



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES
AVANZADOS, S.C.**

DEPARTAMENTO DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**“Obtención de un marcador fluorescente mediante la
funcionalización de nanodiamantes con ZnS”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA DE MATERIALES**

**Presenta:
Lic. Lucero Evelia Acuña Aguilar**

**Asesores:
Dr. Erasmo Orrantia Borunda
Dr. Mario Miki Yoshida**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque toda la sabiduría viene de él.

A mi esposo Luis Mauricio Pérez Molinar por todo su apoyo, amor y por siempre animarme a hacer lo que me gusta.

A mi familia, por siempre escucharme, aconsejarme y estar para mí.

A mis compañeros de estudio por lo que aprendí de todos ustedes.

Un agradecimiento muy especial a los doctores: Dr. Erasmo Orrantia Borunda y al Dr. Mario Miki Yoshida, por su acertada asesoría y dirección en este trabajo.

A los miembros del comité evaluador por su desinteresado trabajo de revisión y por sus recomendaciones.

Expreso mi agradecimiento al Centro de Investigación en Materiales Avanzados C.V por las facilidades otorgadas para llevar a cabo este proyecto de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero otorgado para llevar a cabo este trabajo.

Índice

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	8
2.1 Nanotecnología y sus campos de aplicación.	8
2.2 Nanomateriales	8
2.3 Nanopartículas - Nanodiamantes (ND) y puntos cuánticos.....	9
2.3.1 Sulfuro de Zinc (ZnS)	12
2.4 Marcadores fluorescentes.....	14
2.5 Aplicaciones de los marcadores fluorescentes	14
2.6 Fenómeno de Fluorescencia.....	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVO	20
5.1 General	20
5.2 Específicos.....	20
6. METODOLOGÍA.....	21
6.1 Reactivos y materiales	21
6.2 Determinación de la concentración de impurezas.....	21
6.3 Purificación de los Nanodiamantes	22
6.4 Funcionalización del complejo ND-ZnS y ND+ZnS.....	22
6.4.1 Funcionalización de ND-ZnS	23
6.4.2 Funcionalización de ND+ZnS	24
6.5 Caracterización del Nanodiamante, sulfuro de zinc, y los complejos ND-ZnS y ND+ZnS.	25
6.5.1 Morfología, dispersión, composición química y tamaño de partícula. ...	25

6.5.2 Estructura cristalina, identificación de fase, estructura molecular, identificación de grupos funcionales y cuantificación de grupos COOH.....	27
6.5.3 Espectroscopia de Absorbancia y Fluorescencia.	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
7.1 Pureza del nanodiamante y composición elemental.	29
7.2 Morfología, dispersión, carga y tamaño de partícula.....	33
7.3 Identificación de la estructura cristalina, estructura molecular, identificación de grupos funcionales y cuantificación de grupos COOH.	40
7.4 Absorbancia y fluorescencia	48
7.5 Mecanismos del proceso de funcionalización	52
8.CONCLUSIONES.....	53
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

Índice de Figuras

Figura 1 Grupos presentes en la superficie de nanodiamante (Krueger & Lang, 2012)	11
Figura 2 Los grupos funcionales de la superficie del nanodiamante pueden interactuar electrostáticamente o por medio de enlaces con otras moléculas, por ejemplo, proteínas.....	11
Figura 3 Estructura cristalina del ZnS a) blenda o esfalerita y b) wurtzita.....	13
Figura 4 Diagrama de Jablonski que ilustra los procesos involucrados en la creación de un estado singlete electrónico excitado por absorción óptica (1) y posterior emisión de fluorescencia (3).....	17
Figura 5 Diagrama de energía absorbida y emitida.....	18
Figura 6 Diagrama de funcionalización del ND-ZnS.....	23
Figura 7 Diagrama de la síntesis del punto cuántico de ZnS.	24
Figura 8 Diagrama de funcionalización del ND + ZnS.....	25
Figura 9 Preparación de muestras en MET para una suspensión.....	26
Figura 10 Titulación de Boehm.....	28
Figura 11 Composición elemental para a) nanodiamantes en la membrana de SiOx, b) ZnS, c) ND-Zn y d) ND+ZnS.....	32
Figura 12 Distribución del tamaño de partícula de los ND.	33
Figura 13 a) Distancia interplanar del ND b) Patrón de difracción del ND, c) Distancias interplanares del ZnS fase wurtzita y b) Imagen de campo oscuro para ver el tamaño de partícula del punto cuántico de ZnS con Microscopía Electrónica de Trasmisión.....	35
Figura 14 En a) Dispersión de los nanodiamantes en la membrana de SiOx y b) Morfología de los nanodiamantes c) ZnS d) ND-ZnS y e) ND+ZnS.	38
Figura 15 Micrografías del ND+ZnS donde se indican en a) las distancias interplanares y en b) el tamaño del ND en el complejo ND+ZnS funcionalizado. .	39
Figura 16 a) Difractograma del Nanodiamante y b) difractograma del ZnS.....	41
Figura 17 Difractograma de a) ND-ZnS y b) ND+ZnS.....	42
Figura 18 Espectro raman del Nanodiamante.....	43

Figura 19 <i>Espectro FTIR de a) nanodiamante, b) ZnS, c) ND-ZnS y d) ND+ZnS.</i>	45
Figura 20 <i>Espectros de absorbancia del ND, ZnS, ND-ZnS y ND+ZnS.</i>	49
Figura 21 <i>Espectros de Emisión - Excitación de a) ND, b) ZnS, c) ND-ZnS y d) ND+ZnS.</i>	50
Figura 22 <i>Espectro de fluorescencia de los diferentes compuestos.</i>	51

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Concentración de impurezas en la dispersión del nanodiamante antes y durante el dializado.</i>	29
Tabla 2 <i>Concentraciones y porcentaje de remoción de Na, S y Zn con el centrifugado.</i>	30
Tabla 3 <i>Concentraciones y porcentaje de remoción de Na, S y Zn con el dializado</i>	30
Tabla 4 <i>Radio hidrodinámico y potencial Z.</i>	36
Tabla 5 <i>Ángulos y planos correspondientes al diamante de la.</i>	41
Tabla 6 <i>Ángulos y planos correspondientes a la fase wurtzita del ZnS de la.</i>	42
Tabla 7 <i>Enlace en base al número de onda y tipo de vibración en el análisis de FTIR.</i>	46
Tabla 8 <i>Grupos carboxílicos del ND antes y después de la funcionalización.</i>	47

1. RESUMEN

Los recientes avances en marcadores señalan el uso de nanomateriales con el objetivo de mejorar sus propiedades, por lo que para la elaboración del marcador fluorescente se funcionalizaron nanodiamantes con puntos cuánticos de sulfuro de zinc, considerando las ventajas individuales de ambos constituyentes. Los nanodiamantes contienen varios grupos funcionales en su superficie, tienen alta área específica, son liposolubles y biocompatibles, mientras que el sulfuro de zinc (ZnS), es un semiconductor que presenta alta fluorescencia en longitudes de onda del ultravioleta.

La caracterización del nanodiamante (ND) sin funcionalizar y una vez funcionalizado se llevó a cabo por varias técnicas las cuales incluyeron, Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) con Sistema de Energía Dispersiva (EDS), Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), análisis elemental y espectroscopia de fluorescencia, entre otras.

Se realizaron dos procesos de síntesis para la obtención del complejo funcionalizado, una denominada ND-ZnS y otra ND+ZnS, encontrando similares intensidades de fluorescencia para ambas síntesis, las reacciones para generar el complejo ND-ZnS se llevan a cabo en una sola etapa, mientras que la formación del complejo ND+ZnS requiere de dos etapas.

De las síntesis utilizadas, la primera genera menos residuos que la segunda y requiere de un menor número de reacciones, por lo que sería la síntesis a elegir, además el incremento relativo de la fluorescencia es 76.3% mayor para los compuestos funcionalizados con respecto a los nanodiamantes y puntos cuánticos individuales.

El marcador fluorescente obtenido es un marcador silencioso, ya que presenta emisión en el espectro del ultravioleta.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1 Nanotecnología y sus campos de aplicación.

La nanotecnología es un campo de las ciencias y la tecnología en las que convergen la ingeniería, química, biología, medicina y otras.

El científico Japonés Norio Taniguchi, utilizó por primera vez el término nanotecnología en el año 1974, en la que define a la nanotecnología como el procesamiento, separación y manipulación de materiales átomo por átomo (Avila, 2016). La nanotecnología es un campo muy amplio y heterogéneo en el que se diseñan, producen, estudian y aplican estructuras, componentes y sistemas manteniendo un control sobre sus elementos constituyentes (átomos, moléculas o macromoléculas, clúster, etc.) a nivel nanométrico; de tal manera que dichas estructuras, componentes o sistemas posean al menos una propiedad característica nueva o mejorada debido al tamaño de sus cristales o granos constituyentes (Quispe, 2009).

Los materiales, partículas y estructuras estudiados por esta disciplina deben tener al menos una dimensión espacial inferior a los 100 nm, y se denominan nanomateriales. A esta escala se observan fenómenos totalmente nuevos, optimizados y se rigen bajo las leyes de la mecánica cuántica. Estas propiedades dependen en mayor medida de la superficie del material, y entre más pequeña sea la partícula, tendrá mayor área específica, la cual es una propiedad de los sólidos que hace referencia a la relación entre el área superficial total y la masa del sólido, volumen en bulk o área de la sección transversal (IUPAC, 1997).

2.2 Nanomateriales

Los nanomateriales son uno de los productos principales de la nanotecnología y tienen varias aplicaciones en áreas como electrónica, cosmética, textiles,

informática, protección al medioambiente y cuidado de la salud. La descripción de un nanomaterial debe incluir el tamaño medio de sus partículas.

Los nanomateriales pueden ser orgánicos, inorgánicos o híbridos y presentarse como agregados atómicos, partículas, fibras, películas delgadas, materiales compuestos, todos a nivel de la nanoescala (Quispe, 2009), donde destacan los compuestos base carbono, los cuales han sido y siguen siendo ampliamente estudiados y utilizados (Public Health, 2009).

2.3 Nanopartículas - Nanodiamantes (ND) y puntos cuánticos.

Las nanopartículas, funcionalizadas con diferentes biomoléculas, han sido exitosamente utilizadas en varias aplicaciones debido a su versatilidad, facilidad de síntesis química, baja toxicidad, y propiedades biofísicas únicas (Samantha et-al, 2018).

La capacidad excepcional de los átomos de carbono para formar enlaces covalentes fuertes en diferentes estados de hibridación, es decir, sp , sp^2 y sp^3 , les permiten construir una amplia gama de estructuras químicas como los nanodiamantes, fullerenos, nanotubos de carbono, grafenos, etc. (Tapia et-al., 2016).

Dentro de las nanopartículas destacan los nanodiamantes, los cuales han sido objeto de estudio para aplicaciones industriales, médicas, de diagnóstico, electrónicas, entre otras (Nunn et-al., 2017).

Las partículas de carbono pueden ser pasivadas superficialmente por moléculas orgánicas e inorgánicas para exhibir fluorescencia en el espectro visible con solo excitar un par de fotones, esto nos lleva a lograr más altos rendimientos cuánticos de fluorescencia (Sun et-al., 2008). Los nanodiamantes presentan fluorescencia la cual se debe a los defectos en la red cristalina, causados principalmente por la sustitución de un átomo de carbono del nanodiamante por un nitrógeno y esto depende directamente del método de síntesis.

Por otra parte, el tamaño del nanodiamante es importante, ya que se ha demostrado que de 4 a 6 nm es biocompatible (Gupta, 2017); han sido utilizados como suspensiones coloidales de partículas con estas dimensiones y se ha observado que son menos tóxicos en el cuerpo humano que otros compuestos alotrópicos de carbono (Mochalin et-al., 2012).

Afortunadamente hasta ahora, no se han reportado efectos citotóxicos para el caso de nanodiamantes, lo cual se ha demostrado de forma consistente tanto en estudios *in vitro* (cultivo de células) (Schrand, Hens, & Shenderova, 2009) como *in vivo* (animales) (Cao et al., 2012). Más importante aún, no se ha demostrado que la funcionalización de la superficie adicione toxicidad a los nanodiamantes (Lai & Barnard, 2015).

Además, se sabe que la fracción de la energía superficial aumenta con la disminución del tamaño de partícula (Spitsyn et-al., 2005) lo que permite que haya mayores fuerzas de atracción y repulsión entre las moléculas. Otra característica importante es que los nanodiamantes son estables y se dispersan en agua, tienen escalabilidad y presentan elevada absorción (Landeros-Martinez et-al., 2017).

Una de las características clave de los nanodiamantes (ND), en comparación con otras nanopartículas, es su química de superficie que puede abrir amplias posibilidades para la funcionalización.

Los nanodiamantes pueden ser producidos por varios métodos de síntesis, los más comunes son por detonación (DNDs), donde se obtienen tamaños de partículas con un rango de 3 – 6 nm, por Alta Presión Alta Temperatura (HPHT), para realizar películas sintéticas de diamantes, obteniendo cristales más grandes, más definidos y con menos defectos (Petit & Puskar, 2018), y por deposición de vapor químico (CVD), por sus siglas en inglés, el cual es un método que se basa en crear un plasma de carbono encima de un substrato sobre el cual los átomos de carbono se depositan. Actualmente, los nanodiamantes pueden ser sintetizados en gran cantidad y a un costo relativamente bajo por HPHT (Alfaro, et-al, 2006)

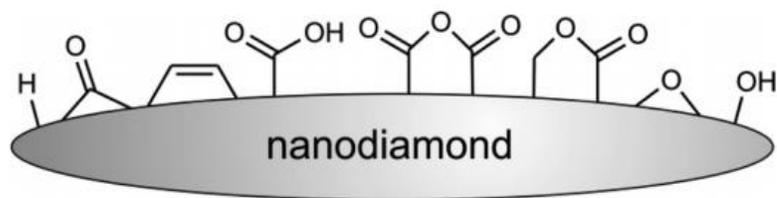


Figura 1 Grupos presentes en la superficie de nanodiamante (Krueger & Lang, 2012) .

Los nanodiamantes son partículas de gran interés debido a su tamaño y los numerosos grupos funcionales que se pueden generar en su superficie, como se observa en la Figura 1 (Pichot et-al., 2017). Todas estas características permiten la modificación de su superficie con grupos funcionales a través de enlaces covalentes y no covalentes para la unión de moléculas que son agentes relevantes en estas nanopartículas ya que pueden cambiar sus propiedades individuales y tener diversas aplicaciones. Estos grupos funcionales en el ND también pueden interactuar electrostáticamente o químicamente con otras moléculas para llevar a cabo una interacción específica. La interacción electrostática o los enlaces de hidrogeno entre alguna molécula específica y un grupo carboxílico o hidroxilo del ND son ejemplos de lo que se denomina funcionalización (Landeros-Martinez et-al., 2017), como se muestra en la Figura 2.

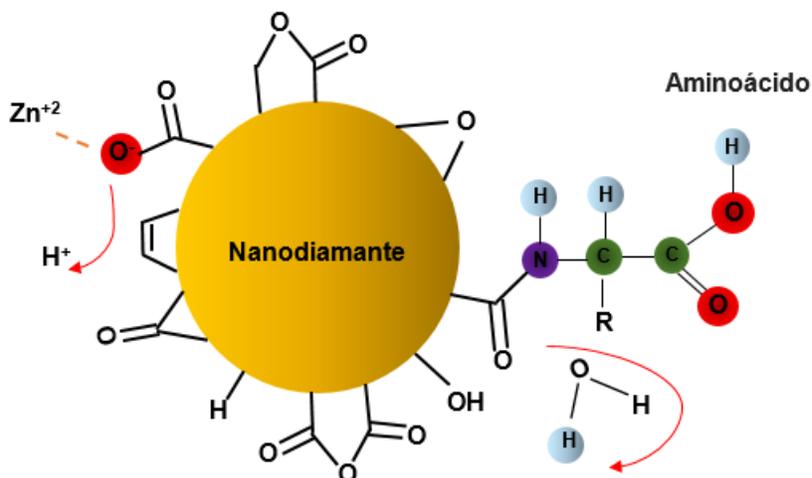


Figura 2 Los grupos funcionales de la superficie del nanodiamante pueden interactuar electrostáticamente o por medio de enlaces con otras moléculas, por ejemplo, proteínas.

La funcionalización consiste en la modificación de la superficie, mediante técnicas químicas o físicas, generando grupos funcionales, sitios con carga o radicales como carboxilos, hidroxilos, aminos, que luego pueden reaccionar con moléculas tales como antibióticos, proteínas, metales, moléculas de reconocimiento, moléculas fluorescentes, puntos cuánticos etcétera.

Otra nanopartícula importante son los puntos cuánticos o quantum dots (QD), estos son un tipo especial de semiconductor, con diámetros que oscilan entre 2 nm y 6 nm. Debido a este tamaño, exhiben propiedades específicas diferente de aquellos materiales en bulk. Cuando estos puntos cuánticos son irradiados con cierta energía externa como luz o calor, emiten un electrón de la banda de valencia a la banda de conducción, permitiendo que al regresar a la banda de valencia emita radiación en una longitud de onda característica y fija (Quispe, 2009). Al alterar el tamaño de cristal con la adición o sustracción de átomos, se modifica la distancia entre las bandas de conducción y de valencia, y con ello la energía asociada a la transición de los electrones, haciendo posible controlar el color de la luz emitida por el punto cuántico.

Los puntos cuánticos se utilizan en una amplia gama de aplicaciones, como en bioimagen de células vivas, células fijas y etiquetado de tejidos y biosensores de alto rendimiento (Verma et al., 2017). Su alto brillo, duradero, y la luminiscencia los distingue de los colorantes de fluorescencia convencionales y están siendo desarrollados para una variedad de aplicaciones biológicas, incluyendo ensayos fluorescentes para drogas, detección de enfermedades, seguimiento de proteínas individuales e informes intracelulares.

2.3.1 Sulfuro de Zinc (ZnS)

Dentro de los puntos cuánticos es de particular interés el sulfuro de zinc (ZnS), la cual es una sal inorgánica con propiedades fotoluminiscentes, esto es, brilla en la oscuridad al recibir un estímulo de luz o calor, especialmente luz ultravioleta y también presenta bajos índices de radiactividad.

Este punto cuántico presenta dos tipos de estructura, blenda o esfalerita, que corresponde a la estructura cristalina cubica centrada en las caras y wurtzita que es la estructura hexagonal, mostradas en la Figura 3 (Labiadh & Hidouri, 2017).

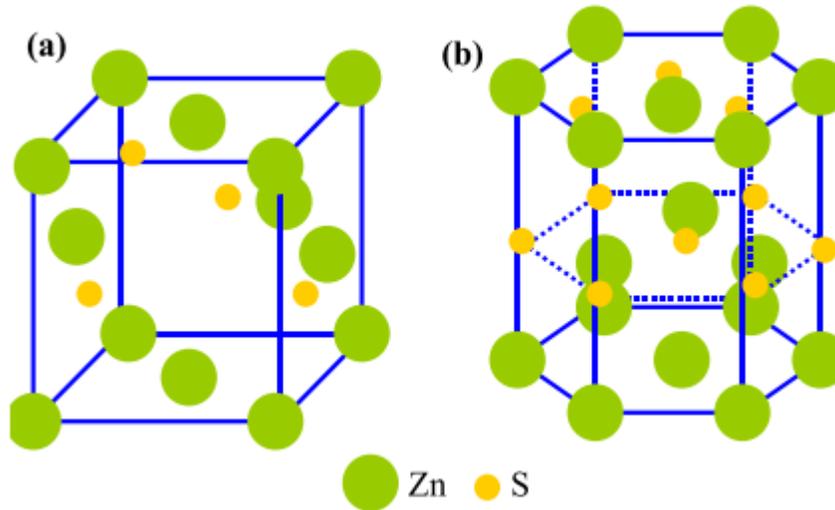


Figura 3 Estructura cristalina del ZnS a) blenda o esfalerita y b) wurtzita.

Las nanopartículas de ZnS con diferentes biomoléculas pueden generar diferencias en la intensidad de fluorescencia y emisión fluorescente (Li et-al., 2009), una forma de medir esta emisión fluorescente es con el rendimiento cuántico, el cual es la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas.

El rendimiento cuántico de fluorescencia y emisión de longitud de onda están muy influenciados por el tamaño de partícula, que está directamente relacionado con su método de preparación, la naturaleza y la proporción del elemento dopante (Labiadh & Hidouri, 2017).

2.4 Marcadores fluorescentes

Las nanopartículas como el nanodiamante cumplen con características que los hacen aptos para su aplicación como marcadores fluorescentes, si son funcionalizados con sulfuro de zinc o compuestos con características luminiscentes.

Un marcador fluorescente es una molécula que puede ser detectada por algún método analítico u óptico, su estructura debe ser simple, contener grupos aceptores y donantes con presencia de un grupo reactivo apropiado y específico que permita una conexión fácil a macromoléculas.

Los puntos cuánticos son utilizados como una nueva clase de marcadores fluorescentes, debido a que pueden ser excitados por fuentes de luz que cubren un amplio rango espectral, desde el ultravioleta hasta la región del infrarrojo cercano. Esta clase de marcadores presenta grandes ventajas sobre los convencionales, como alto potencial de detección, emisión de fluorescencia en longitudes de onda multicolores, alta fotoestabilidad y sencillos procedimientos de preparación (Silva do Nascimento et al., 2019).

Los marcadores fluorescentes pueden aplicarse como marcadores silenciosos porque son invisibles a la luz ambiente, pero pueden ser fácilmente detectados por su fluorescencia, lo que ofrece muchas ventajas respecto a los productos de color.

Las características físicas y químicas más importantes para los marcadores son la transferencia de carga intramolecular, fluorescencia brillante, rendimiento cuántico, estabilidad química, así como una fuerte absorción y emisión bajo excitación (Krawczyk, et-al, 2018).

2.5 Aplicaciones de los marcadores fluorescentes

Los marcadores se utilizan regularmente para detectar el fraude y la adulteración en el combustible, así como para rastrear los productos en una cadena de distribución. Silva y su equipo de trabajo probaron el CdSe, que son nanocristales

fluorescentes semiconductores o puntos cuánticos, como una nueva clase de marcadores de combustible. Esta clase de marcadores presenta grandes ventajas sobre los convencionales, como el potencial de detección alto, la emisión de fluorescencia en longitudes de onda multicolores, fotoestabilidad alta y procedimientos de preparación sencillos (Silva do Nascimento et al., 2019).

El marcador usualmente consiste en una molécula agregada al aceite que puede ser detectada por algún método analítico. El método de detección puede ser por absorción electrónica o por espectroscopia de fluorescencia.

Debido a que el CdSe puede ser excitado por un amplio rango espectral, se evita con esto, la interferencia de la autofluorescencia en la región azul de las moléculas orgánicas de combustible, que pueden surgir bajo la excitación UV.

Un marcador ideal debe cumplir con varios requisitos técnicos para ser aceptado comercialmente. Según la literatura, el marcador deber ser una sustancia cuantitativamente identificable con una concentración no mayor a 1 mg kg^{-1} cuando se agrega al combustible (Industry Meeting for Sustainability, 2012). Este criterio garantiza que el marcador no interfiere con características fisicoquímicas del combustible o con el manejo seguro de este (Silva do Nascimento et al., 2019). También la estabilidad del nanomarcador a lo largo del tiempo es un tema muy importante para la comercialización.

En bioquímica y medicina la fluorescencia es usada generalmente como un modo no destructivo de moléculas biológicas usando la emisión fluorescente a una frecuencia específica sin necesidad de luz de excitación, pues muchos componentes celulares son fluorescentes naturalmente (fenómeno conocido como fluorescencia intrínseca o autofluorescencia), de hecho, una proteína u otro componente pueden ser marcados con una tinta fluorescente especial, lo que tiene muchas aplicaciones biológicas (Ecured, 2012)

El uso de la tecnología de bioimágenes de células vivas está limitada debido al difícil acceso a pruebas de fluorescencias adecuadas y permeables a las células. Son

particularmente deseables los marcadores con tolerancia no tóxica por parte de las células vivas y la profundidad de penetración en los tejidos vivos.

También, los puntos de carbono, conocidos como carbon dots, pueden ser funcionalizados en su superficie con alguna sal inorgánica, como el ZnS. Cao y su equipo de trabajo evaluaron la fluorescencia de los puntos de carbono en bioimagen óptica en ratones, dando una nueva clase de agentes de contraste de alto rendimiento y no tóxicos para la bioimagen óptica (Cao et al., 2012).

Esto es importante ya que la localización de tumores en etapas tempranas permite llevar a cabo una extirpación inmediata. Para conseguir la localización, hay que recubrir la superficie del punto cuántico con moléculas biológicas (biorreceptores) con afinidad hacia un compuesto específico. Cuando los puntos cuánticos se acercan a una muestra que contiene dichos compuestos específicos, ambos se unen, pudiéndose detectar la interacción mediante la iluminación de los nanocristales con luz ultravioleta y observando su emisión característica. Debido a la cantidad de colores en que puede emitir, los puntos cuánticos se pueden combinar para detectar diversas sustancias, células tumorales, antígenos, etc., de forma simultánea (Quispe, 2009).

Las biomoléculas pueden marcarse con un grupo químico fluorescente (fluorocromo) mediante una reacción química simple, lo cual permite una detección sensible y cuantitativa de la molécula.

Otra aplicación de los marcadores fluorescentes es en la detección de ADN, el compuesto bromuro de etidio, libre de cambiar su conformación en disolución, tiene poca fluorescencia. La fluorescencia del bromuro de etidio se aumenta cuando se une al ADN, de tal forma que este compuesto es muy útil para visualizar la localización de fragmentos de ADN en el método de electroforesis en geles de agarosa.

También, diversas moléculas biológicas tienen fluorescencia intrínseca y, por tanto, pueden ser empleadas sin necesidad de unirles a una etiqueta química. Algunas veces, esta fluorescencia intrínseca cambia cuando la molécula se encuentra en un ambiente específico, de tal forma que la distribución o el ligamiento de la molécula

pueden ser medidos. La bilirrubina, por ejemplo, es altamente fluorescente cuando se une a la albúmina sérica en un sitio específico.

El petróleo emite fluorescencia en un rango de colores, desde el marrón mate para aceites pesados y alquitrán hasta el amarillento y blanco azulado para los aceites muy livianos y condensados.

En ciencias forenses, las huellas dactilares pueden visualizarse con compuestos fluorescentes como la ninhidrina (Skoog, 2012).

2.6 Fenómeno de Fluorescencia

La fluorescencia es un tipo particular de luminiscencia que caracteriza a las sustancias que son capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir esa energía en forma de radiación de longitud de onda diferente (Holler F.J, 2006)

Este proceso es el resultado de tres etapas que se produce en ciertas moléculas como los fluoróforos, el proceso responsable de la fluorescencia de las sondas fluorescentes y otros fluoróforos se indica mediante el diagrama de estado electrónico simple (diagrama de Jablonski) que se muestra en la Figura 4 (Albani, 2007).

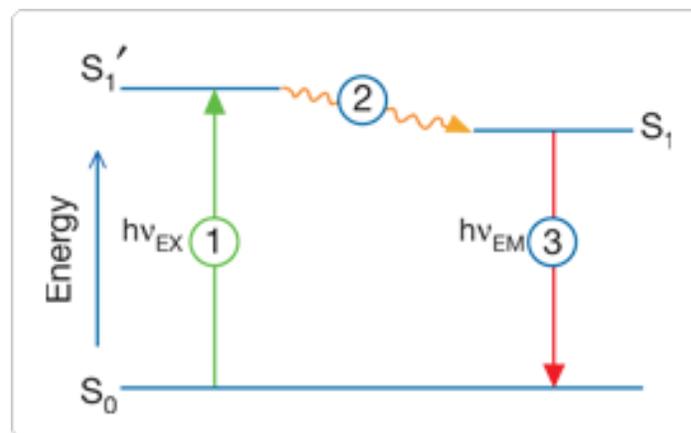


Figura 4 Diagrama de Jablonski que ilustra los procesos involucrados en la creación de un estado singlete electrónico excitado por absorción óptica (1) y posterior emisión de fluorescencia (3).

En la etapa uno que corresponde a la excitación, un fotón de energía $h\nu_{EX}$ es suministrado por una fuente externa como una lámpara incandescente o un láser y es absorbido por el fluoróforo, creando un estado singlete electrónico excitado (S1'). Este proceso distingue la fluorescencia de la quimioluminiscencia, en la cual el estado de excitación es creado por una reacción química (Albani, 2007)

En la etapa dos, el estado de excitación existe durante un tiempo finito (típicamente 1–10 nanosegundos, esto lo diferencia de la fosforescencia). Durante este tiempo, el fluoróforo experimenta cambios conformacionales y también está sujeto a una multitud de posibles interacciones con su entorno molecular. Estos procesos tienen dos consecuencias importantes.

Primero, la energía de S1 'se disipa parcialmente, produciendo un estado excitado singlete relajado (S1) a partir del cual se origina la emisión de fluorescencia. Segundo, no todas las moléculas inicialmente excitadas por absorción (Etapa 1) regresan al estado fundamental (S0) por emisión de fluorescencia. Otros procesos, como el enfriamiento por colisión, la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) y el cruce entre sistemas también pueden despoblar S1. El rendimiento cuántico de fluorescencia, que es la relación entre el número de fotones de fluorescencia emitidos (Etapa 3) y el número de fotones absorbidos (Etapa 1), es una medida de la extensión relativa en que ocurren estos procesos.

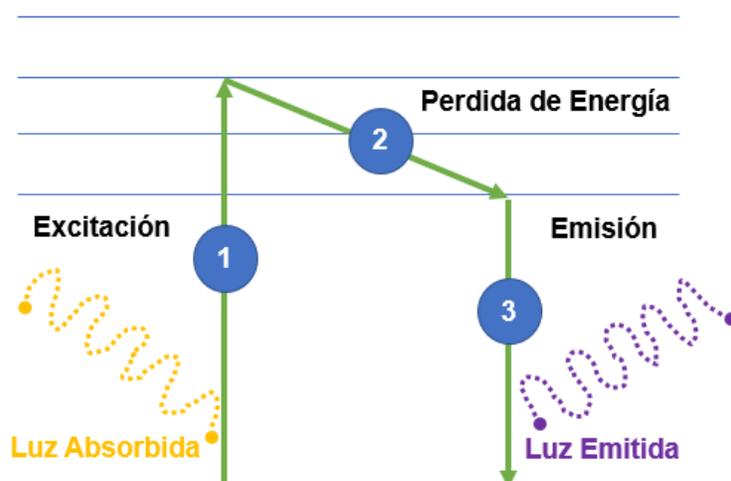


Figura 5 Diagrama de energía absorbida y emitida.

Finalmente, en la etapa tres ocurre la emisión de fluorescencia, donde se emite un fotón de energía $h\nu_{EM}$, que devuelve el fluoróforo a su estado fundamental S_0 . Debido a la disipación de energía durante la vida útil del estado excitado, la energía de este fotón es más baja como se muestra en la Figura 5 y, por lo tanto, de mayor longitud de onda que la del fotón de excitación $h\nu_{EX}$.

La diferencia en energía o longitud de onda representada por $(h\nu_{EX} - h\nu_{EM})$ se denomina cambio de Stokes, el cual es fundamental para la sensibilidad de las técnicas de fluorescencia (Albani, 2007).

En general las sustancias fluorescentes absorben energía en forma de radiación electromagnética de onda corta, es decir, alta frecuencia, por ejemplo, radiación gamma, rayos x, ultravioleta etc., y luego la emiten nuevamente a una longitud de onda más larga, o baja frecuencia, como el espectro visible (Davidson, 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a sus características químicas superficiales y de biocompatibilidad, los nanodiamantes son una excelente alternativa para la funcionalización con puntos cuánticos como el ZnS para ser utilizados como marcadores fluorescentes o moléculas señal, ya que estos presentan aplicaciones en diferentes áreas, como lo es medicina, biotecnología, electrónica, entre otras.

En el momento actual, en la búsqueda bibliográfica realizada, no se ha encontrado reportado en la literatura la interacción de nanodiamantes con puntos cuánticos de sulfuro de Zinc.

4. HIPÓTESIS

La funcionalización de los nanodiamantes con puntos cuánticos de ZnS permitirá incrementar su fluorescencia para eventualmente ser utilizado como marcador fluorescente.

5. OBJETIVO

5.1 General

Funcionalizar nanodiamantes con ZnS para su aplicación como marcador fluorescente.

5.2 Específicos

- Caracterizar los nanodiamantes sin funcionalizar por técnicas espectrométricas y microscópicas.
- Funcionalizar los nanodiamantes con ZnS por dos síntesis diferentes evaluando sus características en cuanto a intensidad de fluorescencia y complejidad.
- Evaluar la funcionalización de los nanodiamantes con ZnS utilizando fluorescencia y caracterizarlos por técnicas microscópicas y espectrométricas.

6. METODOLOGÍA

6.1 Reactivos y materiales

Las siguientes funcionalizaciones y caracterizaciones se llevaron a cabo utilizando diversos reactivos que fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, entre los que están los nanodiamantes del lote No. MKBZ2471V, con una concentración de 10 mg ml^{-1} monodispersados en agua y carboxilados, el acetato de zinc dihidratado ($\text{Zn}(\text{O}_2\text{CH}_3\text{C})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) del lote No. MKCD3805 con una pureza de 99.9% con base de metales traza, el sulfuro de sodio nohidratado ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), el cual presenta una pureza de 98%, alcohol isopropílico con una pureza de 99.5% del lote No. SHBH8682, también de Sigma-Aldrich se adquirió el hidróxido de sodio (NaOH) en pellets, grado reactivo con una pureza de 98% del lote No. SLBT8498.

El ácido clorhídrico fue obtenido de J.T. Baker, con una pureza de 38% y lote No.X11C00, también de J.T. Baker se utilizó polvo de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) del lote No. 3506-01.

La membrana de éster de celulosa Biotech CE tubing fue adquirida en Spectrum laboratorios, Inc. del lote No. 3303287 con un tamaño de poro de 300kD (15-20 nm), diámetro de 20 mm y con un 0.05% de azida de sodio.

6.2 Determinación de la concentración de impurezas.

La cuantificación de las impurezas o elementos presentes en la muestra se determinó por plasma de acoplamiento inductivo (ICP), la cual es una técnica de análisis químico elemental. La marca del equipo utilizado es ThermoScientific modelo iCAP 7000 Series.

En esta técnica, la introducción continua de la muestra líquida y un sistema de nebulización forma un aerosol que es transportado por el argón a la antorcha del plasma acoplado inductivamente por radio frecuencia. En el plasma, debido a las altas temperaturas generadas, los analitos son atomizados e ionizados

generándose los espectros de emisión atómicos de líneas características. Los espectros son dispersados por la red de difracción y el detector sensible a la luz se encarga de medir las intensidades de las líneas. La información es procesada por el sistema informático.

6.3 Purificación de los Nanodiamantes

La membrana de éster de celulosa es utilizada para remoción de sales, surfactantes y solventes, concentración de proteínas, péptidos y anticuerpos, remoción de micromoléculas de contaminación, entre otras aplicaciones. Son usadas para moléculas con límite de peso molecular o MWCO (por sus siglas en inglés, molecular weight cut off) de 300kD y se puede trabajar a temperaturas de 37 °C, esta membrana puede usarse con metanol, etanol, y alcohol isopropílico, pero con exposición limitada o bajas concentraciones, mientras que con agua es recomendado. El tamaño efectivo de algunas moléculas es afectado por el pH y la fuerza iónica de la solución en la cual esta disuelta, por lo que la remoción de las impurezas se verá afectada por estos parámetros.

La membrana se cortó aproximadamente de 20 cm de longitud de la membrana y fue necesario colocarla 15 min en agua tridestilada a temperatura ambiente para remover el 0.05% de azida de sodio (NaN_3), una vez hecho esto, se enjuagó y se cerró en uno de sus extremos, se adicionó 10 ml de la solución de nanodiamantes dentro de la membrana para después cerrar por el otro extremo, posteriormente se colocó dentro de un vaso de precipitados de 1 L que previamente contenía agua tridestilada. Todo el sistema (vaso de precipitado y membrana con nanodiamantes) se puso en agitación continua durante 2 horas, después de este tiempo se cambió el agua tridestilada. Se repitió el proceso de los cambios de agua tridestilada por 8 horas haciendo los cambios cada 2 horas.

6.4 Funcionalización del complejo ND-ZnS y ND+ZnS

La funcionalización se llevó a cabo con dos metodologías distintas, la primera fue adicionando los precursores por separado, esto es, Acetato de Zinc ($\text{Zn}(\text{O}_2\text{CH}_3\text{C})_2$)

· 2H₂O) y Sulfuro de Sodio (Na₂S · 9H₂O) al nanodiamante, la segunda se realizó sintetizando primero el punto cuántico de ZnS, y después agregando este al nanodiamante como se explica a continuación en las Figuras 6, 7 y 8.

6.4.1 Funcionalización de ND-ZnS

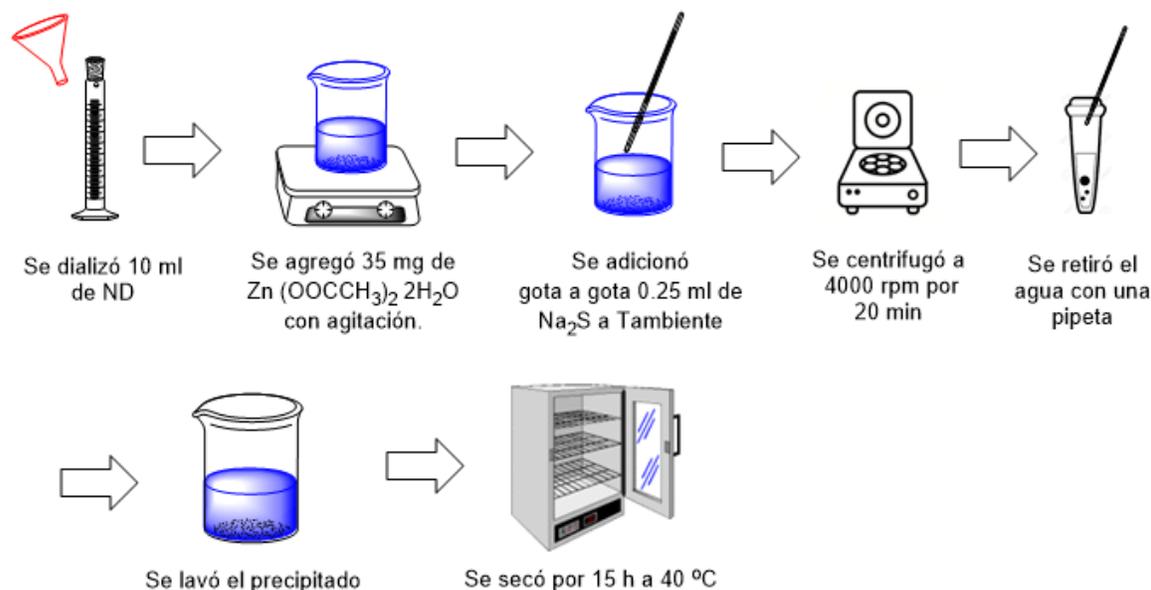


Figura 6 Diagrama de funcionalización del ND-ZnS.

Se midieron 10 ml de nanodiamantes previamente dializados, y se colocaron en un vaso de precipitados de 50 ml. Se pesaron 68 mg de Zn (OOCCH₃)₂ · 2H₂O y se añadió a la solución con agitación por 20 min. Después, se adicionó gota a gota 0.5 ml (10 gotas) de Na₂S a temperatura ambiente y con agitación por 2 horas, se centrifugó a 4000 rpm por 30 min y se retiró el sobrenadante (Cao et al., 2012).

Para el lavado de las nanopartículas, al precipitado obtenido se le adicionó agua tridestilada y se colocó 10 min en ultrasonido, después se centrifugó a 300 rpm por 30 min por triplicado, finalmente se dejó secar en el horno por 15 horas a 40 °C.

6.4.2 Funcionalización de ND+ZnS

Para esta síntesis del nanodiamante con el punto cuántico, fue necesario sintetizar el sulfuro de zinc como se muestra en el diagrama de la Figura 7.

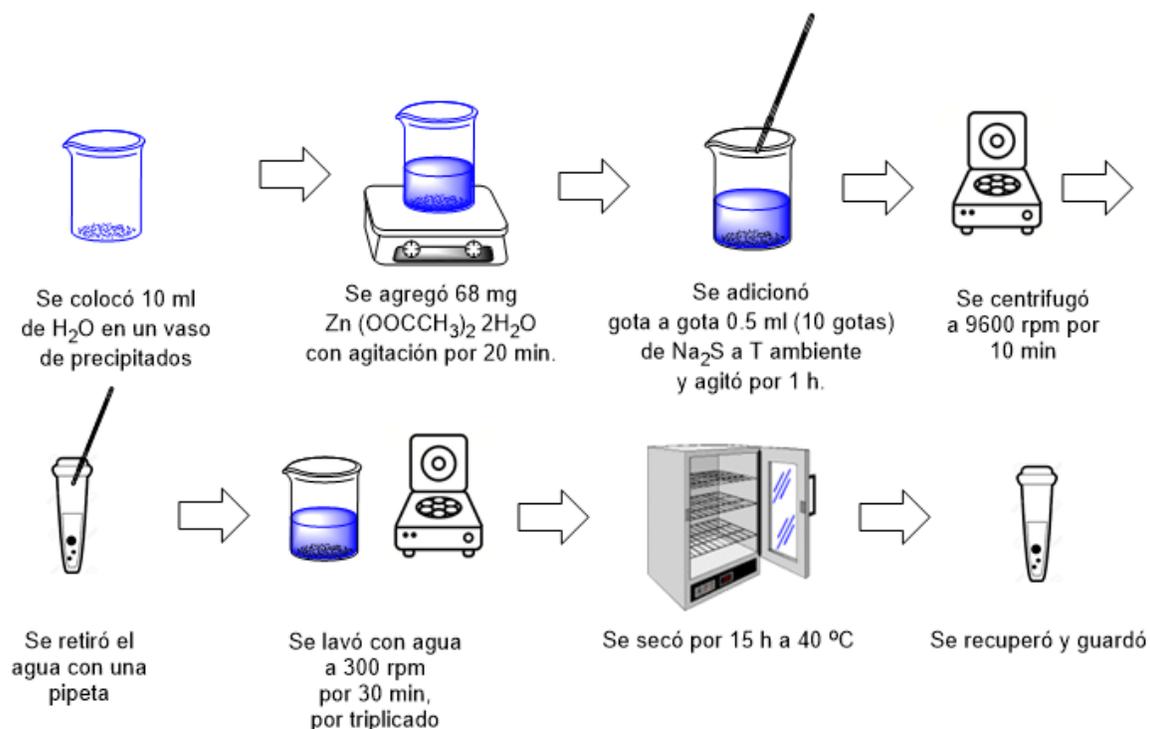


Figura 7 Diagrama de la síntesis del punto cuántico de ZnS.

Una vez obtenido el punto cuántico, se midieron 20 ml del nanodiamante previamente dializado y se adicionaron 3.68 ml de NaOH 0.03 M, esto se hizo con base en los grupos carboxílicos que presenta el nanodiamante y se agitó durante 1 hora. Después se pesaron 11.64 mg de ZnS previamente sintetizado y se añadió con agitación por 2 horas como se indica en el diagrama de la Figura 8.

La solución se colocó en una membrana de éster de celulosa para retirar el sodio y lavar el precipitado, esto se realizó como en el apartado de purificación de los

nanodiamantes, los cambios de agua tridestilada se hicieron cada 2 horas durante 6 horas.

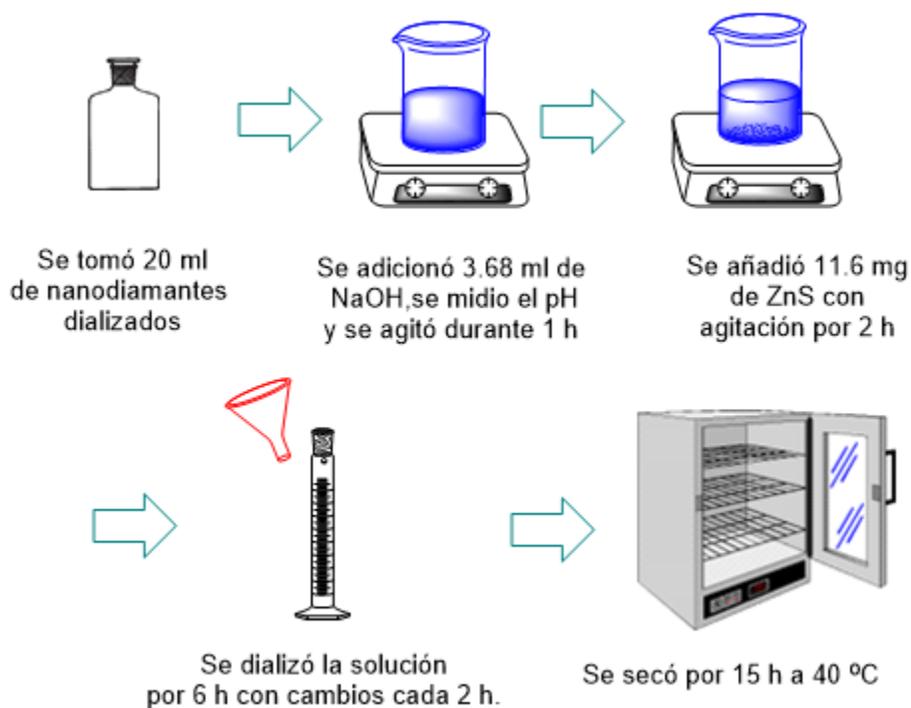


Figura 8 Diagrama de funcionalización del ND + ZnS.

Posteriormente, las nanopartículas se secaron en un horno por 15 horas a 40 °C, para su caracterización posterior.

6.5 Caracterización del Nanodiamante, sulfuro de zinc, y los complejos ND-ZnS y ND+ZnS.

6.5.1 Morfología, dispersión, composición química y tamaño de partícula.

Para la determinación de la morfología, dispersión de las partículas y composición química fue utilizada la microscopía electrónica de transmisión (MET) con sistema de energía dispersiva (EDS). El equipo utilizado fue JEOL JEM 2200FS+CS, que

consta de un emisor de campo de electrones de 200 kV con corrector de aberración esférica del haz de prueba para el modo barrido en transmisión (STEM).

Las rejillas utilizadas para el análisis fueron de cobre recubiertas con SiO_x y carbono con un diámetro de 3 mm. Para la preparación de la muestra en MET se dispersaron las nanopartículas en un medio de alcohol isopropílico y se homogenizó la solución en ultrasonido, después se colocó con un capilar una gota por gravedad de la solución sobre la rejilla y se secó bajo la lámpara de IR. El esquema de la Figura 9 indica la preparación.

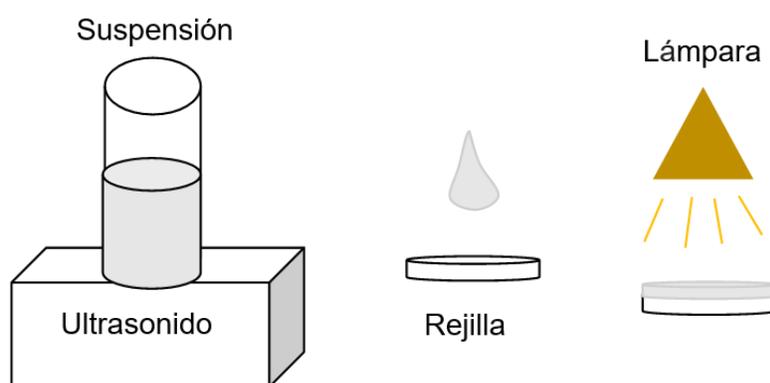


Figura 9 Preparación de muestras en MET para una suspensión.

El tamaño de partícula se determinó con base en 400 mediciones de las micrografías para el nanodiamante.

La medición de radio hidrodinámico y potencial Z se llevó a cabo con el equipo de la marca Malvern Panalytical modelo Zetasizer nano series. La muestra fue colocada 5 min en ultrasonido y se llevaron a cabo 9 mediciones con un espacio entre cada medición de 30 segundos para cada muestra y fueron medidas a temperatura ambiente.

6.5.2 Estructura cristalina, identificación de fase, estructura molecular, identificación de grupos funcionales y cuantificación de grupos COOH.

La identificación de fase y estructura cristalina se llevó a cabo con el equipo de difracción de rayos X (DRX) marca PANalytical modelo X'PertPRO utilizando radiación $\text{CuK}\alpha$ con $\lambda = 1.54056\text{\AA}$ en el rango de exploración $2\theta = 10^\circ - 100^\circ$, con un paso de 0.01 y un tiempo de 100 seg/paso, con Bragg Brentano.

La espectroscopia raman es una técnica fotónica de alta resolución y nos proporciona información sobre la estructura molecular del nanodiamante. Su importancia radica en que cada estado molecular posee un espectro de vibración único que es asociado a su estructura. El equipo utilizado fue un LabRamHR Vis-633 Horiba, esta es una técnica complementaria a absorción infrarroja (IR). Es una técnica no destructiva y lleva muy poca cantidad de muestra. La luz tiene que ser absorbida por la muestra para poder presentar una emisión o señal Raman.

La espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) fue utilizada para la caracterización de los nanodiamantes debido a su alta sensibilidad con los grupos funcionales que presentan en su superficie, además de la fácil preparación de muestra y a que no requiere condiciones de alto vacío para llevar a cabo el análisis.

Los ND se compraron en solución monodispersados en H_2O , por lo que fue necesario un secado al vacío a 40°C por 4 horas para obtener un polvo fino de ND. Para el análisis por FTIR se usó un espectrómetro marca Shimadzu modelo IR Affinity 1S. El espectro se obtuvo por reflectancia con ayuda de un accesorio de ATR (Total Attenuated Reflectance) marca Smiths, modelo Quest, con ventana de diamante de un paso.

La cuantificación de grupos carboxilo se evaluó en base a la titulación de Boehm (Schmidlin et al., 2012), que consistió en preparar 1 L de HCl 0.1 M y otro de NaHCO_3 0.05 M. Después se midieron 10 ml de nanodiamantes y se colocaron en un vaso de precipitados de 100 ml, se adicionaron 60 ml de la solución de NaHCO_3

0.05 M y se dejó en agitación continua en atmósfera de nitrógeno por 24 horas. Posteriormente se aforó en un matraz a 100 ml con el bicarbonato de sodio, se midieron 10 ml de la solución y se colocaron en un vaso de precipitados de 50 ml, y con un titulador automático marca Metrohm modelo 848 Titrino plus se tituló la solución, esto se realizó por triplicado, la Figura 10 muestra el proceso descrito.

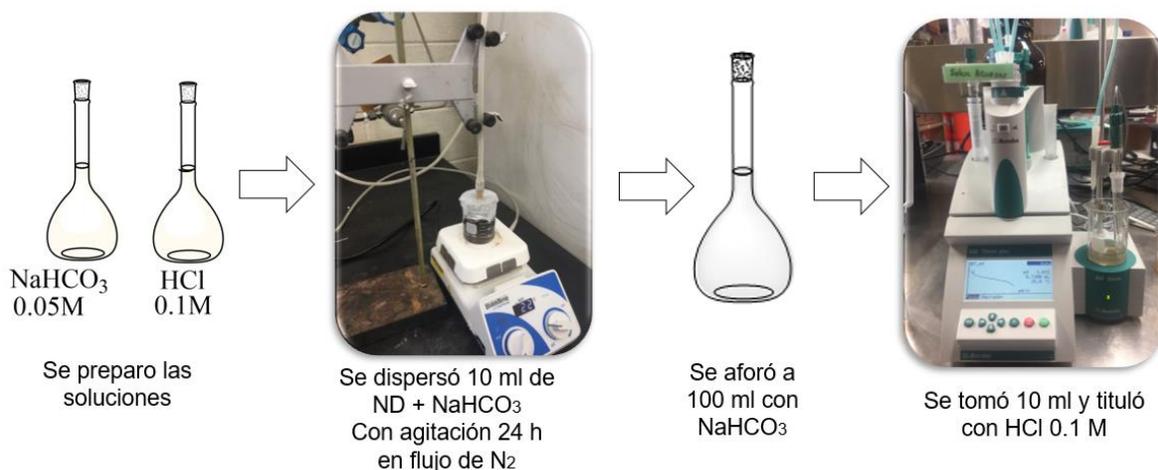


Figura 10 *Titulación de Boehm.*

6.5.3 Espectroscopia de Absorbancia y Fluorescencia.

La fluorescencia de emisión fue medida usando el espectrofotómetro de fluorescencia modelo FluoroMax-4 spectrofluorometer marca Horiba Scientific. Se utilizaron celdas de cuarzo y las soluciones fueron preparadas a una concentración de 20 ppm.

El análisis de absorbancia se manipuló con la misma concentración de 20 ppm en un equipo de espectroscopia UV-Vis Lambda 35 marca PerkinElmer en un rango de longitud de onda de 1100 a 190 nm.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Pureza del nanodiamante y composición elemental.

La dispersión de nanodiamante se cuantificó por ICP y se observó que incluye algunas impurezas como: Ba, Ca, Cu, Fe, Mg y Na. Es necesario retirar estos elementos para evitar posibles interferencias durante la síntesis, es decir, que interaccionen en los sitios activos de interés, como lo son los grupos COOH del nanodiamante.

En la Tabla 1, se observa cómo disminuye la concentración de cada uno de estos elementos con cada cambio en el dializado.

Tabla 1 Concentración de impurezas en la dispersión del nanodiamante antes y durante el dializado.

Impureza	[ND]	Cambio 1	Cambio 2	Cambio 3
Ba mg/L ICP	0.11	0.25	PDL	PDL
Ca mg/L ICP	15.01	0.73	PDL	PDL
Cu mg/L ICP	0.39	0.28	PDL	PDL
Fe mg/L ICP	3.39	1.04	0.60	0.17
Mg mg/L ICP	3.36	PDL	PDL	PDL
Na mg/L ICP	10.82	3.66	3.79	1.95

Nota: PDL= Por debajo del límite de detección.

Se llevó a cabo un análisis de la solución de los lavados para la síntesis de ND+ZnS y del agua utilizada identificada como blanco, ya que al centrifugar había pérdida de muestra. El análisis fue solo para los elementos de Na, S, y Zn, con el objetivo de identificar si se estaba retirando el sodio de la solución y cuantificarlo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2 para la solución del centrifugado.

Tabla 2 Concentraciones y porcentaje de remoción de Na, S y Zn con el centrifugado

Nº DE MUESTRA:	Na (mg/L)	S (mg/L)	Zn (mg/L)
Blanco	1,34	PDL	0,09
Concentración Inicial	61.48	21.28	179.11
Primer residuo	48.48	4.43	7.78
Centrifugado 1	17.63	4.93	7.85
Centrifugado 2	2.50	0.87	2.47
Centrifugado 3	1.48	0.24	5.40
% de Remoción.	~100 %	49.23 %	13.12 %

Nota: PDL= Por debajo del límite de detección.

Como se observa, la remoción para el sodio fue del 100%, mientras que, para el Zn y S, fue de 13.12% y 49.23% respectivamente. Para esta síntesis de ND+ZnS, se optó por llevar a cabo una diálisis en lugar de centrifugar con la finalidad de remover el sodio, en la Tabla 3, se muestran los resultados para la solución obtenida del dializado, donde se observa que se obtuvo una remoción de 6.45% para el sodio, y la disminución de la remoción del zinc y azufre también se vio interferida, lo cual fue favorable.

Tabla 3 Concentraciones y porcentaje de remoción de Na, S y Zn con el dializado

Nº DE MUESTRA:	Na (mg/L)	S (mg/L)	Zn (mg/L)
Blanco	0,72	PDL	0,11
Concentración Inicial	53.51	14.29	178.67
Dializado 1	0.84	0.04	0.03
Dializado 2	0.87	PDL	0.19
Dializado 3	1.75	0.77	3
% de Remoción	6.45	5.68	1.80

Nota: PDL= Por debajo del límite de detección.

La determinación de la composición elemental se realizó con el análisis por EDS, en la zona del espectro 1 en la Figura 11a se observa un 100% atómico para el carbono (C), ya que es la zona donde se localizan los nanodiamantes, mientras que en el espectro 2, que es la zona de la membrana de SiO_x se comprueba su composición con un 49.9% de O y un 14.7% de Silicio.

El ZnS, como se observa en la Figura 11b, presenta varios elementos que provienen del agua y de los reactivos utilizados, también se observa que la proporción de Zn y S se mantiene de 11.2% y 12.7% respectivamente. El porcentaje de carbono que aparece en el EDS es de la membrana utilizada ya que fue de cobre con una membrana de carbono.

En la Figura 11c se analiza el complejo ND-ZnS, el cual fue funcionalizado adicionando los reactivos por partes, y se observa un alto contenido de carbono, que represente un 90.9%. De S y Zn contiene un 1.2% y 1.6% atómico respectivamente. En la Figura 11d se examina el complejo ND+ZnS, este complejo fue sintetizado en dos etapas, contiene 97.4% de carbono, 0.2% de Zn y 0.3% de S y se observa un 5.03% de sodio, esto indica que con el dializado anteriormente descrito, hay un remanente de Na que no fue retirado, lo cual se comprueba con los análisis de ICP mostrados en la Tabla 3, además estos resultados nos indican solo una porción de las impurezas presentes, ya que el MET tiene un nivel de detección de 0.1% atómico, lo cual es bajo.

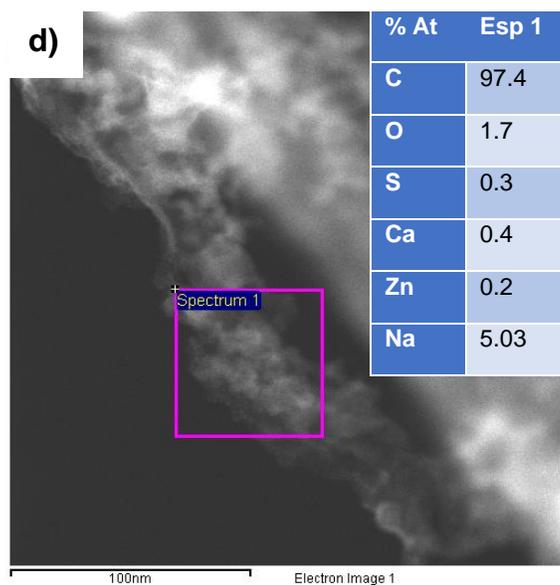
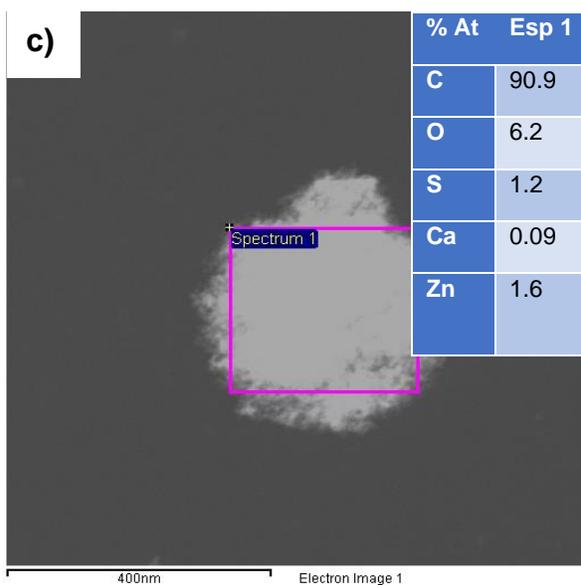
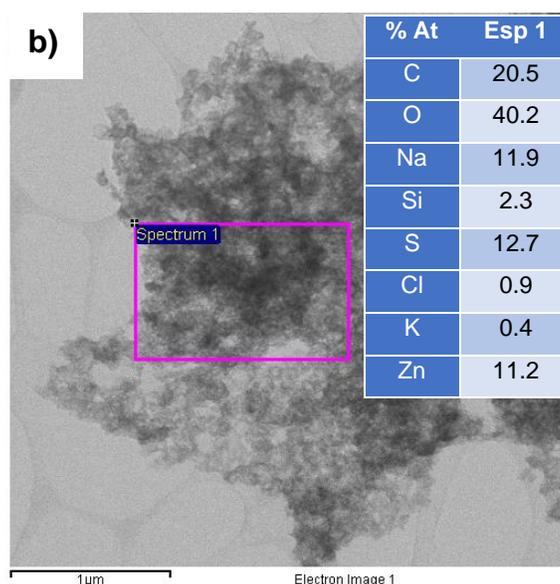
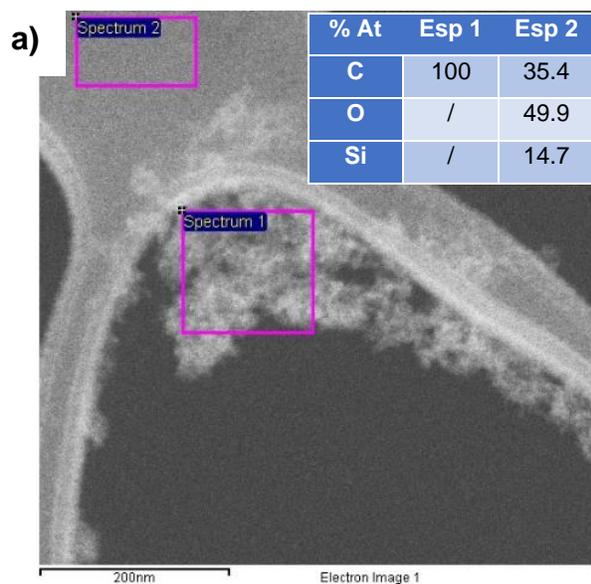


Figura 11 Composición elemental para a) nanodiamantes en la membrana de SiOx, b) ZnS, c) ND-Zn y d) ND+ZnS.

7.2 Morfología, dispersión, carga y tamaño de partícula.

El tamaño de partícula del nanodiamante se estudió llevando a cabo 400 mediciones, obteniendo un promedio de 5.3 ± 1.3 nm como se observa en la distribución de la Figura 12. El tamaño de partícula es muy importante ya que de él depende la biocompatibilidad, la intensidad de fluorescencia, la toxicidad y el área superficial.

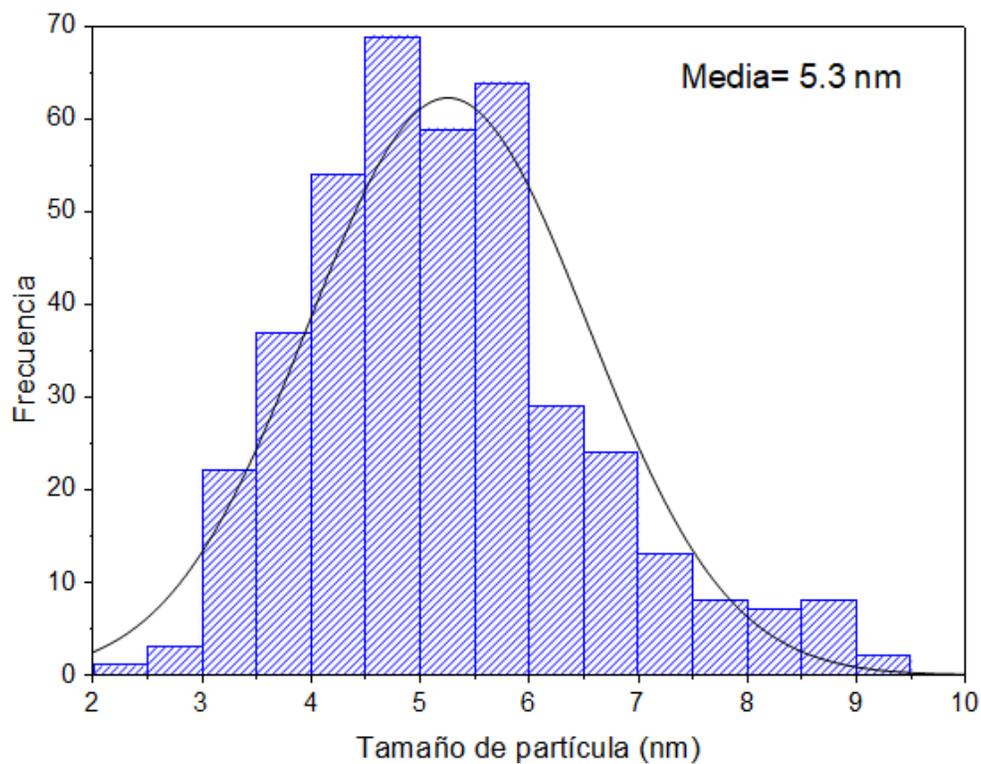


Figura 12 Distribución del tamaño de partícula de los ND.

El tamaño de partícula también fue estimado utilizando datos de difracción de rayos X, aplicando la ecuación de Scherrer, mostrada a continuación.

$$D = \frac{k\lambda_{XR}}{\beta \cos \theta}$$

Ecuación 1 *Ecuación de Scherrer*

Donde $k = 0.9$ y $\lambda_{XR} = 0.15406 \text{ nm}$ son valores constantes, mientras que β corresponde a FWHM, que es el ancho del pico de mayor intensidad a media altura y el valor de θ , es el ángulo correspondiente a dicho pico.

Los valores estándar para nanopartículas esféricas son equivalentes a $k=0.9$, $\beta=3.3$, $\lambda_{XR} = 0.15406 \text{ nm}$, por lo que el tamaño obtenido usando esta ecuación fue de $4.8 \pm 0.7 \text{ nm}$, lo cual es similar a lo obtenido en el análisis anterior para el nanodiamante.

Las micrografías descritas a continuación fueron obtenidas con la finalidad de observar la morfología y dispersión del nanodiamante, ZnS, ND-ZnS y ND+ZnS.

En la Figura 13a, se indica la distancia interplanar de 1.07 \AA del ND, que corresponde al plano (311) esto con base en la ficha 01-071-364; el patrón de difracción del nanodiamante se muestra en la Figura 13b. En la Figura 13c, se indican las distancias interplanares del ZnS, que corresponden a la fase wurtzita de la ficha 00-001-1280, donde la distancia 1.068 \AA , 1.074 \AA , y 1.071 \AA indica el plano (213), 1.687 \AA indica el plano (200) y finalmente la distancia 1.746 \AA , indica el plano (103). En la Figura 13d, se indica el tamaño de partícula del ZnS, obtenido de las micrografías, que es en promedio de $4.9 \pm 0.7 \text{ nm}$, el valor obtenido con la ecuación de Scherrer fue de $2.0 \pm 0.03 \text{ nm}$, lo que indica una diferencia de más del doble, esto puede ser explicado por las limitaciones asociadas a ambos métodos, ya que con la ecuación de Scherrer se tienen mejor estadística, pero calculas con un solo pico de difracción, estos métodos dan valores aproximados, pero probablemente esta ecuación, podría ser más confiable según lo estiman Yu y colaboradores, debido a la correlación de los datos que utiliza (Yu et-al, 2003).

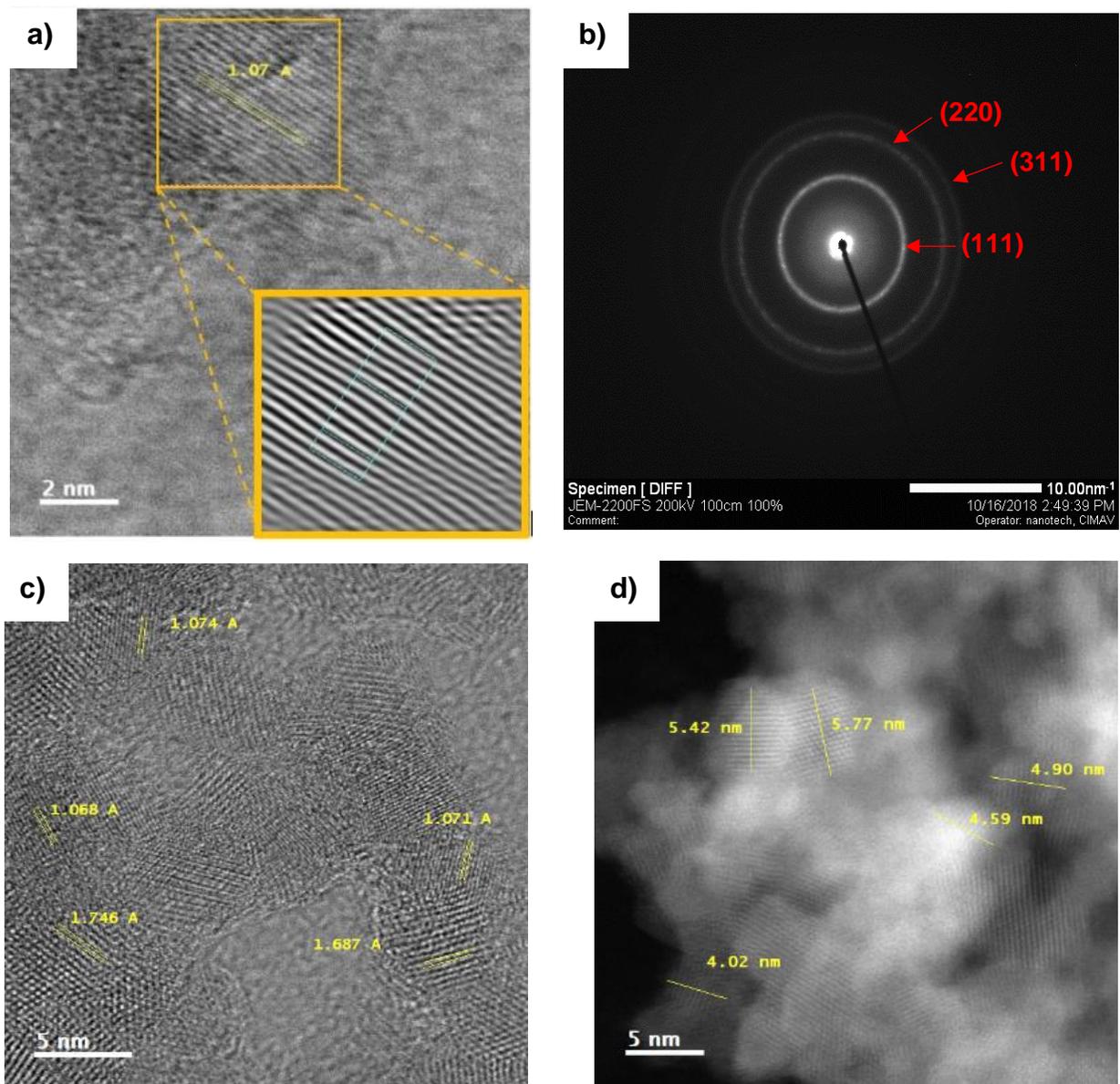


Figura 13 a) Distancia interplanar del ND b) Patrón de difracción del ND, c) Distancias interplanares del ZnS fase wurtzita y b) Imagen de campo oscuro para ver el tamaño de partícula del punto cuántico de ZnS con Microscopía Electrónica de Trasmisión.

El potencial zeta es una función tanto de la superficie de las partículas como del dispersante y proporciona información sobre el comportamiento interfacial para los productos formulados. El análisis es llevado a cabo mediante la dispersión dinámica de luz (DLS).

Los nanodiamantes presentan estabilidad y dispersión en agua, por lo que se obtiene un radio hidrodinámico de 14 ± 0.1 nm, debido a que el potencial Z obtenido permite que la aglomeración de estas partículas sea menor.

El valor de potencial Z es importante para las interacciones electrostáticas, y es donde se unen la capa difusa y la de Stern, esto nos indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión que existe entre los coloides. El valor de -41.4 mV, mostrado en la Tabla 4, indica una estabilidad alta de la dispersión.

Tabla 4 Radio hidrodinámico y potencial Z

Muestra	Radio hidrodinámico (nm)	Potencial Z (mV)	Estabilidad
ND	14.0 ± 0.1	-41.0 ± 0.7	<i>Estabilidad de la dispersión alta</i>
ZnS	730 ± 91	7 ± 1	<i>Límite de aglomeración</i>
ND-ZnS	72.0 ± 0.7	-30.0 ± 0.6	<i>Estabilidad de la dispersión moderada</i>
ND+ZnS	42 ± 3	-21 ± 2	<i>Estabilidad de la dispersión moderada</i>

Al maximizar las fuerzas repulsivas entre el nanodiamante en su medio de dispersión permite generar suspensiones estables, ya que las partículas se repelen unas con otras, estas repulsiones mutuas entre partículas impiden la unión de aglomerados. Con base en la estabilidad de suspensión descrita por Riddick, las partículas funcionalizadas de ND-ZnS indican una estabilidad moderada ya que presentan un potencial Z de -30.0 ± 0.6 mV y el ND+ZnS, por su valor de -21.0 ± 2 mV, empieza a manifestar inestabilidad. Por otra parte, el potencial Z del ZnS indica una máxima aglomeración y precipitación (Riddick, 1968).

El diámetro hidrodinámico (dinámico en un medio acuoso), permite medir el diámetro de partículas en un medio acuoso por medio de un haz de luz, las partículas no se encuentran aisladas, por esto se detecta un diámetro mayor al tamaño primario de partícula medido en MET. Este valor está muy relacionado con el grado de agregación que se presenta en el medio. Como se observa en la Tabla 4, para las partículas funcionalizadas se presentan valores de radio hidrodinámico de 72 ± 0.7 nm para el ND-ZnS y de 42 ± 3 nm para el ND+ZnS.

Esto se confirma con los aglomerados que se analizan en las micrografías de MET de la Figura 14. La dispersión la cual indica aglomeración de estas partículas es debido a que tienen un tamaño nanométrico y una de las características de los nanomateriales es que presentan aglomeración a estas dimensiones; en la Figura 14b se observa una morfología esférica o elíptica de las partículas del nanodiamante.

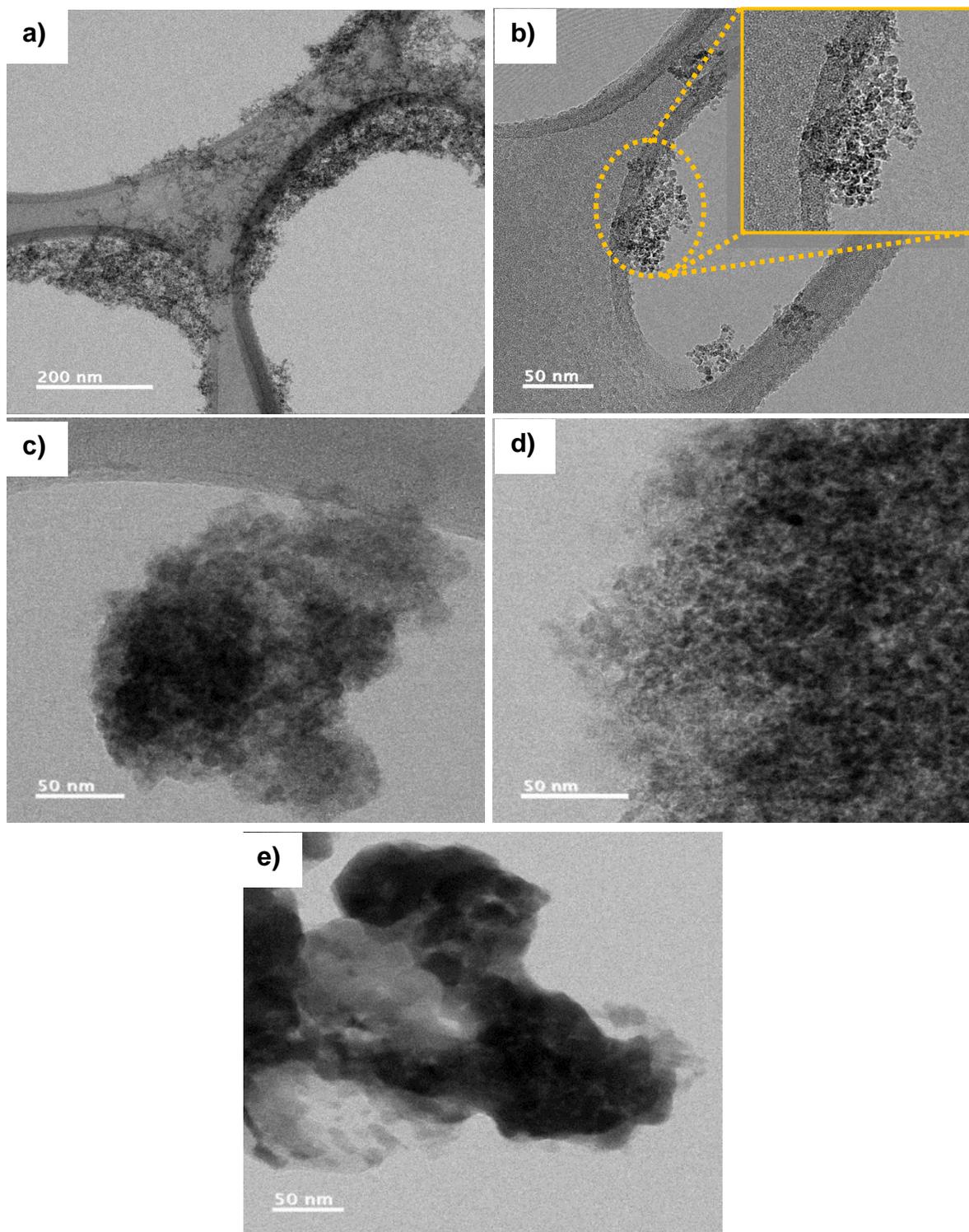


Figura 14 En a) *Dispersión de los nanodiamantes en la membrana de SiOx* y b) *Morfología de los nanodiamantes* c) *ZnS* d) *ND-ZnS* y e) *ND+ZnS*.

La Figura 15a muestra la micrografía obtenida del ND+ZnS, donde se indican las distancias interplanares, la distancia 1.628 Å corresponde al plano (112), la 1.774 Å y 1.734 Å al plano (103) y la distancia 1.901 Å son del plano (110), que corresponde al ZnS de fase Wurtzita de la ficha 00-001-1280, como se observa, esta fase se presentan en el borde de la partícula, lo que puede suponer que el compuesto de ZnS, queda en la superficie, lo que es importante considerar son las distancias de 1.881 Å y 1.851 Å, ya que no son del diamante, sugieren ser del Na₂S del plano (222) de la ficha 00-003-0933, y debido a que este no se utilizó como reactivo en la síntesis 2, se puede considerar que fue formado durante la funcionalización.

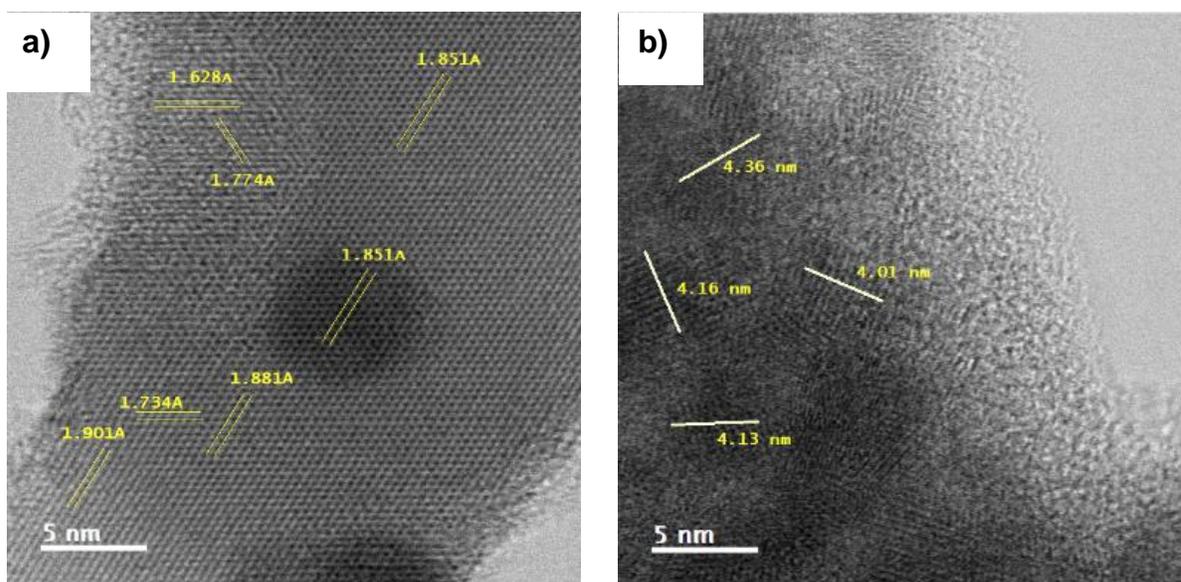


Figura 15 Micrografías del ND+ZnS donde se indican en a) las distancias interplanares y en b) el tamaño del ND en el complejo ND+ZnS funcionalizado.

Cuando la distancia interplanar no corresponde al compuesto, es posible que sean fases de las distintas mezclas formadas por las impurezas y reactivos utilizados, por lo que con el análisis de EDS en conjunto con las distancias obtenidas con las micrografías, se pueden determinar dichas fases.

En la Figura 15b, se indican los tamaños de partícula para el nanodiamante en el complejo ND+ZnS que es en promedio de 4.2 ± 0.1 nm según las micrografías, el tamaño obtenido con nanosizer es de 14.0 ± 0.1 nm, para el radio hidrodinámico, lo cual tiene una variación considerable, aunque se sabe que, con esta técnica, debido a que se lleva a cabo por dispersión de luz dinámica, siempre resulta en un valor superior respecto al de las micrografías. Con la ecuación de Scherrer, sin embargo, se obtuvo un valor de 4.8 ± 0.7 nm, lo cual es, sin lugar a dudas, similar a lo obtenido en microscopia electrónica de transmisión (MET).

7.3 Identificación de la estructura cristalina, estructura molecular, identificación de grupos funcionales y cuantificación de grupos COOH.

Para la caracterización de la estructura cristalina se utilizó DRX, este análisis permite determinar los parámetros de red, el tamaño de grano y el análisis cualitativo y cuantitativo de fases (Zou, et-al., 2009).

El análisis de difracción de rayos X muestra en la Figura 16a tres picos característicos, a $2\theta = 43.7^\circ$, 75.2° y 91.5° los cuales corresponden a los planos (111), (220) y (311) del nanodiamante, respectivamente. Esto demuestra que el crecimiento del cristal es cúbico (Zou et-al, 2009) y corresponde a la ficha 01-071-3649, como se muestra en la Tabla 5.

La Figura 16b, indica el difractograma del sulfuro de Zinc, que muestra igualmente tres picos característicos a $2\theta = 28.73^\circ$, 47.93° y 56.43° los cuales corresponden a los planos (002), (110) y (112) del ZnS, respectivamente, indicando que pertenece a la fase Wurtzita la cual tiene una estructura hexagonal con base en la ficha 00-001-1280.

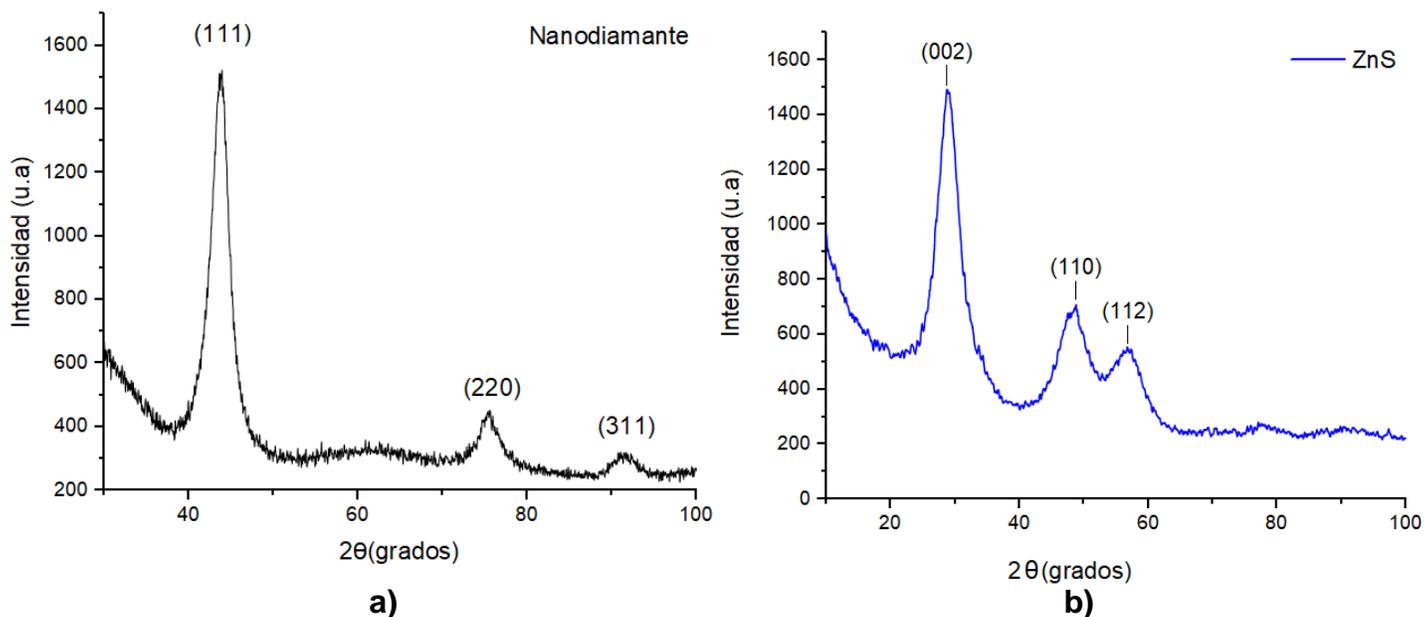


Figura 16 a) Difractograma del Nanodiamante y b) difractograma del ZnS.

El valor de $2\theta=28.72^\circ$, que corresponde al primer pico del difractograma para el ZnS, mostrado en la Tabla 6 permitió obtener un tamaño promedio de partícula de 2.01 ± 0.03 nm con Scherrer de la Ecuación 1.

Tabla 5 Ángulos y planos correspondientes al diamante de la ficha 01-071-3649

2θ (grados) Experimental	2θ (grados) Ficha	(h,k,l)	d(Å)
43.71	43.93	(111)	2.059
75.26	75.29	(220)	1.261
91.50	91.49	(311)	1.075

Tabla 6 Ángulos y planos correspondientes a la fase wurtzita del ZnS de la ficha 00-001-1280

2θ (grados) Experimental	2θ (grados) Ficha	(h,k,l)	d(Å)
28.73	28.681	(002)	3.11
47.93	47.835	(110)	1.90
56.43	56.403	(112)	1.63

En la Figura 17a, se muestra el difractograma del ND-ZnS, mostrando seis picos característicos a $2\theta = 28.45^\circ$, 47.74° y 56.52° que son del ZnS de los planos (002), (110) y (112), y los ángulos a $2\theta = 43.61^\circ$, 75.52° y 90.43° los cuales corresponden a los planos (111), (220) y (311) del nanodiamante respectivamente. Esto sugiere que el punto cuántico se forma durante la síntesis como propone el mecanismo de reacción.

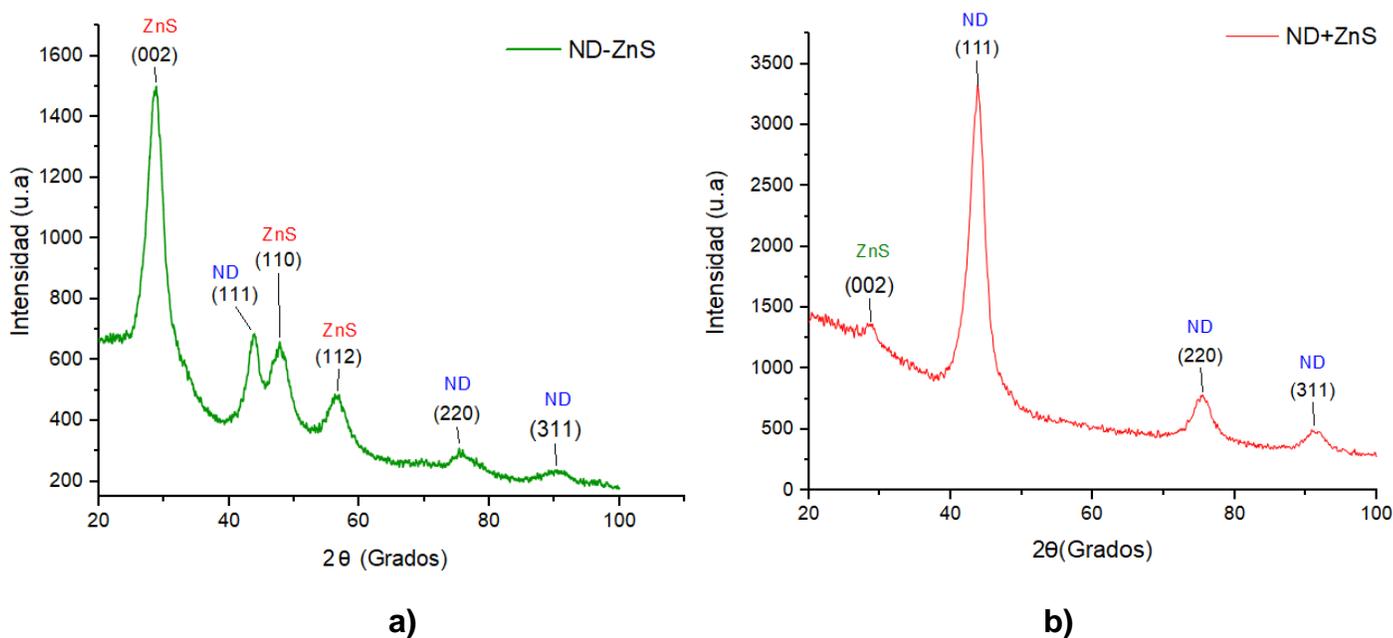


Figura 17 Difractograma de a) ND-ZnS y b) ND+ZnS.

Siguiendo con el análisis, en la Figura 17b, se muestra el difractograma del ND+ZnS, mostrando 4 picos característicos. A $2\theta = 28.80^\circ$ aparece un pico con baja intensidad que sugiere que el plano (002) del ZnS se presenta con muy pocos cristales de este compuesto, debido a que como se vio anteriormente, con el dializado, la pérdida de sodio es muy baja (6.45%), lo que podría sugerir que se forme Na_2S , lo que evitaría que se mantenga el compuesto de ZnS. Por otra parte, los ángulos a $2\theta = 43.83^\circ$, 75.34° y 90.84° que corresponden a los planos (111), (220) y (311) respectivamente, son de nanodiamante. Cabe mencionar que el valor del ángulo $2\theta = 75.34^\circ$, con base en la ficha 00-003-0933, corresponde al plano (511) del Na_2S , que podría estarse sobreponiendo con el del nanodiamante.

Para la estructura molecular del nanodiamante se utilizó el equipo de raman. En la Figura 19 se muestra el espectro obtenido, donde se indica un pico cercano a los 1332 cm^{-1} (1318.93 cm^{-1}) que es característico a la hibridación sp^3 del nanodiamante. En la vecindad de los 1685.72 cm^{-1} se observa un pico particular de la estructura del grafito.

Se sabe con base en la literatura (Shenderova, 2017) que para los cristales de diamante y grafito en bulk aparecen picos agudos alrededor de los 1332 cm^{-1} y 1581 cm^{-1} respectivamente.

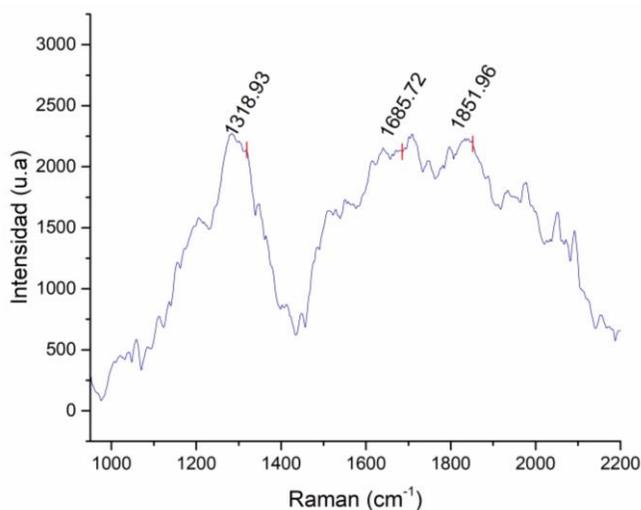


Figura 18 Espectro raman del Nanodiamante.

Cabe destacar que no fue posible el análisis por raman de los otros compuestos, debido a la interferencia de la fluorescencia que presentan.

La caracterización de los grupos funcionales presentes en la superficie del nanodiamantes (ND) se realizó con un análisis por espectroscopia infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

La espectroscopia infrarroja es una técnica de vibración utilizada para la caracterización a nivel molecular, los momentos dipolares eléctricos de los grupos funcionales vibratorios sufren cambios a medida que absorben la luz infrarroja entrante, esta absorción se traza como una función de la longitud de onda, y se mide en unidades de números de onda o cm^{-1} (Petit & Puskar, 2018)

En el espectro de la Figura 19a podemos observar una banda alrededor de los 3385 cm^{-1} y otro pico a los 1630 cm^{-1} , estos corresponden a la vibración de tensión del enlace O-H y a la vibración de flexión del H_2O , lo que sugiere que la superficie del nanodiamante pudo haber absorbido humedad de la atmósfera (Petit & Puskar, 2018), lo mismo ocurre para la Figura 19b y la Figura 19c. A los 1776 cm^{-1} , en la Figura 19a, 19c y 19d el pico es causado por las vibraciones de tensión del enlace -C=O de la cetona y el -COOH del grupo carboxílico. El pico de 1273 cm^{-1} y 1103 cm^{-1} son causados por el grupo -C-O-C (Zou et-al.,2009).

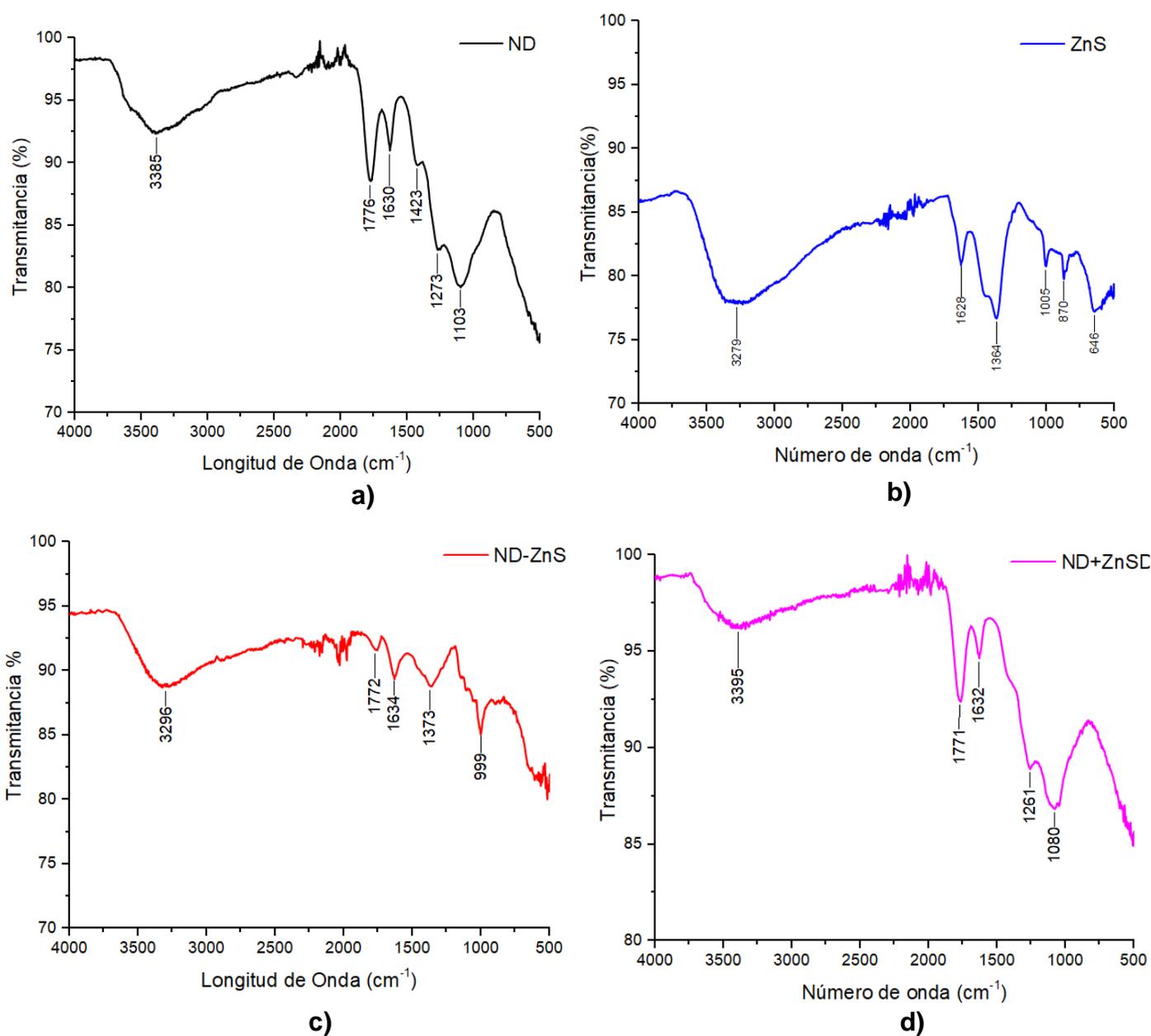


Figura 19 Espectro FTIR de a) nanodiamante, b) ZnS, c) ND-ZnS y d) ND+ZnS.

El pico de 1423 cm⁻¹ indica una flexión asimétrica del C-H. Cabe mencionar que la vibración de tensión C-C del diamante aparece con un pico a los 1332 cm⁻¹ y el estiramiento C=C entre 1535-1595 cm⁻¹, los cuales no se muestran en el espectro

de la Figura 19a (Petit & Puskar, 2018). Un resumen de los picos característicos se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7 Enlace en base al número de onda y tipo de vibración en el análisis de FTIR

Número de onda (cm ⁻¹)	Enlace	Tipo de vibración
3390	-O-H	Tensión
1770 y 1630	-C=O y - COOH	Tensión y Flexión O-H
1273 y 1103	-C-O	Flexión y Tensión
1761	-C=O	Tensión, protonación carboxílico
1632	-O-H	Flexión
1423	-C-H	Flexión asimétrica
1364	C-N, C-H, C-O	Tensión carboxílico
1149	-C-O	Tensión OH, éter
1109	-C-O	Tensión OH, éter
1062	-C-O	Tensión OH, éter
1001	-C-O, CCC	Flexión OH o tensión éter, Flexión
870	-COOH	Tensión del dímero del -COOH
646	CO ₂ , -NH ₂ , - NH	Estiramiento asimétrico en CO ₂ , Torsión en aminas

También se cuantificaron la cantidad de grupos carboxílicos presentes en la superficie del nanodiamante antes de la funcionalización y una vez funcionalizados como se indica en la Tabla 8.

Tabla 8 Grupos carboxílicos del ND antes y después de la funcionalización

	Área específica (m ² /g)	Sitios (COOH/nm ²)
ND	327.79	1.10
ND-ZnS	327.79	-4.85
ND+ZnS	327.79	74.35

Como se indica la cantidad de sitios fue menos para la funcionalización del ND-ZnS, esto se examina en el espectro IR de la Figura 19c, donde la intensidad del pico a 1772 cm⁻¹ disminuyó considerablemente, esta banda es causada por las vibraciones de tensión del enlace -C=O de la cetona y el -COOH del grupo carboxílico. Sin embargo, los sitios COOH·nm⁻² aumentaron para la funcionalización ND+ZnS, donde en la síntesis se adiciono NaOH, para retirar el H del COOH y poder enlazar el ZnS, pero como se observa, esto pudo haber activado más grupos de la superficie del nanodiamante o generado más sitios COOH, lo que podría explicar el por qué fue mayor la fluorescencia para este compuesto, ya que al aumentar los sitios COOH, es posible la unión de más puntos cuánticos, lo que aumenta la fluorescencia.

Las nanopartículas poseen una relación de superficie-volumen muy elevada. El tener un área superficial mayor incrementa la reactividad química de la superficie de las nanopartículas, esta reactividad química depende de muchos factores, como tamaño, forma, composición química, estructura electrónica, estructura de la superficie entre otras. La reactividad química de los materiales se encuentra en su superficie, el aumento del número de átomos aumenta a medida que se reduce el tamaño, esto incrementa la energía libre provocando así una alta propiedad de atracción en la superficie.

El área específica obtenida para los nanodiamantes fue de 327 m²/g. Esta fue calculada como sigue; con la fórmula de área de superficie que es:

$$\text{Área de superficie} = 4\pi R^2$$

Ecuación 2 Ecuación de área de superficie.

La fórmula de $\text{volumen} = \frac{4}{3}\pi R^3$ y la de la masa $m = \rho V$, es posible obtener una fórmula para el área específica, mostrada en la ecuación 3:

$$\text{Área específica} = \text{Área de superficie}/m = 3/\rho R$$

Ecuación 3 Ecuación de área específica

Utilizando el valor obtenido del tamaño de partícula con las micrografías de MET, de $D=5.3 \pm 1.3$ nm, se obtuvo el radio de $R = 2.625 \times 10^{-9}$ m, y con la densidad del diamante que es de $\rho = 3.52 \times 10^6$ g/m³.

Finalmente:

$$\text{Área específica} = \frac{3}{\rho R} = \frac{3}{3.52 \times 10^6 (2.625 \times 10^{-9})} = 327.7 \text{ m}^2/\text{g}$$

7.4 Absorbancia y fluorescencia

El perfil de la banda de absorción muestra las bandas típicas, con un pico a $\lambda=201$ nm para el nanodiamante, $\lambda=215$ nm para el ZnS, $\lambda=218$ nm para el compuesto funcionalizado ND-ZnS y finalmente el ND+ZnS presenta absorción a $\lambda=206$ nm, como se observa en la Figura 20.

La absorbancia se relaciona con la fluorescencia linealmente, ya que, a mayor absorbancia, mayor fluorescencia. Aunque la fluorescencia puede verse afectada por algunas variables como; el rendimiento cuántico, que es la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas, la estructura, como los compuestos con grupos funcionales aromáticos que dan intensidad de fluorescencia más elevada, al igual que estructuras con dobles enlaces muy conjugados, la rigidez estructural, siendo

favorecidas las moléculas con estructuras más rígida favorable para la fluorescencia, igualmente la temperatura, disolvente, pH y concentración son algunas variables que modifican la fluorescencia (Universidad de Granada, 2019).

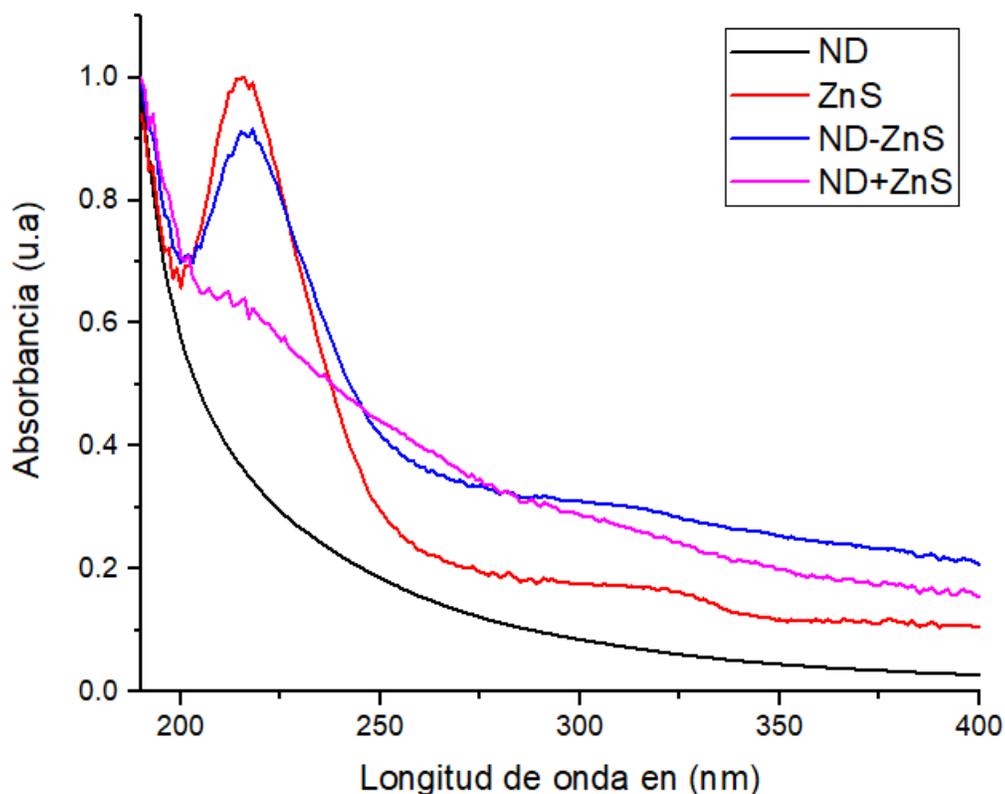


Figura 20 Espectros de absorción del ND, ZnS, ND-ZnS y ND+ZnS.

La longitud de onda para obtención del espectro de fluorescencia fue de alrededor de los 300 nm, examinando la absorbancia a esa λ es posible predecir que se obtendrá una mayor fluorescencia para los complejos funcionalizados como se indica en la Figura 20.

Los nanodiamantes presentan un rango de longitud de onda de emisión de 350 – 600 nm (Kang et-al, 2018) y una longitud de onda de excitación de 320 nm. Para el análisis se utilizó agua tridestilada para evitar interferencias.

En la Figura 21a se indica el espectro de emisión - excitación del nanodiamantes, donde se observa su longitud de onda de emisión a 359 nm y longitud de onda de excitación a 320 nm. También se indican los espectros para los diferentes compuestos, los cuales tenían una concentración de 20 ppm.

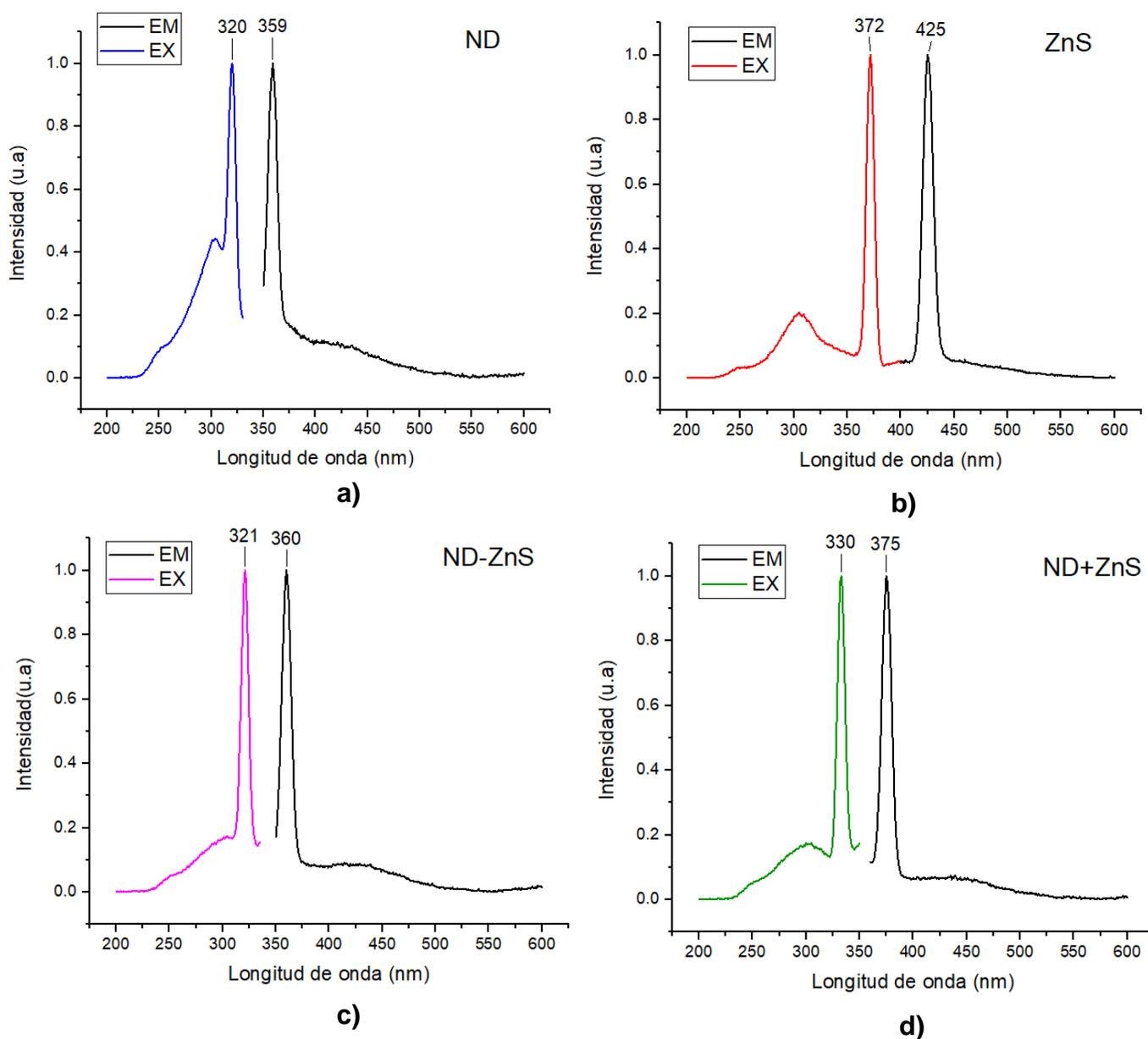


Figura 21 Espectros de Emisión - Excitación de a) ND, b) ZnS, c) ND-ZnS y d) ND+ZnS.

El espectro de fluorescencia para los diferentes compuestos se muestra en la Figura 22, como se indica, se tiene un 76.3% más de incremento relativo de la fluorescencia con los complejos funcionalizados respecto al nanodiamante y punto cuántico sin funcionalizar.

Cabe mencionar que para los compuestos funcionalizados, ambas intensidades de fluorescencia superan el valor de la fluorescencia del punto cuántico de ZnS al igual que la del ND, además se muestra que el ZnS presenta una intensidad mayor respecto al ND, y su longitud de onda de emisión corresponde a lo reportado en la literatura que es de 425 nm (Barberio et-al, 2012).

Otra característica importante es que las emisiones se dan dentro del espectro UV, que es por debajo de los 400 nm, lo que coloca al marcador como invisible al ojo humano.

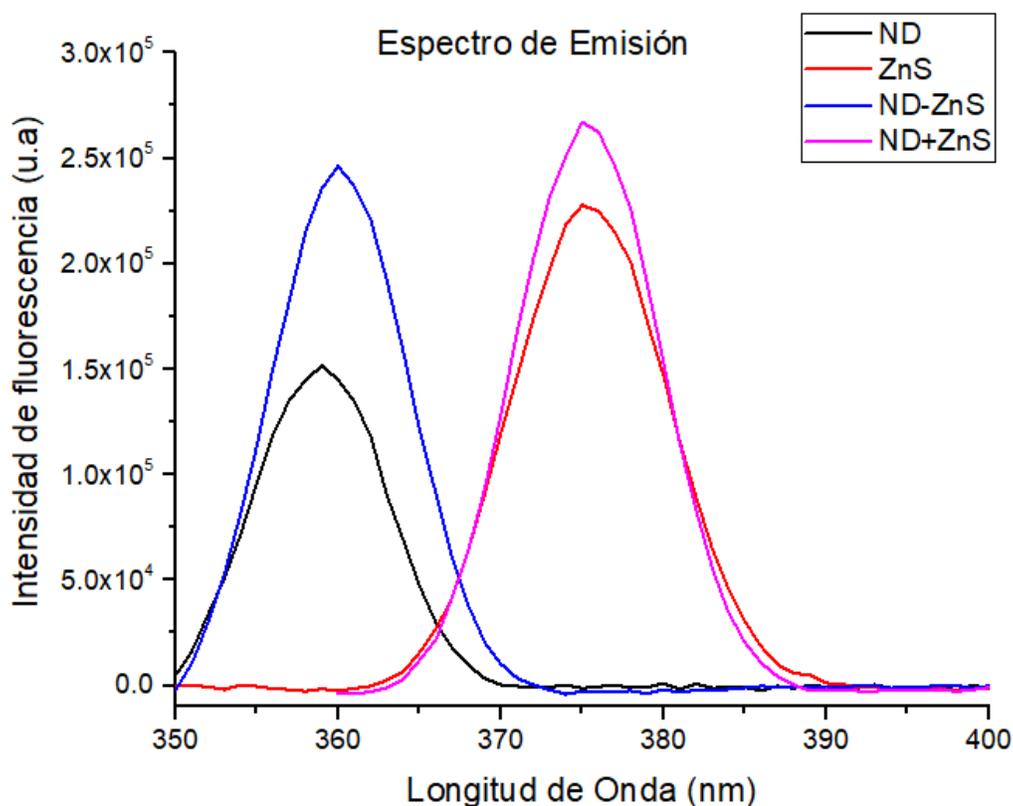


Figura 22 Espectro de fluorescencia de los diferentes compuestos.

7.5 Mecanismos del proceso de funcionalización

La síntesis uno identificada como ND-ZnS, propone el siguiente mecanismo de reacción con un rendimiento del 20%, donde se observa como producto el acetato de sodio, el cual es removido mediante centrifugación. La interacción propuesta que ocurre entre los grupos carboxílicos del nanodiamante y el punto cuántico de ZnS es de tipo electrostática, ya que se pueden dar atracciones o repulsiones por acción de cargas.



La síntesis dos etiquetada como ND+ZnS, se lleva a cabo en dos pasos y tiene un rendimiento de 19.8%, en el primero se obtiene el ZnS y en el segundo se adiciona NaOH para activar el grupo carboxílico y que el punto cuántico pueda ser acoplado al nanodiamante como se observa a continuación.

Paso 1



Paso 2



Es importante mencionar como se observó en los resultados anteriores de fluorescencia que ambos presentan intensidad similares, sin embargo, la síntesis uno se lleva a cabo en menos pasos, lo que la hace más sencilla. Es posible aumentar el rendimiento de la síntesis dos hasta un 40.08% si se aumenta al doble los mg de ZnS utilizado en la reacción.

8.CONCLUSIONES

- ❖ Los complejos obtenidos ND-ZnS y ND+ZnS pueden ser detectados por técnicas analíticas como absorción y fluorescencia, lo que los hace marcadores multidetectable.
- ❖ Este nanomarcador es un ejemplo de tipos de nanopartículas semiconductoras, que puede ser usado, solo o con otros compuestos, para diversas aplicaciones, ya sea en medicina, biotecnología, electrónica etc.
- ❖ El uso de técnicas que involucran espectroscopías de absorción y de fluorescencia para análisis de puntos cuanticos, son más sencillas de llevar a cabo y presentan costos bajos de operación respecto a otras técnicas analíticas comunes.
- ❖ Se obtuvo un incremento relativo de fluorescencia superior con los nanodiamantes funcionalizados respecto al nanodiamantes y ZnS sin funcionalizar.
- ❖ Ya que ND-ZnS y ND+ZnS presentan emisión por debajo de los 400 nm, se dice que es un marcador silencioso.
- ❖ De las síntesis utilizadas, la primera genera menos residuos que la segunda y requiere de un menor número de reacciones, por lo que sería la síntesis a elegir, independientemente de que la intensidad de fluorescencia es similar para ambas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albani, J. (2007). *Fluorescence Spectroscopy Principles*. (I, Ed.), *Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy*. Australia: Blackwel.
- Alfaro, A.M Huitle, U.M y Martínez, C. (2006). *Nanodiamantes*. (University of Milan, Ed.) (Vol. IX). Italy.
- Avila, M. F. S. (2016). Nanotecnología. El Arte de lo invisible. Recuperado a partir de <https://www.gestiopolis.com/nanotecnologia-arte-lo-invisible/>
- Barberio, M., Barone, P., & Oliva, A. (2012). Optical properties of ZnS-carbon nanotubes composites. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(6), 642–646. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.02.028>
- Cao, L., Yang, S. T., Wang, X., Luo, P. G., Liu, J. H., Sahu, S., ... Sun, Y. P. (2012). Competitive performance of carbon “quantum” dots in optical bioimaging. *Theranostics*, 2(3), 295–301. <https://doi.org/10.7150/thno.3912>
- Davidson, M. W. (2015). Basic Concepts in Fluorescence. Recuperado a partir de <https://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html>
- Ecured. (2012). Fluorescencia. Recuperado el 12 de marzo de 2019, a partir de <https://www.ecured.cu/Fluorescencia>
- Gupta, C. (2017). Cancer treatment with nano-diamonds. *Frontiers in Bioscience*, 9(1), 473. <https://doi.org/10.2741/s473>
- Holler F.J, D. A. S. & S. R. (2006). Principles Of Instrumental Analysis, 1, 345–352.
- Industry Meeting for Sustainability. (2012). The Brazilian oil , gas and biofuels industry ’ s contribution to the country ’ s sustainable development.
- IUPAC, C. of C. T. (1997). specific surface area. Recuperado a partir de <https://web.archive.org/web/20110721220742/http://goldbook.c60.kiev.ua/S05806.pdf>
- Kang, R. H., Baek, S. W., Ryu, T. K., & Choi, S. W. (2018). Fabrication of blue-fluorescent nanodiamonds modified with alkyl isocyanate for cellular bioimaging. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 167, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.04.014>
- Krawczyk, P., Czeleń, P., Jeliński, T., & Cysewski, P. (2018). The influence of donor substituents on spectral properties and biological activities of fluorescent markers conjugated with protein. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 365(July), 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.08.003>
- Krueger, A., & Lang, D. (2012). Functionality is key: Recent progress in the surface modification of nanodiamond. *Advanced Functional Materials*, 22(5), 890–906.

<https://doi.org/10.1002/adfm.201102670>

- Labiadh, H., & Hidouri, S. (2017). ZnS quantum dots and their derivatives: Overview on identity, synthesis and challenge into surface modifications for restricted applications ZnS quantum dots and their derivatives. *Journal of King Saud University - Science*, 29(4), 444–450. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.12.001>
- Lai, L., & Barnard, A. S. (2015). Functionalized Nanodiamonds for Biological and Medical Applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(2), 989–999. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9735>
- Landeros-Martinez, L. L., Glossman-Mitnik, D., Orrantia-Borunda, E., & Flores-Holguín, N. (2017). New methods of esterification of nanodiamonds in fighting breast cancer-a density functional theory approach. *Molecules*, 22(10). <https://doi.org/10.3390/molecules22101740>
- Li, L., Bian, R., Ding, Y., Yu, M., & Yu, D. (2009). Application of functionalized ZnS nanoparticles to determinate uracil and thymine as a fluorescence probe. *Materials Chemistry and Physics*, 113(2–3), 905–908. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2008.08.050>
- Mochalin, V. N., Shenderova, O., Ho, D., & Gogotsi, Y. (2012). The properties and applications of nanodiamonds. *Nature Nanotechnology*, 7(1), 11–23. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.209>
- Nunn, N., Torelli, M., McGuire, G., & Shenderova, O. (2017). Nanodiamond: A high impact nanomaterial. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 21(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cossms.2016.06.008>
- Petit, T., & Puskar, L. (2018). FTIR spectroscopy of nanodiamonds: Methods and interpretation. *Diamond and Related Materials*, 89(December 2017), 52–66. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2018.08.005>
- Pichot, V., Muller, O., Seve, A., Yvon, A., Merlat, L., & Spitzer, D. (2017). Optical properties of functionalized nanodiamonds. *Scientific Reports*, 7(1), 3–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14553-z>
- Public Health. (2009). Nanomateriales. Recuperado a partir de https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/nanomaterials/es/index.htm
- Quispe, V. H. (2009). Aplicaciones Industriales de la Nanotecnología. *Revista de Información Tecnología y Sociedad*, 58–61.
- Riddick. (1968). *Control of colloid stability through zeta potential* (Vol. Zeter Mete). Livingston: Zeta-Meter. Recuperado a partir de https://books.google.com.mx/books/about/Control_of_colloid_stability_through_zet.html?id=5tVqAAAAMAAJ&redir_esc=y
- Samantha, N. R., Onani, M. O., Meyer, M., & Madiehe, A. M. (2018). Peptide-functionalized quantum dots for potential applications in the imaging and

treatment of obesity, 2551–2559.

- Schmidlin, L., Pichot, V., Comet, M., Josset, S., Rabu, P., & Spitzer, D. (2012). Identification, quantification and modification of detonation nanodiamond functional groups. *Diamond and Related Materials*, 22, 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.diamond.2011.12.009>
- Schrand, A. M., Hens, S. A. C., & Shenderova, O. A. (2009). Nanodiamond particles: Properties and perspectives for bioapplications. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 34(1–2), 18–74. <https://doi.org/10.1080/10408430902831987>
- Shenderova, O. A. (2017). Monodispersed Nanodiamonds and their Applications. Recuperado a partir de <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/technology-spotlights/monodispersed-nanodiamonds-applications.html>
- Silva do Nascimento, A., Cabral Filho, P. E., Fontes, A., Saegesser Santos, B., Rodrigues de Carvalho, F., Stragevitch, L., & Soares Leite, E. (2019). CdSe quantum dots as fluorescent nanomarkers for diesel oil. *Fuel*, 239(August 2018), 1055–1060. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.11.043>
- Skoog, D. A. (2012). Fluorescencia en Nuestra Vida. Recuperado a partir de <http://fluorescenciaennuestravida.blogspot.com/2012/05/aplicaciones-de-la-fluorescencia.html>
- Spitsyn, B. V., Gradoboev, M. N., Galushko, T. B., Karpukhina, T. a, Serebryakova, N. V, Kulakova, I. I., & Melnik, N. N. (2005). Purification and functionalization of nanodiamond. *Synthesis, Properties and Applications of Ultrananocrystalline Diamond*, 192, 241–252. https://doi.org/10.1007/1-4020-3322-2_18
- Sun, Y.-P., Wang, X., Lu, F., Cao, L., Meziani, M. J., Luo, P. G., ... Veca, L. M. (2008). Doped Carbon Nanoparticles as a New Platform for Highly Photoluminescent Dots. *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces*, 112(47), 18295–18298. <https://doi.org/10.1021/jp8076485>
- Tapia, J. I., Larios, E., Bittencourt, C., Yacamán, M. J., & Quintana, M. (2016). Carbon nano-allotropes produced by ultrasonication of few-layer graphene and fullerene. *Carbon*, 99, 541–546. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.12.071>
- Universidad de Granada. (2019). ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR. Recuperado a partir de <https://www.ugr.es/~decacien/Planes/Quimica/Plan 1997/temarios/671111d-archivos/fundamentos/SEMINARIO 3.PDF>
- Verma, N., Singh, A. K., & Saini, N. (2017). Synthesis and characterization of ZnS quantum dots and application for development of arginine biosensor. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 15(July), 41–45. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2017.07.004>

- Yu, W. W., Qu, L., Guo, W., & Peng, X. (2003). Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chemistry of Materials*, 15(14), 2854–2860. <https://doi.org/10.1021/cm034081k>
- Zou, Q., Li, Y. G., Zou, L. H., & Wang, M. Z. (2009). Characterization of structures and surface states of the nanodiamond synthesized by detonation. *Materials Characterization*, 60(11), 1257–1262. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2009.05.008>