

SEP

SES

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico de Tijuana

Centro de Graduados e Investigación en Química

TRABAJO DE TESIS

“Ensamblajes supramoleculares basados en puntos cuánticos de carbono modificados superficialmente para aplicaciones biológicas”

Presentado por

MCQ. Roberto Daniel Sotolongo García

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN QUÍMICA

Directores de Tesis

Dra. Georgina Esther Pina Luis

Dr. Manuel Alatorre Meda

TIJUANA, B.C.

DICIEMBRE 2022

Carta de liberación de tesis



Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California, 24/mayo/2022

Oficio No. 300/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 "Ensamblajes supramoleculares basados en puntos cuánticos de carbono modificados superficialmente para aplicaciones biológicas", presentado por el C. Roberto Daniel Sotolongo García, (con número de control D15212555), 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. MANUEL ALATORRE MEDA
Secretario del Jurado

DRA. MERCEDES TERESITA OROPEZA GUZMAN
Vocal del Jurado

DR. SERGIO PÉREZ SICAÍROS
Vocal del Jurado

DR. EDUARDO ALBERTO LOPEZ MALDONADO
Vocal del Jurado

C.p. Oficina de Titulación
C.p. Expediente
C.p. Interesado
GEPL/MAM/MTOG/SPS/EALM



Calzada del Tecnológico S/N Eq. Castillo de Chagnitepec y calle Cuauhtémoc,
Fracc. Tomás Aquino C.P. 22414 Tijuana, Baja California. Tel. 01 (664) 6078400
Ext. 101



Carta de autorización de impresión emitida por la DEPI



Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California, 30/junio/2022
OFICIO No. 071/DEPI/2022
Asunto: **Autorización de Impresión de Tesis**

MARÍA MAGDALENA SERRANO ORTEGA
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE

En lo referente al trabajo de tesis, "Ensamblajes supramoleculares basados en puntos cuánticos de carbono modificados superficialmente para aplicaciones biológicas". Presentado por C. Roberto Daniel Sotolongo García, alumno del Doctorado en Ciencias en Química con número de control D15212555; 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 envió un cordial saludo.



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



Carta de cesión de derechos



Instituto Tecnológico de Tijuana

Tijuana, Baja California, **29/Noviembre/2022**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Por medio de la presente, el C. Roberto Daniel Sotolongo García, estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias en Química con número de control D15212555, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección de la Dra. Georgina Esther Pina Luis. Por tanto, haciendo uso de sus facultades cede los derechos del trabajo titulado "Ensamblajes supramoleculares basados en puntos cuánticos de carbono modificados superficialmente para aplicaciones biológicas" al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de 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 autor del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo electrónico: robertosg2989@gmail.com. Si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica
Por una juventud integrada al desarrollo de México*

MCQ. Roberto Daniel Sotolongo García



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



CONTENIDO

Carta de liberación de tesis	ii
Carta de autorización de impresión emitida por la DEPI	iii
Carta de cesión de derechos.....	iv
CONTENIDO	v
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS	xviii
RESUMEN	xix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	4
2.1. Justificación	4
2.2. Objetivo general.....	5
2.3. Objetivos específicos.....	5

III.	TOERÍA GENERAL Y ANTECEDENTES	7
3.1.	Fundamentos de luminiscencia molecular.....	7
3.2.	Puntos de carbono.....	9
3.2.1.	Estructura.....	9
3.2.2.	Estrategia de síntesis de CDs	10
3.2.3.	Propiedades ópticas de los CDs	15
3.2.4.	Toxicidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de CDs.....	23
3.2.5.	Transferencia de energía resonante de Förster (FRET) y CDs	26
3.2.6.	Aplicaciones en el desarrollo de sensores y en bioimagen	30
3.3.	Hipótesis.....	35
IV.	EXPERIMENTAL	36
4.1.	Generalidades	36
4.1.1.	Materiales, reactivos y solventes	36
4.1.2.	Instrumentos.....	36
4.2.	Etapas experimentales.....	36
4.3.	Síntesis de puntos de carbono (CDs) y recubrimiento con polímeros... 37	
4.3.1.	Síntesis de CDs mediante tratamiento hidrotérmico.....	38

4.3.2. Síntesis de CDs asistida por microondas	38
4.3.3. Recubrimiento con polímeros	39
4.4. Síntesis de quantum dots (QDs)	39
4.5. Caracterización de los materiales.....	40
4.5.1. Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Visible)	40
4.5.2. Espectroscopia de fluorescencia	40
4.5.3. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier FT-IR.....	40
4.5.4. Potencial Z.....	41
4.5.5. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	41
4.6. Determinación de rendimientos cuánticos¹⁰⁶	41
4.7. Evaluación del proceso FRET.....	41
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
5.1. Síntesis de CDs mediante tratamiento hidrotérmico y su caracterización	43
5.1.1. Caracterización por FT-IR	43
5.1.2. Caracterización por TEM.....	44
5.1.3. Caracterización óptica	46
5.1.4. Determinación de rendimiento cuántico ¹⁰⁶	48

5.1.5.Efecto del pH en la IF y pZ.....	50
5.2. Síntesis de CDs asistida por microondas y su caracterización	51
5.2.1.Caracterización por FT-IR	52
5.2.2.Caracterización por TEM y EDS	52
5.2.3.Caracterización óptica	54
5.2.4.Determinación de rendimiento cuántico.....	56
5.2.5.Efecto del pH en la intensidad de fluorescencia y el potencial Z.....	57
5.2.6.Recubrimiento de la superficie de los CDs con polímeros	59
5.3. Síntesis de puntos cuánticos (quantum dots, QDs)	62
5.3.1.Caracterización por UV-Vis y fluorescencia	63
5.4. Estudios de transferencia de energía resonante de Förster (FRET)	64
5.4.1.Evaluación del proceso FRET utilizando CDs ACEM@PEI	65
5.4.2.Evaluación del proceso FRET utilizando CDs ACEM.....	70
5.4.3.Eficiencia del proceso FRET (E), integrales de solapamiento (J), constante de enlace (K), distancia entre donador-aceptor (r) y distancia de Förster (R_0) de los conjugados.....	73
5.5. Estudio de reconocimiento de analitos de interés biológico	81
5.5.1.Reconocimiento de receptores de folato (RF)	81
5.5.2. Reconocimiento de ácido fólico (AF).....	88

5.5.3.Sensor de riboflavina (VB2)	94
5.6. Estudios de citocompatibilidad	99
VI. CONCLUSIONES	102
VII. TRABAJO A FUTURO	104
VIII. REFERENCIAS	105

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	Absorbancia
AF	Ácido fólico
AMP	Ácido 3-mercaptopropiónico
PBS	Buffer de fosfatos
cm	Centímetro
CIMAV	Centro de Investigación de Materiales Avanzados
CA	Cisteamina
ϵ	Coefficiente de absorción molar
K	Constante de enlace
h	Constante de Planck
KSV	Constante de Stern-Volmer
XRD	Difracción de rayos X
DLS	Dispersión de luz dinámica
R_0	Distancia de Förster
r	Distancia entre donador y aceptor de energía
E	Eficiencia
E_g	Energía del gap
EDS	Espectroscopia de energía dispersiva
Grad	Gradiente
°C	Grados Celsius
g	Gramo
h	hora
n	Índice de refracción
n	Número de sitios de interacción
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
J	Integral de solapamiento

IF	Intensidad de fluorescencia
LD	Límite de detección
λ	Longitud de onda
μg	Microgramo
μL	Microlitro
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
HRTEM	Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución
LT	Ligando tiolado
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
min	Minuto
M	Molar
S	Pendiente
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
%T	Por ciento de transmitancia
pZ	Potencial Z
CQDs	Puntos cuánticos de carbono
GQDs	Puntos cuánticos de grafeno
QDs	Puntos cuánticos o Quantum dots
N-CDs	Puntos de carbono dopados con nitrógeno
CDs	Puntos de carbono o Carbon dots
RF	Receptores de folato
ΦF	Rendimiento cuántico
VB2	Riboflavina
DFT	Teoría del funcional de la densidad
FRET	Transferencia de energía resonante de Förster
UV-Vis	Ultravioleta visible

u.a. Unidades arbitrarias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de Jablonski. ²⁹	7
Figura 2. Representación estructural de A) CQDs y B) GQDs. ^{34,35}	10
Figura 3. A) TEM. B) Distribución de tamaño N-CDs. C) HRTEM. ⁴⁸	13
Figura 4. A) Espectro UV-Vis N-CDs. B) Dependencia de la emisión de fluorescencia con la longitud de onda de excitación N-CDs. ⁴⁷	13
Figura 5. Imágenes TEM (izquierda) y HRTEM (derecha). ⁴⁸	14
Figura 6. A) Espectro UV-Vis (—). Fluorescencia, excitación (---), emisión (-.-). B) Emisión de fluorescencia a diferentes longitudes de onda de excitación. ⁴⁸	15
Figura 7. Dependencia entre la longitud de onda de emisión y la de excitación de los CDs. A) Fotografías de CDs pasivados con polietilenglicol (PEG) excitados a 400 nm (a), y registrados en diferentes filtros de emisión, o excitados en las longitudes de onda indicadas (b). B) Espectros de emisión de fluorescencia de los CDs excitados a incrementos crecientes de 20 nm. El recuadro muestra los espectros de emisión a intensidades normalizadas. ³	16
Figura 8. Emisión de fluorescencia de CDs atribuida a diferentes estados de energía superficiales. ³⁴	17
Figura 9. A) Esquema de síntesis de CDs; B) emisión de fluorescencia a diferentes longitudes de onda de excitación; C) espectro de absorbancia UV-vis. ⁵⁰	19

Figura 10. Modulación de la fluorescencia de CDs inducida por esterificación. La fluorescencia fue baja en los CDs generados con ácido cítrico a pH=1 (izquierda); tras la esterificación, la fluorescencia aumentó significativamente (derecha).⁵¹ 19

Figura 11. Modelo del mecanismo de emisión de fluorescencia de CDs. El esquema de la izquierda muestra la excitación de los puntos de carbono a una longitud de onda específica y la emisión en varias longitudes de onda. Los espectros de la derecha reflejan las diferentes emisiones de fluorescencia.⁵⁰ 20

Figura 12. A) Longitud de onda de emisión calculada utilizando DFT en función del diámetro de los GQDs con bordes en zigzag; B) longitud de onda de emisión de GQDs oxidados en función de la cobertura de los grupos -OH y -COOH.⁵³ 21

Figura 13. CDs que exhiben emisión de fluorescencia específica; A) síntesis purificación de CDs; B) colores de diferentes fracciones de CDs; C) longitudes de onda de emisión; D) mecanismo hipotético que vincula la emisión con el grado de oxidación superficial.⁵⁴ 22

Figura 14. Citotoxicidad de CQDs para células HepG2 estudiadas mediante ensayos de MTT y azul de tripano.⁵⁷ 24

Figura 15. Citotoxicidad de CQDs para células HepG2 estudiadas mediante ensayos de MTT y azul de tripano.⁵⁸ 24

Figura 16. Diagrama esquemático con las condiciones necesarias para que ocurra un FRET.^{64,65} 27

Figura 17. A: Espectros de emisión de CDs (a) y de absorción de vitamina B₁₂ (b). B: Abatimiento de fluorescencia de los CDs en presencia de vitamina B₁₂.⁶⁷ 28

Figura 18. Espectros de absorción y emisión de CDs y QDs (a y b: absorción y emisión de CDs; c y d: absorción y emisión de QDs). ⁶⁸	29
Figura 19. A: FRET entre CDs y QDs. B: Abatimiento del FRET en presencia del clortolurón. ⁶⁸	29
Figura 20. Efecto del pH en la intensidad de fluorescencia de los CDs en diferentes trabajos; A, ⁶⁹ B. ⁷⁰	30
Figura 21. A) Espectros de fluorescencia de FITC-CDs a diferentes pH; B) Gráficos de calibración radiométrica de pH de la relación de emisión I_{524}/I_{470} e I_{524}/I_{565} de FITC-CDs en función del pH. ⁷¹	31
Figura 22. Representación esquemática del mecanismo de detección de Fe^{3+} y dopamina (DA) utilizando CDs. ⁸⁰	32
Figura 23. Representación esquemática del mecanismo de detección de Hg^{2+} utilizando CDs y OG. ⁸¹	32
Figura 24. Imágenes microscópicas de barrido láser confocal de A) células B16F1 y B) HEK293 después de la incubación a 37 ° C durante 24 h con CDs y conjugados CDs-AH en ausencia y presencia de un exceso 100 veces molar de AH. La barra de escala indica 30 μm . ⁸⁴	34
Figura 25. Imagen de campo claro (A) e imágenes de fluorescencia de los CDs en células endoteliales bajo excitación con láser de 380 (B), 455 (C) y 555 nm (D), respectivamente, barra de escala = 10 μm . ⁸⁹	35
Figura 26. Etapas experimentales.	37
Figura 27. Esquema de síntesis de CDs mediante tratamiento hidrotérmico.	38

Figura 28. Esquema de síntesis de CDs asistida por microondas.....	39
Figura 29. Muestra de CDs sintetizados mediante tratamiento hidrotérmico.	43
Figura 30. Espectro FT-IR de CDs ACEH.	44
Figura 31. Imágenes TEM e histograma de distribución de tamaños para CDs ACEH.	45
Figura 32. Espectro de EDS de la muestra CDs ACEH.	46
Figura 33. Espectro de absorción UV-Vis de CDs ACEH.....	47
Figura 34. Espectros de emisión de fluorescencia 2D de CDs ACEH a diferentes $\lambda_{excitación}$	48
Figura 35. Espectro de emisión de fluorescencia 3D y contorno de emisión de fluorescencia CDsACEH a diferentes $\lambda_{excitación}$	48
Figura 36. Comparación de la intensidad de fluorescencia integrada de muestra (CDs ACEH) y estándar.	49
Figura 37. Efecto del pH en la intensidad de fluorescencia de CDs ACEH.....	50
Figura 38. Efecto del pH en el potencial Z (pZ) de CDs ACEH.	51
Figura 39. Muestra de CDs sintetizados mediante microondas.....	52
Figura 40. Espectro FT-IR de CDs ACEM.....	52
Figura 41. Imágenes TEM de CDs ACEM.....	53
Figura 42. Histograma de distribución de tamaños para CDs ACEM.....	53

Figura 43. Espectro de EDS para la muestra CDs ACEM.	54
Figura 44. Espectro de absorción UV-Vis de CDs ACEM.	55
Figura 45. Espectros de emisión de fluorescencia de CDs ACEM a diferentes $\lambda_{excitación}$	56
Figura 46. Espectro de emisión de fluorescencia 3D y contorno de emisión de CDs ACEM a diferentes $\lambda_{excitación}$	56
Figura 47. Comparación de la intensidad de fluorescencia integrada de muestra (CDs ACEM) y estándar.	57
Figura 48. Efecto del pH en la intensidad de fluorescencia de CDs ACEM.	58
Figura 49. Efecto del pH en el potencial Z de CDs ACEM.	59
Figura 50. Diagramas de fase obtenidos en la determinación del pZ a pH 7.4.	60
Figura 51. Efecto del pH en el potencial Z de CDs ACEM@PEI.	61
Figura 52. Comparación de la intensidad de fluorescencia integrada de muestra (CDs ACEM@PEI) y estándar.	62
Figura 53. Espectros normalizados de absorción UV-Vis y de fluorescencia de QDs CdTe@CA.	63
Figura 54. Fotografía de QDs CdTe@CA bajo radiación UV.	64
Figura 55. Superposición de espectros (UV-Vis/Fluorescencia). Sistema CDs ACEM@PEI/Fluoresceína.	66

Figura 56. Superposición de espectros (UV-Vis/Fluorescencia). Sistema CDs ACEM@PEI/QDs CdTe@AMP.	66
Figura 57. Titulación FRET de CDs ACEM@PEI con fluoresceína.	67
Figura 58. Titulación FRET de CDs ACEM@PEI con QDs CdTe@AMP.	67
Figura 59. Gráficas de IF Normalizada Vs [Fluoresceína].	69
Figura 60. Gráficas de IF Normalizada Vs [QDs CdTe@AMP].	69
Figura 61. Superposición de espectros (UV-Vis/Fluorescencia). Sistema CDs CEM/QDs CdTe@CA.	70
Figura 62. Superposición de espectros (UV-Vis/Fluorescencia). Sistema CDs ACEM/VB2.	71
Figura 63. Titulación FRET de CDs ACEM con QDs CdTe@CA.	71
Figura 64. Titulación FRET de CDs ACEM con VB2 (Riboflavina).	72
Figura 65. Gráficas de IF Normalizada Vs [QDs CdTe@CA].	72
Figura 66. Gráficas de IF Normalizada Vs [VB2].	73
Figura 67. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer del conjugado CDs ACEM@PEI/Fluoresceína.	76
Figura 68. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer del conjugado CDs ACEM@PEI/QDs CdTe@AMP.	76
Figura 69. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer del conjugado CDs ACEM/QDs CdTe@CA.	77

Figura 70. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer del conjugado CDs ACEM/VB2.77	
Figura 71. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer modificada para el conjugado CDs ACEM@PEI/Fluoresceína ($K=5.03 \times 10^3$).....	78
Figura 72. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer modificada para el conjugado CDs ACEM@PEI/QDs CdTe@AMP ($K=1.53 \times 10^6$).	79
Figura 73. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer modificada para el conjugado CDs ACEM/QDs CdTe@CA ($K=2.26 \times 10^5$).....	79
Figura 74. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer modificada para el conjugado CDs ACEM/VB2 ($K=2.67 \times 10^4$).	80
Figura 75. Titulación de CDs ACEM@PEI con AF.	82
Figura 76. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer para el conjugado CDs ACEM@PEI/AF.....	82
Figura 77. Gráfica Log-Log para el abatimiento de fluorescencia de CDs ACEM@PEI por AF.	83
Figura 78. Titulación por pZ de CDs ACEM@PEI con AF.....	85
Figura 79. Estudios de selectividad frente a diferentes moléculas de interés biológico.	86
Figura 80. Titulación de CDs ACEM@PEI/AF con RF.	87
Figura 81. Gráfica de Benesi Hildebrand para la titulación de CDs ACEM@PEI/AF con RF.	88
Figura 82. Titulación del sistema FRET CDs ACEM/QDs CdTe@CA con AF.....	89

Figura 83. Curva de calibración de AF basada en el sistema FRET CDs ACEM/QDs CdTe@CA.....	90
Figura 84. Estudios de selectividad para AF del sistema FRET CDs ACEM/QDs CdTe@CA.....	91
Figura 85. Estudios de competitividad para AF del sistema FRET CDs ACEM/QDs CdTe@CA.....	92
Figura 86. Gráfica de adición de estándar en jugo de naranja (Jumex).	93
Figura 87. Variación en la emisión de fluorescencia del conjugado CDs ACEM/VB2 a diferentes concentraciones de VB2 (0 - 11 μ M). Inserto: relación lineal entre la señal radiométrica y la concentración de VB2.	95
Figura 88. Estudios de selectividad para VB2 del sistema FRET CDs ACEM/VB2..	96
Figura 89. Estudios de competencia para VB2 del sistema FRET CDs ACEM/VB2.	97
Figura 90. Viabilidad de las células de cáncer de mama (MDA-MB-231) después de la exposición a CDs en concentraciones variables y un conjugado CDs ACEM/VB2 durante 24 y 48 h. La diferencia estadísticamente significativa entre los datos ($p < 0.05$) se denota con *.	99

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores de pZ de CDs ACEM antes y después de recubrir.	60
Tabla 2. Propiedades ópticas de los QDs CdTe@CA.....	64
Tabla 3. Datos teóricos de los sistemas FRET estudiados.....	81
Tabla 4. Datos obtenidos para el sistema CDs ACEM@PEI/AF.....	84
Tabla 5. Parámetros analíticos calculados para la curva de valoración del sistema CDs ACEM/QDs CdTe@CA - AF.....	91
Tabla 6. Determinación de AF en jugo de naranja (Jumex).....	93
Tabla 7. Parámetros analíticos calculados para la curva de valoración del sistema CDs ACEM/VB2.....	95
Tabla 8. Determinación de VB2 en muestras reales.....	98

RESUMEN

En los últimos años una nueva clase de nanopartículas de carbono, conocidas como carbon dots (CDs) ha despertado el interés de los investigadores. Debido a sus excelentes propiedades ópticas y biocompatibilidad, los CDs han recibido una gran atención por sus potencialidades de aplicación en estudios de sistemas FRET.

La transferencia de energía resonante de Förster es un proceso no radiativo en el que la energía de excitación electrónica de un donador (generalmente un fluoróforo) se transfiere a un receptor en el estado fundamental a través de interacciones dipolo-dipolo. Aunque hay numerosos reportes basados en sistemas FRET entre diferentes puntos cuánticos (QDs) y colorantes, poco ha sido reportado sobre el uso de CDs en este tipo de sistemas.

En el presente trabajo se llevó a cabo la síntesis de CDs con el objetivo de utilizarlos en la detección de especies biológicas. Las propiedades ópticas de los CDs se estudiaron mediante espectroscopía UV-Visible y fluorescencia molecular determinándose su rendimiento cuántico. Se diseñaron sistemas FRET entre CDs (donador) y diferentes especies (aceptores). Los sistemas FRET con mejores características se utilizaron para la detección de moléculas de interés biológico.

I. INTRODUCCIÓN

Como uno de los elementos esenciales del organismo, la industria y la sociedad, el carbono siempre ocupa una posición importante en el desarrollo de la ciencia y la tecnología modernas. En la última década los nanomateriales de carbono han sido ampliamente estudiados y utilizados en aplicaciones diversas debido a sus propiedades excelentes. Como nanomateriales de carbono se pueden mencionar a los nanodiamantes, grafeno, nanotubos de carbono de pared simple y múltiple, nanoconos de carbono, fullerenos y los puntos de carbono o “carbon dots” (CDs por sus siglas en inglés).¹

En los últimos años se ha experimentado un auge en las investigaciones sobre los CDs, tanto en relación a sus propiedades ópticas como de sus posibles aplicaciones en áreas diversas. Los CDs comprenden dos tipos de nanomateriales luminiscentes, los puntos cuánticos de carbono y los puntos cuánticos de grafeno, CQDs y GQDs respectivamente por sus siglas en inglés.

Los CQDs fueron obtenidos accidentalmente durante la separación y purificación de nanotubos de carbono de pared simple en el año 2004 mediante electroforesis preparativa.^{2,30} Sin embargo no es hasta el año 2006, con el trabajo de Sun y colaboradores³, en que logra sintetizarse en grandes cantidades este tipo de material, marcando un hito en las investigaciones sobre CQDs. Por otro lado, aunque el grafeno se conoce desde el siglo XX, es durante la primera década del siglo XXI que comienzan a investigarse las propiedades de los GQDs. Precisamente en el año 2010 Pan⁴ y colaboradores sintetizan, partiendo de hojas de grafeno, GQDs con luminiscencia azul llevando las investigaciones sobre materiales luminiscentes de carbono a un clímax.

Estos nanomateriales (CQDs y GQDs) se han vuelto muy populares desencadenando una gran cantidad de investigaciones con el fin de explorar sus

propiedades luminiscentes. Muestran un rendimiento cuántico alto, buena estabilidad fotoquímica, dispersabilidad en agua, biocompatibilidad, costo bajo y tienen la ventaja de ser elementos no tóxicos, de acuerdo a pruebas *in vivo* de toxicidad.⁵ Estas interesantes propiedades los convierten en materiales luminiscentes de nueva generación superiores a los colorantes orgánicos fluorescentes usados convencionalmente y los puntos cuánticos inorgánicos o “quantum dots” (QDs).

Una de las características más importantes de los puntos de carbono es la dependencia existente entre la longitud de onda de emisión y la de excitación. Es importante destacar que, a pesar de ser materiales ampliamente estudiados en los últimos años, aún no existe consenso en cuanto al origen de sus propiedades ópticas. Pese a esto es innegable la influencia que ejercen los dominios sp^2 presentes en la estructura de estos puntos de carbono (CQDs y GQDs) en el origen de sus propiedades ópticas. Otro aspecto importante a tener en cuenta es la influencia del tamaño de los puntos de carbono y la presencia de grupos funcionales en su superficie. Según estudios recientes el aumento del tamaño de los GQDs desplaza la longitud de onda de emisión desde el azul hasta el rojo y el infrarrojo cercano.⁶ Por otro lado, ha sido reportado en diversos trabajos como el aumento de la presencia de grupos funcionales en la superficie de los CQDs desplaza la longitud de onda de emisión hacia la región del rojo.⁷

Debido a sus propiedades ópticas excelentes, los CDs han recibido una gran atención por sus potencialidades de aplicación en estudios de sistemas de transferencia de energía de resonancia de Förster.⁸ La transferencia de energía de resonancia de Förster, habitualmente abreviado como FRET por sus siglas en idioma inglés, es un mecanismo mecánico cuántico mediante el cual se transfiere energía de un donador a un aceptor. Este mecanismo ha sido utilizado ampliamente en aplicaciones biológicas debido a las distancias favorables (2-8 nm) para la transferencia de energía.⁹ Esta técnica es usada comúnmente para evaluar la

localización precisa y las interacciones entre dos moléculas específicas, lo cual no puede ser evaluado con instrumentos convencionales debido a una resolución limitada (>200 nm).

En contraste con materiales fluorescentes convencionales como colorantes orgánicos y los puntos cuánticos, el pico de emisión de los CDs se puede controlar fácilmente en un intervalo de longitud de onda amplio, lo que los hace apropiados para detectar diversos analitos de interés biológico. Por otra parte, la estructura superficial de los CDs puede diseñarse fácilmente para mostrar una fuerte unión con los aceptores específicos detectados, lo que permite un acercamiento a distancias muy cortas entre los CDs y los aceptores.⁶ Estas características satisfacen los requisitos del sistema FRET y hace de los CDs excelentes donantes potenciales con una alta selectividad y sensibilidad.

Debido a sus propiedades excelentes, los puntos de carbono han recibido numerosas aplicaciones en bioimagen, fotocatalisis, optoelectrónica, cargado y liberación de fármacos y desarrollo de sensores. Como consecuencia de lo anteriormente descrito en este trabajo se plantea la síntesis de nanoestructuras de carbono con diferentes modificaciones superficiales y su utilización como sensores y posibles acarreadores teragnósticos. La ubicación de este proyecto es en el área de analítica, específicamente en el desarrollo de nanosensores ópticos.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. Justificación

La espectroscopia de fluorescencia ha emergido como una herramienta analítica poderosa para la detección de biomoléculas, el análisis no invasivo de células individuales y la obtención de imágenes biomédicas.^{10,11} En comparación con las técnicas convencionales, incluidas la tomografía computarizada, la tomografía por emisión de positrones y la resonancia magnética, la microscopía molecular de fluorescencia logra resoluciones de profundidad de hasta 800 μm , proporciona información tridimensional de la luz emitida por marcadores fluorescentes y proporciona imágenes con resoluciones espaciales altas.^{12,13} Actualmente, la obtención de imágenes moleculares mediante técnicas basadas en fluorescencia se utiliza ampliamente en la detección de células cancerosas debido a su extraordinaria sensibilidad y resolución espacial. La imagen de fluorescencia visualiza la expresión y la actividad de moléculas particulares, así como las células y los procesos biológicos que influyen en el comportamiento del tumor y / o la respuesta a las drogas terapéuticas.¹⁴

El desarrollo de un método eficiente para distinguir las células cancerosas de las células normales es un tema desafiante, y en este sentido, una medida factible puede ser a través del monitoreo de las moléculas sobre expresadas en las células cancerosas. El receptor de folato (RF) se sabe que está regulado positivamente en una variedad de células cancerosas humanas, incluida la neoplasia de ovario, glándula mamaria, pulmón, riñón, cerebro, próstata y garganta; mientras que en las células normales está solo mínimamente distribuida.¹⁵ El nivel de RF también parece aumentar a medida que aumenta la etapa del cáncer.¹⁵ En la actualidad, las nanopartículas fluorescentes conjugadas con ligandos de afinidad biomolecular (péptidos, anticuerpos o moléculas pequeñas) se han usado ampliamente para imágenes moleculares y

celulares tanto *in vitro* como *in vivo*, y tales estrategias también se han empleado como una ruta importante para localizar células cancerosas.¹⁶⁻¹⁹

Para RF, el ácido fólico (AF) es un ligando ideal debido a su alta afinidad ($Kd \approx 10^{-10}$ M), estabilidad y compatibilidad con disolventes orgánicos y acuosos.^{15,20} Además, el ligando se internaliza fácilmente en las células a través de endocitosis.²¹ Estas características hacen que el AF sea un agente prometedor para la detección de RF, administración de fármacos y terapia contra el cáncer.²²⁻²⁴ Se han reportado trabajos para la localización de células cancerosas, mediante la detección de RF, utilizando materiales diversos conjugados con AF.²⁵⁻²⁸ Los materiales utilizados incluyen nanopartículas de oro, puntos cuánticos inorgánicos, nanopartículas de sílice, nanopartículas lipídicas, nanopartículas magnéticas fluorescentes, etc. Sin embargo, algunos de estos nanomateriales funcionalizados tienen diámetros grandes o efectos potencialmente tóxicos, que pueden limitar su accesibilidad a las células o conducir a la intoxicación celular. Por lo tanto, es deseable un tamaño más pequeño y materiales no tóxicos.

Los CDs poseen propiedades ópticas excelentes, tamaños pequeños y son materiales no tóxicos. Además, en comparación con otros materiales, los CDs son de preparación fácil, presentan buena biocompatibilidad y estabilidad coloidal. Por lo tanto, los CDs son candidatos idóneos para el desarrollo de sensores ópticos y como posibles agentes teragnósticos.

2.2. Objetivo general

Obtener y caracterizar nanoestructuras de carbono con diferentes modificaciones superficiales para su utilización como sensores.

2.3. Objetivos específicos

1. Sintetizar nanoestructuras de carbono (CQDs) con carga negativa y carga positiva.

2. Caracterizar las nanopartículas obtenidas por TEM, EDS y FTIR.
3. Realizar estudios por potencial Z y DLS.
4. Caracterizar las nanoestructuras obtenidas mediante espectroscopia UV visible y fluorescencia molecular.
5. Determinar la influencia del pH en las propiedades fluorescentes de las nanoestructuras sintetizadas.
6. Estudiar la influencia de las modificaciones superficiales en las propiedades de citocompatibilidad de las nanoestructuras obtenidas.
7. Estudiar la formación de ensamblés ácido fólico con las diferentes nanoestructuras de carbono.
8. Utilizar los diferentes ensamblés en el reconocimiento de receptores de folato y seleccionar el que presente mejores características.
9. Evaluar la selectividad de la sonda fluorescente de receptores de folato en presencia de iones metálicos como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} , moléculas de interés biológico como glucosa, ácido oxálico, urea, ácido ascórbico, ácido cítrico y aminoácidos como histidina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina y treonina.
10. Utilizar la sonda fluorescente para la determinación de los receptores de folato sobre expresados en la superficie de las células de cáncer Hela por microscopia confocal de fluorescencia

III. TOERÍA GENERAL Y ANTECEDENTES

3.1. Fundamentos de luminiscencia molecular

La fotoluminiscencia es el proceso mediante el cual los átomos o moléculas emiten luz tras haberse excitado previamente mediante la absorción de radiación electromagnética, siendo ésta de mayor energía que la emitida. La emisión de luz ocurre cuando las especies excitadas vuelven al estado fundamental a través de procesos de relajación.

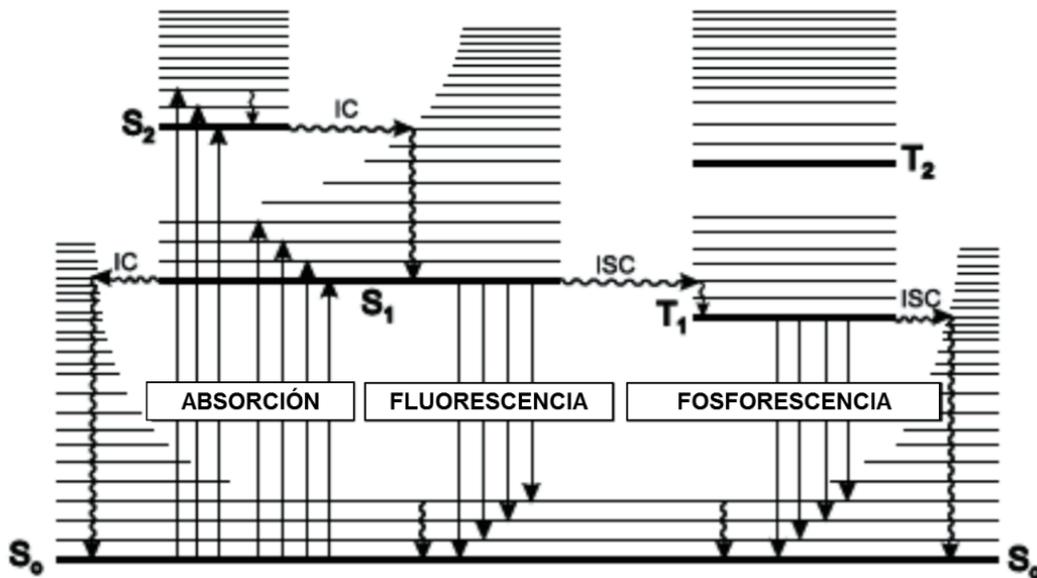


Figura 1. Diagrama de Jablonski.²⁹

Los procesos que ocurren entre la absorción y emisión de luz son usualmente ilustrados mediante el diagrama de Jablonski (Figura 1).²⁹ En este diagrama las líneas horizontales de menor grosor representan los distintos niveles vibracionales de los diferentes niveles electrónicos: el estado singulete base (S_0), los estados singuletes excitados S_1 y S_2 o los estados tripletes excitados T_1 y T_2 .

Los procesos fotoluminiscentes se dividen en dos categorías, fluorescencia y fosforescencia. La fluorescencia se diferencia de la fosforescencia en que las transiciones electrónicas que producen la primera no llevan asociadas un cambio de espín del electrón, mientras que la fosforescencia sí. Dado que el cambio en la multiplicidad, como consecuencia de la absorción de radiación electromagnética, es un proceso prohibido por las reglas de la mecánica cuántica, la fosforescencia presenta un tiempo de vida más largo que la fluorescencia, siendo del orden de milisegundos a segundos frente a los nanosegundos habituales en la segunda. Una característica común en los casos de emisión de fotoluminiscencia (tanto fluorescencia como fosforescencia) es que la emisión ocurre a mayor longitud de onda que la empleada para la excitación.

Una molécula excitada puede también volver a su estado fundamental mediante procesos no radiativos, los cuales se conocen con el nombre de procesos de desactivación.

En disolución, el exceso de energía vibracional se pierde como consecuencia de las colisiones entre moléculas de las especies excitadas y el disolvente (conversión externa). Cuando dos niveles vibracionales de dos estados electrónicos diferentes están suficientemente próximos, la molécula puede pasar de un estado electrónico a otro de más baja energía sin emisión de radiación (conversión interna). Si durante este proceso se invierte el espín de un electrón excitado, produciendo un cambio en la multiplicidad de la molécula, el proceso se denomina cruce entre sistemas.

El camino más favorable hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida del estado excitado. Así, si la desactivación por fluorescencia es más rápida que los procesos no radiantes, se observará esta emisión. Si por su parte, la desactivación no radiante tuviese una constante de velocidad más favorable, la fluorescencia desaparecería o sería menos intensa.

En la actualidad, los métodos luminiscentes son ampliamente utilizados debido a sus amplios intervalos de linealidad y a sus límites de detección bajos, del orden de las partes por billón (ppb), entre uno y tres órdenes de magnitud inferiores a los que caracterizan a la espectroscopia de absorción.

3.2. Puntos de carbono

3.2.1. Estructura

Hace ya más de 10 años desde que una nueva familia de nanomateriales, posteriormente denotados como puntos de carbono (CDs), han sido inicialmente sintetizados y caracterizados.^{30,96} Desde entonces, el campo de los CDs ha sido testigo de un desarrollo impresionante, en particular centrado en la mejora de sus propiedades luminiscentes.

Desde un punto de vista estructural, se distinguen dos tipos de estos materiales, los GQDs y los CQDs (Figura 2). Los primeros, son nanopartículas cuasi esféricas, con tamaños generalmente inferiores a 10 nm y comúnmente poseen una coraza amorfa con núcleo nanocristalino, observándose la presencia de hibridaciones sp^2 y sp^3 .^{31,96} Por otro lado, los GQDs, están compuestos por varias capas de grafeno con dimensiones laterales que pueden llegar hasta los 100 nm.³² La forma de la mayoría de los GQDs es circular o elíptica, aunque también se han obtenido con formas triangulares, cuadradas y hexagonales.³³

Tanto para los CQDs como para los GQDs, se ha revelado el espaciado reticular gráfico en el plano de 0.18 – 0.24 nm (correspondiente a diferentes planos de difracción) y el espaciado entre capas de 0.334 nm (o mayor debido a la presencia de grupos funcionales) por mediciones HRTEM y XRD.³³ Dependiendo de las rutas sintéticas, se introducen varios defectos, heteroátomos y grupos funcionales, lo que puede alterar significativamente sus propiedades estructurales y fisicoquímicas.⁹⁶

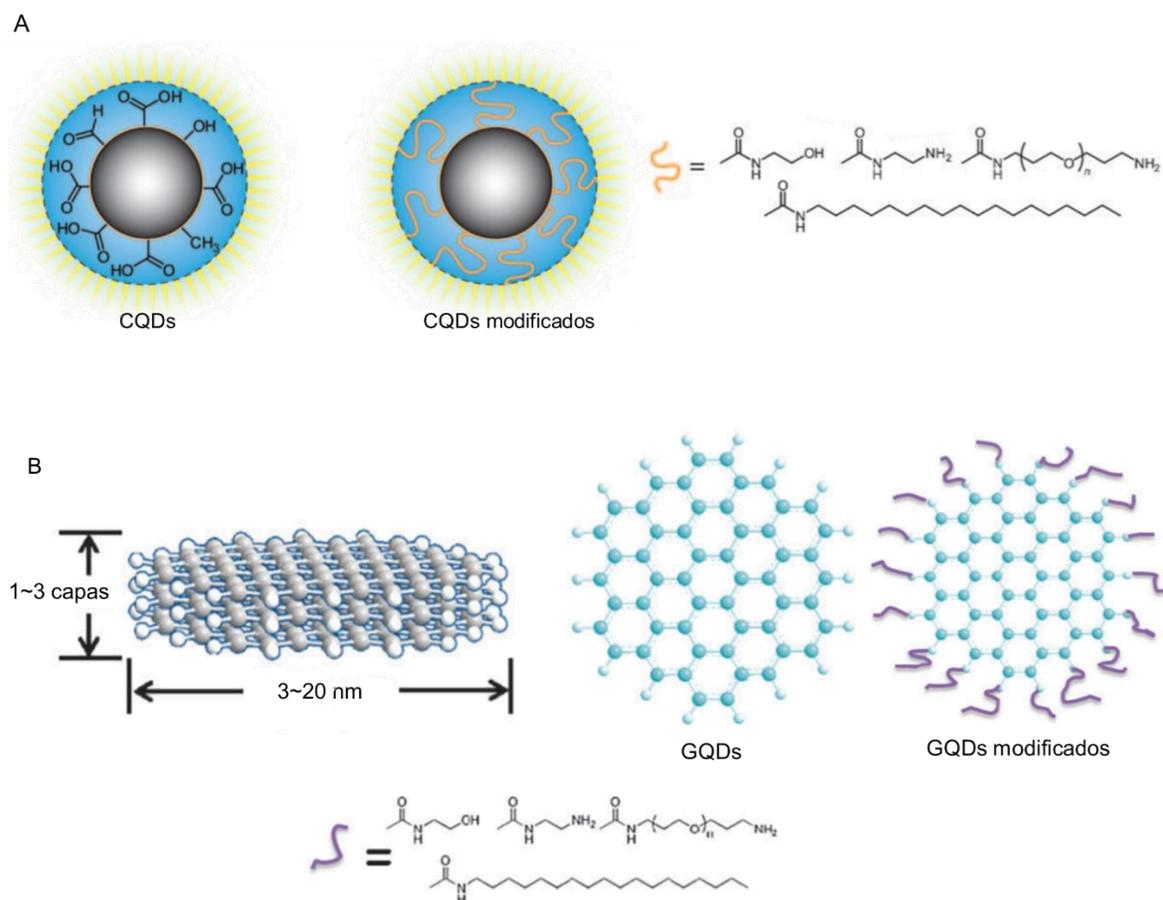


Figura 2. Representación estructural de A) CQDs y B) GQDs.^{34,35}

3.2.2. Estrategia de síntesis de CDs

Muchas son las rutas de síntesis para obtener CDs, siendo todas de manera general sencillas y donde al menos uno de sus reactivos funciona como fuente de carbono. La síntesis de CDs puede ser dividida, desde un punto de vista operacional, en tres etapas:³¹

1. Síntesis de nanopartículas en bruto,
2. Operaciones de pasivación y
3. Reacciones de funcionalización.

La síntesis de CDs en bruto puede clasificarse en dos categorías, los métodos de “top down” (arriba hacia abajo) y de “bottom up” (abajo hacia arriba). Los enfoques “top down” se basan en reducir el tamaño de las estructuras de grafito/grafeno hasta que los productos muestran las características de nanopartículas fluorescentes. Estos métodos incluyen técnicas como descarga de arco eléctrico, ablación láser de fuentes de carbono, impacto electroquímico de nanotubos de carbono, exfoliación electroquímica de grafito, irradiación láser de nanopartículas de carbono (<50 nm) dispersas en un solvente orgánico luego de haber sido sonicadas.^{31,36} El tamaño de los CD resultantes suele variar entre 2 y 25 nm, con rendimientos cuánticos que pueden alcanzar hasta 28% después de los procesos de pasivación superficial.^{36,38}

En pocas palabras, en los enfoques “bottom up” todo lo que es de naturaleza carbógena que puede "arder" puede producir CDs. Por esta razón, los CDs se han encontrado en caramelo³⁸ o en Nescafé® café³⁹. Una ruta sintética más conveniente implica la oxidación térmica de diferentes precursores orgánicos que puede producir, en una sola etapa, CDs altamente fluorescentes sin necesidad de realizar operaciones de pasivación superficial.^{40,41} La oxidación térmica de precursores orgánicos también puede llevarse a cabo en solución acuosa calentando en un microondas,^{42,43} o en autoclave⁴⁴ y en presencia de ácidos⁴⁵ produciendo CDs altamente fluorescentes. El control de las condiciones de carbonización a través de la selección de precursores permite el ajuste del color de fluorescencia de los CD resultantes. Una característica importante de los métodos “bottom up” es que normalmente no requieren agentes de pasivación en la superficie (por ejemplo, polietilenglicol, polietilenimina) para obtener materiales fluorescentes como en el caso de los métodos “top down”.

Las operaciones de pasivación se aplican cuando se han obtenido CDs con rendimientos cuánticos pobres y tienen como finalidad mejorar las propiedades ópticas de las nanopartículas sintetizadas. Con este fin se recurre a tratamientos químicos que incluyen la oxidación de la superficie de estas nanopartículas con ácido nítrico, dopaje

con sales inorgánicas y el recubrimiento con polímeros orgánicos.³¹ Es muy probable que estas operaciones tengan el mismo efecto que la pasivación en los semiconductores del tipo QDs.

Con el fin de estabilizar y maximizar la emisión de fluorescencia en los QDs, estos son recubiertos con una envoltura inorgánica. Esta operación concentra los portadores de carga en el núcleo nanocristalino alejándolos de la superficie. Con esto se minimiza el impacto que tienen los defectos superficiales y las trampas de energía sobre la eficiencia en la emisión de fluorescencia y además disminuye la influencia de los factores del entorno sobre las propiedades fluorescentes de la nanopartícula.⁴⁶

La última etapa de síntesis involucra a las llamadas reacciones de funcionalización que engloban todas las transformaciones químicas que se realizan después de las operaciones de pasivación. Desde el punto de vista químico analítico, el objetivo de las etapas de funcionalización es el de proveer a la nanopartícula de una reactividad química determinada según el uso final deseado.

En el año 2013 Xu y colaboradores⁴⁷ reportaron la síntesis de CDs dopados con nitrógeno (N-CDs) para su aplicación como sensores de bioimagen. Este trabajo muestra una estrategia fácil y general para preparar N-CDs y con bajo nivel de oxidación utilizando como precursores de carbono L-DOPA, L-histidina y L-arginina. Los N-CDs son obtenidos mediante un proceso de carbonización térmica de los precursores y posterior extracción con solventes orgánicos diferentes, presentando estos una estructura tipo núcleo coraza (Figura 3 C) con un núcleo de carbono y una capa amorfa con grupos que contienen oxígeno. En las imágenes TEM (Figura 3) de los N-CDs se muestra la uniformidad y monodispersidad de estas nanopartículas con un diámetro medio de 3.64 nm. La Figura 4 muestra el espectro de fluorescencia de los CDs obtenidos en DMF. Los autores estudiaron la dependencia entre la longitud de onda de excitación y emisión excitando en un intervalo comprendido entre 320 y

480 nm. Aunque la banda de emisión se movió desde 475 a 555 nm, se obtuvo un máximo de emisión al ser excitado a una longitud de onda de 400 nm.

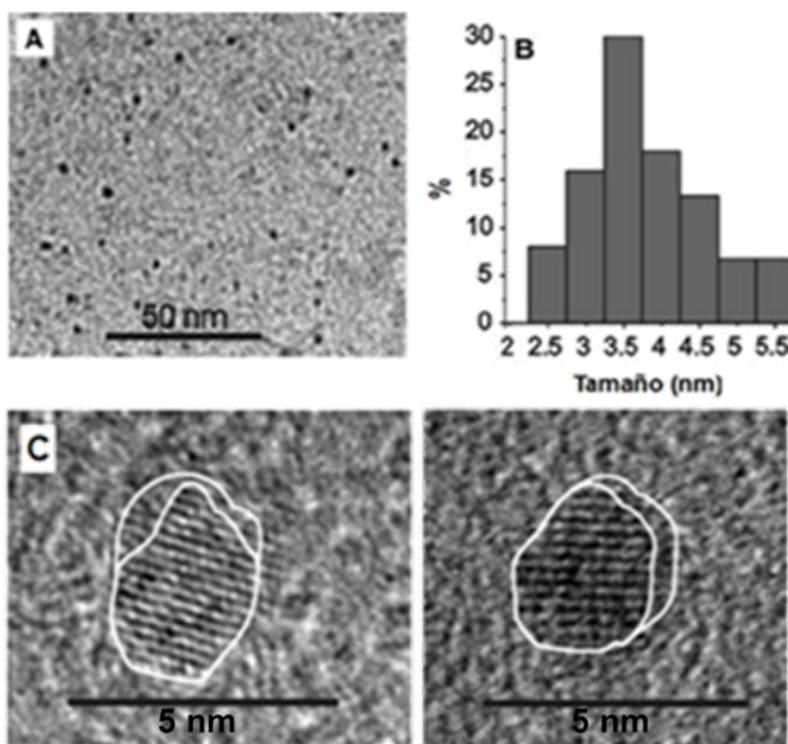


Figura 3. A) TEM. B) Distribución de tamaño N-CDs. C) HRTEM.⁴⁸

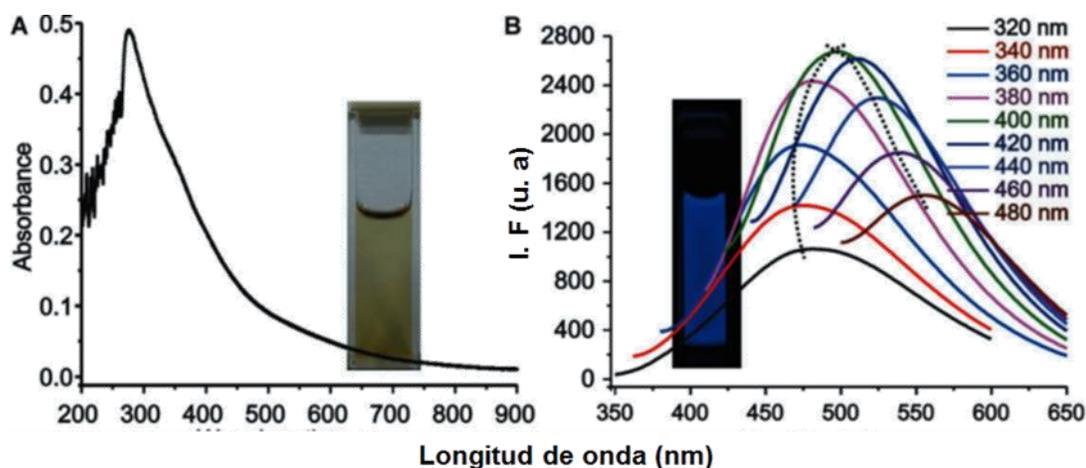


Figura 4. A) Espectro UV-Vis N-CDs. B) Dependencia de la emisión de fluorescencia con la longitud de onda de excitación N-CDs.⁴⁷

Zhu y colaboradores⁴⁸ en el año 2013 sintetizaron CDs a partir de ácido cítrico y etilendiamina mediante tratamiento hidrotérmico, realizando una síntesis sencilla en un solo paso con un rendimiento de 58 %. Los autores variaron las condiciones de síntesis para estudiar la influencia de ciertas variables (reactivos, temperatura) en el rendimiento cuántico de los CDs, obteniendo nanopartículas con rendimientos cuánticos de hasta 80 %.

Los CDs sintetizados que presentaron mejor rendimiento cuántico fueron caracterizados por diferentes técnicas. La estructura y morfología de las nanopartículas fue determinada mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 5), observándose una uniformidad en la dispersión de las nanopartículas sin presentar una aparente agregación. Los CDs mostraron una distribución de tamaño entre 2 y 6 nm. Las propiedades ópticas fueron estudiadas mediante espectroscopia UV-Visible y espectroscopia de fluorescencia. El espectro UV-Visible en solución acuosa muestra un máximo de absorción en 344 nm (Figura 6 A). En el espectro de fluorescencia se observa una excitación óptima a 360 nm y una emisión a los 443 nm (Figura 6 A). En la Figura 6 B puede observarse el espectro de emisión de los CDs a diferentes longitudes de onda de excitación.

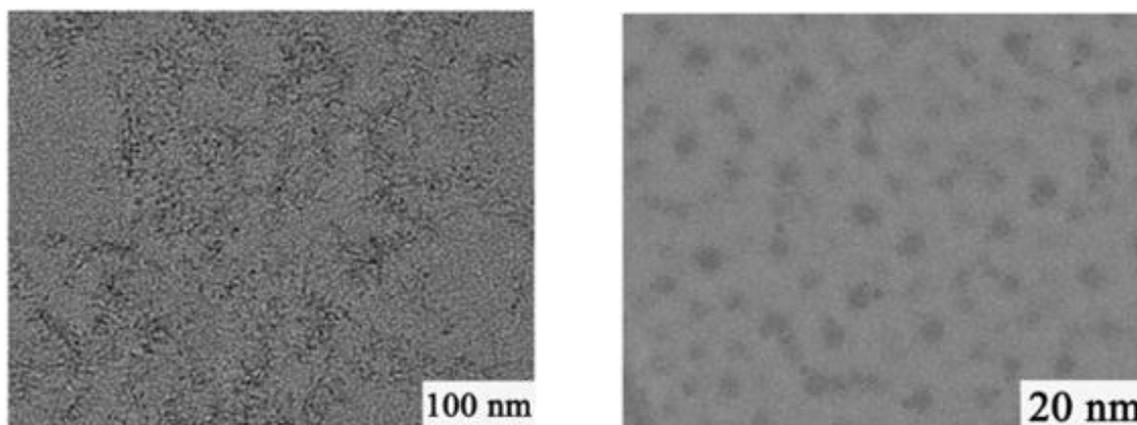


Figura 5. Imágenes TEM (izquierda) y HRTEM (derecha).⁴⁸

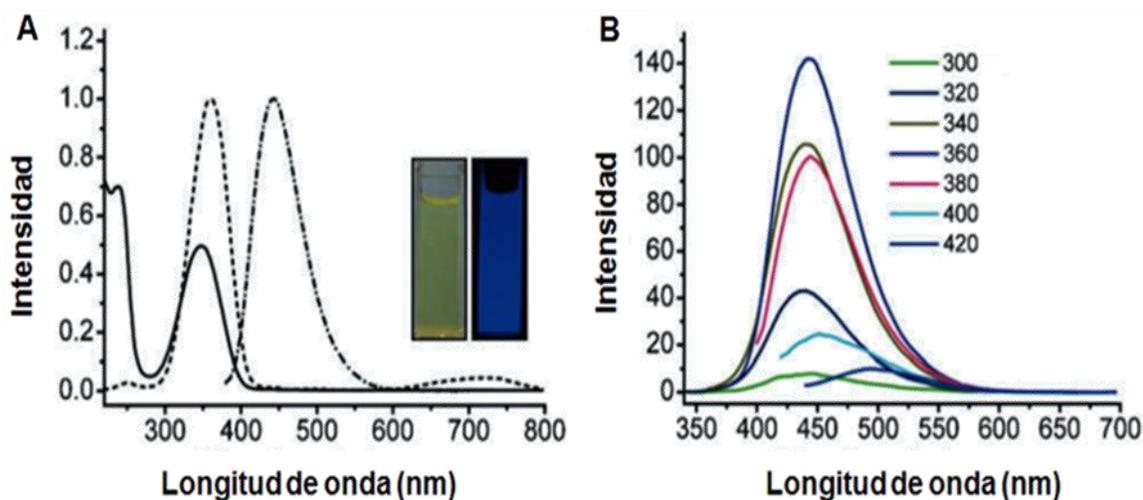


Figura 6. A) Espectro UV-Vis (—). Fluorescencia, excitación (---), emisión (-.-.). B) Emisión de fluorescencia a diferentes longitudes de onda de excitación.⁴⁸

3.2.3. Propiedades ópticas de los CDs

Quizás la propiedad más llamativa de los CDs (CQDs y GQDs) es la dependencia que existe entre la longitud de onda de emisión y la longitud de onda de excitación. Un ejemplo de esto puede observarse en la Figura 7,³ el amplio intervalo espectral y las intensidades relativamente altas de los picos de emisión resaltan las propiedades multicolores de los CDs. En efecto, el hecho de que la banda de emisión de fluorescencia pueda desplazarse en función de la longitud de onda de excitación que se utilice es una de las propiedades únicas de los CDs y ha sido explotado en aplicaciones diversas.

Mientras que la variación en la emisión de fluorescencia de los ampliamente estudiados QDs, corresponden a los efectos del confinamiento cuántico y se correlacionan con el tamaño de las nanopartículas,^{46,49} la variación en las propiedades fluorescentes de los CDs no puede explicarse a través de este mecanismo. La variación en la emisión de fluorescencia en CDs se ha atribuido, a estados de energía asociados con defectos superficiales sobre las nanopartículas gráficas. La Figura 8

ilustra este concepto, que muestra las emisiones de fluorescencia generadas a partir de distintos niveles de energía asociados con la superficie de los CDs.

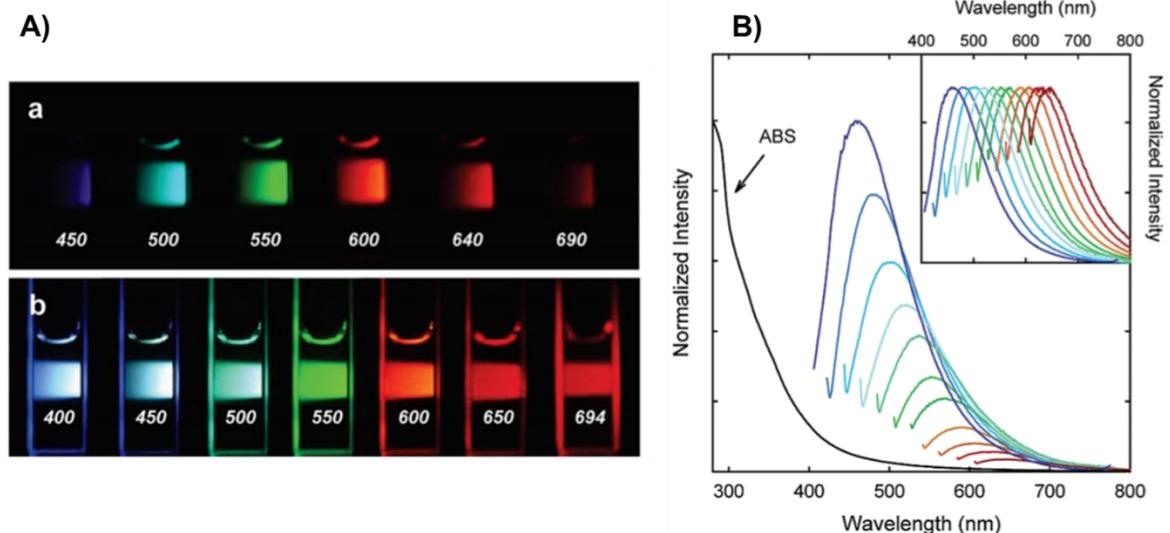


Figura 7. Dependencia entre la longitud de onda de emisión y la de excitación de los CDs. A) Fotografías de CDs pasivados con polietilenglicol (PEG) excitados a 400 nm (a), y registrados en diferentes filtros de emisión, o excitados en las longitudes de onda indicadas (b). B) Espectros de emisión de fluorescencia de los CDs excitados a incrementos crecientes de 20 nm. El recuadro muestra los espectros de emisión a intensidades normalizadas.³

Muchos estudios han proporcionado evidencia experimental que respalda el modelo de luminiscencia ilustrado en la Figura 8 y que muestra que la modulación de los "estados superficiales" de los puntos de carbono es la fuente subyacente de las propiedades de luminiscencia dependientes de la excitación. De hecho, las primeras investigaciones en el campo de CDs han demostrado que la luminiscencia solo puede lograrse después de la pasivación superficial de las nanopartículas de carbono a través de reacciones químicas posteriores a la síntesis. De hecho, varios estudios han demostrado que CDs que exhiben longitudes de onda de emisión única (por ejemplo, sin luminiscencia dependiente de la excitación) se pueden sintetizar modificando cuidadosamente la superficie de los CDs, eliminando o reduciendo las concentraciones de los "defectos superficiales" responsables de los diferentes niveles de energía.

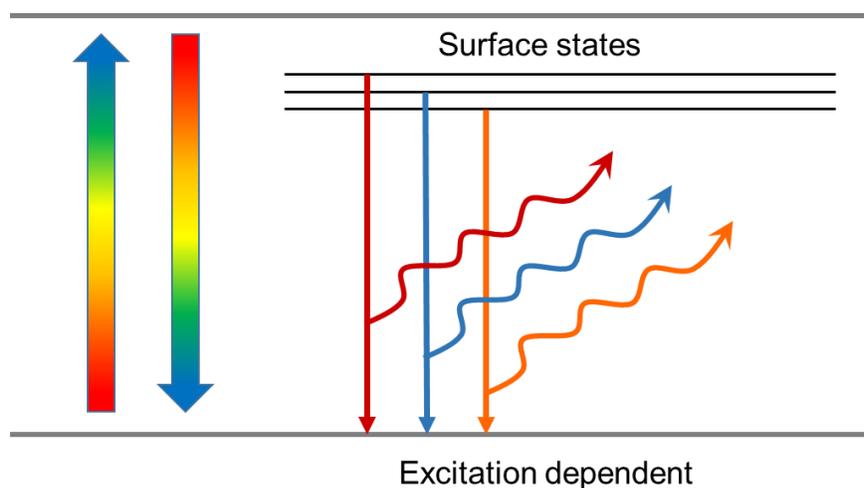


Figura 8. Emisión de fluorescencia de CDs atribuida a diferentes estados de energía superficiales.³⁴

La modulación de las propiedades ópticas de los CDs a través de medios químicos ha sido una dirección de investigación prominente en el área, dirigida a controlar los perfiles de emisión dependientes de la excitación de CDs. Lin y colaboradores en el Instituto de Tecnología e Ingeniería de Materiales de Ningbo, China, por ejemplo, sintetizaron CDs para los cuales los espectros de emisión exhibieron intensidades de pico similares incluso con la excitación en longitudes de onda significativamente diferentes (Figura 9).⁵⁰ Dichos CDs son, de hecho, diferentes a la abrumadora mayoría de los sistemas de CDs reportados en la bibliografía, en los que se han observado generalmente altas intensidades máximas de emisión solo dentro de una "ventana" de fluorescencia específica y bastante estrecha con disminución rápida de las señales de emisión de fluorescencia tras la excitación fuera de la ventana espectral, véase, por ejemplo, la Figura 9. Desde el punto de vista mecanicista, las propiedades ópticas de los CDs presentados en la Figura 9 se remontan a la abundancia relativa de grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas, particularmente residuos aromáticos y enlaces como C=N, C=O y C-N. De hecho, los autores demostraron que al cambiar las condiciones de síntesis

generadas por la formamida se obtuvieron CDs que exhiben diferentes distribuciones de las unidades químicas sobre la superficie y los cambios correspondientes en los colores de emisión.

La estrecha relación entre la emisión de fluorescencia y los grupos funcionales presentes en la superficie de los CDs se ha manifestado en muchos otros estudios. Un ejemplo interesante de fluorescencia "on-off" en CDs, logrado a través de reacciones de esterificación en la superficie, se describe en la Figura 10.⁵¹

Los CDs, preparados por Chowdhury y sus colegas en el Instituto de Estudios Avanzados en Ciencia y Tecnología, India, a partir del ácido cítrico como precursor de carbono, mostraron una disminución en la intensidad de fluorescencia en condiciones muy ácidas.⁵¹ Sin embargo, tras la esterificación de los grupos $-OH$ y $-COOH$ presentes en la superficie, mediante reacción con alcoholes, los CDs se volvieron altamente fluorescentes. Curiosamente, el proceso fue reversible: la acidificación de los CDs esterificados dio como resultado la extinción de fluorescencia, la reesterificación posterior recuperó nuevamente la emisión de fluorescencia. Si bien el mecanismo responsable de este fenómeno no se ha aclarado, se ha atribuido la modulación de intensidad de fluorescencia a cambios en los estados de energía de la superficie, directamente afectados por las reacciones químicas.

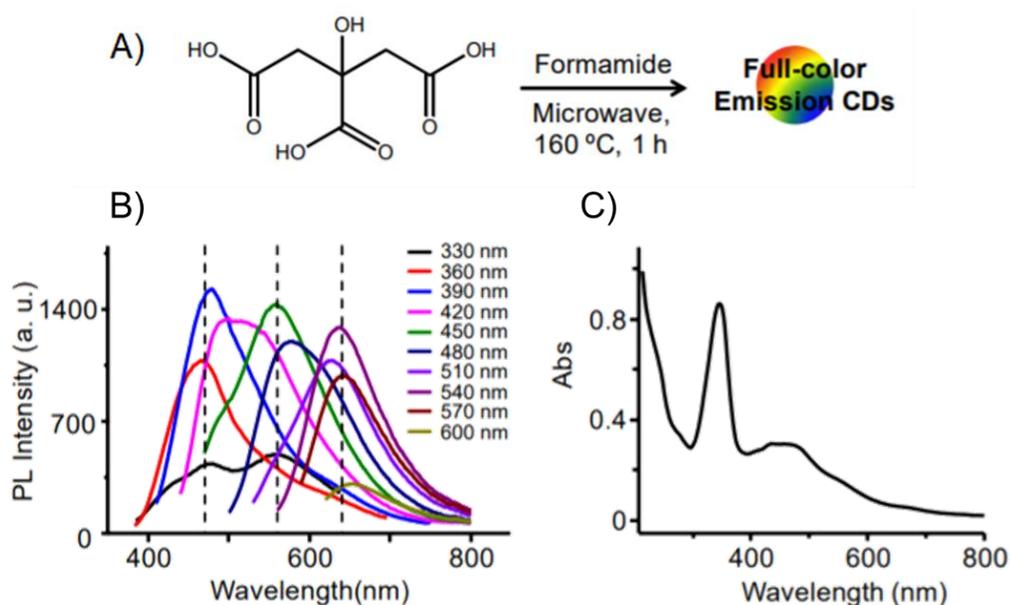


Figura 9. A) Esquema de síntesis de CDs; B) emisión de fluorescencia a diferentes longitudes de onda de excitación; C) espectro de absorción UV-vis.⁵⁰

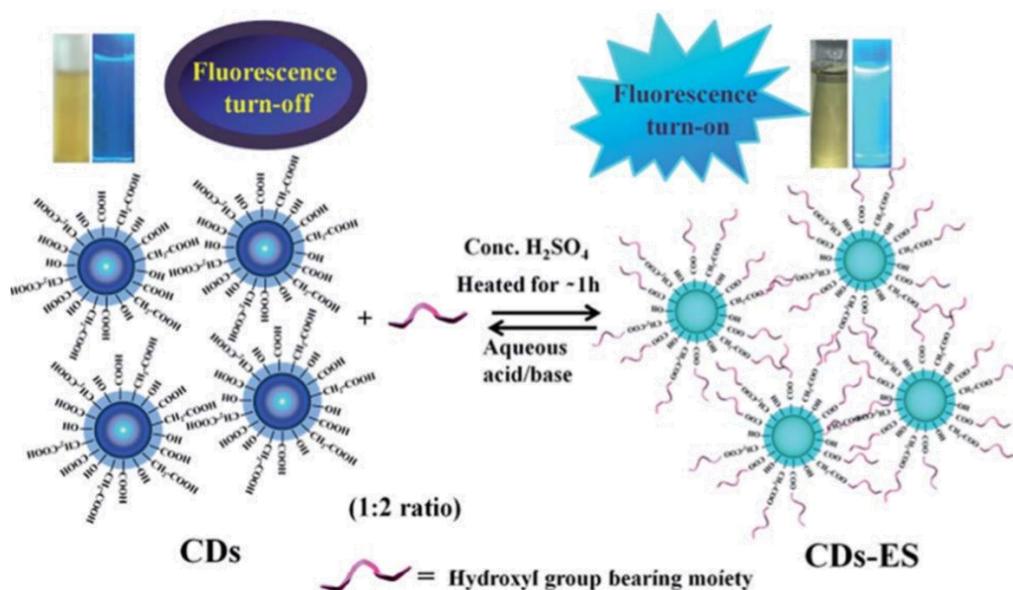


Figura 10. Modulación de la fluorescencia de CDs inducida por esterificación. La fluorescencia fue baja en los CDs generados con ácido cítrico a pH=1 (izquierda); tras la esterificación, la fluorescencia aumentó significativamente (derecha).⁵¹

Muchos estudios han propuesto mecanismos de la luminiscencia dependiente de la excitación de CDs. Urban y colaboradores en Ludwig-Maximilians-Universitaet, Alemania, llevaron a cabo una cuidadosa comparación entre las propiedades ópticas de los CDs incrustados dentro de una matriz polimérica y los hidrocarburos poli-aromáticos (HPA) que se encapsularon de manera similar dentro del polímero huésped, permitiendo controlar las concentraciones y composiciones de la especie emisora.⁵² El modelo propuesto por los investigadores, delineado en la Figura 11, trata los puntos de carbono como un "cóctel" de fragmentos de HPA bidimensionales (por ejemplo, unidades moleculares que contienen carbono con hibridación sp^2) incrustados dentro de una matriz de carbono amorfo. La luminiscencia en esta configuración se debió a la excitación de las especies aromáticas, y los diferentes colores de emisión surgieron de ligeras modificaciones estructurales de las unidades de HPA, particularmente la funcionalización de carbono con oxígeno y nitrógeno. Las diferencias estructurales entre los HPA dieron lugar a brechas de energía distintas, que corresponden a las diferentes longitudes de onda de emisión.

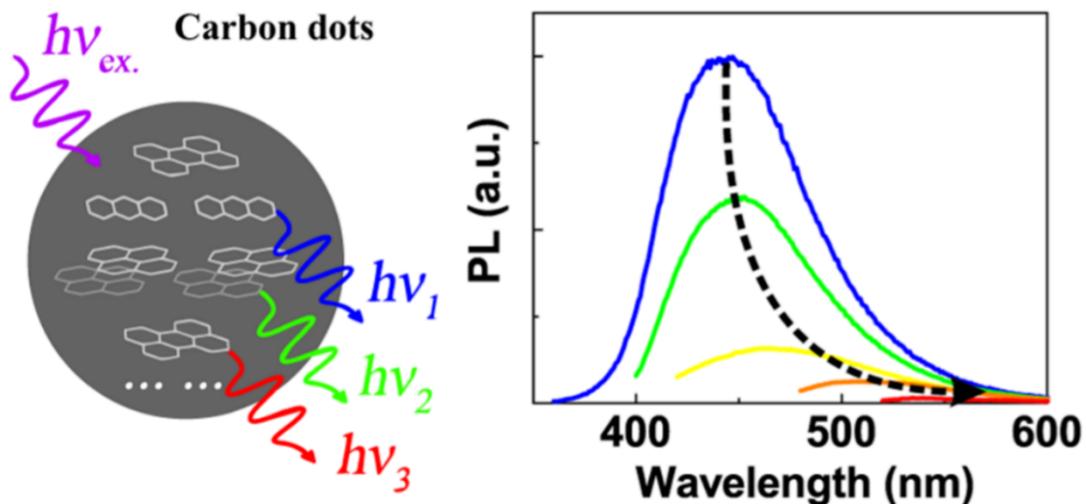


Figura 11. Modelo del mecanismo de emisión de fluorescencia de CDs. El esquema de la izquierda muestra la excitación de los puntos de carbono a una longitud de onda específica y la emisión en varias longitudes de onda. Los espectros de la derecha reflejan las diferentes emisiones de fluorescencia.⁵⁰

Por otro lado, Sk y colaboradores,⁵³ usando cálculos DFT dependientes del tiempo, demostraron que la fotoluminiscencia de GQDs se origina esencialmente a partir del confinamiento cuántico de electrones π conjugados en la red de carbonos sp^2 y puede ajustarse con sensibilidad según varía su tamaño, configuración de borde, forma, funcionalidades químicas asociadas, dopaje de heteroátomos y defectos.⁵³ Específicamente, este trabajo revela que los GQDs prístinos con bordes en zigzag emiten desde el UV profundo (235.2 nm) hasta el infrarrojo cercano (999.5 nm) mientras varían el diámetro de 0.46 a 2.31 nm debido a la disminución de la banda prohibida inducida por deslocalización π (Figura 12 A). El dopado con nitrógeno desplaza hacia el azul la emisión de fluorescencia de los GQDs, mientras que la oxidación y los defectos causan el desplazamiento hacia el rojo (Figura 12 B). La emisión de fluorescencia de GQDs de gran tamaño y con hibridación heterogénea está dictada por los dominios pequeños aislados de hibridación sp^2 .

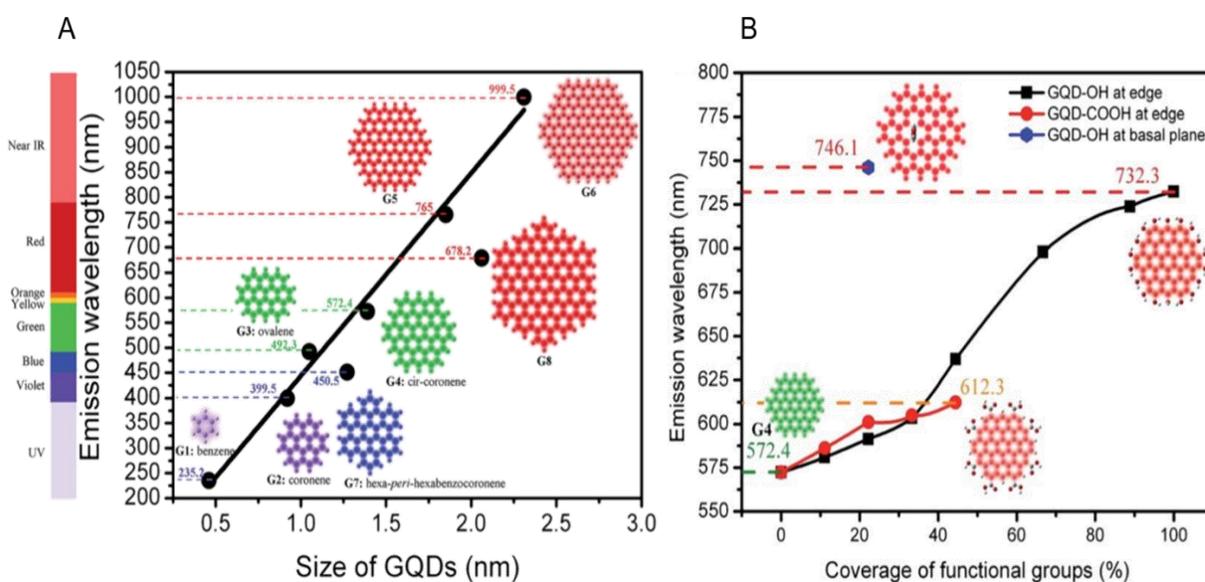


Figura 12. A) Longitud de onda de emisión calculada utilizando DFT en función del diámetro de los GQDs con bordes en zigzag; B) longitud de onda de emisión de GQDs oxidados en función de la cobertura de los grupos -OH y -COOH.⁵³

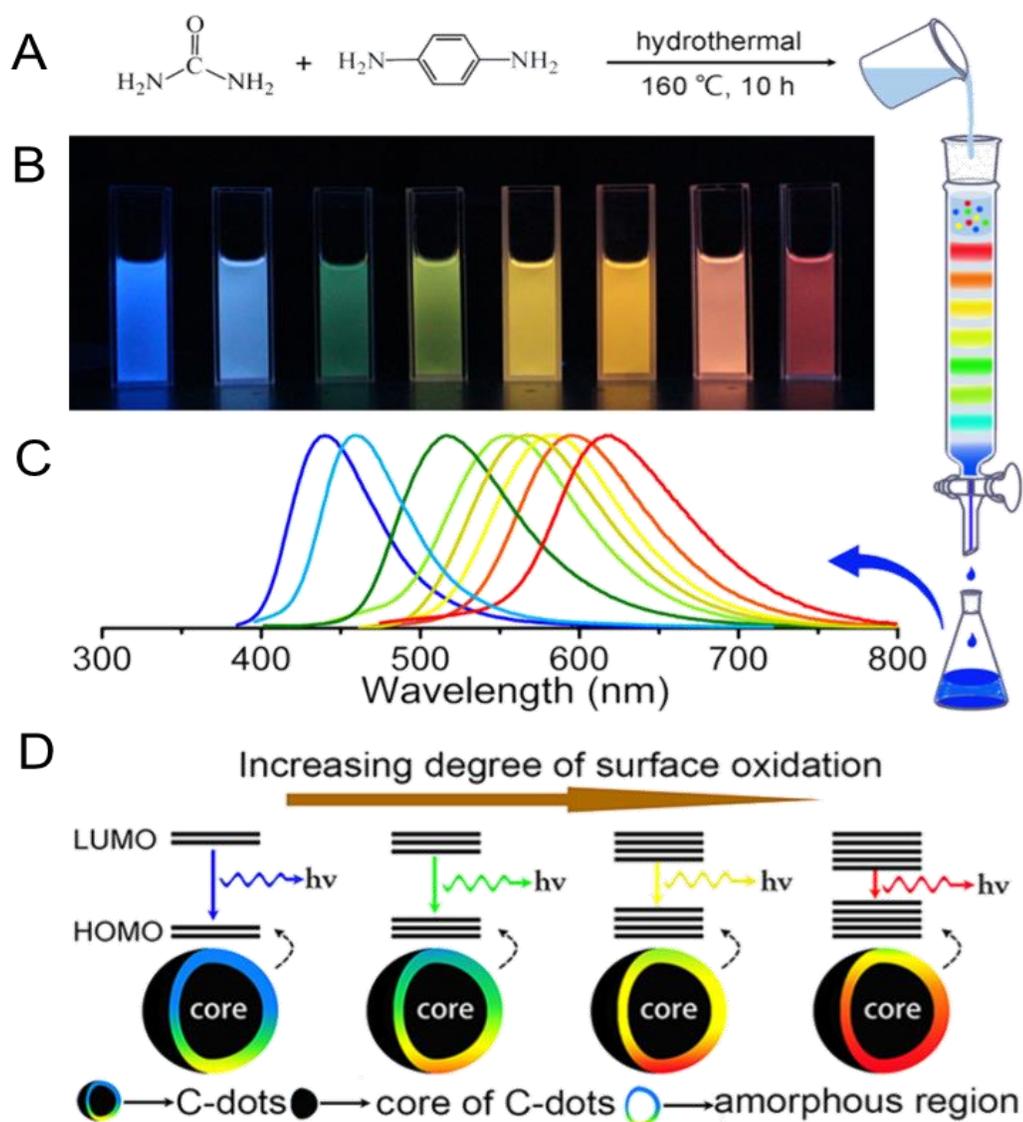


Figura 13. CDs que exhiben emisión de fluorescencia específica; A) síntesis purificación de CDs; B) colores de diferentes fracciones de CDs; C) longitudes de onda de emisión; D) mecanismo hipotético que vincula la emisión con el grado de oxidación superficial.⁵⁴

Otros estudios tuvieron como objetivo delinear los mecanismos responsables de la generación de estados de energía superficial en CDs. Una clave en muchos de estos estudios ha sido aislar eficazmente los CDs que exhiben características químicas y fotofísicas definidas. Xiong y colaboradores prepararon CDs con emisiones de

fluorescencia que cubren todo el intervalo espectral visible (Figura 13).⁵⁴ De manera crucial, esos CDs podrían separarse en partículas ópticamente puras que emitan colores luminiscentes distintos utilizando la cromatografía en columna de sílice, porque cada especie de puntos de carbono exhibió una polaridad distinta. Los CDs aislados se analizaron y sus emisiones de fluorescencia se correlacionaron directamente con el grado de oxidación superficial de los mismos, en lugar de parámetros como el tamaño (excluyendo así los posibles efectos de "confinamiento cuántico" similares a QDs). La Figura 13 D representa la relación propuesta entre los colores de los puntos de carbono y el grado de oxidación de la superficie.

3.2.4. Toxicidad *in vitro* e *in vivo* de CDs

Al igual que los semiconductores QDs tradicionales, los CDs ofrecen propiedades únicas favorables en imágenes celulares o seguimiento celular a largo plazo, a diferencia de los colorantes fluorescentes, son muy fotoestables.^{34,55} Otro requisito previo crucial para la formación de imágenes celulares, además de las propiedades ópticas adecuadas, es su baja citotoxicidad. Se han realizado muchos estudios *in vitro* e *in vivo* que muestran una citotoxicidad muy baja o nula incluso en concentraciones mucho más altas que las necesarias para la obtención de imágenes celulares.^{34,56} Las células de carcinoma hepatocelular humano muestran una tasa de supervivencia >90% después de la exposición a CQDs con una concentración de 0,5 mg/ml (Figura 14).⁵⁷ También se ha demostrado que los CDs presentan una citotoxicidad insignificante para muchas otras líneas celulares. [poner varios artículos]

Ajayan y colaboradores, han demostrado que las GQDs, con una dosis de hasta 50 µg/mL, no presentan una toxicidad significativa para las líneas celulares de cáncer de mama humano (Figura 15).⁵⁸ Una investigación más detallada realizada por Fan y colaboradores, demostró que no hay cambio significativo en la viabilidad, proliferación, actividad metabólica, capacidad de autorrenovación y potencial de diferenciación de

las células madre neuronales humanas después del tratamiento con GQDs (250 $\mu\text{g/ml}$).⁵⁹

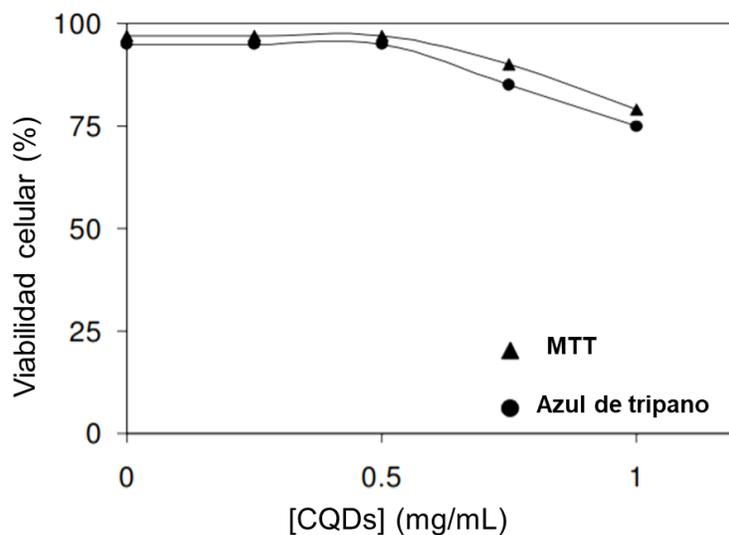


Figura 14. Citotoxicidad de CQDs para células HepG2 estudiadas mediante ensayos de MTT y azul de tripano.⁵⁷

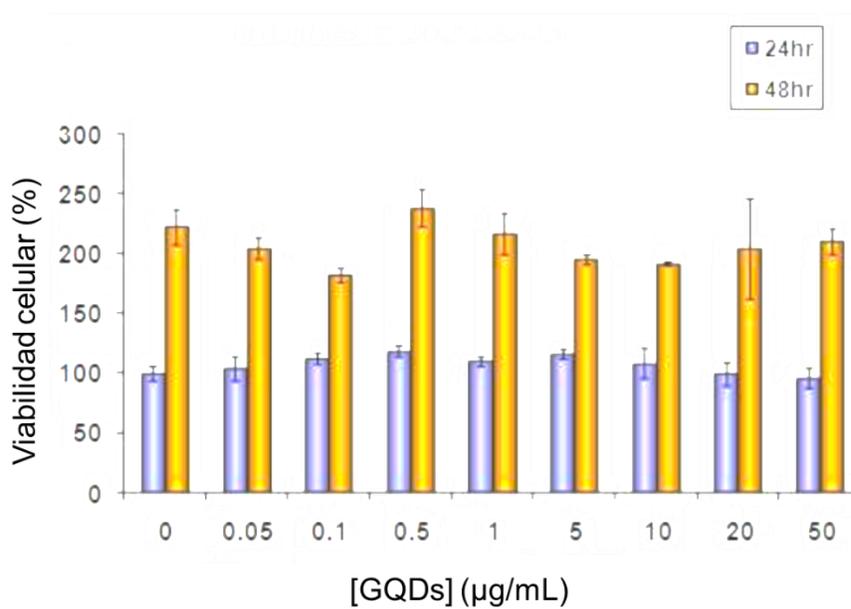


Figura 15. Citotoxicidad de CQDs para células HepG2 estudiadas mediante ensayos de MTT y azul de tripano.⁵⁸

Se han realizado estudios de toxicidad *in vivo* de CQDs en ratones.⁶⁰ Después de la exposición a CQDs pasivados con PEG 1500N (40 mg, inyectados por vía intravenosa), los ratones evaluados no mostraron anomalías en la ingesta de alimentos, peso corporal, actividades, función renal y hepática e indicadores bioquímicos séricos (alanino aminotransferasa, ácido úrico, nitrógeno ureico en sangre, etc.).

Los criterios para usar nanomateriales para el diagnóstico *in vivo* y la terapia dirigida son más desafiantes que aquellos para el etiquetado celular. Parámetros importantes a tener en cuenta, además de la baja toxicidad y la captación celular suficiente, son hemocompatibilidad, diámetro hidrodinámico pequeño, baja absorción de proteínas no específicas y extracción rápida del cuerpo con administración suficiente al tejido diana (generalmente cáncer).⁶¹ Huang y colaboradores, rastrearon el destino *in vivo* de los CQDs en ratones a través de tres vías de inyección utilizando fluorescencia en el infrarrojo cercano y tomografía por emisión de positrones.⁶² Se observó una excreción rápida y eficiente de CQDs en las tres vías de inyección. La velocidad de eliminación se puede ordenar como intravenosa > intramuscular > subcutánea. Los CQDs tenían una retención relativamente baja en el sistema retículo-endotelial y mostró un alto contraste en las áreas del tumor.

La toxicología *in vivo* y la biodistribución a largo plazo de las GQDs funcionalizados con PEG se han estudiado en ratones. Los GQDs no causaron una toxicidad apreciable para los ratones a una dosis de 20 mg/kg durante tres meses. Estos se acumularon principalmente en el hígado y el bazo y se eliminaron gradualmente.⁶³ Todos estos experimentos sugieren el gran potencial de los CQDs y GQDs para aplicaciones biomédicas *in vitro* e *in vivo*.

3.2.5. Transferencia de energía resonante de Förster (FRET) y CDs

Debido a sus excelentes propiedades ópticas, mejor fotoestabilidad, fabricación sencilla, costo bajo y mejor biocompatibilidad, los CDs han recibido una gran atención por sus potencialidades de aplicación en estudios de sistemas FRET.

FRET son las siglas en inglés de transferencia de energía resonante de Förster en honor al científico alemán Theodor Förster, quien originalmente describió este fenómeno.^{64,65} Los procesos FRET involucran una transferencia de energía desde un fluoróforo en el estado excitado a un segundo fluoróforo a través de una transferencia no radiativa de energía. Para entender este fenómeno se puede pensar en un experimento clásico de FRET entre una proteína fluorescente (Venus) que funciona como aceptor y un colorante (CFP) que funciona como donador. En este caso, luego de la excitación del CFP ocurre una emisión de luz de color azul cian; sin embargo, si la energía es transferida a la proteína Venus, entonces se observa también fluorescencia de color amarilla (Figura 16) aun cuando la proteína no fue directamente excitada por la luz de la lámpara.

Para que ocurra un proceso FRET entre un donador y un aceptor son necesarias una serie de condiciones. En primer lugar, debe existir un significativo solapamiento entre el espectro de emisión del donador y espectro de absorción del aceptor (Figura 16 A). Segundo, la distancia entre el aceptor y el donador debe estar en un intervalo comprendido entre 1 y 10 nm (Figura 16 B). Tercero, los momentos dipolares del donador y el aceptor deben tener una orientación correcta (Figura 16 C).^{64,65}

En contraste con materiales fluorescentes convencionales como colorantes orgánicos y los puntos cuánticos, el pico de emisión de los CDs se puede controlar fácilmente en un intervalo de longitud de onda amplio, lo que los hace apropiados para detectar diversas biomoléculas. Por otra parte, la estructura superficial de los CDs puede diseñarse fácilmente para mostrar una fuerte unión con los aceptores

específicos detectados, lo que permite una distancia corta entre los CDs y los aceptores.⁶⁶ Estas propiedades satisfacen los requisitos del sistema FRET y hace de los CDs donantes excelentes en los sistemas ópticos FRET con alta selectividad y sensibilidad.

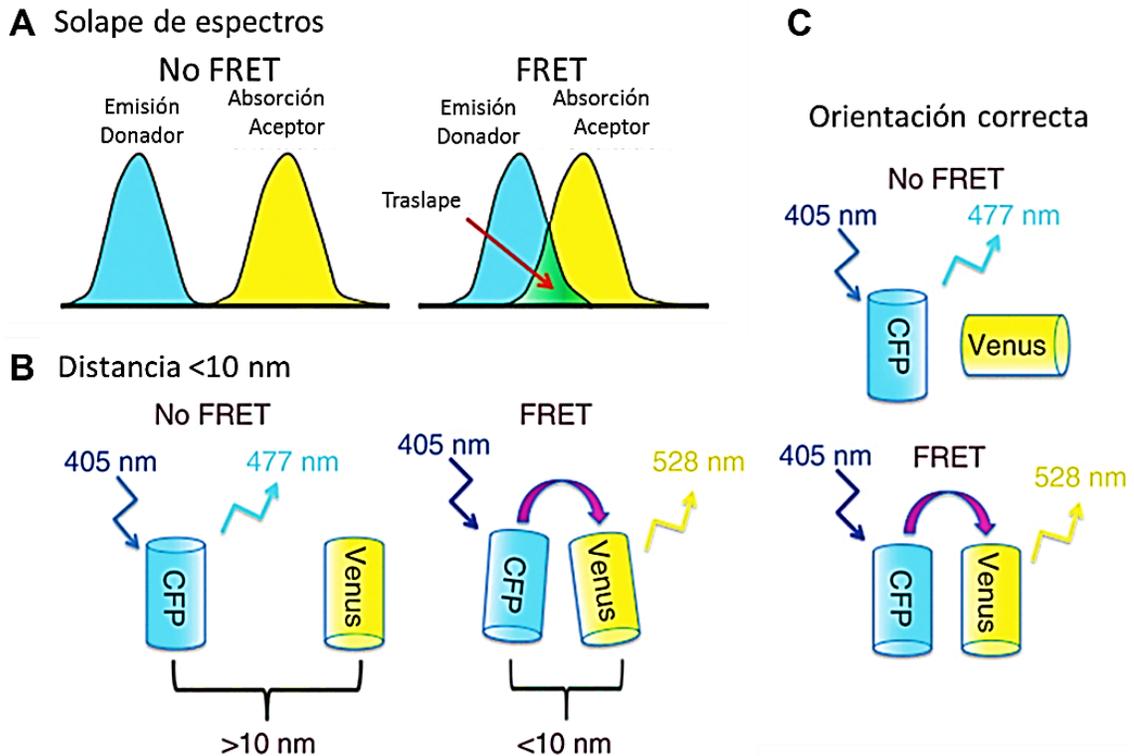


Figura 16. Diagrama esquemático con las condiciones necesarias para que ocurra un FRET.^{64,65}

Qiu y colaboradores⁶⁷ obtienen CDs con luminiscencia azul a partir de ácido cítrico y son reducidos térmicamente utilizando un analizador termogravimétrico. Luego de la reducción térmica los CDs experimentan un aumento en su rendimiento cuántico, por lo que pueden ser utilizados como donadores excelentes en procesos FRET. Los CDs obtenidos fueron utilizados como sensores ópticos de vitamina B₁₂. Estos emiten fluorescencia a una longitud de onda de 431 nm y en presencia de la vitamina se establece un sistema FRET entre ambos (Figura 17) trayendo como

consecuencia el abatimiento de la intensidad de fluorescencia de los CDs. El intervalo de concentración utilizado fue de de 1 a 12 $\mu\text{g/mL}$ con un límite de detección de 0.1 $\mu\text{g/mL}$. Esta técnica de detección resultó ser simple, rentable, sensible y selectiva para la detección de vitamina B₁₂.

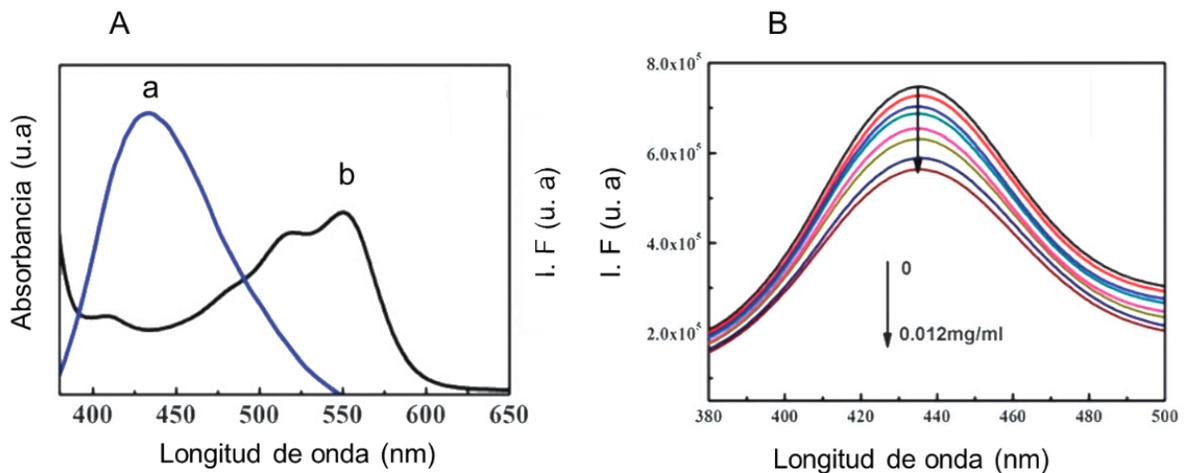


Figura 17. A: Espectros de emisión de CDs (a) y de absorción de vitamina B₁₂ (b). B: Abatimiento de fluorescencia de los CDs en presencia de vitamina B₁₂.⁶⁷

Por otro lado, Huang y colaboradores⁶⁸ establecen un sistema FRET entre CDs (donador) y QDs (aceptor), proponiendo una plataforma novedosa para la determinación de clortolurón de manera sensible y selectiva. Mediante estudios de intensidad de fluorescencia se evidenció un abatimiento del sistema FRET a medida que aumentaba la concentración del clortolurón. El método propuesto fue utilizado para la detección de clortolurón en agua mostrando resultados satisfactorios.

En la Figura 18 se muestra la superposición entre la banda de emisión de los CDs y la banda de absorción de los QDs. La Figura 19 muestra el FRET entre CDs y QDs y el abatimiento del mismo en presencia de concentraciones de clortolurón.

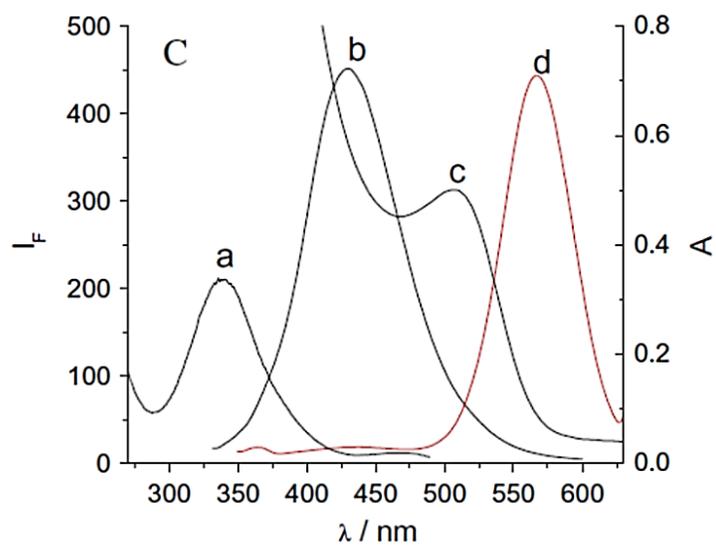


Figura 18. Espectros de absorción y emisión de CDs y QDs (a y b: absorción y emisión de CDs; c y d: absorción y emisión de QDs).⁶⁸

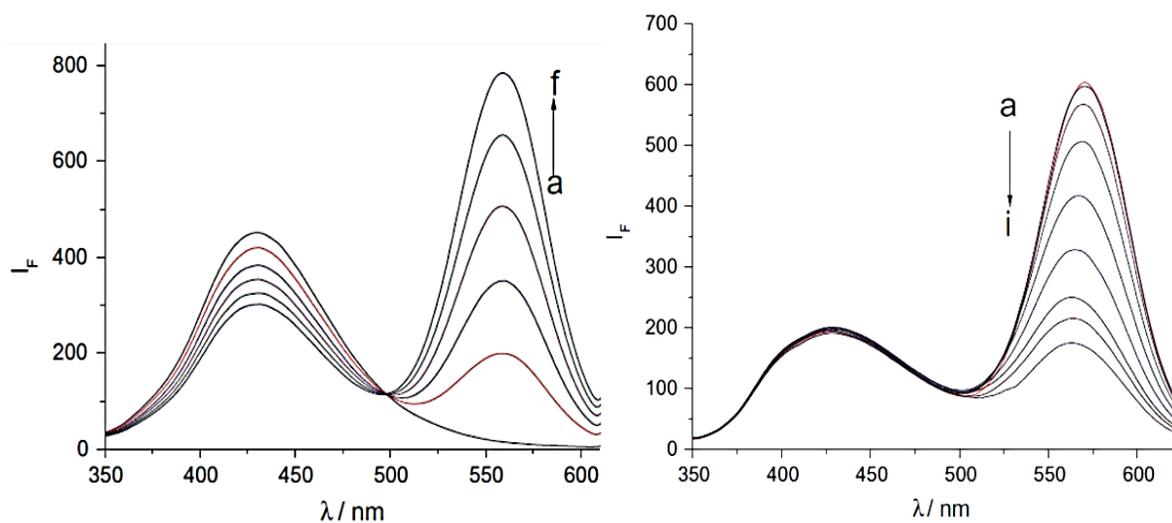


Figura 19. A: FRET entre CDs y QDs. B: Abatimiento del FRET en presencia del clortolurón.⁶⁸

3.2.6. Aplicaciones en el desarrollo de sensores y en bioimagen

Las propiedades ópticas de los CDs, específicamente su emisión de fluorescencia, es sensible a varios parámetros químicos experimentales que, si se pueden controlar, transforman los CDs en nanosensores con gran potencial analítico.

En varios trabajos publicados se han utilizados CDs, sintetizados por estrategias experimentales diferentes, como sensores de pH. Los CDs derivados del hollín de las velas seguido de tratamiento con ácido, mostraron una intensidad de fluorescencia máxima a pH = 7 y, para los valores de pH ácido y básico, se observó una marcada disminución (40-89%) en la fluorescencia, junto con un desplazamiento de la banda de emisión hacia el azul (Figura 20 A).⁶⁹ Los CD obtenidos por electro oxidación de grafito mostraron una intensidad de fluorescencia máxima a pH = 4.5 y una disminución reversible para valores de pH más bajos y más altos, y el espectro de emisión no se modificó con los cambios de pH (Figura 20 B).⁷⁰

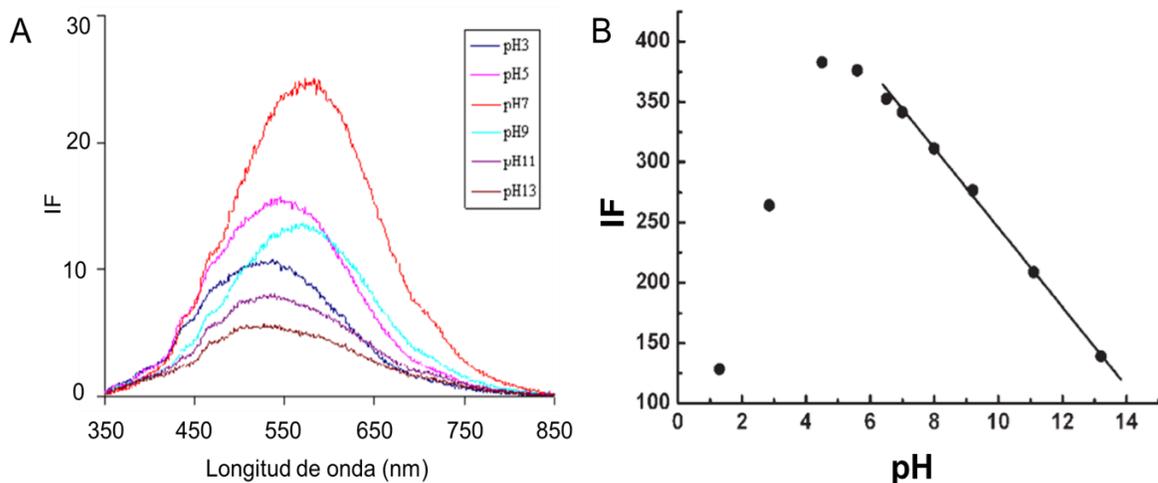


Figura 20. Efecto del pH en la intensidad de fluorescencia de los CDs en diferentes trabajos; A,⁶⁹ B.⁷⁰

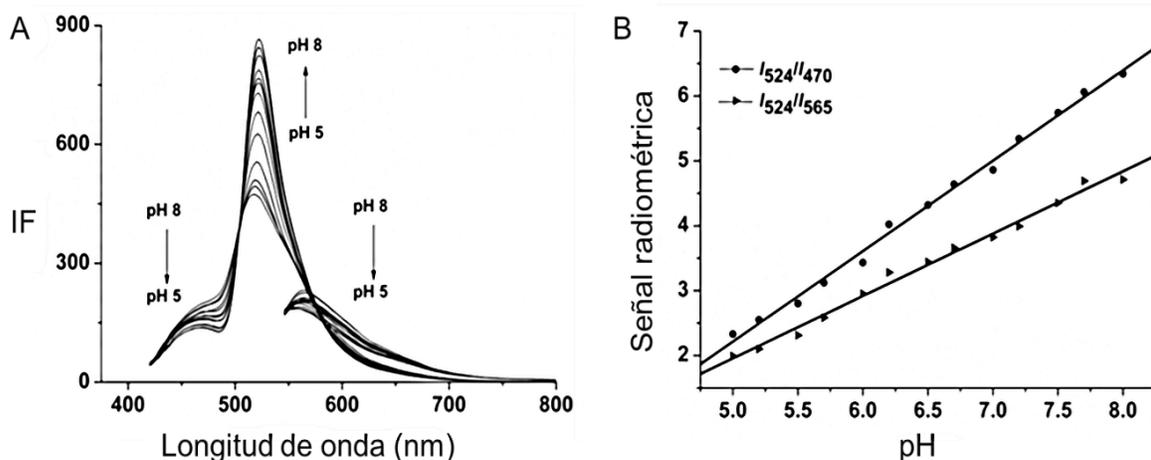


Figura 21. A) Espectros de fluorescencia de FITC-CDs a diferentes pH; B) Gráficos de calibración radiométrica de pH de la relación de emisión I_{524}/I_{470} e I_{524}/I_{565} de FITC-CDs en función del pH.⁷¹

También se han usado los CDs para el desarrollo de sensores radiométricos de pH. En este tipo de trabajo generalmente se establece un sistema entre los CDs y algún colorante orgánico y se estudia la variación en las intensidades de fluorescencias de ambos, mientras se varía el pH. En la Figura 21 se muestra un ejemplo de este tipo publicado por Zhang y colaboradores en el año 2014.⁷¹

Aunque los CDs sintetizados a partir de diferentes precursores se han utilizado para detectar diferentes iones, incluidos Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{2+} , Ag^+ , Cr^{3+} , Fe^{3+} , K^+ , Cl^- y H^+ ,^{72,73,74,75,76,77,78,79,93,95,97} los mecanismos de detección son similares. Los grupos funcionales presentes en la superficie de los CDs presentan afinidades distintivas a iones diferentes, lo que da como resultado el abatimiento de la intensidad de fluorescencia a través de un proceso de transferencia de electrones o energía. Por ejemplo, Qu y colaboradores usaron la dopamina como precursor para sintetizar CDs, que podría usarse como sensor de Fe^{3+} con un excelente límite de detección de 0.32 μM .⁸⁰ El mecanismo fundamental se representa de manera simple en la Figura 22. La interacción entre los CDs y el Fe^{3+} resulta en el abatimiento de la intensidad de

fluorescencia y esta se recupera cuando la interacción se rompe mediante la fuerza externa.

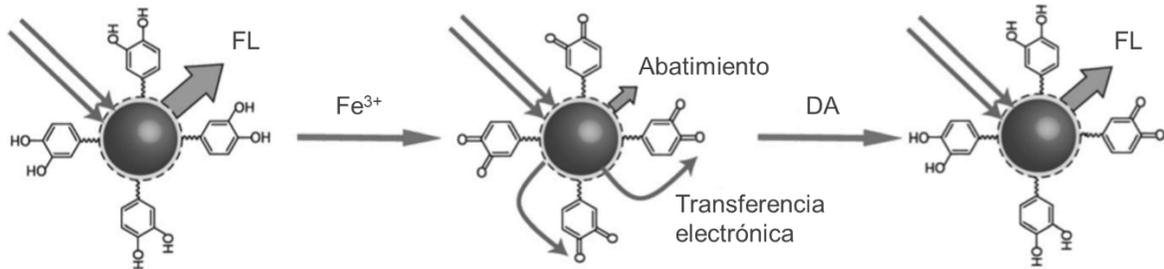


Figura 22. Representación esquemática del mecanismo de detección de Fe^{3+} y dopamina (DA) utilizando CDs.⁸⁰

En el año 2015 Yang *et al.* sintetizó CDs y los recubrió con un oligonucleótido (ODN) y a través de un sistema FRET con óxido de grafeno (OG) desarrolló un sensor óptico para detectar Hg^{2+} .⁸¹ En detalle, la fluorescencia de CDs-ODN se inactivó eficazmente con óxido de grafeno (OG) mediante transferencia de energía de resonante de Förster (FRET). Con la adición de Hg^{2+} , la intensidad de fluorescencia se recuperó liberando CDs-ODN de OG (Figura 23).

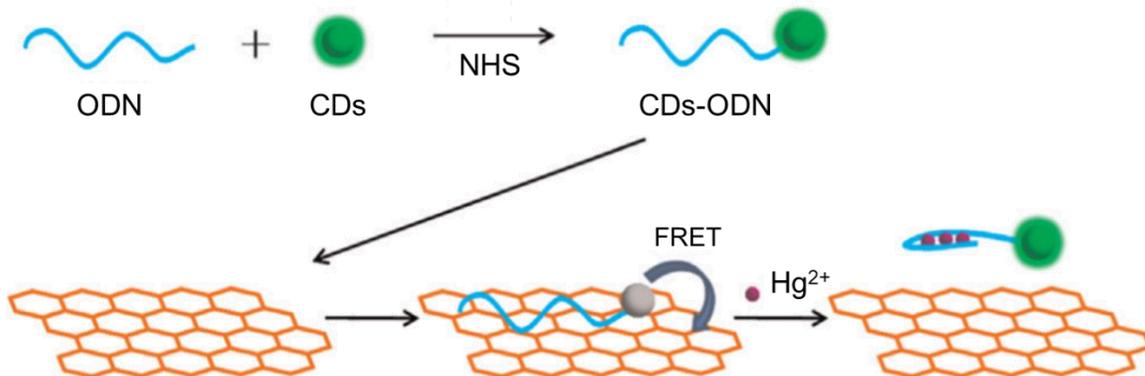


Figura 23. Representación esquemática del mecanismo de detección de Hg^{2+} utilizando CDs y OG.⁸¹

Los sensores basados en CD han recibido amplios intereses para detectar biomoléculas que incluyen vitaminas y aminoácidos. En el año 2015, se publicó el diseño un sensor novedoso basado en CDs para detectar cisteína con excelente selectividad y sensibilidad.⁸² Además, en el 2015 se diseñó un nanosensor compuesto de CDs y nanopartículas de oro para detectar cisteína con múltiples señales.⁸³

Los CDs también han encontrado aplicaciones numerosas en el área de biomimagen. Aunque los QDs y otras nanopartículas núcleo-coraza relacionadas se han investigado para aplicaciones de bioimagen *in vitro* e *in vivo*, los problemas graves de salud y las preocupaciones ambientales limitan sus aplicaciones biológicas debido a la existencia de metales pesados.⁹⁶ Con una fotoestabilidad superior y baja citotoxicidad, los CDs, se han estudiado ampliamente en aplicaciones de imágenes ópticas como alternativa a los QDs. Tanto las evaluaciones *in vitro* como las *in vivo* indican que los CDs son candidatos excelentes en bioaplicaciones debido a sus propiedades ópticas.⁹⁶

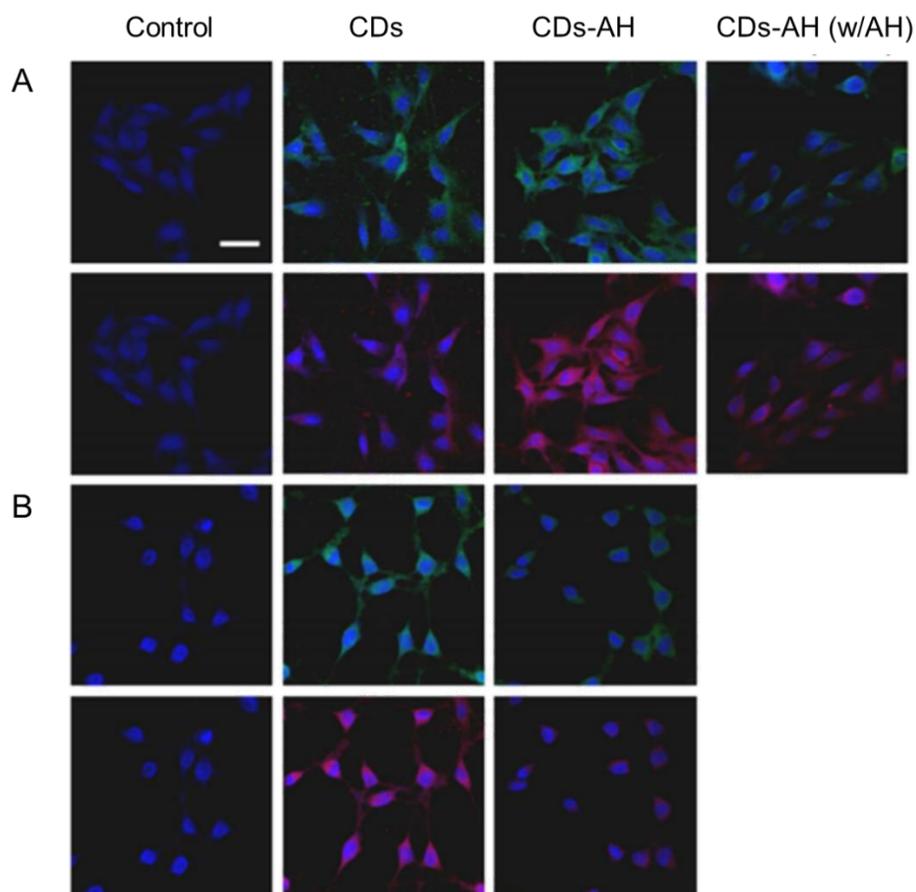


Figura 24. Imágenes microscópicas de barrido láser confocal de A) células B16F1 y B) HEK293 después de la incubación a 37 ° C durante 24 h con CDs y conjugados CDs-AH en ausencia y presencia de un exceso 100 veces molar de AH. La barra de escala indica 30 μm .⁸⁴

Se han realizado muchos estudios mediante fluorescencia de CDs en bioimagen de varias líneas celulares, incluidas células Caco-2,⁵⁶ células de carcinoma de ascitis de Ehrlich,⁵⁷ HEK293,⁸⁴ línea celular de riñón de cerdo,⁸⁵ B16F1,⁸⁴ células progenitoras de P19 murinas,⁸⁶ células HeLa,⁸⁷ A549,⁸⁸ células glioma C6⁹⁴ etc. Hahn y colaboradores, sintetizaron CDs recubiertos con polietilenglicol (PEG) diamina para marcar las células B16F1 y HEK293. Las imágenes microscópicas de barrido láser

confocal de células B16F1 y HEK293 después de la incubación con CDs se representan en la Figura 24.⁸⁴

Recientemente Yang y colaboradores, obtuvieron CDs que emiten fluorescencia en todo el espectro visible mediante un método de química verde.⁸⁹ Estos CDs presentaron buena fotoestabilidad y una citotoxicidad notablemente baja lo que permitió su aplicación exitosa en la obtención de imágenes de la adhesión de eritrocitos (RBCs) a células endoteliales demostrando la gran aplicabilidad de los CDs como reactivos de bioimagen (Figura 25). La investigación no solo ofrece un método fácil, verde y de un solo paso para la preparación de CDs, sino que también presenta un nuevo modo de investigación experimentalmente conveniente para estudiar las funciones celulares.

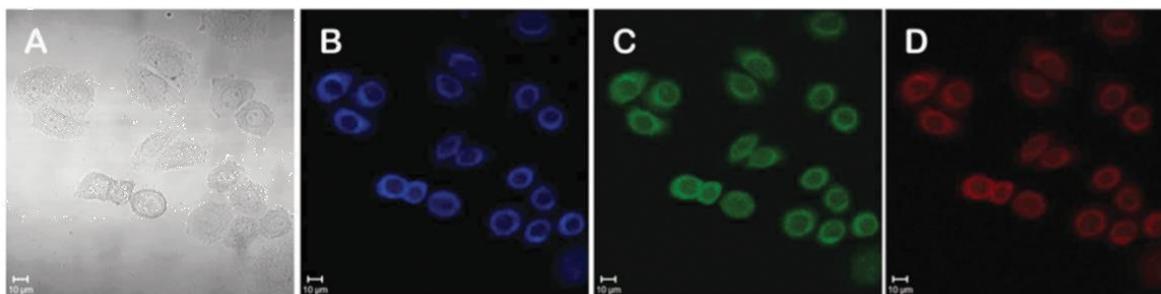


Figura 25. Imagen de campo claro (A) e imágenes de fluorescencia de los CDs en células endoteliales bajo excitación con láser de 380 (B), 455 (C) y 555 nm (D), respectivamente, barra de escala = 10 μm .⁸⁹

3.3. Hipótesis

El uso de puntos cuánticos de carbono con diferentes modificaciones superficiales permitirá su uso en ensamblajes supramoleculares para el desarrollo de sensores de especies biológicas y como acarreadores de biocompatibilidad alta para la terapia y el diagnóstico.

IV. EXPERIMENTAL

4.1. Generalidades

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Química Supramolecular y Nanosensores Ópticos del Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana. La caracterización por TEM y EDS de las nanopartículas fue desarrollada en el Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV) en la ciudad de Chihuahua, Chih.

4.1.1. Materiales, reactivos y solventes

Los materiales, reactivos y solventes utilizados fueron obtenidos de las compañías Sigma Aldrich y VWR con grado de pureza alta.

4.1.2. Instrumentos

- Espectrofluorímetro Cary Eclipse de Agilent Technologies
- Espectrómetro UV-Visible UV-2700 de Shimadzu
- Microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM2200FS con modo STEM
- Malvern Zetasizer Nano ZS 3600
- Espectrómetro de infrarrojo PerkinElmer FT-IR/FT-NIR
- Microondas Milestone START D

4.2. Etapas experimentales

Las etapas experimentales se realizaron como se muestra en la Figura 26. La primera etapa contempla la obtención de CDs y el recubrimiento de los mismos con diferentes polímeros, así como su caracterización. Los cálculos teóricos mediante DFT conforman la segunda etapa. La tercera etapa consiste en la formación de ensamblajes

CDs-AF, ensambles FRET y los estudios analíticos. Finalmente, como cuarta etapa, los estudios de citocompatibilidad y microscopia confocal.

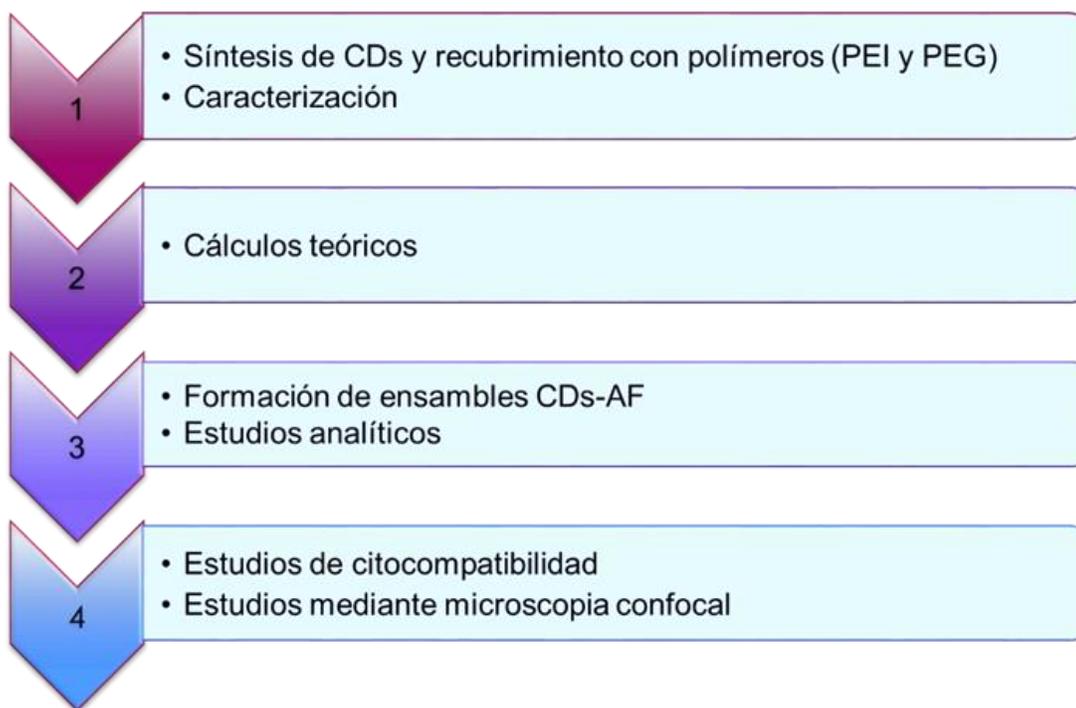


Figura 26. Etapas experimentales.

4.3. Síntesis de puntos de carbono (CDs) y recubrimiento con polímeros

La síntesis de CDs se realizó utilizando dos metodologías de síntesis diferentes, aunque utilizando los mismos precursores. La primera síntesis basó en una metodología reportada en la literatura⁴⁸ (con ciertas modificaciones), en la cual se obtienen CDs mediante tratamiento hidrotérmico utilizando ácido cítrico y etilendiamina. Para la segunda metodología se utilizan los mismos precursores, pero se realiza la síntesis asistida por microondas.

4.3.1. Síntesis de CDs mediante tratamiento hidrotérmico

Primeramente, se pesaron 1.0507 g de ácido cítrico, se mezclaron con 335 μ L de etilendiamina en 10 mL de agua desionizada y se sometió la mezcla a sonicación durante 15 minutos. Luego la solución fue transferida a un vial de teflón la cual se introduce en un reactor de acero inoxidable y se calienta en horno a 200 °C durante 5 h (Figura 27). Después de ese tiempo el reactor es enfriado a temperatura ambiente. El producto obtenido se purifica mediante diálisis en agua desionizada durante 10 h. Finalmente, la solución purificada se somete a un proceso de liofilización para eliminar el solvente. Los CDs obtenidos se denominaron CDs ACEH.



Figura 27. Esquema de síntesis de CDs mediante tratamiento hidrotérmico.

4.3.2. Síntesis de CDs asistida por microondas

Para la síntesis asistida por microondas se utilizaron ácido cítrico y etilendiamina en las mismas proporciones que en la metodología anteriormente descrita. La síntesis se llevó a cabo en un horno de microondas a una temperatura de 180 °C, 1000 W de potencia y 15 minutos de reacción (Figura 28). El producto obtenido se purifica mediante diálisis en agua desionizada durante 10 h para obtener los CDs. Finalmente, la solución purificada se somete a un proceso de liofilización para eliminar el solvente. Para los CDs obtenidos se utilizó la denominación CDs ACEM.

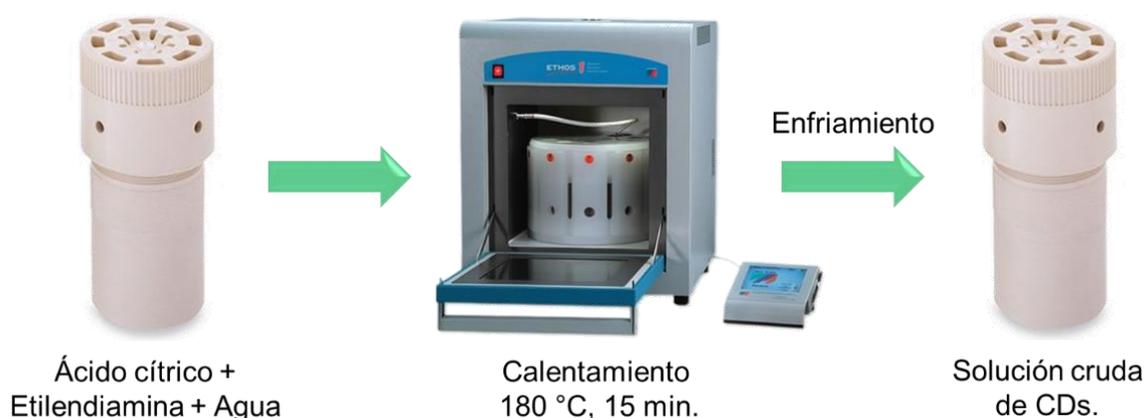


Figura 28. Esquema de síntesis de CDs asistida por microondas.

4.3.3. Recubrimiento con polímeros

Para recubrir la superficie de los CDs con polietilenimina (PEI) y polietilenglicol (PEG) se siguió una metodología similar a la reportada por Zboril y colaboradores.⁹⁰ Se mezclaron 100 mg de polímero con 20 ml de CDs (concentración de 1 mg/ml) y la mezcla se calentó a reflujo en agua en condiciones atmosféricas durante dos horas. La solución resultante se dializó en agua desionizada (3.5 kDa cut-off) para eliminar el polímero no unido y luego se pasó a través de un filtro Millipore de 200 nm para eliminar posibles aglomerados y contaminación por microorganismos. Los CDs recubiertos con los polímeros se denominaron CDs ACEM@PEI y CDs ACEM@PEG.

4.4. Síntesis de quantum dots (QDs)

La síntesis de QDs de CdTe se llevó a cabo directamente en agua a partir de una modificación a la metodología reportada en 2014 por Oluwatobi y colaboradores.¹⁰²

La ruta sintética es muy simple ya que consiste en un solo paso y no es necesaria la presencia de una atmósfera inerte. El procedimiento consistió primeramente en disolver 0.4 mmol de CdCl₂ y 0.4 mmol del ligando tiolado (LT) correspondiente, se utilizaron: 3-ácido mercatopropiónico (AMP) y cisteamina (CA), en

100 mL de H₂O dentro de un matraz de 3 bocas, una vez disuelto se ajustó el pH entre 5 y 6 utilizando una solución de NaOH (1 M). Después de una agitación vigorosa por 5 min, se añadieron 100 mL de una solución de 0.08 mmol de K₂TeO₃ y 4.2 mmol de NaBH₄. La solución se agitó por otros 5 min, para posteriormente someterla a reflujo a 100 °C. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de reflujo. Las muestras se enfrían rápidamente en un baño de hielo y agua para detener el crecimiento de las nanopartículas. Los QDs fueron purificados mediante precipitación con etanol y centrifugación a 3300 rpm y re-dispersados en agua. Los QDs obtenidos se denominaron como QDs CdTe@AMP y QDs CdTe@CA.

4.5. Caracterización de los materiales

4.5.1. Espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Visible)

Para la caracterización de los CDs por espectroscopia UV-Visible se utilizó un equipo Shimadzu UV-2700. Se utilizaron dispersiones de concentración 0.01 mg/mL en agua.

4.5.2. Espectroscopia de fluorescencia

Los estudios de fluorescencia molecular se realizaron en un espectrofluorímetro Cary Eclipse. Para ello se prepararon dispersiones a concentraciones de 0.01 mg/mL en agua.

4.5.3. Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier FT-IR

Los CDs obtenidos por las diferentes vías de síntesis fueron caracterizados por espectroscopia de infrarrojo. (Espectrómetro de Infrarrojo. Perkin Elmer FT-IR/FT-NIR modelo spectrum 400). Los estudios se realizaron en un barrido de 700 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹ en modo ATR.

4.5.4. Potencial Z

Los estudios de potencial Z se realizaron en un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS 3600. Se preparó una dispersión a una concentración de 0.01 mg/mL para la determinación de la carga superficial de los materiales y para los estudios de pH se prepararon dispersiones con la misma concentración a diferentes valores de pH (3, 4, 5, 6, 7, 7.4 y 8).

4.5.5. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Los estudios de microscopia electrónica de transmisión se realizaron en un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM): Jeol JEM2200FS con modo STEM, con detector Bruker. Se preparó una dispersión de CDs en metanol y se aplicó sobre una rejilla de cobre con película de SiO, se dejó secar.

4.6. Determinación de rendimientos cuánticos¹⁰⁶

La determinación de los rendimientos cuánticos se realizó utilizando la ecuación (1).

$$\Phi_x = \Phi_{es} \left(\frac{Grad_x}{Grad_{es}} \right) \left(\frac{n_x^2}{n_{es}^2} \right) \quad (1)$$

Donde *Grad* es la pendiente de la recta que resulta de graficar la fluorescencia integrada contra absorbancia (*es*: estándar y *x*: muestra problema) y *n* es el índice de refracción del solvente utilizado. Tomando al sulfato de quinina como estándar o patrón de grado espectroscópico con un rendimiento cuántico de 0.54 en H₂SO₄ (0.1 M).

4.7. Evaluación del proceso FRET

La selección de los donadores de energía (CDs) se realizó de acuerdo al solapamiento espectral de sus bandas de emisión con las bandas de absorción del

donador. Para el estudio FRET, utilizando como donador a CDs ACEM@PEI, se utilizaron como especies aceptoras al colorante orgánico fluoresceína (100 μM) y QDs CdTe@AMP (2.64×10^{-5} M). También se evaluó el proceso FRET utilizando como donador CDs ACEM y como aceptor QDs CdTe@CA (8.52×10^{-6} M). El pH de la solución se mantuvo en 7.4 utilizando buffer de fosfatos (PBS), garantizando de esta forma que donador y aceptor presenten carga superficial diferente.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la síntesis de CDs se utilizaron rutas de síntesis distintas que se diferencian solo por el método utilizado, manteniéndose los precursores. Con el fin de exponer las ideas de forma organizada y clara se tratarán los resultados en función de la ruta de síntesis utilizada.

5.1. Síntesis de CDs mediante tratamiento hidrotérmico y su caracterización

Los CDs obtenidos presentaron buena dispersión en agua, lo cual resulta atractivo para su aplicación en la determinación de especies biológicas. En la Figura 29 se muestra una fotografía de una muestra sólida de CDs (izquierda), una solución de CDs frente a luz blanca (centro) y luz UV (derecha) observándose sus propiedades fluorescentes.



Figura 29. Muestra de CDs sintetizados mediante tratamiento hidrotérmico.

5.1.1. Caracterización por FT-IR

En la Figura 30 se muestra el espectro de infrarrojo por transformada de Fourier de los CDs ACEH donde se marcan las principales bandas de absorción. La banda ancha que se observa entre 3500 y 3200 cm^{-1} es atribuida a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H y N-H. En 3070 cm^{-1} se observa la absorción de estiramiento del enlace =C-H y en 2933 cm^{-1} la absorción de estiramiento de -C-H. La

banda correspondiente al estiramiento vibracional del enlace C=O está presente en 1650 cm^{-1} y alrededor de 1544 cm^{-1} puede observarse la vibración de estiramiento del enlace C=C.

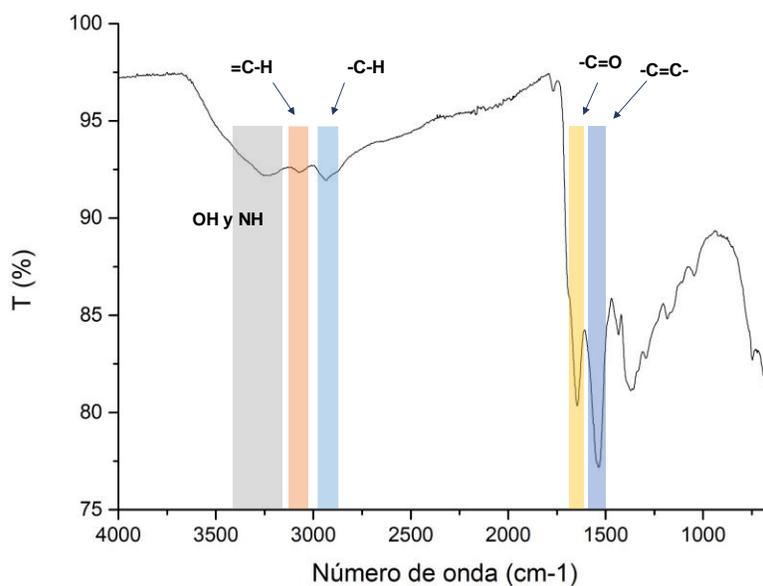


Figura 30. Espectro FT-IR de CDs ACEH.

5.1.2. Caracterización por TEM

En la Figura 31 se aprecian las imágenes de TEM para CDs ACEH. El histograma de distribución de tamaños muestra diámetros entre 2.0 y 10.0 nm, con un diámetro promedio de $6.1 \pm 2.1\text{ nm}$.

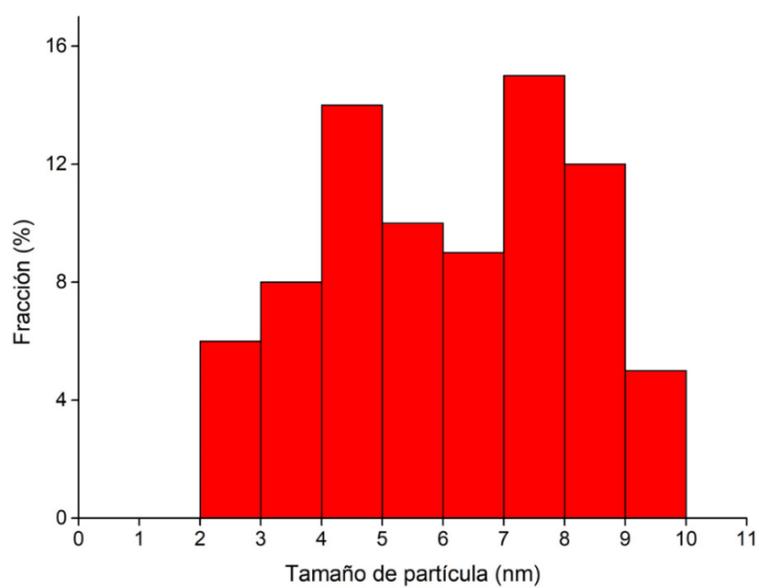
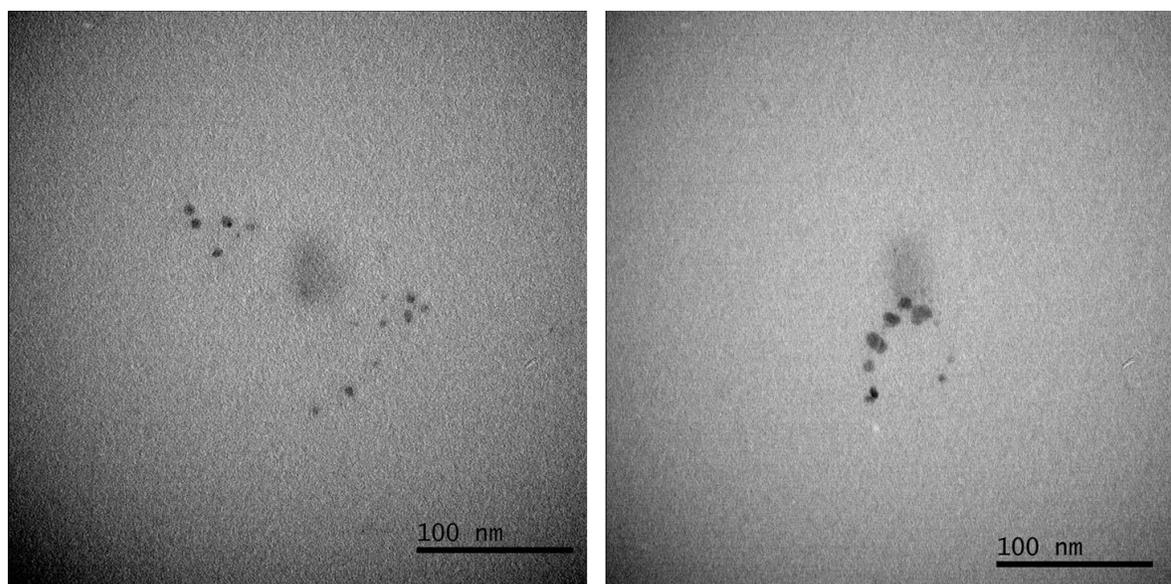


Figura 31. Imágenes TEM e histograma de distribución de tamaños para CDs ACEH.

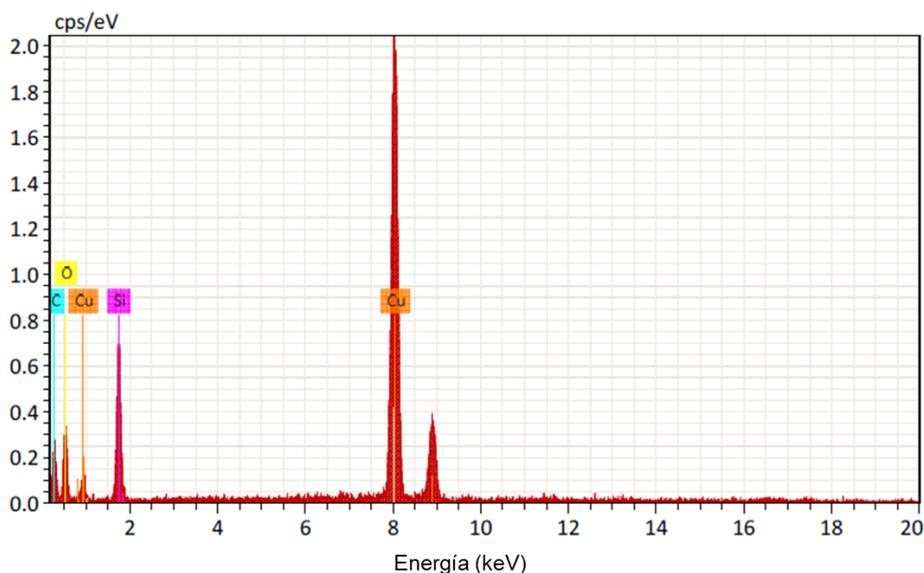


Figura 32. Espectro de EDS de la muestra CDs ACEH.

La Figura 32 muestra el espectro de EDS para la muestra de CDs obtenidos mediante síntesis hidrotérmica (CDs ACEH). Se pueden observar señales características de C y O, elementos presentes en la muestra debido a la naturaleza de los precursores utilizados en la síntesis de CDs. También aparecen señales de Cu y Si, debido a la naturaleza de la rejilla utilizada para la medición, la cual es de Cu y presenta una capa de SiO.

5.1.3. Caracterización óptica

En la Figura 33 se muestra el espectro UV-Vis de CDs ACEH donde puede observarse un máximo de absorción en 261 nm atribuido a las transiciones electrónicas $\pi-\pi^*$, las cuales se ven favorecidas por la presencia de grupos amino electrodonadores. También se observa una banda de absorción de intensidad más débil en 340 nm atribuida a transiciones electrónicas del tipo $n-\pi^*$.

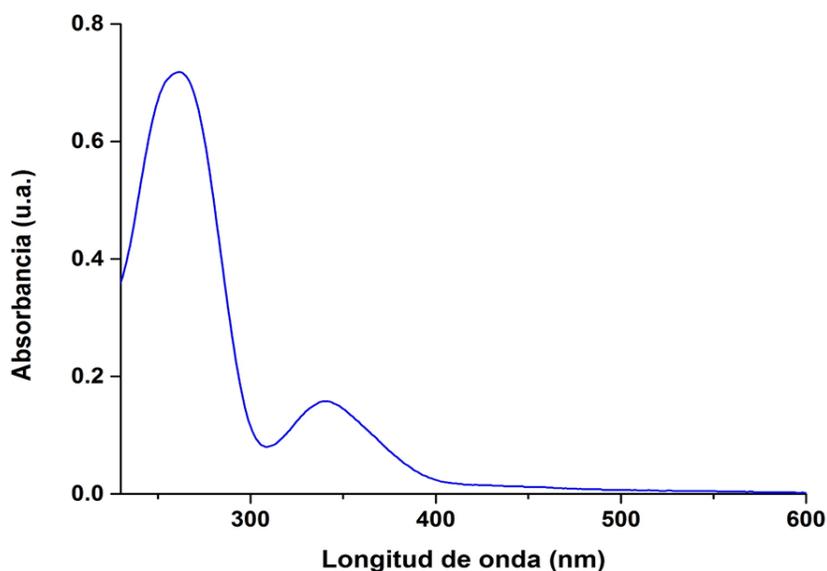


Figura 33. Espectro de absorción UV-Vis de CDs ACEH.

En las Figuras 34 y 35 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia 2D, 3D y el contorno de emisión de fluorescencia de la muestra CDs ACEH, obtenidos al realizar la excitación a diferentes longitudes de onda. Los espectros se obtuvieron en un intervalo de excitación comprendido entre 300 y 460 nm. La emisión de fluorescencia se registró en un intervalo de 370-650 nm con un máximo de emisión cercano a 450 nm al excitar a 360 nm. Como puede observarse, la dependencia entre la longitud de onda de emisión y la longitud de onda de excitación en estos CDs no es tan evidente, lo cual está relacionado con la pasivación de la superficie de la nanopartícula.⁴⁸

La pasivación de la superficie está controlada por los grupos $-NH_2$, los cuales son inestables y a temperaturas elevadas abandonan la superficie de los CDs. La poca dependencia observada entre la longitud de onda de emisión y de excitación nos puede indicar que la mayor parte de los estados de energía superficiales se encuentran pasivados.⁴⁸

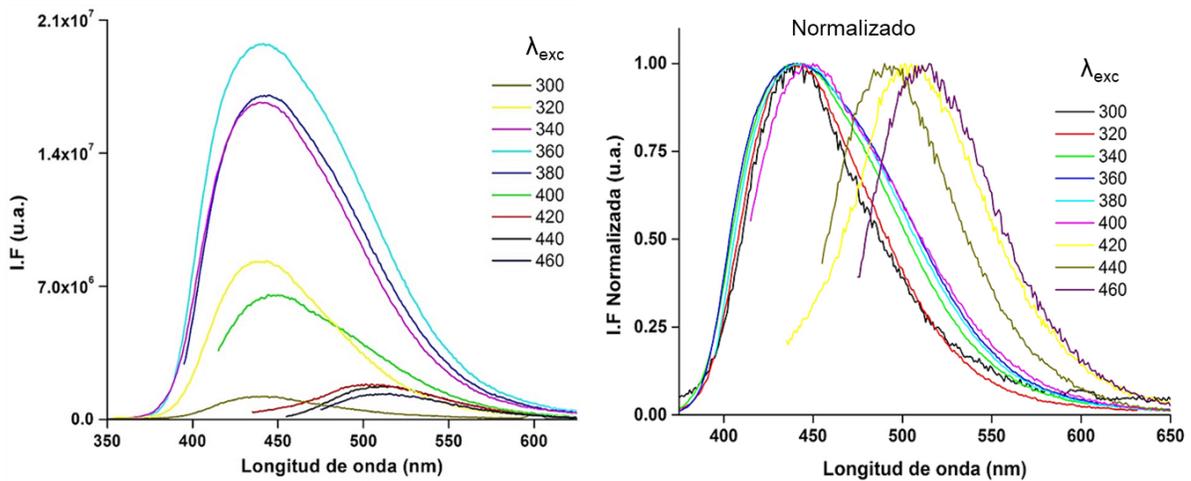


Figura 34. Espectros de emisión de fluorescencia 2D de CDs ACEH a diferentes $\lambda_{excitación}$.

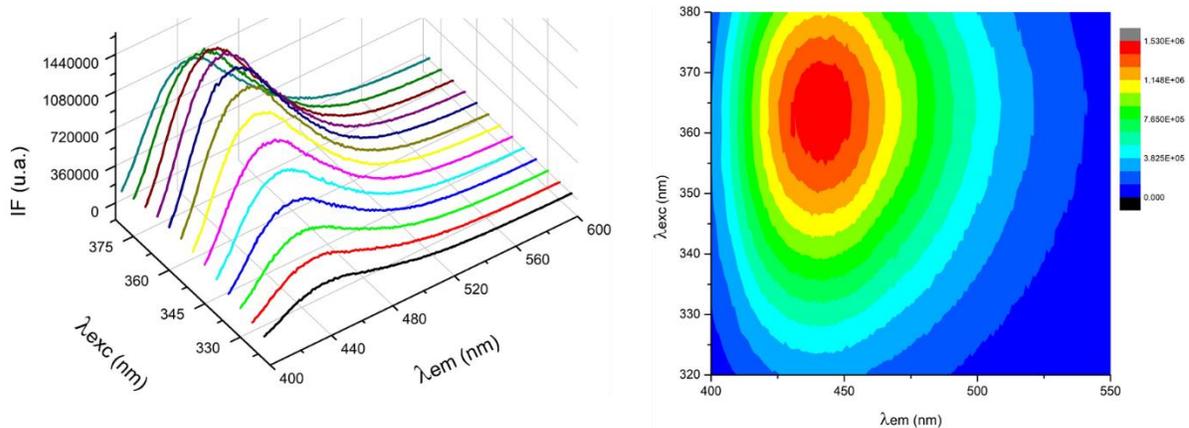


Figura 35. Espectro de emisión de fluorescencia 3D y contorno de emisión de fluorescencia CDsACEH a diferentes $\lambda_{excitación}$.

5.1.4. Determinación de rendimiento cuántico¹⁰⁶

El rendimiento cuántico de fluorescencia es quizás una de las características más importantes de un fluoróforo. Se define como el número de fotones emitidos en relación con el número de fotones absorbidos. Las sustancias con los mayores rendimientos cuánticos, que se aproximan a la unidad, como las rodaminas, muestran las emisiones de fluorescencia más intensas. La forma más fácil de estimar el

rendimiento cuántico de un fluoróforo es en comparación con estándares de rendimiento cuántico conocido. Los rendimientos cuánticos de estos compuestos son en su mayoría independientes de la longitud de onda de excitación, por lo que los estándares pueden usarse donde sea que muestren una absorción útil. La determinación del rendimiento cuántico generalmente se lleva a cabo mediante la comparación de la intensidad de fluorescencia integrada de la muestra con la del estándar. El rendimiento cuántico se calcula usando la ecuación 1 (sección experimental).

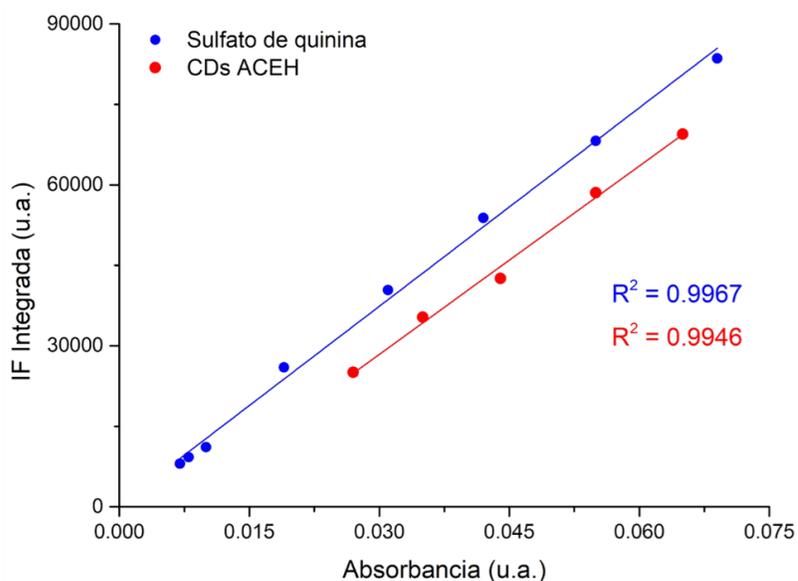


Figura 36. Comparación de la intensidad de fluorescencia integrada de muestra (CDs ACEH) y estándar.

En la Figura 36 se muestra la comparación de la intensidad de fluorescencia integrada de muestra y estándar; el rendimiento cuántico determinado para la muestra de CDs ACEH fue de 51%.

5.1.5. Efecto del pH en la IF y pZ

Con el fin de estudiar la influencia del pH en las propiedades ópticas de los CDs ACEH se midió la emisión de fluorescencia de soluciones preparadas a valores de pH comprendidos entre 3 y 10 (Figura 37). Al aumentar el pH se observa un aumento en la intensidad de fluorescencia hasta pH=5 y luego es notable una disminución de la fluorescencia a valores de pH mayores (medio básico). Este resultado es consecuencia de la estructura química superficial de los CDs que cuenta con la presencia de grupos $-OH$ y $-COO^-$. La emisión de fluorescencia se ve fuertemente afectada por factores externos presentes en el medio que rodea a las nanopartículas; tal es el caso de medios muy básicos y ácidos.¹²

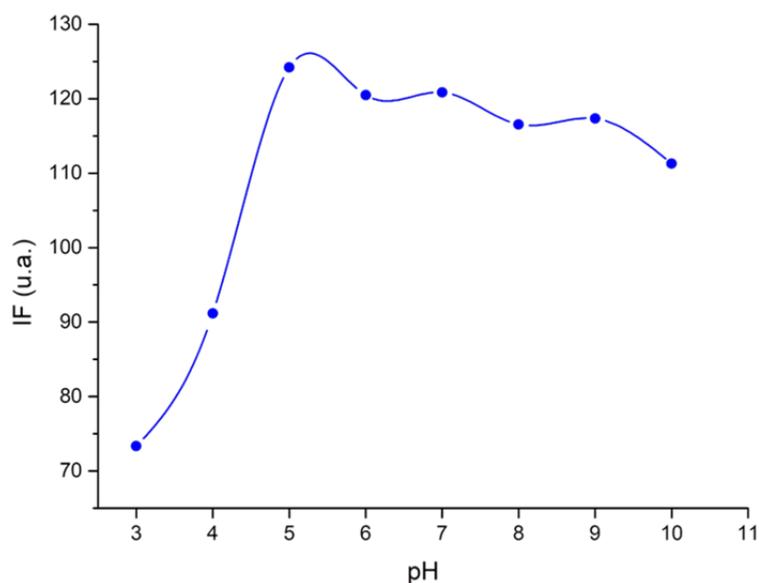


Figura 37. Efecto del pH en la intensidad de fluorescencia de CDs ACEH.

Otro parámetro importante estudiado fue el potencial Z, este se evaluó en un intervalo de pH de 3 a 10 (Figura 38). Los CDs presentaron una carga superficial positiva a un pH de 3 y 4 y una carga negativa de pH 5 - 10. La presencia de grupos $-COOH$ en la superficie de los CDs juega un papel muy importante a la hora de explicar la variación de la carga superficial de estas nanopartículas. Estos grupos ácidos con

valores de pKa bastante bajos, se encontrarán disociados a medida que aumenta el valor del pH. En su forma disociada, estos grupos presentan carga negativa.

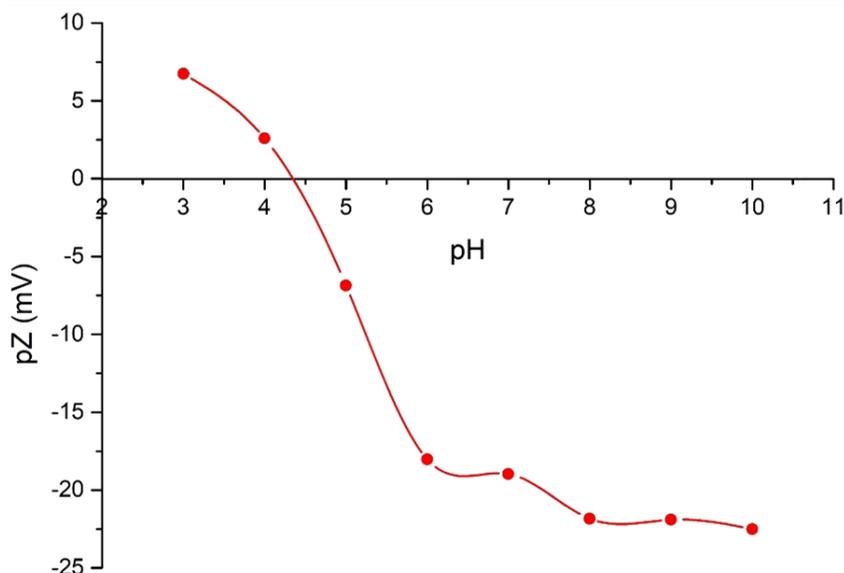


Figura 38. Efecto del pH en el potencial Z (pZ) de CDs ACEH.

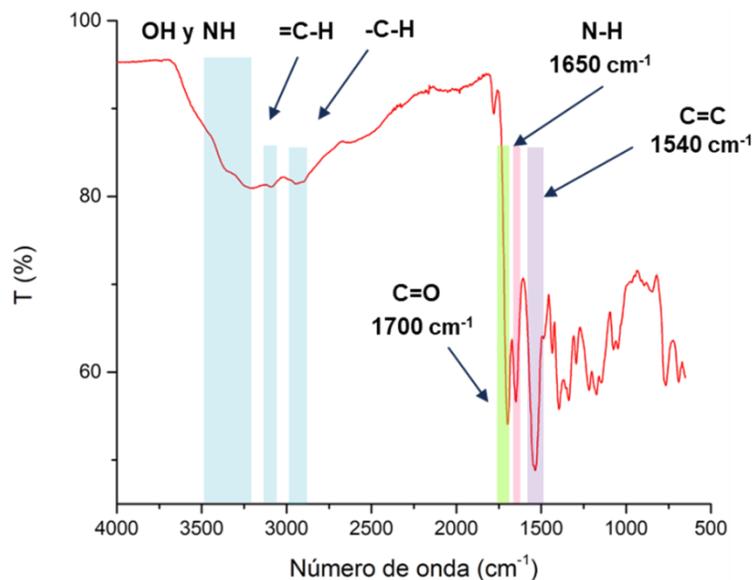
5.2. Síntesis de CDs asistida por microondas y su caracterización

La síntesis se realizó con los mismos precursores que en el método anterior. Luego de la eliminación del solvente se obtuvo un sólido de color amarillo dorado. Los CDs obtenidos también presentaron buena dispersión en agua, lo cual resulta atractivo para posibles aplicaciones biológicas. En la Figura 39 se muestra una fotografía de una muestra sólida de CDs (izquierda), una solución de CDs frente a luz blanca (centro) y luz UV (derecha) observándose sus propiedades fluorescentes.



Figura 39. Muestra de CDs sintetizados mediante microondas.

5.2.1. Caracterización por FT-IR

**Figura 40.** Espectro FT-IR de CDs ACEM.

En la Figura 40 se muestra el espectro de infrarrojo por transformada de Fourier de los CDs ACEM donde pueden observarse las principales bandas de absorción. La banda ancha que se observa entre 3500 y 3200 cm^{-1} es atribuida a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H y N-H. En 3080 cm^{-1} se observa la absorción de estiramiento del enlace =C-H y en 2920 cm^{-1} la absorción de estiramiento de -C-H. La banda correspondiente al estiramiento vibracional del enlace C=O está presente alrededor de 1700 cm^{-1} , en 1650 cm^{-1} aparece una banda correspondiente a la flexión del enlace N-H y alrededor de 1540 cm^{-1} puede observarse la vibración de estiramiento del enlace C=C.

5.2.2. Caracterización por TEM y EDS

Por otro lado, se caracterizaron las muestras por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y análisis elemental por medio de la técnica de EDS. En la Figura 41 se aprecian las imágenes de TEM para CDs ACEM. En estas imágenes se observa buena dispersión del material y que presentan morfología cuasi-esférica. El histograma

de distribución de tamaños (Figura 42) muestra diámetros comprendidos entre 1.0 y 10.0 nm, con un diámetro promedio de 5.32 ± 2.04 nm. Estos resultados fueron obtenidos haciendo 150 mediciones en las diferentes imágenes obtenidas para esta muestra.

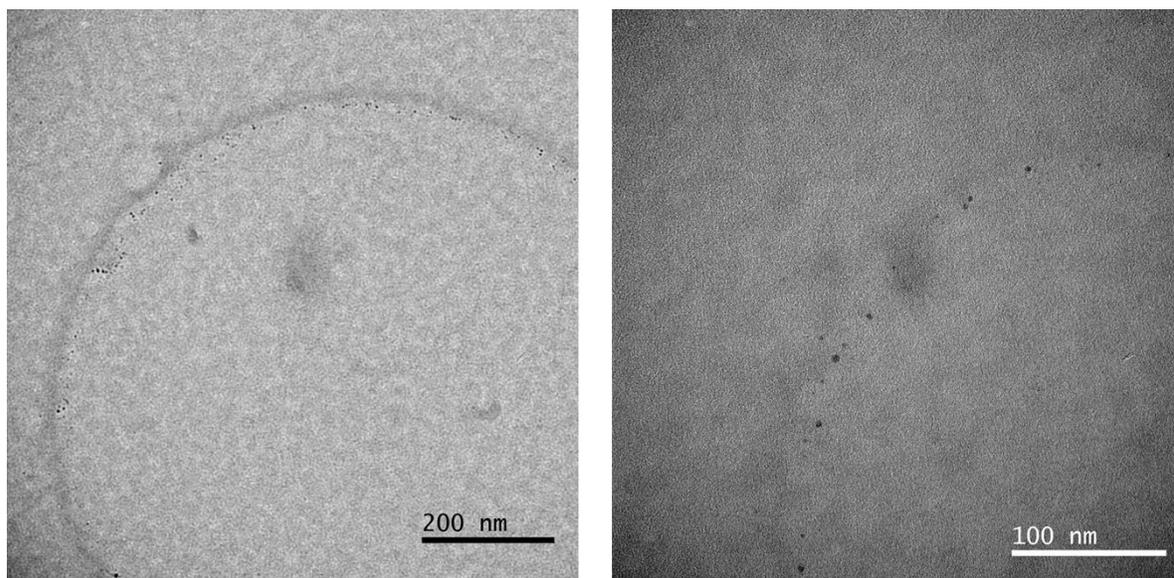


Figura 41. Imágenes TEM de CDs ACEM.

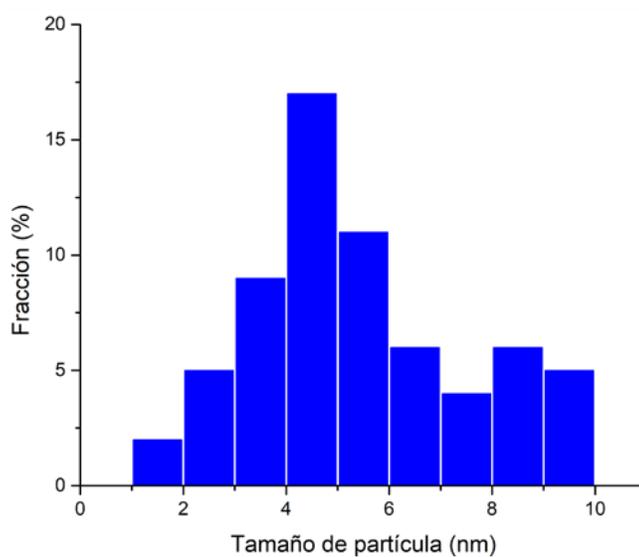


Figura 42. Histograma de distribución de tamaños para CDs ACEM.

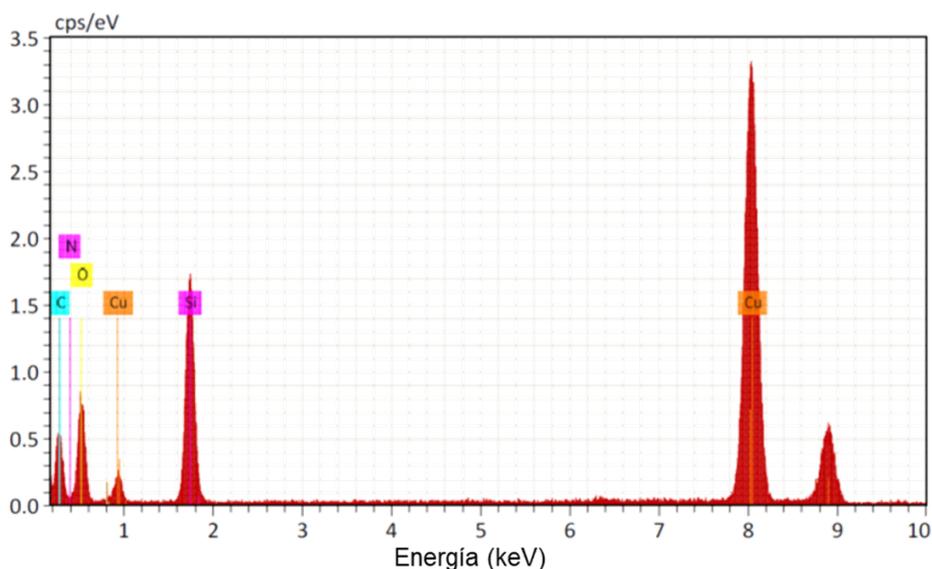


Figura 43. Espectro de EDS para la muestra CDs ACEM.

La Figura 43 muestra el espectro de EDS para la muestra de CDs obtenidos mediante microondas (CDs ACEM). Se pueden observar señales características de C, O y N, elementos presentes en la muestra debido a la naturaleza de los precursores utilizados en la síntesis de CDs. También aparecen señales de Cu y Si, debido a la rejilla utilizada para la medición, la cual es de Cu y presenta una capa de SiO.

5.2.3. Caracterización óptica

En la Figura 44 se muestra el espectro UV-Vis de CDs-AC@EDA. Es de esperar que presente un espectro idéntico al anterior, ya que se están usando los mismos precursores. Puede observarse un máximo de absorción en 240 nm atribuido a las transiciones electrónicas π - π^* de los sistemas aromáticos de estos nanomateriales. También se observa una banda de absorción en 340 nm atribuida a transiciones electrónicas del tipo n - π^* debido a la presencia de grupos carbonilo en la superficie del nanomaterial.

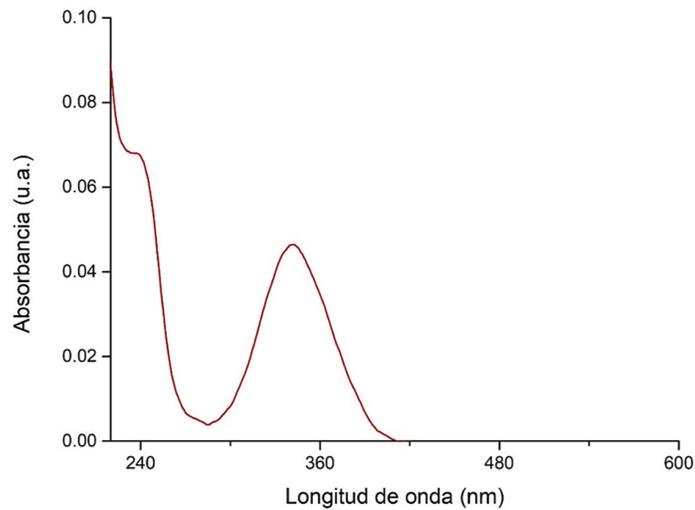


Figura 44. Espectro de absorción UV-Vis de CDs ACEM.

En las Figuras 45 y 46 se muestra el espectro de emmisión fluorescencia 2D, 3D y el contorno de emisión de fluorescencia de CDs ACEM, obtenidos al realizar un barrido de longitudes de onda de excitación. Los espectros se registraron en un intervalo de excitación comprendido entre 280 y 400 nm. La emisión de fluorescencia se registró en un intervalo de 370-650 nm con un máximo de emisión cuando se excita a 360 nm. En estos espectros puede observarse, la dependencia entre la longitud de onda de emisión y la longitud de onda de excitación, aunque no de manera muy marcada.

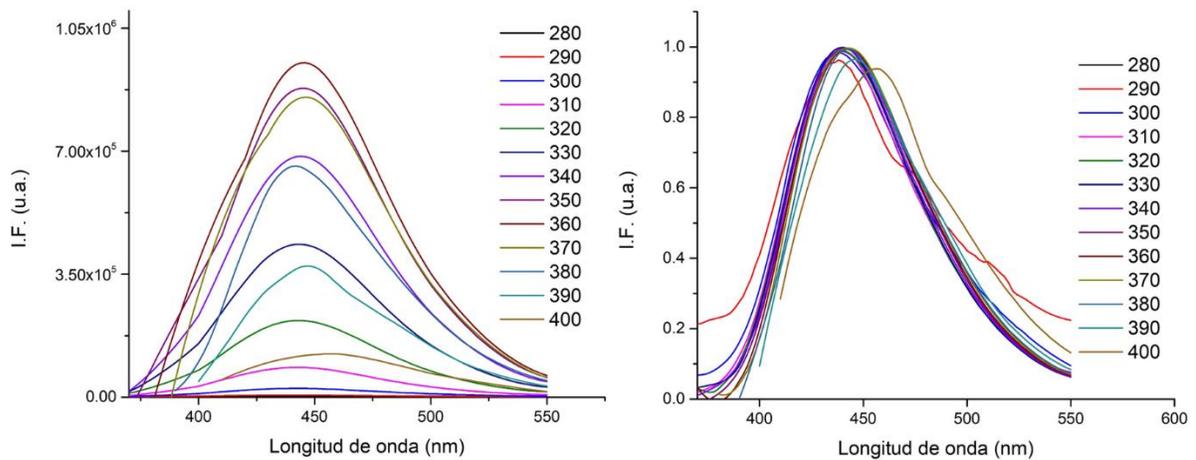


Figura 45. Espectros de emisión de fluorescencia de CDs ACEM a diferentes $\lambda_{excitación}$.

La poca dependencia observada entre la longitud de onda de emisión y de excitación nos puede indicar que la mayor parte de los estados de energía superficiales se encuentran pasivados.

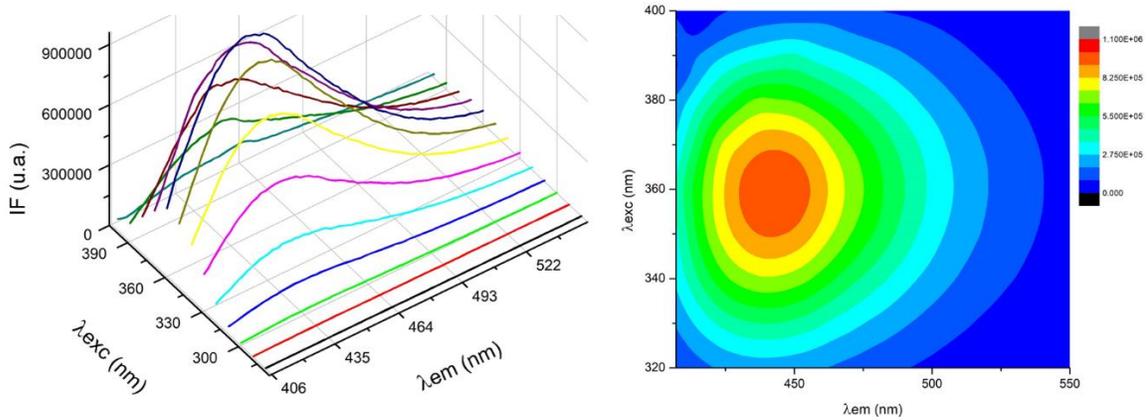


Figura 46. Espectro de emisión de fluorescencia 3D y contorno de emisión de CDs ACEM a diferentes $\lambda_{excitación}$.

5.2.4. Determinación de rendimiento cuántico

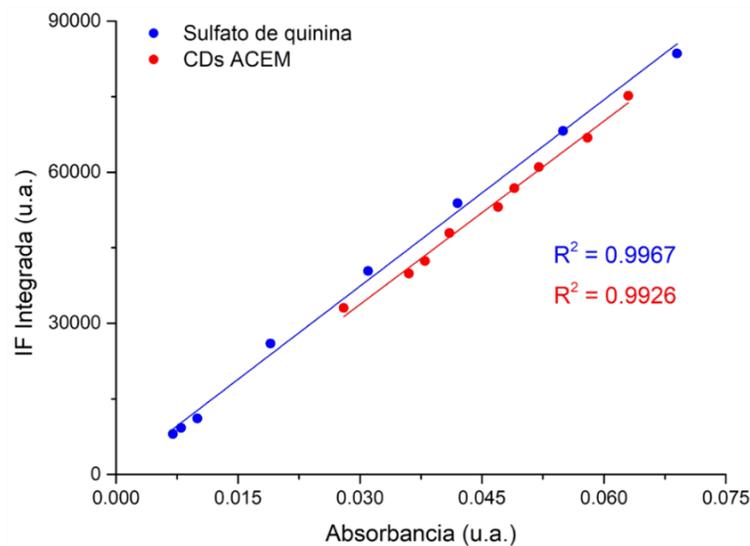


Figura 47. Comparación de la intensidad de fluorescencia integrada de muestra (CDs ACEM) y estándar.

La determinación del rendimiento cuántico fue realizada por la metodología ya descrita. En la Figura 47 se muestra la comparación de la intensidad de fluorescencia integrada de muestra y estándar; el rendimiento cuántico determinado para la muestra de CDs ACEM fue de 53 %.

5.2.5. Efecto del pH en la intensidad de fluorescencia y el potencial Z

También se estudió la influencia del pH en las propiedades ópticas de los CDs ACEM, se midió la emisión de fluorescencia de soluciones preparadas a diferentes valores de pH (Figura 48). Al variar el pH en el intervalo estudiado, se observa una clara disminución de la intensidad de fluorescencia a valores de pH bajos (medio ácido) y altos (medio básico); obteniéndose un máximo de emisión a un pH=7. Este resultado es consecuencia de la estructura química superficial de los CDs que cuenta con la presencia de grupos $-OH$ y $-COO^-$. La emisión de fluorescencia se ve fuertemente afectada por factores externos presentes en el medio que rodea a las nanopartículas; tal es el caso de medios muy básicos y ácidos.¹²

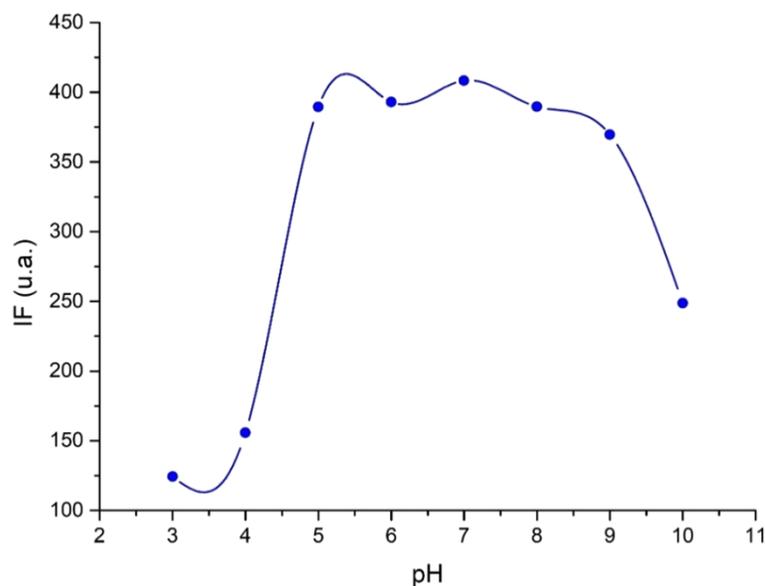


Figura 48. Efecto del pH en la intensidad de fluorescencia de CDs ACEM.

Otro parámetro importante estudiado fue el potencial Z, la carga superficial de los CDs ACEM se evaluó en un intervalo de pH de 3 a 10 (Figura 49). Los CDs presentaron una carga superficial positiva a pH 3 y 4 y una carga superficial negativa en el resto de intervalo de pH estudiado. La presencia de grupos $-\text{COOH}$ en la superficie de los CDs juega un papel muy importante a la hora de explicar la variación de la carga superficial de estas nanopartículas. Estos grupos ácidos con valores de pKa bastante bajos, se encontrarán disociados a medida que aumenta el valor del pH. En su forma disociada, estos grupos presentan carga negativa.

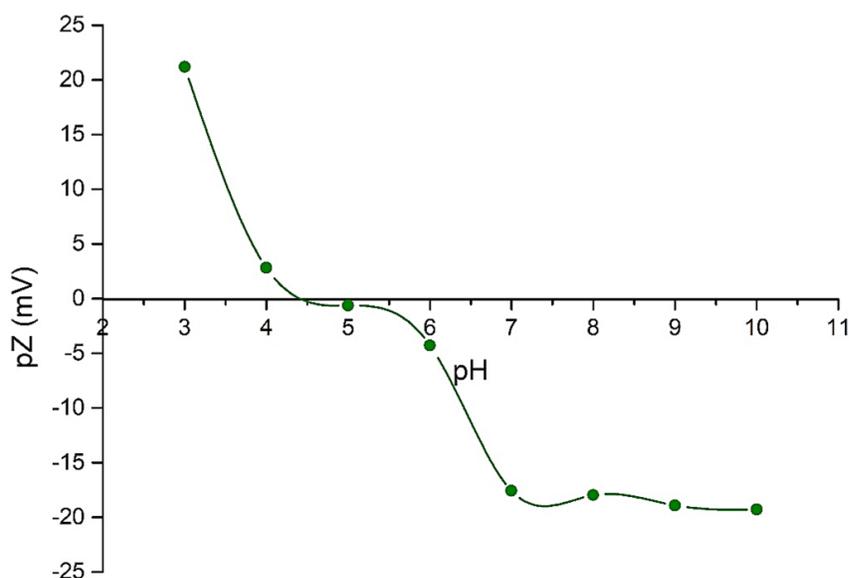


Figura 49. Efecto del pH en el potencial Z de CDs ACEM.

5.2.6. Recubrimiento de la superficie de los CDs con polímeros

Los CDs obtenidos presentaron, según los estudios de potencial Z, una carga superficial negativa en un amplio intervalo de valores de pH. Como se puede constatar por los estudios realizados, los CDs sintetizados por las diferentes técnicas no muestran diferencias significativas en cuanto a propiedades fluorescentes y rendimiento cuántico. Basados en esto, se decidió continuar con los experimentos y estudios posteriores utilizando los CDs ACEM, debido a la relativa facilidad con lo que se pueden sintetizar estos CDs mediante microondas.

Con el fin de modificar la carga superficial de los CDs ACEM, se procedió a recubrirlos con PEI y PEG. El recubrimiento de la superficie de los CDs con los dos polímeros se realizó según la metodología descrita en el capítulo IV. El cambio en la carga superficial de los CDs se estudió mediante potencial Z, antes y después del recubrimiento. Las medidas de potencial Z se realizaron preparando las soluciones a un pH de 7.4, emulando el pH fisiológico.

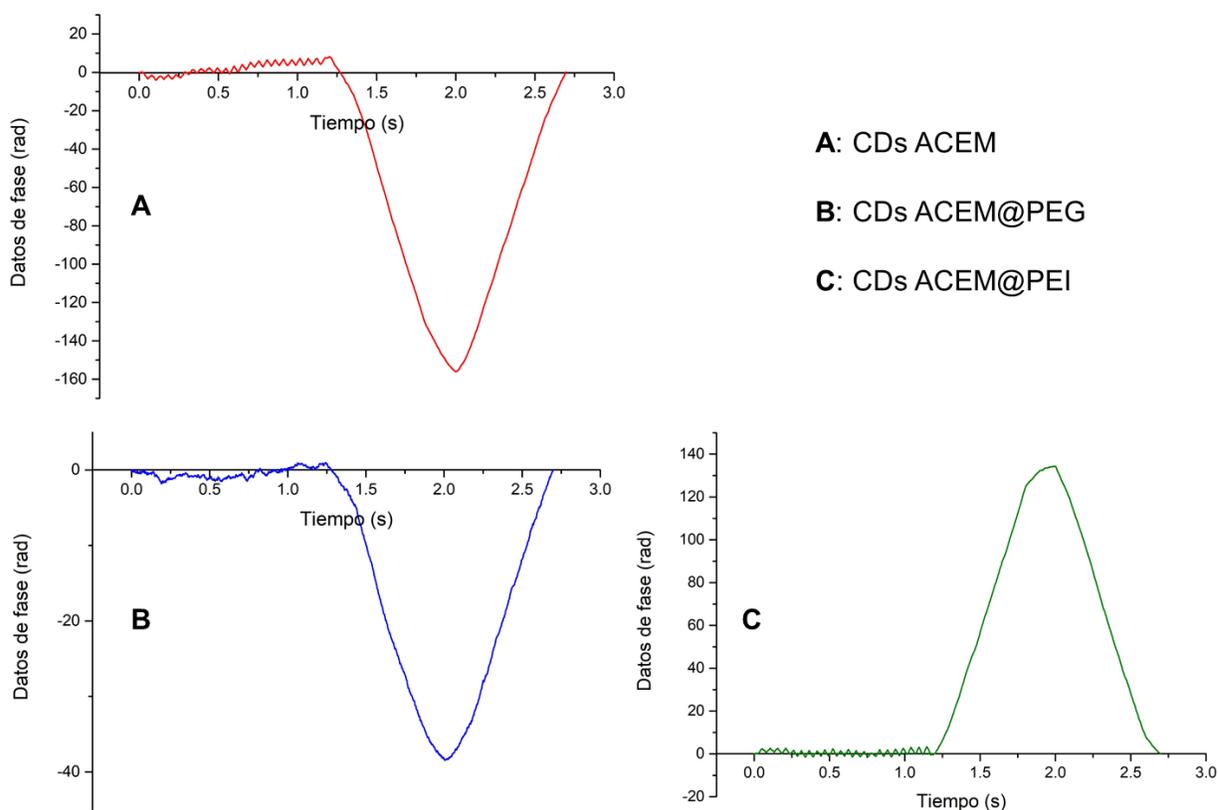


Figura 50. Diagramas de fase obtenidos en la determinación del pZ a pH 7.4.

En la Tabla 1 se puede observar que la solución de CDs ACEM preparada a un pH 7.4, mostró un pZ de -17.97 mV. El nanomaterial al ser recubierto con PEG presentó una carga superficial casi neutra de -0.55 mV. Por otra parte, al ser recubierto con PEI se observa un cambio drástico en la carga superficial del nanomaterial, pasando de -17.97 mV a 18.5 mV. La Figura 50 muestra los diagramas de fase para cada determinación de potencial Z, corroborando los resultados obtenidos.

Tabla 1. Valores de pZ de CDs ACEM antes y después de recubrir.

Muestra	CDs ACEM	CDs ACEM@PEG	CDs ACEM@PEI
Potencial Z (mV)	-17.97	-0.55	18.5

Teniendo en cuenta el potencial Z obtenido a un pH de 7.4 para la muestra de CDs ACEM@PEI, se decidió realizar un estudio del potencial Z en un intervalo de pH comprendido entre 4.0 y 11.2. Como puede observarse en la Figura 51 a medida que aumenta el valor del pH el potencial Z comienza a disminuir de forma progresiva. Este comportamiento está estrechamente relacionado con los grupos amino del polímero PEI y que recubren la superficie de los CDs.

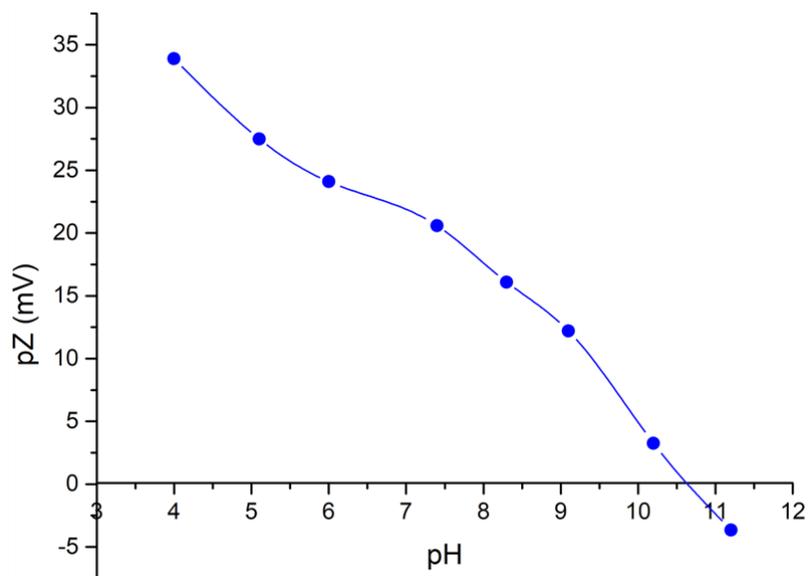


Figura 51. Efecto del pH en el potencial Z de CDs ACEM@PEI.

5.2.6.1. Determinación del rendimiento cuántico

La determinación del rendimiento cuántico fue realizada por la metodología ya descrita. En la Figura 52 se muestra la comparación de la intensidad de fluorescencia integrada de muestra y estándar; el rendimiento cuántico determinado para la muestra de CDs ACEM@PEI fue de 35 %. El recubrimiento de los CDs con PEI conllevó a una disminución en el rendimiento cuántico.

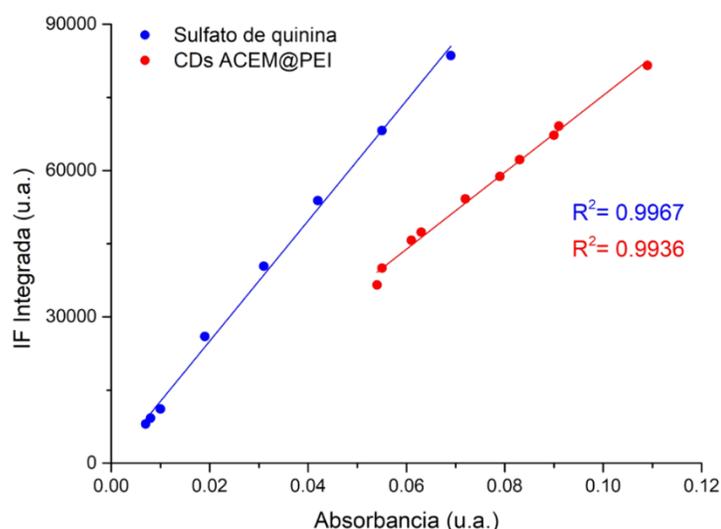


Figura 52. Comparación de la intensidad de fluorescencia integrada de muestra (CDs ACEM@PEI) y estándar.

5.3. Síntesis de puntos cuánticos (quantum dots, QDs)

Los QDs han sido ampliamente estudiados y los métodos de síntesis más reportados involucran generalmente solventes orgánicos, lo cual implica una segunda etapa en donde se modifique la superficie del QD para solubilizarlo en agua, ocasionando en la mayoría de las veces una reducción drástica en las propiedades ópticas del semiconductor.¹⁰³ Por dicha razón, se realizó en esta investigación la síntesis directa en agua de QDs de CdTe utilizando una metodología en un solo paso y en atmósfera ambiente.¹⁰²

El mecanismo de la formación de los QDs puede describirse de la siguiente manera; durante la primera etapa el ligando tiolado (AMP o CA) se coordina con los iones Cd^{2+} para formar el complejo Cd-LT (una solución turbia) y prevenir la deposición de compuestos de Cd sin disolver. La adición de NaBH_4 en la solución provoca la reducción de TeO_3^{2-} en Te^{2-} . El precursor Te (Te^{2-}) reacciona rápidamente con el complejo Cd-LT para formar QDs de CdTe/LT.

5.3.1. Caracterización por UV-Vis y fluorescencia

La caracterización óptica se llevó a cabo obteniendo primeramente los espectros de absorción y fluorescencia de los QDs de CdTe/CA a los distintos tiempos de reflujo (Figura 53). Al incrementarse el tiempo de reflujo, los espectros de absorción y de emisión se desplazaron a mayores longitudes de onda indicando un incremento en el tamaño de las nanopartículas. Esto se atribuye al efecto del confinamiento cuántico.

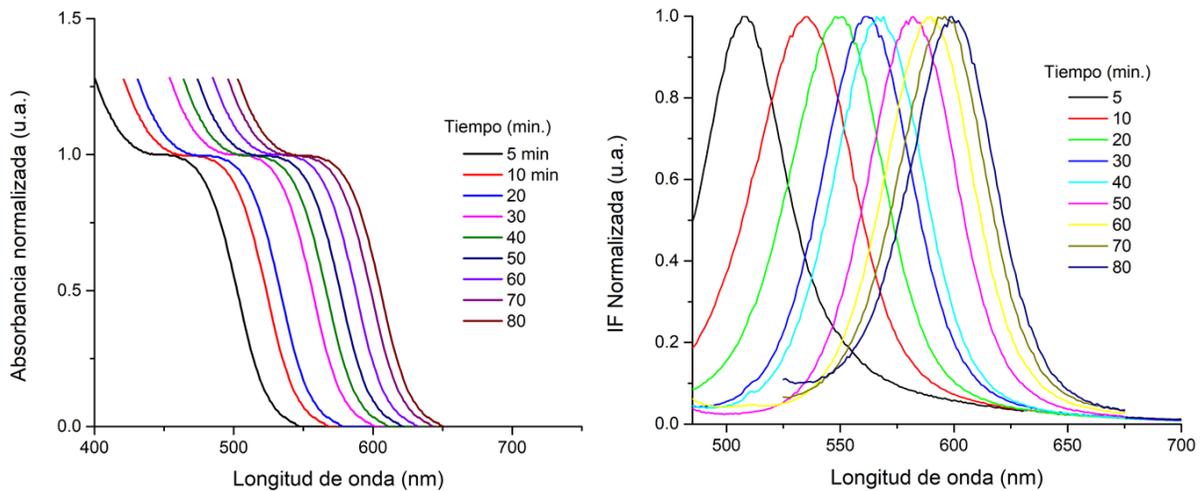


Figura 53. Espectros normalizados de absorción UV-Vis y de fluorescencia de QDs CdTe@CA.

La Figura 54 muestra la fotografía de los QDs CdTe@CA bajo la irradiación UV, y se puede observar que el color de los QDs puede ser fácilmente obtenido desde verde, amarillo, anaranjado, hasta rojo.



Figura 54. Fotografía de QDs CdTe@CA bajo radiación UV.

Los diámetros y las concentraciones de los QDs CdTe@CA se estimaron utilizando los picos de absorción y la ecuación empírica reportada previamente por Peng y colaboradores.¹⁰⁴ Los resultados demostraron que los tamaños de las nanopartículas a los distintos tiempos de reacción fueron de 2.42 nm (5 min.) a 3.57 nm (80 min). En la Tabla 2 se muestran estos resultados.

Tabla 2. Propiedades ópticas de los QDs CdTe@CA.

Tiempo (min.)	5	10	20	30	40	50	60	70	80
$\lambda_{m\acute{a}xAb}$	465	490	500	523	544	554	564	574	581
λ_{em}	507	534	551	561	569	582	590	596	599
D_{AbUV} (nm)	2.42	2.60	2.85	3.01	3.24	3.34	3.52	3.53	3.57

5.4. Estudios de transferencia de energía resonante de Förster (FRET)

El uso de CDs como donadores o aceptores de energía en sistemas de transferencia de energía resonante de Förster ha generado un marcado interés en los últimos años. En contraste con materiales fluorescentes convencionales como colorantes orgánicos y los puntos cuánticos, el pico de emisión de los CDs se puede controlar fácilmente en un intervalo de longitudes de onda amplio, lo que los hace apropiados para detectar diversas biomoléculas. Por otra parte, la estructura superficial de los CDs puede diseñarse fácilmente para mostrar una fuerte interacción

con los aceptores específicos detectados, lo que permite una distancia corta entre los CDs y los aceptores⁵. Estas excelentes propiedades satisfacen los requisitos del sistema FRET y hace de los CDs excelentes donadores potenciales en los sistemas ópticos FRET con alta selectividad y sensibilidad.

En el presente estudio se ha explorado el potencial de los CDs ACEM y CDs ACEM@PEI como donadores fluorescentes en ensayos FRET. Teniendo en cuenta la carga superficial positiva de la muestra CDs ACEM@PEI, se decidió realizar los ensayos FRET utilizando como aceptores fluoresceína y QDs CdTe@AMP. Por otro lado, la muestra de CDs ACEM presenta carga superficial negativa y se estudió el proceso FRET utilizando como aceptores riboflavina (vitamina B2) y QDs CdTe@CA. Los estudios se realizaron a un pH de 7.4 garantizando de esta forma que las especies donadoras y las especiesceptoras presentaran cargas superficiales contrarias. Bajo estas condiciones se forma un ensamble supramolecular a través de interacciones electrostáticas permitiendo que el donador y el aceptor se coloquen a una distancia apropiada que garantice la transferencia de energía, lo que ocurre a una distancia comprendida entre 2 y 10 nm.^{20,21}

5.4.1. Evaluación del proceso FRET utilizando CDs ACEM@PEI

Como se ha señalado anteriormente, para que exista un proceso FRET debe existir una superposición entre la banda de emisión del donador y la banda de absorción del aceptor. Esta condición se cumple para los sistemas basados en CDs ACEM@PEI (donador) con especiesceptoras como fluoresceína y QDs CdTe@AMP como puede observarse en las figuras 55 y 56.

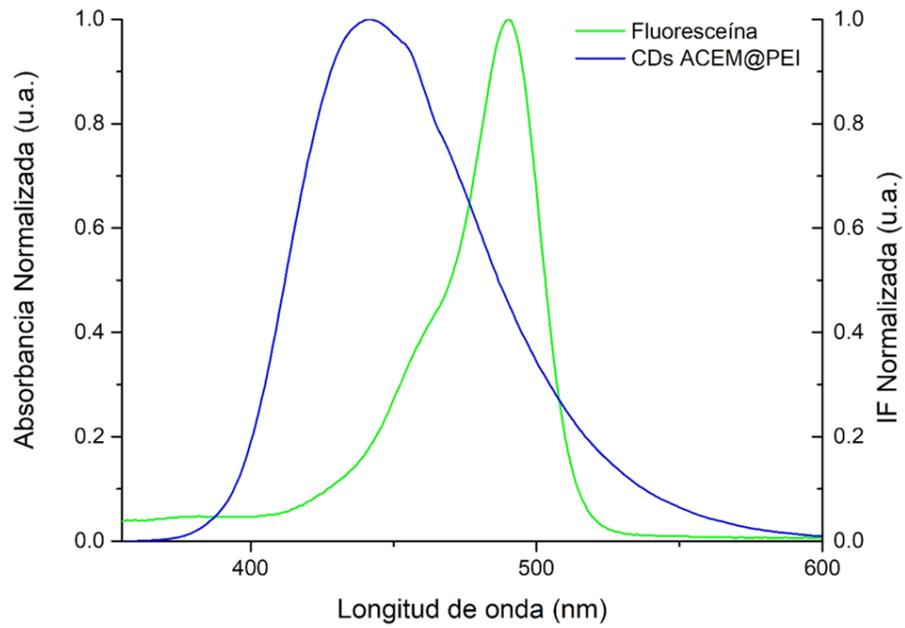


Figura 55. Superposición de espectros (UV-Vis/Fluorescencia). Sistema CDs ACEM@PEI/Fluoresceína.

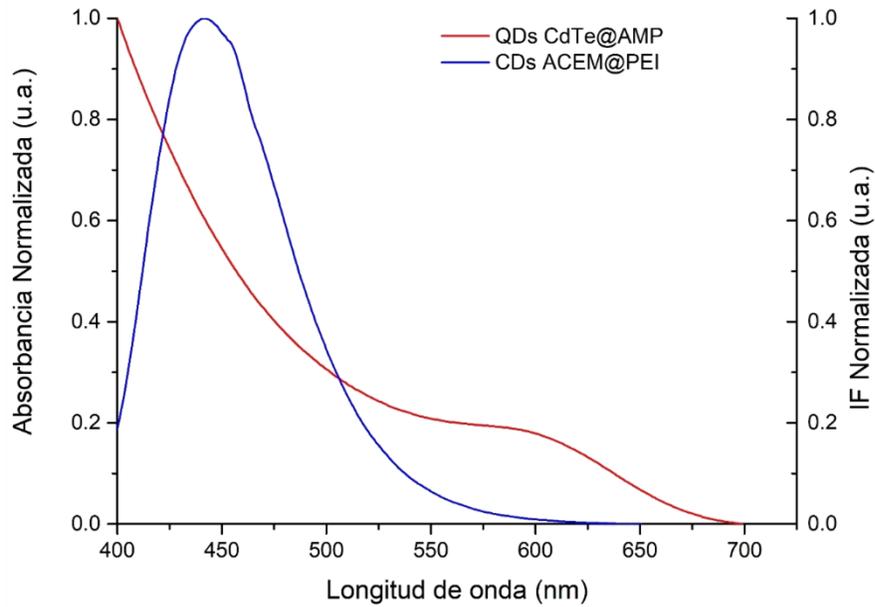


Figura 56. Superposición de espectros (UV-Vis/Fluorescencia). Sistema CDs ACEM@PEI/QDs CdTe@AMP.

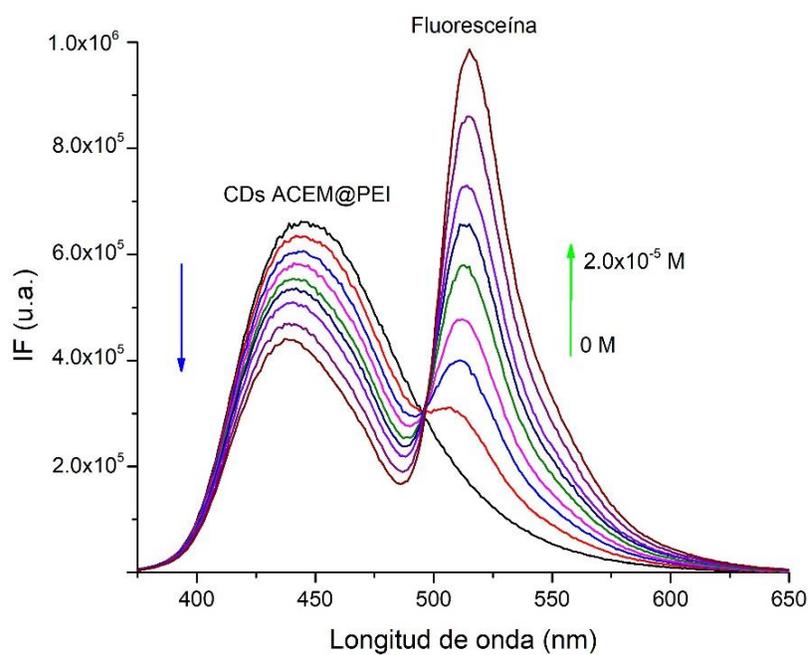


Figura 57. Titulación FRET de CDs ACEM@PEI con fluoresceína.

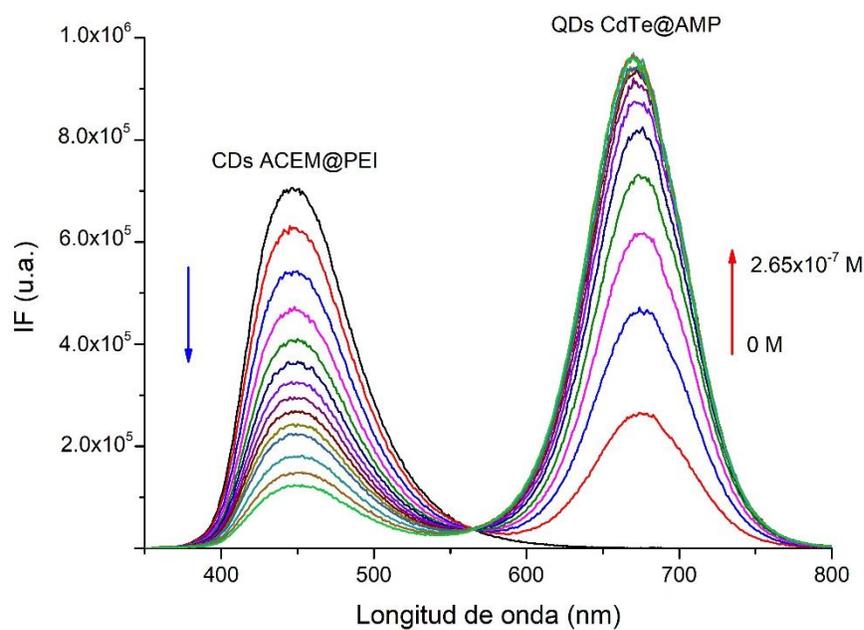


Figura 58. Titulación FRET de CDs ACEM@PEI con QDs CdTe@AMP.

Se realizó la titulación de los CDs ACEM@PEI con fluoresceína y QDs CdTe@AMP. Los intervalos de concentración utilizados fueron de $0-2.00 \times 10^{-5}$ M para el primero y de $0-2.65 \times 10^{-7}$ M para el segundo.

Al realizar la titulación se observó una disminución en la banda de emisión de los CDs ACEM@PEI y un aumento en la banda de emisión de la fluoresceína y QDs CdTe@AMP, indicando la presencia del proceso FRET en ambos sistemas. Las Figuras 57 y 58 muestran las titulaciones sucesivas de los CDs ACEM@PEI con la fluoresceína y QDs CdTe@AMP a una longitud de onda de excitación de 360 nm.

Con el objetivo de analizar el sistema FRET, se obtiene la dependencia de la intensidad de fluorescencia relativa de los CDs ACEM@PEI a la longitud de onda de máxima emisión en función de la concentración de la especie aceptora. En las Figuras 59 y 60 se puede apreciar la disminución de la señal de fluorescencia de los CDs y el incremento de la señal de fluorescencia de la fluoresceína y de los QDs CdTe@AMP a medida que aumenta la concentración de estos últimos.

Un análisis detallado de estas gráficas muestra que el aumento de la intensidad de fluorescencia en la titulación con fluoresceína no presenta signos de saturación lo que puede indicar que la titulación se podría realizar a mayores concentraciones de especie aceptora. Por otro lado, en la titulación con los QDs CdTe@AMP si se observan signos de saturación a medida que aumenta la concentración de QDs, es decir, el incremento en la señal fluorescente del CDs presenta una menor variación.

A diferencia de un par FRET basado en colorantes orgánicos convencionales, los cuales se encuentran confinados a un simple par donador-aceptor y en los cuales la interacción se produce molécula a molécula, los ensamblajes FRET CDs-QDs presentan la ventaja de tener mayor número sitios de interacción puesto que tanto la especie donadora como la aceptora presenta muchos grupos funcionales en su superficie.

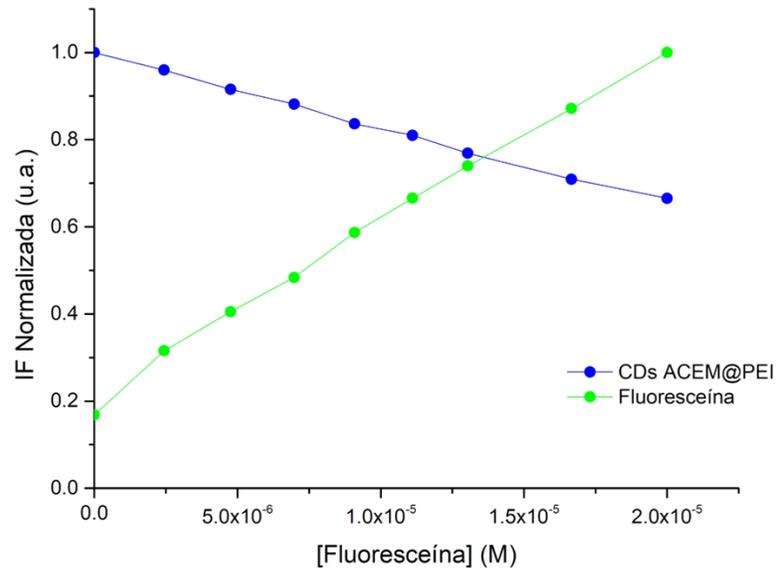


Figura 59. Gráficas de IF Normalizada Vs [Fluoresceína].

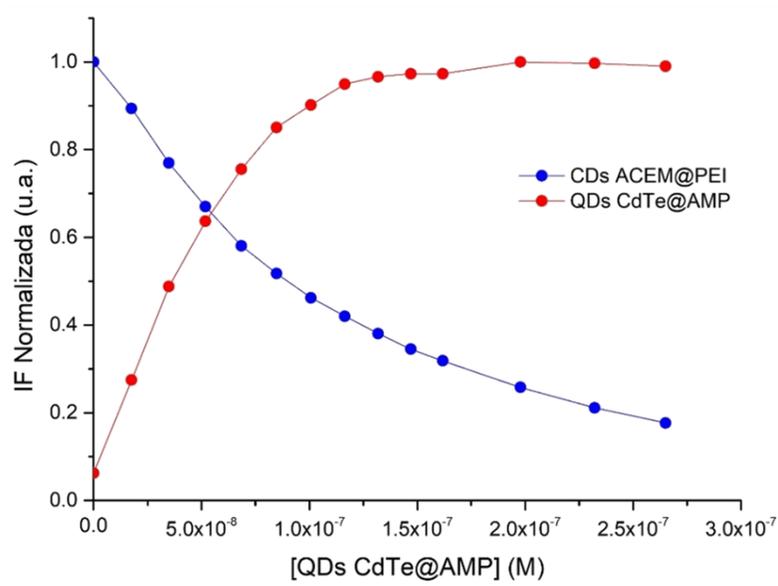


Figura 60. Gráficas de IF Normalizada Vs [QDs CdTe@AMP].

5.4.2. Evaluación del proceso FRET utilizando CDs ACEM

En las figuras 61 y 62 se muestran las gráficas de superposición de la banda de emisión del donador y la banda de absorción del aceptor para los sistemas CDs ACEM/ QDs CdTe@CA y CDs ACEM/VB2.

La titulación FRET de CDs ACEM con QDs CdTe@CA se llevó a cabo aumentando la concentración de este último desde 0 hasta 2.9×10^{-6} M. Por otro lado, para el sistema CDs ACEM/VB2 se incrementó la concentración de VB2 desde 0 hasta 6.26×10^{-5} M. Ambas titulaciones fueron llevadas a cabo utilizando una longitud de onda de excitación de 360 nm. La gráfica de la Figura 63 muestra una disminución en la banda de emisión de los CDs ACEM y un aumento en la banda de emisión de QDs CdTe@CA, indicando la presencia de un proceso FRET.

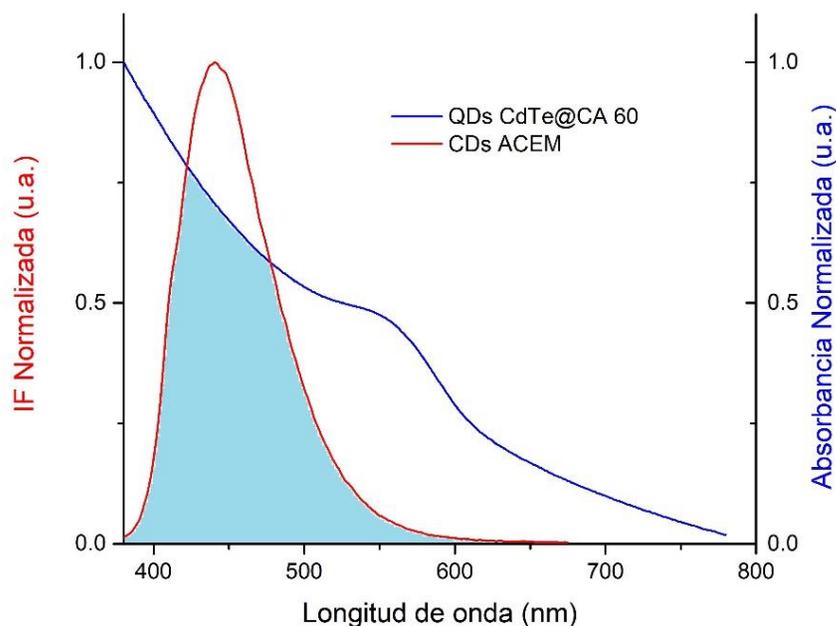


Figura 61. Superposición de espectros (UV-Vis/Fluorescencia). Sistema CDs ACEM/QDs CdTe@CA.

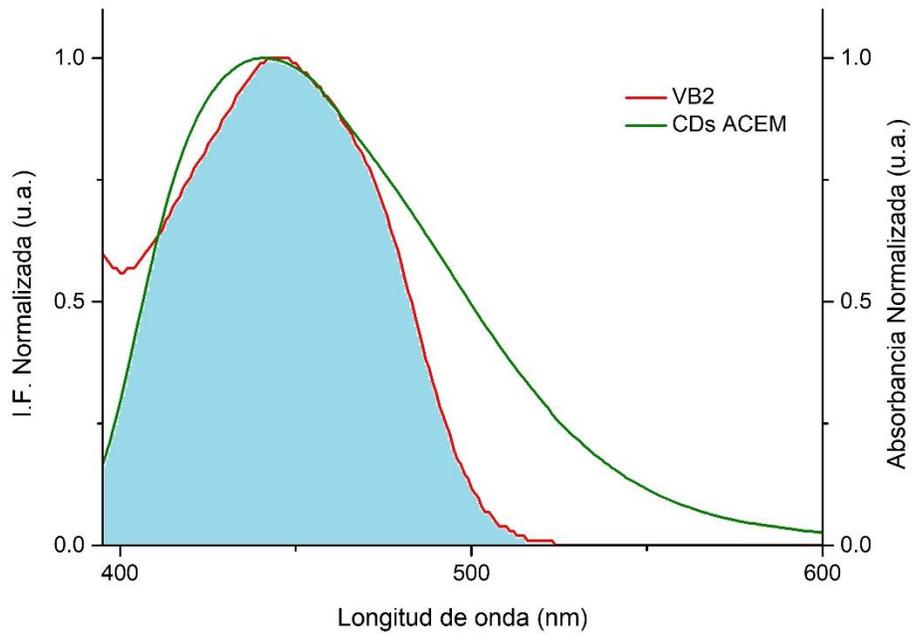


Figura 62. Superposición de espectros (UV-Vis/Fluorescencia). Sistema CDs ACEM/VB2.

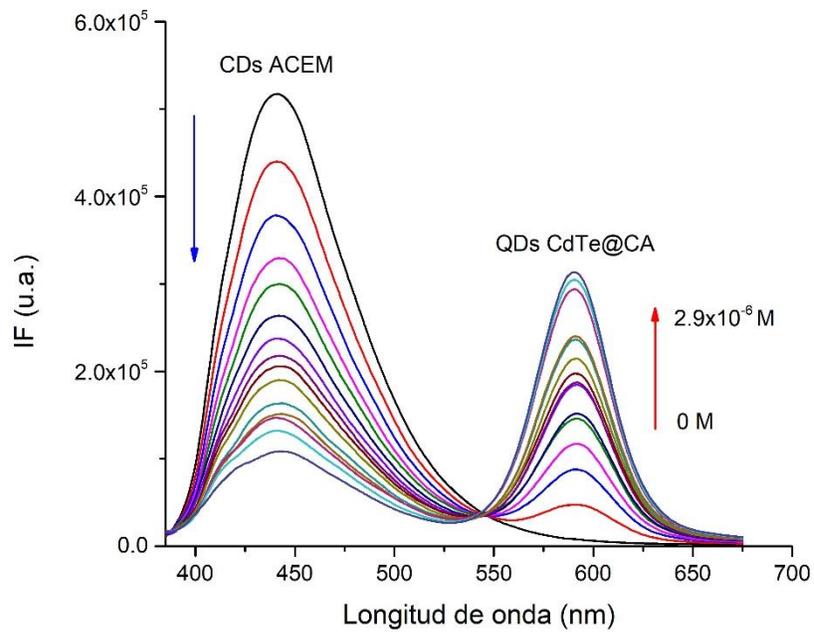


Figura 63. Titulación FRET de CDs ACEM con QDs CdTe@CA.

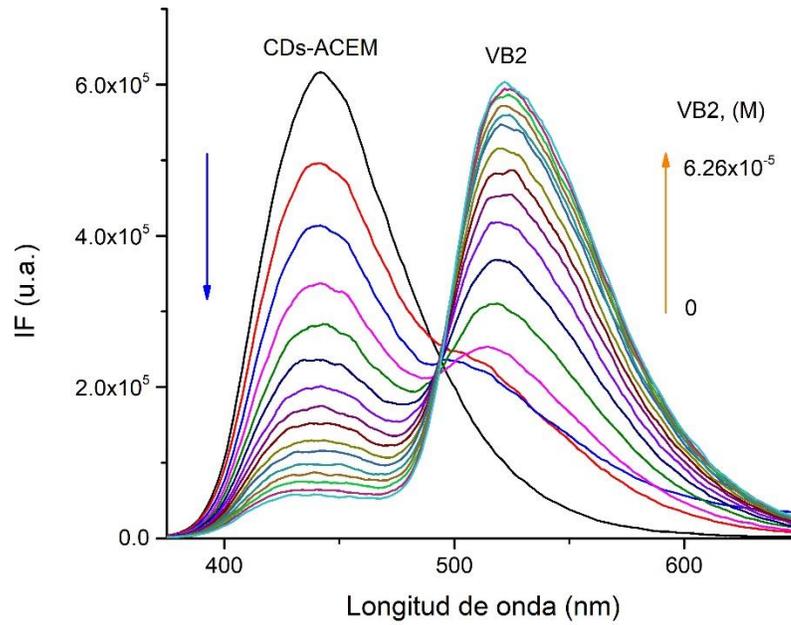


Figura 64. Titulación FRET de CDs ACEM con VB2 (Riboflavina).

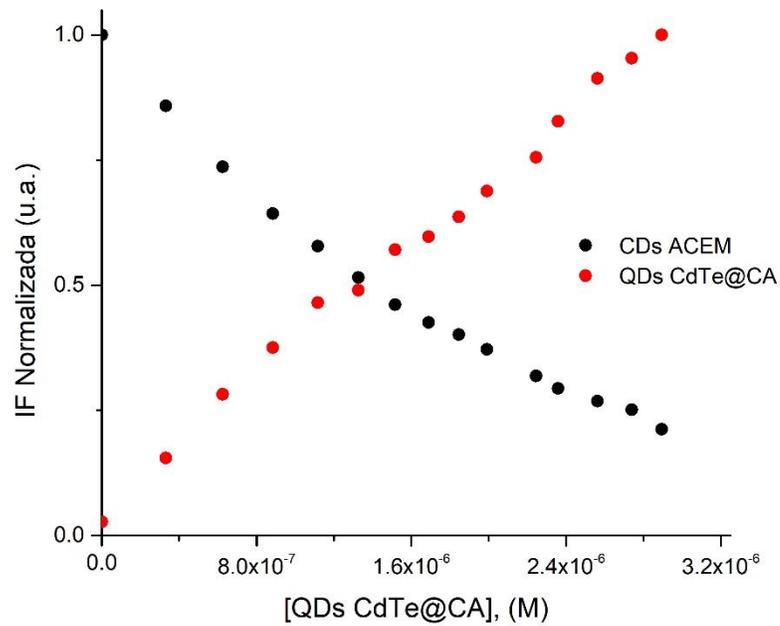


Figura 65. Gráficas de IF Normalizada Vs [QDs CdTe@CA].

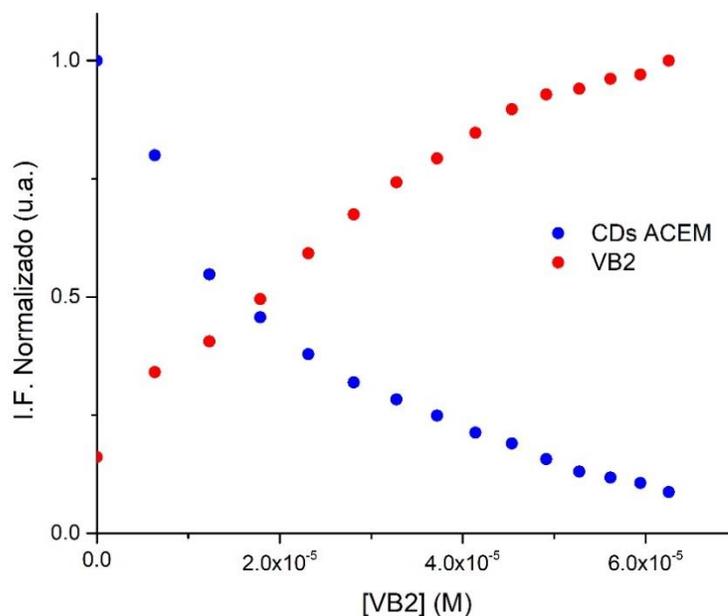


Figura 66. Gráficas de IF Normalizada Vs [VB2].

Las variaciones en la intensidad de la señal de fluorescencia debido a las interacciones que se establecen entre la especie donadora y la especie receptora de energía, se muestran de manera muy clara en las gráficas de las figuras 65 y 66. Haciendo un análisis detallado de estas gráficas se observa cómo disminuye la intensidad de fluorescencia del donador (CDs) y aumenta la señal del aceptor (QDs CdTe@CA y VB2) con los incrementos sucesivos en la concentración de este último; no se observan signos de saturación en ambas titulaciones.

5.4.3. Eficiencia del proceso FRET (E), integrales de solapamiento (J), constante de enlace (K), distancia entre donador-aceptor (r) y distancia de Förster (R_0) de los conjugados.

La transferencia de energía fluorescente o de Förster, (FRET) es un proceso que involucra la transferencia de energía no radiativa de una molécula donadora fotoexcitada, después de la absorción de un fotón de energía mayor, a una molécula

aceptora de una especie diferente (colocada en estrecha proximidad), la cual puede relajarse al estado base emitiendo un fotón de energía menor. Este proceso resulta de interacciones dipolo-dipolo y es fuertemente dependiente de la distancia de separación del centro del donador al centro del aceptor. Para esto se requiere que exista una superposición entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor. Una selección apropiada del par donador-aceptor asegura una eficiencia alta de la transferencia de energía. Además del solapamiento espectral mencionado y la distancia donador-aceptor adecuada para que se produzca el proceso FRET (2-8 nm), se requiere de un evento de enlace debido a una interacción específica. Una vez establecido el par FRET y realizadas las titulaciones correspondientes es posible calcular los principales parámetros que caracterizan el proceso FRET, como son la eficiencia (E), la distancia de Förster (R_0), la distancia donador-aceptor (r) y la integral de solapamiento a partir de las Ecuaciones 2, 3 y 4 respectivamente:⁹²

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (2)$$

donde E es la eficiencia del proceso FRET, 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, para la cual ha ocurrido una transferencia de energía del 50 % y r es la distancia entre el donador y el aceptor.

$$R_0^6 = 8.79 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \Phi J(\lambda) \quad (3)$$

donde 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 es igual a 2/3 para una orientación aleatoria; Φ es el rendimiento cuántico del donador en ausencia del aceptor; n es el índice de refracción del medio y $J(\lambda)$ es la integral de solapamiento de la emisión del donador y la absorción del aceptor que se calcula:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \mathcal{E}_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (4)$$

donde $F_D(\lambda)$ es la intensidad de fluorescencia integrada corregida del donador en el intervalo de longitudes de onda de λ a $\lambda + \Delta\lambda$ y \mathcal{E}_A es el coeficiente de absortividad del aceptor a λ .

Para la evaluación del tipo de abatimiento de fluorescencia presente, dinámico resultante de las colisiones, o estático referente a la formación de complejos en el estado base, se utilizó la Ecuación 5:⁹³

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (5)$$

donde F_0 es la intensidad de fluorescencia en ausencia del abatidor, F es la intensidad de fluorescencia en presencia del abatidor, K_{SV} es la constante de Stern-Volmer y $[Q]$ la concentración del abatidor.

Para el cálculo de las constantes de enlace se utilizó una modificación de la ecuación de Stern-Volmer, la Ecuación 6 que explica el abatimiento estático:

$$\frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{F_0} + \frac{1}{KF_0[Q]} \quad (6)$$

donde K es la constante de enlace del complejo donador-abatidor.

5.4.3.1. Gráficos de Stern-Volmer y cálculo de la constante de enlace (K)

Se obtuvieron los gráficos de Stern-Volmer a partir de la Ecuación 5 para determinar si se trata de un solo tipo de abatimiento o ambos en los procesos FRET de los conjugados CDs ACEM@PEI/Fluoresceína, CDs ACEM@PEI/QDs CdTe@AMP, CDs ACEM/QDs CdTe@CA y CDs ACEM/VB2.

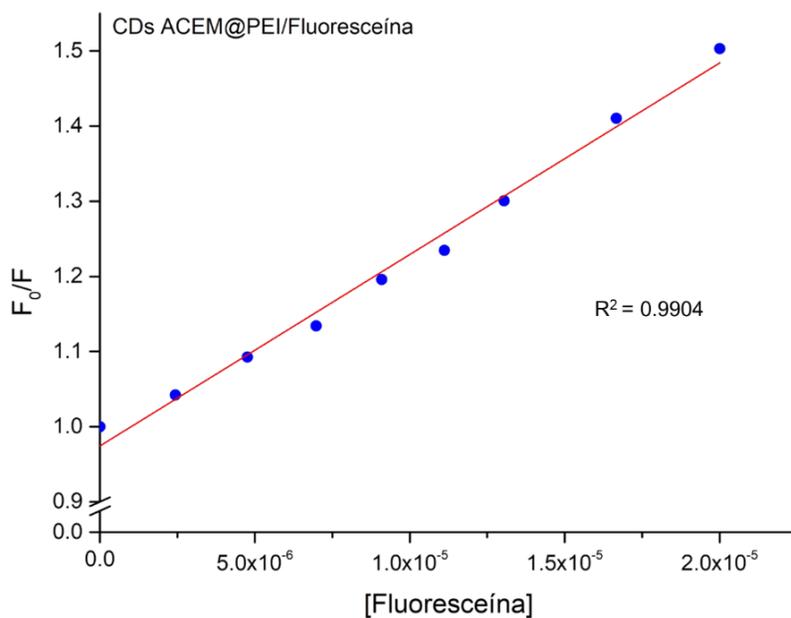


Figura 67. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer del conjugado CDs ACEM@PEI/Fluoresceína.

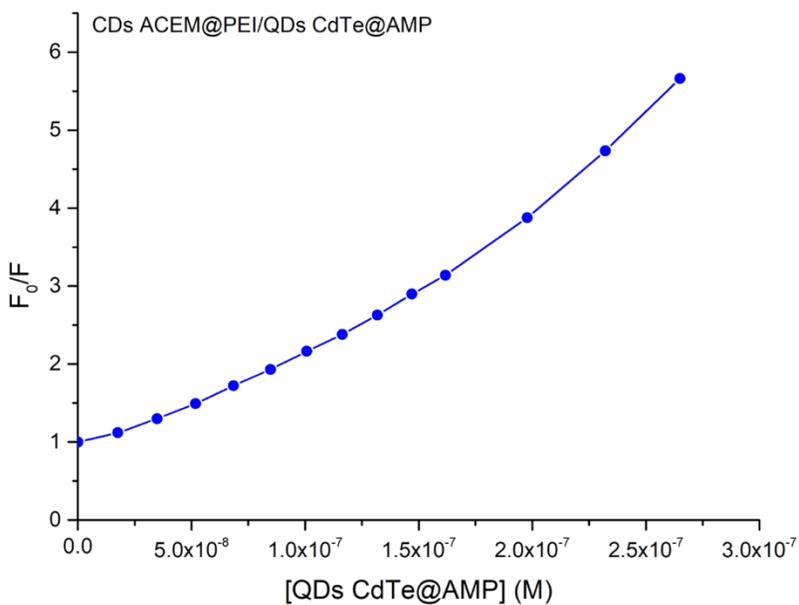


Figura 68. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer del conjugado CDs ACEM@PEI/QDs CdTe@AMP.

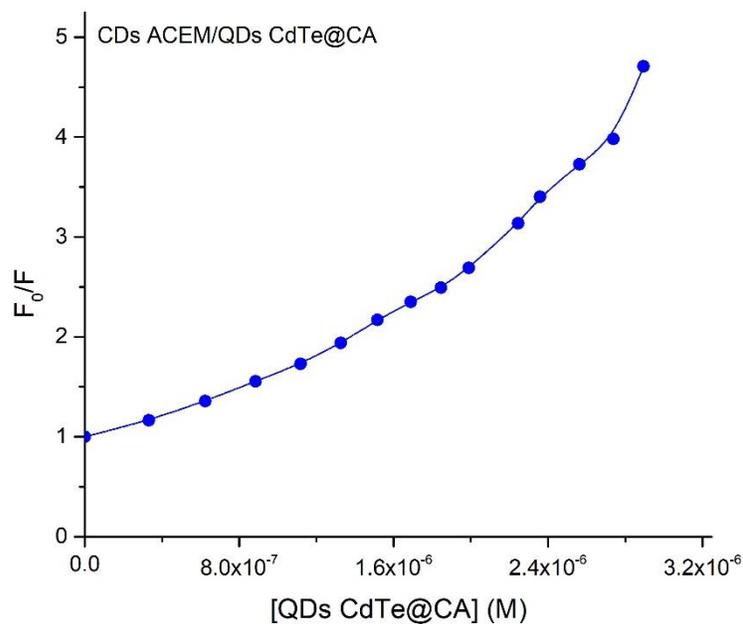


Figura 69. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer del conjugado CDs ACEM/QDs CdTe@CA.

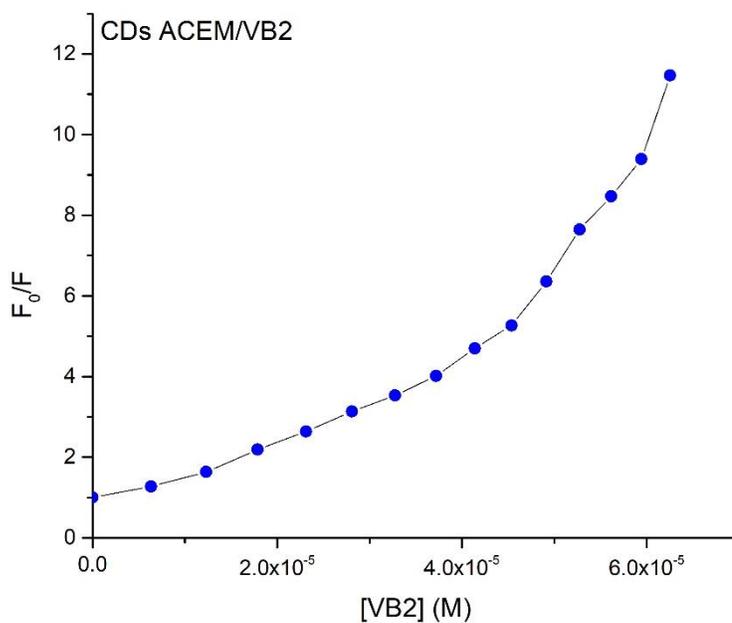


Figura 70. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer del conjugado CDs ACEM/VB2.

En la Figura 67 se muestra el gráfico de la ecuación de Stern-Volmer para el conjugado CDs ACEM@PEI/Fluoresceína observándose linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado, indicando que existe un solo tipo de abatimiento. Para los conjugados CDs ACEM@PEI/QDs CdTe@AMP, CDs ACEM/QDs CdTe@CA y CDs ACEM/VB2 las gráficas de Stern-Volmer (Figuras 68, 69 y 70) muestran que a bajas concentraciones de la especie donadora existe linealidad, mientras que a medida que aumenta la concentración la curva se hace cóncava hacia el eje de las Y. Esto indica que a bajas concentraciones predomina solamente un tipo de abatimiento. Para calcular las constantes de enlace del complejo donador-aceptor se utilizó una modificación de la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 6) que describe el abatimiento estático y se obtuvo el gráfico correspondiente de $1/(F_0-F)$ vs $1/[Q]$. En las figuras 71, 72, 73 y 74 se pueden observar los gráficos de los dos sistemas estudiados y los valores de las constantes de enlace de cada uno.

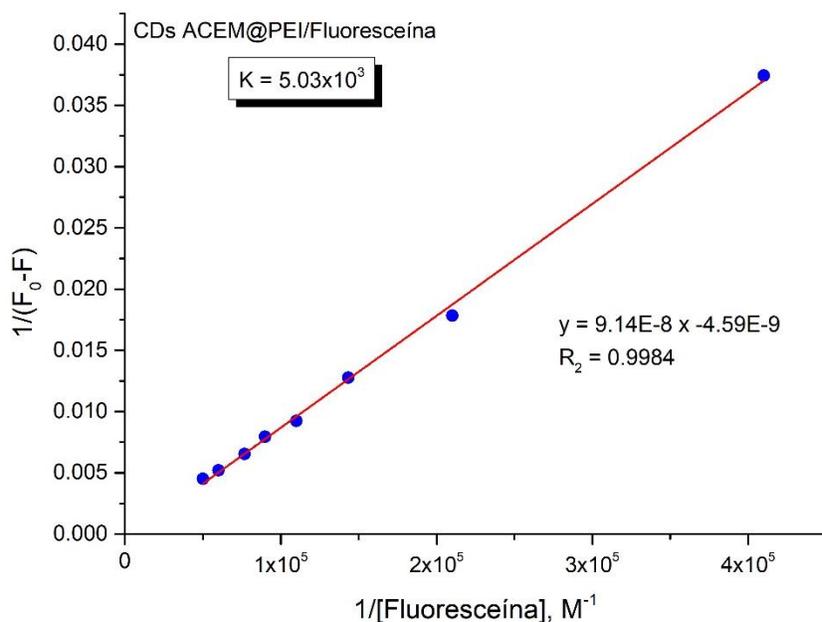


Figura 71. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer modificada para el conjugado CDs ACEM@PEI/Fluoresceína ($K=5.03 \times 10^3$).

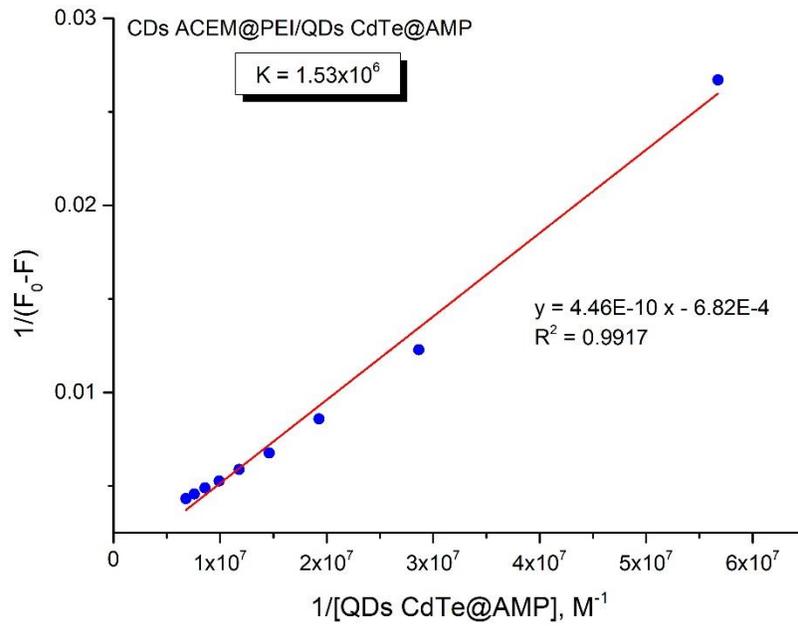


Figura 72. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer modificada para el conjugado CDs ACEM@PEI/QDs CdTe@AMP ($K=1.53 \times 10^6$).

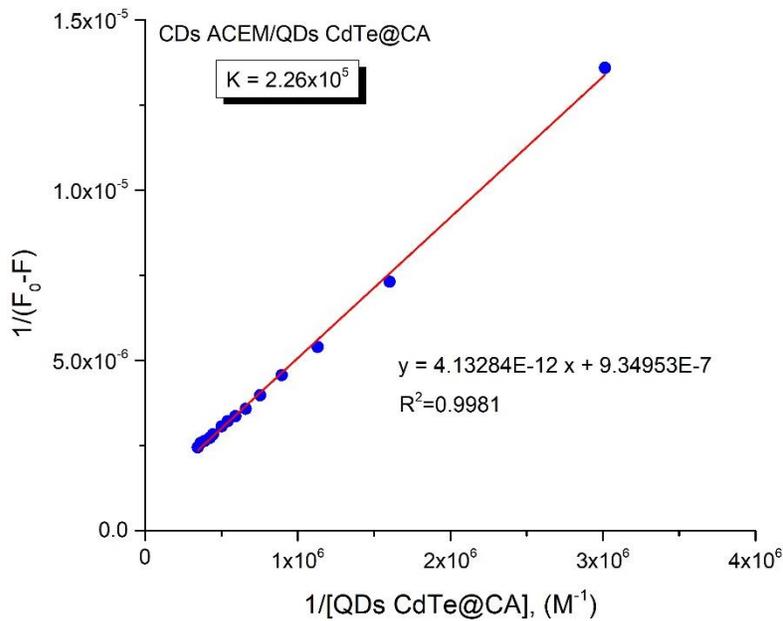


Figura 73. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer modificada para el conjugado CDs ACEM/QDs CdTe@CA ($K=2.26 \times 10^5$).

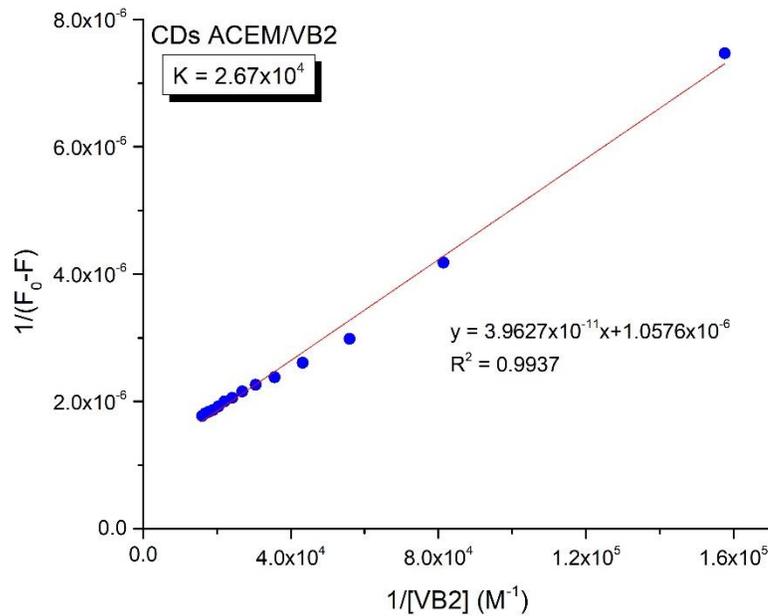


Figura 74. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer modificada para el conjugado CDs ACEM/VB2 ($K=2.67 \times 10^4$).

5.4.3.1.1. Cálculo de la eficiencia del proceso FRET (E) y del grado de solapamiento espectral (J).

Uno de los parámetros que indica la eficiencia de un proceso de transferencia de energía es el grado de superposición entre el espectro de emisión de fluorescencia del donador con el espectro de absorción del aceptor. Observando nuevamente las figuras 55, 56, 61 y 62 se puede percibir el área de solapamiento entre la banda de emisión de fluorescencia de CDs ACE@PEI y la banda de absorción UV de la fluoresceína y QDs CdTe@AMP, así como entre la banda de emisión de CDs ACEM y la banda de absorción de QDs CdTe@CA y VB2.

En la Tabla 3 se muestran los datos teóricos de los sistemas FRET estudiados, obtenidos a partir de las Ecuaciones 2-6.

Tabla 3. Datos teóricos de los sistemas FRET estudiados.

Conjugados	J (cm ³ Lmol ⁻¹)	E(%)	R ₀ (nm)	r (nm)	K
CDs ACEM@PEI/Fluoresceína	1.77x10 ⁻¹⁴	33	3.47	3.89	5.03x10 ³
CDs ACEM@PEI/QDs CdTe@AMP	2.17x10 ⁻¹⁴	82	3.60	2.78	2.84x10 ⁵
CDs ACEM/QDs CdTe@CA	3.35x10 ⁻¹³	79	5.67	4.56	2.26x10 ⁵
CDs ACEM/VB2	3.32x10 ⁻¹⁵	91	2.67	1.78	2.6x10 ⁴

5.5. Estudio de reconocimiento de analitos de interés biológico

5.5.1. Reconocimiento de receptores de folato (RF)

Para el desarrollo de un posible sensor de receptores de folato se evaluó la interacción entre los CDs ACEM@PEI y el ácido fólico (AF). Las soluciones de CDs y AF se prepararon en un pH de 7.4. Se tituló una solución de CDs ACEM@PEI con una solución de AF 2.29 x 10⁻³ M.

En la Figura 75 se puede observar la titulación de CDs ACEM@PEI con AF seguida por fluorescencia. La IF de los CDs se abate progresivamente a medida que aumenta la concentración de AF desde 0 hasta 6.88 x 10⁻⁴ M, alcanzándose un abatimiento cercano a un 93 %. Se obtuvieron los gráficos de Stern-Volmer a partir de la Ecuación 5 para determinar si se trata de un solo tipo de abatimiento o ambos.

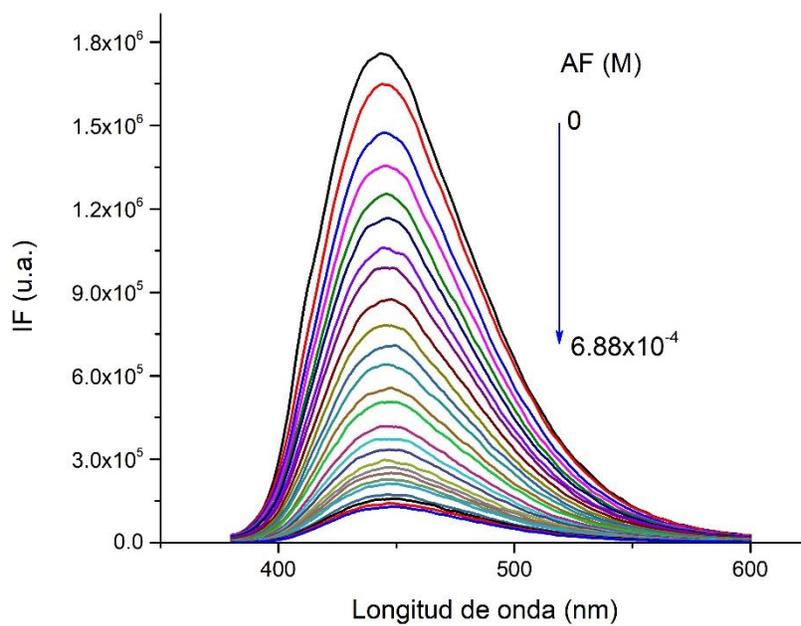


Figura 75. Titulación de CDs ACEM@PEI con AF.

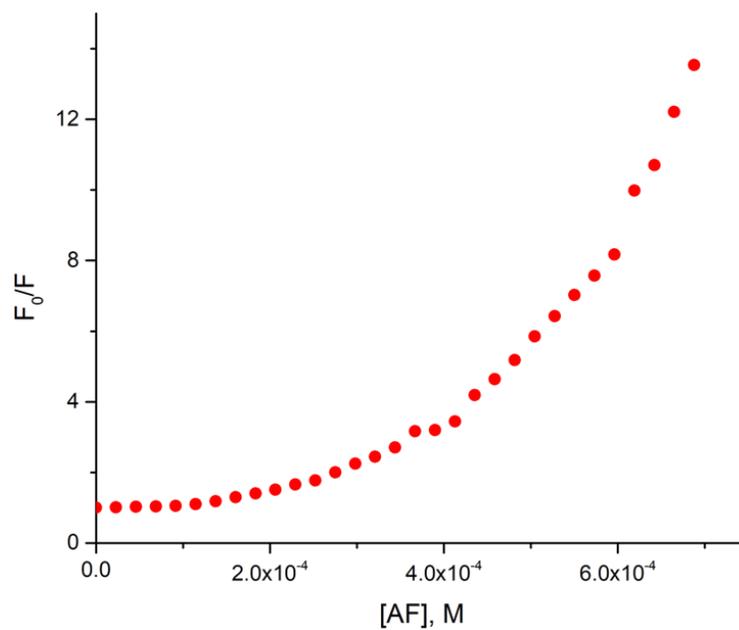


Figura 76. Gráfica de la ecuación de Stern-Volmer para el conjugado CDs ACEM@PEI/AF.

En la Figura 76 puede observarse que la curva no presentó linealidad existiendo la presencia de los dos tipos de abatimiento (estático y dinámico). Para determinar la constante de asociación en el abatimiento estático se utilizó la siguiente ecuación:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_A + n \log [Q] \quad (7)$$

Donde K_A es la constante de asociación de CDs ACEM@PEI con AF y n es el número de sitios de interacción.

La Figura 77 muestra el gráfico de $\text{Log} ((F_0 - F)/F)$ Vs $\text{Log} [Q]$ para calcular la K_A del complejo CDs ACEM@PEI/AF y n . Se puede observar que la curva muestra dos pendientes por lo que se calculan constantes de asociación para cada intervalo de concentraciones.

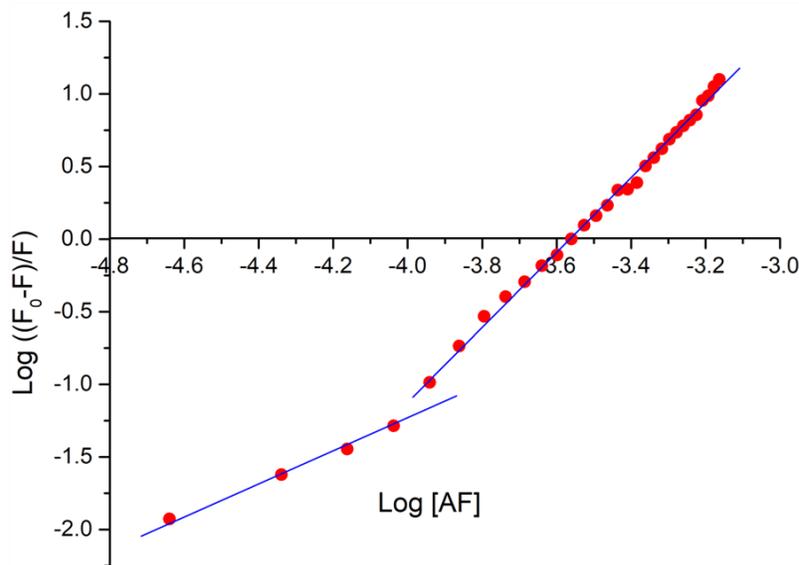


Figura 77. Gráfica Log-Log para el abatimiento de fluorescencia de CDs ACEM@PEI por AF.

La gráfica muestra dos pendientes; la primera comprendida en un intervalo de concentraciones de 2.29×10^{-5} a 9.17×10^{-5} M y la segunda en un intervalo de $1.15 \times$

10^{-4} a 6.88×10^{-4} M. Cada pendiente muestra buena linealidad con R^2 mayores a 0.99 (Tabla 4).

Tabla 4. Datos obtenidos para el sistema CDs ACEM@PEI/AF.

Intervalo de concentraciones (M)	Log K_A	n	R^2
2.29×10^{-5} - 9.17×10^{-5}	2.95	1.05	0.9978
1.15×10^{-4} - 6.88×10^{-4}	9.15	2.56	0.9965

Los resultados revelaron que los valores log K_A y el número de sitios de unión (n) son mayores en un intervalo de concentraciones de AF más altas. Cuando la concentración de AF es muy baja, los sitios de unión de baja afinidad son ocupados ($n=1.0515$), mientras que a una mayor concentración de AF, los sitios de unión con mayor afinidad pueden estar ocupados ($n=2.5676$). Esto explica que a mayor concentración de AF exista mayor constante de asociación.

También se estudió la interacción de CDs ACEM@PEI con AF a través de una titulación por potencial Z. En la Figura 78 se muestra la gráfica obtenida y se puede notar como al aumentar la concentración de AF ocurre una disminución de la carga superficial positiva de los CDs, lo cual pone en evidencia que el AF tiene una carga negativa al valor del pH de la titulación (pH 7.4) y que adiciones sucesivas neutralizan la carga superficial de los CDs. Este comportamiento también es evidencia de la formación de un complejo supramolecular entre los CDs modificados en su superficie con PEI y el ácido fólico.

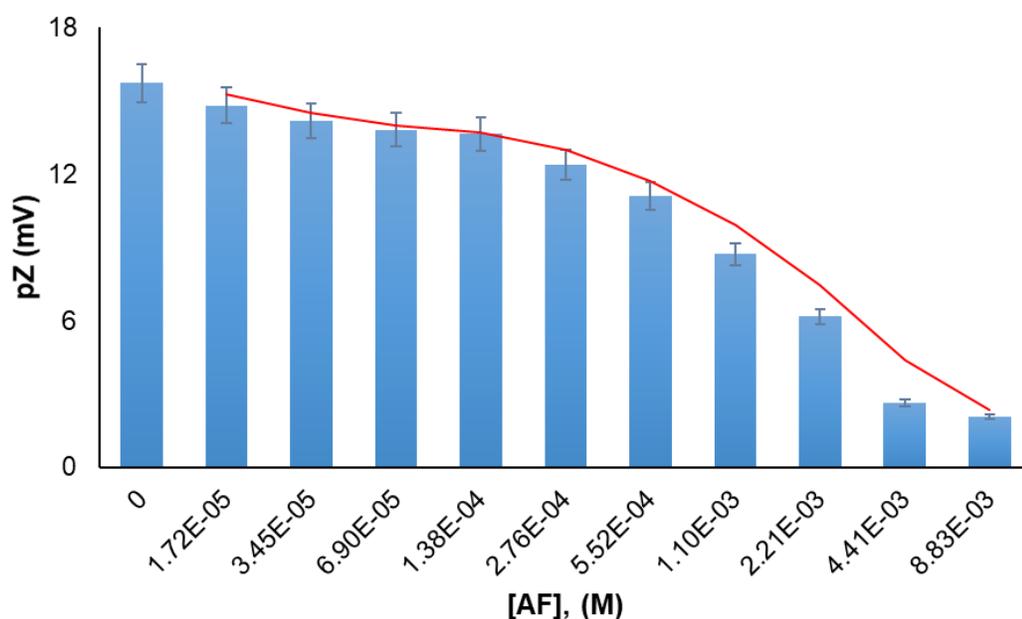


Figura 78. Titulación por pZ de CDs ACEM@PEI con AF.

Para el desarrollo de un sensor, es importante estudiar las posibles interferencias. En este caso, se estudió el efecto que tiene sobre la IF de CDs ACEM@PEI, adicionar diferentes moléculas de interés biológico. Las moléculas utilizadas fueron, ácido fólico (AF), treonina (Thr), glutamina (Gln), ácido cítrico (AC), leucina (Leu), isoleucina (Ile), lisina (Lys), fenilalanina (Phe), ácido ascórbico (AA) e histidina (His).

En la Figura 79 se muestran los estudios de interferencia que se llevaron a cabo utilizando soluciones de concentración 2.29×10^{-3} M. Como puede observarse la IF de los CDs experimenta un fuerte abatimiento solo en presencia de AF. Esto es evidencia de una respuesta selectiva en el abatimiento de la IF de los CDs para AF.

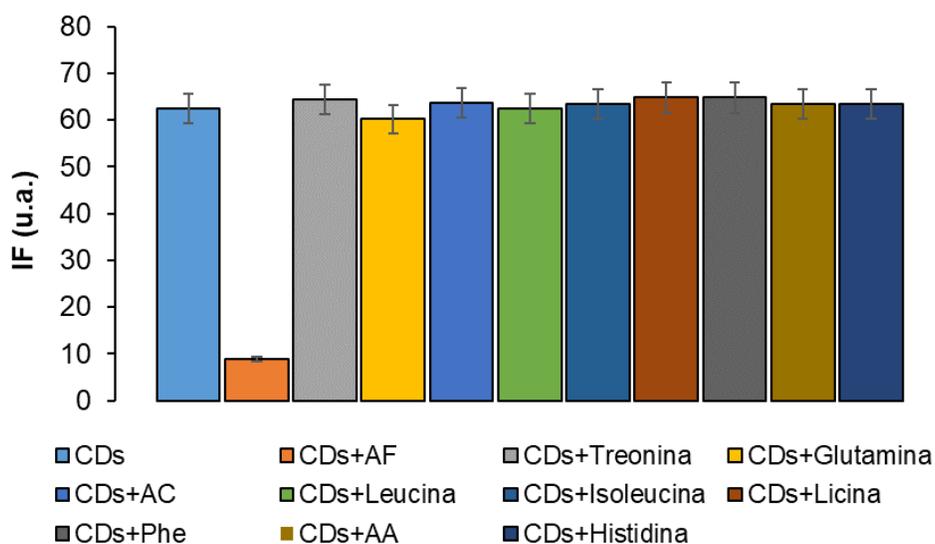


Figura 79. Estudios de selectividad frente a diferentes moléculas de interés biológico.

Luego de haber estudiado el abatimiento de la fluorescencia de los CDs ACEM@PEI en presencia de AF, se continuó con el estudio de reconocimiento de RF. Basado en la alta afinidad entre AF y RF se estudió la recuperación de la IF de CDs ACEM@PEI mediante una titulación del sistema CDs ACEM@PEI/AF con adiciones sucesivas de RF.

En la Figura 80 A se muestra la titulación seguida por fluorescencia y se puede observar como a medida que aumenta la concentración de RF, desde 0 a 7.01×10^{-8} , se va recuperando la intensidad de fluorescencia de los CDs ACEM@PEI. Como resultado de la presencia de RF en la solución, las moléculas de AF comienzan a interactuar con estos conduciendo a una recuperación de la intensidad de fluorescencia de los CDs ACEM@PEI. Además, la recuperación de la IF se ajusta a una buena relación lineal con respecto al aumento de la concentración de RF, como puede observarse en la Figura 80 B.

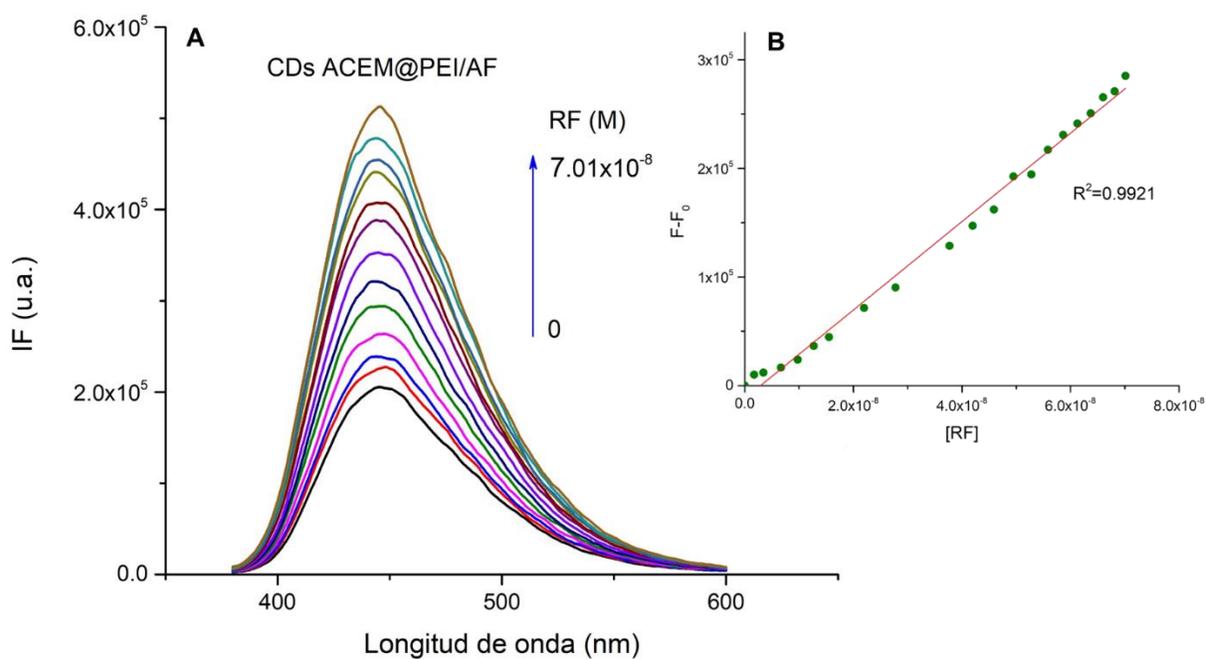


Figura 80. Titulación de CDs ACEM@PEI/AF con RF.

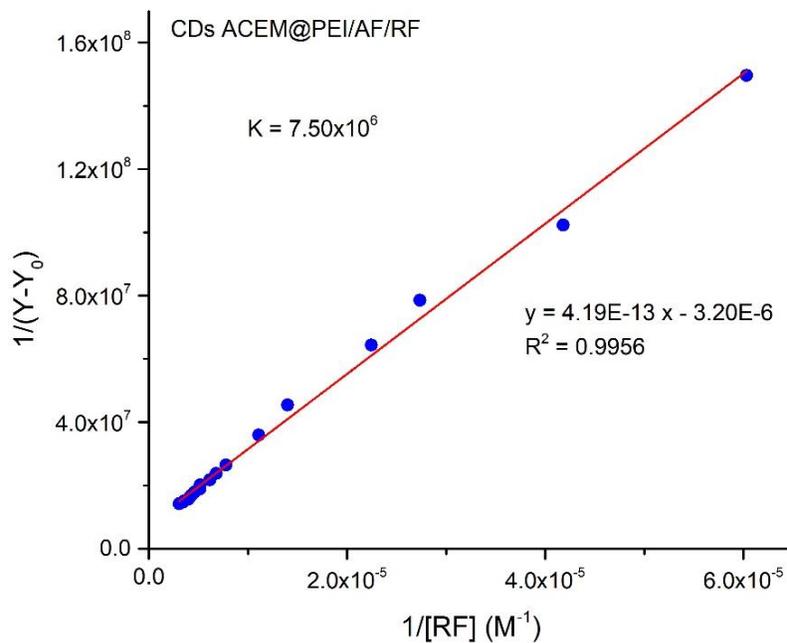


Figura 81. Gráfica de Benesi Hildebrand para la titulación de CDs ACEM@PEI/AF con RF.

Para determinar la constante de asociación entre AF y RF se realizó una gráfica de Benesi Hildebrand como se muestra en la Figura 81. La constante de asociación fue de 7.50×10^6 .

5.5.2. Reconocimiento de ácido fólico (AF).

Para el desarrollo de un posible sensor de AF se evaluó la interacción entre el sistema FRET CDs ACEM/QDs CdTe@CA y AF. Las soluciones se prepararon en un pH de 7.4 y se tituló una solución de CDs ACEM/QDs CdTe@CA con una solución de AF 1.95×10^{-4} M.

En la Figura 82 A se muestra la titulación seguida por fluorescencia y se puede observar como a medida que aumenta la concentración de AF, desde 0 a 2.29×10^{-5} , ocurre una interrupción del sistema FRET, se recupera la intensidad de fluorescencia de los CDs ACEM y se abate la intensidad de fluorescencia de la señal de QDs CdTe@CA. Como resultado de la presencia de AF en la solución, las nanopartículas de QDs CdTe@CA comienzan a interactuar con estos conduciendo a una recuperación de la intensidad de fluorescencia de los CDs ACEM. Además, la relación entre las señales de fluorescencia de CDs y QDs, IF_{CDs}/IF_{QDs} (señal radiométrica) presenta un buen ajuste lineal con respecto al aumento de la concentración de AF, como puede observarse en la Figura 82 B.

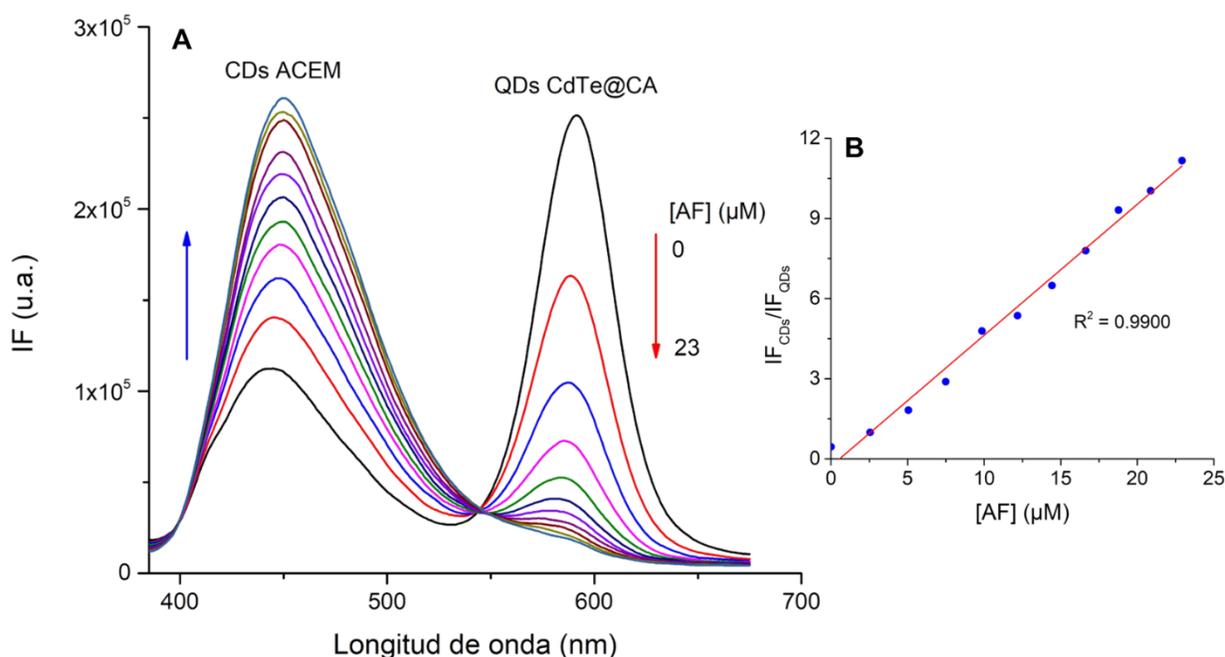


Figura 82. Titulación del sistema FRET CD ACEM/QDs CdTe@CA con AF.

5.5.2.1. Sensor de ácido fólico (AF)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la titulación del sistema FRET CD ACEM/QDs CdTe@CA con AF, se decidió utilizar la relación radiométrica IF_{CDs}/IF_{QDs} para el desarrollo de un sensor de AF basado en la interrupción del sistema FRET entre CD ACEM/QDs CdTe@CA.

Los sensores basados en sistemas FRET tienen como ventajas el hecho de que se puedan hacer pruebas *in situ*, presentan una respuesta más rápida, mayor simplicidad, menor coste y mayor sensibilidad. Actualmente, los sensores basados en FRET para biomoléculas e iones son principalmente sondas que se basan en la modulación de la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda única (sistemas de apagado o encendido). Sin embargo, los ensayos radiométricos aplican la relación de dos intensidades de emisión a diferentes longitudes de onda, lo que es más eficaz para reducir la interferencia de fondo y la fluctuación de diversas condiciones.¹⁰⁵

5.5.2.1.1. Curva de calibración y estudios de selectividad

En la Figura 83 se muestra la curva de calibración obtenida para el sistema CDs ACEM/QDs CdTe@CA/AF, ésta se realizó adicionando concentraciones crecientes de AF que van de 0 a 23 μM . En la misma existe un comportamiento lineal con un coeficiente de correlación de 0.9913. El límite de detección (LD) se calculó utilizando la ecuación 8. Donde σ es la desviación estándar de la señal del blanco medida diez veces y S es la pendiente de la curva de calibración. En la Tabla 5 se resumen los parámetros analíticos calculados.

$$LD = 3\sigma_{\text{blanco}}/S \quad (8)$$

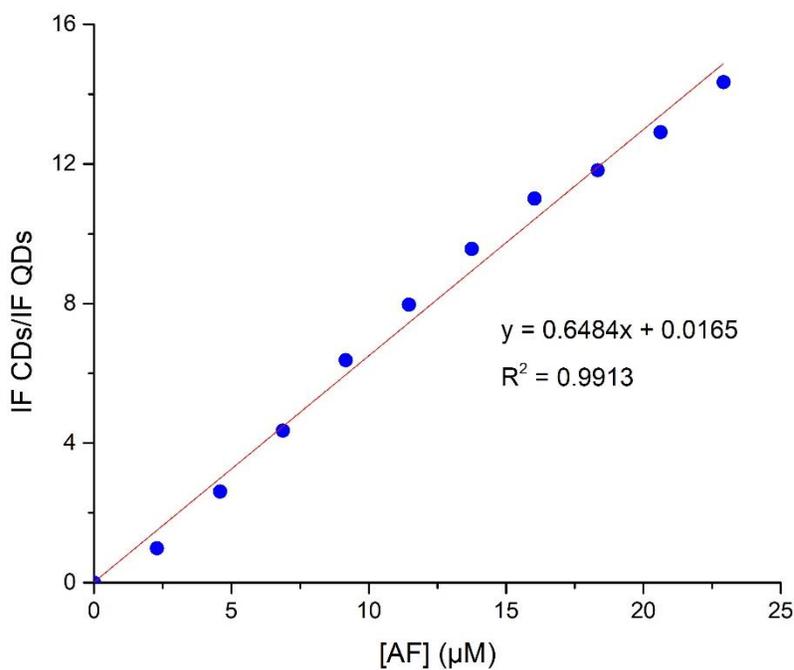


Figura 83. Curva de calibración de AF basada en el sistema FRET CDs ACEM/QDs CdTe@CA.

Tabla 5. Parámetros analíticos calculados para la curva de valoración del sistema CDs ACEM/QDs CdTe@CA - AF.

Variables	CDs ACEM/QDs CdTe@CA - AF
Regresión lineal	$y = 0.6484 x + 0.0165$
Coefficiente de correlación	0.9913
Intervalo lineal (μM)	0 - 23
Límite de detección (nM)	158

Para el desarrollo de un sensor, es importante estudiar las posibles interferencias. En este caso, se estudió la influencia de 10 aminoácidos, ácido ascórbico y ácido cítrico sobre la relación radiométrica IF_{CDs}/IF_{QDs} del sensor. Los aminoácidos fueron añadidos en una concentración de 195 μM . Como se observa en la Figura 84 el sensor radiométrico muestra una respuesta selectiva hacia AF.

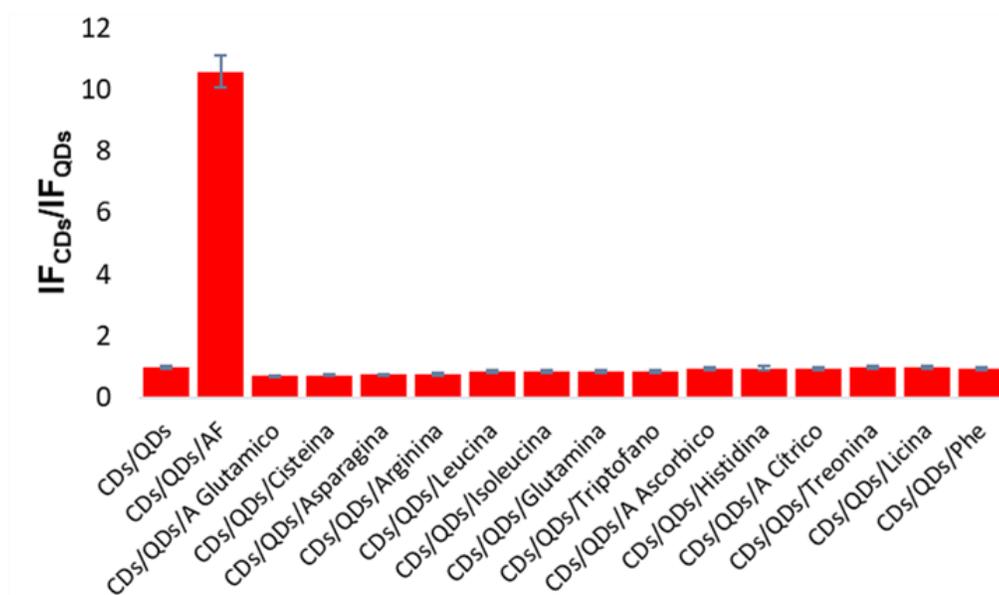


Figura 84. Estudios de selectividad para AF del sistema FRET CDs ACEM/QDs CdTe@CA.

En la Figura 85 se muestran los estudios de competitividad que se llevaron a cabo con los aminoácidos, ácido ascórbico y ácido cítrico. Como puede observarse la especie que más interfiere al sensor es la lisina, pero no representa una interferencia significativa.

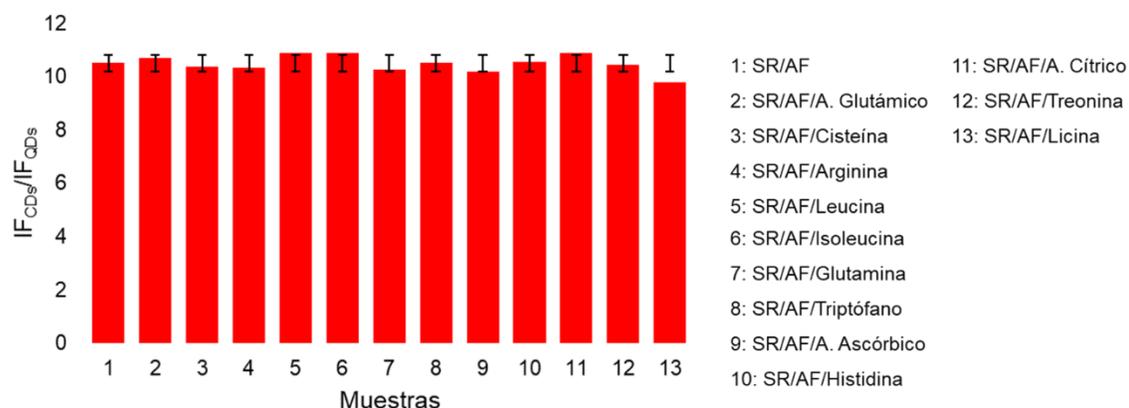


Figura 85. Estudios de competitividad para AF del sistema FRET CDs ACEM/QDs CdTe@CA.

5.5.2.1.2. Análisis en muestras reales

La determinación de AF se llevó a cabo en una muestra de jugo de naranja (Jumex) a partir del método de adición estándar. El jugo no recibió ningún pretratamiento, simplemente se ajustó el pH a 7.4 con buffer de fosfatos y se tomaron los espectros de fluorescencia excitando a 360 nm para observar posibles interferencias en la banda del sensor.

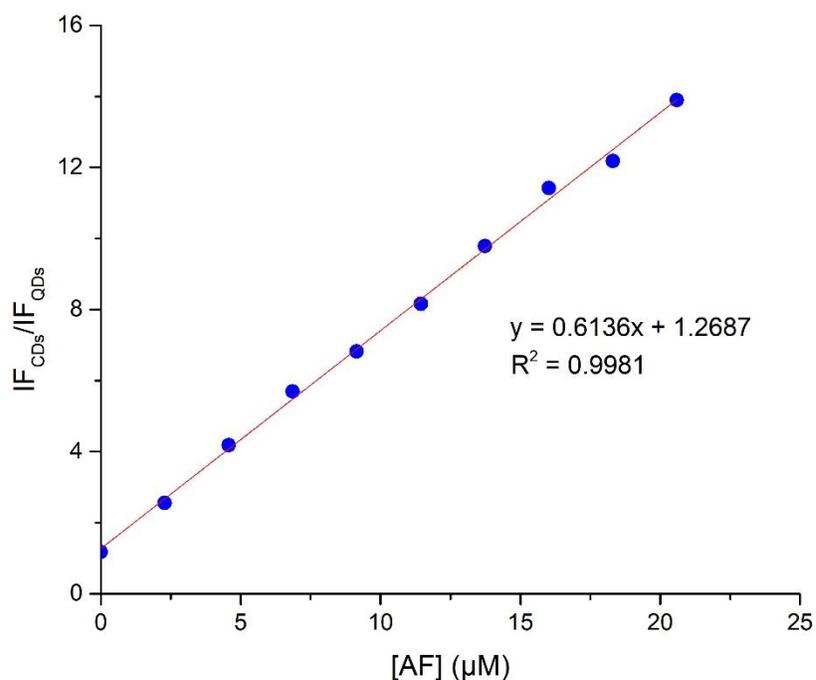


Figura 86. Gráfica de adición de estándar en jugo de naranja (Jumex).

Tabla 6. Determinación de AF en jugo de naranja (Jumex).

Añadido (μM)	Encontrado (μM)	Recobrado (μM)	Recobrado (%)	SD	RSD
2.29	2.07	4.38	101.16	0.04	1.34
4.58		6.42	95.11	0.01	0.27
6.86		8.75	97.40	0.03	0.53
9.15		11.38	101.80	0.02	0.23
11.44		13.02	95.72	0.01	0.17
13.73		15.68	99.14	0.02	0.18
16.02		17.59	96.94	0.01	0.09
18.30		20.46	100.47	0.01	0.10
20.59		22.94	101.38	0.02	0.15

Como puede observarse en la Figura 86, el análisis de adición de estándar en jugo de naranja mostró una buena linealidad presentando un coeficiente de correlación alto.

Adicionalmente se hicieron los cálculos de las concentraciones añadidas, encontradas y porcentajes recobrados en cada punto del gráfico de adición estándar de cada muestra de vino (Tabla 7), los cuales resultaron satisfactorios ya que los porcentajes de recobrado no deben ser mayores al 5% para considerar un buen método de análisis y en ninguno de los puntos se supera éste parámetro, por tanto, resultó ser un buen sensor para la detección de AF en jugo de naranja.

5.5.3. Sensor de riboflavina (VB2).

La riboflavina, comúnmente llamada vitamina B2, es una de las vitaminas hidrosolubles más ampliamente distribuidas y es fácilmente absorbida por los micronutrientes que se absorben activamente en las células eucariotas.¹⁰⁷ La riboflavina está presente en el cuerpo principalmente como un constituyente básico de las coenzimas flavina adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleótido (FMN).¹⁰⁸ La vitamina B2 también se requiere para una amplia variedad de procesos celulares, tales como metabolismo de grasas, cuerpos cetónicos, carbohidratos y proteínas, desempeña así un papel clave en la dieta humana.^{107,108}

Teniendo en cuenta los valores obtenidos de eficiencia (E), integral de traslape (J), distancia de Förster (R_0) y distancia entre donador y aceptor para el sistema FRET CDs ACEM / VB2, se decidió diseñar un sensor radiométrico para la determinación de riboflavina.

5.5.3.1. Curva de calibración y estudios de selectividad

La curva de calibración fue obtenida a partir de la medida radiométrica ($IF_{VB2}/IF_{CDs_{ACEM}}$) del aumento de intensidad de emisión de fluorescencia de la VB2 y

el abatimiento de la intensidad de emisión de fluorescencia del CDs ACEM a diferentes concentraciones de VB2. El inserto de la figura 87 muestra la curva de calibración (promedio de tres repeticiones), con un coeficiente de correlación de 0.9973 y un límite de detección (LD) de 0.025 μM . El LD fue calculado utilizando la ecuación 8.

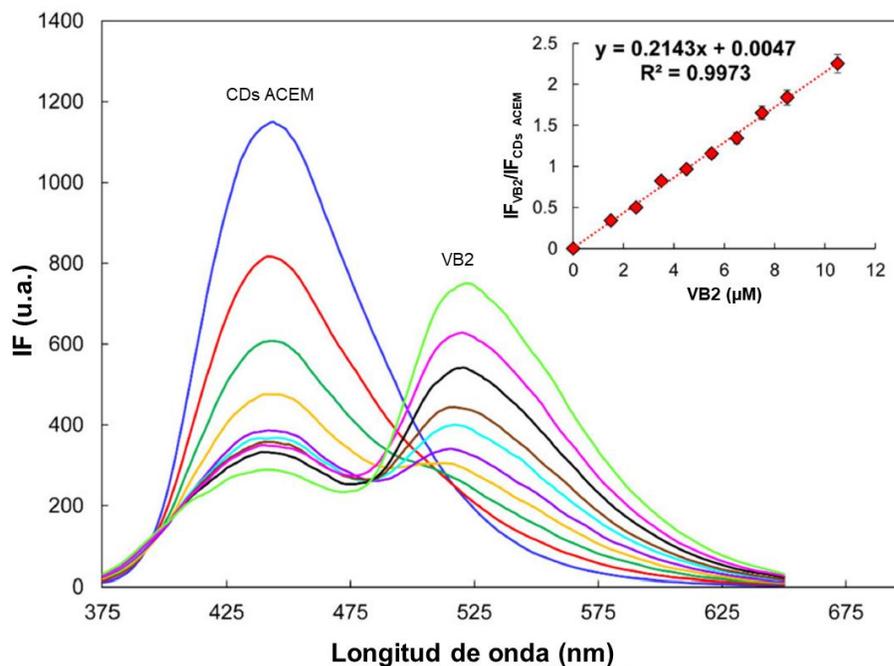


Figura 87. Variación en la emisión de fluorescencia del conjugado CDs ACEM/VB2 a diferentes concentraciones de VB2 (0 - 11 μM). Inserto: relación lineal entre la señal radiométrica y la concentración de VB2.

Tabla 7. Parámetros analíticos calculados para la curva de valoración del sistema CDs ACEM/VB2.

Variables	CDs ACEM/VB2
Regresión lineal	$y = 0.2143x + 0.0047$
Coefficiente de correlación	0.9973
Intervalo lineal (μM)	0 - 11
Límite de detección (μM)	0.025

La influencia de posibles sustancias interferentes que de manera natural se encuentran presentes en muestras alimenticias o biológicas, fue también estudiada. Diferentes sustancias representativas como L-amino ácidos (Lys, Trp, Asn, His, Gly, Phe, Ala, Gln, Arg, Pro y Glu) y ácido ascórbico (AA), fueron analizadas en un medio de PBS a pH 7.4. A pH fisiológico las nanopartículas de CDs están cargadas negativamente (Figura 49) y el pH se encuentra por encima del punto isoeléctrico de la VB2 ($pI = 6$). Bajo estas condiciones, las interacciones electrostáticas no son esperadas. Sin embargo, todas las interferencias estudiadas presentan grupos con la capacidad de formar puentes de hidrógeno con los grupos activos en la superficie de las nanopartículas.

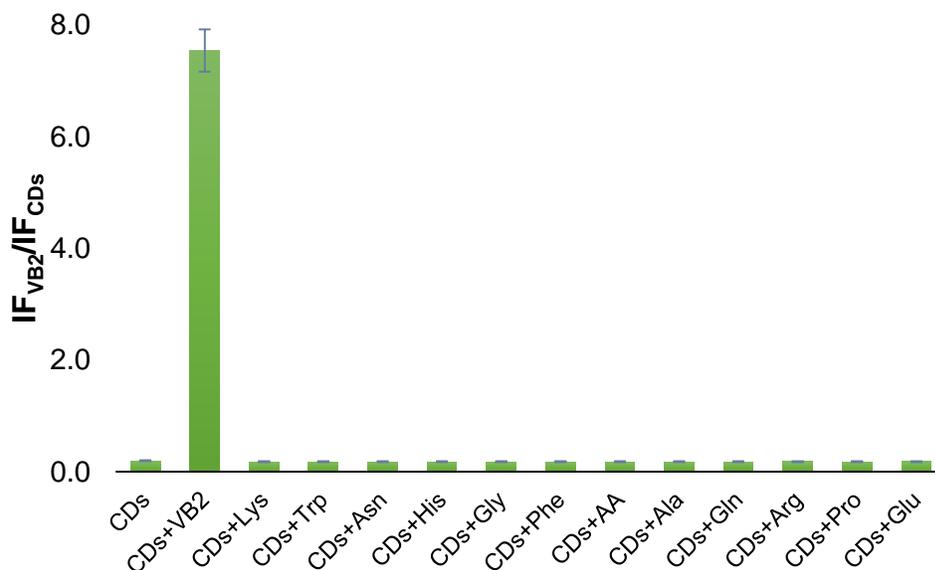


Figura 88. Estudios de selectividad para VB2 del sistema FRET CDs ACEM/VB2.

En la figura 88 puede observarse que la señal radiométrica solamente muestra un cambio significativo en el sistema CDs ACEM/VB2, mientras que para el resto de las sustancias estudiadas no existe una variación significativa de la señal. La selectividad del CDs por la VB2 está basada en la transferencia de energía que ocurre solamente entre estas dos especies. También se realizaron estudios de competencia

con estas sustancias, manteniendo una relación molar constante de 1:1 entre la VB2 y la sustancia interferente. En la figura 89 se puede observar que la relación radiométrica IF_{VB2}/IF_{CDs} en presencia de VB2 y la correspondiente interferencia, muestra una clara selectividad hacia VB2 por encima de las otras sustancias bajo estudio. Estas posibles interferencias en concentraciones de 20 μ M no afectan la formación del conjugado CDs ACEM/VB2 y no interfieren con la señal radiométrica. Por tanto, el sensor propuesto muestra una alta selectividad para la determinación de VB2.

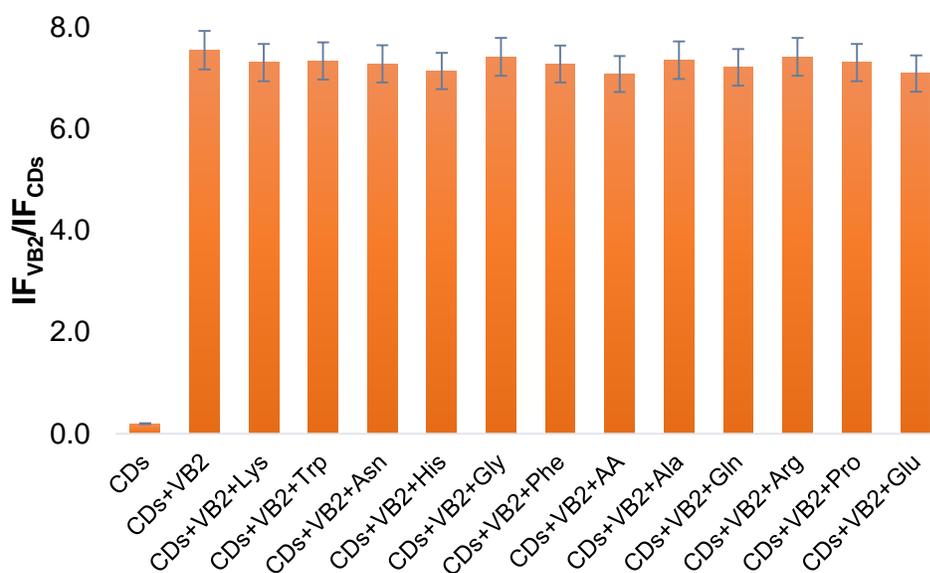


Figura 89. Estudios de competencia para VB2 del sistema FRET CDs ACEM/VB2.

5.5.3.2. Análisis en muestras reales

Para la determinación de VB2 en muestras reales se seleccionaron tres tipos de bebidas, una bebida energética (Monster Energy), té verde (McCORMICK) y un vino blanco (L.A. Cetto, Blanc de Blancs). El sensor propuesto fue aplicado en la detección de VB2 directamente sin tratamiento previo de las muestras, utilizando el método de adición de estándar. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Determinación de VB2 en muestras reales.

Muestra	Añadido (μM)	Encontrado (μM)	Recobrado (μM)	Recobrado (%)	SD	RSD
Monster Energy	2.5	3.81	6.46	106.30	0.02	3.64
	3.5		7.21	97.26	0.01	1.13
	4.5		8.38	101.60	0.02	2.67
	5.5		9.22	98.37	0.03	3.40
	6.5		1.01	97.59	0.01	0.75
	7.5		1.16	104.50	0.02	1.28
	8.5		1.20	96.58	0.01	0.69
Té verde	2.5	1.33	3.94	104.50	0.02	3.07
	3.5		4.76	97.95	0.01	1.62
	4.5		5.81	99.51	0.01	1.74
	5.5		7.07	104.30	0.01	1.12
	6.5		7.96	101.90	0.02	1.56
	7.5		8.84	101.10	0.04	3.13
	8.5		9.68	98.24	0.02	1.42
Vino blanco	2.5	1.61	4.08	98.80	0.01	1.30
	3.5		5.05	98.32	0.01	1.37
	4.5		6.18	101.60	0.02	1.39
	5.5		7.21	101.80	0.03	1.79
	6.5		8.33	103.50	0.02	1.48
	7.5		8.97	98.23	0.03	1.49
	8.5		1.00	99.06	0.07	3.19

Las pruebas de recobro se realizaron adicionando siete diferentes cantidades de VB2 a cada muestra. Como se indica en la Tabla 8, se obtuvo una buena concordancia entre las cantidades añadidas y encontradas de VB2 en muestras enriquecidas de bebida energética, té verde y vino, con buenos porcentajes de recuperación (entre 96% y 106%) y una desviación estándar relativa (RSD) inferior a 4 %, lo que indica la fiabilidad de esta sonda fluorescente FRET para la detección de VB2. Las concentraciones de VB2 en estas tres muestras analizadas están en el mismo rango de concentración que el reportado en trabajos previos sobre la estimación de concentraciones de VB2.^{109, 110} Los resultados son la media de tres análisis paralelos.

5.6. Estudios de citocompatibilidad

Las pruebas preliminares de citocompatibilidad se llevaron a cabo con la exposición directa, de CDs ACEM a concentraciones variables y un conjugado CDs ACEM/VB2 seleccionado, a células MDA-MB 231 en cultivo. Con el objetivo de obtener una información completa, las concentraciones superiores de CDs y su tiempo de incubación con las células se extendieron a valores más altos en comparación con otras publicaciones^{111, 112} y los explorados en las caracterizaciones anteriores (hasta 5 mg/mL y 48 h, respectivamente).

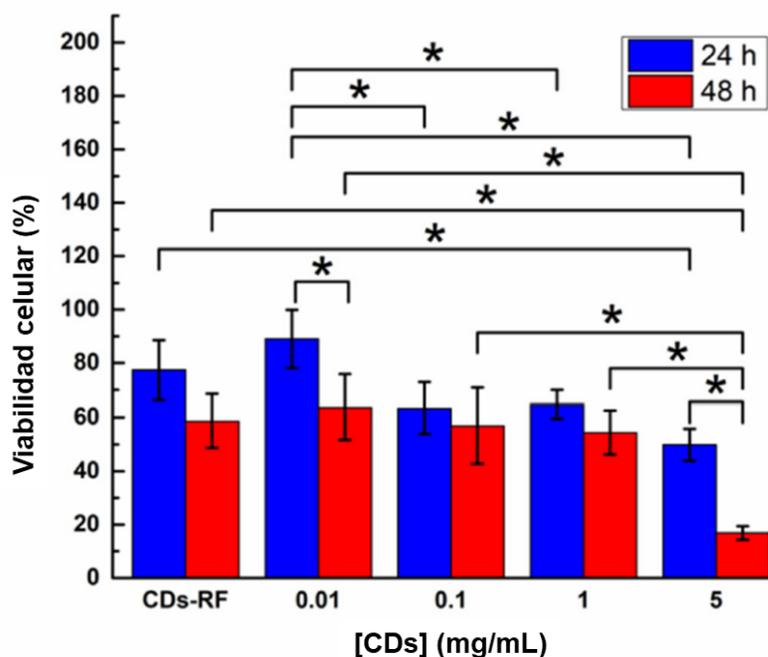


Figura 90. Viabilidad de las células de cáncer de mama (MDA-MB-231) después de la exposición a CDs en concentraciones variables y un conjugado CDs ACEM/VB2 durante 24 y 48 h. La diferencia estadísticamente significativa entre los datos ($p < 0.05$) se denota con *.

La Figura 90 muestra la viabilidad de las células cultivadas a las 24 h y 48 h posteriores a la exposición. Puede observarse que los CDs ACEM muestran una

citocompatibilidad dependiente de la dosis en ambos puntos de tiempo, lo cual es típico de los nanomateriales¹¹². Analizando las muestras a las 24 h primero, se observa que los CDs a la concentración más baja (0.01 mg/mL) junto con el conjugado CDs ACEM/VB2 dieron lugar a niveles sobresalientes de viabilidad celular (aprox. 90% y 80%, respectivamente) sin diferencia estadística significativa entre ellos ($p > 0.05$). De acuerdo con la escala de cinco puntos comúnmente utilizada para clasificar los biomateriales en contacto con las células, ambas muestras pueden considerarse citocompatibles en la medida en que los valores de viabilidad a los que conducen (en el intervalo de 70-90%) corresponden a una reactividad leve.^{114,115} Mientras tanto, se encontró que el resto de las muestras de CDs (0.1 – 5 mg/mL) produjeron valores de viabilidad celular ligeramente más bajos en el rango de 50–65%, lo que corresponde a una reactividad moderada.^{114,115}

Con respecto a las muestras incubadas durante 48 h, por otro lado, tanto el conjugado de CDs ACEM/VB2 como las muestras de CDs en el rango de 0.01-1 mg/mL también reflejaron una reactividad moderada^{114,115}, mostrando una viabilidad celular con valores de aproximadamente 55-60%. Por el contrario, la muestra de CDs más concentrada (5 mg/mL) produjo una viabilidad celular de aproximadamente 17%, lo que corresponde a una reactividad severa^{114,115}. Como ya se mencionó, vale la pena señalar que el procedimiento experimental aquí seguido implicó la incubación de las muestras durante toda la duración de los experimentos (24 h y 48 h), lo que podría haber contribuido a la moderada a severa reactividad mostrada por la muestra concentrada a las 48 h. Otras publicaciones en el campo han considerado el intercambio de medios de cultivo celular en períodos cortos después de la administración de los respectivos nanomateriales^{112,113}, lo que podría ayudar a reducir los escenarios probables de citotoxicidad. Cualquiera que sea el caso, es notable que los CDs producidos en este trabajo demostraron ser citocompatibles en el régimen de concentración en el que se utilizan como sensores de VB2. Además, no se espera que la VB2 confiera alguna citotoxicidad al conjugado CDs-RF dado que se ha demostrado que es totalmente citocompatible en concentraciones de hasta 5 mM (una

concentración aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor que la aquí estudiada).¹¹⁶ Además del proceso de síntesis suave, aquí optimizado, la citocompatibilidad observada de las CDs y el conjugado CDs ACEM/VB2 ciertamente puede estar relacionada con la ocurrencia natural de la VB2 en el organismo y la solubilidad adecuada de ambos (CDs y VB2) en PBS. La excelente citocompatibilidad de la plataforma desarrollada en sus condiciones de trabajo, incluso después de un largo tiempo de incubación con células, hace que la consideremos muy atractiva para otras aplicaciones en el campo biológico, como la detección intracelular y la tinción para microscopía de células vivas.¹¹⁷ En particular, la sonda CDs ACEM/VB2 se puede probar para estudiar el transporte y la localización intracelular de VB2, de forma similar a otras sondas basadas en el proceso FRET.¹¹⁸

VI. CONCLUSIONES

1. Los métodos empleados resultaron eficientes para la obtención de CDs con buena dispersabilidad en agua y con diámetros de 6.10 nm (CDs ACEH) y 5.32 nm (CDs ACEM).
2. El estudio de las propiedades ópticas no mostró diferencias significativas entre los CDs ACEH y CDs ACEM, obteniéndose rendimientos cuánticos de 51 y 53% respectivamente.
3. La técnica de síntesis directa de QDs en agua permitió obtener QDs CdTe@CA. El tiempo de reacción permitió preparar QDs que emiten en un intervalo de 507-599 nm y con diámetros desde 2.42 a 3.57 nm.
4. Mediante la formación de ensamblajes electrostáticos se logró observar transferencia de energía para los sistemas CDs ACEM@PEI/Fluoresceína, CDs ACEM@PEI/QDs CdTe@AMP, CDs ACEM/QDs CdTe@CA y CDs ACEM/VB2. Estos ensamblajes mostraron un proceso de transferencia de energía típico con eficiencias de 33, 82, 79 y 91% respectivamente.
5. Se estudió la interacción de CDs ACEM@PEI con AF observándose que la IF de los CDs se abate progresivamente a medida que aumenta la concentración de AF. La presencia de RF en el sistema CDs ACEM@PEI/AF provocó un encendido de la fluorescencia producto de la alta afinidad AF-RF.
6. El sistema FRET CDs ACEM/QDs CdTe@CA fue utilizado para el desarrollo de un sensor radiométrico de AF obteniéndose un límite de detección de 158 nM. El método de adición estándar fue aplicado satisfactoriamente en una muestra de jugo de naranja, determinándose una concentración de AF de 2.07 μM .
7. El sistema FRET CDs ACEM/VB2 fue utilizado para el desarrollo de un sensor radiométrico de VB2 obteniéndose un límite de detección de 0.025 μM . El método de adición estándar fue aplicado satisfactoriamente en muestras Monster Energy, té verde y vino blanco, determinándose concentraciones de VB2 de 3.81, 1.33 y 1.61 μM , respectivamente.

8. Los estudios de citocompatibilidad a las concentraciones de trabajo, mostraron que incluso después de largos tiempos de incubación con células, la plataforma desarrollada también puede contemplarse para otras aplicaciones de interés biológico, como la detección intracelular y la tinción para microscopía de células vivas.

VII. TRABAJO A FUTURO

- Estudiar la influencia de las modificaciones superficiales en las propiedades de citocompatibilidad de las nanoestructuras obtenidas.
- Evaluar la selectividad de la sonda fluorescente de receptores de folato en presencia de iones metálicos como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} .
- Utilizar la sonda fluorescente para la determinación de los receptores de folato sobre expresados en la superficie de las células de cáncer Hela por microscopia confocal de fluorescencia.

VIII. REFERENCIAS

1. Baptista, F. R.; Belhout, S. A.; Giordani, S.; Quinn, S. J. Recent developments in carbon nanomaterial sensors. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4433-4453.
2. Esteves da Silva, J. C. G.; Gonçalves, H. M. R. Analytical and bioanalytical applications of carbon dots. *Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 1327-1336.
3. Sun, Y. P.; Zhou, B.; Lin, Y.; Wang, W.; Fernando, K. A.; Pathak, P.; Mezziani M. J.; Harruff, B. A.; Wang, X.; Wang, H.; Luo, P. G.; Yang, H.; Kose, M. E.; Chen, B.; Veca, L. M.; Xie, S. Y. Quantum-size carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7756-7757.
4. Pan, D.; Zhang, J.; Li, Z.; Wu, M. Hydrothermal route for cutting graphene sheets into blue-luminescence graphene quantum dots. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 734-738.
5. Tang, J.; Kong, B.; Wu, H.; Xu, M.; Wang, Y.; Wang, Y.; Zhao, D.; Zheng, G. Carbon nanodots featuring efficient FRET for real-time monitoring for drug delivery and two-photon imaging. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 6569-6574.
6. Sk, M. A.; Ananthanarayanan, A.; Huang, L.; Lim, K. H.; Chen, P. Revealing de tunable photoluminescence properties of graphene quantum dots. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2*, 6954-6960.
7. Ding, H.; Yu, S.; Wei, J.; Xiong, J. Full-color light-emitting carbon dots with surface-state-controlled luminescence mechanism. *ACS Nano* **2016**, *10*, 484-491.
8. Wang, J.; Wei, J.; Su, S.; Qiu, J. Novel fluorescence resonance energy transfer optical sensors for vitamin B12 detection using thermally reduced carbon dots. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 501-507.
9. Murphy, C. J.; Coffey, J. L. Quantum dots: A primer. *Appl. Spectrosc.* **2002**, *56*, 16A-27A.
10. Weissleder, R.; Pittet, M. J. Imaging in the era of oncology. *Nature* **2008**, *452*, 580-589.
11. Cao, L.; Mezziani, M. J.; Sahu, S.; Sun, Y. Photoluminescence properties of graphene versus others carbon nanomaterials. *Acc. Chem. Rs.* **2013**, *46*, 171-180.

12. Feng, D.; Song, Y.; Shi, W.; Li, X.; Ma, H. Distinguishing folate-receptor-positive cells from folate-receptor-negative cells using a fluorescence on-off nanoprobe. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 6530-6535.
13. Wang, X.; Morales, A. R.; Urakami, T.; Zhang, L.; Bondar, M. V.; Komatsu, M.; Belfield, K. D. Folate receptor-targeted aggregation-enhanced near-IR emitting silica nanoprobe for one-photon *in vivo* and two-photon *ex vivo* fluorescence bioimaging. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 1438-1450.
14. Zhang, M.; Yu, R.; Chen, J.; Ma, Z.; Zhao, Y. Targeted quantum dots fluorescence probes functionalized with aptamer and peptide for transferrin receptor on tumor cells. *Nanotechnology* **2012**, *23*, 11.
15. Lu, Y. J.; Low, P. S. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 675-693.
16. Xie, L. L.; Tong, W. J.; Yu, D. H.; Xu, Q.; Li, J.; Gao, C. Y. Bovine serum albumine nanoparticles modified with multilayers and aptamers for pH-responsive and targeted anti-cancer drug delivery. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 6053-6060.
17. Gao, X. H.; Cui, Y. Y.; Levenson, R. M.; Chung, L. W. K.; Nie, S. M. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 969-976.
18. Kawashima, N.; Nakayama, K.; Itoh, K.; Itoh, T.; Ishikawa, M.; Biju, V. Reversible dimerization of EGFR revealed by single-molecule fluorescence imaging using quantum dots. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 1186-1192.
19. Pan, J.; Feng, S. S. Targeting and imaging cancer cells by folate-decorated, quantum dots (QDs)-loaded nanoparticles of biodegradable polymers. *Biomaterials* **2009**, *30*, 1176-1183.
20. Low, P. S.; Antony, A. C. Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases. *Adv. Drug Delivery Re.* **2004**, *56*, 1055-1058.
21. Leamon, C. P.; Low, P. S. Folate-mediated targeting from diagnostics to drug and gen delivery. *Drug Discovery Today* **2001**, *6*, 44-51.

22. Zhao, M. X.; Huang, H. F.; Xia, Q.; Ji, L. N.; Mao, Z. W. Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electrooxidation of graphite. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 10290-10297.
23. Yoo, H. S.; Park, T. G. Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. *J. Controlled Release* **2004**, *96*, 273-283.
24. Reddy, J. A.; Dean, D.; Kennedy, M. D.; Low, P. S. Optimization of folate-conjugated liposomal vectors for folate receptor-mediated gene therapy. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 1112-1118.
25. Zhang, Z. W.; Jia, J.; Lai, Y. Q.; Ma, Y. Y.; Weng, J.; Sun, L. P. Conjugating folic acid to gold nanoparticles through glutathione for targeting and detecting cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5528-5534.
26. Li, G. P.; Li, D.; Zhang, L. X.; Zhai, J. F.; Wang, E. K. One step-synthesis of folic acid protected gold nanoparticles and their receptor-mediated intracellular uptake. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9868-9873.
27. Bharali, D. J.; Lucey, D. W.; Jayakumar, H.; Pudavar, H. E.; Prasad, P. N. Folate-Receptor-Mediated Delivery of InP Quantum Dots for Bioimaging Using Confocal and Two-Photon Microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11364-11371.
28. Geszke, M.; Murias, M.; Balan, L.; Medjahdi, G.; Korczynski, J.; Moritz, M.; Lulek, J.; Schneider, R. Folic acid-conjugated core/shell ZnS:Mn/ZnS quantum dots as targeted probes for two photon fluorescence imaging of cancer cells. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 1327-1338.
29. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; WILEY-VCH Verlag GmbH: Weinheim, **2002**; p 35.
30. Xu, X.; Ray, R.; Gu, Y.; Ploehn, H. J.; Gearheart, L.; Raker, K.; Scrivens, W. A. Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12736-12737.
31. Esteves da Silva, J. C. G.; Gonçalves, H. M. R. Analytical and bioanalytical applications of carbon dots. *Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 1327-1336.

32. Liu, R.; Wu, D.; Feng, X.; Müllen, K. Bottom-Up Fabrication of Photoluminescent Graphene Quantum Dots with Uniform Morphology. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15221–15223.
33. Zheng, M.; Ruan, S.; Liu, S.; Sun, T.; Qu, D.; Zhao, H.; Xie, Z.; Gao, H.; Jing, X.; Sun, Z. Self-Targeting Fluorescent Carbon Dots for Diagnosis of Brain Cancer Cells *ACS Nano* **2015**, *9*, 11455-11461.
34. Baker, S. N.; Baker, G. A. Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6726 – 6744.
35. Shen, J.; Zhu, Y.; Yang, X.; Li, C. One-pot hydrothermal synthesis of graphene quantum dots surface-passivated by polyethylene glycol and their photoelectric conversion under near-infrared light. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3686–3699.
36. Lim, S. Y.; Shen, W.; Gao, Z. Carbon quantum dots and their applications. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 362-381.
37. Jin, S. H.; Kim, D. H.; Jun, G. H.; Hong, S. H.; Jeon, S. Tuning the photoluminescence of graphene quantum dots through the charge transfer effect of functional groups. *ACS Nano* **2013**, *7*, 1239-1245.
38. Sk, M. P.; Jaiswal, A.; Paul, A.; Ghosh, S. S.; Chattopadhyay, A. Presence of Amorphous Carbon Nanoparticles in Food Caramels. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 1-5.
39. Jiang, C.; Wu, H.; Song, X.; Ma, X.; Wang, J.; Tan, M. *Talanta* **2014**, *127*, 68–74.
40. Bourlinos, A. B.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Zboril, R.; Georgakilas, V.; Giannelis, E. P. Photoluminescent Carbogenic Dots. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 4539–4541.
41. Bourlinos, A. B.; Stassinopoulos, A.; Anglos, D.; Zboril, R.; Karakassides, M.; Giannelis, E. P. Surface functionalized carbogenic quantum dots. *Small* **2008**, *4*, 455–458.
42. Zhu, H.; Wang, X.; Li, Y.; Wang, Z.; Yang, F.; Yang, X. Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties. *Chem. Commun.* **2009**, 5118–5120.

43. Qu, S.; Wang, X.; Lu, Q.; Liu, X.; Wang, L. A Biocompatible Fluorescent Ink Based on Water-Soluble Luminescent Carbon Nanodots. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12215 –12218.
44. Guo, Y.; Wang, Z.; Shao, H.; Jiang, X. Hydrothermal synthesis of highly fluorescent carbon nanoparticles from sodium citrate and their use for the detection of mercury ions. *Carbon* **2013**, *52*, 583-589.
45. Bhunia, S. K.; Saha, A.; Maity, A. R.; Ray, S. C.; Jana, N. R. Carbon Nanoparticle-based Fluorescent Bioimaging Probes. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1-7.
46. Smith, A. M.; Nie, S. Semiconductor nanocrystals: structure, properties and band gap engineering. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 190-200.
47. Xu, Y.; Wu, M.; Liu, Y.; Feng, X. Z.; Yin, X. B.; He, X. W.; Zhang, Y. K. Nitrogen-doped carbon dots: A facile and general preparation method, photoluminescence investigation and imaging applications. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 2276 – 2283.
48. Zhu, S.; Meng, Q.; Wang, L.; Zhang, J.; Song, Y.; Jin, H.; Zhang, K.; Sun, H.; Wang, H.; Yang, B. Highly photoluminescent carbon dots for multicolor patterning, sensors, and bioimaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1-6.
49. Reimann, S. M.; Manninen, M. Electronic structure of quantum dots. *Rev. Mod. Phys.* **2002**, *74*, 1283-1342.
50. Pan, L.; Sun, S.; Zhang, A.; Jiang, K.; Zhang, L.; Dong, C.; Huang, Q.; Wu, A.; Lin, H. Truly fluorescent excitation-dependent carbon dots and their applications in multicolor cellular imaging and multidimensional sensing. *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 7782–7787.
51. Baruah, U.; Deka, M. J.; Chowdhury, D. Reversible on/off switching of fluorescence via esterification of carbon dots. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 36917–36922.
52. Fu, M.; Ehrat, F.; Wang, Y.; Milowska, K. Z.; Reckmeier, C.; Rogach, A. L.; Stolarczyk, J. K.; Urban, A. S.; Feldmann, J. Carbon dots: a unique fluorescent cocktail of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 6030–6035.

53. Sk, M. A.; Ananthanarayanan, A.; Huang, L.; Lim, K. H.; Chen, P. Revealing the tunable photoluminescence properties of graphene quantum dots. *J. Mater. Chem. C* **2014**, *2*, 6954-6960.
54. Ding, H.; Yu, S.; Wei, J.; Xiong, J. Full-color light-emitting carbon dots with a surface-state-controlled luminescence mechanism. *ACS Nano* **2016**, *10*, 484-491.
55. Biju, V.; Itoh, T.; Ishikawa, M. Delivering quantum dots to cells: bioconjugated quantum dots for targeted and nonspecific extracellular and intracellular imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3031–3056.
56. Luo, P. G.; Sahu, S.; Yang, S.; Sonkar, S. K.; Wang, J.; Wang, H.; LeCroy, G. E.; Cao, L.; Sun, Y. Carbon “quantum” dots for optical bioimaging. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 2116–2127.
57. Ray, S. C.; Saha, A.; Jana, N. R.; Sarkar, R. Fluorescent carbon nanoparticles: synthesis, characterization, and bioimaging application. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 18546-18551.
58. Peng, J.; Gao, W.; Gupta, B. K.; Liu, Z.; Romero-Aburto, R.; Ge, L.; Song, L.; Alemany, L. B.; Zhan, X.; Gao, G.; Vithayathil, S. A.; Kaiparettu, B. A.; Marti, A. A.; Hayashi, T.; Zhu, J.; Ajayan, P. M. Graphene quantum dots derived from carbon fibers. *Nano Lett.* **2012**, *12*, 844–849.
59. Shang, W.; Zhang, X.; Zhang, M.; Fan, Z.; Sun, Y.; Han, M.; Fan, L. The uptake mechanism and biocompatibility of graphene quantum dots with human neural stem cells. *Nanoscale* **2014**, *6*, 5799–5806.
60. Yang, S.; Wang, X.; Wang, H.; Lu, F.; Luo, P. G.; Cao, L.; Mezziani, M. J.; Liu, J.; Liu, Y.; Chen, M.; Huang, Y.; Sun, P. Carbon dots as nontoxic and high-performance fluorescence imaging agents. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 18110-18114.
61. Hola, K.; Bourlinos, A. B.; Kozak, O.; Berka, K.; Siskova, K. M.; Havrdova, M.; Tucek, J.; Safarova, K.; Otyepka, M.; Giannelis, E. P.; Zboril, R. Photoluminescence effects of graphitic core size and surface functional groups in carbon dots: COO⁻ induced red-shift emission. *Carbon* **2014**, *70*, 279–286

62. Fu, C.; Qiang, L.; Liang, Q.; Chen, X.; Li, L.; Liu, H.; Tan, L.; Liu, T.; Ren, X.; Meng, X. Facile synthesis of highly luminescent carbon dots@silica nanorattle for *in vivo* bioimaging. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 46158-46162.
63. Abdullah-Al-Nahain; Lee, J.; In, I.; Lee, H.; Lee, K. D.; Jeong, J. H.; Park, S. Y. Target delivery and cell imaging using hyaluronic acid-functionalized graphene quantum dots. *Mol. Pharmaceutics* **2013**, *10*, 3736-3744.
64. Broussard, J. A.; Rappaz, B.; Webb, D. J.; Brown, C. M. Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 265-281.
65. Periasamy, A. Fluorescence resonance energy transfer microscopy: a mini review. *J. Biomed. Opt.* **2001**, *6*, 287-291.
66. Huang, P.; Lin, J.; Wang, X.; Wang, Z.; Zhang, C.; He, M.; Wang, K.; Chen, F.; Li, Z.; Shen, G.; Cui, D.; Chen, X., Light-Triggered Theranostics Based on Photosensitizer-Conjugated Carbon Dots for Simultaneous Enhanced-Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 5104-5110.
67. Wang, J.; Wei, J.; Su, S.; Qiu, J., Novel fluorescence resonance energy transfer optical sensors for vitamin B12 detection using thermally reduced carbon dots. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 501-507.
68. Tao, H.; Liao, H.; Sun, Ch.; Xie, X.; Zhong, F.; Yi, Z.; Huang, Y. A carbon dots-CdTe quantum dots fluorescence resonance energy transfer system for the analysis of ultra-trace chlortoluron in wáter. *Spectrochim. Acta, Part A* **2015**, *36*, 1328-1334.
69. Liu, H.; Ye, T.; Mao, C. Fluorescent carbon nanoparticles derived from candle soot. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6473 –6475.
70. Zhao, Q.; Zhang, Z.; Huang, B.; Peng, J.; Zhang, M.; Pang, D. Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electrooxidation of graphite. *Chem. Commun.* **2008**, 5116–5118.

71. Nie, H.; Li, M.; Li, Q.; Liang, S.; Tan, Y.; Sheng, L.; Shi, W.; Zhang, S. X. Carbon Dots with Continuously Tunable Full-Color Emission and Their Application in Ratiometric pH Sensing. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 3104–3112.
72. Xu, Q.; Zhao, J.; Liu, Y.; Pu, P.; Wang, X.; Chen, Y.; Gao, C.; Chen, J.; Zhou, H. Enhancing the luminescence of carbon dots by doping nitrogen element and its application in the detection of Fe(III). *J. Mater. Sci.* **2015**, *50*, 2571–2576.
73. Hou, Y. X.; Lu, Q. J.; Deng, J. H.; Li, H. T.; Zhang, Y. Y. One-pot electrochemical synthesis of functionalized fluorescent carbon dots and their selective sensing for mercury ion. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *866*, 69–74.
74. Xu, Q.; Pu, P.; Zhao, J.; Dong, C.; Gao, C.; Chen, Y.; Chen, J.; Liu, Y.; Zhou, H. Preparation of highly photoluminescent sulfur-doped carbon dots for Fe(III) detection. *J. Mater. Chem. A* **2015**, *3*, 542–546.
75. Li, L.; Yu, B.; You, T. Nitrogen and sulfur CO-doped carbon dots for highly selective and sensitive detection of Hg (II) ions. *Biosens Bioelectron* **2015**, *74*, 263–269.
76. Liu, S.; Tian, J.; Wang, L.; Zhang, Y.; Qin, X.; Luo, Y.; Asiri, A. M.; Al-Youbi, A. O.; Sun, X. Hydrothermal treatment of grass: a low-cost, green route to nitrogen-doped, carbon-rich, photoluminescent polymer nanodots as an effective fluorescent sensing platform for label-free detection of Cu (II) ions. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 2037–2041.
77. Dong, Y. Q.; Li, G. L.; Zhou, N. N.; Wang, R. X.; Chi, Y. W.; Chen, G. N. Graphene quantum dot as a green and facile sensor for free chlorine in drinking water. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 8378–8382.
78. Zhou, L.; Lin, Y. H.; Huang, Z. Z.; Ren, J. S.; Qu, X. G. Carbon nanodots as fluorescence probes for rapid, sensitive, and label-free detection of Hg²⁺ and biothiols in complex matrices. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1147–1149.
79. Wang, C.; Wang, C.; Xu, P.; Li, A.; Chen, Y.; Zhuo, K. Synthesis of cellulose-derived carbon dots using acidic ionic liquid as a catalyst and its application for detection of Hg²⁺. *J. Mater. Sci.* **2016**, *51*, 861–867.

80. Qu, K.; Wang, J.; Ren, J.; Qu, X. Carbon Dots Prepared by Hydrothermal Treatment of Dopamine as an Effective Fluorescent Sensing Platform for the Label-Free Detection of Iron (III) Ions and Dopamine. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 7243-7249.
81. Cui, X.; Zhu, L.; Wu, J.; Hou, Y.; Wang, P.; Wang, Z.; Yang, M. A fluorescent biosensor based on carbon dots-labeled oligodeoxyribonucleotide and graphene oxide for mercury (II) detection. *Biosensors and Bioelectronics* **2015**, *63*, 506–512.
82. Jana, J.; Ganguly, M.; Pal, T. Intriguing cysteine induced improvement of the emissive property of carbon dots with sensing applications. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 2394-2403.
83. Deng, J.; Lu, Q.; Hou, Y.; Liu, M.; Li, H.; Zhang, Y.; Yao, S. Nanosensor composed of nitrogen-doped carbon dots and gold nanoparticles for highly selective detection of cysteine with multiple signals. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 2195–2203.
84. Gho, E. J.; Kim, K. S.; Kim, Y. R.; Jung, H. S.; Beack, S.; Kong, W. H.; Scarcelli, G.; Yun, S. H.; Hahn, S. K. Bioimaging of hyaluronic acid derivatives using nanosized carbon dots. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 2554–256.
85. Hsu, P.; Shih, Z.; Lee, C.; Chang, H. Synthesis and analytical applications of photoluminescent carbon nanodots. *Green Chem.* **2012**, *14*, 917–920.
86. Liu, R.; Wu, D.; Liu, S.; Koynov, K.; Knoll, W.; Li, Q. An aqueous route to multicolor photoluminescent carbon dots using silica spheres as carriers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4598–460.
87. Xu, J.; Zhou, Y.; Cheng, G.; Dong, M.; Liu, S.; Huang, C. Carbon dots as a luminescence sensor for ultrasensitive detection of phosphate and their bioimaging properties. *Luminescence* **2015**, *30*, 411-415.
88. Zhuo, Y.; Miao, H.; Zhong, D.; Zhu, S.; Yang, X. One-step synthesis of high quantum-yield and excitation-independent emission carbon dots for cell imaging. *Mater. Lett.* **2015**, *139*, 197-200.
89. Lai, Z.; Yang, X.; Li, A.; Qiu, Y.; Cai, J.; Yang, P. Facile preparation of full-color emissive carbon dots and their applications in imaging of the adhesion of erythrocytes to endothelial cells. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 5259-5264.

90. Havrdova, M.; Hola, K.; Skopalik, J.; Tomankova, H.; Pert, M.; Cepe, K.; Polakova, K.; Tucek, J.; Bourlinos, A. B.; Zboril, R. Toxicity of carbon dots—Effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle. *Carbon* **2016**, *99*, 238-248.
91. Sarkar, S.; Bose, R.; Jana, S.; Jana, N.; Pradhan, N. Doped semiconductor nanocrystals and organic dyes: an efficient and greener FRET system. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 636–640.
92. Xiao, Q.; Huang, S.; Ma, J.; Su, W.; Li, P.; Cui, J., Liu, Y. Systematically investigation of interactions between BSA and different charge-capped CdSe/ZnS quantum dots. *J. Photochem. Photobiol. A* **2012**, *249*, 53-60.
93. Devi, S.; Kaur, A.; Sarkar, S.; Vohra, S.; Tyagi, S. Synthesis and characterization of highly luminescent N-doped carbon quantum dots for metal ion sensing. *Integrated ferroelectrics* **2018**, *186*, 32-39.
94. Yang, W.; Zhang, H.; Lai, J.; Peng, X.; Hu, Y.; Gu, W.; Ye, L. Carbon dots with red-shifted photoluminescence by fluorine doping for optical bio-imaging. *Carbon* **2018**, *128*, 78-85.
95. Dang, D. K.; Chandrasekaran, S.; Ngo, Y. T.; Chung, J. S.; Kim, E. J.; Hur, S. H. One pot solid-state synthesis of highly fluorescent N and S co-doped carbon dots and its use as fluorescent probe for Ag⁺ detection in aqueous solution. *Sens. Actuators, B* **2018**, *255*, 3284-3291.
96. Hassan, M.; Gomes, V. G.; Dehghani, A.; Ardekani, S. M. Engineering carbon quantum dots for photomediated theranostics. *Nano Res.* **2018**, *11*, 1-41.
97. Iqbal, A.; Iqbal, K.; Xu, L.; Li, B.; Gong, D.; Liu, X.; Guo, Y.; Liu, W.; Qin, W.; Guo, H. Heterogeneous synthesis of nitrogen-doped carbon dots prepared via anhydrous citric acid and melamine for selective and sensitive turn on-off-on detection of Hg (II), glutathione and its cellular imaging. *Sens. Actuators, B*, **2018**, *255*, 1130-1138.
98. Li, Z.; Zhang, J.; Li, Y.; Zhao, S.; Zhang, Y.; Bi, J.; Liu, G.; Yue, Z. Carbon Dots Based Photoelectrochemical Sensors for Ultrasensitive Detection of Glutathione

- and Its Applications in Probing of Myocardial Infarction. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *99*, 251-258.
99. Liu, X.; Yang, Ch.; Zheng, B.; Dai, J.; Yan, L.; Zhuang, Z.; Du, J.; Guo, Y.; Xiao, D. Green anhydrous synthesis of hydrophilic carbon dots on large-scale and their application for broad fluorescent pH sensing. *Sens. Actuators, B*, **2018**, *255*, 572-579.
100. Liu, W.; Wang, X.; Wang, Y.; Li, J.; Shen, D.; Kang, Q.; Chen, L. Ratiometric fluorescence sensor based on dithiothreitol modified carbon dots-gold nanoclusters for the sensitive detection of mercury ions in water samples. *Sens. Actuators, B*, **2018**, *262*, 810-817.
101. Zu, F.; Yan, F.; Bai, Z.; Xu, J.; Wang, Y.; Huang, Y.; Zhou, X. The quenching of the fluorescence of carbon dots: A review on mechanisms and applications. *Microchim. Acta*, **2017**, *184*, 1899-1914.
102. Oluwatobi, O.; Daramola, O. A.; Ncapayi V. A Facile Green Synthesis of Type II Water Soluble CdTe/CdS Core Shell Nanoparticles. *Mater. Lett.* **2014**, *133*, 9-13.
103. Ramírez-Herrera, D. E. Desarrollo de semiconductores nanocristalinos que emiten en el infrarrojo cercano y su evaluación en sistemas de transferencia de energía. Tesis de Maestría en Ciencias en Química, Instituto Tecnológico de Tijuana, Centro de Graduados e Investigación en Química, Tijuana, B. C., **2013**, p 62.
104. Yu, W. W.; Qu, L.; Guo, W.; Peng, X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854-2860.
105. Wang, J.; Su, S.; Wei, J.; Bahgi, R.; Hope-Weeks, L.; Qiu, J.; Wang, S. Ratiometric sensor to detect riboflavin via fluorescence resonance energy transfer with ultra-high sensitivity. *Physica E* **2015**, *72*, 17-24.
106. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer: New York, **2006**; p 9 y 54.

107. García, L.; Blázquez, S.; San Andrés, M.P.; Vera, S. Determination of thiamine, riboflavin and pyridoxine in pharmaceuticals by synchronous fluorescence spectrometry in organized media. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *434*, 193–199.
108. Ma, Q.; Song, J.; Zhang, S.; Wang, M.; Guo, Y.; Dong, C. Colorimetric detection of riboflavin by silver nanoparticles capped with β -cyclodextrin-grafted citrate. *Colloids Surf. B* **2016**, *148*, 66–72.
109. Mattivi, F.; Monetti, A.; Vrhovšek, U.; Tonon, D.; Andrés-Lacueva, C. High-performance liquid chromatographic determination of the riboflavin concentration in white wines for predicting their resistance to light. *J. Chromatogr. A* **2000**, *888*, 121–127.
110. Zougagh, M.; Ríos, A. Supercritical fluid extraction as an on-line clean-up technique for determination of riboflavin vitamins in food samples by capillary electrophoresis with fluorimetric detection. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 3213–3219.
111. Li, H.; Shao, F.-Q.; Zou, S.-Y.; Yang, Q.-J.; Huang, H.; Feng, J.-J.; Wang, A.-J. Microwave-assisted synthesis of N,P-doped carbon dots for fluorescent cell imaging. *Microchim. Acta* **2016**, *183*, 821–826.
112. Ramírez-Herrera, D.; Rodríguez-Velázquez, E.; Alatorre-Meda, M.; Paraguay-Delgado, F.; Tirado-Guizar, A.; Taboada, P.; Pina-Luis, G. NIR-emitting alloyed CdTeSe QDs and organic dye assemblies: A nontoxic, stable, and efficient FRET system. *Nanomaterials* **2018**, *8*, 231.
113. Zhang, Z.; Duan, Y.; Yu, Y.; Yan, Z.; Chen, J. Carbon quantum dots: Synthesis, characterization, and assessment of cytocompatibility. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26*, 213.
114. Xian, W. *A Laboratory Course in Biomaterials*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, **2010**; p. 115.
115. Assad, M.; Jackson, N. Biocompatibility evaluation of orthopedic biomaterials and medical devices: A review of safety and efficacy models. In *Encyclopedia of Biomedical Engineering*; Narayan, R., Ed.; Elsevier: Oxford, UK, **2019**; pp. 281–309.

116. Piluso, S.; Flores Gomez, D.; Dokter, I.; Moreira Texeira, L.; Li, Y.; Leijten, J.; van Weeren, R.; Vermonden, T.; Karperien, M.; Malda, J. Rapid and cytocompatible cell-laden silk hydrogel formation via riboflavin-mediated crosslinking. *J. Mat. Chem. B* **2020**, *8*, 9566–9575.
117. Ferri, G.; Digiaco, L.; D'Autilia, F.; Durso, W.; Caracciolo, G.; Cardarelli, F. Time-lapse confocal imaging datasets to assess structural and dynamic properties of subcellular nanostructures. *Sci. Data* **2018**, *5*, 180191.
118. Phelps, M.A.; Foraker, A.B.; Gao, W.; Dalton, J.T.; Swaan, P.W. A novel rhodamine-riboflavin conjugate probe exhibits distinct fluorescence resonance energy transfer that enables riboflavin trafficking and subcellular localization studies. *Mol. Pharm.* **2004**, *1*, 257–266.