

SEP

SES

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico de Tijuana
Centro de Graduados e Investigación en Química

Trabajo de Tesis

**“Sistemas fluorescentes basados en ensamblajes
nanoclusters metálicos-puntos cuánticos para la detección de
especies de interés biológico”**

Presentado por:
M.C. Ana Patricia Reyes Cruzaley

Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS EN QUÍMICA

Director de tesis:
Dra. Georgina Pina Luis

TIJUANA, B. C.

JULIO DE 2022

Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California, 29/marzo/2022

Oficio No. 203/CG/2022

Asunto: Se autoriza impresión de trabajo de tesis

GUADALUPE HERNÁNDEZ ESCOBEDO
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE

Los que suscriben tienen a bien informar que el manuscrito de tesis titulado “**Sistemas fluorescentes basados en ensamblajes nanoclusters metálicos-puntos cuánticos para la detección de especies de interés biológico**”, presentado por la **C. Ana Patricia Reyes Cruzaley**, (con número de control D09210782), cumple con los requisitos de calidad y formato para tesis de Doctorado en Ciencias en Química. Por consiguiente, se aprueba y autoriza al interesado para que proceda a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE



DRA. GEORGINA ESTHER PINA LUIS
Presidente



DR. ADRIÁN OCHOA TERÁN
Secretario del Jurado



DR. ANTONIO TIRADO GUIZAR
Vocal del Jurado



DRA. ROSA MARÍA FÉLIX NAVARRO
Vocal del Jurado



DR. GABRIEL ALONSO NUÑEZ
Vocal del Jurado

C.p. Oficina de Titulación
C.p. Expediente
C.p. Interesado
GEPL/AOT/RMFn/ATG/GAN



Calzada del Tecnológico S/N Esq. Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotzín, Fracc. Tomás Aquino
C.P.22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400 Est. 101
e-mail: dir_tijuana@tecnm.mx | tecnm.mx | Tijuana.tecnm.mx





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California,

27/mayo/2022

OFICIO No. 057/DEPI/2022

Asunto: Autorización de Impresión de Tesis

MARIA MAGDALENA SERRANO ORTEGA
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE

En lo referente al trabajo de tesis, "Sistemas fluorescentes basados en ensamblajes nanoclusters metálicos-puntos cuánticos para la detección de especies de interés biológico". Presentado por C. **Ana Patricia Reyes Cruzaley**, alumna del Doctorado en Ciencias en Química con número de control **D09210782**; informo a usted que a solicitud del comité de tutorial, tengo a bien **Autorizar la impresión de Tesis**, atendiendo las disposiciones de los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado del Tecnológico Nacional de México.

Sin más por el momento le envié un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
Excelencia en Educación Tecnológica



GUADALUPE HERNÁNDEZ ESCOBEDO
JEFE DE DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ccp. Archivo

GHE/lap



Calzada del Tecnológico S/N Esq. Castillo de Chapultepec y calle Cuauhtemotzin,
Fracc. Tomás Aquino C.P.22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400
Est. 101

e-mail: dir.tijuana@tecnm.mx | tecnm.mx | Tijuana.tecnm.mx



2022 Flores
Año de Magón
PRESENCIA EN LA REVOLUCIÓN MEXICANA



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TIJUANA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Tijuana, B. C. del 23 de mayo del 2022, la C. Ana Patricia Reyes Cruzaley del Programa de Doctorado en Ciencias en Química con número de control D09210782 manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección de la Dra. Georgina Pina Luis ceden los derechos del trabajo titulado **“Sistemas fluorescentes basados en ensamblajes nanoclusters metálicos-puntos cuánticos para la detección de especies de interés biológico”** al Tecnológico Nacional de México / IT Tijuana para su difusión con fines académicos y de Investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, figuras, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo electrónico: ana.reyes@tectijuana.edu.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y cita la fuente del mismo.

Ana Patricia Reyes C.

Ana Patricia Reyes Cruzaley

CONTENIDO

Carta de liberación de tesis	i
Carta de autorización de impresión emitida por la DEPI	ii
Carta de cesión de derechos	iii
Contenido	iv
Lista de Abreviaturas y símbolos	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tablas	vi
Reconocimientos institucionales	vii
Vita, publicaciones y áreas de estudios	viii
Resumen	ix
Hoja de publicaciones producto de la tesis	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	3
III. ANTECEDENTES	5
3.1 Nanopartículas metálicas	5
3.2 Propiedades de los Nanoclusters metálicos.....	7
3.3 Síntesis de Nanoclusters metálicos.....	11
3.4 Puntos cuánticos y propiedades ópticas.....	15
3.5 Puntos cuánticos de carbono y propiedades ópticas	20
3.6 Aplicaciones de los NCs fluorescentes.....	21
3.6.1 Sensores fluorescentes de pH	23
3.6.2 Sensores fluorescentes de colesterol	26
3.6.3 Sensores fluorescentes de ácido fólico.....	28

3.7	Fenómeno de transferencia de energía resonante de Förster (FRET)	30
3.8	Hipótesis.....	34
IV.	EXPERIMENTAL	35
4.1	Equipos:	35
4.2	Reactivos:.....	35
4.3	Etapas experimentales.....	36
4.4	Síntesis de QDs de CdTe.....	36
4.5	Síntesis de NCs recubiertos con BSA	36
4.6	Síntesis de nanoclusters de Ag con PEI.....	37
4.7	Síntesis de nanoclusters de Cu con PEI.....	37
4.8	Síntesis de puntos cuánticos de carbono con PEI.....	37
4.9	Síntesis de NCs recubiertos con β -ciclodextrina	38
4.10	Síntesis de QDs de CdS	38
4.11	Caracterización de los nanomateriales.....	38
4.12	Reconocimiento de analitos y pruebas analíticas.....	39
4.13	Estudios de pH.....	40
4.14	Estudios Electroquímicos	40
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
5.1.	Síntesis y caracterización de QDs de CdTe.....	41
5.2.	Síntesis y caracterización de NCs recubiertos con BSA	46
5.3.	Síntesis y caracterización de los NCs recubiertos con PEI	52
5.3.2	Estabilidad de los NCs de Ag	58
5.4.	NCs metálicos como sensores de pH.....	68
5.5.	Estudios electroquímicos de NCs Ag-PEI	73
5.6.	Aplicación en muestras reales del sensor de pH con NCs Ag-PEI	78
5.7.	Respuesta de los NCs de Ag frente a iones metálicos.....	82
5.8.	NCs de Cu como sensores de metales	86
5.9.	Estudio de los tiempos de vida de los NCs de Cu	96

5.10.	Caracterización electroquímica de NCs de Cu	97
5.11.	NCs metálicos como sensores de ácido fólico	99
5.12.	Mecanismo de abatimiento de los NCs frente al AF	102
5.13.	Ensamblajes FRET NCs-NCs y QDs-NCs.....	103
5.14.	Estudio de los tiempos de vida de los ensamblajes FRET	114
5.15.	Respuesta de ensamblaje FRET frente a la creatina	115
5.16.	Síntesis y caracterización de CDs con PEI	119
5.17.	Síntesis y caracterización de QDs de CdS-AMP	122
5.18.	Síntesis y caracterización de NCs recubiertos con β -CDx	123
VI.	CONCLUSIONES.....	126
VII.	REFERENCIAS.....	130
VIII.	ANEXOS.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	Absorbancia
AA	Ácido ascórbico
AF	Ácido fólico
AMP	Ácido 3-mercaptopropiónico
BSA	Albúmina de suero bovino
CA	Cisteamina
CEW	Clara de huevo
DLS	Dispersión de luz dinámica
EDS	Espectroscopía de energía dispersiva
E_{Fermi}	Energía de Fermi
E_g	Energía del band gap
FRET	Transferencia de energía resonante de Förster
GHS	Glutación
ICP	Plasma de acoplamiento inductivo
IF	Intensidad de fluorescencia
IR	Infrarrojo
J	Integral de solapamiento
K	Constante de enlace
KSV	Constante de Stern-Volmer
LMCT	Transferencia de carga del ligando al metal
M	Molar
mM	miliMolar
mV	miliVolts
Mw	Peso molecular del polímero
N	Número de átomos
NCs	Nanoclusters
nm	Nanómetro
nM	nanoMolar
NP	Nanopartícula
NSET	Transferencia de energía en la superficie del nanomaterial

PAMAM	Poliamidoamina
PEI	Polietilenimina
PET	Transferencia electrónica fotoinducida
pH	Potencial de Hidrógeno
pHe	pH extracelular
pHi	pH intracelular
pZ	Potencial Z
QDs	Puntos cuánticos
r	Distancia entre donador y aceptor de energía
R ₀	Distancia de Förster
R6G	Rodamina 6G
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
UV	Ultravioleta
XPS	Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X
β-CDx	β-ciclodextrina
ε	Coeficiente de absortividad molar
λ _{em}	Longitud de onda de emisión
λ _{ex}	Longitud de onda de excitación
μg	Microgramo
τ	Tiempo de vida
φF	Rendimiento cuántico

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Vaso de Lycurgus, vista con a) luz transmitida y b) luz reflejada. 5
- Figura 2.** Efecto del tamaño en los niveles de energía de metales, nanopartículas y nanoclusters. 7
- Figura 3.** A) Espectros de excitación (línea punteada) y emisión (línea sólida) de NCs de Au de tamaños diferentes. Au₅ (morado), Au₈ (azul) Au₁₃ (verde), Au₂₃ (rojo) y Au₃₁ (rosa). B) Solución de los 3 NCs más pequeños bajo luz UV (366 nm).¹⁰ 8
- Figura 4.** a) Correlación de la masa abundante obtenida por espectrometría de masas y la intensidad de fluorescencia máxima. b) Correlación del número de átomos N por NC con la energía de emisión.¹⁰ 9
- Figura 5.** a) Espectros de fluorescencia de los NCs de Au-Ag preparados con 0, 1, 2, 5 y 10 mM de Ag⁺ manteniendo la concentración de Au³⁺ a 5 mM. b) Cambio de la posición del pico de fluorescencia incrementando la concentración de Ag⁺.¹¹ 10
- Figura 6.** Síntesis de nanoestructuras “top-down” y “bottom-up”. 11
- Figura 7.** Reactor hidrotermal. 1) Capa de acero inoxidable, 2) solvente, 3) taza de teflón, 4) tapa de acero inoxidable y 5) disco de ruptura 13
- Figura 8.** Caracterización de los nanoclusters de Pt. a) Imagen por microscopia electrónica. b) Espectro XPS.⁶ 14
- Figura 9.** Efecto del ligando en la emisión de fluorescencia de NCs metálicos.⁵ 14
- Figura 10.** Estructura del PEI a) lineal y b) ramificado. 15
- Figura 11.** Bandas de energía de los puntos cuánticos y moléculas aisladas. ... 17
- Figura 12.** Confinamiento cuántico, (a) Fotografía bajo luz UV, de QDs de CdSe/ZnS al incrementar el tamaño (izquierda a derecha). (b) Cambios cualitativos en las energías de las bandas “gap” (E_g) de los QDs y en la densidad de los estados para QDs de CdSe. c) Intervalos de emisión aproximados.¹⁷ 18

Figura 13. Caracterización de los puntos cuánticos de carbono. a) Microscopía de fuerza atómica, b) tamaño promedio y c) separación de las tres fracciones acuosas. ²¹	20
Figura 14. Espectros de emisión de CDs a diferentes longitudes de onda de excitación desde 315 a 380 nm. ²²	21
Figura 15. Esquema del nanosensor de mangiferina. ²⁸	22
Figura 16. Esquema del biosensor fluorométrico de Caspasa 3 basado en NCs de Au. ²⁹	23
Figura 17. Intensidad de fluorescencia de CEW@CuNCs a valores de pH diferentes de 6.14-12.08 y b) estudios de reversibilidad. ³⁴	26
Figura 18. Esquema de la detección de colesterol por medio de la interacción competitiva anfitrión-huésped de β -CD y R6G. ³⁷	28
Figura 19. Estructura del ácido fólico.	29
Figura 20. a) Esquema del reconocimiento de AF utilizando QDs CdTe/CA. ⁴⁰ ..	30
Figura 21. Condiciones de traslape para llevar a cabo el fenómeno FRET.	31
Figura 22. Esquema de los orbitales moleculares para la transferencia de energía resonante.....	31
Figura 23. Espectros de emisión de los CDs con adiciones sucesivas de NCs Au (0-600 μ g/mL). b) Soluciones de CDs con NCs Au bajo luz ultravioleta. ⁴³	33
Figura 24. Espectros de absorción y fluorescencia de QDs-CdTe con AMP (a y b) GSH (c y d) y CA (e y f).	42
Figura 25. Fotografías bajo luz UV de QDs de CdTe con a) AMP, b) GSH y c) CA.	43
Figura 26. Estructuras de a) cisteamina b) ácido mercaptopropiónico y c) glutatión.....	45
Figura 27. Espectros de FTIR para QDs de CdTe con AMP, GHS y CA.	45
Figura 28. Esquema de la formación de NCs de Au-BSA.	46
Figura 29. a) Espectros UV-visible y de fluorescencia molecular de NCs de Au-BSA, b) NCs de Au bajo luz visible y luz UV.	47
Figura 30. Distribución de tamaños por DLS de NCs Au-BSA.....	48

Figura 31. Micrografía TEM y distribución de tamaños de NCs Au-BSA.	48
Figura 32. Espectro EDS de NCs Au-BSA.....	49
Figura 33. Potencial Z de los NCs de Au-BSA a valores de pH diferentes.	50
Figura 34. Espectros UV-visible y de Fluorescencia molecular de NCs de Cu-BSA	51
Figura 35. Distribución de tamaños por DLS de NCs de Cu-BSA.....	51
Figura 36. Esquema de la formación de los NCs de Ag con PEI.	52
Figura 37. Espectros de absorción de los NCs de Ag.....	53
Figura 38. Espectros de fluorescencia molecular emisión de los NCs Ag con PEI a un slit de 5 nm.....	55
Figura 39. Distribución de tamaños por DLS de a) 1 Ag y b) 4 Ag.....	55
Figura 40. Espectro de FTIR de 2 Ag	56
Figura 41. Micrografías TEM y distribución de tamaños de 2 Ag	57
Figura 42. Distribución de tamaños por DLS de NCs Ag-PEI después de un tiempo de almacenamiento.	58
Figura 43. a) Espectros de emisión del efecto del tiempo en la fluorescencia y b) fotografías bajo luz visible de NCs Ag-PEI.	59
Figura 44. a) Espectros de Fluorescencia molecular de 12 Ag y 13 Ag (slit de 10 nm). b) Imágenes bajo luz visible y luz UV de los NCs.	60
Figura 45. Esquema de la formación de los NCs de Cu con PEI.....	61
Figura 46. Espectros de absorción de los NCs de Cu.	62
Figura 47. a) Espectros de UV-visible, b) fluorescencia molecular y c) fotografías bajo luz visible y UV de 2 Cu	63
Figura 48. Espectro de FTIR para 2 Cu	63
Figura 49. Distribución de tamaños por DLS de 2 Cu	64
Figura 50. Micrografías TEM y distribución de tamaños de 2 Cu	65
Figura 51. Análisis Termogravimétrico de los NCs recubiertos con PEI	65
Figura 52. Estudios de fotoestabilidad de los NCs recubiertos con PEI	67
Figura 53. Efecto del pH en la fluorescencia de NCs Ag-PEI.	68
Figura 54. Efecto del pH en la fluorescencia de NCs Cu-PEI.....	68
Figura 55. Estudios de reversibilidad para a) NCs Ag-PEI y b) NCs Cu-PEI.	69

Figura 56. Mecanismo de transferencia electrónica en los NCs recubiertos con PEI variando el pH	70
Figura 57. Potencial Z de a) NCs Ag-PEI y b) NCs Cu-PEI a diferentes valores de pH.	71
Figura 58. Distribución de tamaños de NCs Ag-PEI variando el pH de 3 a 11...73	
Figura 59. Voltamperometrías cíclicas a 100 mVs ⁻¹ de soluciones acuosas de PEI a valores de pH diferentes con burbujeo de N ₂	74
Figura 60. Voltamperometrías cíclicas a 100 mVs ⁻¹ de soluciones acuosas de NCs Ag-PEI a valores de pH diferentes con burbujeo de N ₂	75
Figura 61. Voltamperometrías cíclicas a 100 mVs ⁻¹ de soluciones acuosas de a) Ag ⁺ y PEI b) NCs Ag a pH 3 en el reactor fotoquímico con burbujeo de N ₂	76
Figura 62. Voltamperometrías cíclicas a 100 mVs ⁻¹ de soluciones acuosas de AgNPs a valores de pH diferentes con burbujeo de N ₂	77
Figura 63. Experimentos por triplicado de hidrogeles de agarosa con NCs Ag a valores de pH diferentes bajo lámpara UV.	79
Figura 64. Hidrogeles de agarosa con NCs Ag a valores de pH.	79
Figura 65. Emisión de los NCs Ag-PEI por microscopia de fluorescencia de los pétalos de rosa x alba con cada canal en a) pH 3, b) pH 11 y c) acercamiento en pH 11.....	80
Figura 66. Fotografía de <i>Rosa x alba</i> , pétalos utilizados en los estudios de microscopia de fluorescencia.	80
Figura 67. Emisión de los NCs de Ag por microscopia de fluorescencia. Pétalos sumergidos en solución de NCs a) pH 3, b) pH 11 y sin NCs como control.	81
Figura 68. Estudios de abatimiento de fluorescencia de NCs Ag-PEI en medio ácido frente a iones a) Fe ³⁺ y a) Cu ²⁺	82
Figura 69. Estudios de abatimiento de fluorescencia de NCs Ag en medio neutro frente a iones a) Fe ³⁺ y a) Cu ²⁺	83
Figura 70. Estudios de selectividad de NCs de Ag a pH 3 y 7 a una concentración de metal de 1.5x10 ⁻⁴ M.	84

Figura 71. Estudios de selectividad de NCs Ag-PEI a pH 3 y 7 a una concentración de metal de 50 μM (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Li^+ , Na^+ , K^+ y Cd^{2+}) y 15 μM (Fe^{3+} y Cu^{2+}).....	85
Figura 72. a) Titulación de NCs de Cu frente a iones Cu^{2+} en Fluorescencia molecular, b) curva de Stern-Volmer, c) titulación por UV-visible y c) curva de de calibración de 0-0.44 μM	88
Figura 73. Titulación de NCs de Cu frente a iones Co^{2+} a) por Fluorescencia molecular, b) curva de Stern-Volmer, c) titulación por UV-visible y d) curva de de calibración de 0-0.26 μM	89
Figura 74. Excitación-relajación de un electrón en orbital <i>d</i> , liberando energía en forma de luz.	90
Figura 75. Separación de orbitales <i>d</i> degenerados en dos estados no degenerados en un cristal octaédrico.....	91
Figura 76. Titulación de NCs de Cu frente a iones Fe^{2+} a) por Fluorescencia molecular, b) curva de Stern-Volmer, c) titulación por UV-visible y d) curva de de calibración de 0-1.7 μM	93
Figura 77. Titulación de NCs de Cu frente a iones Ni^{2+} a) por Fluorescencia molecular, b) curva de Stern-Volmer, c) titulación por UV-visible y d) curva de de calibración de 0-0.12 μM	94
Figura 78. Estudios de selectividad de NCs Cu con PEI en medio neutro a una concentración de metal de 0.20 μM	95
Figura 79. Decaimiento del tiempo de vida de fluorescencia de NCs Cu en ausencia y presencia de 0.20 μM de iones a) Fe^{2+} y b) Cu^{2+}	97
Figura 80. Voltamperometrías cíclicas a 100 mVs^{-1} de soluciones acuosas de CuNCs a valores de pH diferentes con burbujeo de N_2	98
Figura 81. Voltamperometrías cíclicas a 100 mVs^{-1} de soluciones acuosas de NPs Cu a valores de pH diferentes con burbujeo de N_2	99
Figura 82. Estructura del ácido fólico.	99
Figura 83. Espectros de fluorescencia y curvas de abatimiento de NCs de a) Cu-PEI y b) Ag-PEI en buffer PBS pH = 7.4.....	100

Figura 84. Curvas de Stern-Volmer modificadas contra el inverso de la concentración de AF de PEI-Ag en buffer PBS pH = 7.4.	103
Figura 85. Estudios de potencial Z de QDs y NCs a valores diferentes de pH.	104
Figura 86. Ensamble NCsPEI-Cu@NCsBSA-Au a) Traslape de espectros b) Modelo FRET, c) Titulación de NCs PEI-Cu con NCs BSA-Au d) Gráfico IF normalizada frente a adiciones NCs BSA-Au.....	107
Figura 87. Ensamble NCsPEI-Ag@CdTe-AMP a) Traslape de espectros b) Modelo FRET, c) Titulación de NCs PEI-Ag con CdTe-AMP d) Gráfico IF normalizada frente a adiciones de QDs.....	108
Figura 88. Ensamble NCsPEI-Cu@CdTe-GHS60m a) Traslape de espectros b) Modelo FRET, c) Titulación de NCs PEI-Ag con CdTe-GHS d) Gráfico IF normalizada frente a adiciones de QDs.....	110
Figura 89. Ensamble NCsPEI-Cu@CdTe-AMP15m a) Traslape de espectros b) Modelo FRET, c) Titulación de NCs PEI-Cu con CdTe-AMP d) Gráfico IF normalizada frente a adiciones de QDs.....	111
Figura 90. Ensamble NCsPEI-Cu@CdTe-AMP30m a) Traslape de espectros b) Modelo FRET, c) Titulación de NCs PEI-Cu con CdTe-AMP d) Gráfico IF normalizada frente a adiciones de QDs.....	112
Figura 91. Curvas de Stern-Volmer modificadas contra el inverso de la concentración de QD en buffer PBS pH = 7.4 a) NCsPEI- Cu@CdTe-AMP15m y b) NCsPEI-Cu@CdTe-AMP 30m.....	113
Figura 92. Decaimiento de la fluorescencia del ensamble NCsPEI-Cu@CdTe-AMP30m a una longitud de onda de excitación de 370 nm.....	115
Figura 93. Diseño del sensor NCsPEI-Cu@CdTe-AMP para la identificación de creatina.	116
Figura 94. Espectros de emisión de NCsPEI-Cu@CdTe-AMP30min con diferentes concentraciones de creatina ($\lambda_{exc}= 370$ nm).....	116
Figura 95. Estructura de L-arginina	117
Figura 96. Espectros de emisión de NCsPEI-Cu@CdTe-AMP con diferentes concentraciones de arginina ($\lambda_{exc}= 370$ nm).	118

Figura 97. a) Fotografía de la extracción de clorofila de hojas de maíz y b) CDs bajo luz UV.	119
Figura 98. Espectros de UV-visible y fluorescencia a longitudes de onda de excitación diferentes de CDs.	120
Figura 99. Potencial Z de CDs variando el pH del medio.	120
Figura 100. Estructuras de aminoácidos cargados positivamente.	121
Figura 101. Titulación de CDs con adiciones sucesivas de a) arginina e b) histidina.	121
Figura 102. Espectros de UV-visible y fluorescencia molecular de los QDs de CdS.	122
Figura 103. Esquema de la formación de NCs con β -CDx.....	123
Figura 104. Espectro UV-visible y Fluorescencia de los NCs de Au con β -CDx.	124
Figura 105. Espectro UV-visible y Fluorescencia de los NCs de Ag con β -CDx	125
Figura 106. Distribución de tamaños por DLS de NCs con β -CDx.....	125

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades ópticas de los QDs de CdTe.....	43
Tabla 2. Parámetros de reacción para la síntesis de NCs de Ag con PEI (Mw = 10 000)	52
Tabla 3. Parámetros de reacción para la síntesis de NCs de Ag con PEI (Mw= 800)	58
Tabla 4. Parámetros de reacción para la síntesis de NCs de Cu	60
Tabla 5. Datos para calcular los rendimientos cuánticos de NCs Ag y Cu	65
Tabla 6. Comparación de sensores de pH fluorescentes reportados en la literatura.....	71
Tabla 7. Determinación de pH en muestras reales con los NCs de Ag.....	77
Tabla 8. Parámetros analíticos calculados de las titulaciones con NCs de Cu.....	95
Tabla 9. Diferencia en la cantidad de átomos teóricos de los NCs con PEI en presencia de ácido fólico	100
Tabla 10. Variación del diámetro hidrodinámico a diferentes concentraciones de AF.....	101
Tabla 11. Parámetros del sistema FRET NCsPEI-Cu@QDsCdTeAMP.....	113

RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se desarrolló en los laboratorios del Centro de Graduados e Investigación del Instituto Tecnológico de Tijuana, bajo la dirección de la Dra. Georgina Pina Luis.

Se agradece el apoyo brindado por el CONACyT para la realización de estudios de postgrado (No. 328832) y el desarrollo de esta investigación a través del proyecto No. 5238.19-P.

Asimismo, el suscrito agradece al Instituto Tecnológico de Tijuana por el apoyo brindado para la realización de estos estudios.

VITA

Abril 26, 1991	Nacida en Guadalajara, Jalisco.
2014	Licenciatura en Ingeniería en Nanotecnología, Instituto Tecnológico de Tijuana
2014-2016	Becaria CONACyT
2016	Maestría en Ciencias. Química. Instituto Tecnológico de Tijuana
2017-2021	Becaria CONACyT
2022	Doctorado en Ciencias. Química. Instituto Tecnológico de Tijuana

PUBLICACIONES

1. Reynoso-Soto, E. A.; Pérez-Sicairos, S.; Reyes-Cruzaley, A. P.; Castro-Riquelme, C. L.; Félix-Navarro, R. M.; Paraguay-Delgado, F.; Alonso-Núñez, G.; Lin-Ho, S. W. Photocatalytic Degradation of Nitrobenzene Using Nanocrystalline TiO₂ Photocatalyst Doped with Zn Ions, *J. Mex. Chem. Soc.* **2013**, *57(4)*, 298-305.
2. Reyes-Cruzaley, A. P.; Silva-Carrillo, C.; Félix-Navarro, R. M.; Trujillo-Navarrete, B.; Zapata-Fernández, J. R.; Romo-Herrera, J. M.; Contreras, O. E.; Reynoso-Soto, E. A. Synthesis of novel Pd NP-PTH-CNTs hybrid material as catalyst for H₂O₂ generation”, *Electrochimica Acta*, **2019**, *296*, 575-581.
3. Ramírez-Herrera, D. E.; Reyes-Cruzaley, A. P.; Dominguez, G.; Paraguay-Delgado, F.; Tirado-Guizar, A.; Pina-Luis, G. CdTe Quantum Dots Modified

with Cysteamine: A New Efficient Nanosensor for the Determination of Folic Acid, *Sensor*, **2019**, *19*, 4548.

4. Reyes-Cruzaley, A. P.; Ochoa-Terán A.; Tirado-Guizar, A.; Félix-Navarro, R. M.; Alonso-Núñez, G.; Pina-Luis, G. A fluorescent PET probe based on polyethyleneimine-Ag nanoclusters as a reversible, stable and selective broad-range pH sensor, *Analytical Methods*, **2021**, *13*, 2495-2503.

ÁREAS DE ESTUDIO

Área principal: Nanosensores ópticos

Síntesis y caracterización de nanomateriales para su aplicación en el desarrollo de sensores químicos.

RESUMEN

“Sistemas fluorescentes basados en ensamblajes nanoclusters metálicos-puntos cuánticos para la detección de especies de interés biológico”

Por

Ana Patricia Reyes Cruzaley

Doctora en Ciencias en Química

Instituto Tecnológico de Tijuana, 2022

Dra. Georgina Pina Luis

Directora de Tesis

Los nanoclusters (NCs) metálicos son una clase de nanopartículas nuevas con propiedades ópticas atractivas debido a su tamaño menor a 5 nm. Cuando el tamaño de la partícula es reducido, se generan bandas de energía nuevas, similar a los niveles de energía de moléculas orgánicas, esto produce propiedades nuevas como la fluorescencia y una fotoestabilidad buena. Debido a estas propiedades y su toxicidad baja, los NCs metálicos han llamado la atención para su aplicación como nanosensores ópticos. En este trabajo se sintetizaron NCs de Cu y Ag funcionalizados con polietilenimina (PEI), estos nanomateriales mostraron una intensidad de fluorescencia alta, así como estabilidad buena. Estos NCs

mostraron una respuesta lineal en la intensidad de fluorescencia con el pH (3-11), además de una sensibilidad y reversibilidad buena. El mecanismo de abatimiento propuesto es por medio de una transferencia electrónica fotoinducida (PET) que se comprueba por medio de estudios electroquímicos. El sensor de NCs de Ag fue aplicado en estudios de muestras reales, así como en detecciones visuales utilizando geles de agarosa y por microscopia de fluorescencia, confirmando que el nanosensor tiene potencial para su aplicación en imagen celular. Además, los NCs de Cu presentaron un abatimiento lineal en su intensidad de fluorescencia frente a los iones Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Fe^{2+} , con límites de detección de hasta 5.81 nM. Además, mostraron un cambio de coloración que se midió por medio de UV-visible, esto los hace candidatos para utilizarse como nanosensores ópticos de iones metálicos.

Por otro lado, el desarrollo de nanosensores basados en la transferencia de energía resonante de Förster (FRET) permite obtener sensores con respuesta más sensible y específica. Por ello, se sintetizaron nanomateriales con recubrimientos y propiedades ópticas diferentes como NCs de Au recubiertos con BSA, puntos cuánticos de carbono y de CdTe funcionalizados con glutatión, ácido mercaptopropiónico y cisteamina. Se calcularon los parámetros del proceso FRET, se realizaron estudios de tiempos de vida y se aplicaron en la detección de creatina y arginina.

ABSTRACT

“Fluorescent systems based on metallic nanocluster-quantum dot assemblies for the detection of species of biological interest”

By

Ana Patricia Reyes Cruzaley

Dr. Sc. Chemistry

Instituto Tecnológico de Tijuana, 2022

Dra. Georgina Pina Luis

Thesis director

Metallic nanoclusters (NCs) are a class of new nanoparticles with attractive optical properties due to their size less than 5 nm. When the particle size is reduced, new energy bands are generated, like the energy levels of organic molecules, and new properties such as fluorescence and photostability are produced. Metallic NCs have attracted attention for their application as optical nanosensors due to these properties and their low toxicity. In this work, Cu and Ag functionalized NCs were synthesized with polyethyleneimine (PEI), these nanomaterials showed a high fluorescence intensity as well as good stability. These NCs showed a linear response in fluorescence intensity with pH (3-11), in addition to good sensitivity and reversibility. The proposed abatement mechanism is through a photoinduced electron transfer (PET) that is verified by electrochemical studies. The Ag NCs sensor was applied in studies of real samples

as well as in visual detections using agarose gels and by fluorescence microscopy, confirming that the nanosensor has potential for its application in cell imaging. In addition, the Cu NCs showed a linear decrease in their fluorescence intensity for Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} and Fe^{2+} ions with detection limits of up to 5.81 nM. The development of new efficient FRET systems based on metallic NCs and other nanoparticles, makes it possible to obtain sensors with improved analytical characteristics for their application in different fields. For this purpose, nanoparticles with different coatings were synthesized, which present varied optical properties. Au NCs coated with BSA, carbon and CdTe quantum dots coated with glutathione, cysteamine and mercaptopropionic acid were obtained. Different FRET pairs between these nanoparticles were studied and the corresponding FRET parameters were determined. Studies on the lifetimes of these nanomaterials were also carried out. The results were applied in the design and obtaining of new nanosensors for the determination of creatinine and arginine.

PUBLICACIONES PRODUCTO DE LA TESIS

1. Ramírez-Herrera, D. E.; Reyes-Cruzaley, A. P.; Dominguez, G.; Paraguay-Delgado, F.; Tirado-Guizar, A.; Pina-Luis, G. CdTe Quantum Dots Modified with Cysteamine: A New Efficient Nanosensor for the Determination of Folic Acid, *Sensor*, **2019**, *19*, 4548.
2. Reyes-Cruzaley, A. P.; Ochoa-Terán A.; Tirado-Guizar, A.; Félix-Navarro, R. M.; Alonso-Núñez, G.; Pina-Luis, G. A fluorescent PET probe based on polyethyleneimine-Ag nanoclusters as a reversible, stable and selective broad-range pH sensor, *Analytical Methods*, **2021**, *13*, 2495-2503.

I. INTRODUCCIÓN

En medicina el diagnóstico clínico es el procedimiento por el cual se identifica una enfermedad, síndrome o cualquier estado de salud. En términos de la práctica médica, el diagnóstico es un juicio clínico sobre el estado psicofísico de una persona. En algunas enfermedades el diagnóstico puede llevarse a cabo solamente con la constatación de los síntomas del paciente, pero para otras es necesario de pruebas más complejas. En estos casos, los sensores que se utilizan en los análisis químicos juegan un papel clave, debido a la respuesta inmediata que proporcionan estos dispositivos, por ello se han reportado investigaciones que involucran el desarrollo de sensores con aplicación en áreas diversas.

Los sensores ópticos que se basan en el fenómeno de fluorescencia tienen la ventaja de diseñar sistemas sensibles y selectivos. Además, el mecanismo de transferencia de energía resonante de Förster (FRET) es una herramienta espectroscópica útil para proporcionar información sobre los mecanismos de interacción entre el analito y la zona de reconocimiento del sensor, lo cual ayuda a mejorar el diseño de los sistemas de detección actuales.

Los materiales que han llamado la atención en los últimos años son los “nanoclusters” metálicos (NCs por sus siglas en inglés) o nanocúmulos fluorescentes. Estas son nanopartículas muy pequeñas cuyos diámetros son menores a 5 nm. En estas dimensiones, la estructura de sus bandas energéticas se separa en niveles discretos, debido a que en ese momento tanto el tamaño como el número de átomos comienza a ser limitado, lo que genera sus propiedades ópticas inusuales, como emisión de fluorescencia intensa que no se presenta en las nanopartículas con plasmón superficial.¹⁻³

Los NCs son preparados a través de dos estrategias comúnmente utilizadas para la síntesis de nanomateriales, llamados “bottom-up” y “top-down”. En el primer enfoque los iones metálicos son reducidos hasta llegar a la formación de los pequeños aglomerados por medio de la nucleación de unos cuantos átomos que

son estabilizados con ligandos diferentes, tales como moléculas tioladas pequeñas, oligonucleótidos, ADN, dendrímeros, polímeros y proteínas.⁴ Por otro lado, el segundo método se basa en el uso de nanopartículas que luego son transformadas en partículas más pequeñas por métodos químicos, comúnmente se utiliza el ácido 3-mercaptopropiónico.⁵

Los metales utilizados para la obtención de estos nanomateriales generalmente son Au y Ag debido a su estabilidad química y metodología de síntesis sencilla, sin embargo, hay pocos reportes sobre el uso de sistemas a base de otros metales como Cu y Pt. Una de las ventajas de utilizar Cu es que se disminuye el costo del nanomaterial, aunque los rendimientos cuánticos son menores del 16 %. En cambio, recientemente se ha reportado el uso de NCs de Pt con un rendimiento cuántico del 28 %. Otra estrategia en etapa de desarrollo es el uso de NCs bimetalicos, presentando interés por las propiedades que no se observan en sistemas monometálicos, debido al sinergismo que se produce al incorporar un segundo metal en la estructura del material.⁶⁻⁷

Los NCs metálicos además de presentar fotoestabilidad buena y desplazamientos de Stokes grandes, presentan toxicidad baja, a diferencia de los semiconductores cristalinos y los colorantes orgánicos convencionales. Gracias a estas características de los NCs, existe el interés por desarrollar un tipo nuevo de sensores biocompatibles, así como sistemas de diagnóstico de imagen para la detección de varios analitos como aminoácidos, flavonoides, ácido fólico y colesterol. Además, si estos nanomateriales trabajan en conjunto con otras especies fluorescentes como los puntos cuánticos de semiconductores nanocristalinos (QDs), se pueden obtener sistemas más específicos y sensibles. Por ello, en este proyecto se plantea el desarrollo de nanoclusters fluorescentes de metales diferentes con rendimientos cuánticos óptimos para su aplicación en el reconocimiento de especies de interés biológico. Este trabajo se encuentra en el área de nanomateriales fotoluminiscentes.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Un área de investigación de gran interés por su impacto biológico y ambiental es la detección de analitos utilizando sensores fluorescentes, que tienen la ventaja de ser altamente sensibles y selectivos.

Los NCs metálicos presentan toxicidad baja e involucran metodologías de síntesis sencillas a diferencia de los colorantes orgánicos fluorescentes. Por ello, debido al reciente descubrimiento de estos nanomateriales es necesaria la investigación en la obtención de diferentes NCs con propiedades ópticas mejoradas, así como su evaluación en el reconocimiento de especies de interés.

2.1 Objetivo general

Diseñar nanosensores ópticos de diferentes tipos de nanoclusters metálicos y/o puntos cuánticos para su aplicación en la detección de especies de interés biológico y ambiental.

2.2 Objetivos Particulares

1. Sintetizar puntos cuánticos de CdTe con ligandos estabilizantes diferentes.
2. Sintetizar nanoclusters metálicos fluorescentes con ligandos estabilizantes diferentes.
3. Caracterizar los nanomateriales por las técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopia de energía dispersiva (EDS), potencial Z, dispersión de luz dinámica (DLS), espectroscopía de UV-visible y fluorescencia molecular.
4. Determinar el potencial Z de los QDs y NCs.
5. Relacionar el potencial Z con las propiedades ópticas de los nanomateriales para su aplicación como nanosensores.
6. Estudiar el reconocimiento de especies de interés con los NCs metálicos.
7. Estudiar las propiedades ópticas de los NCs metálicos a valores de pH diferentes.

8. Estudiar el proceso de transferencia de energía resonante de Förster (FRET) entre los nanoclusters y los puntos cuánticos.
9. Determinar los parámetros que caracterizan el proceso FRET tales como eficiencia (E), distancia de Förster (R_0), distancia donador-aceptor (r).
10. Determinar las características analíticas de los nanosensores desarrollados como el límite de detección, intervalo dinámico y sensibilidad. Realizar estudios de interferencias y ensayos de competitividad.

III. ANTECEDENTES

3.1 Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas son sistemas que poseen sus tres dimensiones a una escala menor de 100 nm.⁸ Estos materiales representan una transición entre las moléculas y un material en bulto, ya que al estar en estas dimensiones se modifican sus propiedades que finalmente difieren del mismo material en orden micrométrico o en bulto.

En el caso de las nanopartículas metálicas, éstas poseen propiedades con aplicaciones en diversas áreas tecnológicas. Respecto a sus primeros usos se puede citar a la cultura egipcia que empleaba nanopartículas de oro como coloides medicinales para conservar la juventud y buena salud, por otro lado, la civilización china que además de utilizarlas para fines curativos también las empleaban como colorantes inorgánicos en porcelanas. Un caso de gran interés es el vaso de Lycurgus, creado por los romanos en el siglo IV DC. Este vaso se encuentra en exhibición en el Museo Británico con una característica muy interesante: su color es verde si la luz con la que se observa es reflejada y cambia a rojo si la luz es transmitida a través de él (Figura 1). El análisis del recipiente muestra que está compuesto de una matriz de vidrio con nanopartículas metálicas alrededor de 70 nm de oro y plata, en una relación molar de 14:1 respectivamente, las cuales son las responsables del fenómeno óptico.⁹

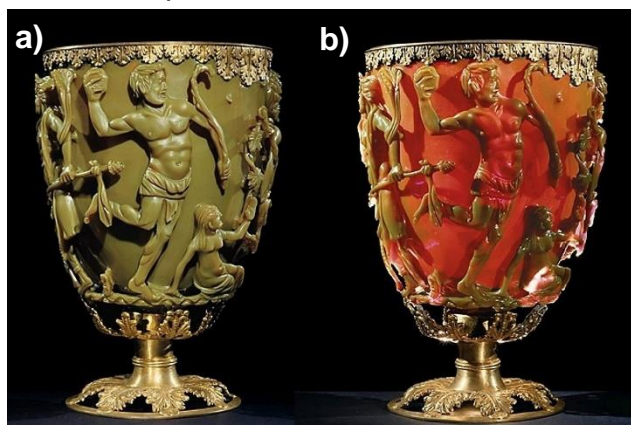


Figura 1. Vaso de Lycurgus, vista con a) luz transmitida y b) luz reflejada.

Las propiedades de los metales en bulto se tienen que mencionar para entender los fenómenos ópticos de las nanopartículas metálicas. Los metales se caracterizan por ser conductores eléctricos y reflectores ópticos debido al movimiento libre de los electrones deslocalizados en la banda de valencia y la banda de conducción. Sin embargo, cuando se reducen las dimensiones del metal a la nanoescala se encuentran diferentes dominios o propiedades más dependientes del tamaño.

En el caso de las nanopartículas metálicas cuyas dimensiones son comparables o menores que el recorrido libre medio del electrón (~20 nm), el movimiento de los electrones comienza a estar limitado por el tamaño, por lo que la interacción con la luz se produce principalmente con la superficie del material. Lo anterior da lugar al fenómeno de la Resonancia del Plasmón Superficial, en el cual las propiedades ópticas se determinan por la oscilación colectiva de los electrones de conducción resultante de la interacción con la luz. De este modo, las NPs plasmónicas se caracterizan por ser fuertes absorbentes de la luz y no presentar luminiscencia.^{1,7}

Cuando el tamaño de la nanopartícula se disminuye aún más hasta ser comparable con la longitud de onda de Fermi de un electrón, se obtienen los NCs o nanocúmulos metálicos, los cuales son aglomeraciones de unos cuantos átomos con diámetros menores a 5 nm. En este caso, la estructura de sus bandas se separa en niveles de energía discretos, debido a que tanto el tamaño como el número de átomos comienza a ser limitado (Figura 2).^{8,9} Debido al confinamiento cuántico fuerte de los electrones libres en estas dimensiones, se producen estados electrónicos discretos generando propiedades nuevas que no poseen las nanopartículas metálicas, como la emisión de fluorescencia. Es por ello que los NCs metálicos son una clase nueva de nanomateriales fluorescentes que representan la separación entre los átomos de un metal y las nanopartículas plasmónicas.

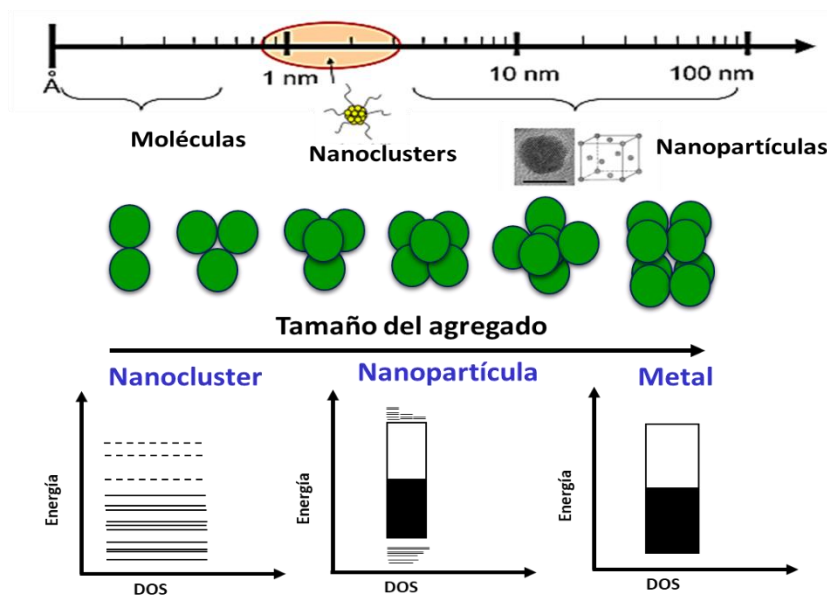


Figura 2. Efecto del tamaño en los niveles de energía de metales, nanopartículas y nanoclusters.

3.2 Propiedades de los Nanoclusters metálicos

La densidad electrónica alta, el apantallamiento y acoplamiento de electrones fuerte en los metales nobles deberían hacer que las estructuras electrónicas cambien drásticamente con el tamaño y estructura del NCs, pero se cree que la influencia de los electrones d complica significativamente el comportamiento electrónico. Por ejemplo, las nanopartículas de Au exhiben la resonancia del plasmón superficial dependiendo del tamaño de partícula, pero al confinar los electrones de conducción a dimensiones más pequeñas que la ruta libre del electrón (~ 20 nm), ocurren restricciones mayores en su movimiento, los cuales alcanzan una segunda escala de tamaño crítico: la longitud de onda de Fermi de un electrón (~ 0.7 nm) que produce transiciones electrónicas discretas y cuánticas. Hasta el momento, no se encuentra aclarado el mecanismo principal en el cambio de las propiedades ópticas de los nanoclusters. Sin embargo, los comportamientos mencionados anteriormente se han predicho utilizando el modelo matemático *Jellium*, donde se explica que las energías de transición de estos electrones libres se relacionan con el inverso del radio de agrupamiento. En otras palabras, existe una relación del

tamaño del NC con la longitud de onda de emisión de fluorescencia, similar a lo que ocurre con los puntos cuánticos de semiconductores nanocrystalinos. En la Figura 3 se observa un desplazamiento a longitudes de onda mayores conforme se aumenta el tamaño de la nanopartícula indicando una disminución en la energía de emisión. El mismo comportamiento se puede observar en la gráfica de correlación de la Figura 4 y utilizando el modelo matemático se concluye la ecuación 1, que sirve para determinar la cantidad de átomos (N) del nanocluster donde E_{em} es la energía de emisión y E_{Fermi} es la energía de Fermi del elemento.¹⁰

$$E_{em} = \frac{E_{Fermi}}{N^{1/3}} \quad (1)$$

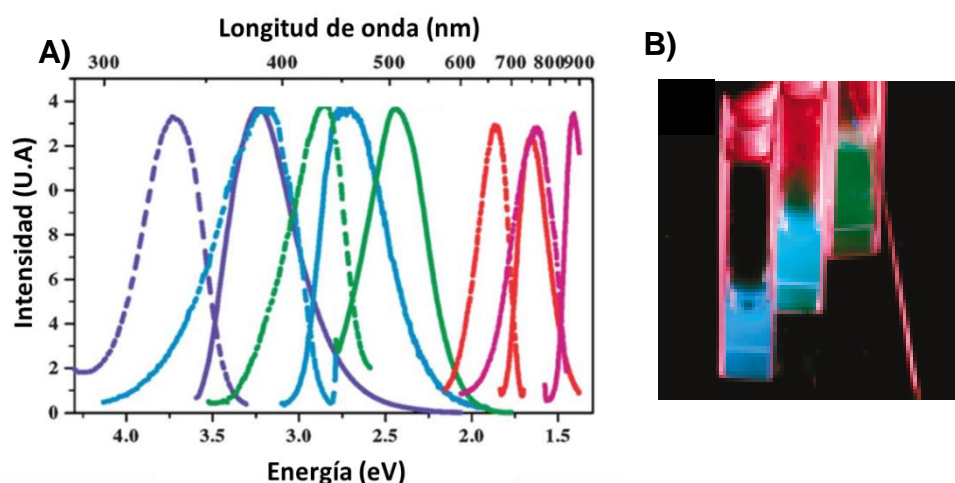


Figura 3. A) Espectros de excitación (línea punteada) y emisión (línea sólida) de NCs de Au de tamaños diferentes. Au₅ (morado), Au₈ (azul) Au₁₃ (verde), Au₂₃ (rojo) y Au₃₁ (rosa). B) Solución de los 3 NCs más pequeños bajo luz UV (366 nm).¹⁰

La intensidad de fluorescencia en cada longitud de onda se correlacionó con la abundancia másica, obtenida por espectrometría de masas por ionización de electrospray para determinar el tamaño de cada nanocluster (Figura 4A). En cada caso, hay una correspondencia entre un solo pico en el espectro de masas y una transición fluorescente específica para producir correlaciones lineales que permiten

la determinación directa de las especies fluorescentes en el UV (Au_5), azul (A_8), verde (Au_{13}), rojo (Au_{23}) e IR cercano (Au_{31}).

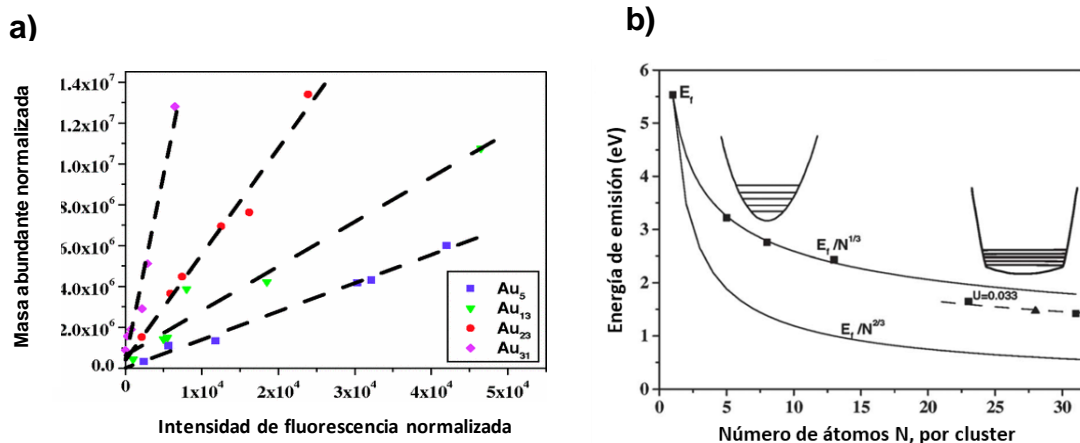


Figura 4. a) Correlación de la masa abundante obtenida por espectrometría de masas y la intensidad de fluorescencia máxima. b) Correlación del número de átomos N por NC con la energía de emisión.¹⁰

De acuerdo con la Figura 4b, se muestra que los electrones en los NCs más grandes ($N= 23$ y 31) aumentan el apantallamiento y el potencial que limita cada electrón se aplanan, aumentando la anarmonía del sistema físico. Estos resultados quieren decir lo siguiente, los NCs de tamaño menor muestran una estructura electrónica aproximadamente esférica en donde los electrones de conducción realizan transiciones dentro de bandas de estados electrónicos discretos con momentos angulares bien definidos, lo que produce espectros de excitación y emisión, llamándolos también como “átomos artificiales multielectrónicos”. Sin embargo, la principal diferencia entre éstos y los átomos reales es que la densidad electrónica no cambia en el NCs pero si cambia cuando se incrementa el número atómico.

Las nanopartículas de Au han sido de las más estudiadas y por ello fueron de los primeros NCs en ser sintetizados, sin embargo, recientemente se ha reportado el uso de otros metales como Ag, Cu y Pt. Los NCs de Ag son más reactivos que sus análogos de Au, además son propensos a la agregación y a crecer hasta formar nanopartículas, así que para disminuir su energía superficial es necesario utilizar

plantillas o agentes ligantes para sintetizar estructuras estables. Por esta razón, los reportes sobre NCs de Ag son limitados.

Por otra parte, debido a la dificultad de controlar el tamaño en la síntesis de estos nanomateriales, se ha comenzado a trabajar en los últimos años en la síntesis de NCs bimetálicos, cuyo interés recae en el cambio de sus propiedades luminiscentes con la incorporación de un segundo metal en la estructura.

La Figura 5 muestra bandas de emisión que se desplazan hacia el azul en NCs de Au-Ag al aumentar la proporción de átomos de Ag en la estructura del clúster. Aunque se puede tener un control en la emisión de fluorescencia controlando estos parámetros, la intensidad se ve disminuida (Figura 5b), lo cual es predecible porque los rendimientos cuánticos de NCs de Au son más altos respecto a los NCs de Ag.¹¹

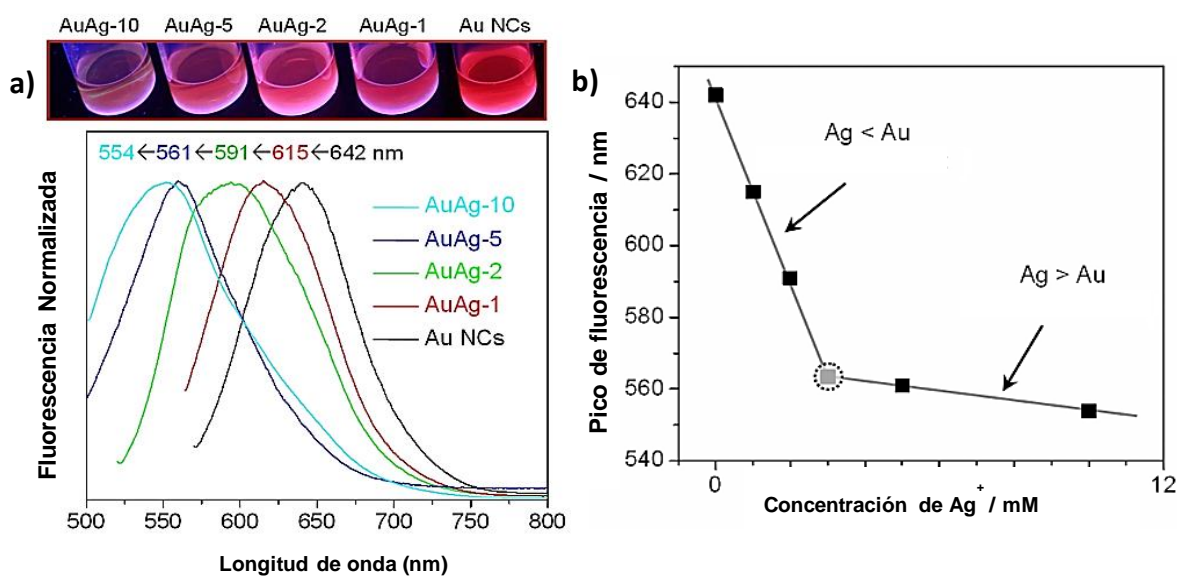


Figura 5. a) Espectros de fluorescencia de los NCs de Au-Ag preparados con 0, 1, 2, 5 y 10 mM de Ag^+ manteniendo la concentración de Au^{3+} a 5 mM. b) Cambio de la posición del pico de fluorescencia incrementando la concentración de Ag^+ .¹¹

3.3 Síntesis de Nanoclusters metálicos

La síntesis de NCs fluorescentes se basa en dos estrategias, llamadas “bottom-up” y “top-down” así como sucede en la síntesis de nanomateriales (Figura 6). El método “top-down” se enfoca en diseñar y miniaturizar el tamaño de las estructuras para obtener a nanoescala sistemas funcionales y en el caso de los NCs se controlan las condiciones para obtener aún más pequeñas las nanopartículas metálicas, comúnmente se utiliza el ácido 3-mercaptopropiónico. Por otro lado, en el primer enfoque, los iones metálicos son reducidos hasta llegar a la formación de los pequeños aglomerados por medio de la nucleación de unos cuantos átomos que son estabilizados con diferentes ligandos, tales como moléculas tioladas pequeñas, oligonucleótidos, ADN, dendrímeros, polímeros y proteínas.

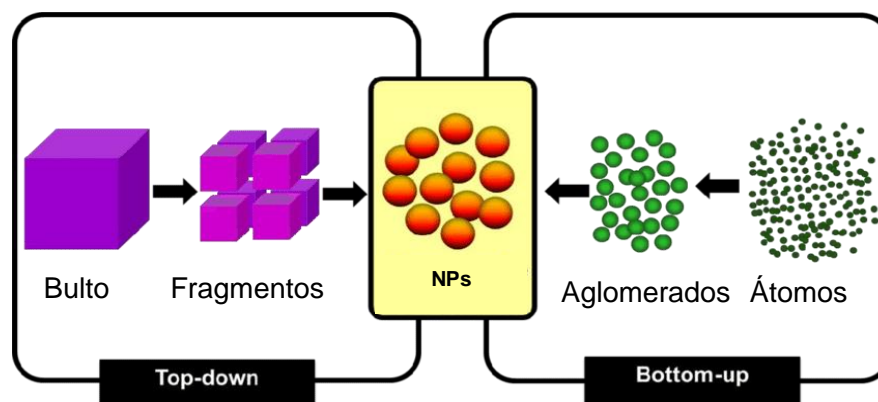


Figura 6. Síntesis de nanoestructuras “top-down” y “bottom-up”.

La síntesis más utilizada se basa en la reducción de los iones metálicos en presencia del agente estabilizante. Los reductores más utilizados son borohidruro de sodio (NaBH_4), citrato de sodio, hidracina y ácido ascórbico. Mientras que los agentes estabilizantes pueden ser proteínas, péptidos, ADN, dendrímeros, polímeros y moléculas tioladas. Los primeros NCs obtenidos fueron de oro, dada la afinidad fuerte entre Au-S, en la síntesis de NCs de Au se ha reportado el uso de moléculas como glutatión, dodecanotiol, ácido lipoico, ácido mercaptopropiónico y tiopronina como agentes estabilizantes, aunque los rendimientos cuánticos reportados son bajos en estos sistemas. Una alternativa para mejorar tales

rendimientos se basa en el uso de BSA (~6 %) que funciona tanto como ligando estabilizante y agente reductor. Esto es importante no solo porque se mejoran las propiedades ópticas, sino porque se presenta como una alternativa verde para la obtención de NCs fluorescentes.^{12,13}

Otra alternativa para la obtención de NCs fluorescentes con propiedades ópticas mejoradas se basa en el uso de otros metales de transición. Una opción más económica y poco reportada es utilizar plata utilizando varias técnicas de reducción como fotoquímicas, sonoquímicas y radiolíticas. Las primeras plantillas utilizadas fueron con ADN debido a la afinidad fuerte con los iones Ag^+ , después de añadir el agente reductor se forman NCs de hasta 4 átomos enlazados a 12 bases de oligonucleótidos. Por otro lado, Dickson y colaboradores prepararon NCs de Ag por reducción fotoquímica en una solución de Ag^+ y dendrimeros de poliamidoamina (PAMAM), donde el polímero actúa como agente estabilizante y ayuda a solubilizar los NCs con 2-8 átomos de plata.¹³

La síntesis hidrotermal es otra alternativa para la obtención de partículas metálicas y perovskitas. El mecanismo de síntesis se basa en la hidrólisis y condensación de una sal metálica en una solución acuosa a temperaturas y presiones altas de hasta $T_c = 646.95 \text{ K}$ y $p_c = 22.064 \text{ MPa}$, todo se lleva a cabo en un reactor de acero inoxidable (Figura 7). En este método las características del agua como su constante dieléctrica y viscosidad disminuyen, lo cual produce una solubilidad mayor de los complejos metálicos, favoreciendo la formación y el crecimiento de partículas, facilitando la interacción entre el solvente y el precursor durante la síntesis. Por ello, seleccionando adecuadamente las condiciones de reacción como la temperatura, presión, concentración de reactivos y pH se puede controlar las características de la nanopartícula como el tamaño, forma y la fase cristalina. Debido a las condiciones óptimas que se generan en esta reacción se evita la generación de productos indeseados, por ello la síntesis hidrotermal se cataloga como una metodología viable, sencilla y en un solo paso.¹⁴

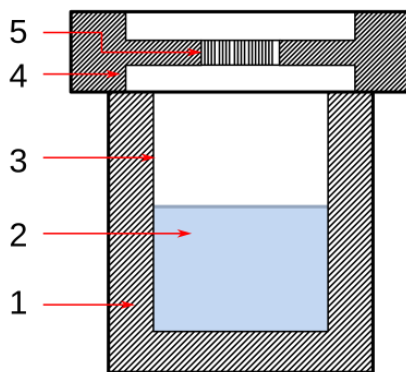


Figura 7. Reactor hidrotérmico. 1) Capa de acero inoxidable, 2) solvente, 3) taza de teflón, 4) tapa de acero inoxidable y 5) disco de ruptura

Wu y colaboradores han utilizado la síntesis hidrotérmica para la obtención de NCs de Pt.⁶ La reacción se lleva a cabo por la reducción de iones Pt^{4+} con ácido ascórbico utilizando polietilenimina (PEI) como ligando estabilizante, lo cual permite un control en el diámetro del nanocluster debido a la formación de un complejo estable en medio ácido del polímero y los cationes metálicos. El valor promedio del diámetro medido por microscopía electrónica de transmisión fue de 2 nm (Figura 8a).

En la Figura 8b se presenta el espectro por espectroscopia fotoelectrónica de Rayos X (XPS) el cual proporciona información estructural del nanomaterial. La deconvolución de los picos asignados a Pt $4f_{7/2}$ produce otros dos picos atribuidos a la presencia de Pt(I) y Pt(0), cuya integración muestra un 45 % de Pt(0) en la estructura de estos nanoclusters. Este valor resulta alto de acuerdo con lo reportado previamente en la literatura y proporciona una mejora en las propiedades luminiscentes del nanomaterial. En este trabajo se obtuvo un rendimiento cuántico del 28 % a comparación de un 6.8 %, utilizando el mismo ligando y agente reductor, pero sin llevar a cabo la reacción en el reactor hidrotérmico. Por lo anterior, esta metodología de síntesis presenta la ventaja de utilizar tiempos de reacción cortos, una reproducibilidad buena y se lleva a cabo en un solo paso.

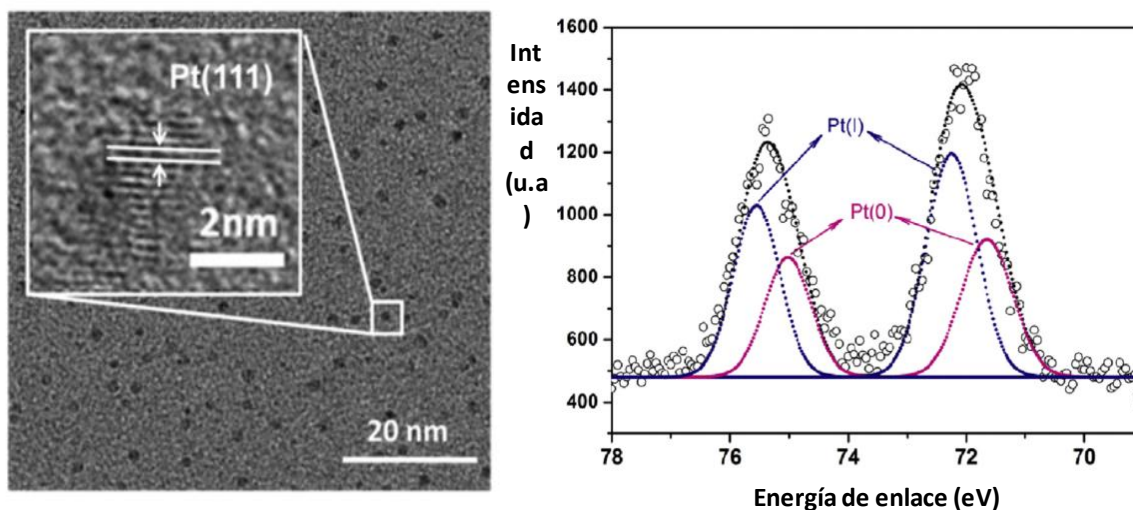


Figura 8. Caracterización de los nanoclusters de Pt. a) Imagen por microscopía electrónica. b) Espectro XPS.⁶

Las propiedades y concentraciones del ligando son factores importantes para controlar el tamaño de partícula y que se logren obtener NCs fluorescentes, además del tipo de metodología de síntesis. En la literatura se ha reportado el uso de ligandos diferentes que ayudan a modular las propiedades ópticas de los NCs.

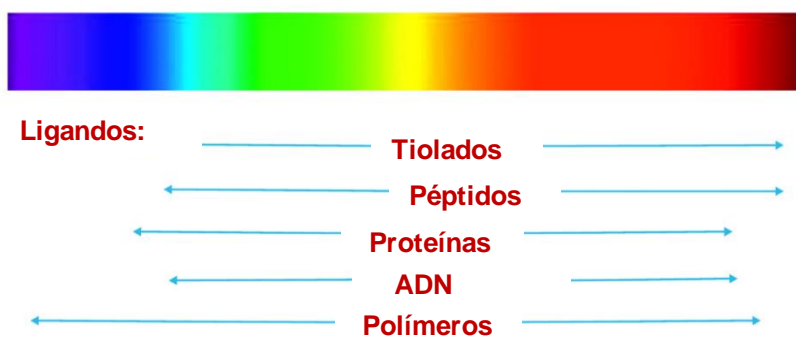


Figura 9. Efecto del ligando en la emisión de fluorescencia de NCs metálicos.⁵

En la Figura 9 se muestra la región del espectro visible en donde emiten los NCs con determinado ligando o recubrimiento. El uso de polímeros permite la obtención de NCs que emitan en todo el intervalo visible. De los polímeros que se

han utilizado se encuentra el ácido polimetacrílico combinado con pentaeritritol, acetato de polivinilo, poliamidoamina, polietilenimina, etc.

La polietilenimina es un polímero catiónico obtenido a partir de monómeros de etilenimina. Según su estructura molecular, este compuesto puede ser lineal o ramificado, además está disponible en una variedad de pesos moleculares, tales como $M_w = 600, 1800, 25\ 000, 70\ 000$, etc. El PEI ramificado se considera una plantilla ideal debido a la presencia de grupos aminos primarios, secundarios y terciarios que pueden interactuar con iones metálicos como con los átomos de Ag debido a su interacción fuerte.

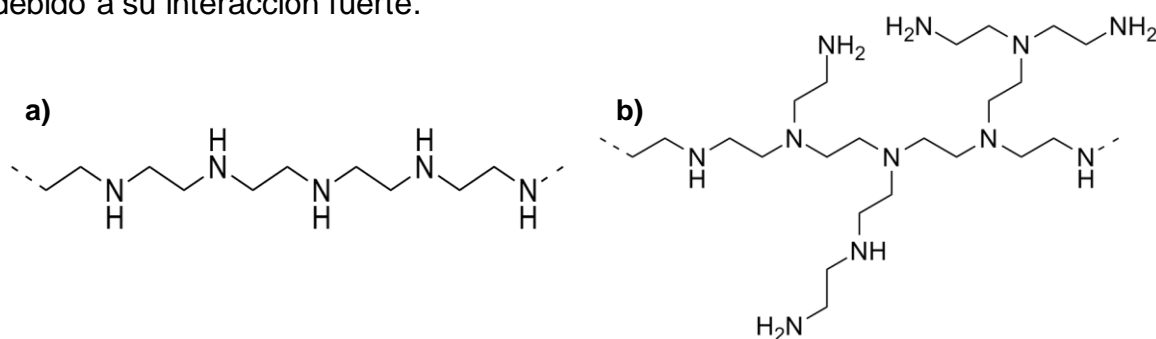


Figura 10. Estructura del PEI a) lineal y b) ramificado.

La PEI se ha utilizado como acarreador de genes y oligonucleótidos para la transfección a cultivos celulares en terapia génica, debido a su densidad de carga alta forma complejos o nanopartículas con ácidos nucleicos que permite su entrada eficiente a la célula sin ser degradado. Estas características hacen a este polímero una opción viable y biocompatible para utilizarse como ligando en la síntesis de NCs metálicos.

3.4 Puntos cuánticos y propiedades ópticas

Los puntos cuánticos o “quantum dots” (QDs) también conocidos como nanocristales, se descubrieron por primera vez en 1980 por dos grupos independientes, uno en Rusia por Alexei I. Ekimov en una matriz de vidrio y el otro en Estados Unidos de América por Louis E. Brus y Alexander Afros quienes los

obtuvieron en soluciones coloidales.¹⁴ El término de “punto cuántico” fue acuñado por el físico estadounidense Mark A. Reed, quien buscaba reflejar el hecho de que son una clase especial de semiconductores, están confinados en las tres dimensiones espaciales por el tamaño físico tan pequeño que poseen estas partículas.¹⁵⁻¹⁶ Por lo general son partículas semiconductoras cristalinas compuestas de elementos pertenecientes a los grupos II-VI, III-V, o IV-VI de la tabla periódica.

Las propiedades únicas de los puntos cuánticos son ocasionadas por su tamaño pequeño alrededor de 2 a 10 nanómetros, con sólo varios cientos o unos pocos miles de átomos que conforman al punto cuántico. El confinamiento cuántico es un fenómeno que ocurre por consecuencia al tamaño pequeño de estas nanopartículas. En materiales semiconductores, el nivel inferior de la banda de valencia (VB) está casi llena de electrones, mientras que el nivel superior de la banda de conducción (CB) permanece casi vacío; de manera que los electrones pueden saltar de la VB a la CB, pasando por la banda de energía, o la banda prohibida (band-gap). De tal manera que las bandas cargadas opuestamente, el electrón excitado y el hueco cargado positivamente, se unen mediante fuerzas de Coulomb electrostáticas, dando lugar a una cuasi-partícula eléctricamente neutra conocida como excitón.

Los efectos de confinamiento en un semiconductor sobre los niveles de energía electrónica son significativos, es decir, en un semiconductor común, los niveles de energía dentro de la VB y CB están tan cerca que pueden ser tratados como si fuesen bandas continuas. Los electrones que son excitados hacia la banda de conducción se quedan allí por un periodo corto de tiempo (del orden de nano o milisegundos dependiendo del material), pero rápidamente se relajan y pasan de nuevo a la banda de valencia, con la emisión resultante de un fotón correspondiente a la pérdida de energía. En el caso de los puntos cuánticos, existen los mismos procesos de la formación del excitón y su recombinación que en los materiales semiconductores, sin embargo, hay una gran diferencia en la densidad de los estados debido al tamaño de la partícula finita (Figura 11).

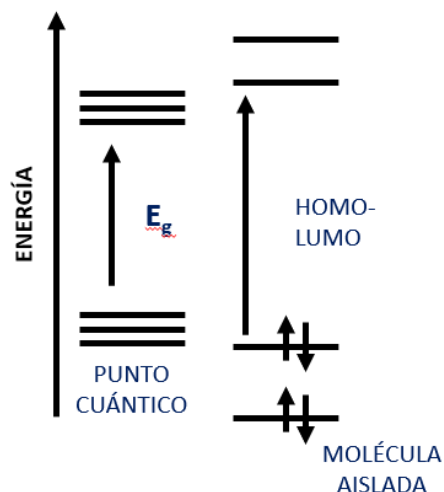


Figura 11. Bandas de energía de los puntos cuánticos y moléculas aisladas.

Existe un aumento en el confinamiento del excitón con la distribución del tamaño de la partícula, esto hace que los niveles de energía en lugar de ser líneas de energía continua pasen a ser discretas, lo que implica que existe una separación pequeña y finita entre los niveles de energía, lo que hace que los cristales más pequeños tengan band-gaps grandes. La magnitud de este espaciado es inversamente proporcional al número de átomos en el semiconductor cristalino. El confinamiento cuántico ocurre cuando el número de átomos en un semiconductor cristalino es pequeño, la energía entre los estados se incrementa, y la densidad de estados se hace pequeña. En la Figura 12 se muestra la consecuencia principal de la formación del excitón, la cual implica que la variación de las propiedades ópticas del punto cuántico depende del tamaño de la partícula, así se pueden controlar los espectros de absorción y emisión en un intervalo de longitudes de onda amplio. Si el tamaño es muy grande, la energía de la banda prohibida disminuye, obteniendo nanocristales que emiten en la zona del rojo del espectro visible o del IR hasta que el confinamiento cuántico desaparece y se forma una partícula grande sin propiedades ópticas.

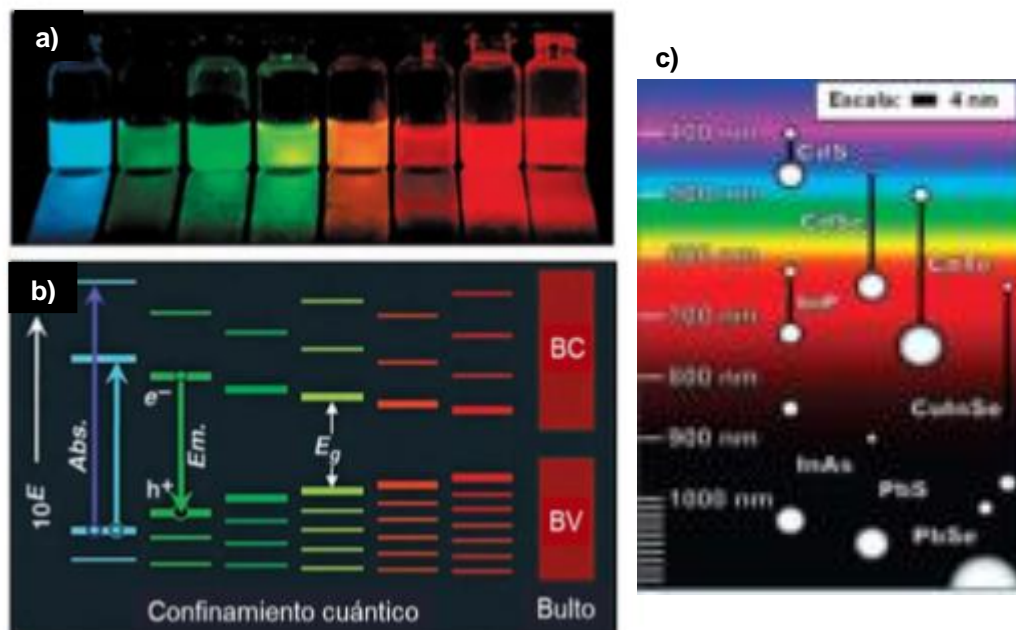


Figura 12. Confinamiento cuántico, (a) Fotografía bajo luz UV, de QDs de CdSe/ZnS al incrementar el tamaño (izquierda a derecha). (b) Cambios cualitativos en las energías de las bandas “gap” (E_g) de los QDs y en la densidad de los estados para QDs de CdSe. (c) Intervalos de emisión aproximados.¹⁷

Los QDs están constituidos de compuestos binarios y terciarios semiconductores, la mayoría suelen ser de arsenuro de indio (InAs), fosfuro de indio (InP), sulfuro de cadmio (CdS), selenuro de cadmio (CdSe), telururo de cadmio (CdTe), sulfuro de plomo (PbS), selenuro de plomo (PbSe) y telururo de plomo (PbTe). De los mencionados anteriormente los puntos cuánticos de CdTe son los que presentan longitudes de emisión amplias como se observa en la Figura 12c, además se ha reportado una variedad de metodologías de síntesis para la incorporación de ligandos diferentes y poder proporcionarle propiedades adecuadas dependiendo de la aplicación del nanomaterial, como por ejemplo obtener QDs de CdTe con cargas superficiales diferentes para su incorporación en ensambles de transferencia de energía resonante.¹⁷⁻¹⁸

La síntesis de QDs se reportó por primera vez en 1993 en el trabajo de Bawendi y colaboradores, donde se desarrollan rutas de síntesis organometálicas de QDs fluorescentes en fase orgánica. En este trabajo, nanocristales de CdSe con distribución de tamaños homogénea y cristalinidad alta fueron producidos empleando dimetilcadmio como el precursor.¹⁹ En 2001, Peng optimizó los métodos de síntesis organometálicos utilizando CdO como precursor de Cd. A diferencia de la anterior, esta metodología es reproducible y útil para sintetizar QDs a gran escala. En el mismo año, ellos realizaron un estudio sistemático de la relación entre las propiedades ópticas y las condiciones de síntesis, estas fueron las bases para su trabajo publicado en 2003 sobre la determinación de las absortividades molares (ϵ) y el diámetro (D) de partícula teórico para QDs de CdTe, CdSe y CdS por medio de un análisis estadístico por microscopia electrónica y regresiones polinomiales.²⁰

$$CdTe: D = (9.8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1.7147 \times 10^{-3})\lambda^2 + (1.0064)\lambda - (194.84) \quad (1)$$

$$CdSe: D = (1.6122 \times 10^{-9})\lambda^4 - (2.6575 \times 10^{-6})\lambda^3 + (1.6242 \times 10^{-3})\lambda^2 - (0.4277)\lambda - (41.57) \quad (2)$$

$$CdS: D = (-6.6521 \times 10^{-8})\lambda^3 + (1.9557 \times 10^{-4})\lambda^2 - (9.2352 \times 10^{-2})\lambda + (13.29) \quad (3)$$

$$CdTe: \epsilon = 10043(D)^{2.12} \quad (4)$$

$$CdSe: \epsilon = 5857(D)^{2.65} \quad (5)$$

$$CdS: \epsilon = 21536(D)^{2.3} \quad (6)$$

La síntesis en fase acuosa ha sido una alternativa para una metodología directa de QDs solubles en agua. En los primeros reportes, el $Cd(ClO_4)_2$ se disuelve con moléculas tioladas en condiciones de pH apropiadas, después se añade H_2Te en forma gaseosa para producir el precursor de CdTe. Finalmente, la reacción se lleva a reflujo a 100 °C. Estos nanocristales poseen rendimientos cuánticos relativamente bajos (< 30 %). Sin embargo, para mejorar esta característica ya se ha reportado el uso de otros ligantes como el ácido tioglicólico, incluso se han empleado otras estrategias como la síntesis por microondas o hidrotermal para obtener QDs con rendimientos cuánticos superiores al 80 %.

3.5 Puntos cuánticos de carbono y propiedades ópticas

Los puntos cuánticos de carbono o “carbon dots” (CDs) fueron sintetizados por primera vez en el año 2004, como material secundario de la síntesis de nanotubos de carbono por Xu y colaboradores.²¹ Después de la síntesis por descarga de arco y una posterior purificación electroforética, observaron varios puntos fluorescentes y creyendo que eran impurezas realizaron su caracterización en donde observaron partículas de carbono de 0.96 nm. Los investigadores obtuvieron una solución acuosa que consiguieron separar en 3 fracciones con tamaños de partículas diferentes. Y al ser expuestos a una radiación ultravioleta de 365 nanómetros se observó fluorescencia de colores diferentes para cada tamaño (Figura 13).

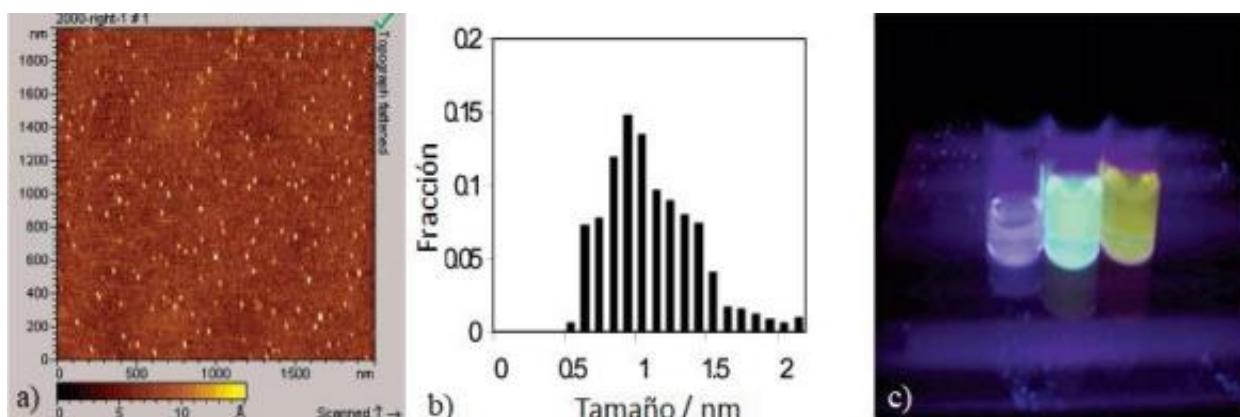


Figura 13. Caracterización de los puntos cuánticos de carbono. a) microscopía de fuerza atómica, b) tamaño promedio y c) separación de las tres fracciones acuosas.²¹

Los puntos cuánticos de carbono presentan el fenómeno de confinamiento cuántico, provocando que sus propiedades ópticas y el tamaño de la nanopartícula tengan una relación estrecha, similar con lo que ocurre con los puntos cuánticos de semiconductores nanocristalinos. Los CDs presentan otro fenómeno particular ya que son una excepción de la regla de Kasha. En fluorescencia, esta regla plantea

que para el mismo sistema se observa el mismo espectro de emisión, independientemente de cuál haya sido la longitud de onda de excitación. En la Figura 14 se muestran los desplazamientos en los espectros de emisión de CDs a diferentes longitudes de onda de excitación.

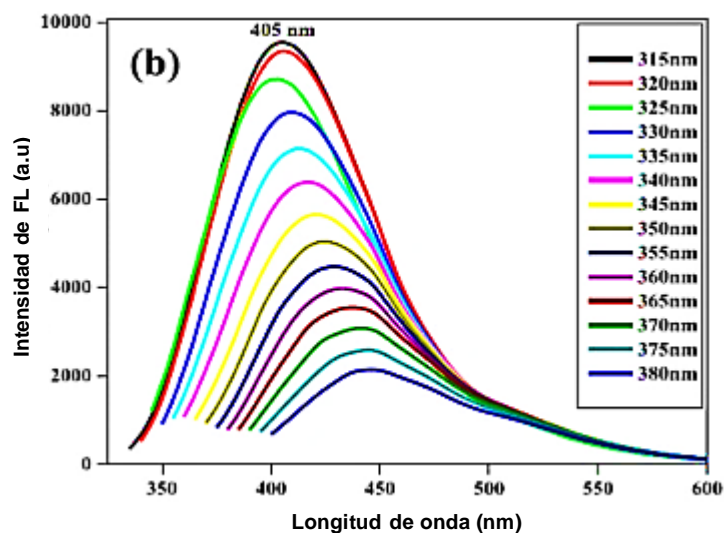


Figura 14. Espectros de emisión de CDs a diferentes longitudes de onda de excitación desde 315 a 380 nm.²²

La composición química predominante de carbono en estos nanomateriales se muestra como ventaja para su síntesis, por lo cual se pueden utilizar una variedad de materias primas y metodologías para la obtención de los CDs, como la ablación láser, exfoliación electrotérmica de grafito, choque electroquímico de nanotubos de carbono, quema por descarga de arco, carbonización térmica, tratamiento ultrasónico de glucosa, combustión de vela y gas natural, deshidratación de carbohidratos, etc.

3.6 Aplicaciones de los NCs fluorescentes

Los NCs se presentan como alternativas de los fluoróforos convencionales en campos de aplicación diferentes debido a sus propiedades atractivas. Estas

nanopartículas muestran un gran potencial en la detección de moléculas distintas o iones de interés biológico y ambiental.

Recientemente se han utilizado NCs para la detección de metales pesados como Hg^{2+} y Pb^{2+} utilizando ADN como ligando estabilizante.^{23,24} Son sensores altamente sensibles, sin embargo, el uso de biomoléculas ocasiona un aumento en el costo del sensor. También se han utilizado NCs para identificar moléculas como trinitrotolueno (TNT) y pesticidas.²⁵ En la literatura hay muy pocos reportes del uso de NCs metálicos en la detección de moléculas de interés biológico como aminoácidos, dopamina, colesterol y ácido úrico.²⁶⁻²⁷ Todas estas moléculas juegan un papel fundamental en las funciones celulares, metabolismo y se relacionan con enfermedades cardiacas, Parkinson, Alzheimer, etc.

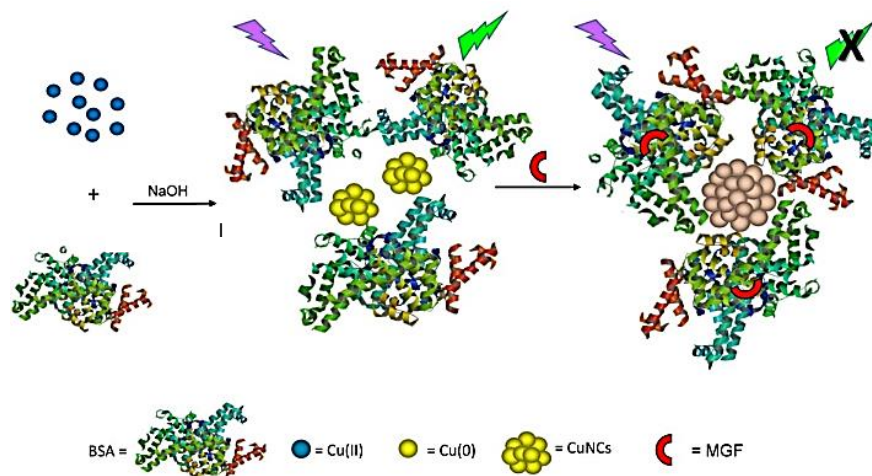


Figura 15. Esquema del nanosensor de mangiferina.²⁸

Sin embargo, se ha reportado el uso de NCs de Cu recubiertos con BSA para reconocer moléculas como la mangiferina. Este analito es un flavonoide con gran poder antioxidante que tiende a disminuir la producción de radicales libres de oxígeno, reduciendo el daño en el ADN. De esta forma, ayuda a reducir el crecimiento de células cancerosas. Debido a esto, existe interés en el desarrollo de sensores de mangiferina por su uso potencial en aplicaciones biológicas y farmacéuticas. El diseño del sensor se presenta en la Figura 15. La determinación del analito se lleva a cabo midiendo el abatimiento de la fluorescencia debido a la

formación de un complejo entre el flavonoide y residuos de aminoácidos en la proteína BSA.²⁸

Por otra parte, los NCs han mostrado interés para utilizarse como marcadores fluorescentes en la determinación de proteínas. Esta aplicación ha sido poco desarrollada ya que es necesaria la conjugación con moléculas receptoras selectivas en la superficie de los NCs. En la Figura 16 se muestra el diseño de un sensor desarrollado por Li *et al.*²⁹ Ellos obtuvieron dos tipos de NCs uno recubierto con péptidos que funcionan como ligando estabilizante y el segundo se funcionalizó con un fluoróforo (TRAMA o FITC). La fluorescencia es abatida por medio de un proceso de transferencia de energía en la superficie del nanomaterial (NSET). Esta fluorescencia se regenera en presencia de una enzima que es indicadora de apoptosis celular, debido a la ruptura de los enlaces de los aminoácidos que se encuentran en los sitios de unión entre el NC y el fluoróforo.

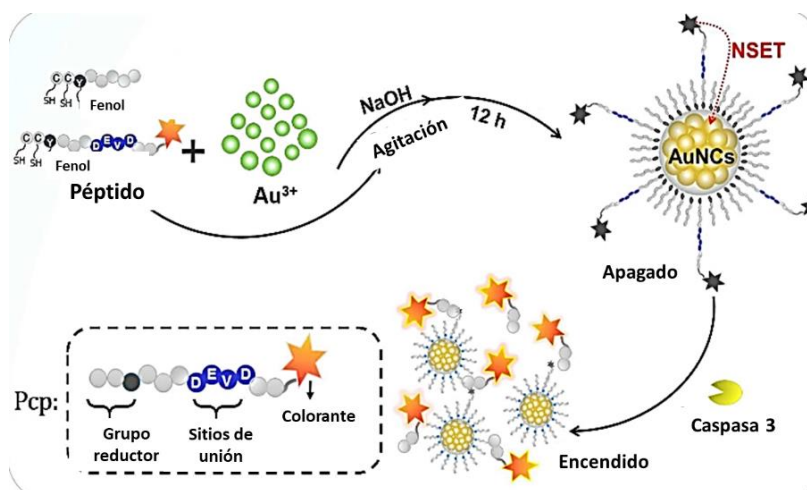


Figura 16. Esquema del biosensor fluorométrico de Caspasa 3 basado en NCs de Au.²⁹

3.6.1 Sensores fluorescentes de pH

Otra aplicación de estos nanomateriales fluorescentes son los sensores de pH debido a que tiene un papel importante en varios campos de biomedicina y farmacéutica. La ventaja que poseen los NCs sobre los colorantes orgánicos y los

puntos cuánticos nanocristalinos es su toxicidad baja, por lo que son candidatos para aplicaciones en estudios celulares.

Estudios en modelos celulares han demostrado que el transporte de iones y el control del pH tanto extracelular (pHe) como intracelular (pHi) juegan un rol crucial en procesos celulares y fisiológicos variados, incluyendo el control de la proliferación celular, el metabolismo, mantener el potencial de membrana, la actividad mitocondrial, la síntesis de ADN y la síntesis de proteínas.³⁰

Estudios *in vitro* han demostrado que las células tumorales poseen un control del transporte de protones y un balance ácido-base desregulado en comparación con las células normales. Se ha reportado que las células tumorales poseen valores de pH intracelular alcalinos que van desde 7.2 a 7.7 mientras que las células normales exhiben valores más bajos de 6.9 a 7.1. Además, las células tumorales poseen un pH extracelular más ácido que el normal, bordeando valores entre 6.2 y 6.9 mientras que en células normales el pH se mantiene en valores más alcalinos entre 7.3 y 7.4. La diferencia en los valores del pH intracelular y pH extracelular crea una gradiente de pH a través de la membrana plasmática, este gradiente es capaz de alterar el funcionamiento y metabolismo normal de la célula, promoviendo la malignidad tumoral.³⁰⁻³¹

La determinación precisa del pH en diversos sistemas es de gran importancia en los laboratorios de industrias y clínicas debido a que muchos procesos químicos y biológicos dependen del pH del medio. En el ámbito biológico el pHi juega un papel crucial para el buen desarrollo de la célula, ya que de este parámetro dependen funciones como la actividad enzimática, proliferación, apoptosis, transporte iónico, endocitosis, etc. Valores anormales de pHi están asociados con mal funcionamiento de las células que son observadas en enfermedades degenerativas como el cáncer y Alzheimer's.³²

Además de entender la regulación del pH, es importante contar con las herramientas necesarias para una medición precisa. Una de las técnicas más utilizadas para la determinación del pH celular es por medio de microelectrodos, estos están contruidos con un tipo especial de vidrio que es conductivo solamente

a los iones H^+ . Pequeños capilares de este vidrio son pulidos hasta obtener un electrodo con una punta muy fina, sellándola con calor. Luego este pequeño electrodo sensible al pH es ensamblado dentro de un segundo capilar de vidrio construido de silicato de aluminio. Finalmente, este electrodo es llenado con una solución conductora, además presenta en su interior un filamento de plata tratado previamente con una solución de cloruro. Para realizar la medición de pH se introducen a la célula dos electrodos, uno sensible al pH y otro al potencial. El electrodo sensible al potencial posee un electrodo de referencia de KCl. Así, la diferencia de voltaje en el electrodo dada entre los electrodos de referencia y de potencial es igual al potencial de membrana. Y esta diferencia es proporcional al pH_i .³²

Aunque medir el pH con el uso de electrodos genera resultados precisos, presenta algunas desventajas como los costos altos de estas herramientas, tienen una vida útil limitada y requieren ser calibrados. Por otro lado, mediciones cualitativas se pueden lograr utilizando indicadores fluorescentes. Algunas moléculas son capaces de identificar H^+ de manera reversible afectando su intensidad de fluorescencia. Generalmente son derivados de la fluoresceína, la más comúnmente usada es BCECF (2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(6)carboxifluoresceína). Se utiliza una longitud de onda de excitación a 440 nm, mientras que su banda de emisión se presenta a 500 nm y aumenta su intensidad a medida que aumenta el pH.

Debido a limitaciones tanto físicas como de costos de las herramientas mencionadas anteriormente, se ha dirigido la atención a otro tipo de indicadores fluorescentes como los NCs metálicos, ya que al ser modificados con moléculas sensibles a los iones H^+ o OH^- se puede obtener una medición de pH en tiempo real y de manera precisa. Un ejemplo de este tipo de moléculas es la polietilenimina (PEI), este es un polímero con gran cantidad de grupos amino primarios, secundarios y terciarios los cuales son sensibles al pH del medio.³³

Actualmente, ya se han utilizado los NCs metálicos como sensores de pH. Qiao y colaboradores desarrollaron NCs de Cu recubiertos con clara de huevo, por

medio de una síntesis directa sin el uso de agentes reductores, siendo la principal ventaja de este trabajo. La clara de huevo es rica en proteínas las cuales funcionan como agentes estabilizantes en la nucleación del nanocluster, similar a lo que ocurre con la BSA. Los NCs sintetizados mostraron un diámetro promedio de 2.4 nm, una banda de absorción a 350 nm y una emisión de fluorescencia a 417 nm.

En la Figura 17 se muestra la respuesta en su intensidad de fluorescencia variando el pH del medio. La respuesta lineal es a valores de pH de 6.14 a 12.08 con un coeficiente de correlación de 0.9933 y muestra una buena reversibilidad de hasta 5 ciclos.³⁴

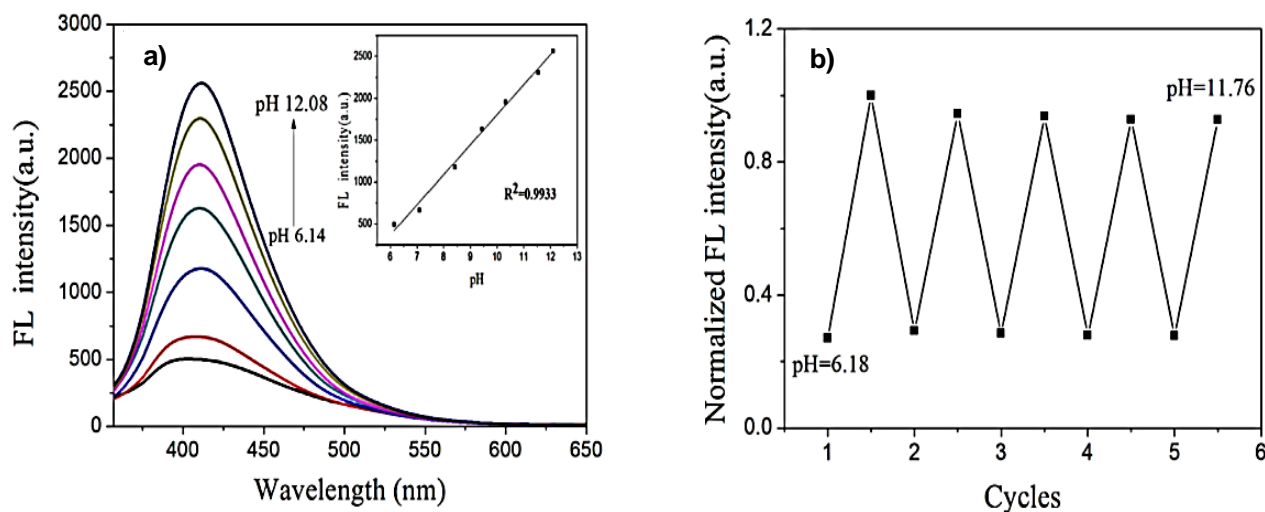


Figura 17. Intensidad de fluorescencia de CEW@CuNCs a valores de pH diferentes de 6.14-12.08 y b) estudios de reversibilidad.³⁴

3.6.2 Sensores fluorescentes de colesterol

El colesterol es un constituyente indispensable de las membranas celulares de los mamíferos y precursores de otros materiales biológicos como las hormonas esteroides y la vitamina D. Está ampliamente distribuido en el cuerpo humano, especialmente en el cerebro y el sistema nervioso central. El nivel de colesterol en

sangre adecuado se encuentra entre 200 y 240 mgdL⁻¹, la alteración de los niveles de este parámetro importante se relaciona con el daño a los vasos sanguíneos, resultando en enfermedades cardiovasculares, nefrosis y diabetes.³⁵

Por lo tanto, la determinación de colesterol es importante para el diagnóstico clínico de enfermedades relacionadas con niveles anormales de este analito. Sin embargo, debido a la solubilidad en agua baja e interacciones supramoleculares limitadas que presenta la molécula de colesterol, los sensores reportados para detectar esta molécula se basan principalmente en el uso de enzimas, como la colesterol oxidasa.^{35,36} Esto provoca un aumento en el costo del sensor, así como una disminución en su tiempo de vida útil, ya que la enzima puede desnaturalizarse fácilmente.

Estas características, generan un interés mayor en el desarrollo de otros tipos de sensores de colesterol. Una alternativa es el uso de β -ciclodextrina (β -CD) que está conformada por 7 moléculas de glucosa y presenta afinidad hacia moléculas hidrofóbicas, por ello se ha utilizado para extraer selectivamente el colesterol de muestras biológicas. Esta extracción se basa en la formación de un complejo de inclusión supramolecular, a través de interacciones hidrofóbicas de los anillos alifáticos la cavidad de la β -CD y el colesterol. Un ejemplo es el sensor desarrollado por Jana y Mondal,³⁷ en el cual el mecanismo de reconocimiento propuesto ocurre a través de la interacción competitiva anfitrión-huésped de la rodamina 6G (R6G) y el colesterol por la β -CD. El sensor se basa en un encendido de la fluorescencia (Figura 18) en presencia del colesterol. En una primera etapa se forma un complejo supramolecular entre la β -CD y R6G, provocando una disminución en la intensidad de fluorescencia de la R6G. En una segunda etapa se recupera la fluorescencia del colorante al añadir el colesterol, debido a que es más favorable la formación del complejo β -CD y colesterol.

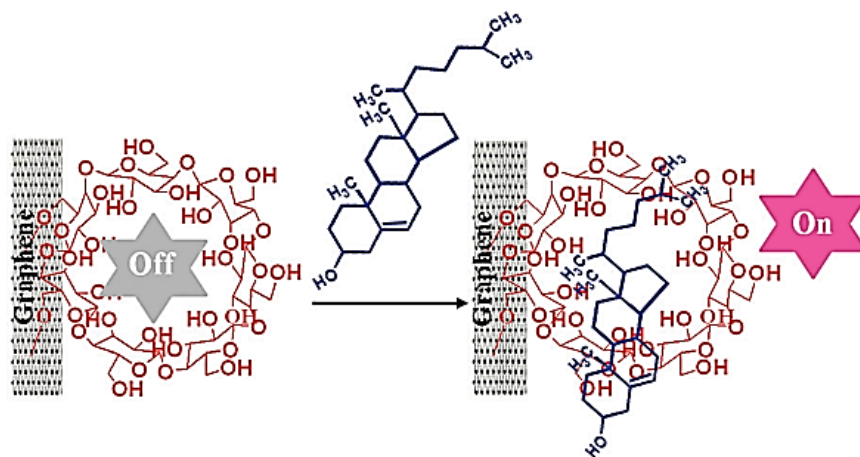


Figura 18. Esquema de la detección de colesterol por medio de la interacción competitiva anffitrión-huésped de β -CD y R6G.³⁷

Por otra parte, se ha reportado la funcionalización de nanopartículas de oro con β -CD para la liberación de fármacos hidrofóbicos como el diclofenaco.³⁵ También se ha utilizado para controlar el crecimiento de nanopartículas de magnetita con la formación previa de un complejo supramolecular entre los iones Fe^{3+} , Fe^{2+} y la ciclodextrina.³⁸ Por los resultados anteriores, la β -CD es una molécula prometedora para su aplicación en nanosensores de analitos con carácter hidrofóbico y por ello el interés el aplicarlo en la síntesis de NCs metálicos.

3.6.3 Sensores fluorescentes de ácido fólico

El ácido fólico (AF) es una vitamina hidrosoluble del grupo B. Se considera un nutriente esencial, lo que significa que el ser humano no es capaz de sintetizarlo. Las únicas fuentes de folatos son la dieta y la síntesis a partir de algunas bacterias intestinales. Su estructura está determinada por un anillo de pteridina, ácido p-amino benzoico y una "cola" de 1 a 6 moléculas de ácido glutámico (Figura 19). Se encuentra principalmente en vegetales de hoja verde, hígado y riñón. La deficiencia de ácido fólico es uno de los déficits aislados de vitaminas más frecuentes. Las principales causas son una ingesta inadecuada o problemas de absorción y las

interferencias producidas por medicamentos como metotrexato y algunos anticonvulsivantes.

El ácido fólico tradicionalmente se ha asociado en medicina a la anemia macrocítica. Sin embargo, en la actualidad se sabe que deficiencias marginales o alteraciones de su metabolismo se asocian a otras patologías frecuentes como malformaciones congénitas y enfermedades cardiovasculares. Los folatos tienen principalmente dos efectos fisiológicos importantes: son un cofactor para enzimas que sintetizan ADN y ARN y son necesarios para la conversión de homocisteína a metionina. Algunos estudios de la década de 1990 sugirieron que una falta de folato podría aumentar el riesgo de cáncer colorrectal y de seno, especialmente entre personas que toman bebidas con alcohol.³⁹

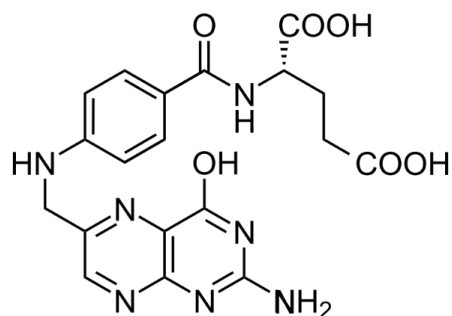


Figura 19. Estructura del ácido fólico.

Ramírez-Herrera y colaboradores desarrollaron un sensor de ácido fólico a base de puntos cuánticos de CdTe recubiertos con cisteamina (Figura 20).⁴⁰ El sensor mostró un abatimiento lineal de la fluorescencia en el intervalo de 0.16-16.4 μM . El mecanismo de abatimiento se basa en la formación de un complejo por medio de interacciones electrostáticas entre la carga positiva del QD recubierto con cisteamina y la carga negativa del ácido fólico. Los estudios se realizaron en un medio de solución buffer a pH 8.

La constante de abatimiento de fluorescencia mostró un valor de $K = 5.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. El mecanismo fue comprobado por medio de potencial Z, el cual disminuyó de 7 a -12 mV indicando la interacción con las aminas protonadas de la CA de la nanopartícula. Sin embargo, el uso de Cd en los nanosensores produce un riesgo

en la toxicidad del nanomaterial por ello es necesario el desarrollo de métodos rápidos, selectivos y sensibles para cuantificar ácido fólico.

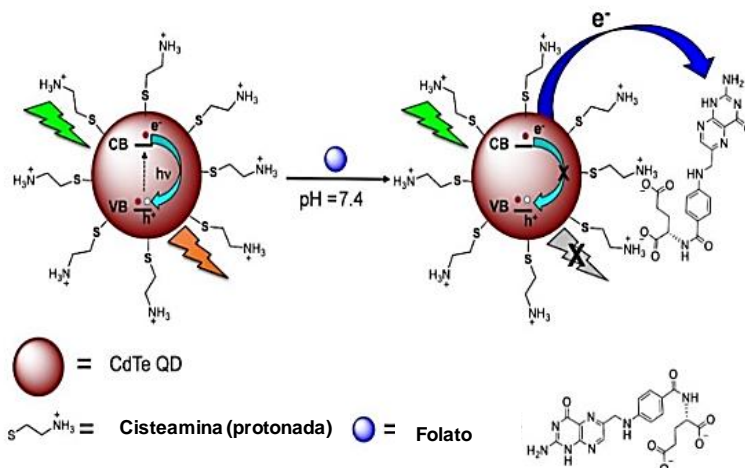


Figura 20. a) Esquema del reconocimiento de AF utilizando QDs CdTe/CA.⁴⁰

3.7 Fenómeno de transferencia de energía resonante de Förster (FRET)

Una aplicación en pleno desarrollo es el uso de NCs metálicos para el ensamble de sensores basados en el mecanismo de transferencia de energía resonante de Förster (FRET), que ha sido utilizada ampliamente en investigaciones biológicas debido a que se puede evaluar la localización e interacción entre dos especies fluorescentes (1-10 nm). En este proceso presentado en la Figura 21, la molécula donadora se considera que actúa como una antena eléctrica (un dipolo), lo que supone la creación de un campo electromagnético en su proximidad.

Las moléculas con capacidad para recibir la energía transferida pueden actuar como antenas receptoras si se encuentran dentro del radio efectivo del campo eléctrico creado por la molécula donadora (< 10 nm). De este modo, tras una excitación de la molécula donadora, las moléculas aceptoras absorben energía del campo eléctrico, resultando en una excitación de su estado electrónico (Figura 22).

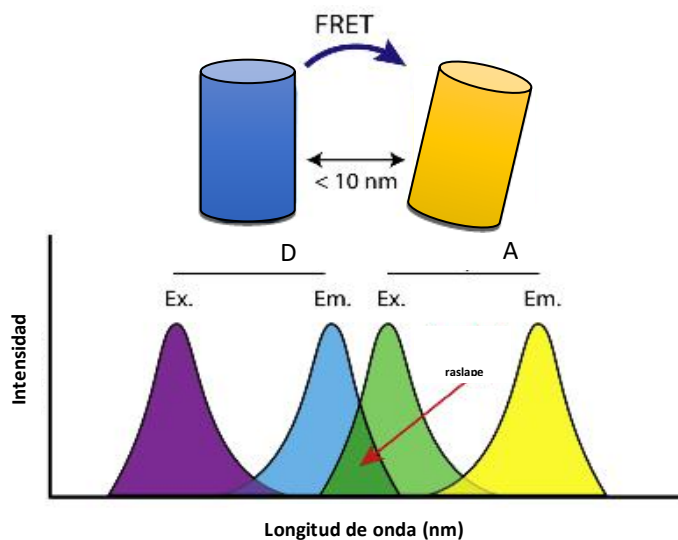


Figura 21. Condiciones de traslape para llevar a cabo el fenómeno FRET.

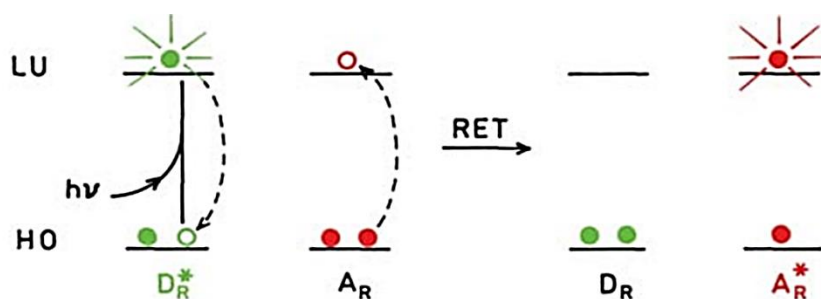


Figura 22. Esquema de los orbitales moleculares para la transferencia de energía resonante.

La eficiencia en la transferencia de energía está dada por la siguiente ecuación:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (1)$$

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \phi J(\lambda) \quad (2)$$

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3)$$

Donde F_{DA} es la intensidad de fluorescencia integrada del donador en presencia del aceptor, F_D es la intensidad de fluorescencia integrada del donador en ausencia del aceptor, R_0 es la distancia de Förster, en la cual ha ocurrido una transferencia de energía del 50 %, r es la distancia entre el donador y el aceptor, K^2 es el factor de orientación relativa en el espacio relacionado a las transiciones de los dipolos del donador y aceptor, el cual se asume un valor de $2/3$ para una orientación aleatoria, ϕ es el rendimiento cuántico del donador, n es el índice de refracción del medio, $J(\lambda)$ es la intensidad de fluorescencia integrada corregida del donador en el intervalo de longitudes de onda de λ a $\lambda + \Delta\lambda$ y ϵ_A es el coeficiente de absorptividad del aceptor.⁴¹

Los ensambles FRET utilizados para nanosensores ópticos tienen un área amplia de aplicación debido a la variedad de propiedades ópticas de los nanomateriales fluorescentes. En el grupo de trabajo se han realizado ensambles con puntos cuánticos de CdTe y violeta de Cresilo para la detección de arginina en muestras reales con límites de detección en el orden del μM . La arginina es uno de los aminoácidos más abundantes presente en variedad de alimentos y se ha reportado que su metabolito se altera en presencia de tumores malignos. La detección de arginina es por medio de la ruptura del ensamble FRET, debido a que la arginina presenta un grupo guanidino afín al grupo carboxilato del QD, remplazando al colorante y recuperando la fluorescencia del punto cuántico.⁴²

Xu y colaboradores desarrollaron en 2019 un sensor FRET de NCs de Au recubiertos con GHS y CDs recubiertos con PEI para la detección de cisteína. Los nanomateriales se obtuvieron por un proceso hidrotérmico con rendimientos cuánticos del 3.07 y 31.95% respectivamente.⁴³ Los análisis se realizaron en buffers con $\text{pH} = 7.4$, en estas condiciones los CDs presentan carga positiva y los NCs carga negativa, las cargas opuestas es importante para que el ensamble se forme por medio de interacciones electrostáticas.

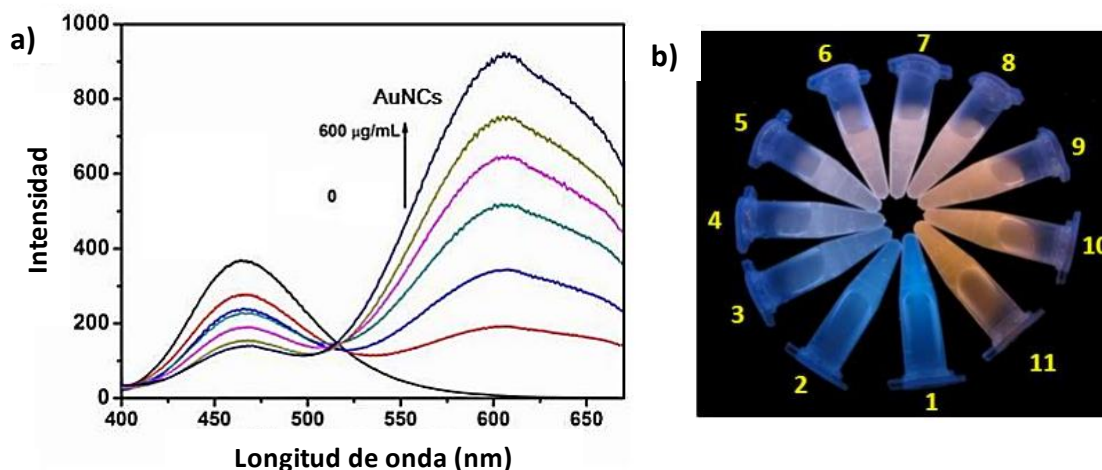


Figura 23. Espectros de emisión de los CDs con adiciones sucesivas de NCs Au (0-600 $\mu\text{g/mL}$). b) Soluciones de CDs con NCs Au bajo luz ultravioleta.⁴³

Los puntos cuánticos se utilizaron como donadores de energía, fueron excitados a una longitud de onda de 345 nm y presentaron una emisión a 465 nm (Figura 23). Esta energía de emisión es suficiente para excitar al NCs y que presente fluorescencia, donde ocurre una eficiencia en la transferencia de energía del 65.7%. Después la fluorescencia del NCs es abatida por completo en presencia de 200 μM de cisteína y al mismo tiempo la emisión del CDs se recupera. Las condiciones del sistema fueron optimizadas para obtener un límite de detección de 100 nM. Este ensamble podría utilizarse para detectar cisteína en sueros o muestras reales, debido a su respuesta selectiva y sensibilidad alta mostrando un potencial en aplicaciones prácticas. Los ejemplos anteriores muestran la diversidad de ensambles FRET que pueden desarrollarse, para ello se debe tomar en cuenta las propiedades ópticas de los materiales, así como las interacciones supramoleculares que se logren presentar entre el sensor y el analito.

3.8 Hipótesis

La síntesis de NCs fluorescentes de metales de transición de costos bajos como Ag y Cu permitirá desarrollar una clase de nanosensores no tóxicos para la identificación de especies de interés biológico y ambiental, como iones metálicos, ácido fólico y de pH. El desarrollo de ensambles FRET basados en nanoclusters metálicos con otras especies fluorescentes permitirán desarrollar nanosensores nuevos más sensibles y específicos.

IV. EXPERIMENTAL

4.1 Equipos:

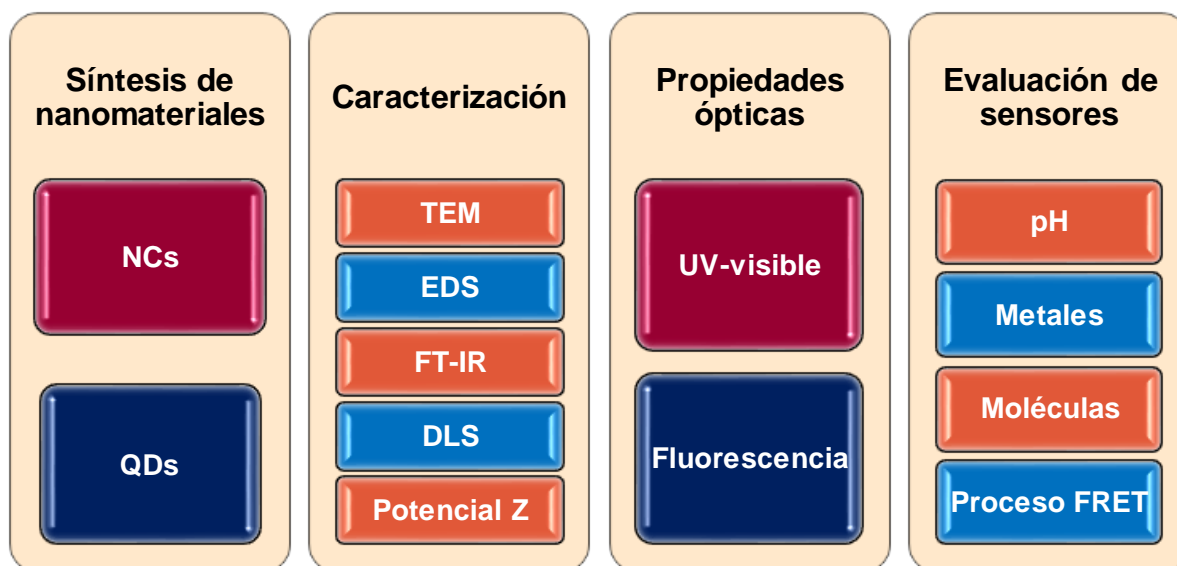
- ❖ Espectrofotómetro de fluorescencia Varian, modelo Cary Eclipse
- ❖ Espectrofotómetro de UV/visible de doble haz Shimadzu, modelo UV2700
- ❖ Equipo de dispersión de luz dinámica Horiba Scientific, ZetaSizer 100
- ❖ Espectrofotómetro de infrarrojo, Perkin Elmer FT-IR Spectrum 400
- ❖ Potenciometro con electrodo de pH Denver, UP-5

4.2 Reactivos:

- ❖ Albúmina de suero bovino (BSA) Sigma-Aldrich
- ❖ Ácido ascórbico (AA) Sigma-Aldrich
- ❖ $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ Sigma-Aldrich
- ❖ AgNO_3 Fermot
- ❖ NaBH_4 Sigma-Aldrich
- ❖ β -Ciclodextrina Sigma-Aldrich
- ❖ Polietilenimina Mw~800 Sigma-Aldrich
- ❖ Polietilenimina Mw~10 000 Sigma -Aldrich
- ❖ NaOH Fermot
- ❖ CdCl_2 Sigma-Aldrich
- ❖ Glutación (GSH) Sigma-Aldrich
- ❖ K_2TeO_3 Sigma-Aldrich
- ❖ Ácido mercaptopropiónico (AMP) Sigma-Aldrich
- ❖ $\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Sigma-Aldrich
- ❖ Tiourea Sigma-Aldrich
- ❖ Hidracina Sigma-Aldrich
- ❖ Colesterol Sigma-Aldrich
- ❖ NPs de Cu, APS 20-50 nm Sigma-Aldrich
- ❖ NPs de Ag, APS 20-40 nm Sigma-Aldrich

4.3 Etapas experimentales

El primer paso de la metodología es realizar la síntesis y caracterización de los NCs funcionalizados con PEI y BSA, además de los QDs funcionalizados con AMP, GHS y CA. Una vez que se obtienen los nanomateriales se evalúan sus propiedades ópticas y su aplicación como nanosensores de diferentes especies.



4.4 Síntesis de QDs de CdTe

La síntesis de puntos cuánticos se llevó a cabo en un matraz de fondo redondo disolviendo 0.2 mmoles de CdCl_2 con 0.2 mmoles del ligando tiolado (AMP o GSH) en 50 mL de agua, después se ajusta el pH a 10 con NaOH 1 M dejando en agitación 10 min. Transcurrido el tiempo, se añaden lentamente 25 mL con 0.04 mmoles de K_2TeO_3 , se mantiene la agitación por otros 10 min, se agregan 25 mL con 2.1 mmoles de NaBH_4 lentamente y se mantiene la reacción a reflujo. Finalmente, los QDs se purifican precipitando con acetona y por centrifugación a 4000 rpm por 40 min.⁴²

4.5 Síntesis de NCs recubiertos con BSA

La síntesis de NCs Au-BSA se realizó mezclando 5 mL de una solución de BSA (50 mg/mL) con 5 mL de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ o CuNO_3 (10 mM) y se dejó en agitación 30

minutos, después se ajustó el pH a 10 con una solución de NaOH 1 M dejando reaccionar por 24 h a 40 °C. La solución final se centrifugó a 4000 rpm por 40 minutos para eliminar partículas grandes y finalmente se utilizó un proceso de diálisis por 1 h con una membrana MWCO de 3.5 kD.¹³

4.6 Síntesis de nanoclusters de Ag con PEI

Para estos nanomateriales se utilizó la metodología de Xu y colaboradores⁶ con algunas modificaciones. Se preparó una solución acuosa de PEI y AgNO₃, se dejó en agitación 1 h, se añadió ácido ascórbico (AA) y se ajustó el pH con una solución de NaOH o HCl 1 M. La reacción se llevó a cabo por un proceso hidrotérmico a 90 °C en una autoclave de teflón. El producto de reacción se centrifugó a 4000 rpm por 40 minutos para eliminar partículas grandes y después se llevó a un proceso de diálisis por 1 h con una membrana MWCO de 3.5 kD.

4.7 Síntesis de nanoclusters de Cu con PEI

La síntesis de los NCs de Cu se realizó de acuerdo con lo reportado por Liu⁴⁴ y colaboradores con algunas modificaciones. En un matraz bola se añadió 15 mL de una solución acuosa de PEI 47 mgmL⁻¹, después se agregó lentamente 3 mL de una solución de CuSO₄ al 43 mM y se dejó en agitación vigorosa por 20 min. Por otro lado, se diluyeron 20 µL de hidracina en 2 mL de agua para añadirlos al matraz bola lentamente. La reacción se dejó a reflujo a 100 °C por 24 h. El producto de reacción se llevó a un proceso de diálisis por 1 h con una membrana MWCO de 3.5 kD.

4.8 Síntesis de puntos cuánticos de carbono con PEI

La síntesis de los CDs se realizó de acuerdo con lo reportado por Xu⁴⁵ y colaboradores con algunas modificaciones. El material utilizado como precursor de clorofila fueron hojas de maíz, las cuales fueron sumergidas en etanol para su posterior extracción y secado. Se realizó la solución acuosa de clorofila (4.9 mg/mL) y se agregó a otra solución de PEI (0.52 mg/mL) en agitación constante. La mezcla se llevó a sonicación por 10 min y después al reactor hidrotérmico por 20 h. El

producto de reacción se centrifugó a 4000 rpm por 30 min y se llevó a un proceso de diálisis con una membrana MWCO de 3.5 kD por 30 min.

4.9 Síntesis de NCs recubiertos con β -ciclodextrina

La síntesis de NCs con carácter hidrofóbico recubiertos con β -ciclodextrina se realizó con algunas modificaciones a lo reportado por Xu y colaboradores.⁴⁶ Se realizó la solución del precursor metálico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ o AgNO_3) al 1 mM, se tomaron 10 mL para su calentamiento a 70°C, después bajo agitación vigorosa se añadieron 1.57 g de β -ciclodextrina. Finalmente, se añadieron 2 mL de NaOH (1 M) y se dejó reaccionar por 6 h. El material se purificó por centrifugación a 4 000 rpm por 20 minutos para eliminar partículas grandes y se colocó en diálisis por 12 h para eliminar el reactivo que no haya reaccionado.

4.10 Síntesis de QDs de CdS

Los puntos cuánticos de CdS se sintetizaron utilizando un reactor hidrotérmico de acuerdo con lo reportado por Aboulaich⁴⁷ y colaboradores. Se preparó una solución de 0.088 mmoles de $\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 0.15 mmoles de tiourea en 7 mL de agua destilada. Después se agregan 10 mL de una solución 0.2 mmoles de AMP, se ajusta el pH de la reacción a 10 con una solución de NaOH 1 M y se burbujea con N_2 por 30 min. La reacción se transfiere a una autoclave de teflón y se deja reaccionar por 30 minutos a 100 °C.

4.11 Caracterización de los nanomateriales

Las propiedades luminiscentes de los nanomateriales se evaluaron por Fluorescencia molecular y espectroscopia UV-visible. Se obtuvo el material en sólido por liofilización y se realizaron mediciones por espectroscopia de FT-IR para conocer su modificación superficial. Además, se realizaron estudios por dispersión de luz dinámica (DLS) para conocer el diámetro hidrodinámico de los NCs, la preparación de la muestra se realizó por medio de una dilución del producto de reacción en agua con una relación 1:100 respectivamente, utilizando un índice de refracción de 0.636, 0.135 y 0.20 para los NCs de Cu, Ag y Au respectivamente.

Para las mediciones en el equipo de potencial Z la preparación de la muestra se realizó con las mismas cantidades mencionadas para DLS.

Para obtener el diámetro real de la partícula se realizaron estudios por microscopia electrónica de transmisión, la muestra se preparó utilizando una solución de 1 mg de nanomaterial liofilizado en 1 mL de metanol, se dispersó por medio de ultrasonido para finalmente colocar 30 μ L sobre una rejilla de Cu o de Ni con membrana de carbono y dejar secar a temperatura ambiente.

4.12 Reconocimiento de analitos y pruebas analíticas

Para los estudios de reconocimiento de analitos, se utilizó una solución madre del nanomaterial en donde se tituló sucesivamente con adiciones de la solución del analito (3 mM), se agitó por 1 min y se midió su espectro de fluorescencia. Después se realizó un tratamiento de datos por medio de la ecuación de Stern-Volmer (4) para conocer el tipo y la constante de abatimiento.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] \quad (4)$$

Donde:

F_0 = Intensidad de fluorescencia en ausencia del abatidor

F = Intensidad de fluorescencia en presencia del abatidor

K_{SV} = Constante de Stern-Volmer

Los analitos evaluados fueron:

Metales: Na^+ , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} y Hg^{2+}

Aniones: Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- y anión Acetato

Moléculas: Ácido fólico, colesterol, triptófano, BSA

En el caso de los estudios con la molécula de colesterol, la solución madre se realizó en etanol para mejorar la solubilidad del analito en la solución acuosa del sensor fluorescente.

4.13 Estudios de pH

Los estudios de pH se realizaron preparando una solución de 5 mL con 400 μ L de la reacción de los NCs, después del proceso de diálisis. Los espectros de emisión se obtuvieron a diferentes pH ajustando con soluciones de NaOH y HCl 1 M. Se utilizó un slit de 10 nm para estos estudios. Para las muestras reales se cambió el volumen de agua destilada por la muestra real utilizando la misma cantidad de NCs. Para conocer el pH real de las muestras se utilizó un electrodo de pH Denver.

4.14 Estudios Electroquímicos

Los estudios electroquímicos se realizaron en un potenciostato/galvanostato Biologic VMP-300 con un sistema de tres electrodos. Electrodo de carbón vítreo como electrodo de trabajo, Ag/AgCl sat. KCl como electrodo de referencia y un alambre de Pt como contraelectrodo.

Las soluciones se preparan con alícuotas de 200 μ L de la solución madre de NCs o 2.5 mg/mL de PEI ajustando el pH con HCl o NaOH (1 M) que también funciona como electrolito. Las voltamperometrías cíclicas se realizan a 100 mVs⁻¹ con burbujeo de N₂ constante.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostrados a continuación están divididos en tres etapas. Primero se muestra la síntesis y caracterización de QDs de CdTe recubiertos con glutatión, ácido mercaptopropiónico y cisteamina. Por otra parte, se presenta la síntesis y caracterización de NCs metálicos diferentes, estudiando condiciones de reacción y estabilidad. Después se presentan estudios de NCs de Ag y Cu como sensores y ensambles FRET. Por último, la síntesis y aplicación de otros sistemas fluorescentes.

5.1. Síntesis y caracterización de QDs de CdTe

Se inició con la síntesis de una biblioteca de QDs de CdTe variando el ligando y los tiempos de reacción debido al interés de realizar ensambles entre los NCs metálicos y otros sistemas fluorescentes, ya que estos presentan fotoestabilidad alta y rendimientos cuánticos elevados. La síntesis se lleva a cabo en medio acuoso en etapas diferentes. Primero ocurre la coordinación de los iones Cd^{2+} con el ligando tiolado (AMP, GSH o CA) a un pH adecuado, seguida de la adición del precursor de Te y el agente reductor para dar lugar a la nucleación de las nanopartículas, cuyo tamaño se ve afectado por los tiempos de reacción.

En la Figura 24 se presentan las bandas de absorción UV-vis y emisión de fluorescencia de los QDs recubiertos con ligandos diferentes. Las bandas de emisión son más estrechas cuando se utiliza GSH indicando una distribución de tamaños más homogénea. Además, se aprecia un desplazamiento hacia el rojo en la longitud de onda de emisión desde 495 a 620 nm, característico del aumento de tamaño del punto cuántico. Este cambio de tamaño también se puede identificar debido al cambio de color en la solución de los QDs. En la Figura 25 se muestran las fotografías de los QDs-GSH, QDs-AMP y QDs-CA bajo luz UV.

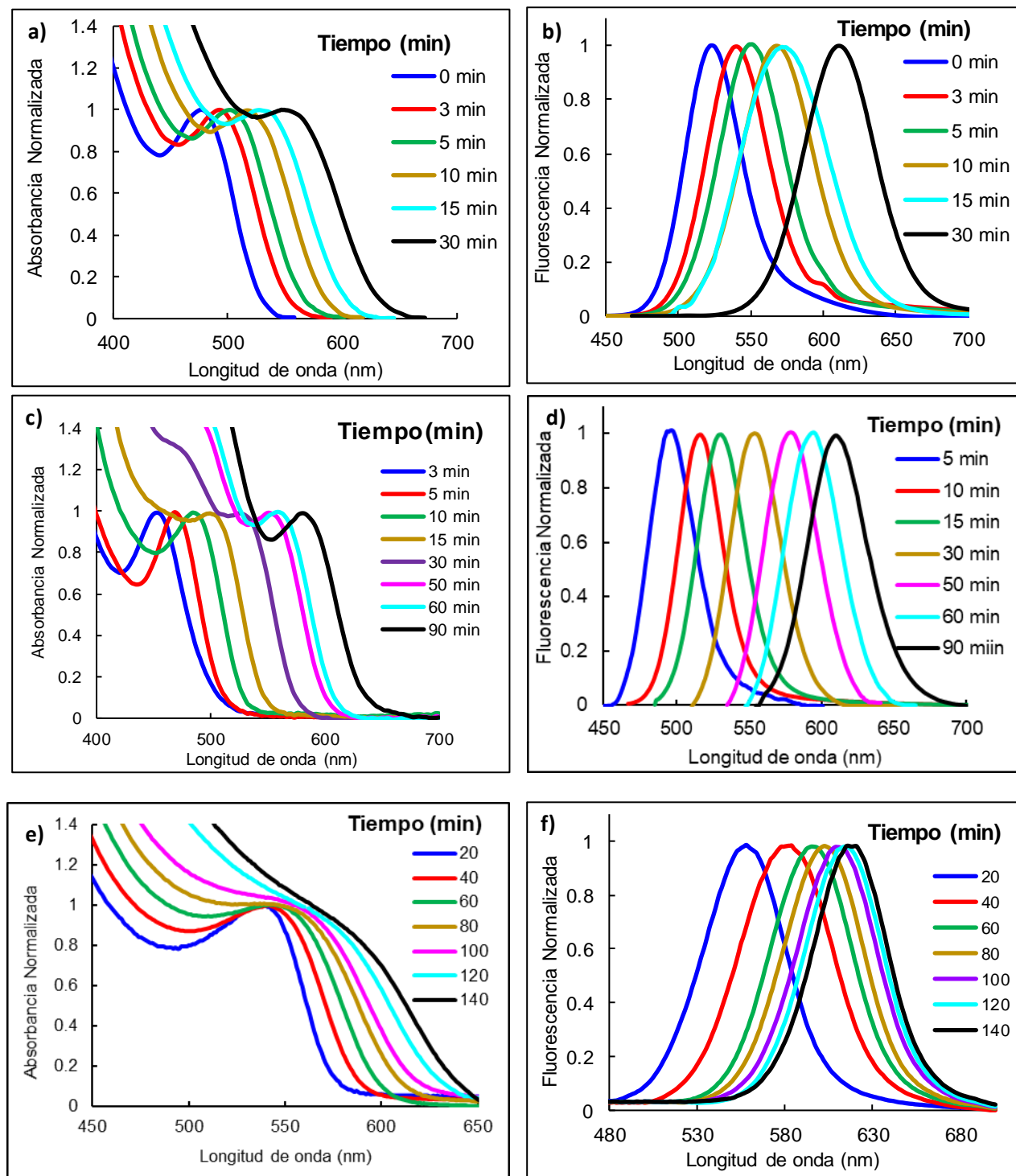


Figura 24. Espectros de absorción UV-Vis y fluorescencia de QDs-CdTe con AMP (a y b) GSH (c y d) y CA (e y f).

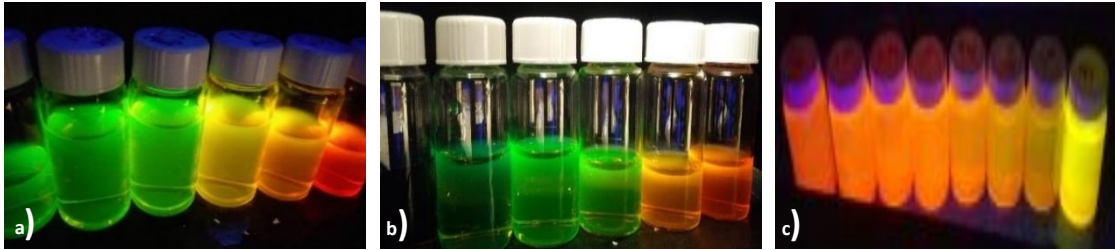


Figura 25. Fotografías bajo luz UV de QDs de CdTe con a) AMP, b) GSH y c) CA.

En la Tabla 1 se presentan los resultados anteriores, con las longitudes de onda de absorción y emisión de fluorescencia a los tiempos de reacción diferentes. Los diámetros promedio y las absortividades molares se calculan utilizando los polinomios de Peng.²⁰

Las siguientes ecuaciones se utilizan para QDs de CdTe:

$$D = (9.8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1.7147 \times 10^{-3})\lambda^2 + (1.0065)\lambda - 194.84 \quad (5)$$

$$\varepsilon = 10043(D)^{2.12} \quad (6)$$

Donde λ es la longitud de onda de absorción del punto cuántico.

Tabla 1. Propiedades ópticas de los QDs de CdTe

	Tiempo de reacción (min)	λ_{ABS} (nm)	Diámetro (nm)	Absortividad ϵ ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	λ_{EM} (nm)
CA	20	540	3.1	112383.8	558
	40	550	3.2	121562.7	582
	60	554	3.3	124882.2	599
	80	559	3.3	128792.4	605
	100	561	3.4	130291.2	611
	120	565	3.4	133193.5	614
	140	577	3.5	141381.7	618
AMP	3	498	2.3	58035.7	541
	5	508	2.6	73064.2	548
	10	532	3.0	104012.5	557
	15	558	3.3	128029.8	573
	30	562	3.4	131028.1	597
GSH	3	455	0.5	2493.4	-
	5	470	1.3	16646.5	495
	10	491	2.0	47175.7	515
	15	508	2.6	73064.2	529
	30	533	3.0	105112.2	553
	50	544	3.2	116216.9	580
	60	562	3.4	131028.1	586
90	580	3.5	143371.7	610	

El diámetro del punto cuántico aumenta a mayores tiempos de reacción acompañado de un cambio de color en la solución de verde a rojo como se reporta en la literatura. Es notorio que la nucleación de las nanopartículas es más rápida con la cisteamina. En los primeros minutos de reacción se obtiene un tamaño de partícula de 3.1 nm aproximadamente, con emisión a 558 nm, el diámetro llega hasta 3.5 nm al aumentar los tiempos de reacción. Para los QDs con AMP y GSH el crecimiento es más lento, ya que los primeros QDs obtenidos son de 2.3 y 1.3 nm respectivamente. Este resultado puede atribuirse a la estructura del ligando (Figura 26), el glutatión es la molécula más voluminosa, por lo que involucra un impedimento estérico mayor para la formación de los núcleos de CdTe, prolongando la etapa de maduración de la nanopartícula y favoreciendo la formación de puntos cuánticos más pequeños, mientras que la cisteamina al ser la molécula más pequeña produce los QDs a tiempos de reacción menores.⁴⁸

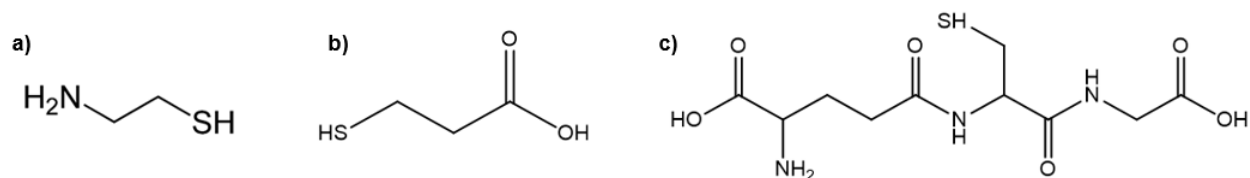


Figura 26. Estructuras de a) cisteamina b) ácido mercaptopropiónico y c) glutatión.

Se realizaron los espectros FTIR de los QDs de CdTe con AMP, GHS y CA con el fin de identificar los grupos funcionales de los puntos cuánticos obtenidos y confirmar su recubrimiento con los ligandos diferentes, los cuales se muestran en la Figura 27.

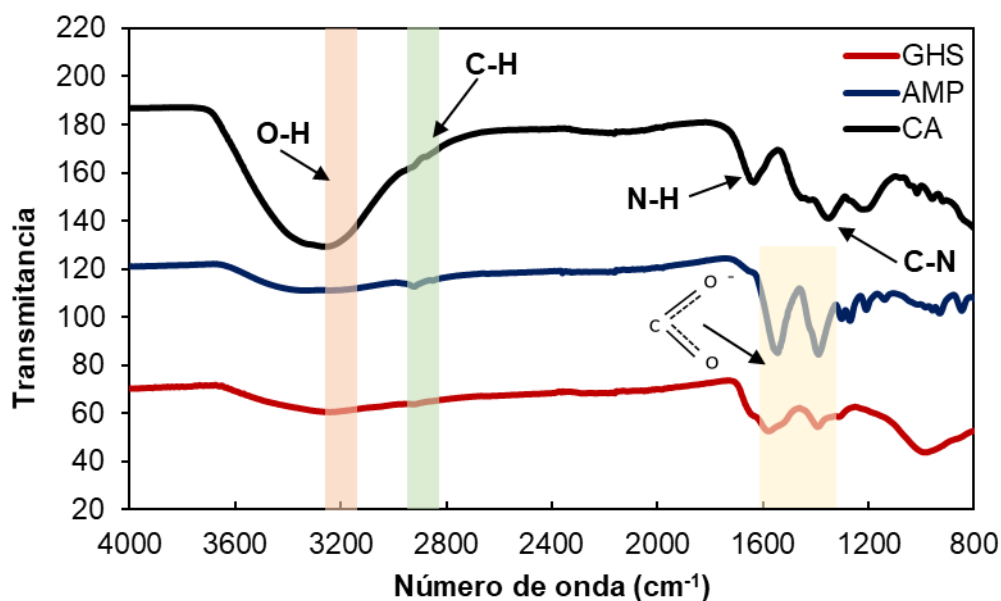


Figura 27. Espectros de FTIR para QDs de CdTe con AMP, GHS y CA.

En los tres espectros se presenta una señal alrededor de 3200 cm^{-1} atribuida al estiramiento del enlace O-H. En los QDs-CA la señal es más intensa y ancha debido a humedad y traslape con la señal de estiramiento del enlace N-H de la cisteamina. La señal correspondiente a la vibración de flexión de N-H se presenta a

1620 cm^{-1} así como la señal de vibración del enlace C-N a 1340 cm^{-1} . También se presenta una banda a 2925 cm^{-1} debido al estiramiento del enlace C-H alifático para los tres casos. Con AMP se observan dos bandas alrededor de 1600 y 1377 cm^{-1} , atribuidos al estiramiento del enlace COO^- asimétrico y simétrico respectivamente. Con glutatión estas señales son de intensidad menor, debido a que puede solaparse con la vibración de flexión del enlace N-H para aminas primarias y secundarias (1500-1640 cm^{-1}) presentes en este compuesto.

5.2. Síntesis y caracterización de NCs recubiertos con BSA

5.2.1 NCs de Au-BSA

Se sintetizaron NCs de Au recubiertos con BSA utilizando la metodología de Yingm y colaboradores con algunas modificaciones.¹³ De acuerdo con este procedimiento primero ocurre la formación de un complejo entre los iones Au^{3+} y los 34 residuos de cisteína de la proteína. Este aminoácido tiene un grupo tiol susceptible a la oxidación y cuando se ajusta el pH a un valor mayor de 10 inicia la reducción de los iones formando los NCs (Figura 28).

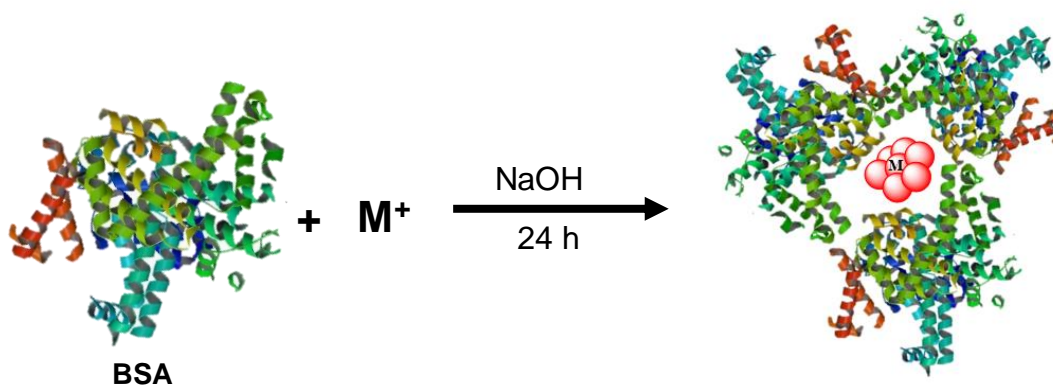


Figura 28. Esquema de la formación de NCs de Au-BSA.

En la Figura 29 se muestra el espectro de absorción de los NCs de Au, donde se observa una banda a los 280 nm mientras que la banda de emisión presenta un máximo a 648 nm, resultados muy similares a los reportados en la literatura.^{12,13} La

ecuación 1 se utilizó para calcular el número de átomos de Au en el NCs, con un valor de $E_{Fermi} = 5.53$ eV el cual presenta una cantidad de 24 átomos en la estructura del NCs.

En la Figura 30 se muestran los estudios por DLS para identificar el tamaño de la partícula, en la curva se aprecia un diámetro promedio de 8.7 nm. Aunque el tamaño es mayor al reportado en los NCs (5 nm), indispensable para que ocurra el efecto de confinamiento cuántico y se presente la fluorescencia, los estudios por DLS son realizados en medio acuoso por lo que se obtiene un diámetro hidrodinámico.

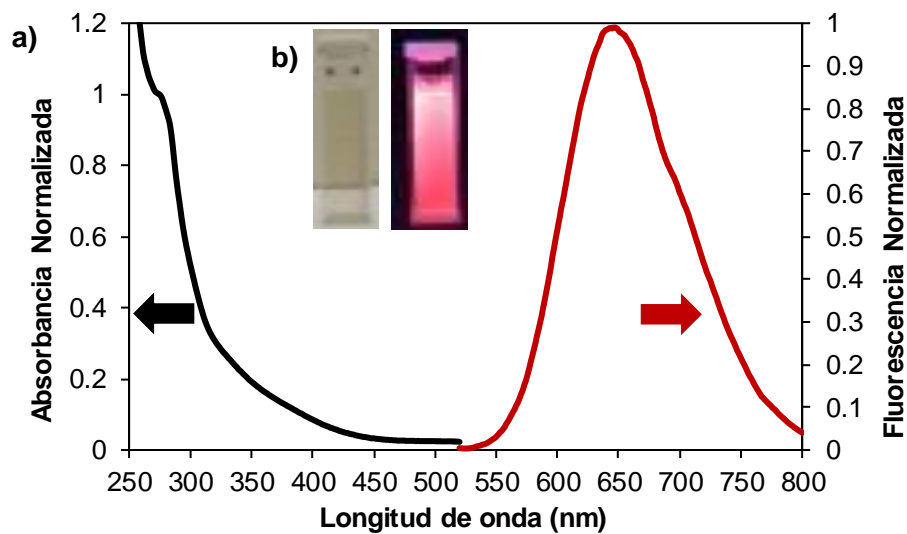


Figura 29. a) Espectros UV-visible y de fluorescencia molecular de NCs de Au-BSA, b) NCs de Au bajo luz visible y luz UV.

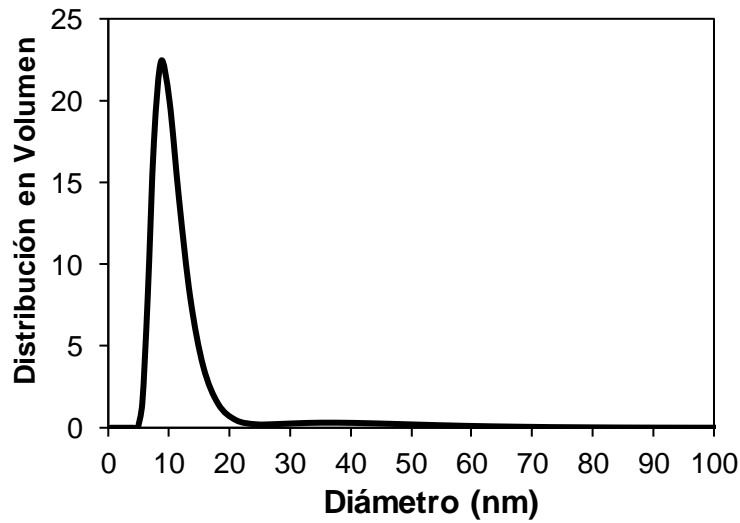


Figura 30. Distribución de tamaños por DLS de NCs Au-BSA.

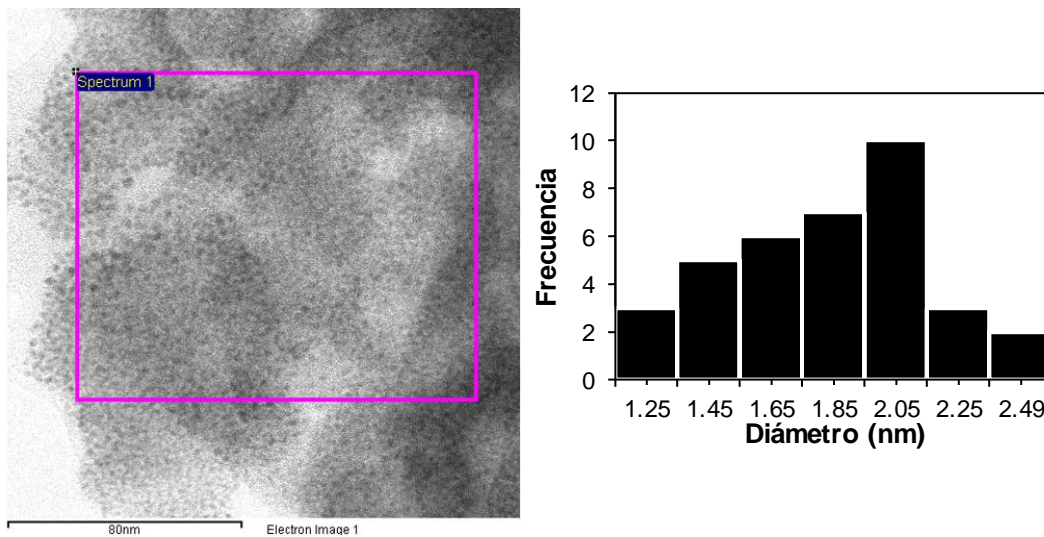


Figura 31. Micrografía TEM y distribución de tamaños de NCs Au-BSA.

Para complementar estos resultados se realizaron caracterizaciones por microscopía electrónica de transmisión y espectroscopía de energía dispersiva. En la Figura 31 se aprecian los NCs de Au de morfología esférica con un diámetro promedio de 1.8 ± 0.3 nm. Los estudios por EDS muestra los picos característicos

de los rayos X emitidos del Au confirmando el análisis estructural y del Cl proveniente del precursor metálico $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ utilizado en la síntesis (Figura 32).

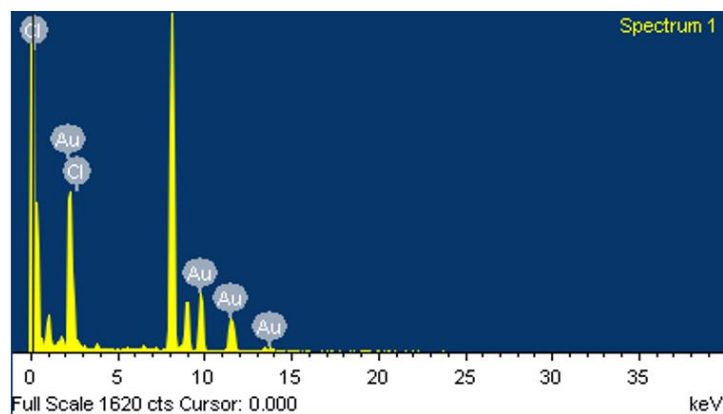


Figura 32. Espectro EDS de NCs Au-BSA.

Se realizaron estudios de potencial Z con el fin de conocer la carga superficial de los NCs para su aplicación como sensores y desarrollo de ensambles FRET. En la Figura 33 se muestra la respuesta de los NCs de Au al pH, donde se observa que estos nanomateriales presentan una carga superficial negativa en la mayoría de los valores y un punto isoeléctrico alrededor de 4.8. Estos resultados son similares a lo reportado en la literatura sobre la estructura de la albúmina. Esta proteína posee tres dominios con densidad electrónica variable, debido a la presencia de aminoácidos como el ácido glutámico y el ácido aspártico, la BSA presenta carga negativa en medio neutro, mientras que en condiciones ácidas presenta carga positiva debido a los residuos de lisina e histidina.^{49,50}

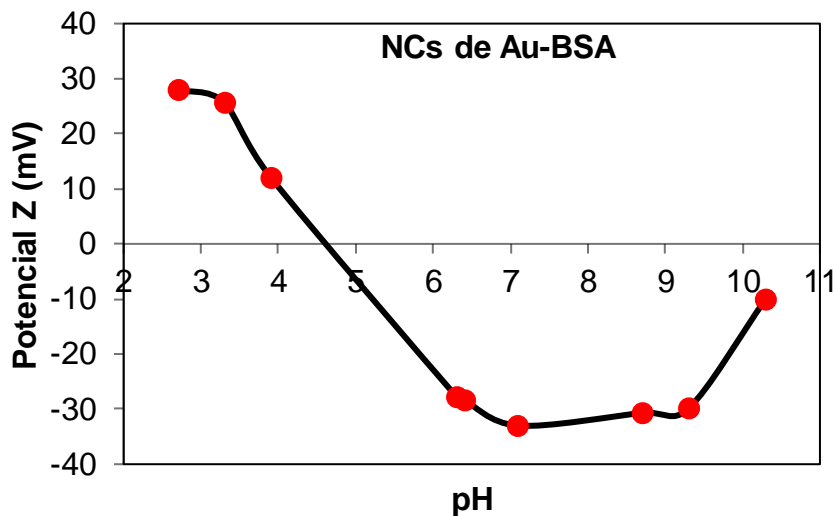


Figura 33. Potencial Z de los NCs de Au-BSA a valores de pH diferentes.

5.2.2 NCs de Cu-BSA

La síntesis de NCs de Cu con BSA se realizó con una metodología similar a la de los NCs de Au con el fin de tener NCs con emisiones en longitudes de onda diferentes. Las propiedades ópticas se presentan en la Figura 34, indicando una emisión máxima a una longitud de onda de 415 nm y en consecuencia una cantidad de 13 átomos por clúster.

Mientras tanto los estudios por DLS de la Figura 35 demostraron la obtención de partículas con diámetros de 3.6 nm, confirmando la obtención de los NCs.

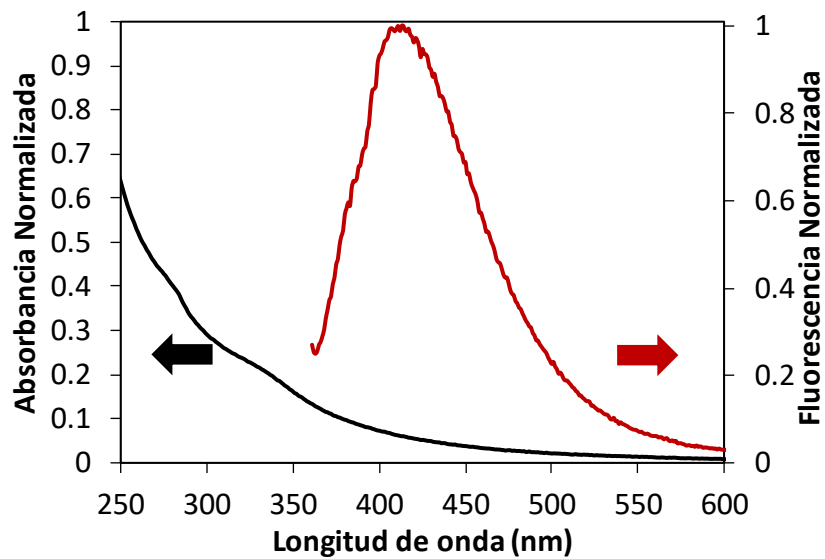


Figura 34. Espectros UV-visible y de Fluorescencia molecular de NCs de Cu-BSA

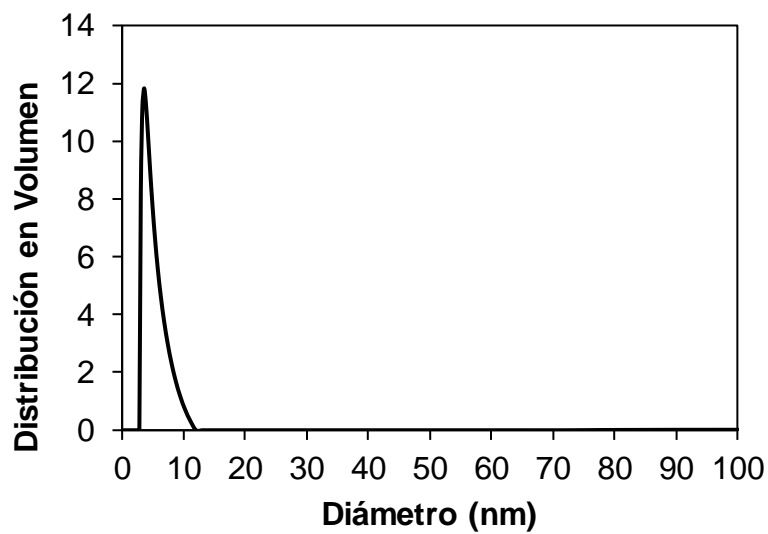


Figura 35. Distribución de tamaños por DLS de NCs de Cu-BSA

5.3. Síntesis y caracterización de los NCs recubiertos con PEI

5.3.1 NCs de Ag-PEI

Se sintetizaron NCs de Ag recubiertos con PEI por medio de un método hidrotérmico, basándose en la metodología de Xu y colaboradores.⁶ El mecanismo de reacción propuesto se presenta en la Figura 36 y puede describirse de la siguiente manera: primero ocurre la formación de un complejo entre los iones Ag^+ y los grupos amino del polímero. Después, se añade el ácido ascórbico (AA) que funciona como agente reductor de los iones metálicos. La PEI es un polímero ramificado que permite una dispersión buena de los NCs en la matriz, logrando un control en el diámetro de las partículas a un tamaño menor de 5 nm. La ventaja de esta síntesis es que se pueden obtener los nanomateriales a tiempos de reacción cortos.

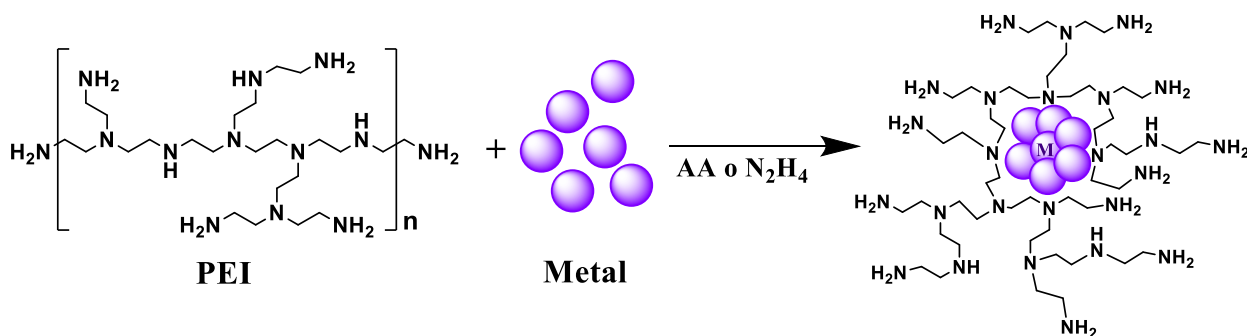


Figura 36. Esquema de la formación de los NCs de Ag con PEI.

En la Tabla 2 se muestran los parámetros estudiados en la síntesis de los NCs de Ag con el fin de obtener las mejores condiciones de reacción. Se variaron las concentraciones de PEI ($M_w = 10000$), AA, AgNO_3 y los tiempos de reacción. El valor N representa el número de átomos por nanocluster, calculado con la ecuación 1, $E_{\text{Fermi}} = 5.49$ eV para Ag y λ_{EM} es la longitud de onda donde se presenta la intensidad de fluorescencia máxima. La caracterización óptica se realizó por medio de espectroscopia UV-visible y fluorescencia.

Tabla 2. Parámetros de reacción para la síntesis de NCs de Ag con PEI (Mw = 10 000).

Síntesis	PEI	AA	AgNO ₃	Tiempo	λ_{EM} (nm)	N
1 Ag	2.5 mg/mL	0.5 M	2.5 mM	1 h	491	10
2 Ag	2.5 mg/mL	0.16 M	2.5 mM	1 h	504	11
3 Ag	5 mg/mL	0.16 M	2.5 mM	1 h	502	11
4 Ag	2.5 mg/mL	0.16 M	5 mM	1 h	516	12
5 Ag	2.5 mg/mL	0.16 M	2.5 mM	1.5 h	508	11

Una de las características principales de las nanopartículas metálicas es su resonancia de plasmón superficial que puede ser medido por medio de la técnica de UV-visible. Sin embargo, cuando estas partículas son más pequeñas se ha encontrado que la banda se desplaza o inclusive presenta valores bajos de absorbancia.¹⁹ En la Figura 37 se puede apreciar este comportamiento para los NCs sintetizados, lo cuales muestran una banda de absorción máxima alrededor de los 323 nm, mientras que para las nanopartículas de Ag se ha reportado un plasmón superficial entre 400 y 480 nm, aproximadamente.⁵¹⁻⁵⁴

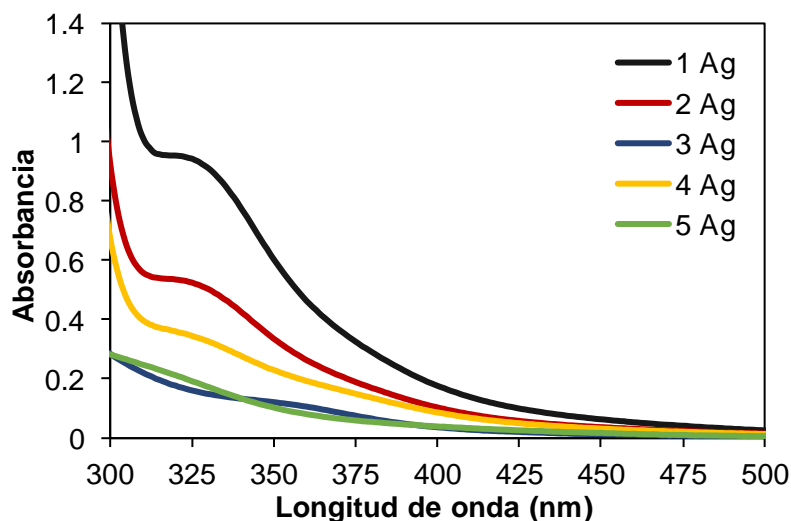


Figura 37. Espectros de absorción de los NCs de Ag

En la Figura 38, se presentan los espectros de fluorescencia de los NCs de Ag donde se modificaron parámetros diferentes. Lo primero que se estudió fue la concentración de AA; comparando los NCs **1 Ag** (0.5 M) y **2 Ag** (0.16 M) se tiene una intensidad de fluorescencia mayor donde se utilizó la concentración más alta. Sin embargo, no se escogió esta concentración debido a la formación de un precipitado en el producto de reacción, atribuido a la concentración alta de ácido ascórbico que no se disuelve totalmente en la solución. El siguiente parámetro que se estudió fue la concentración de PEI; comparando **2 Ag** (2.5 mgmL⁻¹) y **3 Ag** (5 mgmL⁻¹) se puede observar que las intensidades de fluorescencia son muy similares a pesar de utilizar una cantidad de polímero doble. Por lo que se continuó utilizando 2.5 mgmL⁻¹ de PEI.

El tercer parámetro estudiado fue la concentración de AgNO₃, ésta fue de 2.5 mM para **2 Ag** y 5 mM para **4 Ag**. Los espectros de fluorescencia muestran una disminución notable en la intensidad para **4 Ag**, debido a que a una concentración mayor de AgNO₃ se puede favorecer el crecimiento del NCs al de una nanopartícula. Y debido al desplazamiento de la banda de emisión hacia longitud de onda mayor, se obtiene un número mayor de átomos por clúster (N=12), además su banda de absorción disminuye respecto a los NCs anteriores indicando un cambio en las propiedades del NC.

El efecto en el tiempo de reacción se estudió con las condiciones encontradas anteriormente (PEI = 2.5 mgmL⁻¹, AgNO₃ = 2.5 mgmL⁻¹). A 90 minutos se sintetizó **5 Ag**, su espectro de fluorescencia presentó una disminución de intensidad comparándolo con **2 Ag** (60 min). Estos resultados indican que se desfavorece la reacción a tiempos mayores.

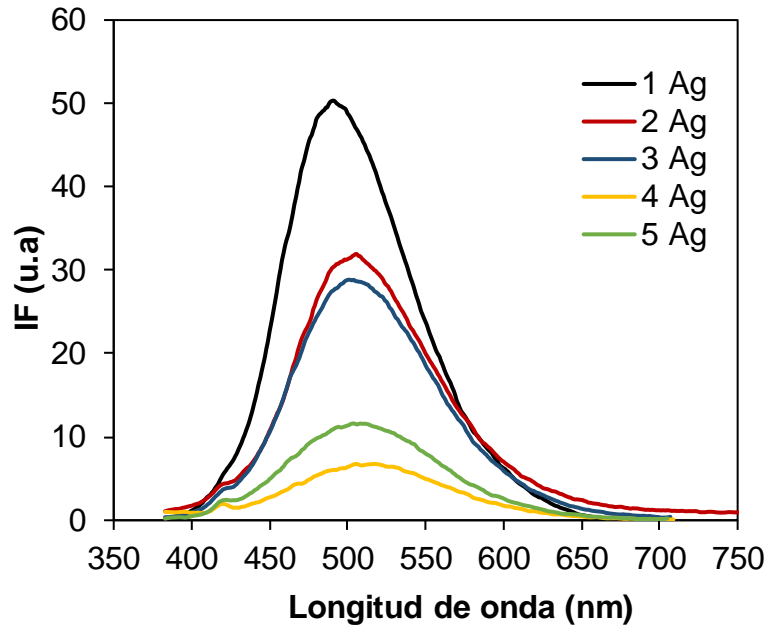


Figura 38. Espectros de emisión de fluorescencia de los NCs Ag con PEI a un slit de 5 nm.

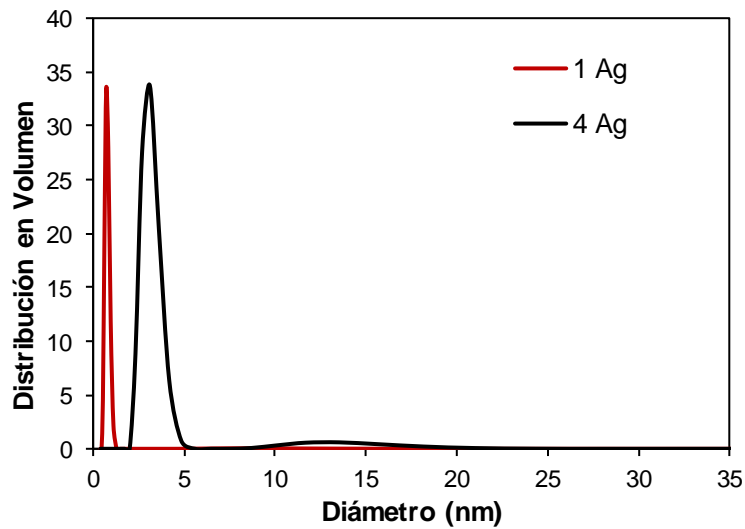


Figura 39. Distribución de tamaños por DLS de a) 1 Ag y b) 4 Ag.

En la Figura 39 se muestran los estudios por dispersión de luz dinámica con el fin de conocer el diámetro hidrodinámico. Los valores de diámetros obtenidos fueron de 0.71 nm para 1 Ag (N=10) y 3.1 nm para 3 Ag (N=11), hay que aclarar

que estos estudios se realizaron inmediatamente al finalizar la reacción y corroboran que al tener un tamaño de NCs más grande las propiedades fluorescentes son disminuidas debido a que el confinamiento cuántico no es tan fuerte.

Estos resultados proporcionan información sobre los parámetros que se podrían cambiar para optimizar la síntesis de estos nanomateriales. Por ejemplo, partir de concentraciones menores de AgNO_3 y evaluar en tiempos de reacción cortos. Sin embargo, al observar que no hubo mejora en las propiedades ópticas a partir de **2 Ag** se planteó seguir utilizando este NCs para las caracterizaciones posteriores y aplicaciones como nanosensor. Por lo que se cambió su nombre de **2 Ag** solo a NCs Ag-PEI.

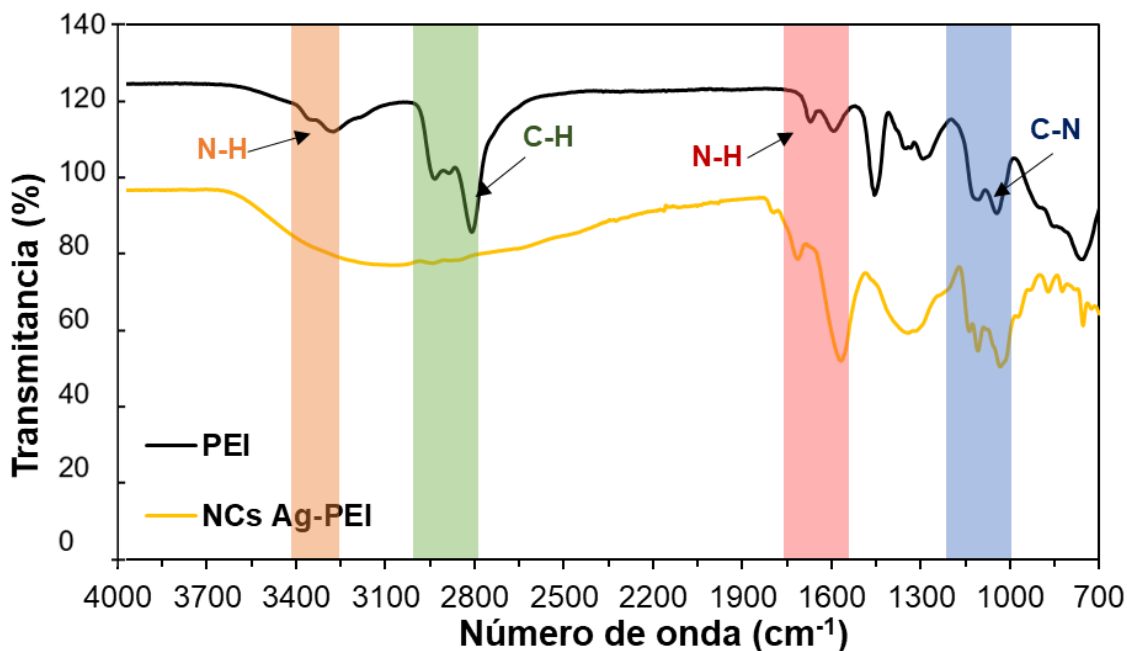


Figura 40. Espectro de FTIR de **2 Ag**.

Los NCs Ag-PEI se lograron obtener en sólido por un proceso de liofilizado, por lo que se continuó con su caracterización por espectroscopia de IR y microscopia electrónica. En la Figura 40 se muestra su espectro de infrarrojo para conocer la modificación superficial. Los resultados se comparan con el espectro de IR de la polietilenimina. Se presentan bandas de intensidad baja a 2930 y 2800 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos asimétricos y simétricos del enlace C-H, en 1100 cm^{-1} la vibración de estiramiento del enlace C-N proveniente de las cadenas

del polímero, una banda intensa alrededor de 1600 cm^{-1} de la vibración de flexión del enlace N-H, mientras que la señal de estiramiento del mismo enlace se encuentran en el intervalo $3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ que se encuentran traslapadas por la vibración del enlace O-H proveniente del agua que absorbe el material del ambiente.

Finalmente, se realizó la caracterización por microscopía electrónica de transmisión para conocer el tamaño real de los NCs mostrando las imágenes en la Figura 41, en donde se aprecia su morfología esférica.

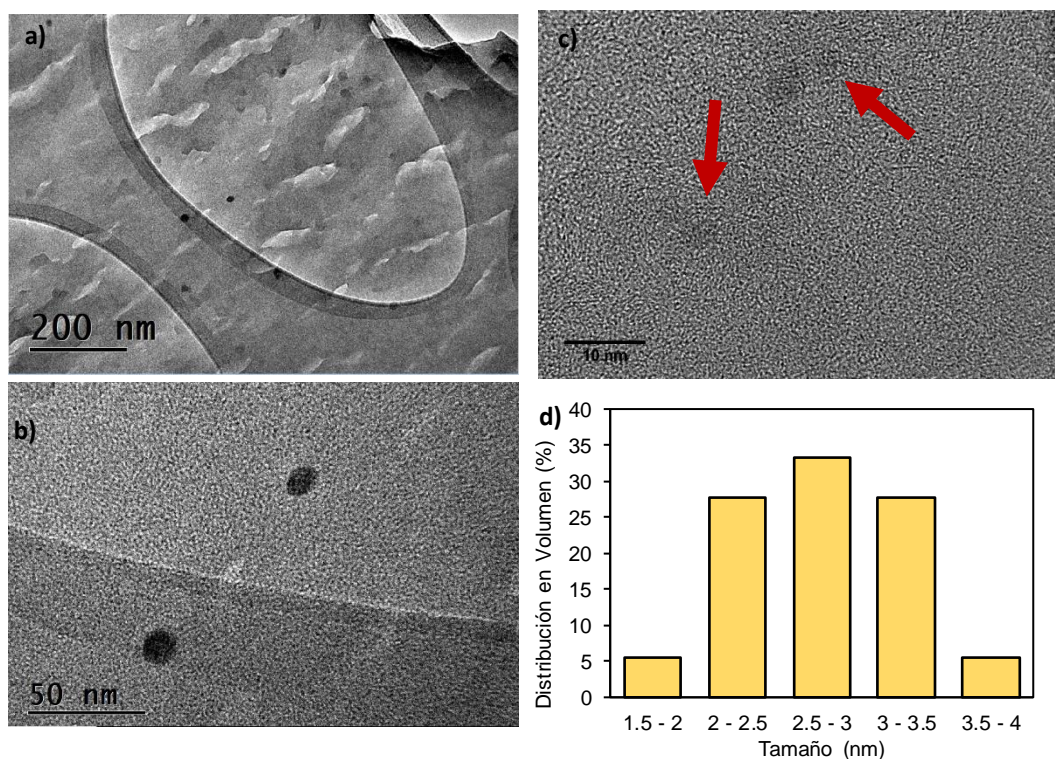


Figura 41. Micrográficas TEM y distribución de tamaños de NCs Ag-PEI.

En las micrográficas se logra observar una distribución amplia de tamaños, desde 2 hasta 20 nm ocasionadas por su aglomeración, consecuencia de su estabilidad baja (Figura 41c). Estos resultados coinciden con el diámetro hidrodinámico obtenido por DLS de la Figura 42. La distribución de tamaños con D_H de 3.1 nm, corresponden a la población de nanopartículas menores de 3 nm obtenidas por TEM, ya que el diámetro obtenido por DLS siempre es mayor al diámetro real.

Por otro lado, la ausencia de una distribución de tamaños mayores en la Figura 39 se atribuye a que estos estudios se realizaron en cuanto se obtuvieron los NCs por el método hidrotérmico. En la Figura 42 se muestran estudios de DLS del mismo material, pero después de un tiempo de almacenamiento prolongado, se observa una población de partículas mayor de 30 nm pero de intensidad baja y una distribución alta de nanopartículas alrededor de 6.8 nm. Estos resultados comprueban la presencia de nanopartículas con diámetros menores de 5 nm que producen el efecto de fluorescencia. Sin embargo, aún falta mejorar el estudio por microscopia electrónica para encontrar imágenes donde se logre apreciar más a detalle la población de tamaño menor.

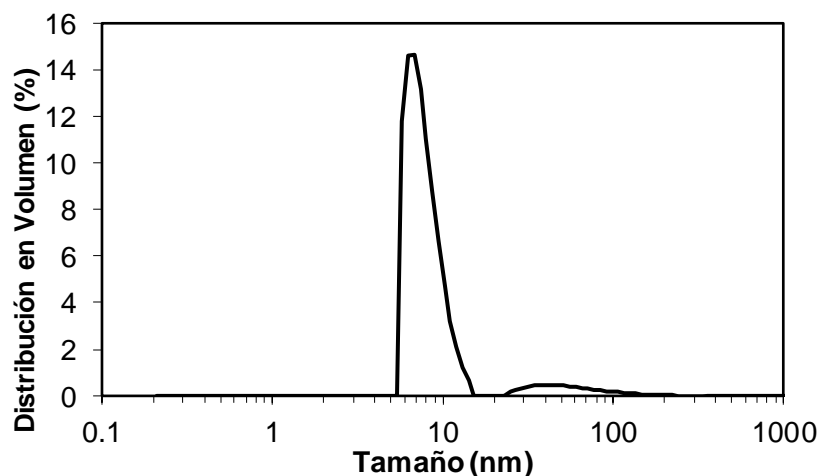
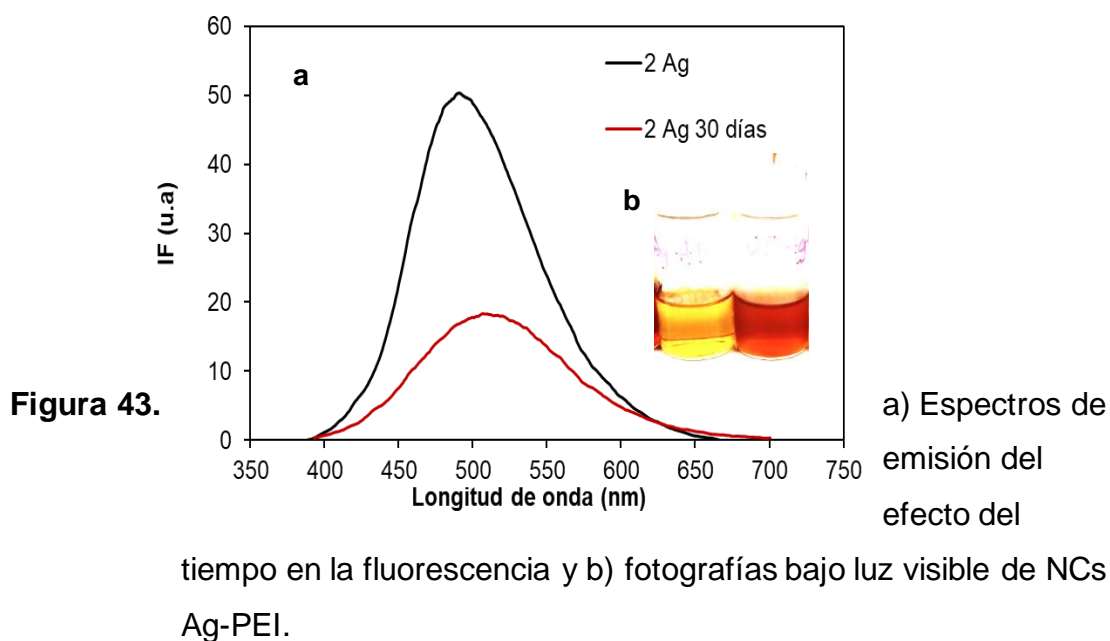


Figura 42. Distribución de tamaños por DLS de NCs Ag-PEI después de un tiempo de almacenamiento.

5.3.2 Estabilidad de los NCs de Ag

Después de un tiempo de almacenamiento, los NCs obtenidos mostraron un cambio de color y una disminución en su intensidad de fluorescencia como se muestra en la Figura 43. Después de 30 días de obtener los NCs Ag-PEI, la fluorescencia baja un 64 %. La pérdida de las propiedades fluorescentes puede ser atribuida a la descomposición fotoquímica del sistema a Ag elemental, que conlleva al oscurecimiento de la solución y a la dificultad de purificar el material mediante diálisis.²⁵ Debido a estos resultados la purificación fue optimizada, después de

obtener el producto de reacción se llevó a centrifugación (4 000 rpm) por 40 minutos evitando que el material se calentara, después a filtración con membrana y finalmente a diálisis por 40 minutos; cuidando estos parámetros se logra obtener NCs más estables ya que después de 1 año de almacenamiento su coloración se mantuvo amarilla sin oscurecerse.



Por último, se realizó una síntesis para conocer el efecto del polímero. Se utilizó PEI de peso molecular menor ($M_w = 800$) con los parámetros óptimos encontrados en la síntesis de NCs Ag-PEI para conocer el efecto del polímero en las propiedades ópticas. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros de reacción para la síntesis de NCs de Ag con PEI
(Mw= 800)

NC	pH	PEI	AA	AgNO ₃	λ_{EM} (nm)	N
12 Ag	3	2.5 mg/mL	0.16 M	2.5 mM	488	10
13 Ag	7	2.5 mg/mL	0.16 M	2.5 mM	485	10

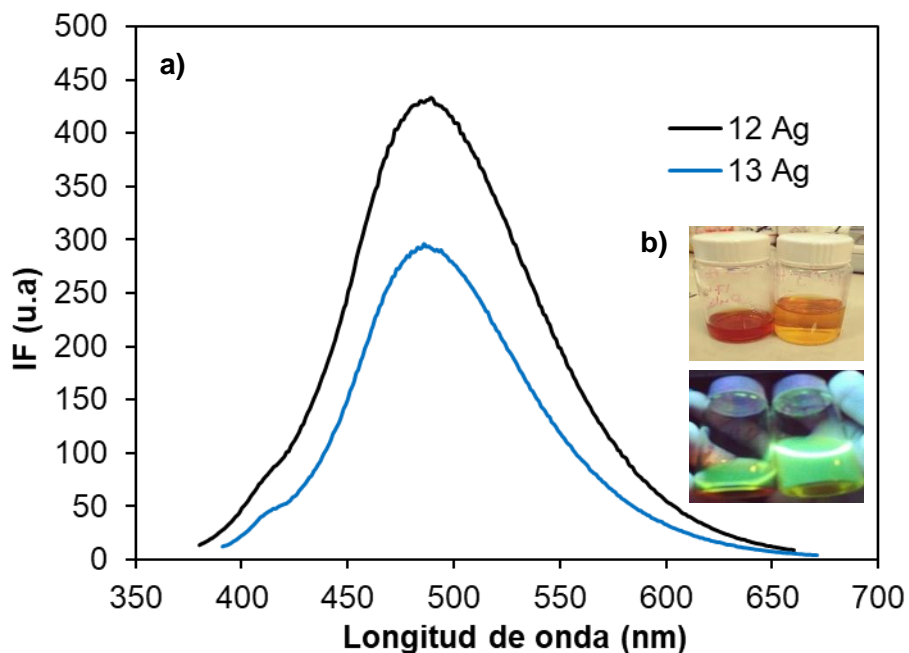


Figura 44. a) Espectros de Fluorescencia molecular de **12 Ag** y **13 Ag** (slit de 10 nm). b) Imágenes bajo luz visible y luz UV de los NCs.

En la Figura 44 se muestran las bandas de emisión de los NCs sintetizados, donde se obtuvo un espectro más estrecho en **13 Ag** indicando una distribución de tamaños más homogénea. La diferencia de **12** y **13 Ag** es la variación del pH en el medio de reacción antes de iniciar el proceso hidrotérmico. En ambos casos se obtienen valores de 10 átomos por clúster debido al desplazamiento hacia el azul en la longitud de onda de emisión a comparación de los materiales con PEI Mw = 10 000. En las fotografías bajo luz UV se aprecia que, si no hay un control en la

purificación, el material se descompone hasta llegar a una coloración marrón similar que el material anterior.

Los estudios anteriores no resultaron ser lo suficientemente buenos para reemplazar a los NCs con el PEI de peso molecular mayor, por ello se seleccionaron los NCs Ag-PEI etiquetados anteriormente como **2 Ag** como los NCs para su aplicación como sensor de pH y en los sistemas FRET.

5.3.3 NCs de Cu-PEI

La síntesis de NCs de Cu recubiertos con PEI se llevó a cabo basándose en lo reportado por Liu⁴⁴ y colaboradores, con algunas modificaciones. Esta metodología se basa en el uso de una reacción a reflujo utilizando hidracina como agente reductor. El mecanismo de reacción es similar al planteado para la síntesis de los NCs de Ag con el polímero PEI que sirve como matriz para el crecimiento de las partículas (Figura 45).

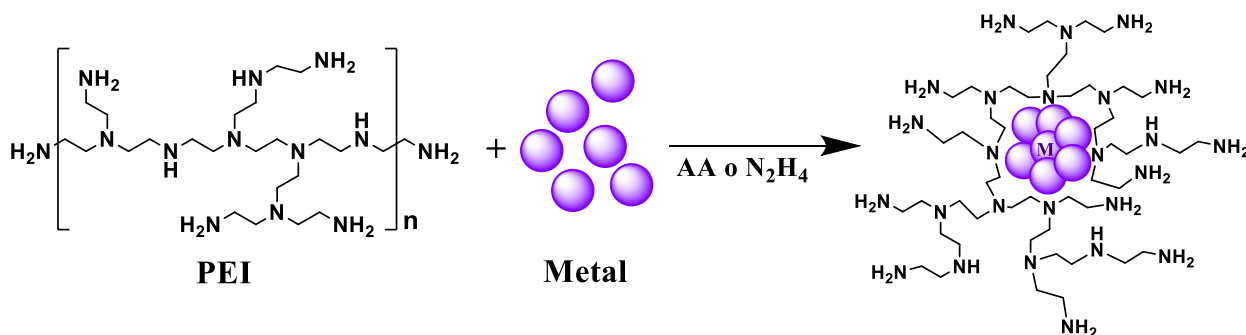


Figura 45. Esquema de la formación de los NCs de Cu con PEI.

En esta síntesis se estudió el tiempo de reacción para conocer su influencia en las propiedades ópticas, así como en el tamaño del nanocluster. En la tabla 4 se muestran los materiales sintetizados a tiempos de reacción diferentes. La reacción se monitoreó por UV-visible (Figura 46), observando que a 24 h el tiempo es suficiente para que se presente la banda alrededor de los 300 nm atribuida a la formación de los NCs. Además, se obtuvo la absorbancia máxima, por lo que se utilizaron estos NCs para las caracterizaciones posteriores y aplicaciones en la

identificación de iones metálicos y sistemas FRET. Se nombrará a continuación solo como NCs Cu-PEI.

Tabla 4. Parámetros de reacción para la síntesis de NCs de Cu

Reacción	Tiempo de Reacción	Absorbancia
1 Cu	12 h	-
2 Cu	24 h	0.724
3 Cu	36 h	0.492

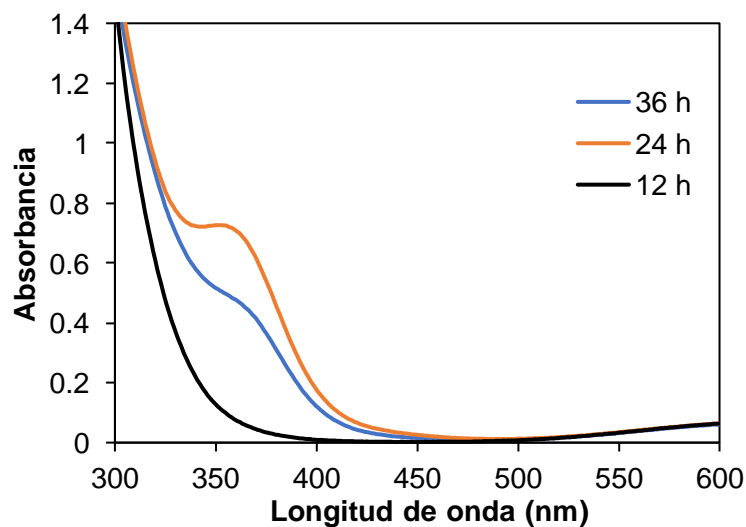


Figura 46. Espectros de absorción de los NCs de Cu.

En la Figura 47 se muestran los espectros de UV-visible y fluorescencia de los NCs sintetizados, se observa una banda de absorción a 360 nm atribuida a la presencia del NC de Cu, ésta se presenta a una longitud de onda menor que el plasmón superficial de las nanopartículas de Cu el cual ha sido reportado que se encuentra entre 560 y 600 nm.⁵⁵ En este caso también se puede apreciar que la absorbancia aumenta en este intervalo de longitud de onda, asumiendo que se puede tener una mezcla de ambos nanomateriales. Sin embargo, el espectro de excitación a 360 nm y emisión a 470 nm confirman la presencia de nanoclusters fluorescentes. Con la ecuación 1 y utilizando un valor de $E_{\text{Fermi}} = 7$ eV para el Cu, se obtuvo un valor aproximado de 19 átomos por NC.

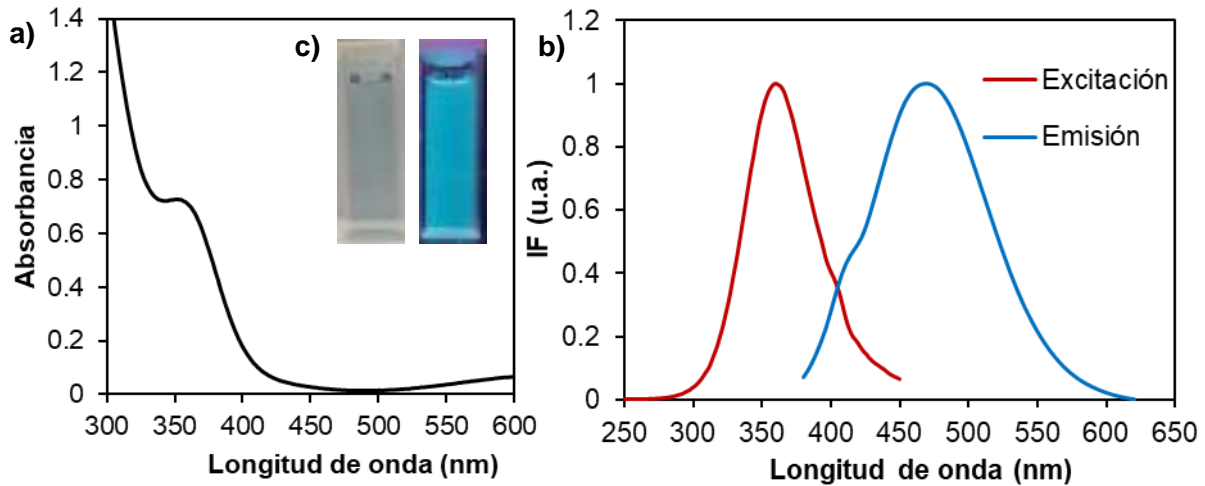


Figura 47. a) Espectros de UV-visible, b) fluorescencia molecular y c) fotografías bajo luz visible y UV De NCs Cu-PEI.

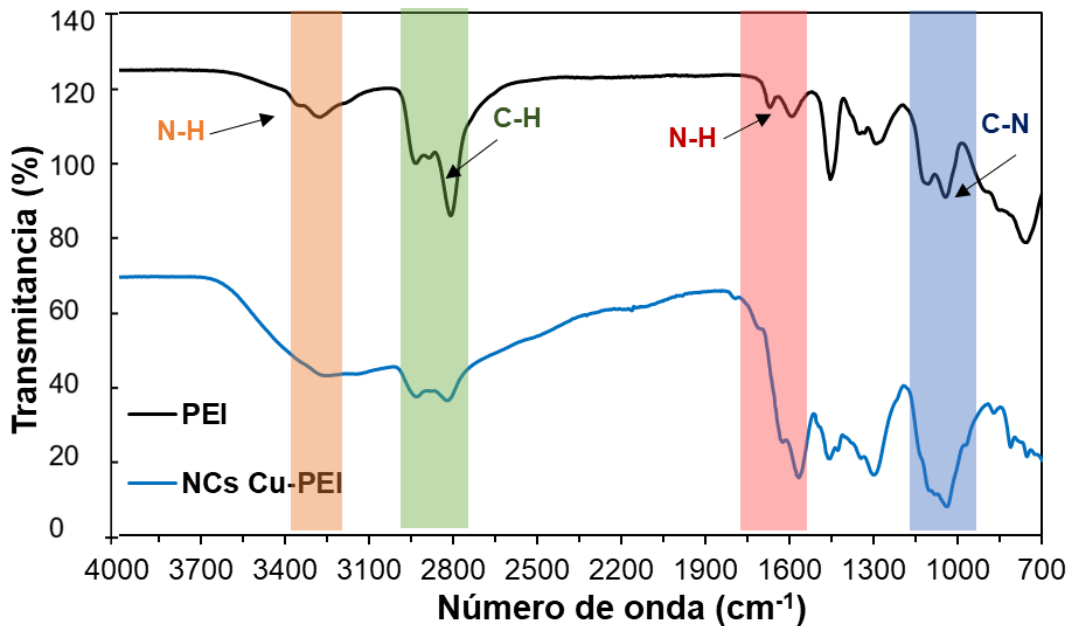


Figura 48. Espectro de FTIR para NCs Cu-PEI.

En la Figura 48 se muestra la caracterización por infrarrojo de los NCs para confirmar la funcionalización de su superficie. Los picos característicos son similares a los mostradas para el material NCs Ag-PEI, sin embargo cuando se llevó a cabo la liofilización de los NCs de Cu, se observó que es un material menos higroscópico

que los NCs de Ag, es por ello que en este caso si se aprecian las bandas de estiramiento simétrico y asimétrico del enlace N-H entre 3300 y 3500 cm^{-1} , además de la vibración de estiramiento del enlace C-H a 2940 cm^{-1} , la vibración de flexión del enlace N-H a 1470 cm^{-1} y la vibración de estiramiento del enlace C-N a 1060 cm^{-1} .

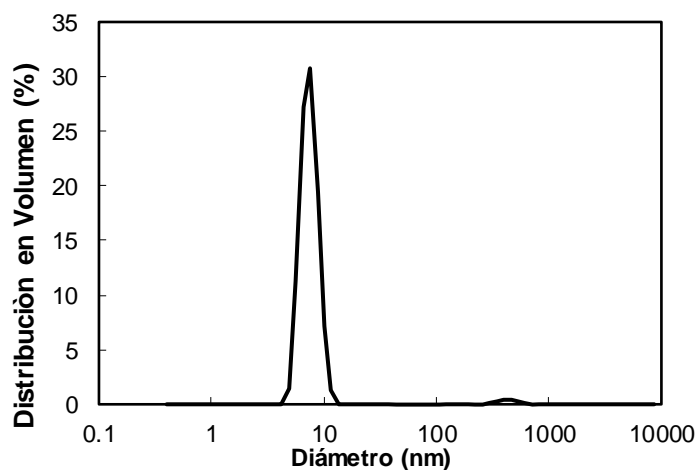


Figura 49. Distribución de tamaños por DLS de NCs Cu-PEI.

Para conocer el tamaño del nanocluster se realizaron estudios por DLS en donde se obtuvo un valor de 9.3 ± 3.4 nm (Figura 49). El diámetro real del NC se obtuvo por microscopia electrónica, en la Figura 50 se aprecian algunos aglomerados de partículas esféricas de hasta 15 nm que podría explicar el aumento de absorbancia alrededor de los 600 nm mostradas en la Figura 46. Sin embargo, también se observó una distribución de partículas más pequeñas cuyo diámetro fue de 3.1 ± 0.7 nm.

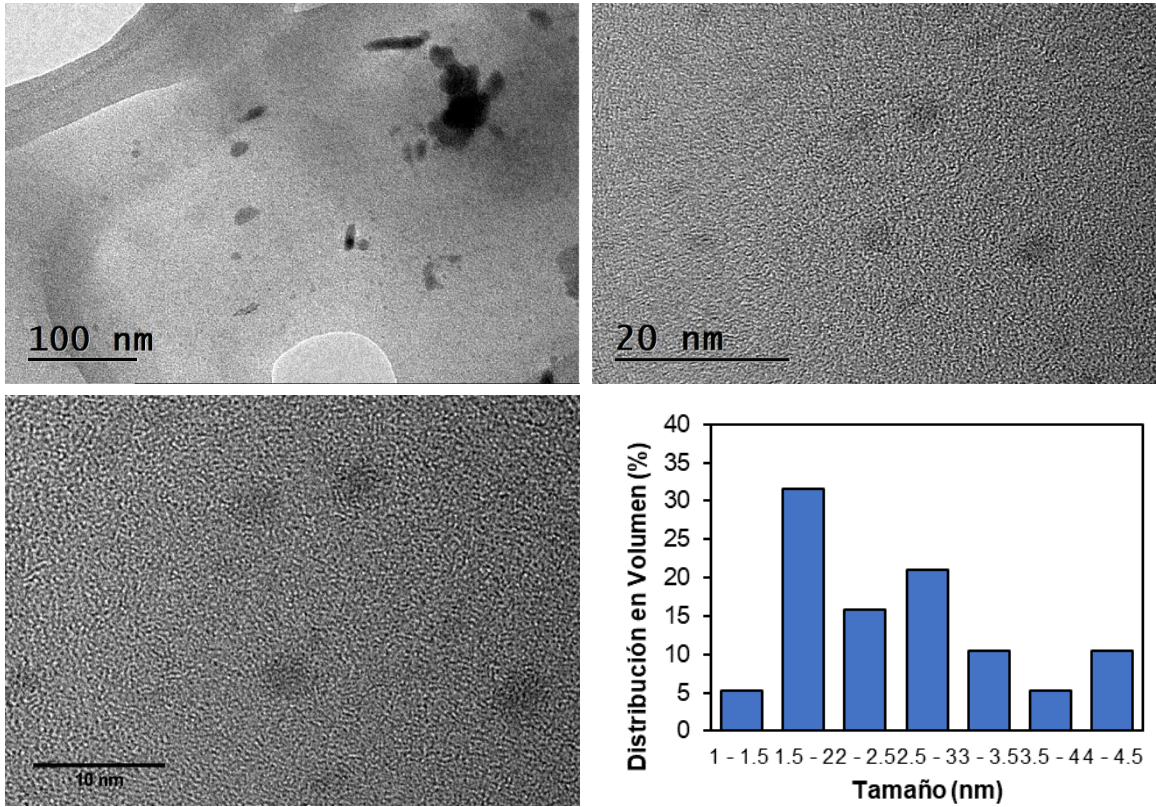


Figura 50. Micrográficas TEM y distribución de tamaños de NCs Cu-PEI.

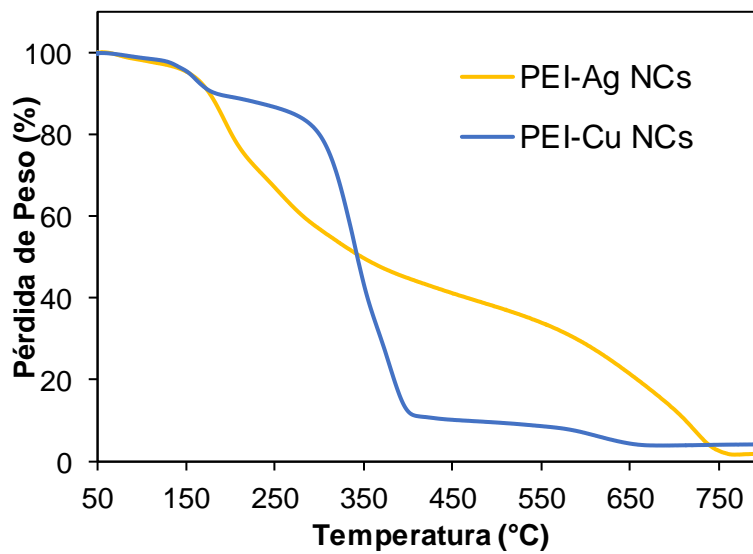


Figura 51. Análisis Termogravimétrico de los NCs recubiertos con PEI

La Figura 51 muestra el análisis termogravimétrico de los NCs Cu-PEI bajo atmósfera de N₂ con los NCs Ag-PEI para comparar en un mismo gráfico. En ambos casos hay 3 pérdidas de peso principales, primero se muestra una pérdida del 9.7 % a una temperatura debajo de los 180 °C debido a la humedad de la muestra, la segunda pérdida toma lugar entre 180 y 311 °C la cual se atribuye a la descomposición térmica del polímero. Estos resultados son similares a los obtenidos en la literatura para la combustión del PEI en nanomateriales de carbono.⁵⁶ También se puede observar que la estabilidad térmica del material con Ag es mayor que el material de Cu debido a que a 411 °C la pérdida de peso es de 55.7 y 88.7 % respectivamente. El residuo metálico final corresponde a 1.7 % para Ag y 4.2 % para Cu.

Todas las caracterizaciones anteriores se realizaron con el sistema **2 Cu** y debido a sus resultados buenos fue el material que se utilizó más adelante para su aplicación como sensor y en sistemas FRET, donde se nombrará solo como NCs Cu-PEI.

Después de la caracterización óptica de los materiales, se calcularon los rendimientos cuánticos utilizando sulfato de quinina como estándar con rendimiento cuántico de 0.54 en H₂SO₄ 0.1 M y con la ecuación 3. Donde *Grad* es la pendiente de la recta que resulta de graficar la fluorescencia integrada contra su absorbancia (st: estándar y x: NCs) y η es el índice de refracción del solvente utilizado. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

$$\phi_x = \phi_{st} \left(\frac{Grad_x}{Grad_{st}} \right) \left(\frac{\eta_x^2}{\eta_{st}^2} \right) \quad (5)$$

Tabla 5. Datos para calcular los rendimientos cuánticos de NCs Ag y Cu.

Sulfato de Quinina		NCs Ag		NCs Cu	
Abs	Área	Abs	Área	Abs	Área
2.80E-02	3.34E+08	4.40E-02	7.10E+07	2.40E-02	4.20E+07
4.30E-02	5.25E+08	7.10E-02	1.21E+08	5.50E-02	8.08E+07
5.20E-02	6.32E+08	7.30E-02	1.24E+08	7.40E-02	1.04E+08
6.80E-02	7.49E+08	9.40E-02	1.60E+08	1.13E-01	1.47E+08
7.60E-02	8.16E+08	$\Phi = 12$		$\Phi = 6$	

En otro estudio de estabilidad, los NCs fueron irradiados con luz UV durante 60 min y cada 5 min se realizaba la medición de su espectro de emisión. Para ambos NCs ocurre un cambio en la IF hasta los 10 min y después permanece constante (Figura 52). En el caso de NCs Ag-PEI ocurre un aumento de hasta el 10 % en su IF, este fenómeno puede ser asociado con el “photobrightening” mencionado por Oda y colaboradores para los puntos cuánticos nanocristalinos. Este efecto ocurre cuando los defectos del nanocristal se llenan por la presencia de moléculas polares como el agua, disminuyendo sus defectos y eliminando estados atrapados como un efecto de pasivación en la superficie.⁵⁷

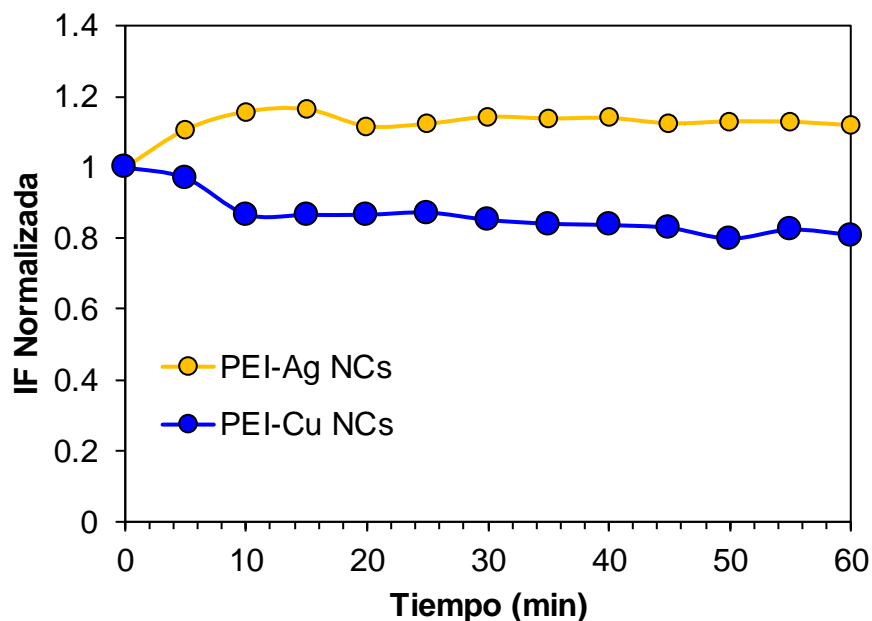


Figura 52. Estudios de fotoestabilidad de los NCs recubiertos con PEI.

Para concluir la caracterización fisicoquímica de los NCs, se realizaron experimentos por plasma de acoplamiento inductivo (ICP) para determinar la concentración de los metales en el producto final de reacción después de la diálisis. Los resultados fueron 7.1 y 369 ppm de Ag y Cu respectivamente. Estos valores concuerdan con los porcentajes de residuo metálico encontrado por TGA donde NCs Cu-PEI presenta la mayor cantidad de metal.

5.4. NCs metálicos como sensores de pH

Las propiedades fotoluminiscentes de los NCs de Ag y Cu se estudiaron variando el pH del medio de 3 a 11. En la Figura 53 se muestran los espectros de emisión de NCs de Ag donde se observa una disminución de la intensidad de fluorescencia con tendencia lineal conforme se aumenta el pH. Para el material de Cu se observó el mismo comportamiento (Figura 54).

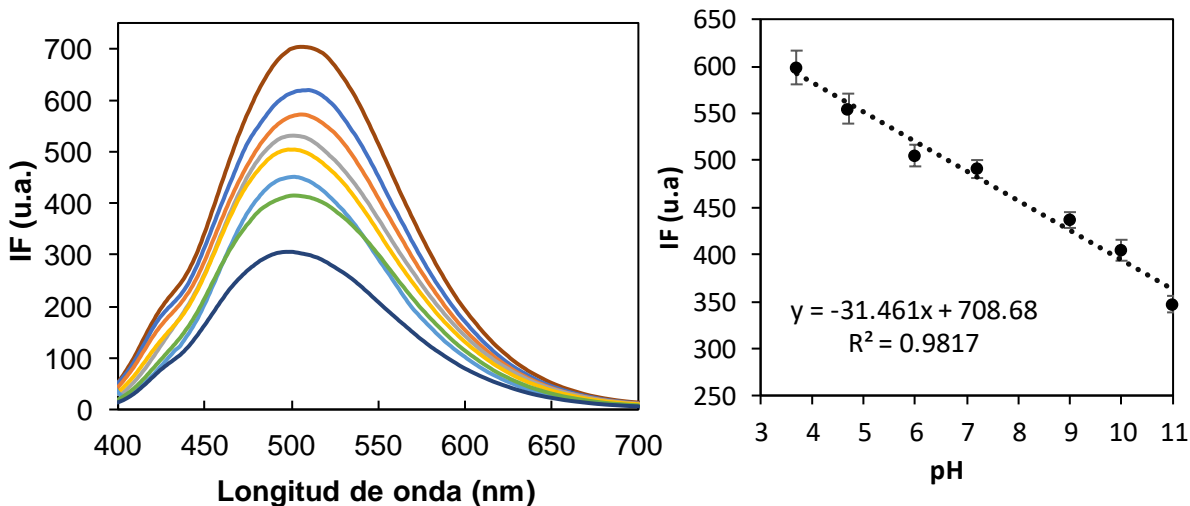


Figura 53. Efecto del pH en la fluorescencia de NCs Ag-PEI.

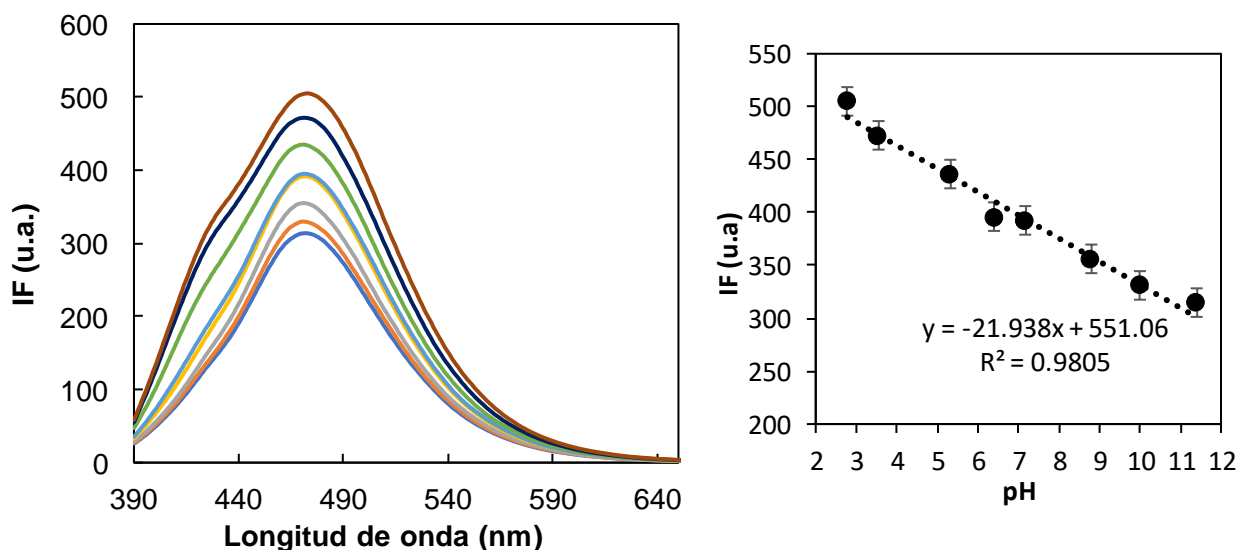


Figura 54. Efecto del pH en la fluorescencia de NCs Cu-PEI.

El comportamiento de abatimiento de fluorescencia ya se ha reportado en la literatura y se atribuye a la hidrólisis de la superficie en la nanoestructura, llevándolo a su descomposición y en consecuencia disminuyendo su fluorescencia.⁵⁸ Sin embargo, en estos estudios se observó la reversibilidad del sistema (Figura 55). Para NCs Ag-PEI el sistema se mostró totalmente reversible hasta 7 ciclos mientras que para NCs Cu-PEI en el tercer ciclo va perdiendo su reversibilidad, por lo que se propone que existe otro mecanismo para el apagado y encendido de la fluorescencia.

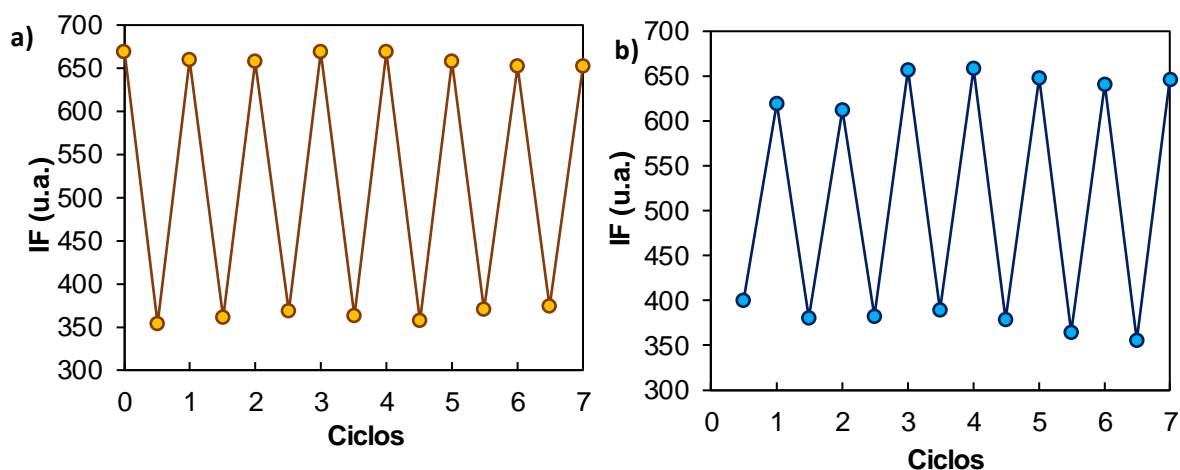


Figura 55. Estudios de reversibilidad para a) NCs Ag-PEI y b) NCs Cu-PEI.

La sensibilidad del PEI al pH se debe a los valores de pKa de las diferentes aminas en su estructura. En la Figura 56 se propone el mecanismo de abatimiento en la intensidad de fluorescencia con el aumento del pH. Cuando se inciden fotones al nanocluster, un electrón del estado base se excita pasando a un orbital de mayor energía. Este estado deja una vacancia de electrones que puede ser llenado por un donador, siendo en este caso los grupos amino en la estructura del PEI, de esta forma se evita la relajación del electrón del primer estado electrónico excitado al estado base del NCs, desactivando la fluorescencia en un medio básico. Sin embargo, en medio ácido al estar protonados los grupos amino, el nivel de energía del donador baja respecto al estado base del nanocluster, lo que permite la

relajación del electrón de S_1 a S_0 y por ello es que la intensidad de fluorescencia aumenta al disminuir el pH del medio.

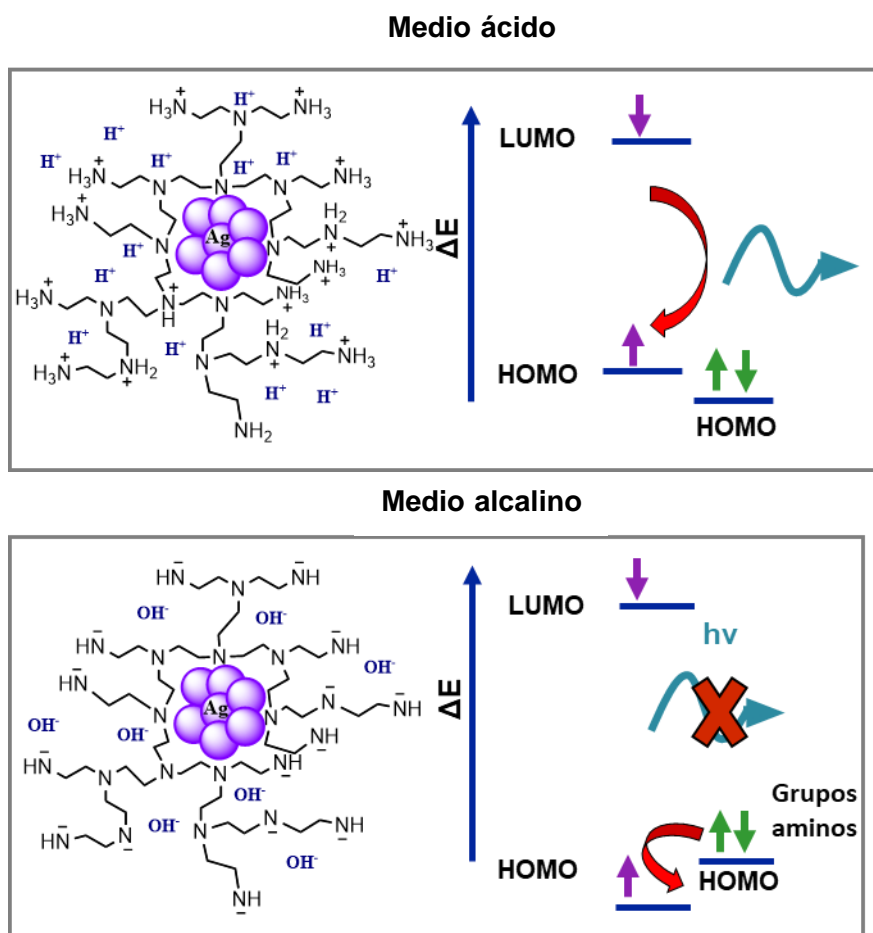


Figura 56. Mecanismo de transferencia electrónica en los NCs recubiertos con PEI variando el pH.

Se realizaron estudios de potencial Z para identificar la carga superficial de los nanoclusters. En la Figura 57 se muestran los resultados obtenidos, en donde se aprecia que los NCs de Ag y Cu con PEI presentan una carga superficial positiva que disminuye al aumentar el valor de pH. También se observa que presenta un punto isoeléctrico alrededor de 8.9 lo cual concuerda con lo reportado en la literatura respecto al punto isoeléctrico del PEI (pH 8.8).^{59,60} Estos resultados sirven para respaldar el mecanismo de abatimiento propuesto en la Figura 56.

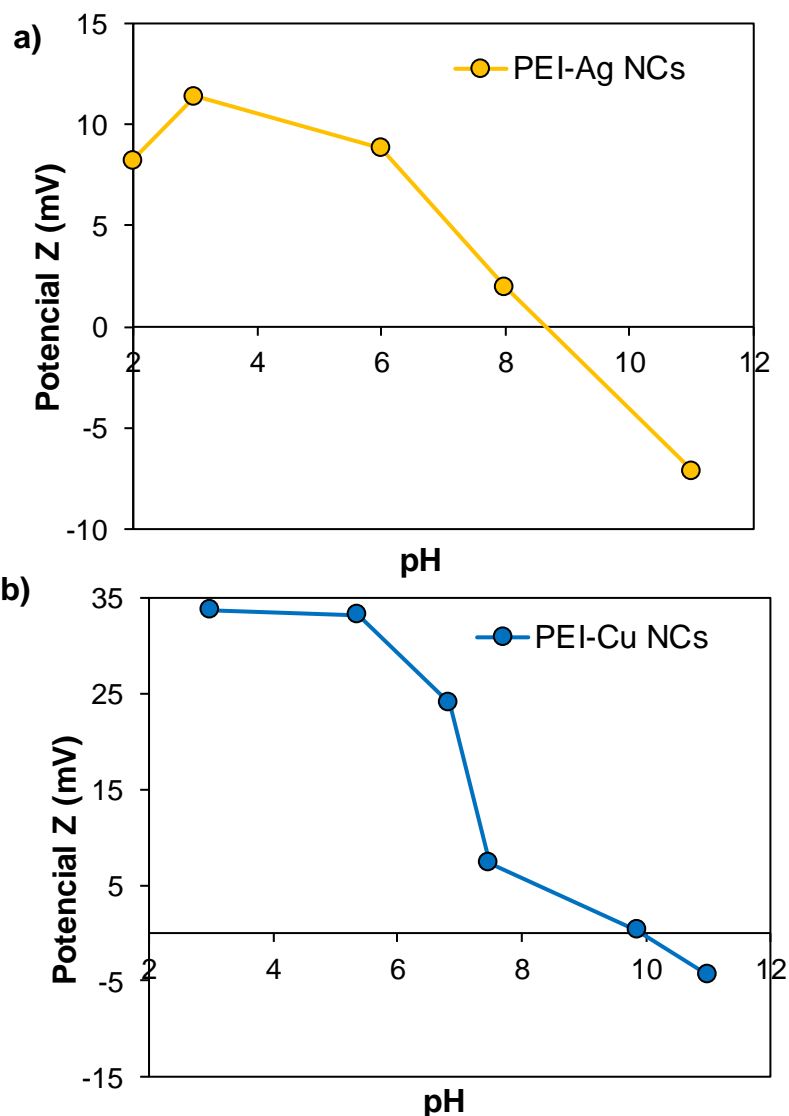


Figura 57. Potencial Z de a) NCs Ag-PEI y b) NCs Cu-PEI a diferentes valores de pH.

Por otra parte, los resultados por potencial Z son importantes ya que permiten identificar el intervalo de pH óptimo en donde la carga positiva es mayor, esta información es necesaria para el desarrollo posterior de ensamblajes FRET con NCs recubiertos con PEI ya sea como donadores o aceptores de energía.

Los resultados anteriores muestran el potencial de estos materiales como sensores de pH. En la literatura se han reportado gran cantidad de sensores fluorescentes, por ejemplo, quimiosensores de moléculas sensibles a los iones H^+

hasta nanomateriales metálicos, sin embargo, la ventaja de utilizar NCs de Ag o Cu recubiertos con PEI es que se puede trabajar en un intervalo de pH amplio (3 a 11) a diferencia de la mayoría de los sensores de pH fluorescentes reportados, algunos ejemplos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Comparación de sensores de pH fluorescentes reportados en la literatura.

Método	Intervalo de trabajo	Características	Ref
Quimiosensor con naftalendiimidias	pH 1.7 - 4.1	Fenómeno PET	61
QDs de CdTe	pH 4 - 6	Abatimiento de fluorescencia	62
CDs-FITC	5.3-8.7	Abatimiento del conjugado	63
Sondas fluorescentes de BSA-Ce/Au	pH 6 - 9	Aplicado en células HeLa	64
NCs de Cu con CEW	pH 6.14 – 12.08	Sensor reversible	34
CDs con PEI	pH 3-11	No hay respuesta lineal	65
NCs Ag con PEI	-	Agregación	66
MOFs con aminas	pH 4-8	No reversible	67
Cu ₉ S ₅ NCs	3-10	Síntesis con polímeros de coordinación	68
NCs de Ag con PEI	pH 3 – 11	Sensor reversible	Este trabajo

De acuerdo con reportes previos, los nanosensores ópticos de NCs metálicos para el reconocimiento de la variación de pH se basan en la aglomeración de partículas, el cual tiene como consecuencia una disminución en su intensidad de fluorescencia. Sin embargo, en este trabajo se propone un mecanismo PET debido a que el sistema mostró una reversibilidad buena en la identificación de pH. Además, en la Figura 58 se muestran los estudios por DLS de los NCs a valores de pH 3 y 11, los cuales no presentaron alguna variación de tamaño descartando alguna aglomeración. Lo anterior justifica que el mecanismo propuesto por medio de una transferencia electrónica fotoinducida sigue siendo factible y se confirma con los estudios electroquímicos mostrados a continuación.

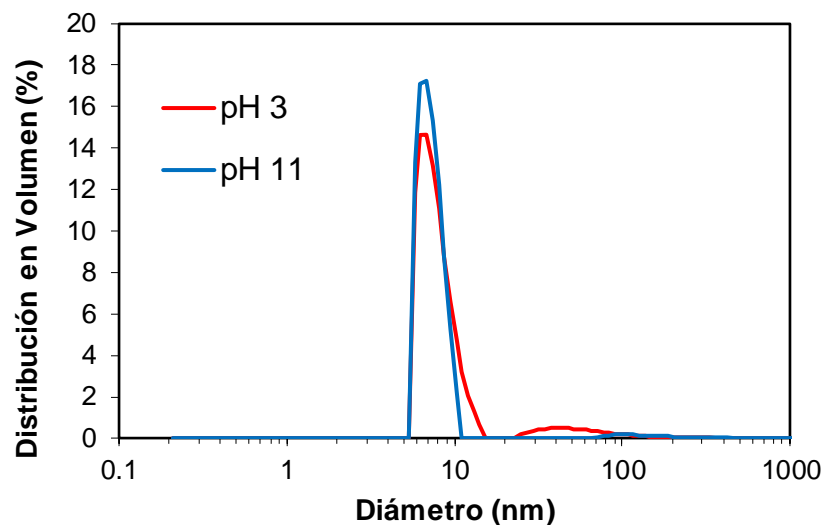
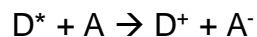


Figura 58. Distribución de tamaños de NCs Ag-PEI variando el pH de 3 a 11.

5.5. Estudios electroquímicos de NCs Ag-PEI

El abatimiento de la fluorescencia dependiendo del sistema se puede explicar por 3 fenómenos. El primero es por un proceso FRET donde se necesitan dos especies fluorescentes, por lo que en el sensor de pH este fenómeno queda descartado ya que las especies involucradas son los NCs y los protones del medio. El siguiente fenómeno es el efecto de filtro interno (IFE), éste se presenta comúnmente en soluciones concentradas ya que el haz de excitación se atenúa por la fluorescencia alta de la muestra. También ocurre si el espectro de absorción de una especie se traslapa con el espectro de excitación o emisión del fluoróforo, situación que tampoco puede presentarse porque solo tenemos una especie que presenta absorción y emisión, el NC Ag.

Los casos anteriores se descartan por lo que el fenómeno posible es el PET. Además, la longitud de onda máxima en los espectros de emisión no cambia al variar el pH del medio, siendo una característica principal del fenómeno PET. El mecanismo se basa en una transferencia de electrones en el estado excitado del NC, de acuerdo con las siguientes reacciones:



Donde D y A son la especie donadora y aceptora.

Debido a los resultados anteriores con aplicación potencial en el sensado de pH, se estudiaron las propiedades electroquímicas de los NCs para dar explicación al mecanismo de abatimiento. Éste fue estudiado por voltamperometrías cíclicas de soluciones de AgNCs y PEI a valores de pH diferentes (3, 7 y 11). En ambos casos se aprecia un cambio en el comportamiento electroquímico de los materiales. En la Figura 59, los resultados muestran una oxidación del polímero a pH 7 (+0.78 mV) y pH 11 (+0.59 mV) correspondiente a los grupos amino de la polietilenimina, mientras que en medio ácido no se presenta la señal de oxidación debido a que ya se tiene a las aminas protonadas como se mencionó en el mecanismo PET (Figura 56).

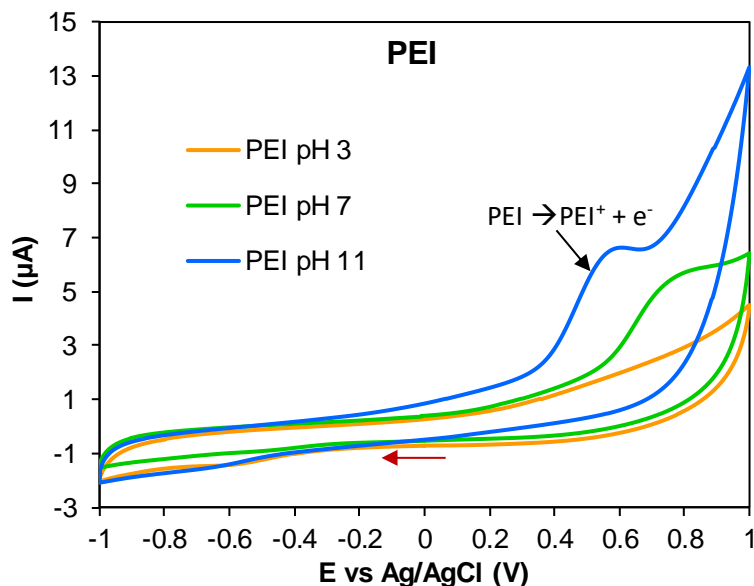


Figura 59. Voltamperometrías cíclicas a 100 mVs^{-1} de soluciones acuosas de PEI a valores de pH diferentes con burbujeo de N_2 .

El comportamiento electroquímico de los NCs de Ag se muestra en la Figura 60, en medio ácido los NCs presentan un pico de oxidación a +0.41 mV asignada a la oxidación de Ag^0 a Ag^+ mientras que a pH 7 presenta intensidad menor y se

desplaza a +0.23 mV. En medio básico la señal de oxidación de Ag^+ no se presenta, pero se muestra la oxidación del polímero a +0.59 mV como en el caso anterior.

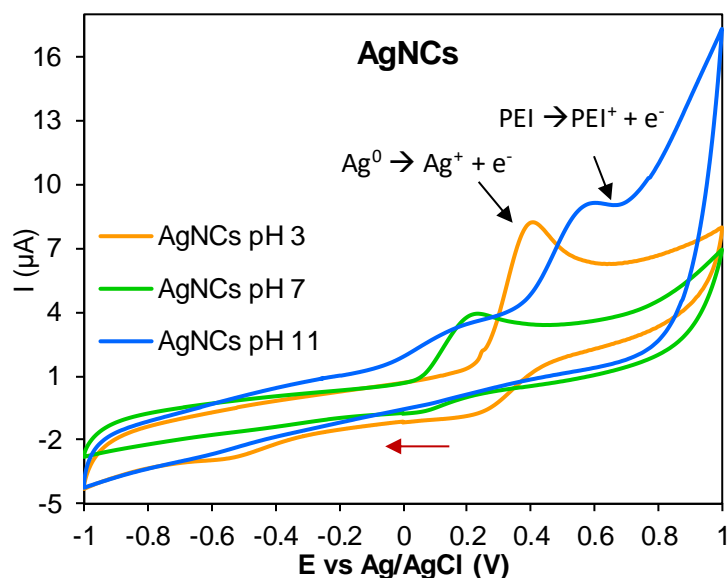


Figura 60. Voltamperometrías cíclicas a 100 mVs^{-1} de soluciones acuosas de NCs Ag-PEI a valores de pH diferentes con burbujeo de N_2 .

La forma de estos voltamperogramas es similar a lo reportado en la literatura, en donde se tiene un sistema cuasi-reversible para NPs de Ag en 2019.⁶⁹ Estos resultados muestran la influencia del pH en los procesos oxido-reducción que se plantearon anteriormente, en medio básico hay mayor presencia de especies donadoras (PEI) que inhiben la fluorescencia debido a la transferencia de electrones del PEI al NCs. En medio ácido no hay especies donadoras, ya que el polímero no presenta señal de oxidación y el proceso PET no ocurre. La relajación del electrón en el primer estado electrónico excitado al estado base se favorece y la emisión de fluorescencia es máxima. Esto se comprueba al ver la oxidación de PEI solo en medio básico.

Estos resultados confirman el mecanismo propuesto, de acuerdo con lo siguiente:



En la Figura 61a se muestra la voltamperometría con 2.5 mM de AgNO_3 y 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de PEI, como las condiciones previas a la reacción hidrotérmica. Con el fin de comprobar que la señal a +0.41 V corresponde al NCs de Ag y no solo de Ag coloidal, donde efectivamente se aprecia la diferencia en el comportamiento electroquímico. El estudio se realizó en el sentido de la reducción, observando un entrecruzamiento en el barrido a -0.83 V debido a la formación de cristales de Ag sobre el electrodo y en consecuencia la señal de oxidación es intensa, además se sigue presentando la oxidación del PEI al mismo potencial.

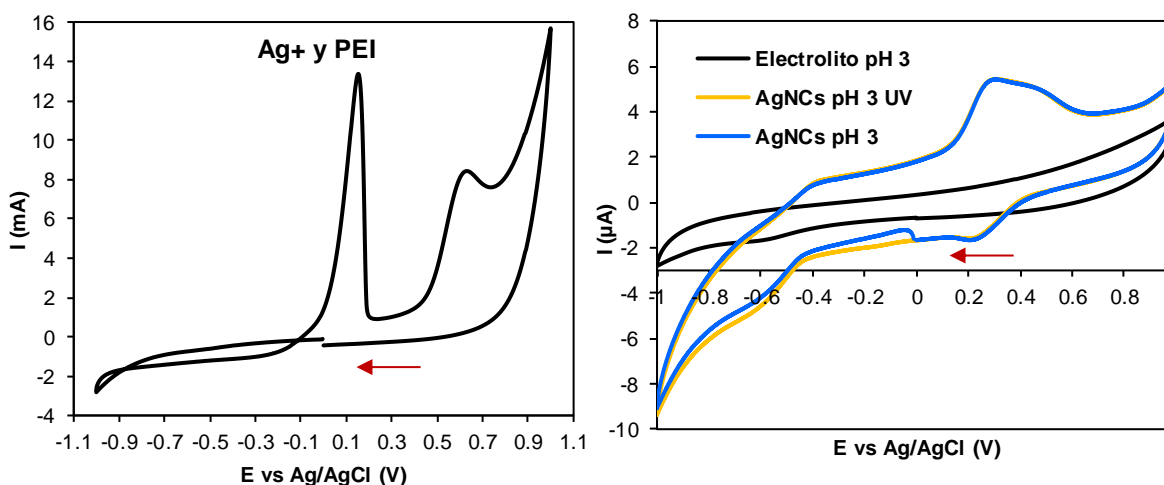


Figura 61. Voltamperometrías cíclicas a 100 mVs^{-1} de soluciones acuosas de a) Ag^+ y PEI b) NCs Ag a pH 3 en el reactor fotoquímico con burbujeo de N_2 .

Como último estudio se planteó el estudio fotoelectroquímico de los NCs, los experimentos se realizaron en un reactor fotoquímico con una lámpara UV ($\lambda = 360$ nm). Los NCs fueron expuestos a la radiación y al mismo tiempo se realizó el barrido de potencial en sentido de la reducción, donde no se obtuvo ningún cambio en la respuesta electroquímica (Figura 61b).

Para finalizar, en la Figura 62 se muestran las voltamperometrías cíclicas de NPs de Ag comerciales con el fin de comparar el comportamiento electroquímico entre nanopartícula y nanocluster. En medio ácido se presenta un pico de oxidación a 0.15 V debido a la oxidación de Ag^0 de la partícula y una señal de reducción a -0.52 V debido a la señal del electrolito mientras que al aumentar el pH las señales de oxidación se vuelven de intensidad muy baja. Esto demuestra la diferencia en la estabilidad y funcionalización entre NCs y NPs.

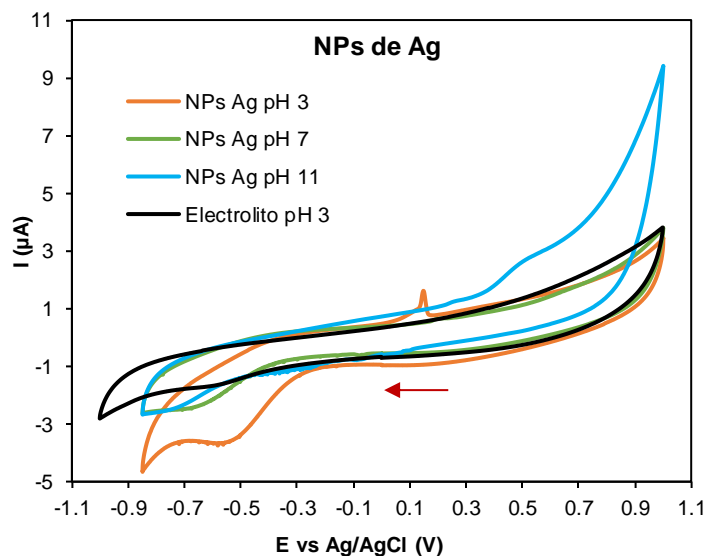


Figura 62. Voltamperometrías cíclicas a 100 mVs^{-1} de soluciones acuosas de AgNPs a valores de pH diferentes con burbujeo de N_2 .

5.6. Aplicación en muestras reales del sensor de pH con NCs Ag-PEI

Los NCs de Ag fueron utilizados para conocer la viabilidad del sensor en la medición de pH en muestras reales, debido a que fueron los materiales que mostraron una mejor reversibilidad y fotoestabilidad mayor. Se utilizó la curva de calibración de NCs Ag-PEI para encontrar el pH de las siguientes muestras problema: agua de la llave en medio ácido, agua de la llave en medio básico y una muestra de té verde (reposado previamente por 10 mn). El pH real se midió utilizando un potenciómetro con electrodo de pH. En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos con variaciones de hasta 0.06 del resultado real medido con el electrodo de pH.

Tabla 7. Determinación de pH en muestras reales con los NCs Ag-PEI.

Muestra	pH (electrodo de pH)	pH (calculado) ^a	RSD (%)	Error relativo (%)
Agua de la llave	5.22	5.21 ± 0.37	12.3	0.89
Agua de la llave	10.16	10.07 ± 0.28	4.5	0.19
Té verde ^b	5.77	5.71 ± 0.13	4.0	1.04

^a Calculado de experimentos por triplicado

^b Té verde, Valley Foods®

Debido a los buenos resultados en la obtención del pH de muestras reales, se buscó realizar una aplicación visual del nanosensor. Por lo que se prepararon muestras en agarosa como lo reportaron Xion y colaboradores en 2017.⁷⁰ Los resultados se muestran en las Figuras 63 y 64. Las soluciones de agar se prepararon a valores de pH diferentes (ajustando con NaOH o HCl 1 M) y se dejaron reposar por 15 mn hasta la obtención del sólido, después se tomaron las fotografías bajo la luz UV. A pH 3 se observa que la intensidad de fluorescencia es máxima y ésta desciende conforme se aumenta el pH como en los estudios por espectroscopia.

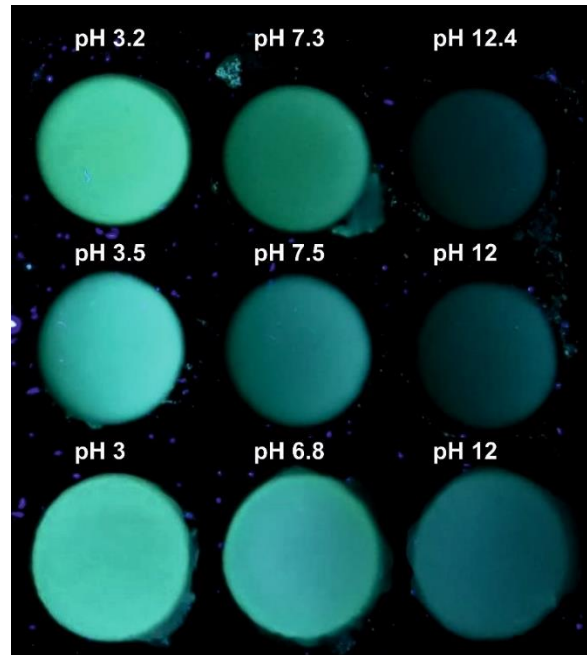


Figura 63. Experimentos por triplicado de hidrogeles de agarosa con NCs Ag a valores de pH diferentes bajo lámpara UV.

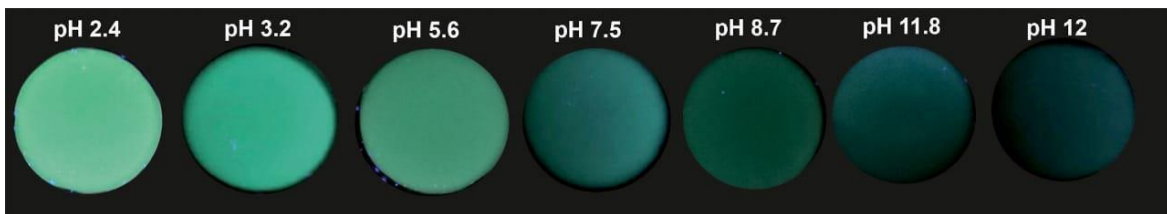


Figura 64. Hidrogeles de agarosa con NCs Ag a valores de pH.

El nanosensor se caracterizó por microscopía de fluorescencia como última aplicación visual, donde se utilizaron pétalos de rosa blanca como sustrato. En la Figura 65 se muestran las imágenes en el canal azul $\lambda_{ex}= 355/40 - \lambda_{em} =433/36$ nm, canal verde $\lambda_{ex}= 480/17 - \lambda_{em} =517/23$ nm y canal rojo $\lambda_{ex}= 556/20 - \lambda_{em} =615/61$ nm. La emisión de fluorescencia se presenta en los tres canales. Sin embargo, en el canal verde la intensidad es mayor, como es de esperar ya que por espectroscopia se obtuvo un máximo de la banda de emisión a 490 nm.

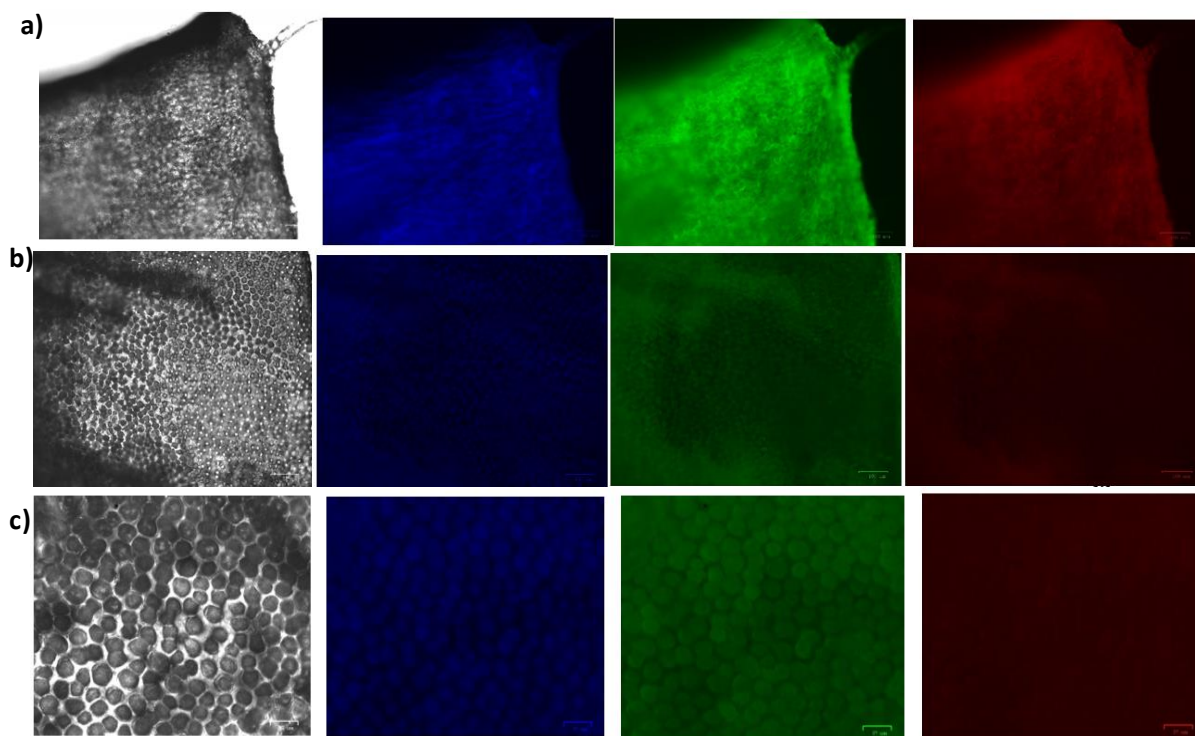


Figura 65. Emisión de los NCs Ag-PEI por microscopia de fluorescencia de los pétalos de rosa x alba con cada canal en a) pH 3, b) pH 11 y c) acercamiento en pH 11.



Figura 66. Fotografía de *Rosa x alba*, pétalos utilizados en los estudios de microscopia de fluorescencia.

En la Figura 67 se muestran los resultados en el canal verde variando el pH de la solución donde se sumergió el pétalo, una emisión de fluorescencia intensa se observa en el pétalo sumergido en la solución de NCs a un pH de 3 mientras que a pH 11 la intensidad de fluorescencia disminuye. Además, las imágenes muestran que los NCs se encuentran distribuidos de manera uniforme en el sustrato. En todos los experimentos se utilizaron los mismos valores de tiempo de exposición (300 ms), intensidad del LED (40) y contraste (0). Estos resultados muestran a los NCs de Ag-PEI con características potenciales para utilizarse como sondas de contraste o biomarcadores para indicar los cambios de pH por ejemplo en fluidos celulares, ya que este parámetro es indicativo de anomalías y enfermedades como el cáncer.^{71,72}

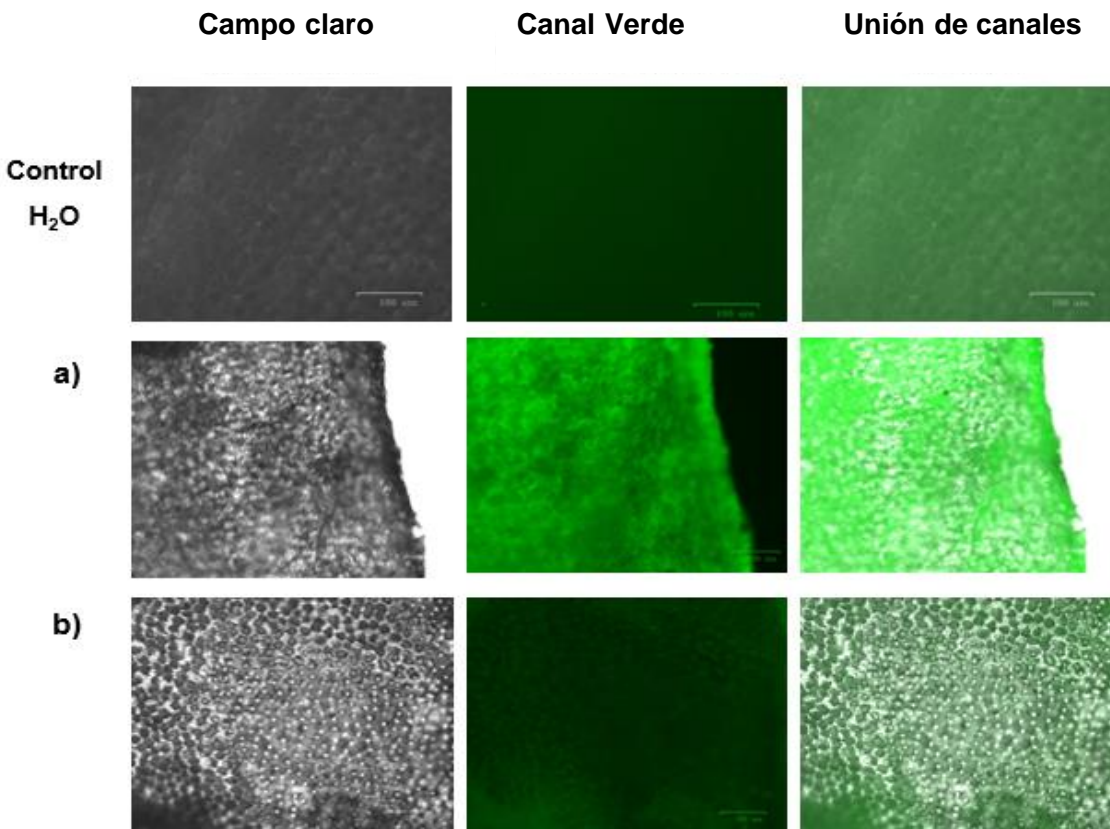


Figura 67. Emisión de los NCs de Ag por microscopía de fluorescencia. Pétalos sumergidos en solución de NCs a) pH 3, b) pH 11 y sin NCs como control.

5.7. Respuesta de los NCs de Ag frente a iones metálicos

La detección de iones metálicos diferentes es de importancia vital en el área biológica, ya que niveles anormales pueden ocasionar el desarrollo de enfermedades diferentes. Por otra parte, en el área ambiental concentraciones altas de metales pesados propician la contaminación de medios diferentes. Se realizaron estudios de la respuesta fluorescente de los NCs de Ag frente a cationes metálicos y algunos aniones para estudiar si ocurre alguna interferencia de estos en su aplicación como sensor de pH. Su respuesta analítica fue evaluada con la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = K_{SV}[Q] + 1 \quad (4)$$

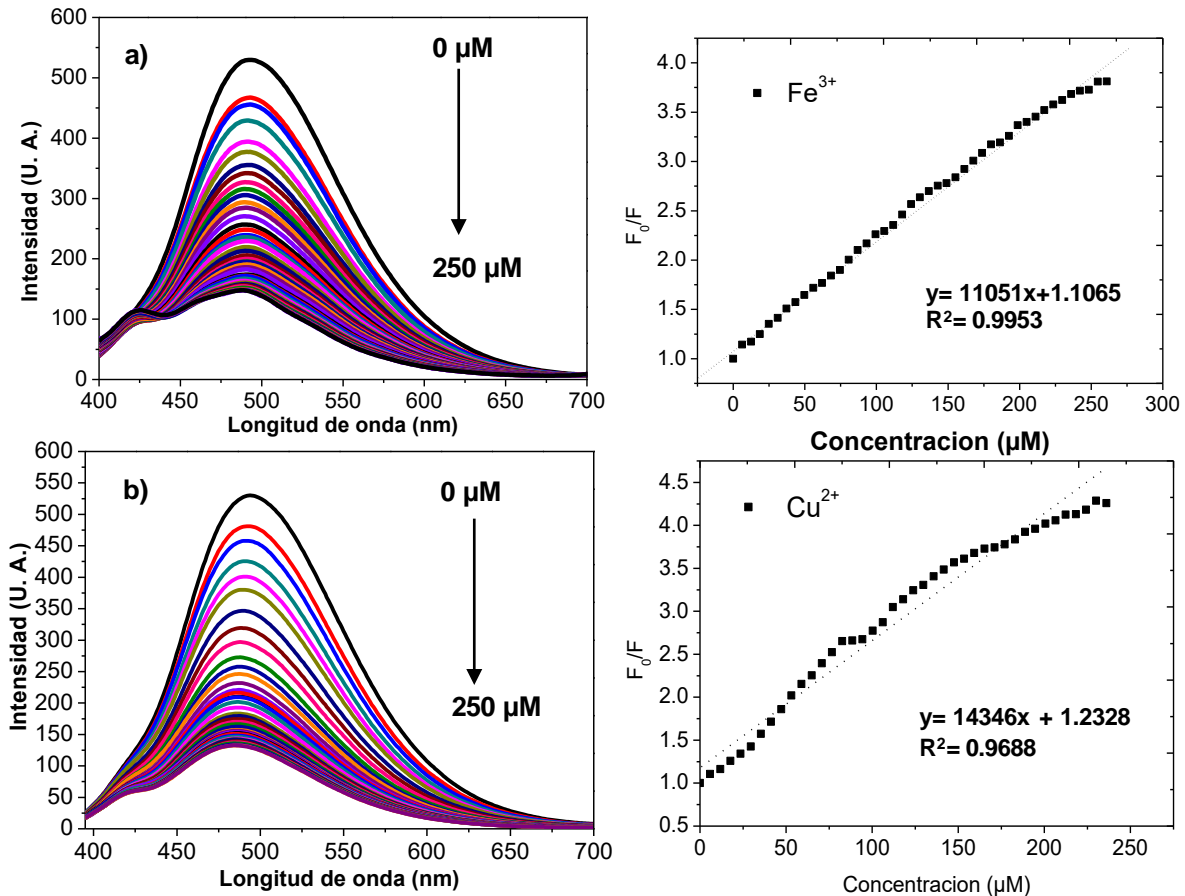


Figura 68. Estudios de abatimiento de fluorescencia de NCs Ag-PEI en medio ácido frente a iones a) Fe³⁺ y a) Cu²⁺.

En la Figura 68 y 69 se muestran las titulaciones y gráficas de Stern-Volmer de los NCs de Ag en medio ácido y neutro respectivamente, frente a los iones metálicos en donde se obtuvo una respuesta considerable en el cambio de la intensidad de fluorescencia.

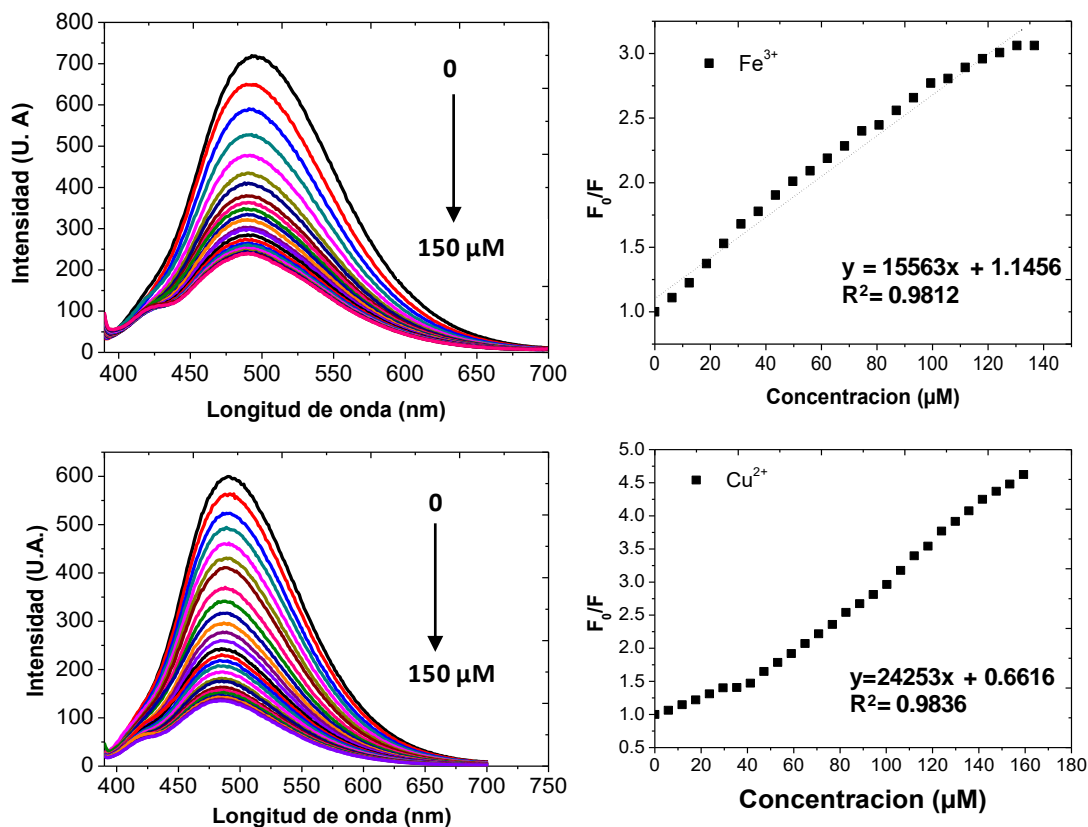


Figura 69. Estudios de abatimiento de fluorescencia de NCs Ag en medio neutro frente a iones a) Fe^{3+} y a) Cu^{2+} .

La respuesta lineal con los iones Fe^{3+} en todo el intervalo de trabajo indica un solo tipo de abatimiento para este analito. Mientras que para los iones Cu^{2+} se observan dos perfiles de abatimiento separados a una concentración de $40 \mu\text{M}$, indicando que ocurren los dos tipos de abatimiento. La respuesta de sensibilidad mayor se obtiene en presencia de iones Cu^{2+} debido a su K_{sv} de $14\,346 \text{ Lmol}^{-1}$, comparado con $11\,051 \text{ Lmol}^{-1}$ de los iones Fe^{3+} . Estos resultados se atribuyen al efecto paramagnético de ambas especies, además de la posible formación de un

complejo entre las aminas disponibles en la estructura ramificada del polímero y los iones Cu^{2+} .

Por otro lado, se realizaron las mismas titulaciones a un pH de 7 para estudiar la influencia del medio en la detección de los iones metálicos. Estos estudios mostraron una sensibilidad mayor para ambos metales a este valor de pH. Los resultados se muestran en la Figura 69, la K_{sv} para Fe^{3+} fue de $15\,563\text{ Lmol}^{-1}$, mientras que para Cu^{2+} fue de $24\,253\text{ Lmol}^{-1}$. Estos datos concuerdan con lo propuesto anteriormente sobre la transferencia electrónica entre el nanocluster metálico y los grupos amino en la PEI. En medio neutro se encuentra una menor proporción de grupos amino protonados, entonces su par de electrones se encuentra disponible para la interacción con los analitos a evaluar y por ello hay una mayor sensibilidad para los iones Cu^{2+} debido a la posible formación del complejo entre ambas especies.

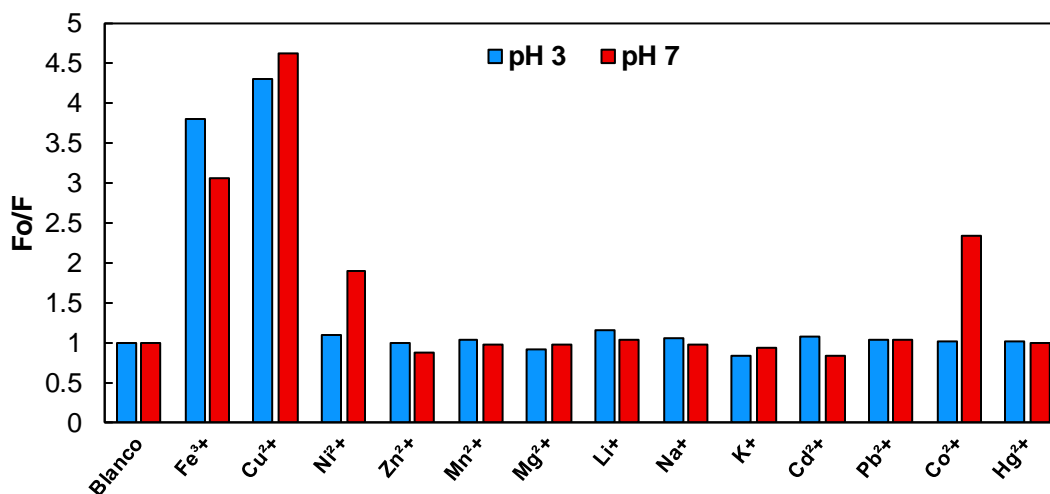


Figura 70. Estudios de selectividad de NCs de Ag a pH 3 y 7 a una concentración de metal de 1.5×10^{-4} M.

En la Figura 70 se presentan los estudios de selectividad de los NCs de Ag en presencia de otros iones metálicos a una concentración de 1.5×10^{-4} M en medio ácido y neutro. Las especies que muestran una respuesta mayor en ambos medios son Cu^{2+} y Fe^{3+} sin embargo, a pH 7 la respuesta cambia para los iones Ni^{2+} y Co^{2+} . Estos iones al tener número de coordinación 4 pueden formar complejos hasta con el 70 % de los sitios de unión del polímero. Kislenco y Oliynyk estudiaron las constantes de equilibrio de complejos de PEI con Cu^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} donde

encontraron una mayor sensibilidad hacia Cu^{2+} similar a lo obtenido en este trabajo.⁷³ En medio neutro al tener una proporción menor de grupos amino protonados, estos sirven como bases de Lewis hacia los iones M^{2+} , por ello Ni y Co mostraron un abatimiento de fluorescencia mayor que en medio ácido.

Los límites de detección calculados en estas titulaciones fueron en el orden de μM , los cuales no son significativos con los límites de detección de sensores fluorescentes reportados en la literatura, ya que se encuentra hasta en el orden del nM. Estos resultados son importantes ya que los NCs Ag-PEI se utilizaron como sensores visuales de pH con resultados prometedores, por lo que es conveniente que no presenten interferencias con otros analitos como los iones metálicos. Al tener límites de detección bajos, en la Figura 71 se muestran los resultados de las titulaciones de NCs Ag-PEI frente a metales en un intervalo de concentraciones que se presentan en muestras biológicas de acuerdo con lo reportado en la literatura.

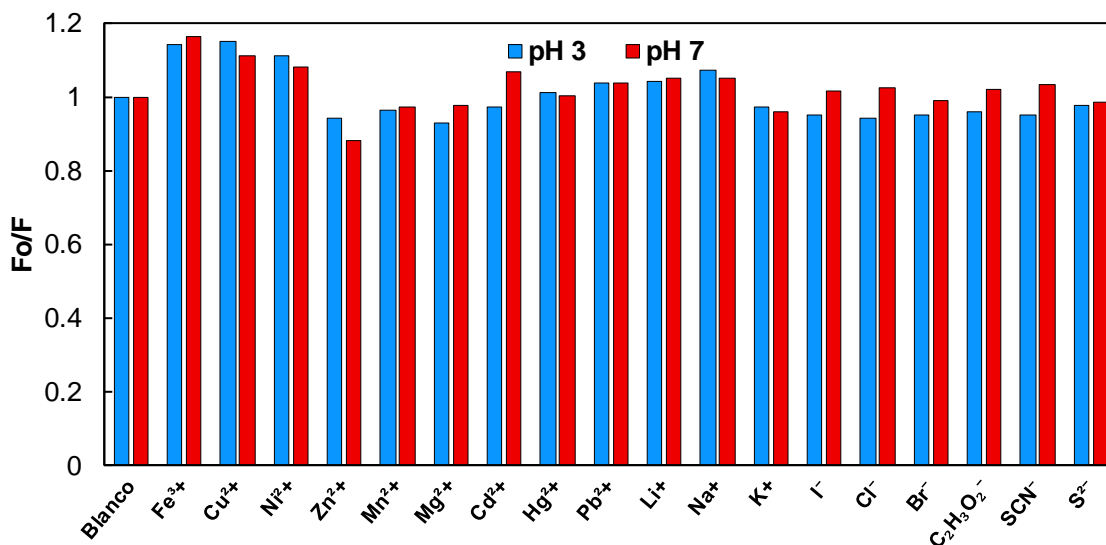


Figura 71. Estudios de selectividad de NCs Ag-PEI a pH 3 y 7 a una concentración de metal de $50 \mu\text{M}$ (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Li^{+} , Na^{+} , K^{+} y Cd^{2+}) y $15 \mu\text{M}$ (Fe^{3+} y Cu^{2+}).

La respuesta luminiscente no varía significativamente a concentraciones de metal de 50 μM para Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Li^+ , Na^+ , K^+ y Cd^{2+} . Mientras que para Fe^{3+} y Cu^{2+} se compararon a una concentración de 15 μM , debido a que este valor es cercano a la concentración máxima de estos iones en los fluidos extra e intracelular.⁷⁴ De acuerdo con lo anterior, este sensor puede utilizarse para medir el pH en muestras biológicas sin que se presente el inconveniente de la influencia de estas especies, debido a la interferencia baja de estos metales en estas concentraciones.

5.8. NCs de Cu como sensores de metales

La identificación de metales en soluciones acuosas es un área de investigación donde pueden utilizarse nanosensores ópticos debido a la ventaja de tener una respuesta fácilmente medible, como un cambio de color o una variación en la intensidad de fluorescencia.

El cobre es uno de los micronutrientes esenciales en los seres vivos, pero en niveles altos resulta ser tóxico, por lo que es importante conocer los niveles de cobre en los sistemas naturales. En plantas los efectos secundarios son la producción de lesiones en las raíces e inhibir el crecimiento. En adultos, el cobre se puede acumular en el hígado, los riñones, el cerebro y los ojos. Este exceso del metal puede destruir las células del hígado y provocar daño en los nervios. Mientras que al ser un metal pesado es un contaminante de fuentes hídricas, por lo que es considerado un problema serio en el tratamiento de aguas.

Por otro lado, el cobalto es otro oligoelemento beneficioso para los humanos porque forma parte de la vitamina B12 esencial para la salud humana, actúan como activadores de enzimas como la colinesteraza, carboxilasa y fosfoglucomutaza. Sin embargo, exposiciones altas al cobalto llegan a producir enfermedades como asma, trastornos gastrointestinales, daño hepático, daño renal y agrandamiento cardíaco. Y su deficiencia afecta la producción de eritrocitos y leucocitos en la médula ósea, conduciendo a la anemia perniciosa, por lo que su cuantificación es de interés.

Los NCs de Cu se utilizaron para la detección de iones metálicos con el mismo procedimiento que los NCs de Ag, los cuales mostraron respuesta frente a los iones Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} y Ni^{2+} .

En la Figura 72 se muestran los estudios con los iones Cu^{2+} el cual presenta un abatimiento en la intensidad de fluorescencia. Estos resultados son esperados debido al “efecto del átomo pesado”, la presencia de átomos con número atómico alto disminuye la fluorescencia debido a perturbaciones en el spin electrónico y aumentar el cruzamiento entre sistemas. Sin embargo, la curva F_0/F vs la concentración [M] mostró un solo tipo de abatimiento en el intervalo de concentraciones de 0-0.29 μM y después se llega a la saturación, esto indica un solo tipo de abatimiento con una $K_{sv} = 1.15 \times 10^7 \text{ Lmol}^{-1}$. Un resultado interesante fue el siguiente, conforme se realizaron las adiciones se observó un aumento en la coloración azul de la solución por lo que se prosiguió a realizar estudios por UV-visible (Figura 72c). Los NCs presentan una banda de absorción a 270 nm y conforme se aumenta la concentración de los iones Cu^{2+} la absorción de la banda aumenta hasta llegar a la saturación, a la misma concentración que los resultados obtenidos en fluorescencia. Estos resultados comprueban que el abatimiento de la fluorescencia se da por la formación de un complejo en el estado basal.

En la Figura 73a se muestra la curva de abatimiento de fluorescencia de los NCs frente a concentraciones crecientes de iones Co^{2+} , también muestra un solo tipo de abatimiento y la saturación se llega a 0.32 μM con una $K_{sv} = 1.14 \times 10^7 \text{ Lmol}^{-1}$. En este caso la coloración de la solución cambia de un azul a rosa, pero no se da el mismo comportamiento en las bandas de absorción como en el caso de los iones Cu^{2+} ya que, también hay cambios en la banda alrededor de 244 nm que podría tratarse de transiciones electrónicas nuevas. Para estos dos metales se obtuvieron límites de detección muy bajos lo cuales son competitivos con lo reportado en la literatura, 5.83 y 5.87 nM para Cu^{2+} y Co^{2+} respectivamente. Además, el cambio de color en la solución vuelve a estos sensores viables para un sistema de detección visual rápida.

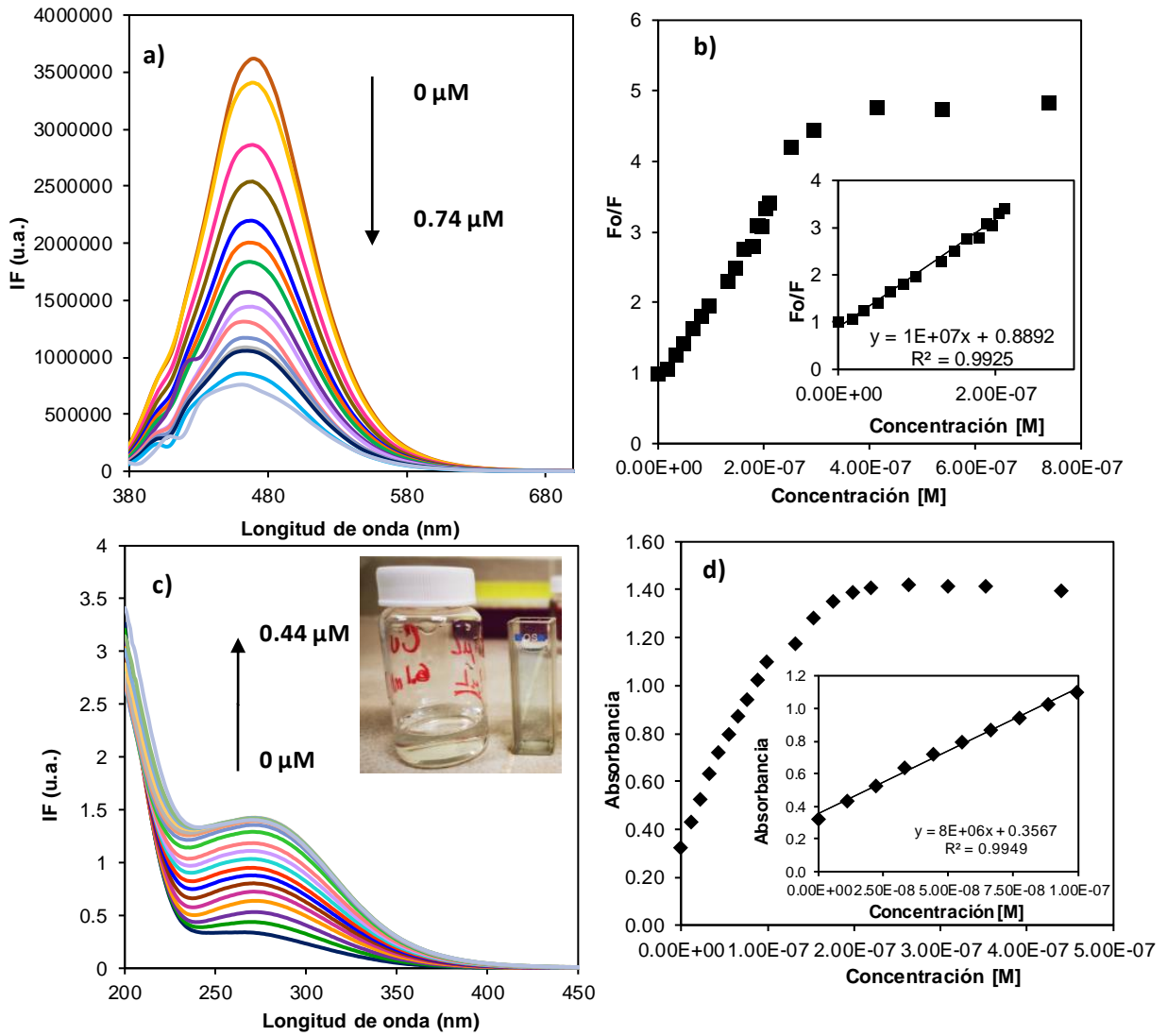


Figura 72. a) Titulación de NCs de Cu frente a iones Cu²⁺ en Fluorescencia molecular, b) curva de Stern-Volmer, c) titulación por UV-visible y c) curva de calibración de 0-0.44 μM.

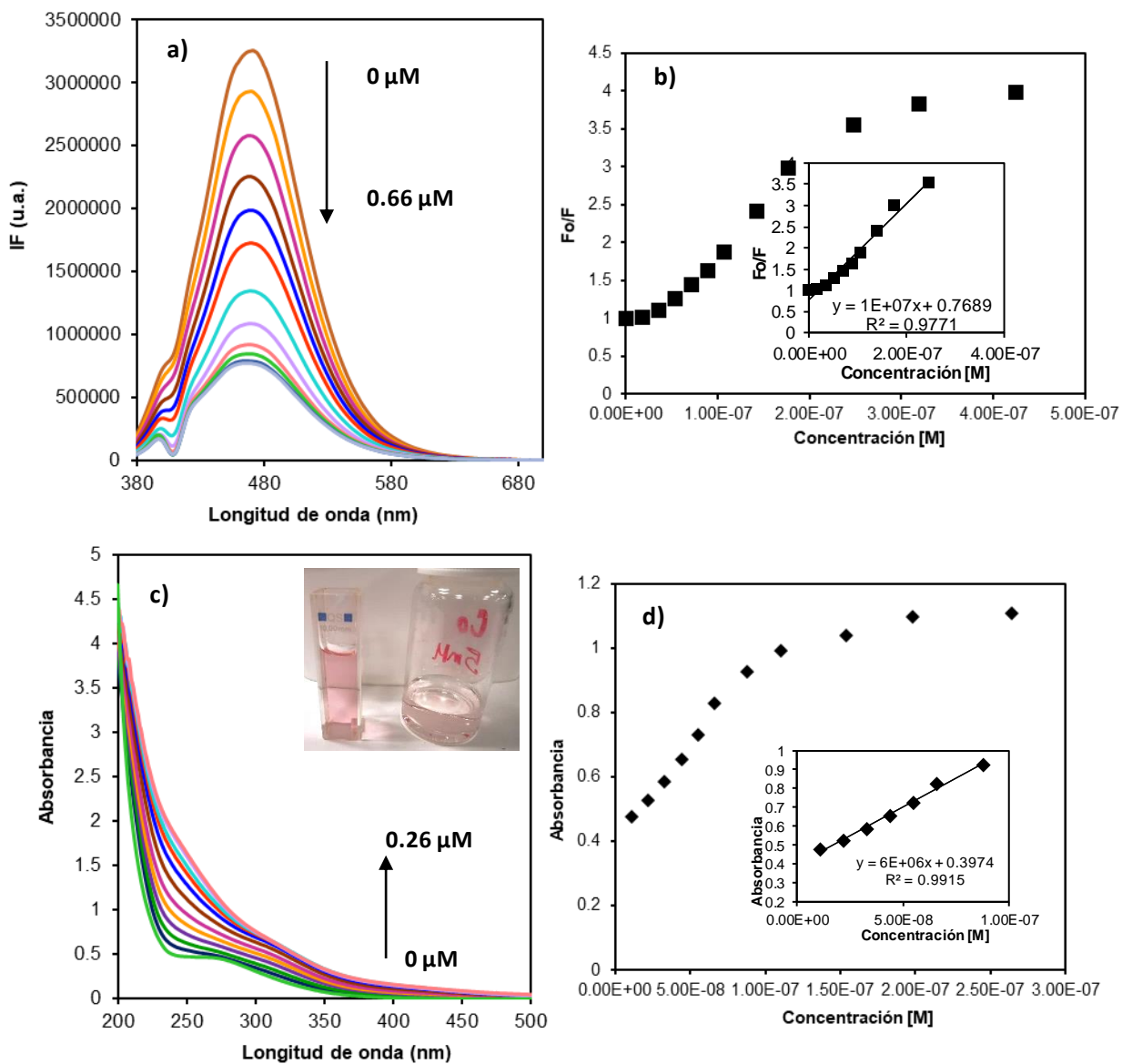


Figura 73. Titulación de NCs de Cu frente a iones Co^{2+} a) por Fluorescencia molecular, b) curva de Stern-Volmer, c) titulación por UV-visible y d) curva de calibración de 0-0.26 μM .

Los metales de transición forman muchos iones y complejos coloreados debido a su estructura. El color de un complejo depende del metal específico, su estado de oxidación y los ligandos unidos al metal. Generalmente se origina a partir de la excitación de electrones en orbitales d de un nivel de energía al siguiente. Por ejemplo, un electrón en el orbital de enlace puede ser excitado por la luz al orbital de antienlace y al regresar al estado fundamental la energía se libera en forma de luz (Figura 74).



Figura 74. Excitación-relajación de un electrón en orbital d , liberando energía en forma de luz.

Los complejos de metales de transición se forman cuando los metales se unen a una o más especies no metálicas neutras o cargadas negativamente, denominadas "ligandos". Sin estos enlaces, todos los orbitales d serían de igual energía; sin embargo, una vez que están presentes, algunos orbitales d se mueven a una energía más alta de la que tenían antes, mientras que otros se mueven a una energía más baja, creando una brecha de energía (Figura 75). Esto se debe a las diferentes formas de los orbitales d y que algunos orbitales están más cerca de los ligandos que otros.⁷⁵

Los electrones pueden moverse desde los orbitales d de menor energía a los orbitales d de mayor energía absorbiendo un fotón de luz; la longitud de onda de la luz absorbida depende del tamaño de la brecha de energía y esto causa la apariencia coloreada de los compuestos. Por ejemplo, la solución madre de Co^{2+} realizada para la titulación mencionada anteriormente tiene una coloración rosada debido a la formación del complejo $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, mientras que la solución de Cu^{2+} es azul por el complejo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$.

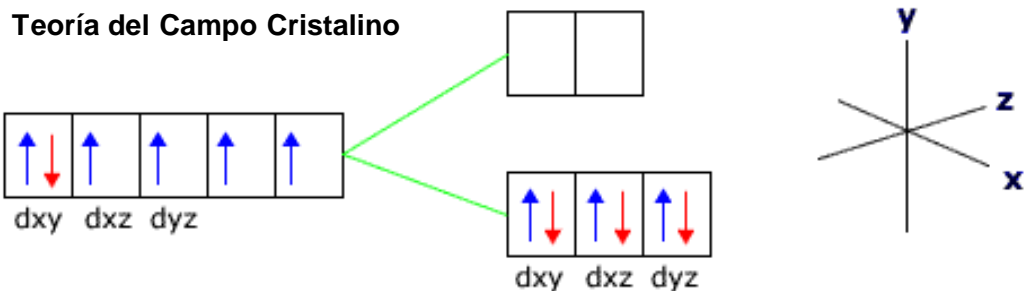


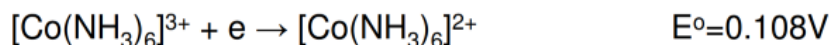
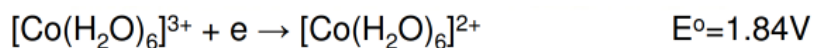
Figura 75. Separación de orbitales d degenerados en dos estados no degenerados en un cristal octaédrico.

Sin embargo, en todos los estudios la coloración es más intensa cuando se realiza la titulación que en la solución madre del metal. Este resultado sugiere que las aminas del PEI participan en la estructura de los complejos y en consecuencia ocurre el cambio en la coloración. El pH de las soluciones fue de 7 y de acuerdo con los estudios por potencial Z a este valor los NCs presentan una carga positiva cercana a su punto de carga cero. Por lo que se pueden tener aminas $-\text{NH}_3^+$ y $-\text{NH}_2$ con pares de electrones libres y su interacción con los iones metálicos se deba a fuerzas de atracción entre la carga positiva del metal y los extremos negativos de los ligandos que contienen un par de electrones no compartido.⁷⁵ En este caso la interacción atractiva es del tipo ion-dipolo. Y de acuerdo con la naturaleza del ligando, la estabilidad de las aminas es mayor en comparación a las moléculas de agua como ligandos, por lo que puede ocurrir este desplazamiento para formar complejos octaédricos más estables.⁷⁶

Decremento en estabilidad →

NH_3 , RNH_2 , RNH , R_3N , ($\text{R}=\text{alquil}$), H_2O , ROH , R_2O , RCOR , RCHO ,
 CO (carbonilos), NO (nitrilos), CN^- , SCN^- , F^- , OH^- , Cl^- , Br^- , I^- .

Como se muestra a continuación, la formación del complejo $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ requiere una energía menor de acuerdo a su potencial de reducción.^{76,77}



En el caso de Co^{2+} los complejos octaédricos son de un color rojo pálido o púrpura mientras que los tetraédricos son de un color azul intenso, mientras que los complejos de Cu^{2+} en su mayoría son azules o verdes, el color puede cambiar a rojo o café si se presentan bandas de transferencia de carga intensas en la región del UV y es de los metales que puede adquirir varios números de coordinación (3, 4, 5, 6, 7 y 8) aunque 4 y 6 son los más comunes.

En la Figura 76 se muestran los estudios para los iones Fe^{2+} , en fluorescencia también se muestra un solo tipo de abatimiento y se aprecia un aumento en la absorbancia conforme aumenta la cantidad de metal. Para este metal se llegó a una concentración de 2.1 μM para observar un abatimiento significativo en la intensidad de fluorescencia. Lo mismo ocurre en los estudios por ultravioleta visible, pero en este caso se definen bandas de absorción nuevas a 307 y 360 nm, esto se atribuye a las transiciones $d-d^*$ del complejo $[\text{Fe}(\text{NH}_3)_6]^{2+}$ que suelen ser de intensidad baja y en la zona del visible mientras que las transiciones de transferencia de carga del ligando al metal δ_L-d^* (LMCT) son de intensidad alta y en la zona del ultravioleta. La coloración de la solución cambio a amarilla característica de las sales de hierro. Por lo que también se propone la formación de complejos de Fe^{2+} con las aminas del PEI. Los complejos de Fe^{2+} tienen 6 electrones en los orbitales d , en ausencia de ligandos, los orbitales están degenerados; cuando se forman los complejos de coordinación surge el desdoblamiento de las energías de los orbitales d produciendo una división del campo cristalino. Este efecto se debe a las diferentes fuerzas de repulsión electrostáticas entre el par de electrones del donador y los electrones en los distintos orbitales d del ion metálico central. Las moléculas de agua son ligandos de alto spin y en consecuencia producen un campo débil. Cuando se cambia de

ligando como -NH_3 se produce un complejo de espín bajo y en consecuencia producen un campo alto.

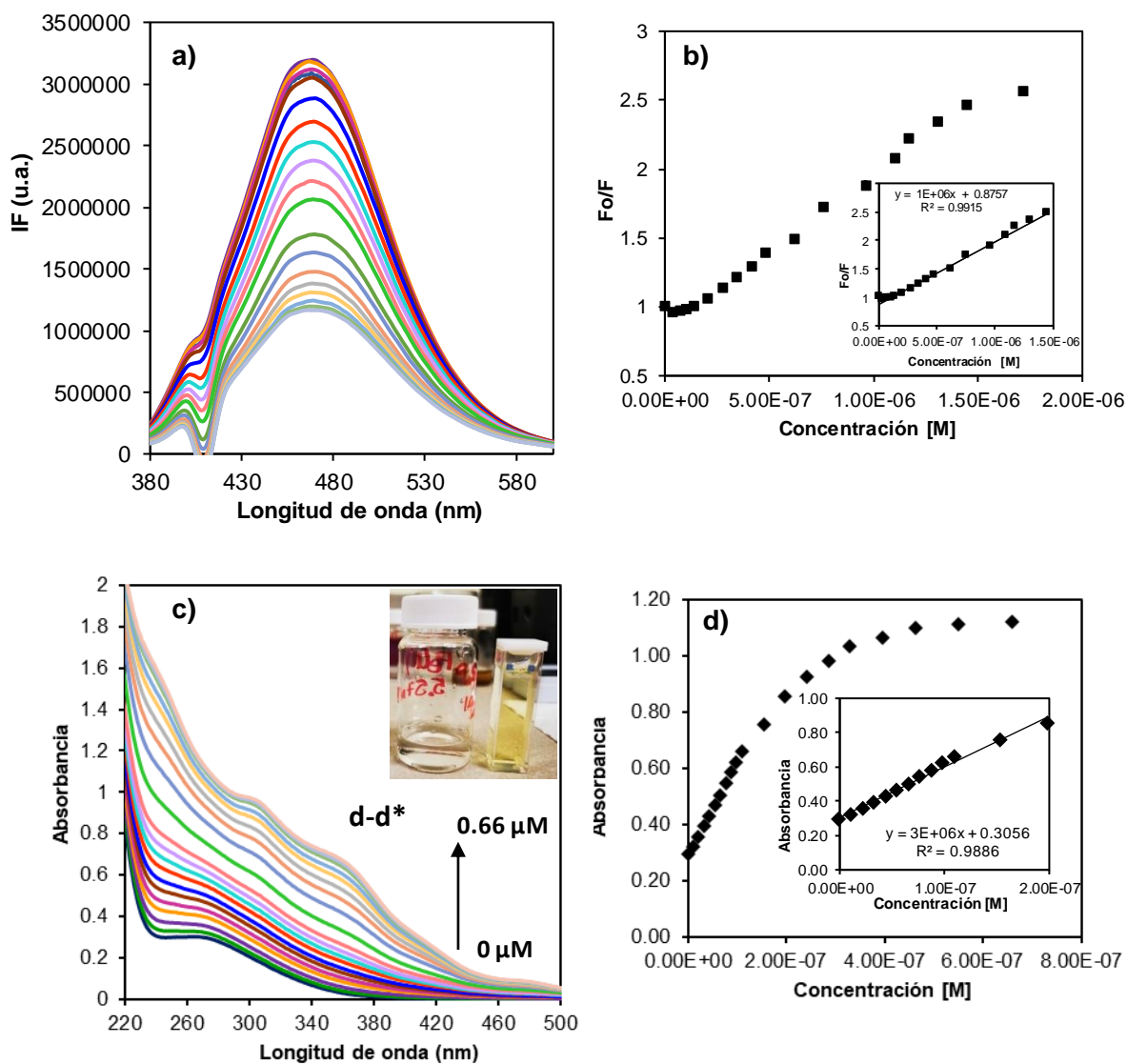


Figura 76. Titulación de NCs de Cu frente a iones Fe^{2+} a) por Fluorescencia molecular, b) curva de Stern-Volmer, c) titulación por UV-visible y d) curva de calibración de 0-1.7 μM .

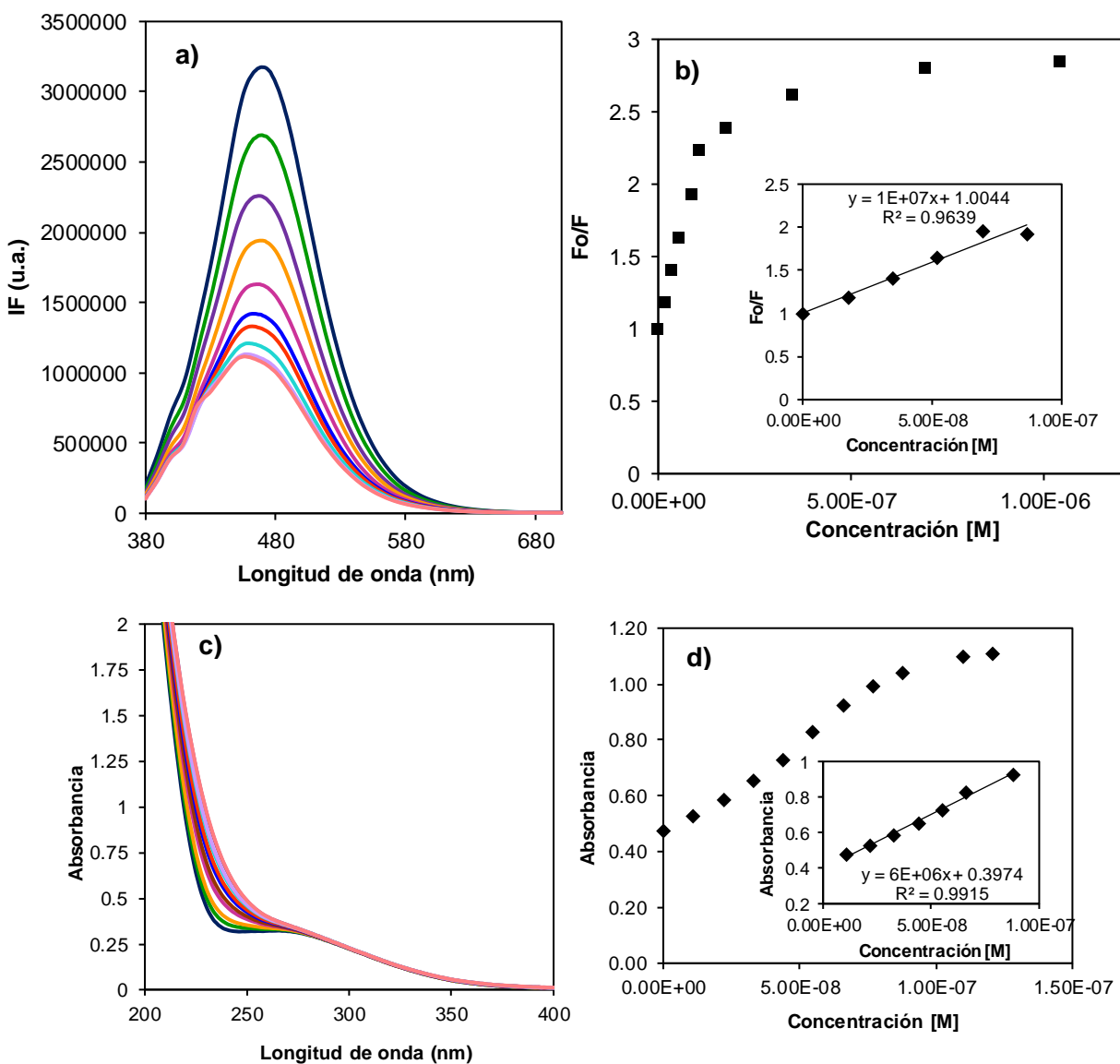


Figura 77. Titulación de NCs de Cu frente a iones Ni²⁺ a) por Fluorescencia molecular, b) curva de Stern-Volmer, c) titulación por UV-visible y d) curva de calibración de 0-0.12 μM.

Los resultados de abatimiento de fluorescencia con Ni^{2+} mostraron una saturación hasta $0.087 \mu\text{M}$, sin un cambio en la coloración de la solución en consecuencia, no se observan cambios en la absorbancia de los NCs ni la presencia de bandas nuevas, pero en fluorescencia también se muestra un solo tipo de abatimiento (Figura 77b).

En la Figura 78 se compara el abatimiento de fluorescencia de los NCs frente a iones metálicos diferentes a una concentración de $0.50 \mu\text{M}$, en este gráfico se identifican los metales en donde el abatimiento es mayor (Cu^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+}). En la tabla 8 se resumen los parámetros analíticos calculados con las curvas de Stern-Volmer en el intervalo lineal. El límite de detección se calculó a partir de $3 \sigma/m$, donde m es la pendiente de la curva de titulación y σ es la desviación estándar de la medición de 10 soluciones blanco del NCs (0.02234). Los límites de detección calculados están en orden nanoMolar, lo cual nos indica la sensibilidad alta del nanosensor además el cambio de color proporciona la identificación del analito de manera visual y en tiempo real.

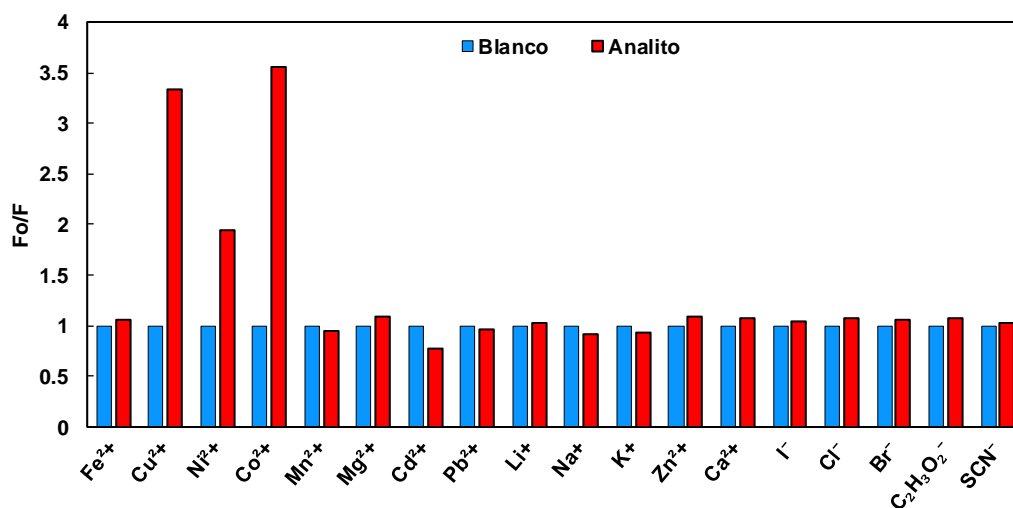


Figura 78. Estudios de selectividad de NCs Cu con PEI en medio neutro a una concentración de metal de $0.20 \mu\text{M}$.

Tabla 8. Parámetros analíticos calculados de las titulaciones de fluorescencia con NCs de Cu.

Metal	Intervalo lineal (μM)	K_{sv} (Lmol^{-1})	Límite de detección (nM)	R^2	Coloración
Cu²⁺	0 - 0.30	1.15E+07	5.83	0.9925	Azul
Co²⁺	0 - 0.26	1.14E+07	5.87	0.9771	Rosa
Fe²⁺	0 - 1.44	2.29E+06	61.06	0.9915	Amarilla
Ni²⁺	0 - 0.09	1.15E+07	5.81	0.9639	-

5.9. Estudio de los tiempos de vida de los NCs de Cu

Los estudios de tiempos de vida en fluorescencia es una caracterización óptica que permite conocer el tiempo en que un fluoróforo pasa al estado excitado, antes de emitir un fotón y regresar al estado fundamental. Los tiempos pueden variar desde picosegundos hasta cientos de nanosegundos dependiendo del fluoróforo. Es una propiedad intrínseca que no depende de la concentración, absorción ni la intensidad de fluorescencia del fluoróforo. Sin embargo, si es afectado por factores externos como la temperatura y la presencia de abatidores de fluorescencia. Si estos abatidores intervienen en el estado excitado los tiempos de vida se ven afectados, por ello esta técnica permite estudiar el ambiente químico y entorno molecular que afecta la fluorescencia, así como establecer los mecanismos de interacción con los abatidores.

El mecanismo de abatimiento de fluorescencia del sensor de NCs de Cu con PEI, frente a iones metálicos es por medio de la formación de complejos supramoleculares en estado basal. Esto se comprobó utilizando la técnica de UV-visible y como experimentos adicionales se realizaron estudios de tiempos de vida. Se obtuvieron valores de $\tau = 57$ ns en ausencia y presencia de los iones Fe^{2+} y Cu^{2+} (Figura 79). Se debe señalar que no ocurre ningún cambio en los tiempos de vida, lo cual indica que las especies responsables del abatimiento de fluorescencia no intervienen en el estado excitado del NCs. Esto corrobora un abatimiento estático planteado en los estudios de ultravioleta.

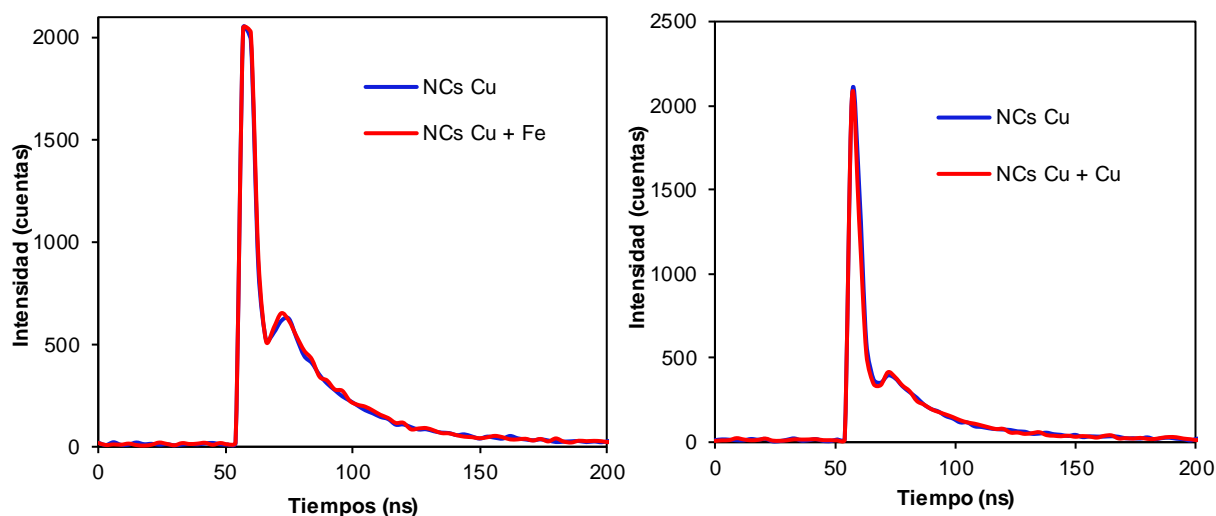


Figura 79. Decaimiento del tiempo de vida de fluorescencia de NCs Cu en ausencia y presencia de 0.20 μM de iones a) Fe^{2+} y b) Cu^{2+} .

5.10. Caracterización electroquímica de NCs de Cu

La respuesta electroquímica de los NCs de Cu se evaluó en las condiciones mencionadas previamente para los NCs de Ag. Se utilizó un sistema de 3 electrodos en un medio acuoso, un electrodo de trabajo de carbón vítreo, Ag/AgCl como electrodo de referencia y platino como contraelectrodo. En la Figura 80 se muestra la actividad electroquímica de los NCs de Cu, mostrando un sistema cuasi reversible en medio ácido. En pH 3, los NCs muestran una señal de oxidación a -0.05 V, señalada como la oxidación del Cu^0 del NC, después aparece otro proceso de oxidación a +0.11 V, atribuida a la obtención de Cu^{2+} . Sin embargo, la oxidación de $\text{Cu}^0 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + 2\text{e}^-$ en medio acuoso suele ser tan rápida y llevarse en un solo paso, se ha reportado la presencia de estas dos señales en estudios electroquímicos con NPs de Cu.⁷⁸ En medio neutro solo aparece una señal alrededor de +0.66 V atribuida a la oxidación del PEI como ocurría con NCs Ag-PEI.

Mientras que a pH 11 el sistema no presenta actividad ya que no hay picos de oxidación del PEI ni Cu^0 .

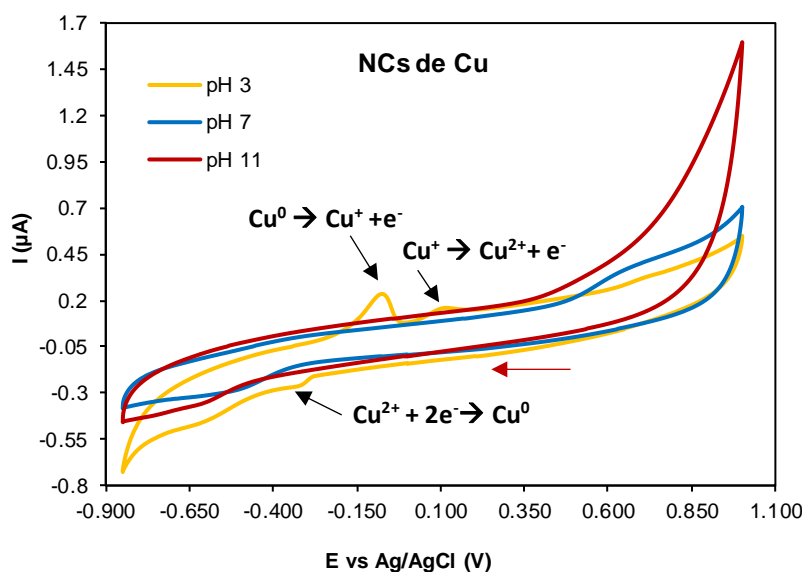


Figura 80. Voltamperometrías cíclicas a 100 mVs^{-1} de soluciones acuosas de CuNCs a valores de pH diferentes con burbujeo de N_2 .

En la literatura se ha reportado la afinidad del Cu hacia moléculas con sustituyentes amino, de acuerdo con la teoría de Pearson los ácidos duros interaccionan más con las bases duras y los ácidos blandos con las bases blandas. La base en este caso son las aminas del polímero, considerada como una base dura. Si comparamos la dureza de los metales Ag(blando) y Cu(duro), las especies de Cu serán más afines hacia el polímero que la plata, en consecuencia, la afinidad entre el polímero y los NCs de Cu es mayor que con los NCs Ag. Y debido a lo anterior, no se presenta tan marcada la oxidación del PEI con estos NCs como se aprecian en los voltamperogramas con NCs Ag-PEI (Figura 59). Estos resultados se relacionan con las caracterizaciones fisicoquímicas, ya que los NCs Cu-PEI fueron los que presentaron reversibilidad y linealidad menor en los estudios como sensor de pH.

De la misma forma que con los NCs de Ag, se realizó la comparación del nanoclúster con nanopartículas. En la Figura 81 se muestran las voltamperometrías

cíclicas de NPs de Cu comerciales con el fin de comparar el comportamiento electroquímico. Sin embargo, las nanopartículas de Cu no mostraron actividad. Estos resultados son un indicativo de la importancia en la funcionalización y propiedades de los NCs sintetizados en este trabajo, además hay que mencionar que es la primera vez que se reporta la actividad electroquímica de NCs de Cu.

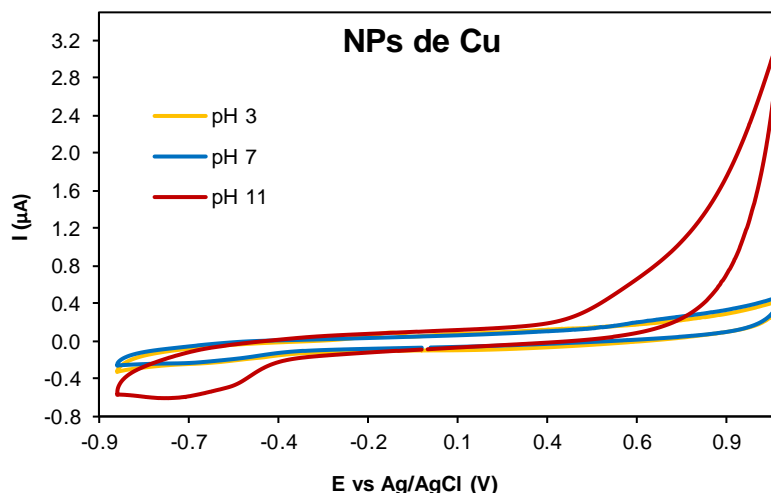


Figura 81. Voltamperometrías cíclicas a 100 mVs^{-1} de soluciones acuosas de NPs Cu a valores de pH diferentes con burbujeo de N_2 .

5.11. NCs metálicos como sensores de ácido fólico

Los resultados de potencial Z de los NCs recubiertos con PEI mostraron una carga positiva en un intervalo amplio de pH (Figura 57), por lo que se propone su utilización como sensores de ácido fólico, debido a que esta molécula presenta una carga negativa por los grupos carboxílicos en su estructura, con $\text{pKa} = 3.46$ y 4.83 (Figura 82).

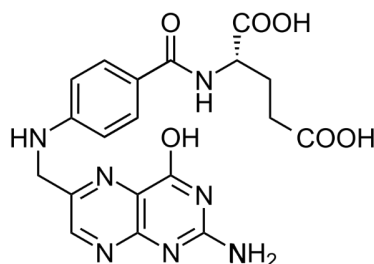


Figura 82. Estructura del ácido fólico.

La polietilenimina le proporciona a los NCs una carga superficial positiva debido a las aminas primarias, secundarias y terciarias en su estructura. En un medio adecuado, los NCs pueden interactuar por interacciones electrostáticas con cargas negativas de otras moléculas como el AF.

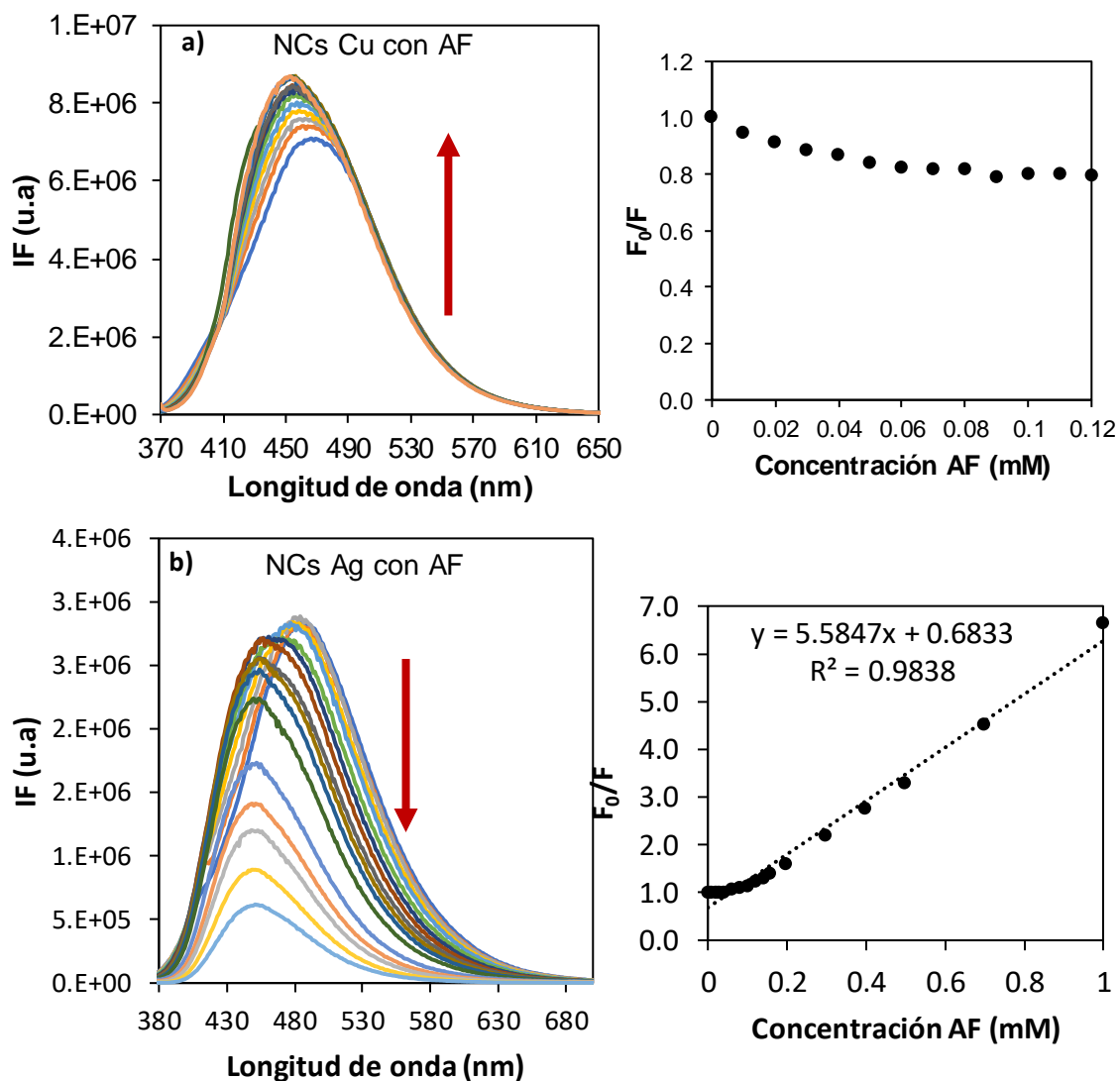


Figura 83. Espectros de fluorescencia y curvas de abatimiento de NCs de a) Cu-PEI y b) Ag-PEI en buffer PBS pH = 7.4.

Las titulaciones y los perfiles de abatimiento de los NCs con PEI se muestran en la Figura 83. En el caso de los NCs Cu-PEI la fluorescencia aumenta hasta llegar a la saturación (60 μ M). En cambio, para los NCs de Ag-PEI, no se aprecia un abatimiento hasta concentraciones mayores de 0.20 mM, donde la fluorescencia disminuye con un valor de $K_{sv} = 5.58 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}$. Debido al desplazamiento de la banda de emisión, se utilizó como referencia la $\lambda=482 \text{ nm}$.

En ambos casos la intensidad de fluorescencia máxima se desplaza a menores longitudes de onda de 470 a 455 nm para Cu y de 490 a 447 nm para Ag. Esto se puede relacionar con una disminución del tamaño de partícula, al realizar los cálculos del número de átomos teóricos con la ecuación 1 se obtienen 17 átomos para Cu y 8 átomos para Ag, estos resultados se resumen en la Tabla 9.

Este cambio en el número de átomos de NCs se estudió por dispersión de luz dinámica, esperando la disminución del diámetro hidrodinámico como indicaban los cálculos teóricos para N. Sin embargo, se obtuvieron tamaños mayores conforme aumenta la concentración de AF (Tabla 10).

Tabla 9. Diferencia en la cantidad de átomos teóricos de los NCs con PEI en presencia de ácido fólico.

NCs	λ_{EM1}	N_1	λ_{EM2}	N_2
PEI-Cu	470	19	455	17
PEI-Ag	490	11	447	8

* E_{Fermi} para Cu = 7 mV y Ag = 5.49 mV.

Tabla 10. Variación del diámetro hidrodinámico a diferentes concentraciones de AF.

[AF μM]	D_H (nm)
0	2.0
40	3.6
78	2.8
115	4.9
134	4.2
188	3.9
205	11.1
290	10.0

5.12. Mecanismo de abatimiento de los NCs frente al AF

El PEI es un polímero utilizado en la liberación de genes, debido a su naturaleza policatiónica le permite condensar cadenas de oligonucleóticos con carga negativa y facilitar la entrada a la célula mediante endocitosis.³¹ Los resultados anteriores sugieren la posible condensación de moléculas de AF en las cadenas del polímero, además los resultados por DLS indican un incremento del tamaño de partícula sin llegar a la aglomeración. En la titulación de NCs PEI-Cu con AF, las interacciones electrostáticas entre el PEI y AF son débiles a comparación de las interacciones del PEI y Cu del NCs. Por ello, no ocurre un cambio en la intensidad de fluorescencia, porque los grupos amino ya se encuentran comprometidos con el cobre. Y como se mencionó en los sensores de iones metálicos, de acuerdo con la teoría de ácidos y bases de Pearson, los iones Cu^{2+} son ácidos con comportamiento intermedio, mientras que los grupos amino se clasifican como bases duras cuya basicidad disminuye mientras más voluminosos sean los sustituyentes en las aminas, efecto conocido como *Impedimento P*.

Si se comparan los aductos Nitrógeno-Metal entre ambos NCs, la afinidad entre el PEI y el Cu es mayor por su comportamiento duro-intermedio. A diferencia de los iones Ag^+ , cuya clasificación es de un ácido blando debido a que tiene una cantidad de electrones mayor y es más polarizable. En consecuencia, la afinidad duro-blando del PEI y Ag produce que las aminas del polímero se encuentren más

disponibles y puedan interactuar con otras especies, en este caso el AF abatiendo la fluorescencia del NC.

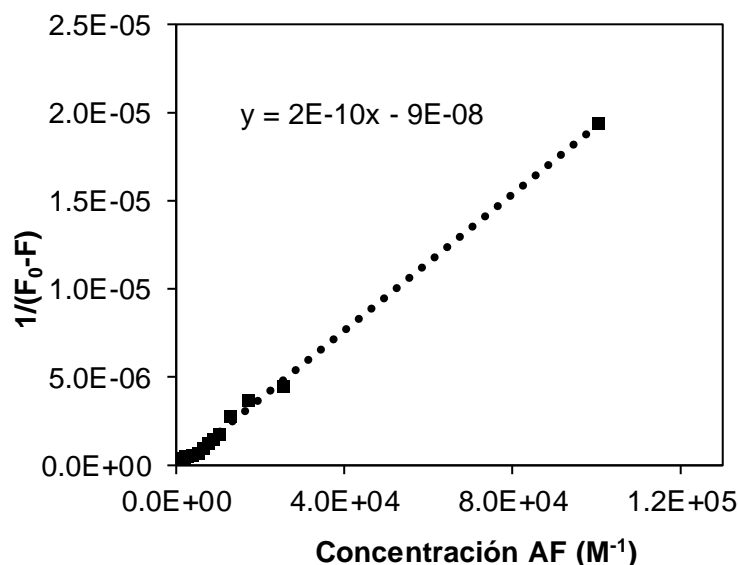


Figura 84. Curvas de Stern-Volmer modificadas contra el inverso de la concentración de AF de PEI-Ag en buffer PBS pH = 7.4.

En la Figura 84 se realizó la curva de Stern-Volmer modificada para conocer la constante de afinidad entre el NCs y el AF ($K = 4.5 \times 10^2 \text{ Lmol}^{-1}$) en el intervalo lineal de 0-75 mM ($R^2 = 0.9977$). En la literatura se ha reportado una variedad de sensores ópticos de AF con límites de detección en el orden del nM o incluso menores.^{40,79-81} Sin embargo, existen muy pocos reportes en el uso de NCs metálicos para la identificación de este tipo de analitos, además el intervalo de trabajo del sensor se encuentra dentro de las cantidades utilizadas en los suplementos alimenticios y vitaminas de acuerdo con las recomendaciones de ingesta diaria.⁸²

5.13. Ensamblajes FRET NCs-NCs y QDs-NCs

Uno de los objetivos de este trabajo es desarrollar ensamblajes FRET entre NCs y QDs, que permitan el desarrollo de nanosensores nuevos basados en el fenómeno

FRET con características analíticas mejoradas. Con este fin se sintetizaron nanomateriales con ligandos de cargas superficiales diferentes, los QDs se recubrieron con AMP, GHS y CA; mientras que los NCs se sintetizaron con PEI y BSA.

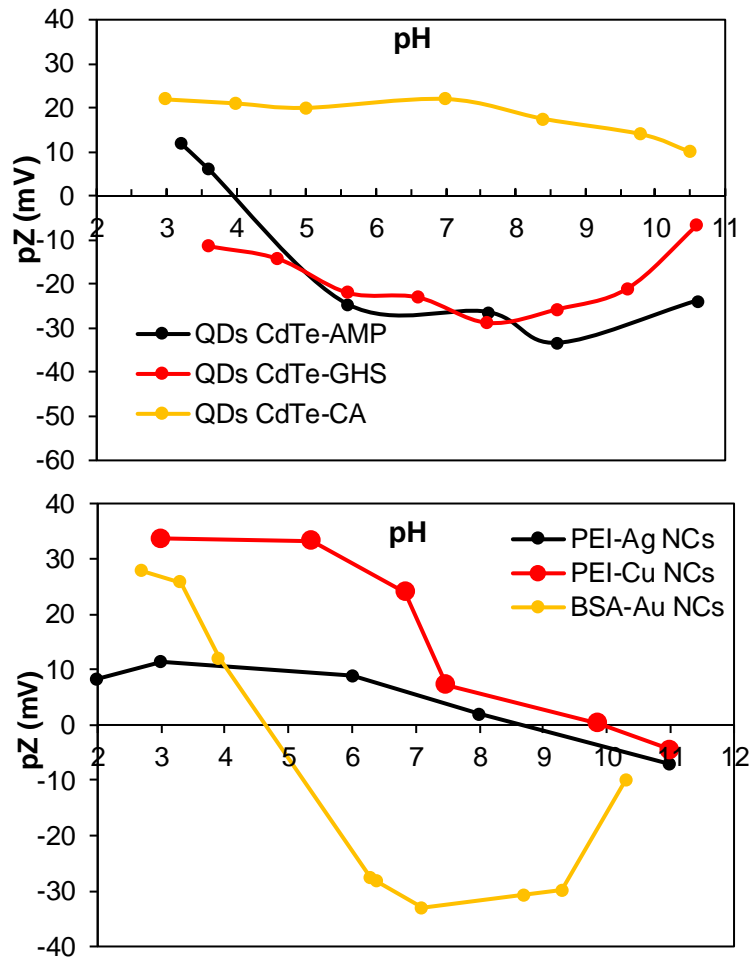


Figura 85. Estudios de potencial Z de QDs y NCs a valores diferentes de pH.

En la Figura 85 se muestran los estudios de pZ para conocer su carga superficial a valores de pH diferentes y proponer los siguientes ensambles. Todos los experimentos se realizaron en buffer PBS a pH = 7.4.

El uso de puntos cuánticos como nanosensores en sistemas FRET ha sido ampliamente estudiado para la detección de especies de interés biológico, iones metálicos, fármacos, etc. La diferencia en este trabajo es la aplicación de los NCs

como donadores o aceptores de energía, debido a que existen pocos reportes sobre las aplicaciones de los NCs en sistemas FRET. Además, al utilizar los NCs como donadores, los QDs pueden utilizarse como aceptores. Esto ofrece ciertas ventajas debido a que los puntos cuánticos presentan bandas de absorción amplias y coeficientes de absorción altos, esto permite una excitación eficiente a diferencia de otros donadores de energía como los colorantes orgánicos.

El fenómeno FRET es un proceso de abatimiento de la fluorescencia que ocurre en el estado excitado de la especie donadora, donde se involucra la transferencia de energía no radiativa hacia una especie aceptora cuya proximidad es muy estrecha, la misma especie es excitada y después puede relajarse emitiendo un fotón de energía menor. El proceso anterior se puede llevar a cabo si se obtiene un traslape en la banda de emisión del donador con la banda de absorción del aceptor. Por ello, como primera gráfica se muestran los traslapes de los ensambles FRET propuestos, con estos datos y las siguientes ecuaciones se calculan los parámetros que caracterizan el proceso. Como la eficiencia en la transferencia de energía (E), la distancia donador-aceptor (r), la distancia donde ocurre el 50 % de la transferencia de energía conocida como la distancia de Förster (R_0) y la integral de solapamiento (J).

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (1) \text{ Eficiencia del proceso FRET}$$

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \phi J(\lambda) \quad (2) \text{ Distancia de Förster}$$

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3) \text{ Integral de solapamiento}$$

Una de las principales características para que un proceso FRET se lleve a cabo es que ambas especies deben encontrarse a una distancia menor de 10 nm, esto puede lograrse por medio de interacciones electrostáticas entre la especie donadora y aceptora, además de interacciones supramoleculares como los enlaces de hidrógeno entre los ligandos de cada nanomaterial. Debido a lo anterior se

pueden formar complejos cuya afinidad se estudia con la ecuación de Stern-Volmer modificada:

$$\frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{F_0} + \frac{1}{KF_0[Q]} \quad (5) \text{ Ecuación Stern – Volmer modificada}$$

Donde F_0 y F es la intensidad de fluorescencia en ausencia y presencia del abatidor respectivamente, K es la constante de enlace del complejo donador-abatidor y $[Q]$ es la concentración del abatidor.

En las Figuras siguientes (86-89) se presentan los estudios de los ensambles FRET enlistados a continuación. Primero se muestran los traslapes en los espectros de absorción y emisión de fluorescencia, así como las titulaciones realizadas en un medio de buffer de fosfatos a pH = 7.4.

- Donador@Aceptor
- NCsPEI-Cu@NCsBSA-Au
- NCsPEI-Cu@QDs-AMP30m
- NCsPEI-Cu@QDs-GHS
- NCsPEI-Cu@QDs-AMP15m
- NCsPEI-Ag@QDs-AMP30m

En la Figura 86a el ensamble de NCsPEI-Cu@NCsBSA-Au muestra un traslape total con el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción de los NCs BSA-Au. Sin embargo, en las primeras adiciones de la especie aceptora ocurre un aumento en la fluorescencia y un desplazamiento hipsocrómico de la longitud de onda de los NCs de Cu, después de añadir 40 μ L de los NCs de Au ocurre su abatimiento sin obtener un comportamiento lineal en la transferencia de energía.

Los resultados del ensamble NCs PEI-Ag@QDs-AMP30m de la Figura 87 muestran un buen traslape entre los espectros de absorción y emisión ($\lambda = 607$ nm). La titulación con los puntos cuánticos mostró un abatimiento de fluorescencia de los NCs de hasta un 20%, la fluorescencia del QD fue aumentando debido a la banda amplia de absorción del punto cuántico. En consecuencia, las fotografías bajo luz

UV muestran de manera visual el cambio en la fluorescencia de la solución conforme se realizan las adiciones. La eficiencia en la transferencia de energía calculada fue de un 19.8%.

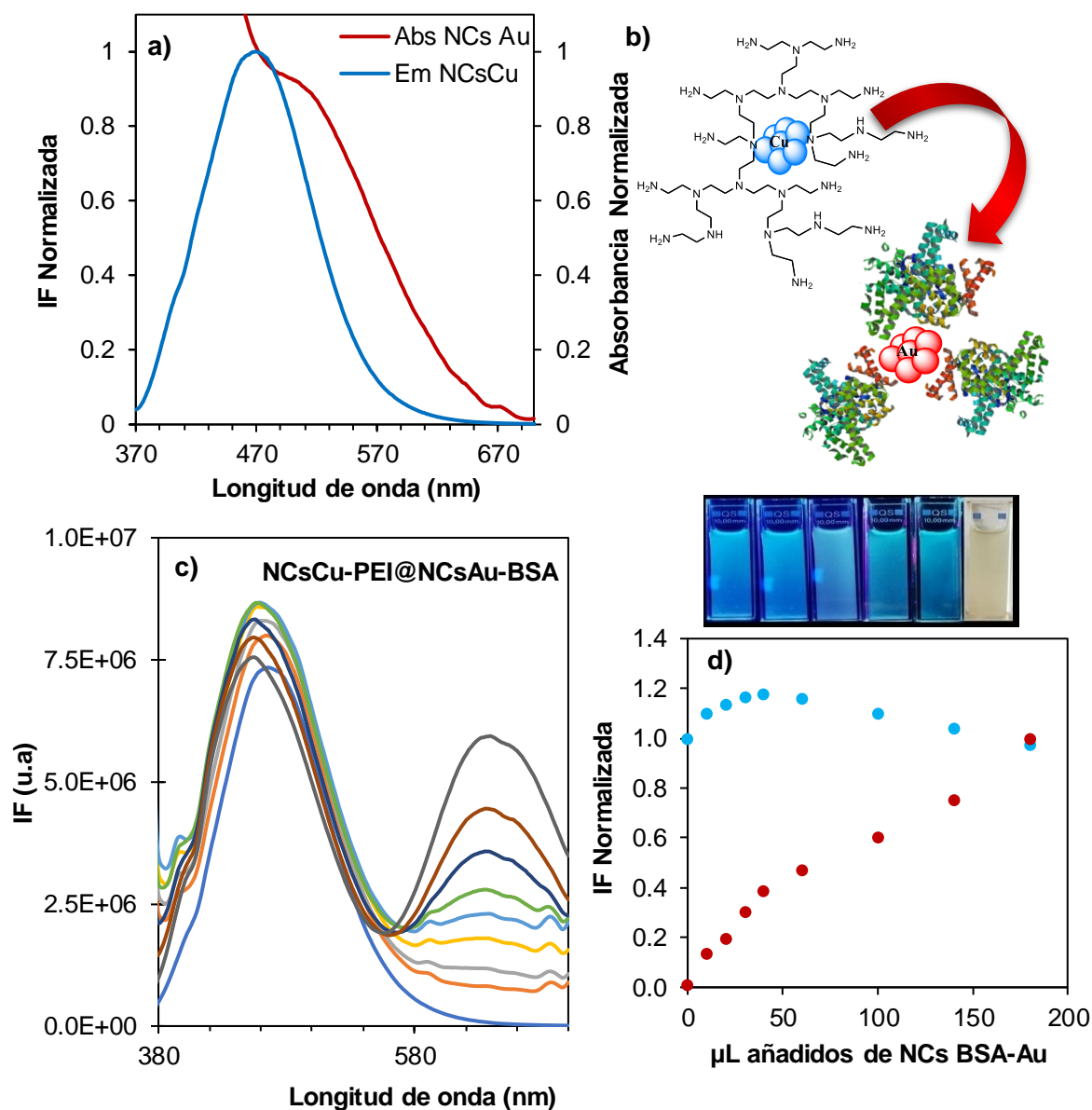


Figura 86. Ensamble NCsPEI-Cu@NCsBSA-Au a) Traslape de espectros b) Modelo FRET, c) Titulación de NCs PEI-Cu con NCs BSA-Au d) Gráfico IF normalizada frente a adiciones NCs BSA-Au.

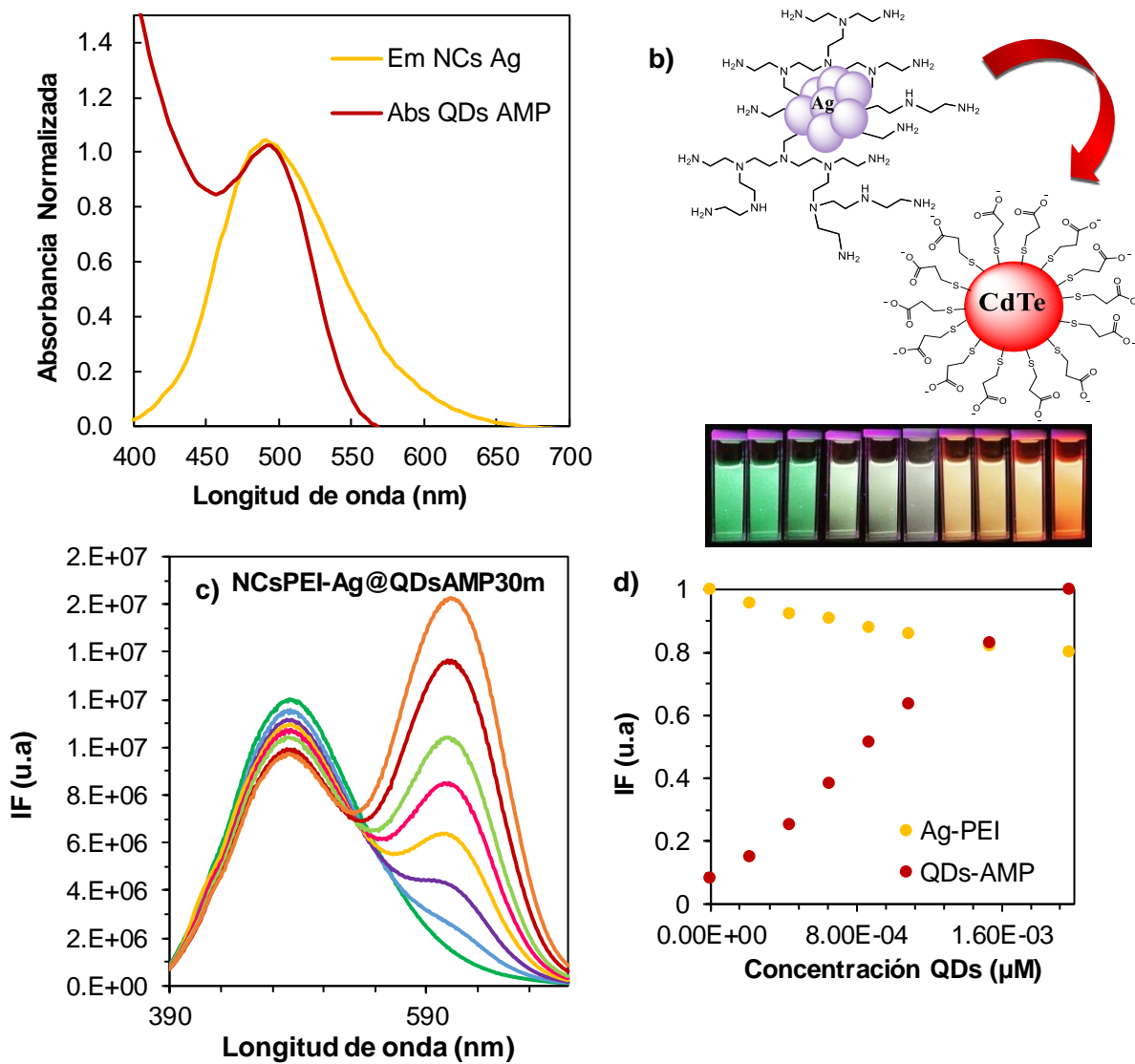


Figura 87. Ensamble NCsPEI-Ag@CdTe-AMP a) Traslapo de espectros b) Modelo FRET, c) Titulación de NCs PEI-Ag con CdTe-AMP d) Gráfico IF normalizada frente a adiciones de QDs.

En los casos anteriores no se apreció el comportamiento típico de un ensamble FRET, ya que no se logró el abatimiento total de la especie donadora. Por ello, las eficiencias en la transferencia de energía fueron menores al 20%. Estos resultados se pueden relacionar con el potencial Z de ambos materiales. Para los NCs PEI-Ag,

su carga superficial en medio neutro es cercano a +8 mV, mientras que los QDs CdTe-AMP presentan un valor de -26.3 mV. La polietilenimina no presenta una carga positiva suficiente para que ocurra el ensamble electroestático con el QD. Además, se puede observar el cambio de color de verde a naranja bajo luz UV por el aumento en la concentración del punto cuántico.

Por ello, se evaluaron los siguientes ensambles utilizando los NCs de Cu como especie donadora debido a que su carga superficial es de +24 mV en medio neutro. En la Figura 88a se aprecia el traslape casi total de la banda de absorción del punto cuántico recubierto con glutatión con el espectro de emisión del NCs. En las condiciones de la titulación, los NCs presentan carga positiva, mientras que el glutatión y el ácido mercaptopropiónico presentan cargas negativas por la desprotonación de los ácidos carboxílicos. Las cargas opuestas provocarán la atracción de los iones carboxilato con las aminas protonadas del PEI de los NCs.

En el ensamble NCs PEI-Cu@QDs-GHS60m se muestra un traslape total en las bandas de absorción y emisión ($\lambda=603$ nm), debido al intervalo amplio de absorción de los QDs. Al realizar las adiciones del punto cuántico ocurre el aumento en su intensidad de fluorescencia y el abatimiento del NCs hasta la concentración de 3.1×10^{-9} M. Los resultados se aprecian mejor en la Figura 88d, para los NCs se pueden identificar dos pendientes en la curva F_0/F , en el intervalo de concentración del QD de 0 a 1.19×10^{-9} M y de 1.19×10^{-9} M a 3.1×10^{-9} M. Estos cambios en la linealidad de la curva nos indican que ocurren los dos tipos de abatimiento de fluorescencia, la formación de un complejo supramolecular entre el donador y aceptor generando el proceso FRET y el abatimiento debido a colisiones entre ambos.

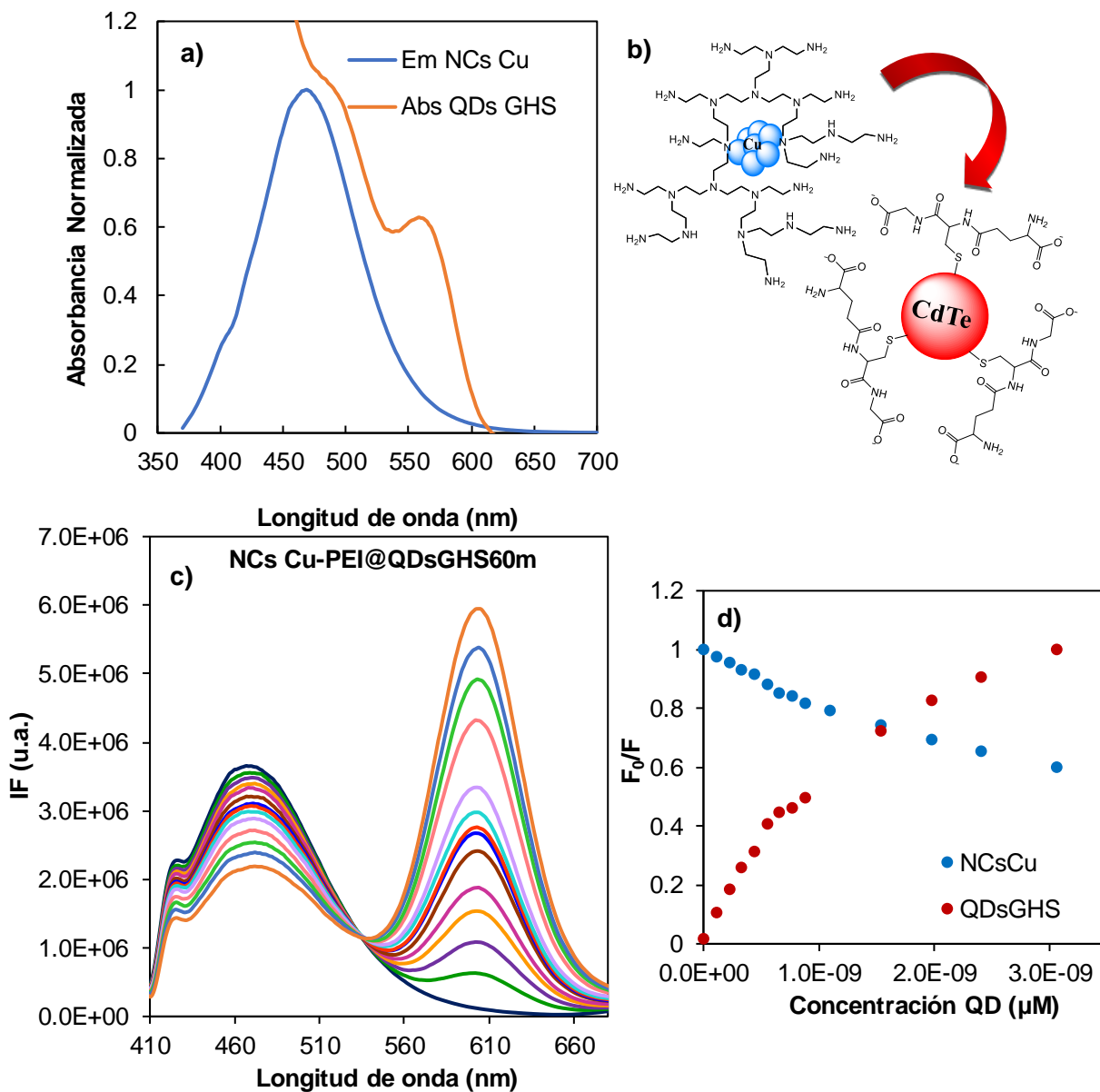


Figura 88. Ensamble NCsPEI-Cu@CdTe-GHS60m a) Traslapo de espectros b) Modelo FRET, c) Titulación de NCs PEI-Ag con CdTe-GHS d) Gráfico IF normalizada frente a adiciones de QDs.

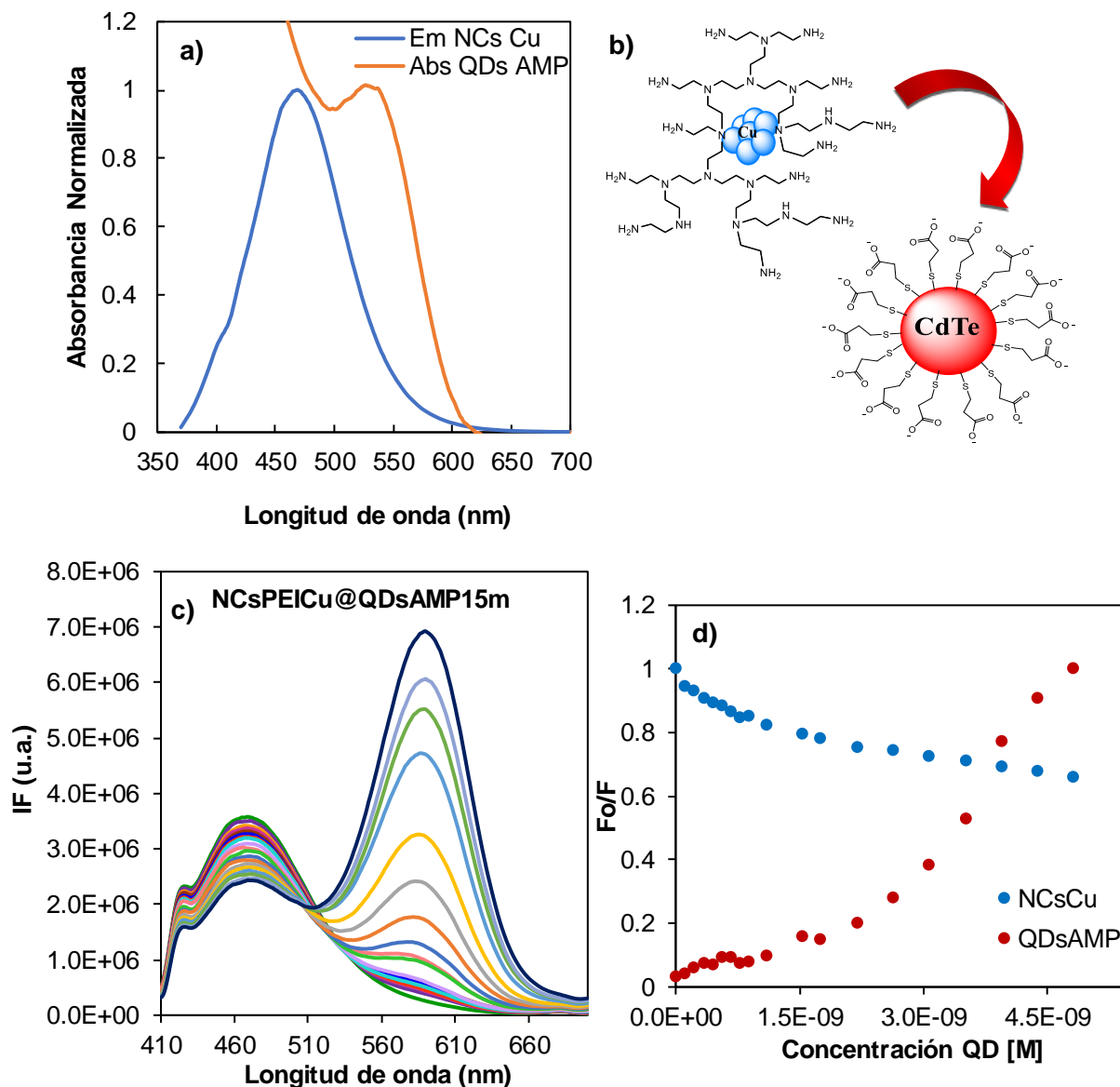


Figura 89. Ensamble NCsPEI-Cu@CdTe-AMP15m a) Traslapo de espectros b) Modelo FRET, c) Titulación de NCs PEI-Cu con CdTe-AMP d) Gráfico IF normalizada frente a adiciones de QDs.

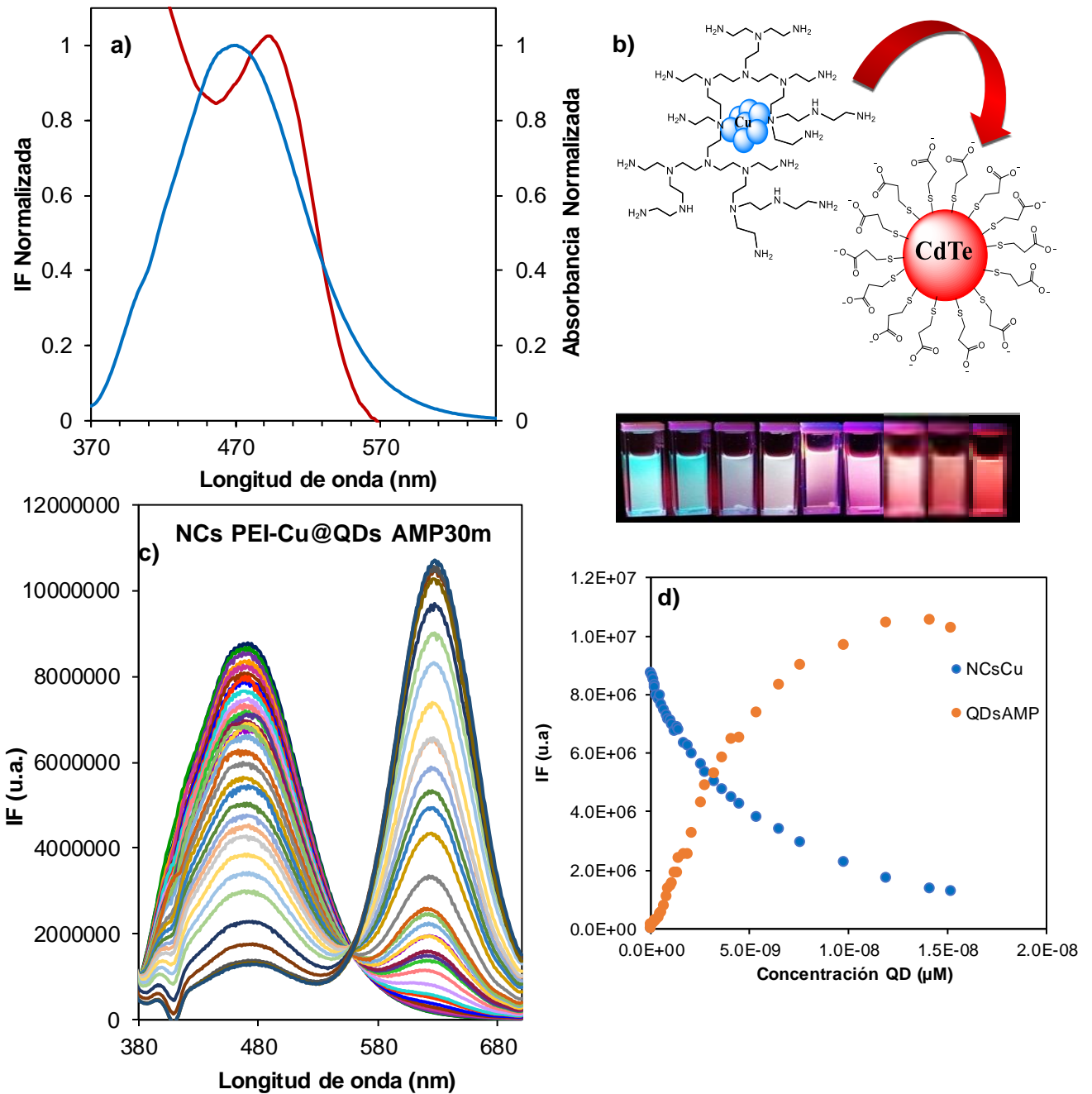


Figura 90. Ensamble NCsPEI-Cu@CdTe-AMP30m a) Traslape de espectros b) Modelo FRET, c) Titulación de NCs PEI-Cu con CdTe-AMP d) Gráfico IF normalizada frente a adiciones de QDs.

Los ensambles NCsPEI-Cu@QDs-AMP también mostraron un abatimiento de fluorescencia de los NCs y un aumento de fluorescencia de los QDs. En las Figuras 89 y 90 muestran un traslape casi total en los espectros de absorción y emisión. Los resultados para el ensamble con el punto cuántico de 15 minutos de reacción (NCsPEI-Cu@QDs-AMP15m), muestra un abatimiento de los NCs por medio de los dos mecanismos, como en el caso anterior. La linealidad de ambas curvas se encuentra en el intervalo de concentraciones del QD de 0 a 8.8×10^{-10} M y de 8.8×10^{-10} M a 4.8×10^{-9} M. Con estos datos se obtuvo una eficiencia en la transferencia de energía de un 32%.

Los resultados del ensamble con los QDs de 30 minutos de reacción (NCsPEI-Cu@QDs-AMP30m), muestran un abatimiento total de la intensidad de fluorescencia del NC. En la curva F_0/F se aprecia un comportamiento lineal hasta llegar a la saturación a una concentración de 15 nM. En consecuencia, la eficiencia en la transferencia de energía aumenta hasta un 64%.

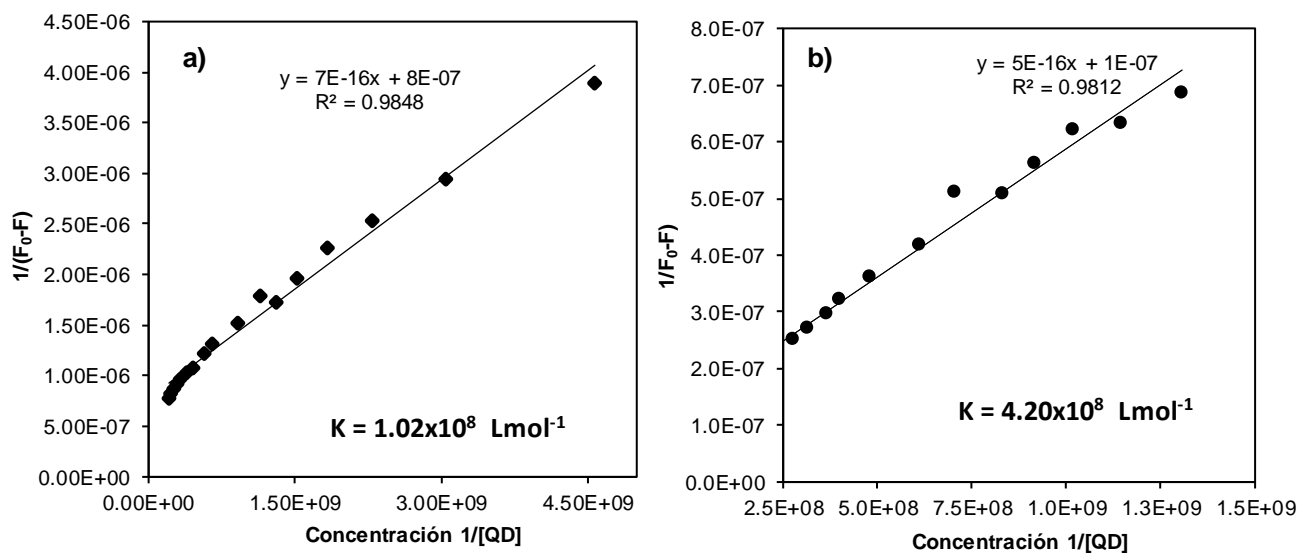


Figura 91. Curvas de Stern-Volmer modificadas contra el inverso de la concentración de QD en buffer PBS pH = 7.4 a) NCsPEI-Cu@CdTe-AMP15m y b) NCsPEI-Cu@CdTe-AMP 30m.

Con los resultados anteriores, se utilizó la ecuación de Stern-Volmer modificada para conocer la constante de afinidad en la formación de los complejos supramoleculares, en los ensambles donde se obtuvo una mayor eficiencia en la transferencia de energía (Figura 91). En la tabla 11 se presentan los datos teóricos de los ensambles mostrados previamente, donde se aprecia que éstos cumplen con la siguiente característica del proceso FRET: $0.5R_0 < r < 1.5R_0$. El ensamble NCsPEI-Cu@CdTe-AMP 30mn, fue el sistema que mostró un abatimiento total en la fluorescencia del donador, la constante de enlace más alta ($4.20 \times 10^8 \text{ Lmol}^{-1}$) y con la eficiencia en la transferencia de energía mayor. Por ello, este sistema se planteó como candidato para un posible nanosensor óptico. Además, bajo luz UV se aprecia el cambio de coloración azul del NC hasta un naranja-rojizo del punto cuántico (Figura 90d). Estas imágenes muestran una gran ventaja de utilizar nanomateriales fluorescentes como sensores, debido a una identificación rápida del analito de manera visual. Además, utilizar NCs como donadores de energía en sistemas FRET es una investigación novedosa, debido a que la mayoría de los reportes en la literatura se enfocan a utilizar nanomateriales con rendimiento cuántico mayor, como los puntos cuánticos de semiconductores nanocristalinos o de carbono.⁸³⁻⁸⁵

Tabla 11. Parámetros de los sistemas FRET con NCs metálicos.

Donador	Aceptor	J ($\text{cm}^3\text{Lmol}^{-1}$)	E	R_0 (nm)	r (nm)
NCs PEI-Cu	NCsAu	6.15E-14	0.029	2.97	5.33
NCs PEI-Ag	QDs-AMP 30 min	7.48E-14	0.198	3.44	4.35
NCs PEI-Cu	QDs-GHS 60 min	1.08E-13	0.040	3.27	3.50
NCs PEI-Cu	QDs-AMP 15 min	6.37E-14	0.319	2.99	3.39
NCs PEI-Cu	QDs-AMP 30 min	7.55E-14	0.636	3.45	3.14

5.14. Estudio de los tiempos de vida de los ensambles FRET

Los tiempos de vida en fluorescencia es una medición del tiempo que pasa el fluoróforo en el estado excitado antes de regresar a su estado basal por emisión

del fotón. Como ya se mencionó anteriormente, esta técnica permite estudiar el estado excitado de estas especies y proporcionar información sobre los mecanismos involucrados en el abatimiento, como el fenómeno FRET. En la Figura 92, se muestran los estudios de tiempos de vida de una titulación del ensamble NCs Cu-PEI con QDs-AMP30m a una longitud de onda de excitación de 370 nm. En todos los casos se observa un mismo pulso de excitación de 57 ns. Sin embargo, conforme se van añadiendo cantidades crecientes del punto cuántico, el decaimiento de la fluorescencia cambia, lo cual confirma que ocurre un fenómeno de desactivación en el estado excitado del fluoróforo.

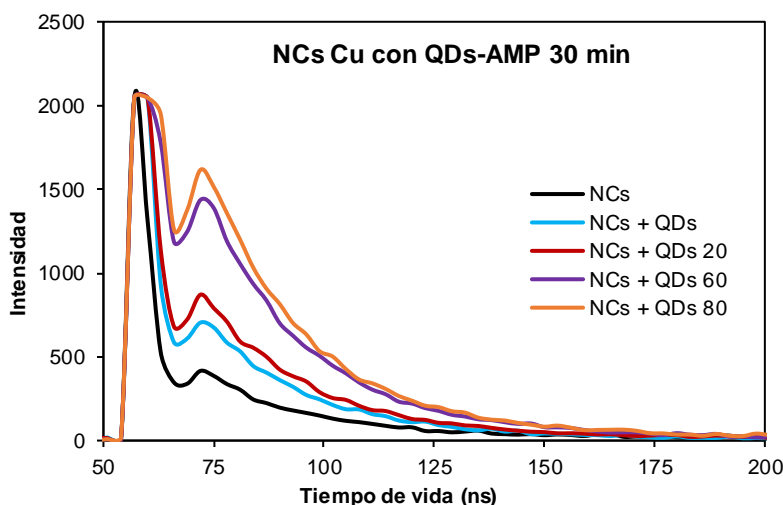


Figura 92. Decaimiento de la fluorescencia del ensamble NCsPEI-Cu@CdTe-AMP30m a una longitud de onda de excitación de 370 nm.

5.15. Respuesta de ensamble FRET frente a la creatina

La molécula de interés que se utilizó para evaluar el sistema FRET anterior fue la creatina, se trata de un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos. Normalmente, se produce en el cuerpo en una tasa muy constante (dependiendo de la masa de los músculos) y se filtra a los riñones excretándola en la orina. La medición de la creatina es el modo más simple de evaluar el funcionamiento de los riñones. Esta molécula tiene dos grupos amino que pueden

convertirse a un grupo guanidinio en un medio adecuado, este grupo posee una afinidad alta hacia los grupos carboxilato. Por lo tanto, en presencia del punto cuántico recubierto con AMP, se esperaría la ruptura del ensamble FRET por la interacción electrostática entre el QD y la creatina. En consecuencia, se presentaría un aumento de la fluorescencia del NCs (Figura 93).⁴²

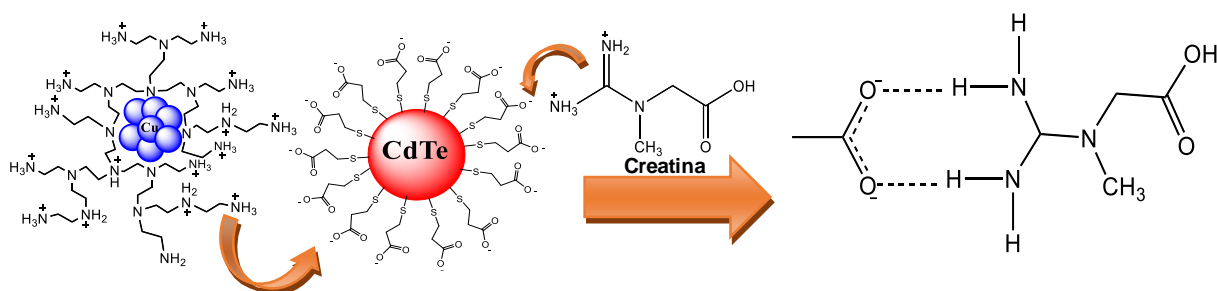


Figura 93. Diseño del sensor NCsPEI-Cu@CdTe-AMP para la identificación de creatina.

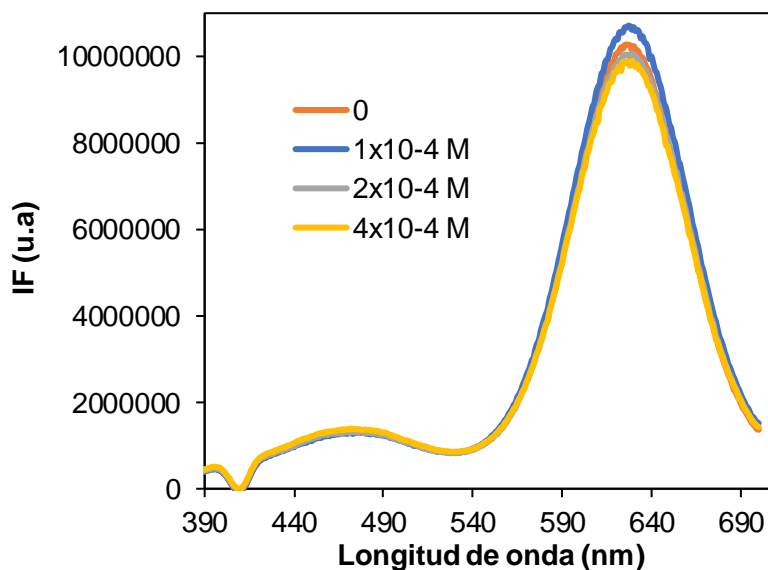


Figura 94. Espectros de emisión de NCsPEI-Cu@CdTe-AMP30min con diferentes concentraciones de creatina ($\lambda_{exc}= 370$ nm).

En la Figura 94 se muestra el espectro de emisión del sistema FRET NCsPEI-Cu@CdTe-AMP30m a una concentración 15 nM del QD y en donde la señal del NCs está totalmente abatida. Se realizaron adiciones crecientes de creatina. Sin embargo, la fluorescencia del QD aumenta en la primera adición y después disminuye sin que varíe la fluorescencia del NCs.

En base a los resultados anteriores se prosiguió a buscar otra molécula que lograra tener interacciones con la superficie del punto cuántico. La arginina es un aminoácido esencial implicado en diversas funciones orgánicas. Aunque no es considerado un aminoácido esencial ya que el cuerpo puede producirla a partir de la glutamina, el ácido glutámico y la prolina. Está involucrada en la producción del óxido nítrico esencial para la homeostasis vascular, el sistema endocrino e inmune y en la detoxificación del amoníaco en el ciclo de la urea. La molécula de arginina mostrada en la Figura 95 posee una estructura guanidina como la creatina, con la capacidad de proveer interacciones electrostáticas y/o enlaces de hidrógeno con especies aniónicas (punto isoeléctrico = 10.76).

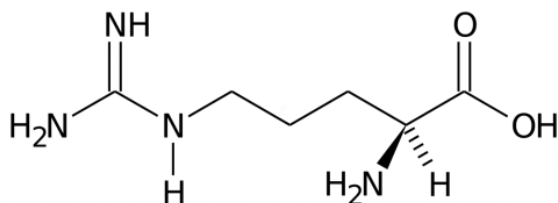


Figura 95. Estructura de L-arginina.

En la Figura 96 se muestra el espectro de emisión del sistema FRET NCsPEI-Cu@CdTe-AMP30m con adiciones crecientes de arginina. El espectro en verde representa el ensamble con una concentración 3 nM del QD. La fluorescencia del QD a 629 nm disminuye conforme aumenta la concentración de arginina, pero la fluorescencia del NCs no muestra el cambio esperado. El abatimiento del punto cuántico puede deberse a interacciones electrostáticas con la creatina, debido a la

carga negativa del QDs por los grupos carboxilato y las cargas positivas del aminoácido en medio neutro.

Aunque la titulación con creatina no muestra un cambio apreciable en la fluorescencia de los NCs de Cu, es importante mencionar que la emisión del NCs puede utilizarse como una señal de referencia para el desarrollo de un sensor radiométrico. Estos sensores tienen la ventaja de evitar las interferencias producidas por el equipo de medición y mostrar respuestas con sensibilidad alta.⁸⁵⁻⁸⁶ Otra ventaja de utilizar un sensor radiométrico fluorescente es la respuesta visual que se puede obtener en tiempo real. Por ejemplo, al iniciar el experimento, la fluorescencia de la solución predominaría de color naranja debido al QD como en la Figura 90d, pero en presencia de la creatina se abate su fluorescencia y cambiaría a un color azul por la emisión del NC. Estas características hacen al ensamble NCsPEI-Cu@CdTe-AMP30m un candidato con gran potencial para su aplicación como sensor de arginina.

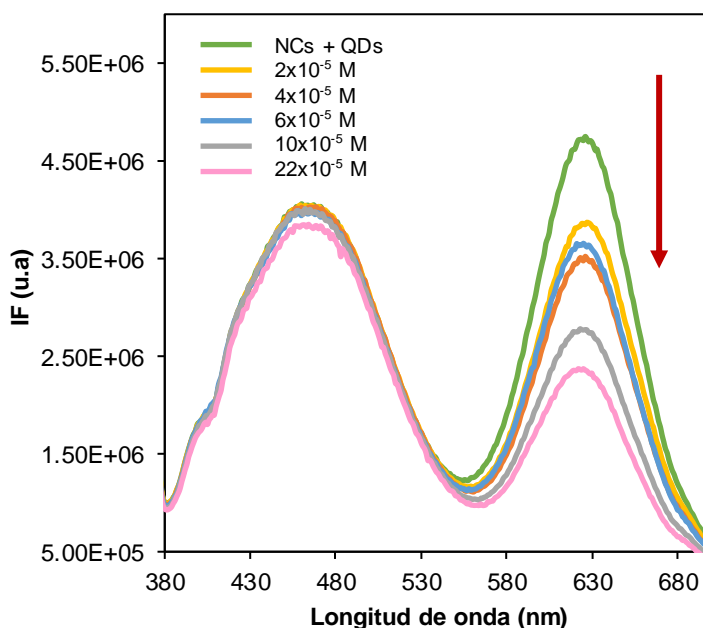


Figura 96. Espectros de emisión de NCsPEI-Cu@CdTe-AMP con diferentes concentraciones de arginina ($\lambda_{exc} = 370$ nm).

5.16. Síntesis y caracterización de CDs con PEI

Los resultados obtenidos en los sistemas FRET plantearon la idea de cambiar los NCs metálicos como aceptores de energía y utilizar otros materiales como donadores. Esto con el fin de obtener ensambles con eficiencias en la transferencia de energía mayores. Una opción son los puntos cuánticos de carbono ya que presentan rendimientos cuánticos altos y pueden emitir a longitudes de onda desde los 400 nm. Xu y colaboradores sintetizaron CDs por un método hidrotérmico utilizando hojas de espinaca como precursor de carbono.⁴⁵

En este caso los CDs se sintetizaron extrayendo la clorofila de hojas de maíz con etanol como el precursor de carbono, las hojas se dejaron en reposo por 48 hrs, el producto se rotavaporó y se secó en horno a 60 °C (Figura 97a). El espectro de absorción muestra una banda a 285 nm característica a las transiciones $n-\pi^*$ de heteroátomos como carbonilo o hidroxilo, mientras que alrededor de 342 nm se aprecia otra banda de intensidad menor atribuida a la transición $\pi-\pi^*$ del grupo $C=C$.⁴¹

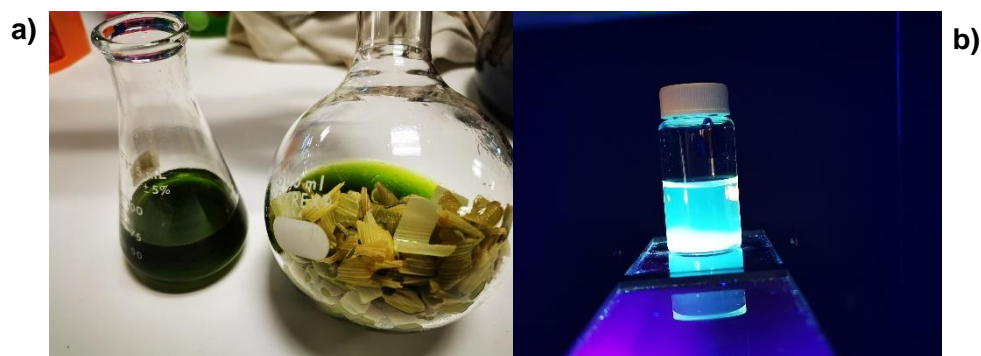


Figura 97. a) Fotografía de la extracción de clorofila de hojas de maíz y b) CDs bajo luz UV.

Los espectros de emisión de la Figura 98 son característicos de los CDs, se aprecia un desplazamiento de las bandas utilizando diferentes longitudes de onda de excitación. Sin embargo, las emisiones se encuentran debajo de los 500 nm,

traslapándose con la emisión de los NCs de Ag (490 nm) y Cu (470 nm). Por lo que no es posible el uso de estos CDs como aceptores de energía en sistemas FRET con los NCs. Sin embargo, debido a la novedad de la síntesis los CDs se caracterizaron por potencial Z para conocer su carga superficial e identificar el tipo de analitos que se podrían identificar.

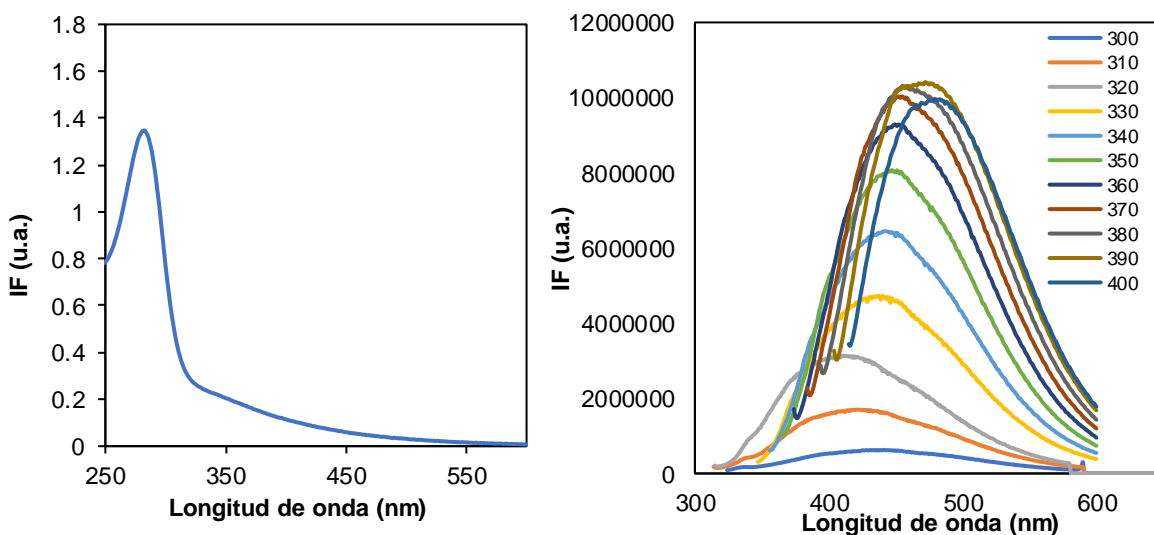


Figura 98. Espectros de UV-visible y fluorescencia a longitudes de onda de excitación diferentes de CDs.

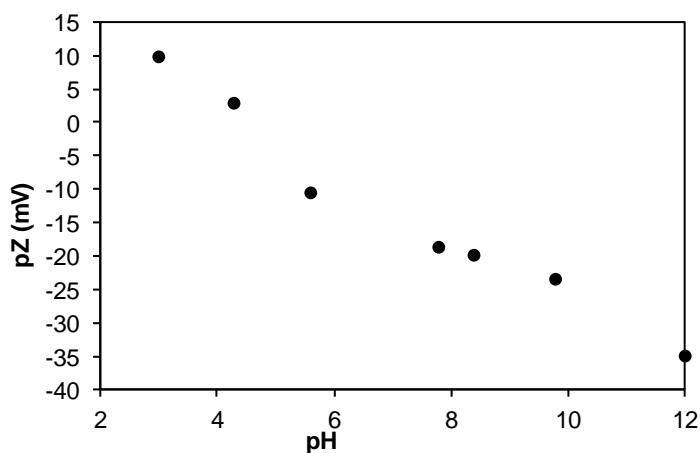


Figura 99. Potencial Z de CDs variando el pH del medio.

La Figura 99 muestra una carga negativa en la mayoría del intervalo de pH. Con estos resultados se planteó usar los CDs como sensores de aminoácidos, empezando por arginina e histidina debido a la carga positiva de éstos en pH 7 (Figura 100). Las titulaciones se realizaron hasta una concentración de 0.45 μM mostradas en la Figura 101. Sin embargo, el abatimiento de la fluorescencia no llegó a ser significativo.

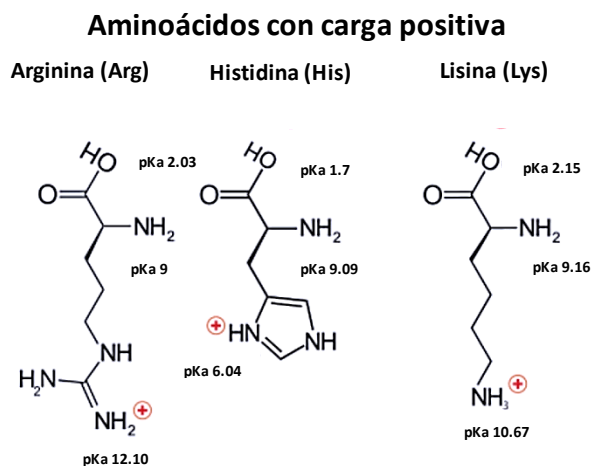


Figura 100. Estructuras de aminoácidos cargados positivamente.

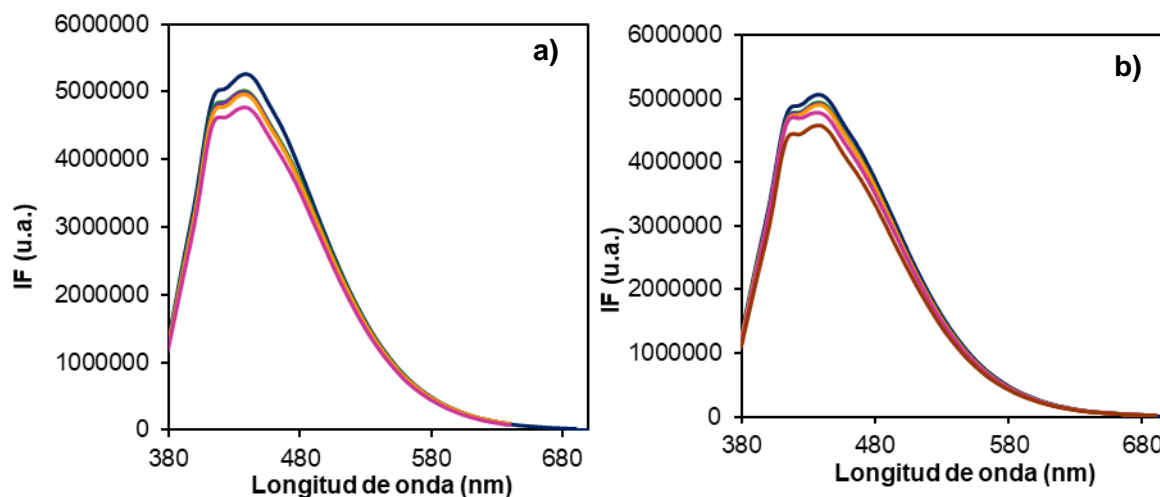


Figura 101. Titulación de CDs con adiciones sucesivas de a) arginina e b) histidina.

5.17. Síntesis y caracterización de QDs de CdS-AMP

Continuando con el interés de realizar ensambles FRET para diseñar sensores fluorescentes más sensibles a especies de interés, se realizó la síntesis de puntos cuánticos de CdS por un método hidrotérmico basándose en lo reportado por Aboulaich⁴⁷ *et al* con modificaciones en el tiempo de reacción. Esto se realizó con el fin de que los QDs presentaran fluorescencia a longitudes de onda menores en comparación de los QDs de CdTe obtenidos anteriormente y así pudieran utilizarse como donadores de energía en ensambles con los NCs metálicos.

En la Figura 102 se muestra el espectro de absorción y fluorescencia de los QDs de CdS, observando una banda de absorción a los 357 nm y una emisión de fluorescencia a 540 nm. Con estos resultados, las longitudes de onda de las emisiones de los NCs de Ag y Cu se traslaparían con la emisión de este punto cuántico, por lo que no se podría diseñar un ensamble FRET para estos materiales.

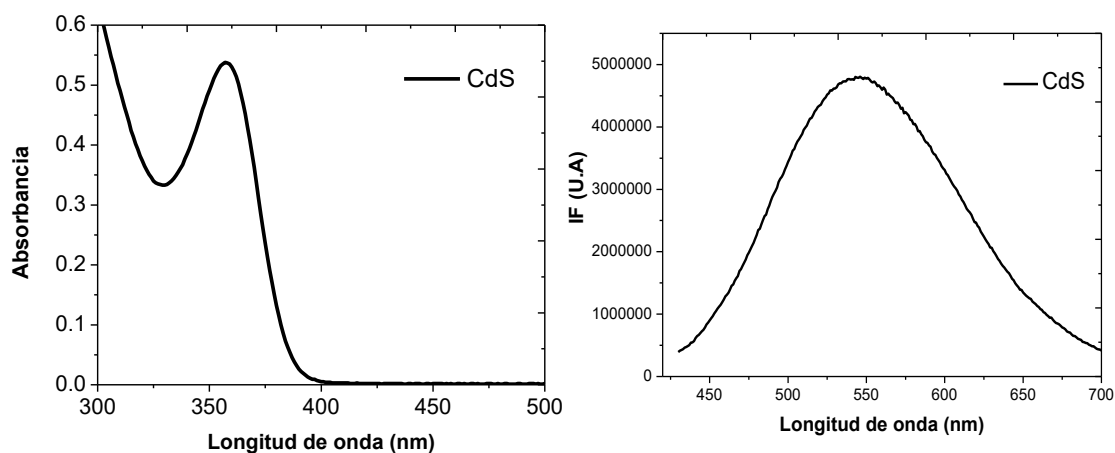


Figura 102. Espectros de UV-visible y fluorescencia molecular de los QDs de CdS.

5.18. Síntesis y caracterización de NCs recubiertos con β -CDx

Las ciclodextrinas han sido objeto de una variedad de aplicaciones debido a su estructura molecular rígida y con una cavidad interior de volumen específico. Esta cavidad es hidrófoba, por lo que estos compuestos son capaces de albergar especies hidrófobas más pequeñas para formar complejos “anfitrión-huésped” en los que la molécula huésped queda encapsulada por la ciclodextrina. Recientemente se ha reportado que el carácter hidrofóbico de la cavidad en las ciclodextrinas sirve para la formación de nanopartículas, debido a interacciones hidrofóbicas entre el metal y los oligosacáridos cíclicos.⁸⁷⁻⁸⁹

En la siguiente Figura se muestra un esquema de síntesis de NCs con β -CDx. Para la obtención de estos materiales. Primero se disuelve el precursor metálico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ o AgNO_3) en solución acuosa, se calienta la solución y se añade la ciclodextrina para mejorar su solubilidad. Finalmente se agrega NaOH para iniciar la reacción por 6 horas.

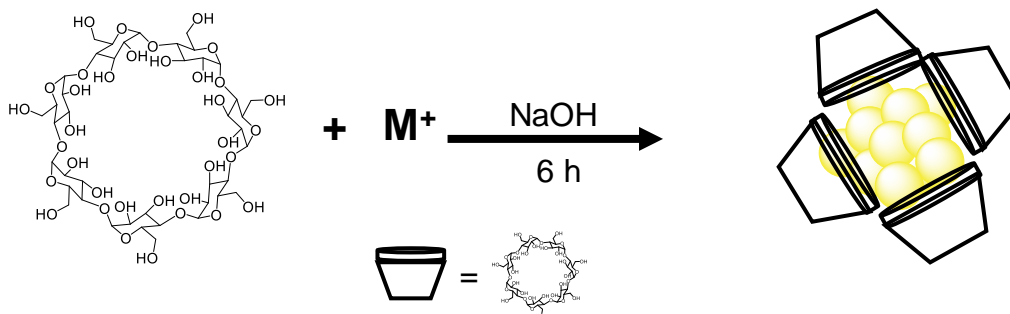


Figura 103. Esquema de la formación de NCs con β -CDx.

En la Figura 104 se muestran los espectros de absorción UV-visible y de fluorescencia de los NCs de Au donde se puede apreciar una banda de absorción alrededor de los 270 nm y la ausencia de la banda correspondiente al plasmón superficial de las nanopartículas de Au (500-600 nm), además de la banda de emisión de fluorescencia a 450 nm. A partir de los resultados obtenidos y haciendo uso de la ecuación 1, se obtiene un valor de 8 átomos de Au por cada nanocluster en este nanomaterial.

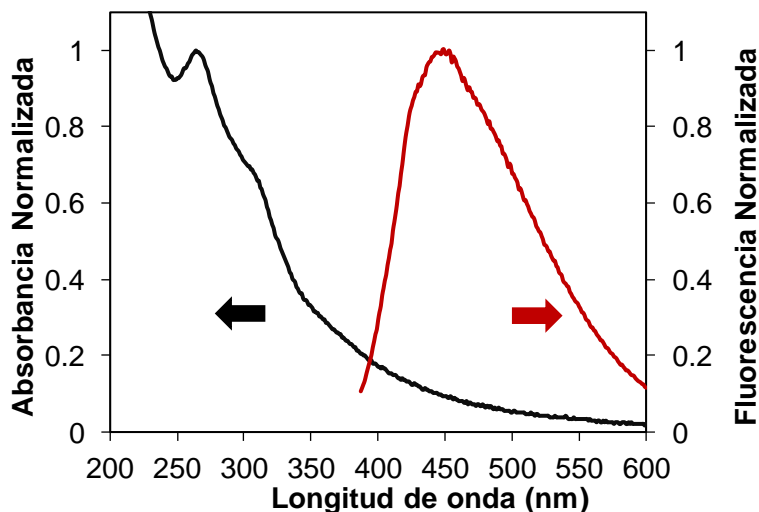


Figura 104. Espectro UV-visible y Fluorescencia de los NCs de Au con β -CDx.

Utilizando las mismas condiciones, pero a una temperatura de reacción menor se prosiguió a sintetizar NCs de Ag recubiertos con β -CDx. En la Figura 105 se observa una banda de absorción a los 303 nm y una emisión de fluorescencia a los 433 nm, realizando el cálculo del número de átomos se obtiene un valor de 7, mientras que los resultados obtenidos por DLS mostraron diámetros hidrodinámicos hasta de 1.2 nm (Figura 106). Estos valores tan pequeños concuerdan con lo reportado en la literatura de NCs de Au con β -CDx donde se han reportado diámetros de 1.7 nm por TEM.⁸² Además, cabe mencionar que el interés en realizar la síntesis de este material radica en que no hay reportados NCs de Ag utilizando la β -CDx como ligando, por lo que se puede utilizar en el diseño de sensores para analitos de carácter hidrofóbico como la molécula de colesterol.

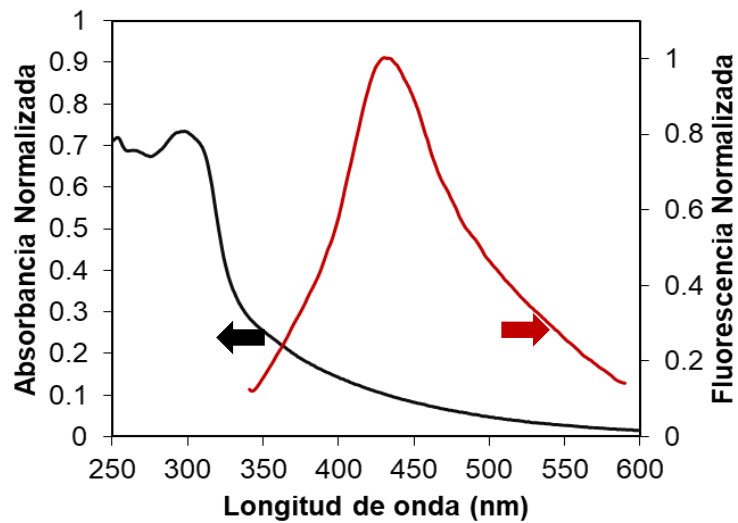


Figura 105. Espectro UV-visible y Fluorescencia de los NCs de Ag con β -CDx.

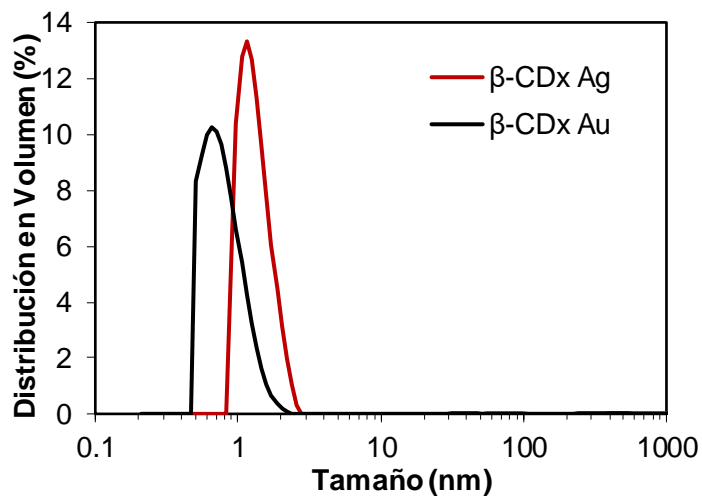


Figura 106. Distribución de tamaños por DLS de NCs con β -CDx.

VI. CONCLUSIONES

1. El tiempo de reacción es un parámetro importante que afecta el tamaño de los puntos cuánticos de CdTe. Con base a este comportamiento se logró obtener una biblioteca de QDs-CdTe con diámetros teóricos desde 1.3 a 3.5 nm.
2. El tamaño de los puntos cuánticos influye en el espectro de emisión de fluorescencia. A medida que el tamaño de partícula aumenta, se aprecia un desplazamiento hacia el rojo en la longitud de onda de emisión desde 495 a 610 nm además de un aumento en las absortividades molares.
3. El crecimiento del punto cuántico también depende del tipo de ligando, cuando se utilizó GHS el crecimiento fue más lento debido a que el ligando es más voluminoso en comparación con AMP. Los QDs recubiertos con GHS con emisión alrededor de los 620 nm tuvieron un tiempo de reacción de 90 min a diferencia de los 30 min empleados con los QDs recubiertos con AMP.
4. Se logró confirmar la incorporación de los ligandos tiolados en los QDs-CdTe recubiertos con CA, AMP y GSH por espectroscopia de FTIR. Sus espectros muestran las señales características principales de estas moléculas y los estudios por potencial Z muestran la diferente carga superficial de cada uno.
5. La BSA es una proteína que estabiliza la nucleación de los átomos metálicos y permite la obtención de NCs de Au y Cu. Los NCs obtenidos fueron de 24 y 13 átomos respectivamente, con una emisión de fluorescencia a una longitud de onda de 648 y 415 nm y con una carga superficial negativa debido a los residuos de ácido aspártico y glutámico de la proteína.
6. La concentración de ácido ascórbico y AgNO_3 fueron los parámetros que más afectaron en la síntesis de los NCs de Ag con PEI. El uso de concentraciones altas produce una intensidad de fluorescencia menor. El uso de PEI de

diferentes pesos moleculares ($M_w = 10,000$ y $M_w = 800$), no cambió significativamente las propiedades ópticas del NCs.

7. El tiempo de reacción es un factor importante en la obtención de los NCs de Cu con PEI. Con 24 h de reacción se logró obtener NCs con un tamaño promedio de 3.1 nm verificado por TEM, los cuales presentan la banda de absorción y de fluorescencia características.
8. Se estableció que existe una dependencia reversible de la intensidad de fluorescencia de NCs Ag-PEI y NCs Cu-PEI con el pH en un intervalo de 3-11. A medida que aumenta el pH, disminuye la intensidad de fluorescencia de los NCs.
9. La aplicación del sensor de NCs Ag-PEI en muestras reales mostraron valores de RSD menores del 5 %. La inmovilización en agarosa permitió obtener el sensor en un soporte para la identificación visual de pH. Los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia muestran a los NCs de Ag con aplicación potencial en el marcaje biológico. Además, son solubles en agua y de baja toxicidad.
10. El mecanismo de abatimiento de fluorescencia para el sensor de pH de NCs Ag-PEI fue por medio de un proceso PET que se corroboró por medio de estudios electroquímicos, donde la oxidación del PEI en medio básico confirma la disponibilidad de los grupos amino para que sirvan como la especie donadora y en consecuencia disminuya la fluorescencia del NCs. Además, se descarta un mecanismo por aglomeración debido a que no cambia el D_H del NCs a valores de pH diferentes.

11. Se estudió la respuesta de fluorescencia de los NCs de Ag recubiertos con PEI frente a diversos iones metálicos. Los iones Cu^{2+} y Fe^{3+} mostraron un abatimiento de la fluorescencia de los NCs, la cual es más sensible para el Cu^{2+} (24253 L mol^{-1}) que para el Fe^{3+} ($K_{sv} = 15563 \text{ L mol}^{-1}$) a pH 7. Sin embargo, a concentraciones bajas estos metales no muestran interferencia significativa para competir en la detección de pH.
12. Las titulaciones de NCs de Cu con PEI frente a iones metálicos mostraron una respuesta lineal en el abatimiento de fluorescencia, así como una sensibilidad alta para Cu, Co, Fe y Ni además el cambio en la coloración de la solución ayuda a identificar el metal de manera visual. Los límites de detección fueron en el orden del nM, lo cual hace este nanomaterial prometedor para su uso como sensor visual de iones metálicos.
13. Estudios preliminares mostraron que los NCs de Ag presentan un abatimiento lineal de fluorescencia frente al ácido fólico en un intervalo de concentración de 0-1 mM con una constante de afinidad de $4.5 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1}$.
14. Los valores de pZ es un parámetro importante para considerar en los ensambles FRET, debido a que la carga positiva es mayor para el NCs PEI-Cu que el NCs PEI-Ag, El ensamble NCsPEI-Cu@QDsCdTe-AMP mostró características buenas para su aplicación como posible sensor, con una transferencia de energía de 0.59.
15. El ensamble FRET NCsPEI-Cu@QDsCdTe-AMP30m se utilizó para identificar creatina y arginina debido a la carga positiva que presentan estos aminoácidos en medio neutro. Los mejores resultados se obtuvieron con arginina, ya que la fluorescencia del QD disminuye en presencia del analito. Sin embargo, la fluorescencia del NC permanece constante, este resultado interesante puede utilizarse para el desarrollo de un nanosensor radiométrico de arginina.

16. Se sintetizaron puntos cuánticos de carbono y de CdS con el fin de utilizarlos como donadores de energía y cambiar a los NCs como aceptores en los sistemas FRET. Los nanomateriales presentaron buena estabilidad, sin embargo, sus espectros de emisión (450-550 nm) se solapan con las emisiones de los NCs de Ag y Cu (470 y 490 nm). Estas características no hacen posible el desarrollo de ensambles FRET con los NCs, pero si podrían utilizarse como donadores con los QDs de CdTe con emisiones mayores a 600 nm.

17. Los CDs de hojas de maíz se sintetizaron por primera vez en el laboratorio y resultaron ser nanomateriales muy estables. Se pueden realizar más estudios y caracterizaciones para ser utilizados como sensores o en el desarrollo de ensambles FRET, ya que su obtención por medio de química verde los presenta como candidatos potenciales para aplicaciones en el área de nanosensores ópticos.

18. La cavidad interior de la β -CDx permite la síntesis de NCs de Au y Ag con D_H de hasta 1.2 nm. Es importante mencionar que no hay reportes de NCs de Ag con este recubrimiento hidrofóbico que permite el análisis de moléculas insolubles en agua. Estos nanomateriales pueden desarrollarse para sensores de moléculas como el colesterol.

VII. REFERENCIAS

1. Trapiella-Alfonso, L. Síntesis y evaluación de nanomateriales metálicos fluorescentes como marcadores en el desarrollo de inmunoensayos. Tesis de Doctorado en análisis químico, Universidad de Oviedo, Oviedo, España, 2013, p 45.
2. Obliosca, J. M.; Cong, L.; Hsin-Chih, Y. Fluorescent silver nanoclusters as DNA probes. *Nanoscale* **2013**, *3*, 8443-8461.
3. Zheng, J.; Zhou, C.; Yu, M.; Liu, J. Different sized luminescent gold nanoparticles. *Nanoscale* **2012**, *4*, 4073-4083.
4. Zheng, Y.; Lai, L.; Liu, W.; Jiang, H.; Wang, X. Recent advances in biomedical applications of fluorescent gold nanoclusters. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *242*, 1-16.
5. Li-Yi, C.; Chia-Wei, W.; Zhiqin, Y.; Huan-Tsung, C. Synthesis of fluorescent gold nanodot-Liposome hybrids for detection of phospholipase C and its inhibitor. *Anal Chem.* **2015**, *87*, 216-229.
6. Xu, N.; Li, H. W.; Wu, Y. Hydrothermal synthesis of polyethylenimine-protected high luminescent Pt-nanoclusters and their application to the detection of nitroimidazoles. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *958*, 51-58.
7. Link, S; El-Sayed, M. A. Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103*, 8410-8426
8. Ríos-Corripio, R. C. M. A.; López-Díaz, A. S.; Ramírez-Corona, N.; López-Malo, A.; Palou, E. Metallic Nanoparticles: Development, Applications, and Future Trends for Alcoholic and Nonalcoholic Beverages; Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816677-2.00009-0>.
9. Ortiz-Méndez, U. Nanometals. *Handb. Less-Common Nanostructures* 2012, No. February, 699–720.
10. Zheng, J.; Zhang, C.; Dickson, R. M. Highly Fluorescent, Water-Soluble, Size-Tunable Gold Quantum Dots. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 1-4.

-
11. Guan, G.; Cai, Y.; Liu, S.; Yu, H.; Bai, S.; Cheng, Y.; Tang, T.; Bharathi, M. S.; Zhang, Y. W.; Han, M. Y. High-Level Incorporation of Silver in Gold Nanoclusters: Fluorescence Redshift upon Interaction with Hydrogen Peroxide and Fluorescence Enhancement with Herbicide. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22*, 1675-1681.
 12. Yong, L.; Pei, L.; Rong, Z.; Chao, L.; Hao, L.; Shanfang, H.; Zhou, N.; Yan, H.; Shouzhuo, Y. Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 11184-11192.
 13. Xie, J.; Zheng, Y.; Ying, J. Y. Protein-directed synthesis of highly fluorescent gold nanoclusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 888-889.
 14. Ekimov, A.I.O., A. A., Quantum size effect in three-dimensional microscopic semiconductor crystals 1981.
 15. Reed, M. A.; Randall, J. N.; Luscombe, J. H. Semiconductor quantum dot resonant tunnelling spectroscopy. *Semicond. Sci. Technol.* **1992**, *7*, B12-B14.
 16. Reed, M.A., Randall, J. N.; Aggarwal, R. J.; Matyi, R. J.; Moore, T. M.; Wetsel, A. E. Observation of Discrete Electronic States in a Zerodimensional Semiconductor Nanostructures. *Physics Review Letter*, **1988**, *60*, 535.
 17. Algar, W. R.; Susumu, K.; Delehanty, J. B.; Medintz, I. L. Semiconductor Quantum Dots in Bioanalysis: Crossing the Valley of Death. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8826–8837.
 18. Murphy, C. J.; Coffey, J. L. Quantum Dots: A Primer. *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 16A–27A.
 19. Bawendi, M. G.; Steigerwald, M. L.; Brus, L. E. The Quantum Mechanics of Larger Semiconductor Clusters ("Quantum Dots"). *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1990**, *41*, 477–496.
 20. Yu, W.; Lianhua, Q.; Wenzhuo, G.; Peng, X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe and CdS nanocrystals. *Chem. Matter.* **2003**, *15*, 2854-2860.

-
21. Xu, X.; Ray, R.; Gu, Y.; Ploehn, H. J.; Gearheart, L.; Raker, K.; Scrivens, A. Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12736-12737.
 22. Nair, A.; Haponiuk, J. T.; Thomas, S.; Gopi, S. Natural carbon-based quantum dots and their applications in drug delivery: A review. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *132*, 110834.
 23. Zhai, Q.; Xing, H.; Zhang, X.; Li, J.; Wang, E. Enhanced electrochemiluminescence behavior of gold-silver bimetallic nanoclusters and its sensing application for mercury (II). *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 7788-7794.
 24. Zhang, B.; Wei, C. Highly sensitive and selective detection of Pb²⁺ using a turn-on fluorescent aptamer DNA silver nanoclusters sensor. *Talanta* **2018**, *182*, 125-130.
 25. Aparna, R. S.; Anjali, D. J. S.; Sachidanandam, P.; Sony, G. Polyethylene imine capped copper nanoclusters-fluorescent and colorimetric on site sensor for the trace level detection of TNT. *Sens. Actuators B* **2018**, *254*, 811-819.
 26. Zheng, Y.; Lai, L.; Liu, W.; Jiang, H.; Wang, X. Recent advances in biomedical applications of fluorescent gold nanoclusters. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *242*, 1-16.
 27. Zhao, L.; Ma, Z. New immunoprobes based on bovine serum albumin-stabilized copper nanoclusters with triple signal amplification for ultrasensitive electrochemical immunosensing for tumor marker. *Sens. Actuators B* **2017**, *241*, 849-854.
 28. Muñoz-Bustos, C.; Tirado-Guizar, A.; Paraguay-Delgado, F.; Pina-Luis, G. Copper nanoclusters-coated BSA as a novel fluorescence sensor for sensitive and selective detection of mangiferin. *Sens. Actuators B* **2017**, *244*, 922-927.
 29. Li-Yi, C.; Chia-Wei, W.; Zhiqin, Y.; Huan-Tsung, C. Peptide-templated gold nanocluster beacon as a sensitive, label-free sensor for protein post-translational modification enzymes. *Anal Chem.* **2015**, *87*, 216-229.
 30. Bischof, H.; Burgstaller, S.; Waldeck-Weiermair, M.; Rauter, T.; Schinagl, M.; Ramadani-Muja, J.; Graier, W. F.; Malli, R. Live-Cell Imaging of

-
- Physiologically Relevant Metal Ions Using Genetically Encoded FRET-Based Probes. *Cells* **2019**, 8 (5), 492.
31. Yuan, W.; Li, H. Polymer-Based Nanocarriers for Therapeutic Nucleic Acids Delivery; Elsevier Inc., **2017**.
32. Han, J.; Burgess, K. Fluorescent indicators for intracellular pH. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2709-2728.
33. Wang, C.; Xu, Z.; Zhang, C. Polyethyleneimine-functionalized fluorescent carbon dots: water stability, pH sensig, and cellular imaging *Chem. Nano. Mat.* **2015**, 1, 69-135.
34. Qiao, Y.; Xu, T. Zhang, Y.; Zhang, C.; Shi, L.; Zhang, G.; Shuang, S.; Dong, C. Green synthesis of fluorescent copper nanoclusters for reversible pH-sensors. *Sens. Actuators B.* **2015**, 220, 1064-1069.
35. Bui, T. T.; Park, S. Y. A carbon dot-hemoglobin complex-based biosensor for cholesterol detection. *Green Chem.* **2016**, 18, 4245-4253.
36. Narsingh, R. N.; Shiju, A.; Vinod, K.; Anushka, B.; Anchal, S.; Preeti, S. S. Colorimetric detection of cholesterol based on highly efficient peroxidase mimetic activity of graphene quantum dots. *Sens. Actuators B* **2015**, 218, 42-50.
37. Mondal, A.; Jana, N. Fluorescent detection of cholesterol using β -cyclodextrin functionalized graphene. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 7316-7318.
38. Cobos-Cruz, L.A.; Martínez-Perez, C. A.; Monreal-Romero, H. A.; García-Casillas, P. E. Synthesis of magnetic nanoparticles- β -cyclodextrin complex. *J. Alloys. Compd.* **2008**, 466, 330-334.
39. Cortés, F.; Hirsch, S.; Pía de la Maza, M. The importance of folic acid in present medicine *Rev. Méd.* 2000, 2, 128.
40. Ramírez-Herrera, D. E.; Reyes-Cruzaley, A. P.; Dominguez, G.; Paraguay-Delgado, F.; Tirado-Guizar, A.; Pina-Luis, G. CdTe Quantum Dots Modified

-
- with Cysteamine: A New Efficient Nanosensor for the Determination of Folic Acid, *Sensor*, **2019**, *19*, 4548.
41. Broussard, J. A.; Rappaz, B.; Webb, D.; Brown, C. Research techniques made simple: methodology and applications of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) Microscopy. *Nature* **2013**, *8*, 265-281.
42. Ramirez-Herrera, D. E.; Tirado-Guizar, A.; Paraguay-Delgado, F.; Pina-Luis, G. Ratiometric arginine assay based on FRET between CdTe quantum dots and Cresyl violet. *Microchim Acta* **2017**, *184*, 1997-2005.
43. Xu, Y.; Chun-Xia, Z.; Lening, Z.; Ya-Rong, X.; Hong-Wei, L.; Yuqing, W. The construction of a FRET assembly by using gold nanoclusters and carbon dots and their application as a ratiometric probe for cysteine detection *Sens. Actuators B*. **2017**, *263*, 327-335.
44. Liu, J.; Wang, B.; Xu, M.; Wang, L.; Zhou, Z. Preparation and use of Cu nanoclusters as fluorescent probes to determine Au (III) ions. *J. Lumin.* **2017**, *185*, 258-262.
45. Xu, X.; Cai, L.; Hu, G.; Mo, L.; Zheng, Y.; Hu, C.; Lei, B.; Zhang, X.; Liu, Y.; Zhuang, J. Red-emissive Carbon Dots from Spinach: Characterization and Application in Visual Detection of Time. *J. Lumin.* **2020**, *207*, 117534.
46. Halawa, M. I.; Wu, F.; Fereja, T. H.; Lou, B.; Xu, G. One-pot green synthesis of supramolecular β -cyclodextrin functionalized gold nanoclusters and their application for highly selective and sensitive fluorescent detection of dopamine. *Sens. Actuators B*. **2018**, *254*, 1017-1024.
47. Aboulaich, A.; Billaud, D.; Abyan, M.; Balan, L.; Gaumet, J. J.; Medhadhi, G.; Ghanbaja, J.; Scheneider, R. One-pot noninjection route to CdS quantum dots via hydrothermal synthesis. *Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 2561-2569.
48. Ramírez-Herrera, D. E. Sistemas de Transferencia de Energía Basados en Ensamblajes de Puntos Cuánticos con Colorantes y Nanopartículas. Tesis Doctorado en Ciencias en Química, Instituto Tecnológico de Tijuana, Centro de Graduados e Investigación en Química, Tijuana, B. C.; 2017, p 61.

-
49. Phan, H. T. M.; Bartelt-Hunt, S.; Rodenhausen, K. B.; Schubert, M.; Bartz, J. C. Investigation of bovine serum albumin (BSA) attachment onto self-assembled monolayers (SAMs) using combinatorial quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) and spectroscopic ellipsometry (SE) *PLoS One* **2015**, *10*, 1-20.
50. Fologea, D.; Ledden, B.; McNabb, D.; Li, J. Electrical characterization of protein molecules by a solid-state nanopore *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *5*, 901-903.
51. Díez, I.; Ras, R. H. A. Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale* **2011**, *3*, 1963-1970.
52. Díez, I.; Ras, R. *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology II*, Springer, 2010, pp. 307-332.
53. Mafuné, F.; Kohno, J.; Takeda, Y.; Kondow, T. Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 9111-9117.
54. Kuang-Che, L.; Su-Jien, L.; Chih-Hong, L.; Chih-Song, T.; Yu-Jen, L. Size effect of Ag nanoparticles on surface plasmon resonance. *Surf. Coat. Tech.* **2008**, *22*, 5339-5342.
55. D. Mott, J. Galkowski, L.Y. Wang, J. Luo, C.J. Zhong, Synthesis of size-controlled and shaped copper nanoparticles. *Langmuir* **2007**, *23*, 5740–5745.
56. Shen, L.; Zhang, L.; Chen, M.; Chen, X.; Wang, J. The Production of PH-Sensitive Photoluminescent Carbon Nanoparticles by the Carbonization of Polyethylenimine and Their Use for Bioimaging. *Carbon N. Y.* **2013**, *55*, 343–349.
57. Oda, M.; Tsukamoto, J.; Hasegawa, A.; Iwami, N.; Nishiura, K.; Hagiwara, I.; Ando, N.; Horiuchi, H.; Tani, T. Photobrightening of CdSe/ZnS/TOPO Nanocrystals *J. Lumin.* **2007**, *122-123*, 762-765.

-
58. Zhu, H.; Yu, T.; Xu, H.; Zhang, K.; Jiang, H.; Zhang, Z.; Wang, Z.; Wang, S. Fluorescent nanohybrid of gold nanoclusters and quantum dots for visual determination of lead ions. *Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 21461-21467.
59. Erol, M.; Du, H.; Sukhishvili, S. Control of specific attachment of proteins by adsorption of polymer layers *Langmuir*, **2006**, *22*, 11329-11336.
60. Kislenko, V. N.; Oliynik, L. P. Complex formation of polyethyleneimine with copper(II), Nickel(II), and cobalt(II) ions. *J. Polym. Sci. A1* **2002**, *40*, 914-922.
61. Martínez-Quiroz, M.; Ochoa-Terán, A.; Pina-Luis, G.; Santacruz-Ortega, H. Photoinduced electron transfer in N,N bis(pyridylmethyl)naphthalenediimides: study of their potential as pH chemosensors. *Supramol. Chem.* **2016**, *29*, 32-39.
62. A.S. Susha, A.M. Javier, W.J. Parak, A.L. Rogach, Luminescent CdTe nanocrystals as ion probes and pH sensors in aqueous solutions. *Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *281*, 40–43.
63. Zhu, X.; Jin, H.; Gao, C.; Gui, R.; Wang, Z. Ratiometric, visual, dual-signal fluorescent sensing and imaging of pH/copper ions in real samples based on carbon dots-fluorescein isothiocyanate *Talanta*, **2017**, *162*, 65-71.
64. Y.N. Chen, P.C. Chen, C.W. Wang, Y.S. Lin, C.M. Ou, L.C. Ho, H.T. Chang, One-pot synthesis of fluorescent BSA–Ce/Au nanoclusters as ratiometric pH probes. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 8571–8574.
65. Wang, C.; Xu, Z.; Zhang, C. Polyethyleneimine-Functionalized Fluorescent Carbon Dots: Water Stability, pH Sensing, and Cellular Imaging. *Chem.Nano. Mat.* **2015**, *1* (2), 122–127.
66. Dong, J. X.; Qu, F.; Li, N. B.; Luo, H. Q. Aggregation, Dissolution and Cyclic Regeneration of Ag Nanoclusters Based on pH-Induced Conformational Changes of Polyethyleneimine Template in Aqueous Solutions. *RSC Adv.* **2015**, *5* (8), 6043–6050.

-
67. Xiao-Yu, X.; Bing, Y. An efficient and sensitive fluorescent pH sensor based on amino functional metal-organic frameworks in aqueous environment. *Dalton Trans.* **2016**, *16*, 6741-7180.
68. Cheng, Y.; Shouyong, D.; Feifei, S.; Ying-Hua, Z. Synthesis of luminescent Cu₉S₅ nanoclusters from copper-2,5-dimercapto-1,3,4-thiadiazole coordination polymer as pH sensor *J. Lumin.* **2019**, *210*, 38-46.
69. Patri, S. B.; Shivappa, P.; Malingappa, P. Silver Nanoparticles-chitosan composite embedded graphite screen-printed electrodes as a novel electrochemical platform in the measurement of trace level nitrite: application to milk powder samples *Curr. Anal. Chem.* **2019**, *15*, 56-65.
70. Xiong, H.; Wang, W.; Liang, J.; Wen, W.; Zhang, X.; Wang, S. A convenient purification method for metal nanoclusters based on pH-induced aggregation and cyclic regeneration and its applications in fluorescent pH *Sens. Actuators B.* **2017**, *239*, 988-992.
71. Pavlova, N.; Thompson, C. The emerging hallmarks of cancer metabolism *Cell Metab.* **2016**, *23*, 27-47.
72. Araos, J. Cibercita pH y cáncer: ¿En qué se relacionan?. Página virtual, <http://portalbiomedicina.uc.cl/ph-y-cancer-en-que-se-relacionan/>, 15 de Noviembre 2018.
73. Kislenco, V. N.; Oliynik, L. P. Complex formation of polyethyleneimine with copper(II), Nickel(II), and cobalt(II) ions. *J. Polym. Sci. A1* **2002**, *40*, 914-922.
74. Bischof, H.; Burgstaller, S.; Waldeck-Weiermair, M.; Rauter, T.; Schinagl, M.; Ramadani-Muja, J.; Graier, W. F.; Malli, R. Live-Cell Imaging of Physiologically Relevant Metal Ions Using Genetically Encoded FRET-Based Probes. *Cells* **2019**, *8* (5), 492.
75. Huheey, J. E. *Química Inorgánica Principios de estructura y reactividad*; Alfaomega; Oxford, 1994.
76. Steele, D. *The Chemistry of Metallic Elements*. Pergamon, 1966, pp 97.
77. Reverté, E. *Química Inorgánica*; Purcell & Kotz, Barcelona, 1979.

-
78. Hemraj, M. Y.; Jae-Joon, L. One-pot synthesis of copper nanoparticles on glass: applications for non-enzymatic glucose detection and catalytic reduction of 4-nitrophenol *J. Solid. State Electrochem.* **2019**, *23*, 503-512.
79. Nigovic, B.; Mornar, A.; Brusac, E.; Jelcic, M. L. Selective sensor for simultaneous determination of mesalazine and folic acid using chitosan coated carbon nanotubes functionalized with amino groups *J. Electroanal. Chem.* **2019**, *851*, 113450.
80. Zhang, W.; Wu, B.; Li, Z.; Wang, Y.; Zhou, J.; Li, Y. Carbon quantum dots as fluorescence sensors for label-free detection of folic acid in biological samples *Spectrochim. Acta A* **2020**, *229*, 117931.
81. Yang, B.; Li, X.; Wang, L.; An, J.; Wang, T.; Zhang, F.; Ding, B.; Li, Y. A water-stable MOF-AgClO₄-abt₂ as fluorescent sensor for detection of folic acid based on inner filter effect *Talanta*, **2020**, *217*, 121019.
82. PDR Cibécita. En: Folic Acid Injection Drug Information. Página Virtual, <https://www.pdr.net/drug-summary/Folic-Acid-Injection-folic-acid-24035#2>, 10 de Diciembre 2021.
83. Yu, X.; Zhang, C. X.; Zhang, L.; Xue, Y. R.; Li, H. W.; Wu, Y. The construction of a FRET assembly by using gold nanoclusters and carbon dots and their application as a ratiometric probe for cysteine detection *Sens. Actuators B.* **2017**, *263*, 327-335.
84. Ma, Y.; Mei, H.; Li, Y.; Zhou, P.; Mao, G.; Wang, H.; Wang, X. A novel ratiometric fluorescence probe based on silicon quantum dots and copper nanoclusters for visual assay of L-cysteine in milks *Food Chem.* **2022**, 132155.
85. Wang, L.; Cao, H. X.; He, Y. S.; Pan, C. G.; Sun, T. K.; Zhang, X. Y.; Wang, C. Y.; Liang, G. X. Facile preparation of amino-carbon dots/gold nanoclusters FRET ratiometric fluorescent probe for sensing of Pb²⁺/Cu²⁺ *Sens. Actuators B.* **2018**, *282*, 78-84.

86. Y.N. Chen, P.C. Chen, C.W. Wang, Y.S. Lin, C.M. Ou, L.C. Ho, H.T. Chang, One-pot synthesis of fluorescent BSA–Ce/Au nanoclusters as ratiometric pH probes. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 8571–8574.
87. Mondal, A.; Jana, N. Fluorescent detection of cholesterol using β -cyclodextrin functionalized graphene. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 7316-7318.
88. Oroujeni, M.; Kaboudin, B.; Xia, W.; Jönsson, P.; Ossipov, D. A. Cyclodextrin-based magnetic nanoparticles for cancer therapy. *Prog. Org. Coat.* **2018**, *114*, 154-161.
89. Cobos-Cruz, L.A.; Martínez-Perez, C. A.; Monreal-Romero, H. A.; García-Casillas, P. E. Synthesis of magnetic nanoparticles- β -cyclodextrin complex. *J. Alloys. Compd.* **2008**, *466*, 330-334.

VIII. ANEXOS

Apéndice I. Artículos científicos publicados

Analytical
Methods

PAPER

View Article Online
View Journal

Cite this: DOI: 10.1039/d1ay00302j

A fluorescent PET probe based on polyethyleneimine-Ag nanoclusters as a reversible, stable and selective broad-range pH sensor†Ana Patricia Reyes-Cruzaley,^a Adrián Ochoa-Terán,^b Antonio Tirado-Guizar,^a Rosa María Félix-Navarro,^a Gabriel Alonso-Núñez^b and Georgina Pina-Luis^b*^a

In this work, nanoclusters (NCs) of Cu and Ag capped with hyperbranched polyethyleneimine (PEI) were prepared using chemical reduction by a one-step hydrothermal method. The PEI coated-NCs were characterized by high-resolution transmission electron microscopy, ζ potential, thermogravimetric analysis, dynamic light scattering, Fourier-transform infrared, UV-visible, and fluorescence spectroscopy. The PEI-NCs exhibited strong absorption and fluorescence, high stability, and excellent water dispersibility. The resulting PEI-NCs showed a reversible and linear response of fluorescence intensity with pH over a wide range (3–11); however, PEI-AgNCs showed a better reversibility and sensitivity than PEI-CuNCs. Unlike several types of pH sensors based on modified NCs, which are based on a nanoparticle aggregation/disaggregation mechanism, the response of our sensor is based on a photoinduced electron transfer process, which gives it a high reversibility. This method was successfully applied in pH measurements in tap water and green tea samples, with excellent results, indicating its practical utility for these applications. A visual device was obtained by immobilizing PEI-AgNCs into agarose hydrogels at different pH values. The results show that the proposed sensor can be used as a pH visual detector. Besides, the light emission of the nanosensor was corroborated by fluorescence microscopy, confirming that the nanosensor based on PEI-AgNCs has great potential to be used in cellular imaging.

Received 22nd February 2021
Accepted 13th April 2021

DOI: 10.1039/d1ay00302j

rsc.li/methods



Article

CdTe Quantum Dots Modified with Cysteamine: A New Efficient Nanosensor for the Determination of Folic Acid

Doris E. Ramírez-Herrera ¹, Ana Patricia Reyes-Cruzaley ¹, Giselle Dominguez ²,
Francisco Paraguay-Delgado ³, Antonio Tirado-Guizar ¹ and Georgina Pina-Luis ^{1,*}

¹ Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tijuana, Centro de Graduados e Investigación, A.P. 1166, Tijuana 22500, Mexico; doris_e_777@hotmail.com (D.E.R.-H.); ana.reyes@tectijuana.edu.mx (A.P.R.-C.); guizarantonio@gmail.com (A.T.-G.)

² Miami Dade College, North Campus, 11380 NW 27th Ave, Miami, FL 33167, USA; gdomingu@mdc.edu

³ Centro de Investigación en Materiales Avanzados S. C., Departamento de Física de Materiales, Av. Miguel de Cervantes 120, Complejo Industrial Chihuahua, Chihuahua CP 31136, Mexico; francisco.paraguay@cimav.edu.mx

* Correspondence: gpinaluis@yahoo.com or gpinaluis@tectijuana.mx

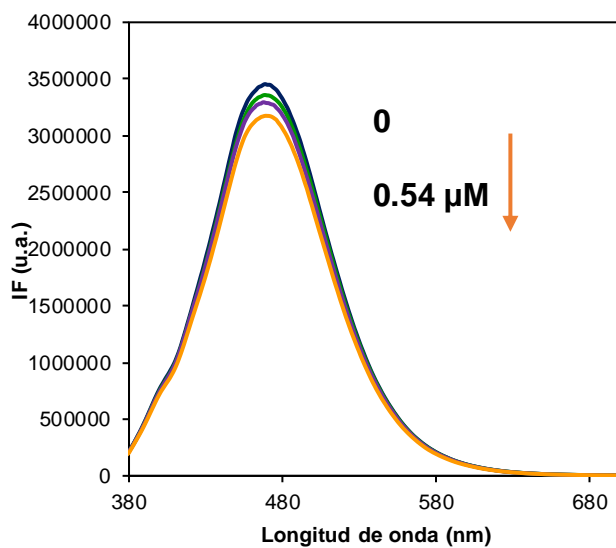
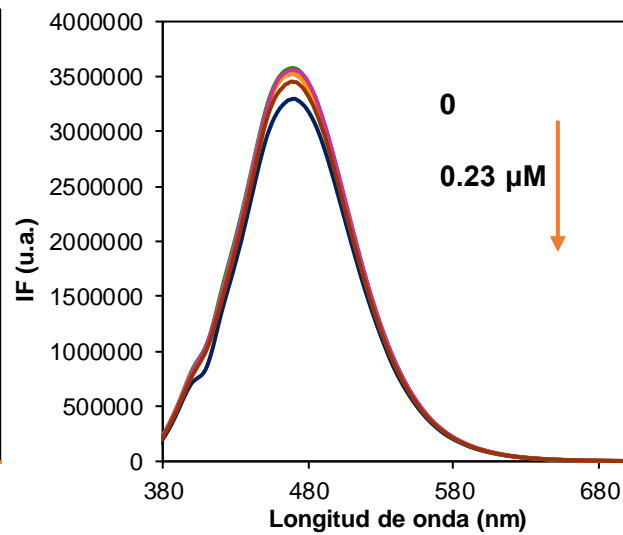
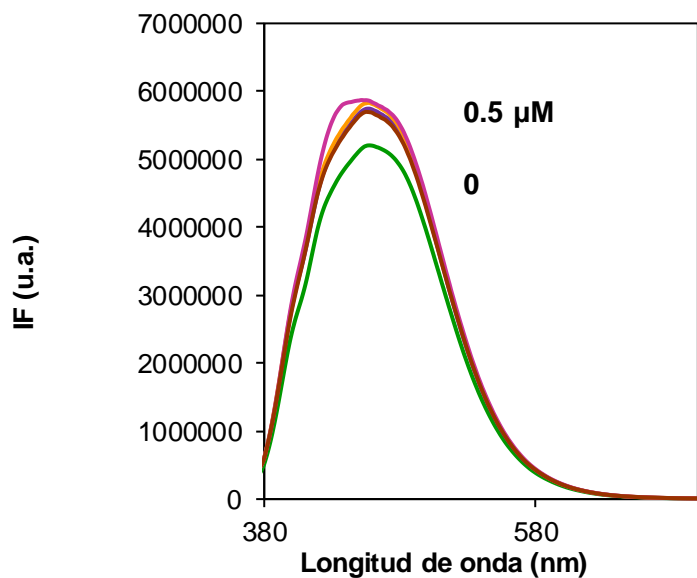
Received: 13 September 2019; Accepted: 15 October 2019; Published: 19 October 2019



Abstract: In this paper, we report the synthesis, characterization, and application of a new fluorescent nanosensor based on water-soluble CdTe quantum dots (QDs) coated with cysteamine (CA) for the determination of folic acid (FA). CdTe/CA QDs were characterized by high-resolution transmission electron microscopy, the zeta potential, and Fourier-transform infrared (FT-IR), UV-visible, and fluorescence spectroscopy. CdTe QDs coated with mercaptopropionic acid (MPA) and glutathione (GSH) were prepared for comparison purposes. The effect of FA on the photoluminescence intensity of the three thiol-capped QDs at pH 8 was studied. Only CdTe/CA QDs showed a notable fluorescence quenching in the presence of FA. Then, a nanosensor based on the fluorescence quenching of the CdTe QDs at pH 8 was explored. Under optimum conditions, the calibration curve showed a linear fluorescence quenching response in a concentration range of FA from 0.16 to 16.4 μM ($R^2 = 0.9944$), with a detection limit of 0.048 μM . A probable mechanism of fluorescence quenching was proposed. The nanosensor showed good selectivity over other possible interferences. This method has been applied for FA quantification in orange beverage samples with excellent results (recoveries from 98.3 to 103.9%). The good selectivity, sensitivity, low cost, and rapidity make CdTe /CA QDs a suitable nanosensor for FA determination.

Keywords: folic acid nanosensor; positive quantum dots; fluorescence quenching; electron transfer

Apéndice II. Titulaciones con NCs de Cu frente a iones metálicos

Mg²⁺**Mn²⁺****Na⁺****Li⁺**