



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

GRAU DE QUÍMICA

TREBALL DE FI DE GRAU

**FABRICACIÓ DE NANOCOMPOSTOS  
LUMINESCENTS BASATS EN IONS LANTÀNID I LA  
SEVA CARACTERITZACIÓ I FUNCIONALITZACIÓ  
PER LA FABRICACIÓ DE BIOSENSORS**

Presentat per:

**Gerard Bartra Celdran**

Dirigit per:

**Xavier Mateos i Rosa Maria Solé**

Grup de recerca:

**Física i Cristal·lografia de Materials (FiCMA), URV**

2021/2022



# AGRAÏMENTS

En primer lloc m'agradaria agrair el suport i l'ajuda rebuda per part dels meus directors del projecte Dr. Xavier Mateos i Dr. Rosa Maria Solé, i per proporcionar-me la oportunitat de treballar al seu grup de recerca (FiCMA) i obrir-me les portes al interessantíssim món de la investigació.

A tots els companys de recerca, en especial a l'estudiant de doctorat J. David Coral que ha estat sempre amb mi, amb el que hem tirat endavant el projecte i amb el que s'està escrivint un article científic com a resultat d'aquesta investigació (*Development of  $Ca_8NaBi(PO_4)_6F_2:xEu/PDMS$  Nanocomposite for Biosensing Applications*).

I finalment a la tècnica de laboratori Dr. Gemma Marsal.

# ÍNDEX

1- Introducció .....	2
1.1- Nanocompostos polimèrics.....	2
1.2- Polidimetilsiloxà (PDMS) .....	3
1.3- Resina SU-8 fotoresistent.....	4
1.4- Biosensors .....	4
2- Fonaments.....	5
2.1- Mètode Sol-Gel per la síntesi de nanopartícules .....	5
2.2- Mecanismes fotoluminescents en ions lantànids .....	6
2.3- Funcionalització de la superfície dels nanocompostos .....	9
3- Objectius.....	13
4- Metodologia i Pla de treball.....	14
4.1- Materials, reactius i seguretat .....	14
4.2- Construcció d'una corba de calibratge del gruix de les capes .....	15
4.3- Dispersió de les nanopartícules .....	18
4.4- Fabricació dels nanocompostos.....	18
4.5- Detecció de les emissions de l'Europi .....	20
4.6- Funcionalització per etapes dels nanocompostos .....	22
4.7- Caracterització de la funcionalització per etapes .....	26
5- Resultats i discussió .....	27
5.1- Construcció d'una corba de calibratge del gruix de les capes .....	27
5.2- Dispersió de les nanopartícules .....	29
5.3- Fabricació dels nanocompostos.....	29
5.4- Detecció de les emissions de l'Europi .....	31
5.5- Funcionalització per etapes dels nanocompostos .....	37
5.6- Caracterització de la funcionalització per etapes .....	37
6- Conclusions .....	43

## RESUM / ABSTRACT

Els nanocompostos són materials amb una gran millora de les propietats del nanomaterial incorporat. Minerals com les apatites  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$  poden dopar-se amb ions lantànids, el que proporciona propietats luminescents al material. La fabricació de nanocompostos polimèrics amb nanopartícules luminescents (NPs) obre noves portes al disseny de sensors òptics basats en la modificació de la intensitat de la llum produïda per la presència d'una molècula objectiu. A través de diferents passos de funcionalització de la superfície del nanocompost, es pot assolir la immobilització d'una molècula en qüestió.

En aquest treball es fabrica un biosensor per a la detecció d'aflatoxina B1 (una molècula extremadament tòxica) mitjançant un nanocompost que conté apatites dopades amb europi ( $\text{Eu}^{3+}$  4% en pes respecte al calci). El fonament de la detecció de l'aflatoxina B1 es basa en la ressonància dels anells aromàtics, provocant una variació de la intensitat de la llum de longitud d'ona visible emesa per l' $\text{Eu}^{3+}$ . Vists els resultats, aquest treball obre la porta a la nova fabricació de sensors d'interès biològic, mediambiental, etc, d'una forma compacta, econòmica i ràpida, on caldrà continuar posant esforços en millorar la sensibilitat del sensor. Els resultats d'aquest estudi seran presentats a la conferència 19th Edition ANM 2022 University of Aveiro, Portugal, els dies 27, 28 i 29 de Juliol, on han estat acceptats com a presentació oral.

Nanocomposites are materials with a great improvement in the properties of the embedded nanomaterial. Minerals like the apatites  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$  can be doped with lanthanide ions, providing luminescent properties to the material. The fabrication of polymeric nanocomposites with luminescent nanoparticles (NPs) opens new doors to the design of optical sensors based on the modification of the light intensity produced by the presence of a target molecule. Via different steps functionalization of the nanocomposite's surface, the immobilization of a target molecule can be reached.

In this work, a biosensor for Aflatoxin B1 (an extremely toxic molecule) detection is fabricated through a nanocomposite containing apatites doped with europium ( $\text{Eu}^{3+}$  4% wt regarding to calcium). The basis of the detection of the aflatoxin B1 is based on the resonance of its aromatic rings, causing a variation in the intensity of the visible wavelength light emitted from  $\text{Eu}^{3+}$ . In view of the results, this work opens the door to the new manufacture of sensors of biological, environmental, etc. interest, in a compact, economical and fast way, where efforts should continue to be made to improve sensitivity of the sensor. The results of this study will be presented at the 19th Edition ANM 2022 University of Aveiro, Portugal.

## 1- Introducció

El camp de la nanociència i la nanotecnologia és una àrea que està guanyant, cada cop més, un gran interès científic. Això és gràcies, en gran part, a la millora de les propietats dels materials quan es troben a la nanoescala (nanocompostos), en comparació amb els micro- i macromaterials.

Una de les aplicacions que està agafant més força en el camp de la nanociència és la fabricació de biosensors per a deteccions biomèdiques, a causa de l'increment dels perills bacteriològics, alimentaris o virus com la recent COVID-19. Es pot dir que un biosensor és ideal si aquest és capaç de proporcionar una anàlisi ràpid, precís, sensible i rentable, i sobretot que sigui fàcil de manipular<sup>1</sup>.

La molècula que hem decidit detectar mitjançant el biosensor és la Aflatoxina B1 (AFB1), però el rang de productes possibles de detectar (toxines, cèl·lules, molècules, etc) mitjançant mecanismes molt similars i a través de l'ús de biosensors és infinitament elevat. La AFB1 pertany a les micotoxines, que són substàncies produïdes per fongs que contaminen els productes agrícoles, també poden causar molts efectes negatius sobre la salut, en particular càncer i efectes immunosupressors. Les seves contaminacions en aliments, tant per persones com per animals, han esdevingut un problema molt important a nivell mundial i s'estan dedicant grans esforços en desenvolupar mètodes per controlar els nivells d'aquestes micotoxines.

Una de les estratègies nanotecnològiques per a la detecció de micotoxines és l'ús d'aptàmers amb seqüència específica selectiva per la toxina d'interès, i fer-los servir per aconseguir biosensors d'alt rendiment basats en detecció òptica, que és l'objectiu principal de la nostra investigació<sup>2</sup>.

### 1.1- Nanocompostos polimèrics

Hi ha diferents tipus de nanocompostos, com per exemple de matriu ceràmica, metàl·lica, polimèrica i també nanocompostos magnètics o resistents a la calor. Aquest treball es centra en nanocompostos de matriu polimèrica, ja que és amb el que s'ha estat treballant i investigant.

Els compostos polimèrics dopats amb nanopartícules, atrauen molt l'interès tant del camp de la ciència com de la nanotecnologia. Això és degut a les seves possibles aplicacions en dispositius microelectromecànics, òptics, biosensors, etc. Aquests tipus de materials han de tenir una de les seves fases en escala nanomètrica, la qual els hi permet tenir una superfície per unitat de volum major. Es coneix perfectament que una gran part de les propietats físiques i químiques dels materials estan directament relacionades amb la seva superfície, per tant, aquesta és la raó per la qual hi ha diferències importants, i generalment millores, en les propietats d'un material de la mateixa composició quan està a nanoescala.

Algunes de les propietats que es veuen millorades pels nanocompostos són la conductivitat tèrmica i elèctrica, propietats superficials, resistència química, estabilitat tèrmica, entre d'altres. Aquestes propietats depenen de amb quin nanomaterial es dopa la matriu polimèrica que normalment acostumen a ser nanopartícules (NPs), que és el cas en el nostre treball, nanotubs de carboni (CNTs) o nanofibres de carboni (CNFs)<sup>3,4</sup>.

## 1.2- Polidimetilsiloxà (PDMS)

Un dels polímers amb els que hem estat treballant és el PDMS, un polímer amb una base inorgànica, ja que està constituït d'enllaços entre silici i oxigen fortament covalents. En concret, el PDMS, com a polímer està considerat com a elastòmer, una subclasse de polímers amb mòdul de Young baix i amb gran estabilitat tèrmica i química. La seva unitat repetitiva, com es pot veure a la Figura 1, és bàsicament dos grups metil units a l'àtom de silici que forma l'enllaç amb l'oxigen.

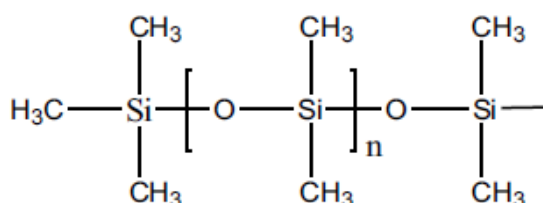


Figura 1. Estructura genèrica del PDMS<sup>5</sup>

És un dels materials polimèrics més utilitzats per la producció de nanocompostos gràcies a la seva gran elasticitat, transparència, i també té una gran estabilitat tèrmica. Òbviament, també presenta inconvenients, com per exemple que la seva superfície és inert, i això implica dificultats a l'hora de funcionalitzar-lo i lligar-hi biomolècules (aquesta problemàtica l'afrontem durant el treball).

Per fabricar nanocompostos de PDMS amb unes propietats en concret, s'utilitzen tècniques diferents per afegir les NPs com la deposició, incrustació o mesclar-les directament amb el polímer. La morfologia dels nanomaterials que s'afegeixin també tindrà un efecte important en les propietats<sup>4-6</sup>.

### 1.3- Resina SU-8 fotoresistent

El segon i últim polímer amb el que hem treballat és el SU-8. Consisteix en una resina epoxi fotoresistent negativa.

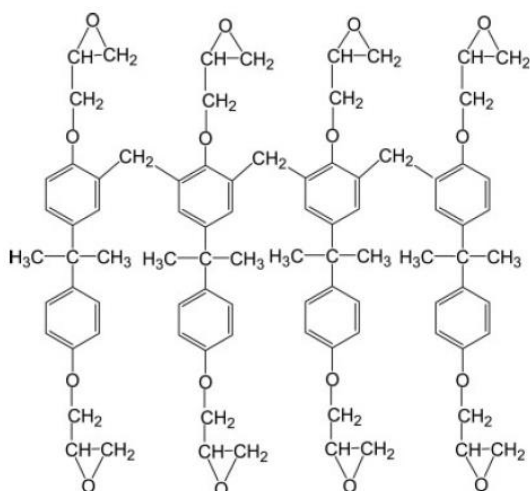


Figura 2. Estructura química del SU-8<sup>7</sup>

El terme negativa fa referència a que les parts exposades a la llum UV esdevindran insolubles per reticulació, mentre que les altres parts romandran solubles.

L'estructura del polímer es pot apreciar en la imatge adjunta. El seu nom, SU-8, fa referència als 8 grups epoxi presents, els quals juguen un paper importantíssim a l'hora de tractar aquesta resina.

La resina SU-8 curada forma una matriu altament reticulada mitjançant enllaços covalents, que mostra una gran adhesió i característiques superiors a resines convencionals. La seva compatibilitat amb diferents tècniques com la llum UV o els raig-X, i també amb diferents processos de recobriment (de fabricació de les capes), fan d'aquest material una solució molt rentable per la producció de fines capes i estructures per sistemes microelectromecànics (MEMS), microfluídica, i altres aplicacions<sup>7,8</sup>.

### 1.4- Biosensors

Una de les aplicacions que està guanyant més importància dels avenços nanotecnològics és la producció de biosensors, els quals prometen grans innovacions en la biomedicina per la detecció de malalties, tractaments, diagnòstics, monitorització de la salut dels pacients.

Segons la IUPAC, un biosensor és un dispositiu que utilitza una reacció bioquímica en concret mitjançant proteïnes, enzims o sistemes immunològics, amb l'objectiu de detectar un compost químic d'interès per senyals tèrmiques, elèctriques o òptiques, com és el nostre cas. En els nanobiosensors, aquestes senyals venen produïdes per nanomaterials com poden ser les nanopartícules (NPs), nanotubs de carboni (CNTs), nanofibres de carboni (CNFs), grafè, entre d'altres.

Per la producció de biosensors és imprescindible la flexibilitat i l'estabilitat tant química com tèrmica del substrat. Aquestes propietats les poden aportar polímers com el PDMS o el SU-8, que són els que hem utilitzat nosaltres, però també d'altres com el PET, poliuretà, etc<sup>9</sup>.



## 2- Fonaments

### 2.1- Mètode Sol-Gel per la síntesi de nanopartícules

Encara que el nostre treball no es centra en la producció de nanopartícules, sí que són una part imprescindible del projecte, per això és molt important conèixer com s'han sintetitzat les partícules amb les que hem treballat i els fonaments del procés. En concret, les nanopartícules amb les que hem estat treballant són apatites amb fórmula  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$  dopades amb  $\text{Eu}^{3+}$  (Eu) i han estat sintetitzades pel mètode que explico a continuació.

El mètode sol-gel és capaç de produir nanopartícules de gran puresa i d'una mida determinada dins d'uns certs marges en escala industrial. També és possible fabricar dos o més tipus de nanopartícules de manera simultània. L'avantatge més destacat del procés és la producció de compostos altament homogenis (estructura coneguda com gel) i de gran puresa, però també hi ha altres factors que fan d'aquest mètode el més eficient per la producció de nanomaterials, com per exemple les baixes temperatures de treball (70-320°C) comparant-lo amb altres mètodes que no baixen dels 1200°C, i també la poca variació de la mida de les mateixes nanopartícules i la seva distribució.

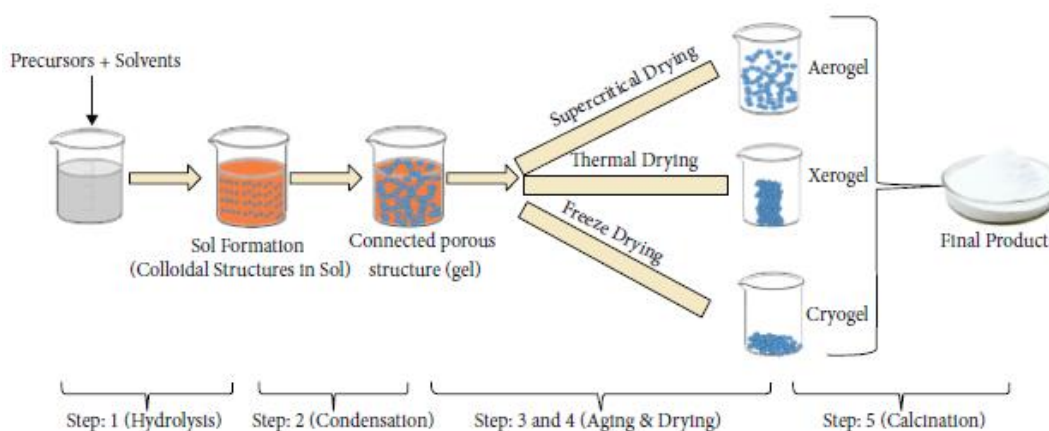


Figura 3. Esquema de les diferents etapes del mètode Sol-Gel<sup>10</sup>

Primer es produeix una solució homogènia amb els precursors i el dissolvent (generalment aigua). Després de la homogeneïtzació dels precursors, la presència d'aigua desencadena la seva hidròlisi per formar l'anomenat "Sol", constituït per fines partícules disperses en el dissolvent.

#### Step 1: hydrolysis

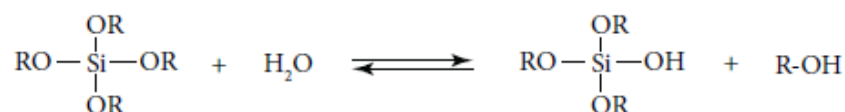


Figura 4. Exemple d'hidròlisi en Sol-Gel<sup>10</sup>

Posteriorment, per formar el “Gel” s’ha d’estimular la solució d’alguna forma, normalment a base d’escalfar-la, per a que tingui lloc la condensació a base de reaccions de polimerització i acabar formant enllaços Si-O-Si

Per últim, cal precalcinar el gel a uns 300°C per acabar d’eliminar els dissolvents del material, per a després calcinar a major temperatura per acabar obtenint les nanopartícules desitjades en forma de pols<sup>10-12</sup>.

## 2.2- Mecanismes fotoluminescents en ions lantànids

En aquest estudi s’ha estudiat l’absorció i l’emissió de fotons de les nanopartícules dopades amb Europi amb les que s’ha treballat, per tant, és essencial entendre els mecanismes i processos que tenen lloc per l’existència d’aquesta luminescència.

En el cas dels lantànids, els fotons són absorbits i posteriorment emesos en una longitud d’ona menor (mecanisme conegut per *up-conversion*) o també poden ser emesos en longituds d’ona majors (*down-conversion*).

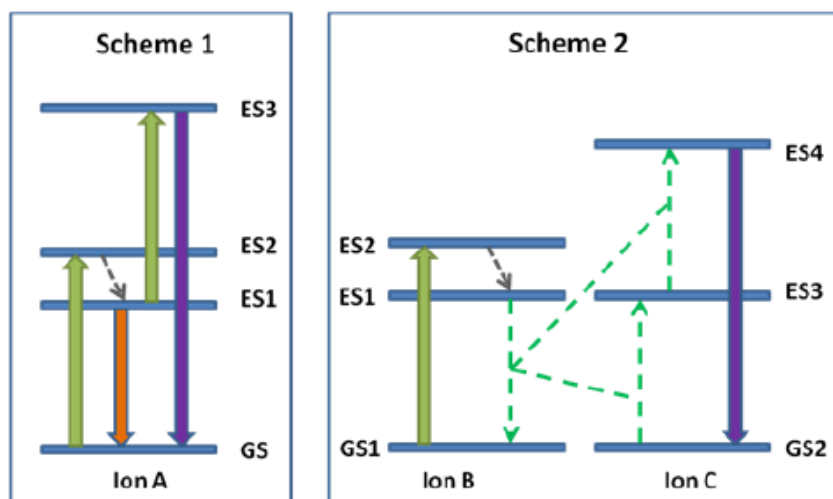


Figura 5. Mecanismes fotoluminescents en ions lantànids per ions individuals (esquema 1) i en parells de ions diferents (esquema 2)<sup>13</sup>

A l’esquema 1 es poden veure els dos mecanismes *up* i *down-conversion*. En les nostres NPs en particular, el procés que té lloc és la *down-conversion*. En el primer cas, un fotó amb energia de l’estat inicial GS és promocionat a l’estat excitat ES2, després aquest fotó es relaxa i passa a l’estat de menor energia ES1 gràcies a processos no radiats. En aquest punt és on es diferencien els dos mecanismes, si l’emissió és originada per la relaxació del fotó de l’estat ES1 a GS, el fotó generat tindrà menor energia que el fotó absorbit i aquest procés es coneix com *down-conversion*. En canvi, si hi ha una segona absorció des de l’estat ES1 a l’estat de major energia ES3, l’emissió d’aquest fotó serà més energètic que l’absorció i aquest procés es coneix com *up-conversion*.

Aquest últim mecanisme també pot tenir lloc gràcies a les interaccions dels ions lantànid que estiguin suficientment pròxims en la matriu. Aquestes interaccions s'anomenen mecanismes de transferència d'energia i depenen de la distància en la que es troben aquests ions. Es poden observar en l'esquema 2 de la Figura 5, però no hi aprofundiré ja que no són mecanismes que tenen lloc en les nostres mostres.

Important saber que en el procés de *down-conversion*, hi ha un fotó emès per cada fotó absorbit (procés d'òptica lineal). En canvi, en la *up-conversion* el procés és no lineal, és a dir, necessita un nombre major de fotons per acabar obtenint una emissió<sup>13</sup>.

Per últim, comentaré quina és la luminescència de les partícules que hem utilitzat per fabricar els nostres nanocompostos, ja que és la base del nostre treball.

Com ja he comentat en l'apartat anterior, les NPs consisteixen en les apatites  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}$ . La matriu  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$  cristal·litza en el sistema hexagonal i presenta el grup espacial  $P6_3/m$  ( $a = b = 9.3980 \text{ \AA}$ ,  $c = 6.9039 \text{ \AA}$  i  $\gamma = 120^\circ$ ). Quan la matriu es dopa amb els ions d' $\text{Eu}^{3+}$ , aquests substitueixen el  $\text{Bi}^{3+}$  de l'estructura, i és l'Eu el que aporta les propietats luminescents al material.<sup>14</sup>

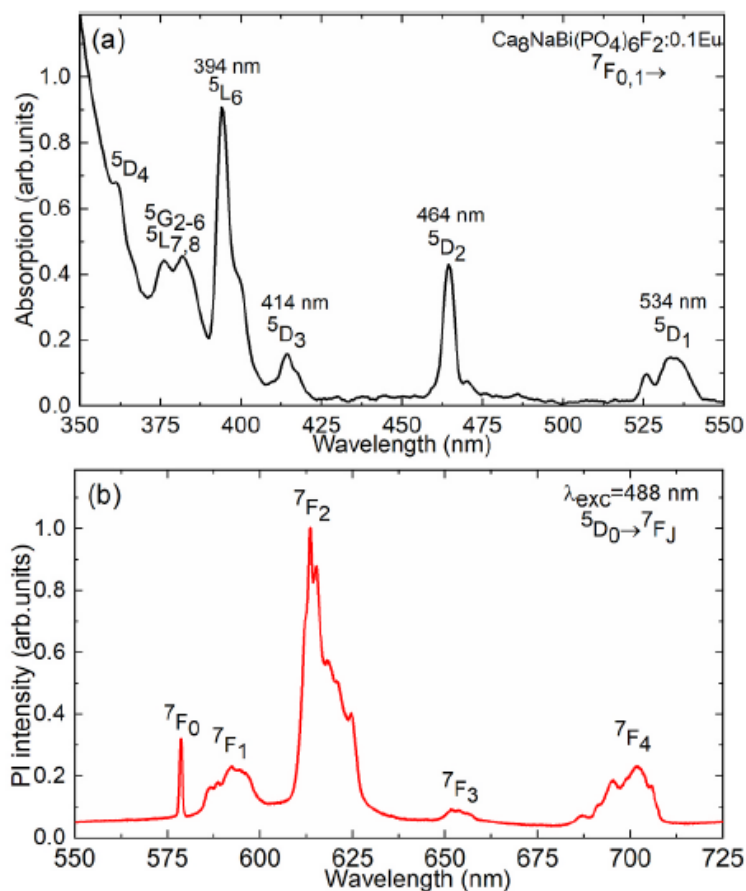


Figura 6. Espectres d'absorció (a) i luminescència (b) de les NPs de  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}^{3+}$ .<sup>14</sup>

Es van utilitzar aquestes NPs per diferents raons, primer perquè són les que el grup de recerca tenia a disposició ja que havien estat sintetitzades amb antelació, i també per les avantatges i facilitats que aquestes proporcionaven per a la realització d'aquest projecte.

Una avantatge essencial és que l'apatita és biocompatible gràcies a l'existència en la seva estructura de grups fosfats, que en un futur possiblement ajudarà a l'hora de treballar amb mostres biològiques, com pot ser l'AFB1.

Una altra raó que justifica l'ús d'aquestes NPs en concret, són les intenses emissions al visible que presenta l'Europi, que fa que sigui poc complexa la seva detecció, gràcies a l'existència de detectors de llum visible molt sensibles i amb molt bona resolució i sensibilitat. A més, aquestes emissions són ressonants amb l'absorció de l'AFB1, ja que els dos compostos presenten absorció en longituds d'ona en el rang de l'UV. L'absorció de l'AFB1 es pot trobar a l'article (J. C. Netto-Ferreira, B. Heyne and J. C. Scaiano)<sup>15</sup>.

En la Figura 6 estan representats els espectres d'absorció i de fotoluminescència de  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}$ . En l'espectre d'absorció es poden apreciar pics en aproximadament 361, 375, 382, 394, 414, 464 i 534 nm, però la banda situada a 394 nm és la que presenta una millor intensitat, per tant les mostres es poden excitar amb llum UV i obtenir una molt bona emissió. La banda ampla menor a les bandes de l' $\text{Eu}^{3+}$ , sobre uns 350 nm aproximadament, s'atribueix a transicions de transferència de càrrega entre orbitals buits 2p de l' $\text{O}_2$  i 4f de l' $\text{Eu}^{3+}$ . Per tant, està gairebé assegurada la presència de transferència d'energia entre els grups fosfats  $\text{PO}_4^{3-}$  i els ions d' $\text{Eu}^{3+}$ .

Pel que fa l'emissió, el pic més dominant és el que està centrat a 613 nm i és el que està relacionat amb l'emissió vermella de gran intensitat. També es troben emissions secundàries de menor intensitat a 578, 593, 652 i 701 nm.

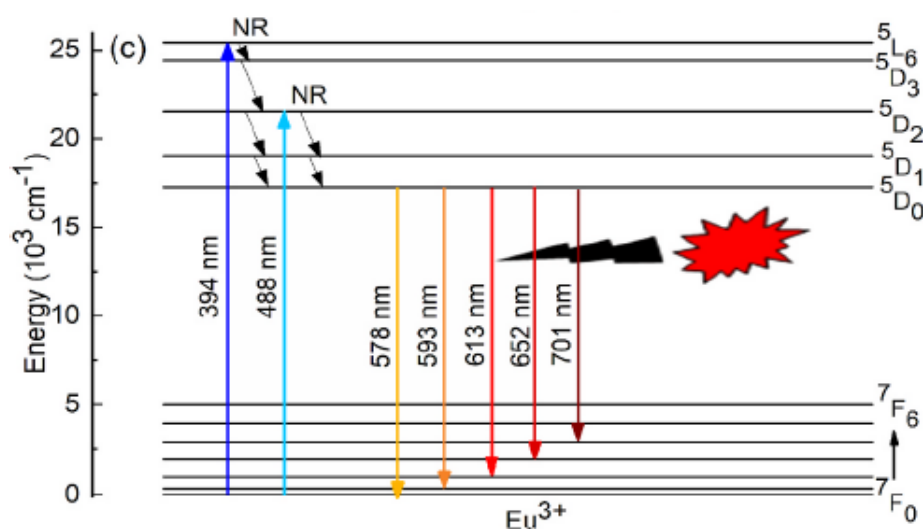


Figura 7. Esquema dels nivells energètics del  $\text{Eu}^{3+}$  i les seves transicions<sup>14</sup>

En el diagrama de la Figura 7 es mostra les transicions electròniques observades per les apatites dopades amb  $\text{Eu}^{3+}$ . Primer de tot els ions s'exciten a l'estat  $^5\text{L}_6$ , després hi ha una relaxació no radiativa que pobla l'estat  $^5\text{D}_0$ , i finalment tenen lloc les transicions radiatives  $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_J$  responsables de l'emissió vermella característica dels ions d'Europi<sup>14</sup>.

### 2.3- Funcionalització de la superfície dels nanocompostos

Una vegada preparats els nanocompostos luminescents, ja passem a la segona part del treball, que és la seva funcionalització per aprofitar les seves propietats òptiques per la producció d'un biosensor per a la detecció de l'Aflatoxina B1. En aquest apartat entraré en detall en quines són les etapes i reaccions químiques que tenen lloc durant tot el procés de funcionalització de les capes de PDMS amb les NPs luminescents.

L'esquema general de la funcionalització és, primer de tot activar la superfície del PDMS mitjançant plasma d'oxigen creant grups funcionals -OH en la superfície del nanocompost. Seguidament, es fan reaccionar aquests grups hidroxil amb un intermediari per acabar obtenint -NH<sub>2</sub> com a grups terminals en la superfície del PDMS, aquest intermediari és el (3-Aminopropil)triètoxissilà (APTES). Posteriorment, un altre pas intermitg és l'addició d'anhidrid succínic (SA), que s'utilitza com a molècula intermitja que proporciona grups carboxílics a la superfície per assegurar la unió del grup amino de l'APTES a les cadenes amino terminals de l'aptàmer. Gràcies a la presència d'aquest aptàmer selectiu per la molècula d'interès, l'Aflatoxina B1 s'enllaçarà perfectament sobre la superfície del nanocompost.

L'activació de la superfície del polímer consisteix bàsicament en sotmetre'l a plasma d'oxigen durant un cert temps, el que provoca la substitució d'un dels grups metil de la unitat repetitiva del PDMS per un grup hidroxil.

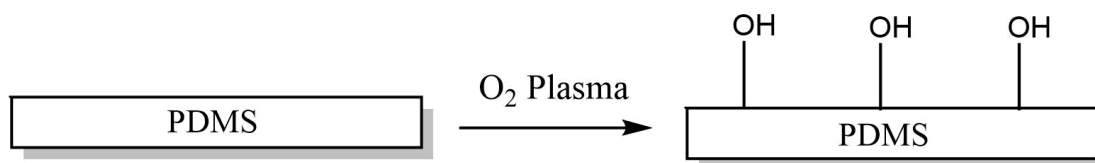


Figura 8. Activació de la superfície del PDMS mitjançant plasma d'oxigen

Un cop activada la superfície, la introducció de grups amino com a grups terminals és imprescindible per les etapes que vindran a continuació. Per aconseguir-ho, una reacció molt útil és la silanització amb aminosilans com l'APTES. Els grups hidroxil de la superfície prèviament activada amb plasma d'oxigen, mitjançant una reacció de condensació, ataquen i desplacen els grups alcoxi dels aminosilans per acabar formant enllaços covalents entre -Si-O-Si-.

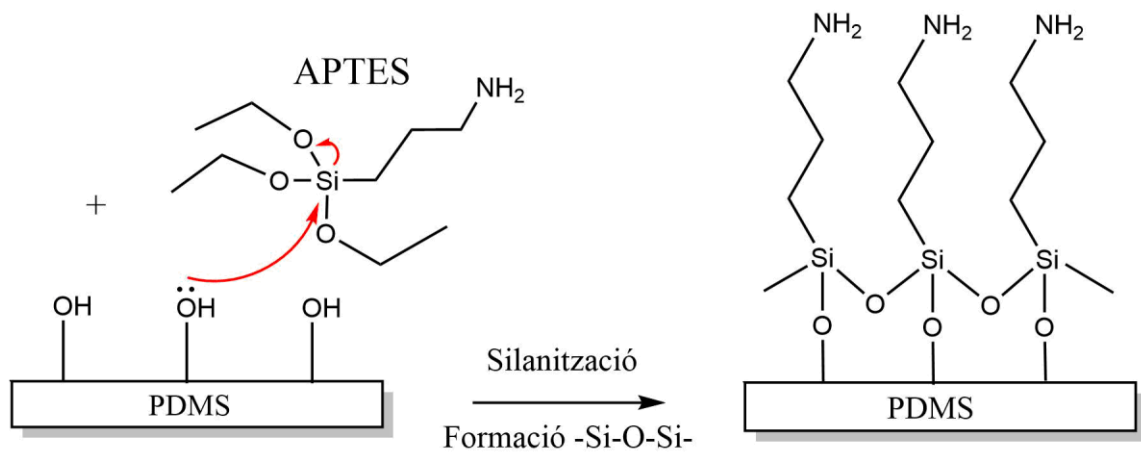


Figura 9. Adhesió de les molècules d'APTES en la superfície del material

La pròxima etapa consisteix en l'addició nucleòfila dels grups amino terminals presents en la superfície a l'anhídrid succínic (SA). S'acaba formant una amida entre l'APTES i l'anhídrid, i el grup terminal de la cadena es converteix en un àcid carboxílic a causa de l'apertura del SA.

En les imatges presents a continuació es poden apreciar tant el mecanisme de reacció com l'estructura del producte final d'aquesta etapa.

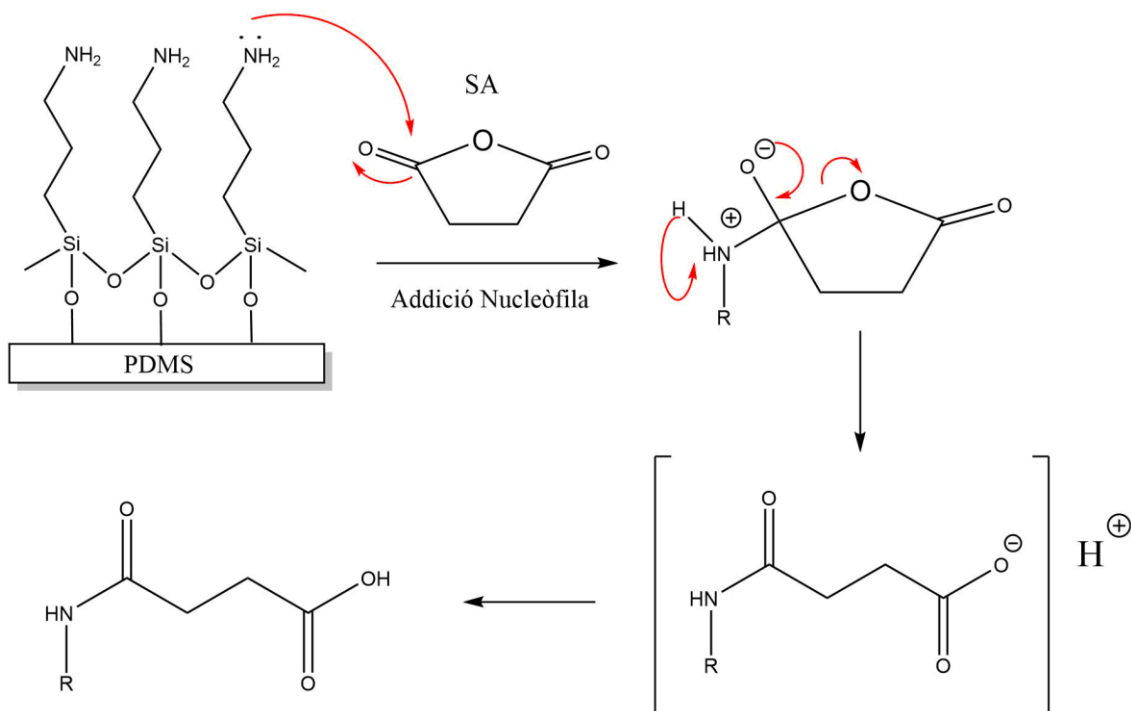
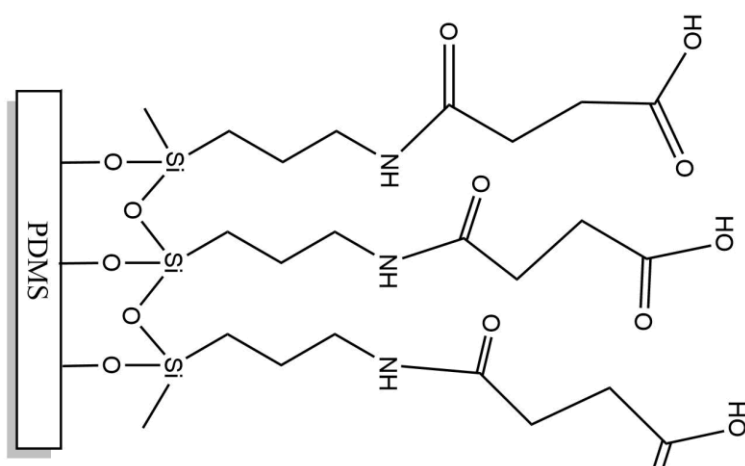


Figura 10. Mecanisme de reacció entre els grups amino i l'anhídrid succínic (SA). R = -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Si-O-Si-



En la Figura 11 es pot apreciar justament el que ja he comentat anteriorment, l'estructura final després de la formació d'una amida entre l'APTES i el SA, i com el grup terminal de la cadena ha esdevingut un àcid carboxílic.

Figura 11. Producte final després de l'addició de SA

Seguidament, ens interessa activar aquest àcid carboxílic terminal mitjançant EDC/NHS per enllaçar-lo amb els grups terminals amino de l'aptàmer.

El reactiu d'acoblament, EDC, és una carbodiimida utilitzada generalment com a agent activador de grups carboxil pel posterior acoblament d'amines que acabaran formant un enllaç amídic, aquesta també és la seva funció principal en aquesta reacció. Quan s'afegeix l'EDC, es forma un èster altament reactiu que al posar-lo en contacte amb el NHS s'obté un compost menys làbil anomenat èster de succinat. Aquests èsters, normalment, s'utilitzen per la modificació de proteïnes i és molt útil per aplicacions en biosensors. Un cop s'ha format l'èster de succinat (èster NHS), només cal posar-lo en contacte amb l'aptàmer per enllaçar-lo.

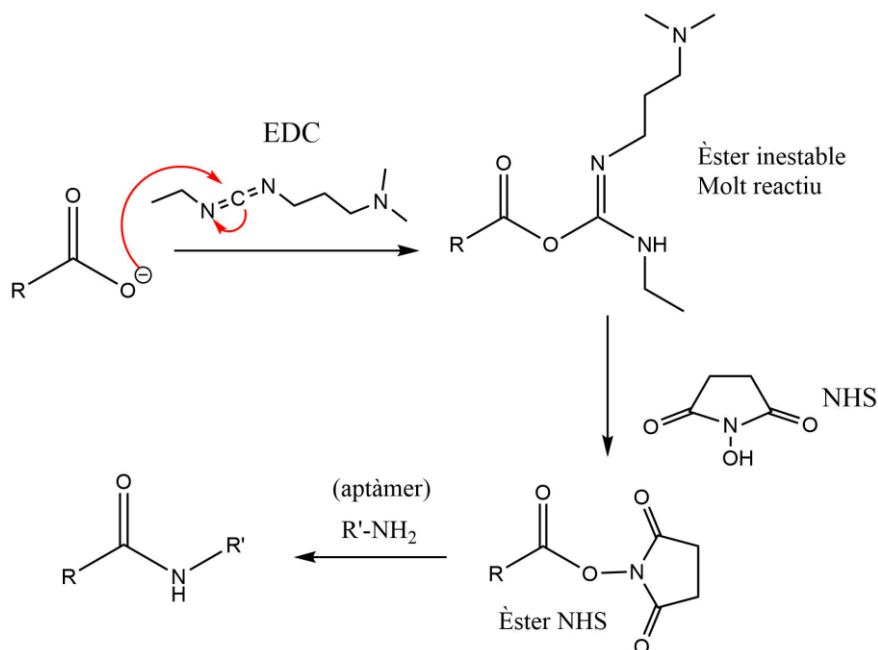


Figura 12. Mecanisme de reacció entre el grup carboxílic, EDC/NHS i l'aptàmer. (R) Representa la cadena enllaçada a la superfície del PDMS. (R') Fa referència a la seqüència d'aminoàcids de l'aptàmer.

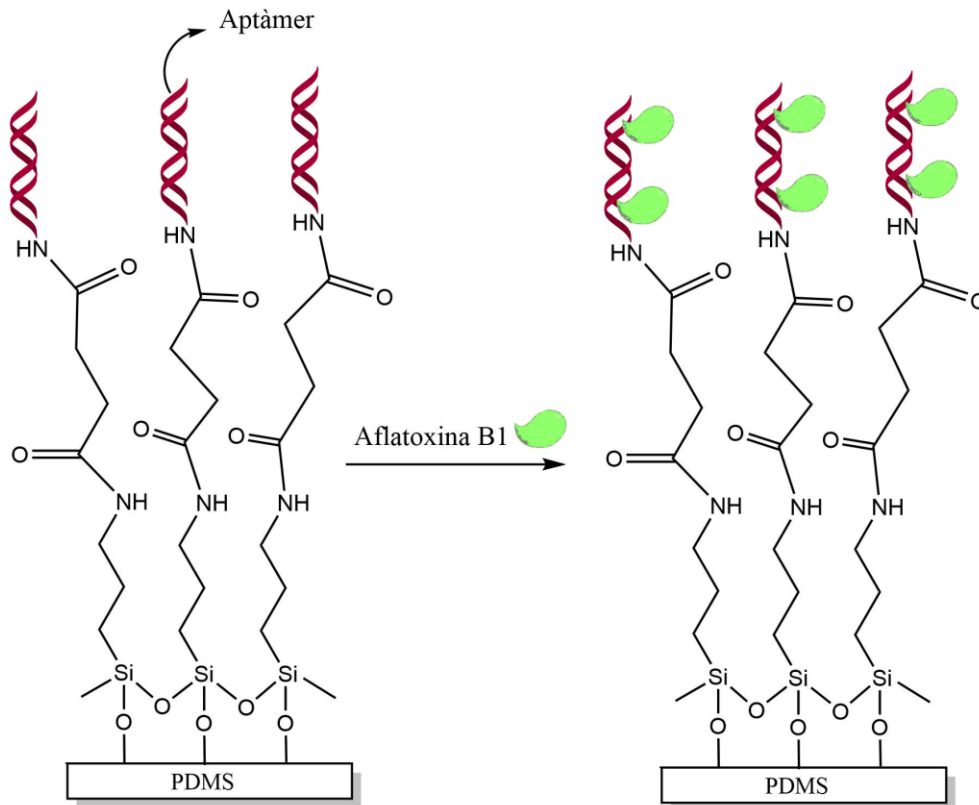


Figura 13. Inserció de l'Aflatoxina B1 selectivament en l'aptàmer

Finalment, ja tenim l'aptàmer funcionalitzat a la superfície del nanocompost de PDMS. Com que l'aptàmer és selectiu per l'Aflatoxina en qüestió, l'enllaç entre els dos compostos és espontani. L'Aflatoxina B1 es pot eliminar mitjançant l'ús de PBS buffer, tampó fosfat salí utilitzat per la neteja de mostres biològiques, així es podrà reutilitzar el biosensor per a la detecció d'altres molècules d'aflatoxina.



### 3- Objectius

L'objectiu principal i més general d'aquest treball i investigació és la fabricació d'un biosensor mitjançant nanopartícules luminescents per la detecció d'Aflatoxina B1 a causa d'una variació de l'emissió, però aplicable per a tot tipus de toxines, cèl·lules, molècules, i tant per gasos com per líquids.

El treball es pot dividir en dos objectius específics:

- **Fabricació dels nanocompostos**

Les tasques d'aquesta primera part són: a) la construcció d'una corba de calibratge per fabricar les capes amb un gruix exacte conegut, b) conèixer la dispersió de les nanopartícules en el material, c) la fabricació dels nanocompostos amb *spin-coater* en Sala Blanca, i d) l'estudi de la fotoluminescència dels nanocompostos en funció de la concentració de nanopartícules, el gruix de les capes i la naturalesa dels dos polímers diferents com a matriu.

- **Funcionalització dels nanocompostos**

En aquesta segona i última part del treball, les tasques són: a) la funcionalització de la superfície de les capes dels nanocompostos en diferents etapes per captar l'Aflatoxina B1 i b) la seva caracterització mitjançant emissions òptiques i microanàlisi de Raig-X.

## 4- Metodologia i Pla de treball

### 4.1- Materials, reactius i seguretat

A continuació es troba una llista amb els productes utilitzats durant l'estudi, i els perills a tindre en compte per treballar amb ells. Òbviament, no cal mencionar repetidament l'ús obligatori de bata de laboratori, ulleres de seguretat i guants durant la manipulació de qualsevol dels productes utilitzats.

També cal considerar que la majoria de les etapes s'han dut a terme en sala blanca, on les mesures de seguretat i aïllament són extremadament obligatòries, encara que sigui només per entrar-hi.

- Polidimetilsiloxà (PDMS): Sense perills representatius.
- Resina SU-8: Líquid inflamable. Irritant en inhalació, contacte amb la pell i ulls. Tòxic pel medi ambient.
- $\gamma$ -butirolactona: Toxicitat aguda per ingestió oral. Irritació ocular important. I com a efectes adversos més importants, presenta efectes narcòtics (somnolència).
- Poly(Glycidyl Methacrylate) (PGMA): Pot causar irritació respiratòria, irritació al contacte amb la pell i ulls.
- (3-Aminopropil)triètoxissilà (APTES): Líquid inflamable, perjudicial si s'ingereix. Pot causar reacció al·lèrgica amb la pell i cremades oculars.
- Dimetilformamida (DMF): Líquid inflamable. Toxicitat aguda per inhalació, contacte amb la pell i ocular.
- Solució tampó salina amb fosfats (PBS Buffer): No és una substància perillosa.
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC): És perjudicial si s'ingereix. Presenta toxicitat si entra en contacte amb la pell, pot causar irritacions i reaccions al·lèrgiques. Irritacions oculars si entra en contacte amb els ulls. Dany important a òrgans per exposició prolongada.
- N-hidroxisuccinimida (NHS): Irritacions importants si entra en contacte amb el sistema respiratori, pell o ulls.
- Acetonitril (ACN): Líquid altament inflamable. Perjudicial si s'ingereix i si entra en contacte amb pell o s'inhala. Causa irritacions oculars importants.
- Aflatoxina B1 (AFB1): Toxicitat extrema degut a que és altament cancerigen. Pot resultar fatal si s'ingereix, si entra en contacte amb la pell o s'inhala.

## 4.2- Construcció d'una corba de calibratge del gruix de les capes

Per la fabricació de les capes s'utilitza la tècnica de *spin-coating*, una tècnica capaç de produir capes fines de polímers o resines mitjançant una simple rotació (es poden aconseguir capes de menys de 10  $\mu\text{m}$ ). Depenent de si les revolucions per minut (RPM) del gir són més o menys elevades, la capa també serà més o menys gruixuda. És per això de la importància del coneixement exacte de la corba. Només vam fer la corba de calibratge del PDMS, la corba del SU-8 ja era coneguda i proporcionada pel fabricant<sup>16</sup>.

Primer de tot es va produir la mescla del PDMS amb el 10% de catalitzador per la curació del polímer. Es van pesar 20g de PDMS, s'hi van afegir 2g del catalitzador i es va agitar consistentment fins l'aparició d'una gran quantitat de bombolles.

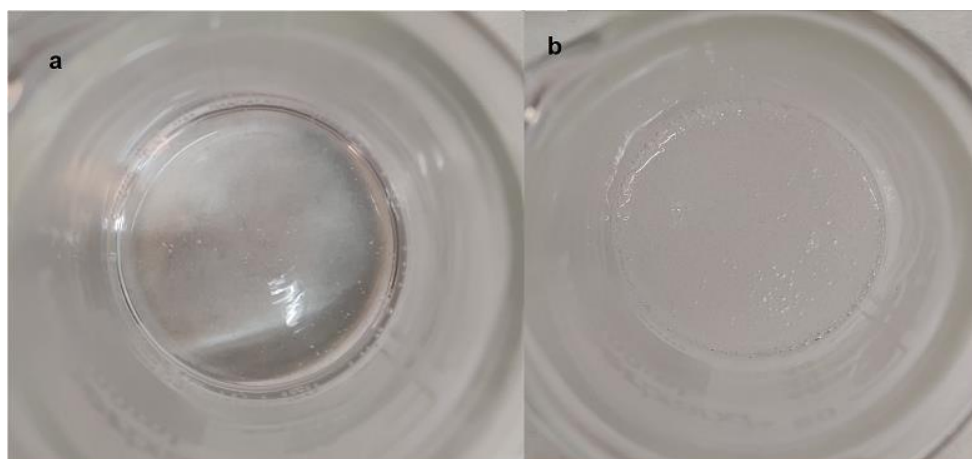


Figura 14. (a) PDMS sense catalitzador. (b) PDMS amb catalitzador després d'agitació

Per tal d'eliminar aquestes bombolles, el PDMS es va sotmetre a un procés de degasificació. Es va dipositar el recipient amb la mescla de polímer i catalitzador en un dessecador en el qual s'hi pot fer el buit mitjançant una bomba, durant aquest procés es pot observar com les bombolles es van desprendre.

Aproximadament aquest procés dura uns 60 minuts i es du a terme tal com s'aprecia en la Figura 15. També és important tindre en compte que s'ha de vigilar que les bombolles no pugin més del compte i puguin sobreeixir del vas. Si pugen massa el que es fa és parar la bomba de buit i esperar a la desaparició les bombolles abans de tornar a engegar-la.

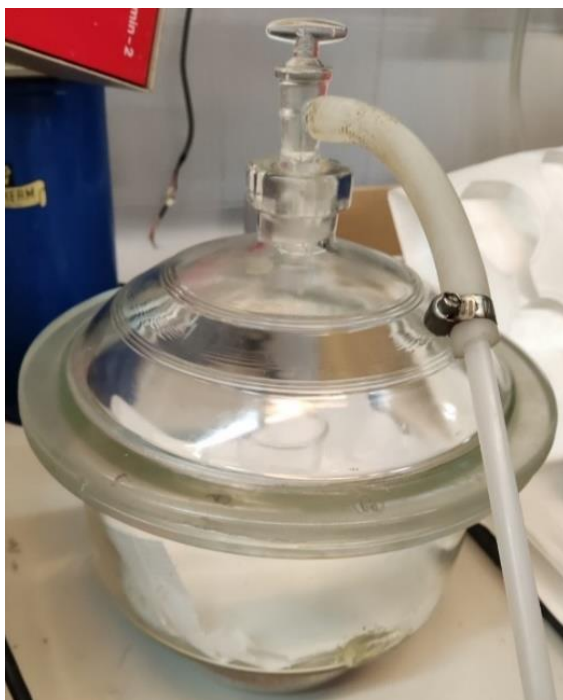


Figura 15. Degasificació de la mescla mitjançant dessecador

Una vegada la mescla es troba totalment degasificada, ja es pot passar a la producció de les capes en sala blanca on es troba l'*spin-coater*.

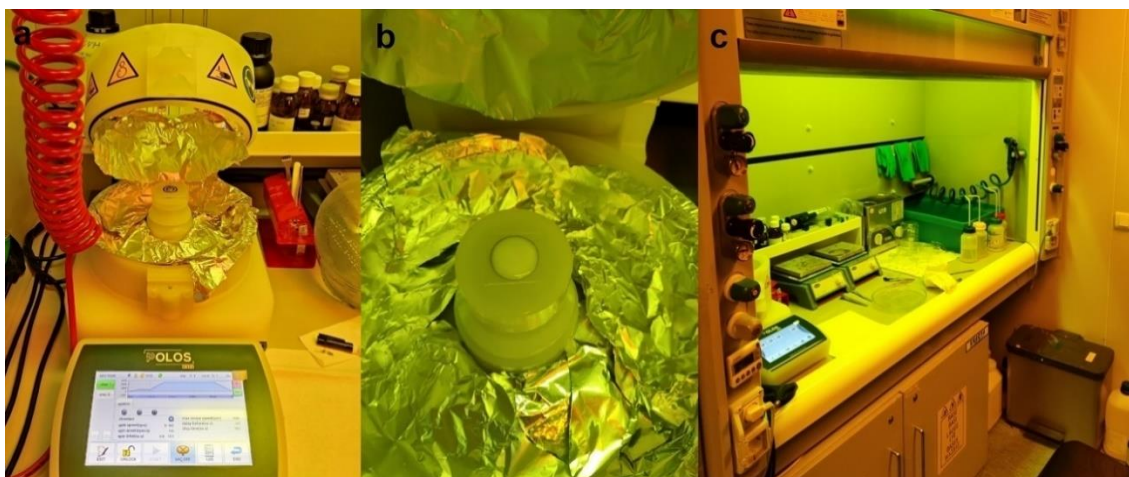


Figura 16. (a) *Spin-coater*. (b) Disposició d'una mostra en l'*spin-coater*. (c) Espai de treball en Sala Blanca.

En la imatge anterior es pot apreciar tant l'*spin-coater* com la manera en la que es disposa la mostra en l'instrument. Abans de mesurar cal programar les revolucions per minut (rpm) amb les que es vol tractar la mostra en concret. Les revolucions de l'*spin-coater* que es van utilitzar en les diferents mostres per produir la recta de calibratge van ser 2500, 2100, 1700, 1300, 900, 500 rpm. L'instrument consta de dos passos, el primer pas és sempre constant a 500 rpm i presenta una duració de 5 segons. El pas a modificar és el segon, el qual consta de les rpm que he comentat anteriorment i té una duració de 30 segons i una acceleració de 300 rpm/s.

Es disposa la mostra al centre de l'instrument (Figura 16b) i es manté immòbil gràcies a una bomba de buit, per cadascuna de les mostres s'utilitzen únicament 0.3 mL per fer l'*spin-coating*.

Cada vegada que es finalitza una mostra cal deixar-les en un forn 2h a 80°C per a que tingui lloc la curació i enduriment (reticulació) del polímer.

El gruix de les capes del PDMS es va mesurar amb el microscopi confocal PLu 2300 Optical Surface Profiler de Sensofar, representat en la Figura a continuació.

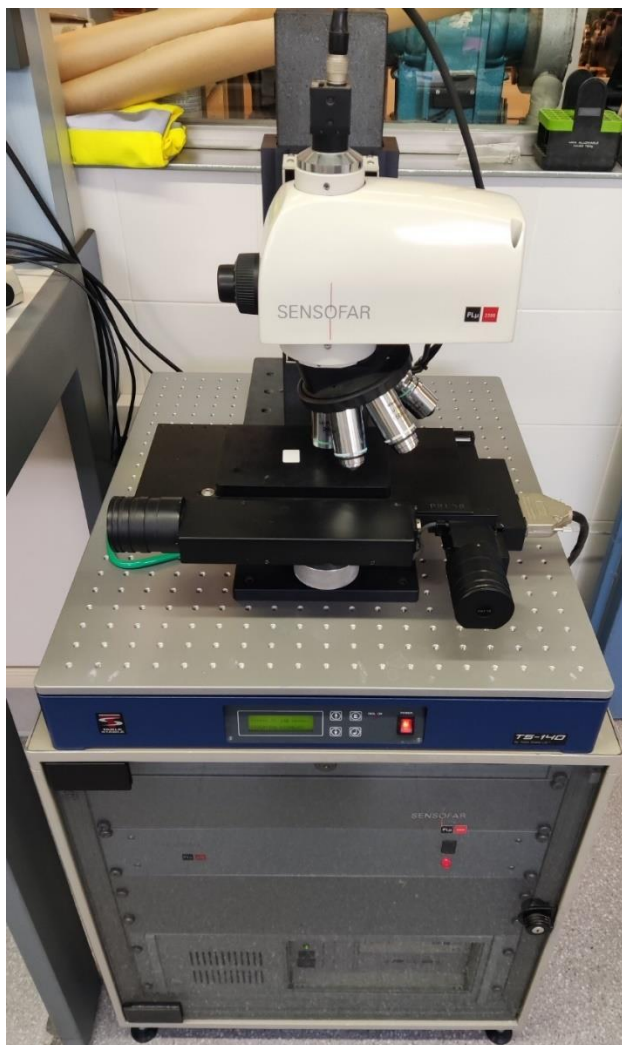


Figura 17. Microscopi confocal PLu 2300 Optical Surface Profiler de Sensofar en el grup de recerca FiCMA

### 4.3- Dispersió de les nanopartícules

Quan s'afegeixen NPs a les capes de PDMS, aquestes s'han de dispersar mitjançant un bany d'ultrasons. Per saber quin és el temps adequat que han d'estar les mostres en l'ultrasons per obtenir una dispersió el més homogènia possible, es van preparar 3 mL de PDMS amb una concentració del 0.5% de les nanopartícules de  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}$  on a la seva vegada, l'Eu està en quantitats dopants del 4% respecte del Calci.



Aquests 3 mL es van dividir en 3 mostres d'1 mL cadascuna, una d'aquestes mostres va estar 1h en l'ultrasons, una segona s'hi va estar 2h i l'última 3h.

Es va realitzar una anàlisi mitjançant un microscopi electrònic de transmissió (TEM), per observar en quina de les mostres les nanopartícules estaven millor dispersades, i per tant, determinar el temps de bany d'ultrasons més òptim, a banda de conèixer la seva mida i la distància mitja entre partícules.

Figura 18. Bany d'ultrasons

### 4.4- Fabricació dels nanocompostos

Mitjançant la tècnica de *spin-coating* explicada en l'apartat 4.1- *Corba de calibratge*. Cinc concentracions diferents (6, 4, 2, 1.5, 1% wt NPs) i quatre capes de diferent gruix (100, 50, 25 i 10  $\mu\text{m}$ ) es van preparar, per triplicat, seguint els passos explicats a continuació.

Primer de tot, 10g de PDMS es van mesclar amb 0.6, 0.4, 0.2, 0.15 i 0.1g de les NPs de  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}$  en concordança amb les concentracions mencionades anteriorment, les mostres es van agitar amb força durant 3 minuts aproximadament, fins observar l'aparició de bombolles en la mescla que s'eliminaran mitjançant degasificació amb un dessecador durant 1 hora.

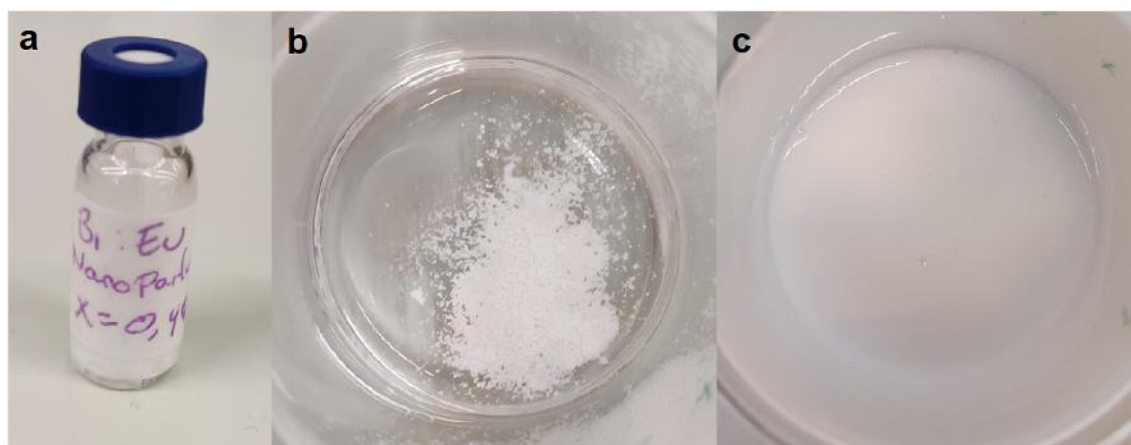


Figura 19. (a) Nanopartícules  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}_{3+x=0.4}$ . (b) NPs en el PDMS abans de la mescla. (c) Mescla de PDMS amb NPs després de degasificació i bany d'ultrasons.

Per tal d'obtenir una bona dispersió de les NPs en el material es sotmet a la mescla a un bany d'ultrasons durant 1 hora, el resultat és apreciable en la Figura 19c.

Posteriorment, s'afegeix un 10% en pes de catalitzador en cada mostra i es torna a realitzar el mateix procediment, s'agita vigorosament i es torna a degasificar.

Una vegada les mostres estan llestes, ja es poden preparar les capes amb l'*spin-coater* en Sala Blanca (funcionament de l'instrument explicat en apartat 4.1). En la taula a continuació hi ha representats les revolucions per minut de gir de instrument utilitzades per la fabricació de cada gruix de capa.

Taula 1. Revolucions per minut utilitzades en funció del gruix de capa de PDMS.

Gruix( $\mu\text{m}$ )	100	50	25	10
RPM	288	966	1768	2542

Els valors s'han obtingut per interpolació de la corba de calibratge construïda prèviament.

Pel que fa referència a les mostres de SU-8 cas es van preparar nanocompostos de tres diferents concentracions (6, 4 i 2% wt NPs) i també quatre gruixos de capa (100, 50, 25 i 10  $\mu\text{m}$ ). Es va seguir un procediment diferent alhora de fabricar les capes, explicat a continuació.

Directament en sala blanca, 6 mL de SU-8 + 0.3 mL de  $\gamma$ -butirolactona (l'addició del solvent és únicament per dispersar les NPs i evitar aglomeracions en el material) es van mesclar amb 0.36, 0.24 i 0.12 g de les NPs de  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}$ . La mescla es va deixar 15 min en bany d'ultrasons després de sotmetre-les a una suau agitació.

Paral·lelament, les làmines de vidre es van deshidratar per eliminar qualsevol molècula d'aigua ja que el SU-8 és extremadament sensible a l'aigua.

Bàsicament es van deixar per 1 min en una placa calefactora a 60°C i després es va passar a una segona placa a 100°C.

Una vegada deshidratats, es deixen refredar les làmines i es procedeix amb el *spin-coating* exactament igual que amb els nanocompostos de PDMS, només varien dos paràmetres, s'utilitzen 0.2 mL de mostra i les revolucions per minut de l'instrument apreciables a la taula adjunta a continuació (valors interpolats de la corba de calibratge del fabricant).

Taula 2. Revolucions per minut utilitzades en funció del gruix de capa de SU-8

Gruix( $\mu\text{m}$ )	100	50	25	10
RPM	1238	2775	4155	5293

Després de l'*spin-coating*, es van deixar les mostres en una placa calefactora 1 min a 60°C i es torna a passar a una de 100°C, d'aquesta forma l'ordenació de les molècules és la correcta per procedir amb el següent pas, l'enduriment del polímer.

La reticulació del SU-8 es catalitza mitjançant una làmpada UV. S'exposa la mostra a llum UV durant 6 segons a màxima intensitat i per finalitzar l'enduriment de la mostra, es torna utilitzar una placa calefactora durant 2 min a 65°C i per últim 5 min a 100°C.

A banda del solvent  $\gamma$ -butirolactona, també es van preparar mostres amb un segon solvent, PGMA, per comparar si el solvent utilitzat afecta en les emissions de les NPs. El procediment és exactament el mateix, però només es van preparar mostres del 6 i 4%, a part del canvi de solvent.

#### 4.5- Detecció de les emissions de l'Europi

Mitjançant l'espectrofotòmetre *StellarNet BLUE-Wave* (capaç de mesurar a les regions de longitud d'ona d'entre 200-1150 nm), es va mesurar la intensitat d'emissió de tots i cadascun dels nanocompostos, tant de PDMS com de SU-8, preparats amb anterioritat, excitant-los amb llum ultra violeta (UV) ja que les NPs de  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}$  presenten una important absorció a 394 nm, a part de pics també importants en longituds d'ona una mica menors (informació en apartat 2.2).



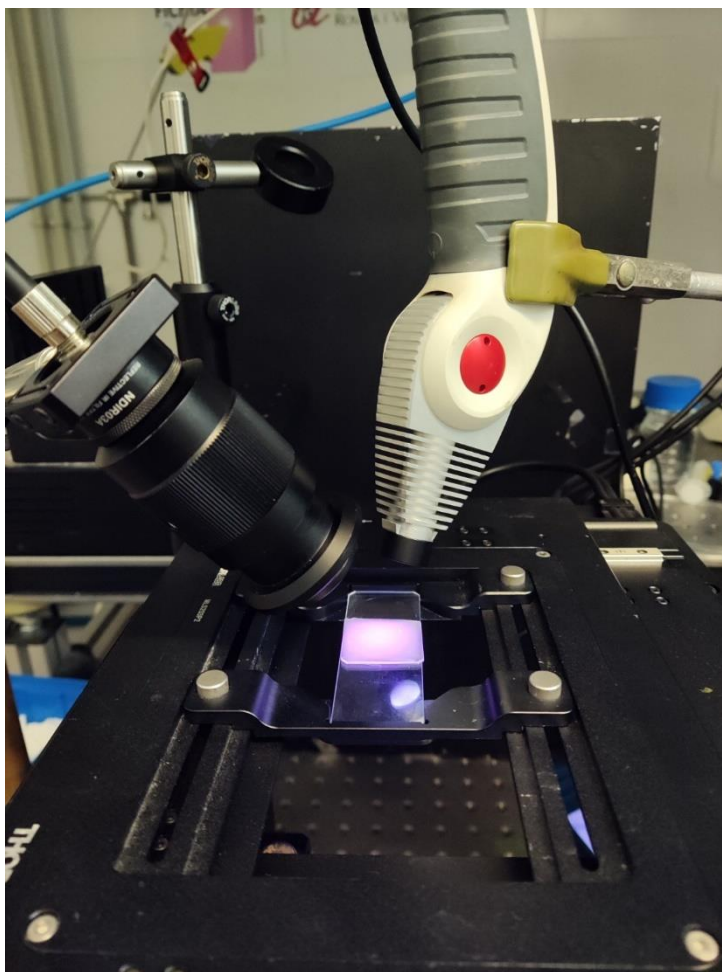


Figura 20. Muntatge de la làmpada UV juntament amb la fibra òptica per la detecció de les emissions

La instrumentació utilitzada es pot apreciar en la Figura 20. El muntatge costa d'una làmpada UV (instrument blanc a la dreta de la imatge) de 365 nm, juntament amb una fibra òptica connectada a l'espectrofotòmetre en qüestió. La fibra òptica està envoltada amb una sèrie d'elements òptics per tal de concentrar i enfocar l'emissió de les mostres i acabar obtenint una major intensitat en l'espectre d'emissió. Entre aquests elements, es troba un filtre dicròmic LP-500 capaç d'atenuar totes les longitud d'ona menors a 500 nm, d'aquesta manera s'aconsegueix eliminar totes les senyals produïdes per aquestes longituds d'ona que no aporten informació rellevant.

Cal remarcar la importància de que el muntatge es mantingui immòbil i rígid durant totes les mesures, ja que qualsevol petita modificació pot provocar una gran variació en la intensitat dels resultats.

Cada mostra es va mesurar per triplicat intentant enfocar la llum UV el més centrada possible en el nanocompost. Els espectres es van obtenir mitjançant el software específic de l'espectrofotòmetre (*Stellarnet SpectraWiz*),

#### 4.6- Funcionalització per etapes dels nanocompostos

Per assolir la immobilització de l'Aflatoxina B1 en el material, és essencial la funcionalització de la superfície dels nanocompostos fabricats amb anterioritat.

El procediment que es va seguir, en sala blanca, en cada una de les etapes de funcionalització es troben explicades a continuació.

- Adhesió d'(3-Aminopropil)triètoxissilà (APTES)

Inicialment, l'activació de la superfície del nanocompost mitjançant plasma d'oxigen és imprescindible. Aquesta activació es va dur a terme mitjançant el RIE que disposa la universitat a la Sala Blanca, Plasma PRO 80 Oxford Instruments.

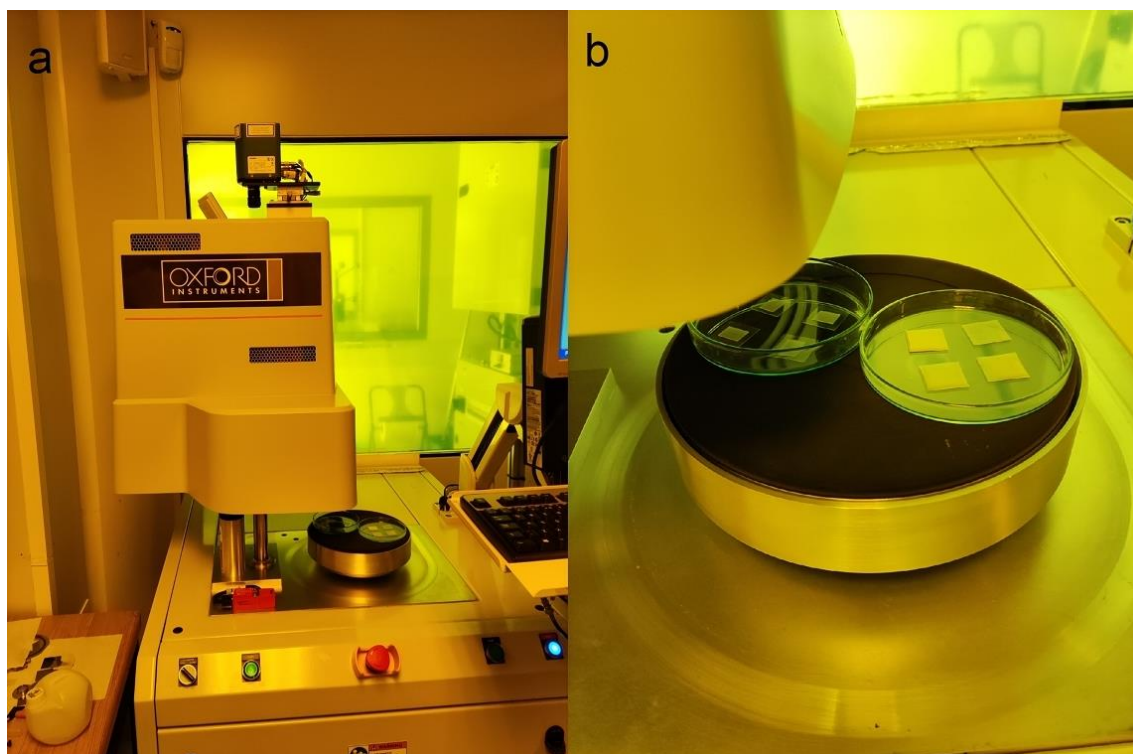


Figura 21. (a) Instrument RIE Plasma PRO 80 Oxford Instruments en Sala Blanca. (b) Disposició de les mostres en el RIE.

Tant l'instrument utilitzat com la disposició de les mostres analitzades es veu representat en la Figura 21.

Cal remarcar que les mostres que es van utilitzar van ser les que millors resultats pel que fa a emissions van presentar. Tampoc es va dur a terme cap tractament previ a les mostres en qüestió, es van dipositar en l'instrument directament.

Les condicions de treball van ser 35 sccm de flux d'Oxigen, durant 6 segons a 22W de potència i dins de la cambra 50 mTorr (condicions d'alt buit) per tal de produir plasma.

Una vegada es va dur a terme l'activació de la superfície dels nanocompostos, ja es va procedir amb l'adhesió dels APTES en les mostres.

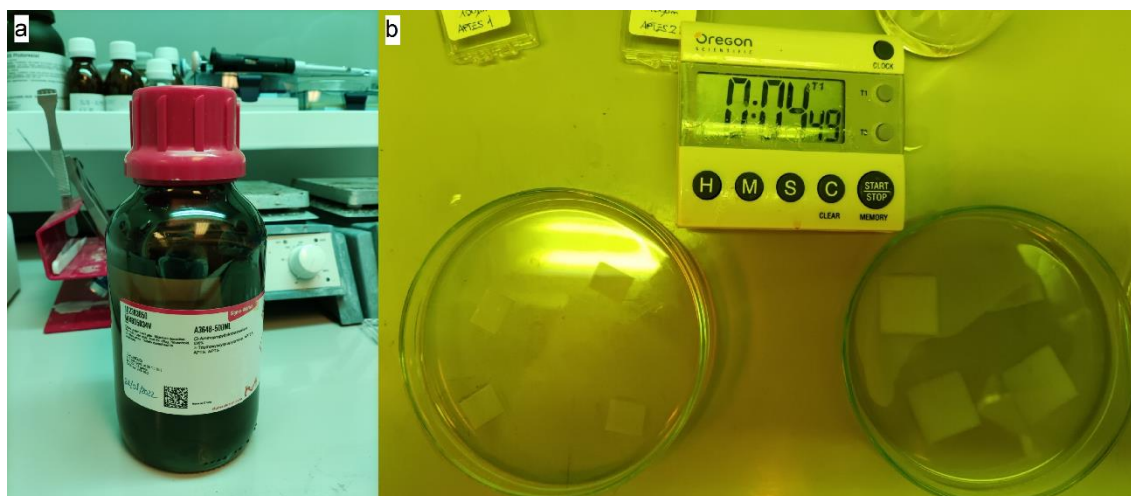


Figura 22. (a) Recipient de (3-Aminopropil)triètoxissilà (APTES) utilitzat. (b) Procediment de funcionalització dels APTES en les mostres.

Tan ràpid com es van extreure les mostres del RIE, aquestes es van banyar en APTES (cobrint les mostres en la seva totalitat) durant 5 minuts tal i com s'aprecia en la Figura 22b.

Per últim, es van esbandir les mostres amb aigua desionitzada i es van dipositar al forn a 35°C i durant 4 hores.

- Funcionalització de l'Aptàmer

Una vegada l'APTES es va enllaçar a la superfície del nanocompost, el següent pas és la immobilització de l'anhídrid succínic (SA). Per fer-ho, es va preparar una solució de 30 mL de 18 mg SA/mL DMF. El que implica que en total es van pesar 0.54g de SA.

Es van submergir les mostres durant 30 minuts en la solució anterior. Després de la reacció, les mostres es van esbandir amb DMF, deixar 2 minuts en aigua bullint, es van rentar amb etanol i finalment amb aigua MiliQ. Per últim s'assequen amb un corrent de N<sub>2</sub>. El procediment és idèntic al observat en la Figura 22, però utilitzant la solució del SA/DMF.

L'etapa següent correspon a la formació de l'èter-NHS. Es va preparar una solució de 10 mM solució tampó salina amb fosfats (PBS) de pH 7.0 amb 2 mM EDC i 5 mM NHS. En concret va ser de 25 mL, per tant, es van pesar 0.098g de EDC, 0.0147g de NHS i es va afegir directament 25 mL de PBS 10 Mm.

Les mostres es van submergir de nou, aquesta vegada amb la solució de EDC/NHS, durant 15 minuts. Les mostres es van rentar amb una corrent de N<sub>2</sub>.

Per finalitzar la funcionalització de l'aptàmer, es va preparar una solució de 10 mM PBS de pH 7.4 amb 1  $\mu$ M de l'aptàmer, que es goteja per sobre (tal com s'aprecia en la Figura 23) de les mostres i es deixa durant un temps òptim de 3 hores. A l'hora de treballar amb l'aptàmer, aquest s'ha de manipular sempre amb contacte amb gel, per a que l'estructura de l'aptàmer no pateixi desviacions amb la temperatura.



Figura 23. Nanocompostos amb les gotes de la solució d'aptàmer en la seva superfície

Pel que fa a la preparació d'aquesta última solució, en el nostre cas concret, disposàvem de 2.07  $\mu$ mol de l'aptàmer, i vam decidir dissoldre'l en 2.5 mL de solució TE (ja preparada). El que representa una concentració de 828  $\mu$ M. Mitjançant una dilució d'aquesta solució anterior, representada en els càlculs a continuació, es va preparar la solució de 1  $\mu$ M d'aptàmer en PBS.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \rightarrow 828\mu M \times 10\mu L = 1\mu M \times V_2 \quad (1)$$

On  $V_2$  presenta un valor de 8.28 mL, que és el volum total que tindrà la solució i el valor aproximat que es va afegir als 10  $\mu$ L d'aptàmer.

Com a tractament previ a la solució, és necessari sotmetre l'aptàmer a la desnaturalització de les seves cadenes d'ADN, per tal de poder manipular-lo. Aquesta desnaturalització de les cadenes és reversible quan es tornen a les condicions inicials (renaturalització), aquesta característica presenta moltes aplicacions, com per exemple la possibilitat de detectar la molècula objectiu quan aquesta entri en contacte amb l'aptàmer, sense necessitat de transportar i emmagatzemar el sensor refrigerat en condicions de molt baixa temperatura.

Per dur a terme aquest procediment es van agafar 20  $\mu$ L, ja que 10  $\mu$ L era tan insignificant que treballar era molt complicat, aquests 20  $\mu$ L es van portar a 90°C (desnatura lització) durant 5 minuts i es va disminuir la temperatura a 25°C de forma natural i es va dipositar amb un recipient amb gel immediatament. A partir d'aquí, molt important tindre en compte que l'ADN es va manipular sempre en presència de gel per no interferir en aquesta desnatura lització.

- Immobilització de l'Aflatoxina B1 (AFB1)

És extremadament essencial tindre present que, l'AFB1 presenta un punt d'ebullició de 2°C i que aquesta és preocupadament tòxica si s'inhala o entra en contacte amb el nostre cos. Per tant, la manipulació de l'AFB1 ha de ser sempre en presència de gel una vegada s'ha obert el recipient on esta emmagatzemada, per evitar la seva evaporació. De la mateixa forma com està representat en la Figura 24, on hi ha l'AFB1 encara sota el gel.



Figura 24. Recipient amb gel utilitzat per manipular l'aptàmer i l'AFB1

Abans de posar en contacte l'AFB1 amb les mostres, es va preparar una solució de 1  $\mu\text{M}$  d'aquest compost. La solució d'AFB1 de la que disposàvem presentava una concentració de 6.4  $\mu\text{M}$  dissolt en acetonitril (ACN). Vam calcular:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \rightarrow 6.4\mu\text{M} \times 1\text{mL} = 1\mu\text{M} \times V_2 \quad (2)$$

On  $V_2$  presenta un valor de 6.4 mL com a volum total de la solució. Per tant, la solució es va preparar amb 5.4 mL d'ACN i 1 mL de la solució d'AFB1 6.4  $\mu\text{M}$ , per acabar obtenint la solució desitjada de 1  $\mu\text{M}$  AFB1/ACN.

Tan ràpid com la solució es va preparar, aquesta es va gotejar per damunt de les mostres i es va deixar reposar durant 1 hora. Després, aquestes es van assecar amb un flux de  $\text{N}_2$ .

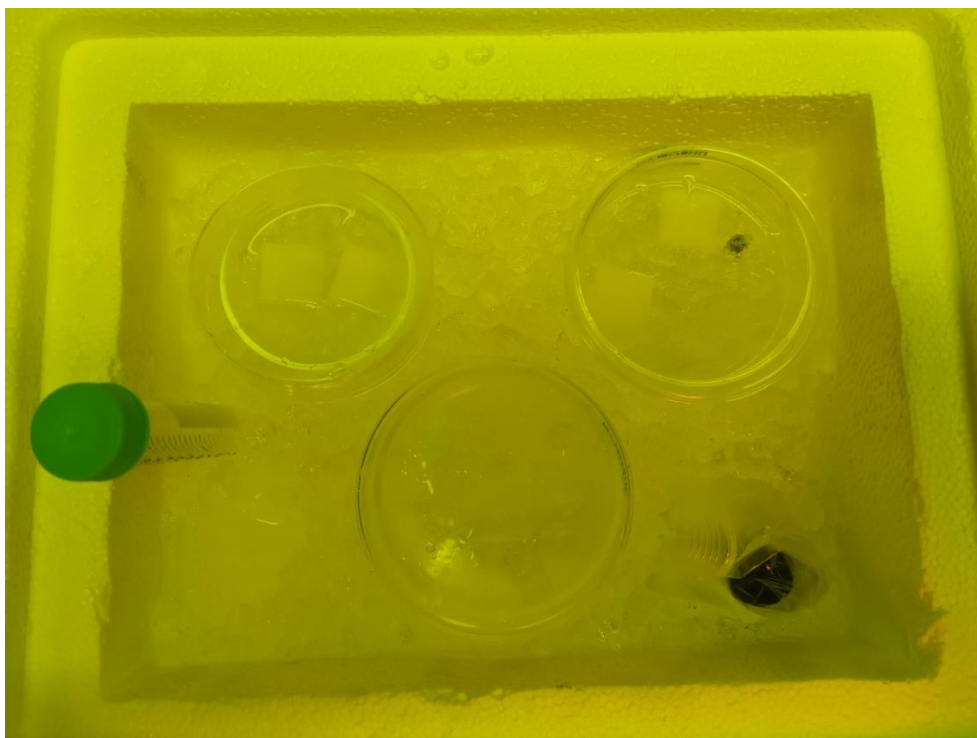


Figura 25. Disposició de les mostres en gel després de les gotes d'AFB1.

La imatge anterior no permet veure amb exactitud les mostres amb l'AFB1 per la seva superfície, però és molt útil per entendre com es va treballar i que l'aflatoxina va ser manipulada amb gel i sota de la campana d'extracció, fins i tot quan es va posar en contacte amb les mostres.

En dues de les mostres, una de 100  $\mu\text{m}$  i una segona de 10  $\mu\text{m}$  de gruix, es va finalitzar la seva funcionalització en l'etapa de l'aptàmer, d'aquesta manera es possible la comparació dels resultats entre les diferents etapes.

#### 4.7- Caracterització de la funcionalització per etapes

Es van caracteritzar les mostres després de cada una de les etapes de la funcionalització mitjançant instrumentació de Microscòpia electrònica de rastreig ambiental de pressió variable (ESEM) amb microanàlisi de raig-X. L'instrument en concret és el model Quanta 600 de la marca FEI Company.

Gràcies al ESEM va ser possible l'obtenció d'espectres elementals produïts amb microanàlisi que permet confirmar la presència d'elements, i la seva proporció, en la superfície de les mostres.

Finalment, es va procedir a mesurar, amb la làmpada UV i la fibra òptica, les emissions de la mateixa manera que es va procedir en apartats anteriors, per comprovar si l'AFB1 causa alguna variació en les emissions de l'Eu característiques de les mostres.

## 5- Resultats i discussió

### 5.1- Construcció d'una corba de calibratge del gruix de les capes

Els gruixos de capa obtinguts, per les RPM escollits, estan representats en la taula que es troba a continuació, juntament amb la recta de calibratge produïda amb els mateixos resultats.

Taula 3. Dades de la corba de calibratge del gruix de PDMS

PDMS Corba de calibratge					
	Mostra 1	Mostra 2	Mostra 3	Mostra 4	Mostra 5
<b>Pas1 RPM</b>	500	500	500	500	500
<b>Pas2 RPM</b>	<b>2500</b>	<b>2100</b>	<b>1700</b>	<b>1300</b>	<b>500</b>
<b>Gruix</b>	<b>14</b>	<b>18</b>	<b>21</b>	<b>39</b>	<b>78</b>
<b>Forn</b>	2 H	2 H	2 H	2 H	2 H

Com es pot observar en la taula, l'*spin-coater* consta de dos passos a diferents revolucions. El segon pas és l'etapa que més influeix en el gruix de les capes i és amb el es va construir la corba. Els gruixos resultants van ser de 14, 18, 21, 39 i 78  $\mu\text{m}$ .

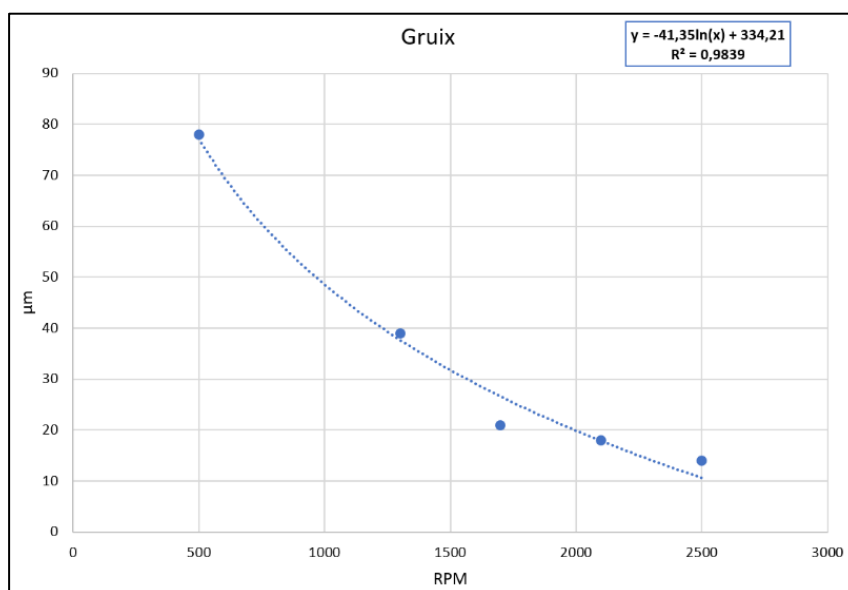


Figura 26. Representació de la corba de calibratge del gruix de PDMS

Es va obtenir una bona corba de calibratge amb una  $R^2$  de valor 0.9839 i una equació de recta:  $y = -41.35\ln(x) + 334.21$  com és apreciable en la Figura 26. Cap dels punts va ser eliminat.

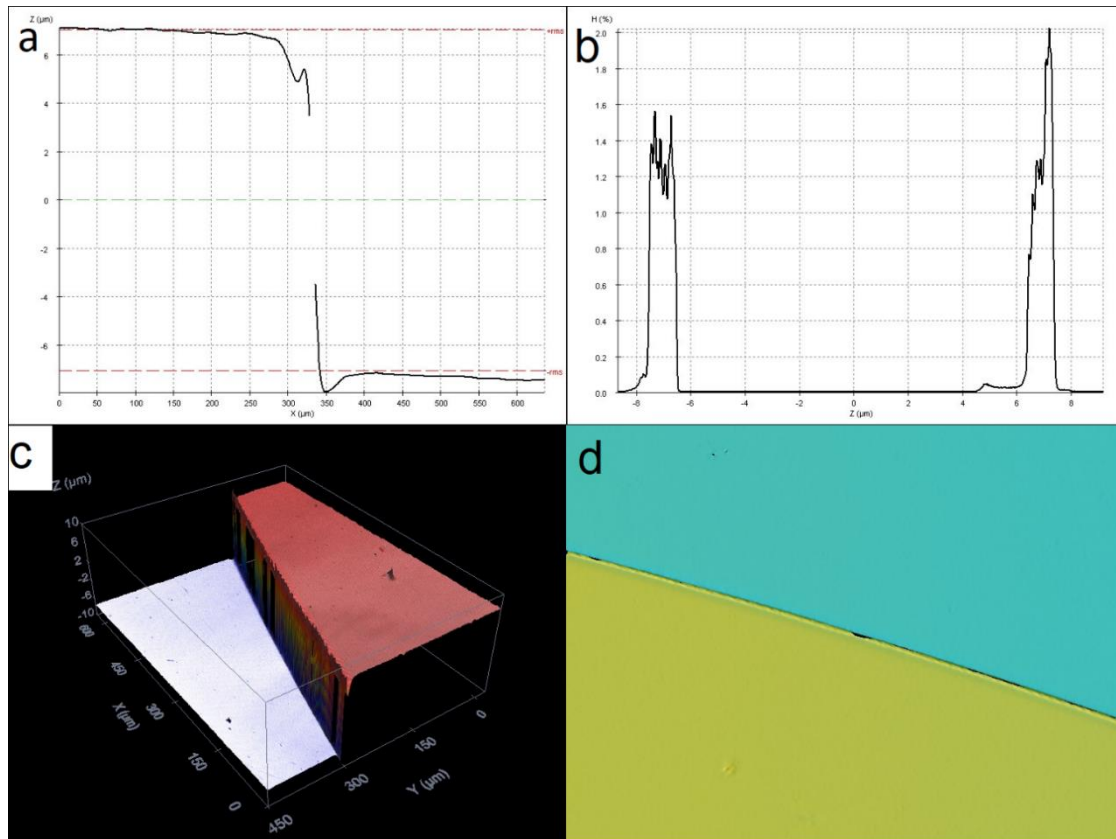


Figura 27. (a) i (b) Representacions del gruix de capa de PDMS. (c) Imatge 3D de la superfície de la capa. (d) Topografia de la capa de PDMS

En la Figura anterior es veuen representats els gràfics utilitzats per la determinació del gruix de les mateixes capes de PDMS. Els gràfics pertanyen a la mostra 2 (2100 RPM i 18  $\mu\text{m}$ ).

Els dos primers gràfics, (a) i (b), representen el gruix de la capa de formes diferents. El (a) representa la variació de l'eix z de la superfície de la capa respecte el recipient on està immobilitzada. En la representació (b) s'observen dos pics que fan referència a el percentatge de superfície observada per cada alçada en concret. Si un pic és més alt que l'altre, vol dir que, en la zona que està mesurant el microscopi, hi ha més quantitat de superfície observable per una alçada que de l'altra. La diferència de l'eix z entre els dos pics, fa referència al gruix de la capa.

La imatge (c), és bàsicament una representació en tres dimensions de la capa de PDMS, que està representada en color vermell. La superfície de color blanc és el recipient on està immobilitzat la capa.

Per últim, una topografia vertical s'aprecia en la Figura (d). No aporta informació imprescindible per la determinació del gruix de les capes, però permet veure el salt entre la capa de PDMS (color groc) i el recipient (color blau).



## 5.2- Dispersió de les nanopartícules

Mitjançant microscòpia electrònica de transmissió (TEM), es va analitzar la dispersió de les NPs  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}^{3+}$  en tot el nanocompost de PDMS.

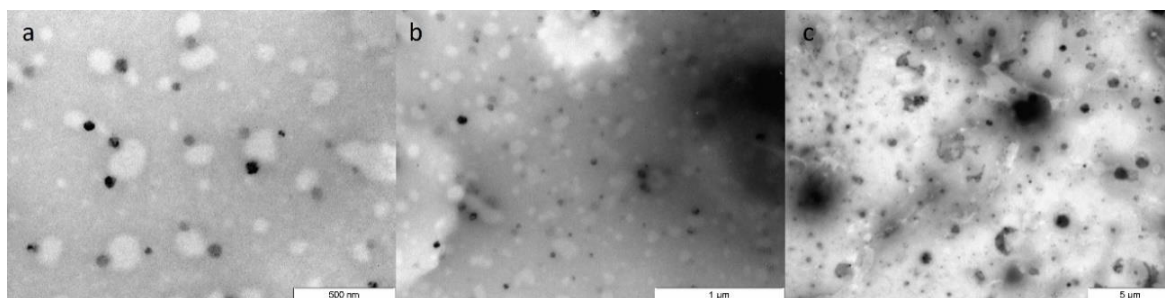


Figura 28. Representació de la dispersió de les NPs ( $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}^{3+}$ ) al llarg del material de PDMS a diferent escala després de 1 hora de bany d'ultrasons. (a) Distribució de partícules de menys de 250nm, (b) Distribució de partícules entre 250 i 300nm. (c) Distribució de partícules d'entre 300nm i 3 μm.

Per fer-ho, abans de la mesura es va triturar el material per observar la dispersió en el material de forma real i no només en la superfície.

La Figura 28, corrobora la dispersió homogènia de les NPs a diferents escales. Demostrant que 1 hora de bany d'ultrasons és suficient per l'obtenció d'una bona dispersió i distància entre les NPs.

S'observen dues taques diferents que es podria arribar a pensar que pertanyen a partícules diferents, però aquest pensament és erroni. La única diferència és la profunditat de les NPs, les que s'observen amb una coloració més fosca o negra directament, són les NPs que es troben en el pla que s'està mesurant, a mesura que aquestes van obtenint una coloració més clara és perquè es troben a major profunditat.

## 5.3- Fabricació dels nanocompostos

Per a les NPs de  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}$  utilitzades, es van obtenir resultats més que satisfactoris per als nanocompostos fabricats amb PDMS. Mostres molt homogènies i distingibles a simple vista a causa de la disminució de la coloració blanca, produïda per les NPs, a mesura que disminueix el gruix.

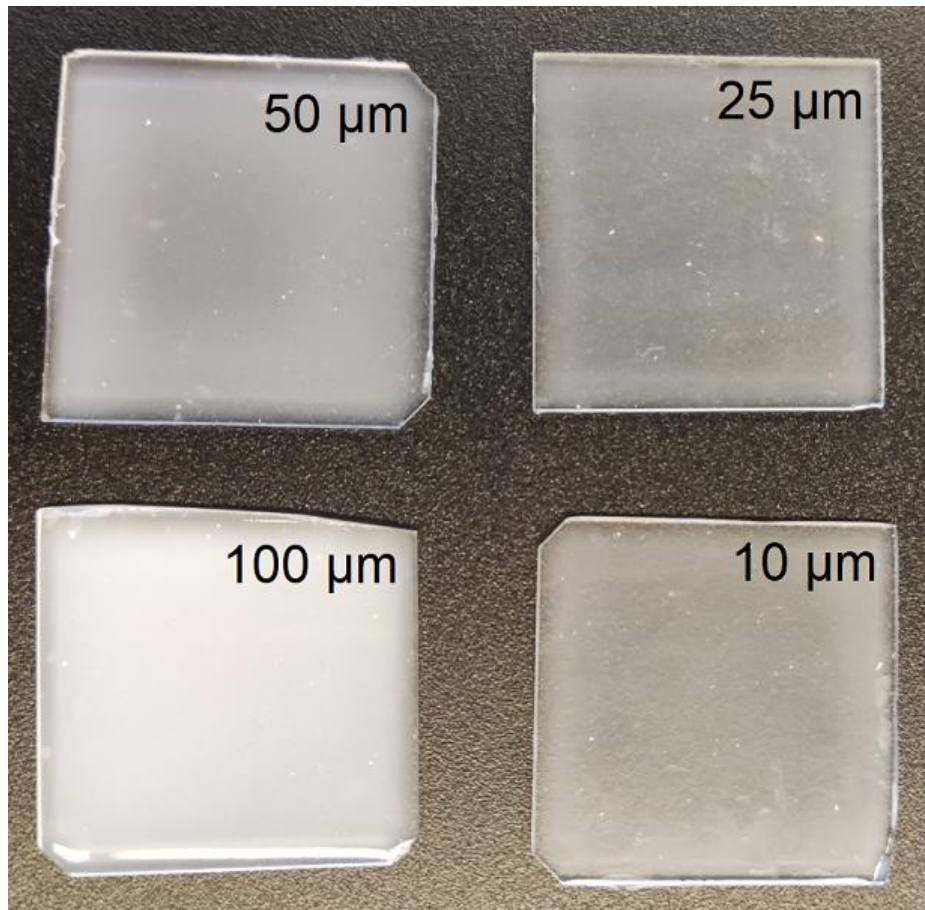


Figura 29. Comparació dels nanocompostos fabricats mitjançant PDMS al 4% wt de NPs de  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}^{3+}$  de 100, 50, 25 i 10  $\mu\text{m}$

Pel que fa als nanocompostos fabricats mitjançant SU-8, els resultats no van tindre tant èxit. Això és degut a que la resina SU-8 és fotosensible a la llum UV, que de fet és la que es va utilitzar durant 6 segons per catalitzar el procés de curació del polímer durant la fabricació de les capes. El problema és que, més endavant, per mesurar l'emissió de les NPs dopades amb  $\text{Eu}^{3+}$ , també es va utilitzar una làmpada de longituds d'ona pertanyents al rang de l'UV que va causar una sobreexposició d'aquesta llum UV i les mostres es van malmetre.

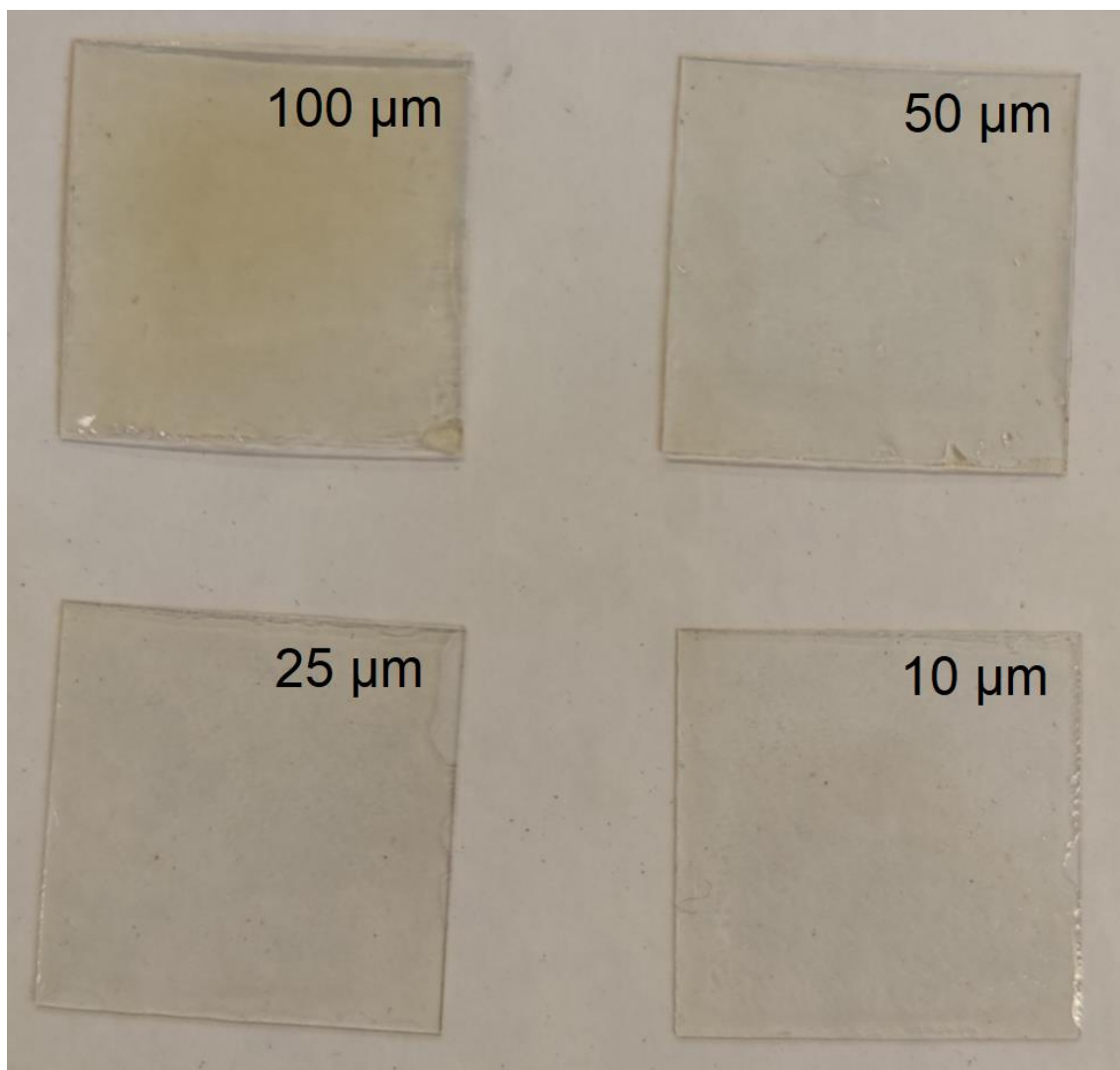


Figura 30. Comparació dels nanocompostos fabricats mitjançant SU-8 al 4% wt de NPs de  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}^{3+}$  de 100, 50, 25 i 10  $\mu\text{m}$

En la Figura 30, s'aprecia sobretot en la mostra de 100  $\mu\text{m}$  com va adquirir un color més fosc, com si s'hagués cremat, demostrant que ha estat sobreexposada a llum UV i s'ha malmès.

Aquest problema que es podria solucionar perfectament només canviant les NPs de  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}$  per unes altres que no absorbeixin en el rang de l'UV.

#### 5.4- Detecció de les emissions de l'Europi

Per a totes i cada una de les mostres es van utilitzar les mateixes NPs de  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}$  dopades en un 4% wt d'Europi respecte del Calci.

Utilitzant el programa Origin, es van construir la mitjana dels espectres d'emissió de les mostres, ja que per a cada nanocompost es van realitzar tres repeticions per assegurar la veracitat dels resultats.

A continuació estan representades les comparacions dels espectres 2D de d'emissió de cada gruix de mostra en funció de la concentració de NPs, per a les

mostres que es van fabricar amb PDMS. Tots els espectres segueixen el mateix patró de pics, característic de l'emissió de l'Eu<sup>3+</sup>.

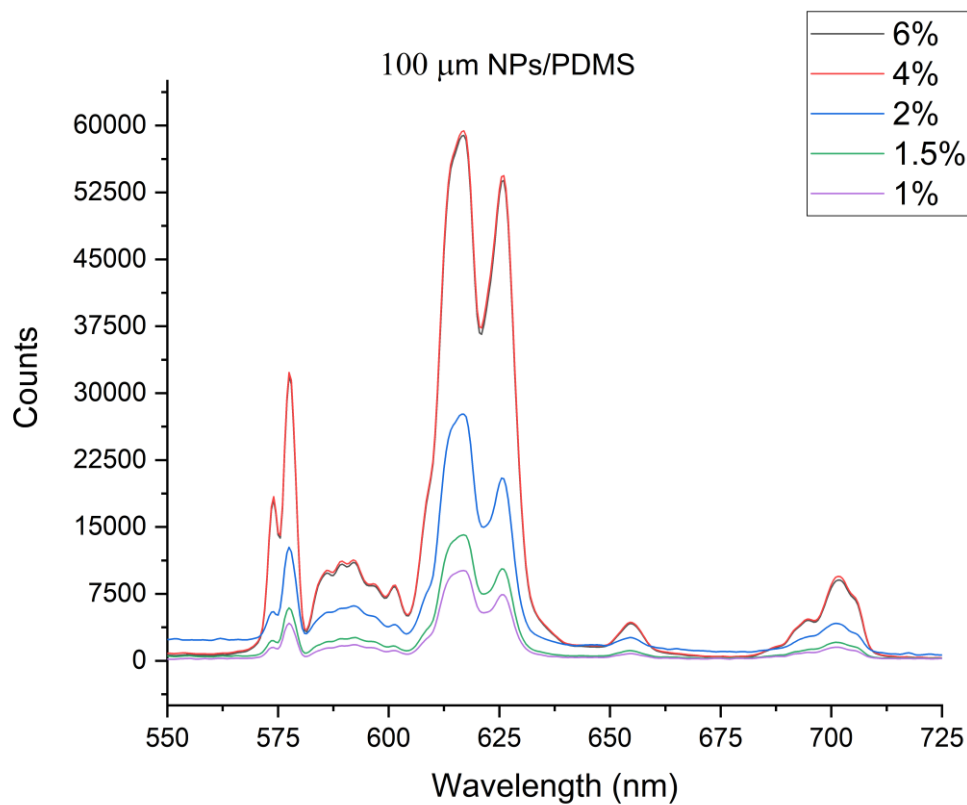


Figura 31. Comparació dels espectres d'emissió dels nanocompostos de PDMS de 100 µm en funció de la concentració de NPs (6, 4, 2, 1.5 i 1%)

Les mostres fabricades amb un gruix de 100 µm són les que tenen una mida major, i en conseqüència, són les que van presentar una emissió superior amb gran diferència, en comparació a gruixos inferiors.

Destacable, especialment, l'emissió dels nanocompostos amb un 6 i 4% de NPs que estan les dues en unes 60000 comptes, un valor molt més elevat que la següent mostra corresponent al 2% de concentració que ronda les 30000 comptes.

Entre el 6 i 4% no hi ha gairebé variació de la intensitat, fins i tot es podria dir que la mostra al 4% està lleugerament per damunt de la del 6%, però a partir d'aquí, s'observa una disminució clara de l'emissió en funció de la seva concentració de NPs de Ca<sub>8</sub>NaBi(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>F<sub>2</sub>:Eu.

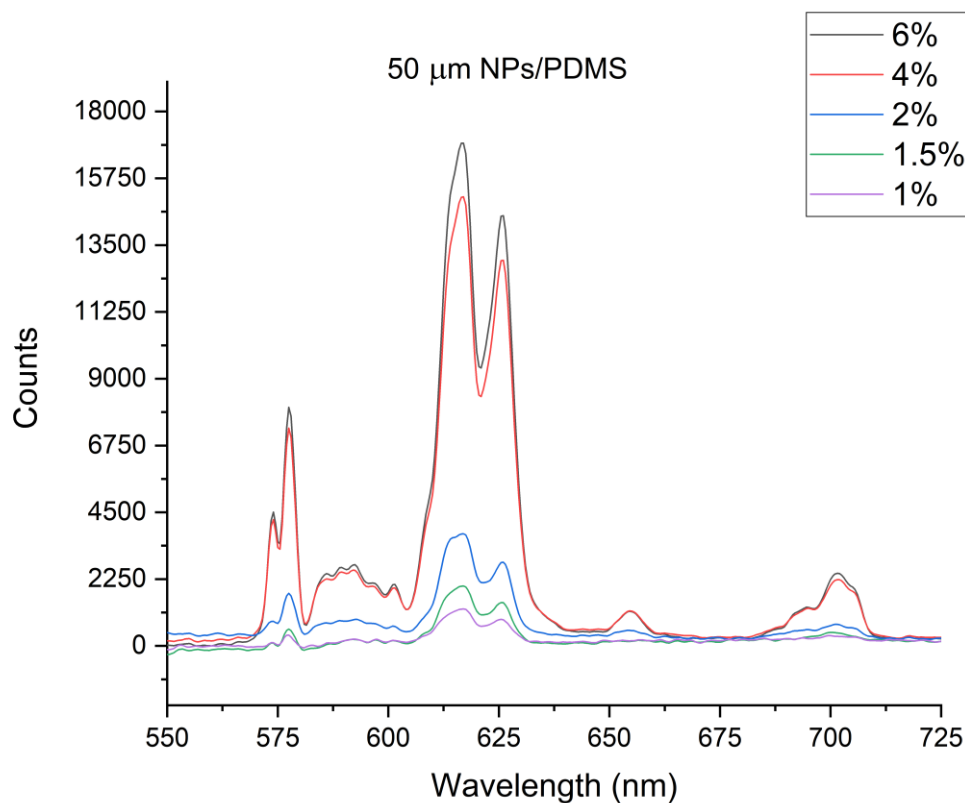


Figura 32. Comparació dels espectres d'emissió dels nanocompostos de PDMS de 50 µm en funció de la concentració de NPs (6, 4, 2, 1.5 i 1%)

En la Figura 32, s'aprecia la disminució general considerable de l'emissió de les mostres si es comparen amb les mostres de 100 µm. Per exemple, la mostra del 6% ha passat de 60000 comptes a unes 17000 comptes (disminució del 72%), el mateix fenomen passa en la resta de mostres.

De nou, hi ha una gran diferència a partir de les concentracions de 2% si es comparen amb les mostres del 6 i 4%, unes 11000 comptes aproximadament són les que separen els resultats entre les mostres de 2 i 4%, una diferència gegant tenint en compte que la del 4% presenta unes 15000 comptes.

Els resultats entre el 6 i 4% tornen a ser molt similars, però la intensitat del 6% en concentració està per damunt en aquest cas.

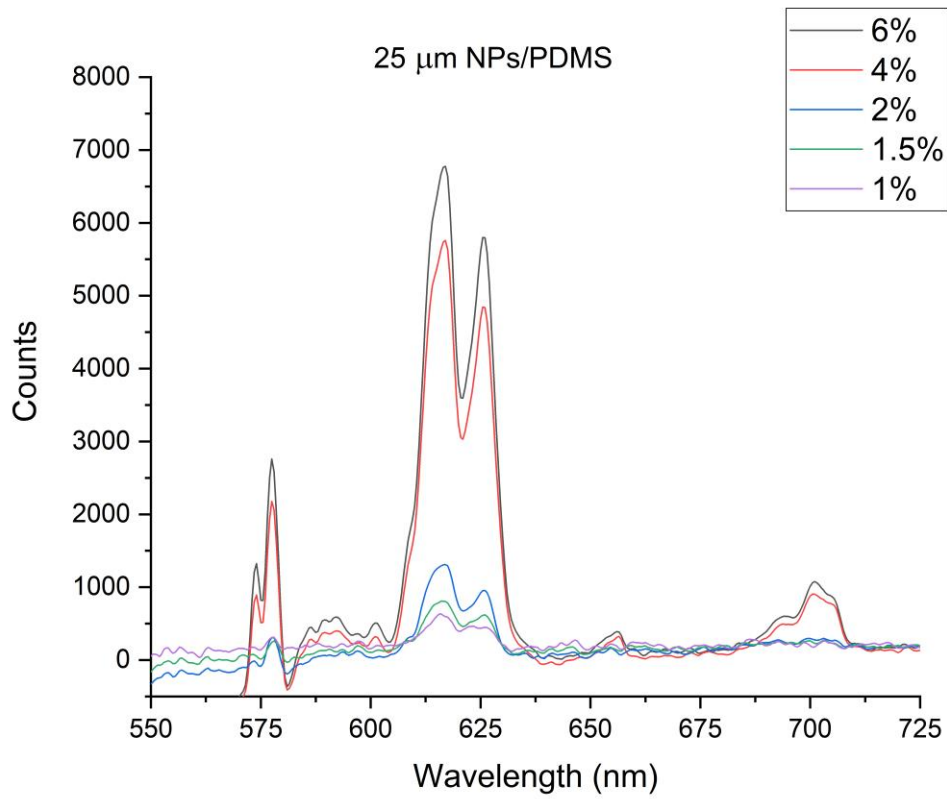


Figura 33. Comparació dels espectres d'emissió dels nanocompostos de PDMS de 25  $\mu\text{m}$  en funció de la concentració de NPs (6, 4, 2, 1.5 i 1%)

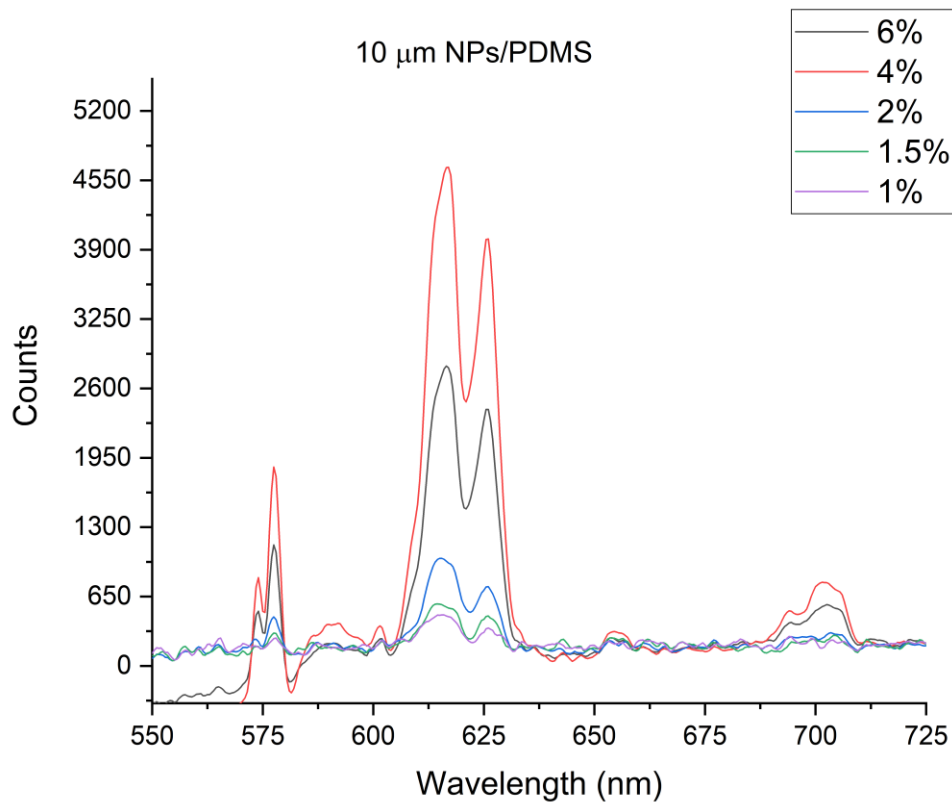


Figura 34. Comparació dels espectres d'emissió dels nanocompostos de PDMS de 10  $\mu\text{m}$  en funció de la concentració de NPs (6, 4, 2, 1.5 i 1%)

Pel que fa les mostres de 25 i 10  $\mu\text{m}$ , els resultats estan representats en les Figures 33 i 34 respectivament.

Les emissions en aquests dos casos, en general, ja són molt menors en comparació a les anteriors, sobretot amb les mostres de 100  $\mu\text{m}$ . Ja que les màximes intensitats estan en 7000 comptes en el cas de 25  $\mu\text{m}$ , i menys de 5000 comptes en les de 10  $\mu\text{m}$ .

Es podria dir, fins i tot, que els resultats proporcionats per les mostres amb concentracions menors (2, 1.5 i 1%) es confonen amb el soroll dels espectres.

Un fenomen observable entre les mostres de 10  $\mu\text{m}$  és que l'emissió de la concentració de NPs al 4% és superior a la del 6%. Això ja passava, de forma més lleu, en les mostres de gruix de 100  $\mu\text{m}$ . I en les mostres restants els resultats entre 6 i 4% eren gairebé els mateixos

Per tant, es pot extreure que les mostres amb una concentració òptima són les del 4% de les NPs de  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}$  que s'apropen a la intensitat màxima d'emissió dels nanocompostos pel que fa a la concentració, ja que per molt que s'augmenti la concentració de NPs per damunt del 4%, no s'observaran grans variacions en els resultats. Això pot ser degut a que les NPs i les seves emissions poden començar a interaccionar entre elles a partir d'una concentració determinada, el que provocaria que no augmentés, o fins i tot una disminució, de la intensitat d'emissió.

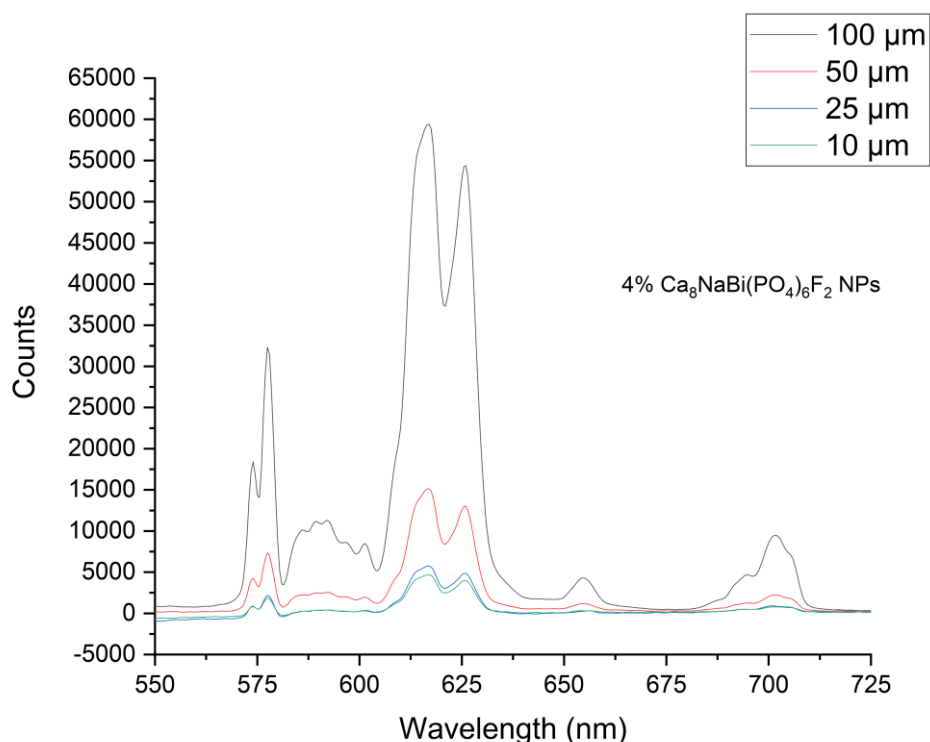


Figura 35. Comparació dels espectres d'emissió dels nanocompostos de PDMS en un 4% de concentració en funció del gruix dels nanocompostos (100, 50, 25 i 10  $\mu\text{m}$ )

Com és apreciable en la Figura 35 i en tots els resultats obtinguts, la intensitat d'emissió dels nanocompostos és directament proporcional al gruix del material i els resultats són molt millors en el cas de les 100  $\mu\text{m}$ .

Gràcies a aquests resultats, es va procedir les etapes següents de l'estudi amb les mostres de 100  $\mu\text{m}$  i 10  $\mu\text{m}$  amb un 4% de concentració de les NPs, les de 100  $\mu\text{m}$  són les que van presentar uns resultats més òptims pel que fa a la intensitat. També es van escollir les mostres de 10  $\mu\text{m}$ , ja que existeix la possibilitat de que les variacions en les senyals òptiques s'observin millor en mostres amb un gruix menor degut a la menor quantitat de nanocompost i menor intensitat d'emissió. Al final de l'estudi es comprovarà si aquesta hipòtesi és certa.

Per últim, també es van mesurar les emissions de les mostres fabricades amb SU-8. Amb les quals, com ja he avançat l'apartat anterior, no es van obtenir els resultats esperats.

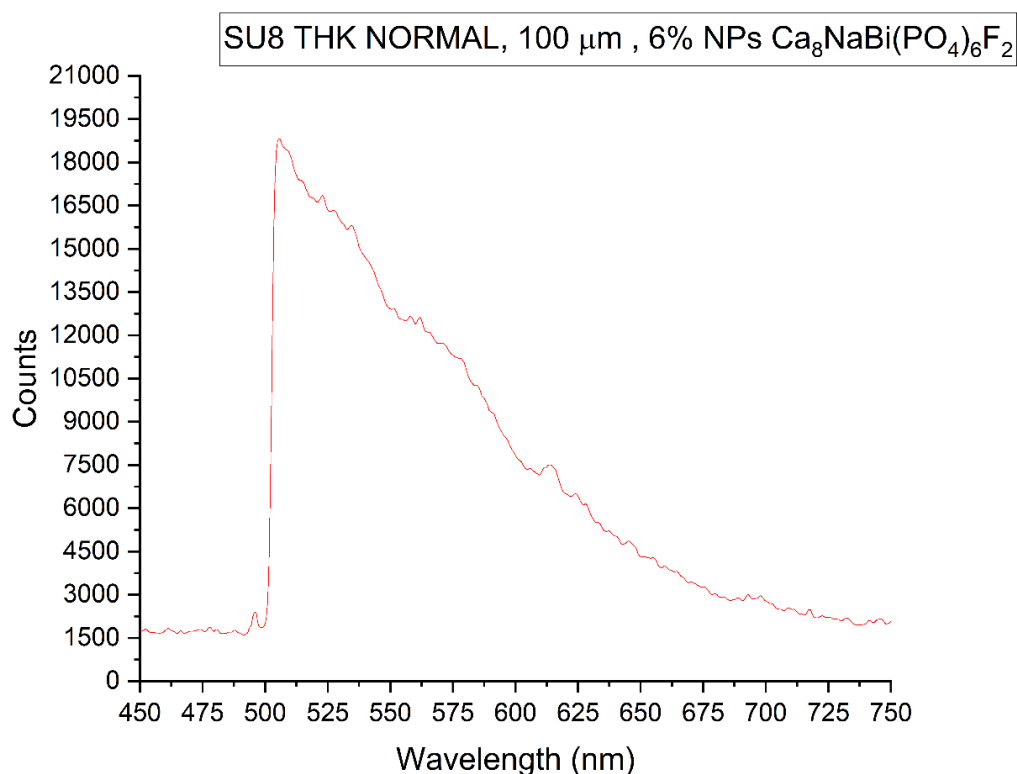


Figura 36. Espectre d'emissió d'un nanocompost de SU-8 de 100  $\mu\text{m}$  en una concentració de NPs del 6%.

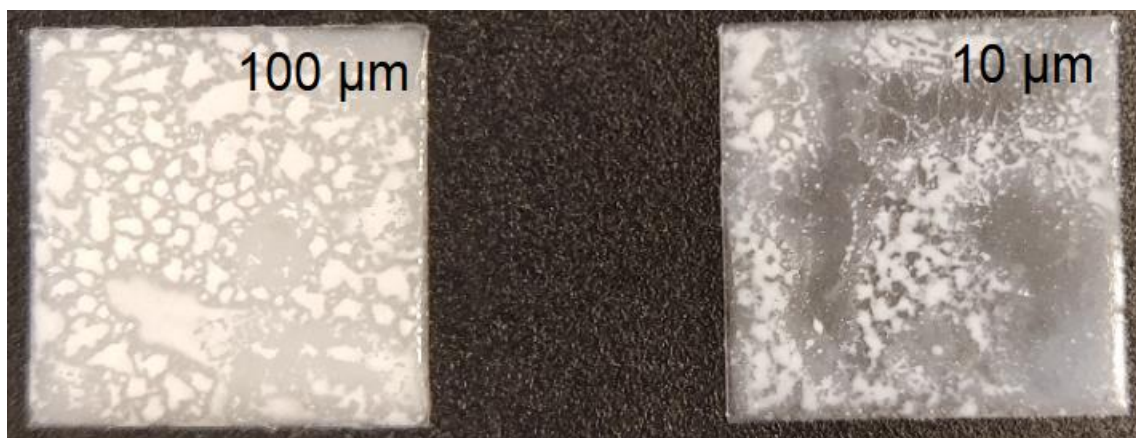
En la Figura 36 s'entén la immensa diferència de resultats entre el PDMS i el SU-8. En aquest últim cas, no va ser possible apreciar ni un dels pics característics de l'emissió de l' $\text{Eu}^{3+}$  en cap de les mostres fabricades. Tot això degut a la sobreexposició de la resina a la llum UV. Degut a aquests resultats, el grup de recerca està pensant altres aplicacions possibles, aprofitant aquesta luminescència de les mostres de SU-8 amb diferents solvents.



Per aquest motiu es van apartar les mostres de SU-8 pel que fa a la funcionalització i es va treballar amb les mostres de PDMS esmentades anteriorment.

### 5.5- Funcionalització per etapes dels nanocompostos

En relació a l'etapa de funcionalització del les molècules d'APTES, immediatament després de treure les mostres del forn, la superfície del material va ser sotmesa a canvis molt destacables. Unes taques blanques van aparèixer propagades per tot el material (apreciables en la Figura 37), produïdes per la mateixa adhesió de les molècules d'APTES. Les zones on el blanc és més intens, és a causa de l'aglomeració d'aquestes molècules.



*Figura 37. Nanocompostos de PDMS de 100 i 10  $\mu\text{m}$  amb una concentració del 4% de NPs, després de l'adhesió dels APTES*

Variacions importants, a simple vista, de la superfície dels nanocompostos no van ser detectades al finalitzar les etapes de funcionalització següents, tant per l'aptàmer com per l'AFB1.

Les superfícies s'aprecien molt similars a les observades a la Figura 37.

### 5.6- Caracterització de la funcionalització per etapes

A continuació es troben els resultats corresponents pel que fa a la primera etapa de la funcionalització, l'adhesió de les molècules d'APTES sobre la superfície dels nanocompostos.

Apart de microscòpia, l'ESEM també incorpora microanàlisi de Raig-X amb el que es van caracteritzar les mostres.

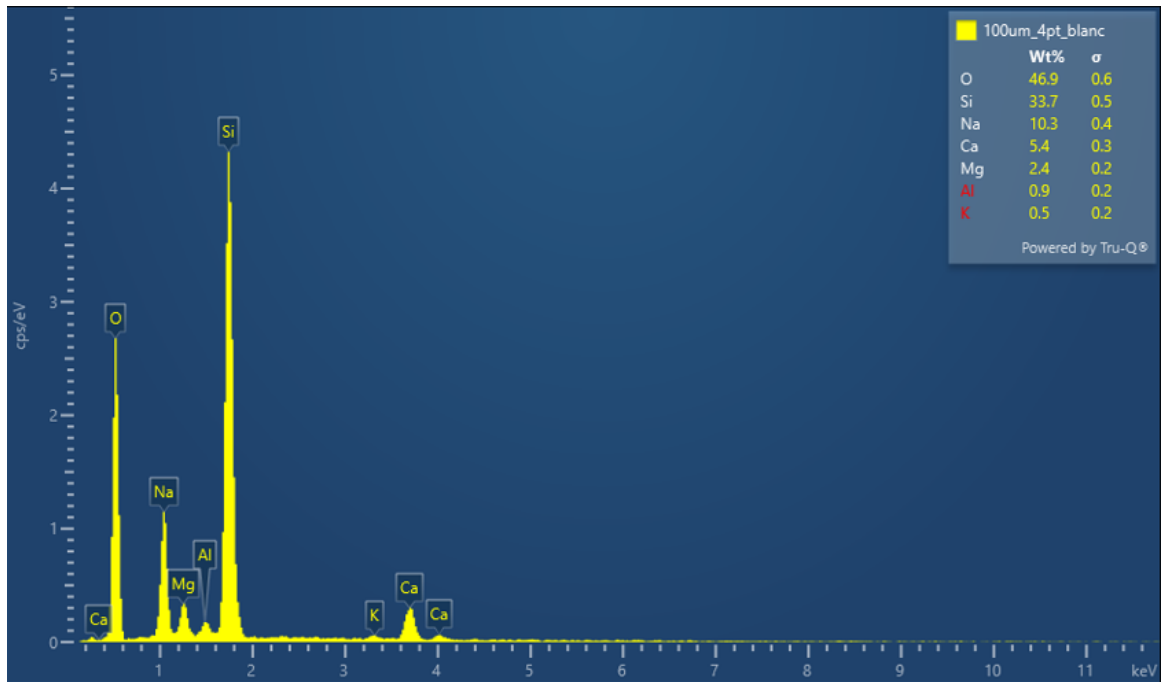


Figura 38. Espectre de Raig-X d'una mostra sense funcionalitzar (blanc) de 100 μm al 4%

Tal com es veu en l'espectre de la Figura 38, els pics més grans que es van detectar són els del Si i l'O procedent del PDMS de la mostra (part del Si prové del vidre on es troba la mostra). Altres pics com són els del Ca i el Na, corresponen a pics originats per les NPs que contenen aquests elements. Els altres pics petits corresponen a, segurament, impureses en el material.

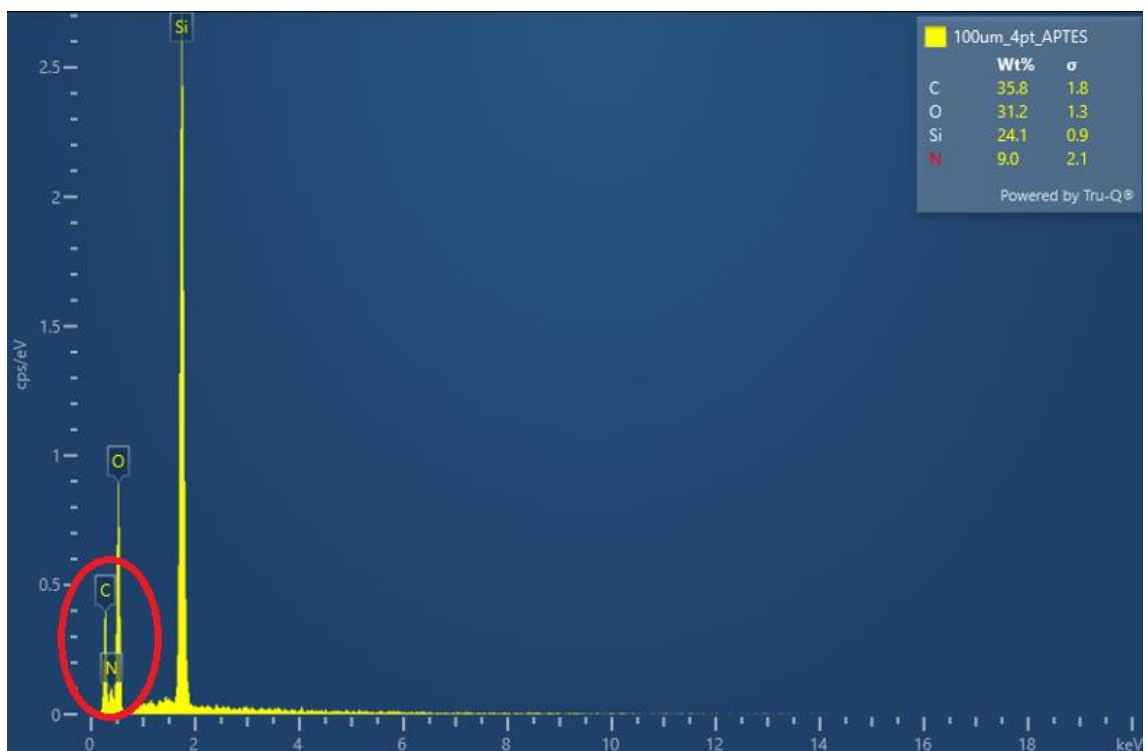


Figura 39. Espectre de Raig-X d'una mostra de 100 μm al 4% funcionalitzada amb APTES.

En canvi, tal com es veu en l'espectre de la Figura 39, per les mostres on s'han adherit les molècules d'APTES apareixen els pics de C i N característics, en el nostre cas, d'aquesta molècula, ja que és la única font d'aquests dos elements.

Són considerablement menys intensos que el de Si, degut a la gran quantitat d'aquest element en el polímer i també en la làmina de vidre que suporta la mostra, que també té un efecte important en aquest pic. Pel que fa als pics de C i N, també s'aprecia que el pic de C és més gran que el de N, degut a que en la molècula d'APTES hi ha tres vegades més àtoms de C que de N.

Es van mesurar totes les mostres funcionalitzades amb APTES, entre elles estan les mostres del 6% de NPs de 100 i 50  $\mu\text{m}$  de gruix i per les de 4% es van funcionalitzar les de 100 i 10  $\mu\text{m}$  gruix. Es volia comprovar si hi havia alguna diferència apreciable en els resultats, però tots els espectres van resultar ser anàlegs.

Pel que fa a les mostres ja funcionalitzades amb l'aptàmer, els resultats van ser els de la Figura representada a continuació.

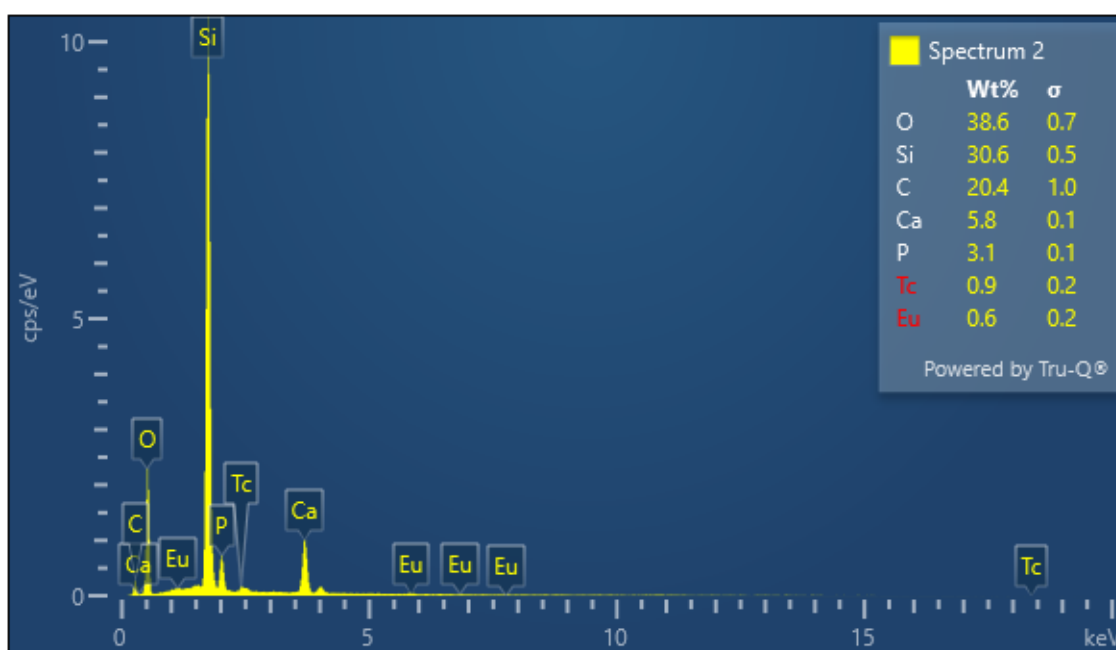


Figura 40. Espectre de Raig-X d'una mostra de 100  $\mu\text{m}$  al 4% funcionalitzada amb aptàmer.

Com sempre, destaca el pic del Si característic per el PDMS i del vidre on es troba la mostra. També s'observen pics característics de les NPs utilitzades, en concret elements com el P, Ca o fins i tot pics corresponents a l'Eu. El més destacable és que el pic del C segueix present en l'espectre, però el pic del N ha desaparegut totalment. Aquest fenomen pot ser provocat per la immobilització de l'aptàmer i que aquest hagi provocat que la quantitat de N present sigui insignificant en la superfície, si aquest es compara amb el C.

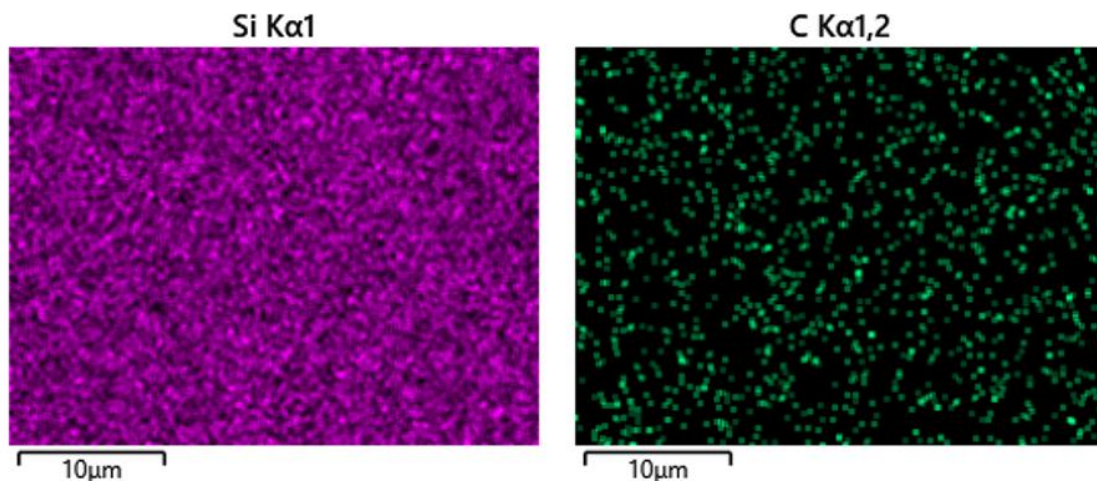


Figura 41. Estudi de la proporció de Si i C en la superfície de la mostra

La Figura 41 confirma la important presència de C, procedent de totes les etapes de funcionalització, en una zona en concret de la superfície del nanocompost, però que comparat amb el Si és molt menor.

Per últim, també es van obtenir els espectres de les mostres amb l'AFB1 immobilitzada en la superfície del material.

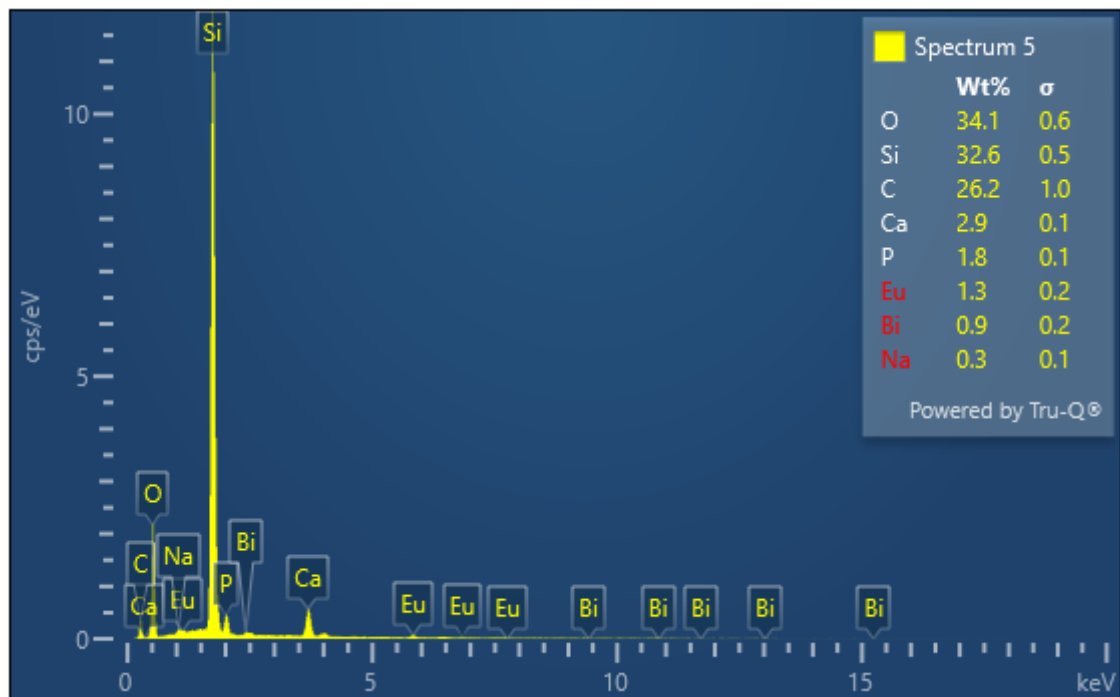


Figura 42. Espectre de Raig-X d'una mostra de 100 μm al 4% funcionalitzada amb AFB1

És apreciable que no hi ha cap diferència representativa entre l'espectre observat després de la funcionalització amb AFB1, i els pics després de funcionalitzar les mostres amb l'aptàmer (Figura 40). La dispersió de Raig-X no proporciona prou informació com per confirmar la presència de l'AFB1, per això utilitzarem una tècnica òptica que és més sensible per confirmar la seva presència.

Pel que fa a les mostres de 100  $\mu\text{m}$  amb un 4% de NPs, els resultats van ser els següents:

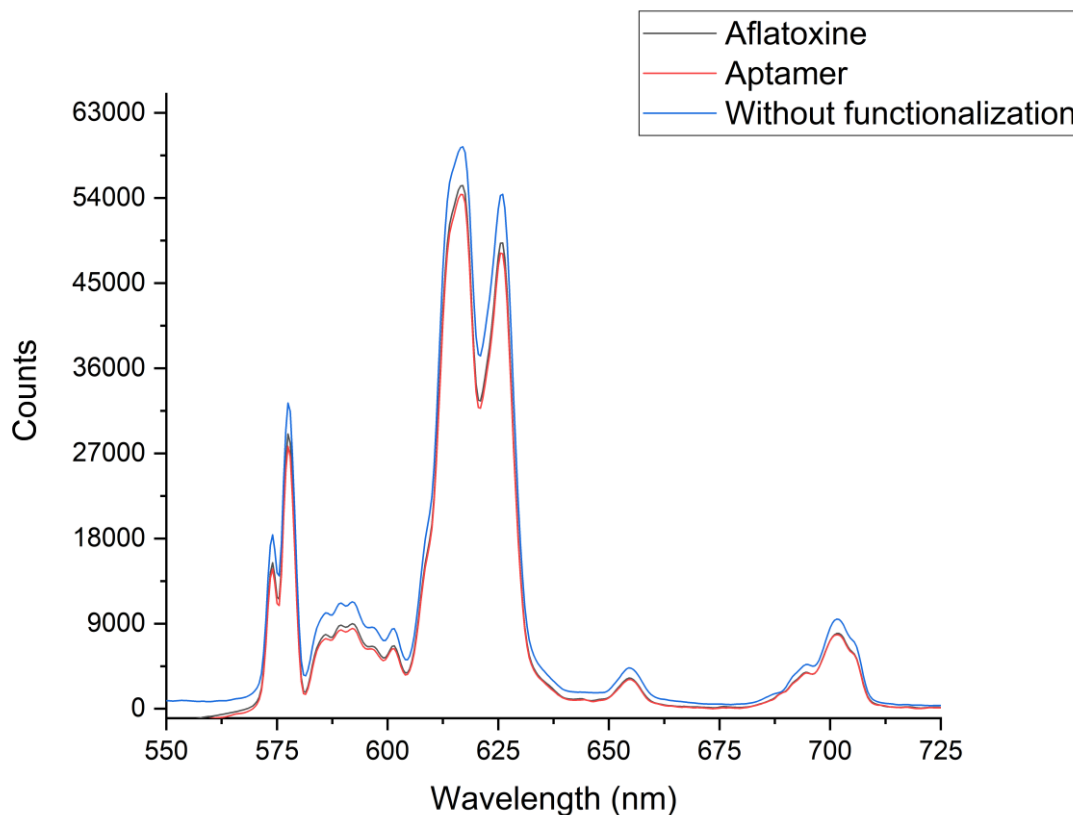


Figura 43. Comparació de les emissions dels nanocompostos, de 100  $\mu\text{m}$  al 4% de NPs, en diferents etapes de la funcionalització, sense funcionalitzar (línia blava), després de funcionalitzar els aptàmers (línia vermella) i la immobilització de la AFB1 (línia negra).

A primera vista, s'observa una disminució, d'unes 5000 contes, de les emissions en presència d'aptàmers en la superfície del nanocompost. A més, s'aprecia un lleuger augment de les emissions quan les molècules d'AFB1 es troben immobilitzades en aquests aptàmers, si es comparen amb les mostres sense l'AFB1 adherida.

Les mostres de 10  $\mu\text{m}$  de gruix de la mateixa concentració de NPs també es van caracteritzar òpticament. Els resultats són similars a les mostres comentades anteriorment, però les variacions en les emissions es veuen d'una manera molt més clara que amb les mostres anteriors. Per tant, es pot confirmar que per a aplicacions de biosensors, com més prima sigui la capa del nanocompost, millor per a detectar diferències en les emissions òptiques del material.

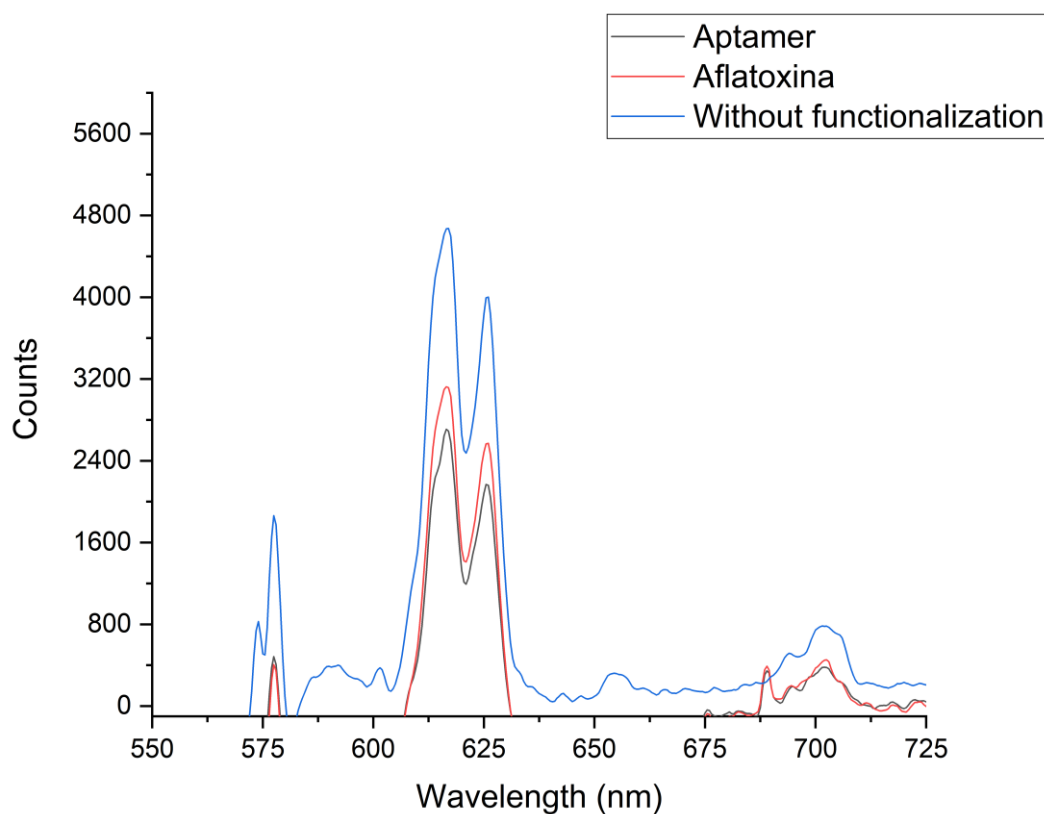


Figura 44. Comparació de les emissions dels nanocompostos, de 10  $\mu\text{m}$  al 4% de NPs, en diferents etapes de la funcionalització, sense funcionalitzar (línia blava), després de funcionalitzar els aptàmers (línia negra) i la immobilització de la AFB1 (línia vermella).

Com ja he comentat, els resultats són molt similars. Hi ha una clara disminució de les emissions, causada pels aptàmers, en la superfície que causen interferències. De nou, les AFB1 immobilitzades en la superfície de les mostres causen un petit augment en les emissions, comparant amb les mostres funcionalitzades únicament amb aptàmers.

Aquest fet ens va portar a pensar que, tal com confirmen tant en les mostres de 100  $\mu\text{m}$  com les de 10  $\mu\text{m}$  de gruix, l'AFB1 està interferint en la senyal òptica emesa per les NPs d'una forma molt lleu. D'aquesta manera, es va arribar a la conclusió que la solució d'AFB1 utilitzada (1  $\mu\text{M}$ ) presentava una concentració de l'aflatoxina excessivament baixa com per a que una bona quantitat de molècules d'AFB1 s'adherissin als aptàmers i poguessin causar una variació realment important de les emissions de les NPs. Però que en general, la interacció de l'AFB1 existeix i està present en les mostres.

El grup d'investigació, gràcies a aquests resultats, seguirà investigant i proposant noves idees per optimitzar aquestes variacions de les emissions provocades per l'AFB1, millorar la seva sensibilitat i fabricar el biosensor.

## 6- Conclusions

L'emissió òptica produïda pel nanocompost  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}/\text{PDMS}$  s'ha pogut optimitzar en funció del gruix de capa i de la concentració de NPs, per a aplicacions de detecció òptica. En concret, 100  $\mu\text{m}$  i 4% de NPs és la combinació que aporta una màxima emissió, però les mostres de 10  $\mu\text{m}$  i 4% de NPs són amb les que s'aprecien millor les variacions de les senyals òptiques i, per tant, són la combinació òptima per aplicacions en biosensors. També ha estat possible determinar que el SU-8 no és una matriu polimèrica vàlida per a la fabricació de biosensors mitjançant les NPs estudiades en aquest treball, si s'utilitzen unes NPs que no absorbeixin a l'UV els resultats també podrien ser favorables.

Variacions de les emissions òptiques s'han detectat, a causa d'una funcionalització de la superfície d'aquests nanocompostos. Important mencionar que les variacions de les emissions s'han detectat per l'adhesió dels aptàmers i que per l'AFB1 s'ha apreciat una lleugera variació en aquesta senyal, s'esperava que aquesta interaccionés amb les emissions òptiques d'una forma més clara i provoqués un canvi important. Probablement, s'haurà d'incrementar la concentració d'AFB1 en solució per acabar obtenint una millor sensibilitat per aplicacions de biosensors. Noves propostes i investigacions en relació a aquest estudi es duran a terme pel grup de recerca FiCMA.

The optical emission produced by the  $\text{Ca}_8\text{NaBi}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2:\text{Eu}/\text{PDMS}$  nanocomposite has been optimised as a function of layer thickness and NPs concentration for optical sensing applications. In particular, 100  $\mu\text{m}$  and 4% NPs is the combination that provides maximum emission, but 10  $\mu\text{m}$  samples and 4% NPs are the ones with the best optical signal variations and therefore the optimal combination for biosensor applications. It has also been possible to determine that SU-8 is not a valid polymeric matrix for the fabrication of biosensors using the NPs studied in this work, if NPs that do not absorb UV are used, the results could also be favourable.

Variations of the optical emissions have been detected, due to a functionalisation of the surface of these nanocomposites. It is important to mention that the variations of the emissions have been detected by the adhesion of the aptamers and that AFB1 has shown a slight variation in this signal, which was expected to interact with the optical emissions in a clearer way and cause an important change. It is likely that the concentration of AFB1 in solution will have to be increased in order to obtain better sensitivity for biosensor applications. Further proposals and research in relation to this study will be carried out by the FiCMA research group.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Xin, Y.; Pandraud, G.; Otten, L.; Zhang, Y.; French, P. Surface Functionalization of SU-8 Vertical Waveguide for Biomedical Sensing: Bacteria Diagnosis; MDPI AG, 2018; p 1081. <https://doi.org/10.3390/proceedings2131081>.
- (2) Lu, Z.; Chen, X.; Wang, Y.; Zheng, X.; Li, C. M. Aptamer Based Fluorescence Recovery Assay for Aflatoxin B1 Using a Quencher System Composed of Quantum Dots and Graphene Oxide. *Microchimica Acta* **2015**, *182* (3–4), 571–578. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1360-0>.
- (3) Kumar, A.; Rajput, J. K. Polymer Nanocomposites - Materials for Sensor Technology. *Materials Science Forum* **2013**, *757*, 197–216. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.757.197>.
- (4) Zhang, Q.; Xu, J. J.; Liu, Y.; Chen, H. Y. In-Situ Synthesis of Poly(Dimethylsiloxane)-Gold Nanoparticles Composite Films and Its Application in Microfluidic Systems. *Lab on a Chip* **2008**, *8* (2), 352–357. <https://doi.org/10.1039/b716295m>.
- (5) Jang, L. W.; Lee, J.; Razu, M. E.; Jensen, E. C.; Kim, J. Fabrication of PDMS Nanocomposite Materials and Nanostructures for Biomedical Nanosystems. In *IEEE Transactions on Nanobioscience*; Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc., 2015; Vol. 14, pp 841–849. <https://doi.org/10.1109/TNB.2015.2509602>.
- (6) Zaman, Q.; Zia, K. M.; Zuber, M.; Mabkhot, Y. N.; Almalki, F.; Hadda, T. ben. A Comprehensive Review on Synthesis, Characterization, and Applications of Polydimethylsiloxane and Copolymers. *International Journal of Plastics Technology*. Springer December 1, 2019, pp 261–282. <https://doi.org/10.1007/s12588-019-09259-y>.
- (7) Xu, J.; Wong, C. P. High Dielectric Constant SU8 Composite Photoresist for Embedded Capacitors. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *103* (3), 1523–1528. <https://doi.org/10.1002/app.24957>.
- (8) Jiguet, S.; Judelewicz, M.; Mischler, S.; Hofmann, H.; Bertsch, A.; Renaud, P. SU-8 Nanocomposite Coatings with Improved Tribological Performance for MEMS. *Surface and Coatings Technology* **2006**, *201* (6), 2289–2295. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2006.03.041>.



- (9) Mohankumar, P.; Ajayan, J.; Mohanraj, T.; Yasodharan, R. Recent Developments in Biosensors for Healthcare and Biomedical Applications: A Review. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation* **2021**, *167*. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2020.108293>.
- (10) Bokov, D.; Turki Jalil, A.; Chupradit, S.; Suksatan, W.; Javed Ansari, M.; Shewael, I. H.; Valiev, G. H.; Kianfar, E. Nanomaterial by Sol-Gel Method: Synthesis and Application. *Advances in Materials Science and Engineering*. Hindawi Limited 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5102014>.
- (11) Tredwin, C. J.; Young, A. M.; Georgiou, G.; Shin, S. H.; Kim, H. W.; Knowles, J. C. Hydroxyapatite, Fluor-Hydroxyapatite and Fluorapatite Produced via the Sol-Gel Method. Optimisation, Characterisation and Rheology. In *Dental Materials*; 2013; Vol. 29, pp 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.11.008>.
- (12) Yamagata, C.; Elias, D. R.; Paiva, M. R. S.; Misso, A. M.; Castanho, S. R. H. M. Facile Preparation of Apatite-Type Lanthanum Silicate by a New Water-Based Sol-Gel Process. *Materials Research Bulletin* **2013**, *48* (6), 2227–2231. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2013.02.041>.
- (13) Maciel, G. S.; Rakov, N. Photon Conversion in Lanthanide-Doped Powder Phosphors: Concepts and Applications. *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry 2015, pp 17283–17295. <https://doi.org/10.1039/c4ra15804k>.
- (14) Slimi, S.; Loiko, P.; Volokitina, A.; Bogdanov, K.; Solé, R. M.; Aguiló, M.; Díaz, F.; Salem, E. ben; Mateos, X. Structure, Optical Properties and Preferential Site Substitution of Eu<sup>3+</sup> Activated Ca<sub>8</sub>NaBi(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>F<sub>2</sub> Red Emitting Phosphors Prepared by Modified Pechini Process. *Journal of Luminescence* **2022**, *241*. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2021.118523>.
- (15) Netto-Ferreira, J. C.; Heyne, B.; Scaiano, J. C. Photophysics and Photochemistry of Aflatoxins B1 and B 2. *Photochemical and Photobiological Sciences* **2011**, *10* (10), 1701–1708. <https://doi.org/10.1039/c1pp05103b>.
- (16) *SU-8 2000 Permanent Epoxy Negative Photoresist PROCESSING GUIDELINES FOR.*