



Universidad de Sonora
Departamento de Investigación en Física
Posgrado en Ciencias (Física)

Modificaciones Físico-Químicas de Nanopartículas de Diamante y Oro en la Formación de Nanoestructuras Híbridas Para Uso en la Biomedicina.

Tesis para la obtención del grado científico:

Doctor en Ciencias (Física)

presentada por el Maestro en Ciencias:

Seidy Pedroso Santana

Directores de tesis:

Dr. Raúl Riera Aroche

Dr. Martín Pedroza Montero

Asesor de tesis:

Dr. Andrei Sarabia Saíenz

Hermosillo, Sonora

Marzo de 2017

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

En el presente trabajo, describimos la utilización de nanopartículas de oro y diamante para obtener nanoestructuras híbridas, multifuncionalizables y biocompatibles, que demostraron ser eficientemente internalizadas por la célula viva. La combinación de nanodiamantes y nanopartículas metálicas busca potenciar sus propiedades individuales para la obtención de nuevas características.

Como primera etapa se procedió a la desaglomeración de agregados de nanodiamantes obtenidos por detonación, desde tamaños mayores a un micrómetro hasta aglomerados aproximadamente menores o igual a 100 nm. Estos pequeños agregados no presentaron un efecto negativo sobre la viabilidad de glóbulos rojos después de 3 horas de incubación, y tampoco indujeron cambios estructurales en la molécula de la Hemoglobina, como se pudo detectar por el estudio del espectro Raman. El tamaño de los desaglomerados fue comprobado por técnicas de Dispersión Dinámica de la Luz y Microscopía Electrónica de Transmisión.

A continuación, los nanodiamantes de detonación y también nanodiamantes fluorescentes con centros Nitrógeno-Vacancia, fueron conjugados con el fluoróforo Isotiocianato de Fluoresceína e incubados con células de la línea tumoral HeLa, para estudiar su interacción mediante Microscopía de Fluorescencia Confocal. Se pudo observar que ambos conjugados de nanodiamantes con fluoresceína lograron pasar al medio intracelular y se encontraron libres en el citosol tras 24 horas de incubación. Paralelamente, se estudiaron las propiedades de emisión de fluorescencia de los conjugados, detectándose la ocurrencia de un proceso de interacción colaborativa entre los centros Nitrógeno-Vacancia y la fluoresceína, que posibilitaron un incremento en la emisión de fluorescencia a 520 nm. Este resultado permite recomendar al conjugado para aquellas aplicaciones de los nanodiamantes que conlleven un seguimiento de su posición en la célula, mediante microscopía de fluorescencia.

Las etapas anteriores permitieron sentar las bases para el proceso de hibridación diamante-oro, confirmándose la obtención de los nanohíbridos a través de la Microscopía Electrónica de Transmisión. El estudio de sus propiedades fluorescentes, luego de la conjugación con fluoresceína, mostró la existencia de un efecto antena de la partícula de oro que incrementó en gran medida la emisión de fluorescencia de los híbrido-conjugados. Un estudio de viabilidad *in vitro* permitió concluir que ambas nanoestructuras no resultan tóxicas para la célula HeLa a 3 horas de incubación. Al igual que como ocurrió con los nanodiamantes por separado, se pudo observar por Microscopía de Fluorescencia Confocal que los híbridos son capaces de entrar a la célula HeLa, teniendo una ubicación citosólica y perinuclear luego de 24 horas de incubación.

Mediante los procedimientos seguidos en este trabajo de Tesis se desagregaron nanodiamantes de detonación, que fueron modificados químicamente en sus superficies y funcionalizados con fluoresceína para estudiar su interacción con la célula viva, resultando biocompatibles en las condiciones probadas. Experimentos similares fueron realizados para nanodiamantes con centros nitrógeno-vacancia, que mostraron además incrementar la fluorescencia del fluoróforo conjugado, mediante un fenómeno de transferencia de fotoelectrones.

La unión de los nanodiamantes con nanopartículas de oro por vía química permitió obtener nanoestructuras híbridas con probada biocompatibilidad y superiores características ópticas. Estas nanoestructuras presentan un elevado potencial para su uso en aplicaciones biomédicas, ya sea como plataformas para transportar fármacos o moléculas de interés o para su uso en imagenología utilizando las propiedades de fluorescencia.

In this work, we describe the use of gold and diamond nanoparticles to obtain multifunctional and biocompatible hybrid nanostructures, which proved to be efficiently internalized by the living cells. The combination of nanodiamonds and metal nanoparticles seeks to enhance their individual properties to acquire new potentialities.

As the first step, we proceeded to the de-agglomeration of detonation nanodiamonds, from sizes higher than 1 μm to smaller aggregates of approximately 100 nm. The reduced particles did not show a negative effect on red blood cells viability after 3 hours of incubation nor did they induced alterations to the Raman spectrum of hemoglobin. Their effective disaggregation was verified using Dynamic Light Scattering and Transmission Electron Microscopy.

Next, detonation nanodiamonds and also fluorescent Nitrogen-Vacancy center nanodiamonds were conjugated with the fluorophore Fluorescein Isothiocyanate, and incubated with HeLa tumor cell line to study their interaction by using Confocal Microscopy. Both nanodiamond-fluorescein conjugates were able to internalize the cells and were observed free in the cytosol after 24 hours of incubation. In parallel, the fluorescence emission properties of the conjugates were studied showing the existence of a collaborative process between the Nitrogen-Vacancy centers and fluorescein, which allowed an increase in fluorescence emission at 520 nm.

Once the above steps were completed, we had the basis for the obtaining of the diamond-gold nanohybrid. The presence of the nanostructures formed by the union of gold nanoparticles and both nanodiamond types mentioned before was successfully verified by Transmission Electron Microscopy. The study of their fluorescent properties showed the existence of an antenna effect induced by gold nanoparticles that increased the intensity of the emitted fluorescence. Testing biocompatibility by the Tetrazolium assay revealed that

both nanostructures were biologically safe in HeLa cells after 3 hours of incubation. While, as with the nanodiamonds separately, it was observed by Confocal Microscopy that the hybrids are able to enter the HeLa cell, exhibiting a cytosolic/perinuclear location 24 hours post-incubation.

By using the procedures described in this work, detonation nanodiamonds were disaggregated to sizes about 100 nm, and subsequently chemically modified on their surfaces. The functionalization with fluorescein allowed to study nanodiamonds interaction with living cells, showing biocompatibility under the conditions tested. Similar experiments were performed for nanodiamonds with Nitrogen-Vacancy centers, which also showed an enhancement of the fluorescence emitted by the conjugated fluorophore, through a photoelectron transfer phenomenon.

The chemical linkage of nanodiamonds with gold nanoparticles allowed to obtain hybrid nanostructures with proven biocompatibility and superior optical characteristics. These nanostructures have a high potential for biomedical applications, either as platforms for the delivery of drugs and molecules or for their use in fluorescence experiments.

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1: Estado del Arte.....	7
1.1 Las Nanopartículas en las Investigaciones Biomédicas.	7
<i>1.1.1 Estudio de las aplicaciones de las nanopartículas</i>	<i>8</i>
1.2 Nanodiamantes	12
<i>1.2.1 Aplicaciones biomédicas de los nanodiamantes</i>	<i>15</i>
<i>1.2.2 Entrega controlada de medicamentos.....</i>	<i>17</i>
<i>1.2.3 Bio-imagenología por Fluorescencia</i>	<i>18</i>
<i>1.2.4 Dispersión elástica e inelástica de la luz.</i>	<i>18</i>
1.3 Nanopartículas de oro.....	19
<i>1.3.1 Aplicaciones biomédicas</i>	<i>20</i>
1.4 Nanopartículas híbridas y multifuncionales	22
1.5 Principales técnicas empleadas para la caracterización de nanopartículas.....	24
Referencias.....	27
CAPÍTULO 2: Fundamentos Físicos de la Investigación.....	35
2.1 Propiedades electrónicas de los sólidos: Oro y Diamante.....	35
<i>2.1.1 Aproximación de valencia.</i>	<i>36</i>
<i>2.1.2 Aproximación de Born-Oppenheimer.</i>	<i>37</i>
<i>2.1.3 Aproximación de Campo Medio o Aproximación Monoeléctrica.</i>	<i>39</i>
<i>2.1.4 Aproximación de la Masa Efectiva.....</i>	<i>40</i>
<i>2.1.5 Sistema de baja dimensionalidad: Confinado o nanoestructura.</i>	<i>47</i>
<i>2.1.6 Estructura electrónica de los centros NV en el diamante.</i>	<i>51</i>
<i>2.1.7 Caracterización Experimental.</i>	<i>53</i>
CAPÍTULO 3: Desaglomeración y Caracterización de Nanodiamantes de Detonación.	57
3.1 Desagregación de los DND.....	57
3.2 Estudio de interacción con eritrocitos.	67
Conclusiones del Capítulo 3.	71
Referencias.....	72
CAPÍTULO 4: Obtención de conjugados nanodiamante-fluoresceína y su interacción con células HeLa.....	73
4.1 Conjugación con FITC.....	73
4.2 Estudios de Fluorescencia.....	77
4.3 Interacción con células HeLa.	83
Referencias.....	87

CAPÍTULO 5: Obtención de nanoestructuras híbridas diamante-oro, caracterización y estudio de su interacción con la célula viva.....	89
5.1 Obtención de los híbridos.....	90
5.2 Reacción con FITC y medición de la fluorescencia.....	92
5.3 Interacción entre los nanohíbridos y la célula viva.....	96
Referencias.....	103
CONCLUSIONES GENERALES DE LA TESIS.....	105
ANEXO 1.....	108
Agradecimientos.....	109

INTRODUCCIÓN

Uno de los avances más importantes de la Física de finales del siglo pasado y lo que va de este, es la manipulación y control de los sistemas y materiales en dimensiones mesoscópicas. Lo cual ha permitido estudiar en detalle las interacciones y propiedades de estos sistemas. La aparición de las Nano-Ciencias y las nanotecnologías posibilitan cada día contar con mayor información sobre procesos que ocurren entre partículas de tamaños en el orden de los nanómetros, a la vez que se hace posible la síntesis de nuevas estructuras, su modificación y manipulación, de acuerdo a intereses científicos.

Tales avances han sido incorporados a la vida diaria en la búsqueda de soluciones a múltiples problemáticas de la humanidad. En el caso de las investigaciones biomédicas, la interacción entre la biología, la física y la química, entre otras áreas, pudiera ser la respuesta ante retos urgentes como el mejoramiento del diagnóstico temprano y las terapias contra enfermedades como el cáncer. Las nanopartículas multifuncionales, que portan varios agentes efectores a la vez, podrían proveer información estructural y metabólica específica sobre sitios de interacción para el desarrollo de tumores, a la vez que propiciarían la detección imagenológica. Además, estas nanopartículas pueden transportar agentes terapéuticos (drogas anticáncer, genes, etc.) y descargarlos de manera específica en aquellos tejidos que presentan alteraciones patológicas. Con el desarrollo en estas direcciones, la aplicación de las Nanociencias promete revolucionar el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades en los próximos años.

En el campo de la Nano-biomedicina, existen principalmente dos tipos de nanopartículas en estudio: las poliméricas y las inorgánicas. Las primeras, aunque son flexibles y biodegradables, tienen generalmente tamaños entre 200-500 nm que limitan su aplicación a

nivel celular, y su estabilidad puede verse comprometida en aplicaciones sistémicas que necesitan una elevada vida media. Además de ello, estas partículas pueden inducir una respuesta inmune que probablemente contrarrestaría el efecto de la terapia. En cambio, las partículas inorgánicas pueden ser sintetizadas en rangos de tamaños muy pequeños, desde los 5 hasta los 100 nm, lo que garantizaría su circulación por el torrente sanguíneo y alcanzar los sitios de acción terapéutica. Este tipo de partículas permite su unión a moléculas mediante modificaciones a su superficie, que pueden lograrse luego del tratamiento de las nanopartículas con distintos tipos de sustancias químicas, incluyendo ácidos y agentes redox. Un punto crítico a garantizar luego de estas alteraciones superficiales y antes de cualquier aplicación en biomedicina, es la biocompatibilidad de cada unidad funcional.

Entre las aplicaciones más desarrolladas para las nanopartículas en el campo biomédico se encuentran: la mejoría de las técnicas de obtención de imágenes; los avances en proyectos de liberación de fármacos sitio-específicos y en tiempo controlado; el desarrollo de estudios de detección e identificación de proteínas para el diagnóstico; y el trabajo en terapias que emplean nanopartículas, como es el caso de la terapia fototérmica. Debido al carácter único de sus propiedades estructurales, químicas, mecánicas, ópticas y de biocompatibilidad, existen algunas nanopartículas que generan mayor interés para su uso en la biomedicina. Tal es el caso de los nanodiamantes (NDs) y las nanopartículas de oro (AuNPs).

Los NDs obtenidos por detonación, con estructuras primarias generalmente entre 4 y 5 nm, resultan de especial utilidad para las aplicaciones biomédicas debido a su pequeño tamaño. Además, su empleo en proyectos de liberación de fármacos se ve propiciado por la presencia de una amplia superficie para funcionalizar, así como por su probada biocompatibilidad. En el caso de aplicaciones en imagenología, han sido más estudiados los nanodiamantes

fluorescentes con centros Nitrógeno-Vacancia, que poseen una elevada foto-estabilidad. Junto a los aspectos antes mencionados, la aplicación de los NDs en la biomedicina requiere de su habilidad para interactuar con tejidos y células y de su capacidad para penetrarlos; factores que deben ser tenidos en cuenta durante su modificación y funcionalización.

En el caso de las nanopartículas de oro, estas han atraído una atención significativa gracias a su relativa biocompatibilidad a corto plazo y a su densidad física. Propiedades que, unidas a sus características ópticas, propician variadas aplicaciones. Su uso se ha visto potenciado también por la existencia de métodos sencillos y rápidos para su síntesis y conjugación, y por su alta estabilidad en dispersión acuosa.

La obtención de nanopartículas híbridas entre dos o más materiales, donde cada componente contribuya con sus propiedades individuales y se obtengan nuevas funcionalidades, es una proyección de la nanotecnología actualmente en estudio. Nanoestructuras que combinan diamante y oro están siendo usadas en aplicaciones como la nano-termometría y en la creación de sondas fotoluminiscentes, agentes fotoacústicos, sistemas antioxidantes, entre otros.

A continuación ofrecemos una pequeña síntesis del contenido del presente trabajo de Tesis, que consta de una Introducción, 4 capítulos y un epígrafe de conclusiones generales.

- **Introducción.** Se realiza una presentación corta acerca del contexto en que se inserta el trabajo de tesis. Primeramente se trata de ubicar al lector en el tema que se comentará en los demás capítulos, mientras que en una segunda parte se define el problema de investigación, proponiéndose los objetivos y las hipótesis que rigen el trabajo de investigación desarrollado.

- **Capítulo 1: Estado del arte.** Consiste en una revisión de la literatura científica acerca de diferentes temas que son utilizados en las investigaciones que se refieren en los capítulos siguientes. Se describe la metodología empírica y teórica, presentando los principales métodos experimentales y de observación, así como el aparato conceptual y teórico basado en técnicas y procedimientos hipotético-deductivos. Se refiere la importancia, novedad y actualidad del problema investigado en la tesis, de acuerdo con aplicaciones de nanoestructuras similares reportadas por otros investigadores.
- **Capítulo 2: Fundamentos Físicos de la Investigación.** En este capítulo, se expone el tratamiento del modelo físico-matemático de los sólidos utilizados en el trabajo de tesis: el oro como metal y el diamante como semiconductor. Se ofrecen datos de sus propiedades en dimensión tridimensional y en forma de nanopartículas, donde el efecto de tamaño cuántico es aprovechado en las propiedades electrónicas del plasmón del oro y las ópticas de los centros NV en el diamante fluorescente.
- **Capítulo 3: Desaglomeración y caracterización de Nanodiamantes de Detonación.** En este capítulo, se describe y discute la aplicación de la técnica Desintegración sónica asistida con perlas de sílica, seguida de un procedimiento de carboxilación, para la reducción de los tamaños de aglomerados de nanodiamantes de detonación desde 1 μm hasta 40-100 nm. De manera que se hace posible su utilización en experimentos de interacción con células vivas. Igualmente, se presentan los resultados de un estudio de la incubación de los nanodiamantes con eritrocitos durante 3 horas, que muestran que la metodología utilizada no alteró la biocompatibilidad de las nanopartículas.

- **Capítulo 4: Obtención de conjugados nanodiamante-fluoresceína y su interacción con células HeLa.** En este capítulo, se presenta la metodología seguida para la obtención de conjugados de dos tipos de nanodiamantes (de detonación y fluorescentes con centros NV) con la fluoresceína. Se describen las propiedades fluorescentes de los conjugados, sugiriendo la existencia de un proceso de incremento de la fluorescencia por transferencia de fotoelectrones, para el caso centro NV-fluoresceína, y se discute la internalización de las nanopartículas por la célula HeLa luego de 3 y 24 horas de incubación.
- **Capítulo 5: Obtención de nanoestructuras híbridas diamante-oro, caracterización y estudio de su interacción con la célula.** En este capítulo, se muestra la obtención de nanoestructuras híbridas diamante-oro, que son funcionalizadas con fluoresceína, y se describe el proceso de incorporación por la célula. Además, se presenta la metodología seguida para la generación de los híbridos, sus propiedades y características; haciendo énfasis en la emisión de fluorescencia en los conjugados híbridos-fluoresceína. De esta manera se comprueba la aparición de nuevas propiedades, que podrían ser usadas en aplicaciones biológicas.
- **Conclusiones Generales de la Tesis.** Aunque cada capítulo cuenta con un epígrafe de conclusiones parciales, al cierre del documento de tesis se enuncian las conclusiones generales de la misma, como resultado totalizador que engloba las consecuencias fundamentales de toda la investigación realizada.

Objetivo general del trabajo:

Desarrollar distintas estrategias metodológicas de investigación en el trabajo con nanopartículas biocompatibles de materiales como el diamante y el oro, controlando tamaño y funcionalización, para su uso en aplicaciones biológicas.

Objetivos parciales:

1. Desagregar los nanodiamantes de detonación mediante la aplicación de la técnica BASD y la reacción de carboxilación, reduciendo el tamaño de los aglomerados desde 1 μm hasta el nivel nanométrico.
2. Realizar la modificación de las superficies de los nanodiamantes mediante métodos químicos para obtener grupos carboxilo e hidroxilo activos, que permitan la unión posterior de fluoresceína, cisteína, y nanopartículas metálicas.
3. Evaluar la interacción de los nanodiamantes desaglomerados y sometidos a procedimientos de modificación de su superficie, con diferentes tipos de células, a través de su incubación durante 3 y/o 24 horas, con eritrocitos y células HeLa.
4. Obtener nanopartículas híbridas diamante-oro, estudiar sus características en cuanto a tamaño, funcionalización, propiedades ópticas e interacción con células vivas.

Hipótesis:

“El diseño y la obtención de nanoestructuras híbridas diamante-oro con propiedades biocompatibles, tamaños y condiciones de funcionalización que garantizan su interacción con la célula viva, permite mejorar el desempeño de cada componente por separado y generar nuevas propiedades en el híbrido.”

CAPÍTULO 1: Estado del Arte

1.1 Las Nanopartículas en las Investigaciones Biomédicas.

La Investigación en el campo de las Nanociencias combina conocimientos obtenidos mediante el uso de la Física, la Ingeniería, la Química, la Biología, y otras áreas, para la comprensión de las propiedades y características de los nanomateriales y sus posibles aplicaciones. Las partículas cuyo diámetro se encuentra entre 1 y 100 nm son consideradas como nanopartículas; aunque en las investigaciones biomédicas es común llamar de esa manera también a unidades ligeramente mayores, que conservan sus propiedades (Nune, 2009).

A escala nanométrica, las partículas muestran características únicas, distintas de las mostradas por sus componentes (iones, átomos o moléculas) o por sólidos mayores. Es por ello que los métodos para su obtención y manipulación se han desarrollado de manera que se controle el tamaño y la forma, buscando manifestar esas propiedades. Al mismo tiempo, la modificación superficial y la funcionalización de las nanopartículas, han aprovechado la elevada relación superficie-volumen, para permitir la unión de ligandos (Smith, 2008).

En la interacción con organismos vivos, se ha visto que las nanopartículas se acumulan en los tumores de manera pasiva, debido al incremento de los efectos de permeabilidad y retención (Greish, 2007). Además de ello, la unión a una molécula o ligando con reconocimiento tumoral las puede convertir en sondas de alta especificidad (Davis, 2008). El uso de las nanopartículas (NPs) en imagenología molecular se relaciona principalmente con el desarrollo de sondas para la detección de funciones celulares, la caracterización, y la medición de procesos que ocurren a escala molecular en los organismos vivos, todo ello se realiza buscando no introducir perturbaciones que alteren la célula (Weissleder, 2006).

La funcionalización de la superficie de las nanopartículas es un método usado para ajustar las propiedades de las partículas y adaptarlas a aplicaciones específicas. Entre los objetivos que se persiguen con la modificación de superficies mediante la unión a moléculas, polímeros y otras partículas, están: estabilizar las nanopartículas en dispersión; proporcionar grupos reactivos para posteriores funcionalizaciones; proporcionar capas o cubiertas a las NPs que modifiquen sus propiedades electrónicas, ópticas, espectroscópicas y químicas; modificar su capacidad para ensamblarse en arreglos con otras partículas o su habilidad para unirse de manera específica a blancos químicos, físicos o biológicos; y mejorar su funcionamiento en diversos ambientes (reducción de toxicidad, etc.) (Simón de Dios, 2010).

1.1.1 Estudio de las aplicaciones de las nanopartículas

Una amplia variedad de sistemas de nanopartículas se encuentran en estudio para comprobar su potencial en imagenología, tanto en aplicaciones de diagnóstico como de terapias. La carga eléctrica de las partículas, el tamaño, la forma y su solubilidad, están entre las propiedades más importantes cuando se exploran aplicaciones de entrega de fármacos (Lee 2009).

En los últimos años se han producido avances en el uso de NPs en la obtención de imágenes biomédicas, con el mejoramiento del contraste en comparación a los agentes convencionales. Esto ha sido posible también debido a la potente absorción de la luz de muchas nanopartículas y a su baja toxicidad por tiempos pequeños (Hainfeld, 2006 y Yu, 1999). Gracias a ello, se han podido identificar tumores en animales en estadios mucho más tempranos que lo obtenido con métodos clínicos de uso convencional (Nune, 2009). No obstante, aún cuando estos resultados tienen un carácter muy promisorio, deben estudiarse con mayor detalle otros aspectos como la farmacocinética, la biodistribución y la toxicidad de los nanomateriales.

Varios esfuerzos se continúan realizando para el mejoramiento de las aplicaciones en desarrollo para las NPs (Longmire, 2008 y Choi, 2007). Tanto en el campo de las terapias para el cáncer como en la imagenología, estos usos podrían beneficiarse de mejoras en cuanto a entrada a la célula y especificidad, estabilidad *in vitro* e *in vivo*, y en la obtención de mayores tiempos de vida media. La unión a diferentes ligandos puede garantizar estas mejoras mediante una correcta estrategia de funcionalización; entre los posibles ligandos se pueden encontrar pequeñas moléculas, péptidos, proteínas y anticuerpos (Byrne, 2008 y Weissleder, 2005).

Debido al rápido crecimiento en el número de aplicaciones de las nanopartículas en la biomedicina, su carácter tóxico para la célula es un aspecto que debe ser considerado en detalle y que ha sido objeto de numerosos estudios (Lewinski, 2008; Pan, 2007 y Lanone, 2006). De igual manera deben tenerse en cuenta dificultades que pueden sobrevenir en la formulación, como aquellas relacionadas con la agregación y el tiempo de almacenamiento. Cuando se estudia la interacción con la célula, se ha visto que las nanopartículas más pequeñas (5-10 nm) pueden pasar a través de canales de la membrana celular, lo que les da una alta posibilidad de interacción con proteínas y otras biomoléculas (Cai, 2008). Partículas de tamaños mayores (40-100 nm), son generalmente internalizadas a través de mecanismos como la endocitosis y la pinocitosis (Faklaris, 2009 y Liu, 2009). En algunos casos se ha reportado la acumulación de las NPs en vesículas sin que llegue a ocurrir su liberación en el citoplasma (Ma, 2011), para evitarlo se deben emplear estrategias de funcionalización adecuadas. La modificación de las superficies con grupos químicos como los -OH, -COOH, -NH₃, ha sido empleada para unir moléculas funcionales, pero también favorece la penetración en las células al incrementar la interacción con proteínas (Liu, 2007).

Entre las interrogantes que deben ser respondidas antes de la aplicación de nanopartículas en sistemas vivos hay algunas como: ¿En qué áreas se produce la distribución de las NPs?, ¿Cómo se eliminan del organismo luego de realizar su función? ¿Qué tiempo demoran en ser eliminadas? ¿Cuál es la dosis óptima de aplicación y cuáles son sus efectos en el organismo? Todos estos factores deben ser considerados cuidadosamente antes de proceder a aplicaciones clínicas de las nanopartículas (Yong, 2009). Los estudios *in vitro* de etapas investigativas o pre-clínicas deben también ir encaminados a coleccionar información similar en modelos celulares.

El tema de la toxicidad de las nanopartículas puede ser complejo, y estará en dependencia de sus propiedades físico-químicas, de la concentración empleada, el tiempo de aplicación, la ruta de exposición y el mecanismo de acción. Aunque estos estudios necesitan una evaluación *in vivo* a largo plazo para ser concluyentes, los datos conseguidos en diversos experimentos *in vitro* proporcionan la información necesaria para llegar a conclusiones acerca de un sistema en análisis. Para la aplicación de las NPs en técnicas de diagnóstico y otros ensayos que se realicen *in vitro*, los estudios de toxicidad y viabilidad resultan más sencillos, pues no involucran reacciones sistémicas. En estos casos pueden combinarse los análisis de liberación de proteínas citoplasmáticas al medio extracelular (como el ensayo de hemólisis), los conteos de células vivas o metabólicamente activas (azul de tripano, tetrazolium amarillo MTT), el análisis de la expresión de proteínas citotóxicas (citometría de flujo), y otros.

Entre las aplicaciones más desarrolladas en los últimos 15 años, se pueden encontrar proyectos de liberación de fármacos (Liang, 2014; Zhu, 2012; Smith, 2011 y Panatarotto, 2003), detección de proteínas (Nam, 2003), reemplazo de agentes orgánicos en técnicas que requieren una alta fotoestabilidad y elevada capacidad para multifuncionalización (Wolfbeis,

2015 y He, 2002) y terapias fototérmicas (Jaque, 2014). Existen enfoques terapéuticos que trabajan en el direccionamiento y control a distancia de las funciones de nano-sondas, por ejemplo, guiando nanopartículas magnéticas hacia los tumores y una vez allí provocar un aumento de la temperatura para destruir el tejido circundante (Huang, 2010), o induciendo la liberación de un medicamento que ha sido transportado por las NPs (Yong, 2009).

Las tendencias más modernas de estas aplicaciones están enfocadas hacia la obtención de nanodispositivos multifuncionales; ya sea para la realización de diagnósticos en el laboratorio (Diercks, 2009 y Zheng, 2005), o para funcionar como nano-robots dentro de un organismo vivo (Saadeh, 2014), de una manera controlada a través de señales externas o mediante el entorno local (cambio de pH, presencia de ligandos, etc.). Aunque son varios los materiales que se han evaluado, las nanopartículas de oro y diamante aparecen entre las más promisorias gracias a sus propiedades.

Debido a la elevada incidencia y al incremento del cáncer en todo el mundo (Jemal, 2011), son muchos los esfuerzos que se llevan a cabo por la comunidad científica para su contención y eliminación. El uso de la nanotecnología presenta un gran potencial para diagnóstico temprano, certero y también para terapias de distintos tipos de cáncer. Es por ello que muchas de las aplicaciones de las nanopartículas han estado enfocadas en ese sentido. El desarrollo de una disciplina como la Nanotecnología del cáncer contribuiría al establecimiento de la oncología personalizada, en la que se usen marcadores genéticos para el diagnóstico y se determinen los tratamientos en función de los perfiles individuales de cada paciente (Cai, 2008).

1.2 Nanodiamantes

El Carbono como elemento químico tiene un número atómico $Z=6$, con una configuración electrónica $1s^2 2s^2 2p^2$ en su estado basal. Los 4 electrones del segundo nivel son electrones de valencia. La hibridación sp^2 conlleva a la formación de una estructura hexagonal, planar, en dos dimensiones, estableciendo un arreglo donde el átomo central está unido a otros tres átomos de carbono. El electrón que queda disponible permanece deslocalizado, libre para migrar en el plano. Varias capas planares de este tipo de estructura establecen una interacción débil entre ellas, conformando uno de los alótropos del Carbono: el Grafito.

La hibridación sp^3 , por su parte, forma una estructura rígida, con simetría tetraédrica, donde los 4 electrones de valencia del carbono están enlazados con 4 átomos vecinos; esta es la estructura del Diamante (**Figura 1.1**), que determina muchas de sus propiedades. La ausencia de electrones libres contribuye a su carácter inerte, no obstante, la estructura superficial del material es diferente de la de su centro. De manera que el cierre de los enlaces en la superficie involucra uniones a especies químicas como el hidrógeno, el hidroxilo, el nitrógeno, etc. (Kaur, 2013).

Debido al carácter único de sus propiedades estructurales, químicas, mecánicas, ópticas y biológicas, los nanodiamantes han atraído mucha atención científica y tecnológica. De acuerdo al método usado para su síntesis, estas nanopartículas pueden clasificarse en nanodiamantes de deposición química de vapor, diamantes de alta temperatura y alta presión y nanodiamantes de detonación. Estos últimos resultan de especial interés para las aplicaciones biomédicas debido a sus pequeños tamaños, con unidades primarias generalmente entre 4 y 5 nm (Mochalin, 2012).

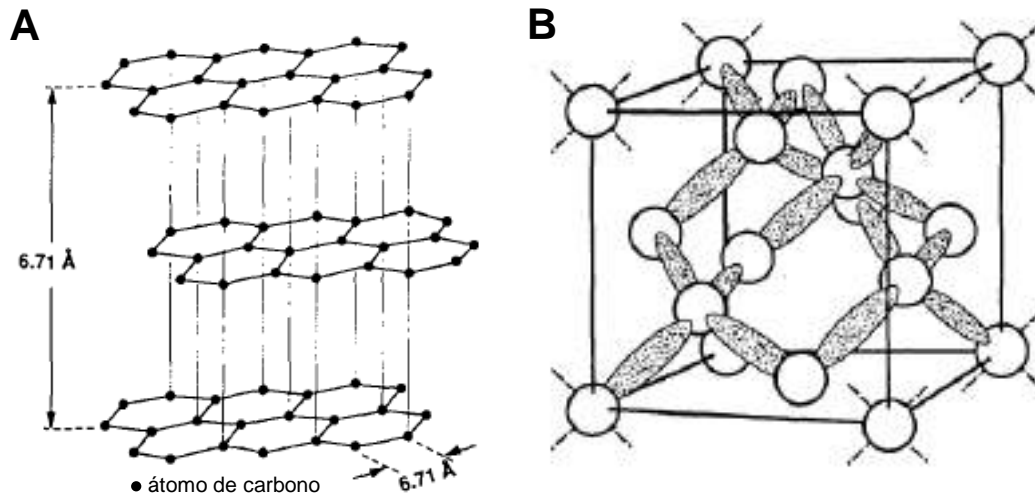


Figura 1.1 Representación esquemática de la estructura cristalina **A:** del Grafito y **B:** del Diamante (tomado de Pierson, 1993)

Por el método de deposición de vapores de carbono pueden obtenerse películas de diamante. La mayor parte del interés en torno a ellas se debe a sus propiedades mecánicas y a su resistencia (Gracio, 2010). Estas estructuras se han estudiado en aplicaciones biomédicas para el recubrimiento de implantes (Shi, 2009) y en el desarrollo de biosensores (Yang, 2002). Los nanodiamantes obtenidos por el método de alta presión/alta temperatura llaman especial atención gracias a que contienen de 100 a 300 ppm de nitrógeno (Chang, 2008). La irradiación con alta energía de este tipo de nanodiamantes genera vacancias en la estructura de carbono. Estas vacancias pueden ser desplazadas hacia la cercanía de los átomos de nitrógeno, mediante un proceso de calentamiento a 800-900 grados Celsius, formándose los centros Nitrógeno-Vacancia (NV). Los centros NV se consideran defectos de la red cristalina que propician la emisión de fluorescencia de color rojo (Davies, 1992). Esta técnica, que resulta compleja y costosa, es la empleada para la obtención de los nanodiamantes fluorescentes con centros NV (FND).

Los nanodiamantes de detonación (DND), también llamados diamantes ultradispersos, se obtienen de manera relativamente barata mediante la detonación de explosivos de carbono. Luego de la síntesis, estos nanodiamantes deben ser extensamente purificados para eliminar contaminantes metálicos y fases de carbono con hibridación sp^2 (Dolmatov, 2001). La estructura básica final de los DND consiste en un centro inerte de diamante con una cubierta o capa superficial de estructuras de grafito (Krueger, 2008). En esta superficie se encuentra generalmente una variedad de grupos funcionales como carboxilos, hidroxilos, etc. que pueden ser modificados en posteriores pasos de tratamientos químicos.

Aunque el tamaño de las partículas primarias es menor de 10 nm, los DND se agregan en suspensión, formando aglomerados de 1 a 5 μm . Estas microestructuras pueden ser usadas en aplicaciones de cromatografía y liberación de fármacos, sin embargo, para obtener un completo aprovechamiento de las propiedades de los nanodiamantes, es necesaria su desagregación a tamaños mucho menores (Mochalin, 2012).

Entre las causas que producen la agregación de los DND se ha propuesto la existencia de diferentes tipos de enlaces: covalentes y electrostáticos, que producen aglutinados de nanopartículas hasta alrededor de 100 nm; interacciones iónicas, que involucran metales unidos a las superficies, formando agregados primarios por encima de 150 nm; y Fuerzas de Van der Waals, que posibilitan la formación de agregados secundarios por encima de 1 μm (Vul, 2014). Varios han sido los trabajos dedicados a la desaglomeración de estos DND, ya que técnicas relativamente rutinarias como la centrifugación y el ultrasonido de alta frecuencia no han tenido resultados positivos por sí solas. Es por ello que han debido proponerse estrategias más complejas, que varían en dependencia del uso final que se quiera dar a los nanodiamantes (Aleksenskiy, 2011; Hsin, 2011 y Pentecost, 2010).

Entre los métodos de desaglomeración que han resultado más efectivos se encuentran la molienda de los DND en suspensión, con perlas de cerámica (Kruger, 2005) y la desintegración sónica asistida con perlas (BASD en inglés) que genera menor contaminación y resulta relativamente sencilla (Ozawa, 2007). Un aspecto a tener en cuenta luego de la realización de un procedimiento de desagregación es la posibilidad de que las partículas se re-agreguen. Por ejemplo, los pasos de secado para el almacenamiento y previos a la aplicación de técnicas de caracterización, promueven la aglutinación debido a fuerzas capilares (Mochalin, 2012).

El uso de los nanodiamantes en proyectos de liberación de fármacos está determinado por los pequeños tamaños y amplia superficie para funcionalizar, así como por su biocompatibilidad (Kaur 2013). En el caso de aplicaciones en imagenología, estas se han posibilitado gracias a la significativa estabilidad de los centros Nitrógeno-Vacancia (NV) en los nanodiamantes fluorescentes (FND) (Man, 2012). La conjugación de NDs con fluoróforos orgánicos como la rodamina y la fluoresceína, ha sido también una estrategia empleada en estudios de fluorescencia (Liu, 2016 y Vul, 2014).

1.2.1 Aplicaciones biomédicas de los nanodiamantes

La aplicación de los NDs en la biomedicina requiere de al menos tres aspectos fundamentales: biocompatibilidad, capacidad de ser conjugados con biomoléculas y habilidad para interactuar y/o penetrar tejidos y células. La modificación de las superficies de los NDs permitirá la unión posterior a biomoléculas y partículas funcionales. Una de las modificaciones más conocidas es la generación de grupos funcionales en la cubierta de los nanodiamantes. Para lograr una mayor capacidad de carga en la superficie, es esencial lograr la uniformidad de esta. Las reacciones con ácidos fuertes producen la homogeneidad

superficial y un incremento en la reactividad. La adición posterior de moléculas con grupos terminales aminos, hidroxilos, etc. permitirá contar a los nanodiamantes con una capa externa lista para ser funcionalizada (Liu, 2004). Estos tratamientos han emergido también como pasos complementarios a los procesos de desagregación, logrando reducciones de tamaño en agregados de DND (Krueger, 2008a, b).

La biocompatibilidad intrínseca de los NDs ha sido confirmada en varios estudios (Schrand, 2007; Liu, 2007 y Yu, 2005), sin embargo, otros trabajos han refutado estos resultados, planteando que los nanodiamantes pueden generar respuesta tóxica ante ciertas circunstancias (Xing, 2011 y Li, 2010). De manera general, el uso de varias líneas celulares y modelos animales ha mostrado la presencia de poca o nula citotoxicidad, lo que demuestra el potencial de los nanodiamantes en aplicaciones con organismos vivos. No obstante, la introducción de modificaciones superficiales, el grado de pureza, el tamaño de los NDs, su carga superficial y la formación de agregados, entre otros, son aspectos que deben ser considerados como variables que pudieran afectar su compatibilidad biológica (Kaur, 2013). Es por ello que cualquier propuesta de aplicación de estas nanopartículas en la biología necesita una confirmación de la ausencia de daño inducido en la célula.

Son numerosos los estudios que han demostrado la internalización de los nanodiamantes por la célula viva (Chao, 2007; Faklaris, 2008; Wee, 2009 y Faklaris, 2009). La penetración de NDs de 46 nm en células HeLa se ha observado predominantemente por endocitosis, luego de 2 horas de incubación (Faklaris, 2009). Nanodiamantes de 100 nm, tras 4 horas de incubación, han sido encontrados con localización perinuclear en células cancerígenas y células madre, tras una aparente entrada por macropinocitosis (Liu, 2009). La capacidad de introducirse al interior de las células, es una de las características de los NDs que favorece

muchas de sus aplicaciones potenciales, como la liberación de fármacos y moléculas con acción terapéutica y en la imagenología.

1.2.2 Entrega controlada de medicamentos

La posibilidad de los NDs de funcionar como portadores de moléculas activas dependerá tanto de su capacidad de carga como de la habilidad que tengan para retener y proteger el agente terapéutico. El mejoramiento en la liberación intracelular de pequeñas moléculas y productos biotecnológicos ha sido uno de los usos propuestos para los nanodiamantes, con mayor énfasis en el caso de agentes quimio-terapéuticos (Li, 2011; Liu 2010 y Chen, 2009). La vía más sencilla para lograr la carga de los medicamentos en la superficie de los NDs es a través de la adsorción física. Este proceso evita la utilización de reacciones complejas y costosas que pudieran afectar la actividad final de la molécula transportada. No obstante, también es posible unir químicamente los fármacos a la superficie del nanodiamante, después de una previa modificación de ésta con grupos activos (Kaur, 2013).

En general, los resultados de las investigaciones realizadas hasta el momento, han demostrado que la unión de agentes terapéuticos a nanodiamantes mejora las propiedades farmacológicas de los primeros, al proveerles alta capacidad de carga, mejor dispersión en medio acuoso, liberación controlada y posibilidad de incrementar la retención en células más resistentes (Kaur, 2013). Lo anterior sugiere que los nanodiamantes pueden convertirse en una eficiente alternativa ante las dificultades presentadas por algunas de las terapias actuales contra enfermedades como el cáncer.

1.2.3 Bio-imagenología por Fluorescencia

Los nanodiamantes fluorescentes con centros NV, con su característica emisión en el rojo, han posibilitado la aplicación de los NDs en estudios imagenológicos (Mohan, 2010). Los centros NV pueden clasificarse en dos tipos: neutral (NV^0) con pico de emisión a los 575 nm y negativo (NV^-) con máximo de emisión a 638 nm (Chang, 2008). La emisión de fluorescencia por los FND se ha empleado, por ejemplo, en estudios de cuantificación del patrón de carga de ácidos nucleicos en la superficie de los nanodiamantes (Fu, 2007), y también en investigaciones acerca del mecanismo de entrada de la proteína transferrina en células HeLa (Weng, 2009).

En el caso de los DND, no existen evidencias de la presencia de nitrógeno en su red cristalina (Kulakova, 2004). La ocasional emisión de fluorescencia por estos nanodiamantes se ha atribuido a efectos a nivel de superficie, aunque su rendimiento cuántico es muy bajo (Zhao, 2004). Una estrategia empleada para dotar de propiedades fluorescentes a los DND ha sido su conjugación con fluoróforos, lo que ha permitido su empleo también en la imagenología para detectar uniones a proteínas (Huang, 2004).

1.2.4 Dispersión elástica e inelástica de la luz.

Si vemos el valor del índice de refracción de los nanodiamantes, este es de 2.42; lo que nos da una medida de su capacidad para dispersar la luz (Hui, 2010). Esta propiedad ha sido explorada para su uso en microscopía de contraste, en células que internalizaron NDs de 55 nm (Smith, 2007). La dispersión elástica de la luz (Rayleigh) en los nanodiamantes es 300 veces mayor que en estructuras celulares de similar tamaño, lo que ofrece una ventaja para usarlos en imagenología de alto contraste (Colpin, 2006). La dispersión de la luz que realizan de manera inelástica (Raman), permitiría también el uso de los nanodiamantes en

experimentos que emplean la Espectroscopía Raman para mapeo y caracterización (Kaur, 2013).

1.3 Nanopartículas de oro

Las nanopartículas de oro (AuNPs) han atraído una atención significativa en la biomedicina gracias a su relativa biocompatibilidad a corto plazo y a su alto coeficiente óptico de absorción, entre otras propiedades (Nune, 2009). Entre sus características ópticas se puede resaltar la presencia de una fuerte banda de absorción en la región ultravioleta-visible, y la existencia de un plasmón de superficie, que ha sido aprovechado para varias aplicaciones, como es el caso de aquellas relacionadas con la dispersión resonante de la luz (El-Sayed, 2001).

Otros aspectos que han potenciado el uso de las AuNPs son la existencia de métodos sencillos y rápidos para su síntesis y conjugación, su estabilidad en dispersión acuosa y la ausencia de toxicidad a bajas concentraciones, lo que, unido a sus excelentes propiedades físicas y químicas, ha propiciado la utilización de las AuNPs en diferentes proyectos biomédicos (Giljohann, 2010; Ghosh 2008 y Huang, 2007).

El modo de síntesis más comúnmente utilizado para estas nanopartículas es la reducción en medio acuoso del ácido tetracloro áurico (HAuCl_4), empleando citrato de sodio, a la temperatura de ebullición (Turkevitch, 1951). Este método produce partículas esféricas monodispersas de tamaños entre 10 y 20 nm. Las superficies de las nanopartículas así obtenidas tienen carga negativa debido a una cubierta de aniones citrato débilmente unidos y se pueden caracterizar fácilmente por la banda de absorción del plasmón de superficie, cercano a los 520 nm en AuNPs de 15 nm.

La mayoría de las técnicas reportadas para la inmovilización de moléculas sobre las nanopartículas de oro están basadas en la formación del puente covalente Au-S entre la molécula a unir y uno de los átomos de la superficie de la partícula. Esta táctica emplea los sulfuros presentes en los ligandos, como los que forman parte de los grupos tiol (SH), disulfuro (S₂), etc. (Ghosh, 2008).

1.3.1 Aplicaciones biomédicas

Entre las aplicaciones más recientes de las AuNPs en la biomedicina se puede mencionar su unión a cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN) para bioanálisis (Lin, 2009). También su uso en imagenología diagnóstica, como biosensores y en la terapia del cáncer (Giljohann, 2010 y Chen, 2008) y además su empleo como plataformas para la liberación de fármacos (Dykman, 2012). Son varios los ejemplos que pueden mencionarse, muchos de ellos vinculados con enfermedades cancerosas.

La unión de AuNPs a agentes fluorescentes como el luminol (Roux, 2005) no solo propició la obtención de una nanopartícula fluorescente, sino que incrementó por un factor de 9 la intensidad de la luz emitida; lo que sugiere la posibilidad de usar sistemas similares en estudios de fluorescencia. Los sensores de ADN, construidos a partir de nanopartículas de oro multifuncionales, son otro tipo de aplicación desarrollada. En este caso, el sensor es obtenido por la inmovilización de dos sondas de ADN, la primera es capaz de reconocer a la molécula blanco, mientras que la segunda se une a una secuencia reportera que porta el marcaje (Hu, 2008). Esta estrategia permite cuantificar la molécula blanco además de tener una alta selectividad.

La unión a óxido de hierro, usando sus propiedades electromagnéticas en métodos de separación y detección de proteínas y polisacáridos, también ha sido explorada (Liang, 2009

y Bao, 2007); lo que permitió la selección de moléculas de interés en muestras de muy baja concentración. Otros proyectos han usado los cambios del pH del medio para modificar las interacciones electrostáticas superficiales con otras moléculas y realizar procesos de adsorción/desorción sobre la partícula de oro (Lin, 2009). Estudios como éste tienen potencial aplicación en el transporte de moléculas hacia sitios de pH cambiante, donde se podría realizar su liberación de manera dirigida.

Por sus propiedades como apagadoras de la fluorescencia (*quencher* en inglés), las nanopartículas de oro han sido empleadas en sistemas de FRET (Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente, por sus siglas en inglés). Además de ello, se han convertido en plataformas para la realización de ensayos fluorescentes múltiples, gracias a la posibilidad de unión de variados nucleótidos-sondas en su superficie (Song, 2009), funcionando como nano-emisores de señales (nanobeacons).

El empleo de nanopartículas de oro como incrementadoras de la señal Raman de proteínas ha sido reportado para las nanovarillas (Huang X, 2007). Este efecto ha permitido su uso como sondas para SERS (Espectroscopía Raman de Superficie Aumentada, por sus siglas en inglés), logrando el reconocimiento de marcadores tumorales en experimentos *in vivo* (Qian, 2008 y Keren, 2008). Otra aplicación estudiada se relaciona con su capacidad para liberar calor (terapia fototérmica): Pulsos de un haz láser enfocado sobre una nanopartícula de oro, se han usado para provocar la absorción de energía y su liberación en forma de calor, matando bacterias (Zharov, 2006) y células cancerígenas (Chen, 2007 y Tong, 2007).

Su aplicación efectiva en estudios de imagenología de células cancerígenas también ha sido observada (Dykman, 2012). Las AuNPs pueden ser mucho más fotoestables y biocompatibles (si se funcionalizan correctamente) que los cromóforos tradicionales. Esta es la base de su

uso para pruebas de alta sensibilidad y monitoreo en tiempo real de la progresión del cáncer (Shi, 2008).

1.4 Nanopartículas híbridas y multifuncionales

Mientras que las nanoestructuras monofuncionales llevan a cabo una sola función, las nanopartículas multifuncionales (MFNPs) pueden combinar diferentes efectos (terapia, actividad como biosensor, respuesta fluorescente, etc.) en un mismo sistema. (**Figura 1.2**). El desarrollo de la multifuncionalidad permite que las MFNPs sean usadas en imagenología biomédica y liberación de fármacos, con un gran potencial en áreas como el cáncer, las neuropatologías y en el diagnóstico de enfermedades (Srinivasan, 2015; Bao, 2013 y Jia, 2013).

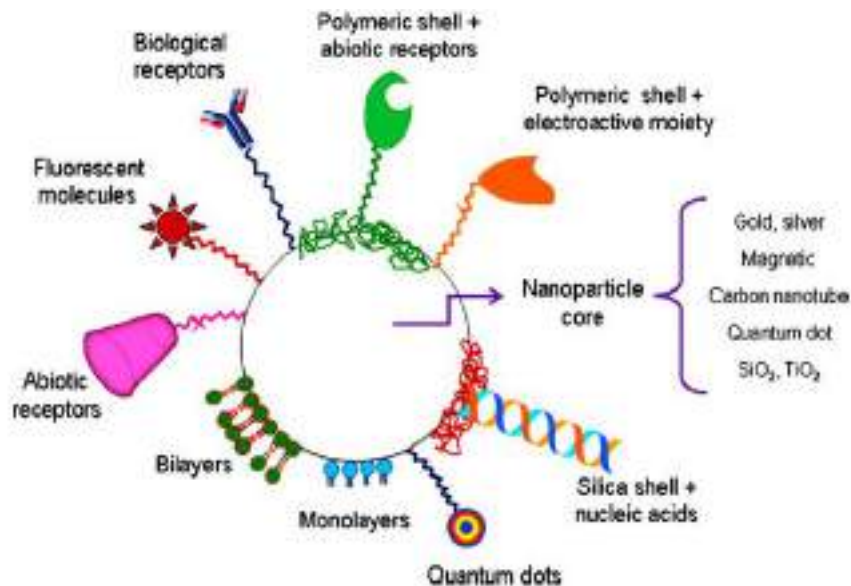


Figura 1.2 Multifuncionalidad de las nanopartículas (tomado de Simón de Dios, 2010).

El híbrido multifuncional entre diamante y oro fue definido por Tsai y colaboradores en 2015, como aquella nanoestructura formada por la unión de varias AuNPs a un FND (Tsai, 2015). Este concepto puede ser generalizado para definir a las nanopartículas híbridas oro-diamante (HGD) como aquellas que pueden obtenerse al unir nanopartículas de oro a la superficie de un nanodiamante de cualquier tipo.

En la actualidad son varias las investigaciones que se realizan usando HGDs en la búsqueda de nanoestructuras superiores, donde cada componente contribuya con sus propiedades y se obtengan nuevas funcionalidades. Los híbridos AuNPs-FND han sido usados para medir y elevar, al mismo tiempo, la temperatura de la célula (Tsai, 2015); también como sondas en estudios de fotoluminiscencia (Liu, 2011) y para mejorar las propiedades fotoacústicas de los centros NV (Zhang, 2012). En el caso de las AuNPs unidas a DND, sus aplicaciones actuales incluyen la producción de sistemas antioxidantes (Martin, 2010) y el uso en dispositivos optoelectrónicos (Sankaran, 2015).

En los estudios del cáncer, las MFNPs podrían proveer información estructural y metabólica específica sobre sitios de interacción para el desarrollo de tumores, a la vez que propiciarían la detección imagenológica. De esta manera, podría incluso realizarse la detección de metástasis ocultas (Azzazy, 2007). Además, estas nanopartículas pueden cargar agentes terapéuticos (drogas anticáncer, genes, etc.) y descargarlos en los tejidos enfermos de manera específica. Con el desarrollo en estas direcciones, la nanotecnología promete revolucionar el diagnóstico y el tratamiento del cáncer en los próximos años.

1.5 Principales técnicas empleadas para la caracterización de nanopartículas

La Dispersión Dinámica de la Luz (DLS en inglés) es una técnica muy usada para determinar el tamaño de nanopartículas en suspensión. Al hacer incidir sobre las partículas un haz de luz monocromático y coherente, como un láser, se observa una fluctuación en la luz dispersada dependiente del tiempo. Esta fluctuación es debida a que, en suspensión, las partículas pequeñas están bajo el movimiento browniano y dispersan la luz de manera cambiante. El perfil de las fluctuaciones en la intensidad de la dispersión estará relacionado con el tamaño de las partículas: mayores partículas tendrán un movimiento más lento, mientras que las menores tendrán más rapidez. Además de medir el tamaño, esta técnica puede brindar información sobre estabilidad, agregación, formación de complejos y conformación de las partículas (Hoo, 2008).

La Espectroscopía Infraroja por Transformada de Fourier (FTIR en inglés) es una técnica de caracterización de materiales que permite determinar los componentes (grupos o elementos químicos) presentes en una muestra. Al incidir radiación infraroja sobre un material, una parte de la radiación será absorbida y la otra parte será transmitida, pudiendo ser medida en un detector. La luz absorbida dependerá de las frecuencias vibracionales de los enlaces en las moléculas que componen el material. La radiación detectada será transformada mediante un método matemático (transformada de Fourier) para obtener un espectro distintivo de la muestra analizada. Con esta técnica es posible detectar también cambios en el material y su consistencia en diferentes momentos o al someterse a diferentes procedimientos (Tu, 2006).

Otro método comúnmente empleado para el estudio de las propiedades estructurales de un material es la Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM en inglés). Su aplicación requiere el paso de un haz de electrones a través de una muestra ultrafina del objeto en

estudio. Como resultado de esta interacción de los electrones con la muestra se genera una imagen que es magnificada y luego recogida por un dispositivo imagenológico. Se pueden obtener entonces evidencias de la forma y tamaño de la muestra, a la vez que se genera información sobre la red cristalina, material que la compone, etc. (Williams, 1996).

Cuando se estudian las propiedades ópticas de las partículas, es común realizar la medición de la absorción de luz y su emisión en aquellos casos en que esta ocurra. La formación de sistemas híbridos o conjugados de nanopartículas puede afectar la emisión de fluorescencia de sus componentes, pues la interacción entre estos podría conllevar a fenómenos de aumento o de apagado de la fluorescencia. Entre los mecanismos usados para detectar estos fenómenos se encuentran la Microscopía de Fluorescencia y la Espectroscopía de Fluorescencia. Mediante la primera se observan imágenes de la emisión de luz en las muestras cuando son iluminadas bajo un microscopio, mientras que la segunda detecta la fluorescencia emitida por una muestra que es excitada con un haz de luz. Este proceso tiene su fundamento físico en la capacidad de los electrones de un material de pasar de un estado basal a un estado excitado mediante la absorción de un fotón. Los electrones retornarán a su estado basal emitiendo energía a través de varios procesos, uno de los cuales es la emisión de otro fotón con menor energía (Guibault, 1990).

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) es el método de caracterización de superficies más ampliamente utilizado hoy en día. Un análisis básico de una superficie por XPS proporciona información cualitativa y cuantitativa de todos los elementos presentes (excepto H y He). La técnica consiste en hacer incidir un haz de rayos X sobre una muestra, detectando los electrones que son liberados. Con aplicaciones más sofisticadas de este procedimiento se obtienen informaciones detalladas de la química, organización y

morfología de la superficie; tales como el estado de oxidación, átomos enlazantes y orbitales moleculares (Hollander, 1970).

Referencias

- Aleksenskiy, A. E., Eydelman, E. D., Vul, A. Ya. 2011. Deagglomeration of Detonation Nanodiamonds. *Nanosci.Nanotechnol. Lett.* 3:68-74.
- Azzazy, H. M. E., Mansour, M. M. H., Kazmierczak, S. C. 2007. From diagnostics to therapy: Prospects of quantum dots. *Clin. Biochem.* 40: 917–927.
- Bao, G., Mitragotri, S., Tong, S. 2013. Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery and Molecular Imaging. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 15:253–82.
- Bao, J., Chen, W., Liu, T., Zhu, Y., Jin, P., Wang, L., Liu, J., Wei, Y., Li, Y. 2007. Bifunctional Au-Fe₃O₄ Nanoparticles for Protein Separation. *ACS Nano.* 1(4): 293–298.
- Byrne, J. D., Betancourt, T., Brannon-Peppas, L. 2008. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 60(15):1615–26.
- Cai, W., Gao, T., Hong, H., Sun, J. 2008. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 1: 17-32.
- Chang, Y. R., Lee, H. Y., Chen, K. 2008. Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds. *Nat. Nanotechnol.* 3(5):284–288.
- Chao, J. I., Perevedentseva, E., Chung, P. H. 2007. Nanometer-sized diamond particle as a probe for biolabeling. *Biophys J.* 93(6): 2199–2208.
- Chen, J., Wang, D., Xi, J., Au, L., Siekkinen, A., Warsen, A., Li, Z. Y., Zhang, H., Xia, Y., Li, Z. 2007. Immuno Gold Nanocages with Tailored Optical Properties for Targeted Photothermal Destruction of Cancer Cells. *Nano Lett.* 7(5): 1318–1322.
- Chen, M., Pierstorff, E. D., Lam, R., et al. 2009. Nanodiamond-mediated delivery of water-insoluble therapeutics. *ACS Nano.* 3(7):2016–2022.
- Chen, P. C., Mwakwari, S. C., Oyelere, A. K. 2008. Gold nanoparticles: From nanomedicine to nanosensing. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 1: 45–66.
- Choi, H. S., Liu, W., Misra, P. 2007. Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 25(10): 1165–70.
- Colpin, Y., Swan, A., Zvyagin, A. V., Plakhotnik, T. 2006. Imaging and sizing of diamond nanoparticles. *Opt. Lett.* 31(5):625–627.
- Davies, G., Lawson, S. C., Collins, A. T., Mainwood, A., Sharp, S. J. 1992. Vacancy-related centers in diamond. *Phys. Rev. B Condens. Matter.* 46(20): 13157-13170.
- Davis, M. E., Chen, Z., Shin, D. M. 2008. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 7(9):771–82.

- Diercks, A. H., Ozinsky, A., Hansen, C. L., Spotts, J. M., Rodriguez, D. J., Aderem, A. 2009. A microfluidic device for multiplexed protein detection in nanoliter Volumes. *Anal Biochem.* 386(1): 30–35.
- Dolmatov, V. Y. 2001. Detonation synthesis ultradispersed diamonds: properties and applications. *Russ. Chem. Rev.* 70(7):607-626.
- Dykman, L., Khlebtsov, N. 2012. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem. Soc. Rev.* 41: 2256–2282.
- El-Sayed, M. A. 2001. Some Interesting Properties of Metals Confined in Time and Nanometer Space of Different Shapes. *Accounts Chem. Res.* 34(4): 257-264.
- Faklaris, O., Joshi, V., Irinopoulou, T., Tauc, P., Girard, H., Gesset, C., Senour, M., Thorel, A., Arnault, J. Ch., Boudou, J. P., Curmi, P. A., Treussart, F. 2009. Photoluminescent diamond nanoparticles for cell labeling: study of the uptake mechanism in mammalian cells. *ACS Nano.* 3 (12): 3955-3962.
- Faklaris, O., Garrot, D., Joshi, V. 2008. Detection of single photoluminescent diamond nanoparticles in cells and study of the internalization pathway. *Small.* 4(12):2236–2239.
- Fu, C. C., Lee, H. Y., Chen, K., et al. 2007. Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(3):727–732.
- Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K., Rotello, V. M. 2008. Gold nanoparticles in delivery applications. *Ad. Drug Deliver. Rev.* 60: 1307-1315.
- Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Daniel, W. L., Massich, M. D., Patel, P. C., Mirkin, C. A. 2010. Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49: 3280-3294.
- Gracio, J. J., Fan, Q. H., Madaleno, J. C. 2010. Diamond growth by chemical vapour deposition. *J. Phys. D Appl. Phys.* 43:374017.
- Greish, K. 2007. Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: A royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *J. Drug Target.* 15(7-8):457–64.
- Guilbault, G. G. 1990. *Practical Fluorescence*, Second Edition, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N., Focella, T. M., Smilowitz, H. M. 2006. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *Br. J. Radiol.* 79(939):248–53.
- He, X., Wang, K., Tan, W., Li, J., Yang, X., Huang, S., Xiao, D. 2002. Photostable luminescent nanoparticles as biological label for cell recognition of system Lupus Erythematosus patients. *J. Nanosci. Nanotechno.* 2(3-4): 317-320.
- Hollander, J. M., William, L. J. 1970. X-ray photoelectron spectroscopy. *Acc. Chem. Res.* 3(6):193–200.

- Hoo, C. M., Starostin, N., West, P., Mecartney, M. L. 2008. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *J. Nanopart. Res.* 10:89-96.
- Hsin, Y. L., Chu, H.-Y., Jeng, Y.-R., Huang, Y.-H., Wang, M. H., Changa, Ch. K. 2011. In situ deagglomeration and surface functionalization of detonation nanodiamond, with the polymer used as an additive in lubricant oil. *J. Mater. Chem.* 21:13213-13222.
- Hu, K., Lan, D., Li, X., Zhang, S. 2008. Electrochemical DNA Biosensor Based on Nanoporous Gold Electrode and Multifunctional Encoded DNA-Au Bio Bar Codes. *Anal. Chem.* 80: 9124–9130.
- Huang, C.C., Yang, Z., Lee, K. H., Chang, H. T. 2007. Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoparticles for Sensing Mercury (II). *Angew. Chem. Int. Ed.* 46: 6824-6828.
- Huang, L. C., Chang, H. C. 2004. Adsorption and Immobilization of Cytochrome c on Nanodiamonds. *Langmuir.* 20: 5879-5884.
- Huang, X., El-Sayed, M. A. 2010. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J. Adv. Res.* 1:13–28.
- Huang, X, Jain, P. K., El-Sayed, I. H., El-Sayed, M. A. 2007. Gold nanoparticles: Interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomed.* 2(5): 681-693.
- Hui, Y. Y., Cheng, C. L., Chang, H. C. 2010. Nanodiamonds for optical bioimaging. *J Phys. D Appl. Phys.* 43(37):374021.
- Jaque, D., Martinez-Maestro, L., Del Rosal, B., Haro-Gonzalez, P., Benayas, A., Plaza, J. L. Martin-Rodriguez, E., Garcia-Sole, J. 2014. Nanoparticles for photothermal therapies. *Nanoscale.* 6: 9494.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. 2011. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin.* 61:69–90.
- Jia, F., Liu, X., Li, L., Mallapragada, S., Narasimhan, B., Wang, Q. 2013. Multifunctional nanoparticles for targeted delivery of immune activating and cancer therapeutic agents. *J. Control. Release.* 172: 1020–1034.
- Kaur, R., Badea, I. 2013. Nanodiamonds as novel nanomaterials for biomedical applications: drug delivery and imaging systems. *Int. J. Nanomed.* 8: 203-220.
- Keren, S., Zavaleta, C., Cheng, Z., de la Zerda, A., Gheysens, O., Gambhir, S. S. 2008. Noninvasive molecular imaging of small living subjects using Raman spectroscopy. *PNAS.* 105(15): 5844 –5849.
- Krueger, A. 2008. The structure and reactivity of nanoscale diamond. *J. Mater. Chem.* 18(13):1485-1492.
- Krueger, A., Boedeker, T. 2008. Deagglomeration and functionalisation of detonation nanodiamond with long alkyl chains. *Diam. Relat. Mater.* 17(7–10):1367–1370.

- Kruger, A., Kataoka, F., Ozawa, M., Fujino, T., Suzuki, Y., Aleksenskii, A. E., Vul, A. Ya., Osawa, E. 2005. Unusually tight aggregation in detonation nanodiamond: identification and disintegration. *Carbon*. 43(8): 1722-1730.
- Kulakova, I. I. 2004. Surface chemistry of nanodiamonds. *Physics of the Solid State*. 46(4): 636–643.
- Lanone, S., Boczkowski, J. 2006. Biomedical applications and potential health risks of nanomaterials molecular mechanisms. *Curr. Mol. Med.* 6(6):651–63.
- Lee, S., Chen, X. Y. 2009. Dual-modality probes for in vivo molecular imaging. *Mol. Imaging*. 8(2):87–100.
- Lewinski, N., Colvin, V., Drezek, R. 2008. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*. 4(1):26–49.
- Li, J., Zhu, Y., Li, W., Zhang, X., Peng, Y., Huang, Q. 2010. Nanodiamonds as intracellular transporters of chemotherapeutic drug. *Biomaterials*. 31(32):8410–8418.
- Li, X., Shao, J., Qin, Y., Shao, C., Zheng, T., Ye, L. 2011. TAT-conjugated nanodiamond for the enhanced delivery of doxorubicin. *J. Mater. Chem.* 21(22):7966–7973.
- Liang, C. H., Wang, C. C., Lin, Y. C., Chen, C. H., Wong, C. H., Wu, C. Y. 2009. Iron Oxide/Gold Core/Shell Nanoparticles for Ultrasensitive Detection of Carbohydrate-Protein Interactions. *Anal. Chem.* 81: 7750–7756.
- Liang, Z., Li, X., Xie, Y., Liu, S. 2014. ‘Smart’ gold nanoshells for combined cancer chemotherapy and hyperthermia. *Biomed. Mater.* 9:025012.
- Lin, Y. W., Liu, C. W., Chang, H. T. 2009. DNA functionalized gold nanoparticles for bioanalysis. *Anal. Methods*. 1: 14–24.
- Liu, B., Hu, X., Chai, J., Zhu, J., Yang, B., Li, Y. 2016. Application of nanodiamonds in Cu(II)-based rhodamine B probes for NO detection and cell imaging. *J. Mater. Chem. B*. 4: 3358.
- Liu, K. K., Wang, C. C., Cheng, C. L., Chao, J. I. 2009. Endocytic carboxylated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and differentiation in cancer and stem cells. *Biomaterials*. 30 (26), 4249-4259.
- Liu, K.-K., Cheng, Ch.-L., Chang, Ch.-Ch., Chao, J.-I. 2007. Biocompatible and detectable carboxylated nanodiamond on human cell. *Nanotechnology*. 18: 325102.
- Liu, K. K., Zheng, W. W., Wang, C. C. 2010. Covalent linkage of nanodiamond-paclitaxel for drug delivery and cancer therapy. *Nanotechnology*. 21(31):315106.
- Liu, Y., Gu, Z., Margrave, J. L., Khabashesku, V. N. 2004. Functionalization of nanoscale diamond powder: fluoro-, alkyl-, amino-, and amino acid-nanodiamond derivatives. *Chem. Mater.* 16(20):3924–3930.
- Liu, Y. L., Sun, K. W. 2011. Plasmon-enhanced photoluminescence from bioconjugated gold nanoparticle and nanodiamond assembly. *Appl. Phys. Lett.* 98: 153702.

- Longmire, M., Choyke, P. L., Kobayashi, H. 2008. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine-UK*. 3(5):703–17.
- Ma, X., Wu, Y., Jin, S., Tian, Y., Zhang, X., Zhao, Y., Yu, L., Liang, X. J. 2011. Gold Nanoparticles Induce Autophagosome Accumulation through Size-Dependent Nanoparticle Uptake and Lysosome Impairment. *ACS Nano*. 5(11): 8629-8639.
- Man, H. B., Ho, D. 2012. Diamond as a nanomedical agent for versatile applications in drug delivery, imaging, and sensing. *Phys. Status Solidi A*. 209(9): 1609-1618.
- Martin, R., Menchon, C., Apostolova, N., Victor, V. M., Alvaro, M., Herance, J. R., Garcia, H. 2010. Nano-Jewels in Biology. Gold and Platinum on Diamond Nanoparticles as Antioxidant Systems against Cellular Oxidative Stress. *ACS Nano*. 4(11): 6957-6965.
- Mohan, N., Chen, C. S., Hsieh, H. H., Wu, Y. C., Chang, H. C. 2010. In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans*. *Nano. Lett.* 10(9):3692–3699.
- Mochalin, V. N., Shenderova, O., Ho, D., Gogotsi, Y., 2012. The properties and applications of nanodiamonds. *Nat. Nanotechnol.* 7:11-23.
- Nam, J. M., Thaxton, C. C., Mirkin, C. A. 2003. Nanoparticles-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science*. 301: 1884-1886.
- Nune, S. K., Gunda, P., Thallapally, P. K., Lin, Y. Y., Forrest, M. L., Berkland, C. J. 2009. Nanoparticles for biomedical imaging. *Expert Opin. Drug Deliv.* 6(11): 1175–1194.
- Ozawa, M., Inaguma, M., Takahashi, M., Kataoka, F., Krüger, A., Osawa, E. 2007. Preparation and Behavior of Brownish, Clear Nanodiamond Colloids. *Adv. Mater.* 19: 1201-1206.
- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A. 2007. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*. 3(11):1941–9.
- Panatarotto, D., Prtidos, C. D., Hoebeke, J., Brown, F., Kramer, E., Briand, J. P., Muller, S., Prato, M., Bianco, A. 2003. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chem. Biol.* 10: 961-966.
- Pentecost, A., Gour, S., Mochalin, V., Knoke, I., Gogotsi, Y. 2010. Disaggregation of Nanodiamond Powders Using Salt- and Sugar-Assisted Milling. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2 (11): 3289-3294.
- Pierson, H. O. 1993. *Handbook of Carbon, Graphite, Diamond and Fullerenes*. Noyes Publications. New Jersey, USA.
- Qian, X., Zhou, X., Nie, S. 2008. Surface-Enhanced Raman Nanoparticle Beacons Based on Bioconjugated Gold Nanocrystals and Long Range Plasmonic Coupling. *J. Am. Chem. Soc.* 130(45): 14934-14935.

- Roux, S., Garcia, B., Bridot, J. L., Salome, M., Marquette, C., Lemelle, L., Gillet, P., Blum, L., Perriat, P., Tillement, O. 2005. Synthesis, Characterization of Dihydrolipoic Acid Capped Gold Nanoparticles, and Functionalization by the Electroluminescent Luminol. *Langmuir*. 21: 2526-2536.
- Saadeh, Y., Vyas, D. 2014. Nanorobotic Applications in Medicine: Current Proposals and Designs. *Am. J. Robot Surg.* 1(1): 4–11.
- Sankaran, K. J., Kunuku, S., Sundaravel, B., Hsieh, P. Y., Chen, H. C., Leou, K. C., Tai, N. H., Lin, I. N. 2015. Gold nanoparticle-ultrananocrystalline diamond hybrid structured materials for high-performance optoelectronic device applications. *Nanoscale*. 7: 4377.
- Schrand, A. M., Huang, H., Carlson, C. 2007. Are diamond nanoparticles cytotoxic? *J. Phys. Chem. B*. 111(1):2–7.
- Shi, B., Jin, Q., Chen, L., Auciello, O. 2009. Fundamentals of ultrananocrystalline diamond (UNCD) thin films as biomaterials for developmental biology: Embryonic fibroblasts growth on the surface of (UNCD) films. *Diam. Relat. Mater.* 18(2–3):596–600.
- Shi, C., Zhu, Y., Cerwinka, W. H., Zhau, H. E., Marshall, F. F., Simons, J. W., Nie, S., Chung, L. W. K. 2008. Quantum Dots: Emerging applications in urologic oncology. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 26: 86–92.
- Simón de Dios, A., Díaz-García, M. E. 2010. Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects. *Anal. Chim. Acta*. 666: 1–22.
- Smith, A. M., Duan, H. W., Mohs, A. M., Nie, S. M. 2008. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 60(11):1226–40.
- Smith, A. H., Robinson, E. M., Zhang, X. Q., Chow, E. K., Lin, Y., Osawa, E., Xi, J., Ho, D. 2011. Triggered release of therapeutic antibodies from nanodiamond complexes. *Nanoscale*. 3: 2844-2848.
- Smith, B. R., Niebert, M., Plakhotnik, T., Zvyagin, A. V. 2007. Transfection and imaging of diamond nanocrystals as scattering optical labels. *J. Lumin.* 127(1):260–263.
- Song, S., Liang, Z., Zhang, J., Wang, L., Li, G., Fan, C. 2009. Gold-Nanoparticle-Based Multicolor Nanobeacons for Sequence-Specific DNA Analysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48: 8670 –8674.
- Srinivasan, M., Rajabi, M., Mousa, S. A. 2015. Multifunctional Nanomaterials and Their Applications in Drug Delivery and Cancer Therapy. *Nanomaterials*. 5: 1690-1703.
- Tong, L., Zhao, Y., Huff, T. B., Hansen, M. N., Wei, A., Cheng, J. X. 2007. Gold Nanorods Mediate Tumor Cell Death by Compromising Membrane Integrity. *Adv. Mater.* 19: 3136–3141.
- Tsai, P. C., Chen, O. Y., Tzeng, Y. K., Hui, Y. Y., Guo, J. Y., Wu, C. C., Chang, M. S., Chang, H. C. 2015. Gold/diamond nanohybrids for quantum sensing applications. *EPJ Quantum Technology*. 2: 19.
- Tu, J. S., Perevedentseva, E., Chung, P. H., Cheng, C. L. 2006. Size-dependent surface CO stretching frequency investigations on nanodiamond Particles. *J. Chem. Phys.* 174713.

- Turkevich, J., Stevenson, P. C., Hillier, J. 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 11: 55-75.
- Vul, A., Shenderova, O. 2014. *Detonation Nanodiamonds: Science and Applications*. CRC Press. Boca Raton, Florida. P 281.
- Wee, T. L., Mau, Y. W., Fang, C. Y., Hsu, H. L., Han, C. C., Chang, H. C. 2009. Preparation and characterization of green fluorescent nanodiamonds for biological applications. *Diam. Relat. Mater.* 18(2-3):567-573.
- Weissleder, R. 2006. Molecular imaging in cancer. *Science*. 312(5777):1168-71.
- Weissleder, R., Kelly, K., Sun, E. Y. 2005. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules. *Nat. Biotechnol.* 23(11):1418-23.
- Weng, M. F., Chiang, S. Y., Wang, N. S., Niu, H. 2009. Fluorescent nanodiamonds for specifically targeted bioimaging: application to the interaction of transferrin with transferrin receptor. *Diam. Relat. Mater.* 18(2-3): 587-591.
- Williams, D. B., Carter, C. B. 1996. *Transmission Electron Microscopy A textbook for Materials Science*. Plenum Press.
- Wolfbeis, O. S. 2015. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chem. Soc. Rev.* 44: 4743.
- Xing, Y., Xiong, W., Zhu, L., Osawa, E., Hussin, S., Dai, L. 2011. DNA damage in embryonic stem cells caused by nanodiamonds. *ACS Nano*. 5(3): 2376-2384.
- Yang, W., Auciello, O., Butler, J. E. 2002. DNA-modified nanocrystalline diamond thin-films as stable, biologically active substrates. *Nat. Mater.* 1(4):253-257.
- Yong, K. T., Roy, I., Swihart, M. T., Prasad, P. N. 2009. Multifunctional Nanoparticles as Biocompatible Targeted Probes for Human Cancer Diagnosis and Therapy. *J. Mater. Chem.* 19: 4655-4672.
- Yu, S. B., Watson, A. D. 1999. Metal-based X-ray contrast media. *Chem. Rev.* 99(9):2353-77.
- Yu, S. J., Kang, M. W., Chang, H. C., Chen, K. M., Yu, Y. C. 2005. Bright fluorescent nanodiamonds: no photobleaching and low cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 127(50):17604-17605.
- Zhang, B., Fang, C. Y., Chang, C. C., Peterson, R., Maswadi, S., Glickman, R. D., Chang, H. C., Ye, J. Y. 2012. Photoacoustic emission from fluorescent nanodiamonds enhanced with gold nanoparticles. *Biomed. Opt. Express*. 3(7): 1664.
- Zhao, F. L., Gong, Z., Liang, S. D., Xu, N. S., Deng, S. Z., Chen, J., Wang, H. Z. 2004. Ultrafast optical emission of nanodiamond induced by laser excitation. *Appl. Phys. Lett.* 85(6): 9.

Zharov, V. P., Mercer, K. E., Galitovskaya, E. N., Smeltzer, M. S. 2006. Photothermal Nanotherapeutics and Nanodiagnostics for Selective Killing of Bacteria Targeted with Gold Nanoparticles. *Biophys. J.* 90: 619–627.

Zheng, G., Chen, J., Li, H., Glickson, J. D. 2005. Rerouting lipoprotein nanoparticles to selected alternate receptors for the targeted delivery of cancer diagnostic and therapeutic agents. *PNAS.* 102(49): 17757–17762.

Zhu, Y., Li, J., Li, W., Zhang, Y., Yang, X., Chen, N., Sun, Y., Zhao, Y., Fan, C., Huang, Q. 2012. The Biocompatibility of Nanodiamonds and Their Application in Drug De-livery Systems. *Theranostics.* 2(3):302-312.

CAPÍTULO 2: Fundamentos Físicos de la Investigación.

El objetivo general de la investigación de esta tesis está relacionado con modificaciones físico-químicas de nanopartículas de diamante y oro para la formación de nanoestructuras híbridas, con potencial uso en la biomedicina. Esta es una tarea multidisciplinaria de la transición de las ciencias naturales Física, Química y Biología a la llamada Nanociencia, la cual comprende el estudio, diseño, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia a nanoescala, donde la Física Cuántica juega el papel fundamental, en los estudios al nivel de átomos y moléculas.

2.1 Propiedades electrónicas de los sólidos: Oro y Diamante.

El carbono y el oro son elementos claves en la Física del Estado Sólido, que presentan estructura cristalina en su forma de materiales, pero con propiedades físicas diferentes, como es el caso de sus propiedades electrónicas. Para calcular las propiedades electrónicas de los materiales se resuelve la ecuación de Schrödinger para el sólido, sobre lo cual comentaremos a continuación.

En un sólido se encuentran dos grandes sistemas de partículas, los electrones y los iones que forman la red cristalina. Para encontrar la solución a la ecuación de Schrödinger en el sólido cristalino es necesario determinar las interacciones que se presentan en este tipo de sistema, es decir, el hamiltoniano. En el hamiltoniano se debe de incluir la energía cinética de los electrones \hat{H}_e^k y la energía cinética de los iones \hat{H}_I^k , además debemos conocer la interacción entre los electrones \hat{H}_{e-e}^{int} , la interacción entre iones \hat{H}_{I-I}^{int} y la interacción entre iones y electrones \hat{H}_{I-e}^{int} .

Así, el hamiltoniano toma la forma:

$$\hat{H} = \hat{H}_e^k + \hat{H}_I^k + \hat{H}_{e-e}^{int} + \hat{H}_{I-I}^{int} + \hat{H}_{I-e}^{int} \quad (2.1)$$

Este es un problema donde hay un gran número de ambos tipos de partículas (electrones e iones), donde existen interacciones entre partículas del mismo tipo y de diferentes tipos. La solución de la ecuación de Schrödinger no se puede obtener si no se utilizan algunos modelos físicos y aproximaciones, que permitan separar el hamiltoniano en dos hamiltonianos de partículas diferentes. Por lo tanto se han buscado alternativas para estudiar el sistema de forma aproximada, que simplifiquen el problema sin modificar su esencia. Enseguida describiremos algunos de los métodos y aproximaciones más comunes, entre los cuales abordaremos la aproximación de la masa efectiva para los electrones, que es de especial interés en este trabajo.

2.1.1 Aproximación de valencia.

La aproximación de valencia consiste principalmente en considerar solo las excitaciones de los electrones más externos o electrones de valencia del átomo, ya que en estos recaen la mayoría de las propiedades químicas y eléctricas (Betancourt 2013). Bajo estos argumentos el átomo puede considerarse compuesto por dos partes:

- 1) Los **electrones de valencia**, que son aquellos electrones correspondientes a las capas externas semi-llenas de los átomos, y son los responsables de casi todas las propiedades del material, entre ellas las químicas, ópticas, electrónicas, de transporte y estructurales, características de los sólidos (Yu 2010).
- 2) El **core**, el cual está formado por el núcleo y los electrones internos correspondientes a las capas completamente llenas, es decir, los orbitales más profundos y cercanos al

núcleo. Estos electrones están fuertemente ligados a los núcleos, y se distribuyen en torno a ellos de forma similar a como lo hacen en los átomos aislados. El núcleo, junto a estos electrones, forman los llamados iones de la red, lo que suele llamarse también como **corazón iónico** (Yu 2010).

Los electrones de valencia son susceptibles a las perturbaciones externas, ya sean campos eléctricos, magnéticos, temperatura, entre otras; y su densidad de carga varía considerablemente al estar débilmente ligados al núcleo atómico. Por el contrario, el corazón iónico se puede considerar casi insensible al entorno del átomo, pues sus electrones están fuertemente ligados al núcleo, por lo que su densidad electrónica prácticamente no varía.

2.1.2 Aproximación de Born-Oppenheimer.

La segunda aproximación que se requiere para la obtención de los estados electrónicos del sólido es llamada Aproximación de Born-Oppenheimer. Esta aproximación consiste en considerar el movimiento de los electrones por separado del movimiento de los núcleos, es decir desacoplar los grados de libertad electrónicos de los vibracionales de un sólido (Yu 2010). Los electrones y los iones están sometidos a fuerzas de igual magnitud, pero al ser la masa de los electrones mucho menor que la de los iones, las velocidades de movimiento de ambos son muy diferentes. Es por ello que podemos considerar que los electrones responden inmediatamente al movimiento de los iones; mientras que los iones van evolucionando conforme a un potencial de interacción con los electrones, que se obtiene resolviendo la correspondiente ecuación electrónica para diferentes configuraciones iónicas fijas (Foresman 1995). Esto significa que los electrones siempre “ven” al ión fijo en una sola posición, lo que se corresponde con la aproximación de Born-Oppenheimer de orden cero en teoría de perturbaciones, que es lo que se conoce como aproximación adiabática.

El operador hamiltoniano del sólido, ver ecuación (2.1), puede escribirse de la siguiente forma:

$$\hat{H} = \sum_l \left(-\frac{\hbar^2}{2M} \frac{\partial^2}{\partial \mathbf{R}_l^2} + \sum_{l < s} V_{l-l}(\mathbf{R}_l - \mathbf{R}_s) \right) + \sum_i \left(-\frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{\partial^2}{\partial \mathbf{r}_i^2} + \sum_{i < j} \frac{e^2}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} + \sum_l V_{l-e}(\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_l) \right) \quad (2.2)$$

En este caso \mathbf{R}_l es la posición del l -ésimo ión, con respecto a su posición de equilibrio, \mathbf{r}_i es la posición del i -ésimo electrón, M es la masa de los iones, y μ la masa de los electrones.

Este hamiltoniano puede ser considerado como la suma de dos hamiltonianos, un hamiltoniano para los iones y otro para los electrones; por esta razón la solución a la ecuación se puede representar como la multiplicación de dos funciones, una que represente a la solución para los electrones y otra que represente la solución para los iones, es decir

$$\Psi(\mathbf{R}, \mathbf{r}) = \psi(\mathbf{R}, \mathbf{r}) \phi(\mathbf{R})$$

De tal forma que $\psi(\mathbf{R}, \mathbf{r})$ satisface la ecuación de Schrödinger para los electrones en una red estática con el ión l -ésimo fijo en \mathbf{R}_l y $\phi(\mathbf{R})$ es una ecuación similar para los iones. Entonces la ecuación de Schrödinger toma la forma

$$\sum_i \left[-\frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{\partial^2}{\partial \mathbf{r}_i^2} + \sum_{ij} \frac{e^2}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} + \sum_{il} V_{l-e}(\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_l) \right] \psi(\mathbf{R}, \mathbf{r}) = \varepsilon_e(\mathbf{R}) \psi(\mathbf{R}, \mathbf{r}) \quad (2.3)$$

Analizando la parte izquierda de la ecuación (2.3), tenemos que:

$$\begin{aligned} \hat{H}\Psi &= -\sum_l \frac{\hbar^2}{2M} \frac{\partial^2}{\partial \mathbf{R}_l^2} \Psi + \varepsilon_e(\mathbf{R}) \Psi + \sum_{l < s} V_{l-l}(\mathbf{R}_l - \mathbf{R}_s) \Psi \\ &= \psi(\mathbf{R}, \mathbf{r}) \left\{ -\frac{\hbar^2}{2M} \frac{\partial^2}{\partial \mathbf{R}_l^2} + \varepsilon_e(\mathbf{R}) + \sum_{l < s} V_{l-l}(\mathbf{R}_l - \mathbf{R}_s) \right\} \phi(\mathbf{R}) + C(\mathbf{R}) \end{aligned}$$

donde

$$C(\mathbf{R}) = -\sum_l \frac{\hbar^2}{2M} \left\{ 2 \frac{\partial \phi}{\partial \mathbf{R}_l} \frac{\partial \psi}{\partial \mathbf{R}_l} + \phi \frac{\partial^2 \psi}{\partial \mathbf{R}_l^2} \right\}$$

Así el hamiltoniano para los electrones queda en forma reducida como:

$$\hat{H} = \hat{H}_e^k + \hat{H}_{e-e}^{\text{int}} + \hat{H}_{I-e}^{\text{int}}.$$

A pesar de todas las consideraciones la ecuación sigue sin ser separable, debido a que depende de todas las coordenadas de cada uno de los electrones de valencia, esto nos lleva a realizar otras aproximaciones.

2.1.3 Aproximación de Campo Medio o Aproximación Monoeléctronica.

Después de utilizar la aproximación de valencia y la aproximación adiabática, se puede dar otro paso para simplificar la ecuación Schrödinger que describe el sistema físico de los electrones e iones, es decir, del sólido. Éste consiste en representar la función de onda del sólido, como funciones de onda individuales para cada electrón; esto se logra utilizando el método de Hartree-Fock (Yu 2010, Foresman 1995).

La aproximación del Campo Medio consiste en cambiar la energía potencial de interacción

entre los electrones por un campo de energía potencial de la forma $\sum_{k=0}^n \tilde{U}(r_i)$, que representa la interacción del i -ésimo electrón con cierto potencial efectivo, donde cada electrón se mueve independientemente. Se debe considerar que el movimiento del i -ésimo electrón modifica el campo medio ya que es parte del mismo (Pavlov 1987). De esta manera el hamiltoniano no depende de la interacción entre los electrones y es la suma de los hamiltonianos de cada electrón por separado. Con esto tenemos que la solución a la ecuación de Schrödinger es un producto de las funciones onda monoeléctronicas, es decir, de la función de onda de cada electrón del sistema.

Por el principio de exclusión de Pauli, la función de onda tiene que cumplir la condición de ser anti-simétrica, es decir, la función de onda se puede escribir como un determinante Slater [33]:

$$\psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \psi_1(\mathbf{r}_1) & \psi_1(\mathbf{r}_2) & \dots & \psi_1(\mathbf{r}_N) \\ \psi_2(\mathbf{r}_1) & \psi_2(\mathbf{r}_2) & \dots & \psi_2(\mathbf{r}_N) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \psi_N(\mathbf{r}_1) & \psi_N(\mathbf{r}_2) & \dots & \psi_N(\mathbf{r}_N) \end{vmatrix}$$

donde N es el número total de electrones y \mathbf{r}_i representa las tres coordenadas y el espín de cada electrón. Este determinante cumple con que la función de onda sea anti-simétrica respecto a la permutación de dos partículas cualesquiera. Si se buscan variacionalmente las funciones de onda monoeléctricas de manera que se minimice el valor medio de la energía se obtienen las llamadas ecuaciones de Hartree-Fock. Estas ecuaciones se pueden resolver directamente y sirven de base para un conjunto de métodos numéricos que se agrupan bajo el nombre de química cuántica (Betancourt 2013, Levine 2000).

2.1.4 Aproximación de la Masa Efectiva.

Con la aproximación de la Masa Efectiva se obtienen ecuaciones de gran utilidad para estudiar los estados que se presentan energéticamente en los límites de la banda de conducción, ya que son ecuaciones relativamente sencillas pero cualitativamente correctas, que permite un análisis bastante completo de la física del sólido (Luttinger 1955). Entonces tenemos que en un cristal la ecuación de Schrödinger monoeléctrica toma la forma:

$$\hat{H}\psi(\mathbf{r}) = \left(\frac{\hat{\mathbf{p}}^2}{2\mu_0} + V(\mathbf{r}) \right) \psi = E\psi(\mathbf{r}) \quad (2.4)$$

donde μ_0 es la masa del electrón libre, $V(\mathbf{r})$ es el potencial periódico de la red cristalina y $\hat{\mathbf{p}}$ es el operador de momento. El conmutador del hamiltoniano con el operador de traslación es cero, $[\hat{H}, \hat{T}] = 0$, esto es debido a que el hamiltoniano es invariante ante traslaciones en la red, lo que hace de \mathbf{k} un buen número cuántico. Así podemos escoger autofunciones del hamiltoniano y del operador de traslación \hat{T}_d simultáneamente.

$$\hat{T}_d \psi_k(\mathbf{r}) = \psi(\mathbf{r} + \mathbf{d}) = e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{d}} \psi_k(\mathbf{r})$$

El teorema de Bloch permite escribir la función de onda electrónica de un cristal infinito como producto de una función periódica $u_{nk}(\mathbf{r})$ definida en la celda unidad del cristal, denominada función de Bloch, por una función envolvente $e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}}$ que cambia lentamente en la estructura.

$$\psi_{nk}(\mathbf{r}) = e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}} u_{nk}(\mathbf{r}) \quad (2.5)$$

Así la función de onda queda matemáticamente compuesta por un producto de una onda plana $e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}}$ que es modulada por una función $u_{nk}(\mathbf{r})$ en la celda unidad, con la cual se puede describir las perturbaciones de la red sobre los electrones libres en el sólido cristalino.

Sustituyendo (2.5) en (2.4), tenemos:

$$\left\{ \frac{\hat{\mathbf{p}}^2}{2\mu_0} + \frac{\hbar}{2\mu_0} \mathbf{k} \cdot \hat{\mathbf{p}} + \frac{\hbar^2 k^2}{2\mu_0} + V(\mathbf{r}) \right\} u_{nk}(\mathbf{r}) = E_n(\mathbf{k}) u_{nk}(\mathbf{r}) \quad (2.6)$$

ahora

$$\hat{H}_{\mathbf{k}_0, \mathbf{p}} = \frac{\hat{\mathbf{p}}^2}{2\mu_0} + \frac{\hbar}{2\mu_0} \mathbf{k}_0 \cdot \hat{\mathbf{p}} + \frac{\hbar^2 k^2}{2\mu_0} + V(\mathbf{r})$$

es conocido como el hamiltoniano $\mathbf{k} \cdot \hat{\mathbf{p}}$, el cual describe la función de onda de un electrón libre en un cristal tridimensional infinito. Para un \mathbf{k} dado, el conjunto de todas las $u_{n\mathbf{k}}(\mathbf{r})$ es completo para funciones con la periodicidad del cristal. Por lo tanto, si tomamos $\mathbf{k} = \mathbf{k}_0$, la función de onda para cualquier \mathbf{k} puede expresarse en términos de $u_{n\mathbf{k}_0}(\mathbf{r})$.

$$u_{n\mathbf{k}}(\mathbf{r}) = \sum_n C_{n'n}(\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) u_{n'\mathbf{k}_0}(\mathbf{r})$$

La ecuación (2.6) puede reescribirse como sigue:

$$\left\{ \hat{\mathbf{H}}_{\mathbf{k}_0, \mathbf{p}} + \frac{\hbar}{\mu_0} (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) \cdot \hat{\mathbf{p}} + \frac{\hbar^2}{2\mu_0} (\mathbf{k}^2 - \mathbf{k}_0^2) \right\} u_{n\mathbf{k}}(\mathbf{r}) = E_n(\mathbf{k}) u_{n\mathbf{k}}(\mathbf{r})$$

A partir de la cual se obtiene una ecuación de autovalores para la energía si multiplicamos por $u_{n\mathbf{k}}^*(\mathbf{r})$ e integramos en el volumen de la celda unitaria, entonces

$$\sum_{n'} \left[\left\{ E_n(\mathbf{k}_0) + \frac{\hbar}{2\mu_0} (\mathbf{k}^2 - \mathbf{k}_0^2) \right\} \delta_{nn'} + \frac{\hbar}{\mu_0} (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) \cdot \mathbf{p}_{nn'} \right] c_{nn'} = E_n(\mathbf{k}) \quad (2.7)$$

donde

$$\mathbf{p}_{nn'} = \int u_{n\mathbf{k}_0}^*(\mathbf{r}) \mathbf{p} u_{n'\mathbf{k}_0}(\mathbf{r}) d\mathbf{r}.$$

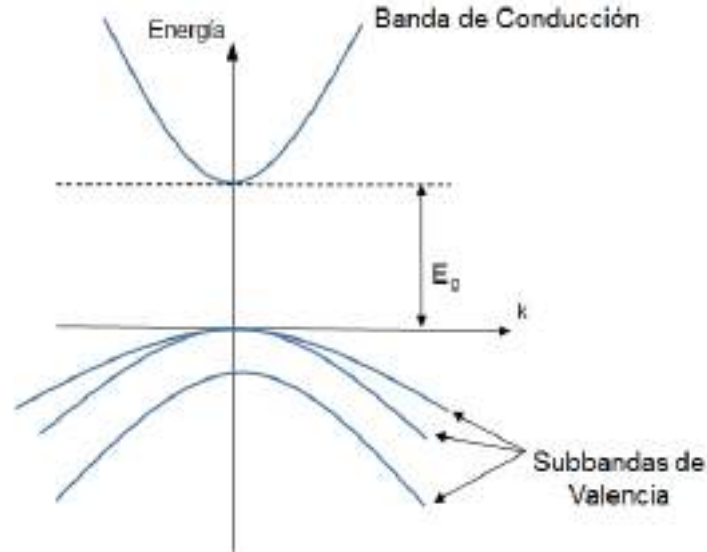


Figura 2.1. Representación esquemática de la estructura de banda de un semiconductor de *gap* directo en las proximidades del punto Γ de la zona de Brillouin.

Para un semiconductor de *gap* directo, la diagonalización del hamiltoniano $\mathbf{k} \cdot \hat{\mathbf{p}}$, proporciona la distribución de los niveles energéticos en los alrededores del centro de la zona de Brillouin (punto Γ , $\mathbf{k} = 0$), como se ilustra en la **Figura 2.1**. Dicha distribución muestra la división de las bandas de energía, etiquetadas por el número cuántico n , donde aparecen regiones de energía prohibida o *gaps*, inducidas por el potencial periódico del sistema. La banda de conducción se forma como una combinación de orbitales atómicos de tipo s y por tanto, al contrario que la banda de valencia, está constituida por una única sub-banda (doblemente degenerada si se consideran los grados de libertad del espín), separada de la banda de valencia por una cantidad de energía ε_g . Cuando ε_g es lo suficientemente grande, para apreciar la separación de la banda de valencia y la de conducción, el hamiltoniano $\mathbf{k} \cdot \hat{\mathbf{p}}$ puede ser aproximado a un hamiltoniano de una sola banda (Betancourt 2013).

Sabemos que los autovalores de una cantidad física en general forman una matriz con todos los posibles resultados, para la ecuación (2.7) se obtienen elementos fuera de la diagonal que

vuelven un poco complicado el análisis físico, pero cuando el valor $\mathbf{k} \cong \mathbf{k}_0$ los elementos fuera de la diagonal son pequeños:

$$\frac{\hbar}{\mu_0} (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) \cdot \hat{\mathbf{p}}_{mn}$$

y entonces pueden tratarse como una perturbación del hamiltoniano $\hat{H}_{\mathbf{k}_0, \mathbf{p}}$. Para el caso de una sola banda se usa la teoría de perturbaciones hasta segundo orden, teniendo como resultado que la ecuación de autovalores (2.7) quede como sigue:

$$E_n(\mathbf{k}) = E_n(\mathbf{k}_0) + \frac{\hbar}{\mu_0} (\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) \cdot \hat{\mathbf{p}}_{nn} + \frac{\hbar^2}{2\mu_0} (k^2 - k_0^2) + \frac{\hbar^2}{\mu_0^2} \sum_{n'} \frac{|(\mathbf{k} - \mathbf{k}_0) \cdot \hat{\mathbf{p}}_{nn'}|^2}{E_n(\mathbf{k}_0) - E_{n'}(\mathbf{k}_0)}$$

Esta ecuación es válida en el entorno de \mathbf{k}_0 , por lo regular \mathbf{k}_0 es un extremo de la banda, lo que implica que el término lineal, $\mathbf{k} - \mathbf{k}_0 = 0$.

Así utilizando los ejes principales tenemos que la energía de una partícula es:

$$E_n(\mathbf{k}) = E_n(\mathbf{k}_0) + \frac{\hbar^2}{2} \sum_{i=1}^3 \frac{(\mathbf{k}_i - \mathbf{k}_{0i})^2}{\mu_i^*} \quad (2.8)$$

aquí

$$\frac{1}{\mu_i^*} = \frac{1}{\mu_0} + \frac{2}{\mu_0^2} \sum_{n'} \frac{|\mathbf{u}_i \cdot \mathbf{P}_{nn'}|^2}{E_n(\mathbf{k}_0) - E_{n'}(\mathbf{k}_0)}$$

donde μ_i^* son las llamadas masas efectivas en las direcciones de simetría y \mathbf{u}_i son los vectores de dichas direcciones. Cuando el sistema físico es isótropo las masas efectivas son iguales en cualquier dirección, con esto la ecuación (2.8) se reduce a:

$$E_n(\mathbf{k}) = E_n(\mathbf{k}_0) + \frac{\hbar^2}{2} \frac{(\mathbf{k} - \mathbf{k}_0)^2}{\mu^*}$$

que representa la energía de una partícula libre de masa μ^* . Este modelo muestra que la interacción de un electrón con el potencial cristalino es equivalente a un cambio de masa de la partícula.

En el caso de un electrón la energía tiene la siguiente relación de dispersión:

$$E(k) = \frac{\hbar^2}{2\mu^*} k^2$$

Donde se puede deducir que μ^* es la nueva masa del electrón, bajo la acción de un potencial constante, y está determinada por la curvatura de la relación de dispersión,

$$\frac{1}{\mu^*} = \frac{1}{\hbar^2} \frac{\partial^2 E(\mathbf{k})}{\partial \mathbf{k}^2}$$

La masa reducida en general es un tensor de segundo rango, y los valores del vector de onda \mathbf{k} son distintos para cada dirección, esto es debido a que la masa reducida en general es anisótropa. Así, la respuesta de un electrón frente a un potencial cristalino es una respuesta dinámica.

El análisis anterior se realizó utilizando un método perturbativo por lo que este modelo solo funciona para valores cercanos a $\mathbf{k} = 0$, si consideramos valores mayores la aproximación parabólica para $E(\mathbf{k})$ deja de ser cierta, por lo tanto la masa efectiva deja de ser una constante. De esta forma, la aproximación de la función envolvente no es un método general. Fundamentalmente, su rango de aplicación se restringe a la vecindad de puntos de alta simetría como Γ , X y otros de la Zona de Brillouin. Este modelo es relativamente sencillo comparado con otros, pero ha resultado ser de gran utilidad para el cálculo de propiedades físicas con una adecuada precisión; para este trabajo resulta de gran interés ya que es la aproximación utilizada para encontrar los valores de energía de nuestro sistema cuántico.

Según las propiedades electrónicas de los materiales podemos clasificar los sólidos cristalinos en tres tipos: metales, semiconductores y aislantes (**Figura 2.2**).

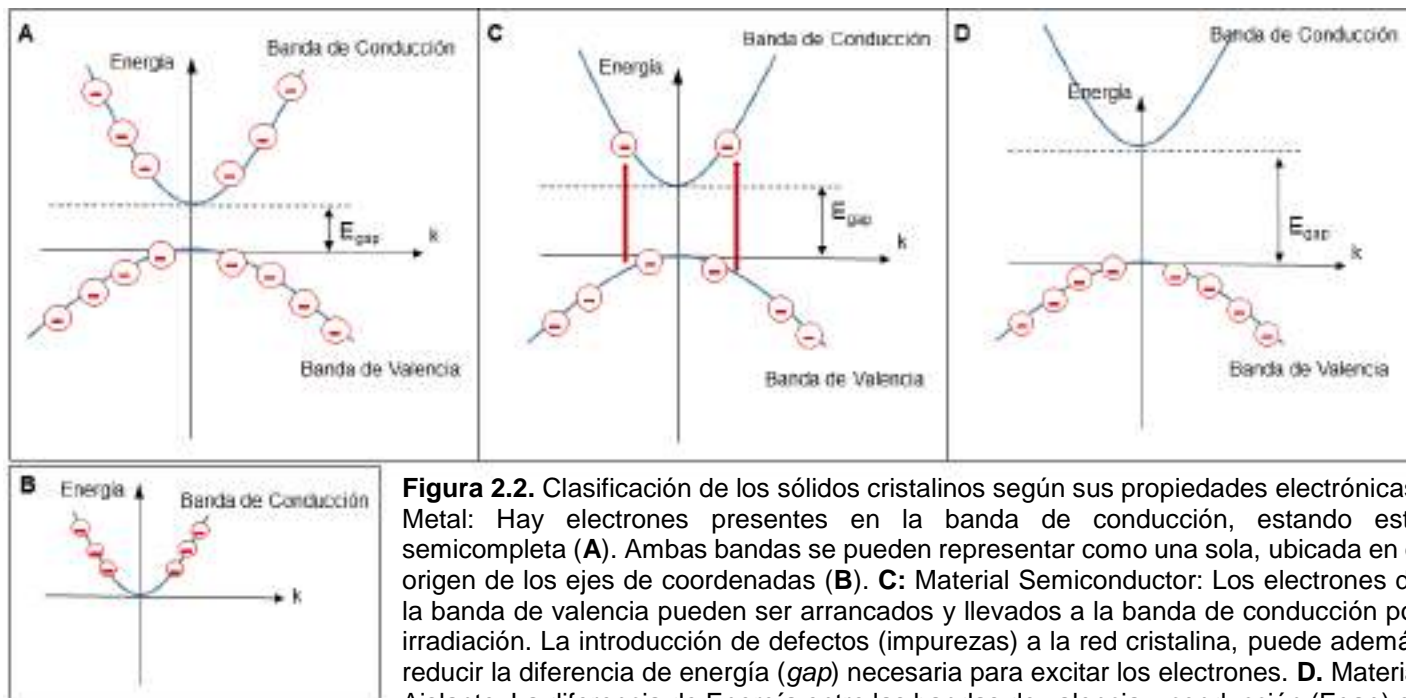


Figura 2.2. Clasificación de los sólidos cristalinos según sus propiedades electrónicas. Metal: Hay electrones presentes en la banda de conducción, estando esta semicompleta (**A**). Ambas bandas se pueden representar como una sola, ubicada en el origen de los ejes de coordenadas (**B**). **C:** Material Semiconductor: Los electrones de la banda de valencia pueden ser arrancados y llevados a la banda de conducción por irradiación. La introducción de defectos (impurezas) a la red cristalina, puede además reducir la diferencia de energía (*gap*) necesaria para excitar los electrones. **D.** Material Aislante: La diferencia de Energía entre las bandas de valencia y conducción (E_{gap}) es tanta que no se permite el paso de electrones de una a la otra.

El oro es un sólido metálico donde la banda de valencia está totalmente llena y la de conducción parcialmente llena, en este caso se dice semicompleta. Por lo tanto, todos los fenómenos físicos estarán relacionados solo con la banda de conducción, por lo que es común considerar esquemáticamente, en el diagrama de bandas, una sola banda centrada en el origen de coordenadas, tal como indica la **Figura 2.2B**. El oro metálico no presenta propiedades ópticas en su estado tridimensional ya que tiene una sola banda y, considerando en la aproximación de ondas largas que el fotón tiene momento $k=0$, no pueden existir transiciones verticales que conservan el momento. Cuando está en forma de nanopartículas, las bandas se encuentran bajo el efecto cuántico y se desdoblán en sub-bandas. De manera que, ante la presencia de un campo eléctrico, la nube de los electrones que se encuentran en la banda de

conducción oscila colectivamente de una manera coherente, y a la cuantificación de estas oscilaciones como un todo se le denomina plasmón (Sapsford 2013).

El diamante es un alótropo del carbono que se diferencia de las demás formas alotrópicas por poseer una hibridación sp^3 . Como resultado de resolver la ecuación de Schrödinger para este material, su estructura de bandas electrónicas lo ubica entre los semiconductores; encontrándose la banda de valencia completamente llena y la de conducción completamente vacía, separadas por un gap de 5.3 a 5.4 eV. Por lo tanto, si se quieren utilizar las propiedades electrónicas del diamante, deben introducirse los portadores de cargas por vía extrínseca, o sea impurezas, o por vía intrínseca: mediante la radiación de alta frecuencia. De forma natural se usa para el estudio de propiedades ópticas introduciendo defectos (como los centros NV), o en sistemas de baja dimensionalidad, confinado o como una nanoestructura.

2.1.5 Sistema de baja dimensionalidad: Confinado o nanoestructura.

Los sistemas confinados son sistemas creados artificialmente donde una o todas las dimensiones se reducen a dimensiones mesoscópicas o del orden del nanómetro. Todo sistema de partícula cuántica siente el efecto de tamaño cuántico en la dirección de confinamiento; es decir, la energía aumenta y las bandas se desdoblán en un sub-sistema de bandas por encima de la banda de energía original. Las nanopartículas son diferentes a los llamados sistemas confinados, pero al ser de dimensiones de los nanómetros también presentan el efecto de tamaño cuántico y por lo tanto nanopartículas y sistemas confinados se consideran nanoestructuras cuánticas.

La física del estado sólido es fundamental para el estudio de las nanoestructuras cristalinas de diferente dimensionalidad y simetría, como es el caso de sistemas construidos a capas: los pozos cuánticos, los pozos cuánticos múltiples, las superredes, etcétera. El estudio de estos

tipos de sistemas ocupa gran parte de la investigación de las nanoestructuras, para entender y mejorar las propiedades ópticas y electrónicas de estos materiales. Para llevar a cabo el análisis teórico, con el fin de estudiar las propiedades físicas de sistemas de efecto de tamaño cuántico, debemos resolver la ecuación de Schrödinger con el objetivo de obtener la función de onda y sus energías asociadas.

Las nanoestructuras son consideradas sistemas dinámicos debido a que son sólidos que siempre están sometidos a un potencial de barrera o de confinamiento, el cual puede lograrse mediante campos magnéticos o creciendo estructuras cuyas distintas regiones sean de materiales diferentes. Para su estudio se utiliza entonces el formalismo de la aproximación de la función envolvente o aproximación de la masa efectiva.

Con el paso del tiempo, debido a la necesidad de mejores dispositivos electrónicos, fueron diseñados nuevos semiconductores, con el fin de poder manipular las propiedades optoelectrónicas que anteriormente no se podían: el gap, la estructura de bandas, las masas efectivas de los portadores carga, etcétera. Un ejemplo es el GaAs, un semiconductor que tiene las mejores cualidades del Germanio y el Silicio.

Así, con estos nuevos semiconductores, los dispositivos electrónicos mejoraron en calidad, eficiencia y potencia de funcionamiento, además de ser más pequeños, del orden de las micras (10^{-6} m). Pero aún con estas dimensiones el comportamiento de las partículas involucradas en los dispositivos, como los electrones y fonones, no muestran cambios por el efecto del tamaño, ya que la longitud de onda del electrón puede considerarse infinitamente

pequeña, comparada con las dimensiones de una caja donde cada uno de sus lados son del orden de las micras.

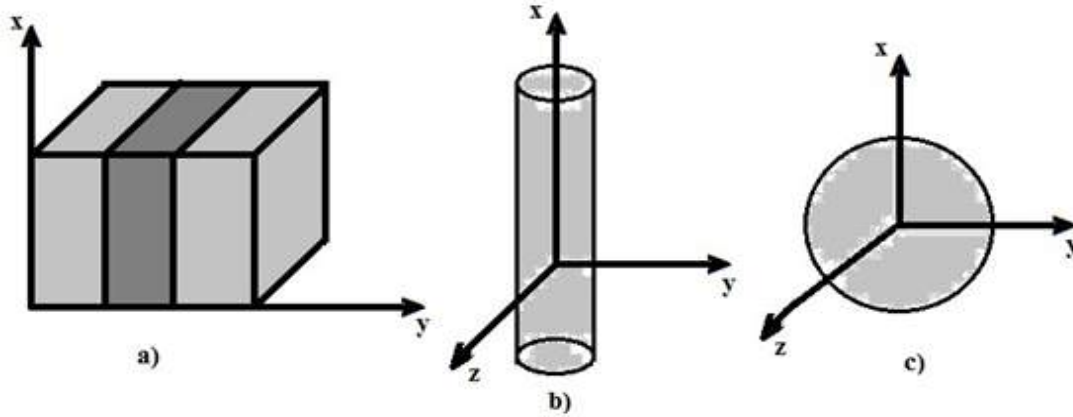


Figura 2.3. Representación esquemática de los sistemas confinados, a) QW, b) QWW y c) QD de simetría esférica (tomado de Marín 2001).

En las últimas décadas se desarrollaron los sistemas nanoestructurados que son sistemas confinados en una, dos o tres dimensiones, con tamaño reducido del orden de los nanómetros. Los sistemas con una dimensión espacial confinada y dos libres se denominan cuasi-bidimensionales (Q2D), luego con dos direcciones confinadas y una libre cuasi-unidimensionales (Q1D) y con las tres dimensiones confinadas y cero libre cuasi-cerodimensionales (Q0D). El número de dimensiones confinadas del sistema afecta fuertemente las propiedades de las cuasi-partículas (electrones, huecos, excitones, polarones, polaritones, fonones, etc) en los semiconductores. La geometría del sistema confinado también afecta las propiedades físicas que presentan las partículas y cuasi-partículas, como son las propiedades ópticas determinadas por las reglas de transición.

La clasificación de los sistemas (**Figura 2.3**) no sólo está dada por el número de direcciones confinadas, sino también por la forma o simetría de la región resultante, como son los casos del pozo cuántico (QW, del inglés *Quantum Well*), hilo o alambre cuántico (QWW, del

inglés *Quantum Well Wire*), y puntos cuánticos (QD, del inglés *Quantum Dot*) (Harrison 2005).

En los pozos cuánticos el confinamiento del movimiento de las partículas se da en una dirección, de tal forma que su movimiento se hace cuasi-bidimensional teniéndose dos direcciones para el movimiento libre; para el alambre cuántico se confinan las partículas en dos direcciones, teniéndose sólo una dirección de movimiento libre, es decir, el movimiento sería cuasi-unidimensional, y en los puntos cuánticos se confinan las tres direcciones, por lo que la partícula no puede moverse libremente, siendo cuasi-cerodimensional (Betancourt 2011, Harrison 2001).

Los sistemas cuasi-bidimensionales, también llamados de estructuras en capas, fueron los primeros sistemas estudiados y son construidos con heteroestructuras de diferentes materiales (principalmente de semiconductores polares). Los cuatro tipos de sistemas cuasi-bidimensionales más estudiados son: las heteroestructuras simples, SH, las heteroestructuras dobles QW, las heteroestructuras múltiples MQW (súper-pozos) y las superredes SL (Basu 2005).

Los materiales más utilizados para la producción de nanoestructuras son, en primer lugar, los semiconductores y los metales, y en segundo lugar, los compuestos dieléctricos, magnéticos y superconductores. En nuestra investigación trabajamos con nanopartículas de oro para aprovechar las propiedades ópticas de los plasmones bajo el efecto de tamaño cuántico. Por otro lado, trabajamos también con dos tipos de nanodiamantes según sus propiedades ópticas: nanodiamantes fluorescentes y no fluorescentes.

2.1.6 Estructura electrónica de los centros NV en el diamante.

Los centros NV en el diamante, consisten de una vacancia de carbono y una impureza de nitrógeno, además exhiben dos configuraciones electrónicas la NV^0 y la NV^- . Los centros NV^0 del diamante consisten de una vacancia de carbono y una impureza de nitrógeno, el cual tiene cinco electrones de valencia (por estar en el grupo V de la tabla periódica); tres de ellos se comparten con los tres átomos de carbono más próximos y los otros dos se posicionan en la dirección de la vacancia. Por lo tanto, en la periferia de la vacancia existen tres enlaces insatisfechos; debido a los carbonos que rodean a la vacancia (**Figura 2.4**) (Bradac 2011).

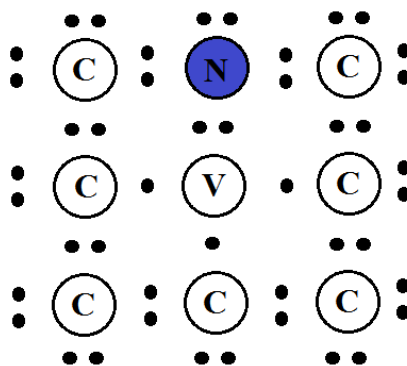


Figura 2.4. Representación esquemática en dos dimensiones, de la configuración atómica de un centro NV^0 , en la que podemos observar que de los átomos de carbono (círculos marcados con C), uno ha sido sustituido por un átomo de nitrógeno (color azul), el cual capta una vacancia (marcada con V) quedando con cinco electrones (puntos negros) en dirección hacia ella.

Por otro lado, los enlaces C—C que conforman al diamante, presentan una hibridación de tipo sp^3 lo cual queda demostrado por la estructura tetraédrica del diamante, por lo tanto el enlace N—C debe de presentar el mismo tipo de hibridación que el enlace C—C, así pues se tiene que el carbono tiene cuatro orbitales semi-llenos, pero tres de ellos son completados con los tres enlaces covalentes que forma con el resto de los carbonos de la red; y el nitrógeno tiene tres orbitales semi-llenos y uno lleno, pero sus tres orbitales semi-llenos son completados con los tres enlaces covalentes que forma con el resto de los carbonos de la red.

Como se puede observar en la **Figura 2.4**, el nitrógeno orienta su orbital lleno hacia la vacancia, así como los tres carbonos circundantes orientan sus orbitales semi-llenos; entonces es factible afirmar que energéticamente es posible tener un espín total, S de $3/2$ ó $1/2$ solamente, ya que para lograr un espín total de $5/2$, sería necesario que el nitrógeno no tuviera apareados los dos electrones que apuntan hacia la vacancia.

En los centros NV^- , el nitrógeno tiene cinco electrones de valencia; tres de ellos se comparten con los tres átomos de carbono más próximos y los otros dos se posicionan en la dirección de la vacancia. Los tres electrones de los carbonos de la periferia de la vacancia, se orientan hacia ella, más uno extra que es capturado desde el bulk (cedido por alguna impureza donadora, circundante al defecto), el cual se posiciona en la vacancia. Es decir, la configuración atómica del centro NV^- es idéntica a la del centro NV^0 solo con la diferencia que tiene seis electrones (**Figura 5**) (Weber 2010).

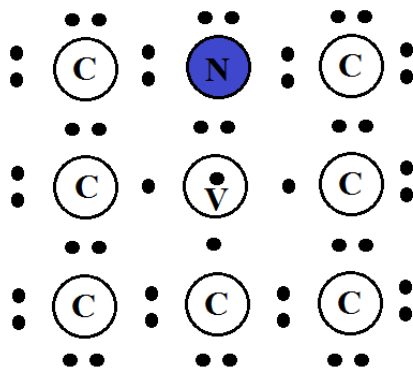


Figura 2.5. Representación esquemática en dos dimensiones, de la configuración atómica de un centro NV^- (donde los círculos marcados con C simulan a los carbonos de la red cristalina), en la que se puede observar que un sexto electrón se ha posicionado en el centro de la vacancia (marcada con V).

Como ya mencionamos anteriormente, el nitrógeno orientará su orbital lleno hacia la vacancia, los enlaces insatisfechos de los carbonos se orientaran hacia la vacancia, y probablemente el electrón extra sea empujado hacia alguno de los carbonos circundantes por

efecto de los dos electrones del orbital lleno del nitrógeno; lo cual muy probablemente daría lugar al apareamiento del electrón de dicho carbono, por lo tanto, es factible que el sistema presente un $S=1$ ó $S=0$ para el caso en el cual los dos electrones de los carbonos circundantes tengan momentos de espín antiparalelos.

2.1.7 Caracterización Experimental.

Experimentalmente los centros NV en diamante son caracterizados por las técnicas de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR, por sus siglas en inglés) o también llamada Resonancia de Espín Electrónico (ESR, por sus siglas en inglés) y la señal de Fluorescencia que emite cuando se relaja de un estado excitado a un estado base.

En el centro NV^0 ha sido detectada una línea de fonón cero (ZPL, por sus siglas en inglés) de 2.156 eV (575nm), la cual se ha asociado con una transición óptica entre los dobletes de espín base (simetría 2E) y excitado (simetría 2A) del estado $S=1/2$, aunque hasta el momento no se ha detectado ninguna señal de EPR en los estados doblete 2E y 2A . Esto se debe posiblemente a la interferencia de algún otro defecto paramagnético que no permite observar la señal en el espectro EPR, pero lo más probable es que sea por la distorsión dinámica del efecto Jahn-Teller (Felton 2008), que provoca el ensanchamiento de las líneas del EPR lo suficiente, como para evitar la detección.

De acuerdo con los estudios de Felton en 2008, para poder obtener señal de resonancia paramagnética del estado $S=3/2$ por EPR es necesario la utilización de iluminación continua, lo cual lleva a concluir que se trata del estado excitado (simetría 4A_2) del centro NV^0 , el cual está formado por un multiplete de dos dobletes, uno superior $m_s=\pm 3/2$ y otro inferior superior $m_s=\pm 1/2$ (**Figura 2.6**), entre los cuales existe una resonancia de ~ 1.685 GHz. Se puede concluir que el estado doblete del centro se debe al estado de espín $S=1/2$ y el estado

multiplete se debe al estado de espín $S=3/2$, entonces, para poder acceder del estado de espín $S=1/2$ al $S=3/2$ es necesaria una transición no radiativa, lo cual se comprueba en el

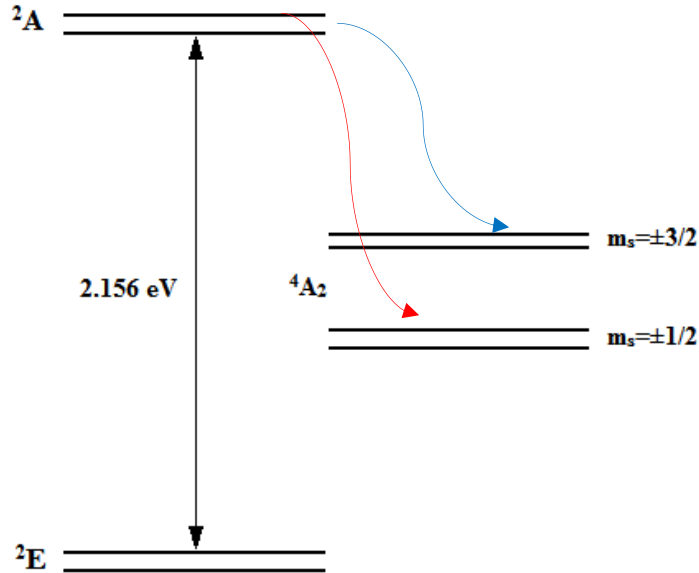


Figura 2.6. Representación esquemática de la estructura de espín de los centros NV^0 , en la cual se pueden observar las transiciones radiativas (indicadas con flechas negras sólidas) y las no radiativas (la más probable indicada con flecha ondulada roja y la menos probable indicada con flecha ondulada azul) entre sus distintos niveles de espín.

experimento al polarizar al sistema en el nivel $m_s=\pm 1/2$ en el estado 2A para posteriormente poblar los niveles $m_s=\pm 1/2$ (con mayor probabilidad) y $m_s=\pm 3/2$ (con menor probabilidad).

En el centro NV^- existe una transición óptica con conservación del espín ($\Delta m_s=0$, debido a las reglas de selección presentes en el sistema) desde el estado triplete de espín base (simetría 3A_2) al estado triplete de espín excitado (simetría 3E), dicha transición presenta una ZPL de 1.945 eV (637 nm) (**Figura 2.7**), con un estado triplete con señal de resonancia de ~ 2.88 GHz entre los niveles $m_s=0$ y $m_s=\pm 1$ en el estado 3A_2 (Bradac 2011). Además, se encontró un meta-estado a través del cual se llevan a cabo transiciones no radiativas desde el estado 3E al estado 3A_2 , con una ZPL adicional de 1.185 eV (1046 nm) en el infrarrojo (IR). Este

fenómeno fue asociado a la transición entre los singletes de espín base (simetría 1E) y excitado (simetría 1A_1) que conforman al meta-estado intermedio (Doherty 2013).

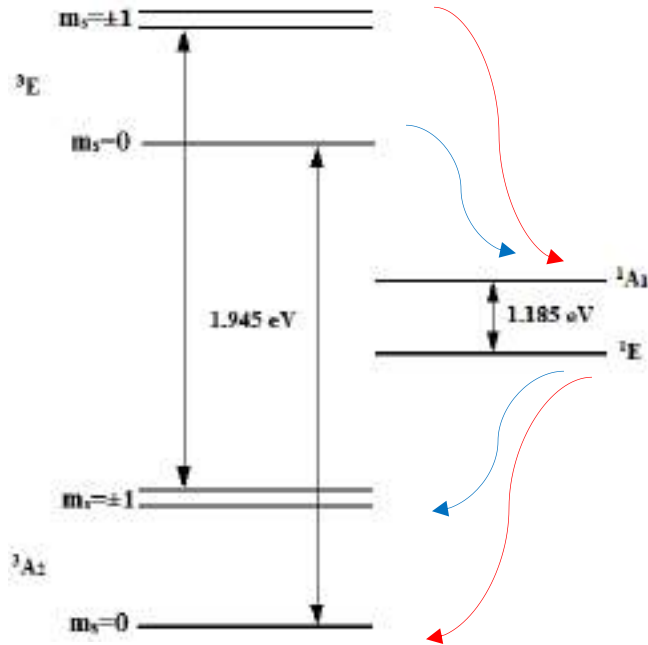


Figura 2.7. Representación esquemática de la estructura de espín a temperatura ambiente de los centro NV⁻, en la cual se pueden observar las transiciones radiativas (indicadas con flechas negras sólidas) y las no radiativas (la más probable indicada con flechas onduladas rojas y la menos probable indicada con flechas onduladas azules) entre sus distintos niveles de espín.

Como se observa en la **Figura 2.7**, las transiciones no radiativas (que no siguen las reglas de selección de las transiciones ópticas ($\Delta m_s = 0$)) se llevan a cabo a través del meta-estado. Estas son una fuerte (más probable), que va desde el nivel de espín $m_s = \pm 1$ del estado 3E al nivel $m_s = 0$ del estado 1A_1 , alcanzando el nivel $m_s = 0$ del estado 1E por medio de una transición radiativa infrarroja, para posteriormente terminar en el nivel $m_s = 0$ del estado 3A_2 ; y una débil (menos probable), que va desde el nivel $m_s = 0$ del estado 3E al nivel $m_s = 0$ del estado 1A_1 y alcanza el nivel $m_s = 0$ del estado 1E por medio de una transición radiativa infrarroja, para posteriormente terminar en el nivel $m_s = \pm 1$ del estado 3A_2 (Doherty 2013).

Referencias

- Basu, P. K. 2005. *Theory of Optical Processes in Semiconductors: Bulk and Microstructures*. Clarendon Press, Oxford.
- Betancourt-Riera, Re., Betancourt-Riera, Ri., NietoJalil, J. M., Riera, R. 2013. One phonon resonant Raman scattering in semiconductor quantum wires: magnetic field effect. *Physica B*. 410: 126-130.
- Betancourt-Riera, Ri. 2011. *Electron Raman Scattering in Nanostructures*. American Scientific Publishers, Vol. 13 2011, 427-480.
- Bradac, C., Gaebel, T., Rabeau, J. R., Barnard, A. S. Nitrogen-vacancy colour centres in diamond: theory, characterization, and applications. in *Nanotechnol. Aust. Showc. Early Career Res. Pan Stanford Publishing, USA*. pp. 113–149. 2011.
- Doherty, M. W., Manson, N. B., Delaney, P., Jelezko, F., Wrachtrup, J., Hollenberg, L. C. L. The nitrogen-vacancy colour centre in diamond. *Phys. Rep.* 528, 1. 2013.
- Felton, S., Edmonds, A., Newton, M. Electron paramagnetic resonance studies of the neutral nitrogen vacancy in diamond. *Phys. Rev. B* 77, 81201. 2008.
- Foresman, J. B. Frisch, A. 1995. *Exploring chemistry with electronic structure methods*. 2nd Edition, Gaussian, Inc., Pittsburgh.
- Harrison, P. 2005. *Quantum Wires and Dots*, in *Quantum Wells, Wires and Dots: Theoretical and Computational Physics of Semiconductor Nanostructures*, Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Levine, I. N. 2000. *Quantum chemistry*. 5th Edition, Prentice Hall, New York.
- Luttinger, J. M., Kohn, W. 1955. Motion of Electrons and Holes in Perturbed Periodic Fields. *Phy. Rev.* 97(4): 869-883.
- Marín, J. L. 2001. *Confined Systems and Nanostructured Materials*. Academic Press, Chap. 7 Vol. 6, 291-416.
- Pavlov, P. V., Jojlov, A. F. 1987. *Física del Estado Sólido*. Editorial MIR, Moscú.
- Sapsford, K. E., Algar, W. R., Berti, L., Gemmill, K. B., Casey, B. J., Oh, E., Stewart, M. H., Medintz, I. L. 2013. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *Chem. Rev.* 113: 1904–2074.
- Weber, J. R., Koehl, W. F., Varley, J. B., Janotti, A., Buckley, B. B., Van de Walle, C. G., Awschalom, D. D. Quantum computing with defects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 8513. 2010.
- Yu, P. Y., Cardona M. 2010. *Fundamentals of Semiconductor: Physics and materials properties*. 4th Edition, Springer, New York.

CAPÍTULO 3: Desaglomeración y Caracterización de Nanodiamantes de Detonación.

El procedimiento de elección para la desaglomeración de nanodiamantes de detonación, que serán usados en aplicaciones que involucran la interacción con la célula viva, debe garantizar dos factores muy importantes: conservar el carácter biocompatible del diamante y alcanzar tamaños que permitan la interacción de las nanoestructuras con la célula. Es por ello que la caracterización de los DND desaglomerados deberá incluir, además de una determinación de sus dimensiones, un estudio preliminar del resultado de su incubación con un tipo celular eucarionte y experimentos que permitan estimar la nanotoxicidad en estas condiciones.

Los nanodiamantes de detonación usados en este trabajo, Nanopure-G01, se obtuvieron de la firma Plasmachem GmbH, USA. Se trata de nanodiamantes de 4-5 nm de diámetro que se aglomeran en estructuras con tamaños mayores a 1 μm . Durante el proceso de desaglomeración se usaron micropartículas de sílica de 500 μm , que se prepararon siguiendo el método de Stober, similar a lo descrito por Rao y colaboradores (Rao, 2005). De manera breve, 2.8 mL del precursor TEOS se adicionaron a 54.8 mL de etanol y la mezcla se dejó por 20 minutos en un baño sónico. Seguidamente, 4.9 mL de Hidróxido de Amonio al 28% fueron agregados para promover la reacción de condensación. La mezcla se mantuvo en agitación en baño sónico durante 12 horas, hasta obtener una suspensión turbia de color blanco opaco, que indica la formación de micropartículas de sílica.

3.1 Desagregación de los DND.

Se siguió el procedimiento de desintegración sónica asistida por perlas (BASD en inglés) para la desaglomeración, con variaciones a la propuesta de Ozawa y colaboradores (Ozawa 2007). Inicialmente fueron probadas varias condiciones hasta llegar al método que permitió

la disminución de los tamaños hasta aproximadamente 140-150 nm (**Tabla 2.1**). Para ello, un volumen de DND al 1% en agua se mezcló con cuatro volúmenes de perlas de sílica en agua (relación 1:4). La mezcla fue depositada en un recipiente de plástico y este sumergido en hielo, antes de proceder a la ultrasonificación en un equipo QSonica, Q700 (700 W, 20 kHz), al 60% de la amplitud. Pasos de 30 s de sonicación con 1 minuto de descanso fueron repetidos hasta un total de 5 ciclos. Luego del ultrasonido, las nanopartículas de sílica se separaron de la mezcla por centrifugación (20 minutos a 3500 rpm).

Tabla 2.1 Diferentes experimentos realizados para estandarizar el BASD. El tamaño de los DNDs luego de la separación de la sílica se muestra en la última columna.

Condición	Relación DNDs/silica	Volumen Total	Ciclos de sonicación	Tamaños DND en DLS
1	1:no silica	5 mL	4 x 30 s	1325 nm
2	1:1	5 mL	4 x 30 s	204,3 nm
3	1:4	5 mL	4 x 30 s	167,1 nm
4	1:4	10 mL	5 x 30 s	154 nm
5	1:4	25 mL	5 x 30 s	140 nm

El empleo de perlas de sílica para el BASD, en lugar de zirconio, se debió por una parte a su resistencia al proceso de ultrasonificación (Russo, 2011) y por otra a la facilidad con que pueden obtenerse en el laboratorio. La **Tabla 2.1** muestra que el ultrasonido sin perlas no produjo una reducción del tamaño de los aglomerados. En las condiciones donde se usaron las perlas se logró una reducción efectiva, que permitió obtener los menores tamaños para la relación DND-sílica 1:4. Una mayor cantidad de partículas de silicio facilita la fragmentación de los aglomerados al incrementar el número de colisiones efectivas. Estos impactos producen la energía necesaria para romper los enlaces químicos entre las superficies de los nanodiamantes que contribuyen a la aglutinación (**Figura 3.1**).



Figura 3.1 Representación esquemática del proceso empleado para la desaglomeración. Los nanodiamantes de detonación y las perlas de sílica son ultrasonificados juntos y luego separados por centrifugación.

Los resultados mostrados en la **Tabla 2.1** sugieren que un incremento del volumen total de la mezcla sílica-DND mantiene la disminución del tamaño lograda mediante el BASD, por lo que se pueden usar otros volúmenes de la mezcla. Otras condiciones del experimento, como la aplicación de más ciclos de ultrasonido y diferentes relaciones sílica-DND pueden ser estudiados, buscando una disminución aún mayor del tamaño final de los aglomerados.

Posterior a la desaglomeración, los nanodiamantes fueron carboxilados de manera similar al método descrito por Liu y colaboradores (Liu, 2007). Brevemente, 12 mL de H_2SO_4 (95%) fueron añadidos a 200 mg de DND desaglomerados en polvo; seguido por la adición gota a gota de 3 mL de HNO_3 (70%) (relación $H_2SO_4:HNO_3$ 4:1), en campana por seguridad. La mezcla se calentó a $75^{\circ}C$ y se mantuvo a esa temperatura, en agitación, durante 24 h, cubierta con papel metálico. Posteriormente, se agregó 1 mL de $NaOH$ 0.1 M y se elevó la temperatura a $90^{\circ}C$ por 2 h. Finalmente se adicionó 1 mL de HCl 0.1 M y se dejó agitando a $90^{\circ}C$ por 2 horas más. Los nanodiamantes carboxilados (cND) fueron colectados por centrifugación y se lavaron cuatro veces con agua (las centrifugaciones se realizaron a 3500 rpm por 25

minutos). Los cND se conservaron en agua a temperatura ambiente (pH=5) y una porción se secó para ser analizada por FTIR en un equipo Spectrum GX System (Perkin Elmer).

Las poblaciones de nanodiamantes fueron caracterizadas en cuanto a tamaño, antes y después de la realización del BASD, mediante la técnica de DLS. Para ello se usó un láser de longitud de onda 632 nm, en un equipo Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments Ltd.). Este equipo fue utilizado también para el estudio del potencial zeta.

Una vez que los nanodiamantes desaglomerados y carboxilados se sometieron al proceso de secado, este conllevó a una re-agregación de los cNDs hasta tamaños de 1 μm . Este efecto, reportado por Mochalin en 2012 (Mochalin, 2012), es debido a la atracción entre las partículas durante el secado. En este momento, actúan fuerzas capilares y de Van der Waals, que producen la aglomeración. Aun cuando los cNDs fueron sonicados nuevamente, en ausencia de perlas y en baño ultrasónico, el tamaño se mantuvo sobre 1 μm . La recuperación de los tamaños obtenidos luego de la aplicación del BASD se logró solamente al realizar una variación del pH de la dispersión hasta alcanzar un valor de potencial zeta entre -37 y -38 mV.

El potencial zeta de una dispersión en medio acuoso, como medida de estabilidad de una partícula en suspensión, está estrechamente ligado al valor del pH (Kirby y Hasselbrink, 2004). Antes de la aplicación del BASD, una medición del potencial zeta realizada a muestras de los nanodiamantes en agua, con diferentes valores de pH (3-13), reveló que el mejor valor de potencial zeta se obtenía a pH=10-11. Aunque en aquel momento la muestra con mejor valor de potencial no mostró ningún cambio en el tamaño de las partículas, una vez realizada la desaglomeración los resultados podrían ser diferentes. Por lo que se decidió ajustar el pH

de la dispersión re-agregada, a 10, buscando recuperar el tamaño obtenido con la aplicación del BASD. Luego de las mediciones de DLS comprobamos que efectivamente se recuperó el tamaño cercano a 100 nm y que, además, aparecieron poblaciones de cNDs con tamaños menores, entre 30-50 nm (**Figura 3.2**).

La influencia del pH en la dispersión de nanodiamantes está relacionada con el valor del punto isoeléctrico de los grupos funcionales superficiales. Al cambiar de un pH ácido a uno alcalino, los grupos carboxilo en las superficies de los cNDs se cargan eléctricamente, sobrepasando el valor de pH de su punto isoeléctrico. La obtención de partículas cargadas de manera similar y homogénea promueve la repulsión y favorece la dispersión. De esta manera se logró que el tamaño de los aglomerados después del BASD, aproximado a 150 nm, fuera reducido a valores cercanos a 100 nm luego de carboxilar.

El proceso de carboxilación se convierte entonces en un segundo paso en el procedimiento de desaglomeración, dándole un carácter físico-químico. Según Panich y Aleksenskii (Panich 2012), la desagregación por carboxilación ocurre luego de la interacción de los grupos carboxilos con el agua, lo que conlleva a la formación de una doble capa eléctrica alrededor de los cNDs. Esta doble capa es responsable de la repulsión electrostática entre los cNDs, al reducir la interacción coulombiana entre las partículas.

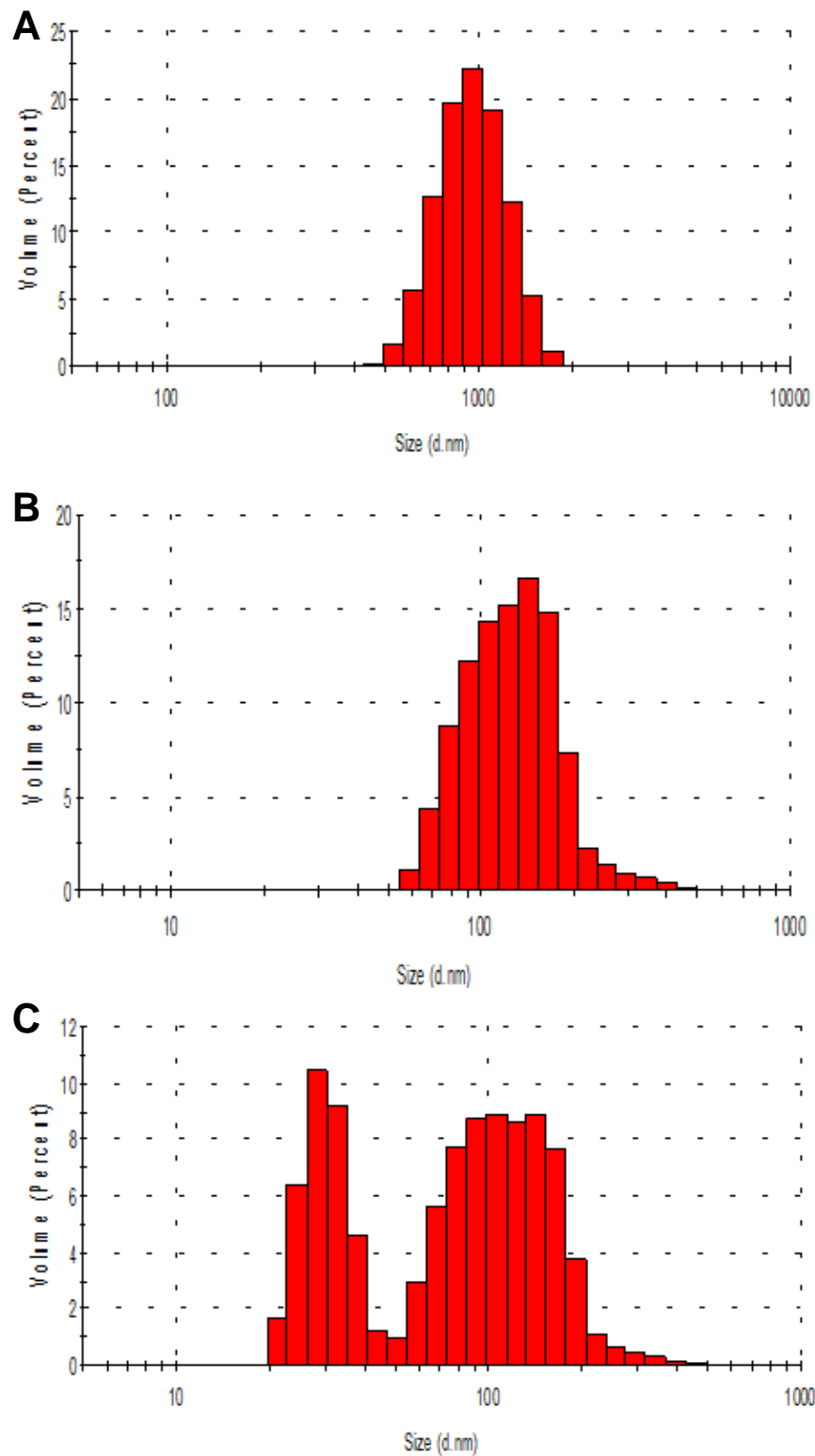


Figura 3.2 Distribución de tamaños de los DNDs obtenida por DLS. **A:** Muestra antes del BASD. **B:** Muestra después del BASD. **C:** Muestra de nanodiamantes carboxilados y a pH=10.

Otro efecto de la carboxilación que podría estar aportando al proceso de desagregación en este punto es la reducción de la capa gráfica de la superficie de los nanodiamantes. Esta fase de grafito (que interviene en muchas de las interacciones superficiales de los nanodiamantes), podría haberse visto incrementada por las altas temperaturas locales-superficiales, generadas al chocar los diamantes y la sílica a altas velocidades durante el BASD (Chao 2007). No obstante, luego del fuerte tratamiento ácido al que se someten las partículas durante la carboxilación, la capa gráfica podría verse nuevamente reducida, llevando a la disminución de las interacciones entre los DNDs y contribuyendo a la desagregación.

Los resultados de tamaño obtenidos por DLS fueron corroborados mediante la microscopía electrónica de transmisión. Para ello, usamos un microscopio Jeol 2010 F (JEOL Ltd., Akishima-shi, Japan) a 200 kV. Los cND en suspensión acuosa (10 μ l) se depositaron en una rejilla de oro para TEM y la muestra se secó al vacío por 24 h antes de su análisis. Como puede observarse en la **Figura 3.3**, coincidiendo con los resultados del DLS, se detectó la presencia de aglomerados de diamantes de aproximadamente 100 nm, y de otros con tamaños menores a 50 nm.

El análisis de los espectros obtenidos por FTIR para los nanodiamantes antes y después del proceso de BASD-carboxilación (**Figura 3.4**), muestra la ausencia de los picos típicos de los enlaces Si-O y Si-O-Si, a 1080 cm^{-1} y 800 cm^{-1} , respectivamente (Russo, 2011). No obstante, no descartamos la contaminación con sílica, ya que pudiera estar ocurriendo una superposición de estos picos con los picos del diamante. Por esta razón, se procedió a analizar las muestras mediante XPS, lo que permitió comprobar la existencia de una pequeña contaminación con silicio. Esto indica que las perlas de sílica usadas en el BASD introducen una contaminación no deseada. Para eliminar la sílica presente en las muestras, estas pueden

someterse a un tratamiento ácido posterior, como evidencia el espectro obtenido para los cNDs a los que se les realizó una reacción de hidroxilación por Fenton (**Figura 3.5**).

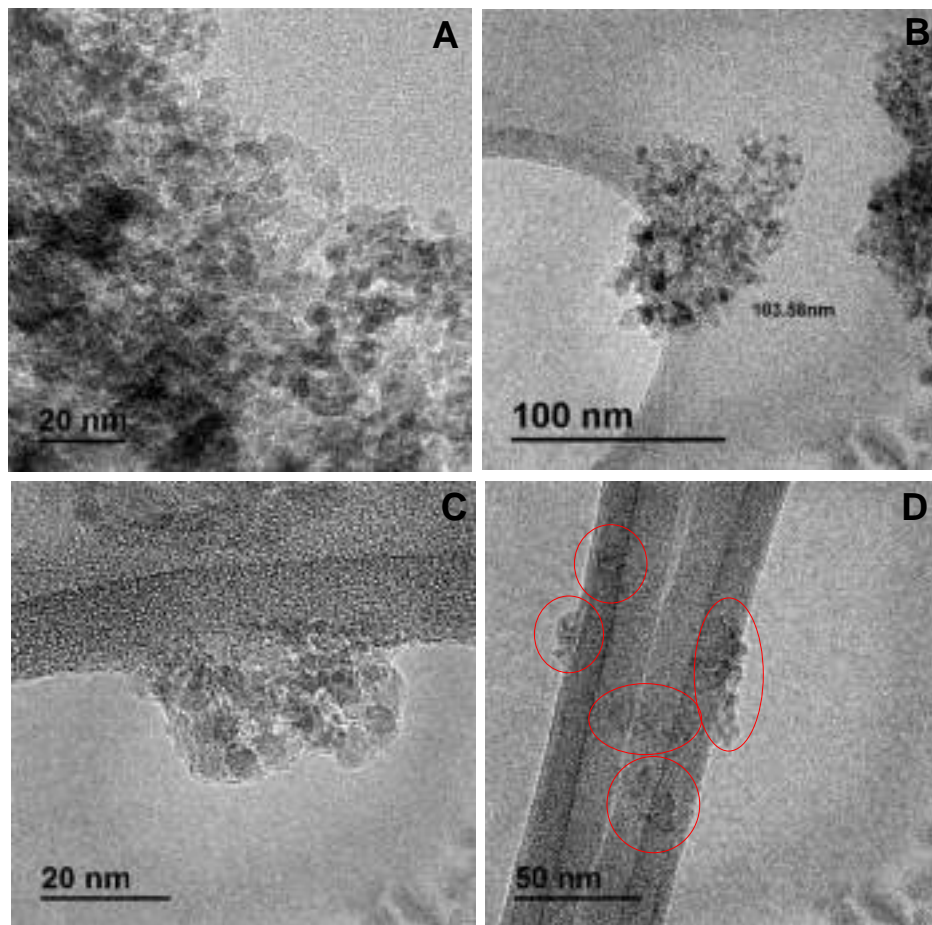


Figura 3.3 Imágenes de los Nanodiamantes de Detonación obtenidas en el Microscopio Electrónico de Transmisión. **A:** DND antes de la desagregación. **B, C, D:** Aglomerados de DND luego de los procesos de BASD y carboxilación.

La observación de los espectros del FTIR (**Figura 3.4**) nos permite también corroborar observaciones realizadas por otros autores, que llegaron a la conclusión de que el tamaño de los nanodiamantes incide en la estructura química y la interacción de los grupos en su

superficie, y puede ser correlacionado con la frecuencia de la banda FTIR del grupo carbonilo, C=O (Tu, 2006). Podemos ver en la **Figura 3.4B** que el espectro de los DNDs sin carboxilar muestra dos bandas en posición similar al espectro de los cNDs re-agregados, en el rango de $1550 - 1850 \text{ cm}^{-1}$, en ambos casos recordamos que los tamaños están sobre $1 \mu\text{m}$. Sin embargo, para el caso de los cNDs a $\text{pH}=10$, se observa un corrimiento hacia frecuencias mayores en la banda que se corresponde al C=O, lo que según lo obtenido por Tu y colaboradores, al estar unido a una disminución de la intensidad de la absorbancia, es indicativo de una disminución del tamaño del nanodiamante.

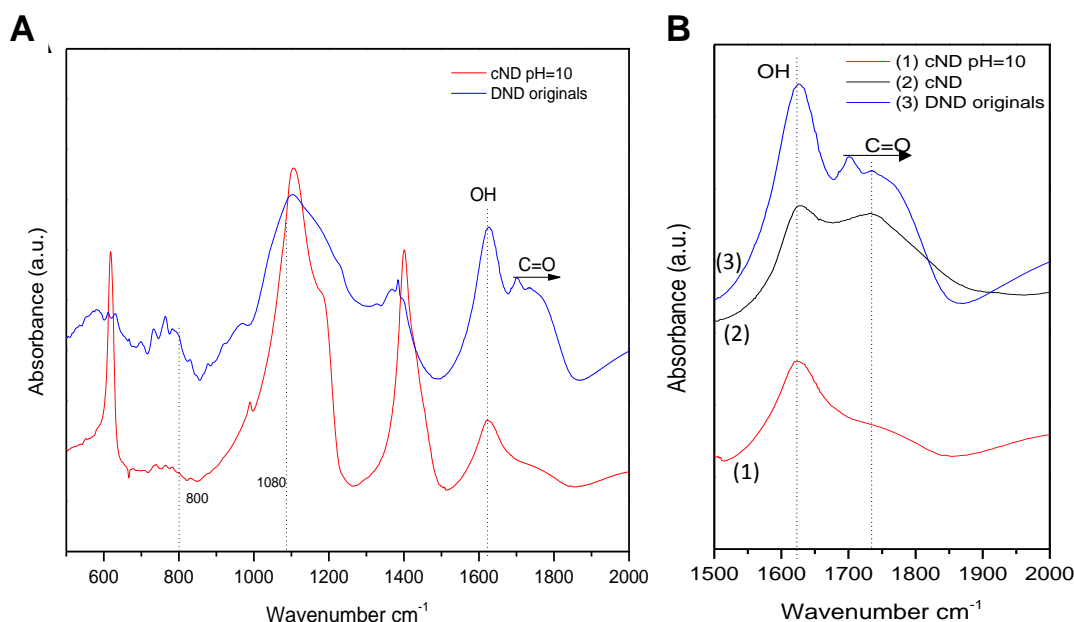


Figura 3.4. Espectros obtenidos por FTIR para los nanodiamantes antes y después del proceso de BASD y carboxilación. **A:** Comparación entre los DND sin procesar (DND originals) y luego de desaglomerar, carboxilar y ajustar el pH a 10 (cND pH=10). **B:** Región de los espectros que contiene los picos de las vibraciones de los grupos OH y C=O. Se muestran los espectros de los DND originales y dos muestras de los desagregados-carboxilados: antes y después de ajustar pH a 10.

Como podemos observar, la frecuencia de la banda de los grupos hidroxilo, OH, no varía ante cambios en el tamaño de las partículas. Tu y colaboradores atribuyen los cambios en la

banda C=O a la interacción de estos grupos con el medio. En este caso, como ya vimos anteriormente, el ajuste del pH a 10 permite recuperar los tamaños menores de los aglomerados, lo que se ve reflejado en una variación del espectro FTIR.

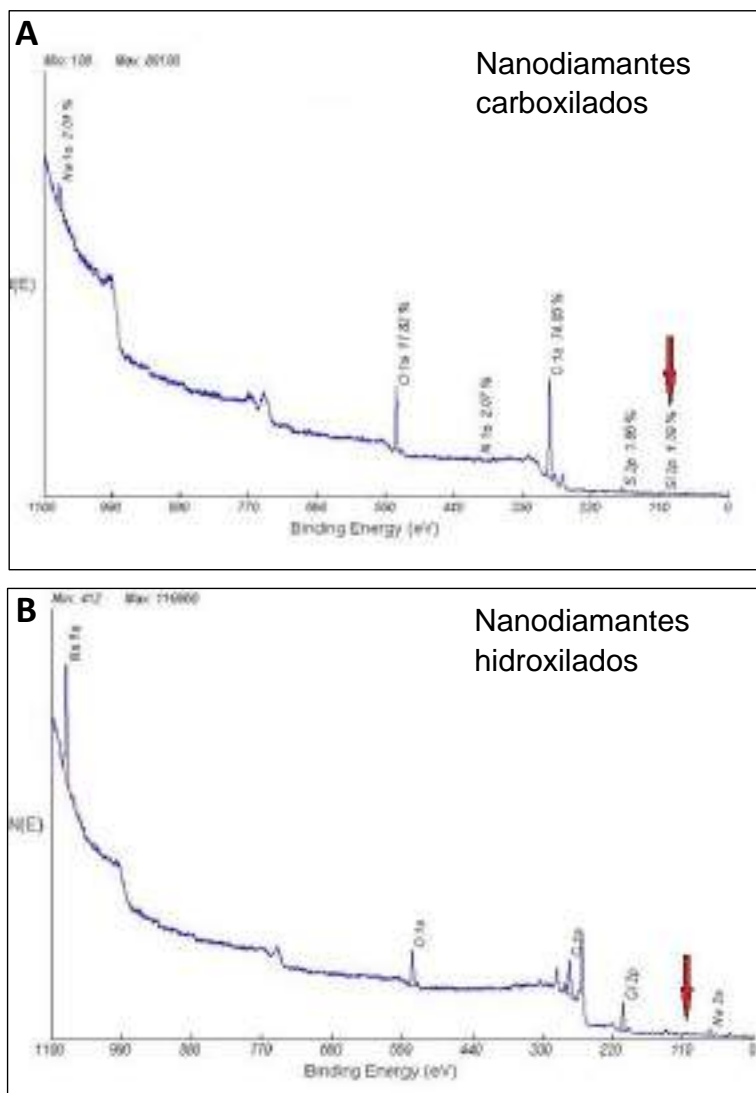


Figura 3.5. Resultados obtenidos por XPS. **A:** Muestra tomada luego de los procesos de BASD y carboxilación. Con una flecha roja se señala el pico de contaminación con sílica. **B:** Muestra tomada luego de un proceso de hidroxilación realizado a la muestra A. La flecha roja señala la zona donde se debería esperar el pico de silicio, que está ausente en este caso.

3.2 Estudio de interacción con eritrocitos.

Una vez que se cuenta con estructuras parcialmente desaglomeradas, pero ya en tamaños que pueden ser incorporados por la célula (alrededor de 100 nm), se requiere analizar si el procedimiento utilizado ha introducido alteraciones en la biocompatibilidad de los nanodiamantes. Para ello se evaluó el efecto citotóxico de los cND en eritrocitos (glóbulos rojos, RBC). Estas células tienen características muy particulares que hacen que no sea un tipo de célula modelo (ausencia de núcleo y otros orgánulos en estado maduro, pequeño tamaño celular, ausencia de mecanismo de endocitosis, etc.). No obstante, al ser el componente fundamental de la sangre, estaría en contacto con las nanopartículas en cualquier aplicación *in vivo*, ya fuera en el momento de la incorporación al organismo como en el de la eliminación; por lo que el estudio de su interacción con los nanodiamantes tiene elevada importancia.

Luego de colectar la sangre total de un voluntario sano, en tubos con el anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetra-acético), se prepararon diluciones de ésta en buffer fosfato salino (PBS), en una relación 15 μL :1000 μL . Los RBC diluidos (1 mL) fueron incubados con DND antes y después de desaglomerar, durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron los estudios de viabilidad por tinción con tripano azul (10 μL : 10 μL , en cámara de Neubauer) y se determinó la hemólisis al cuantificar la liberación de hemoglobina a 540 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 (Perkin Elmer). Finalmente, se obtuvieron los espectros Raman de la hemoglobina en un microespectrómetro Horiba LabRam-HR (Horiba) con láseres de longitud de onda 488 nm y 633 nm. Los resultados fueron analizados y graficados usando el software OriginPro 9.0.

En los experimentos de viabilidad y hemólisis evaluamos diferentes concentraciones de los nanodiamantes luego de la aplicación del BASD-carboxilación y, en el caso de los nanodiamantes sin desaglomerar, solamente evaluamos el valor de la concentración de trabajo (0.004%). Este valor fue fijado en principio teniendo en cuenta reportes anteriores de la literatura (Lin 2012, Liu 2007), aunque su validez en nuestro caso será determinada en este experimento. Las diluciones en PBS de los nanodiamantes desaglomerados fueron las siguientes: cND 0.04% (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cND 0.01% (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), cND 0.004% (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y de los DND sin carboxilar: (ncND) 0.004% (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los resultados de ambos ensayos se muestran en la **Figura 3.6**, promediando los valores obtenidos para tres réplicas por cada condición.

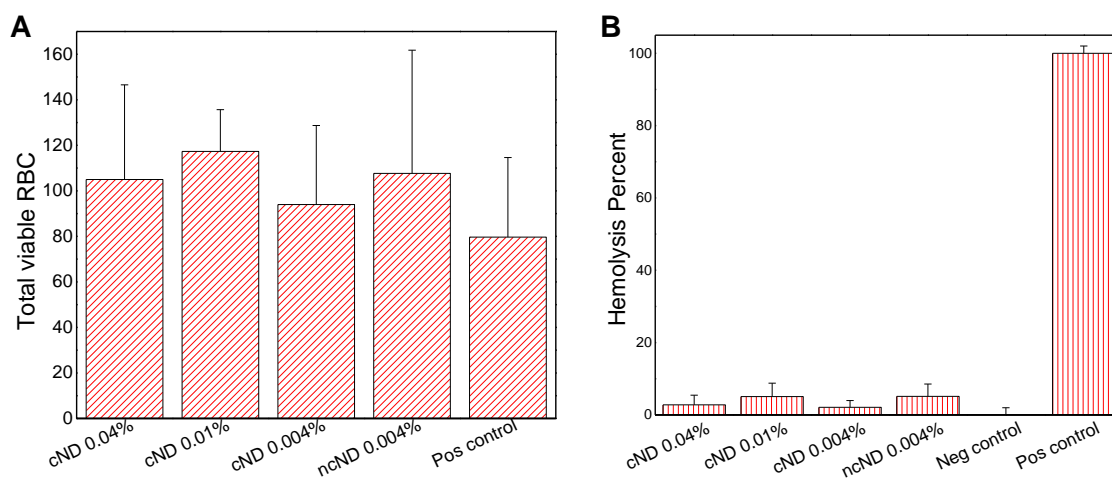


Figura 3.6. Gráficas de los resultados de Viabilidad y Hemólisis después de la incubación de los eritrocitos con los nanodiamantes, a diferentes concentraciones, durante 3-5 horas (n=4). **A:** Número de células vivas por condición. **B:** Porcentaje de hemólisis por condición, partiendo de valores de absorción medidos a 540 nm.

La prueba con tripano azul, usada para medir la viabilidad celular, permite estimar el número de células viables en suspensión al contar en el microscopio las células intactas (no teñidas) (Strober, 2001). Al realizar este experimento observamos que el número de células vivas en

cada condición no fue menor que el valor del control positivo (**Figura 3.6A**). Este resultado está en concordancia con la ausencia de un alto efecto hemolítico (por debajo del 10% en todos los casos) en las concentraciones probadas, luego de 3-5 horas de incubación (**Figura 3.6B**). De esta manera, encontramos evidencias que justifican el uso de los nanodiamantes desaglomerados y carboxilados en experimentos con células; ya que no se genera un impacto negativo en la viabilidad de los glóbulos rojos. Estos resultados coinciden con lo reportado por Lin en 2012 (Lin, 2012) para nanodiamantes carboxilados de 5 y 100 nm, que mostraron un efecto benigno al interactuar con RBC, en concentraciones similares a las usadas en nuestro estudio.

Como vía de analizar un posible efecto de los nanodiamantes sobre los eritrocitos a nivel molecular, estudiamos el espectro Raman de la hemoglobina en RBC bajo dos condiciones distintas: control de células con PBS y células con cND al 0.004%. Luego de 3 horas de incubación, se adquirieron los espectros usando láseres de longitudes de onda 488 nm y 633 nm. Las señales positivas se promediaron y normalizaron, para obtener los gráficos que se muestran en la **Figura 3.7**.

Para ambas longitudes de onda, los espectros control y células tratadas no presentaron alteraciones en la posición de las bandas. Esto indica que la presencia de los nanodiamantes no induce transformaciones estructurales de la hemoglobina, ya que no se ven reflejadas en su espectro Raman. Las bandas principales están de acuerdo a lo obtenido por Wood en 2002 para espectros de RBC bajo diferentes longitudes de onda de excitación (Wood, 2002).

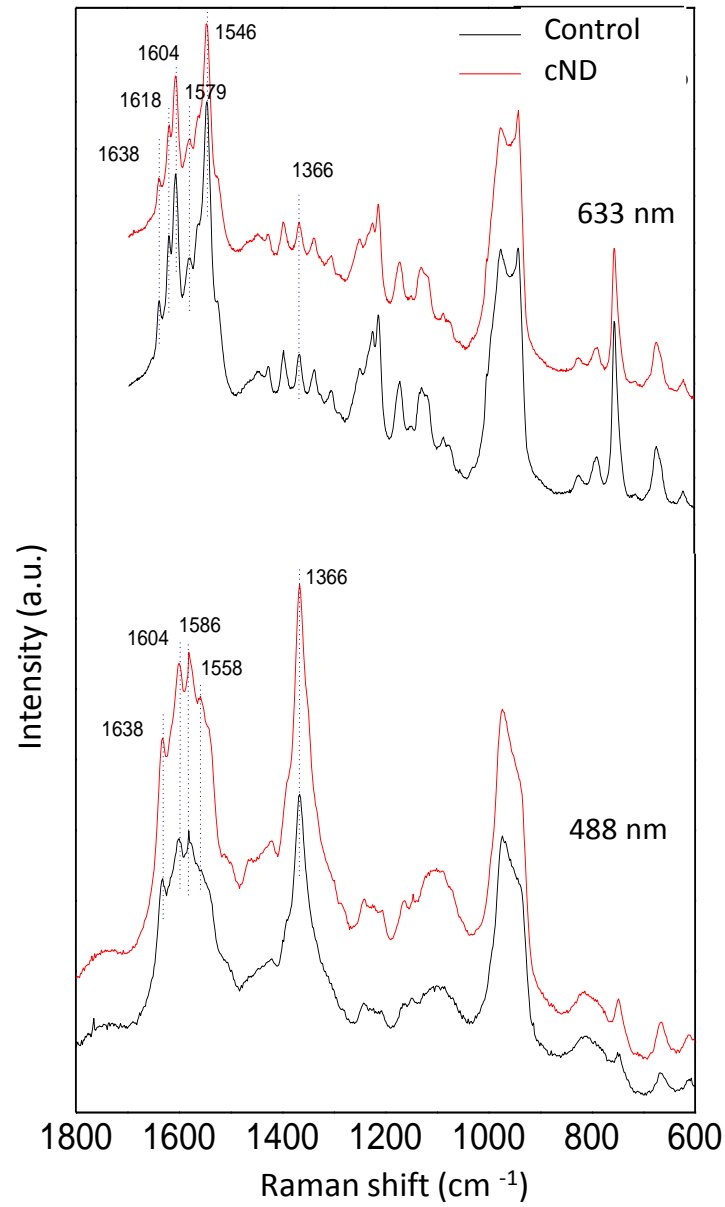


Figura 3.7 Espectros Raman de RBC control y RBC + cND 0.004% a 633 nm y 488 nm. Cada espectro es el promedio de 30 espectros medidos en diferentes eritrocitos bajo las mismas condiciones.

Conclusiones del Capítulo 3.

En este trabajo aplicamos un método previamente descrito por otros autores, para la desaglomeración de nanodiamantes de detonación: la desintegración sónica asistida por perlas. El procedimiento fue modificado para hacerlo más accesible, al disminuir el tiempo de aplicación y emplear perlas de sílica sintetizadas en el laboratorio, que resultan menos costosas y más fáciles de obtener que las de zirconio. Aunque no se llegan a desaglomerar totalmente los DND, los tamaños finales obtenidos, alrededor de 100 nm, permiten su uso en experimentos donde se requiere la internalización por la célula. El procedimiento no introdujo modificaciones a los nanodiamantes que afecten su biocompatibilidad, como demuestran los resultados obtenidos al incubarlos con glóbulos rojos, en las condiciones probadas para un tiempo de incubación de 3 a 5 horas. La invariabilidad de las señales Raman en RBC incubados con y sin nanodiamantes es una señal indirecta del carácter benigno de los DNDs ahora a nivel molecular.

Aunque otros métodos han sido utilizados por varios autores para resolver el mismo problema, el procedimiento empleado en este trabajo es diferente en cuanto a los tamaños que persigue y la aplicación que propone para estos nanodiamantes. Este trabajo representa, además de la solución a una dificultad práctica presentada en nuestro laboratorio, nuestra contribución en la búsqueda de métodos sencillos y eficientes para la desaglomeración de nanodiamantes de detonación. La aplicación de la técnica BASD con perlas de sílica, seguida del proceso de carboxilación, resulta una alternativa viable y recomendable para el uso en la bio-nanomedicina, cuando se buscan DNDs en un rango de tamaños entre 50-100 nm y con un carácter benigno en su interacción con la célula.

Referencias

- Chao, J.-I., Perevedentseva, E., Chung, P.-H., Liu, K.-K., Cheng, Ch.-Y., Chang, Ch.-Ch., Cheng, Ch.-L., 2007. Nanometer-Sized Diamond Particle as a Probe for Biolabeling. *Biophys. J.* 93(6), 2199-2208.
- Kirby, B. J., Hasselbrink, Jr. E. F., 2004. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effectson separations. *Electrophoresis.* 25, 187-202.
- Lin, Y.-Ch., Tsai, L.-W., Perevedentseva, E., Chang, H.-H., Lin, Ch.-H., Sun, D.-Sh., Lugovtsov, A. E., Priezhev, A., Mona, J., Cheng, Ch.-L., 2012. The influence of nanodiamond on the oxygenation states and micro rheological properties of human red blood cells in vitro. *J. Biomed. Opt.* 17(10), 101512.
- Liu, K. K., Wang, C. C., Cheng, C. L., Chao, J. I., 2009. Endocytic carboxylated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and differentiation in cancer and stem cells. *Biomaterials.* 30 (26), 4249-4259.
- Mochalin, V. N., Shenderova, O., Ho, D., Gogotsi, Y., 2012. The properties and applications of nanodiamonds. *Nat. Nanotechnol.* 7, 11-23.
- Ozawa, M., Inaguma, M., Takahashi, M., Kataoka, F., Krüger, A., Osawa, E., 2007. Preparation and Behavior of Brownish, Clear Nanodiamond Colloids. *Adv. Mater.* 19, 1201-1206.
- Panich, A. M., Aleksenskii, A. E., 2012. Disagregation of diamond nanoparticles studied by NMR. *Diamond Relat. Mater.* 27-28, 45-48.
- Rao, K. S., El-Hami, K., Kodaki, T., Matsushige, K., Makino, K., 2005. A novel method for synthesis of silica nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 289, 125-131.
- Russo, L., Colangelo, F., Cioffi, R., Rea, I., De Stefano, L., 2011. A Mechanochemical Approach to Porous Silicon Nanoparticles Fabrication. *Materials.* 4, 1023-1033.
- Strober, W., 2001. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr. Protocols Immunol.* 21:3B:A.3B.1-A.3B.2.
- Tu, J.-S., Perevedentseva, E., Chung, P.-H., Cheng, C.-L., 2006. Size-dependent surface CO stretching frequency investigations on nanodiamond particles. *J. Chem. Phys.* 125, 174713.
- Wood, B. R., McNaughton, D., 2002. Raman excitation wavelength investigation of singlered blood cells in vivo. *J. Raman Spectrosc.* 33, 517-523.

CAPÍTULO 4: Obtención de conjugados nanodiamante-fluoresceína y su interacción con células HeLa.

Los nanodiamantes de detonación (DND) Nanopure-G01, desaglomerados y carboxilados, fueron conjugados al fluoróforo Isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés) y posteriormente utilizados en estudios de interacción con células HeLa. Un procedimiento similar fue aplicado a nanodiamantes fluorescentes con centros NV (FND), de tamaño 40 nm y 1-4 centros NV, carboxilados, comerciales (Adamas Nanotechnology, USA). El FITC, el 3-aminopropil-trietoxisilano (APTES, del inglés 3-Aminopropyl triethoxysilane) y el resto de los reactivos utilizados, fueron adquiridos de la firma Sigma-Aldrich Company, USA.

4.1 Conjugación con FITC.

El primer paso para obtener la conjugación con FITC fue la modificación de las superficies de los nanodiamantes, de manera que se pudiera contar con grupos amino que permitieran la unión a la fluoresceína. Con el fin de probar la eficacia de dos procedimientos distintos para lograr esto, se probaron diferentes métodos en ambos tipos de nanodiamantes. En el caso de los DND el proceso comenzó con la hidroxilación de las superficies, de manera similar a lo descrito por Solarska (Solarska, 2010).

Los nanodiamantes carboxilados en polvo (30-40 mg) se resuspendieron en 30 mL de agua y se adicionaron 4 g de FeSO_4 . Luego de agitar para mezclar, se agregaron 20 mL de H_2SO_4 y se dejó agitar por 15 minutos. A continuación se puso el recipiente con la mezcla en hielo y se adicionaron 20 mL de H_2O_2 mientras se mantenía agitando durante 30 minutos. Luego, la temperatura se elevó hasta 30°C y se dejó agitar durante 90 minutos, con pasos intermedios de sonicación (5 minutos cada 20-30 minutos). Después de un paso de centrifugación, el

sedimento fue dializado (24-48 h) y secado para obtener el polvo de nanodiamantes hidroxilados ($_{OH}DND$).

La adición de APTES permitirá contar con grupos amino en la superficie de los DND, y se puede lograr mediante la unión a los grupos OH de los nanodiamantes hidroxilados. Para ello, el polvo de $_{OH}DND$ fue redispersado en 30 mL de etanol absoluto, a los que luego se agregaron 30 μ L de NH_3OH al 29.4 % y 20 μ L de APTES (Kim, 2006). La mezcla se mantuvo en agitación por 24 h y luego se centrifugó y lavó con etanol y agua 5 veces (centrifugando a 3500 rpm por 25 minutos).

En el caso de los FND, los grupos carboxilo fueron activados usando la reacción de activación con hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-(dimetilamino)propil)carbodiimida / N-hidroxisuccinimida (EDC/NHS, del inglés N-Ethyl-N'-(3-(dimethyl-amino) propyl) carbodiimide hydrochloride / N-hydroxysuccinimide), en presencia de cisteína (Sam, 2010). Brevemente, el polvo de FND se agregó a un tubo que contenía 500 μ L de buffer fosfato salino (10 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 , 0.9% NaCl (PBS)), mientras que 4 mg de cisteína fueron disueltos en otros 500 μ L de PBS. El contenido de ambos tubos fue mezclado y se agregaron rápidamente 100 μ L de EDC en agua (1 mg / 100 μ L). Luego de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se adicionaron 100 μ L de NHS en agua (1 mg / 100 μ L) y la reacción se mantuvo a temperatura ambiente por 1 h más. Finalmente, la mezcla fue centrifugada y los nanodiamantes unidos a cisteína fueron colectados en el sedimento.

El FITC reacciona tanto con grupos amino como con grupos tiol (hidroxilo) (Swoboda, 1985). La unión a los DND se obtuvo a través de los grupos amino de APTES, mientras que en el caso de FND los mediadores fueron los grupos tiol de la cisteína. En ambos casos, se

agregó 1 mg de FITC al tubo que contenía 1 mL de los nanodiamantes al 1% en PBS y los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente en la oscuridad, con agitación esporádica. Después de 4h, los tubos se centrifugaron y los sedimentos se lavaron con PBS, para luego ser resuspendidos y conservados a 4°C hasta su uso. Un esquema general de ambos procedimientos usados puede observarse en la **Figura 4.1**.

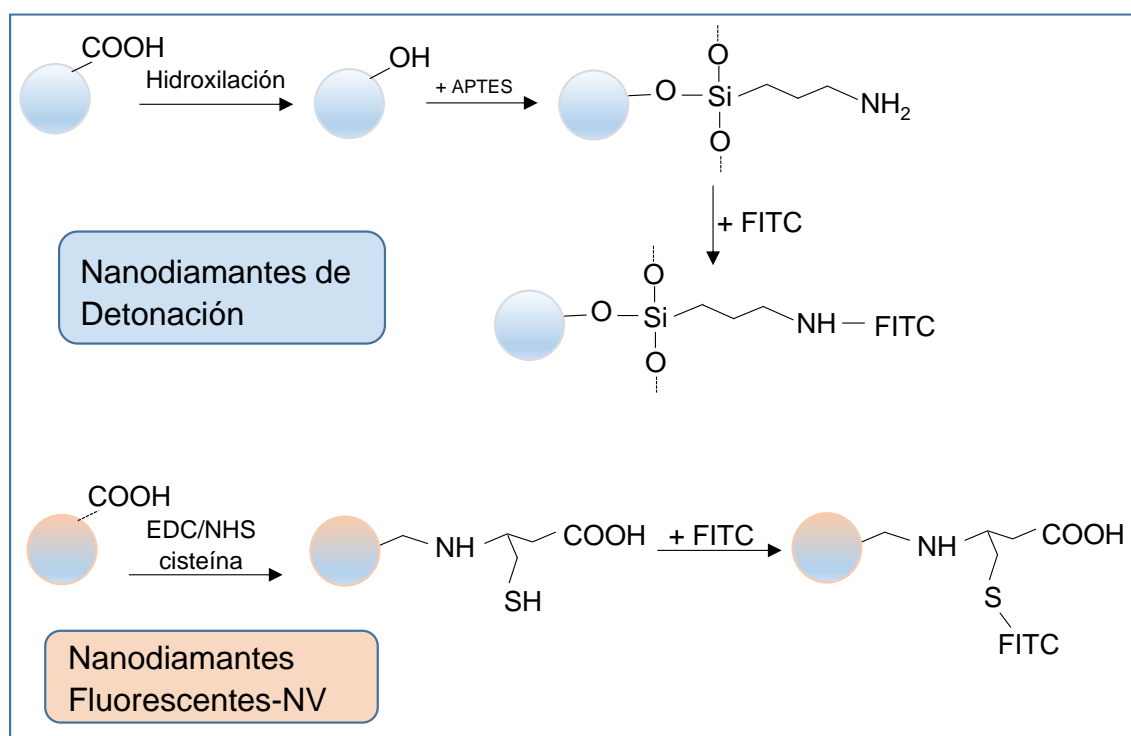


Figura 4.1 Representación esquemática de la modificación de las superficies de los nanodiamantes y su conjugación con FITC.

De acuerdo con los resultados obtenidos (que podrán ser vistos más adelante), se detectó la presencia de FITC en los nanodiamantes lavados y colectados luego de la aplicación de ambos procedimientos. Por lo que se puede plantear que los dos métodos empleados para

unir el FITC a los nanodiamantes resultaron igualmente efectivos y pueden aplicarse indistintamente. El uso de uno u otro mediador permitirá la unión posterior a diferentes elementos, pudiendo ser escogido en dependencia de la funcionalidad final que se desee. Para el caso de APTES, este permite la unión de moléculas reactivas a los grupos amino, como la rodamina, fragmentos de anticuerpos y ADN (Volcke, 2010). Mientras que el uso de cisteína puede mediar la unión a agentes fluorescentes como los bromobimanos y a metales como el oro y la plata, a través de los grupos OH. Ambos métodos son fáciles de llevar a cabo y no requieren condiciones o equipamiento especiales.

Los resultados de las reacciones de carboxilación e hidroxilación de los DND (antes de la unión a FITC u otra molécula) fueron analizados por FTIR. Como puede observarse en la **Figura 4.2**, los modos vibracionales del C=O, correspondientes a la absorción en la zona de $1650-1850\text{ cm}^{-1}$, se reducen luego de la hidroxilación, a la vez que se incrementan los picos a 3450 y 1635 cm^{-1} , asignados a vibraciones del OH. Estos resultados confirman que efectivamente se obtuvo un incremento de los grupos OH en la superficie de los DND luego de hidroxilar, reduciendo también los grupos carboxilo. Las bandas del espectro coinciden con lo reportado por Tu en 2006 para nanodiamantes funcionalizados (Tu, 2006).

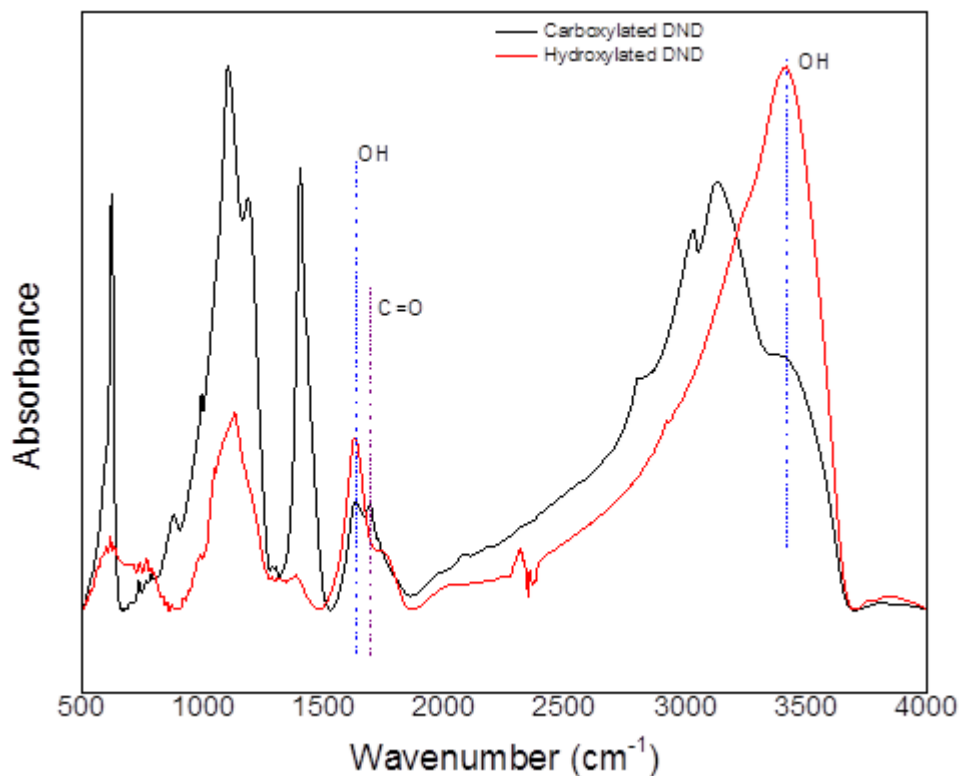


Figura 4.2. Espectros FTIR de los DND después de los procedimientos de carboxilación e hidroxilación.

4.2 Estudios de Fluorescencia.

Luego de la obtención de los conjugados nanodiamante-fluoresceína se procedió a estudiar sus propiedades fluorescentes. En el caso de DND-FITC es de esperar que el fluoróforo aporte emisión de luz a un nanodiamante que no emite fluorescencia por sí mismo. Para el conjugado FND-FITC no es tan sencillo vaticinar su comportamiento, pues la interacción entre los centros NV y la fluoresceína puede provocar la ocurrencia de fenómenos de transferencia de energía.

Muestras de ambos conjugados fueron diluidas al 0,1 % en PBS y llevadas a una cubeta de cuarzo. El análisis se realizó en el equipo Fluorolog (Horiba JobinYvon, USA), usando el

software FluorEssence 3.5.1.99. Los datos obtenidos, graficados mediante el software OriginPro 9.0.0, permitieron corroborar la unión a FITC (**Figura 4.3**).

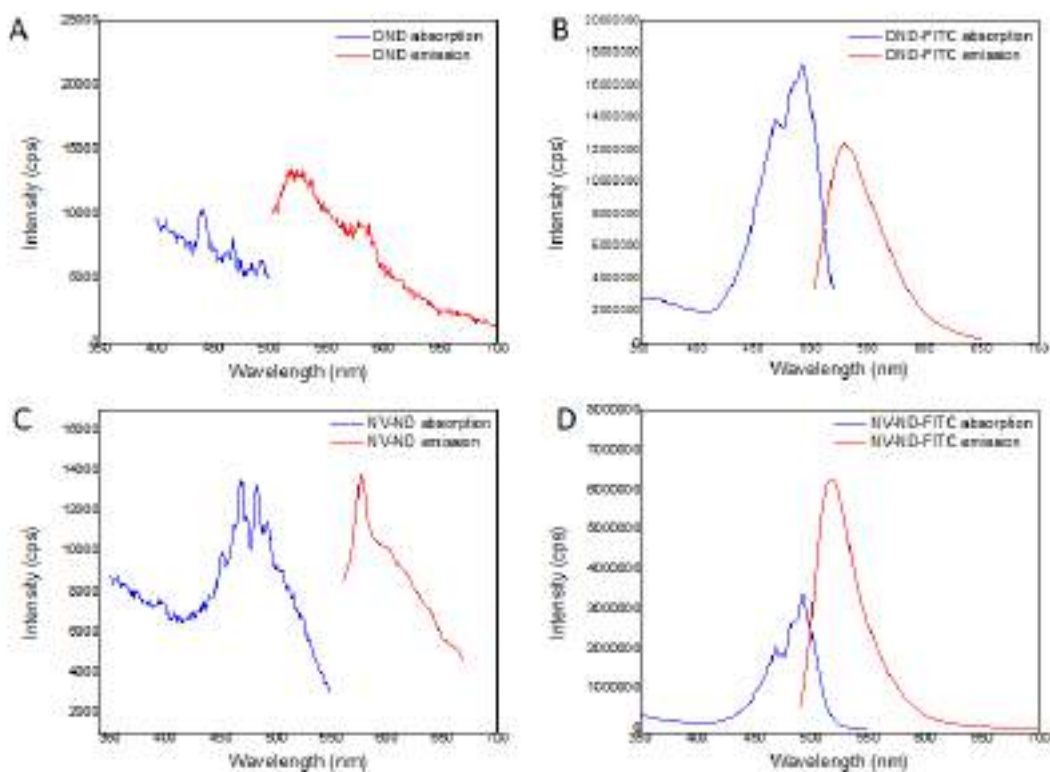


Figura 4.3. Espectros de fluorescencia de los DND antes (**A**) y después de la conjugación con FITC (**B**) y de los FND antes (**C**) y después de la conjugación con FITC (**D**).

Como puede observarse, las muestras de DND en PBS mostraron muy baja fluorescencia (**Figura 4.3A**), mientras que los conjugados DND-FITC tuvieron intensos espectros de absorción y emisión, simétricos y estrechos (**Figura 4.3B**), debidos a la presencia de FITC (Ioannou 2010). Estos picos de luz absorbida a 490-500 nm y de fluorescencia emitida a 520-530 nm se observaron también para el caso del conjugado FND-FITC.

La **Figura 4.3C** nos muestra que los FND sin fluoresceína presentan una banda de emisión a 575 nm, correspondiente a la presencia del centro NV⁰. La banda del centro NV⁻ a 638 nm no se observa, sugiriendo que aunque ambos centros pueden estar presentes en el nanodiamante, un solo estado parece estar dominando; recordemos que estos FND tienen solamente de 1 a 4 centros por partícula. Este comportamiento ha sido visto antes en nanodiamantes con bajas concentraciones de nitrógeno, en los que el estado NV⁰ es mostrado de manera prioritaria (Manson, 2005).

Para el caso de los FND-FITC se puede observar la ocurrencia de otro efecto (**Figura 4.3D**). Las bandas de absorción y emisión se corresponden con lo esperado para FITC, sugiriendo que las bandas del centro NV quedan disminuidas y/o sobrepuestas y no pueden observarse. Aún más relevante es el hecho de que se produce un incremento en la intensidad de la fluorescencia emitida, comparada con el espectro de absorción. Esto último sugiere la ocurrencia de un fenómeno de transferencia de energía.

En el caso que nos ocupa, la distancia entre la superficie del nanodiamante y el FITC es muy corta, ya que la cisteína es un aminoácido muy pequeño con tamaño aproximado a los 8 Å. Aunque generalmente se considera que la transferencia efectiva de energía ocurre para distancias entre 10 y 100 Å (Sapsford, 2006), Fudala y colaboradores en 2014 encontraron que se necesitaba una distancia menor a 40 Å (4 nm) para que moléculas de FITC participaran en la Transferencia de Energía de Fluorescencia Resonante (FRET en inglés) (Fudala, 2014). Si se considera que el centro NV está ubicado en un rango de 10-20 Å desde la superficie del nanodiamante, la distancia total hasta la molécula de FITC sería de 20-30 Å, permitiendo una posibilidad real para la existencia de la transferencia.

Cuando ocurre el FRET, el proceso de transferencia de energía tiene lugar entre dos moléculas, un donador y un aceptor, conllevando a la reducción de la intensidad de la fluorescencia emitida por el donador y a un incremento de la intensidad de la fluorescencia emitida por el aceptor (Chen, 2012). Un requerimiento de este proceso es la existencia de una sobreposición entre el espectro de fluorescencia del donador y el espectro de emisión del aceptor (Albani, 2007).

Como puede observarse en la **Figura 4.3C**, la banda de emisión del centro NV está ubicada entre los 550 y 650 nm; mientras que la banda de absorción del FITC se ha reportado entre los 450-550 nm (Veeranarayanan, 2012). De esta manera, no parece posible que el centro NV logre producir la excitación del FITC, lo que haría no-viable la ocurrencia del FRET. No obstante, los resultados son claros acerca del incremento de la emisión de fluorescencia cuando el par NV/FITC coexiste en la misma partícula. Una explicación más razonable a estas observaciones parece ser la que puede deducirse del análisis de la **Figura 4.4**.

Cuando los conjugados son irradiados con luz de $\lambda=480$ nm, tanto los centros NV como las moléculas de FITC son excitados. La relajación del estado excitado al estado basal puede obtenerse a través de la emisión de fluorescencia a 520 nm, en el caso del FITC, y a 575 nm en el caso del centro NV. Esto es lo que pasa cuando ambos agentes emisores se encuentran independientes, pero en el caso de los conjugados NV-ND-FITC, observamos solamente la emisión a 520 nm sugiriendo que, como se representa en la **Figura 4.4**, el centro NV no emite, donando sus fotoelectrones al FITC. Esta podría ser la explicación para la emisión incrementada a 520 nm. Más fotones son producidos a esta longitud de onda, mientras que ninguno es emitido a 575 nm.

Se puede decir entonces que el sistema está bajo un proceso de transferencia de fotoelectrones desde los centros NV, que incrementa el espectro de emisión del FITC. En este caso, el sistema estaría experimentando un proceso que podríamos llamar Incremento de la Fluorescencia por Transferencia de Electrones (FEET en inglés).

La Intensidad de la fluorescencia emitida en cada caso será una medida del número de fotones que recibe el detector por unidad de tiempo: $I = \text{número de fotones/segundo}$ y dependerá del valor de intensidad I_0 que aporte cada fotón emitido para una misma longitud de onda. Si en presencia del centro NV, se emiten más fotones en la banda a 520 nm y no hay emisión a 575 nm, es indicativo de que el número de fotones que emiten en el pico del FITC se ha incrementado, al sumarse los que debían emitir por el centro NV, ya que para este sistema no se puede producir el FRET.

De tal manera, tendremos que en cualquier sistema la intensidad de la fluorescencia se puede expresar como una relación directamente proporcional entre el número de fotones n y la intensidad de cada fotón $I_f = nI_0$. Si en ese mismo sistema, pero bajo el efecto de FEET, medimos un valor de Intensidad distinto I' para la misma banda, y sabemos que no puede existir un fenómeno de FRET, la explicación posible será el aumento en el número de fotones que se producen a esa longitud de onda: $I' = mI_0$, donde $m > n$, $m = n + n'$; siendo en nuestro caso n el número de fotones producidos por el FITC y n' el número de fotoelectrones del centro NV.

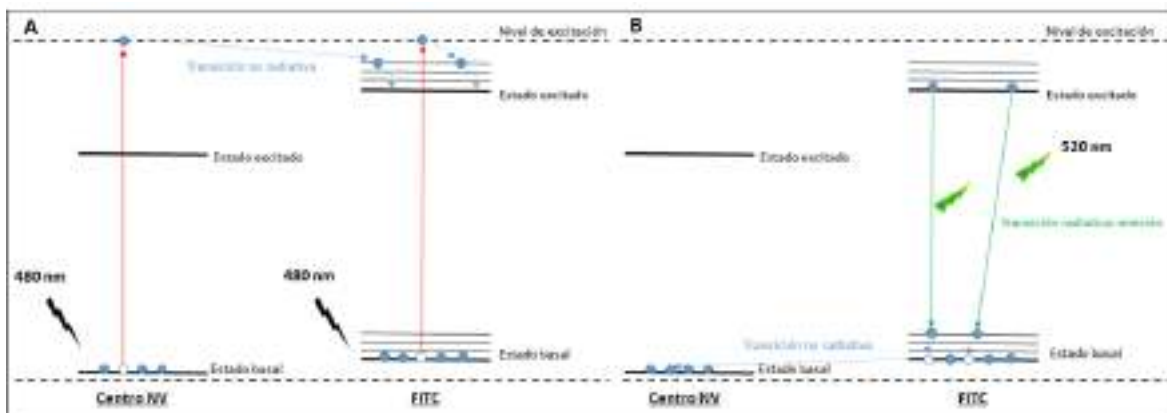


Figura 4.4 Representación esquemática del proceso de Incremento de la Fluorescencia por Transferencia de Electrones propuesto para el Sistema FND-FITC. **A:** Los electrones del centro NV y del FITC se excitan a 480 nm y los primeros son cedidos al estado excitado del FITC. **B:** Los electrones al pasar del estado excitado al basal emiten fotones. Para que el electrón del NV pueda aniquilarse en las bandas del FITC, previamente un electrón del estado basal del FITC pasa a cubrir el hueco presente en el estado basal del centro NV.

El proceso de FEET parece ser una variante del fenómeno de Transferencia de electrones fotoinducidos (PET en inglés). Un proceso de PET clásico es aquel en el que dos unidades: un donador y un aceptor, son unidos covalentemente o se encuentran muy cercanos, y el donador es capaz de excitarse con la incidencia de la luz. Como este sistema actúa como una entidad única, combinada, la excitación se deslocaliza, y la carga puede ser transferida a la unidad aceptora. El sistema luego puede relajarse al estado basal liberando la energía en forma de calor o mediante la emisión de luz por el aceptor (Sariciftci, 1992). La ocurrencia de este fenómeno ha sido descrita anteriormente (Sanders, 2016 y Ashokkumar, 2011), por ejemplo en sistemas en los que participa el buckminsterfullereno (una estructura de carbono), y en otro donde la fluoresceína ha estado unida al Zinc (Walkup, 2000).

El caso que estamos viendo en este trabajo, difiere en un aspecto del sistema clásico anteriormente descrito: tanto el “donador” como el “aceptor” son igualmente excitados por la luz incidente a 480 nm. No obstante, los nanodiamantes fluorescentes y el FITC están covalentemente unidos, comportándose como una sola molécula. Una vez que los

fotodectrones son deslocalizados, el sistema se relaja al estado basal por la vía que se encuentra más favorecida: la emisión de fluorescencia a 520 nm. Esta explicación es consistente con los resultados observados y parece ser la mejor justificación. Para probar su veracidad se pueden realizar estudios mediante técnicas como las espectroscopías de fotoemisión; lo que permitiría comparar la emisión de fotodectrones por cada componente del conjugado con los fotodectrones obtenidos al excitar el propio conjugado FND-FITC.

4.3 Interacción con células HeLa.

Una vez que comprobamos la unión de los nanodiamantes a la fluoresceína y la emisión de fluorescencia por los conjugados, procedimos al estudio de su interacción con una línea celular tumoral: HeLa (ATCC CCL-2). Este experimento, usando la microscopía confocal, permitirá comprobar si existe penetración de las nanopartículas a las células y en qué región se localizan. Para ello, la línea celular fue cultivada sobre cubreobjetos de cristal estériles, incubados en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con 5% de suero fetal bovino. Cuando la confluencia de la monocapa celular alcanzó el 60-80% las células fueron lavadas con PBS e incubadas con 200 μ L de los conjugados nanodiamante-FITC al 0.004% en DMEM, durante 3 y 24 horas. Los cubreobjetos se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂ por separado en placas de cultivo.

Posteriormente se utilizó un microscopio confocal Nikon Ti E C2+ (Japón), para obtener evidencias visuales de la interacción. El láser de 488 nm fue enfocado en la muestra a través de un objetivo de inmersión (en agua) 60X (N. A. 1,4) y se empleó el software NIS-Elements para la captura de las imágenes. Previo a la observación en el microscopio, las células se incubaron durante 30 minutos con el colorante DAPI (SIGMA-Aldrich) para teñir de azul el núcleo celular (1 mL de DAPI a 0.3 μ M en PBS por cubreobjeto). Tres pasos de lavado con

PBS fueron realizados antes, para eliminar el medio de cultivo presente, y después, para eliminar el DAPI no unido de manera específica.

Como podemos ver en la **Figura 4.5**, la fluorescencia verde del FITC indica la posición de los nanodiamantes a 3h y 24 h después de la incubación con las células. Tanto los DND como los FND se encuentran localizados rodeando las células o dentro de vesículas a las 3h post-incubación (**Figuras 4.5A y 4.5C**), mientras que a las 24h la mayoría de los nanodiamantes están dentro de las células, en el citosol o rodeando el núcleo (**Figuras 4.5B y 4.5D**).

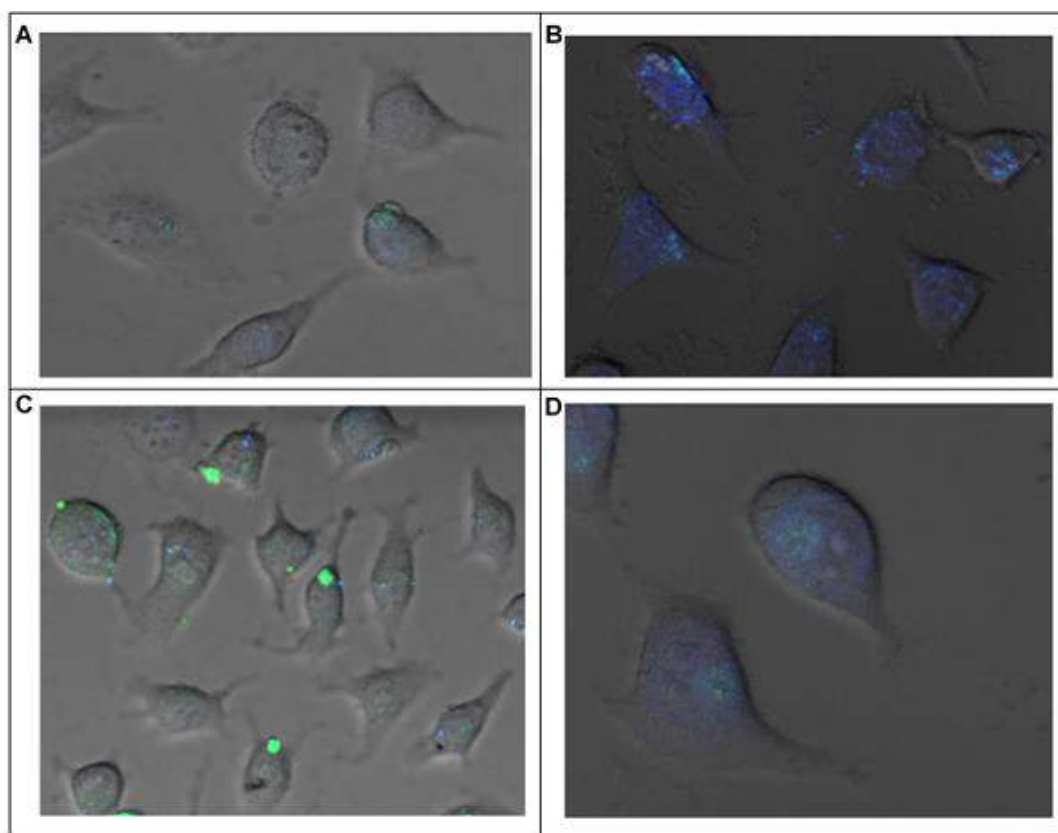


Figura 4.5 Imágenes de la interacción de los conjugados Nanodiamante-FITC con células HeLa a dos tiempos de incubación diferentes. **A:** DND-FITC después de 3 h. **B:** DND-FITC después de 24 h. **C:** FND-FITC después de 3 h. **D:** FND-FITC después de 24 h. Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 20X y ampliadas con posterioridad para su presentación. En color azul se visualizan los núcleos celulares teñidos con DAPI y en color verde se observan las posiciones de los conjugados ND-FITC.

Estos resultados concuerdan con observaciones previas de nanodiamantes de 46 y 100 nm que fueron internalizados por HeLa después de 2 h y 4 h de incubación, respectivamente (Faklaris, 2009 y Liu, 2009). En el año 2010, Martin y colaboradores reportaron la localización de nanodiamantes de 4 nm, tratados con un procedimiento de hidroxilación, en el núcleo de células HeLa a las 24 h de incubación (Martin, 2010). De esta manera, nuestros resultados están en correspondencia con observaciones similares previas de otros investigadores. La posición en núcleo a las 24 h tiene que ser externa debido al tamaño de los nanodiamantes empleados, por lo que se plantea una localización perinuclear.

Los núcleos teñidos con colorante DAPI son más visibles en las imágenes obtenidas a las 24 horas (**Figuras 4.5B y 4.5D**), ya que tanto la fluorescencia azul como la verde se encuentran en el mismo plano. Esto brinda una manera de confirmar que a las 3 horas la localización de los conjugados nanodiamante-fluoresceína es externa a la célula, ya sea a nivel de membrana citoplasmática o dentro de vesículas (puesto que no se ve el color azul del núcleo); mientras que las imágenes obtenidas a las 24 horas están tomadas en un plano interno, bajo la membrana celular, lo que permite observar los nanodiamantes y el núcleo a la misma vez.

El sistema propuesto en este trabajo puede ser de utilidad para estudios que necesitan un seguimiento de la localización de los nanodiamantes en la célula, tanto para investigaciones pre-clínicas como para evaluaciones de liberación de drogas o diagnóstico *in vitro*. Aunque el DND unido a FITC es observable en los tiempos de incubación probados, la ocurrencia del fenómeno de incremento de la fluorescencia antes comentado, en el conjugado FND-FITC, podría convertir a este en más apropiado para estudios de fluorescencia. Un análisis más extenso, usando tiempos de incubación más largos, debe ser realizado para establecer la incidencia real de este proceso en la emisión de fluorescencia a largo plazo.

Conclusiones del Capítulo 4.

En este trabajo aplicamos dos diferentes procedimientos para modificar las superficies de DND y FND con grupos funcionales, que permitieron la unión a los mediadores cisteína y APTES. Esto permitió obtener una conjugación efectiva de los nanodiamantes con FITC. La detección de las partículas unidas a fluoresceína, interactuando con células HeLa, pudo ser realizada mediante microscopía confocal, observando la localización perinuclear de los nanodiamantes a las 24 h. La ubicación de las nanopartículas en el interior de vesículas membranosas a las 3 h post-incubación sugiere un mecanismo de internalización por endocitosis. Este procedimiento sería de utilidad para estudios con nanodiamantes, *in vitro*, donde la localización en el interior de la célula es importante y es necesario su seguimiento. No obstante, con el fin de estudiar de manera más profunda el comportamiento de la emisión de fluorescencia en el tiempo, otros estudios más detallados y extensos deberían realizarse. El incremento de la fluorescencia emitida por el conjugado FND-FITC puede explicarse a través de la existencia de un fenómeno de FEET. Para ello hemos propuesto un sistema en el que los fotoelectrones de los centros NV son transferidos al FITC incrementando la intensidad total de la banda de emisión a 520 nm. Debido a la mejoría en la fluorescencia emitida, este sistema podría ser una opción de elección para estudios de microscopía y localización fluorescente de nanodiamantes.

Referencias

- Albani, J. R., 2007. Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Ashokkumar, P., Ramakrishnan, V. T., Ramamurthy, P., 2011. Photoinduced Electron Transfer (PET) Based Zn²⁺ Fluorescent Probe: Transformation of Turn-On Sensors into Ratiometric Ones with Dual Emission in Acetonitrile. *J. Phys. Chem. A* 115, 14292-14299.
- Chen, N. T., Cheng, S. H., Liu, C. P., Souris, J. S., Chen, C. T., Mou, C. Y., Lo, L. W., 2012. Recent Advances in Nanoparticle-Based Förster Resonance Energy Transfer for Biosensing, Molecular Imaging and Drug Release Profiling. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 16598-16623.
- Faklaris, O., Joshi, V., Irinopoulou, T., Tauc, P., Girard, H., Gesset, C., Senour, M., Thorel, A., Arnault, J. Ch., Boudou, J. P., Curmi, P. A., Treussart, F., 2009. Photoluminescent diamond nanoparticles for cell labeling: study of the uptake mechanism in mammalian cells. *ACS Nano.* 3 (12), 3955-3962.
- Fudala, R., Raut, S., Maliwal, B. P., Zerda, T. W., Gryczynski, I., Simanek, E. E., Borejdo, J., Rich, R., Akopova, I., Gryczynski, Z., 2014. FRET Enhanced Fluorescent Nanodiamonds. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 14(13), 1127-1133.
- Ioannou, D., Griffin, D. K., 2010. Nanotechnology and molecular cytogenetics: the future has not yet arrived. *Nano Rev.* 1, 5117-5130.
- Kim, J. H., Kim, J. S., Choi, H., Lee, S. M., Jun, B. H., Yu, K. N., Kuk, E., Kim, Y. K., Jeong, D. H., Cho, M. H., Lee, Y. S., 2006. Nanoparticle Probes with Surface Enhanced Raman Spectroscopic Tags for Cellular Cancer Targeting. *Anal. Chem.* 78, 6967-6973.
- Liu, K. K., Wang, C. C., Cheng, C. L., Chao, J. I., 2009. Endocytic carboxylated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and differentiation in cancer and stem cells. *Biomaterials.* 30 (26), 4249-4259.
- Manson, N. B., Harrison, J. P., 2005. Photo-ionization of the nitrogen-vacancy center in diamond. *Diamond Relat. Mater.* 14, 1705-1710.
- Martin, R., Alvaro, M., Herance, J. R., Garcia, H., 2010. Fenton-Treated Functionalized Diamond Nanoparticles as Gene Delivery System. *ACS Nano.* 4(1), 65-74.
- Sam, S., Touahir, L., Andresa, J. S., Allongue, P., Chazalviel, J. N., Gouget-Laemmel, A. C., de Villeneuve, C. H., Morailon, A., Ozanam, F., Gabouze, N., Djebbar, S., 2010. Semiquantitative Study of the EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces. *Langmuir.* 26(2), 809-814.

- Sanders, A. M., Magnanelli, T. J., Bragg, A. E., Tovar, J. D., 2016. Photoinduced Electron Transfer within Supramolecular Donor–Acceptor Peptide Nanostructures under Aqueous Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 3362–3370.
- Sapsford, K. E., Berti, L., Medintz, I. L., 2006. Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor–Acceptor Combinations. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 4562–4588.
- Sariciftci, N. S., Smilowitz, L., Heeger, A. J., Wudi, F., 1992. Photoinduced Electron Transfer from a Conducting Polymer to Buckminsterfullerene. *Science.* 258, 1474–1476.
- Solarska, K., Gajewska, A., Skolimowski, J., Wos, R., Bartosz, G., Mitura, K., 2010. Effect of non-modified and modified nanodiamond particles by Fenton reaction on human endothelial cells. *J. Achiev. Mater. Manufact. Engineer.* 43(2), 603–607.
- Swoboda, G., Hasselbach, W., 1985. Reaction of Fluorescein Isothiocyanate with Thiol and Amino Groups of Sarcoplasmic ATPase. *Naturforsch. C: Biosci.* 40, 863–875.
- Tu, J.-S., Perevedentseva, E., Chung, P.-H., Cheng, C.-L., 2006. Size-dependent surface CO stretching frequency investigations on nanodiamond particles. *J. Chem. Phys.* 125, 174713.
- Veeranarayanan, S., Poulouse, A. C., Mohamed, S., Aravind, A., Nagaoka, Y., Yoshida, y., Maekawa, T., Kumar, D. S., 2012. FITC Labeled Silica Nanoparticles as Efficient Cell Tags: Uptake and Photostability Study in Endothelial Cells. *J. Fluoresc.* 22, 537–548.
- Volcke, C., Gandhiraman, R. P., Gubala, V., Raj, J., Cummins, T., Fonder, G., Nooney, R. I., Mekhalif, Z., Herzog, G., Daniels, S., Arrigan, D. W. M., Cafolla, A. A., Williams, D. E., 2010. Reactive amine surfaces for biosensor applications, prepared by plasma-enhanced chemical vapour modification of polyolefin materials. *Biosens. Bioelectron.* 25, 1875–1880.
- Walkup, G. K., Burdette, S. C., 2000. A New Cell-Permeable Fluorescent Probe for Zn²⁺. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 5644–5645.

CAPÍTULO 5: Obtención de nanoestructuras híbridas diamante-oro, caracterización y estudio de su interacción con la célula viva.

Este capítulo trata primeramente de la obtención de nanopartículas híbridas, sintetizadas a partir de los nanodiamantes de detonación (desaglomerados según lo descrito en el **Capítulo 3**) y de los nanodiamantes fluorescentes con centros NV (usados en el **Capítulo 4**) y su unión con nanopartículas de oro de 15-20 nm, producidas en nuestro laboratorio. Posteriormente los híbridos se conjugaron con FITC y se analizaron algunas de sus propiedades ópticas. Además, se estudió su interacción con células HeLa mediante la microscopía confocal y se realizaron estudios de biocompatibilidad, usando el ensayo de viabilidad celular por reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, del inglés 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide).

Los nanodiamantes de detonación Nanopure-G01, 4 wt %, de la firma Plasmachem GmbH, USA fueron desagregados y carboxilados siguiendo el procedimiento descrito en el **Capítulo 3**. Los nanodiamantes fluorescentes de 40 nm (con 1-4 centros NV), fueron adquiridos de la firma Adamas Nanotechnology, USA. El isotiocianato de fluoresceína (fluoresceína, FITC), la cisteína y el MTT se compraron a la firma Sigma-Aldrich Company, USA.

Las nanopartículas de oro se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito por McFarland (McFarland, 2004). Brevemente, 20 mL de HAuCl_4 1 mM fueron calentados hasta la ebullición en una placa térmica con agitación. A continuación, se adicionaron 2 mL de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (citrato de sodio) 38.8 mM y la solución se dejó en las mismas condiciones durante 10-15 minutos. Cuando el líquido adquirió un color rojo oscuro, fue retirado de la agitación y del calentamiento y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Las nanopartículas obtenidas, de tamaños entre 15-20 nm, se conservaron a 4°C hasta su uso.

5.1 Obtención de los híbridos.

La incorporación de grupos amino a las superficies de los nanodiamantes (cND y FND) se logró mediante la unión a cisteína. Para ello se realizó la activación de los grupos carboxilo en ambos nanodiamantes mediante la reacción EDC/NHS en presencia de cisteína, descrita en el **Capítulo 4**. La unión a este aminoácido permitirá contar con grupos amino y tiol en los nanodiamantes, que pueden ser usados para posteriores funcionalizaciones. En este caso, el grupo amino de la cisteína se une a los carboxilos activados en la superficie de los nanodiamantes, mientras que su grupo tiol permanece expuesto. La absorción directa de las nanopartículas metálicas sobre los diamantes ocurrirá a través de su unión a este grupo tiol de la cisteína (Ghosh, 2008).

Para la obtención del nanohíbrido diamante-metal, se preparó una mezcla de la dispersión de oro con los nanodiamantes modificados con cisteína (1 mg/mL in PBS) en una relación de volúmenes 5:1. Ambas mezclas (cND+Au y FND+Au), se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con agitación esporádica. Finalmente los tubos se centrifugaron 20 minutos a 3500 rpm y los sedimentos se resuspendieron en PBS para ser guardados a 4⁰C hasta su uso. Mediante la microscopía electrónica de transmisión se pudo confirmar la formación de los híbridos. El equipo utilizado fue un Jeol 2010 F (JEOL Ltd., Akishima-shi, Japan) a 200 kV. Las suspensiones a observar (10 μ L) fueron previamente depositadas en una rejilla de cobre y secadas al vacío durante 24 h.

La **Figura 5.1** muestra un resumen del procedimiento seguido y las imágenes de los híbridos obtenidos. Como puede observarse, se obtuvieron partículas cNDAu con un tamaño aproximado a los 140 nm, mientras que los híbridos FNDAu son de aproximadamente 90 nm. Como vimos en el capítulo anterior para el caso de nanodiamantes carboxilados, con

tamaños cercanos a los 100 nm, estos fueron internalizados por la célula HeLa luego de 3 h de incubación. Teniendo en cuenta que no hay mucha diferencia con el tamaño de los híbridos obtenidos, se podría esperar que tuvieran un comportamiento similar en su interacción con la célula.

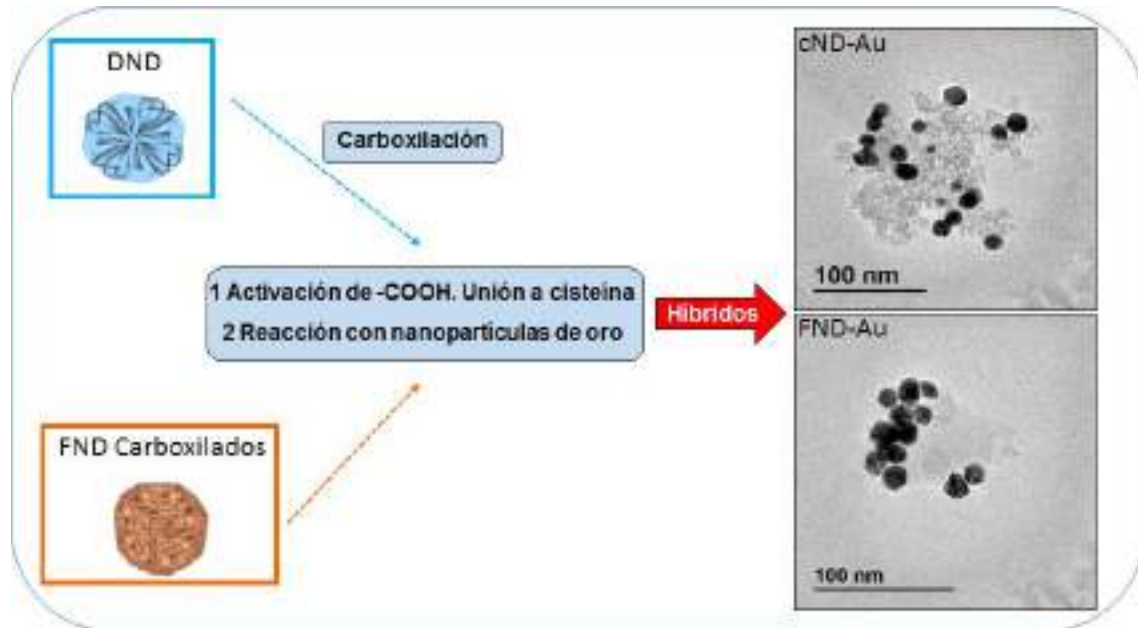


Figura 5.1 Representación esquemática del procedimiento usado. Imágenes de los híbridos obtenidas por TEM.

Las imágenes del TEM mostraron que la cantidad y distribución de las nanopartículas de oro unidas a los nanodiamantes es variable y no llega a cubrirse toda la superficie del diamante. Esto sugiere que hay moléculas de cisteína que permanecen libres y pueden ser utilizadas para funcionalizaciones posteriores.

5.2 Reacción con FITC y medición de la fluorescencia.

La unión del fluoróforo a las nanoestructuras se produjo mediante la interacción con cisteínas libres de la superficie de los nanodiamantes. El procedimiento seguido se puede resumir de la siguiente manera: Primeramente, un miligramo de FITC fue adicionado a cada tubo que contenía 1 mL del conjugado en PBS. A continuación, las mezclas se dejaron a temperatura ambiente, en la oscuridad, con agitación esporádica. Luego de 4h, los tubos fueron centrifugados y los sedimentos lavados con PBS, redispersados y conservados a 4⁰C hasta su uso.

Para el estudio de la fluorescencia de los híbridos unidos a FITC, se prepararon diluciones al 0,1% en PBS. El material fue transferido posteriormente a una cubeta de cuarzo y el análisis se realizó en el equipo Fluorolog (Horiba JobinYvon, USA), utilizando el software FluorEssence 3.5.1.99. Los datos fueron graficados usando el software OriginPro 9.0.0.

Los espectros normalizados de la emisión de FND, FNDAu y FNDAu-FITC pueden observarse en la **Figura 5.2**. La fluorescencia de los nanodiamantes y del híbrido sin fluoresceína es muy similar, con dos picos principales que se corresponden con el espectro del FND (520 y 575 nm). La banda de emisión a 575 nm coincide con la reportada para el centro NV⁰ (Manson, 2005), mientras que la banda de 520 nm ha sido observada anteriormente en nanodiamantes en coloides y se plantea que es debida a la interacción entre los grupos funcionales OH y C=O en la superficie de las nanopartículas (Xiao, 2015). De acuerdo con estos espectros, las nanopartículas de oro usadas no aportan fluorescencia al espectro de los híbridos, pero sí introducen un corrimiento en el pico de FITC, de los 520-530 nm observados en el capítulo anterior para FND-FITC hasta 515 nm, cercano a la longitud de onda de la resonancia del plasmón para estas AuNPs (523 nm).

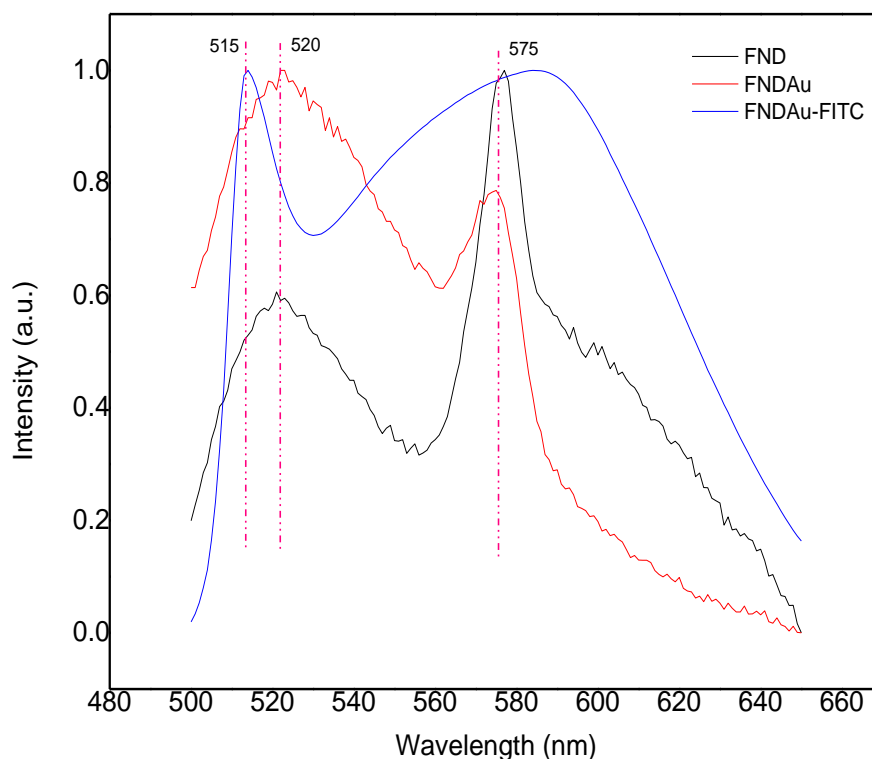


Figura 5.2. Espectros de emisión normalizados de FND, FNDAu y FNDAu-FITC

El espectro del híbrido con FITC mostró, además de la banda a 515 nm del fluoróforo, una región de elevada intensidad en el rango entre los 540 y los 620 nm, con un máximo cercano a los 575 nm, que pudiera ser indicativo de una amplificación de la banda correspondiente al centro NV^0 . Para explicar esta situación debemos analizar las condiciones que se dan en este híbrido unido a un fluoróforo, donde coinciden dos emisores de fluorescencia (el centro NV y el FITC) y una nanopartícula metálica, que puede contribuir con la resonancia de su plasmón de superficie a la modificación del espectro total.

En el capítulo anterior discutimos la existencia del fenómeno de FEET para un sistema FND-FITC. En el caso del conjugado FNDAu-FITC puede estar dándose el mismo proceso entre el centro NV y la molécula de fluoresceína. Esto justificaría la aparición de una banda

incrementada de emisión del FITC y la ausencia de emisión del centro NV. No obstante, cuando observamos las mediciones al Fluorolog, vemos que el espectro del híbrido con fluoresceína (**Figura 5.2**) mostró la banda intensa para el fluoróforo a 515 nm, y además una región con máximo de emisión a 575 nm, que puede relacionarse con el centro NV, cuya intensidad tiene un nivel similar a la del pico del FITC.

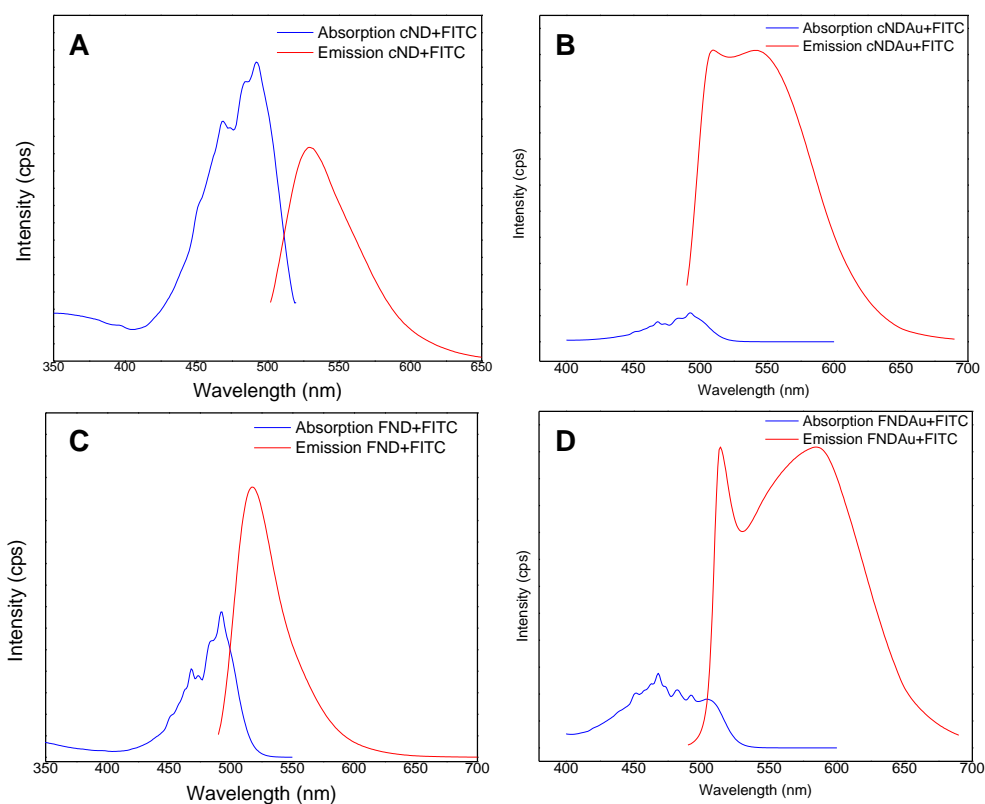


Figura 5.3 Espectros de absorción y emisión de fluorescencia de 4 nanoestructuras unidas a FITC. **A:** Nanodiamantes de detonación carboxilados. **B:** Híbrido cND-Oro. **C:** Nanodiamantes fluorescentes con centros NV. **D:** Híbrido FND-Oro.

La existencia de elevados valores de fluorescencia emitida, varios órdenes mayor que la intensidad de luz de excitación en la zona de absorción, se pudo observar en ambos conjugados HGD-FITC. Lo que sugiere que este incremento de la intensidad emitida no está

relacionado sólo a la existencia de un fenómeno de FEET entre el NV⁰ y la fluoresceína (que no se da en el caso del conjugado cNDAu-FITC), sino que hay otro componente del sistema que está incidiendo en este comportamiento: el Oro. La diferencia entre la intensidad de la luz absorbida y la luz emitida es mayor en las nanopartículas con AuNPs que en aquellas sin oro (**Figura 5.3**).

El rol de las AuNPs en estudios de fluorescencia (Huang, 2007) y también en sistemas de transferencia de energía ha sido previamente estudiado por varios autores (Shi, 2015; Acuna, 2012 y Wang, 2009). No obstante, en este caso estamos observando un comportamiento del oro como amplificador de la fluorescencia, que se ha nombrado como Efecto Antena (Maye, 2010).

El FITC es un emisor de alto rendimiento cuántico (Price, 2011), y su emisión de fluorescencia puede verse incrementada por un campo eléctrico asociado a la excitación del plasmón localizado de una nanopartícula metálica (Herrmann, 2015). Herrmann y colaboradores en 2015 observaron la intensificación de la eficiencia del FRET en sistemas unidos a nanopartículas de oro que actuaban como antenas. En nuestros experimentos, la intensidad de la fluorescencia fue 6 veces mayor que la intensidad de la luz absorbida en ambos casos (**Figuras 5.3B y D**), sugiriendo la prevalencia de un efecto amplificador de la fluorescencia en los híbridos, que puede ser explicado por la existencia de este efecto antena del oro.

Aunque las AuNPs amplificaron la emisión de fluorescencia de FITC en el cNDAu-FITC y pudieran estar afectando el FEET en el híbrido FNDAu-FITC (incrementando tanto la intensidad de la banda de la fluoresceína como la del centro NV), no se ve un efecto antena sobre el centro NV en el híbrido FNDAu sin fluoresceína (**Figura 5.2**). Esto se debe a que el

rendimiento cuántico de la emisión de los centros NV, que hace algunos años era considerado cercano a 1, es en realidad muy variable de nanocrystal a nanocrystal y puede llegar a un valor tan bajo como el 25% (Frimmer, 2013). Este hecho reduce el efecto de amplificación debido a la antena de oro (Herrmann, 2015) y es la explicación de que no se observe este efecto cuando analizamos la emisión del híbrido FNDAu sin FITC.

5.3 Interacción entre los nanohíbridos y la célula viva.

El cultivo de la línea celular tumoral HeLa (ATCC CCL-2) en cubreobjetos de cristal se realizó como se describe en el **Capítulo 4**. De igual manera se llevó a cabo la visualización de la fluorescencia en el microscopio confocal Nikon Eclipse Ti (Japón). El estudio de la viabilidad de las células HeLa incubadas con las nanopartículas por separado y con los híbridos, se realizó mediante el ensayo MTT (Van de Loosdrecht, 1994).

La posición de los nanohíbridos unidos a FITC al interactuar con las células HeLa se pudo observar al microscopio después de 3 y 24 horas de incubación (**Figura 5.4**). Ambos híbridos se encontraron dentro de vesículas externas a la célula o al nivel de la membrana celular a las 3 horas, mientras que a las 24 horas la localización es interna, como puede deducirse de la ubicación del color verde de la fluoresceína sobre el azul del DAPI en el núcleo, que no es observable a las 3 horas. Esto no quiere decir que necesariamente los nanodiamantes hayan entrado al núcleo, sino que están por debajo de la membrana celular, o sea, dentro de la célula. Este resultado coincide con nuestras observaciones previas (ver **Capítulo 4**), para conjugados de nanodiamantes con FITC.

La realización del ensayo MTT permitió estudiar el efecto de los híbridos en la viabilidad de las células HeLa. Como hemos visto en nuestros experimentos, cND, FND, cNDAu y

FND Au son capaces de entrar a la célula e interactuar con organelos celulares y la membrana nuclear. En el caso de las AuNPs, su incorporación mediante endocitosis en células HeLa ha sido reportada por otros autores (Levy, 2010). Así, este ensayo permitirá evaluar la presencia de un efecto nocivo de las nanopartículas al estar en contacto con la célula, no solo fuera sino también dentro de ella.

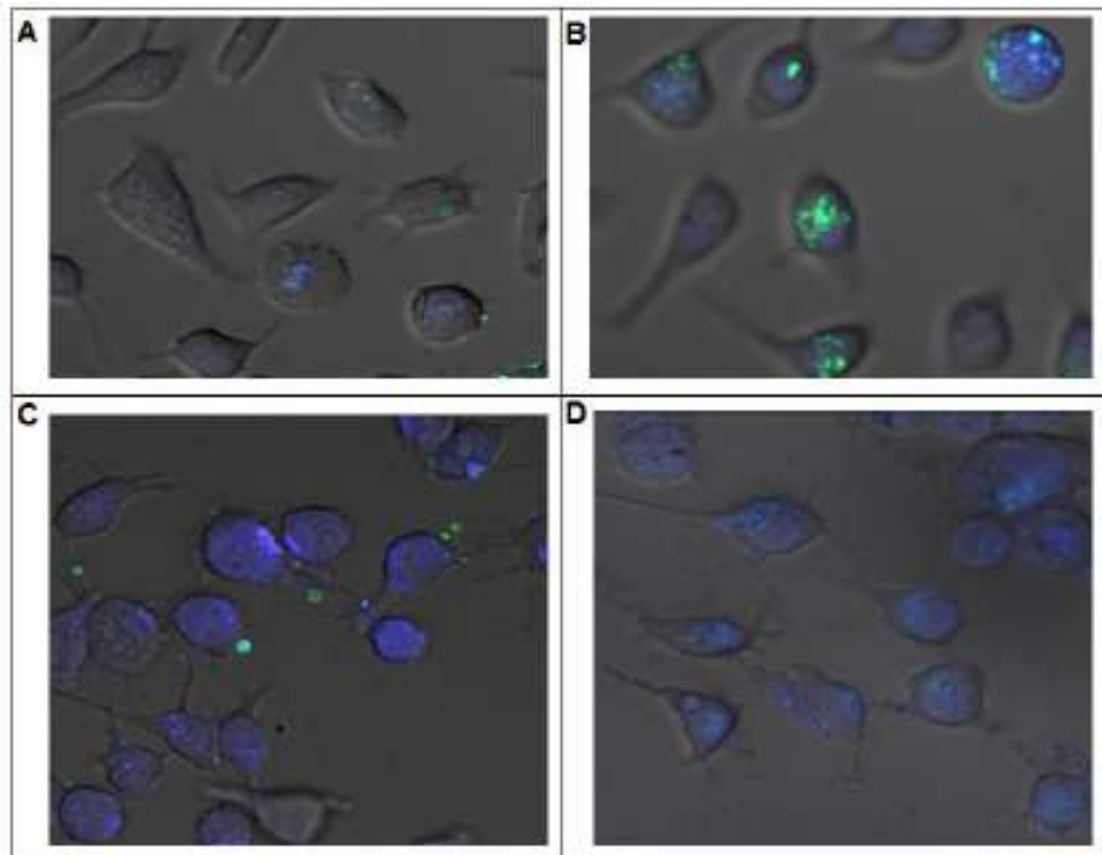


Figura 5.4 Imágenes de la interacción de los conjugados HGD-FITC con células HeLa a 3 y 24 h de incubación. **A:** cNDAu-FITC después de 3 h. **B:** cNDAu-FITC después de 24 h. **C:** FNDAu-FITC después de 3 h. **D:** FNDAu-FITC después de 24 h. Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 20X y ampliadas con posterioridad para su presentación. En color azul se visualizan los núcleos celulares teñidos con DAPI y en color verde se observan las posiciones de los conjugados ND-FITC.

Para la realización del experimento se prepararon al menos dos diluciones de cada nanoestructura. Las muestras más concentradas de cND, cNDAu y FNDAu estaban al 0.02%

en PBS y la concentración de trabajo fue de 0.004% en PBS. En el caso de FND probamos el mismo valor de concentración de trabajo y una concentración menor, al 0.002% en PBS. Para las AuNPs se prepararon tres diluciones de las partículas sintetizadas: 1/5, 1/10 y 1/20. Mientras que el control celular para el 100% de viabilidad fue un cultivo de células HeLa incubadas con PBS sin nanopartículas.

La absorbancia a 570 nm (**Figura 5.5A**) mostró una disminución de la actividad metabólica de las células HeLa para mayores concentraciones de las nanopartículas, lo que puede asociarse a un efecto tóxico inducido por las NPs de manera dosis-dependiente. Aunque todas las condiciones provocaron un mayor efecto tóxico a la mayor concentración evaluada, las AuNPs mostraron el más alto valor de incidencia en las tres diluciones probadas.

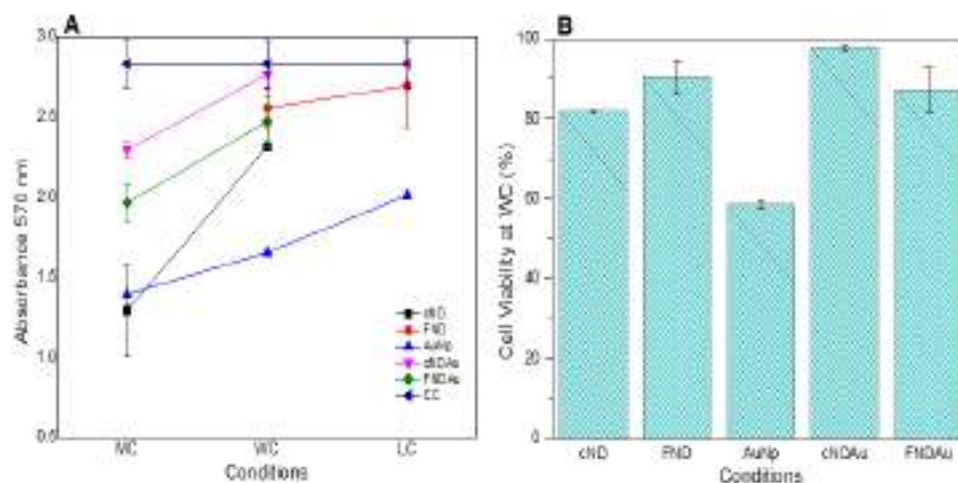


Figura 5.5 A: Absorción a 570 nm debido a la reducción del MTT por las células HeLa metabólicamente activas, a las concentraciones probadas de las nanopartículas (MC: mayor concentración, WC: concentración de trabajo, LC: menor concentración). **B:** Viabilidad, expresada en porcentaje, de las células HeLa incubadas durante 3 horas con la concentración de trabajo de las nanopartículas estudiadas.

Como puede observarse en la **Figura 5.5B**, el porcentaje de viabilidad de las células HeLa, incubadas con la concentración de trabajo propuesta, fue mayor al 80% en todos los casos excepto el oro. No obstante, a pesar del efecto negativo de las diluciones de AuNPs sobre las

células, la presencia del metal en los HGD no muestra las mismas consecuencias. Los porcentos de viabilidad para las condiciones donde se incubó con cNDAu y FNDAu: 97.65% y 87.27%, respectivamente, mostraron que la cantidad de oro presente en los híbridos no afecta negativamente la viabilidad de las células HeLa a las 3 horas de incubación, puesto que el valor porcentual no alcanza niveles por debajo del valor aceptado (80% de viabilidad) (López-García, 2014).

Al realizar un análisis de varianza (ANOVA) para detectar diferencias entre los resultados obtenidos para cada condición estudiada (Ver **Anexo 1**), se obtuvo que sí existen diferencias entre las medias de algunas de las condiciones probadas. El ANOVA encontró diferencias significativas entre el control de células y las condiciones cND y FNDAu. Esto significa que, estadísticamente, ninguna de estas dos condiciones produjo valores de viabilidad celular que se puedan considerar iguales a los resultados obtenidos para el control celular. No obstante, esto no va en contra de lo comentado en el párrafo anterior, ya que, en primer lugar, el conjunto de valores evaluado en cada condición fue muy pequeño (dos réplicas por condición), lo que hace que el procedimiento estadístico no pueda ser un medidor de lo que sucedería en una población mayor de datos. En segundo lugar, aunque dos o más condiciones puedan dar diferencias significativas en viabilidad con respecto al control, siempre que el valor de viabilidad se encuentre por encima del 80%, estas condiciones se pueden considerar no tóxicas para este experimento (López-García, 2014).

Este análisis resultó mayormente esclarecedor para el caso de la condición donde se emplearon las AuNPs. Como puede observarse en la **Figura IB** del **Anexo 1**, la media de los datos de la condición AuNP fue significativamente distinta de las medias de todas las demás

poblaciones de datos, coincidiendo con que es la única condición que produjo valores de viabilidad por debajo del 80%.

Conclusiones del Capítulo 5.

Mediante una secuencia de procedimientos físico-químicos relativamente rápida y sencilla, llegamos a la obtención de dos nanoestructuras híbridas entre dos tipos de nanodiamantes y nanopartículas de oro. La evidencia experimental sugiere un efecto amplificador del oro sobre la fluorescencia de moléculas de FITC conjugadas a los híbridos. Este efecto pudiera ser aprovechado también en experimentos similares con otros agentes fluorescentes unidos a los HGD.

El hecho de contar en una misma estructura con la vasta superficie funcionalizable del nanodiamante y las características de las nanopartículas de oro que les permiten actuar como agentes secuestradores de fluorescencia en sistemas FRET, o incrementadores en otros experimentos, eleva las posibilidades de aplicación de estos híbridos en la Bio-nanomedicina. Las propiedades ópticas y foto-térmicas de las AuNPs están ahora en un entorno de carbono más biocompatible que brinda mayores oportunidades para la funcionalización y la combinación con moléculas terapéuticas o para el diagnóstico.

Algunas de las ventajas de los híbridos para sistemas biológicos, como el aumento de la superficie funcionalizable y una mejor vía de entrada a la célula para las nanopartículas metálicas, son evidenciadas en nuestros resultados. Aunque aún es necesaria la realización de estudios más profundos de biocompatibilidad, las evidencias de penetración en células HeLa a las 3 horas y los resultados positivos obtenidos con el ensayo MTT, son signos del gran potencial de estos HGD en aplicaciones biomédicas.

El uso de FNDs con mayor cantidad de centros NV y mayor emisión de fluorescencia podría proporcionar un híbrido con aplicaciones en experimentos Transferencia de Energía, a la vez que se eliminaría la necesidad de agentes fluorescentes externos. La liberación controlada de

fármacos, la terapia fototérmica y la imagenología, están entre las áreas de impacto de nanoestructuras como las obtenidas en este trabajo.

Referencias

- Acuna G. P., Bucher, M., Stein, I. H., Steinhauer C., Kuzyk A., Holzmeister P., Schreiber R., Moroz A., Stefani F. D., Liedl T., Simmel F. C., Tinnefeld P. 2012. Distance Dependence of Single-Fluorophore Quenching by Gold Nanoparticles Studied on DNA Origami. *ACS Nano*. 6(4): 3189–3195.
- Frimmer M., Mohtashami A., Koenderink A. F. 2013. Nanomechanical method to gauge emission quantum yield applied to NV-centers in nanodiamond. *Appl. Phys. Lett.* 102: 121105.
- Ghosh P., Han G., De M., Kim C. K., Rotello V. M. 2008. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 60: 1307-1315.
- Herrmann J., Höppener C. 2015. Extension of the FRET interaction range for antenna-coupled dye pairs. *ICES. Abstract P1.11*.
- Huang C.C., Yang Z., Lee K. H., Chang H. T. 2007. Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoparticles for Sensing Mercury (II). *Angew. Chem. Int. Ed.* 46: 6824-6828.
- Levy R., Shaheen U., Cesbron Y., See V. 2010. Gold nanoparticles delivery in mammalian live cells: a critical review. *Nano Rev.* 1: 4889.
- López-García J., Lehocký M., Humpolíček P., Sába P. 2014. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *J. Funct. Biomater.* 5: 43-57.
- Manson N. B., Harrison J. P. 2005. Photo-ionization of the nitrogen-vacancy center in diamond. *Diamond Relat. Mater.* 14: 1705-1710.
- Maye M. M., Gang O., Cotlet M. 2010. Photoluminescence enhancement in CdSe/ZnS–DNA linked–Au nanoparticle heterodimers probed by single molecule spectroscopy. *Chem. Commun.* 46: 6111–6113.
- McFarland A. D., Haynes C. L., Mirkin C. A., Van Duyne R. P., Godwin H. A. 2004. Color My Nanoworld. *J. Chem. Educ.* 81(4).
- Price R. L., Jerome G. W. 2011. *Basic Confocal Microscopy*. Springer Science & Business Media, New York.
- Shi J., Chan C., Pang Y., Ye W., Tian F., Lyu J., Zhang Y., Yang M. 2015. A fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor based on graphene quantum dots (GQDs) and gold nanoparticles (AuNPs) for the detection of *mecA* gene sequence of *Staphylococcus aureus*. *Biosens. Bioelectron.* 67: 595–600.
- Van de Loosdrecht A. A., Beelen R. H. J., Ossenkoppelle G. J., Broekhoven M. G., Langenhuijsen M. M. A. C. 1994. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated

cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J. Immunol. Methods.* 174: 311-320.

Wang X., Guo X. 2009. Ultrasensitive Pb²⁺ detection based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) between quantum dots and gold nanoparticles. *Analyst.* 134: 1348-1354.

Xiao J., Liu P., Yang G. W. 2015. Nanodiamonds from coal under ambient conditions. *Nanoscale.* 7: 6114-6125.

CONCLUSIONES GENERALES DE LA TESIS.

La aplicación del método “Desaglomeración asistida con perlas de sílica” permitió reducir el tamaño de los aglomerados de nanodiamantes de detonación, desde más de 1 μm hasta valores en el orden de los 100 nm. Estos pequeños aglomerados pudieron ser eficientemente modificados con la adición de grupos carboxilo e hidroxilo a sus superficies, lo que garantizó la unión posterior a moléculas funcionales tales como agentes mediadores (silicatos y cisteína) y fluoróforos (FITC). El estudio de la interacción de estos nanodiamantes parcialmente desaglomerados con las células rojas de la sangre, demostró que a la concentración propuesta de 0.004% no se genera un efecto negativo en los eritrocitos en cuanto a su viabilidad o en la obtención de la señal Raman de la hemoglobina.

La aplicación de dos procedimientos (reacción con cisteína/reacción con APTES) para obtener nanodiamantes carboxilados unidos al fluoróforo FITC, mostró que ambos métodos pueden ser usados con este propósito. De la incubación de los conjugados nanodiamante-fluoresceína con células HeLa durante 3 y 24 horas, podemos concluir que tanto los DND desaglomerados por BASD, como los FND de aproximadamente 40 nm, pueden ser internalizados por esta célula tumoral a las 3 h de incubación; observándose su ubicación intracitoplasmática a las 24 horas.

El aumento de la emisión de fluorescencia en el conjugado FND-FITC, con respecto a la luz absorbida, sugiere la ocurrencia de un proceso de Incremento de la Fluorescencia por Transferencia de Fotelectrones entre los centros NV del FND y la fluoresceína. Este efecto deberá ser estudiado a mayor profundidad para entender sus implicaciones reales en estudios de fluorescencia.

Mediante la aplicación de un procedimiento físico-químico relativamente rápido y sencillo, se pudieron obtener nanopartículas híbridas nanodiamante-oro. Estos HGD presentan tamaños aproximados de 140 nm (cNDAu) y 80 nm (FNDAu) y no afectan la viabilidad de células HeLa en estudios realizados a 3 horas de incubación. La incorporación de los híbridos por la célula pudo ser detectada por microscopía de fluorescencia a las 3 y 24 h, confirmando un comportamiento similar al observado anteriormente para los cND y FND.

La fluorescencia del FITC resultó incrementada sustancialmente cuando se unió a los HGD, más aún que en el sistema FEET anteriormente propuesto, en ambos casos. Estas observaciones sugieren la existencia de un efecto antena debido a la presencia del oro, que amplifica la emisión de las moléculas del fluoróforo en su cercanía, sobre la superficie del diamante. De esta manera, se obtuvieron nanopartículas híbridas que pueden funcionar como incrementadoras de la emisión de fluorescencia de moléculas unidas a ellas.

De igual forma, los HGD pueden ser incorporados eficientemente al interior de células tumorales con reducida afectación de la viabilidad celular, en comparación a sus componentes individuales. Además de ello, la existencia de una extensa superficie funcionalizable, es otro de los factores que convierte a los híbridos obtenidos en herramientas de utilidad en aplicaciones nano-biomédicas; con potencialidad para proyectos de liberación de medicamentos, imagenología, etc.

El procedimiento seguido y descrito en la tesis permite variaciones en cuanto a los mediadores, grupos y moléculas funcionales a unir. Convirtiéndose en una metodología por la que se pueden obtener diferentes partículas híbridas multifuncionales, en dependencia del objetivo o la función final que se requiera. El uso de uno u otro tipo de nanodiamante deberá estar determinado por la necesidad o no de la fluorescencia de los centros Nitrógeno-

Vacancia. En casos en que esta fuera necesaria podrían usarse FNDs con mayor cantidad de centros NV, cuidando no introducir variaciones en el tamaño final del híbrido.

ANEXO 1

Resultados del Análisis de Varianza a los datos obtenidos en el ensayo MTT, en el **Capítulo 5**. El ANOVA se realizó empleando el software *OriginPro 9.0*.

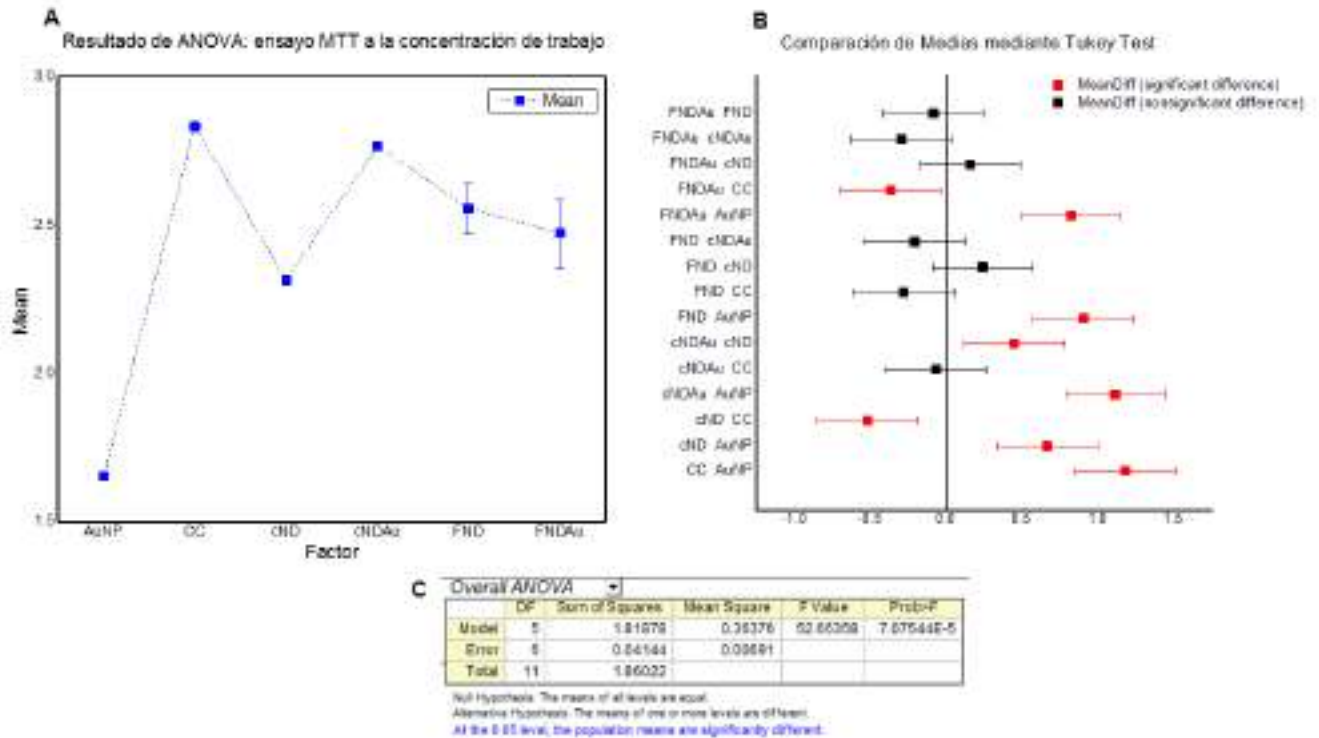


Figura I. A: Gráfico de los valores de las medias en cada condición. El control de células tiene el valor más alto de la media, lo que se corresponde con el 100% de viabilidad celular. **B:** Gráfico de la comparación de las medias de las poblaciones de dos en dos. En rojo los valores que son significativamente diferentes y en color negro cuando los valores no resultan diferentes. En todas las comparaciones con la condición AuNP, ésta resulta diferente a las demás. La condición CC resulta diferente a las condiciones cND y FNDAu. **C:** Tabla con el valor de F, estadístico del análisis, cuya significación es menor de 0.05, estableciendo la diferencia estadística entre dos o más de las poblaciones de datos analizadas.

Agradecimientos

En diferentes momentos del desarrollo de este trabajo de tesis han participado varias instituciones y numerosas personas hacia las cuales me siento totalmente agradecido.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Técnica de México (Conacyt), por contar con programas de financiamiento para estudios de posgrado de nacionales y extranjeros, y estimular así, fuertemente, la superación y el desarrollo profesional del país en múltiples áreas, además de contribuir a la formación de profesionales de otras partes del mundo. Gracias al Conacyt por darme esta gran oportunidad.

En segundo lugar a la Universidad de Sonora, al Departamento de Investigación en Física, y en especial al programa de posgrado en Física. La acogida de esta institución, el haberme sentido respetado y considerado como parte de la misma, desde un inicio, han sido también aspectos que me estimularon positivamente durante estos 4 años y medio. Un fuerte agradecimiento a los trabajadores de la secretaría del DIFUS, y a los doctores que han estado al frente de la coordinación del posgrado y del departamento, por toda su ayuda.

Al Dr. Raúl Riera, cuya guía teórica y metodológica y su preocupación constante por nuestro desarrollo durante este tiempo, son para mí invaluable. Al Dr. Martín Pedroza, por la acogida en su grupo de trabajo, en sus proyectos, haciéndonos parte de un equipo trabajador y en constante evolución. A todos los integrantes de este grupo, cuyos proyectos, todos, en diferentes momentos nos han permitido seguir adelante con el trabajo, agradecimiento especial a la Dra. Karla Santacruz, la Dra. Erika Silva, la Dra. Araceli Angulo, el Dr. Alexel Burgara y al Dr. Andrei Sarabia, con los que siempre aprendí. Al Dr. Andrei además le agradezco su imprescindible apoyo y su precisa asesoría en una gran parte del trabajo de tesis.

A otros laboratorios y grupos de la Unison que me han permitido hacer uso de sus instalaciones y equipos para trabajar. A los laboratorios del Dr. Josué Juárez y del Dr. Enrique Álvarez, en Nanotecnología, especialmente al Dr. Roberto Carrillo por toda la ayuda. Al Dr. Rodrigo Meléndrez, muchas gracias. Al laboratorio del Dr. Velázquez en Químico-Biólogos, especialmente a la M.C. Lucila Rascón y al estudiante de doctorado Efraín Alday por toda la ayuda. Al Dr. Armando Lucero, en cuyo laboratorio también me recibió en determinado momento y me permitió trabajar. A la Dra. Judith Tánori por su apoyo en la realización de experimentos de TEM.

Aunque no realicé experimentos propiamente del trabajo de tesis en el CIAD, sí tuve la oportunidad de usar laboratorios y equipos en varios momentos, que contribuyeron a mi formación y superación, y que fueron proporcionados con entera amabilidad y excelente disposición. Agradezco a todo el personal con el que tuve la oportunidad de interactuar, especialmente a los laboratorios de la Dra. Verónica Mata y de la Dra. Luz Vazquez.

Quisiera agradecer también a los miembros de mi comité de seguimiento del desarrollo de la tesis, los Dres. Marcelino Barboza, Rodrigo Meléndrez, Raúl Riera y Martín Pedroza, que durante 4 años estuvieron analizando con nosotros, en cada seminario de avances, el trabajo realizado y planteando las mejores vías para alcanzar los resultados. Sus consideraciones y señalamientos siempre resultaron de mucha ayuda. Igualmente, agradezco la labor del comité de tesis doctoral, encargado de la revisión del manuscrito final y de realizar observaciones y acotaciones que, en mi parecer, contribuyeron a expresar los resultados en el documento con un mayor rigor científico y superior calidad, a la vez que nos hicieron cuestionarnos y mejorar

numerosos detalles, lo que sin duda propicia el desarrollo de cualquier investigación científica. Gracias a los Dres. Miguel Méndez, Raúl Riera, Verónica Mata, Erika Silva y Judith Tánori.

Parte imprescindible de mi paso por este programa han sido los demás estudiantes del posgrado. A todos un agradecimiento, un abrazo y el deseo de un feliz camino.

Con el deseo de no desviarme del carácter “oficial” de estos agradecimientos voy a incluir a todos los que me faltan en un GRAN AGRADECIMIENTO a mi familia y amigos. Especialmente a Juan Francisco, a Esther, a Osquiél, a Anayexi y a Noralvis, a quienes va dedicada esta tesis.