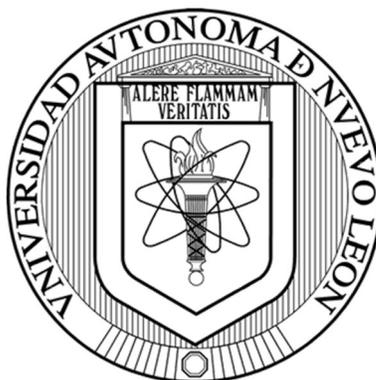


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**OBTENCIÓN DE UN APTASENSOR FLUOROMÉTRICO DE PUNTOS
CUÁNTICOS DE Cu_2S FUNCIONALIZADOS PARA SENSADO DE As(III)**

Por:

BRANDON ALBERTO CRUZ ESCOBAR

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Química de los Materiales**

J u n i o, 2 0 2 3

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**OBTENCIÓN DE UN APTASENSOR FLUOROMÉTRICO DE PUNTOS
CUÁNTICOS DE Cu_2S FUNCIONALIZADOS PARA SENSADO DE As(III)**

Por:

BRANDON ALBERTO CRUZ ESCOBAR

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Química de los Materiales**

J u n i o, 2 0 2 3

**OBTENCIÓN DE UN APTASENSOR FLUOROMÉTRICO
DE PUNTOS CUÁNTICOS DE Cu_2S
FUNCIONALIZADOS PARA
SENSADO DE As(III)**

Revisión de la tesis

**Dra. Yolanda Peña Méndez
Comité Tutorial**

**Dr. Tomás Constantino Hernández García
Comité Tutorial**

**Dr. Boris Ildusovich Kharissov
Comité Tutorial**

**Dr. Jesús Ángel Valdez Aguilar
Comité Tutorial**

**Dr. Pablo Francisco Martínez Ortiz
Comité Tutorial**

**Dra. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS
Sub-Directora de Estudios de Posgrado**

AGRADECIMIENTOS

Sin duda el COVID-19 vino a impactar mi vida en el curso de este posgrado... en todos los sentidos, por lo cual agradezco a Dios, que me protegió durante esta aventura y se hizo presente a través de todos los que me ofrecieron su apoyo cuando más lo necesité. Asimismo, me siento complacido de haber participado en la mejora e innovación de los materiales que ahora han sido reconocidos en el Premio Nobel de Química del 2023, los puntos cuánticos.

A mi mamá, Petra Escobar Flores, por su apoyo incondicional y por ser mi soporte a lo largo de estos 3 años, compartiendo preocupaciones, caídas y logros, con amor y su siempre sabia orientación.

A la directora de este proyecto, la Dra. María Idalia del Consuelo Gómez de la Fuente por todo su apoyo constante desde la Maestría, así como por sus siempre atinadas enseñanzas para orientarme en la ciencia y la investigación.

Al Dr. Jesús Ángel Valdez Aguilar por su apoyo y orientación en la obtención de las imágenes TEM.

A mis amigos del Laboratorio de Materiales I, Fer, Dalmy, Cynthia, José Susana y Eder por los buenos momentos a lo largo de estos 5 años de conocernos desde la Maestría.

A la Dra. Patricia Zambrano por las oportunidades proporcionadas durante su gestión en la Sociedad Mexicana de Materiales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

DEDICATORIA

Dedicado con cariño y aprecio a ti, mamá, sin ti nada de esto hubiera sido posible.

RESUMEN

Brandon Alberto Cruz Escobar

Fecha de Graduación: Junio, 2023

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de Estudio: OBTENCIÓN DE UN APTASENSOR FLUOROMÉTRICO DE PUNTOS CUÁNTICOS DE Cu_2S FUNCIONALIZADOS PARA SENSADO DE As(III) .

Número de páginas: 74

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con orientación en Química de los Materiales.

Área de Estudio: materiales funcionales, puntos cuánticos, sensado, arsénico.

Propósito y Método del Estudio: La invención de sustituir los puntos cuánticos tradicionales por puntos cuánticos de Cu nace de la necesidad de aplicar los principios de la Química e Ingeniería verde, ya que se pretende utilizarlos para la detección de As(III) que por sí solo ya representa una importante fuente de contaminación. Aunado al desconocimiento de que el As puede ser un potencial contaminante en agua de pozo, detectar As a las concentraciones tan bajas que propone la Organización Mundial de la Salud solo permite que este sea detectado por técnicas instrumentales particulares no fácilmente accesibles o comunes. Por ello se propone detectar As(III) mediante QD's de Cu_2S funcionalizados y un aptámero específico para As(III) mediante espectroscopia de fluorescencia, como técnica instrumental sencilla de aplicar.

Contribuciones y Conclusiones: Un aptasensor fluorescente de QD's de Cu_2S funcionalizados con LCIS es presentado por primera vez, aplicando métodos modificados y fáciles para la obtención de los QD's y para detectar As(III) mediante espectroscopia de fluorescencia. Los QD's fueron estables, fluorescentes y solubles en agua, su fluorescencia se vio suprimida por el aptámero y se recuperó al añadir As(III) a concentraciones del orden de 1×10^{-10} M, por lo cual el mecanismo de detección propuesto se cumplió. Este método de detección es atractivo para sensar inclusive otros analitos, simplemente cambiando el aptámero a uno que sea afín al analito a detectar.

Firma de la asesora:

Dra. María Idalia del Consuelo Gómez de la Fuente

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	4
1.2 Análisis crítico	7
1.3 Aportación científica.....	8
1.4 Hipótesis.....	8
1.5 Objetivo general	8
1.6 Objetivos específicos.....	8
II. FUNDAMENTO TEÓRICO	10
2.1 Confinamiento Cuántico, Puntos Cuánticos (QD's) y fluorescencia	10
2.2 Aplicaciones de los QD's, Motivación Para el Uso de Cu ₂ S.....	12
2.2.1 Principio de Síntesis de QD's de Cu ₂ S.....	15
2.3 Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).....	15
2.4 Difracción de Rayos-X en Polvos (DRX).....	17
2.5 Espectroscopia de Absorción Ultravioleta-Visible (UV-vis).....	18
2.6 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	19
2.7.1 Resolución y Ecuación de Abbe.....	19
2.7.2 Interacción de los Electrones con la Muestra.....	21
2.7.3 Funcionamiento general de la técnica de SEM	23
2.7.4 Modo STEM	24
2.7 Espectroscopia Raman	25
2.8 Espectroscopia de Fluorescencia.....	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1 Disolventes y Reactivos	29

3.2	Cuantificación, Manejo y Disposición de Residuos	30
3.3	Técnicas Experimentales y Equipos.....	30
3.3.1	Espectroscopia de Infrarrojo (IR)	30
3.3.2	Espectroscopia de Difracción de Rayos-X en Polvos (DRX). 30	
3.3.3	Espectroscopia UV-Vis.....	31
3.3.4	Microscopía Electrónica de Barrido, modo STEM.....	31
3.3.5	Espectroscopia Raman	31
3.3.6	Espectroscopia de fluorescencia, determinación de relación molar óptima QD's/aptómero para detección de As(III).....	32
3.3.7	Microscopia Electrónica de Transmisión	32
3.4	Procedimiento Experimental.....	32
3.4.1.	Obtención de QD's de Cu ₂ S, Determinación de Condiciones de Síntesis.....	33
3.4.2.	Determinación de Radio Molar Aptómero/QD's que Permite la Mayor Función Respuesta.....	34
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1	Síntesis de QD's de Cu ₂ S	36
4.2	Determinación de Condiciones de Síntesis de QD's de Cu ₂ S.....	36
4.1.1	Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR).....	38
4.1.2	Difracción de Rayos-X en Polvos (DRX).....	40
4.1.3.	Espectroscopia UV-vis	41
4.1.4	Espectroscopia de Fluorescencia	43
4.1.5	STEM.....	44
4.1.6	Efecto de la Dilución Sobre la Fluorescencia y Relación Molar Óptima Aptómero/QD's para Detección de As(III)	46
4.1.7	Imágenes de TEM de los QD's	50
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
	BIBLIOGRAFÍA.....	56
	APÉNDICES	63
	APÉNDICE A. TOXICIDAD DEL AS (AMPLIACIÓN).....	63
	APÉNDICE B. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).....	65

APÉNDICE C. ESPECTROSCOPIA RAMAN, RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	74

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Disolventes y reactivos utilizados para la síntesis de los materiales.....	29
Tabla 2. Cantidades de reactivos utilizados en la determinación de condiciones de síntesis de los QD's de Cu ₂ S.	34

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Ilustración del principio de funcionamiento del aptasensor de As(III) de QD's CdTe/ZnS funcionalizados con cisteamina, tomado y traducido de [2].	5
Figura 2. Aumento de la E_g de los semiconductores en función de la disminución del tamaño del nanocrystal.	11
Figura 3. Niveles de energía de un excitón [15].	12
Figura 4. Estructura molecular de la LCIS.	14
Figura 5. Representación gráfica del accesorio de muestreo ATR.	16
Figura 6. Representación de los componentes principales utilizados en el equipo de DRX [19].	17
Figura 7. Ilustración de resolución en función de: a) círculos concéntricos, b) frente de onda.	20
Figura 8. Señales obtenidas por la interacción del haz de electrones y el espécimen y las regiones de donde son detectadas.	22
Figura 9. Influencia del voltaje de aceleración y del número atómico del espécimen en la excitación: (a) bajo número atómico y (b) alto número atómico.	23
Figura 10. Esquema general de los componentes del SEM [24].	24
Figura 11. Representación del fenómeno de dispersión Raman tipo Stokes y anti-Stokes.	26
Figura 12. Representación de los distintos tipos de ruido que se pueden presentar en un espectro Raman (espectro del yeso).	27
Figura 13. Descripción general de los pasos a seguir para la síntesis de los QD's de Cu_2S y detectar As(III).	33
Figura 14. Ejemplo de gráfico obtenido para determinar el radio molar óptimo aptámero/QD's, tomado y traducido del trabajo de Ensafi <i>et al.</i> [2].	35
Figura 15. Influencia en la emisión fluorescente al variar la relación molar Cu/S. Los valores de tamaño de cristalito para las variaciones LCIS/Cu y Cu/S se incluyen como tablas insertas.	37
Figura 16. Espectro FT-IR de: LCIS (línea verde) y QD's de Cu_2S funcionalizados con LCIS (línea naranja).	39

Figura 17. Posible conformación de los QD's de Cu ₂ S al funcionalizarse con LCIS, R representa el resto de la estructura de la LCIS.....	39
Figura 18. Difractograma de los QD's de Cu ₂ S.....	41
Figura 19. Espectro UV-vis de los QD's de Cu ₂ S.....	42
Figura 20 Espectros UV-vis de: a) de nanobarras y nanoplacas (línea azul) [42] y b) nanoesferas con dos funcionalizaciones diferentes [43].	42
Figura 21. Espectro de excitación de los QD's (verde) y espectro de emisión (marrón) de los QD's de Cu ₂ S funcionalizados con LCIS.....	44
Figura 22. a) Imagen de la dispersión de QD's utilizada en los análisis. Imágenes de STEM de los QD's de Cu ₂ S sintetizados a: b) 50000 aumentos y c) 100000 aumentos.....	45
Figura 23. Efectos de la temperatura en la distribución del tamaño en solución de QD's de Cu ₂ S, gráfica tomada y traducida de [17].	46
Figura 24. Detección de As(III), cambio en la emisión fluorescente antes de la adición de As(III) (línea negra) y después de añadir As(III) (línea roja, relación molar aptámero-QD's 1:1).	47
Figura 25. Representación esquemática del mecanismo de detección de As(III) y las respuestas observadas en la espectroscopía de fluorescencia.....	48
Figura 26. Función respuesta al variar el radio molar aptámero/QD's.	49
Figura 27. Imágenes de TEM de los QD's de Cu ₂ S funcionalizados: a) distribución de diámetros, b) Mapeo elemental de EDS de la imagen a) para Cu, c) y para S. 50	
Figura 28. Imágenes de TEM para reportes previos de obtención de QD's de Cu ₂ S: (a) QD's funcionalizados con glutatión [9], (b) QD's funcionalizados con N-acetilcisteína [17] y (c) QD's tipo núcleo-coraza de grafeno y Cu ₂ S [62].	51
Figura 29. Análisis de EDS de los QD's de Cu ₂ S funcionalizados.	52
Figura 30. Perfil de diámetros de los QD's obtenido mediante TEM.	53
Figura 31. Fases de la división cromosómica que ocurren durante la división celular.....	64
Figura 32. Esquema general de un microscopio electrónico de transmisión.....	66
Figura 33. Generado de rayos-X en una muestra de la interacción de electrones de alta energía.	68
Figura 34. Detección de rayos-X mediante un detector de EDS.	70
Figura 35. Geometría de un detector inclinado y el haz de electrones.....	72
Figura 36. Espectros Raman de la LCIS (línea negra) y de los QD's de Cu funcionalizados con LCIS (línea roja). Se incluye la estructura de la LCIS como inserto.	73

ABREVIATURAS

cm	centímetros.
cps	cuentas por segundo.
g	gramos.
h	hora.
IR	infrarrojo.
DRX	difracción de rayos-X.
min	minuto.
ml	mililitro.
nm	nanómetros.
u.a.	unidades arbitrarias.
cps	cuentas por segundo.
λ	longitud de onda.
Δ	calor.
LOD	límite de detección.

NOMENCLATURA

QD's

puntos cuánticos.

LCIS

L-cisteína.

CAPÍTULO 1

I. INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es uno de los metales pesados presentes en el medio ambiente. La contaminación por As, especialmente en mantos acuíferos, representa una amenaza a la salud pública mundial, concentraciones muy bajas son perjudiciales para el ser humano. La presencia de As en aguas de pozo se ha reportado en diversas zonas del mundo, como Argentina, Australia, Bangladesh, Camboya, Canadá, Chile, China, Ghana, Alemania, Hungría, India, Japón, Laos, Nepal, Pakistán, Polonia, Rumania, Taiwán, Tailandia, Reino Unido, Vietnam, EE.UU. e inclusive México [1]. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) clasifica el As y sus compuestos como carcinógenos para el ser humano, destacando que su presencia en agua para beber conduce al mismo efecto perjudicial. Los principales efectos por beber agua contaminada con As son el daño a la piel, perturbaciones en el sistema circulatorio y la muerte en casos extremos. Se ha confirmado que causa cáncer de piel, pulmones, vejiga, hígado y riñones. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el límite seguro de As en agua para beber es de 10 µg/l (133 nM). El As(III) y el As(V), son especies comunes en agua, sin embargo, la toxicidad del As(III) ha sido reportada como 60 veces mayor que el As(V). Por tanto, la cuantificación de As(III) es más relevante y necesaria [2] (para una explicación ampliada respecto a la toxicidad del As véase el **apéndice 1**). Existen diversos métodos instrumentales para cuantificación de As(III) como la Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente, la Espectrometría Atómica de Fluorescencia (AFS) [1], la

cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (HPLC-ICPMS), métodos electroquímicos [2] y espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS) [3]. No obstante, dichas técnicas son dependientes de instrumentación compleja, requieren de una inversión de tiempo y dinero, además de personal en particular [1].

Se pueden encontrar métodos más simples como los que utilizan aptasensores basados en agregación de nanopartículas [2], también están los compósitos aptasensores que utilizan nanopartículas de sílice [4-5]. Un aptasensor es aquel sensor que posee aptámeros en su estructura, moléculas de oligonucleótido (ARN o ADN de una sola cadena), que se enlazan a un objetivo en específico como moléculas o iones metálicos. La interacción objetivo-aptámero ocurre mediante puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, o una combinación de estas [2]. El uso de aptámeros ha incrementado recientemente, debido a su especificidad, facilidad de obtención y practicidad para detección de diversos analitos [1,2,4-6].

Recientemente se han comenzado a investigar aptasensores basados en puntos cuánticos (QD's) que exhiben eventos de mejora de fluorescencia o transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET por sus siglas en inglés) [1,6]. Este último fenómeno involucra la excitación secuencial y la emisión de dos fluoróforos vecinos, el primero funge como donador de energía a su vecino aceptor, llevando la emisión fluorescente del aceptor a una longitud de onda característica, pero también induce la extinción del fluoróforo donante. Este fenómeno puede utilizarse como una técnica de sensado superior a otras técnicas ópticas en términos de sensibilidad y selectividad [7]. Los QD's son preferidos por sobre otros materiales para sensado óptico debido a su estabilidad, amplio espectro de absorción, alto rendimiento cuántico y estabilidad fotoquímica [1,6].

Si bien pueden encontrarse diversos ejemplos de obtención y/o uso de QD's de Cd, remanece la cuestión del poco conocimiento de la

nanoecotoxicología de esta especie de Cd y de diversos metales, por lo cual, considerar la aplicación de puntos cuánticos más nobles es más apto en el contexto actual de contaminación ambiental [8]. Se ha demostrado recientemente que los QD's de Cu₂S funcionalizados [9] pueden ser obtenidos en medio acuoso de manera sencilla y su citotoxicidad y estabilidad coloidal puede ser modificada mediante biomoléculas.

El fenómeno FRET con estos QD's puede lograrse extinguiendo su fluorescencia al inducir una agregación provisional, recientemente se demostró para sensado de As(III) con QD's, que esta agregación puede inducirse mediante la previa adición de un aptámero que posee una carga diferente, dicha agregación se reduce gradualmente dependiendo de la presencia de As(III) por el cual el aptámero posee alta afinidad, recuperando así la fluorescencia de los QD's, de manera que se obtuvo una respuesta proporcional a la concentración de As(III) [2]. El aplicar diversos aptasensores sobre QD's funcionalizados puede inclusive, abrir un abanico de posibilidades para sensar diversas biomoléculas e iones, simplemente cambiando por el aptámero correspondiente a cierta especie [6].

Por lo tanto, la preparación de un aptasensor basado en QD's de Cu₂S puede ser una ruta efectiva para producir un material que exhiba el fenómeno FRET que permita sensar As(III) con precisión y exactitud mediante una respuesta fluorescente determinable mediante un fluorómetro, como técnica instrumental más económica y sencilla con potencial para sensado de diversos analitos.

1.1 Antecedentes

Aptasensores fluorescentes de As

Se puede ubicar el primer aptasensor fluorescente de As en el trabajo reportado por Liu *et al.* [10] en el 2014, un biosensor basado en ADN que es adsorbido por perlas magnéticas. En este, dichas perlas adsorben oligonucleótidos fluorescentemente marcados mediante su grupo fosfato, lo cual resulta en la extinción fluorescente. En presencia de arsenato, los oligonucleótidos son desplazados por afinidad al arsenato, incrementando la fluorescencia. Se logró un LOD de 300 nM.

En el 2017, Taghdisi *et al.* [5] fabricaron un biosensor de As(III) aprovechándose del cambio en la conformación del objetivo inducido por biotina, un aptámero complementario modificado y marcado con una cadena adicional de ADN, nanopartículas de sílice modificadas con streptavidina y aptámero sin marcar. Al introducir As(III), el aptámero libera su cadena complementaria de ADN, formando una estructura en la superficie de las nanopartículas de sílice funcionalizadas, lo cual incrementó su respuesta fluorescente. Se logró un LOD de 0.45 nM.

Aptasensores de As a base de QD's

En 2016, Ensafi *et al.* [2] crearon un aptasensor de As(III) con propiedad FRET para la determinación de As (III). En este reporte, el aptámero fue utilizado para inducir la agregación de QD's núcleo-coraza de CdTe/ZnS estabilizados catiónicamente con cisteamina, el aptámero al poseer carga negativa indujo la aglomeración y la fluorescencia de los QD's se vio disminuida. Al añadir As(III), el aptámero formó un complejo, previniendo así la agregación de los QD's e incrementando la intensidad de su fluorescencia, respuesta que fue dependiente de la concentración de As(III) (Figura 1) . Este principio de El LOD fue de 1.3

pmol/l con un intervalo de 1.0×10^{-11} – 1.0×10^{-6} mol/l, estos resultados fueron alcanzados debido a la selectividad del aptámero por el As(III) en agua.

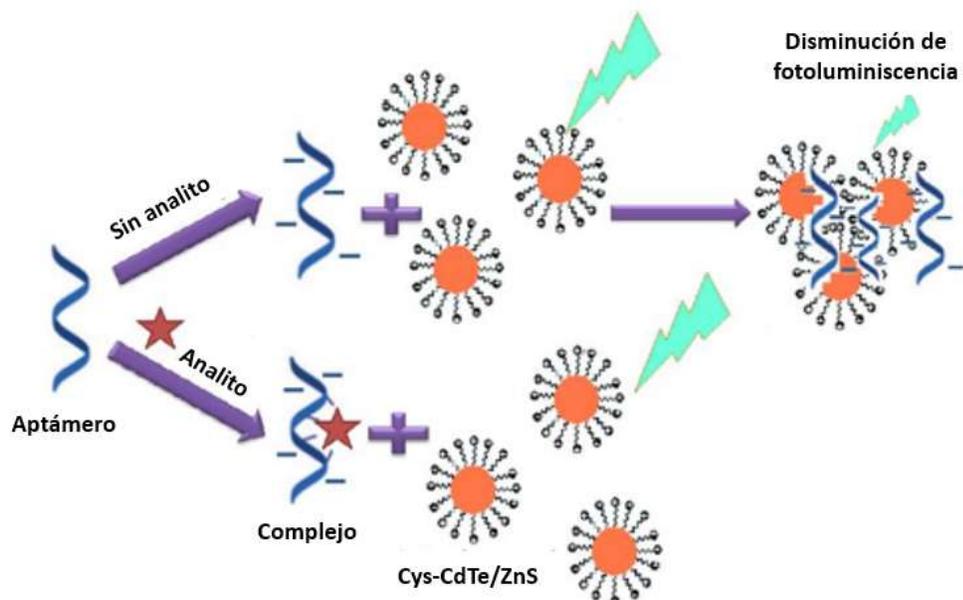


Figura 1. Ilustración del principio de funcionamiento del aptasensor de As(III) de QD's CdTe/ZnS funcionalizados con cisteamina, tomado y traducido de [2].

En el 2017, Oroval *et al.* [4] optaron por el uso de un andamio inorgánico y un material fluorescente con un mecanismo de funcionamiento diferente, para ello sintetizaron NP's mesoporosas de sílice de 100 nm de diámetro funcionalizándola con aptámero específico para As(III), logrando un LOD de 11.97 nM y un intervalo de 53.2 a 798 nM. En este, los poros se modificaron con rodamina B y la superficie de las NP's fue funcionalizada con grupos aminopropilo, dicho compuesto fue envuelto en el aptámero, de manera que al agregar As(III) los poros de las NP's se desbloquean, para subsecuentemente liberar la rodamina y lograr una respuesta fluorescente dependiente de la concentración de As(III).

Además de la estrategia de extinción de fluorescencia, la mejora en la fluorescencia de aptasensores de ADN/QD's fue aplicada por Zhang *et al.* [11] en el 2017 para detección de arsenito. El compuesto sintetizado utilizando ssADN

rico en G/T, mostró propiedades ópticas especiales y adquirió estructura básica y propiedades biológicas de sus precursores de ssADN, que hizo que los QD's se enlazaran selectivamente al arsenito, conduciendo a una región particular del ssADN a una estructura ordenada que se especula, mejoró interacciones intramoleculares, bloqueó canales de relajación no radiativos y propició el decaimiento radiativo. Se logró un LOD de 0.2 µg/l en un intervalo de 1 a 150 µg/l.

En el 2017, Oroval *et al.* [4] optaron por el uso de un andamio inorgánico y un material fluorescente con un mecanismo de funcionamiento diferente, para ello sintetizaron NP's mesoporosas de sílice de 100 nm de diámetro funcionalizándola con aptámero específico para As(III), logrando un LOD de 11.97 nM y un intervalo de 53.2 a 798 nM. En este, los poros se modificaron con rodamina B y la superficie de las NP's fue funcionalizada con grupos aminopropilo, dicho compuesto fue envuelto en el aptámero, de manera que al agregar As(III) los poros de las NP's se desbloquean, para subsecuentemente liberar la rodamina y lograr una respuesta fluorescente dependiente de la concentración de As(III).

Además de la estrategia de extinción de fluorescencia, la mejora en la fluorescencia de aptasensores de ADN/QD's fue aplicada por Zhang *et al.* [11] en el 2017 para detección de arsenito. El compuesto sintetizado utilizando aptámero rico en guanina y timina, mostró propiedades ópticas especiales y adquirió estructura básica, que hizo que los QD's se enlazaran selectivamente al arsenito, cambiando una región en particular del aptámero a una estructura ordenada que se especuló, mejoró interacciones intramoleculares, bloqueando canales de relajación no radiativos y propiciando el decaimiento radiativo. Se logró un LOD de 0.2 µg/l en un intervalo de 1 a 150 µg/l.

QD's de Cu₂S, consideraciones en funcionalización

Vaishnav *et al.* [12] en el 2016 indicaron que la funcionalización con L-cisteína (en este caso de QD's de CdTe) permite una fuerte interacción cisteína-As(III) mediante enlaces de S. Dicha interacción disminuyó la fluorescencia de manera proporcional a la cantidad de As(III) presente, de manera que se logró un LOD de 2.0 nM.

Los QD's de Cu₂S son prometedores para su uso en bioaplicaciones o para tener en cuenta principios de la Química Verde. Sin embargo, los reportes de su obtención son limitados debido a la dificultad para transferirlos de una fase aceite a una acuosa para aplicaciones diversas, como lo señalaron Wang *et al.* en el 2015 [9], para resolver dicha problemática, demostraron la síntesis acuosa de dichos QD's utilizando diversos estabilizantes, los cuáles además fueron evaluados en citotoxicidad, concluyendo que los QD's de Cu₂S estabilizados con glutatión exhibieron mayor estabilidad coloidal en diversas soluciones buffer y tuvieron la menor respuesta citotóxica. Cabe destacar que el glutatión a pH = 7 posee una carga neta negativa [13-14].

1.2 Análisis crítico

Los reportes de aptasensores aplicables a As(III), la especie más tóxica, no son frecuentes y la mayoría utilizan QD's de Cd y/o liberación de colorantes.

Los QD's de Cu₂S se muestran como una alternativa más noble ambientalmente contra el Cd.

Los QD's de Cu₂S pueden utilizarse como sensores de iones metálicos. Su citotoxicidad y estabilidad pueden variarse mediante la funcionalización. Estos no se han utilizado como aptasensores.

Análogamente a Ensafi *et al.* [2], los QD's de Cu₂S podrían funcionalizarse con biomoléculas para atribuirles carga neta positiva, en presencia del aptámero específico (de carga negativa), los QD's se agregarán y disminuirá su

fluorescencia. La fluorescencia podrá recuperarse proporcionalmente a la cantidad de As(III) presente.

1.3 Aportación científica

Un nuevo y ambientalmente noble aptasensor fluorescente de As(III) en agua a base de puntos cuánticos de Cu₂S funcionalizados con LCIS.

1.4 Hipótesis

El As(III) puede ser sentido en agua mediante espectroscopia de fluorescencia a niveles equiparables a reportes previos mediante puntos cuánticos de Cu₂S funcionalizados con LCIS en presencia del aptámero específico para dicho analito.

1.5 Objetivo general

Obtener un aptasensor de QD's de Cu₂S funcionalizados con LCIS y sensar As(III) en agua.

1.6 Objetivos específicos

1. Sintetizar y funcionalizar los puntos cuánticos de Cu₂S.
2. Caracterizar los QD's mediante espectroscopia FT-IR, DRX, UV-vis, STEM, TEM, espectroscopia Raman y espectroscopia de fluorescencia.
3. Determinar si se da un cambio en la respuesta fluorescente de los QD's al añadir primero el aptámero y luego As(III).
4. Obtener la respuesta fluorescente de los QD's en presencia de aptámero sin As (III) (F₀) y con As(III) (F) a distintas relaciones molares aptámero/QD's.

5. Obtener la función respuesta ($F-F_0$) para cada relación molar aptámero/QD's y definir la que permita el mejor resultado.

CAPÍTULO 2

II. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 Confinamiento Cuántico, Puntos Cuánticos (QD's) y fluorescencia

Al restringir los electrones en una región pequeña en el espacio, estos están confinados. Cuando el radio del QD es menor que el radio de Bohr del excitón (radio de Bohr es la distancia promedio entre el electrón en la banda de conducción y el hueco que queda en la banda de valencia), hay una cuantificación de los niveles de energía de acuerdo con el principio de exclusión de Pauli (Figura 2). Los niveles de energía discretos y cuantificados de estos QD's los relacionan más cercanamente a los átomos, que al material macroscópico, por lo cual se les apoda también como "átomos artificiales". A este fenómeno de cuantificación se le conoce como "confinamiento cuántico", en el que los electrones en el átomo están más cerca del núcleo, atrapados por la interacción electromagnética protón-electrón.

Los puntos cuánticos (QD's) se descubrieron en 1980 por grupos independientes en Rusia y Estados Unidos que buscaban demostrar el hecho de que los QD's son una clase particular de semiconductores confinados en las tres dimensiones del espacio, como resultado, tienen propiedades intermedias entre semiconductores convencionales y moléculas discretas. Generalmente, son materiales semiconductores compuestos de los elementos de las familias II-VI, III-V o IV-VI. Los QD's tienen un tamaño de ~2-10 nm, estos poseen varios cientos o pocos miles de átomos para conformar un nanocristal.

A la escala de los QD's, el confinamiento cuántico cambia las propiedades electrónicas y ópticas a los materiales. En semiconductores a escala macroscópica, la energía de banda prohibida (conocida en el inglés como *band-gap* y simbolizada como E_g), aquella barrera de energía entre la banda de valencia y la banda conducción, varía con la composición del material. A diferencia de los semiconductores a escala macroscópica, la E_g en los QD's se verá mayormente influenciada por su diámetro. Por lo tanto, al disminuir el tamaño de cristal, aumenta la diferencia de energía entre la banda de valencia más alta y la banda de conducción más baja. Entonces es necesaria más energía para excitar el QD y, simultáneamente, se libera más energía cuando el material regresa a su estado fundamental, resultando en un cambio de color de rojo al azul en la luz emitida, esto último conocido como fluorescencia, fenómeno que hace a los QD's atractivos para aplicaciones en luminiscencia. Como resultado, los QD's pueden emitir diversos colores de luz utilizando el mismo material, cambiando simplemente el diámetro del QD (Figura 2).

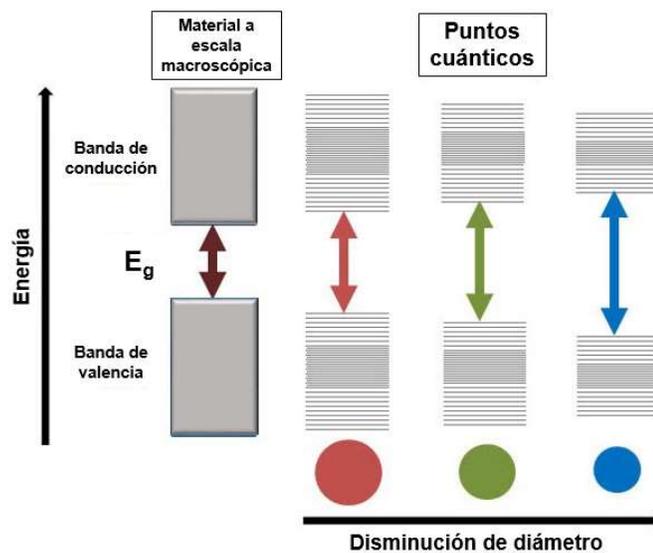


Figura 2. Aumento de la E_g de los semiconductores en función de la disminución del tamaño del nanocristal.

Ampliando un poco más al respecto, en semiconductores como los utilizados en QD's, se forma un estado fundamental para el par electrón-hueco, conocido como excitón, este se crea cuando existe una interacción entre el par electrón-hueco; cuando se excita un electrón desde la banda de valencia a la banda de conducción y el hueco que queda en la banda de valencia, al tener carga opuesta interacciona con el electrón mediante fuerza de Coulomb, quedando ligados uno al otro. Los excitones pueden existir en una serie de estados fundamentales en la E_g (Figura 3) [15-16].

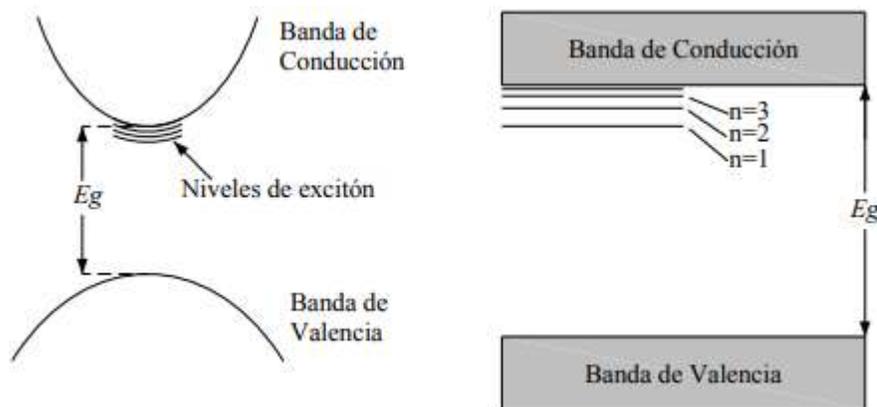


Figura 3. Niveles de energía de un excitón [15].

2.2 Aplicaciones de los QD's, Motivación Para el Uso de Cu_2S

Debido a su intensidad de emisión fluorescente, su emisión estable y absorción modificable, diversas aplicaciones para los QD's han sido estudiadas como: iluminación eficiente, celdas solares, formación de bioimágenes y sensado de analitos [15]. Enfocándose en esta última aplicación, el sensado con QD's ha sido investigado debido a los resultados de alta selectividad y sensibilidad para detectar y/o cuantificar analitos, esto mediante la medición del cambio de la respuesta fluorescente de los QD's. Los sensores fluorescentes representan una de las técnicas útiles para detección de iones de metales pesados. Los

semiconductores nanocristalinos o QD's han llamado la atención como una nueva clase de fluoróforos inorgánicos, debido a sus propiedades únicas y superiores por sobre fluoróforos orgánicos. Los QD's de Cd con diferentes moléculas estabilizadoras representan los materiales sensores de QD's más populares para sensado de iones de metales pesados. Sin embargo, la nanoecotoxicología de los QD's de Cd es un factor a tomar en cuenta a la hora de desarrollar aplicaciones, dado el contexto actual de contaminación ambiental. Estudios previos reportaron que la toxicidad de los QD's de Cu_2S es menor que los QD's de CdTe y algunos otros.

Desde el desarrollo de los QD's, la importancia de los estabilizadores y los elementos utilizados dependiendo de la aplicación de los QD's se ha demostrado a la hora de sintetizarlos. Como un nuevo tipo de semiconductor tipo p de Cu, el Cu_2S atrae interés debido a su alta estabilidad y baja toxicidad, por lo cual el estudio de sus propiedades en función del estabilizador utilizado es importante para definir sus aplicaciones [9]. Desde la síntesis de los QD's de Cu_2S , sus propiedades ópticas han sido estudiadas, pero sus aplicaciones en sensado han sido escasas al momento, esto debido a que la mayoría de los estudios en este material se han dado en fase aceite. La facilidad de nucleación del Cu_2S en fase acuosa comparado con la fase aceite ha hecho que las síntesis de estos QD's sean limitadas. Asimismo, la síntesis de QD's en fase aceite y transferencia a una fase acuosa es complicada, pues existe la facilidad de degradación, que afectará las propiedades del material. Por esto, es de mayor utilidad desarrollar métodos de síntesis de QD's de Cu_2S en fase acuosa directamente con una alta estabilidad.

Un estabilizador que contenga grupos mercaptano es importante al sintetizar QD's en fase acuosa, debido a su coordinación con el catión. Diferentes grupos funcionales superficiales pueden resultar de utilizar diferentes estabilizadores, debido a diferentes fuerzas de enlace de coordinación entre los grupos mercaptano y los QD's.

En fase acuosa, la síntesis de QD's de Cu_2S , el efecto de la coordinación de los grupos mercaptano con Cu^+ puede controlar efectivamente el crecimiento del nanocristal. Por ende, los ligandos mercaptano deben ser seleccionados teniendo en cuenta la pasivación superficial y lograr la estabilidad deseada: solubilidad y funcionalización superficial. La L-cisteína (LCIS) es utilizada para modificar la superficie de QD's. Entre los diferentes estabilizadores existentes, como aminoácido *in vivo* común, la LCIS no es tóxica y es fácilmente soluble en agua.

El tipo de estabilizador tiene un impacto en las propiedades ópticas de QD's que se sintetizan bajo las mismas condiciones de reacción, por lo cual es necesario analizar el efecto del estabilizador en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas [9,17]. Generalmente, la LCIS (Figura 4) es preferida para funcionalizar QD's con el fin de otorgarles dispersabilidad a estos. Se conoce que la LCIS se enlazarán a los QD's mediante enlaces de azufre, quedando así grupos funcionales polares en la periferia de los QD's, como el grupo amino y/o hidroxilo, dándole solubilidad en agua a los QD's y favoreciendo la repulsión entre estos, evitando que se formen cúmulos y que el efecto del confinamiento cuántico se disminuya o pierda por completo por el crecimiento del cristal [17].

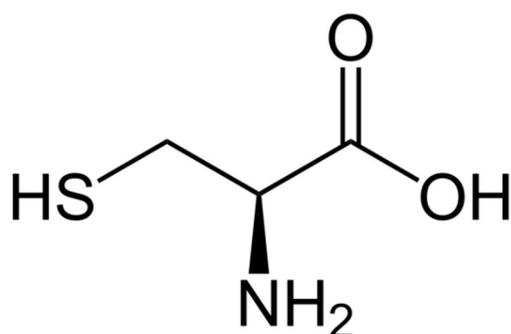


Figura 4. Estructura molecular de la LCIS.

2.2.1 Principio de Síntesis de QD's de Cu₂S

Como se menciona previamente, el crecimiento de los QD's de Cu₂S es controlado principalmente por la coordinación entre el Cu⁺ y los grupos mercaptano. A partir de CuCl₂, el Cu²⁺ debe de reducirse, en presencia del estabilizador este se reduce para formar el complejo Cu⁺-estabilizador que puede llegar a ser estable e inclusive insoluble, hasta el momento, de esta reacción se tendrá un medio de reacción ligeramente ácido por la formación de HCl. Al añadir NaOH, el complejo Cu⁺-estabilizador puede disolverse, el Cu⁺ dissociado podrá reaccionar con iones S²⁻ añadidos a la mezcla de reacción, lo cual derivará en la formación de nanocristales de Cu₂S estables, mediados por el estabilizador. Toda la reacción es llevada a cabo en una atmósfera inerte y en aislamiento de luz para evitar la oxidación del Cu⁺ a Cu²⁺ [17].

2.3 Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia infrarroja se utiliza para observar la vibración de distintos enlaces, en esta técnica los fotones a frecuencia de radiación infrarroja son absorbidos por los enlaces en la muestra, cada tipo de enlace absorbe radiación infrarroja a una frecuencia distinta, lo cual permite identificar enlaces de grupos funcionales. El típico equipo de espectroscopia IR emite las frecuencias IR de interés simultáneamente, la región del IR cercano está en el intervalo de 14000-4000 cm⁻¹, mientras que la región del IR medio está en el intervalo de 4000-400 cm⁻¹. El espectro IR se obtiene graficando el porcentaje de radiación transmitida (% transmitancia) por la muestra, contra el número de onda, (el inverso de la longitud de onda en unidades de cm⁻¹).

La espectroscopia IR es de interés en la caracterización rápida de QD's, pues requiere una mínima o nula preparación de la muestra para obtener un espectro, esto sin destruir la muestra. Analizando los espectros se permite comparar el producto de reacción y la molécula estabilizadora para estimar que

esta se encuentre enlazada al centro metálico, observando por ejemplo la desaparición de las bandas IR del estabilizador que correspondan a grupos funcionales que participan en formar los QD's estabilizados.

Aquellos equipos que aplican el método de transformada de Fourier (FT-IR) poseen mayor resolución y emplean menos tiempo para la recolección de datos. El accesorio de ATR (*Attenuated Total Reflectance* en inglés o *Reflectancia Total Atenuada*) se incorpora como método de muestreo debido a la rapidez y facilidad de análisis, pues no se necesita ninguna preparación de la muestra y esta puede recuperarse.

En el ATR (Figura 5), la radiación IR pasa por el cristal transmisor de alto índice de refracción, donde la reflexión interna crea una “onda evanescente” que sondea la muestra que estará presionada sobre dicho cristal. En las regiones de IR en que la muestra absorbe energía, la reflexión se atenúa, mientras que el resto de las frecuencias no absorbidas se reflejan. El haz atenuado regresa al cristal y sale por el extremo opuesto dirigiéndose al detector. El equipo registra el haz IR atenuado como señal, que puede usar para generar el espectro [18].

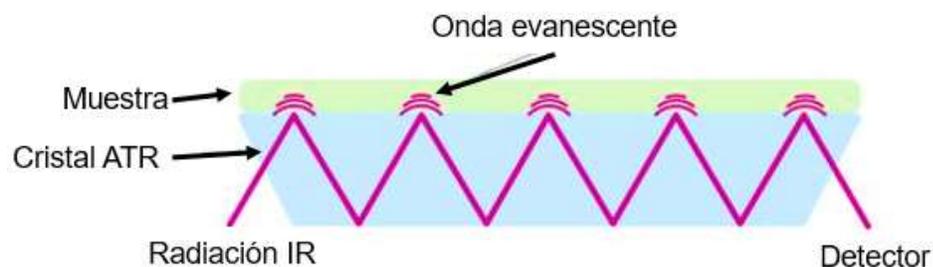


Figura 5. Representación gráfica del accesorio de muestreo ATR.

2.4 Difracción de Rayos-X en Polvos (DRX)

En esta técnica instrumental, un haz de rayos-X de longitud de onda conocida se incide sobre una muestra en polvo que se encuentra colocada sobre un soporte transparente a los rayos x, la intensidad de los rayos-X difractados por la muestra se censa por el detector, que es desplazado a diferentes ángulos (Figura 6).

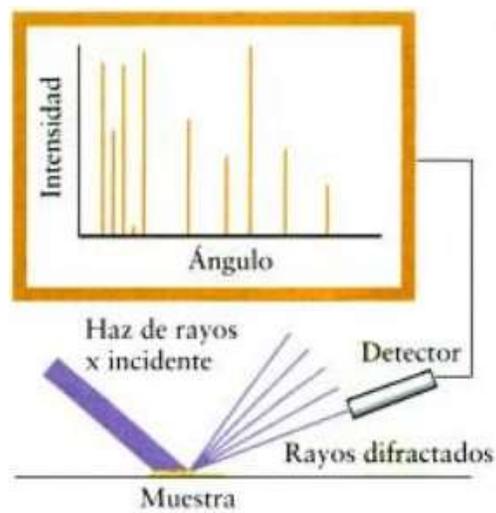


Figura 6. Representación de los componentes principales utilizados en el equipo de DRX [19].

El patrón de difracción será característico de la muestra y puede identificarse comparándolo en bases de datos o reportes dados en la literatura. La ecuación principal para análisis de resultados de un experimento de difracción en polvos es la ecuación 1, la ecuación de Bragg:

$$2d\sin\theta = \lambda \quad (\text{Ecuación 1})$$

Esta relaciona los ángulos (θ) en los que ocurre interferencia constructiva con la distancia interplanar (d) de los átomos de la muestra.

Al construir QD's, estos serán nanocristales, al determinar el tamaño de cristalito puede estimarse que estos son obtenidos en el valor de diámetros de los QD's indicado anteriormente, para esto se comienza por despejar la ecuación de Bragg para obtener d (Ecuación 2):

$$d = \lambda / 2 \sin \theta \quad (\text{Ecuación 2})$$

Este valor calculado a partir del pico de mayor intensidad. Posteriormente este valor, convertido en radianes se reemplaza en la siguiente ecuación, también conocida como ecuación de Debye-Scherrer (Ecuación 3) [19]:

$$D = \frac{K(\lambda)}{B \cos(\theta_B)} \quad (\text{Ecuación 3})$$

B deberá ser convertido a radianes (conocido entonces como β , que representa la anchura a media altura del pico de difracción más intenso) y K tendrá un valor de 0.94 (que aproxima el perfil de difracción a una sola esfera ideal con una gaussiana) y $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$, el valor de longitud de onda emitido por el ánodo de Cu en el equipo. Se determina así el diámetro de cristalito, haciendo un seguimiento del este valor, puede confirmarse que el material se sintetizó en la escala de los QD's [20].

2.5 Espectroscopia de Absorción Ultravioleta-Visible (UV-vis)

La espectroscopia de absorción ultravioleta-visible se basa en la medición de la transmitancia (T) o de la absorbancia de soluciones que se colocan en celdas transparentes a esta región del espectro [21]. La absorción de radiación electromagnética en esta región del espectro provoca la excitación de electrones desde orbitales bajos a más altos. Se obtendrá así una gráfica de absorbancia vs. longitud de onda, permitiendo así observar la región o regiones en que la muestra absorbe radiación electromagnética.

Al caracterizar materiales fluorescentes, el espectro de absorción del material se utiliza para determinar las longitudes de onda de máxima absorción

de fotones, de esta manera al irradiar la longitud de onda de máxima absorción en la espectroscopia de fluorescencia se lograrán obtener las emisiones de mayor intensidad en solución.

Para obtener el espectro de emisión de una muestra, esta deberá ser completamente soluble en un disolvente que no absorba radiación en la región de barrido del espectro [22].

2.6 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy* en inglés) es una técnica para estudiar la morfología microestructural de los materiales. Es preferible conocer los principios básicos de óptica de la luz con el fin de entender los fundamentos de la microscopía electrónica.

2.7.1 Resolución y Ecuación de Abbe

El límite de resolución se conoce como las distancias en las que dos objetos pueden ser separados y apreciarse como dos objetos diferentes. Ernst Abbe definió que el límite de resolución dependerá de la longitud de onda de la fuente de iluminación. A cierta longitud de onda, cuando el límite de resolución se excede, la imagen magnificada pierde definición

Debido a la difracción e interferencia, un punto de luz no podrá enfocarse como uno perfecto. En su lugar, la imagen se observará con un mayor diámetro que la fuente, un círculo compuesto de círculos concéntricos que disminuyen en intensidad (Figura 7, inciso (a)).

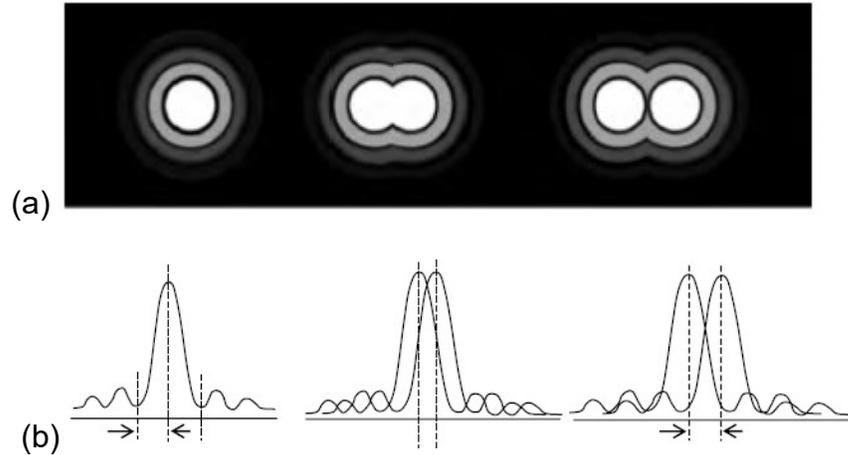


Figura 7. Ilustración de resolución en función de: a) círculos concéntricos, b) frente de onda.

Si el centro de dos picos son separados por una distancia igual al radio del círculo, ambos objetos podrán distinguirse entre sí (Figura 7, inciso (b)). La resolución en un sistema óptico perfecto se describe con la ecuación de Abbe (Ecuación 4):

$$d = 0.612\lambda / n \sin\alpha \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde:

d = resolución.

λ = longitud de onda utilizada.

n = índice de refracción del medio entre la fuente y el lente

α = mitad del ángulo del cono de luz del espécimen plano aceptado por el objetivo (ángulo de apertura media en radianes). $n \sin \alpha$ es también llamado apertura numérica (NA).

Al cambiar la fuente de iluminación y los lentes condensadores por un haz de electrones y lentes electromagnéticos respectivamente, se tendrá un microscopio electrónico. En SEM, un haz de electrones se utiliza para barrer la superficie de la muestra, produciendo diversas señales que se convierten

posteriormente en una imagen, algunas de estas también ayudarán a determinar la composición de la muestra observada.

2.7.2 Interacción de los Electrones con la Muestra

La imagen obtenida dependerá de la adquisición de señales producidas por la interacción electrones-muestra. Dichas interacciones pueden ser de dos clases: elásticas e inelásticas. La dispersión elástica permite la deflexión del haz de electrones incidente por parte del núcleo atómico o por los electrones en la muestra que posean la misma energía. La dispersión inelástica acontece mediante diferentes interacciones entre los electrones del haz y los electrones en la muestra, resultando en una transferencia de la energía de los electrones a los átomos de la muestra. La pérdida de energía dependerá de si los electrones de la muestra se excitan individualmente o en conjunto y de la energía de unión del electrón al átomo. Como resultado, la excitación de los electrones de la muestra durante la ionización de los átomos lleva a que se formen electrones secundarios (SE), que poseen energías de menos de 50 eV, estos se utilizan para obtener imágenes. Además de estas señales usadas para obtener una imagen, se producen otras señales, como la emisión de rayos X característicos, catodoluminiscencia y electrones Auger. Se muestran las zonas donde se detectan diferentes señales (Figura 8), estas se dan en función de la profundidad a la que el haz de electrones penetra la muestra.

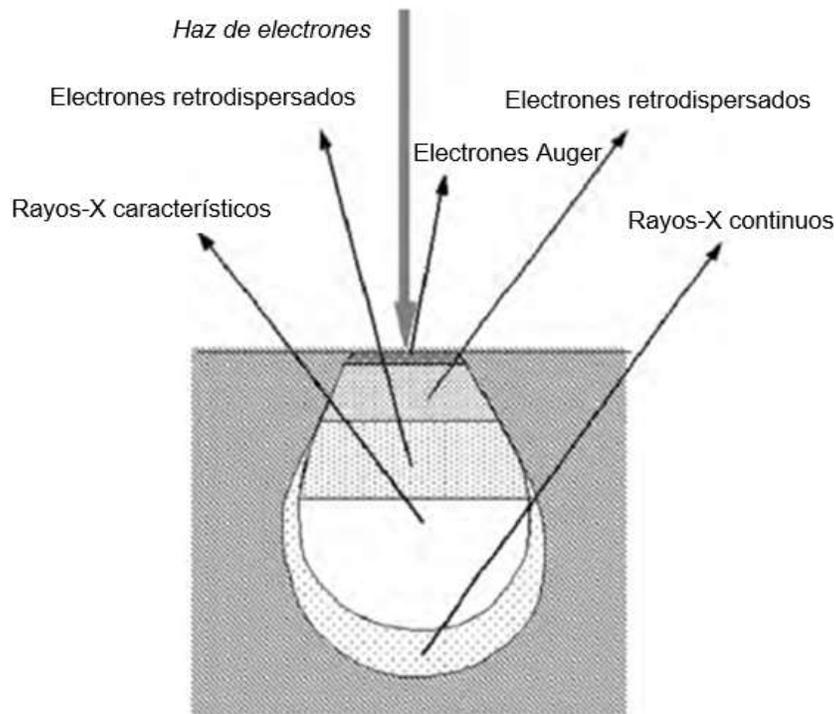


Figura 8. Señales obtenidas por la interacción del haz de electrones y el espécimen y las regiones de donde son detectadas.

En la mayoría de los casos los electrones solo impactarán la muestra en vez de ser dispersarse, penetran en la muestra a cierta distancia antes de que se encuentren con otro átomo y lo impacten. El tamaño y forma de esta zona dependen mayormente de la energía del haz de electrones y del número atómico y, por lo tanto, de la densidad de la muestra. Se muestra la variación del volumen de interacción respecto a diferentes voltajes de aceleración y números atómicos, a cierto voltaje de aceleración, la forma del volumen de interacción es como una gota para muestras de bajo número atómico (Figura 9, inciso (a)) y como una hemiesfera para muestras de alto número atómico (Figura 9, inciso (b)). El volumen y profundidad de penetración aumentan al incrementar el voltaje de aceleración y disminuyen al incrementar el número atómico de la muestra, las muestras con un número atómico mayor tienen más partículas para detener la penetración de electrones. Una influencia del volumen de interacción en la obtención de la señal es que el uso de un alto voltaje de aceleración dará como

resultado una longitud de penetración profunda y una amplia región de excitación, provocando una pérdida de información superficial de la muestra, pero facilitará la emisión de rayos-X característicos a cada elemento, permitiendo información analítica cualitativa respecto a los elementos en la muestra.

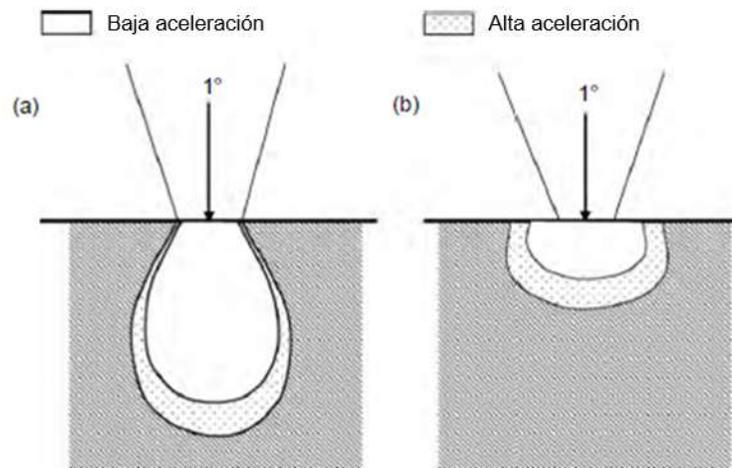


Figura 9. Influencia del voltaje de aceleración y del número atómico del espécimen en la excitación: (a) bajo número atómico y (b) alto número atómico.

2.7.3 Funcionamiento general de la técnica de SEM

Una representación del funcionamiento del SEM es mostrada (Figura 10), como se anticipaba, los electrones “barren” la muestra.

Primero, los electrones se emiten desde la parte superior del equipo utilizando una fuente de emisión de electrones, estos se aceleran y dirigen a la cámara donde está la muestra mediante un ánodo como se describió en la sección anterior. Debe recordarse que todo el equipo está a vacío para que el haz de electrones tenga una trayectoria libre y que moléculas de gases no deflecten el haz.

Después, los electrones pasan por el condensador, este lente converge el haz antes de que el cono se abra nuevamente, posteriormente se converge de

nuevo mediante el lente objetivo. El lente condensador define el diámetro del haz de electrones, mientras que el objetivo focaliza el haz sobre la muestra.

Los electrones luego pasan por las bobinas de barrido, que “barrerá” los electrones la superficie de la muestra, obteniendo así los electrones secundarios utilizados para formar la imagen en la manera descrita anteriormente para la recolección de electrones secundarios [23-24].

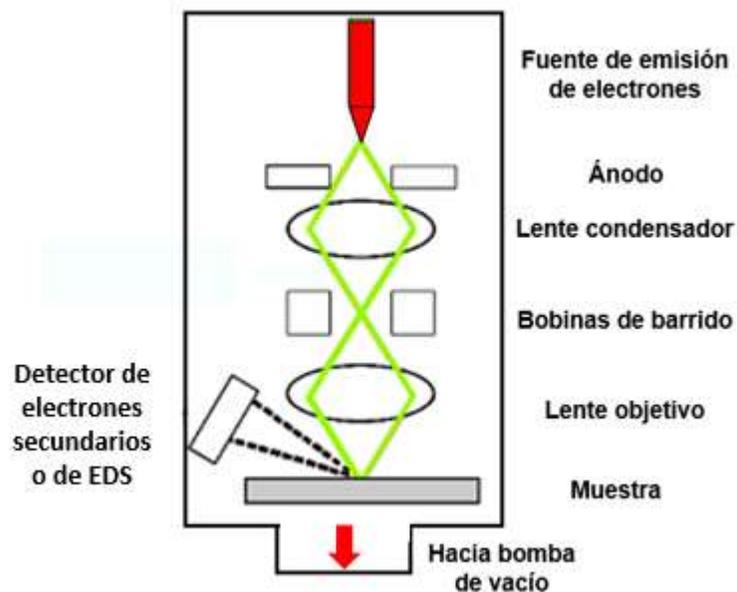


Figura 10. Esquema general de los componentes del SEM [24].

2.7.4 Modo STEM

La microscopía electrónica de barrido de transmisión (*Scanning Transmission Electron Microscopy* en inglés), conocido como modo STEM, es una técnica que puede ser ejecutada desde un equipo SEM o TEM barriendo el haz de electrones a través de la muestra, que deberá ser lo suficientemente delgada para permitir la transmisión de dichos electrones. Una de sus principales ventajas sobre TEM es que permite el uso de otras señales que no pueden

apreciarse en TEM: electrones secundarios o electrones dispersados, inclusive rayos-X, los electrones dispersados serán los utilizados para formar la imagen de la muestra. Su principal ventaja sobre las imágenes SEM convencionales es la mejora en la resolución espacial [25].

2.7 Espectroscopia Raman

El efecto Raman es un fenómeno de dispersión de luz que recibe el nombre de su descubridor Sir Chandrasekhara Venkata Raman, que lo hizo acreedor al premio Nobel de Física en 1930. Este efecto consiste en transiciones entre niveles de energía vibracional de las moléculas.

A través de los desplazamientos e intensidades relativas de las bandas Raman, puede caracterizarse una muestra. Una banda podrá desplazarse, estrecharse o variar en intensidad, esto informa sobre cambios estructurales en la muestra, por ejemplo, señales pertenecientes a una molécula orgánica tendrán cambios en intensidad y/o se manifestarán otros cambios al efectuar reacciones sobre esta, por ejemplo, con metales.

Puede analizarse una muestra en varios puntos arbitrarios o medir sistemáticamente una serie de puntos. El haz monocromático utilizado para excitar la muestra debe ser de alta intensidad (utilizando un láser) con el fin de inducir un estado virtual de energía. La mayoría de las moléculas se relajan directamente al estado S_0 , por lo cual, luz con la misma longitud de onda del haz de láser se emite (dispersión Rayleigh, Figura 11). Solo un número reducido de moléculas excitadas (una fracción de 1 en 10 millones) se relajan a un estado vibracional excitado, por ende, los fotones emitidos son menores que los fotones excitados (dispersión Raman). Un pequeño porcentaje de la muestra sigue este camino de relajación, por lo tanto la dispersión Raman es de baja intensidad, así que su seguimiento requiere de instrumentación que sea sensible para su detección. El efecto Raman puede lograrse excitando en la región del UV, en la visible y en el IR cercano. Particularmente en los puntos donde se pierde esta

energía, la dispersión Raman se denominará "dispersión Stokes"; en aquellos donde se obtendrá energía, la dispersión Raman se denomina "dispersión anti-Stokes", esta es poco utilizada, ya que es menos intensa que la de Stokes y representa información vibracional equivalente de la molécula analizada [26-27].

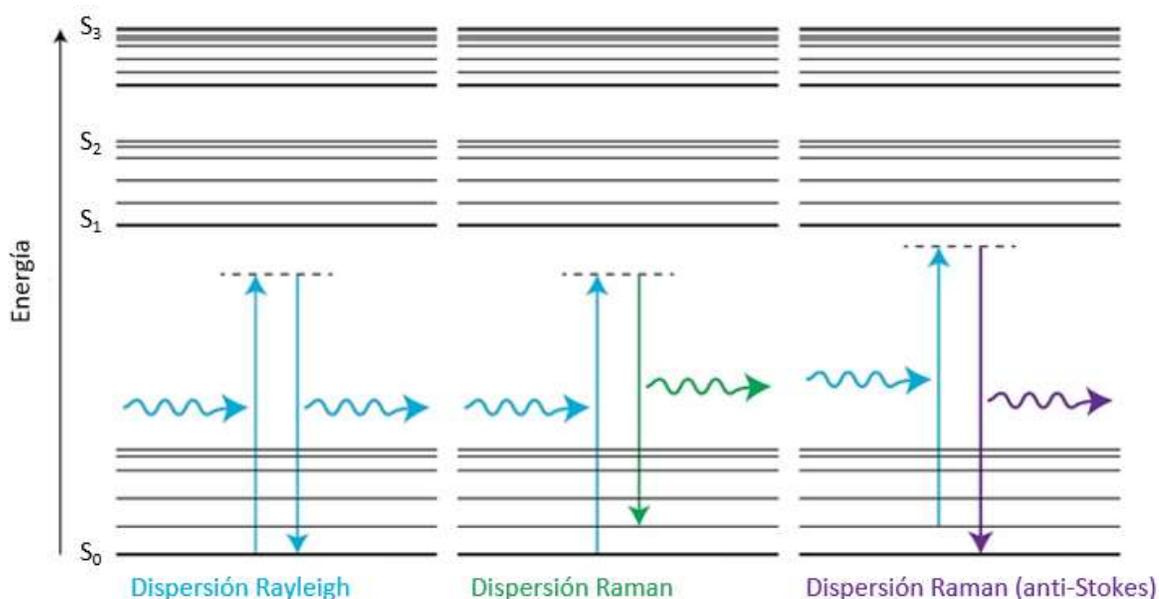


Figura 11. Representación del fenómeno de dispersión Raman tipo Stokes y anti-Stokes.

El requisito para que un analito sea activo en Raman es que se dé un cambio en la polarización o deformación de la nube electrónica durante la interacción con el láser.

La espectroscopia Raman es complementaria a la espectroscopia IR, en la que el estado vibracional excitado es directamente aproximado. La complementariedad de los espectros IR y Raman se basa en la diferencia de cómo ocurre la excitación de la muestra: cambios en el momento dipolar en el caso del espectroscopia IR, cambio en la polarización en el caso de espectroscopia Raman. El espectro Raman gráfica la intensidad Raman (en u.a.)

contra desplazamiento Raman (en cm^{-1}). Los parámetros de banda son su posición en el espectro, intensidad de banda y su forma. Como en el IR, las características de un espectro Raman (número de bandas Raman, intensidades y sus formas) están relacionadas con la estructura molecular de la muestra.

Al irradiar la muestra con el láser puede producirse, además de dispersión Raman, distintos tipos de ruido (Figura 12). La fluorescencia puede ser más intensa que la dispersión Raman (10^7 veces más intensa), incrementando la línea base del espectro, esta dependerá del material analizado, impurezas a nivel traza pueden fluorescer intensamente, complicando observar el espectro del analito. Dichs interferencia puede eliminarse incrementando la potencia del láser, pero puede llegar a sacrificarse la integridad de la muestra por blanqueo fotoquímico.

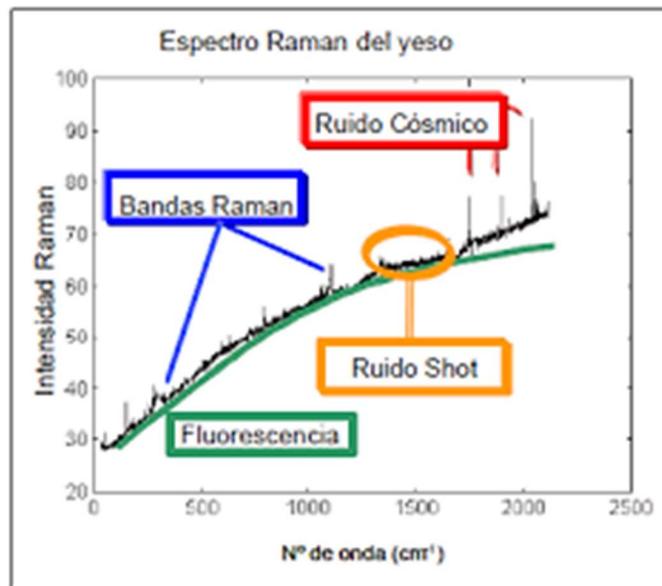


Figura 12. Representación de los distintos tipos de ruido que se pueden presentar en un espectro Raman (espectro del yeso).

El ruido Shot ocurre debido a la naturaleza aleatoria de la luz, siendo así un ruido inevitable. Este disminuye durante la recolección del espectro, análogamente a la fluorescencia, se puede minimizar incrementando la potencia del láser.

El ruido cósmico acontece por incidencia de rayos cósmicos en el detector, usualmente un solo pixel del detector es excitado, de manera que dan señales intensas y/o agudas que pueden indicarse o descartarse [26].

2.8 Espectroscopia de Fluorescencia

El fenómeno de fotoluminiscencia ocurre cuando una especie química es excitada por medio de radiación electromagnética y como consecuencia la especie pierde la energía adquirida reemitiendo esta en forma parcial o total. Esto es, parte de la energía adquirida por la muestra se reemite en forma de choques moleculares y parte en forma de energía luminosa o el total de la energía adquirida se reemite en forma de radiación. Una de las características más atractivas de los métodos de fluorescencia es su sensibilidad inherente, la cual es, con frecuencia, de uno a tres órdenes de magnitud mejor que en las espectroscopias de absorción, Los límites de detección típicos pueden ser del orden de partes por billón, lo cual lo hace una técnica interesante para sensado de analitos tóxicos o peligrosos. Por ende, el desarrollo de materiales fluorescentes como los QD's que exhiban una cambio en su emisión fluorescente proporcional a la presencia de As(III) toma relevancia en este trabajo de Tesis.

Recordemos que en los QD's, los pares electrón-hueco se encuentran confinados, cuando estos se exponen a una longitud de onda determinada estos pares electrón-hueco se excitan y emiten un fotón de cierta longitud de onda al regresar al estado fundamental. La longitud de onda a la que emite el QD está relacionada a su diámetro, como se anticipaba en la sección 2.1.

Mediante un espectrofotómetro de fluorescencia, el espectro de emisión puede obtenerse, de este se determinan las frecuencias de luz emitidas por una muestra, irradiándola a la λ de excitación. Se grafica así la intensidad fluorescente contra las longitudes de onda emitidas [27-28].

CAPÍTULO 3

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Disolventes y Reactivos

Se presentan los disolventes y reactivos empleados en la realización de este trabajo (Tabla 1), los cuales se trabajaron sin previa purificación.

Tabla 1. Disolventes y reactivos utilizados para la síntesis de los materiales.

Compuesto (% de pureza)	Casa comercial
Agua desionizada	CTR
Agua ultrapura	Sigma-Aldrich
Aptámero específico para As(III) (5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATTTACAGAACAACCAACGTCGCTCCGGGTACTTCTTCATCGAGATAGTAAGTGCAATCT-3') (10,000 nmol)	BAKTER
As ₂ O ₃ (99%)	Sigma-Aldrich
CuCl ₂ (99.999%)	Sigma-Aldrich
Na ₂ S (99.99%)	Sigma-Aldrich
NaOH (99.99%)	Sigma-Aldrich
L-cisteína (98%)	Sigma-Aldrich
Nitrógeno (99.99%)	Infra
Acetona (99%)	CTR

3.2 Cuantificación, Manejo y Disposición de Residuos

Los únicos residuos generados en este proyecto son las combinaciones de Cu₂S/aptómero y As(III) después de las pruebas de detección fluorescente. Estas fueron depositadas en el contenedor E inorgánico, correspondiente a combinaciones inorgánicas tóxicas y/o cancerígenas. El volumen de estos, de acuerdo al método de detección propuesto, corresponden a 24 ml.

Las suspensiones de nanocristales de Cu/LCIS generadas en la determinación de condiciones de síntesis de los QD's que dieron tamaños de cristalito que no correspondieron a QD's fueron 6 de los 8 experimentos propuestos en la tabla 2. Al generar cada experimento 100 ml de suspensión de nanocristales, entonces se dispusieron de 600 ml de dichas suspensiones en el contenedor A (soluciones de sales inorgánicas).

3.3 Técnicas Experimentales y Equipos

3.3.1 Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

El espectro del Cu₂S obtenido se realiza en un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier, marca PerkinElmer, modelo Spectrum Two, equipado con un accesorio de muestreo universal ATR de ZnSe.

Dicho espectro se obtiene en el Laboratorio de Materiales 1, Facultad de Ciencias Químicas, U.A.N.L.

3.3.2 Espectroscopia de Difracción de Rayos-X en Polvos (DRX)

El difractograma del Cu₂S se obtiene empleando un Difractómetro de Rayos-X marca Bruker, modelo D2 Phaser a una radiación Cu_{Kα1&2} = 1.5418 Å a un tamaño de paso de 0.5° y en el intervalo de 2θ = (5-90)°.

El difractograma se obtiene en el Laboratorio de Materiales 2, Facultad de Ciencias Químicas, División de Estudios de Posgrado, U.A.N.L.

3.3.3 Espectroscopia UV-Vis

El espectro de absorción UV-Vis se obtiene en un equipo marca Shimadzu, modelo UV-1800, utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de trayectoria de luz, esto en el Laboratorio de Materiales 1, Facultad de Ciencias Químicas, U.A.N.L.

3.3.4 Microscopía Electrónica de Barrido, modo STEM

La imagen de los QD's se obtiene en modo STEM en un Microscopio Electrónico de Barrido de efecto campo marca Jeol, modelo JSM-6701F, empleando rejillas de Cu en las cuales se deposita la dispersión obtenida de QD's diluida a una relación 1:10 en agua desionizada. Se empleó un voltaje de aceleración de 20 kV.

Equipo ubicado en el Laboratorio de Microscopio Electrónico de Barrido, Facultad de Ciencias Químicas, División de Estudios de Posgrado, U.A.N.L.

3.3.5 Espectroscopia Raman

El espectro Raman del Cu_2S es adquirido empleando un Microscopio Raman Thermo-Scientific modelo DXR, utilizando un láser de excitación con una $\lambda = 780 \text{ nm}$ a una potencia de 5 mW. **Los resultados y discusión pueden consultarse en el apéndice C.**

Equipo ubicado en el Laboratorio de Materiales 3, Facultad de Ciencias Químicas, División de Estudios de Posgrado, U.A.N.L.

3.3.6 Espectroscopia de fluorescencia, determinación de relación molar óptima QD's/aptómero para detección de As(III)

Todas las mediciones de fluorescencia se adquirieron mediante un espectrómetro de fluorescencia marca Perkin-Elmer LS55 ubicado en el Laboratorio de Materiales 1, Facultad de Ciencias Químicas, U.A.N.L.

3.3.7 Microscopia Electrónica de Transmisión

Las imágenes de TEM, así como las imágenes de mapeo elemental y el análisis de espectroscopia de energía dispersiva, se obtuvieron mediante un microscopio electrónico de alta resolución marca Thermo Scientific, modelo Talos F200X G2, operando a un voltaje de aceleración de 200 kV ubicado en el Laboratorio de Microscopia electrónica de la Universidad McGill, Quebec, Canadá. Para una consultar el fundamento teórico de esta técnica véase el **apéndice 2**.

3.4 Procedimiento Experimental

Se provee un diagrama a modo de resumen de los pasos a seguir en este documento desde la síntesis de los QD's a su aplicación (Figura 13). Cada etapa para la obtención de los QD's y los procedimientos de sensado se describen a continuación.

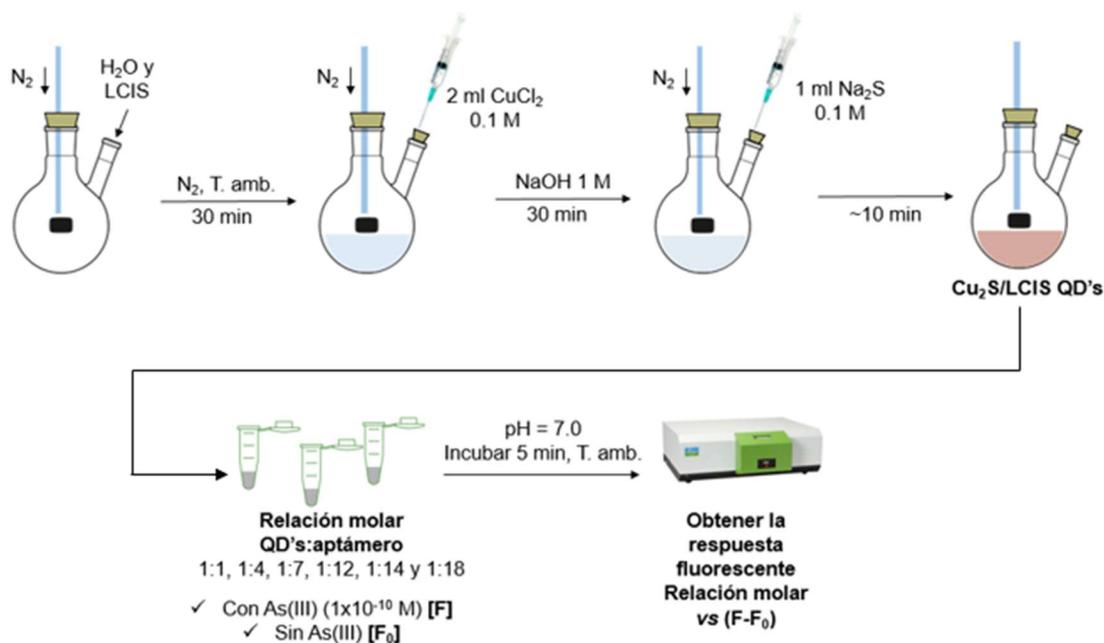


Figura 13. Descripción general de los pasos a seguir para la síntesis de los QD's de Cu_2S y detectar As(III).

3.4.1. Obtención de QD's de Cu_2S , Determinación de Condiciones de Síntesis

Evitando la presencia de luz, a temperatura ambiente y en atmósfera de He se variaron primero las relaciones molares de LCIS respecto al Cu, al determinar la relación que diese un menor tamaño de cristalito esta se mantuvo fina y se varió la relación molar de Cu respecto al S.

Para efectuar la síntesis, 100 ml de agua ultrapura se depositaron en un matraz de 2 bocas de 150 ml, se añadió la LCIS y se taparon las entradas para burbujear N_2 99.99% por 30 min. CuCl_2 0.1 M se inyectó al matraz. Después, NaOH 1 M se añadió gota a gota hasta obtener una solución transparente (que ocurre a $\text{pH} = 7$). Posteriormente se inyectó Na_2S 0.1 M manteniendo la agitación, obteniendo una suspensión naranja-rojiza que se torna café oscura después de 10 min [9]. Los reactivos que quedan sin reaccionar se obtienen como un sobrenadante que es descartado mediante filtración. Las relaciones molares

LCIS:Cu y Cu:S utilizadas y las respectivas cantidades de reactivos se condensan a continuación (Tabla 2).

Tabla 2. Cantidades de reactivos utilizados en la determinación de condiciones de síntesis de los QD's de Cu₂S.

Etap 1. Variación de LCIS respecto al Cu			
Relación molar LCIS/Cu	LCIS (g)	CuCl₂ 0.1 M (ml)	Na₂S 0.1 M (ml)
2(1)	0.0485	2	1
3(1)	0.0727		
5(1)	0.1211		
6(1)	0.1454		
Etap 2. Variación de Cu respecto al S			
Relación molar LCIS/Cu	LCIS (g)	CuCl₂ 0.1 M (ml)	Na₂S 0.1 M (ml)
2(1)	La que se determine en la etapa 1.	2	1
3(1)		3	
4(1)		4	
6(1)		6	

3.4.2. Determinación de Radio Molar Aptámero/QD's que Permite la Mayor Función Respuesta

A pH fisiológico (~7.0, con el fin de mantener la estabilidad del aptámero), se probó la respuesta del aptasensor a una concentración de 1×10^{-10} M en As(III) variando la relación molar aptámero/QD's a 1:1, 1:2, 1:4, 1:7, 1:14 y 1:18.

Para este fin, una alícuota de 20 μ l de una dilución 1:100 de los QD's de Cu₂S obtenidos se mezclaron con la proporción correspondiente de solución de aptámero de concentración 10 nmol/l y se diluyó la mezcla a 3 ml con buffer de fosfatos de pH = 7, para después incubar a temperatura ambiente por 5 min y obtener la respuesta fluorescente a una $\lambda_{exc} = 341$ nm, obteniendo así F₀. Posteriormente, a la mezcla anterior se añadieron 20 μ l de la solución de As(III), se incubó a las mismas condiciones y se obtuvo su respuesta fluorescente a la misma λ_{exc} , obteniendo así F.

El valor $F-F_0$ se calculará como función respuesta para determinar la relación molar óptima (Figura 14) [2].

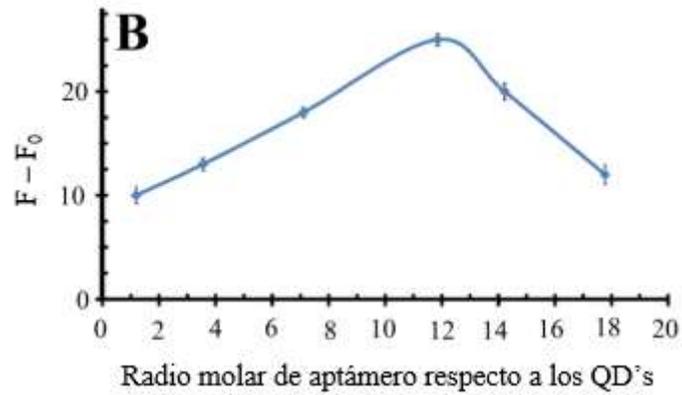


Figura 14. Ejemplo de gráfico obtenido para determinar el radio molar óptimo aptámero/QD's, tomado y traducido del trabajo de Ensafi *et al.* [2].

Capítulo 4.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se discuten los resultados de la síntesis de los QD's, así como los del sensado de As(III).

4.1 Síntesis de QD's de Cu₂S

En todos los experimentos, después de añadir el CuCl₂ a la LCIS previamente disuelta en agua, una solución blanquecina opaca fue obtenida, lo cual sugiere la reducción del Cu(II) a Cu(I), formando un complejo estable con Cu⁺-LCIS, al llevar a pH = 7 con el NaOH, la solución se vuelve translúcida, el Cu(I) se encuentra disuelto nuevamente y reacciona con el S²⁻, al añadir el Na₂S la solución adquiere un tono naranja rojizo, que se vuelve café oscura después de aproximadamente 10 min, indicando la formación de los QD's de Cu₂S [9,17].

4.2 Determinación de Condiciones de Síntesis de QD's de Cu₂S

Con el fin de obtener el menor tamaño de cristalito, se efectuó un seguimiento de DRX de cada experimento señalado previamente.

Una relación molar menor de LCIS respecto al Cu da un mayor tamaño de cristalito, pues los QD's no son recubiertos en su totalidad, propiciando su aglomeración ya que no se dispersan. Un incremento marcado en la cantidad de LCIS incrementa el número de colisiones, formando cúmulos. Una relación molar intermedia (3:1) da el menor tamaño de cristalito [2,9,17].

Teniendo en cuenta el resultado anterior, se varió la relación molar Cu:S. Al igual que en los experimentos previos, una relación intermedia dio el mejor resultado, logrando un tamaño de cristalito de 9 nm, valor ubicado en el intervalo de los QD's (Figura 15).

Se muestran los espectros de emisión fluorescente de los QD's al variar la relación molar Cu:S (Figura 15) a una $\lambda_{exc} = 661$ nm. Se aprecia que la intensidad de emisión incrementa cuando las nanopartículas se aproximan al intervalo de diámetros de los puntos cuánticos, así entonces la fluorescencia disminuye notablemente cuando el tamaño de cristalito aumenta [2].

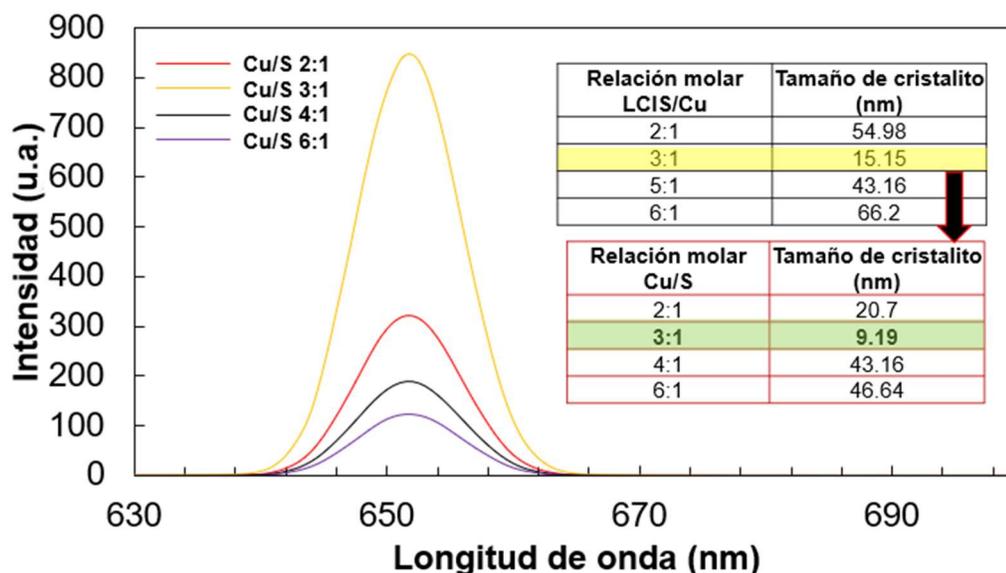


Figura 15. Influencia en la emisión fluorescente al variar la relación molar Cu/S. Los valores de tamaño de cristalito para las variaciones LCIS/Cu y Cu/S se incluyen como tablas insertas.

Una vez obtenidos los QD's, se procedió a caracterizarlos mediante la técnicas instrumentales indicadas en los objetivos.

4.1.1 Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

El espectro FT-IR fue utilizado para identificar los grupos funcionales en la superficie de los QD's, confirmando su funcionalización (Figura 16). En el espectro de los QD's la banda centrada a 3443 cm^{-1} se asigna a la vibración de estiramiento de los enlaces O-H en la LCIS, además de posible agua adsorbida superficialmente [17,29]. Los picos a 1637 cm^{-1} y 1373 cm^{-1} , se atribuyen a las vibraciones de estiramiento C=O y C-O, respectivamente, para la LCIS. El pico de 588 cm^{-1} muestra un estiramiento por vibración del enlace S-S. Comparando con el espectro de la LCIS utilizada, los picos característicos a 2632 y 2548 cm^{-1} (la vibración de estiramiento del enlace S-H) desaparecen por completo, lo que indica que la LCIS se enlaza a las nanopartículas, como también ocurre en las de Ag, PbS [30], ZnS [30-31] e inclusive en nanopartículas de Fe_3O_4 [32], CdTe [33], ZnS:O [34] mediante enlaces tiolato sirviendo de estabilizador para suprimir la aglomeración [30] dando así una conformación tipo "núcleo-coraza" [32]. Asimismo, los grupos -OH y C=O que además les confieren afinidad por el agua y estabilidad [30].

Además, el pico a 2075 cm^{-1} (correspondiente al estiramiento del enlace N-H del grupo $-\text{NH}_3^+$ de la LCIS) también desaparece debido a la alcalinización de este grupo durante la síntesis. Los resultados indicados revelan que la LCIS fue correctamente modificada para enlazarse a la superficie de los QD's [29]. De acuerdo a estos resultados, un breve esquema de la estructura que pueden tomar los QD's de Cu_2S al funcionalizarse es extraída de [17] (Figura 17).

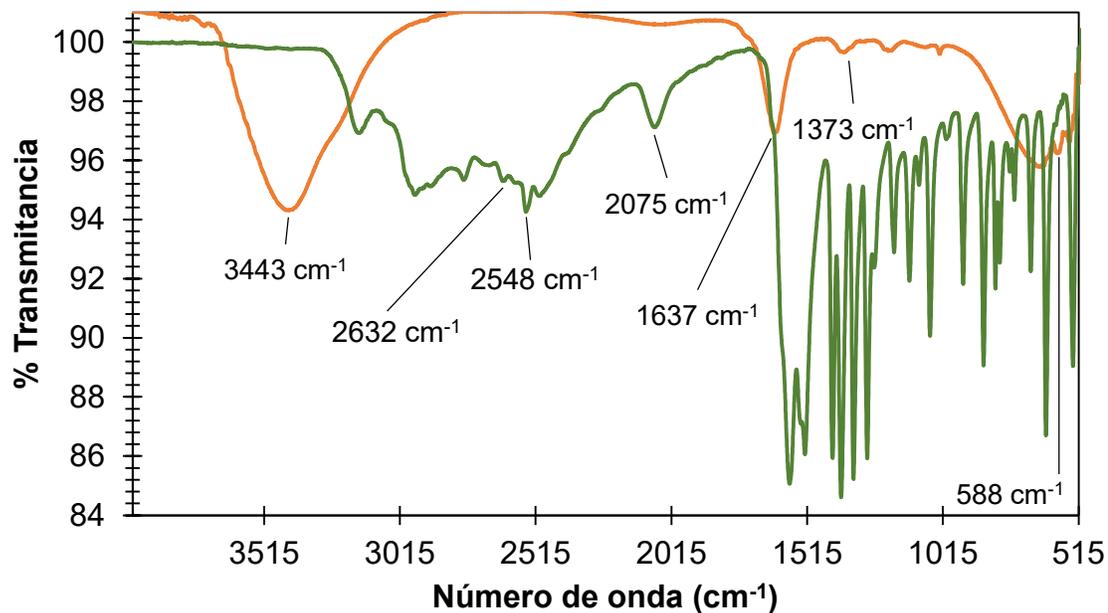


Figura 16. Espectro FT-IR de: LCIS (línea verde) y QD's de Cu₂S funcionalizados con LCIS (línea naranja).

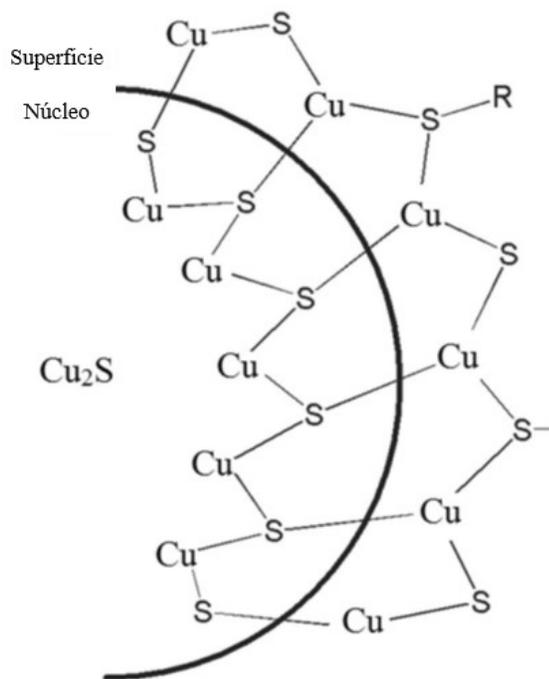


Figura 17. Posible conformación de los QD's de Cu₂S al funcionalizarse con LCIS, R representa el resto de la estructura de la LCIS.

4.1.2 Difracción de Rayos-X en Polvos (DRX)

Se muestra el difractograma de la muestra de QD's (Figura 18), el patrón de difracción está en concordancia con la fase cúbica del sulfuro de cobre (grupo espacial Fm3m, PDF 03-065-2980), con parámetros de celda calculados de $a = b = c = 5.6 \text{ \AA}$ [35] lo cual demuestra que la LCIS aporta en mediar la obtención de la fase cristalina deseada [9,17]. Las señales a $2\theta = 27.57, 31.94, 45.79, 66.76, 84.73$ corresponden a los planos de difracción (111), (200), (220), (400) y (422) respectivamente [36-41]. La aparición de una señal ancha entre $2\theta = (46-52)^\circ$ obedece al estrés o la tendencia al decremento en el parámetro de red del Cu_2S al limitar su crecimiento con la LCIS [17].

Además, las señales agudas demuestran que el producto obtenido se conforma en la estructura cristalina deseada. Asimismo, señales de otras fases no fueron detectadas, comprobando la obtención del producto. Utilizando la ecuación de Debye-Scherrer se determinó el tamaño de cristalito para la relación molar LCIS:Cu:S 3:3:1, que dio mejor resultado (correspondiente al difractograma de la Figura 18), fue de 9.19 nm, esto al plano de difracción de mayor intensidad (200) [35,40].

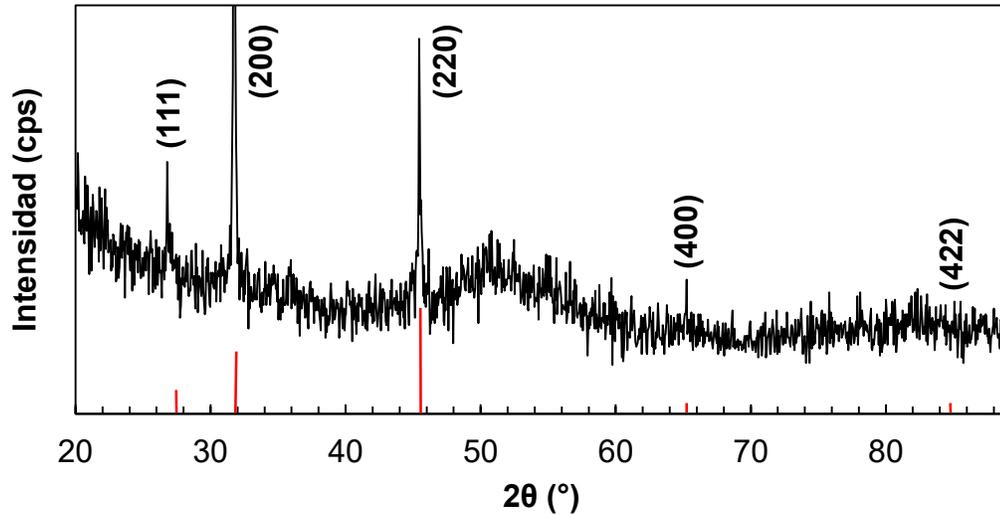


Figura 18. Difractograma de los QD's de Cu₂S.

El espectro de EDS fue utilizado posteriormente durante los análisis de TEM, con el fin de comprobar la pureza de la muestra obtenida.

4.1.3. Espectroscopia UV-vis

Usualmente, las nanopartículas de Cu₂S son de particular interés como sensibilizantes de celdas solares o en fotocatalisis debido a que su banda de conducción es más negativa que el potencial de reducción del protón, y el band gap estrecho permite la absorción de energía en el área visible del espectro electromagnético [42]. Por lo tanto, se estima que será un material que manifestará un amplio intervalo de absorción.

Del espectro UV-vis de los QD's de Cu₂S (Figura 19) puede observarse una amplia absorción desde la región UV (~400 nm) hasta el infrarrojo cercano (~780 nm), similar a nanocristales de Cu₂S obtenidos en fase no acuosa [9,17,42], nanoesferas obtenidas en fase acuosa [43], película [44-46] (Figura 20), depósito [45], recubrimiento [47] y decorado [48-49]. El hecho de que la

absorbancia tienda a ser mayor en el intervalo del UV hace que los QD's de Cu_2S tengan la potencial aplicación como protección UV en lentes solares [43].

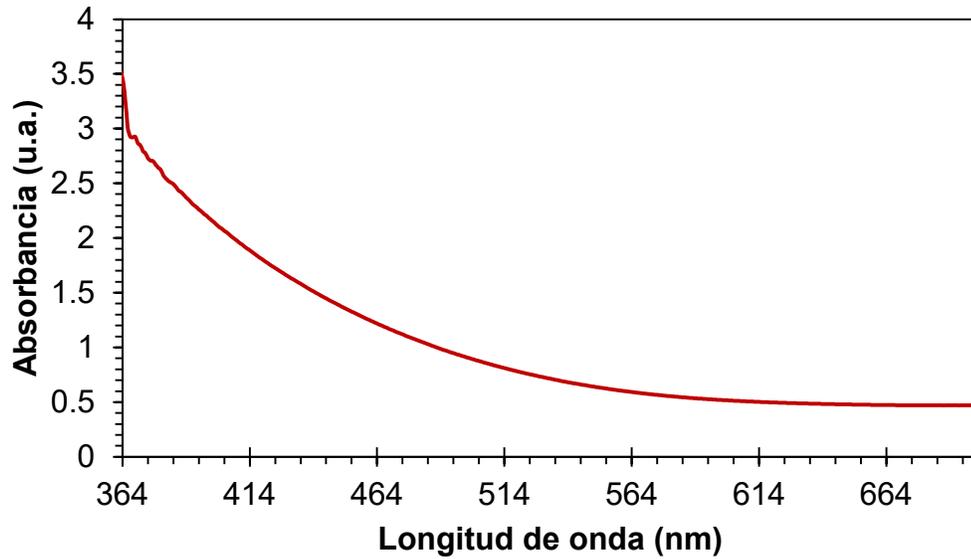


Figura 19. Espectro UV-vis de los QD's de Cu_2S .

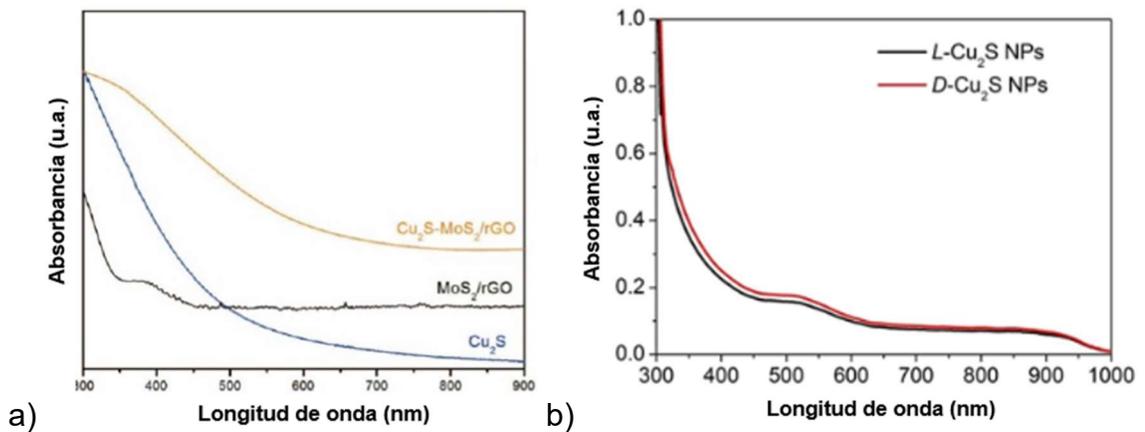


Figura 20 Espectros UV-vis de: a) de nanobarras y nanoplacas (línea azul) [42] y b) nanoesferas con dos funcionalizaciones diferentes [43].

Recientemente, la resonancia de plasmón superficial localizada en el IR cercano se ha utilizado para determinar diferentes estequiometrías en nanoclusters de sulfuro de cobre coloidal, no obstante, este efecto no fue observado, lo cual indica que los QD's (Cu_{2-x}S) preparados son Cu_2S [17].

4.1.4 Espectroscopia de Fluorescencia

La máxima emisión fluorescente de los QD's de Cu_2S funcionalizados se ubica como un pico agudo en la región del rojo a 637 nm (Figura 21, línea marrón) y fue obtenida con una longitud de onda de excitación de 645 nm. Generalmente para puntos cuánticos de Cu_2S la emisión en el rojo es estimada al alcanzar esta conformación como nanomaterial [17,50-52]. Si bien existen dendritas tipo “copos de nieve” de Cu_2S y LCIS, así como copos de nieve de Cu_2S libres, es fácil notar que estas conformaciones no son obtenidas ya que copos de nieve funcionalizados con LCIS emiten en el verde [53], mientras que copos de nieve de Cu_2S libre emiten en el rojo, pero solo como nanoclusters con nanopartículas de Au [54].

La presencia de una sola banda de luminiscencia sugiere la distribución cercana de diámetros de los QD's [17]. El espectro de excitación (Figura 21, línea verde) solamente mostró un pico a 645 nm, atribuyendo así niveles energéticos continuos en los QD's [17,50].

Se aprecia que además de solamente exhibir un pico de excitación y uno de emisión, estos se encuentran solapados, esto solamente ocurre en el caso de la transición S_0-S_1 , de lo contrario, todos los picos de excitación ocurren a longitudes de onda menores y los picos de emisión ocurrirán a longitudes de onda mayores [55].

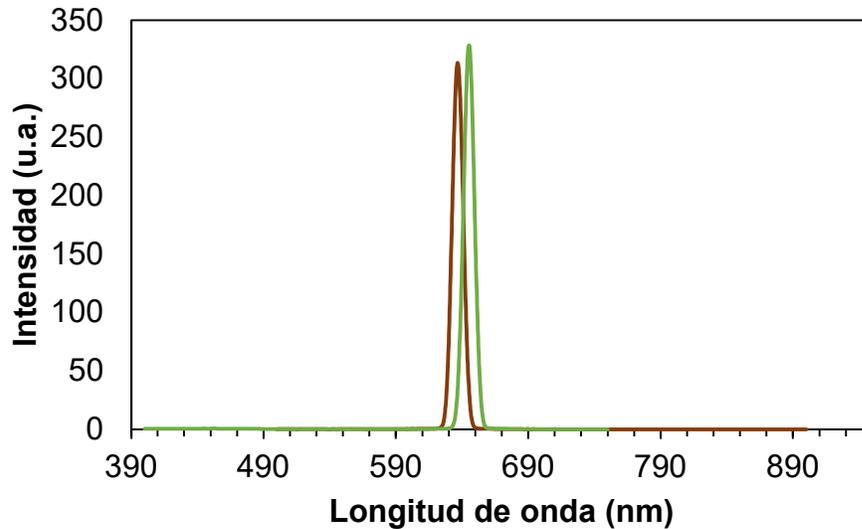


Figura 21. Espectro de excitación de los QD's (verde) y espectro de emisión (marrón) de los QD's de Cu_2S funcionalizados con LCIS.

4.1.5 STEM

Se muestran imágenes de los QD's de Cu_2S preparados (Figura 22), se pueden apreciar diámetros dispersos, desde los 6 hasta los 52 nm con formas de tendencia esférica. Algunas aglomeraciones pueden observarse, sin embargo, la muestra se preserva sin precipitado u opacidad (Figura 22, inciso a).

Esto se contrapone a lo observado en las técnicas previas, sobre todo fluorescencia, pues la misma muestra exhibió fluorescencia, además de una sola banda de emisión, sugiriendo una distribución de diámetros cercana. Al revisar al respecto, si bien se sabe que los nanocristales de Cu_2S son estables térmicamente [56-57], se informa que los QD's de Cu_2S exhiben inestabilidad de manera proporcional al cambio de temperatura por debajo o encima de los $25\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 23), llegando a valores dispersos de diámetro que pueden rayar los 150 nm a $40\text{ }^\circ\text{C}$, por lo cual un mayor cuidado debe tenerse en cuenta a la hora de su manejo para este tipo de análisis [17]. Asimismo, la alta relación superficie-volumen llega a afectar las nanopartículas funcionalizadas con LCIS [58]. Los

demás análisis no se vieron afectados debido a que fueron efectuados a temperatura ambiente (25 °C).

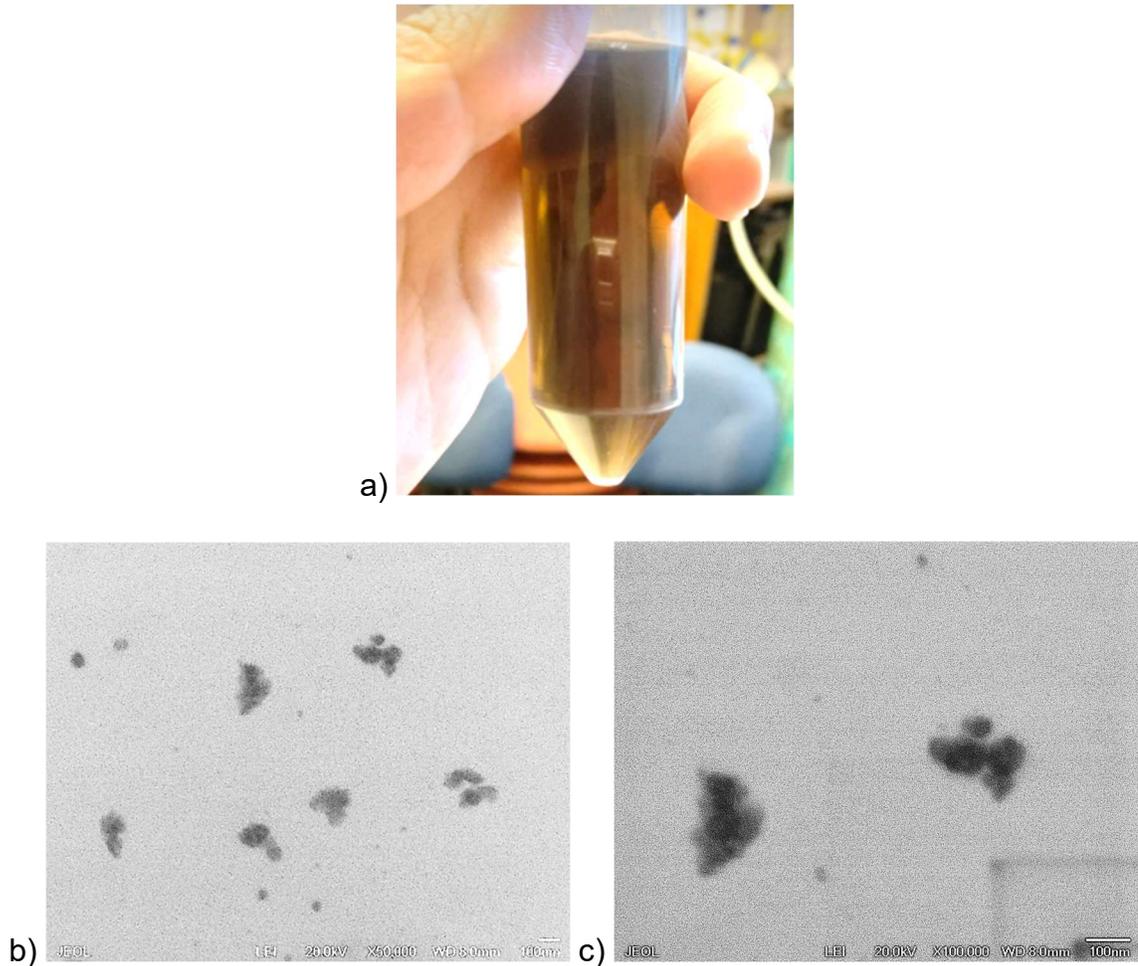


Figura 22. a) Imagen de la dispersión de QD's utilizada en los análisis. Imágenes de STEM de los QD's de Cu_2S sintetizados a: b) 50000 aumentos y c) 100000 aumentos.

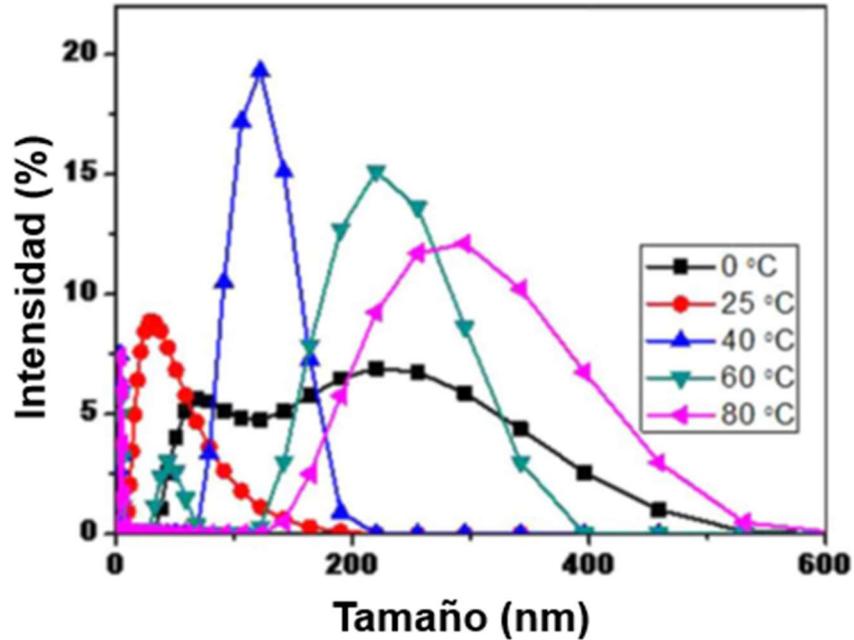


Figura 23. Efectos de la temperatura en la distribución del tamaño en solución de QD's de Cu₂S, gráfica tomada y traducida de [17].

4.1.6 Efecto de la Dilución Sobre la Fluorescencia y Relación Molar Óptima Aptámero/QD's para Detección de As(III)

Para evaluar el efecto de la dilución sobre la fluorescencia de los QD's de Cu₂S, los experimentos se efectuaron a pH = 7 con el fin de mantener la estabilidad de estos.

Una dilución 1:100 fue hecha con el fin de ajustarse a las concentraciones de los reactivos que se utilizaron en las pruebas de detección de As(III). Al obtener los espectros de emisión fluorescente [2,59], los QD's mostraron una λ_{em} menor (notable como una señal ancha y de baja intensidad a $\lambda = 379$ nm (Figura 24)), esto a una $\lambda_{exc} = 341$ nm.

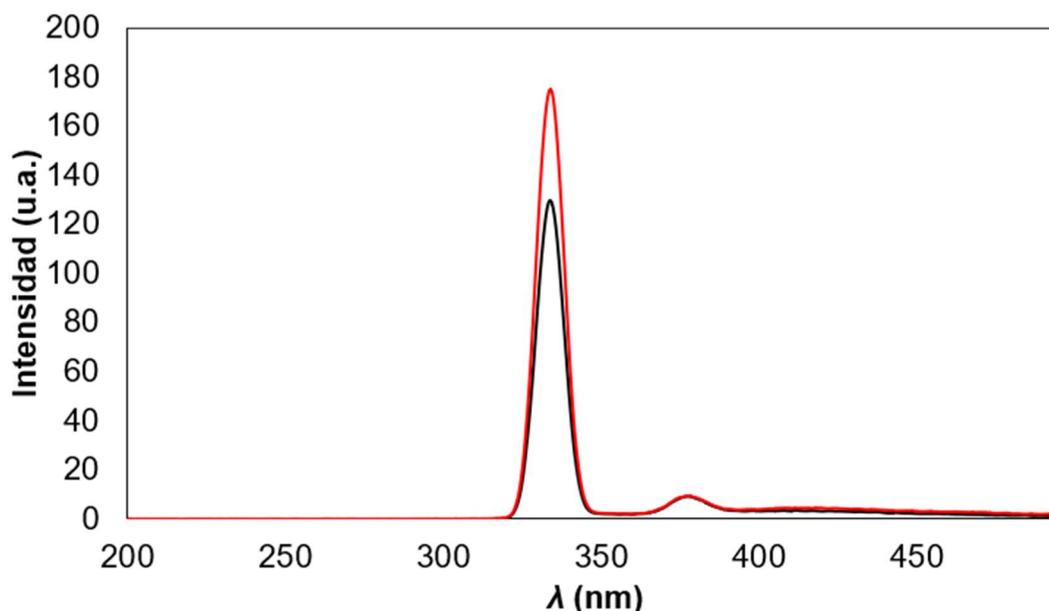


Figura 24. Detección de As(III), cambio en la emisión fluorescente antes de la adición de As(III) (línea negra) y después de añadir As(III) (línea roja, relación molar aptámero-QD's 1:1).

Análogamente a los QD's de grafeno, los nanocúmulos de QD's de Cu_2S pueden formarse mediante interacciones de Van der Waals, lo que produce que un cúmulo numeroso de grupos funcionales (los de la LCIS), dichos cúmulos tendrán una alta polaridad superficial, la cual promueve una rápida relajación de estados excitados a subestados, lo que corresponde a longitudes de onda mayores. Así, los subestados contribuyen a la emisión de fotones, elevando el valor de la longitud de onda de la emisión.

El fenómeno dependiente de la excitación ocurre a valores de longitud de onda mayores cuando se utilizan concentraciones mayores de suspensión de los QD's, cuando estos se diluyen, los nanocúmulos se separan en QD's individuales, lo que debilitará la polaridad superficial y hará que desaparezcan las señales de emisión a longitudes de onda mayores [59]. Comparando con la emisión de los grupos funcionales polares en la superficie de los QD's, la fluorescencia de los QD's de Cu_2S a $\lambda = 335 \text{ nm}$ ahora será dominante durante

la disminución de la concentración de la suspensión [59-60]. Entonces, a bajas concentraciones, el espectro de fluorescencia de los QD's libres se desplaza a regiones de mayor energía (menor longitud de onda), mostrando fluorescencia independiente de la excitación [59].

Para detectar As(III) se mantuvo un pH = 7 para mantener los QD's y el aptámero estables, se utilizó la suspensión 1:100 y se aplicó la $\lambda_{exc} = 341$ nm. A modo de ejemplo se puede apreciar el cambio en la intensidad fluorescente al añadir la alícuota de As(III) (Figura 24).

Al determinar la relación molar óptima aptámero/QD's, se aprecia que la emisión fluorescente aumenta (Figura 26), demostrando que el mecanismo de detección ocurre como estaba estimado: los QD's son liberados de la atracción del aptámero para que este se enlace selectivamente al As(III), este mecanismo está representado esquemáticamente junto con las respuestas fluorescentes obtenidas, basándose en uno de los antecedentes [2] (Figura 25). Añadiendo a esto, se confirma que los QD's cumplen su función de ser emisores fluorescentes a lo largo de la prueba de detección, ya que se ha reportado que funcionalizar nanopartículas de Cu con LCIS evita su fotodegradación [61].

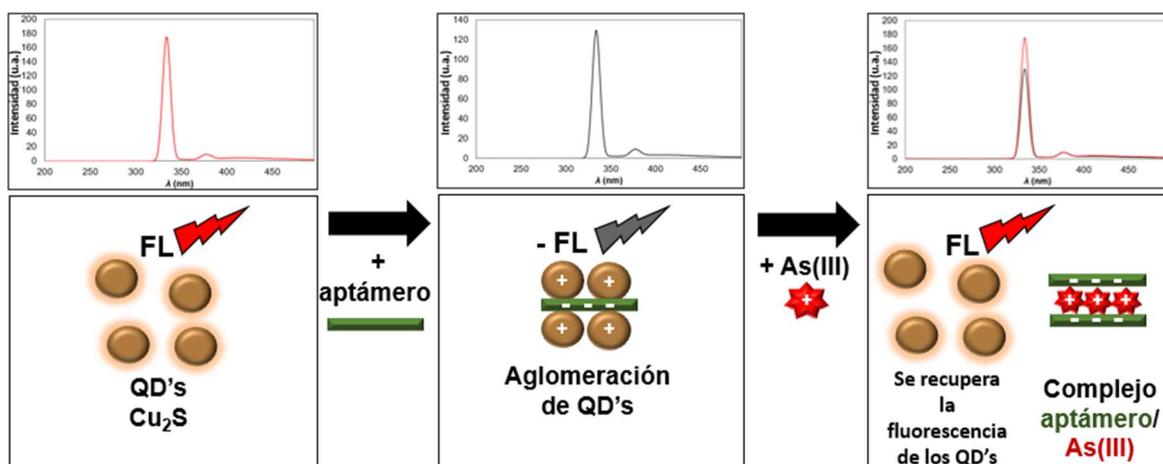


Figura 25. Representación esquemática del mecanismo de detección de As(III) y las respuestas observadas en la espectroscopía de fluorescencia.

Si bien la $F-F_0$ de la relación 1:1 no representa el valor más alto, su tendencia a la baja y luego al incremento demuestra que a valores altos se altera el mecanismo de detección, ya que el aptámero puede enlazarse a la LCIS y, en vez de disminuir la fluorescencia, esta se incrementaría al mantener fijos y separados los QD's con las cadenas de aptámero [2].

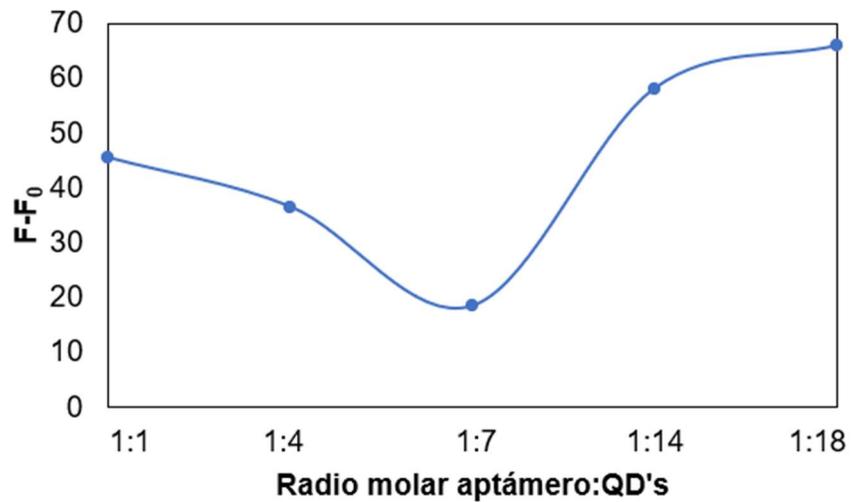


Figura 26. Función respuesta al variar el radio molar aptámero/QD's.

4.1.7 Imágenes de TEM de los QD's

Se muestra la imagen de TEM de los QD's de Cu_2S funcionalizados y medidas de sus diámetros (Figura 27, inciso a)), de estas se observa que las nanopartículas se encuentran dispersas y separadas, con una tendencia esférica en intervalo de diámetros de 2.9–5.0 nm, confirmando las observaciones previas de STEM y DRX. Esta tendencia a formas esféricas coincide con reportes similares (Figura 28) [9,17].

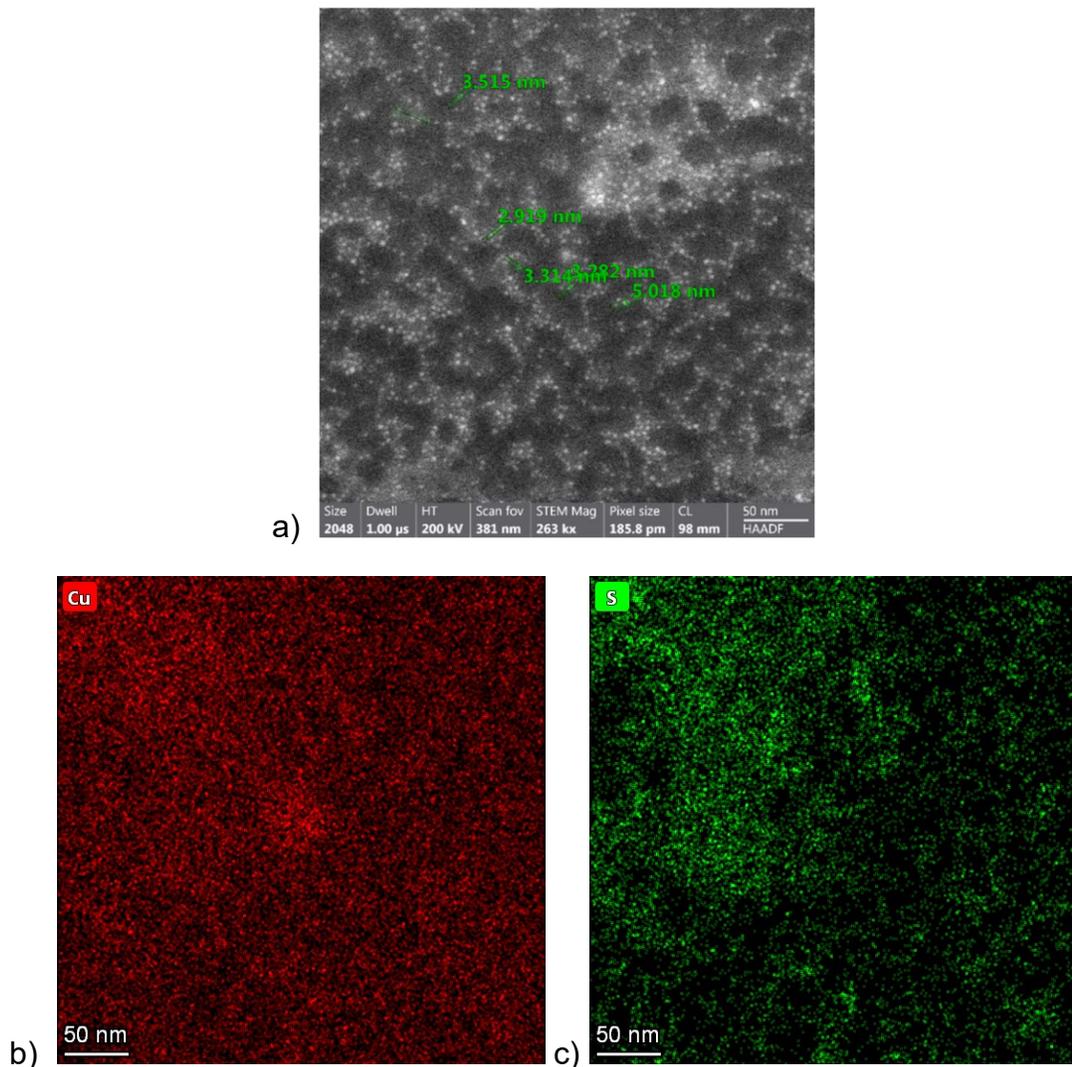


Figura 27. Imágenes de TEM de los QD's de Cu_2S funcionalizados: a) distribución de diámetros, b) Mapeo elemental de EDS de la imagen a) para Cu, c) y para S.

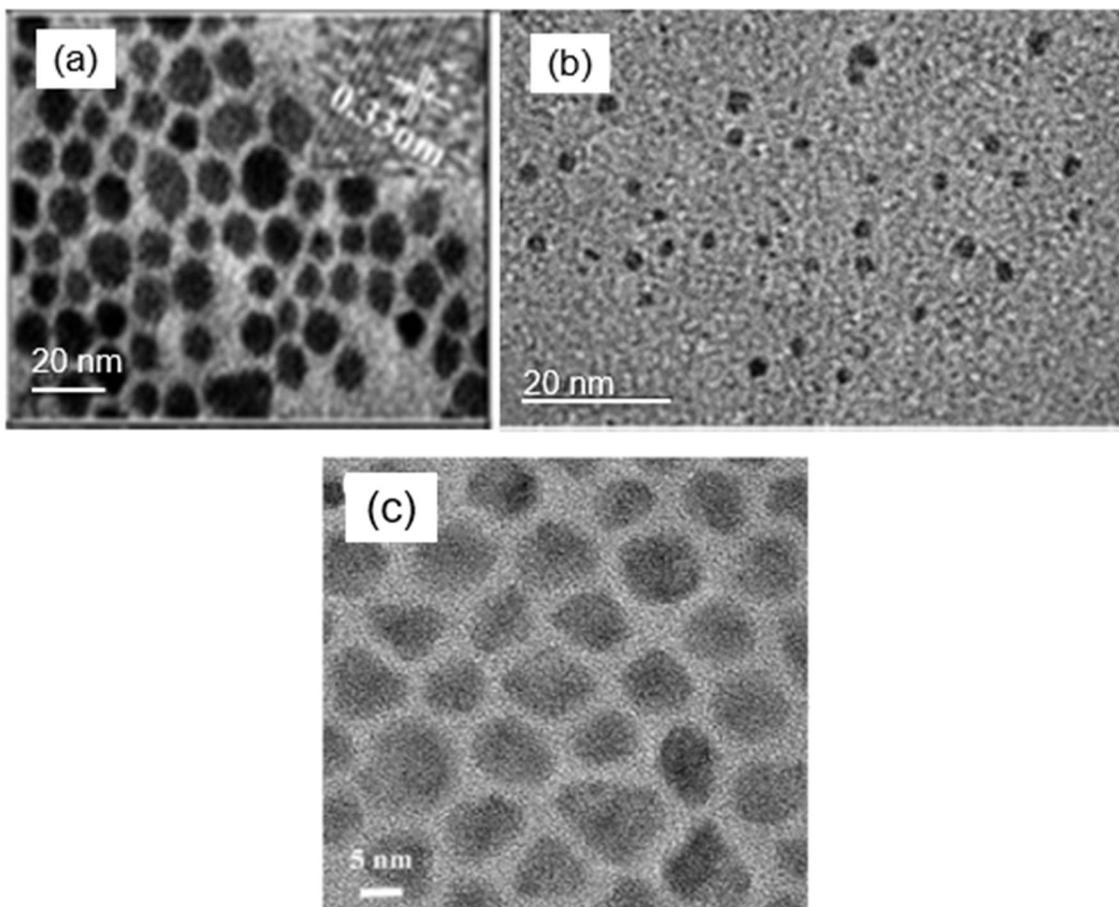


Figura 28. Imágenes de TEM para reportes previos de obtención de QD's de Cu_2S : (a) QD's funcionalizados con glutatión [9], (b) QD's funcionalizados con N-acetilcisteína [17] y (c) QD's tipo núcleo-coraza de grafeno y Cu_2S [62].

Un mapeo elemental correspondiente a la Figura 27 para Cu (inciso b)) y S (inciso c)), permite observar que se obtienen imágenes similares, de manera que se concluye que Cu y S se distribuyen homogéneamente, reforzando la observación de que los QD's observados corresponden a Cu_2S [17,62-66].

Al hacer un análisis de EDS (Figura 29) se puede apreciar la presencia de ambos valores de K para el Cu, así como el S como sería estimado. El radio atómico del Cu es aproximadamente dos veces mayor que la del S, lo que indica que el Cu_2S fue obtenido [62-63].

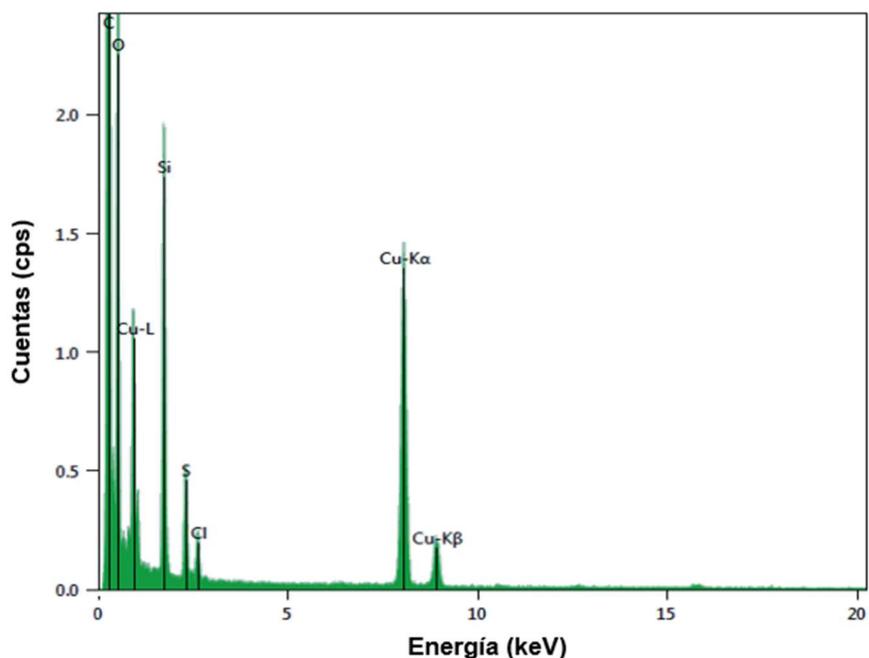


Figura 29. Análisis de EDS de los QD's de Cu_2S funcionalizados.

Por otra parte, el C y el O corresponderán a las moléculas que funcionalizan a los QD's. El Cl corresponde a NaCl que se forma durante la adición de NaOH en la obtención de los QD's debido al uso de CuCl_2 como reactivo de partida. Asimismo, el Si corresponde a impurezas obtenidas durante el tratamiento de la muestra [9].

Un estudio del perfil de diámetros permitió corroborar que los diámetros de 2.9 a 5 nm fueron de los más frecuentes, teniendo a ser mayor el número de QD's de diámetro de alrededor de 4 y 4.9 nm. Asimismo, los cúmulos observados previamente mediante FESEM de alrededor de 15 y 20 nm también fueron vistos en este estudio.

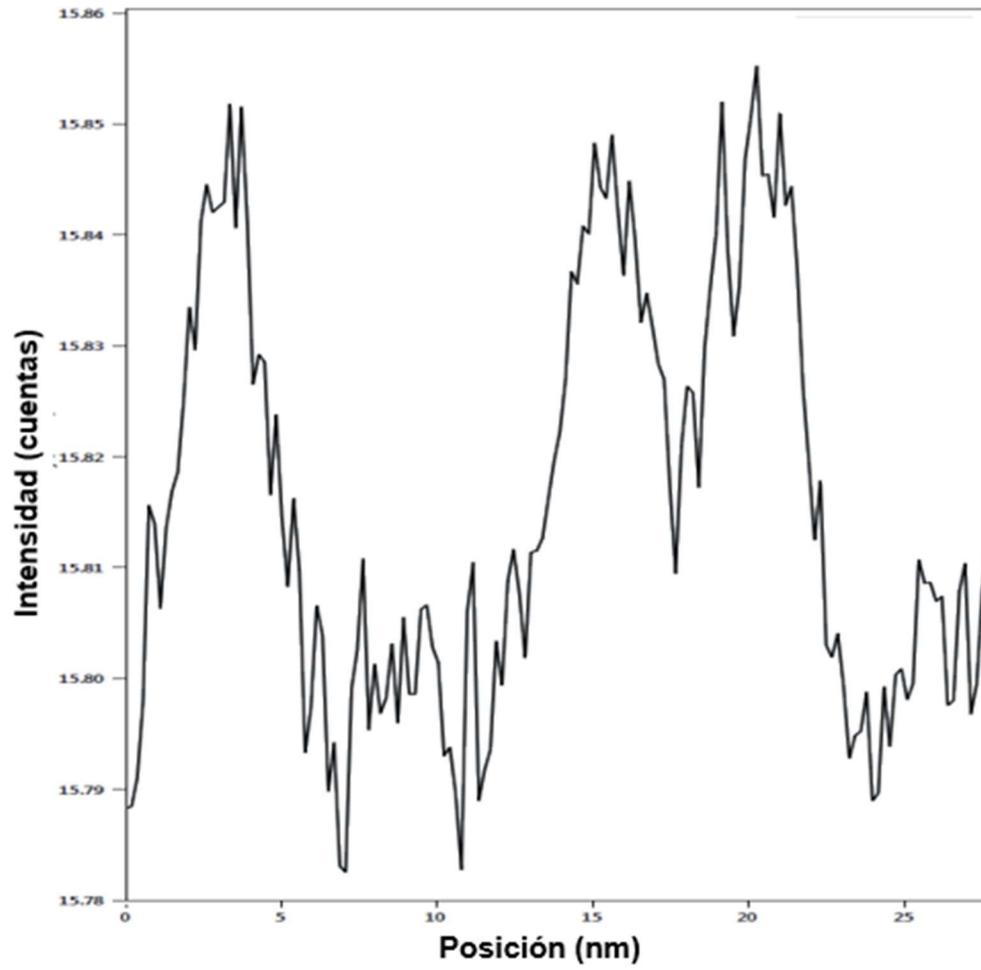


Figura 30. Perfil de diámetros de los QD's obtenido mediante TEM.

CAPÍTULO 5.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se sintetizaron QD's de Cu_2S funcionalizados con LCIS estables y solubles en agua, mediante un método sencillo, con un amplio intervalo de absorción y emisión en el rojo.

Mediante el seguimiento de la síntesis de los QD's de Cu_2S se determinó que relaciones molares intermedias permiten una mayor regulación del crecimiento de los nanocristales, obteniéndolos así como puntos cuánticos.

De los espectros FT-IR fue posible apreciar que la LCIS se enlaza efectivamente a los nanocristales de Cu_2S mediante enlaces disulfuro, funcionalizándolos y dejando en su exterior grupos funcionales que le confieren solubilidad y estabilidad en agua.

Mediante DRX se confirmó que los QD's obtenidos se conforman de Cu_2S , de acuerdo a la base de datos y los antecedentes, lo cual confirma la efectividad del uso de la LCIS para mediar el crecimiento de los nanocristales de Cu_2S .

La estequiometría de los QD's sintetizados se confirmó como Cu_2S mediante espectroscopia UV-vis ya que resonancias de plasmón localizadas en el IR cercano no fueron apreciadas.

Los QD's exhibieron un solo pico de emisión y uno de excitación en su espectro de fluorescencia sugiriendo una distribución cercana de diámetros y un solo tipo de transición electrónica.

Las imágenes de STEM se contraponen al resto de los resultados, una revisión a la bibliografía permitió ver que estas nanopartículas pueden tender a la aglomeración durante cambios bruscos de temperatura, por lo cual la manipulación de muestras para esta técnica deberá hacerse con mayor control de temperatura.

Por otra parte, mediante las imágenes de TEM se comprobó la obtención de QD's esféricos de composición homogénea, corroborando que estos tuvieron diámetros de 2.9 a 5.0 nm y también se apreciaron los cúmulos vistos en las imágenes de STEM.

Una relación molar 1:1 de aptámero y QD's da la mayor función respuesta en la que no se compromete el mecanismo de sensado de la técnica propuesta. Asimismo, resulta ventajoso pues la inversión de aptámero en la obtención de la curva de calibración y en las pruebas de sensado será la mínima.

El método de detección desarrollado tiene una potencial aplicación a la detección de otros analitos, ya que el aptámero puede cambiarse acorde al analito y así ser detectado mediante un espectrómetro de fluorescencia a través del método propuesto.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Mao K., Zhang H., Wang Z., Cao H., Zhang K., Li X., Yang Z. Nanomaterial-based aptamer sensors for arsenic detection. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, 148, 1-32.
- [2] Ensafi A., Kazemifard N., Rezaei B. A simple and sensitive fluorimetric aptasensor for the ultrasensitive detection of arsenic(III) based on cysteamine stabilized CdTe/ZnS quantum dots aggregation. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 77, 499-504.
- [3] Espectrometría de absorción atómica técnica: generación de hidruros. https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UUNI_8f393e64114bd0f0b14d64789f962598 (accesado el 2 de septiembre del 2020).
- [4] Oroval M., Coll C., Brenardos A., Marcos M., Martínez R., Shchukin D., Sancenón F. Selective Fluorogenic Sensing of As(III) Using Aptamer-Capped Nanomaterials. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2017**, 9, 11332-11336.
- [5] Taghdisi S., Danesh N., Ramezani M., Sarreshtehdar E., Abnous K., A simple and rapid fluorescent aptasensor for ultrasensitive detection of arsenic based on target induced conformational change of complementary strand of aptamer and silica nanoparticles. *Sensor Actuat B Chem.* **2018**, 256, 472–478.
- [6] Pehlivan Z., Torabfam M., Kurt H., Ow-Yang C., Hildebrandt N., Yüce M., Aptamer and nanomaterial based FRET biosensors: a review on recent advances (2014–2019). *Microchim. Acta.* **2019**, 563, 1-22.
- [7] Yin P., Kim T., Choi J., Lee K. Prospects for graphene–nanoparticle-based hybrid sensors. *Phys Chem Chem Phys.* **2013**, 15, 12785-12799.
- [8] Duan J., Jiang X., Ni S., Yang M., Zhan J. Facile synthesis of N-acetyl-L-cysteine capped ZnS quantum dots as an eco-friendly fluorescence sensor for Hg²⁺. *Talanta.* **2011**, 85, 1738-1743.
- [9] Wang Y., Liu L., Wang Q., Hu S., Zou P., Shi J., Zhang X. Optimization of the aqueous synthesis of Cu₂S quantum dots with different surface ligands. *Nanotechnology*, **2016**, 27, 1-12.
- [10] Liu B., Liu J. DNA adsorption by magnetic iron oxide nanoparticles and its application for arsenate detection. *Chem Commun.* **2014**, 50, 8568-8570.
- [11] Zhang L., Cheng X., Xu A., Liang R., Qiu J. Simple and highly selective detection of arsenite based on the assembly-induced fluorescence enhancement of DNA quantum dots. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 94, 701-706.

- [12] Vaishnav S., Korram J., Pradhan P., Chandraker K., Nagwanshi R., Ghosh K., Satnami M. Green Luminescent CdTe Quantum Dot Based Fluorescence Nano-Sensor for Sensitive Detection of Arsenic (III). *J Fluoresc.* **2016**, 27, 781–789.
- [13] Garcia G., Eljack N., Sani M., Separovic F., Rasmussen H., Kopec W., Khandelia H., Cornelius F., Clarke R. Membrane accessibility of glutathione. *Biochim. Biophys. Acta.* **2015**, 1848, 2430-2436.
- [14] Ensafi A., Kazemifard N., Rezai B. A simple and rapid label-free fluorimetric biosensor for protamine detection based on glutathione-capped CdTe quantum dots aggregation. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 71, 243-248.
- [15] Sánchez, I. Síntesis y caracterización de puntos cuánticos de CdSe con aplicaciones en celdas fotovoltaicas con configuración FTO/TiO₂/CdSe/ZnS. Tesis de Licenciatura, Universidad de Guanajuato, Junio de 2014.
- [16] Quantum Dots. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/materials-science-and-engineering/biosensors-and-imaging/quantum-dots> (accesado el 2 de agosto del 2021).
- [17] Du W., Liao L., Yang L. Qin A., Liang A. Aqueous synthesis of functionalized copper sulfide quantum dots as near-infrared luminescent probes for detection of Hg²⁺, Ag⁺ and Au³⁺. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 1-12.
- [18] Larkin, P. *Infrared and Raman Spectroscopy Principles and Spectral Interpretation*, 1a. Ed.; Elsevier: Massachusetts, 2011; pp 1-40.
- [19] Zhou W.; Wang Z. L. *Scanning Microscopy for Nanotechnology Techniques and Applications*, 1a. Ed.; Springer Science+Business Media: New York, 2006; pp 1-39.
- [20] Simeonova P. P.; Opopol N.; Luster M. I. *Nanotechnology - Toxicological Issues and Environmental Safety*, 1a. Ed.; Springer: Dordrecht, 2007; pp 231-232.
- [21] Skoog, A; Holler, F; Crouch, S. *Principios de análisis instrumental*, 6a. ed.; Cengage Learning: Distrito Federal, 2008; pp 336-422.
- [22] Yadav, L. D. S. *Organic Spectroscopy*, 1a. Ed.; Springer Science+Business Media Dordrecht: Allahabad, 2005; pp 7-195.
- [23] Carvalho P. M., Felício M. R., Santos N. C., Gonçalves S. Domingues M. M. Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development. *Front Chem.* **2018**, 6, 1-17.
- [24] Zhou W.; Wang Z. L. *Scanning Microscopy for Nanotechnology Techniques and Applications*, 1a. Ed.; Springer Science+Business Media: New York, 2006; pp 1-39.

- [25] Hawkes, P. W.; Spence, J. C. H. *Springer Handbook of Microscopy*, 1a. Ed.; Springer Cham: Switzerland, 2019; pp 49-99.
- [26] Gauglitz G.; Vo-Dinh T. *Handbook of Spectroscopy*, 1a. Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2003; pp 43-44.
- [27] Olsen, E. D. Métodos ópticos de análisis, 1^a. Ed.; Editorial Reverté: Barcelona, 2016; p 335.
- [28] Jameson, D. M. *Introduction to fluorescence*, 1^a. Ed.; CRC Press Taylor & Francis Group: Florida, 2014; pp 57-58.
- [29] Li L., Liao L., Ding Y., Zeng H. Dithizone-etched CdTe nanoparticles-based fluorescence sensor for the off-on detection of cadmium ion in aqueous media. *RSC Adv.* **2017**, 7, 10361-10368.
- [30] Wei S., Guo C., Wang L., Xu J., Xu J., Dong H. Bacterial synthesis of PbS nanocrystallites in one-step with L-cysteine serving as both sulfur source and capping ligand. *Sci. Rep.* **2021**, 11, 1-7.
- [31] Zheng Z., Zheng C., Xiong L., Chen Z., Li X., Zhang G., Liu N., Duo S. Study on the Photoluminescence Properties and First Principles Calculations of L-cysteine Capped ZnS Quantum Dots. *J. Phys. Conf. Ser.* **2021**, 1775, 1-8.
- [32] Alaghmandfard A., Madaah H. R. A facile, two-step synthesis and characterization of Fe₃O₄-L_{Cysteine}-graphene quantum dots as a multifunctional nanocomposite. *Appl. Nanosci.* **2021**, 11, 849-860.
- [33] Feizi F., Shamsipur M., Barati A., Gholivand M. B., Mousavi F. Chiral recognition and quantitative analysis of tyrosine enantiomers using Lcysteine capped CdTe quantum dots: Circular dichroism, fluorescence, and theoretical calculation studies. *Microchem. J.* **2020**, 158, 1-7.
- [34] Wang X., Dai W., Li X., Chen Z., Zheng Z., Chen Z., Zhang G., Xiong L., Duo S. Effects of L-cysteine on the photoluminescence, electronic and cytotoxicity properties of ZnS:O quantum dots. *J. Alloys Compd.* **2020**, 825, 1-8.
- [35] Amin S., Mousavi M., Rahmatolahzadeh R., Motevalli K. Facile hydrothermal synthesis of dendritic Cu₂S nanostructures using novel starting reagents and investigation of their behavior in solar cells. *Appl. Phys. A.* **2017**, 123, 1-8.
- [36] Hamid A., Al-Maiyaly B. Synthesis and characterization of Cu₂S:Al thin films for solar cell applications. *Chalcogenide Lett.* **2022**, 19, 579-590.
- [37] Wang Y., Long Z., Cheng Y., Zhou M., Chen H., Zhao K., Shi X. Chemical bonding engineering for high-symmetry Cu₂S-based materials with high thermoelectric performance. *Mater. Today Phys.* **2023**, 32, 101028.

- [38] Cheng H., Nguyen D., Ching W. Exploring crystal structure by three-dimensional atomic density distribution from molecular dynamics simulations. **2022**, 6, 083601.
- [39] Leal J., Flores J., Vargas R., Alvarado C., Hurtado A., Almaral J. Synthesis of Cu₂S Ultrasmall Nanoparticles in Zeolite 4A Nanoreactor. *J Clust Sci.* **2022**.
- [40] Hasan B., Kadhim M. Structure, Morphology and Optical Properties of Thermally Evaporated Cu₂S Thin Films Annealed at Different Temperatures. *AIP Conf Proc.* **2019**, 2144, 1-10.
- [41] In Situ Self-Heterogenization of Cu₂S/CuS Nanostructures with Modulated D Band Centers for Promoting Photocatalytic Degradation and Hydrogen Evolution Performances – 2023 preprint article. https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4369416 (accesado el 3 de marzo del 2023).
- [42] Ha E., Xin Z., Li D., Zhang J., Ji T., Hu X., Wang L., Hu J. Dual-Modified Cu₂S with MoS₂ and Reduced Graphene Oxides as Efficient Photocatalysts for H₂ Evolution Reaction. *Catalysts.* **2021**, 11, 1278.
- [43] Guo X., Sun M., Guo r., Qu a., Chen C., Xu C., Kuang H., Xu L. Ultrasmall Copper (I) Sulfide Nanoparticles Prevent Hepatitis B Virus Infection. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 1-10.
- [44] Ahmed H., Mohammed R. The Effect of Deposition Parameters on Morphological and Optical Properties of Cu₂S Thin Films Grown by Chemical Bath Deposition Technique. *Photonics*, **2022**, 9, 1-13.
- [45] Li Z., Li H., Wang S., Yang F., Zhou W. Mesoporous black TiO₂/MoS₂/Cu₂S hierarchical tandem heterojunctions toward optimized photothermal-photocatalytic fuel production. *J. Chem. Eng.* **2022**, 427, 131830.
- [46] Ahmed H., Mohammed R., Khalil M. Effects of deposition time and pH on the characterization of chemically synthesized composite nano-wires of Cu₂S thin films. *Sci. j. Univ. Zakho.* **2021**, 9, 184-192.
- [47] Fu S., Feng W., Jia Y., Deng T., Wang W., Zhang G., Fu J. Enhanced photo-electrochemical activity of ZnO/Cu₂S nanotube arrays photocathodes. *Int. J. Hydrog. Energy.* **2021**, 46, 11544-11555.
- [48] Baviskar V., Salunkhe D., Tarkas H., Wagh R., Baviskar P., Patil R. Sensitization of TiO₂ by chemically deposited Cu₂S for solar cell: Effect of deposition time on photoelectrochemical performance. *Optik.* **2020**, 207, 163890.
- [49] Xiang G., Xia Q., Liu X., Wang Y., Jiang S., Li L., Zhou X., Ma L., Wang X., Zhang J. Upconversion nanoparticles modified by Cu₂S for photothermal therapy along with real-time optical thermometry. *Nanoscale.* **2021**, 13, 7161.

- [50] Milenković M., Mišović A., Jovanović D., Popović A., Ciasca G., Romanò S., Bonasera A., Mojsin M., Pejić J., Stevanović M., Jovanović S. Facile Synthesis of L-Cysteine Functionalized Graphene Quantum Dots as a Bioimaging and Photosensitive Agent. *Nanomaterials*. **2021**, 11, 1-18.
- [51] Li S., Yang Q., Liu X., Jiang F., Xiong J., Jiang P., Liu Y. Zn-doped Cu₂S quantum dots as new high-efficiency inhibitors against human insulin fibrillation based on specific electrostatic interaction with oligomers. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, 179, 161-169.
- [52] Li S., Jiang P., Hua S., Jiang F., Liu Y. Near-infrared Zn-doped Cu₂S quantum dots: an ultrasmall theranostic agent for tumor cell imaging and chemodynamic therapy. *Nanoscale*. **2021**, 13, 3673-3685.
- [53] Iqbal S., Bahadur A., Anwer S., Ali S., Irfan R., Li H., Shoaib M., Raheel M., Anjum T., Zulqarnain M. Effect of temperature and reaction time on the morphology of L-cysteine surface capped chalcocite (Cu₂S) snowflakes dendrites nanoleaves and photodegradation Study of Methyl orange dye under visible light. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2020**, 601, 124984.
- [54] Jia Y., Yang L., Xue J., Zhang N., Fan D., Ma H., Ren X., Hu L., Wei Q. Bioactivity-Protected Electrochemiluminescence Biosensor Using Gold Nanoclusters as the Low-Potential Luminophor and Cu₂S Snowflake as Co-reaction Accelerator for Procalcitonin Analysis. *ACS Sens.* **2019**, 4, 1909-1916.
- [55] Nguyen, T. P. *Organic electronics 1 Materials and Physical Processes*. 1a. Ed.; ISTE Wiley: Londres, 2021; pp 88-89.
- [56] Zulkifli, Lee S., Alfaza G., Fahri A., Sambandam B., Mathew V., Lee S., Park J., Song M., Lee J., Hwang J., Kim J. Encapsulation of Cu₂S with a nitrogen-doped carbon boosts Na⁺ storage with a reversible Na₂S conversion reaction. *Mater. Today Sustain.* **2023**, 22, 100348.
- [57] Jo I., Rajesh J., Lee Y., Park J., Ahn K. Enhanced electrocatalytic activity and electrochemical stability of Cu₂S/PbS counter electrode for quantum-dot-sensitized solar cells. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, 30, 146643.
- [58] Kuar S., Taneja S., Banyal S., Singhal M., Kumar V., Sahare S., Lee S. L., Kant R. Bio-synthesised Silver Nanoparticle-Conjugated L-Cysteine Ceiled Mn:ZnS Quantum Dots for Eco-friendly Biosensor and Antimicrobial Applications. *J. Electron. Mater.* **2021**, 50, 3986-3995.
- [59] Li R., Wu D., Liu Y. Yu L., Yu Z., Ye H. Infrared Plasmonic Refractive Index Sensor with Ultra-High Figure of Merit Based on the Optimized All-Metal Grating. *Nanoscale Res. Lett.* **2017**, 12, 1-6.

- [60] Stam W. v. d., Gudjonsdottir S., Evers W. H. Houtepen A. J. Switching between Plasmonic and Fluorescent Copper Sulfide Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 13208-13217.
- [61] Iqbal S., Bahadur A., Anwer S., Ali S., Saeed A., Irfan R., Li H., Javed M., Raheel M., Shoaib M. Shape and phase-controlled synthesis of specially designed 2D morphologies of L-cysteine surface capped covellite (CuS) and chalcocite (Cu₂S) with excellent photocatalytic properties in the visible spectrum. *Appl. Surf. Sci.* **2020**, 526, 146691.
- [62] Akman E., Altintas Y., Gulen M., Yilmaz M., Mutlugun E., Sonmezoglu S. Improving performance and stability in quantum dot-sensitized solar cell through single layer graphene/Cu₂S nanocomposite counter electrode. *Renew. Energy.* **2020**, 145, 2192-2200.
- [63] Selopal G., Chanine R., Mohammadnezhad M., Navarro F., Benetti D., Zhao H., Wang Z., Rosei F. Highly efficient and stable spray assisted nanostructured Cu₂S/Carbon paper counter electrode for quantum dots sensitized solar cells. *J. Power Sources.* **2019**, 436, 226849.
- [64] Zhang Y., Ran L, Li Z., Zhai P., Zhang B., Fan Z., Wang C., Zhang X., Hou J. Sun L. Simultaneously Efficient Solar Light Harvesting and Charge Transfer of Hollow Octahedral Cu₂S/CdS p-n Heterostructures for Remarkable Photocatalytic Hydrogen Generation. *Trans. Tianjin Univ.* **2021**, 27, 348-357.
- [65] Chen Y., Wang D., Lin Y., Zou X., Xie T. An in situ inward etching strategy for constructing a p-p heterojunction Cu₂S/Cu_{2-x}Se material based on brass as an effective counter electrode for quantum dot sensitized solar cells. *J. Power Sources.* **2019**, 442, 227222.
- [66] Hassan S., Bera S., Gupta D., Ray S., Sapra S. MoSe₂-Cu₂S Vertical p-n Nanoheterostructures for High-Performance Photodetectors. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2019**, 11, 4074-4083.
- [67] López O. G., Costilla R., Pelallo N., Alcaraz Y., Bocanegra M., Rocha D. Micronucleus in exfoliated buccal cells of children from durango, mexico, exposed to arsenic through drinking water. *Rev Int Contam Ambie.* **2017**, 33, 281-287.
- [68] Fenech M., Knasmueller S., Bolognesi C., Holland N., Bonassi S., Kirsch M. Micronuclei as biomarkers of DNA damage, aneuploidy, inducers of chromosomal hypermutation and as sources of pro-inflammatory DNA in humans. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **2020**, 786, 1-25.
- [69] Chakraborty T., De M. Clastogenic effects of inorganic arsenic salts on human chromosomes in vitro. *Drug Chem. Toxicol.* **2009**, 32, 169-173.
- [70] Guérard M., Baum M., Bitsch A., Eisenbrand G., Elhajouji A., Epe B., Habermeyer M., Kaina B., Martus H. J., Pfuhrer S., Schmitz C., Sutter A. Thomas

A. D., Ziemann C., Froetschl R. Assessment of mechanisms driving non-linear dose–response relationships in genotoxicity testing. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* **2015**, 763, 181-201.

[71] Tovar E., Mussali P., Martínez M., Ortiz M. L., Sánchez E., Olvera A. Relationship between genotoxic damage and arsenic blood concentrations in individuals residing in an arsenic contaminated area in Morelos, Mexico. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **2016**, 32, 101-117.

[72] Buseck, P. *High Resolution Transmission Electron and Associated Techniques*. 1a. Ed.; Oxford University Press: Nueva York, 1988; pp 3-34.

[73] Bazylewski P., Divigalpitiya R. In situ Raman spectroscopy distinguishes between reversible and irreversible thiol modifications in L-cysteine. *RSC Adv.* **2017**, 7, 2964-2970.

[74] Adegoke O., Forbes P. L-Cysteine-capped core/shell/shell quantum dot–graphene oxide nanocomposite fluorescence probe for polycyclic aromatic hydrocarbon detection. *Talanta.* **2016**, 146, 780-788.

APÉNDICES

APÉNDICE A. TOXICIDAD DEL AS (AMPLIACIÓN)

El As es un agente clastogénico y aneugénico, aún a bajas concentraciones, por lo cual el estudio de estas propiedades es una propuesta para evaluar su riesgo de provocar cáncer [67].

Un material clastogénico será aquel que tenga la facilidad de causar rupturas de la cadena de ADN que, si no se reparan o se reparan incorrectamente, dan lugar fragmentos segmentos faltantes o una gran variedad de reordenamientos o adiciones que pueden ser simétricos o asimétricos. A esto se le conoce como una forma de mutagénesis (cambio de información genética producida por una mutación) que puede derivar en carcinogénesis (transformación de células en células cancerosas) o mutagénesis (transformación de células en células mutadas). Principalmente cuando la célula no muere por el daño clastogénico esta tendrá el potencial de convertirse en una célula cancerosa [68]. Particularmente, se conoce que este potencial de ruptura de ADN es mayor para el As(III) que para el As(V), como fue demostrado en un mayor porcentaje de potencial para aberración cromosómica (cambios en su número o estructura) [69].

Por otra parte, un aneugénico será aquel material que actúe principalmente sobre objetivos que no son el ADN, como el huso mitótico, el que contribuye en la división de cromosomas en la división celular (Figura 31), lo que resulta en una disfunción o función reducida de los diversos pasos durante la división celular, lo que lleva a una segregación cromosómica (compartido de

cromátidas hermanas formadas de la división de ADN durante la división celular) inadecuada [70].

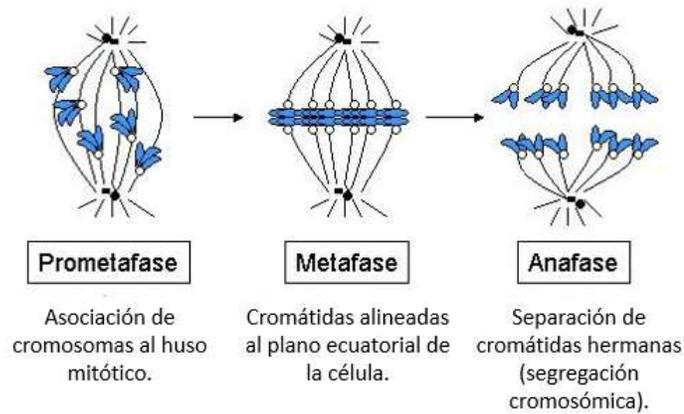


Figura 31. Fases de la división cromosómica que ocurren durante la división celular.

La exposición a As es un problema que puede encontrarse en nuestro país, de hecho, regiones particulares de Durango [67] y Morelos [71] ya han sido objetos de estudio en esta cuestión. El primer estudio se focaliza en infantes y se destaca que concentraciones más bajas de As que las determinadas como máximas tolerables para adultos, pueden tener efectos para los infantes si la exposición ocurre en una etapa de vulnerabilidad biológica, donde los efectos adversos podrían manifestarse a edades mayores. Se indica que, generalmente, los niños son más vulnerables a la toxicidad de los contaminantes debido a sus procesos de desarrollo que involucran maduración fisiológica y metabólica, así como a aspectos conductuales que constituyen ventanas críticas de desarrollo. Además, sus vías de exposición y hábitos también pueden ser diferentes a los de los adultos, lo que puede aumentar el riesgo [67].

Por lo tanto, la exposición a largo plazo a As, sobre todo As(III) puede derivar a los problemas mencionados, por lo cual hacer un seguimiento de este a bajas concentraciones bajo métodos rápidos y sencillos es de relevancia para una

oportuna detección con el fin de evitar que la población se vea expuesta a este por medios comunes, como el agua para beber.

APÉNDICE B. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM)

La Microscopia Electrónica de Transmisión (*Transmission Electron Microscopy*, TEM en inglés) permite estudiar especímenes delgados, obteniendo una imagen bidimensional en vez de una tridimensional como en SEM.

TEM aplica principios similares a la microscopia óptica convencional, pero en vez de utilizar luz, se utilizan electrones que atraviesan la muestra para generar imágenes bidimensionales. Este haz de electrones es enfocado mediante lentes electromagnéticas. El propósito de utilizar electrones es el mismo que el indicado previamente en la teoría de SEM (sección 2.6) para fines de resolución. A diferencia de SEM, el haz de electrones se aplicará a mayores voltajes de aceleración (alrededor de 200 - 400 kV) con el fin de atravesar la muestra y generar la imagen.

En el arreglo básico de un TEM, un haz de electrones emitido regularmente por una fuente de emisión de campo es acelerado y atraviesa una muestra delgada, generando diferentes trayectorias para dicho haz. Los electrones transmitidos atravesarán una apertura que se encuentra debajo de la muestra, mientras que los electrones dispersados no serán tomados en el haz detectado después de la muestra, siendo la imagen obtenida menos intensa en aquellas zonas que tengan una mayor masa. La imagen obtenida se magnifica en una pantalla fluorescente para su observación.

El equipo consta de las siguientes partes principales que pueden verse ilustradas (Figura 32):

Fuente de electrones: emite los electrones y está ubicada en la parte superior del equipo, usualmente un filamento de hexaboruro de lantano (LaB_6).

Lentes electromagnéticas: mediante campos electromagnéticos dirigen y enfocan el haz de electrones. El lente condensador formará el haz de electrones después de la fuente emisora. El objetivo focalizará el haz sobre la muestra y el lente proyector expandirá el haz transmitido hacia la pantalla fluorescente. La distancia entre objetivo y muestra permitirá obtener diferentes magnificaciones.

Sistema de vacío: que evitará la colisión del haz de electrones con el aire y permite la aceleración de electrones.

Pantalla de visualización: una pantalla fluorescente colocada después de la muestra para visualizar la imagen aumentada por el lente proyector.

Sistema para registro: para obtener la imagen transmitida [72].

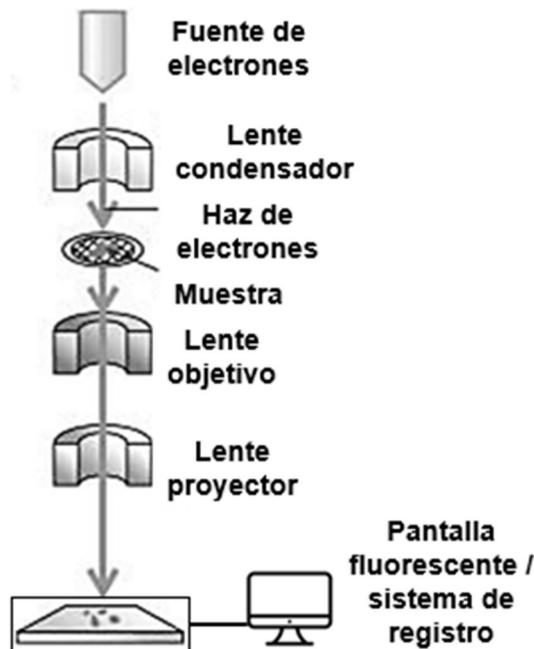


Figura 32. Esquema general de un microscopio electrónico de transmisión.

Generación de Rayos-X

Al utilizar un haz de electrones acelerado en TEM, se producen rayos-X cuando dicho haz provoca la expulsión de un electrón de los orbitales interiores de la muestra (Figura 33). Un electrón de orbitales externos hace su transición para llenar la vacancia, dando rayos-X, cuya energía está relacionada a la diferencia de energías de los orbitales involucrados.

Generalmente, vemos rayos-X de series K, L o M y el nombre de la serie se refiere al orbital desde el que se produce la vacancia original. Es posible que se produzcan rayos X como resultado de una vacante en el orbital N, pero generalmente de muy baja intensidad y energía (0,15-0,3 keV) y casi nunca aparecen como un pico distinto en el espectro.

Los rayos-X K alfa resultan de la expulsión de un electrón del orbital K y de un electrón del orbital L que se mueve a la vacancia. Rayos-X K beta ocurren cuando un electrón del orbital M hace su transición al orbital K. La K beta siempre tendrá una energía ligeramente más alta que la K alfa y siempre es mucho más pequeña en intensidad.

Se muestra una representación simplificada de los orbitales de los electrones (Figura 33), en la que se muestra un solo orbital para los orbitales K, L, M y N. El orbital K es relativamente simple, pero el orbital L consta de tres suborbitales, el M tiene cinco y el N puede tener hasta siete suborbitales. Cuando se produce una vacante en uno de los tres suborbitales L, un electrón puede hacer la transición desde cualquiera de los cinco suborbitales M o los siete del N. Muchos de estos suborbitales tienen pocos electrones, lo que significa que el pico de rayos-X será bastante pequeño y probablemente se perderá en el ruido y no será detectable por técnicas de EDS. Algunos suborbitales que participan en la creación de la vacancia o que proporcionan el electrón de transición son solo ligeramente diferentes en sus energías electrónicas de un suborbital adyacente.

El resultado es que el pico de rayos X es solo ligeramente diferente de otro pico en el espectro y puede que no se pueda discernir o resolver a partir de otro pico más grande en el espectro.

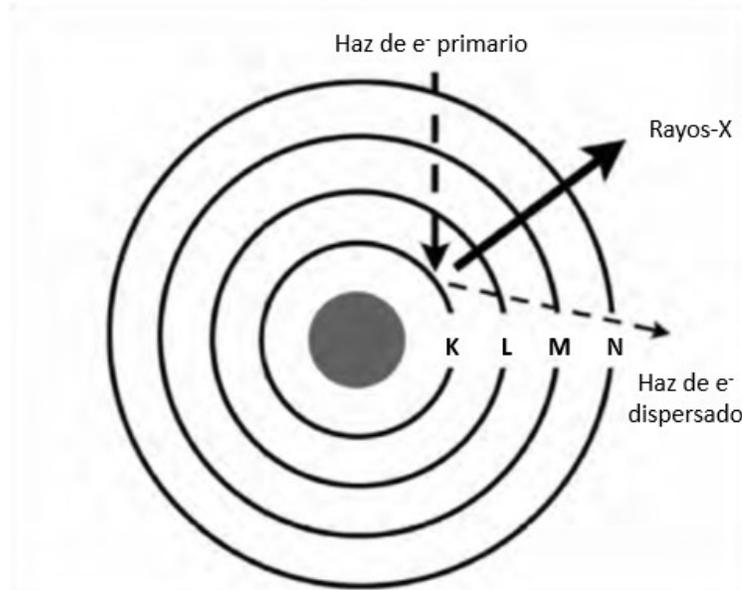


Figura 33. Generado de rayos-X en una muestra de la interacción de electrones de alta energía.

Detección de Rayos-X, Espectroscopia de energía Dispersiva

Una parte de los rayos-X generados en la muestra escaparán de esta y viajarán hacia el detector EDS (Espectroscopia de Energía Dispersiva) y se detectarán (Figura 34). Una configuración de parámetros y geometría de muestra de detector óptima garantizará la mejor eficiencia de la recopilación de datos espectrales con la menor cantidad de dispositivos.

Una vez que los rayos-X se generan en la muestra viajan a través del equipo, atraviesan la ventana del detector y luego las películas delgadas en la superficie del detector (una película metálica y una de silicio). Cada material o película filtrará eficazmente la firma de rayos-X absorbiendo una parte de la señal

y permitiendo que otras pasen. En la mayoría de los casos, la parte de energía más baja de la señal tiene la mayor probabilidad de ser absorbida. Los efectos de la absorción de la parte de baja energía de la señal se pueden minimizar seleccionando uno de los voltajes de haz de electrones menores o un voltaje que no sea más alto de lo necesario. El ángulo de la muestra también se puede aumentar para aumentar la sensibilidad de la parte del espectro de baja energía, estos parámetros serán discutidos en la siguiente sección.

Se presenta una forma simplificada del detector (Figura 34), en última instancia, hay un preamplificador y un amplificador, que preparan la señal aumentando la relación señal-ruido. En el ejemplo que se muestra en esta última figura, estamos considerando el caso en el que se detectan rayos-X del aluminio (1.486 keV) y es secundado 500 μ s después por rayos-X del cobre a una energía de 8.04 keV. Si los rayos-X pudieran detectarse consistentemente a intervalos de 500 μ s, esto sería equivalente a una tasa de recuento de 2000 cps.

Los rayos-X que inciden en un detector de Si dopado con Li generarán pares electrón-hueco dentro del detector por cada 3.8 eV de energía de los rayos-X. Se aplica un voltaje de polarización negativa a la capa de metálica para forzar a los electrones al contacto trasero del detector y a la entrada del transistor de efecto de campo (FET). Por ejemplo, los rayos-X del Al crearán 391 electrones y los rayos-X del Cu crearán 2116 electrones, como se muestra (Figura 34). Esto supone que todos los electrones llegarán al contacto posterior y que ninguno se recombinará con la vacante o el hueco, o que ninguno se perderá como resultado de defectos cristalinos del detector, ni será conducido a áreas no activas del detector.

La señal que emite el detector y entra al FET como un número de electrones (Figura 34, parte "a") dejará el FET como una señal electrónica o rampa (Figura 34, parte "b") y continuará al resto del circuito del amplificador. El incremento o rampa que corresponde a cada evento de rayos-X es un evento muy breve, del orden de 50 ns. Sin embargo, el ruido no se ha mostrado (Figura 34, parte "b"), y debe señalarse que la señal es muy pequeña y el ruido es mayor,

lo que hace imposible medir la energía de los rayos-X en este punto. Se utiliza un circuito de preamplificador-amplificador para aumentar la fuerza de la señal aumentando simultáneamente la relación señal-ruido. Para lograr ambos propósitos, la señal se convierte en un pulso triangular cuya amplitud es mayor pero que ahora se alarga en el tiempo, el eje horizontal de la figura 11, parte “c”. La señal que se muestra es en el momento justo antes de que cada pulso se convierta en unidades de energía y se realiza mediante una fórmula para convertir la altura del pulso (mV) en energía (eV o keV), que el sistema aprende durante el procedimiento de calibración de energía.

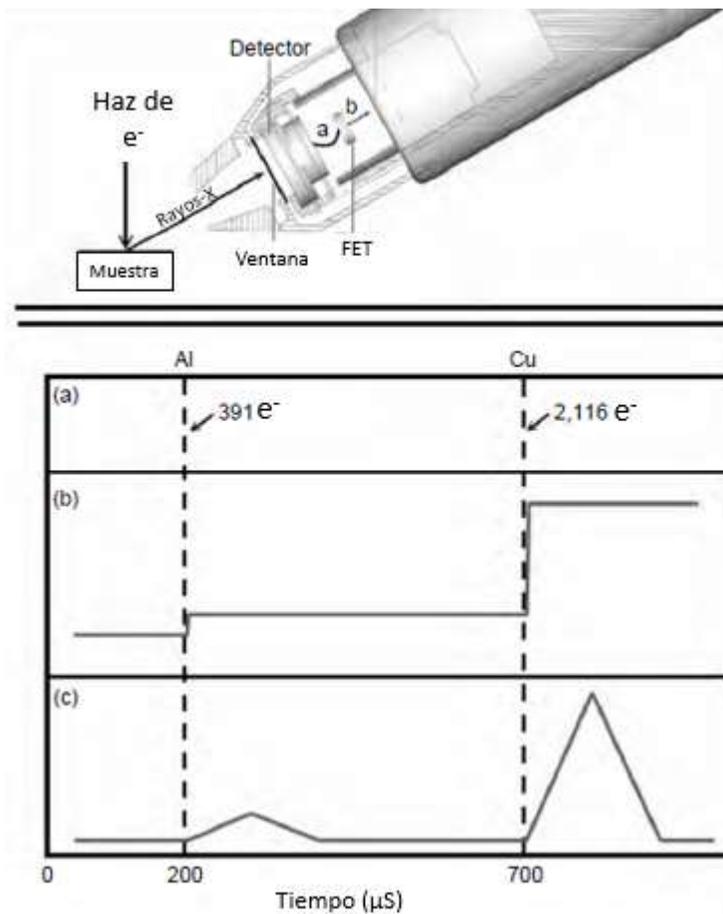


Figura 34. Detección de rayos-X mediante un detector de EDS.

Parámetros a Considerar

Tasa de recuento / tiempo muerto: el más sencillo de estos tres parámetros es la tasa de recuento y se mide en cps. La tasa de conteo se controla ajustando el SEM a las condiciones adecuadas u óptimas como la distancia de trabajo, la inclinación del emisor de electrones y su desplazamiento, también ajustando y alineando adicionalmente la apertura y ajustando su diámetro. El tiempo real o el tiempo de reloj utilizado para recopilar datos espectrales se divide en tiempo “en vivo” y tiempo “muerto”. El tiempo “en vivo” es aquel en que el detector-amplificador no está ocupado y podría recopilar y procesar eventos de rayos-X. El tiempo “muerto” es el momento en que el detector-amplificador no puede recolectar o procesar rayos-X porque está ocupado procesando un evento de rayos X o rechazando múltiples eventos de rayos X. Al 0% de tiempo muerto (o al 100% de tiempo en vivo), no se recopila espectro porque el sistema siempre está disponible y probablemente indica que no se están recibiendo recuentos de rayos X. Al 100% de tiempo muerto, el sistema está ocupado todo el tiempo procesando, pero es más probable que rechace eventos de rayos X; esto probablemente no proporcionará espectro. Para un espectro de buena resolución, es mejor utilizar una de las constantes de tiempo más largas con una tasa de recuento que produzca un tiempo muerto moderadamente bajo, quizás del 20 al 40%.

Voltaje de aceleración: debe ser al menos 2 veces la energía de la línea de energía más alta en nuestro espectro y no más de 10 a 20 veces la línea de energía más baja de interés. El número 10 se utiliza para aplicaciones cuantitativas, mientras que el número 20 es relevante para aplicaciones estrictamente cualitativas. ¿Por qué el voltaje del haz debería ser al el doble del pico de mayor energía de x elemento? A voltajes más bajos, la fracción del volumen de interacción donde se puede excitar el elemento se vuelve muy pequeña y no es posible generar muchos rayos-X de esa energía; el resultado será un pico pequeño y también una sensibilidad pobre para ese elemento. ¿Por qué el voltaje del haz debería ser inferior a 10 a 20 veces el pico de energía más

bajo? Cuando el voltaje es excesivo, la proporción del volumen de interacción por la que los rayos-X de baja energía pueden escapar sin ser absorbidos también se vuelve pequeña. El resultado será una señal de baja intensidad.

Geometría muestra-detector y ángulo: los detectores de EDS regularmente tendrán un colimador que evita que emisiones de otras regiones no focalizadas de la muestra o del equipo incidan sobre el detector. Si se considera la línea de visión del detector o la “normal del detector” (línea imaginaria desde el centro del detector que es perpendicular a su superficie), esta normal intersecta el haz de electrones a una distancia definida en mm del eje del que el detector está sostenido (Figura 35). Esta distancia de intersección debiera ser la distancia ideal de trabajo (en mm) para coleccionar rayos-X. El ángulo entre la intersección del plano horizontal y la normal del detector le da al detector un ángulo de elevación. El típico intervalo de ángulos de inclinación utilizados son entre 30-35°, este ángulo será una combinación del ángulo del detector, su posición, distancia de trabajo de la muestra y ángulo de la muestra. Si el detector ya se encuentra a aproximadamente 35° respecto a la horizontal, la muestra no necesitará ser inclinada en la mayoría de los casos [25].

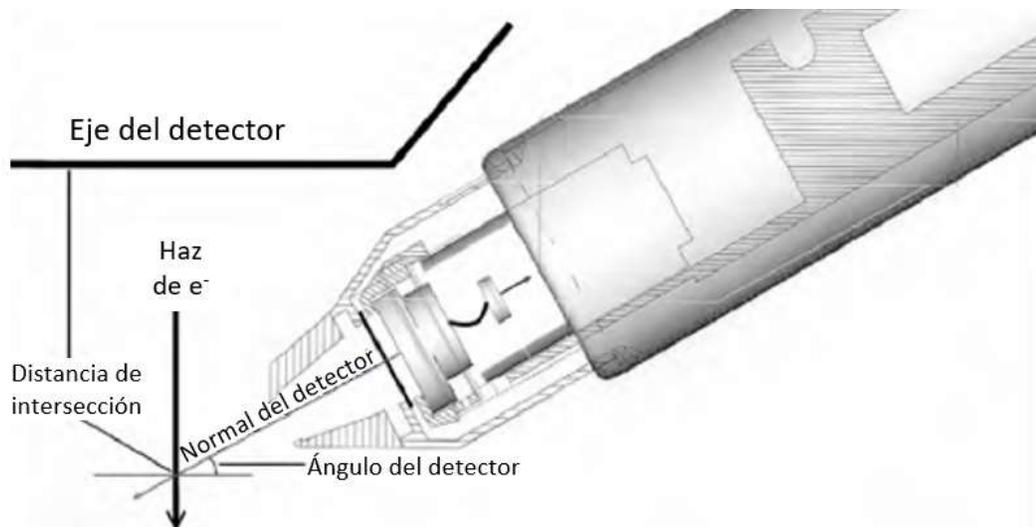


Figura 35. Geometría de un detector inclinado y el haz de electrones.

APÉNDICE C. ESPECTROSCOPIA RAMAN, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 36 puede apreciarse que los picos correspondientes a los modos de estiramiento y flexión del enlace tiol en la LCIS desaparecen por completo en el espectro de los QD's funcionalizados, confirmando el enlazado a la superficie de éstos mediante dicho enlace como previamente se observó en la espectroscopia FTIR.

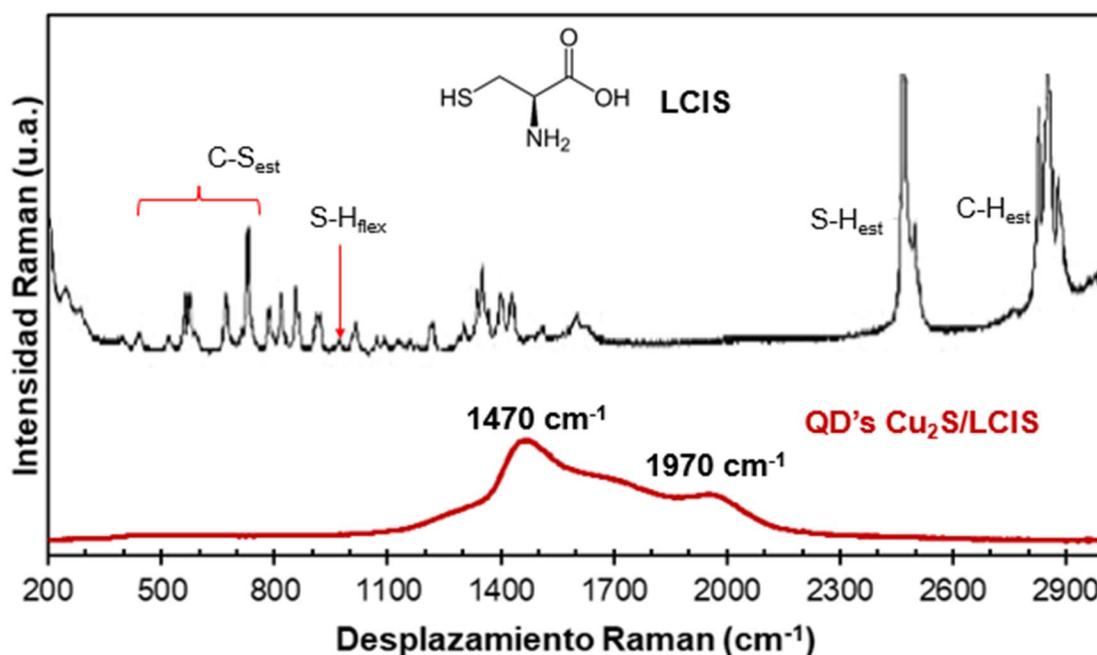


Figura 36. Espectros Raman de la LCIS (línea negra) y de los QD's de Cu funcionalizados con LCIS (línea roja). Se incluye la estructura de la LCIS como inserto.

Para los QD's dos nuevos modos de vibración aparecen centrados a 1470 y 1970 y cm⁻¹, además se aprecian como señales anchas e intensas, un fuerte indicativo de fluorescencia de parte de los QD's domina sobre el resto de las señales que deberían seguir apareciendo, como las correspondientes a los modos de estiramiento de C-S y C-H [9].

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Brandon Alberto Cruz Escobar

Candidato para el Grado de

Doctorado en Ciencias con Orientación en Química de los Materiales

Tesis: OBTENCIÓN DE UN APTASENSOR FLUOROMÉTRICO DE PUNTOS CUÁNTICOS DE Cu_2S FUNCIONALIZADOS PARA SENSADO DE As(III) .

Edad: 26

Campo de Estudio: Materiales Funcionales

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 7 de Agosto de 1996, hijo de Petra Escobar Flores y Jaime Alberto Cruz Q.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestría en Ciencias con orientación en Química de los Materiales.

Experiencia Profesional: Analista de Calidad en Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V.