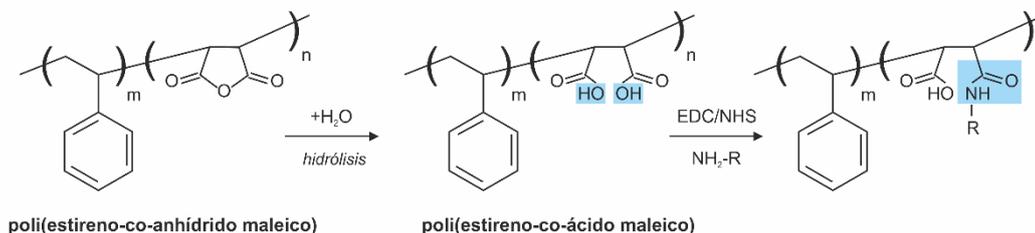


Figura 76. Estructura química del poli(estireno-co-anhídrido maleico) (PSMA) y unión de la biomolécula (NH<sub>2</sub>-R) mediante la conjugación con EDC-NHS.

El PSMA tiene buena estabilidad térmica, es biocompatible y además es soluble en disolventes orgánicos, como el tolueno, donde los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> son estables, por lo que cumple con el requisito de poder preparar una disolución que contenga ambos componentes.

El objetivo principal de esta investigación es determinar si *electrospraying* es posible obtener nanopartículas de CsPbBr<sub>3</sub>@PSMA estables que puedan utilizarse como agentes de contraste en bioimagen de cultivos celulares.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Producir partículas de CsPbBr<sub>3</sub>@PSMA mediante *electrospraying*.
2. Caracterizar las partículas resultantes y determinar si el recubrimiento de PSMA contribuye a su estabilización en agua.
3. Evaluar el potencial de las partículas de CsPbBr<sub>3</sub>@PSMA como agentes de contraste en cultivos celulares.

Esta investigación se ha realizado en el marco de una colaboración, llevada a cabo en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA), concretamente en el grupo de Envases, dirigido por la Dra. Amparo López Rubio y el Grupo de Elementos Traza, bajo la supervisión de Vicenta Devesa, donde disponían de la experiencia y equipamiento necesario para poner a punto la técnica de *electrospraying* y evaluar el potencial de las partículas en cultivos celulares.

## 5.2. Resultados

En primer lugar, se sintetizaron los NCs de  $\text{CsPbBr}_3$  por el método de *hot-injection*,<sup>18</sup> y se añadieron a una disolución de PSMA al 5% (p/v) en tolueno. La disolución se sometió a *electrospraying* en un equipo de diseño propio, a un caudal de 0,3 mL/h, un voltaje de 25 kV y una distancia de 15 cm entre la aguja y el colector. Este mismo proceso se repitió con una disolución de NCs y otra de PSMA al 5% (p/v).

Posteriormente, las partículas depositadas sobre el colector se recogieron mediante raspado y se midió su emisión de fluorescencia tras dispersarlas en agua (**Figura 77a**). La muestra de NCs no se pudo desprender de la superficie del colector, por su bajo contenido en sólidos, por lo que la medida de fluorescencia se realizó a partir de la disolución de NCs en tolueno. La anchura a media altura (*fwhm*) de las partículas de  $\text{CsPbBr}_3$ @PSMA es de 28 nm y su máximo de emisión se sitúa en 515 nm, coincidiendo con el control de NCs. La señal en la región de 420-480 nm se atribuye a la emisión del PSMA.

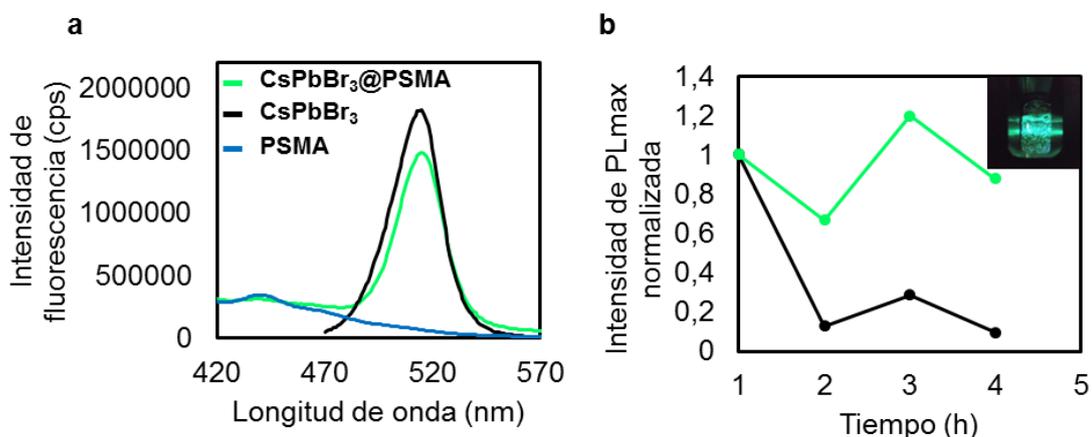


Figura 77. (a) Espectro de emisión de fluorescencia de las partículas de  $\text{CsPbBr}_3$ @PSMA y de PSMA dispersas en agua y de los NCs de  $\text{CsPbBr}_3$  en tolueno. (b) Seguimiento de la emisión máxima de fluorescencia en agua durante 4 h. En la esquina superior se muestran las partículas de  $\text{CsPbBr}_3$ @PSMA en agua. Los espectros están registrados a una  $\lambda_{\text{ex}}$  355 nm.

La **Figura 77b** muestra el seguimiento de la fluorescencia de los NCs de  $\text{CsPbBr}_3$  y las partículas de  $\text{CsPbBr}_3$ @PSMA durante 4 h tras dispersarlas en agua. Transcurrido este tiempo, los NCs encapsulados en PSMA, retienen prácticamente el 90% de su fluorescencia inicial, mientras que en los NCs control decae rápidamente al cabo de 1 h. Por tanto, este primer resultado confirma

que el PSMA puede utilizarse como recubrimiento para mejorar la estabilidad de los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> en agua.

A continuación, se llevó a cabo la caracterización morfológica de las muestras mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo de alta resolución (HRFESEM) a partir del análisis de los portamuestras adheridos sobre la superficie del colector durante el proceso de atomización.

Los resultados de la **Figura 78** indican que las muestras preparadas a partir de las disoluciones que contienen PSMA al 5% (p/v) producen partículas de tamaño micrométrico (10 μm), con una morfología semiesférica que se atribuye a la rápida volatilización del disolvente.<sup>13</sup> Mientras que, en ausencia de polímero, los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> se disponen formando una monocapa, de modo similar a cuando se deposita una gota de la disolución sobre una rejilla de TEM.

La captura de imágenes con el detector de electrones retrodispersados permite distinguir la presencia de metales pesados, como el Pb, por lo que es posible localizar a los NCs en la muestra en aquellas regiones que se muestran más brillantes (**Figura 78 a4 y b4**).

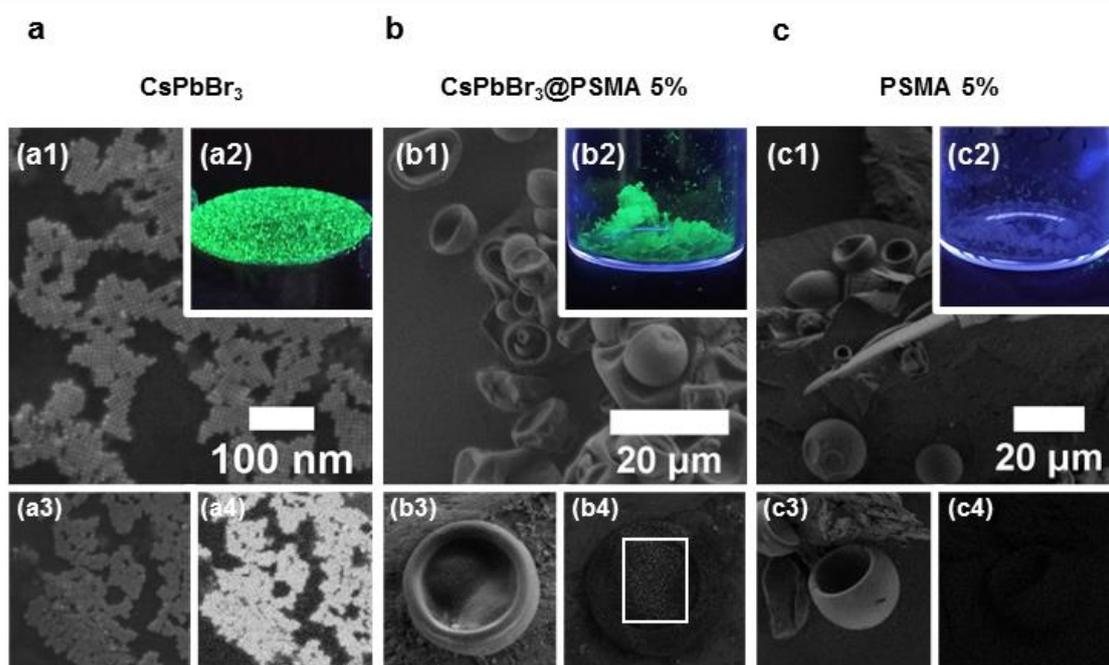


Figura 78. (a1, b1 y c1) Caracterización de las partículas de CsPbBr<sub>3</sub>, CsPbBr<sub>3</sub>@PSMA y PSMA por HRFSEM. En el panel inferior se incluye una región de la imagen tomada con (b3, c3 y d3) el detector de electrones secundarios SE2 y con (b4, c4 y d4) el detector de electrones retrodispersados. (a2, b2 y c2) Imagen bajo luz UV ( $\lambda_{ex}$  254 nm)

El paso siguiente fue optimizar la metodología para obtener partículas con un tamaño inferior, ya que  $10\ \mu\text{m}$  es un tamaño relativamente grande para su utilización en bioimagen.

La concentración de polímero es uno de los parámetros que más influye en el tamaño de la partícula. Cuanto mayor es la concentración de polímero, más viscosa es la disolución y mayor es el tamaño de la partícula final. De modo que se probaron disoluciones con un menor contenido en PSMA: 0,1, 1 y 2,5% (p/v).

Todas las disoluciones se usaron recién preparadas para minimizar el tiempo de evaporación del disolvente y se sometieron a *electrospaying* durante 3h. Pasado este tiempo, se analizaron las partículas por HRFSEM (**Figura 79**).

Según estos resultados, se observa que al reducir la concentración de PSMA, disminuye el tamaño y la dispersión de las partículas. En la muestra de PSMA 2,5% (p/v) las partículas aun presentan un tamaño relativamente grande ( $7,4 \pm 4,9\ \mu\text{m}$ ). Sin embargo, cuando se reduce la concentración de PSMA al 1% (p/v) el tamaño y la dispersión disminuyen ( $1,74 \pm 0,31\ \mu\text{m}$ ), incluso en la muestra de PSMA 0,1% (p/v) se distinguen algunas partículas de tamaño nanométrico ( $72,75 \pm 30,35\ \text{nm}$ ) que coexisten con nanocristales sin encapsular.

Las partículas obtenidas con la concentración más baja de polímero (PSMA 0,1%) son las más adecuadas para su utilización en bioimagen intracelular, ya que el límite establecido para que sean endocitadas por las células es un tamaño  $< 200\ \text{nm}$ . Sin embargo, no fue posible recogerlas del colector, posiblemente porque su proporción en la muestra es muy baja. Como se observa en la **Figura 79a**, coexisten con una población mayoritaria de NCs sin encapsular, y de la misma forma que ocurría inicialmente con la muestra control, no pueden recuperarse del colector mediante raspado, debido al bajo contenido en sólidos.

De este modo, aunque la condición siguiente (PSMA 1%) genera partículas de entre  $1\text{-}2\ \mu\text{m}$  y por tanto se alejan del límite establecido para ser endocitadas, es posible recurrir a células con capacidad fagocítica, como por ejemplo los macrófagos, que pueden internalizar partículas del tamaño de unas pocas micras.<sup>19</sup>

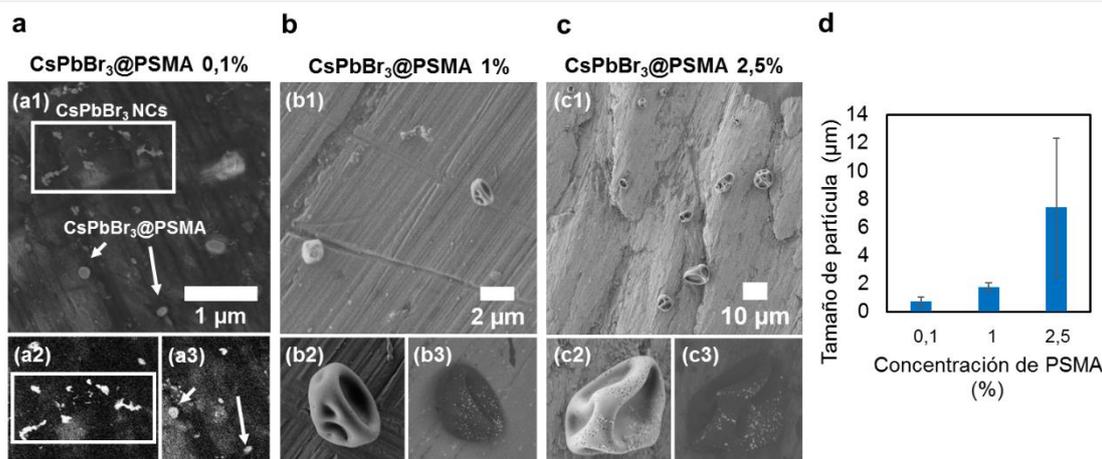


Figura 79. (a-c) Imágenes de HRFESEM y (d) tamaño medio de partícula en función de la concentración de PSMA (0,1%, 1% y 2,5% (p/v)). Las imágenes a2, b3 y c3 están tomadas con el detector de electrones retrodispersados in lens EsB.

Por ejemplo, Nicolette *et al* demostraron con macrófagos de ratón J774 la internalización celular de micropartículas de  $6,5 \mu\text{m}$ .<sup>20</sup> Zhang *et al* seleccionaron macrófagos de ratón de la línea RAW 264.7 en una prueba de concepto de bioimagen con micropartículas multicolores de PS con un tamaño de  $3\text{-}5 \mu\text{m}$ .<sup>21</sup> En este caso, se seleccionó un cultivo de macrófagos de esta misma línea celular para comprobar la compatibilidad de las partículas con este recubrimiento en bioimagen celular.

En una placa de 12 pocillos se establecieron cuatro condiciones (A-D) tal y como se muestra en la **Figura 80**. En todas ellas se crecieron macrófagos RAW 264.7 durante 2 días a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las muestras A y B se crecieron sobre un cubreobjetos de vidrio previamente depositado en el pocillo, para su posterior análisis por microscopía de fluorescencia.

Transcurrido el período de crecimiento, se añadieron las partículas fluorescentes a todas las muestras (excepto C) y se incubaron durante 2 h a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . La muestra A, como control positivo de fagocitosis (CTL +), se incubó con FluoSpheres Rojo Nilo, que son partículas fluorescentes comerciales de poliestireno (PS) funcionalizadas con grupos carboxilo y un tamaño de  $1 \mu\text{m}$ .<sup>22</sup> Las muestras B y D se incubaron con las partículas de CsPbBr<sub>3</sub>@PSMA. La muestra C, como control negativo (CTL-), no se incubó con partículas.

Finalizado el tiempo de incubación, las muestras A y B se tiñeron con diamidino-2-fenilindol (DAPI) y se prepararon para ser analizadas por

microscopía de fluorescencia, mientras que las muestras C y D se sometieron a un proceso de lisis celular y su contenido se midió con un lector de placas, registrando la fluorescencia a una longitud de onda de emisión de 520 nm.

De esta forma, se comprueba de dos formas distintas la interacción de las  $\text{CsPbBr}_3\text{@PSMA}$  con las células, en primer lugar, visualizando directamente la localización de las partículas por microscopía de fluorescencia en el cultivo celular y, en segundo lugar, analizando el contenido celular tras un proceso de disgregación.

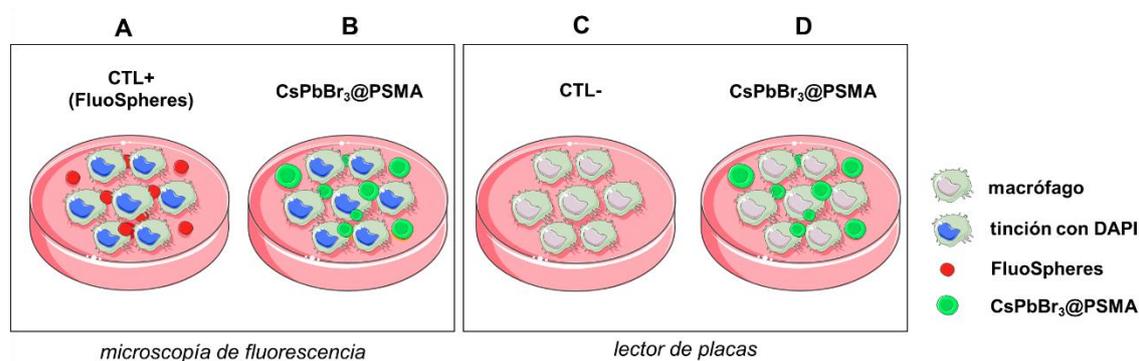


Figura 80. Esquema del diseño experimental. Las muestras A y B se incuban en presencia de las partículas (FluoSpheres Rojo Nilo y  $\text{CsPbBr}_3\text{@PSMA}$ , respectivamente), los núcleos de las células se tiñen con DAPI y los resultados se analizan por CSLM. La muestra C es un control negativo y la muestra D se incubó con las partículas  $\text{CsPbBr}_3\text{@PSMA}$ . Ambas muestras se someten a un proceso de lisado celular y el contenido se analiza con un lector de placas, mediante el registro de su fluorescencia a 520 nm.

Los resultados de las muestras A-D se resumen en la **Figura 81**. La colocalización de la emisión de fluorescencia roja de las FluoSpheres con la emisión azul de los núcleos de las células del grupo CTL+ confirma la capacidad de los macrófagos RAW 264.7 para fagocitar partículas con un tamaño mínimo de 1  $\mu\text{m}$  (muestra A).

Por otro lado, la fluorescencia verde en la muestra B se corresponde con la presencia de micropartículas de  $\text{CsPbBr}_3\text{@PSMA}$  que han interactuado con las células. Sería necesario delimitar la membrana de la célula con otro marcador para poder determinar si han sido internalizadas o simplemente se encuentran adheridas a la membrana.

Los resultados de cuantificación de fluorescencia del contenido del lisado celular demuestran que la señal de la muestra D se atribuye a la presencia de partículas  $\text{CsPbBr}_3@PSMA$  que han interactuado con los macrófagos durante el período de incubación. Además, la detección de esta señal implica que las partículas resisten a las condiciones de cultivo y al proceso de permeabilización y disgregación celular, confirmando la estabilidad de los NCs de  $\text{CsPbBr}_3$  al estar recubiertos por PSMA.

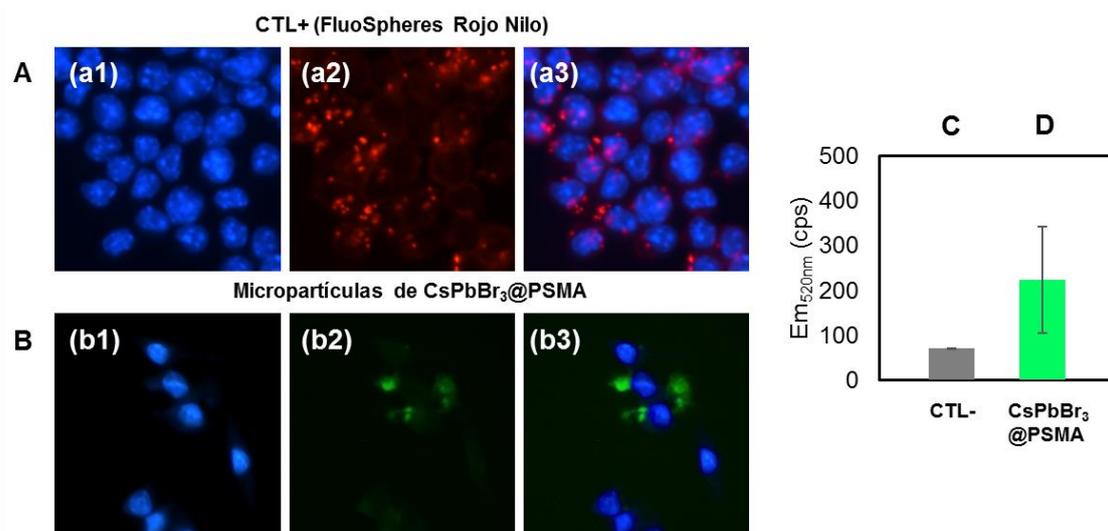


Figura 81. Resultados de la emisión de fluorescencia de las muestras A-D. La secuencia de imágenes de microscopía de fluorescencia de las muestras A y B, comienza con (a1 y b1) fluorescencia azul del núcleo de las células teñido con DAPI, seguido de (a2 y b2) la emisión roja/verde de las FluoSpheres/ $\text{CsPbBr}_3@PSMA$ , respectivamente y de (a3 y b3) la fusión de las imágenes anteriores. En el histograma se muestra la emisión de fluorescencia a 520 nm del contenido del lisado celular de las muestras C y D, cuantificada con un lector de placas. Cada una de las condiciones incluye dos réplicas.

### 5.3. Conclusiones

En este trabajo se ha recurrido por primera vez al copolímero de poli(estireno-co-anhídrido maleico (PSMA) para encapsular NCs de CsPbBr<sub>3</sub> mediante *electrospraying*.

Se ha demostrado que este polímero no interfiere con las propiedades ópticas de los NCs y proporciona un recubrimiento resistente, reteniendo el 90% de su fluorescencia inicial 4 días después de dispersarse en agua.

Con el equipo disponible, se ha determinado que, reduciendo la concentración de PSMA en la disolución que se somete a *electrospraying*, es posible producir nanopartículas de unos 70 nm. Sin embargo, la dificultad para recogerlas del colector por su bajo contenido en sólidos ha llevado a establecer una concentración mínima de PSMA 1% (p/v), con la cual el tamaño de partícula asciende a 1-2 μm.

Aunque este tamaño se aleja de los criterios fijados para esta tesis, es relativamente pequeño si se compara con trabajos similares (**Tabla 13**). Por ejemplo, Yang *et al* produjeron microesferas de PS de 4-5 μm,<sup>8</sup> Zhou *et al* obtuvieron microesferas de PS de 10-15 μm,<sup>10</sup> y Wang *et al* generaron micropartículas de PMMA que alcanzan un tamaño de 17 μm.<sup>13</sup>

Tabla 13. Características de los NCs de perovskita estabilizados en partículas poliméricas mediante electro spraying

| MHP@Recubrimiento         | Diámetro (μm) | PLQY (%) | Estabilidad en agua | Aplicación                   | Ref.         |
|---------------------------|---------------|----------|---------------------|------------------------------|--------------|
| CsPbBr <sub>3</sub> @PSMA | 1,7           | N.D      | 4 días              | Bioimagen                    | Este trabajo |
| CsPbBr <sub>3</sub> @PS   | 4-5           | 52       | 30 días             | LEDs                         | 8            |
| CsPbBr <sub>3</sub> @PS   | 10-15         | 43       | N.D                 | N.D                          | 10           |
| CsPbBr <sub>3</sub> @PVDF | 0,6           | N.D      | 3 días              | Bioimagen                    | 12           |
| CsPbBr <sub>3</sub> @PMMA | 17            | N.D      | 20 días             | Sensor de fosfatasa alcalina | 13           |
| MAPbBr <sub>3</sub> @PC   | 0,16          | 70       | 60 días             | Bioimagen                    | 17           |

Es posible seguir optimizando otros parámetros que influyen en el proceso, además de la concentración de polímero, como por ejemplo el voltaje, la distancia de la aguja al colector o el caudal. Incluso, cabe la posibilidad de incorporar una lámpara infrarroja para acelerar la volatilización del disolvente. De esta manera Yong *et al* consiguieron producir partículas de 80-160 nm.<sup>17</sup>

Independientemente de estos factores, hay que considerar que el modo de recolección de las partículas mediante el raspado del colector puede hacer que se aglomeren y por tanto, el tamaño final de partícula sea superior al estimado inicialmente. En este sentido deben plantearse otras opciones para evitarlo. Por ejemplo, Wang *et al* atomizaron directamente la disolución sobre éter de petróleo y obtuvieron partículas de CsPbBr<sub>3</sub>@PMMA de 100 nm,<sup>23</sup> y Dellacasa *et al* obtuvieron partículas de PSMA de 170 nm al atomizar la disolución sobre etanol.<sup>24</sup>

Finalmente, las partículas de CsPbBr<sub>3</sub>@PSMA obtenidas por *electrospraying* se han incubado en un cultivo de macrófagos con el fin de evaluar su potencial como agentes de contraste en bioimagen celular. Los resultados de esta prueba de concepto demuestran que, si bien algunas células llegan a estar marcadas con la fluorescencia de estas partículas, el porcentaje es bajo, probablemente porque las partículas se agregan durante el proceso de recolección o porque el tiempo de incubación de 2 h no sea suficiente para que las células las fagociten.

En base a los resultados, es posible que las técnicas de atomización no sean las más apropiadas para fabricar nanopartículas que puedan aplicarse en bioimagen. Sin embargo, puede ser una alternativa para depositar películas de NCs sobre grandes superficies para la fabricación de células solares, en lugar de por spin-coating, que está limitada para áreas de menor tamaño.<sup>25,26</sup>

Con todo ello, se ha demostrado por primera vez que el recubrimiento de PSMA estabiliza a los NCs de perovskita en agua, medio de cultivo y frente condiciones agresivas durante la permeabilización y disgregación celular. En el caso de recurrir a otras estrategias que permitan reducir en mayor medida el tamaño de partícula puede convertirse en una opción interesante por su alta estabilidad térmica y biocompatibilidad.

## 5.4. Materiales y métodos

---

### Reactivos

Carbonato de cesio 99,9%, Bromuro de plomo (II)  $\geq 98\%$ , 1-Octadeceno (ODE) grado técnico 90% y poli(estireno-co-anhídrido maleico) (PSMA) con un índice de fluidez 1,9 g/10 min (230 °C/2,16 kg), anhídrido maleico 14 wt% de Sigma-Aldrich. Ácido oleico (OA) grado técnico 90% y Oleilamina (OAm) (contenido aproximado C-18 80-90%) comprados en Fisher Scientific. Tolueno anhidro 99,8% obtenido de Scharlab.

### Síntesis de NCs de CsPbBr<sub>3</sub>

Los NCs de CsPbBr<sub>3</sub> se sintetizaron de acuerdo con la metodología de hot-injection descrita por Protesescu *et al.*<sup>18</sup> Brevemente, en un matraz de 100 mL de 3 bocas sumergido en un baño de silicona sobre una placa calefactora, se añadieron 138 mg PbBr<sub>2</sub>, 10 mL de ODE y 1 mL de OA y se aplicó vacío hasta alcanzar una temperatura de 120 °C (~ 45 min). Posteriormente, se inyectó 1 mL de OAm bajo flujo de Ar y la temperatura se incrementó a 170 °C. Al alcanzar 165 °C, se inyectaron rápidamente 0,8 mL de oleato de cesio previamente calentado en la misma placa. Después de 10 s, la reacción se atemperó sumergiéndola en un baño de hielo.

Para purificar los NCs sintetizados, se dispersaron en 25 mL de tolueno, seguido de centrifugación a 6.654 rcf durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se dispersó en 25 mL de tolueno. La disolución se centrifugó a 10.397 rcf durante 10 min y se almacenó el sobrenadante.

El oleato de cesio se preparó de la siguiente manera: en un matraz de 50 mL de 2 bocas, sumergido en un baño de silicona sobre una placa calefactora, se añadieron 205 mg de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se aplicó vacío durante 10 min. Posteriormente, 10 mL de ODE y 0,620 mL de OA se inyectaron bajo atmósfera inerte de Ar y la temperatura se incrementó a 120 °C en condiciones de vacío y agitación magnética suave durante 40 min. Una vez disuelto el Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, la temperatura se subió a 150 °C bajo Ar y una vez alcanzada se atemperó la reacción.

## Preparación de partículas de CsPbBr<sub>3</sub>@PSMA

Inicialmente el polímero PSMA (en perlas) se disolvió en 2,5 mL de tolueno, obteniendo disoluciones concentradas al 0,2, 2, 5 y 10% (p/v). Posteriormente, se añadieron 2,5 mL de NCs de CsPbBr<sub>3</sub> y la mezcla se homogeneizó mediante agitación magnética durante 5 min. Todas las disoluciones se prepararon previamente a su utilización para minimizar la evaporación del disolvente.

La jeringa de vidrio de 5 mL (Ruthe) se cargó con 3 mL de la disolución. Uno de los electrodos del generador se conectó a la aguja de la jeringa y el otro al colector de aluminio. La distancia entre la aguja y el colector fue de 15 cm. La velocidad de inyección de la bomba de jeringa (KD Scientific 100) se fijó a 0,3 mL/h y se estableció un voltaje de 25 kV en el generador (Acopian Power Supply Model P02HP15).

Sobre el colector se adhirieron portamuestras de aluminio con cinta conductora de doble cara y, tras un tiempo de *electrospraying* de 3h, se despegaron para caracterizar las muestras por microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HRFESEM).

Finalmente, el colector se raspó con una rasqueta para recuperar el resto de las partículas adheridas a su superficie y se almacenaron en un vial. Para evitar contaminación cruzada entre muestras, la jeringa, la aguja y el colector se lavaron con tolueno y etanol tras su uso.

## Incubación de las partículas con células de macrófagos

En una placa de 12 pocillos, se depositó un cubreobjetos de vidrio de borosilicato de 10 mm de diámetro (Menzel Gläser) en los pocillos destinados a las muestras A y B, mientras que los de C y D se dejaron vacíos. La placa se irradió con luz UV durante 90 min en una cabina de seguridad biológica con flujo laminar.

Posteriormente, se incubaron las células de macrófago de ratón de la línea RAW 264.7 a una densidad de 500.000 células/pocillo durante 2 días en *Dulbeccos modified Eagles Medium* (DMEM, Gibco™), suplementado con 10% (v/v) de Suero Bovino Fetal (FBS), 1% de HEPES, 1% de penicilina y 1% de anfotericina B, en una estufa a 37 °C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y humedad del 95%.

El medio se eliminó por aspiración. Se añadieron 300  $\mu\text{L}$ /pocillo de las partículas dispersas en DMEM suplementado y se mantuvo en estufa durante 2h a 37 °C. La muestra A se incubó con las FluoSpheres Rojo Nilo (Invitrogen), mientras que las muestras B y D con las micropartículas  $\text{CsPbBr}_3\text{@PSMA}$ . Transcurrido este tiempo, los pocillos se lavaron 3 veces con 400  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato salino (PBS) 1x, pH 7,4.

### Tinción de las muestras

Las muestras A y B se fijaron con 250  $\mu\text{L}$ /pocillo paraformaldehído (PFA) 4% durante 15 min. Después, se eliminó el PFA con 3 lavados de PBS 1x y los núcleos de las células se tiñeron añadiendo 250  $\mu\text{L}$ /pocillo de diamidino-2-fenilindol (DAPI). Tras 5 min en oscuridad, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS 1x y el cubreobjetos se montó con Prolong Antifade sobre un portaobjetos de vidrio para analizar la muestra por microscopía de fluorescencia.

### Lisis celular

Las células de las muestras C y D se despegaron del pocillo añadiendo 150  $\mu\text{L}$ /pocillo del reactivo de disociación celular (GCDR, Stemcell). Su contenido se centrifugó a 7.500 rcf durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 150  $\mu\text{L}$  de Tritón X-100 (0,1% v/v en PBS) y se sometió a ultrasonidos durante 10 min en baño de hielo para favorecer la disrupción celular. El contenido del lisado se transfirió a una placa multipocillos opaca para medir su fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}}$  295 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  520 nm).

### Métodos de caracterización

El espectro de emisión de fluorescencia se obtuvo con un espectrofluorímetro PTI QMA4 (Horiba) con  $\lambda_{\text{ex}}$  fija a 355 nm. La caracterización de las partículas se realizó por HRFSEM (GeminiSEM 500, ZEISS). Las fotografías de los portamuestras se tomaron bajo lámpara UV (VL-4.C  $\lambda_{\text{ex}}$  254nm, Vilber Lourmat). Las muestras de los cultivos celulares se visualizaron con un microscopio de fluorescencia (Eclipse 90i, Nikon) y el contenido del lisado celular se midió a una longitud de onda de 520 nm con un lector de placas (CLARIOstar, BMG Labtech).

## 5.5. Bibliografía

---

- (1) Boda, S. K.; Li, X.; Xie, J. Electrospinning an Enabling Technology for Pharmaceutical and Biomedical Applications: A Review. *J. Aerosol Sci.* **2018**, *125*, 164–181. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2018.04.002>.
- (2) Sverdlov Arzi, R.; Sosnik, A. Electrohydrodynamic Atomization and Spray-Drying for the Production of Pure Drug Nanocrystals and Co-Crystals. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *131*, 79–100. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.012>.
- (3) Nguyen, D. N.; Clasen, C.; Van den Mooter, G. Pharmaceutical Applications of Electrospinning. *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105* (9), 2601–2620. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.024>.
- (4) Jacobsen, C.; García-Moreno, P. J.; Mendes, A. C.; Mateiu, R. V.; Chronakis, I. S. Use of Electrohydrodynamic Processing for Encapsulation of Sensitive Bioactive Compounds and Applications in Food. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2018**, *9* (1), 525–549. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012348>.
- (5) Qi, S.; Craig, D. Recent Developments in Micro- and Nanofabrication Techniques for the Preparation of Amorphous Pharmaceutical Dosage Forms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *100*, 67–84. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.003>.
- (6) Jayaraman, P.; Gandhimathi, C.; Venugopal, J. R.; Becker, D. L.; Ramakrishna, S.; Srinivasan, D. K. Controlled Release of Drugs in Electrospun Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *94*, 77–95. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.007>.
- (7) Wang, Y.; Zhu, Y.; Huang, J.; Cai, J.; Zhu, J.; Yang, X.; Shen, J.; Jiang, H.; Li, C. CsPbBr<sub>3</sub> Perovskite Quantum Dots-Based Monolithic Electrospun Fiber Membrane as an Ultraprecise and Ultrasensitive Fluorescent Sensor in Aqueous Medium. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7* (21), 4253–4258. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.6b02045>.
- (8) Yang, X.; Xu, T.; Zhu, Y.; Cai, J.; Gu, K.; Zhu, J.; Wang, Y.; Shen, J.; Li, C. Preparation of CsPbBr<sub>3</sub>@PS Composite Microspheres with High Stability by Electrospinning. *J. Mater. Chem. C* **2018**, *6* (30), 7971–7975. <https://doi.org/10.1039/C8TC01408F>.
- (9) Liao, H.; Guo, S.; Cao, S.; Wang, L.; Gao, F.; Yang, Z.; Zheng, J.; Yang, W. A General Strategy for In Situ Growth of All-Inorganic CsPbX<sub>3</sub> (X = Br, I, and Cl) Perovskite Nanocrystals in Polymer Fibers toward Significantly Enhanced Water/Thermal Stabilities. *Adv. Opt. Mater.* **2018**, *6* (15), 1800346. <https://doi.org/10.1002/adom.201800346>.

- (10) Zhou, J.; Lin, H.; Yu, Y.; Zuo, S.; Li, B.; Liu, J. Bright Luminous and Stable CsPbBr<sub>3</sub>@PS Microspheres Prepared via Facile Anti-Solvent Method Using CTAB as Double Modifier. *Chem. – Eur. J.* **2020**, *26* (46), 10528–10533. <https://doi.org/10.1002/chem.202000835>.
- (11) Tian, T.; Yang, M.; Fang, Y.; Zhang, S.; Chen, Y.; Wang, L.; Wu, W.-Q. Large-Area Waterproof and Durable Perovskite Luminescent Textiles. *Nat. Commun.* **2023**, *14* (1), 234. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-35830-8>.
- (12) Wang, F.; Wang, H.; Ali, A.; Zhang, Y.; Cui, X.; Liu, Y. In-Situ One-Step Electro Spray Fabrication of Polyvinylidene Fluoride Encapsulated CsPbBr<sub>3</sub> Spheres with High Stability and Cell Imaging Application. *Inorg. Chem. Commun.* **2019**, *106*, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2019.05.032>.
- (13) Wang, A.-L.; Teng, J.-X.; Yang, C.-G.; Xu, Z.-R. Rapid and Facile Electro spray Preparation of CsPbBr<sub>3</sub>@PMMA Fluorescent Microspheres for Fluorescent Detection of ALP in Biological Samples. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2022**, *634*, 127909. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127909>.
- (14) Wang, Y.; Zhu, Y.; Huang, J.; Cai, J.; Zhu, J.; Yang, X.; Shen, J.; Li, C. Perovskite Quantum Dots Encapsulated in Electrospun Fiber Membranes as Multifunctional Supersensitive Sensors for Biomolecules, Metal Ions and pH. *Nanoscale Horiz.* **2017**, *2* (4), 225–232. <https://doi.org/10.1039/C7NH00057J>.
- (15) Lin, C. C.; Jiang, D.-H.; Kuo, C.-C.; Cho, C.-J.; Tsai, Y.-H.; Satoh, T.; Su, C. Water-Resistant Efficient Stretchable Perovskite-Embedded Fiber Membranes for Light-Emitting Diodes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (3), 2210–2215. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b15989>.
- (16) Tsai, P.-C.; Chen, J.-Y.; Ercan, E.; Chueh, C.-C.; Tung, S.-H.; Chen, W.-C. Uniform Luminous Perovskite Nanofibers with Color-Tunability and Improved Stability Prepared by One-Step Core/Shell Electrospinning. *Small* **2018**, *14* (22), 1704379. <https://doi.org/10.1002/sml.201704379>.
- (17) Long, Z.; Wang, Y.; Fu, Q.; Ouyang, J.; He, L.; Na, N. Accelerated Crystallization and Encapsulation for the Synthesis of Water- and Oxygen-Resistant Perovskite Nanoparticles in Micro-Droplets. *Nanoscale* **2019**, *11* (23), 11093–11098. <https://doi.org/10.1039/C9NR03647D>.
- (18) Protesescu, L.; Yakunin, S.; Bodnarchuk, M. I.; Krieg, F.; Caputo, R.; Hendon, C. H.; Yang, R. X.; Walsh, A.; Kovalenko, M. V. Nanocrystals of Cesium Lead Halide Perovskites (CsPbX<sub>3</sub>, X = Cl, Br, and I): Novel Optoelectronic Materials Showing Bright Emission with Wide Color Gamut. *Nano Lett.* **2015**, *15* (6), 3692–3696. <https://doi.org/10.1021/nl5048779>.

- (19) Srinivas, M.; Sharma, P.; Jhunjhunwala, S. Phagocytic Uptake of Polymeric Particles by Immune Cells under Flow Conditions. *Mol. Pharm.* **2021**, *18* (12), 4501–4510. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00698>.
- (20) Nicolete, R.; dos Santos, D. F.; Faccioli, L. H. The Uptake of PLGA Micro or Nanoparticles by Macrophages Provokes Distinct in Vitro Inflammatory Response. *Int. Immunopharmacol.* **2011**, *11* (10), 1557–1563. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.05.014>.
- (21) Zhang, H.; Wang, X.; Liao, Q.; Xu, Z.; Li, H.; Zheng, L.; Fu, H. Embedding Perovskite Nanocrystals into a Polymer Matrix for Tunable Luminescence Probes in Cell Imaging. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27* (7), 1604382. <https://doi.org/10.1002/adfm.201604382>.
- (22) Colin, M.; Mailly, L.; Rogée, S.; D’Halluin, J.-C. Efficient Species C HAdV Infectivity in Plasmocytic Cell Lines Using a Clathrin-Independent Lipid Raft/Caveola Endocytic Route. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2005**, *11* (2), 224–236. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.10.007>.
- (23) Wang, Y.; Varadi, L.; Trinchi, A.; Shen, J.; Zhu, Y.; Wei, G.; Li, C. Spray-Assisted Coil–Globule Transition for Scalable Preparation of Water-Resistant CsPbBr<sub>3</sub>@PMMA Perovskite Nanospheres with Application in Live Cell Imaging. *Small* **2018**, *14* (51), 1803156. <https://doi.org/10.1002/sml.201803156>.
- (24) Dellacasa, E.; Forouharshad, M.; Rolandi, R.; Pastorino, L.; Monticelli, O. Poly(Styrene-Co-Maleic Anhydride) Nanoparticles as Protein Carriers. *Mater. Lett.* **2018**, *220*, 241–244. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.03.044>.
- (25) Chen, H.; Wang, R.; Ma, W.; Zhang, H.; Yang, L. One-Step Spray Coating Strategy toward a Highly Uniform Large-Area CsPbBr<sub>3</sub>@PMMA Composite Film for Backlit Display. *Opt. Express* **2022**, *30* (12), 20241–20249. <https://doi.org/10.1364/OE.457990>.
- (26) Hong, S. C.; Lee, G.; Ha, K.; Yoon, J.; Ahn, N.; Cho, W.; Park, M.; Choi, M. Precise Morphology Control and Continuous Fabrication of Perovskite Solar Cells Using Droplet-Controllable Electrospay Coating System. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (9), 7879–7884. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b15095>.



# Capítulo 6

## Conclusiones



En esta tesis se han explorado varias estrategias de encapsulación para la estabilización de nanocristales de perovskita de haluros metálicos en medio acuoso, con el fin de desarrollar su potencial como marcadores luminiscentes versátiles en sistemas analíticos o bioimagen *in vitro*.

Los resultados de esta investigación muestran que es posible producir cuatro tipos de partículas, basadas en recubrimientos de sílice o poliméricos, que permiten la transferencia de nanocristales de perovskita luminiscentes en medio acuoso y los protegen frente a su degradación.

### 1. Nanopartículas *core-shell* de CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>@SiO<sub>2</sub>

En primer lugar, se ha desarrollado una metodología que consiste en la adición lenta del alcoxisilano y el catalizador sobre los NCs presintetizados de CsPbBr<sub>3</sub>. Como resultado se ha obtenido una población monodispersa de NPs con estructura *core-shell*, donde unos pocos núcleos de perovskita CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> quedan envueltos por una capa de sílice.

Estas NPs se caracterizan por tener un tamaño de 32 nm, emiten fluorescencia en el azul y pueden dispersarse homogéneamente en agua y tampón salino, condiciones en las que mantienen sus propiedades ópticas durante al menos 3 días. Por último, como prueba de concepto, se ha demostrado el potencial de las NPs *core-shell* como marcadores fluorescentes en un inmunoensayo directo entre el anticuerpo anti-BSA y su diana (BSA). Si bien, este estudio constituye una primera evidencia de su utilización como marcador, el bajo rendimiento cuántico de fotoluminiscencia (PLQY 5%) conduciría a una baja sensibilidad en el caso de implantarse en un sistema analítico.

### 2. Nanopartículas *core-shell* de CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> (X= Cl/Br, Br y I)

En segundo lugar, se ha aprovechado que la transformación de NCs de Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub> en CsPbX<sub>3</sub> ocurre en condiciones compatibles con la metodología sol-gel para obtener NPs *core-shell* de CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> con tamaños de 20-30 nm.

Una de las novedades que aporta este trabajo es que no se centra únicamente en la habitual composición de bromo, sino que extiende la metodología hacia otras composiciones de haluro. Concretamente, se han obtenido NPs que emiten en el azul, en el verde y en el rojo (X = Cl/Br, Br y I, respectivamente), siendo un paso clave hacia el multiplexado basado en la emisión multicolor.

Esta metodología genera un recubrimiento de sílice que mejora la estabilidad estructural y eficiencia de emisión con respecto a los NCs libres, alcanzando valores de PLQY de 18 % y 57% para la composición mixta de Cl/Br y Br, respectivamente.

Posteriormente, la aplicación de un tratamiento térmico adicional ha permitido comprobar el potencial de las partículas como marcadores fluorescentes en un inmunoensayo directo entre Omalizumab (anti-IgE) y su receptor. Sin embargo, es necesario reconsiderar las condiciones de síntesis o buscar una alternativa al tratamiento térmico como solución a la estabilización de las partículas en medio acuoso, ya que esta etapa altera las propiedades ópticas de las partículas resultantes y causa problemas de agregación.

### 3. Nanopartículas CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA

En tercer lugar, se han obtenido nanopartículas poliméricas mediante la estrategia de coprecipitación, donde el cambio de solubilidad ha inducido el autoensamblaje del polímero en micelas, atrapando múltiples nanocristales de perovskita en su interior.

Las NPs de CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA exhiben un PLQY relativamente alto (60%), se dispersan homogéneamente en medio acuoso y mantienen una excelente estabilidad, características que cumplen con las expectativas definidas al comienzo de esta tesis. Además, la optimización de la síntesis, ha derivado en una metodología rápida, sencilla y reproducible, cuya producción es fácilmente escalable sin la necesidad de equipamiento sofisticado.

Considerando todas estas características, prevemos que tienen verdadero potencial como marcadores luminiscentes en tira reactiva como plataforma analítica, pudiendo competir en sensibilidad frente a las NPs de oro coloidal (marcador convencional) y en simplicidad de producción frente a los desarrollos basados en la utilización de QDs clásicos. Si bien, queda un largo recorrido para que se convierta en una realidad, esta tesis ha contribuido con resultados iniciales de la utilización de estas nanopartículas para la detección de H-IgGs, siendo la base para demostrar por primera vez la viabilidad de los NCs de perovskita en tira reactiva.

### 4. Micropartículas CsPbBr<sub>3</sub>@PSMA

En cuarto lugar, la estrategia de *electrospraying* ha permitido encapsular NCs en partículas poliméricas a partir de la atomización de la disolución que contiene ambos componentes. Sin embargo, el gran tamaño y polidispersión de las partículas resultantes, del orden de varios micrómetros, hace que no sea la

estrategia más adecuada para el fin que se pretende en esta tesis. No obstante, puede interesante para la deposición de nanocristales en finas películas que puedan integrarse en LEDs, pantallas o células solares.

En resumen, esta tesis se ha enfrentado al desafío que supone la inestabilidad intrínseca de los nanocristales de perovskita, desarrollando estrategias para su estabilización en medio acuoso con el fin de explorar su potencial en biosensado o bioimagen. De todas ellas, se puede considerar que, hasta ahora, la metodología de encapsulación por coprecipitación en micelas poliméricas promete ser la estrategia más viable, por su sencillez y reproducibilidad en la estabilización de NCs de perovskita sin deteriorar significativamente sus propiedades ópticas. Se espera que la información proporcionada resulte valiosa para reproducir esta metodología con otras composiciones de haluro, o alternativas menos tóxicas comprometidas con el desarrollo sostenible de nanomateriales basados en nanocristales de perovskita.



# Chapter 6

## Conclusions



In this thesis, metal halide perovskite nanocrystals were stabilized in aqueous media through several encapsulation strategies to produce versatile luminescent labels with application in analytical systems and *in vitro* bioimaging.

This research led to the synthesis of four types of water-stable particles, based on silica or polymeric coatings which prevented perovskite nanocrystals from degradation in aqueous environments.

### **1. CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub>@SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticles**

A new methodology consisting of the slow addition of the alkoxy silane precursor and catalyst into previously synthesized CsPbBr<sub>3</sub> NCs solution was developed. As a result, a monodisperse population of core-shell NPs was obtained, where some CsPb<sub>2</sub>Br<sub>5</sub> cores are coated within a silica shell.

The resulting NPs have a size of 32 nm and can be homogeneously dispersed in water and saline buffer, maintaining their blue emission at least for 3 days. Finally, as a proof of concept, their potential as fluorescent labels was assessed in a direct immunoassay involving anti-BSA antibody and its target (BSA protein). While this study constitutes initial evidence, the low photoluminescence quantum yield (PLQY 5%) would lead to low sensitivity if implemented in an analytical system.

### **2. CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticles, (X= Cl/Br, Br y I)**

A methodology that combines Cs<sub>4</sub>PbX<sub>6</sub> NCs transformation into CsPbX<sub>3</sub> NCs with the sol-gel process was optimized to produce core-shell CsPbX<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub> NPs with sizes ranging between 20 and 30 nm.

One of the novelties of this work is applying the methodology to other halide compositions apart from bromine. As a result, multicolor emitting nanoparticles (X = Cl/Br (blue), Br (green), and I (red), respectively) were produced, which is key for multiplexing assays. This methodology produces a silica coating, enhancing the structural stability and emission efficiency compared to free NCs, with PLQY values of 18% and 57% regarding the Cl/Br and Br compositions, respectively.

After applying an additional thermal treatment, which ensured the water resistance, the potential of the resulting particles as fluorescent markers was assessed in a direct immunoassay between Omalizumab (anti-IgE) and its receptor. Regarding this methodology, the synthesis conditions must be adjusted to produce a more compact silica network. Another option is seeking an alternative to applying a thermal treatment, since this step alters the optical properties of the resulting particles and causes some aggregation problems.

### **3. CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA nanoparticles**

Polymeric nanoparticles were synthesized by a coprecipitation methodology, where a change in solubility triggers the polymer self-assembly behavior into micelles, entrapping multiple perovskite nanocrystals during this process.

CsPbBr<sub>3</sub>@PS-b-PAA NPs exhibit a relatively high PLQY, disperse well in aqueous media, and maintain excellent stability, accomplishing the expected requirements established at the beginning of this thesis. Moreover, the optimization process resulted in a faster, simpler, more reproducible, and easy-to-scale-up methodology without sophisticated equipment.

Considering all these characteristics, we envision that they have real potential as luminescent labels in lateral flow as the analytic platform, competing in sensibility with the conventional colloidal Au NPs, and also in terms of cost-effective production in comparison to traditional QDs-based developments. While there is still a long way to become a real possibility, this thesis contributes with initial results using these nanoparticles for H-IgGs detection, paving the way towards the use of perovskite NCs in lateral flow for the first time.

### **4. CsPbBr<sub>3</sub>@PSMA microparticles**

Perovskite NCs can be embedded into polymeric particles by electro spraying a solution containing both components. Given the high size and polydispersion of the resulting particles, in the range of several micrometers, it is not the best strategy according to the main objective of this thesis. However, this technique may be interesting for the deposition of NCs on thin films with applications in LEDs, displays, or solar cells.

To sum up, this thesis faces the intrinsic instability of perovskite nanocrystals by developing strategies for their stabilization in aqueous media to explore their potential in biosensing or bioimaging. Among all of them, encapsulation by coprecipitation should be considered the most viable strategy so far, due to the simplicity and reproducibility to stabilize perovskite nanocrystals without producing significant changes in their optical properties. The information offered is expected to be useful to reproduce this methodology with other halide compositions or less toxic alternatives in order to develop sustainable perovskite-based nanomaterials.