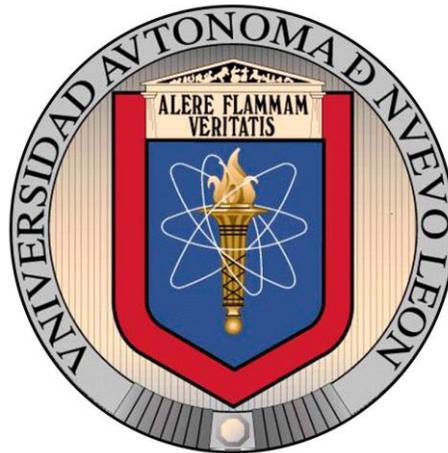


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**MATERIALES NANOESTRUCTURADOS DE G-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Y SU APLICACIÓN  
COMO CONTRASTE EN IMÁGENES DE FLUORESCENCIA.**

**PRESENTA**

**QBT ANAHI ELIZABETH LLANO GUERRERO**

**TESIS**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA  
INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN NANOTECNOLOGÍA**

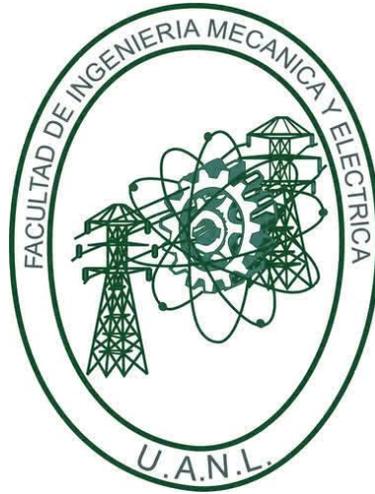
**Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México**

**NOVIEMBRE 2023**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA MECÁNICA Y ELÉCTRICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



MATERIALES NANOESTRUCTURADOS DE G-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Y SU APLICACIÓN  
COMO CONTRASTE EN IMÁGENES DE FLUORESCENCIA.

PRESENTA

QBT ANAHI ELIZABETH LLANO GUERRERO

TESIS

EN OPCIÓN AL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA  
INGENIERÍA CON ORIENTACIÓN EN NANOTECNOLOGÍA

Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México

NOVIEMBRE 2023

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica**  
**Posgrado**

Los miembros del Comité de Evaluación de Tesis recomendamos que la Tesis “Materiales nanoestructurados de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y su aplicación como contraste como imágenes de fluorescencia”, realizada por el estudiante Anahí Elizabeth Llano Guerrero, con número de matrícula 2033976, sea aceptada para su defensa comorequisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Ingeniería con Orientación en Nanotecnología.

**El Comité de Evaluación de Tesis**

Dra. Selene Sepúlveda Guzmán  
Director

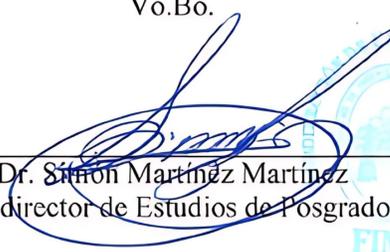
M.C. Frank Eduardo Meléndez Anzures  
Co-Director

Dr. Enrique Manuel López Cuellar  
Revisor

Dra. Sofía Vázquez Rodríguez  
Revisor

Dra. Marcela Cárdenas Tueme  
Revisor

Vo.Bo.

  
Dr. Simón Martínez Martínez  
Subdirector de Estudios de Posgrado

Institución 190001

Programa 557511

Acta Núm. 4251

Ciudad Universitaria, a 12 de septiembre de 2023.

## **Dedicatoria**

*A Dios principalmente por darme fortaleza y mostrarme siempre el camino para salir adelante. Así mismo por todas las personas que ha puesto en mi camino, que de alguna manera me han motivado para seguir creciendo y enseñarme que ante cualquier adversidad “todo va a estar bien”.*

*A mis padres (Manuel y María) por el apoyo brindado durante mi desarrollo profesional y darme las herramientas para salir adelante.*

*A mis hermanas (Alma, Lydia, Erika, Paola) y sobrinos (Rodrigo, Fátima, Paula, Luis, Didier y Arturo), en especial a mi ahijado Arturo, por mostrarme siempre una sonrisa ante la adversidad y sin saberlo darme la fuerza para seguir dando lo mejor de mí.*

*A mis compañeros Dalia, Cristina, Raul y Alicia, por el apoyo y motivación, y por poder desarrollar este proyecto en su colaboración.*

*A la Dra. Selene, por su paciencia y apoyo incondicional.*

*A mí misma, por un logro más y seguir demostrándome de lo que soy capaz.*

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONHACYT) con el número **1036002** de beca otorgada para poder llevar a cabo mis estudios de maestría.

A la FIME y al CIIDIT por las facilidades otorgadas en del desarrollo proyecto de investigación.

A mi asesora de tesis, la Dra. Selene Sepúlveda Guzmán, por su enseñanza, su paciencia y su apoyo incondicional, así como las facilidades que me brindo durante todo el desarrollo y conclusión de mi proyecto de investigación, además de impulsarme a seguir creciendo cada día.

A mí con asesor de tesis el M.C Frank Eduardo Meléndez Anzures, por su apoyo brindado en el desarrollo de la parte biológica del proyecto.

A la FCB UANL y al instituto de Inmunología y Virología - FCB UANL, por las facilidades brindadas para el desarrollo de la aplicación biológica de los nano materiales

Al Dr. Josué Aguilar por su apoyo en la caracterización de muestras mediante Difracción de Rayos X.

Al CIMAV y M.C Alejandro Arizpe por su apoyo en la caracterización de las muestras mediante espectroscopia Raman.

Al Dr. Marco Antonio Morales Sánchez, Profesor de la Facultad de Ingeniería Química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), por su paciencia y sus enseñanzas brindadas.

A mis compañeros de trabajo Dalia, Cristina, Alicia y Raúl por su amistad apoyo, soporte y compartir sus conocimientos durante todo el desarrollo del proyecto de investigación.

A mis padres por todo su apoyo brindado y motivación para seguir creciendo.

¡GRACIAS!

## Contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Fluorescencia.....	3
2.2. Microscopía de Fluorescencia.....	5
2.3. Foto blanqueo .....	7
2.4. Nanopartículas de semiconductores .....	9
2.5. Nitruro de carbono grafítico.....	11
2.6. Métodos de obtención de las nanoestructuras de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> .....	13
2.7. Antecedentes .....	16
2.8. Justificación .....	17
2.9. Hipótesis .....	17
2.10. Objetivos .....	17
2.10.1. Objetivo general.....	17
2.10.2. Objetivos específicos .....	18
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....	19
3.1. Síntesis del g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> .....	19
3.2. Preparación de las Nanoestructuras. ....	19
3.3. Preparación de los puntos cuánticos de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (QD- g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> ) .....	20
3.4. Preparación de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> parcialmente exfoliado (nanohojas (FL)).....	21
3.5. CARACTERIZACIÓN.....	23
3.5.1. Microscopía electrónica de barrido.....	23
3.5.2. Difracción de rayos x.....	23
3.5.3. Espectroscopia UV-Vis .....	23
3.5.4. Espectroscopia de Fotoluminiscencia .....	23
3.5.5. Rendimiento cuántico .....	24
3.5.6. Espectroscopía Raman .....	24
3.5.7. Microscopía electrónica de transmisión.....	25
3.5.8. Microscopía de fluorescencia .....	25
3.6. Estudio del desempeño como biomarcadores.....	25
3.6.1. Preparación de cultivos .....	25
3.6.2. Preparación de las nanoestructuras para bioimagen .....	26
3.6.3. Ensayo de citotoxicidad por MTT.....	26

3.6.4.	Prueba de fluorescencia.....	27
3.6.5.	Marcador de fluorescencia en células caliciformes.....	27
3.7.	Fotocatálisis antibacteriana .....	28
3.7.1.	Preparación de los cultivos bacterianos. ....	28
3.7.2.	Prueba de fotocatálisis .....	29
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	30
4.1.	Obtención del Nitruro de Carbono Grafitico (g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> ).....	30
4.2.	Preparación de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> parcialmente exfoliado (FL-g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> ).....	36
4.2.1.	Preparación de FL de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> para su aplicación en bioimagen .....	41
4.3.	Obtención de puntos cuánticos .....	46
4.3.1.	Estudio de las Nanoestructuras de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> como materiales de contraste en bioimagen .....	54
4.4.	Estudio del desempeño como marcadores .....	56
4.4.1.	ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LAS NANOESTRUCTUAS DE g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> .....	56
4.4.2.	Bioimagen en células.....	67
4.4.3.	Pruebas de foto blanqueo .....	74
4.5.	ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL MEDIANTE FOTOCATALISIS.....	77
5.	CONCLUSIONES.....	84
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	85

## INDICE FIGURAS

Figura 1.	Tipos de luminiscencia. ....	3
Figura 2.	Proceso de fluorescencia.....	4
Figura 3.	Espectro de luz visible .....	6
Figura 4.	Esquema del fenómeno del fotoblanqueo. ....	8
Figura 5.	Clasificación de los marcadores fluorescentes.....	9
Figura 6.	Esquema de bandas de los materiales electrónicos. ....	11
Figura 7.	Estructura molecular 2D Y 3D del g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> [51].....	12
Figura 8.	Esquema representativo de algunas nanoestructuras en g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> .....	13
Figura 9.	Métodos de obtención de las nanoestructuras del g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> a partir del material en escala macroscópica. ....	14
Figura 10.	Esquema representativo de las rutas de preparación de las nanoestructuras del g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> .....	20
Figura 11.	Esquema descriptivo para las condiciones experimentales de preparación de nanohojas (FL) del g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> mediante la exfoliación en dispersión por esfuerzo de corte... ..	21
Figura 12.	Descripción de las muestras que se prepararon de FL del g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> .....	22
Figura 13.	Esquema representativo del proceso de frotis de muestra del epitelio bucal. .	28

Figura 14. Fotografías digitales de las muestras para el estudio de fotocatalisis.....	29
Figura 15. Procedimiento para el estudio del desempeño de fotocatalisis.....	30
Figura 16. Fotografías digitales del seguimiento de obtención de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> a partir de la melamina. a) melamina, b) g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> después de la pirólisis, c) g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> después del tratamiento hidrotermal.....	31
Figura 17. Micrografías de SEM de las muestras (a, b) del g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> a diferente magnificación y (c, d) g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> después del tratamiento hidrotermal.....	32
Figura 18. Patrones de difracción de rayos X del a) g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> después de pirólisis y b) el g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> después de tratamiento hidrotermal .....	33
Figura 19. Espectros de absorción de UV-Vis del a) g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> y b) el g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> después de tratamiento hidrotermal.....	33
Figura 20. Espectro Raman, del a) g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> y b) g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> después de tratamiento hidrotermal.....	35
Figura 21. Análisis TEM g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> después de tratamiento hidrotermal a) baja magnificación b) alta magnificación c) SAED.....	36
Figura 22. Micrografías de SEM de las FL g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> con diferente tiempo de exfoliación (a y b) 20min (c y d) 30 min y (e y f) 40 min .....	37
Figura 23. Espectros de absorción Uv-Vis de las FL g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> a diferente tiempo de exfoliación a) 20min, b) 30 min y c) 40 min.....	38
Figura 24. Espectros de fotoluminiscencia para las muestras de FL g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> a diferente tiempo de exfoliación a) FL a 20 min, b) FL a 30 min y c) FL a 40 min.....	39
Figura 25. Micrografías de SEM, para las muestras de FL- a)nanohojas A 20min con TT , b)nanohojas a 30min con TT, c)nanohojas a 40min con TT .....	40
Figura 26. Fotografías de las dispersiones de FL g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en diferente medio bajo la luz natural y lámpara UV a) FL AD yb) FL PBS.....	42
Figura 27. Micrografías de SEM de (a y b) FL g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en agua desionizada y (c y d) FL g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en PBS. ....	43
Figura 28 . Espectros de UV-Vis de a) FL g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en agua desionizada y b) , FL g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en PBS .....	44
Figura 29. Espectros de fotoluminiscencia de a) FL g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> AD y b) FL g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> PBS .....	44
Figura 30. Espectro Raman de las FL g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en agua desionizada .....	45
Figura 31. Análisis TEM FL AD 30MIN a) baja magnificación b) alta magnificación c) análisis de SAED.....	46
Figura 32. Fotografías del g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> antes y después del proceso de criomolido. ....	47
Figura 33. Caracterización morfológica y óptica del g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> criomolido. a) Micrografía de SEM y b) espectro de absorción de UV-Vis (recuadro muestra el cálculo del Eg).....	47
Figura 34. Estudio de la microestructura del g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> después del proceso de criomolienda; a) patron de difracción de rayos X y b) espectro Raman.....	48
Figura 35. Análisis TEM PARA g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> criomolido a) baja magnificación b) alta magnificación c) Análisis SAED .....	49
Figura 36. Fotografía de las dispersiones de QDs bajo la luz ambiental y la luz UV. dispersión de QDs g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en AD y b) dispersión de QDs g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en PBS.....	50
Figura 37. Espectros de UV-vis de las dispersiones de QDs de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> a) QDs en AD y b) QDs en PBS .....	51
Figura 38. Espectros de fotoluminiscencia de las dispersiones de QDs de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> . Espectro de emisión de a) QDs en AD y b) QDs en PBS.....	52

Figura 40. Análisis TEM Y SAED PARA QDS AD a) baja magnificación b) distribución de tamaños c) análisis SAED d) distancia interplanar .....	53
Figura 40. Imágenes adquiridas sólo de las nanoestructuras de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (FL y QDs) observadas bajo el microscopio de fluorescencia a dos longitudes de onda de excitación; 405 nm y 488 nm.....	55
Figura 41. Imágenes de microscopía óptica de las líneas celulares utilizadas para el estudio de citotoxicidad. ....	56
Figura 42. Fotografía de la microplaca con las muestras donde se realizó la prueba MTT .....	57
Figura 43. Imágenes del microscopio invertido de la formación de cristales de formazán observados en a) células hepáticas y b) células de pulmón a concentración de 10 ug/ml 8	58
Figura 44. Resultados de viabilidad en células hepáticas como función de la concentración de las nanoestructuras de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (QDs y FL) y el medio de dispersión.....	60
Figura 45. Resultados de viabilidad en células de pulmón como función de la concentración de las nanoestructuras de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (QDs y FL) y el medio de dispersión.....	61
Figura 46. Estudio de la viabilidad en células hepáticas C10 y células de pulmón C20 utilizando la 10 ug/ml como concentración óptima. ....	62
Figura 47. Resultados de viabilidad en células hepáticas como función de la concentración de las nanoestructuras de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (QDs y FL) en PBS como medio de dispersión. ....	64
Figura 48. Resultados de viabilidad en células de pulmón como función de la concentración de las nanoestructuras de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (QDs y FL) en PBS como medio de dispersión.....	65
Figura 49. Fotografía de la microplaca del estudio de la viabilidad de células de pulmón en presencia de las nanoestructuras de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (QDs y FL) y diferente medio de dispersión. ....	66
Figura 50. Imágenes de microscopía óptica de células del epitelio bucal sin y con tinción con azul de metileno .....	68
Figura 51. imágenes de microscopía de fluorescencia de las células del tejido epitelial utilizando como contraste las nanoestructuras de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (QDs y FL) en AD y el DAPI ....	70
Figura 52. Imágenes por fluorescencia de nanoestructuras de PBS.....	71
Figura 53. Esquema representativo de la estructura de la célula eucariota.....	72
Figura 54. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células del tejido epitelial adquiridas con los QDs g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> en PBS a 405 nm y 488 nm de excitación.....	73
Figura 55. Estudio de la estabilidad de la imagen de fluorescencia en función del tiempo para las muestras teñidas con prueba de fotoblanqueo con DAPI .....	75
Figura 56. Estudio de la estabilidad de la imagen de fluorescencia en función del tiempo para las muestras teñidas con prueba de fotoblanqueo con QDs PBS.....	76
Figura 57. Conteo de unidades formadoras de colonia de bacterial para el estudio fotocatalítico de los nanomateriales de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> .....	78
Figura 58 Comparación de la actividad fotocatalítica de los nanomateriales de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (QDs y FL).....	79
Figura 59. Esquema representativo del mecanismo fotocatalítico antibacterial. ....	80
Figura 60. Actividad antibacterial por fotocatalisis de las nanoestructuras de g-C <sub>3</sub> N <sub>4</sub> (QDs y FL) a una concentración de 300 µg/µl. ....	81

Figura 61. Resumen comparativo de los resultados de la actividad antibacterial por fotocátalisis utilizando nanoestructuras de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (QDs y FL) a una concentración de 300 µg/µl..... 82

Figura 62. Evidencia fotográfica de la presencia de UFC en placas de E.coli para los experimentos de la actividad antibacterial por fotocátalisis utilizando nanoestructuras de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (QDs y FL) a una concentración de 300 µg/µl. .... 83

**INDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Principales fluoróforos utilizados en microscopía..... 7

Tabla 2. Modos de vibración presentes en Raman para el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>..... 34

Tabla 3. Valores de energía de banda prohibida (E<sub>g</sub>) y rendimiento cuántico de las FL g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>..... 40

Tabla 4. Resultados experimentales de las propiedades ópticas de los QDs de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>... 54

## **Abreviaturas**

**QDS.** Puntos cuánticos

**FL.** (Few Layers) (Nanohojas) material parcialmente exfoliadas

**QDs AD.** Puntos cuánticos dispersados en agua desionizada

**QDs PBS.** Puntos cuánticos dispersados en buffer de sales fosfato

**FL AD.** nanohojas dispersados en agua desionizada

**FL PBS.** nanohojas dispersados en buffer de sales fosfato

**AD.** Agua desionizada

**PBS.** Buffer de sales de fosfato

**DAPI.** 4,6-diamino-2-fenilindol

**g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>.** Nitruro de carbono grafítico

**QY.** Rendimiento cuántico

**ADN.** Ácido desoxiribonucleico

**C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>.** Melamina

**nm.** nanómetro

**MTT.** Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)- 2,5-difeniltetrazólico

**DMSO.** dimetilsulfóxido

**DRX.** Difracción de rayos x

**TEM.** Microscopía electrónica de transmisión

**SEM.** Microscopía electrónica de barrido

**PL.** Fluorescencia

**SAED.** Difracción de electrones de área selecta

**Eg.** Band gap

**A549.** Tejido celular hepático

**HUH7.** Tejido celular de pulmón

## RESUMEN

En este trabajo se realizó la síntesis de nanoestructuras del  $g\text{-C}_3\text{N}_4$ ; nano hojas y puntos cuánticos (QDs) para su aplicación como contraste de imagen por fluorescencia. Las nano hojas se obtuvieron en soluciones acuosas, en agua desionizada (AD) y solución de buffer de fosfatos (PBS) por medio de exfoliación por alto esfuerzo de corte. Las características morfológicas y propiedades ópticas se estudiaron como función del tiempo y el medio de exfoliación. Las nanoestructuras en presencia de PBS favorecieron el rendimiento cuántico debido a la estabilización coloidal. Por otra parte, los QDs de  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  se obtuvieron por medio de dispersión en ultrasonido donde se logró una disminución del tamaño de partícula menor al radio de excitón de Bohr. Estos se sintetizaron en AD y PBS donde las propiedades ópticas mejoraron en aquellas que fueron sintetizadas en PBS dando como resultados rendimientos cuánticos arriba del 60%. Los materiales obtenidos presentaron características específicas para ser aplicados como contraste de imagen de fluorescencia bajo excitación de radiación con longitudes de onda de 405 nm y 488 nm. Así mismo, se realizaron pruebas de viabilidad celular con células de tejido hepático y células de pulmón donde a bajas concentraciones resultaron no tóxicos. También, se aplicaron de manera exitosa como contraste de imagen en células caliciformes donde fue posible la interacción de las partículas con el núcleo y membrana celular. Se realizó una prueba de foto blanqueo exponiendo el material a diferentes tiempos comparándolo con el marcador convencional 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), mostrando mejores resultados que dicho marcador. Finalmente, las nanoestructuras obtenidas presentaron propiedades de fotocatalisis antibacteriales en inhibición UFC de *e-coli*, en las condiciones del estudio.

## 1. INTRODUCCIÓN

La microscopía de fluorescencia es una técnica aplicada para la visualización de procesos biológicos en tiempo real [1]. Esta técnica también conocida como bioimagen ayuda para la comprensión de procesos biológicos como el mecanismo celular, la formación de imágenes moleculares *in vivo*, el análisis de biomoléculas o detección de organismos vivos como hongos, bacterias cultivos celulares, etc. [2,3]. Para la obtención de dichas imágenes por fluorescencia es necesario el uso de marcadores o biomarcadores moleculares como fluoróforos o fluoró cromos. Dichos marcadores pueden ser de origen biológico, como es el caso de algunas biomoléculas tales como las proteínas, ADN o lípidos, que son capaces de emitir fluorescencia. También algunos otros de origen sintético como los tintes orgánicos o bien materiales semiconductores como el caso de las nanopartículas y puntos cuánticos [2, 4].

Para la selección de un marcador ideal es necesario tomar en cuenta diversos aspectos como son que posean un alto rendimiento cuántico, biocompatibilidad, que puedan ser superficialmente modificados, fotoestabilidad y que sea fácil su obtención.

En el caso de los tintes orgánicos y las biomoléculas, estos llegan a presentar diversos problemas durante su aplicación en bioimagen, como es el caso del fotoblanqueo, la superposición espectral y la baja intensidad de la señal que emiten. Es por esto por lo que se ha buscado utilizar diferentes materiales que sean capaces de cubrir estas dificultades así mismo como que tengan una mayor emisión de luz. El uso de nanoestructuras de semiconductores, como nanobarras, nano láminas o puntos cuánticos (QDs) como los QDs de carbono, en aplicaciones de carácter biológico, presentan muchas ventajas ya que se ha demostrado que tienen alta biocompatibilidad, baja toxicidad, son fácil de modificar superficialmente y tienen excelentes propiedades de fotoluminiscencia [4, 5, 6].

Una gran ventaja del uso de nanoestructuras es que es posible ampliar la región del espectro de emisión de luz aplicando técnicas “sencillas” como la modificación en

el tamaño o bien el dopaje con algún otro elemento teniendo imágenes de mejor calidad con alta emisión [6]. Así mismo, los métodos de síntesis que se han descrito para el uso de estos materiales resultan ser no solo más amigables con el ambiente sino también más económicos. Es posible utilizar diversos precursores orgánicos para su síntesis, así como utilizar amplia variedad de rutas para la obtención final de estos [4, 7]. En este trabajo se explora la obtención de nanoestructuras del nitruro de carbono gráfico (g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) mediante técnicas de rompimiento y su posible aplicación como material de contraste en imágenes de fluorescencia.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Fluorescencia

La fluorescencia es uno de los principales procesos de la **luminiscencia** la cual es definida como la capacidad que posee una molécula para emitir luz. Dentro de la luminiscencia existen diferentes procesos que se muestran en la figura 1, donde la diferencia cae en la manera en la que estos se excitan, ya sea a través de corrientes eléctricas como la electroluminiscencia, por medio de reacciones químicas como la quimioluminiscencia, o a través de la excitación de fotones como el caso de la fotoluminiscencia donde los principales procesos son la fosforescencia donde la luminiscencia se mantiene una vez terminada la excitación, en un estado metaestable y la emisión se retarda. Por otra parte la fluorescencia es un proceso donde la emisión se produce de manera simultánea a la absorción de la radiación [8, 9]. La fotoluminiscencia es un tipo de luminiscencia que resulta de las transiciones electrónicas que dan lugar a la emisión de fotones (luz) [8].

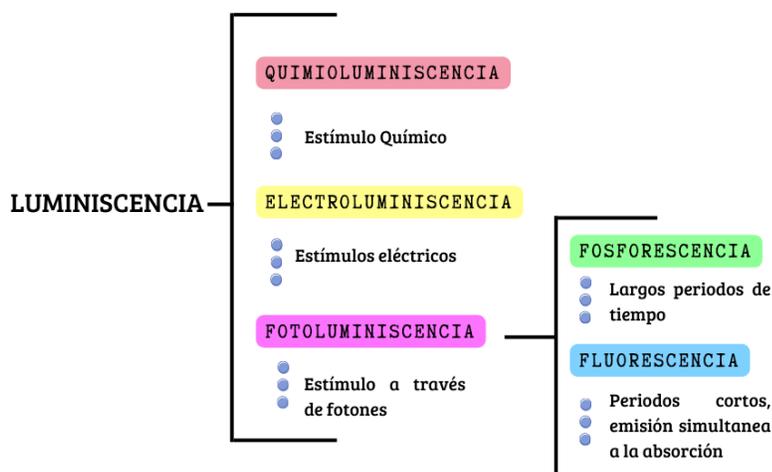


Figura 1. Tipos de luminiscencia.

En este proceso los electrones existen en diferentes estados de energía. En el estado basal, los electrones se encuentran estables teniendo el nivel de energía

más bajo, cuando estos electrones absorben energía, se elevan a un nivel energético superior conocido como el estado excitado, cuando el electrón vuelve de ese estado excitado a su estado basal, la energía se libera a manera de fotones emitidos.

La fluorescencia es un proceso descrito por primera vez por George Gabriel Stokes en 1852 que utilizó para describir la emisión de la fluorita al observar que la luz emitida poseía una longitud de onda más larga que la luz excitante, a esta diferencia se le conoce como desplazamiento de Stokes [10]. En la figura 2 se describe dicho proceso, en donde una radiación de longitud de onda  $\lambda$  (rayos x o radiación ultravioleta) incide sobre una molécula, los fotones son absorbidos por la molécula, excitando electrones desde un estado basal ( $s_0$ ) a un estado de energía mayor (estado excitado) ( $s_1$ ).

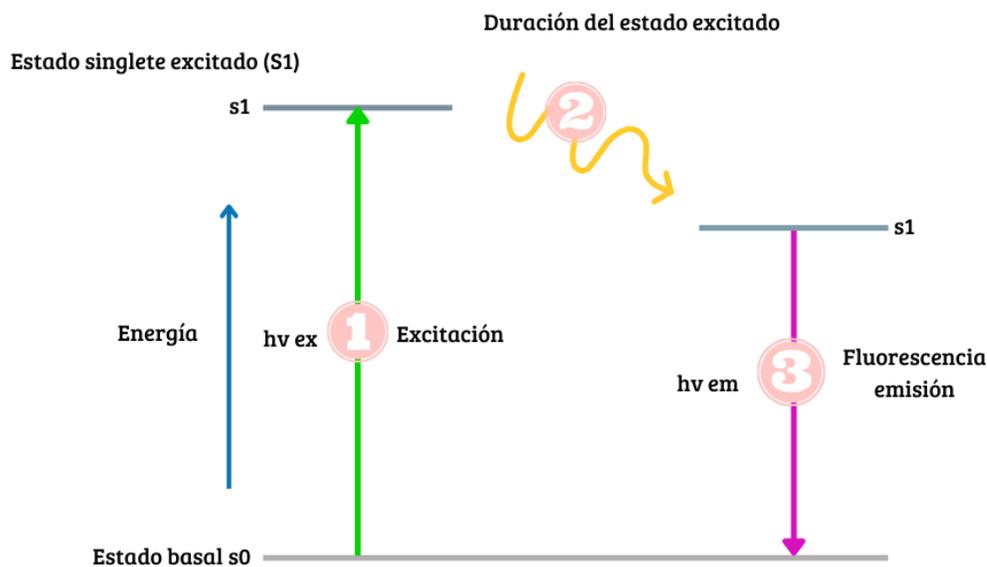


Figura 2. Proceso de fluorescencia.

Este proceso es conocido como excitación, el tiempo de permanencia en ese estado es corto que va de los  $10^{-9}$ - $10^{-8}$  segundos donde parte de la energía del electrón se pierde. Cuando los electrones regresan del estado excitado al estado basal, estos

pierden la energía restante que absorbieron durante la excitación. Para el caso de los fluoróforos (moléculas capaces de emitir fluorescencia) dicha energía se emite en forma de luz (emisión de la fluorescencia) de una longitud de onda mayor que la longitud de excitación.

## 2.2. Microscopía de Fluorescencia

El proceso de fluorescencia es un proceso que debido a su naturaleza es aprovechado en la microscopía de fluorescencia.

La microscopía de fluorescencia es una técnica similar a la microscopía óptica en donde se utiliza la capacidad que tiene una molécula para emitir un fotón de luz después de ser excitado. Las moléculas del contraste o tintes son excitadas bajo una lámpara de mercurio o xenón, provocando dicho fenómeno para la visualización de imágenes. La fuente de excitación está cerca de los 400nm, por lo cual el tinte o molécula a utilizar deberá emitir cerca de los 400-600nm para poder visualizarse [11].

Comúnmente la microscopía de fluorescencia también conocido como bioimagen, es utilizada en diferentes técnicas como: la visualización de moléculas como el DNA, visualización de células, vitaminas, entre otras, permitiendo observar la distribución de moléculas, así como procesos celulares como la división celular [1].

Para lograr la formación de imágenes, es necesario que las moléculas o tintes fluorescentes (marcadores fluorescentes) se adhieran al objeto que se busca observar. Las imágenes formadas resultan del principio de fluorescencia. Los parámetros más importantes durante la adquisición de estas imágenes son la longitud de onda de fuente de excitación, la potencia y apertura que dependen de la molécula fluorescente y el tiempo máximo de exposición. De acuerdo también a la naturaleza de la molécula, ésta se logrará observar en las diferentes longitudes de espectro visible, donde un factor importante será el tamaño de molécula, como se observa en la figura 3 cuando se tengan moléculas grandes se observarán en el rojo, y conforme disminuyéndose disminuye el tamaño de partícula se puede observar en el azul, como es el caso de algunas proteínas que se logran observar en el verde debido al tamaño que estas presentan.



*Figura 3. Espectro de luz visible*

Generalmente los tintes o moléculas conocidos como fluoróforos o fluorocromos, deben cumplir con diversos factores para su visualización:

- Sean biocompatibles,
- se puedan modificar superficialmente,
- no se fotoblanquen,
- su fácil reproductibilidad,
- emisión en un rango de 400-600nm,
- rendimiento cuántico alto.

Existen diversos fluoróforos descritos en la Tabla 1, en donde la mayor problemática que estos poseen para su aplicación recae en que el material sea biocompatible y el foto blanqueo. La proteína verde, DAPI, y QDs son biocompatibles, sin embargo, a diferencia del QDs poseen una degradación rápida debido a la luz (foto blanqueo) [3, 5, 12].

De los marcadores más utilizados en bioimagen el más destacado es DAPI ya que presenta una fuerte emisión en azul, además de biocompatibilidad lo que le permite la interacción con diferentes estructuras biológicas. Comúnmente se utiliza para la marcación cromosomal, debido a su alta afinidad a grupos amino presentes en el ADN. Es un marcador que ha dado buenos resultados a lo largo de su uso, sin embargo, este mismo posee limitantes debido a la tendencia a la rápida degradación por la longitud de onda (Foto blanqueo), lo cual limita su uso debido a su corto tiempo de degradación [12, 13, 14].

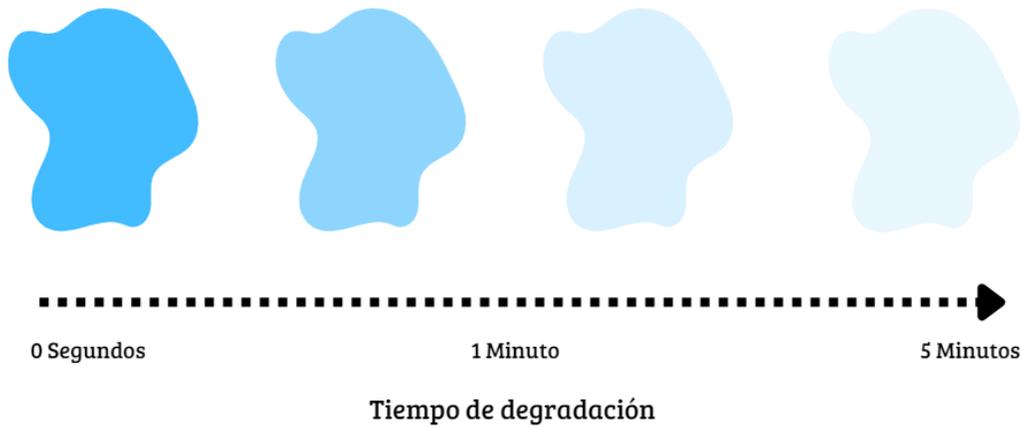
Tabla 1. Principales fluoróforos utilizados en microscopía

fluoró foro	emisión	foto blanqueo	biocompatible
Proteína verde fluorescente	verde	X	X
Rodaminas	Rojo	X	
DAPI	azul	X	X
Metales	azul	X	
Yoduro de propidio	Rojo	X	X
QDs a base de carbono	azul		X

### 2.3. Foto blanqueo

El fotoblanqueo es definido como la degradación irreversible por efecto de la luz (longitud de onda) de un material. Es uno de los principales problemas que se presentan durante los análisis por fluorescencia. Cuando los fluoróforos son excitados, se presentan fenómenos de calentamiento o de rompimiento de enlaces (dependiendo de la fuente de excitación) lo que resulta en una rápida degradación, en lapsos no mayores a 5 minutos de exposición. Mientras mayor sea el tiempo de exposición (excitación del material) y menor sea el rendimiento cuántico del fluoróforo, tenderá la degradación del mismo. [3, 4, 11].

En la figura 4 se presenta un esquema que describe la observación del fenómeno de fotoblanqueo en función al tiempo de observación.



*Figura 4. Esquema del fenómeno del fotoblanqueo.*

En sí el fotoblanqueo, es un aspecto importante para tomar en cuenta para la aplicación de un material fluorescente en la técnica de microscopía de fluorescencia. Los materiales aplicables se pueden clasificar en cuatro tipos, descritos en la figura 5, los cuales son: los tintes orgánicos, biomoléculas, metales y partículas de semiconductores, donde al utilizar partículas de semiconductores se logra disminuir o bien eliminar muchos de los problemas relacionados con el uso marcadores fluorescentes orgánicos en bioimagen. [4, 7]

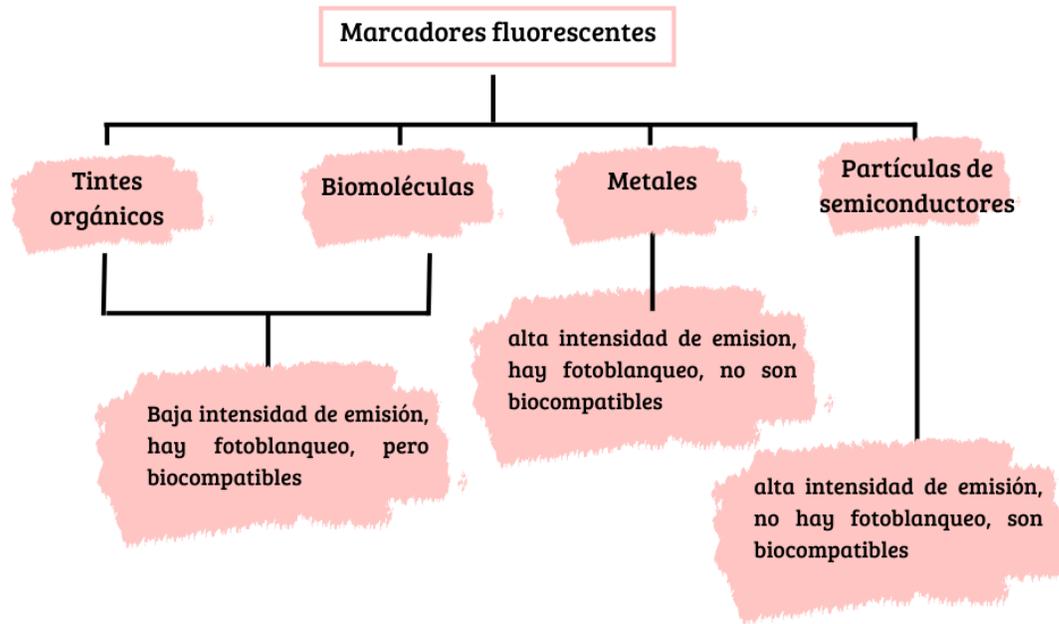


Figura 5. Clasificación de los marcadores fluorescentes.

#### 2.4. Nanopartículas de semiconductores

Un material semiconductor es aquel que posee la capacidad para comportarse como un aislante o un conductor dependiendo de diversos factores como el campo eléctrico, la presión, la radiación incidente, la temperatura ambiente etc. Estos materiales poseen una estructura cristalina y pocos electrones libres a temperatura ambiente, además de resistividades y huecos de energía situados entre los conductores y los aislantes [11]. En la figura 6 se explica el comportamiento electrónico de los materiales y la brecha energética “band gap” presente en los materiales semiconductores esta brecha energética indica el mínimo energético para la promoción de un electrón de la banda de valencia a la banda de conducción. Por decir, la separación entre los niveles energéticos puede superarse si se aporta energía al material, de esta manera puede llevarse a cabo el mecanismo de conducción [11, 15].

En general existen diferentes semiconductores de interés debido a las propiedades que estos presentan. Cuando se reduce el tamaño de partícula las propiedades físicas y químicas cambian, dando lugar a nuevas propiedades asociadas a la gran área superficial que presentan, así como al efecto de confinamiento cuántico. A la escala nanométrica, los electrones quedan confinados a una menor distancia, hay una discretización en los niveles de energía y un aumento en la banda prohibida, esto debido a la disminución de tamaño. El confinamiento puede presentarse en una, dos o tres dimensiones. Cuando dicho confinamiento se da en las tres dimensiones, y el tamaño de partícula es menor al tamaño del radio del excitón de Bohr, a dicho material se le conoce como **punto cuántico**. El efecto de confinamiento cuántico se observa también como un incremento en la intensidad de luminiscencia y un aumento en la energía de la brecha energética. En las partículas de semiconductores, estas propiedades son dependientes del tamaño. [11, 15, 16].

Debido a las propiedades que estos materiales podrían presentar, se ha generado un gran interés para diferentes áreas, desde la captación de energía hasta aplicaciones del tipo biomédico [15].

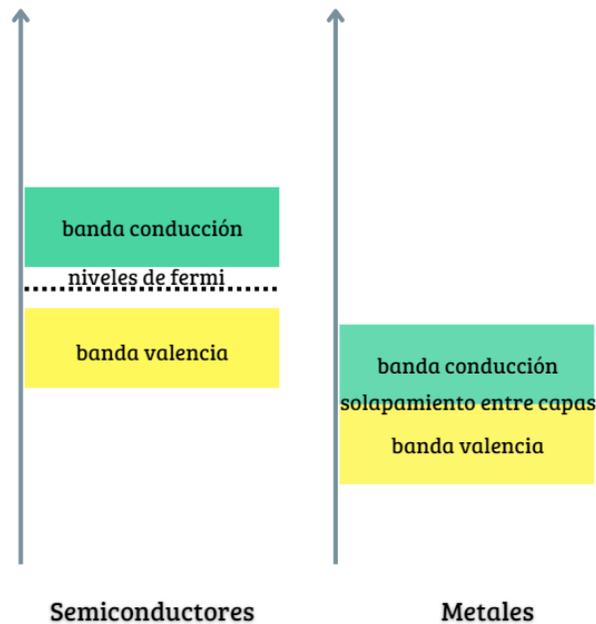


Figura 6. Esquema de bandas de los materiales electrónicos.

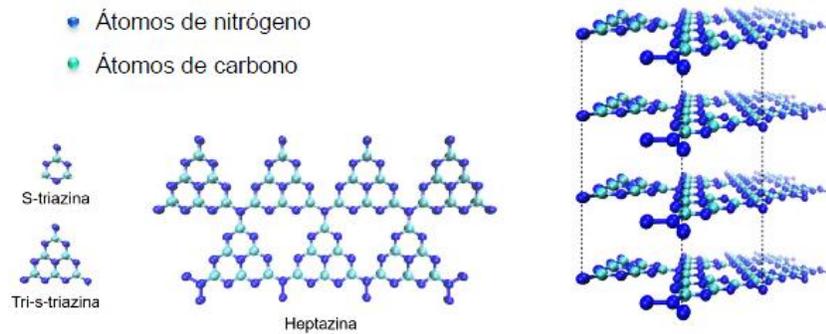
### 2.5. Nitruro de carbono grafítico

Uno de estos materiales semiconductores que han generado gran interés debido a las propiedades que presenta ha sido el nitruro de carbono grafítico ( $g-C_3N_4$ ).

El nitruro de carbono grafítico es un material semiconductor tipo n, libre de metal [17]. Posee una estructura tridimensional similar al grafito, compuesto por átomos de nitrógeno y de carbono teniendo una estructura laminar con una hibridación  $sp^2$ , sus laminas apiladas se encuentran unidas mediante interacciones de tipo van der Waals. [6, 17]. Es un material que se forma a partir de la polimerización de precursores de bajo coste ricos en nitrógeno, como la cianamida, tiourea, dicianamida, melamina, urea, [18].

En la figura 7 se presenta la estructura que posee el  $g-C_3N_4$ . Está compuesto por tres unidades de s-triazina, formando las tri-s-triazina. El ordenamiento periódico de esta forma las heptazinas, así mismo el apilamiento de estas heptazinas formarían la estructura del material en bulk [19]. Posee buenas propiedades ópticas debido a

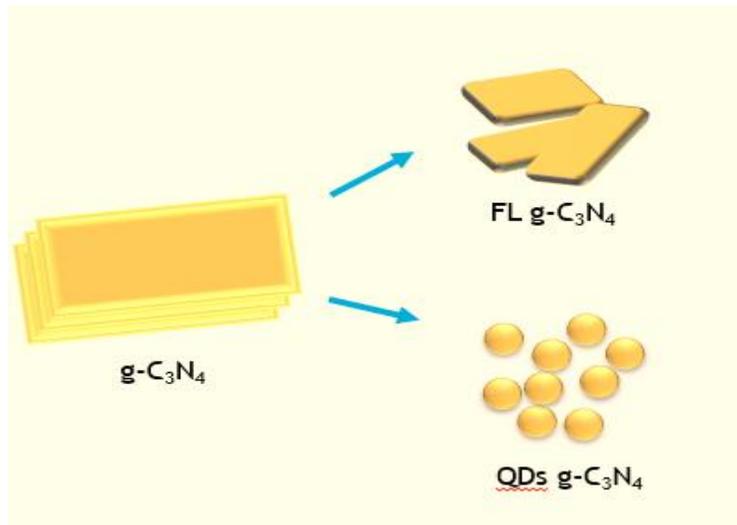
su bandgap de 2.4 a 2.8 eV, aunque presenta poca área superficial debido al apilamiento entre capas que se da durante la policondensación [17]



*Figura 7. Estructura molecular 2D Y 3D del  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  [19]*

Debido a sus propiedades ópticas este material es capaz de absorber la luz visible, teniendo emisiones entre 400 y 480 nm, emitiendo en azul de manera estable, lo que permite su uso para detección. Además de ser un material libre de metal, también es un material biocompatible, el cual permite su uso en aplicaciones de carácter biológico. Asimismo, la reducción del tamaño de este material ha contribuido significativamente a mejorar sus propiedades. En su forma masiva o "bulk", el material presenta limitaciones inherentes, como una baja área superficial y un rendimiento cuántico reducido, causados en gran parte por el apilamiento entre las capas. Precisamente por estas razones, el empleo de este material a escala nanométrica ha capturado gran interés científico. A esta escala, es posible obtener

diversas nanoestructuras, tales como láminas de pocas capas (few layers) y puntos cuánticos, tal como se ilustra en la Figura 8 [17, 18, 20].

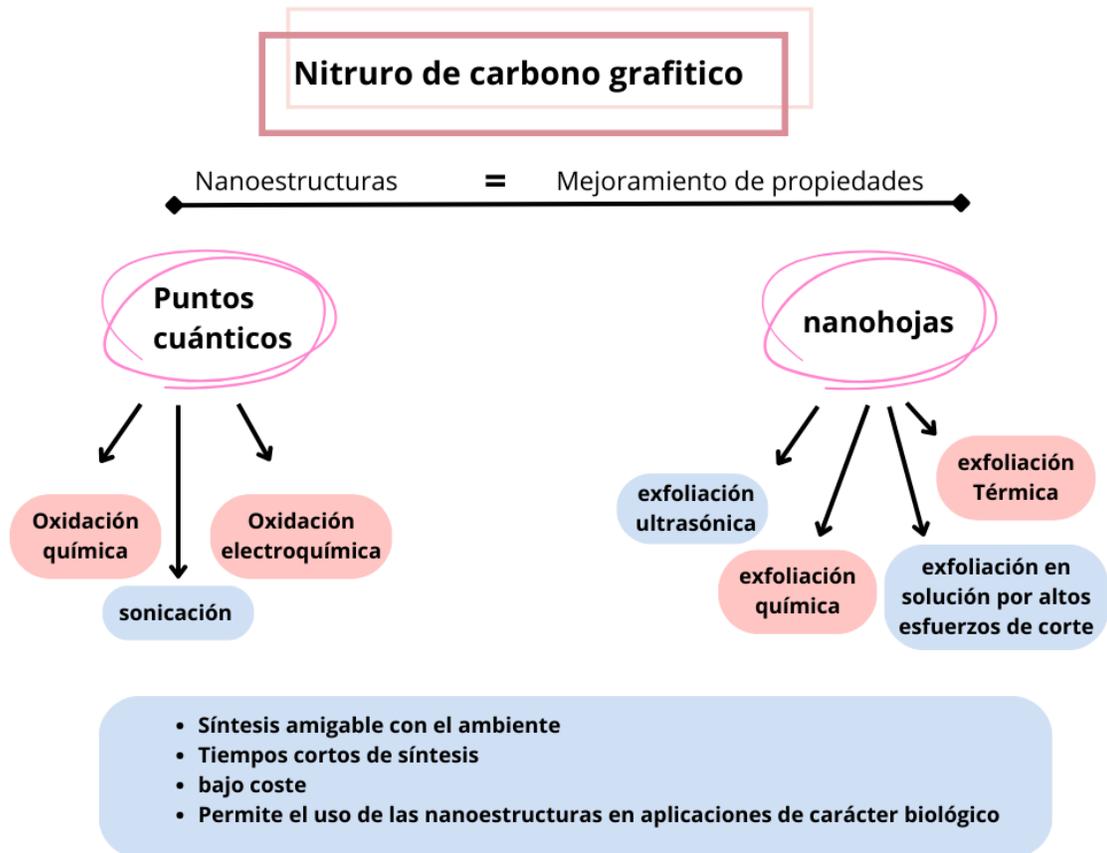


*Figura 8. Esquema representativo de algunas nanoestructuras en g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>*

### 2.6. Métodos de obtención de las nanoestructuras de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>

Las propiedades físicas del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, se han visto mejoradas gracias a los diferentes métodos de obtención de las nanoestructuras en donde se busca la disminución de tamaño de partícula (métodos top-Down), provocando un efecto de confinamiento cuántico, dándole una mayor área superficial, así como el mejoramiento de sus propiedades físicas [20, 21].

En la figura 9 se destacan algunos de los métodos de obtención de las nanoestructuras del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> a partir del material a escala macroscópica



*Figura 9. Métodos de obtención de las nanoestructuras del  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  a partir del material en escala macroscópica.*

Para el caso de las nano hojas del  $g\text{-C}_3\text{N}_4$ , se busca la separación entre capas. La estructura de este material se encuentra formado por átomos de carbono y nitrógeno unidos por enlaces covalentes, en el arreglo tridimensional las capas se encuentran unidas por fuerzas de van de Waals, las cuales se pueden separar en nano hojas 2D cuando se le proporciona la suficiente energía para romper dichas atracciones de van de Waals [17]. Algunos métodos para lograr dicha separación son mediante procesos de exfoliación como la exfoliación química, la exfoliación térmica y la exfoliación ultrasónica. La exfoliación ultrasónica se considera uno de los mejores métodos de obtención debido a que no genera residuos en altas concentraciones, ni es necesario el uso diferentes solventes como ácidos fuertes, como en el caso de la exfoliación química. Así mismo no requiere de grandes tiempos ni temperaturas elevadas como el caso de la exfoliación térmica, simplemente se utiliza en material

en bulk homogeneizado utilizando agua desionizada, las propiedades finales dependen de las condiciones de preparación (el tiempo de exfoliado). Otro de los métodos descritos para la obtención de las nano hojas es la exfoliación por altos esfuerzos de corte en solución, en el cual utiliza un rotor, estator (o palas giratorias) para generar altas velocidades de corte en líquidos, a los que se añaden polvos estratificados, donde las fuerzas de corte provocarían una delaminación de los materiales, permitiendo obtener las nano hojas. [17, 20, 21, 22].

Para el caso de los puntos cuánticos del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se han descrito diferentes métodos de obtención tales como la oxidación química, la oxidación electroquímica y la sonicación. En la oxidación química, se utilizan disolventes polares que ayudan a introducir grupos funcionales de oxígeno polares en los átomos de carbono. Con el uso de ácidos fuertes se produce una protonación y exfoliación simultánea del material, permitiendo la generación de nanoestructuras 0D con grupos hidrófilos. Es un proceso que puede ser relativamente complejo debido a que se requiere la eliminación del exceso del oxidante [21]. Otro método es la oxidación electroquímica, la cual se da mediante la transferencia de electrones desde o hacia un ión o una molécula para cambiar su estado de oxidación, esto ocurre cuando se aplica un potencial externo o cuando se libera energía química [17]. Así mismo otro método de obtención que se destaca es el método de sonicación, donde el material disperso en un solvente es sometido a una frecuencia de ultrasonido y genera un rompimiento de partícula. El tamaño que se obtiene está en función de la frecuencia y el tiempo de ultrasonido. Se ha reportado la obtención de nanopartículas y puntos cuánticos con alto grado de pureza. Mediante esta técnica no siempre es necesario el uso de algún agente para controlar el tamaño de los mismos. Durante la sonicación se permite el rompimiento entre enlaces induciendo el proceso de confinamiento cuántico. Es en sí uno de los mejores métodos descritos debido a que no es necesario el uso de ácidos fuertes, por lo cual se podría decir que es un método amigable con el ambiente, lo que permite también que las nanoestructuras formadas puedan tener aplicaciones de carácter biológico [17, 21].

## 2.7. Antecedentes

En 2013 Tang Y *et al.* Utilizaron nanopartículas de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> como nanosensores y presentaron luminiscencia de larga duración aplicados en biomagen para detección de biotioles en fluidos biológicos. Observaron que el uso de nanopartículas fluorescentes de larga duración proporciona mayor efectividad debido a que mejoran la relación señal-ruido, permitiendo la detección de imágenes de fluorescencia en tiempo real. También reportaron que se evitaron problemas como el fotoblanqueo, o la citotoxicidad. La luminiscencia de alta duración está relacionada con dos tipos de emisión, la primera debido a la transición directa e indirecta de electrones entre bandas y los centros luminiscentes, y la segunda está relacionada con los defectos que pueden presentar el material debido a la presencia de centros paramagnéticos. Las nanopartículas de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> que prepararon fue mediante la pirólisis del clorohidrato de guanidina a altas temperaturas.

En 2018 Zhuang Y *et al.* Estudiaron puntos cuánticos de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> con alta foto estabilidad, baja citotoxicidad y con un amplio rango de emisión como sondas fluorescentes para obtención de imágenes multicolores de células. Los puntos cuánticos de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> fueron obtenidos por una técnica verde debido a su simplicidad y bajo costo. Se utilizó como precursor la orina humana y se llevó a cabo un tratamiento en condiciones hidrotermales dando como resultado QD de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Los cuales se caracterizaron por espectroscopia de UV-Vis, así como espectros de fluorescencia. La mayoría de estos trabajos se ha realizado con nanomateriales obtenidos de técnicas bottom up, y poco se ha estudiado de las características de materiales obtenidos por métodos top down. Si bien tienen ventajas como la producción en masa de nanomateriales, son más sencillos ya que requiere de menos pasos en el proceso, usualmente presentan defectos estructurales que modifican las propiedades ópticas.

## 2.8. Justificación

Existen diversos marcadores biológicos en imágenes por fluorescencia que poseen cierta limitancia para su uso como son los tintes orgánicos y nanoestructuras a base de metal. Los tintes orgánicos son los más comunes y existe una gran variedad, sin embargo, la principal problemática es que tienden al foto blanqueo y poseen poca estabilidad, donde el tiempo de análisis se ve limitado. Las nanopartículas a base de metal como óxidos o semiconductores metálicos han sido probadas para resolver esas problemáticas, sin embargo, presentan una alta toxicidad lo que dificulta su preparación y disposición. Los materiales nanoestructurados de nitruro de carbono grafítico ( $g-C_3N_4$ ) poseen propiedades ópticas y estructurales tales que permiten su aplicación como contraste de imagen, ya que se mejora la intensidad de la emisión en la región del espectro visible. Además de ser un material biocompatible y de baja toxicidad debido a que es a base de carbono. En este proyecto se propone obtener materiales nanoestructurados del nitruro de carbono grafítico por técnicas top Down en donde se favorezcan las propiedades ópticas, de tal manera que posean una absorción en la región visible y puedan tener mayor intensidad de emisión para su posible uso como marcadores moleculares observables en imágenes de fluorescencia.

## 2.9. Hipótesis

Los materiales nanoestructurados de  $g-C_3N_4$  obtenidos por técnicas de arriba hacia abajo “*Top-down*” presentarán las propiedades ópticas que favorecen la intensidad de la emisión en la región del espectro visible con características superficiales que favorezcan su uso como contraste de imágenes en muestras de origen biológico por fluorescencia.

## 2.10. Objetivos

### 2.10.1. Objetivo general

Obtener y caracterizar las propiedades ópticas de nanoestructuras de  $g-C_3N_4$  por técnicas Top-down y estudiar su desempeño como contraste de imagen en muestras de origen biológico.

### 2.10.2. Objetivos específicos

- Obtener y caracterizar QDs  $g-C_3N_4$  por técnica de ultrasonido
- Obtener y caracterizar nanoláminas de  $g-C_3N_4$  mediante exfoliación por alto esfuerzo de corte.
- Estudiar las propiedades ópticas de las nanoestructuras de  $g-C_3N_4$  y el desempeño como marcador en imágenes de contraste.

### 3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

#### 3.1. Síntesis del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>

El g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> se obtuvo mediante la descomposición de melamina (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>6</sub>, 99%, Sigma Aldrich) a 600° C en atmósfera de aire estático durante un tiempo de 2 h. El material de color amarillento se dejó enfriar, para posteriormente homogeneizaren un mortero.

#### 3.2. Preparación de las Nanoestructuras.

El material en Bulk resultante se dividió en dos como se muestra en la figura 10; por un lado se le dio un tratamiento hidrotermal y por otro paso por crio molienda.

Se pesaron 3g de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en bulk y se colocó en un molino criogénico SPEX SamplePrep 6770, como se muestra en la figura 10. Se adicionaron 5 L de nitrógeno líquido y se utilizaron los siguientes parámetros para la criomolienda: 10 ciclos que consisten en 10 min de enfriamiento, 3 minutos de molienda a una frecuencia de 5 cps seguidos de 2 minutos de enfriamiento. Obteniendo así un polvo amarillento fino.

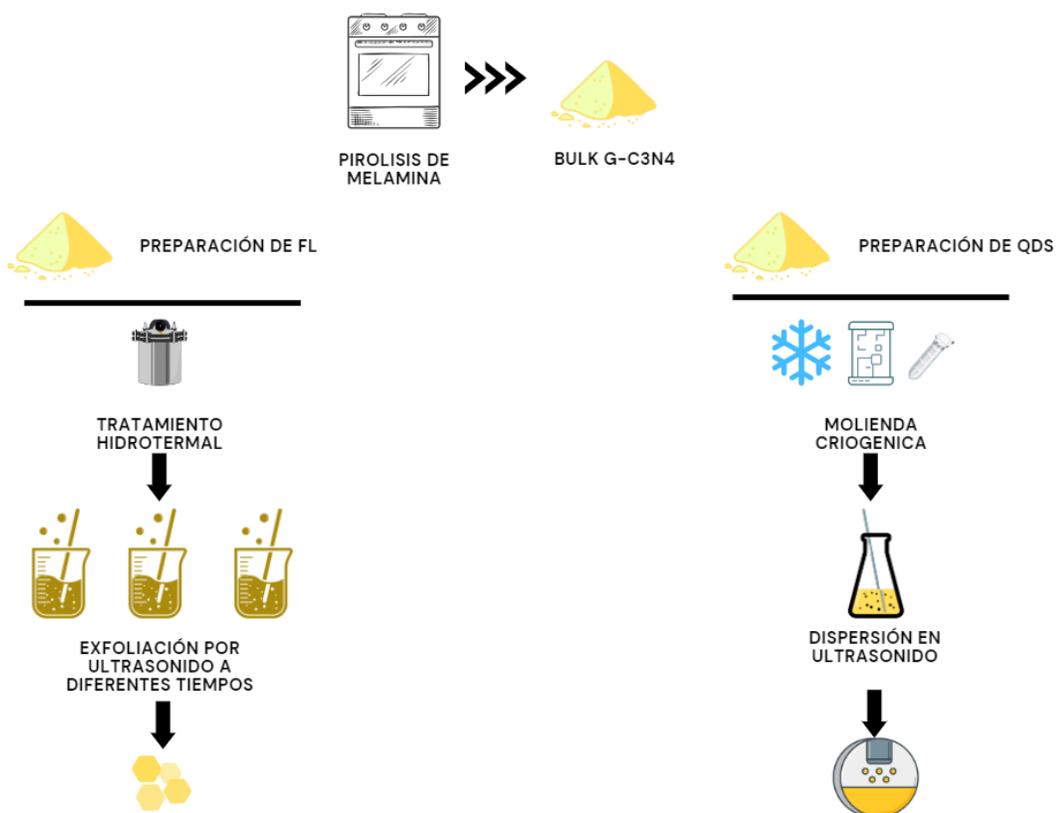


Figura 10. Esquema representativo de las rutas de preparación de las nanoestructuras del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>

### 3.3. Preparación de los puntos cuánticos de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (QD- g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>)

Se realizaron dos dispersiones del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> obtenido por criomolienda, con una concentración de 0.8 mg/mL en agua desionizada (QDs AD) (18.2 Ω de resistencia) y otra en solución buffer de fosfatos (QDS PBS), en total se prepararon 200 mL para cada muestra. Las dispersiones se sometieron a ultrasonido en un baño durante 5 h. Una vez transcurridas las 5 h el material cambia del color de amarillo a un blanco lechoso, dejándose reposar durante 24 h y se centrifugó el material para lograr una mejor separación de las partículas más pequeñas.

### 3.4. Preparación de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> parcialmente exfoliado (nanohojas (FL))

El g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en bulk después de ser homogeneizado en un mortero, posteriormente se pasó a una autoclave completando la mitad del volumen total con agua desionizada (18.2 MΩ de resistencia). Se le dio tratamiento hidrotérmal durante 48 horas a 110°C. Una vez cumplido el tiempo, se decantó el material y se dejó secando por 72 h a 60°C.

Posteriormente se realizaron dos estudios para la obtención de las nano hojas (FL de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>), como se muestra en la figura 11 y se estudió el tiempo de exfoliación y el efecto de un tratamiento térmico posterior al exfoliado. Finalmente, la microestructura, morfología y propiedades ópticas fueron estudiadas para seleccionar las condiciones más eficientes.



Figura 11. Esquema descriptivo para las condiciones experimentales de preparación de nanohojas (FL) del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> mediante la exfoliación en dispersión por esfuerzo de corte

Después de haber sido caracterizadas las nanohojas, 30 mL de una dispersión de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> con tratamiento hidrotérmal con concentración de 0.8 mg/mL en agua desionizada se colocaron en un homogeneizador de esfuerzo de corte (IKA, T 25, ULTRA TURRAX) a una velocidad de 13,200 rpm. Las dispersiones fueron sometidas a diferentes tiempos (20, 30 y 40 min) y después se centrifugó en una ultracentrífuga (Beckman, modelo Allegra X-22R) a 9000rpm por un tiempo de 11 minutos. Las partículas grandes se separaron del material exfoliado. Después el

material exfoliado se colocó una parte de la dispersión en viales y se llevaron a un horno de convección para darle tratamiento térmico, a 110°C por 24 h. Pasado el tiempo, se retiró el material y se dejó enfriar. Finalmente se obtuvieron 6 muestras como se muestra en la figura 12 de las cuales se midieron propiedades ópticas y determinando aquella que cumpliera con mejores características para su posterior aplicación en bioimagen.

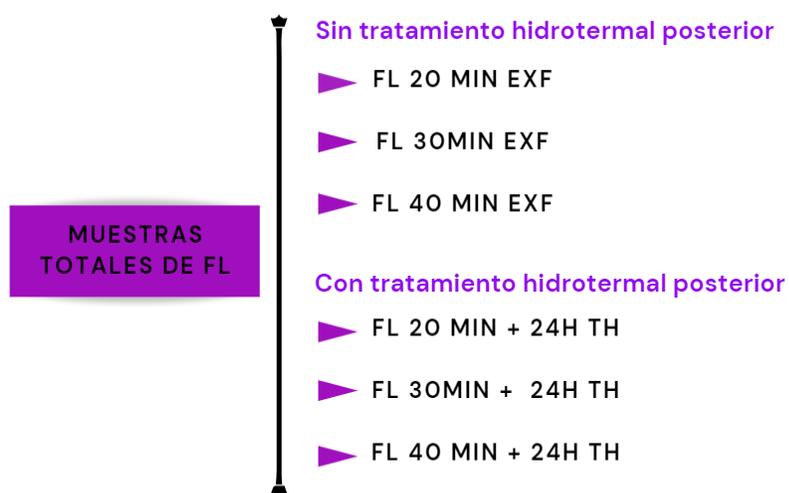


Figura 12. Descripción de las muestras que se prepararon de FL del  $g-C_3N_4$

Una vez encontradas las condiciones óptimas de proceso, se realizaron dos dispersiones de 0.8mg/mL, la primera utilizando agua desionizada (FL AD) (18.2 M $\Omega$  de resistencia), y la otra utilizando una solución de buffer de sulfatos (FL PBS) (PBS pH 7), se sometieron a exfoliación durante 30 minutos a 13,2 RPM en el homogeneizador (IKA, T 25, ULTRA TURRAX) y se purificaron de la misma manera que en los experimentos previos. Se repitió el experimento hasta tener un volumen de 200 mL para cada una de las muestras.

### 3.5. CARACTERIZACIÓN

#### 3.5.1. Microscopía electrónica de barrido

Esta técnica fue utilizada para el estudio de la morfología presente de los diferentes materiales. Se realizó en un microscopio electrónico de barrido de la marca Fei nova nanosem200. Para el análisis de las muestras se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de una dispersión de cada material y se secaron sobre un sustrato de silicio previamente lavado. Las muestras se fijaron con cinta de grafito sobre un portaobjetos, y se analizaron utilizando voltaje de aceleración de 2 KV y una distancia de trabajo de 8 mm. Se adquirieron imágenes utilizando un detector de electrones secundarios. Finalmente se adquirieron imágenes a diferente magnificación.

#### 3.5.2. Difracción de rayos x

Esta técnica fue aplicada para el estudio de la estructura cristalina del material. . Para el análisis se usó el difractómetro de rayos PANalytical Empyrean empeando una fuente de radiación Cu  $K\alpha_1$  ( $\lambda=1.54056 \text{ \AA}$ ) en un rango de  $2\Theta$  de  $5-90^\circ$ . Los patrones de difracción se adquirieron a  $0.05^\circ$  y un paso de 0.5 s, se usó una longitud de onda de  $1.54184 \text{ \AA}$ , 45 kV, 40 mA sobre el rango de  $2\Theta$  de  $5-90^\circ$ .

#### 3.5.3. Espectroscopia UV-Vis

Se obtuvieron espectros de absorbancia de los materiales utilizando un espectrofotómetro UV-VIS NIR, Cary 50 de la marca Agilent. Dispersiones de los materiales en agua desionizada se analizaron utilizando una celda de cuarzo de 3mL. El material en polvo se analizó utilizando la esfera de integración donde el polvo se colocó dentro de una bolsa de polietileno. Se realizó el cálculo del band-gap utilizando el método de Tauc.

#### 3.5.4. Espectroscopia de Fotoluminiscencia

Se utilizó un espectrómetro de fotoluminiscencia PerkinElmer LS55 para la obtención de los espectros de emisión excitando las muestras en 320 nm para el caso de las nano hojas (FL) y en 350 nm para el caso de los QDs. Para el análisis se tomaron 3 ml de cada muestra y se colocaron sobre una celda de cuarzo. Se adquirieron los espectros de excitación fijando el máximo de emisión de los materiales.

### 3.5.5. Rendimiento cuántico

El rendimiento cuántico es la relación entre los fotones absorbidos y los fotones emitidos. Para realizar el cálculo del rendimiento cuántico se utilizó la siguiente ecuación:

$$Q_s = Q_r \left( \frac{m_s}{m_r} \right) \left( \frac{n_s}{n_r} \right)^2$$

Donde:

- $Q_s$  = rendimiento cuántico de muestra problema.
- $Q_r$  = es el rendimiento cuántico de muestra de referencia.
- $m_s$  = gradiente gráfico de intensidad de la integral de fluorescencia contra la absorbancia de la muestra problema.
- $m_r$  = gradiente gráfico de intensidad de la integral de fluorescencia contra la absorbancia de la muestra referencia.
- $n_s$  = es el índice de refracción de la muestra problema.
- $n_r$  = índice de refracción de la muestra de referencia.

Como referencia se utilizó el sulfato de quinina (dihidratado 99.0-101.0% apto para fluorescencia Sigma-Aldrich), se realizaron 5 diluciones de cada material, y se recolectaron los espectros de absorción y emisión bajo las mismas condiciones, para cada una de las diluciones. Se graficó la integral de la luminiscencia contra la absorbancia a la longitud de onda de excitación y se realizó el ajuste lineal. Del ajuste se obtuvo la pendiente que se sustituye en la ecuación de rendimiento cuántico.

### 3.5.6. Espectroscopía Raman

Se obtuvieron los espectros de Raman para observar los modos de vibración de los materiales, empleando un Microscopio Raman DXR de Thermo Scientific equipado con una línea de excitación láser de 532 nm. Para el caso de los polvos, se colocaron sobre un portaobjetos sin tratamiento previo, y para el caso de las

dispersiones 20  $\mu$ L del material se secaron sobre un sustrato de silicio previamente lavado y se llevaron a su análisis.

#### 3.5.7. Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras se analizaron utilizando un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) FEI Titan G2 80-300. Las muestras se prepararon tomando una gota (aproximadamente 20  $\mu$ L ) de la dispersión de los materiales y se secó sobre una rejilla de cobre con una película delgada de carbono amorfo. Las muestras fueron observadas a un voltaje de aceleración de 300 KV y se adquirieron imágenes de alta resolución y patrones de difracción de área selecta.

#### 3.5.8. Microscopía de fluorescencia

Para la observación de las nanoestructuras resultantes, se realizó un barrido (frotis) de cada material sobre un portaobjetos limpio, posteriormente se fijó el material con calor para una mejor manipulación del mismo, fueron llevadas al microscopio de fluorescencia marca ZEISS modelo Axio Imager, a 405nm y 488nm las imágenes resultantes se obtuvieron con la cámara digital integrada al microscopio y se analizaron utilizando el software AxioVision.

### 3.6. Estudio del desempeño como biomarcadores.

#### 3.6.1. Preparación de cultivos

Para las pruebas de citotoxicidad *in vitro* se utilizaron dos cultivos de células cancerosas. Se sembró una cantidad de  $1 \times 10^4$  células de las líneas celulares pulmón (A549) y hepáticas (HUH7) en frascos de cultivo celular F-25 con 4 mL de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) suplementado con 10 % de Suero fetal bovino y antibiótico antimicótico para las células de pulmón. Las células hepáticas fueron en medio DMEM suplementado con 2% de suero fetal bovino, 1% D-glucosa ,1% aminoácidos no esenciales, 1% L-glutamina, piruvato de sodio y antibiótico penicilina estreptomina. En ambos casos se incubaron a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa.

Una vez que las células crecieron en confluencia (3-5 días de incubación), se procedió a separar las células del sustrato de cultivo. En el cultivo hepático se utilizó

tripsina sin EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), para ello se retiró el medio de la placa de cultivo y se realizaron 2 lavados con 2 mL de PBS estéril para debilitar la adherencia de las células al frasco. Se agregó al cultivo 500 mL de tripsina homogeneizando horizontalmente el frasco por al menos 1 minuto para cubrir toda la superficie. Después se incubó durante 5 minutos a 37 °C, pasado este tiempo de incubación se adicionó 1 mL de medio de cultivo, y se homogeneizó la suspensión evitando así alguna posible aglomeración celular.

Una vez hecho esto, se procedió a ajustar la densidad poblacional celular, para cultivar las células en microplacas estériles (el conteo celular se realizó en una cámara de Neubauer).

Este procedimiento se estandarizó para las pruebas de biocompatibilidad *in vitro*; el ensayo de citotoxicidad por MTT (bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)- 2,5-difeniltetrazólico) y las pruebas de bioimagen por microscopía de fluorescencia.

### 3.6.2. Preparación de las nanoestructuras para bioimagen

Las dispersiones de las nanoestructuras se esterilizaron por autoclave durante 15 minutos a 15 psi, posteriormente se realizaron diluciones en PBS para obtener concentraciones que van de 10 a 50 µg/µL.

### 3.6.3. Ensayo de citotoxicidad por MTT

Se estudió el efecto citotóxico de los nanomateriales, mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Para ello, se utilizó una microplaca de 96 pozos estéril utilizando concentraciones de 10 a 50 µg/µL de los cuatro nanomateriales: nano hojas en PBS (FL PBS), nano hojas en agua desionizada (FL AD), puntos cuánticos en PBS (QDS PBS) y puntos cuánticos en agua desionizada (QDs AD). En condiciones de esterilidad. Se agregaron  $1 \times 10^4$  células por pozo y a cada pozo se añadió 1 mL del medio correspondiente para cada línea celular, incubando las muestras durante 24h a una temperatura de 37 °C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa. Posteriormente, se añadieron 10 µL de MTT a cada pozo, y se llevaron a incubación nuevamente durante 4 h a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad en condiciones de oscuridad. Finalmente, se

retiró el medio y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de DMSO (dimetilsulfóxido) para disolver el producto formado. El MTT reducido durante este proceso, forma cristales (formazán) que al diluirlos con DMSO tornará el medio de color morado. Las células viables son proporcionales a la cantidad de formazán producido, y se cuantificaron empleando un lector de microplacas marca Thermo Scientific <sup>TM</sup> modelo Multiskan FC, con una absorbancia de 570 nm, empleando DMSO como blanco y MTT como control. Una vez obtenidas las absorbancias se procedió a hacer los cálculos correspondientes.

#### 3.6.4. Prueba de fluorescencia

Se realizó el estudio como biomarcadores en microscopía de fluorescencia. Para realizar esta prueba se empleó una microplaca de 12 pozos, estéril, y fueron inoculadas un total de  $5 \times 10^4$  células para cada línea celular, y se le agregó el medio correspondiente de cada una. Las placas fueron incubadas por 24h a 37°C. Posteriormente se agregaron los nanomateriales a estudiar (QDs AD, QDs PBS, FL PBS y FL AD) tomando concentraciones de 5-15  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Se dejó interactuando a los materiales con las células durante 4h en condiciones de oscuridad y para poder comparar se utilizó un marcador fluorescente convencional DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol). Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio y se realizaron 2 lavados con 2 mL de PBS estéril. Al terminar los lavados, las células fueron fijadas con 500  $\mu\text{L}$  de glutaraldehído. Se llevaron al microscopio de fluorescencia (marca ZEISS modelo Axio Imager), con longitudes de onda de 405 y 488 nm. Las imágenes fueron tomadas con la cámara digital integrada al microscopio y se analizaron utilizando el software AxioVision, proporcionado por el fabricante.

#### 3.6.5. Marcador de fluorescencia en células caliciformes

Para la obtención de las células se realizó un ligero raspado con un palillo de dientes en el epitelio bucal durante unos segundos, posteriormente se realizó un frotis en un portaobjetos limpio y se añadió el nanomaterial tal como se muestra en la figura 13.

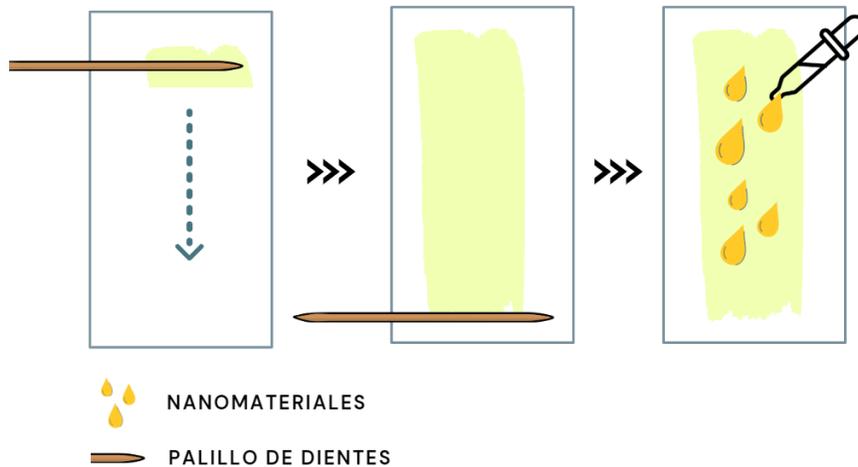


Figura 13. Esquema representativo del proceso de frotis de muestra del epitelio bucal.

Se visualizaron las células del epitelio bucal de 4 maneras. La primera fue de *manera directa* en un microscopio óptico, para la segunda se realizó una *tinción con azul de metileno*, y se observó la morfología celular en el mismo microscopio óptico, en la tercera se añadió el *nanomaterial como contraste* (QDs AD, QDs PBS, FL AD y FL PBS) y se dejó interactuar el material alrededor de 2h en condiciones de oscuridad, se escurrió el exceso y se llevaron a su análisis en el microscopio de fluorescencia ZEISS modelo Axio Imager, a 405 y 488 nm. La cuarta manera fue realizando una tinción con el marcador convencional (DAPI) y se llevó a su análisis en el microscopio de fluorescencia a 405 y 488 nm.

### 3.7. Fotocatálisis antibacteriana

#### 3.7.1. Preparación de los cultivos bacterianos.

Para la preparación de los cultivos bacterianos, se utilizó un medio de cultivo líquido, solución salina en tubos de 9 y 10mL, y medio de cultivo sólido (soya casein digest agar). Se utilizó la bacteria *Escherichia coli* la cual se sembró en tubos con medio de cultivo líquido, después se resembró 200  $\mu$ L en tubos nuevos con medio de cultivo líquido y se incubó 24h a 37°C, esto en tres ocasiones seguidas para corroborar la viabilidad de la bacteria utilizada.

### 3.7.2. Prueba de fotocatalisis

Se prepararon 4 soluciones con 10mL de medio de cultivo líquido y se añadieron 200  $\mu$ L del tubo con bacteria a cada uno de los vasos, y a dos de ellos se les añadieron 200  $\mu$ L del material (QDs AD, FL AD) como se muestra en la figura 14.



*Figura 14. Fotografías digitales de las muestras para el estudio de fotocatalisis.*

Posteriormente se expusieron la luz UV la muestra con bacteria, y las muestras de : bacteria + QD y bacteria + . Se expusieron por 4h de tal manera que tuvieran una radiación de  $0.15 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , las muestras restantes se colocaron en oscuridad total. Pasadas 4 h se tomó 1mL de cada una de las muestras y se realizaron diluciones seriadas en los tubos de solución salina previamente preparada y esterilizada. Se realizaron 7 diluciones para tener el factor de dilución 6 y 7 todo esto en condiciones de esterilidad. Se sembró 1mL del tubo con factor de dilución 7 y 6; y se realizó un vertido en placa con el medio de cultivo solido en caliente (aproximadamente 15mL del medio por caja) se utilizó una técnica de homogeneización de 8 veces 8 para evitar el aglomeramiento durante el crecimiento de colonias, obteniendo así 4 cajas Petri para cada caso:

- Bacteria
- Bacteria +UV
- Bacteria + material
- Bacteria + material + UV

Finalmente, estas fueron incubadas por 24h a 37°C y se realizó el conteo de colonias utilizando un contador de colonias, dicho procedimiento se describe en la figura 15.

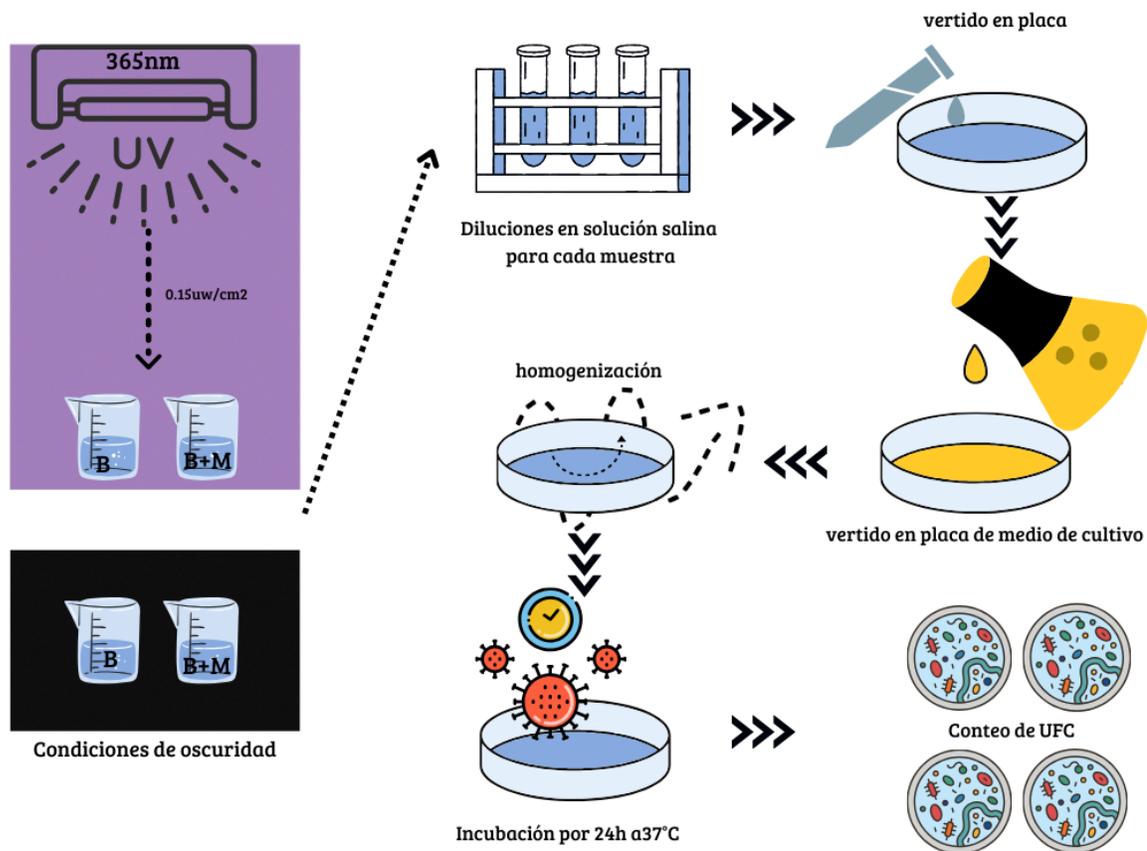
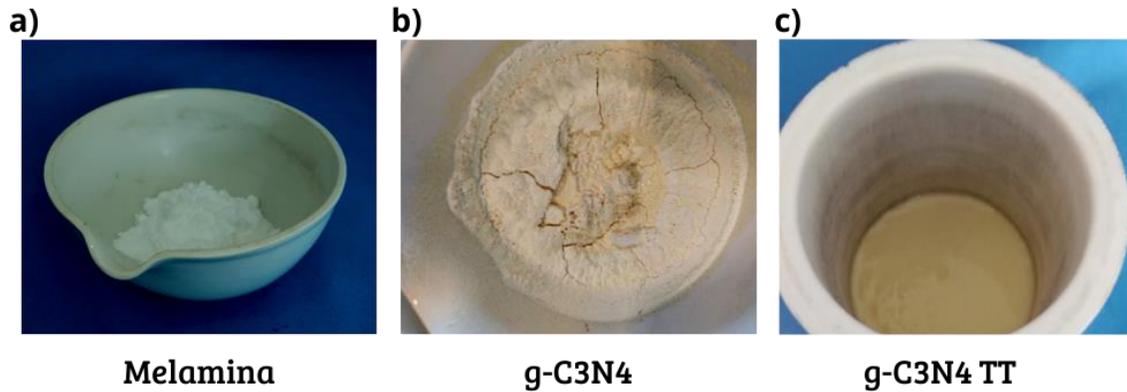


Figura 15. Procedimiento para el estudio del desempeño de fotocatalisis.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. Obtención del Nitruro de Carbono Gráfico (g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>)

El g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> es un material semiconductor que presenta un color amarillo característico [21]. En la figura 16 se muestra las fotografías del cambio observado en el material durante la obtención del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. En la figura 16a se observa la melamina con color blanco característico, luego de la pirólisis a 600°C se observa en la figura 16b el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> con un color amarillo característico. La figura 16c presenta la fotografía después del tratamiento térmico, se observa un color amarillo intenso [17].



*Figura 16. Fotografías digitales del seguimiento de obtención de  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  a partir de la melamina. a) melamina, b)  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  después de la pirólisis, c)  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  después del tratamiento hidrotermal.*

El polvo de  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  después del tratamiento hidrotermal, se observa más fino. En las micrografías de SEM (Figura 17 a y b) se muestra la morfología del material, el  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  obtenido por pirólisis, el cual presenta una morfología heterogénea de hojuelas grandes y algunas otras partículas pequeñas. En la figura 17 c y d se observa la morfología del material después del tratamiento hidrotermal. Se obtuvo un material más homogéneo aplicando el método de maduración de Ostwald donde las

partículas más grandes reabsorbieron a las pequeñas teniendo así un material más homogéneo, sin presencia de partículas pequeñas [23].

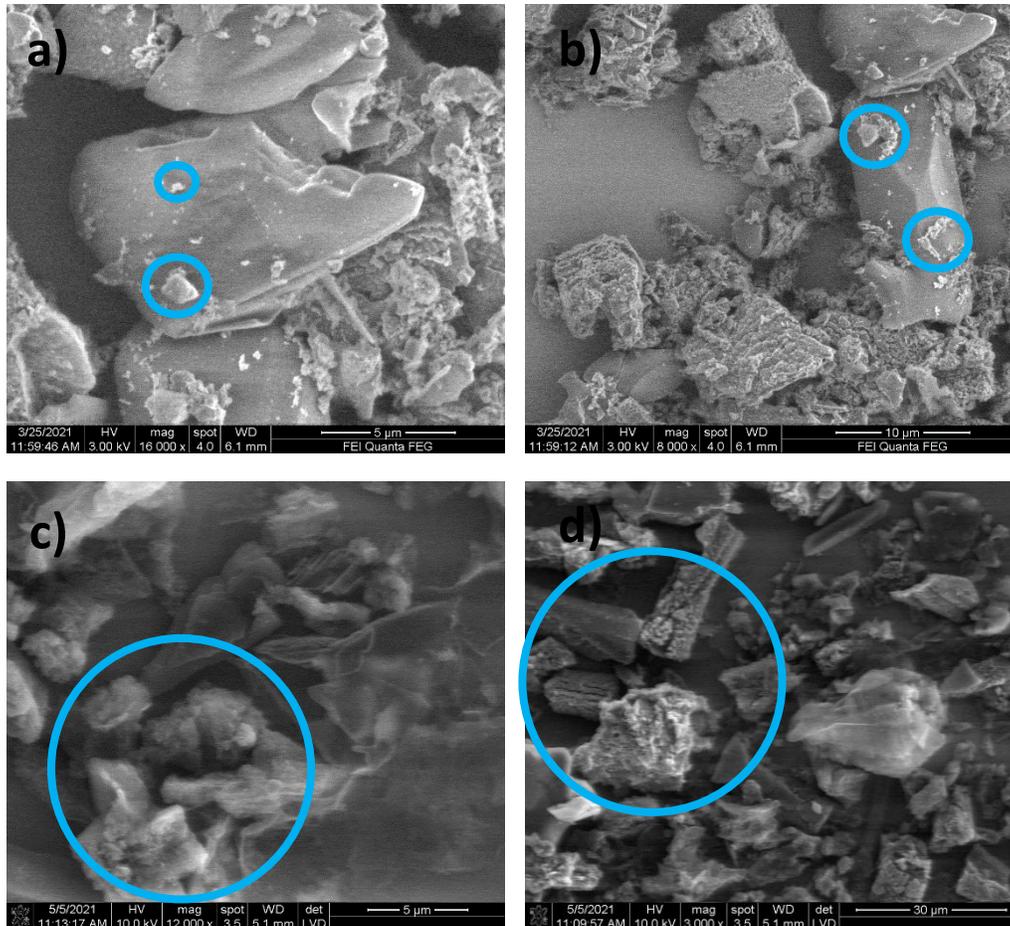


Figura 17. Micrografías de SEM de las muestras (a, b) del  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  a diferente magnificación y (c, d)  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  después del tratamiento hidrotérmal.

La microestructura del material fue analizada mediante DRX (Figura 18). Los patrones de difracción, para ambos casos presentan los picos característicos que corresponden a los planos (100) y (002). El primero alrededor de  $12.8^\circ$  (100) correspondiente al arreglo periódico de las heptazinas presentes en el material, y el segundo alrededor de  $27.5^\circ$  (002) característico al apilamiento que existe entre las capas de heptazinas, lo cual corrobora la estructura hexagonal compacta característica del material [24].

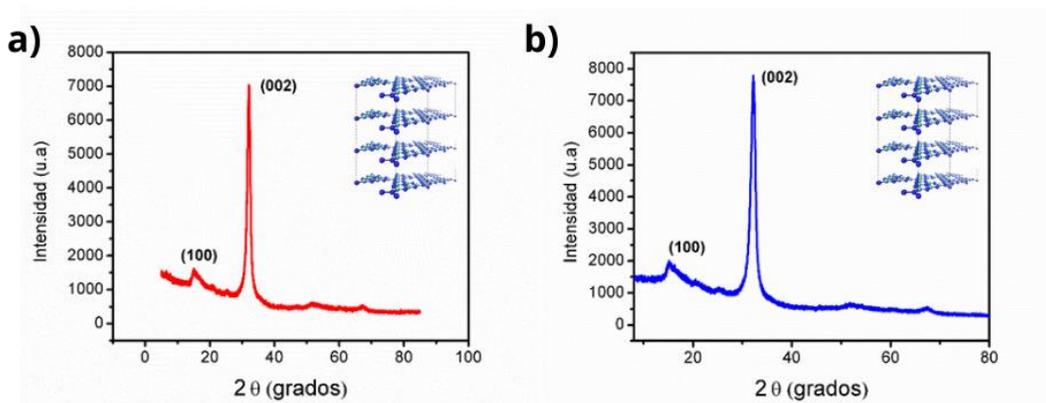


Figura 18. Patrones de difracción de rayos X del a)  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  después de pirólisis y b) el  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  después de tratamiento hidrotermal

Se estudiaron las propiedades ópticas mediante la adquisición de espectros de absorción de UV- VISNIR. Los espectros presentan los picos característicos de absorción del material alrededor de 400 nm correspondientes a transiciones  $\pi\text{-}\pi^*$ . Se realizó el cálculo para la obtención del valor de energía de banda prohibida ( $E_g$ ) por el método de tauc plot [30]. El  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  tuvo un valor de  $E_g$  de 2.68 eV (Figura 19a) y después del tratamiento hidrotermal fue de 2.71 eV (Figura 19b). El cambio observado no fue significativo y los valores se encuentran en el rango reportado para el material [25].

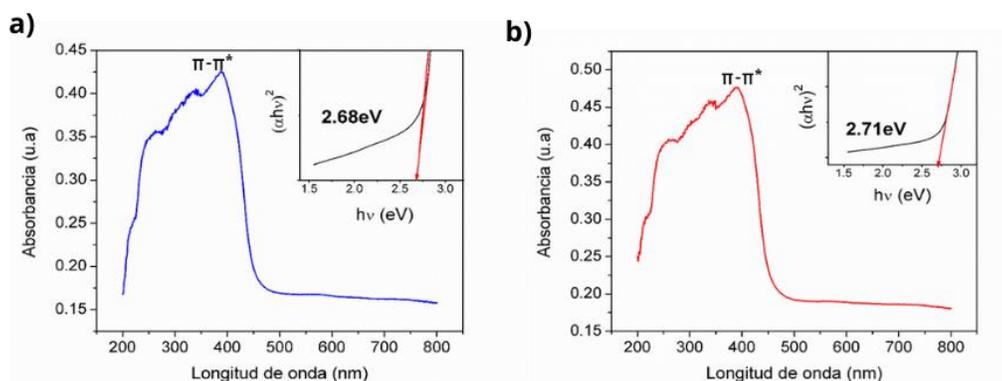


Figura 19. Espectros de absorción de UV-Vis del a)  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  y b) el  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  después de tratamiento hidrotermal

Así mismo se obtuvieron los espectros Raman para ambos casos, tales que se muestran en la figura 20. En los espectros se observan los modos de vibración correspondientes a las vibraciones de los enlaces C-N y C=N entre 1220 y 1300  $\text{cm}^{-1}$ , así mismo se observa una banda alrededor de 700  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a la vibración del grupo heptazina característicos del material. El cuadro 2 presenta otras bandas observadas con la asignación correspondiente a la vibración [25, 26]

*Tabla 2. Modos de vibración presentes en Raman para el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>*

<b>Desplazamiento Raman (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b>	<b>Vibración</b>
<b>1229</b>	C=N y C-N
<b>1309</b>	C=N y C-N
<b>1366</b>	Grupos amino
<b>681</b>	Triazina
<b>807</b>	Triazina
<b>586</b>	C=N
<b>707</b>	Heptazina
<b>767</b>	Heptazina

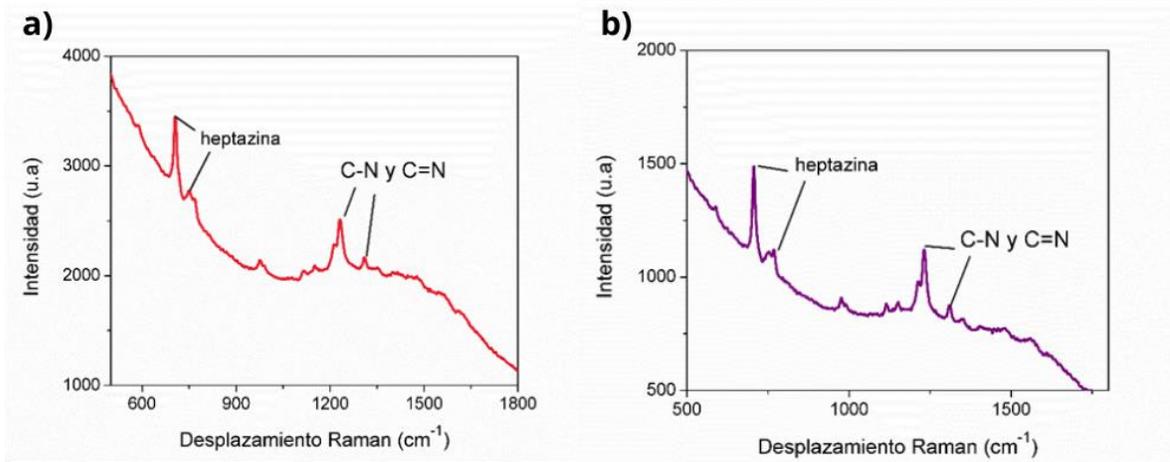


Figura 20. Espectro Raman, del a)  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  y b)  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  después de tratamiento hidrotermal.

El  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  obtenido después del tratamiento térmico se analizó por medio de Microscopía electrónica de transmisión (TEM). En la figura 21a se observa la imagen general de la muestra, donde presenta una morfología, laminar típica para los materiales en bulk de  $g\text{-C}_3\text{N}_4$ . La figura 21b presenta la imagen de la muestra observada a una mayor magnificación donde es posible ver los bordes de las hojuelas, deduciendo una estructura multicapa, con bordes irregulares. Las hojuelas no presentan formaciones o presencia de partículas en la superficie, lo que indica la obtención de una muestra homogénea con una morfología en su mayoría laminar. La figura 21c contiene la imagen correspondiente al análisis de difracción de electrones de área selecta, y se puede observar un anillo de difracción que coincide con el plano (200) que corresponde a la estructura gráfica del material y es consistente con lo reportado en la literatura JCPDS con el PDF #75-1621.

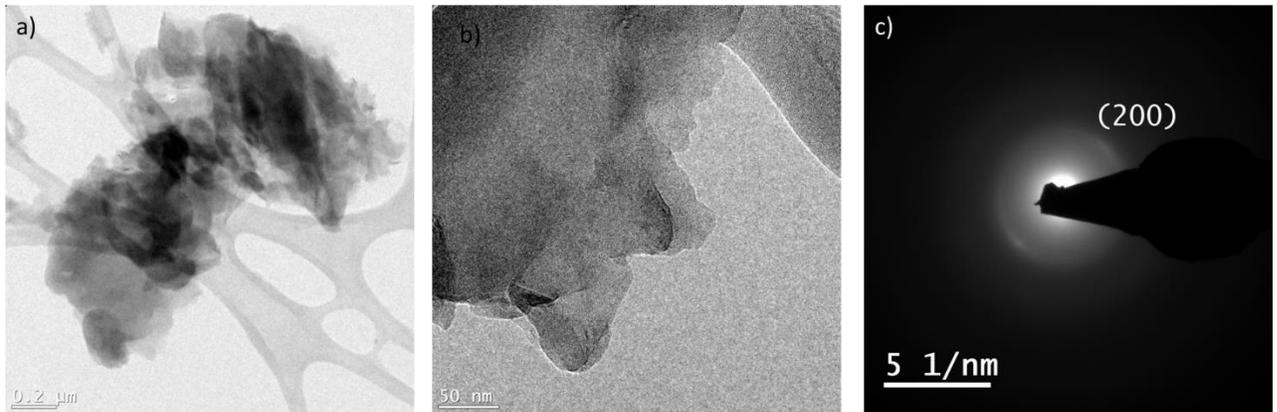


Figura 21. Análisis TEM  $g-C_3N_4$  después de tratamiento hidrotermal a) baja magnificación b) alta magnificación c) SAED

#### 4.2. Preparación de $g-C_3N_4$ parcialmente exfoliado (FL- $g-C_3N_4$ )

Para la obtención de muestras parcialmente exfoliadas, FL, por las siglas en inglés (few layers) se realizaron dos estudios con el objetivo de mejorar las propiedades ópticas de los materiales. Se estudió el tiempo de exfoliado, se mantuvo constante la velocidad de exfoliación a 13.2 rpm y se varió el tiempo a 20, 30 y 40 min buscando obtener una mayor cantidad de material exfoliado. Se analizaron las muestras de FL mediante SEM. En la figura 22 ay b, donde se observó que aquellas que fueron exfoliadas con 20 minutos presentaban poco material exfoliado y se observó aglomeración de hojuelas grandes del material que no alcanza a exfoliarse y partículas más grandes. La morfología de la muestra exfoliada por 30 minutos (figura 22 c y d) presenta mayor cantidad de capas delgadas, con menor aglomeración a comparación de aquellas que fueron exfoliadas por 20 minutos. Finalmente, la muestra exfoliada por 40 minutos (figura 22 e y f) a pesar de haber más material exfoliado, se observó material fracturado, esto disminuye el tamaño lateral de las hojuelas debido al aumento del tiempo de exfoliado.

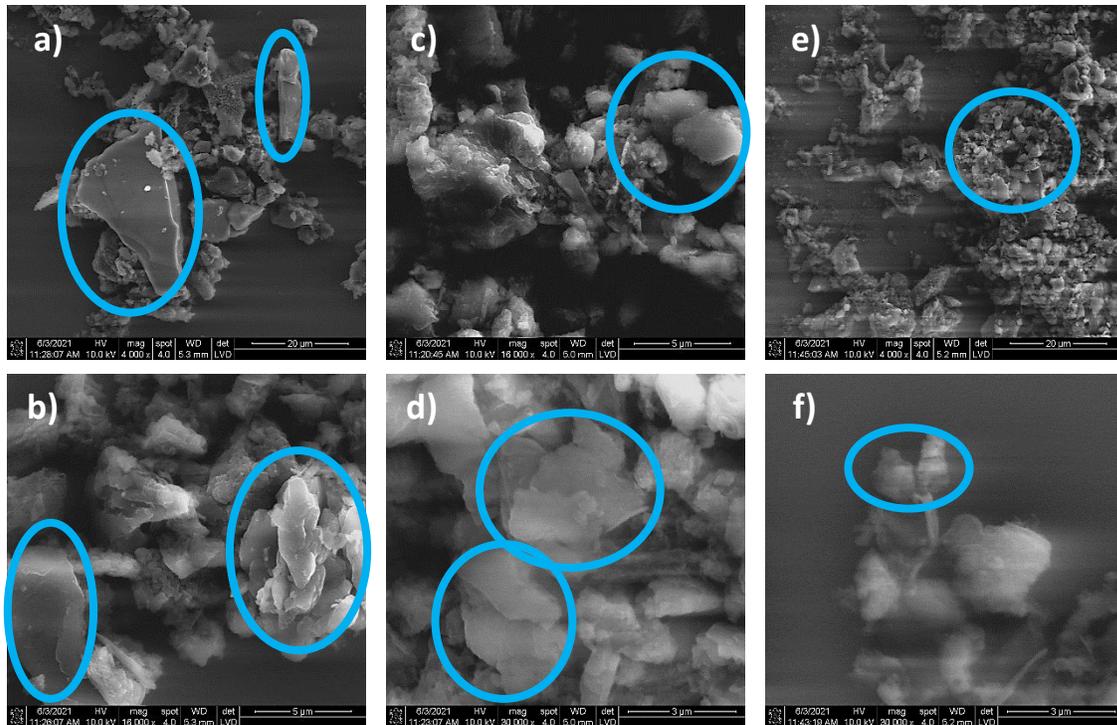


Figura 22. Micrografías de SEM de las FL  $g-C_3N_4$  con diferente tiempo de exfoliación (a y b) 20min (c y d) 30 min y (e y f) 40 min

Se analizaron las propiedades ópticas mediante espectroscopía de UV-Vis. En los espectros de absorción (Figura 23), se observan la banda de absorción correspondiente a la transición  $\pi-\pi^*$  alrededor de 330 nm, el valor de longitud de onda es menor respecto al material original el cual se encontraba alrededor de 450nm, lo que indica una disminución en el tamaño. A 250 nm se observa otra banda de absorción correspondiente a transiciones  $\pi-\pi^*$  propias del grupo melem.

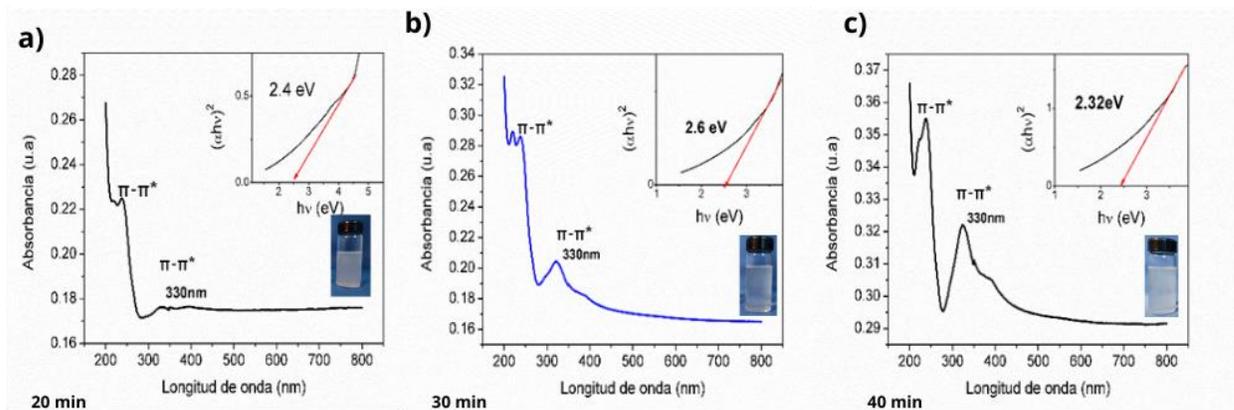


Figura 23. Espectros de absorción Uv-Vis de las FL  $g-C_3N_4$  a diferente tiempo de exfoliación a) 20min, b) 30 min y c) 40 min

A partir de los espectros se obtuvo el valor de  $E_g$  en función del tiempo de exfoliación los cuales fueron 2.4 eV para una exfoliación de 20min, 2.6 eV para 30min y 2.32 eV para 40 min respectivamente. Los tres casos presentan valores característicos del material exfoliado (FL) [27, 28, 29]. Se colectaron los espectros de PL que se observan en la figura 24 para los experimentos en función al tiempo de exfoliación. Las muestras fueron excitadas a una longitud de onda de 320nm y se observó una emisión máxima en 440nm. Estas propiedades son adecuadas para aplicar los materiales como contraste ya que tiene su máximo de emisión en la región visible.

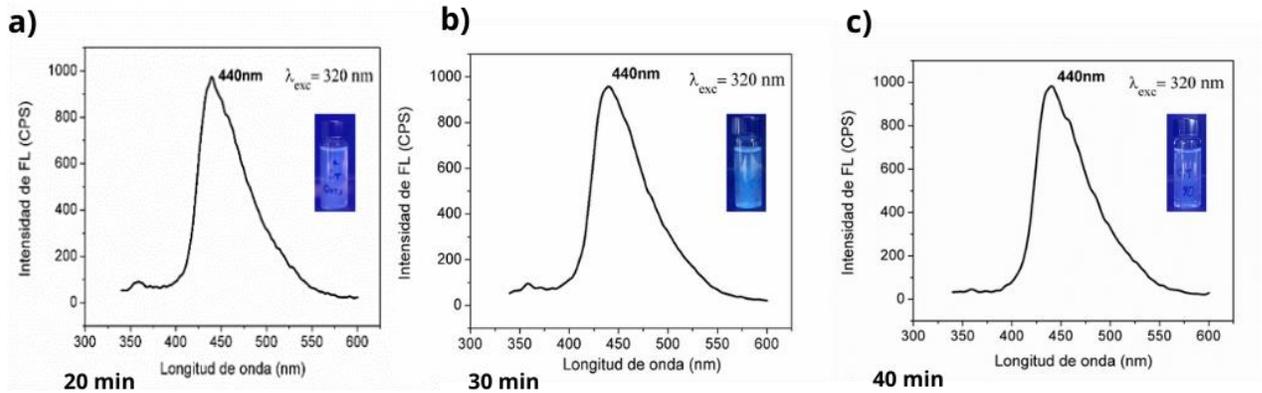


Figura 24. Espectros de fotoluminiscencia para las muestras de FL  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  a diferente tiempo de exfoliación a) FL a 20 min, b) FL a 30 min y c) FL a 40 min.

Para observar la estabilidad de las nanoestructuras se sometieron a un tratamiento hidrotermal de 24h a  $110^\circ$  posterior al tiempo de exfoliado. Se ha reportado que bajo este tratamiento puede ocurrir que las partículas grandes reabsorban a las pequeñas por el mecanismo de envejecimiento de Ostwald y también eliminar los defectos morfológicos como fracturas o huecos [23]. Sin embargo, también puede resultar en un crecimiento del nanomaterial o en la aglomeración, ambos efectos tienen consecuencias en las propiedades ópticas como la fotoluminiscencia. La figura 25 muestra las micrografías de SEM correspondientes; En la figura 25 a se observó que las muestras con tiempo de exfoliación de 20 después del tratamiento aun había presencia de partículas pequeñas, en las muestras de 30 minutos (figura 25 b) después del tratamiento hidrotermal presentaron tendencia a aglomerarse. Para el caso de la muestra con tiempo de exfoliación de 40 minutos (figura 24 c) el tratamiento hidrotermal favoreció la eliminación de huecos o defectos en las FL.

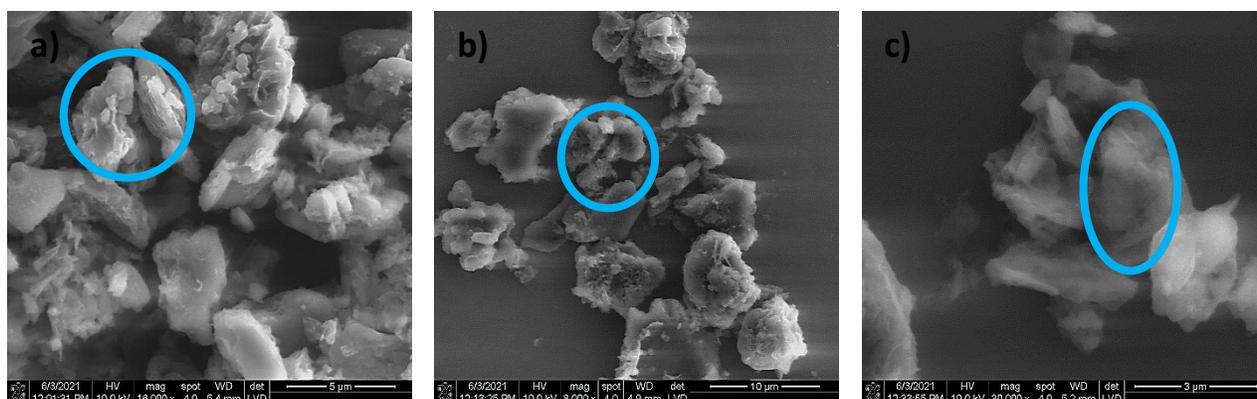


Figura 25. Micrografías de SEM, para las muestras de FL- a)nanhojas A 20min con TT , b)nanhojas a 30min con TT , c)nanhojas a 40min con TT

Se analizaron las propiedades ópticas posteriores al tratamiento hidrotérmal mediante el estudio de espectroscopia de UV-Vis y PL. El espectro de UV-Vis presenta el máximo de absorción en 330 nm. El espectro de emisión tiene un máximo en 440 nm cuando fue excitado con 320 nm. Lo cual indica que a pesar de las diferencias morfológicas observadas no sufrieron modificaciones significativas en las características ópticas. Además, se obtuvieron los valores de energía de banda prohibida y el rendimiento cuántico (QY) [26] de cada una de las muestras sintetizadas y se presentan en el la tabla 3.

Tabla 3. Valores de energía de banda prohibida ( $E_g$ ) y rendimiento cuántico de las FL  $g-C_3N_4$

Muestra	$E_g$ (eV)		QY (%)	
	Sin TT	Con TT	Sin TT	Con TT
FL 20MIN	2.5 eV	2.5 eV	46%	16%
FL 30MIN	2.6 eV	2.6 eV	48%	7%
FL 40MIN	2.3 eV	2.5 eV	17%	15%

Se observó en general que los materiales con tratamiento hidrotermal presentaban valores menores de QY, y esto debido a que durante el tratamiento se favoreció la aglomeración del material dando como resultado menor área superficial. El rendimiento cuántico es un factor importante en la aplicación de materiales como contraste en bioimagen. Los valores obtenidos son altos comparados con la literatura, ya que para este tipo de nanoestructuras se han reportado entre 19% y 20%, [27, 29], y son valores mayores al 4.8% que es el reportado para el material en bulk, [35]. Las nanoestructuras que no tuvieron un tratamiento térmico, presentaron mejores propiedades ópticas, lo que indica la influencia que tiene la temperatura en cuanto a la luminiscencia, ya que mientras mayor sea el rendimiento cuántico, mayor será la luminiscencia del material.

. Para el estudio del desempeño en la aplicación de bioimagen se seleccionó aquella que tuvo un QY mayor.

#### 4.2.1. Preparación de FL de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> para su aplicación en bioimagen

Se prepararon 200mL de FL g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> exfoliadas a 30 minutos. Se realizaron dos dispersiones una en agua desionizada (FL AD) y otra en una solución buffer de PBS (FL PBS). La elaboración de una dispersión en una solución buffer fue con el objetivo que descartar la posible toxicidad del material debido al efecto del PH, ya que al trabajar con material biológico (células, bacterias etc), existen diferentes variantes que podrían afectar el crecimiento de estas, tales como es el medio, el pH, la temperatura, o el tiempo de incubación de estas. El agua desionizada, en sí podría actuar como desestabilizante de la membrana celular al ser una solución del tipo hipotónica. Al utilizar una solución de PBS que es una solución isotónica [32] (electrolítica), mantiene un pH constante y evita cambios repentinos de pH en el medio donde se inoculen las células. Adicionalmente al preparar los materiales en esta solución se obtiene un pH constante de 7 el cual favorece el crecimiento celular.

En la figura 26 se presentan las imágenes de las FL g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> preparadas en PBS (FL PBS) y agua desionizada (FL AD), bajo luz natural y la luz ultravioleta con una longitud de onda de 325nm. Bajo la luz ultravioleta se logra ver el color azul característico de la emisión del material excitado a tal longitud de onda [29].

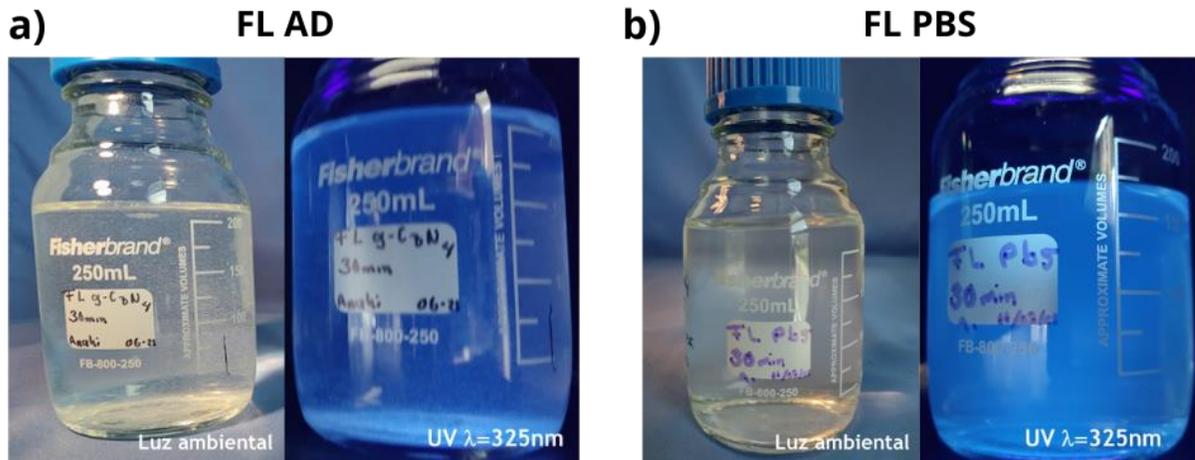


Figura 26. Fotografías de las dispersiones de FL  $g-C_3N_4$  en diferente medio bajo la luz natural y lámpara UV a) FL AD y b) FL PBS

En la figura 27 se muestran las imágenes por SEM de las FL AD Y FL PBS. En la figura 27 a y b se observan aquellas sintetizadas con agua desionizada, donde se observan las láminas aglomeradas, formando arreglos de mayor tamaño. En la figura 27 c y d se observan aquellas sintetizadas con PBS donde se logra ver menos aglomeración, así como laminas más pequeñas aisladas. Esto último debido al efecto que tiene el medio en el cual se sintetizaron. La solución de PBS favorece la estabilización electrostática de las FL  $g-C_3N_4$  resultando en láminas que no sufren aglomeración o re-apilamiento [3]. El pH es un factor muy importante, en este caso, las FL  $g-C_3N_4$  se encuentran a pH 7, gana mayor estabilidad y la luminiscencia aumenta. [28, 33].

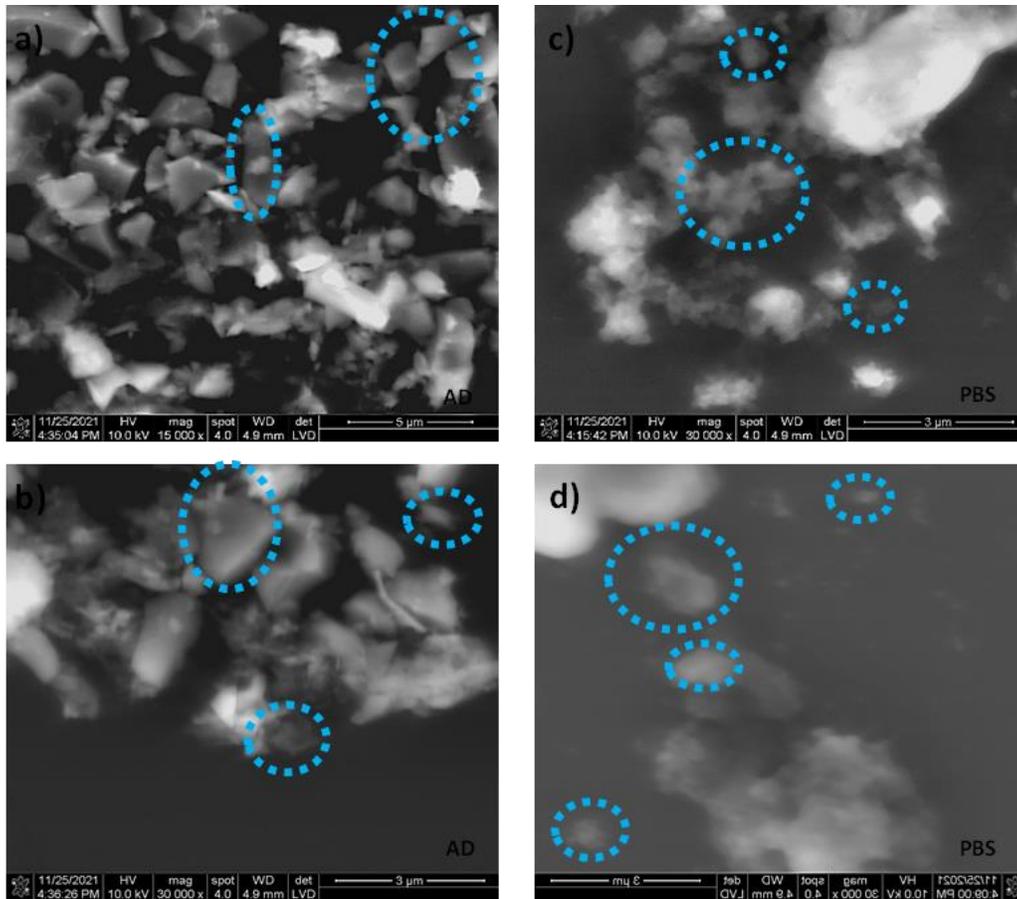


Figura 27. Micrográficas de SEM de (a y b) FL  $g-C_3N_4$  en agua desionizada y (c y d) FL  $g-C_3N_4$  en PBS.

Se estudió el cambio en las propiedades ópticas de las FL de  $g-C_3N_4$  como función del medio y para esto se colectaron los espectros de absorción de UV-Vis (Figura 28). El espectro correspondiente a la dispersión en agua desionizada presentó un máximo de absorción alrededor de 320 nm correspondiente a la transición electrónica  $\pi - \pi^*$ , con un  $E_g$  de 2.77 eV, y para las FL  $g-C_3N_4$  en PBS se observa que hubo un desplazamiento en el espectro hacia la región UV, teniendo el máximo de absorción alrededor de 250 nm, con un  $E_g$  de 4.25 eV.

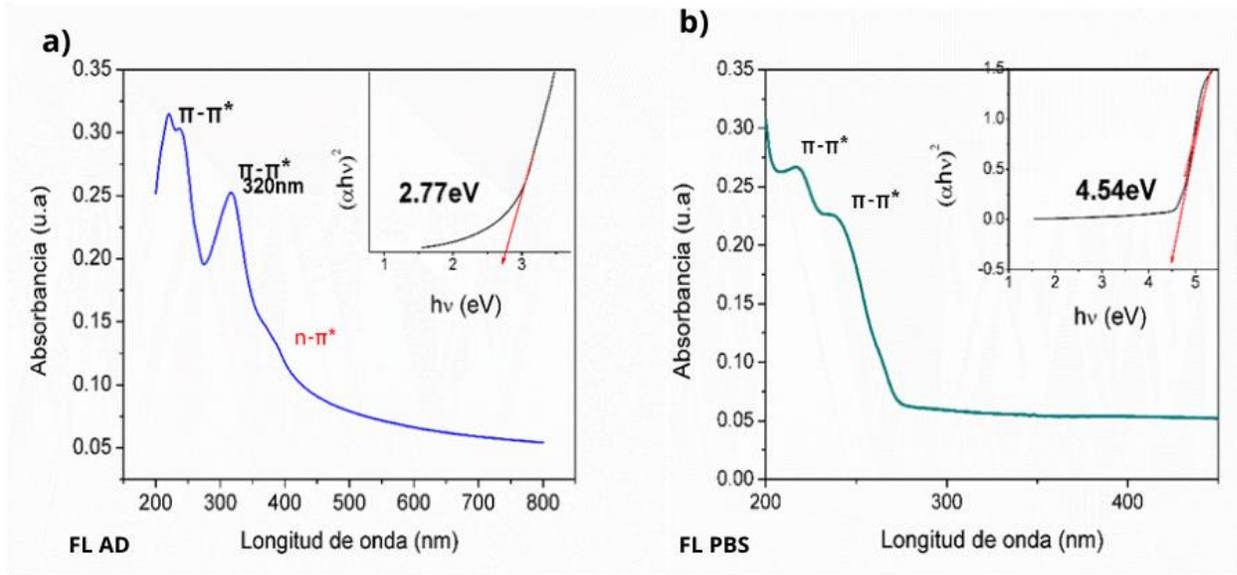


Figura 28 . Espectros de UV-Vis de a) FL  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  en agua desionizada y b) , FL  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  en PBS

Los espectros presentaron una segunda absorción alrededor de los 200 nm que corresponden a transiciones del tipo  $n\text{-}\pi^*$ . Los espectros de PL que se muestran en la figura 29 fueron adquiridos con una longitud de onda de excitación de 320 nm observándose el máximo de emisión en 440nm [27, 28, 33].

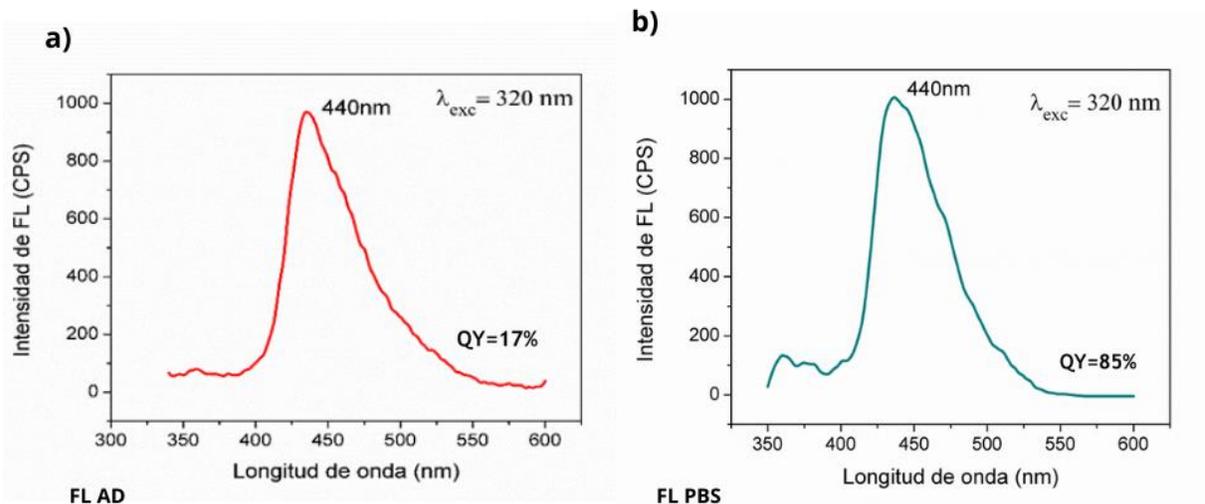
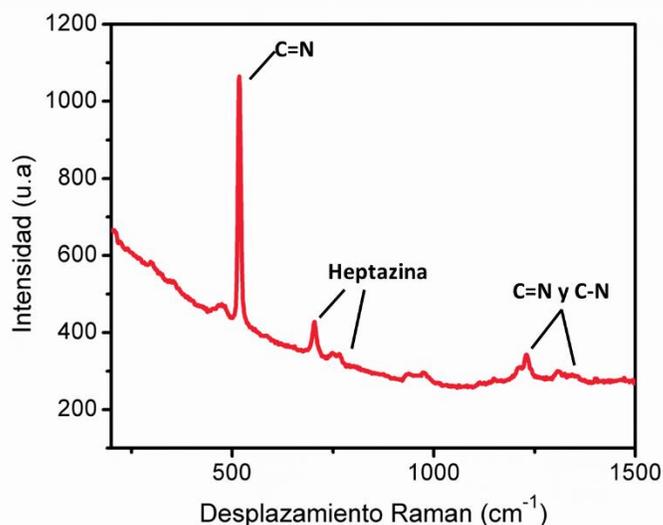


Figura 29. Espectros de fotoluminiscencia de a) FL  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  AD y b) FL  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  PBS

Se obtuvieron los valores del rendimiento cuántico para ambos sistemas. Las FL g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en agua desionizada tienen un valor de 17% y para las FL g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en PBS se observó un aumento, hasta un QY del 85%. Esto debido a que el medio en el que se prepararon las FL favoreció la estabilidad de las nanoestructuras eliminando la interacción entre hojuelas y las transiciones no radiativas [33]. Para ambos casos se tuvieron resultados favorables característicos del material y la naturaleza del medio en el cual se sintetizaron [28]. Así mismo se obtuvo el espectro Raman el cual se muestra en la figura 30. El espectro correspondiente a las FL g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> AD (sintetizadas en Agua desionizada), presentó bandas características del material a 681 cm<sup>-1</sup> vibración del arreglo triazina, entre 1229 cm<sup>-1</sup> y 1309 cm<sup>-1</sup> correspondientes a las vibraciones de C=N y C-N, por último se observó una banda intensa alrededor de 500 cm<sup>-1</sup> la cual corresponde a la vibración de los grupos amino NH<sub>2</sub>. [26, 34]



*Figura 30. Espectro Raman de las FL g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en agua desionizada*

De igual manera se realizó el análisis por TEM de las muestras FL AD 30 min. En la figura 31a se observa la imagen general de la muestra donde se presenta la morfología laminar típica de las nano hojas de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. En la 31b se observa una mayor magnificación donde se muestra un apilamiento entre laminas con bordes

definidos y presencia de partículas lo cual nos indica un rompimiento entre laminas. Finalmente, en la 31c se muestra el análisis SAED donde no se observan anillos de difracción ni dispersión lo pudiera indicar cierta amorficidad.

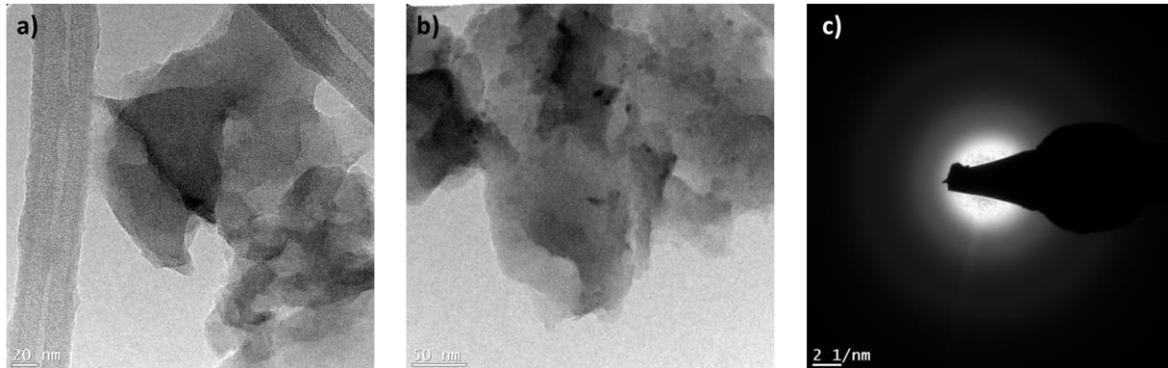


Figura 31. Análisis TEM FL AD 30MIN a) baja magnificación b) alta magnificación c) análisis de SAED

#### 4.3. Obtención de puntos cuánticos

Los puntos cuánticos se obtuvieron a partir del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> criomolido. En la figura 32 se observa el cambio que tuvo el material al someterse al proceso de criomolienda. Un polvo más fino de color amarillo intenso se obtuvo después de este proceso, se observa el cambio a simple vista. El g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> después de la crio molienda presenta una morfología más homogénea, con una forma redondeada a diferencia de las forma de hojuela del material original, también se observa una clara disminución en el tamaño de partícula así como se muestra en la figura 33a. En la figura 33b presenta el espectro de absorción UV-vis del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> criomolido el cual presenta un máximo de absorción en 400 nm asociada a las transiciones  $\pi$ -  $\pi^*$ . Se calculó un band-gap de 2.25eV característico de este material [6, 17, 25]. ,

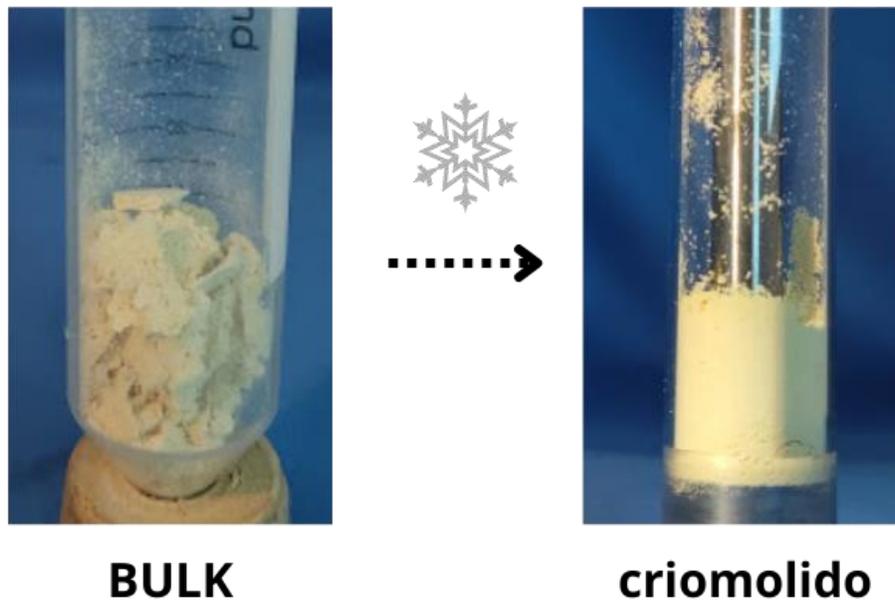


Figura 32. Fotografías del  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  antes y después del proceso de criomolido.

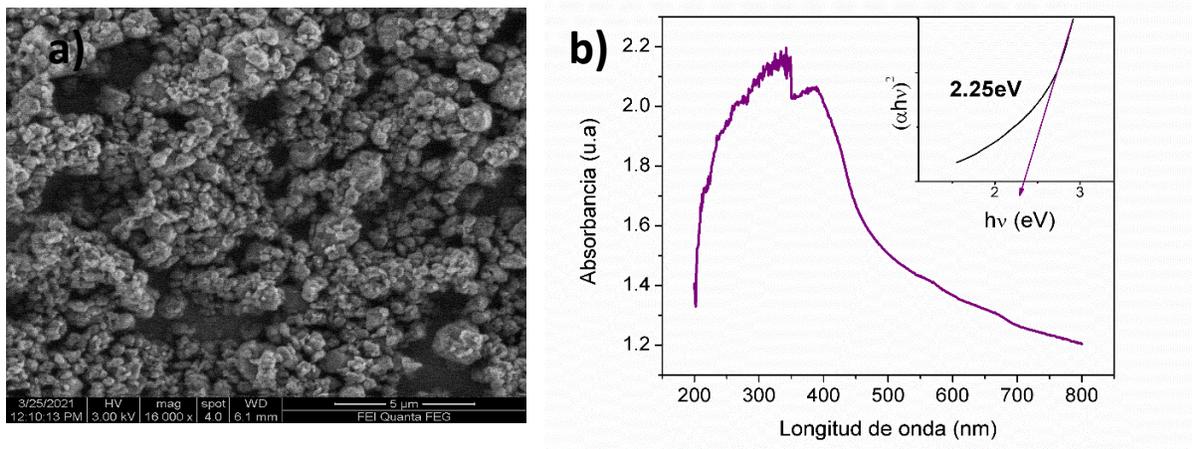


Figura 33. Caracterización morfológica y óptica del  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  criomolido. a) Micrografía de SEM y b) espectro de absorción de UV-Vis (recuadro muestra el cálculo del  $E_g$ )

El material se caracterizó mediante difracción de rayos X (DRX) y el patrón adquirido se presenta en la figura 34a. Se observan las reflexiones principales del material asociadas a los planos (002) y (100), de una estructura hexagonal compacta. La Se compararon los picos de difracción del plano (002) del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> antes y después de la criomolienda, y se observó que fue más ancho en el material criomolido. Esto se debe a que presenta un mayor desorden estructural debido a la fractura de las hojuelas y rompimiento de enlaces que se da durante la criomolienda [24].

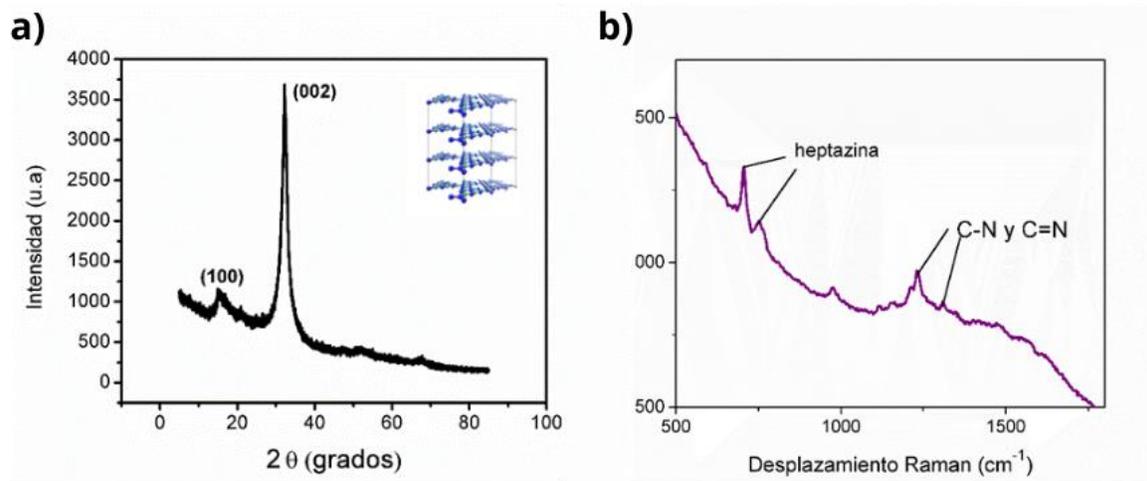
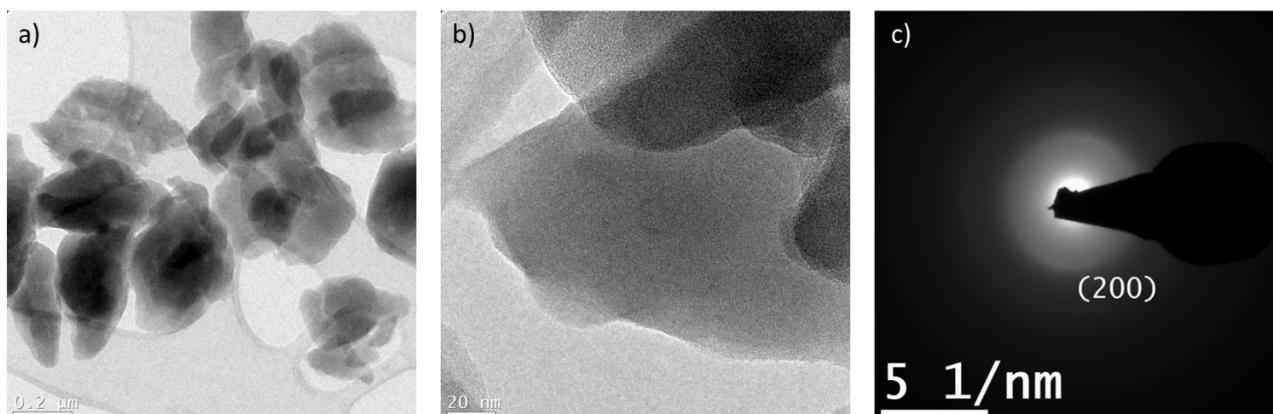


Figura 34. Estudio de la microestructura del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> después del proceso de criomolienda; a) patrón de difracción de rayos X y b) espectro Raman.

Así mismo se caracterizó por Raman, el cual se observa en la figura 34b , mostrando las bandas características a la heptazina y a los enlaces C-N Y C=N presentes en la molécula, no hubo algún cambio significativo en comparación con el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>original y lo reportado en la literatura. [26, 34]

De igual manera se realizó la caracterización del material por TEM en la figura 35a, en donde se observa a baja magnificación el material con morfología característica del material criomolido. En la figura 35b a mayor magnificación se muestra la estructura del material de manera más irregular, esto debido a que el material después de la criomolienda tiende a volverse más amorfo. Así mismo en la figura 36c se observa en análisis SAED, donde no se aprecian anillos de difracción, solamente un anillo de dispersión que se asocia al plano 200, esto de acuerdo a lo reportado en la literatura JCPDS con el PDF #75-1621.



*Figura 35. Análisis TEM PARA  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  criomolido a) baja magnificación b) alta magnificación c) Análisis SAED*

A partir del  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  criomolido se prepararon puntos cuánticos en PBS (QDs PBS) y puntos cuánticos suspendidos en agua desionizada (QDs AD). La figura 36 presenta las fotografías correspondientes a las dispersiones observadas bajo la luz ambiental (figura 36a) (solución turbia blanca) y bajo la luz ultravioleta (365 nm) (figura 36b) presentando en ambos casos una emisión de luz azul intensa característica.

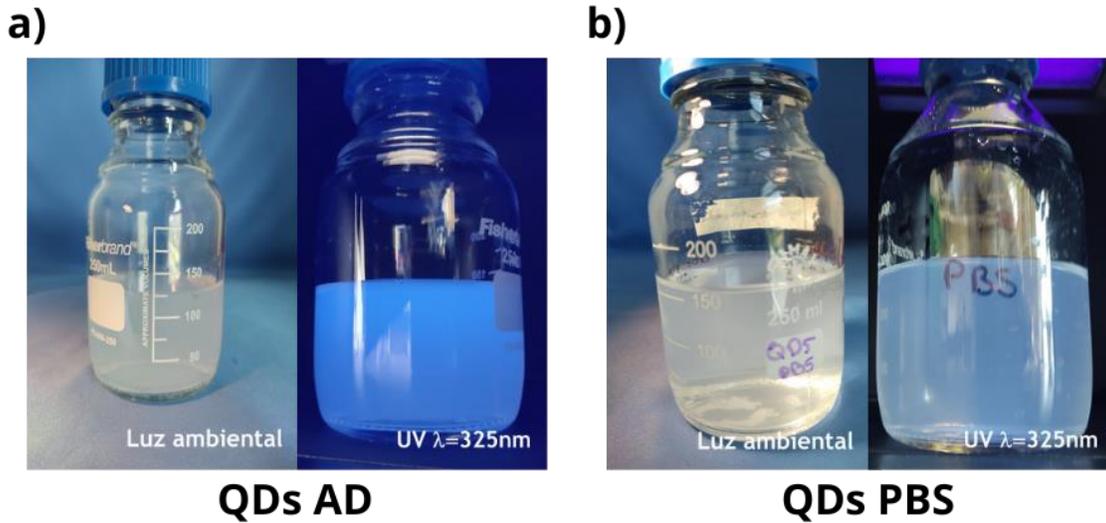


Figura 36. Fotografía de las dispersiones de QDs bajo la luz ambiental y la luz UV. dispersión de QDs  $g-C_3N_4$  en AD y b) dispersión de QDs  $g-C_3N_4$  en PBS

Con la finalidad de caracterizar los materiales que se utilizan como contraste, se llevó a cabo el estudio de las propiedades ópticas. La figura 37, presenta los espectros de UV-VIS para ambos casos de estudio. Los QD de  $g-C_3N_4$  dispersados en agua desionizada presentan un espectro de UV-Vis característico con una absorción en 330 nm correspondiente a transiciones  $\pi-\pi^*$ , otra absorción alrededor de 215 nm que corresponde al melem igual con transiciones  $\pi-\pi^*$ , y a 400 nm se presenta la absorción que corresponde a transiciones del tipo  $n-\pi^*$ . Estas últimas transiciones pueden ser radiativas o no radiativas. Para el caso de los QDs AD se obtuvo un band-gap de 2.57 eV correspondientes a la literatura [7, 21].

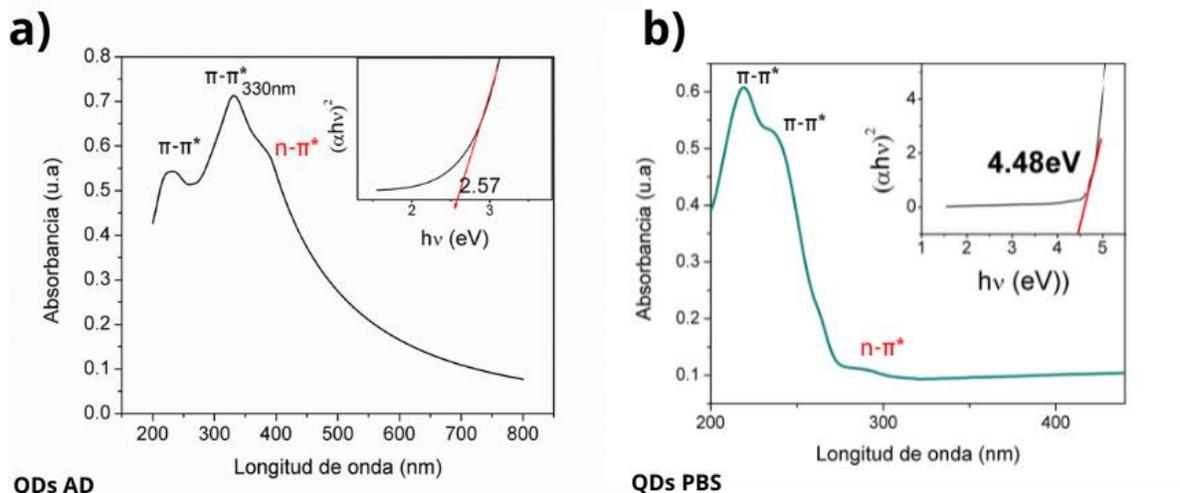


Figura 37. Espectros de UV-vis de las dispersiones de QDs de  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  a) QDs en AD y b) QDs en PBS

El espectro que corresponde a QDs PBS, presentó un corrimiento en la banda de absorción a 250 nm para las transiciones  $\pi\text{-}\pi^*$ , a 215 nm las transiciones del tipo  $\pi\text{-}\pi^*$ , y una banda de menor intensidad alrededor de 300 nm que puede deberse a transiciones tipo  $n\text{-}\pi^*$  de grupos funcionales a base de oxígeno o nitrógeno. En este caso el valor calculado de bangap fue de 4.48 eV el cual puede deberse a la promoción en la disminución en el tamaño de partícula debido al medio electrolítico en el cual fueron sintetizados. Debido a la presencia de una solución con iones se favorece la estabilización electrostática y en consecuencia la disminución del tamaño de partícula. resultando en una mejora en las propiedades ópticas del material. [25, 33]

Se obtuvieron también los espectros de PL para ambos casos excitando con una longitud de onda de 350 nm (Figura 38).

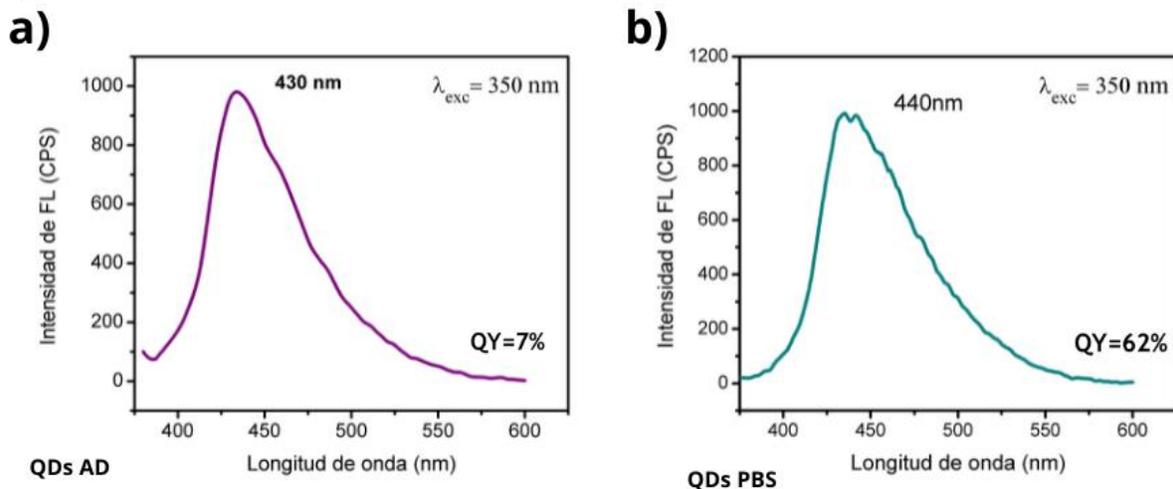


Figura 38. Espectros de fotoluminiscencia de las dispersiones de QDs de  $g\text{-C}_3\text{N}_4$ . Espectro de emisión de a) QDs en AD y b) QDs en PBS

Los QDs AD presentan una emisión máxima en 430nm y para aquellos preparados con PBS la emisión máxima se observa en 440 nm. De igual manera se hizo el cálculo del rendimiento cuántico para ambos casos y se observa que los QDs AD promovieron un QY de 7% y para los dispersados en PBS (QDs PBS) hubo un incremento obteniendo un QY de 62%. Como en el caso del incremento del  $E_g$ , esta reportado que el medio electrolítico favorece la dispersión y estabilidad lo que incrementa el rendimiento cuántico significativamente comparado con el reportado en la literatura de 4.8% para el  $g\text{-C}_3\text{N}_4$ . Estos resultados sugieren que se presentó también una disminución en el tamaño de partícula, sin embargo, debido a la presencia del PBS, no se pudieron observar las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión. [7, 21, 34]

Así mismo se analizaron los puntos cuánticos de agua desionizada por medio de microscopía electrónica de transmisión (TEM). En la figura 39a se observa la imagen general a baja magnificación, donde se muestra la morfología característica de los puntos cuánticos. En la figura 39b se muestra la gráfica de distribución de tamaños donde se presenta en su mayoría diámetros de 3 a 4 nm, así mismo la distribución de tamaños es angosto En la figura 39c se observa el análisis por difracción de electrones de área selecta (SAED), donde se muestran spot de

difracción muy difusos que forman un anillo característico de los puntos cuánticos. En la figura 39d que tiene una imagen de alta resolución se observan las partículas con algunas líneas correspondientes a la distancia interplanar de 0,129nm correspondiente al plano 002 según la literatura PDF #75-1621.

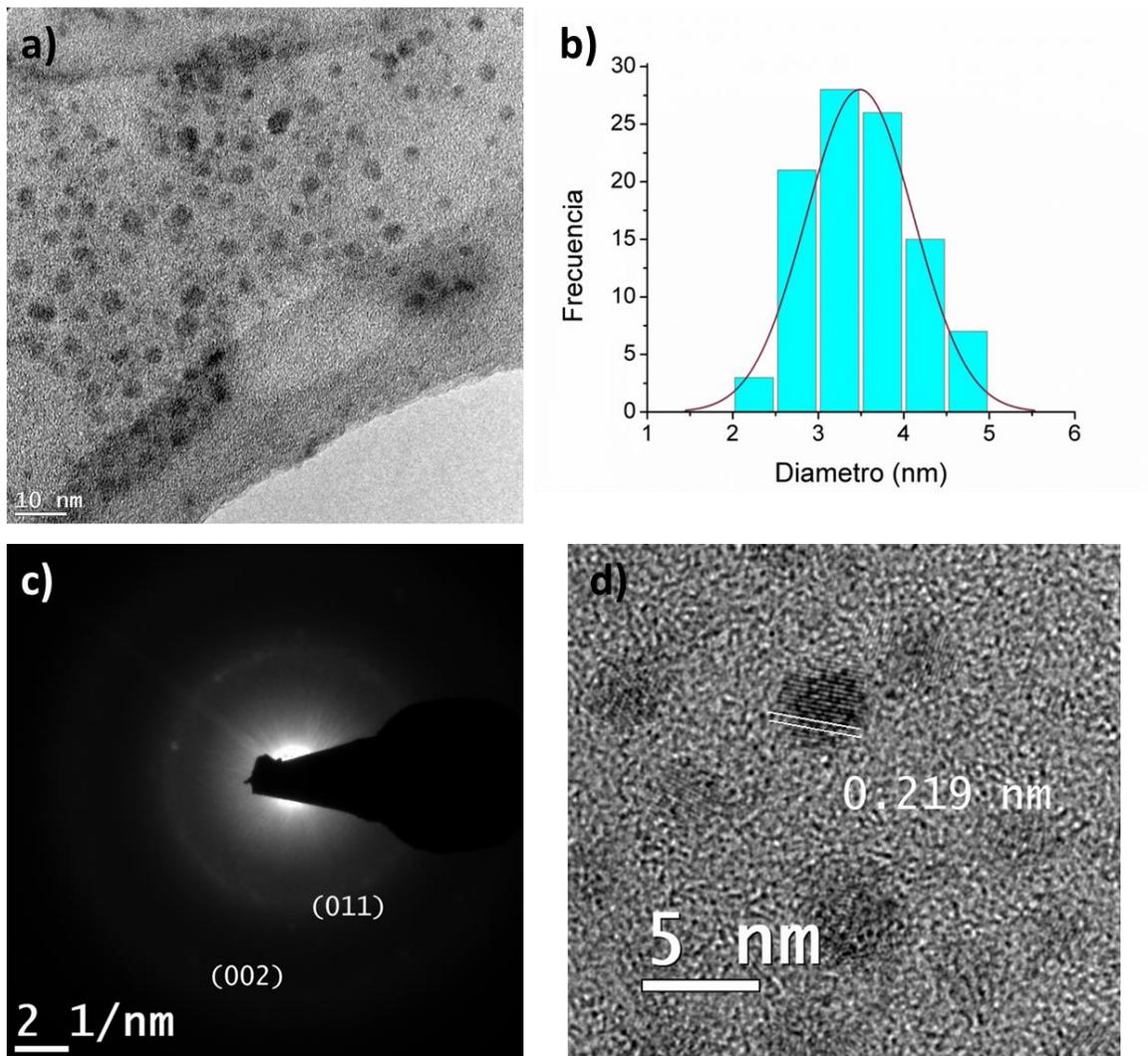


Figura 39. Análisis TEM Y SAED PARA QDS AD a) baja magnificación b) distribución de tamaños c) análisis SAED d) distancia interplanar

En el cuadro 4 Se muestra un resumen de las propiedades ópticas de las 4 nanoestructuras de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> que serán estudiadas como contraste en bioimagen en microscopio de fluorescencia.

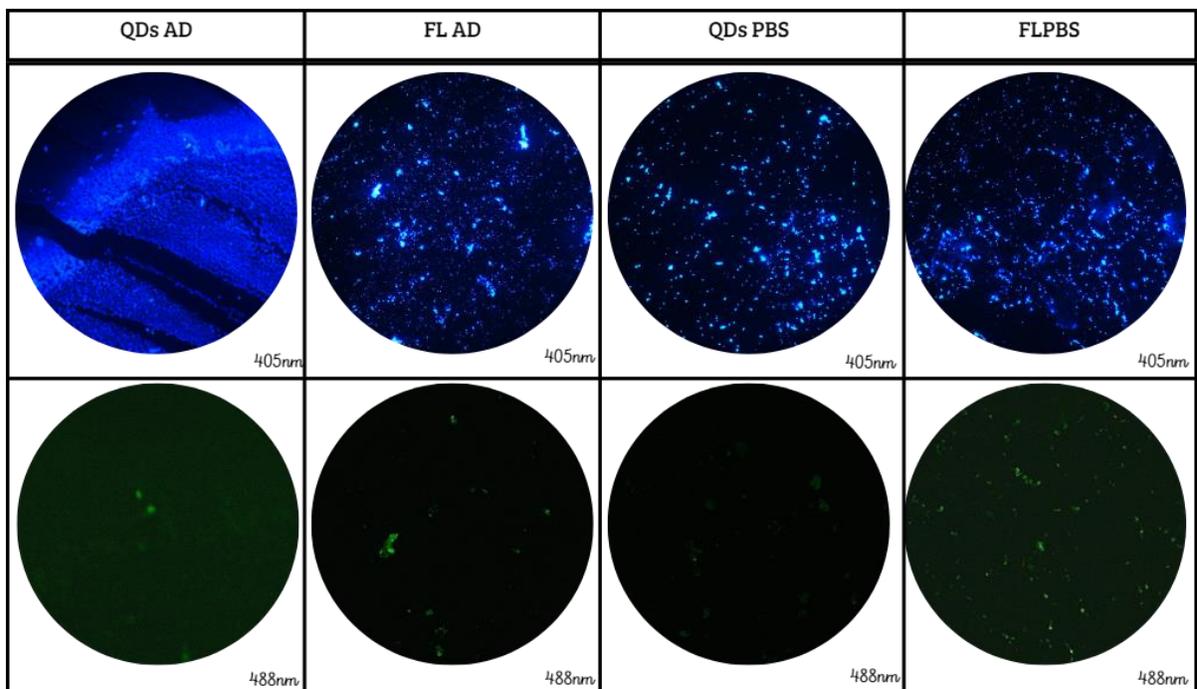
*Tabla 4. Resultados experimentales de las propiedades ópticas de los QDs de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>*

<i>Muestra</i>	Eg (eV)	Longitud de excitación en PL	Longitud de onda del máximo de emisión (nm)	QY
<i>QDs AD</i>	2.57 eV	350 nm	430nm	7%
<i>FL AD</i>	2.77 eV	320 nm	440nm	17%
<i>QDS PBS</i>	4.59 eV	350 nm	440nm	62%
<i>FL PBS</i>	4.54 eV	320 nm	440nm	85%

#### 4.3.1. Estudio de las Nanoestructuras de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> como materiales de contraste en bioimagen

Como primera aproximación las muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia, y se sometieron a excitación bajo dos longitudes de onda; 405nm (en color azul) y en 488nm (en color verde). La Figura 40 muestra las imágenes obtenidas de las nanoestructuras de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. En el caso de los QDs en agua desionizada se observa más aglomeración del material a comparación con la fotografía de las FL en agua desionizada. Para el caso de las nanoestructuras de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> obtenidas en PBS se observan muy similares tanto para los puntos cuánticos como para las FL. Este comportamiento fue independiente de la fuente de excitación así que se observa tanto en el verde como en el azul, es decir a simple vista analizando una gota de cada material no hay diferencia significativa. Las imágenes adquiridas de las nanoestructuras de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> bajo excitación de 488 nm (color verde)

muestran una baja intensidad de emisión a comparación de la de 405 nm, donde solo se distinguen algunos puntos donde se encuentra el material.

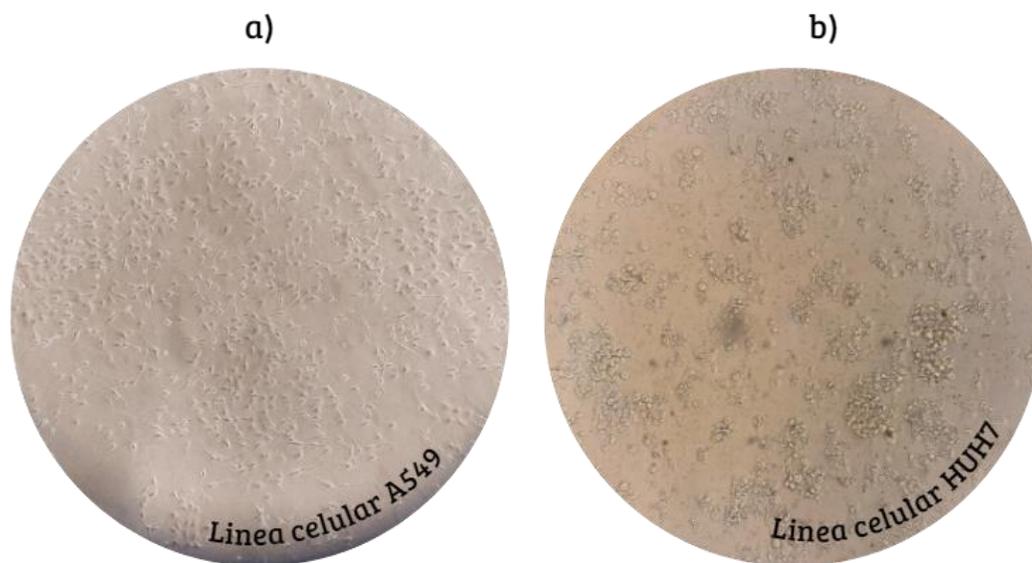


*Figura 40. Imágenes adquiridas sólo de las nanoestructuras de  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  (FL y QDs) observadas bajo el microscopio de fluorescencia a dos longitudes de onda de excitación; 405 nm y 488 nm.*

#### 4.4. Estudio del desempeño como marcadores

##### 4.4.1. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD DE LAS NANOESTRUCTURAS DE g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>

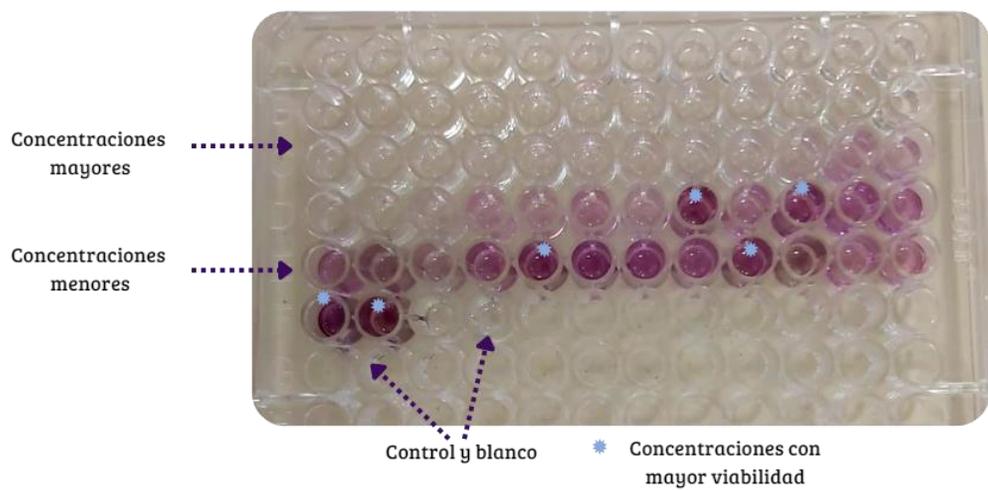
Se realizó un ensayo citotóxico por técnica MTT para todas las muestras. Se utilizaron las líneas celulares A549 y HUH7. El crecimiento de estas fue evidenciadas a través de imágenes captadas en el microscopio invertido con el objetivo 20x tal como se muestra en la figura 41.



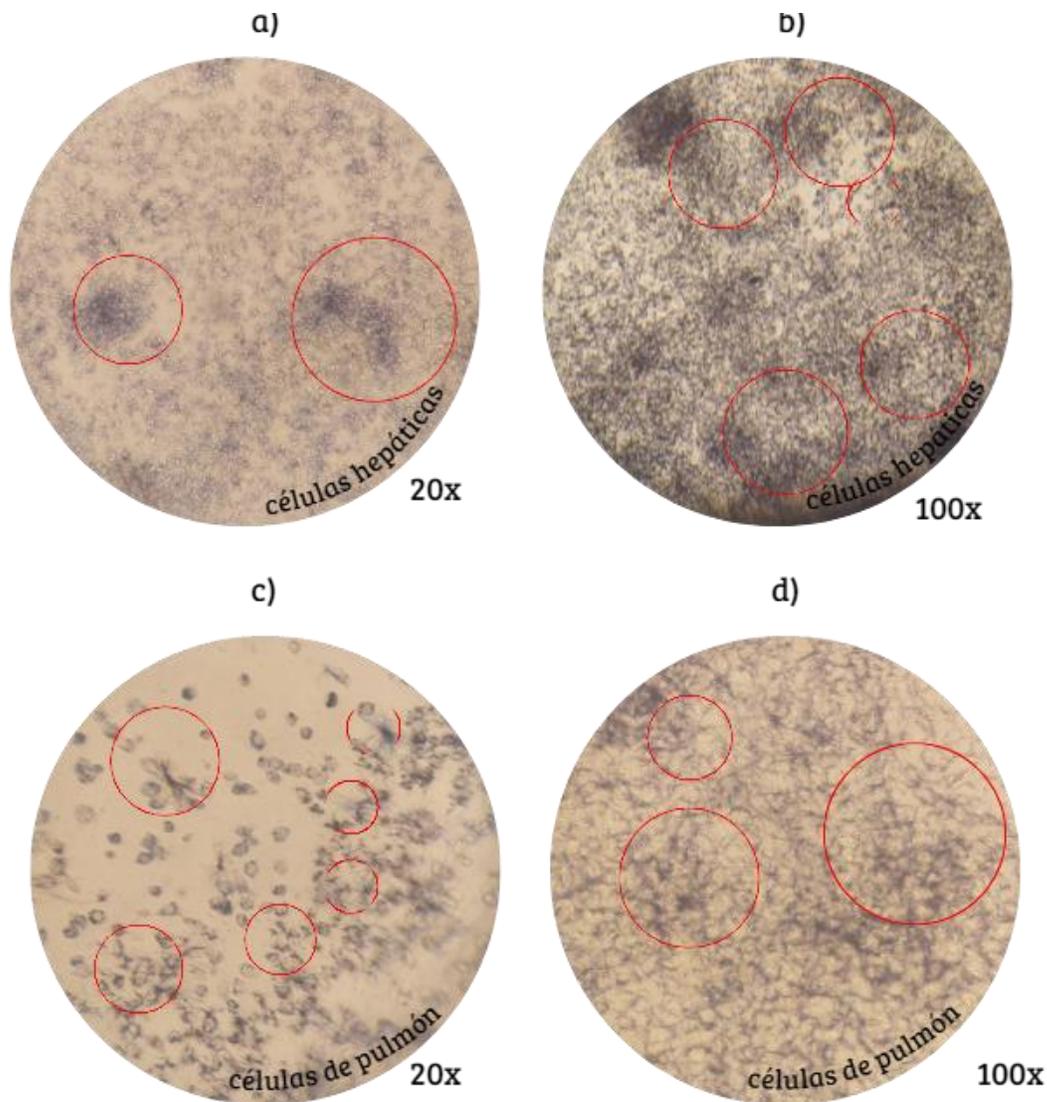
*Figura 41. Imágenes de microscopía óptica de las líneas celulares utilizadas para el estudio de citotoxicidad.*

La prueba MTT consiste en un ensayo colorimétrico donde se reduce el compuesto (MTT) a partir del metabolismo de en células viables dando como resultado la formación de cristales de formazán [35]. Primero al medio de cultivo se agregaron las nanoestructuras a diferentes concentraciones para que interactúen con las células durante 24h, buscando que las células sigan metabolizando y creciendo en el medio de cultivo. Una vez transcurrido este tiempo se agregó el compuesto MTT

(el cual es un compuesto color amarillo) y se dejó interactuar por 4h. Como resultado se observó la formación de cristales de formazán y se llevó a cabo la cuantificación de estos. Se disolvieron en DMSO que adquirió un color morado intenso donde a simple vista se tiene una idea de las concentraciones mostrando mayor viabilidad celular tal como se muestra en la figura 42. Los cristales se analizaron detalladamente en el microscopio invertido en la figura 43 donde se pudo observar también las células viables.



*Figura 42. Fotografía de la microplaca con las muestras donde se realizó la prueba MTT*



*Figura 43. Imágenes del microscopio invertido de la formación de cristales de formazán observados en a) células hepáticas y b) células de pulmón a concentración de 10 µg/ml*

La producción de estos es directamente proporcional a la presencia de células viables, ya que las células se encuentran metabolizando. Si no hubiera la presencia de cristales eso nos indicaría que las células no metabolizaron lo cual indicaría que hubo muerte celular durante la interacción con los materiales. Se realizó un conteo de células viables midiendo la absorbancia a 570 nm, teniendo DMSO como blanco y MTT como control donde el porcentaje (%) de viabilidad se ve dado por:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{Abs cell viables}}{\text{Abs cell control}} * 100$$

Donde:

$$\text{Abs cell viables} = \text{Abs obtenida} - \text{Abs del blanco}$$

La Figura 44 muestra los resultados de viabilidad en células hepáticas expuestas a diversas nanoestructuras. Es notable que la viabilidad celular disminuye a medida que aumenta la concentración de estas nanoestructuras. En el contexto de los puntos cuánticos, tanto en agua desionizada como en solución tampón de PBS, se observa una toxicidad casi inmediata. Por el contrario, las láminas de pocas capas (FL) en ambos tipos de soluciones mantienen una estabilidad en el cultivo celular, sin provocar una disminución drástica de la viabilidad al incrementar la concentración, a diferencia de lo que ocurre con los puntos cuánticos. Este fenómeno podría atribuirse al tamaño más reducido de las partículas que componen los puntos cuánticos, lo que facilitaría su penetración a través de la pared celular, mientras que las FL demuestran una mayor estabilidad en este aspecto. Aunque uno podría esperar que las nanoestructuras sintetizadas en solución tampón de PBS exhibieran una mayor viabilidad celular —debido a su dispersión en una solución isotónica con un pH estable favorable para el crecimiento celular—, en este caso particular, el uso de PBS parece haber reducido el tamaño de las nanoestructuras. Esta reducción en tamaño potencia la accesibilidad celular de las partículas, lo cual, a su vez, promueve la lisis celular.

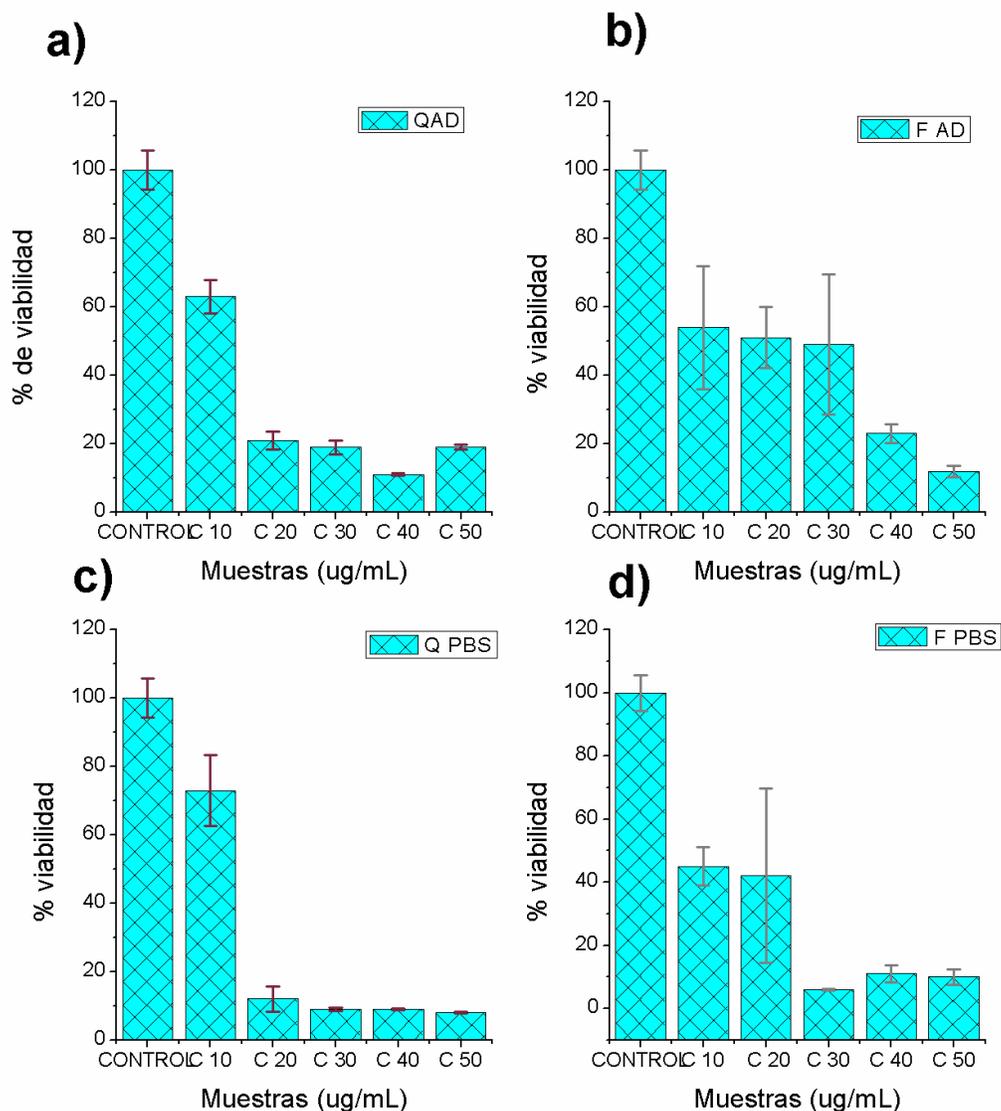


Figura 44. Resultados de viabilidad en células hepáticas como función de la concentración de las nanoestructuras de  $g-C_3N_4$  (QDs y FL) y el medio de dispersión.

En el caso de las células de pulmón figura 45 se observa que aumenta la toxicidad, pero no llega a afectar significativamente a comparación de las células de hígado. Para el caso de las nanoestructuras sintetizadas en agua desionizada se tienen valores que van desde un 50 a un 100% de viabilidad celular, afectando el crecimiento celular, pero manteniéndose de manera estable conforme aumenta la concentración. En el caso de las nanoestructuras sintetizadas con PBS hubo una

viabilidad celular de un 20 a un 50%, hubo crecimiento celular, pero afecto más el crecimiento con las nanoestructuras de PBS. Caso similar a lo ocurrido con las células de tejido hepático, un punto a resaltar es que, en el caso de las hepáticas, la viabilidad celular fue todavía menor, esto se pudo deber a el medio de cultivo ya que se trata de un medio suplementado en donde hubo mayor manejo de nutrientes y pudo haber algún caso de contaminación, ya que era un medio sensible.

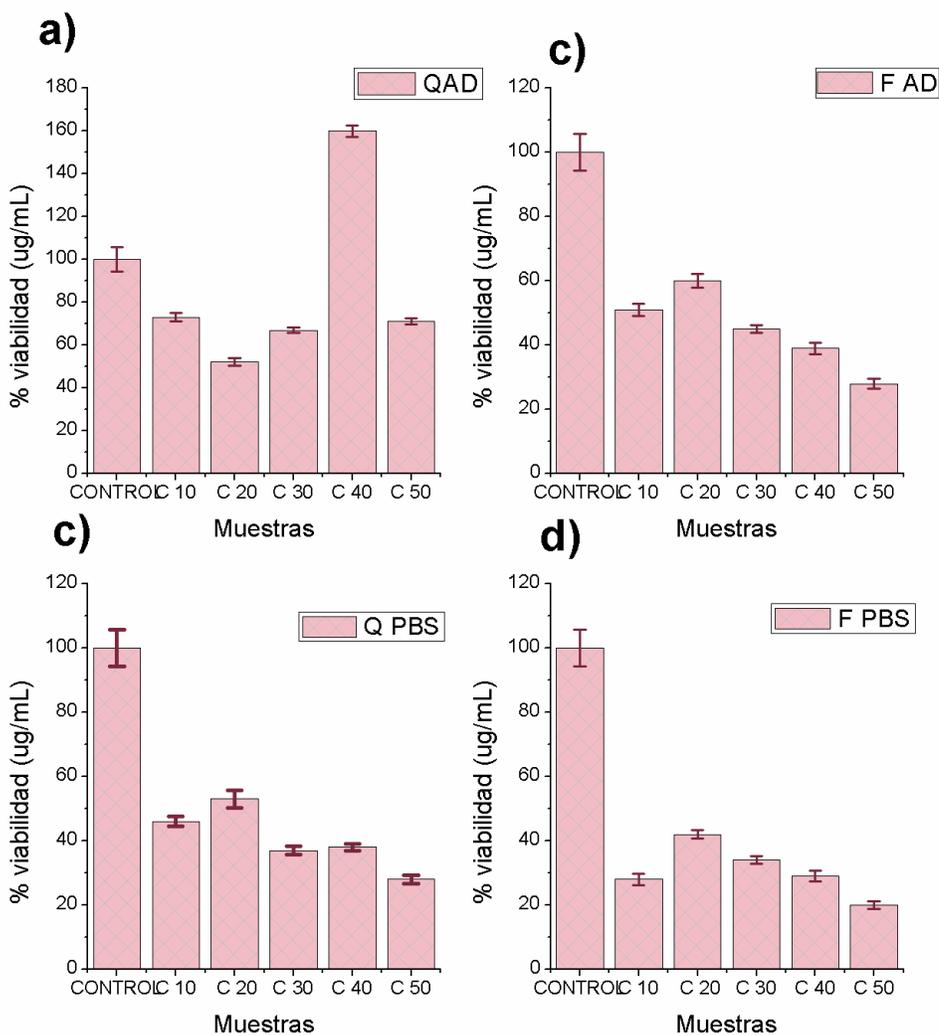


Figura 45. Resultados de viabilidad en células de pulmón como función de la concentración de las nanoestructuras de  $g-C_3N_4$  (QDs y FL) y el medio de dispersión.

Generalmente se ha reportado que el material como tal  $g-C_3N_4$  es un material biocompatible, donde en pruebas de citotoxicidad ha demostrado de un 80 a un 100 % de viabilidad probado en diferentes líneas celulares la más común HeLa [28, 36]. También se reporta esta viabilidad a concentraciones mayores, en esta primera prueba las concentraciones se obtuvieron diluyendo la nanoestructura con el medio de cultivo correspondiente a cada línea celular.

Se observaron los resultados obtenidos y se analizaron las concentraciones más favorables que pueden ser aplicadas para cada línea celular en pruebas de bioimagen, sin que las nanoestructuras pudieran causar alguna interferencia durante su análisis. Dichas concentraciones se observan en la imagen 46

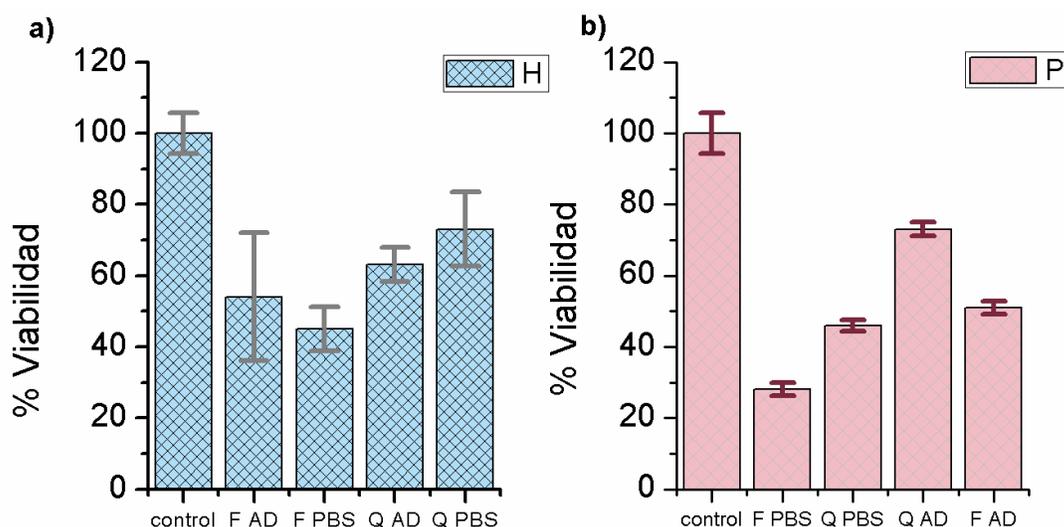


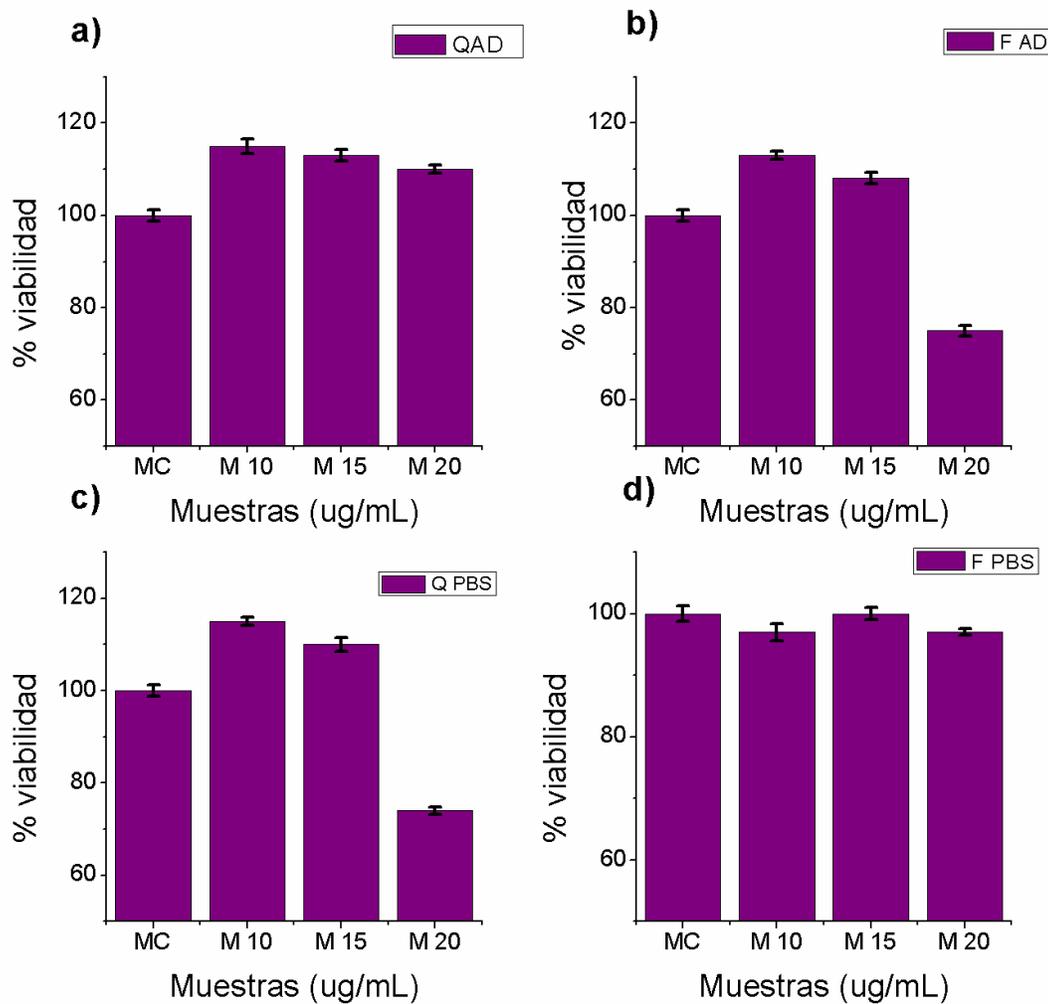
Figura 46. Estudio de la viabilidad en células hepáticas C10 y células de pulmón C20 utilizando la 10 ug/ml como concentración óptima.

Existen diversos factores que pueden afectar durante el crecimiento de las células, que puede ser externos a las nanoestructuras y que resulte viabilidades pobres. Tales como el medio de cultivo, el pH tanto del medio como la nanoestructura [36], el

manejo de las células (presencia de contaminación), la temperatura, el tiempo de incubación, exposición a diversos factores como los rayos de luz, la solución en la que se encuentran etc.

En 2013 Zhang reportó una viabilidad celular al 100% en células de HeLa expuestas a altas concentraciones de nanohojas de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, así mismo Qu, D, Miao, X, *et al* en 2017 reportó una viabilidad celular al 80% en QDs de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> co-dopados con selenio donde el 20% del efecto tóxico que tuvieron fue debido a que el dopado con selenio promovió una disminución de tamaño de partícula. Así mismo, Tadesse, *et al* en 2020 realizaron la síntesis de puntos cuánticos de carbono dopados con nitrógeno obtenidos por síntesis verde, en donde se obtuvo una viabilidad celular del 88% en células de adenocarcinoma de mama humano.

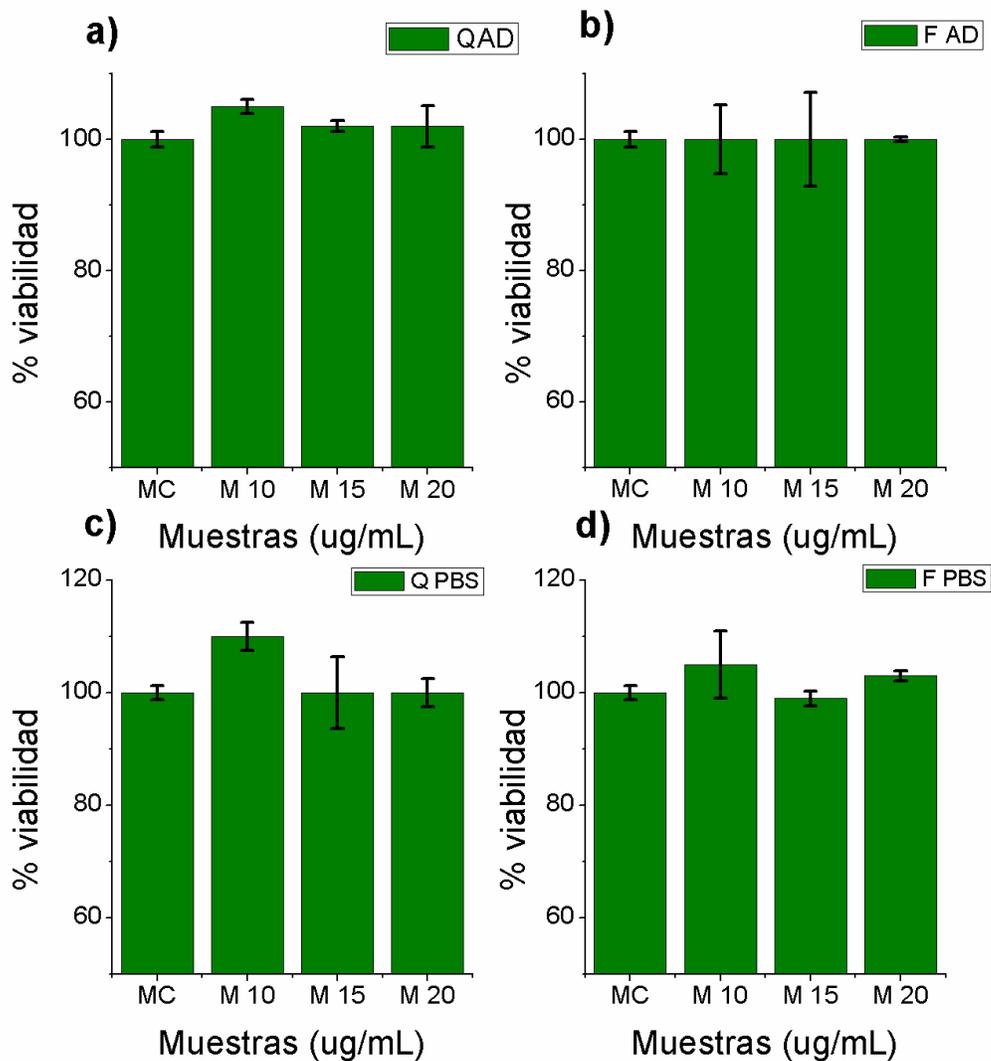
Al ser el medio de cultivo un factor importante, se realizaron las diluciones en el mismo medio, se optó a la realización simultánea de una segunda prueba variando concentraciones de 10, 15 y 20 ug/ml pero esta vez realizando las diluciones en PBS ya que es un medio que favorece las condiciones para el crecimiento de las mismas células. En la figura 47 se observan los resultados para las células hepáticas.



*Figura 47. Resultados de viabilidad en células hepáticas como función de la concentración de las nanoestructuras de  $g-C_3N_4$  (QDs y FL) en PBS como medio de dispersión.*

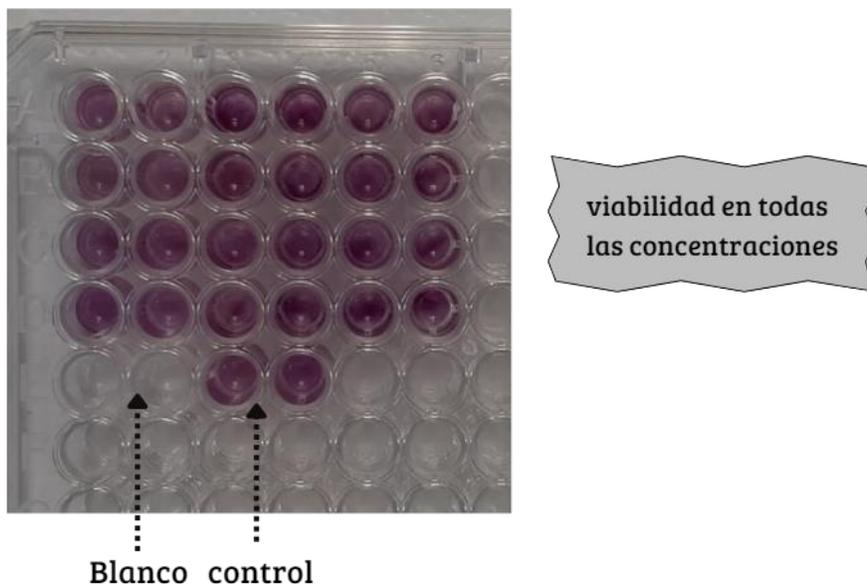
En el segundo procedimiento modificando la preparación de la muestra se observaron resultados favorables para las nanoestructuras donde la viabilidad va de un 70 al 100% en células hepáticas figura 47 y un 100% en células de pulmón (figura 48).

Se observa que para las células hepáticas los valores obtenidos en FL de agua desionizada fueron similares a los QDs de PBS fueron similares teniendo una viabilidad del 70% en concentraciones de 20 ug/ml.



*Figura 48. Resultados de viabilidad en células de pulmón como función de la concentración de las nanoestructuras de  $g-C_3N_4$  (QDs y FL) en PBS como medio de dispersión*

En el caso de las células de pulmón, se obtuvo viabilidad del 100% para las 4 nanoestructuras, donde se permitió el crecimiento celular sin interferencia. Mismo que se observa en la figura 49 observado por colorimetría en la microplaca.



*Figura 49. Fotografía de la microplaca del estudio de la viabilidad de células de pulmón en presencia de las nanoestructuras de  $g-C_3N_4$  (QDs y FL) y diferente medio de dispersión.*

El  $g-C_3N_4$  es un material de gran interés en aplicaciones biológicas debido a su biocompatibilidad y baja o nula toxicidad, cuando se lleva a escala nanométrica, se favorecen sus propiedades fisicoquímicas manteniendo estable su biocompatibilidad [36]. Se ha reportado una viabilidad que va del 80 al 100% en cultivos celulares con mayor reproductividad como HeLa, la cual es una línea celular de fácil reproductibilidad adaptable casi en cualquier medio de cultivo, utilizado ampliamente en investigación científica [39]. Es importante recalcar este punto debido a que, en las primeras pruebas realizadas se tuvo un efecto tóxico muy alto, mismo que en las segundas pruebas se observó un efecto bajo y nulo de toxicidad, donde el factor que cambio en ambas pruebas fue la obtención de las concentraciones a utilizar ya que en el primero fue directamente en medio de cultivo, y en la segunda en PBS, donde el efecto pudo darse debido al manejo en el medio.

Las líneas celulares utilizadas en estas pruebas fueron células donde los medios son especiales y suplementados que requieren de un manejo más sensible en todas las etapas debido a que se trata de células más sensibles donde la reproductibilidad no es tan rápida o fácil como en las células HeLa comúnmente reportadas.

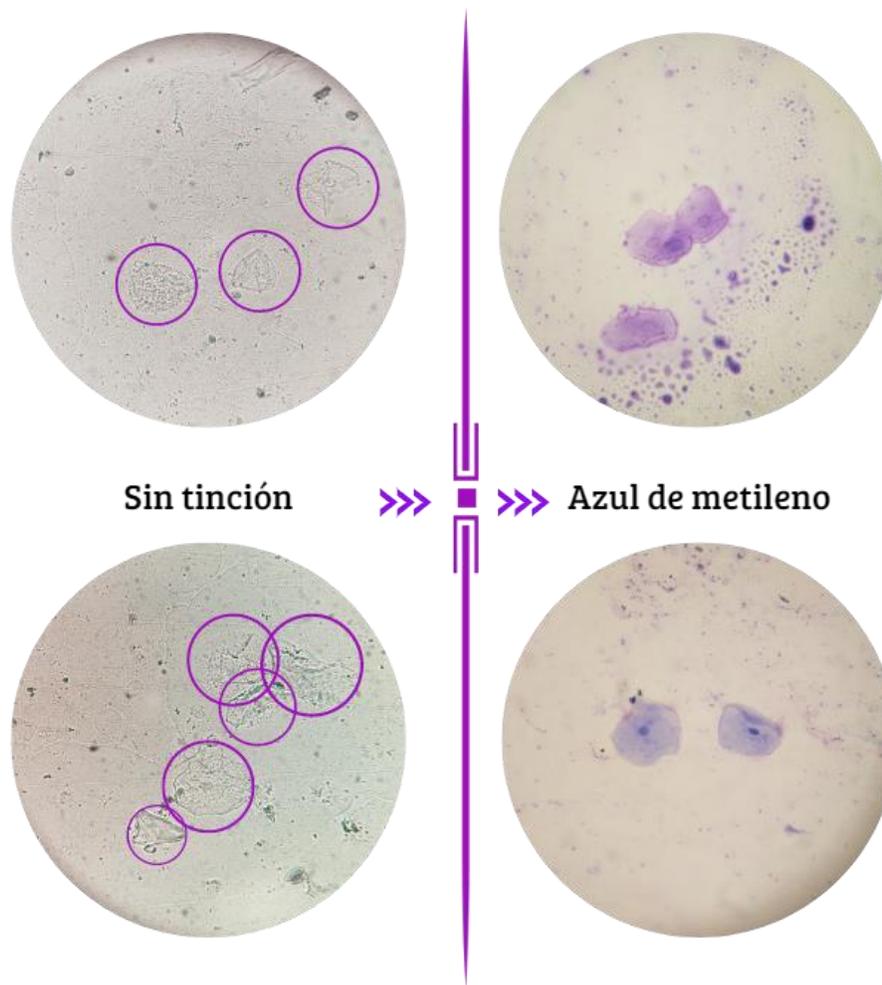
#### 4.4.2. Bioimagen en células

Una vez obtenidas las concentraciones viables por el ensayo citotóxico, analizando los resultados, casi cualquier concentración que llega a los 20 $\mu$ g, es una concentración viable debido a que no causaría algún tipo de interferencia, como la muerte de las células que se utilicen.

En cuanto al tipo de células que se podrían aplicar para el desarrollo de bioimagen se optó por aquellas obtenidas de tejido del epitelio de la mucosa bucal (imagen), ya que poseen diversas características interesantes para su estudio como son:

- Obtención sencilla
- Manipulación sencilla
- Fácil reproductibilidad
- Formación de uniones electrostáticas con colorante
- Son comparables con imágenes en ópticos
- Función como barrera/protección [40, 41].

Como caracterización de la morfología de las células, se adquirieron imágenes con tinción y sin tinción en el microscopio óptico tal como se muestra en la figura 50. Como contrastante se utilizó el azul de metileno, el cual es un colorante básico que al ser expuesto en la célula este reacciona con aquellos componentes aniónicos, teniendo así interacción con el núcleo y la membrana celular [40]



*Figura 50. Imágenes de microscopía óptica de células del epitelio bucal sin y con tinción con azul de metileno*

En la sección del epitelio bucal podemos identificar diferentes células las cuales integran un frotis bucal. En estas estructuras observamos que en aquellas que no tuvieron un proceso de sin tinción son células superficiales queratinizadas [40] encontradas en el frotis realizado. La importancia que posee el estudio de estas células es debido a que forman parte del sustrato tisular en donde asientan la mayoría de las enfermedades principales en la cavidad bucal [42]. Algunas de ellas producidas por virus y/o por el abuso de sustancias como el tabaco o la exposición a sustancias químicas de uso capilar (como el caso de los tintes de cabello) [43].

En general la caracterización de las células brinda información de primera instancia en relación a la salud bucal [44, 45]

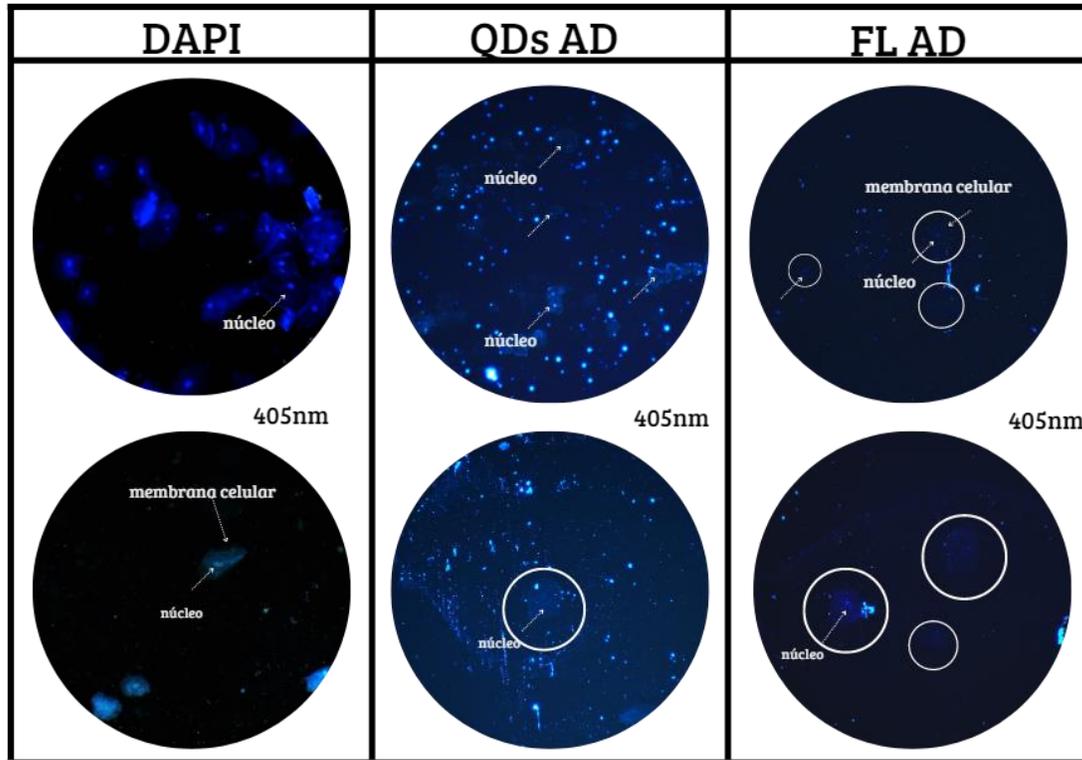
Así mismo una vez conocida la estructura presente y el modo de interacción con el colorante básico (azul de metileno), se realizó el análisis por medio de la técnica de microscopía de fluorescencia donde al frotis bucal se le agregaron las diferentes nanoestructuras como contraste. Se comparó también con un contraste convencional DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol), el cual es un tinte específico para la tinción de ácidos nucleicos [16] y para el análisis del ciclo celular. Aunque el DAPI presenta limitaciones en la estabilidad [13] es común mente utilizado debido a su alta afinidad a grupos AT (adenina y timina) [14] permitiendo así en análisis del ciclo celular principalmente en la tinción nuclear.

Se realizó la comparativa de las nanoestructuras sintetizadas en agua desionizada, observando si es que existen diferencias a simple vista, en cuanto a la interacción de las nanoestructuras con la célula.

En la figura 51 se observa claramente la revelación de la morfología de las células evidenciando una interacción electrostática entre estas y la nanoestructura, como en el caso de la tinción con el azul de metileno interactuando no solo con la pared celular sino también con el núcleo de la célula [1].

Para las células que fueron teñidas con DAPI se observa también una interacción con el núcleo y la membrana celular [1]. Aquellas que fueron teñidas con QD AD, se observa que hubo una mayor afinidad de la nanoestructura con el núcleo de la célula (indicado por las flechas blancas) y se observa de manera tenue la membrana nuclear. Por otra parte, aquellas teñidas con las FL AD casi no lograron observarse las células, hubo muy poca afinidad con el núcleo y membrana celular. Estos resultados pueden atribuirse a errores durante el frotis, sin embargo, también pueden ser debido a la pérdida de la fluorescencia de las FL de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> debido al transcurso del tiempo, la muestra utilizada contaba aproximadamente 60 días desde

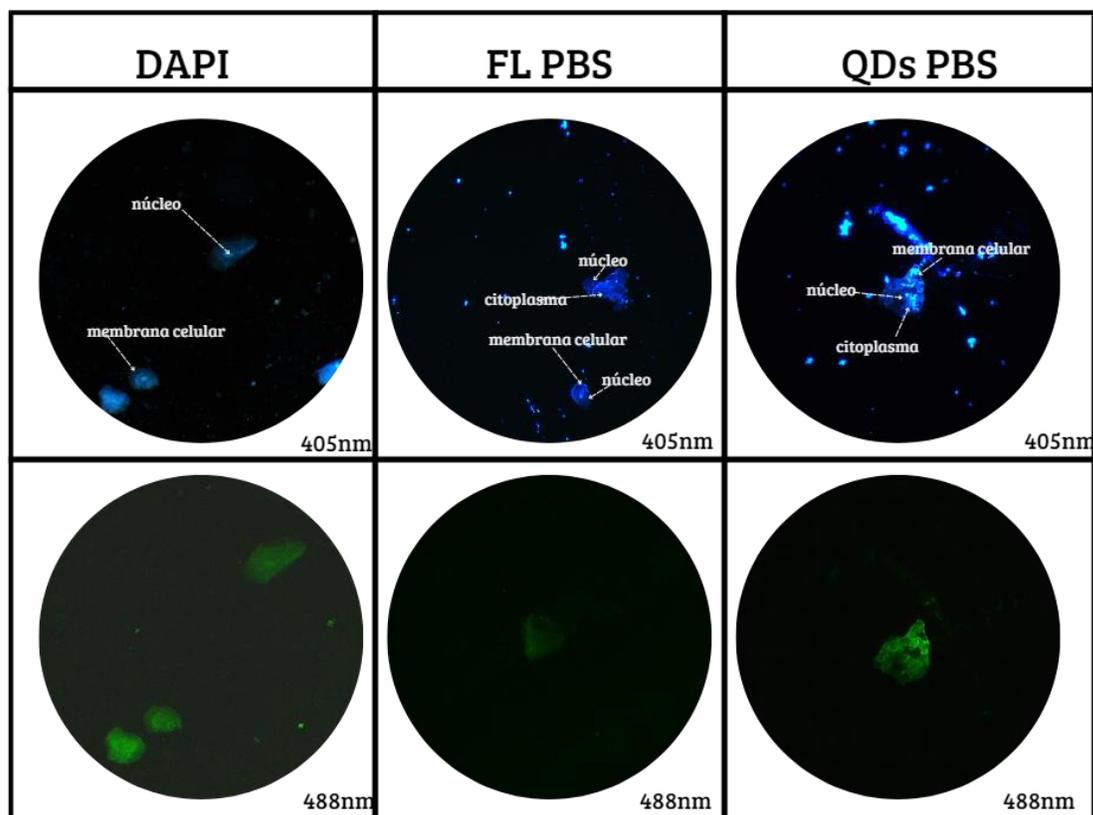
la preparación. El estudio de microscopía de fluorescencia para los tres casos fue observado con una longitud de onda de 405 nm.



*Figura 51. imágenes de microscopía de fluorescencia de las células del tejido epitelial utilizando como contraste las nanoestructuras de  $g-C_3N_4$  (QDs y FL) en AD y el DAPI*

Por otra parte, también se analizaron las muestras de microscopía por fluorescencia con los nanomateriales de  $g-C_3N_4$  (QDs y FL) sintetizados con PBS. La figura 52 presenta las imágenes obtenidas y se comparan también con aquellas adquiridas utilizando tinte convencional DAPI, en este caso se lograron observar a dos longitudes de onda las cuales fueron 405nm (en azul) y 488nm (en verde).

En las imágenes correspondientes al contraste con DAPI se observa que al cambiar la longitud de onda a 488 nm resulta un poco más difícil el análisis del núcleo donde las interacciones que predominan son aquellas del DAPI con el citoesqueleto y membrana celular.



*Figura 52. Imágenes por fluorescencia de nanoestructuras de PBS*

En el caso de las FL PBS se logró observar con longitud de onda de 405 nm el núcleo, membrana celular y el citoplasma de la célula, así mismo al realizar el análisis con longitud de onda de 488nm se observa de manera clara el citoesqueleto de la célula.

Finalmente, en el caso de las imágenes con los QDs PBS se logran observar otras estructuras celulares. Posiblemente al disminuir el tamaño de partícula, entra la membrana celular llegando así a diferentes organelos en la célula, los cuales pudieron ser observables de manera clara tanto a 405nm como 488nm.

Existen diferentes maneras de identificar los organelos presentes en las células [1] primeramente se debe conocer el tipo de célula que se tiene, en este caso nos referimos a una célula eucariota [46]. Se pueden encontrar en la literatura algunas imágenes de las células eucariotas observadas al SEM, esto para darnos una idea

de cómo se encuentran la morfología de los organelos que están presentes. Otra manera de conocer los organelos con los cuales interactúan las nanoestructuras es realizando cortes histológicos y observarlos en el SEM para identificar así con cuales organelos están interactuando. La figura 53 presenta un esquema representativo de la célula con la identificación de la estructura interna. No es posible realizar una comparación directa con la figura 54 la cual corresponde a las células epiteliales teñidas con los QDs PBS, se requieren hacer estudios adicionales comparando con los compuestos diseñados para identificar regiones específicas de la célula.

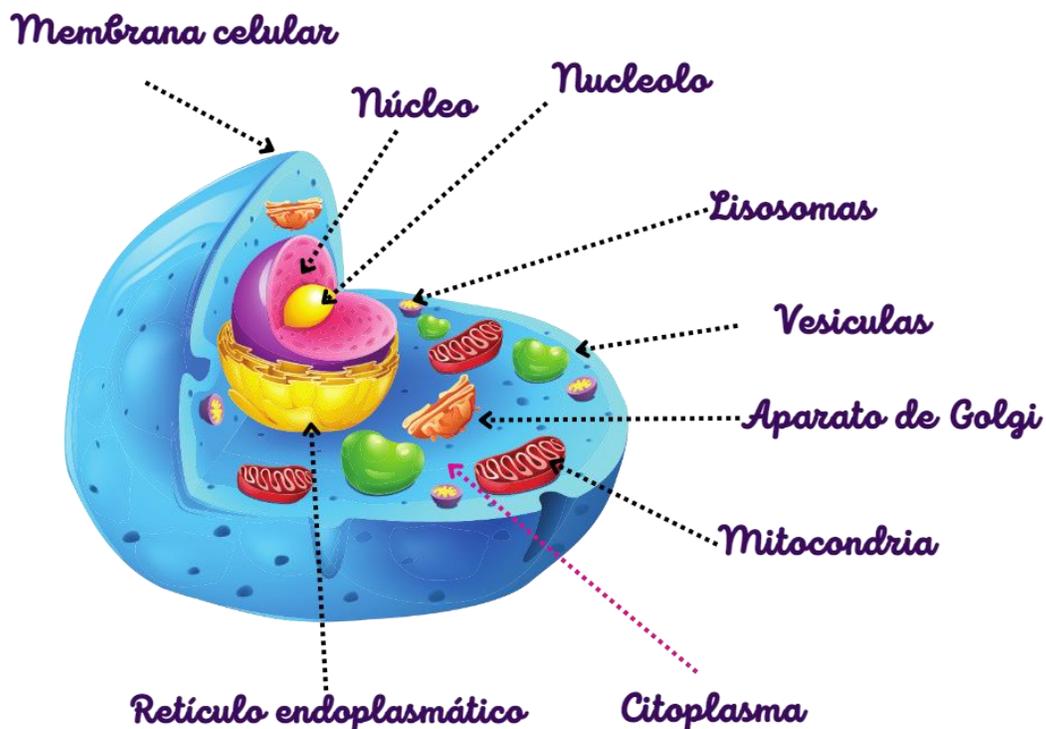
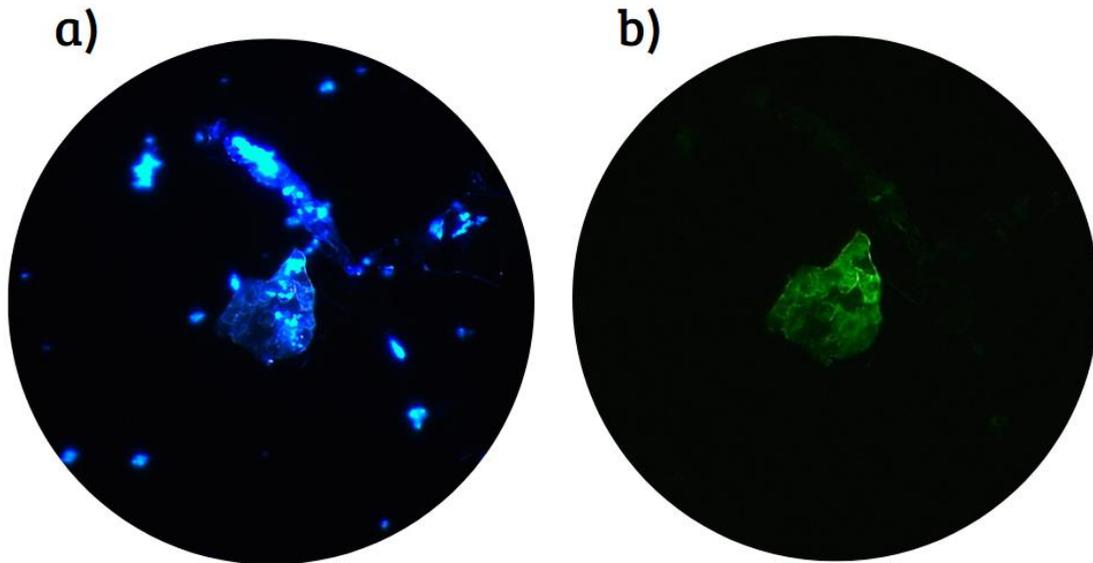


Figura 53. Esquema representativo de la estructura de la célula eucariota.

Sin embargo, es posible que se presenten interacciones entre los grupos amino de las nanoestructuras y carboxilo de las células [16]. Algunas nanoestructuras, conectan con los grupos amino en los diferentes componentes intracelulares como es el caso de mitocondrias, lisosomas y núcleos. [47]. Las nanopartículas deben ingresar al citosol mediante la endocitosis y la membrana de la mitocondria al ser

un organelo cargado altamente negativo [4] la nanoestructura debe de tener una carga opuesta para favorecer la atracción electrostática y un tamaño de partícula menor a 10 nm.



*Figura 54. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células del tejido epitelial adquiridas con los QDs  $g-C_3N_4$  en PBS a 405 nm y 488 nm de excitación.*

La interacción del material podría ocurrir entre las diferentes estructuras intracelulares entre ellas se encuentran las siguientes:

- ✚ **Mitocondria** – en donde el tipo de unión se da por los grupos amino-carboxilo [2] así mismo es posible el marcaje debido a la disminución en el tamaño de partícula, favoreciendo así su entrada desde el citosol hasta la mitocondria [4]. Generalmente se observa una membrana doble con presencia de crestas (pliegues) [1].
- ✚ **Aparato de Golgi** - observados como pilas, adyacentes al núcleo, el marcaje de este organelo se da entre los grupos amino de la nanoestructura con los grupos carboxilo del organelo [1, 4, 40].

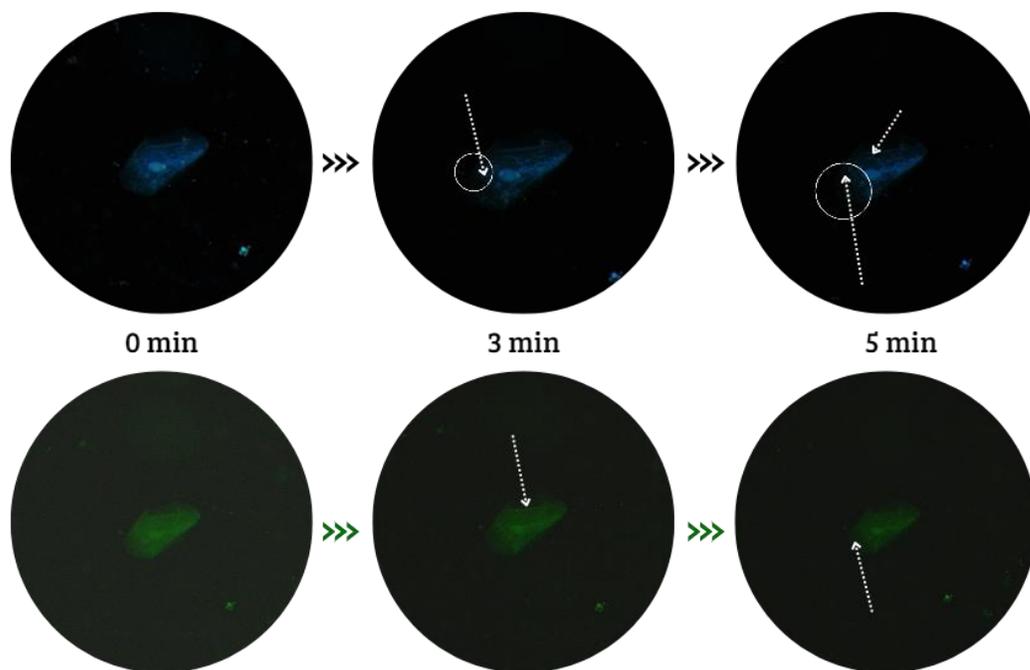
- ✚ **Vesículas-** estas se logran observar cuando el tamaño de estas resulta muy grande, cercanas al aparato de Golgi, no se tiñe, pero se pueden distinguir como círculos bien delimitados entre las partes de la célula [1, 46].
- ✚ **Núcleo-** el marcaje tanto de núcleo como la membrana nuclear es el más típico y comúnmente reportado, debido a la fácil interacción de los materiales con la membrana celular (todo el rededor de la célula). No se requiere un tamaño específico para lograr su interacción, el núcleo celular es una estructura en donde se elabora el ADN y ARN cromosomal, por lo cual se encuentra expuesto a la formación de enlaces amino y carboxilos presentes [1, 40, 46].
- ✚ **Citoplasma y citoesqueleto** el citoesqueleto es en sí el cuerpo esquelético (esqueleto) de la célula y está formado por filamentos intermedios microtúbulos y microfilamentos compuestos por proteínas como es la actina, que interviene con la miosina (proteína fundamental del citoplasma) para la generación de fuerzas y movimientos en la célula. Las nanoestructuras pueden interactuar con la miosina y la actina formando enlaces tipo amino, lo que permitirá el marcaje en el citoplasma (todo el interior de la célula) y en algunas regiones del citoesqueleto [40, 46].

#### 4.4.3. Pruebas de foto blanqueo

Una de las principales problemáticas que se presentan durante el análisis de las muestras por microscopía de fluorescencia es el “fotoblanqueo”. Este término se emplea para describir la degradación irreversible del material de contraste. Este es un problema típico que se presenta en los diferentes tintes fluorescentes convencionales. Para estudiar el comportamiento de las nanoestructuras en función del tiempo de excitación y analizar el efecto de fotoblanqueo, se seleccionó un período de exposición y se adquirieron imágenes para observar los cambios en la luminiscencia.

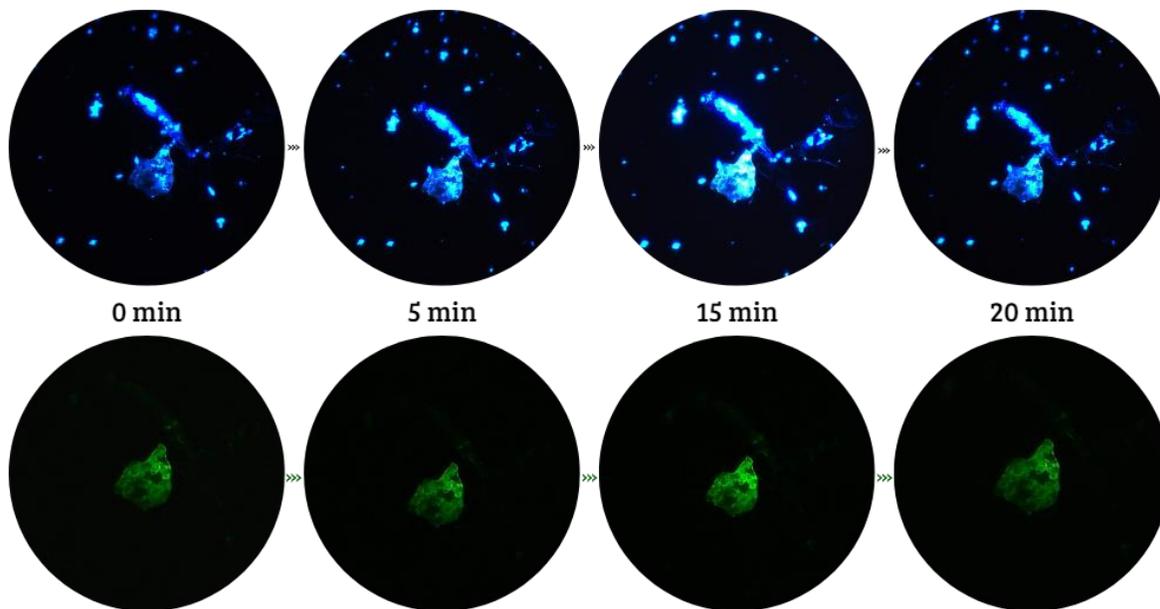
En la figura 55 se observan los resultados obtenidos a los 3 y 5 minutos de exposición para las muestras teñidas con el marcador DAPI. Las imágenes

muestran una disminución en la intensidad de luminiscencia desde el minuto 3. Además, se observa la degradación de la membrana celular. A los 5 minutos este fenómeno es más evidente y finalmente pierde totalmente su intensidad.



*Figura 55. Estudio de la estabilidad de la imagen de fluorescencia en función del tiempo para las muestras teñidas con prueba de fotoblanqueo con DAPI*

Por otro lado los resultados de las imágenes de fluorescencia adquiridas utilizando los QDs PBS como tinte (figura 56) poseen una alta estabilidad a la degradación. Las imágenes muestran contraste e intensidad de luminiscencia después de 20 minutos de exposición. El estudio fue realizado para dos longitudes de onda (verde y azul) de excitación y los resultados fueron similares.



*Figura 56. Estudio de la estabilidad de la imagen de fluorescencia en función del tiempo para las muestras teñidas con prueba de fotoblanqueo con QDs PBS*

El fotoblanqueo en si es un problema presente en diferentes tintes utilizados en bioimagen, el cual no siempre se encuentra relacionado con el rendimiento cuántico (QY) que estos presentan. En algunos casos, al tener un rendimiento cuántico bajo, el tinte tiende a degradarse más rápido, en el caso de DAPI se han reportado QY del 3% a un 68% este último en combinación con DNA. Sin embargo, una de las principales razones es que al ser un material orgánico tiene baja resistencia a la irradiación cercana al UV, que es una fuente de alta energía al incidir sobre el material causa rompimiento de los enlaces y degradando la molécula. Los resultados obtenidos en este trabajo utilizando nanoestructuras de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> son prometedores ya que mostraron mayor estabilidad al fotoblanqueo comparado con lo reportado en la literatura. Zhuang en 2018 reportó la síntesis de quantum dots de nitruro de carbono grafítico obtenidos a partir de la orina con un QY de 15.7% estos tenían un tiempo máximo de exposición de 10 min, a exposiciones mayores el material comenzaba a perder intensidad lentamente. Esto fue muy similar a lo previamente reportado por Zhang 2013 con las nanohojas de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> con un QY de 19.6%. Tang

en 2016 por otro lado realizó experimentos irradiando el material con una lámpara UV a 365 nm a diferentes tiempos, mostrando que el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> pierde intensidad de luminiscencia rápidamente después de 5 min, pero pasado este tiempo, la intensidad disminuye de manera lenta permitiendo su observación hasta 80 minutos (mientras se va degradando).

#### 4.5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL MEDIANTE FOTOCATALISIS

El g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> es un material semiconductor, química y térmicamente estable que ha mostrado tener propiedades ópticas de interés en aplicaciones biomédicas como la bioimagen [25, 29]. Es un material biocompatible, sin embargo, también posee propiedades foto catalíticas antibacteriales y se ven considerablemente mejoradas cuando se encuentra en la nanoescala [48].

Se realizó un estudio del efecto antibacterial mediante la actividad foto catalítica de los materiales nanoestructurado de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. Para esto se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) en presencia de las nanoestructuras. Las mediciones se llevaron a cabo por duplicado y se obtuvo el promedio para cada las siguientes condiciones experimentales

- Bacteria
- Bacteria +UV
- Bacteria + material
- Bacteria + material + UV

Como control se sembraron cajas donde había bacterias y bacterias con exposición al UV, para demostrar que la radiación UV no presenta un efecto significativo en la proliferación de las bacterias. Posteriormente, se sembraron cajas con bacterias (1) y el nanomaterial + bacteria con nanomaterial expuesto al UV (2). El primero para conocer si el material poseía algún efecto sin ningún estímulo (en este caso la radiación). Finalmente, para describir y medir el efecto foto catalítico se tomaron los resultados de las bacterias con material expuesto al UV. La figura 57 presenta los resultados obtenidos del estudio de los materiales sintetizados en agua desionizada. Para este estudio se probaron los materiales a concentraciones de 200

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para el caso de los QDs y de  $150 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  para el caso de las FL. Las concentraciones fueron diferentes debido a que presentan diferente actividad catalítica. La figura 58 se observa el resumen de esta prueba donde podemos comparar los controles que tuvimos para la observación de este efecto.

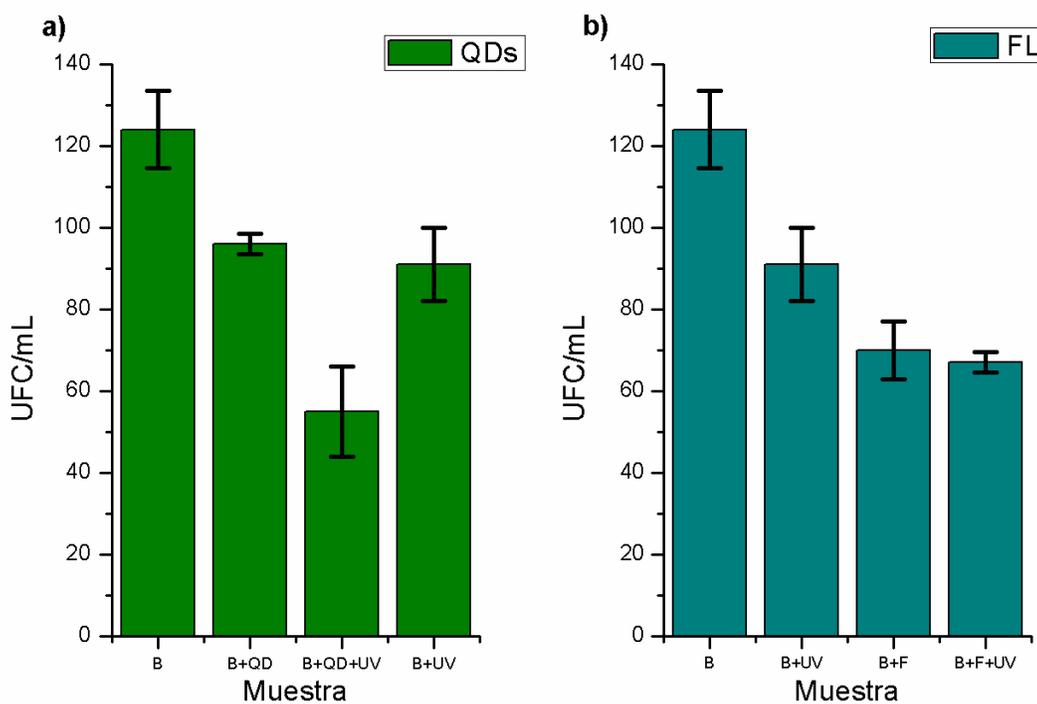
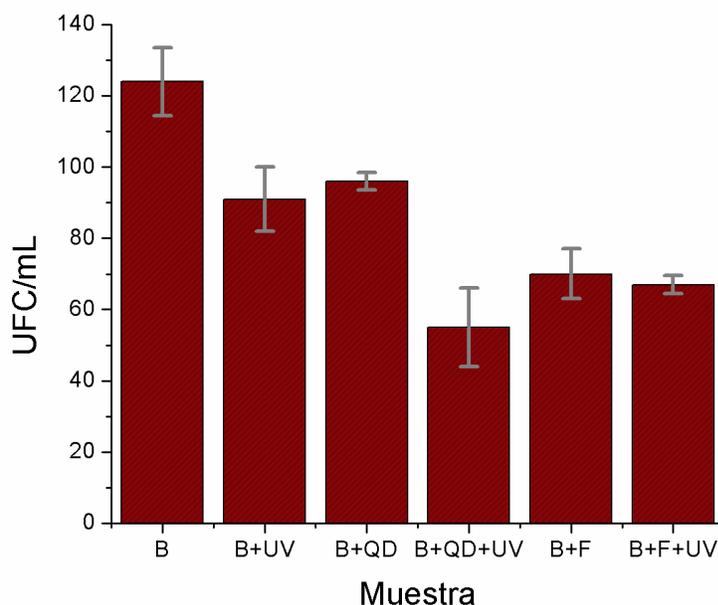


Figura 57. Conteo de unidades formadoras de colonia de bacterial para el estudio fotocatalítico de los nanomateriales de  $g\text{-C}_3\text{N}_4$



*Figura 58 Comparación de la actividad fotocatalítica de los nanomateriales de  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  (QDs y FL).*

A simple vista observamos que efectivamente hubo un mayor efecto fotocatalítico en los QDs expuestos a la luz UV. Debido a que estas nanoestructuras presentaron una mayor eficiencia en la separación de carga para la formación de especies reactivas de oxígeno (radicales libres) [49]. El mecanismo antibacteriano es el resultado del estrés oxidativo en las bacterias promoviendo la degradación de la membrana celular [50], generando así la muerte celular, tal como se observa en la imagen 59.

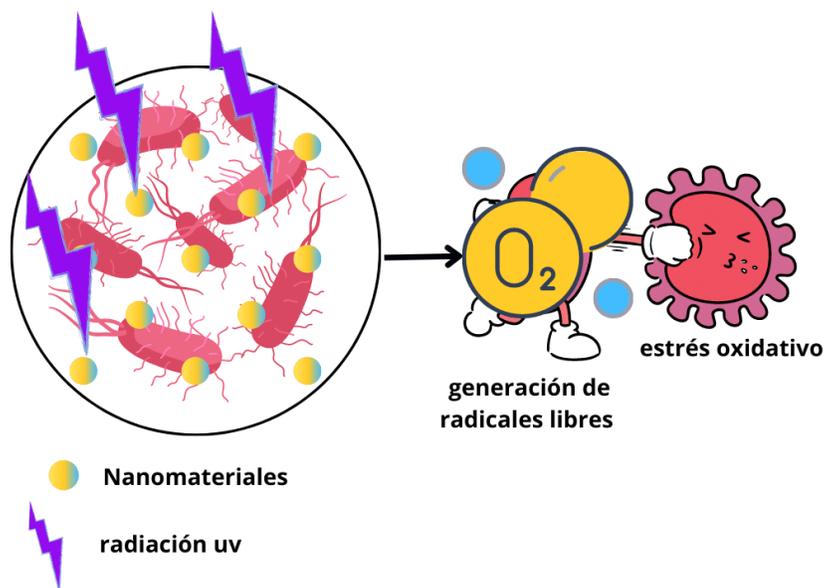


Figura 59. Esquema representativo del mecanismo fotocatalítico antibacteriano.

Para el caso de las FL no se observa un efecto antibacteriano fotocatalítico como tal, y puede ser debido a una mayor recombinación de las especies del par hueco-electrón por tener un tamaño de partícula mayor que resulta en una poca generación de especies reactivas. Aunque se observa que las bacterias en presencia de FL (sin exposición a UV) presentaron un efecto antibacteriano, se cree que se trata de un encapsulado bacteriano en donde se bloquea el intercambio de nutrientes y desechos entre las células y el ambiente [50] y no al efecto fotocatalítico (Figura 55). Se estudió el efecto de la concentración del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> en la actividad fotocatalítica mediante la adición de 300 µg/µL del nanomaterial Figura 60.

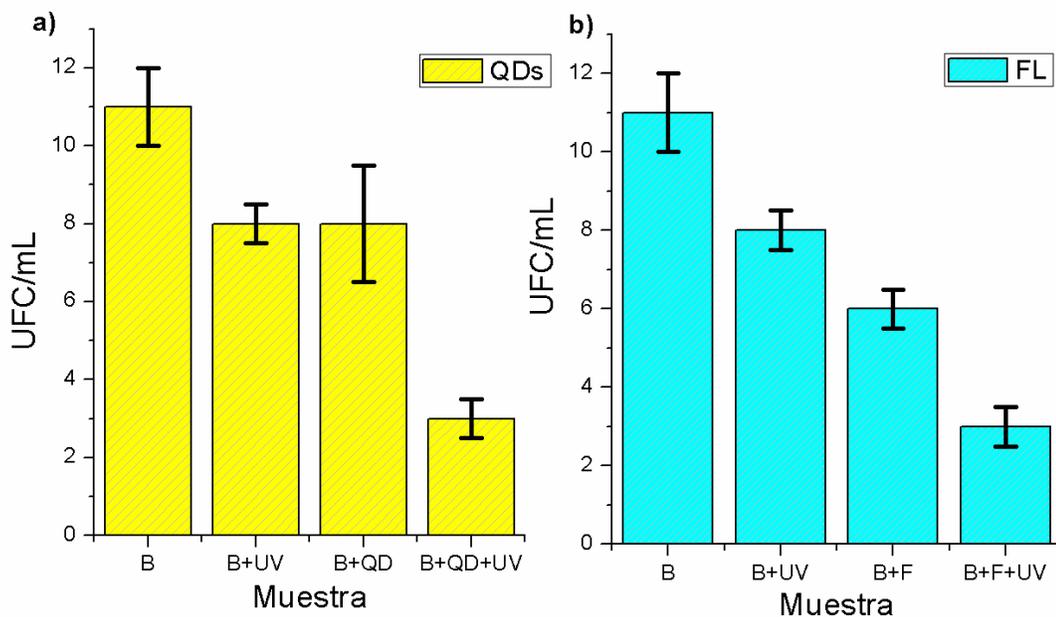
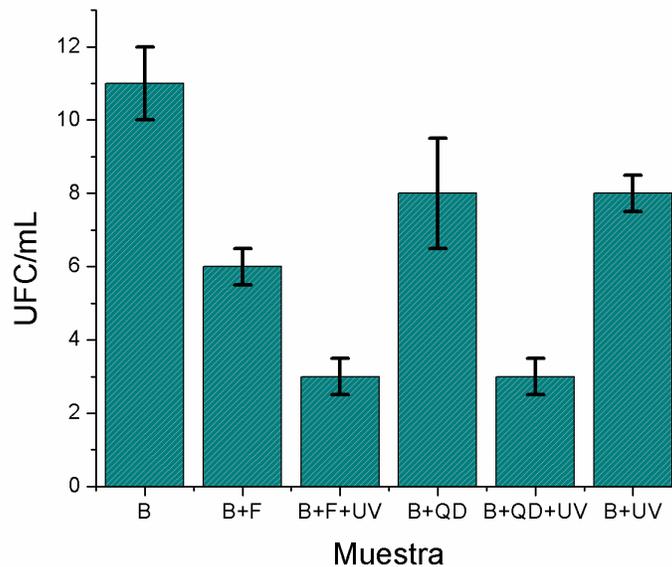


Figura 60. Actividad antibacteriana por fotocatalisis de las nanoestructuras de  $g-C_3N_4$  (QDs y FL) a una concentración de  $300 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

En los resultados se observa el efecto foto catalítico antibacteriana mayor al 60% para el caso de los QDs, y para el caso de las FL a estas condiciones se observa también hasta un 40%. Comparando los controles que fueron la bacteria, la bacteria +uv, bacteria + FL y bacteria + QDs (figura 61), dicho efecto se vuelve más relevante. El control de bacteria + FL se observa un efecto antibacteriana causado por la nanoestructura, donde la bacteria al estar en contacto con las FL afectó en el intercambio de nutrientes, mismo por el cual evitó la propagación de unidades formadoras de colonia. Así mismo se obtuvieron imágenes de cómo se observa la disminución de las unidades formadoras de colonia en el caso de los QDs (Figura 62).



*Figura 61. Resumen comparativo de los resultados de la actividad antibacteriana por fotocatalisis utilizando nanoestructuras de  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  (QDs y FL) a una concentración de  $300 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .*

De acuerdo con los resultados mostrados, se puede confirmar la actividad fotocatalítica antibacteriana, en cepas de *E. coli*, donde su mayor actividad para ambas pruebas se dio en presencia de los QDs. Bajo la irradiación UV se formaron especies reactivas promoviendo la muerte celular debido al rompimiento de membrana generado por el estrés oxidativo. [50] Así mismo en las nanoestructuras de FL se observa un efecto antibacteriano y fotocatalítico antibacteriano. Estos resultados son muy relevantes para el área de investigación del  $g\text{-C}_3\text{N}_4$  ya que tiene un alto potencial de carácter biológico, debido a sus características ópticas [25]. La actividad catalítica y antibacteriana ha sido de gran estudio y el material en bulk es capaz de presentar actividades catalíticas, pero de manera limitada [49]. El aumento de esta actividad ha sido sujeto de investigación a través de la síntesis de nanoestructuras, el dopado o modificación con otros nanomateriales como Ag, Mo, ZnO, S, etc [25, 29, 51, 52]. Se han reportado aumentos considerables en la actividad catalítica en reacciones de degradación de contaminantes de aguas como colorantes,

tetraciclina y diferentes componentes orgánicos. También se ha estudiado la actividad antibacterial fotocatalítica en bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus salivarius* presentando mayor actividad en esta última [49]. Además de la aplicación en terapias contra el cáncer donde bajo la irradiación UV disminuye hasta en un 80% la proliferación en células cancerígenas [29].

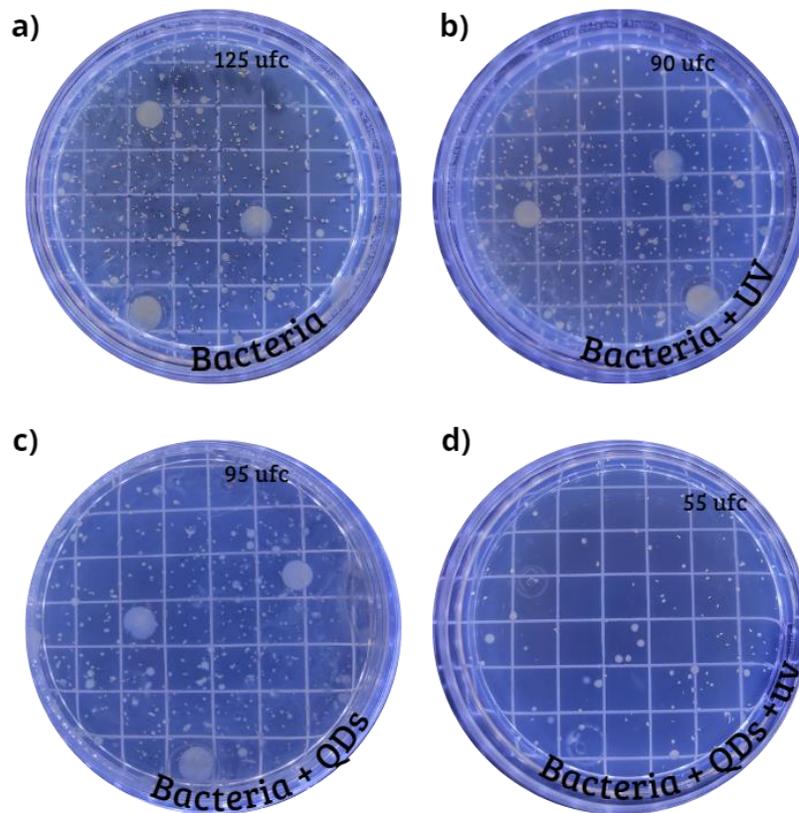


Figura 62. Evidencia fotográfica de la presencia de UFC en placas de *E.coli* para los experimentos de la actividad antibacterial por fotocatalisis utilizando nanoestructuras de  $g-C_3N_4$  (QDs y FL) a una concentración de  $300 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

## 5. CONCLUSIONES

- Se lograron obtener nanoestructuras de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> con diferentes propiedades ópticas dependientes de las condiciones de obtención.
- El proceso de exfoliación mecánico es eficiente para la preparación de FL de el g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> y sus características son afectadas principalmente por el tiempo de exfoliación, a tiempos largos se observa además de exfoliación, fractura del material.
- Las propiedades ópticas de los nanomateriales QDs de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> varían en función del medio de reacción, en presencia de PBS se favorece el rendimiento cuántico por la estabilización coloidal.
- Los materiales nanoestructurados del g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, poseen características adecuadas para aplicaciones de interés como es la bioimagen a dos longitudes de onda 405 nm y 488 nm.
- Los nanomateriales de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> resultaron no tóxicos a bajas concentraciones.
- Los nanomateriales (FL y QDs de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) se aplicaron exitosamente como marcadores biológicos en células epiteliales.
- Los nanomateriales de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> presentaron una mayor resistencia al fotoblanqueo que el tinte orgánico utilizado como referencia (DAPI).
- Los nanomateriales (FL y QDs de g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) presentaron propiedades de fotocatalisis antibacteriales en inhibición UFC de *e-coli*, en las condiciones del estudio.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ross, M. H., & Pawlina, W. (2013). Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular (8va. ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana. (pág. 6-112)
- [2] Sulaxna Pandey, Dhananjay Bodas, (2020) High-quality quantum dots for multiplexed bioimaging: A critical review, *Advances in Colloid and Interface Science*, Volume 278, 102137, ISSN 0001-8686, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102137>.
- [3] Qu, D; Miao, X, et al (2017) Se & N co-doped carbon dots for high-performance fluorescence imaging agent of angiography, [JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY B](#), 5 (25): 4988.
- [4] Ali H, Ghosh S, et al (2020). Fluorescent carbon dots as intracellular imaging probes. *Wiley Interdisciplinary reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2020 Jul;12(4): e1617. DOI: 10.1002/wnan.1617.
- [5] Tang Y, Song H et al. (2013). Turn-on persistent luminescence probe based on graphitic carbon nitride for imaging detection of biothiols in biological fluids. *Anal Chem*. 2013 Dec 17;85(24):11876-84. doi: 10.1021/ac403517u. Epub 2013 Nov 27. PMID: 24236771.
- [6] Dong Y, Wang Q, et al (2016). Graphitic Carbon Nitride Materials: Sensing, Imaging and Therapy. *Small*. 2016 Oct;12(39):5376-5393. doi: 10.1002/smll.201602056. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27611869
- [7] Qianfen Zhuang, Pan Guo, et al (2018). Green synthesis of luminescent graphitic carbon nitride quantum dots from human urine and its bioimaging application, *Talanta*, Volume 188, Pages 35-40.
- [8] Correcher, V., & Garcia-Guinea, J. (2015). Técnicas Luminiscentes. Análisis químico mediante técnicas espectroscópicas moleculares. CIEMAT.
- [9] Bacci, M. (2019). ASPECTOS CLAVE EN LA TEORÍA DE LOS FENÓMENOS LUMINISCENTES. *CONSERVATION 360°*, (1), 29-34.
- [10] Stokes, G. G. (1852). XXX. On the change of refrangibility of light. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, (142), 463-562.

- [11] Terna, A. D., Elemike, E. E., Mbonu, J. I., Osafire, O. E., & Ezeani, R. O. (2021). The future of semiconductors nanoparticles: Synthesis, properties and applications. *Materials Science and Engineering: B*, 272, 115363.
- [12] Estandarte, A. K., Botchway, S., Lynch, C., Yusuf, M., & Robinson, I. (2016). The use of DAPI fluorescence lifetime imaging for investigating chromatin condensation in human chromosomes. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- [13] Krishan, A., & Dandekar, P. D. (2005). DAPI fluorescence in nuclei isolated from tumors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53(8), 1033-1036.
- [14] Barcellona, M. L., Cardiel, G., & Gratton, E. (1990). Time-resolved fluorescence of DAPI in solution and bound to polydeoxynucleotides. *Biochemical and biophysical research communications*, 170(1), 270-280.
- [15] Sahu, M. K. (2019). Semiconductor nanoparticles theory and applications. *Int. J. Appl. Eng. Res*, 14(2), 491-494.
- [16] Kairdolf, B. A., Smith, A. M., Stokes, T. H., Wang, M. D., Young, A. N., & Nie, S. (2013). Semiconductor quantum dots for bioimaging and biodiagnostic applications. *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)*, 6(1), 143.
- [17] Nicholas Rono, Joshua K. Kibet, Bice S. Martincigh & Vincent O. Nyamori (2020): A review of the current status of graphitic carbon nitride, *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, DOI: 10.1080/10408436.2019.1709414
- [18] Dong J, Zhang Y, Hussain MI, Zhou W, Chen Y, Wang LN. g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>: Properties, Pore Modifications, and Photocatalytic Applications. *Nanomaterials (Basel)*. 2021 Dec 30;12(1):121. doi: 10.3390/nano12010121. PMID: 35010072; PMCID: PMC8746910.
- [19] Rivera Rosas, L. P. (2020). Obtención de nitruro de carbono gráfico (g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) parcialmente exfoliado y su aplicación como plataforma libre de metal para SERS (Master dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

- [20] Chan, M. H., Liu, R. S., & Hsiao, M. (2019). Graphitic carbon nitride-based nanocomposites and their biological applications: a review. *Nanoscale*, 11(32), 14993-15003.
- [21] Liu, H., Wang, X., Wang, H., & Nie, R. (2019). Synthesis and biomedical applications of graphitic carbon nitride quantum dots. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(36), 5432-5448.
- [22] Niu, L., et al., Production of Two-Dimensional Nanomaterials via LiquidBased Direct Exfoliation. *Small*, 2016. 12(3): p. 272-293.
- [23] Cao, G. (2004). *Nanostructures & nanomaterials: synthesis, properties & applications*. Imperial college press.
- [24] Li, X., Zhang, J., Shen, L., Ma, Y., Lei, W., Cui, Q., & Zou, G. (2009). Preparation and characterization of graphitic carbon nitride through pyrolysis of melamine. *Applied Physics A*, 94(2), 387-392.
- [25] Yuan, Y., Zhang, L., Xing, J., Utama, M. I. B., Lu, X., Du, K., ... & Xiong, Q. (2015). High-yield synthesis and optical properties of gC<sub>3</sub>N<sub>4</sub>. *Nanoscale*, 7(29), 12343-12350.
- [26] Jiang, J., Ou-yang, L., Zhu, L., Zheng, A., Zou, J., Yi, X., & Tang, H. (2014). Dependence of electronic structure of g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> on the layer number of its nanosheets: a study by Raman spectroscopy coupled with first-principles calculations. *Carbon*, 80, 213-221.
- [27] Yan, T. N., Liu, E. H., Chu, Z. Y., & Li, X. D. (2017). Scalable Synthesis of Ultrathin g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> Nanosheets with Enhanced Photocatalytic Activities via High Shear Exfoliation. *Journal of Nano Research*, 45, 49–54.
- [28] Zhang, X.; Xie, X.; Wang, H.; Zhang, J.; Pan, B.; Xie, Y. Enhanced photoresponsive ultrathin graphitic-phase C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets for bioimaging. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 18–21.
- [29] Lin, L. S., Cong, Z. X., Li, J., Ke, K. M., Guo, S. S., Yang, H. H., & Chen, G. N. (2014). Graphitic-phase C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets as efficient photosensitizers and pH-

responsive drug nanocarriers for cancer imaging and therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(8), 1031-1037.

[30] Viezbicke, B. D., Patel, S., Davis, B. E., & Birnie III, D. P. (2015). Evaluation of the Tauc method for optical absorption edge determination: ZnO thin films as a model system. *physica status solidi (b)*, 252(8), 1700-1710

[31] Lawson-Wood, K., Upstone, S., & Evans, K. (2018). Determination of Relative Fluorescence Quantum Yields using the FL6500 Fluorescence Spectrometer. *Fluoresc. Spectrosc*, 4, 1-5.

[32] Wieczorowska-Tobis K, Polubinska A, Breborowicz A, Oreopoulos DG. (2001) A comparison of the biocompatibility of phosphate-buffered saline and dianeal 3.86% in the rat model of peritoneal dialysis. *Advances in Peritoneal dialysis. Conference on Peritoneal Dialysis.*;17:42-46. PMID: 11510294.

[33] Pan, D., Zhang, J., Li, Z., & Wu, M. (2010). Hydrothermal route for cutting graphene sheets into blue-luminescent graphene quantum dots. *Advanced materials*, 22(6), 734-738.

[34] Larkin, P. (2017). *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. Elsevier. pag 94-133

[35] Tolosa, L., Donato, M. T., & Gómez-Lechón, M. J. (2014). General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, 333–348.

[36] Chu, X., Li, K., Guo, H., Zheng, H., Shuda, S., Wang, X., ... & Zhang, Y. (2017). Exploration of graphitic-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> quantum dots for microwave-induced photodynamic therapy. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(8), 1836-1844.

[37] P. Cavatorta, L. Masotti, A.G. Szabo, (1985) A time-resolved fluorescence study of 4',6' diamidine-2-phenylindole dihydrochloride binding to polynucleotides, *Biophysical Chemistry*, Volume 22, Issues 1–2,

- [38] Tadesse, A., Hagos, M., RamaDevi, D., Basavaiah, K., & Belachew, N. (2020). Fluorescent-nitrogen-doped carbon quantum dots derived from citrus lemon juice: green synthesis, mercury (II) ion sensing, and live cell imaging. *ACS omega*, 5(8), 3889-3898.
- [39] Dosne Pasqualini, C. (2006). Las células Hela como prototipo del cultivo celular inmortalizado. *Medicina (Buenos Aires)*, 66(5), 487-488.
- [40] Campos Muñoz, A. y Gomez de Ferraris, M. (2009). *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*. Miguel Hidalgo, Mexico: Editorial Medica Panamericana
- [41] Díaz Caballero, A., Mora Solano, E., & Herrera Herrera, A.. (2013). Presencia de micronúcleos en células epiteliales de encías, como marcador de inestabilidad cromosomal: Revisión sistemática. *Avances en Odontoestomatología*, 29(2), 95-102.
- [42] Ortiz-García, Y. M., García-Iglesias, T., Orozco, A. G., Montaña-Cisneros, I. M., López-Tela, D. L., & Zamora-Pérez, A. L. (2019). Neutrófilos y células epiteliales en frotis de saliva de pacientes con periodontitis crónica: estudio piloto. *Revista Mexicana de Periodontología*, 9(3), 45-49.
- [43] Ramirez cervantes Y (2015) Tesis" frecuencia de micronúcleos en mucosa oral de mujeres expuestas a tintes de cabello" repositorio institucional CUCBA UDeg.
- [44] Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., & Fenech, M. (2008). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659(1-2), 93-108.
- [45] Majer, B. J., Laky, B., Knasmüller, S., & Kassie, F. (2001). Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 489(2-3), 147-172.

- [46] LODISH, H. (. (2005). BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR (5a. ed.). BUENOS AIRES: PANAMERICANA.
- [47] Bilan, R., Nabiev, I., & Sukhanova, A. (2016). Quantum dot-based nanotools for bioimaging, diagnostics, and drug delivery. *ChemBioChem*, 17(22), 2103-2114.
- [48] Kang, S., Fang, Z., He, M., Chen, M., Gao, Y., Sun, D., ... & Cui, L. (2020). An instant, biocompatible and biodegradable high-performance graphitic carbon nitride. *Journal of colloid and interface science*, 563, 336-346.
- [49] Sher, M., Shahid, S., & Javed, M. (2021). Synthesis of a novel ternary (g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets loaded with Mo doped ZnO nanoparticles) nanocomposite for superior photocatalytic and antibacterial applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 219, 112202.
- [50] Chen, X., Weng, M., Lan, M., Weng, Z., Wang, J., Guo, L., ... & Qiu, B. (2021). Superior antibacterial activity of sulfur-doped g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets dispersed by *Tetrastigma hemsleyanum* Diels & Gilg's polysaccharides-3 solution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 168, 453-463.
- [51] Li, R., Ren, Y., Zhao, P., Wang, J., Liu, J., & Zhang, Y. (2019). Graphitic carbon nitride (g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) nanosheets functionalized composite membrane with self-cleaning and antibacterial performance. *Journal of hazardous materials*, 365, 606-614.
- [52] Wu, Y., Zhou, Y., Xu, H., Liu, Q., Li, Y., Zhang, L., ... & Yang, J. (2018). Highly active, superstable, and biocompatible Ag/polydopamine/g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> bactericidal photocatalyst: synthesis, characterization, and mechanism. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(11), 14082-14094.