

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Desarrollo de un biosensor óptico basado en GQD/ZnO para la potencial
detección de *Salmonella typhimurium*

LQI. Francisco Javier Gámez Ibarra

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA DE LOS MATERIALES

2025

Desarrollo de un biosensor óptico basado en GQD/ZnO para la potencial detección de
Salmonella typhimurium

Los miembros del comité de tesis aprueban la tesis realizada por el alumno Francisco
Javier Gámez Ibarra con matrícula 1861957, como opción a grado de Maestro en
Ciencias con Orientación en Química de los Materiales.

Dra. María Idalia Gómez del Consuelo de la Fuente

Dra. Thelma Elizabeth Serrano Quezada

Dra. María Fernanda Retana Betancourt

Dra. Blanca Margarita Muñoz Flores

Desarrollo de un biosensor óptico basado en GQD/ZnO para la potencial detección de
Salmonella typhimurium

Dra. María Idalia del Consuelo Gómez de la Fuente
Directora de tesis

Dra. Sara Luisa Rodríguez De Luna
Codirectora de tesis

Dedicatoria

Agradezco a Arit, mi novia, por apoyarme en todo este camino, gracias por estar en cada paso y cada obstáculo que he tenido en todo este tiempo.

A mi perrita Mocca que es parte de mi familia y al igual me ha acompañado en los momentos mas difíciles.

Agradezco a mis amigos Ryn, Dino y Smorke por sacarme una sonrisa en todo momento y apoyarme desde tan lejos.

A la Dra. Idalia por creer en mi desde el inicio y darme la libertad de explorar e investigar, por la oportunidad de hacer un intercambio en el extranjero.

Al Dr. Ángel por todo el apoyo, por sus enseñanzas, por todo el apoyo utilizando el TEM.

Agradezco a la vida y a Dios por esta enorme oportunidad de aprender, de investigar y de poder compartir el conocimiento con los demás.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

A McGill University por recibirme para realizar mi intercambio.

A la Dra Sara por su apoyo y la enseñanza a lo largo de este proyecto.

A la Dra Audrey por abrir mi panorama y visualizar las cosas desde una perspectiva diferente.

Resumen

El desarrollo de biosensores para la detección de virus y bacterias es un campo el cual tiene un amplio crecimiento, que sigue en investigación, sin embargo, se pueden observar ciertas ventajas que puede tener con respecto a vías convencionales de análisis, reducción de costos, disminución de tiempos de análisis, disminución de RPBI generados. Estos biosensores pueden tener distintas conformaciones y una de ellas es mediante el uso de fluoroforos como GQD, la adición de nanopartículas como ZnO puede traer consigo ventajas para desarrollar sensores tipo “turn-off” o incluso potenciar la respuesta que el fluoroforo puede tener. Es por esto que en el presente proyecto se desarrolló un biosensor con GQD y ZnO en conjunto de un Apt para la detección del LPS de la bacteria *S.typhi*, se obtuvo un ZnO con un tamaño promedio de 180 nm, con una fase cristalina zincita, para los GQD se logró obtener un tamaño promedio de 5 nm y se encontró que su $\lambda_{\text{max ex}}$ de 330 nm. Los análisis de GQD/ZnO/Apt/LPS para diferentes concentraciones indican una linealidad en los resultados, obteniendo una R^2 de 0.95, finalmente se calculó un LOD de 0.355 nM de LPS de *S.typhi*.

Índice

1. Fundamentos y Propiedades del Grafeno y Óxido de Grafeno	15
1. Síntesis de ZnO	30
1.1 Propiedades del Grafeno	15
1.2 Propiedades del Óxido de Grafeno	16
2. Puntos Cuánticos de Grafeno (GQDs)	17
2. Síntesis GO y GQD	38
2.1 Características Estructurales	17
2.2 Métodos de Síntesis	18
2.3 Características Fisicoquímicas	19
2.4 Fenómeno de Confinamiento Cuántico en GQDs	19
3. Características Fotoluminiscentes de los GQDs	20
3.1 Principios Fundamentales de la Fotoluminiscencia	20
3.2 Procesos Fotoluminiscentes en GQDs	21
3.3 Características Espectrales de la Emisión Fotoluminiscente en GQDs	21
4. Implementación en Sistemas de Biosensado y Detección de Microorganismos Patógenos	22
4.1 Principios Operativos de Biosensores Basados en GQDs	22
4.2 Aptámeros como Elementos de Biorreconocimiento	23
4.3 Sistemas Biosensores para Identificación de <i>S. typhi</i>	24
5. Metodologías Analíticas para la Caracterización de GQDs y Sistemas Biosensores	25
5.1 Análisis Estructural y Morfológico	25
5.1.1 Microscopía Electrónica	25
5.1.3 Difracción de Rayos X (DRX)	25
5.2 Análisis Químico y Composicional	25
5.2.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	25
5.3 Caracterización Óptica	26
5.3.1 Espectroscopía UV-Visible	26
5.3.2 Espectroscopía de Fotoluminiscencia (PL)	26
Antecedentes	11
Aporte Científico	13
Capítulo 1: Introducción	10
Capítulo 2: Marco teórico	15
Capítulo 3: Procedimiento Experimental	27
Capítulo 4: Discusión de Resultados	30
Caracterización GQD/ZnO	47
Conclusiones	52
Detección de LPS de <i>S. typhi</i> utilizando GQD/ZnO/Apt	49
Detección de <i>S. typhi</i>	29
Formación de nanocomposito GQD/ZnO	28
Hipótesis	14
Índice	7
Modificación con Apt	28
Objetivo general	14
Objetivos	14
Objetivos específicos	14

Referencias bibliográficas.....	53
Síntesis de GO.....	27
Síntesis de GQD de GO.....	28
Síntesis de ZnO.....	28

Índice de Tablas y Figuras

Figura 1. Representación estructural del grafeno.....	17
Figura 2. Representación estructural del GO.....	18
Figura 3. Representación estructural de GQDs.....	20
Figura 4. Representación simplificada del diagrama de Jablonski mostrando las principales transiciones en el proceso fotoluminiscente de GQDs.....	22
Figura 5. Representación esquemática del funcionamiento de un biosensor basado en GQDs y aptámeros para la detección de <i>S. typhi</i>	26
Tabla 1. Diferentes concentraciones de <i>S. typhi</i>	31
Tabla 2. Disposición de los residuos generados en cada metodología.....	31
Fig 6. Espectro de Infrarrojo de ZnO.....	32
Fig 7. Espectro de absorción de ZnO.....	33
Fig 8. Difractograma de ZnO.....	34
Tabla 3. Información obtenida de los picos de difracción del difractograma de ZnO.....	34
Fig 9. Espectro de emisión y excitación de ZnO.....	35
Fig 10. Imágenes TEM de ZnO a distintas magnificaciones.....	36
Fig 11. Imágenes HRTEM de ZnO a distintas magnificaciones.....	37
Fig 12. Imagen FFT de ZnO obtenida a partir de la imagen HRTEM.....	38
Fig 13. Imágenes STEM de ZnO a distintas magnificaciones.....	39
Fig 14. Imágenes STEM/EDX junto con su espectro de energía.....	40
Fig 15. Espectro de absorción UV-Vis de GO.....	41
Fig 16. Espectro de infrarrojo de GO.....	42
Fig 17. Difractograma de GO.....	43

Fig 18. Espectro de emisión de GO a distintas longitudes de onda de excitación.....	44
Fig 19. Espectro de absorción UV-Vis de GQD.....	45
Fig 20. Espectro de excitación de GQD.....	46
Fig 21. Espectro de emisión de GQD a diferentes longitudes de onda de excitación.....	47
Fig 22. Imágenes HRTEM y FTT para GQD.....	48
Fig 23. Imagen HRTEM de GQD a diferentes magnificaciones.....	49
Fig 24. Espectro de emisión para GQD y GQD/ZnO a diferentes concentraciones a una λ_{ex} de 330 nm.....	50
Fig 25. Espectro de emisión de GQD/ZnO y GQD/ZnO/Apt a una λ_{ex} de 330 nm.....	51
Fig 26. Espectro de emisión de GQD/ZnO/Apt/LPS a una λ_{ex} de 330 nm.....	52
Fig 27. Gráfica de Linealidad para LPS de <i>S. typhi</i>	53

Índice de Abreviaturas

GQD (Graphene Quantum Dots)

ZnO (Óxido de Zinc)

LPS (Lipopolisacárido)

S. typhi (*Salmonella typhi*)

Apt (Aptámero)

GO (Óxido de Grafeno)

TEM (Microscopía Electrónica de Transmisión)

HRTEM (Microscopía Electrónica de Alta Resolución)

FFT (Transformada Rápida de Fourier)

STEM (Microscopía Electrónica de Barrido en Transmisión)

EDX (Espectroscopía de Dispersión de Energía de Rayos X)

UV-Vis (Ultravioleta-Visible)

DRX (Difracción de Rayos X)

FTIR (Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier)

PL (Espectroscopía de Fotoluminiscencia)

NP (Nanopartículas)

Au (Oro)

TiO₂ (Dióxido de Titanio)

Cu (Cobre)

ADN (Ácido Desoxirribonucleico)

RPBI (Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos)

Capítulo 1: Introducción

Desde el descubrimiento del grafeno y posteriormente el óxido de grafeno (GO), se han estudiado sus propiedades, entre las cuales destacan la alta transparencia óptica¹ y la alta flexibilidad, a pesar de ser un material resistente de tamaño nanométrico². Una propiedad que presenta el GO es la fotoluminiscencia. La fotoluminiscencia es la emisión de luz que ocurre después de la absorción de radiación electromagnética³, dicha propiedad puede ser potenciada con la formación de puntos cuánticos, los puntos cuánticos son nanoestructuras semiconductoras que presentan propiedades distintas a las de la misma estructura con un tamaño de partícula mucho mayor y esto se debe al efecto de la mecánica cuántica⁴, esto sucede por el confinamiento de los electrones presentes en la banda de conducción y los huecos presentes en las bandas de valencia⁵. Los puntos cuánticos de grafeno (GQD) presentan una mayor fotoestabilidad contra el parpadeo y fotoblanqueo y una baja toxicidad que puede ser muy útil para distintas aplicaciones como el biosensado, catálisis, dispositivos ópticos, dispositivos de filtración, etc.⁶⁻⁸

Materiales como nanopartículas (NP) de metales u óxidos metálicos pueden propiciar propiedades que los GQD en condiciones normales no tiene, es el caso de las NP de Au que han sido utilizadas para el desarrollo de sensores ópticos⁹⁻¹¹, NP de TiO₂ se han desarrollado sensores electroquímicos¹², NP de Cu se ha reportado el desarrollo de un biosensor para la detección de glucosa¹³. Además de esto, la formación de nanocompositos puede generar, con mayor facilidad, interacciones con distintas moléculas, un ejemplo de esto es la formación del nanocomposito de GQD/ZnO desarrollado por Garza, *et al*, donde el uso del óxido de zinc (ZnO) favorece la interacción con peróxido de hidrógeno para de este modo se haga una detección de dicha molécula por fotoluminiscencia¹⁴.

El ZnO ha sido utilizado como agente antibacterial, fotocatalizador y sensor de gas gracias a sus propiedades como los son la alta movilidad electrónica, baja toxicidad, buena estabilidad química y compatibilidad biológica. También se reporta que ha sido utilizado para la detección de pequeñas moléculas como ADN, glucosa y colesterol¹⁵.

Los biosensores utilizados en la detección de microorganismos como los patógenos alimenticios son de suma importancia, debido a que la detección se lleva a cabo por métodos

convencionales que se basan en el cultivo en medios enriquecidos para el crecimiento acelerado de los patógenos, sin embargo, esos tiempos rondan entre los 3 a 7 días^{16,17}. Utilizar técnicas alternativas supone una reducción en el consumo de reactivos, disminución de tiempos de análisis y el uso de personal.

Una de las principales enfermedades causadas por patógenos alimenticios es la salmonelosis, encontrándose dentro de los primeros lugares en enfermedades diagnosticadas por el consumo de alimentos contaminados.¹⁸ Esta enfermedad presenta índices de mortalidad en América Latina que van de 500 a 1000 casos por cada 100,000 habitantes anualmente, según estadísticas reportadas en 2016¹⁹. Existen diversos métodos para su detección, que varían dependiendo de la molécula que se utilizará para detectar la *salmonella* y estos son algunos ejemplos: anticuerpos que son proteínas producidas por el sistema inmunológico del cuerpo humano²⁰, los aptámeros (Apt) son cadenas simples de ADN o RNA obtenidos por un proceso in vitro llamado SELEX²¹, bacteriófagos son virus bacterianos que infectan a las células para utilizarlas y llevar a cabo ciclos de replicación²², péptidos antimicrobianos cadenas cortas de péptidos que son la primer línea de defensa ante patógenos invasores en el sistema inmunológico²³, y por último, sondas de ácidos nucleicos consisten en la extracción de ADN de *salmonella* para desnaturalizar y exponer ante sondas de ADN de este modo ocurre una hibridación y se induce una señal que puede ser medible²⁴.

Es por estas razones que en el presente protocolo de investigación se propone desarrollar un biosensor óptico de puntos cuánticos de óxido de grafeno con nanopartículas de óxido de zinc para la potencial detección de la bacteria *salmonella*.

Antecedentes

En el año 2020, M. Muniyalakshmi, *et al.* Realizaron la síntesis y caracterización de nanohojas de GO, aplicando el método de Hummer's, que consiste en la adición de grafito en polvo en ácido sulfúrico concentrado y permanganato de potasio a bajas temperaturas para controlar la reacción y de este modo. La caracterización por difracción de rayos X de polvos (XRD) les permitió obtener los patrones de difracción característicos para el GO. Por espectroscopía Raman reportan las bandas de vibración a 1326 y 1598 cm⁻¹ que corresponde a la banda de desorden (D) y vibraciones en fase (G) característicos del GO, y por FTIR

muestran las bandas de los grupos funcionales de O-H, C-H, C=O y C-O confirmando la obtención de GO. Finalmente, confirmaron la morfología característica del GO de nanohojas con estructuras bidimensionales mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)²⁵.

Posterior a esto, se desarrolló una síntesis con menor impacto ambiental. En el año 2022, Y. Zhu, *et al.* Modificaron el método de Hummer's reduciendo la cantidad de ácido (40% menos) gracias a que manejaron un tiempo de síntesis mayor. Las caracterizaciones realizadas reportan los patrones de difracción (XRD) de GO del plano (001) característico para dicho compuesto, las bandas de vibración observadas por espectroscopía Raman corresponden a las bandas D y G del GO, por espectroscopía UV-Vis se observa la banda de absorción a 240 nm tanto por la síntesis convencional como la modificación, FTIR muestra bandas de los grupos funcionales O-H, C-H, C=O y C-O, característicos del GO. De este modo se confirma la síntesis de GO con menor impacto ambiental que por síntesis convencional²⁶.

Existen algunas investigaciones referentes al desarrollo de sensores ópticos basados en GO y nanopartículas de zinc, un ejemplo de ello es el trabajo desarrollado en el año 2020 por B. Jain, *et al.*, los cuales sintetizaron un nanocomposito de GO/ZnO por precipitación con NaOH y ZnSO₄. La síntesis del GO se realizó por el método de Hummer's, y el composito se obtuvo mezclando ZnO y GO en THF. Las caracterizaciones arrojan por UV-Vis bandas de absorción a 246, 330 y 354 nm, que corresponden a GO, ZnO y ZnG, respectivamente. Por XRD se muestran los patrones de difracción (001) característicos del GO y para ZnO los correspondientes a la wurtzita, SEM la morfología de GO es de gránulos y de clúster para el ZnO, por PL se puede ver que al agregar GO en ZnO se reduce la intensidad de la banda de emisión a 380 nm²⁷.

Años más tarde (2023) se desarrolló un nanocomposito para su aplicación como sensor óptico por los investigadores R. Ramirez, *et al.*, quienes desarrollaron un nanocomposito de GQD/ZnO para sensar H₂O₂ por fotoluminiscencia (PL). Realizaron una modificación del método de Hummer's para la síntesis de GO, siguiendo con la obtención de puntos cuánticos de grafeno (GQD) por síntesis hidrotermal, y la síntesis de nanopartículas de ZnO se realizó por precipitación. Posteriormente, la formación del nanocomposito se realizó por ultrasonido mezclando las suspensiones de GQD y nanopartículas de ZnO. La caracterización por XRD

confirma la obtención de GO y por FTIR-ATR se observan las bandas correspondientes a los grupos funcionales de O-H, C-H, C=O, C=C, C-N, C-O-C y C-O, presentes en el GO. El análisis por fotoluminiscencia (PL) presenta las bandas de emisión en un rango de 250-325 nm, esto se debe al efecto de borde rojo gigante, fenómeno característico de la presencia de GO. Por espectroscopía Raman se presentan las bandas D y G provenientes de GO, y por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se comprueba que el nanocomposito tiene tamaños menores a 100 nm¹⁴.

Recientemente, han surgido investigaciones cuyo objetivo principal es el desarrollo de biosensores basados en GO para la detección de ciertos patógenos en alimentos, tal es el caso de H. Ye, *et al.* Quienes en el año 2019 sintetizaron nanohojas de GO y lo modificaron con 7 Apt distintos para la detección de *S. typhi*, *S. enterica*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Se estudió la selectividad de cada Apt con los patógenos y se realizó una optimización de la polarización fluorescente de GO, donde se obtuvo una respuesta para la detección de *S. typhi*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Obteniendo un límite de detección (LOD) de 38.7, 88.0 and 154 ng·mL⁻¹, respectivamente²⁹. Un año más tarde R. Renuka, *et al.*, crearon un aptasensor fluorescente utilizando GO y quantum dots (QD) de CdTe modificados con Apt. El GO se sintetizó por el método de Hummer's, y posterior a ello se realizó una mezcla de GO y QD de CdTe para la detección de *S. typhi*, obteniendo un LOD de 10 cfu·mL⁻¹. El material se caracterizó por XRD donde se presentan los picos característicos (001) para GO, SEM la morfología corresponde a gránulos de GO y los QD de CdTe se caracterizaron por la técnica de PL donde se observa la banda de emisión a 570 nm, además de un aumento en la intensidad de emisión al realizar la funcionalización³⁰.

Realizando un análisis crítico de la literatura mencionada, podemos ver que existen biosensores ópticos para la detección de *S. typhi*, basados en GO. En este trabajo se propone desarrollar un biosensor basado en GO y mejorar su respuesta óptica añadiendo NP de ZnO y funcionalizarlo con un Apt.

Aporte Científico

Desarrollo de un biosensor óptico de GO/ZnO/Apt para la potencial detección de *S. typhi*.

Hipótesis

El biosensor desarrollado con GO/ZnO/Apt detecta *S. typhi* en concentraciones de 50 nM.

Objetivos

Objetivo general

- Desarrollar un biosensor óptico con GO/ZnO inmovilizando un Apt para la detección de *S. typhi*.

Objetivos específicos

- Sintetizar GO por modificación del método Hummer's y caracterizar el GO por XRD, FTIR, UV-Vis y PL
- Sintetizar NP de ZnO por método de precipitación y caracterizar por XRD, FTIR, UV-Vis, PL y TEM
- Preparar y caracterizar el nanocomposito de GO/ZnO.
- Funcionalizar el nanocomposito GO/ZnO con un Apt.
- Caracterizar el nanocomposito GO/ZnO/Apt (biosensor).
- Realizar estudios para la detección óptica de *S. typhi* con el biosensor mediante PL.

Capítulo 2: Marco teórico

1. Fundamentos y Propiedades del Grafeno y Óxido de Grafeno

1.1 Propiedades del Grafeno

El grafeno representa una configuración alotrópica del carbono caracterizada por una disposición monolaminar de átomos organizados en una matriz cristalina bidimensional con patrón hexagonal. Su identificación y análisis experimental en 2004 por Andre Geim y Konstantin Novoselov constituyó un avance científico reconocido con el galardón Nobel de Física en 2010⁶⁰. Los elementos carbonados en esta estructura exhiben una configuración de hibridación sp^2 , donde cada átomo establece enlaces covalentes con tres elementos adyacentes (Fig 1), manteniendo un electrón no emparejado en un orbital p perpendicular al plano, elemento responsable de sus excepcionales cualidades conductivas³³.

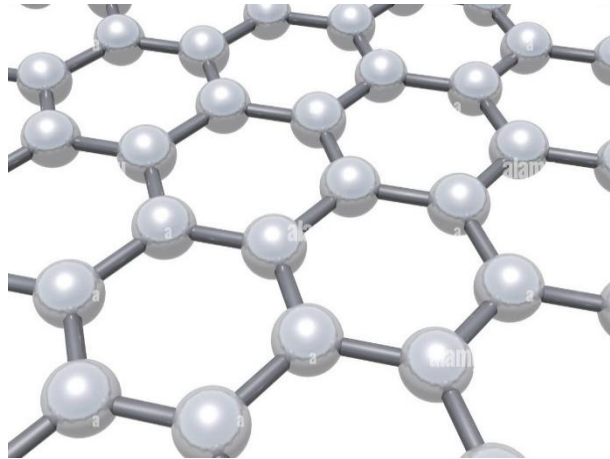


Figura 1. Representación estructural del grafeno.

Entre los atributos más significativos del grafeno destacan:

- Comportamiento electrónico: Presenta una conductividad eléctrica excepcionalmente elevada ($\sim 6,000$ S/cm) debido a la notable movilidad de los portadores de carga ($>200,000$ $\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ en condiciones ambientales estándar)³¹.
- Características mecánicas: Exhibe una resistencia tensil aproximada de 130 GPa, aproximadamente 200 veces superior al acero, con un módulo de Young cercano a 1.0 TPa⁴⁹.

- Comportamiento térmico: Muestra una conductividad térmica extraordinariamente alta ($\sim 5,000 \text{ W/m}\cdot\text{K}$), superior incluso al diamante⁶⁶.
- Propiedades ópticas: A pesar de su estructura monoatómica, absorbe aproximadamente un 2.3% de la radiación visible incidente⁷⁴.

Este conjunto de características excepcionales ha posicionado al grafeno como un material de gran potencial para implementaciones en electrónica, sistemas de almacenamiento energético, dispositivos sensores, aplicaciones biomédicas y materiales compuestos avanzados⁵⁶.

1.2 Propiedades del Óxido de Grafeno

El óxido de grafeno (GO) constituye un derivado del grafeno que incorpora diversos grupos funcionales oxigenados distribuidos tanto en su superficie basal como en sus extremos periféricos. Las principales funcionalidades químicas presentes incluyen grupos epóxido e hidroxilo en el plano superficial, y agrupaciones carboxílicas, carbonilos y lactonas en las regiones marginales³⁹. Esta modificación química mediante oxigenación altera significativamente las características del material en comparación con el grafeno puro (Fig 2).

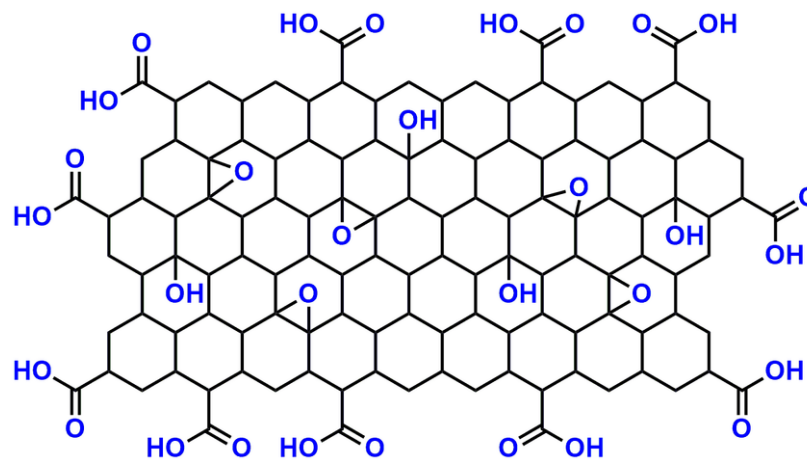


Figura 2. Representación estructural del GO

La incorporación de estos grupos oxigenados confiere al óxido de grafeno características distintivas:

- Capacidad de dispersión en medios acuosos: A diferencia del grafeno, el GO presenta marcada hidrofiliidad debido a los grupos oxigenados, facilitando su dispersión estable en agua y disolventes con polaridad elevada⁶³.
- Alteración de propiedades electrónicas: La presencia de funcionalidades oxigenadas interrumpe la continuidad de la red sp^2 característica del grafeno, disminuyendo considerablemente su conductividad eléctrica. Sin embargo, esta modificación genera una brecha energética (bandgap) que puede ser modulada mediante el grado de oxidación, confiriéndole características semiconductoras⁵⁹.
- Incremento en reactividad química: Las funcionalidades oxigenadas actúan como sitios de anclaje para diversas moléculas, potenciando su capacidad de funcionalización⁴³.

El óxido de grafeno ofrece ventajas considerables para aplicaciones industriales y biomédicas debido a:

Métodos de síntesis escalables: El procedimiento de Hummers modificado y sus variaciones permiten la fabricación masiva de GO a partir de grafito, con costos significativamente inferiores comparados con los métodos de producción de grafeno³⁴.

Versatilidad en procesos de funcionalización: La abundancia de grupos funcionales facilita la unión covalente o no covalente con biomoléculas, nanopartículas, estructuras poliméricas y otros compuestos⁴⁶.

Biocompatibilidad ajustable: Mediante la regulación del nivel de oxidación y funcionalización, es posible modificar su interacción con sistemas biológicos⁶¹.

2. Puntos Cuánticos de Grafeno (GQDs)

2.1 Características Estructurales

Los puntos cuánticos de grafeno (GQDs, por sus siglas en inglés) constituyen fragmentos nanométricos de grafeno con dimensiones laterales inferiores a 100 nm, típicamente oscilando entre 3-20 nm (Fig 3), y espesores variables desde monocapas hasta estructuras multicapa⁵⁰. A diferencia del grafeno macroscópico, los GQDs manifiestan efectos de

confinamiento cuántico debido a sus dimensiones reducidas, lo que les confiere propiedades optoelectrónicas singulares, particularmente fotoluminiscencia⁹³.

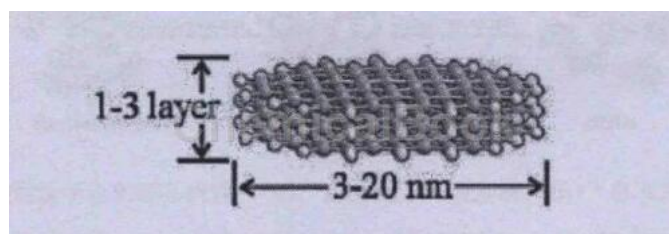


Figura 3. Representación estructural de QDs.

Estructuralmente, los QDs pueden categorizarse en:

- QDs prístinos: Constituidos principalmente por carbonos con hibridación sp^2 , conservando la organización cristalina característica del grafeno.
- QDs oxidados: Incorporan diversas funcionalidades oxigenadas similares a las presentes en el GO.
- QDs dopados: Integran heteroátomos como nitrógeno, boro, azufre o fósforo en la matriz carbonada⁷⁸.

2.2 Métodos de Síntesis

Los QDs pueden sintetizarse mediante aproximaciones "descendentes" y "ascendentes":

Métodos "descendentes" (Top-down): Parten de estructuras gráficas de mayor dimensión que se fragmentan en unidades nanométricas:

- Oxidación y exfoliación de grafito: Similar al método de Hummers pero con condiciones más agresivas para fragmentar las láminas⁶⁷.
- Corte electroquímico: Aplicación de potenciales cíclicos a electrodos de grafito o grafeno en soluciones electrolíticas⁸⁵.
- Procesamiento hidrotérmico/solvotérmico: Tratamiento de GO a elevada temperatura y presión en solventes específicos⁵⁷.
- Ablación mediante láser: Irradiación de materiales gráfiticos con láser pulsado³².

Métodos "ascendentes" (Bottom-up): Construyen QDs a partir de moléculas precursoras más pequeñas:

- Carbonización de compuestos orgánicos: Pirólisis controlada de moléculas aromáticas como ácido cítrico, glucosa o pireno⁴¹.
- Metodología basada en microondas: Calentamiento rápido y homogéneo de precursores orgánicos⁸⁸.
- Ensamblaje de estructuras aromáticas cíclicas: Reacciones de acoplamiento entre precursores aromáticos específicamente diseñados⁷⁹.

2.3 Características Fisicoquímicas

Las propiedades de los GQDs están fuertemente condicionadas por:

Dimensiones: El tamaño lateral determina la intensidad del confinamiento cuántico y, consecuentemente, las propiedades optoelectrónicas⁵⁴.

Morfología y configuración periférica: La disposición de los bordes (zigzag, armchair o mixtos) influye significativamente en las propiedades electrónicas y la reactividad química⁷⁹.

Funcionalidades superficiales: La presencia y distribución de grupos oxigenados o nitrogenados modifica la solubilidad, reactividad y propiedades ópticas⁶⁸.

Incorporación de heteroátomos: La integración de elementos como N, B, S o P altera la estructura electrónica y las características fotofísicas⁶⁵.

2.4 Fenómeno de Confinamiento Cuántico en GQDs

El confinamiento cuántico constituye un fenómeno físico que se manifiesta cuando las dimensiones de una partícula se reducen hasta magnitudes comparables a la longitud de onda de los electrones (longitud de onda de De Broglie), típicamente en escala nanométrica. En los GQDs, este confinamiento ocasiona la discretización de los niveles energéticos, contrastando con las bandas continuas características del grafeno macroscópico⁴⁷.

Las implicaciones del confinamiento cuántico en los GQDs incluyen:

- Generación de un bandgap: A diferencia del grafeno que presenta características de semimetal con bandgap nulo, los GQDs desarrollan un bandgap que varía inversamente con su tamaño, siguiendo aproximadamente la relación $E_g \approx 1/L^2$, donde L representa la dimensión lateral⁹⁶.

- Fotoluminiscencia dependiente del tamaño: La energía de emisión se incrementa a medida que disminuye el tamaño de los GQDs, permitiendo la modulación de la emisión desde el infrarrojo cercano hasta el ultravioleta⁶².
- Incremento en secciones eficaces de absorción: El confinamiento aumenta la probabilidad de transiciones ópticas, resultando en coeficientes de absorción molar considerablemente superiores a los cromóforos orgánicos convencionales⁷³.

3. Características Fotoluminiscentes de los GQDs

3.1 Principios Fundamentales de la Fotoluminiscencia

La fotoluminiscencia (PL) constituye el fenómeno mediante el cual un material absorbe fotones de determinada energía y emite fotones de menor energía tras un proceso de relajación energética. En el caso de los GQDs, la fotoluminiscencia representa una de sus propiedades más relevantes y útiles para aplicaciones en biosensado⁵⁶.

Los mecanismos básicos que explican la fotoluminiscencia en GQDs pueden visualizarse mediante el diagrama de Jablonski (Fig 4), que ilustra las posibles transiciones electrónicas:

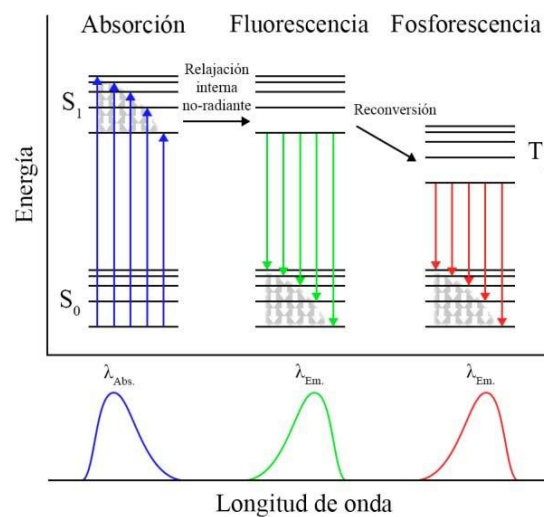


Figura 4. Representación simplificada del diagrama de Jablonski mostrando las principales transiciones en el proceso fotoluminiscente de GQDs.

El proceso de fotoluminiscencia en GQDs típicamente sigue estas etapas:

Absorción: Un electrón en estado basal (S_0) absorbe un fotón ascendiendo a un nivel energético superior (S_1 , S_2 , etc.).

Relajación vibracional: El electrón excitado disipa parte de su energía mediante procesos no radiativos hasta alcanzar el nivel vibracional inferior del estado excitado.

Emisión fluorescente: El electrón retorna al estado fundamental emitiendo un fotón, generalmente con menor energía (mayor longitud de onda) que el fotón absorbido. La diferencia energética entre los fotones absorbidos y emitidos se denomina desplazamiento de Stokes.

3.2 Procesos Fotoluminiscentes en QDs

La fotoluminiscencia en los QDs resulta de múltiples mecanismos coexistentes:

Recombinación entre bandas: En QDs prístinos, la emisión proviene principalmente de la recombinación de pares electrón-hueco generados entre estados discretizados derivados de las bandas de conducción y valencia⁵³.

Estados asociados a defectos: Las imperfecciones estructurales y grupos funcionales superficiales generan estados energéticos localizados dentro del bandgap, actuando como trampas para los portadores de carga y centros de recombinación radiativa⁸¹.

Contribución de los bordes: La configuración atómica periférica (zigzag o armchair) genera estados electrónicos localizados que contribuyen significativamente a la fotoluminiscencia, especialmente en QDs de dimensiones reducidas⁹⁵.

3.3 Características Espectrales de la Emisión Fotoluminiscente en QDs

Los perfiles espectrales de la fotoluminiscencia en QDs están influenciados por múltiples factores:

Correlación con el tamaño: Siguiendo los principios del confinamiento cuántico, la emisión experimenta un desplazamiento hacia longitudes de onda más cortas (desplazamiento al azul) a medida que disminuyen las dimensiones de los QDs. Esta relación puede expresarse aproximadamente como $\lambda_{\text{emisión}} \propto L^n$, donde L representa la dimensión lateral del QD y n constituye un parámetro empírico dependiente de la naturaleza del QD⁵⁸.

Influencia de las funcionalidades superficiales: Los grupos oxigenados (principalmente -OH, -COOH) modifican la distribución electrónica y pueden actuar como centros emisores independientes. El grado de oxidación puede alterar tanto la intensidad como la longitud de onda de emisión⁷⁶.

Consecuencias del dopaje: La incorporación de heteroátomos (N, S, B, P) altera la estructura electrónica, generalmente ocasionando un desplazamiento hacia el rojo de la emisión y mejorando el rendimiento cuántico⁴⁵.

Sensibilidad al pH: Numerosos GQDs exhiben emisión dependiente del pH debido a la protonación/desprotonación de los grupos funcionales superficiales, característica que los hace útiles como sensores de pH⁹⁰.

Dependencia de la excitación: A diferencia de muchos fluoróforos convencionales, los GQDs típicamente muestran emisión dependiente de la longitud de onda de excitación, donde la longitud de onda emitida varía con cambios en la longitud de onda de excitación, atribuido a la distribución heterogénea de tamaños y la diversidad de estados emisores³⁷.

4. Implementación en Sistemas de Biosensado y Detección de Microorganismos Patógenos

4.1 Principios Operativos de Biosensores Basados en GQDs

Los biosensores constituyen dispositivos analíticos que combinan un elemento de reconocimiento biológico con un transductor para detectar compuestos específicos. Los GQDs han emergido como una plataforma prometedora para biosensores debido a sus características fotoluminiscentes singulares, elevada relación superficie/volumen, notable biocompatibilidad y amplia capacidad de funcionalización superficial⁴⁴.

En el contexto de los biosensores ópticos basados en GQDs, el principio de detección generalmente involucra alteraciones en las propiedades de fotoluminiscencia (intensidad, longitud de onda o tiempo de vida) en respuesta a la interacción con el analito objetivo⁷⁰. Los mecanismos más frecuentes incluyen:

Transferencia de energía por resonancia de Förster (FRET): Transferencia energética no radiativa entre los GQDs (donador) y un aceptor adecuado cuando se encuentran en proximidad espacial (5-10 nm)⁵¹.

Transferencia electrónica fotoinducida (PET): Supresión de la fluorescencia debido a la transferencia de un electrón excitado desde los GQDs hacia un aceptor de electrones o viceversa⁸³.

Procesos de agregación/dispersión: Modificaciones en la emisión debido a fenómenos de agregación o dispersión de los GQDs en presencia del analito⁹⁴.

4.2 Aptámeros como Elementos de Biorreconocimiento

Los aptámeros son secuencias oligonucleotídicas (ADN o ARN) monocatenarias que pueden unirse con elevada afinidad y especificidad a una amplia variedad de dianas, incluyendo iones, moléculas pequeñas, proteínas y células completas, incluyendo organismos patógenos⁴⁰.

Las ventajas de los aptámeros como elementos de reconocimiento en biosensores incluyen:

- Elevada especificidad y afinidad: Constantes de disociación (Kd) en el rango nano a picomolar⁵⁵.
- Estabilidad térmica y química: Mayor resistencia a degradación comparados con anticuerpos³⁵.
- Producción sintética reproducible: Sin variabilidad entre lotes, a diferencia de los anticuerpos⁷³.
- Facilidad para modificaciones químicas: Permiten la incorporación de grupos funcionales para su inmovilización o marcaje⁹¹.

El proceso de selección de aptámeros, conocido como SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), consiste en ciclos iterativos de:

Incubación de una biblioteca de oligonucleótidos aleatorios con la diana molecular. Separación de las secuencias unidas. Amplificación de estas secuencias mediante PCR. Obtención de cadenas simples para el siguiente ciclo.

Tras múltiples rondas (típicamente 8-15), las secuencias resultantes son caracterizadas y optimizadas³⁸.

4.3 Sistemas Biosensores para Identificación de *S. typhi*

S. typhi representa el agente etiológico de la fiebre tifoidea, una enfermedad sistémica potencialmente letal que afecta anualmente a millones de individuos, principalmente en regiones en desarrollo⁷⁷. La detección rápida y sensible de este patógeno resulta crucial para el diagnóstico temprano y el control epidemiológico.

Los biosensores basados en GQDs para la detección de *S. typhi* combinan la especificidad de los aptámeros con las propiedades luminiscentes de los GQDs³⁶. Las estrategias más frecuentemente implementadas incluyen:

Biosensores basados en aptámeros conjugados a GQDs: El aptámero específico para *S. typhi* se conjuga directamente a la superficie de los GQDs. La unión del microorganismo provoca cambios conformacionales en el aptámero que modifican las propiedades fotoluminiscentes de los GQDs (Figura 5)⁸⁷.

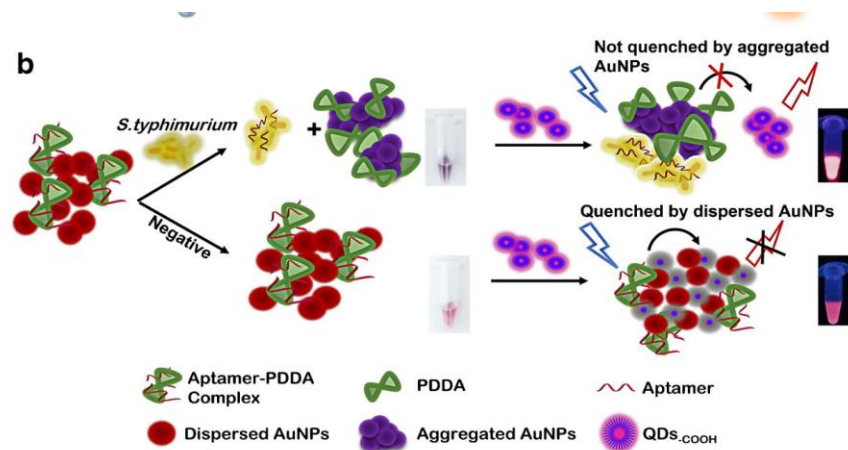


Figura 5. Representación esquemática del funcionamiento de un biosensor basado en GQDs y aptámeros para la detección de *S. typhi*.

Sistemas fundamentados en transferencia energética: El aptámero se modifica con un fluoróforo o quencher que interactúa con los GQDs mediante FRET o PET. La unión de *S. typhi* altera la distancia entre estos componentes, resultando en variaciones medibles en la señal fluorescente⁷².

Detección fundamentada en fenómenos de agregación: La presencia de *S. typhi* induce la agregación de GQDs funcionalizados con aptámeros, resultando en la supresión de la fluorescencia o en un desplazamiento de la longitud de onda de emisión⁵².

Los avances recientes han conseguido límites de detección en el rango de 10-100 CFU/mL (unidades formadoras de colonias por mililitro), comparables o superiores a los métodos de cultivo tradicionales, pero con tiempos de análisis significativamente reducidos (de días a minutos u horas)⁹².

5. Metodologías Analíticas para la Caracterización de GQDs y Sistemas Biosensores

5.1 Análisis Estructural y Morfológico

5.1.1 Microscopía Electrónica

- Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM): Permite la visualización directa de GQDs individuales con resolución atómica, proporcionando información sobre dimensiones, morfología, número de capas y estructura cristalina⁷⁰. La TEM de alta resolución (HR-TEM) puede revelar detalles de la red cristalina y defectos, mientras que la microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM) combinada con espectroscopía de pérdida de energía de electrones (EELS) proporciona información sobre la composición elemental con resolución espacial nanométrica⁸⁶.

5.1.3 Difracción de Rayos X (DRX)

La DRX proporciona información sobre la estructura cristalina, espaciado interplanar y grado de cristalinidad de los GQDs. Los GQDs típicamente muestran picos característicos correspondientes a los planos (002) y (100) del grafito, aunque considerablemente más anchos debido a sus dimensiones nanométricas⁸².

5.2 Análisis Químico y Composicional

5.2.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La FTIR resulta fundamental para identificar los grupos funcionales presentes en los GQDs, como C=O ($\sim 1720\text{ cm}^{-1}$), C-O ($\sim 1050\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$), O-H ($\sim 3400\text{ cm}^{-1}$) y C=C aromático

($\sim 1580\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$). Esta información es crucial para comprender la química superficial de los GQDs y su potencial para funcionalización⁵¹.

5.3 Caracterización Óptica

5.3.1 Espectroscopía UV-Visible

La espectroscopía UV-Vis proporciona información sobre la absorción óptica de los GQDs. Típicamente muestran:

- Una fuerte absorción en la región UV ($\sim 230\text{-}270\text{ nm}$) debido a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ en dominios sp^2 .
- Un hombro o banda menos intensa ($\sim 300\text{-}400\text{ nm}$) atribuido a transiciones $n \rightarrow \pi^*$ en grupos carbonilo.

El perfil y posición de estos picos dependen del tamaño, funcionalización y dopaje de los GQDs⁷⁶.

5.3.2 Espectroscopía de Fotoluminiscencia (PL)

La espectroscopía PL resulta esencial para caracterizar las propiedades emisivas de los GQDs, proporcionando información sobre:

- Longitud de onda de emisión y perfil espectral.
- Rendimiento cuántico de fluorescencia (QY).
- Dependencia de la emisión con la longitud de onda de excitación.
- Tiempos de vida de fluorescencia (mediante PL resuelta en el tiempo).

Estas características son fundamentales para aplicaciones en biosensado⁴⁵.

Capítulo 3: Procedimiento Experimental

Los reactivos utilizados durante el proyecto son los siguientes:

Grafito, KMnO_4 , H_2SO_4 , Agua desionizada, NH_4OH , (ZnAc) , NaOH , Lipopolisacárido de *S. typhi* (LPS) y Apt 5'-TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAATGC-3' (3) y 5'-ATTCTCCTACTGG GATAGGTGGATTAT-3' (4).

El equipo necesario para la realización del proyecto es el siguiente:

XRD: Laboratorio de Servicios Profesionales de la FCQ.

FTIR: Laboratorio de Materiales I.

UV-Vis: Laboratorio de Materiales I.

PL: Laboratorio de Materiales I.

TEM: Talos F200X G2 (S)TEM Facility Electron Microscopy Research (FEMR), McGill University.

El procedimiento experimental se realizó conforme los siguientes procedimientos:

1. Síntesis de GO

Se partió de grafito como precursor para la síntesis del GO, se pesaron 0.5 g de grafito y la misma cantidad de NaNO_3 para ser disueltos en 25 mL de H_2SO_4 (0.1 N), posterior a esto se llevó a un baño de hielos a 5 °C para evitar algún accidente debido a la reacción violenta que sucede al agregar poco a poco 3 g de KMnO_4 , una vez se agregó todo el material, se cambia a un baño de agua a 40 °C por 30 min. Se añaden 50 mL de agua destilada cuidadosamente y se eleva la temperatura a 90 °C por 15 min. Posterior a esto, se agregan 150 mL de agua destilada y con agitación lenta se agregan 10 mL de H_2O_2 , se deja agitando 30 minutos y se retira para dejarlo reposar por 24 h.

En este punto, el grafito se oxidó para tener óxido de grafito, sin embargo, se tiene que agregar 90 mL de HCl (4%) para eliminar iones remanentes y se centrifuga y loava con agua destilada hasta llegar a pH 6, el material se deja secar a 80°C por 24 h.

Se pesan 0.25 g de óxido de grafito y se añaden 250 mL de agua destilada para su exfoliación en baño ultrasónico por 1 h, el material se seca a 80 °C por 24 h y finalmente se obtiene el GO.

2. Síntesis de GQD de GO

Se pesaron 50 mg de GO y se agregaron a un reactor de Teflón, se agregaron 2 mL de NH_4OH y 6 mL de agua destilada, el reactor de Teflón se selló en un reactor autoclave para síntesis hidrotermal y se llevó a calentar a 180 °C por 6 h y el material se dejó enfriar 12 horas.

Una vez el material se retiró del reactor autoclave el material se filtró y se conservó el sobrenadante, dentro de este líquido se encuentran los GQDs, para eliminar el exceso de amoníaco, el líquido se calentó a 60 °C por 30 min.

El material se diluyó hasta 20 mL para su caracterización por PL.

3. Síntesis de ZnO

Se utilizó ZnAc como precursor para obtener ZnO, para ello se agregaron 50 mL de ZnAc (1M) en un vaso de precipitado con agitación moderada, se adicionaron gota a gota NaOH hasta llegar a pH 12. Se lavó el precipitado con agua destilada y se centrifugó hasta llegar a pH 7.

4. Formación de nanocomposito GQD/ZnO

Se tomaron 2 mL de GQDs y se agregaron 200 μL de ZnO (68 μM) y se dejó sonicar por 25 min hasta obtener una solución homogénea.

5. Modificación con Apt

A 2 mL de GQD/ZnO se le agregaron 120 μL de Apt (1 μM), se agitó moderadamente y el material se dejó reposar por 10 min en ausencia de luz.

6. Detección de *S. typhi*.

1 mL de GQD/ZnO/Apt se mezcló con 1 mL de LPS de acuerdo con la tabla 1. La solución agitó moderadamente y se dejó incubar por 10 min en ausencia de luz, posterior a esto, la solución se analizó por PL a una λ_{ex} de 330 nm.

Tabla 1. Diferentes concentraciones de *S. typhi*.

Muestra	Concentración
1	0 nM
2	12 nM
3	50 nM
4	100 nM
5	150 nM
6	200 nM

La disposición de los residuos generados se realizó de acuerdo a la tabla 2.

Tabla 2. Disposición de los residuos generados en cada metodología

Metodología	Contenedor
Síntesis de GO	H
Síntesis de QD de GO	A
Síntesis de ZnO convencional	A
Modificación con Apt	A
Detección de <i>S. typhi</i> .	A

Capítulo 4: Discusión de Resultados

1. Síntesis de ZnO

Como se mencionó en el procedimiento, para la síntesis de ZnO se utilizó un método de precipitación partiendo de una sal ($\text{ZnAc} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) agregando NaOH para favorecer el intercambio de iones acetato de la sal de zinc a iones hidróxido al incrementar el pH del medio, favoreciendo la precipitación de este compuesto $\text{Zn}(\text{OH})_2$, después de realizar lavados y un secado el material procedió a caracterizarse de acuerdo con lo propuesto por las técnicas de FTIR, UV-Vis, PL, XRD y TEM.

El material fue analizado en sólido una vez se encontraba seco y los resultados obtenidos muestran distintas señales (Fig 6), una de ellas se encuentra a 3394 cm^{-1} , esta banda presenta las características de la vibración del enlace O-H, dando indicio que podría ser debido a que se cuenta con $\text{Zn}(\text{OH})_2$ dentro de la muestra o que podría ser agua atrapada dentro de la estructura de ZnO^{97} , también se puede observar la banda a 804 cm^{-1} con las características del enlace Zn-O, indicando que el material sintetizado podría ser ZnO u $\text{Zn}(\text{OH})_2$ debido a la presencia de este enlace en ambos compuestos.

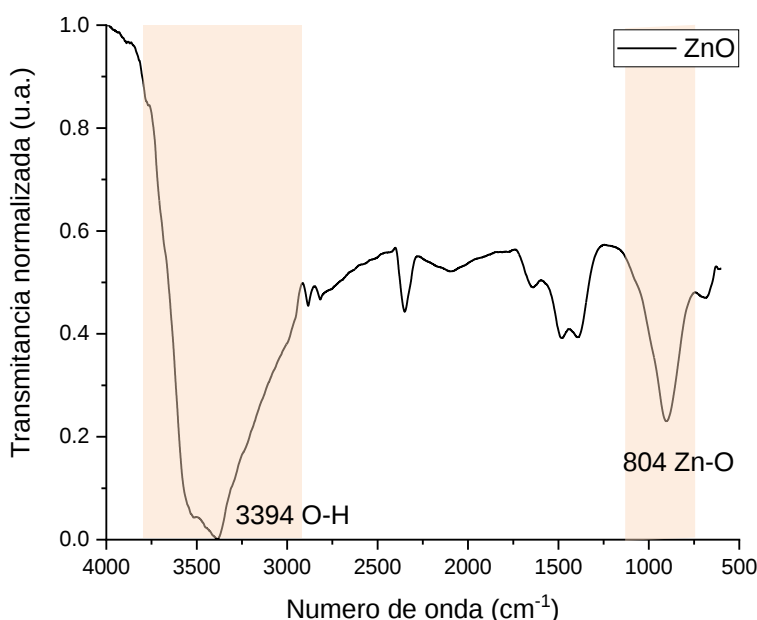


Fig 6. Espectro de Infrarrojo de ZnO.

Mediante la técnica UV-Vis se puede obtener información sobre la banda de absorción característica del material (Fig 7), en el caso del ZnO, se espera obtener una banda entre 360 a 380 nm, mientras que, bandas debajo de 350 nm son características para Zn(OH)_2 ⁹⁸. La absorción que el material presenta es una banda con una disminución pronunciada a 357 nm, esto puede indicar que hay presencia de ambos materiales, ya que la banda se encuentra en un intermedio, sin embargo, no está la certeza si alguno de estos dos materiales predomina o no solamente con estas técnicas.

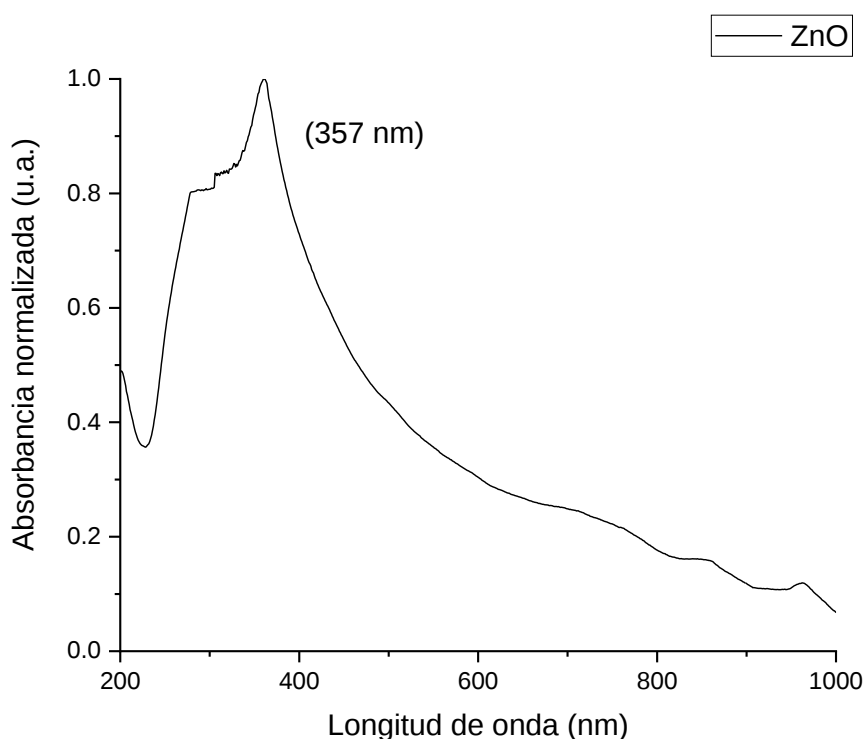


Fig 7. Espectro de absorción de ZnO.

Caracterizando por la técnica XRD se puede tener una mejor idea del material, debido a que, se puede conocer la estructura cristalina del material, es por esta razón que puede ser útil para conocer si se sintetizó ZnO o Zn(OH)_2 o si la presencia del hidróxido es menor a lo que las técnicas de caracterización previas pueden indicar.

Como se puede observar en el difractograma (Fig 8), la muestra de ZnO presenta las reflexiones en la posición (2θ) con respecto con el patrón COD 9004180 indicando que tiene

la fase cristalina zincita con respecto a los planos (Tabla 3), se puede observar una diferencia en la intensidad del material puro con el material sintetizado, indicando que no todo el ZnO se encuentra con el arreglo específico, esto puede deberse a la presencia del hidróxido que se pudo observar en las anteriores caracterizaciones⁹⁹, sin embargo, la cantidad de este material no es suficiente para presentar reflexiones visibles en el material, sugiriendo que el material es en un mayor medida ZnO.

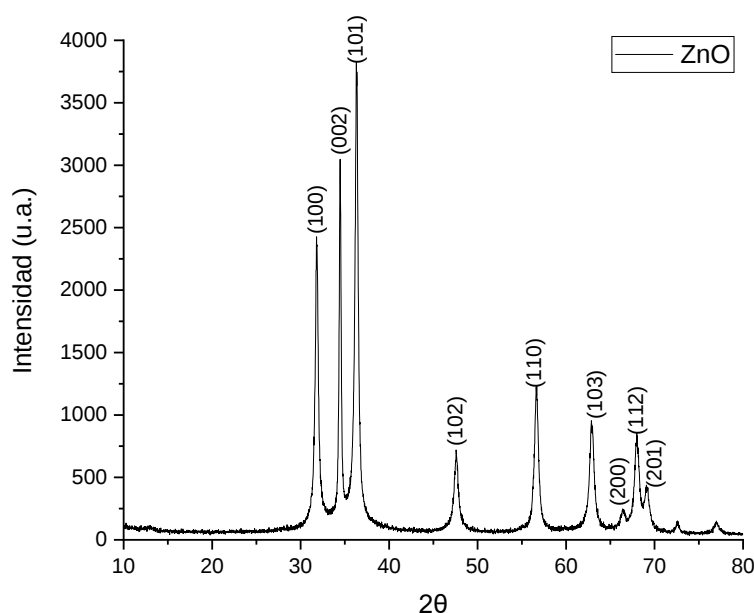


Fig 8. Difractograma de ZnO.

Tabla 3. Información obtenida de los picos de difracción del difractograma de ZnO.

Angulo	Distancia interplanar	Intensidad	Intensidad Relativa	h,k,l
31.773	2.81406	2073	63.10%	1,0,0
34.441	2.6019	2631	80.20%	0,0,2
36.262	2.47531	3283	100.00%	1,0,1
47.558	1.91043	581	17.70%	1,0,2
56.604	1.6247	1077	32.80%	1,1,0
62.888	1.47661	809	24.60%	1,0,3

66.387	1.40703	105	3.20%	2,0,0
67.968	1.3781	678	20.70%	1,1,2
69.1	1.35826	280	8.50%	2,0,1
72.613	1.30095	54.7	1.70%	0,0,4
76.981	1.23766	82.4	2.50%	2,0,2

Utilizando la técnica PL para caracterizar el comportamiento que presenta el material, se esperaba observar una banda de excitación entre 380 a 390 nm, además de esto, el obtener un comportamiento como ese es un indicio de la poca presencia del hidróxido de zinc debido a que la fluorescencia de este se encuentra en longitudes de onda más largas¹⁰⁰, en la siguiente figura 9 se muestra el espectro de emisión y excitación del ZnO, aquí se puede observar que el material presenta una saturación en su análisis, al no observarse de manera definida el pico de la banda de excitación, sin embargo, se encuentra entre los 380 a 390 nm, al realizar el análisis de emisión a 385 nm se puede observar que presenta saturación en su análisis y que la fluorescencia se encuentra en longitudes de onda en la región visible.

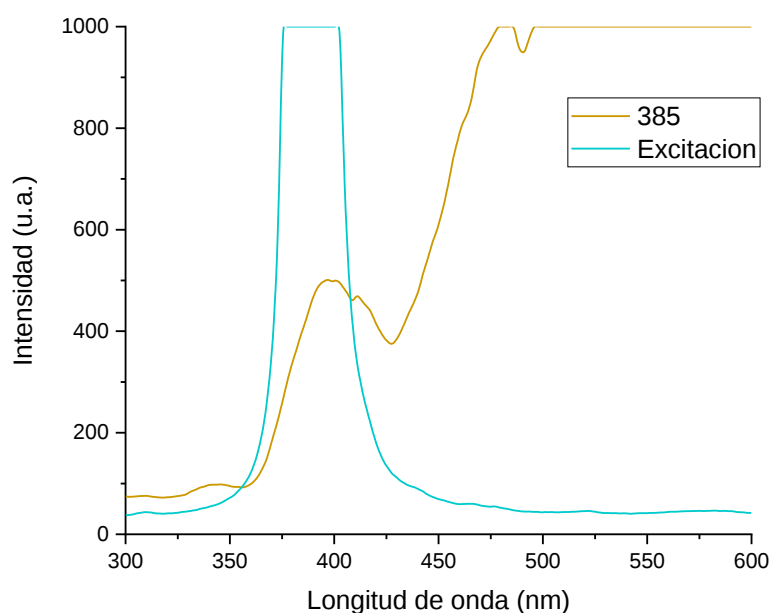


Fig 9. Espectro de emisión y excitación de ZnO.

El material fue analizado por la técnica TEM y algunos complementarios para conocer su morfología y algunas características que pudiera tener para comprender de mejor modo como pudiera ser la interacción entre el ZnO y GQD. Las imágenes de TEM muestran que la morfología del ZnO sintetizado es irregular, no tiene formas homogéneas, son distintas entre sí, esto puede deberse a que no se realizó un tratamiento térmico posterior a la síntesis del material, dicho tratamiento es habitual en otras investigaciones para obtener distintos tamaños y formas en las partículas de ZnO^{101,102}.

En la imagen C y D de la fig 10 se puede observar de mejor modo que las partículas de ZnO tienen una superposición visible como un mayor contraste en ciertas zonas centrales de las partículas, indicando que estas partículas pudieran ser aglomerados de partículas más pequeñas de ZnO, además, esto puede dar una idea sobre ciertos defectos que tienen las partículas¹⁰³, hecho que puede verse de mejor modo al realizar HRTEM en las siguientes imágenes (Fig 11).

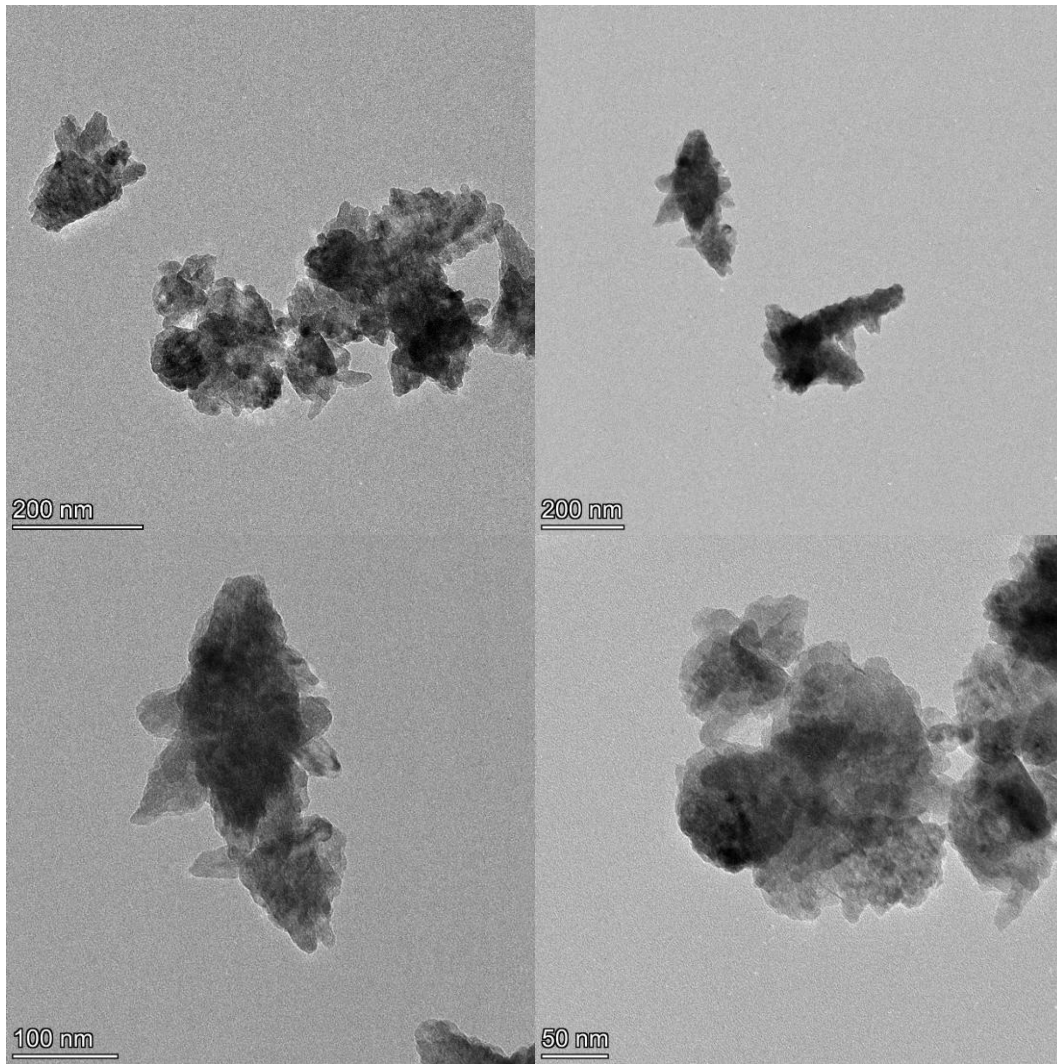


Fig 10. Imágenes TEM de ZnO a distintas magnificaciones.

En estas imágenes puede verse que hay zonas con menor contraste que otras, indicando que hay ciertos defectos, al analizar la red cristalina que presenta mediante imágenes FFT, podemos obtener la distancia interplanar del ZnO y conocer que fase es la presente, ya que, dichos defectos podrían deberse a diferentes fases cristalinas o a vacancias de oxígeno¹⁰⁴ o incluso a cavidades o huecos formados en la formación del material.

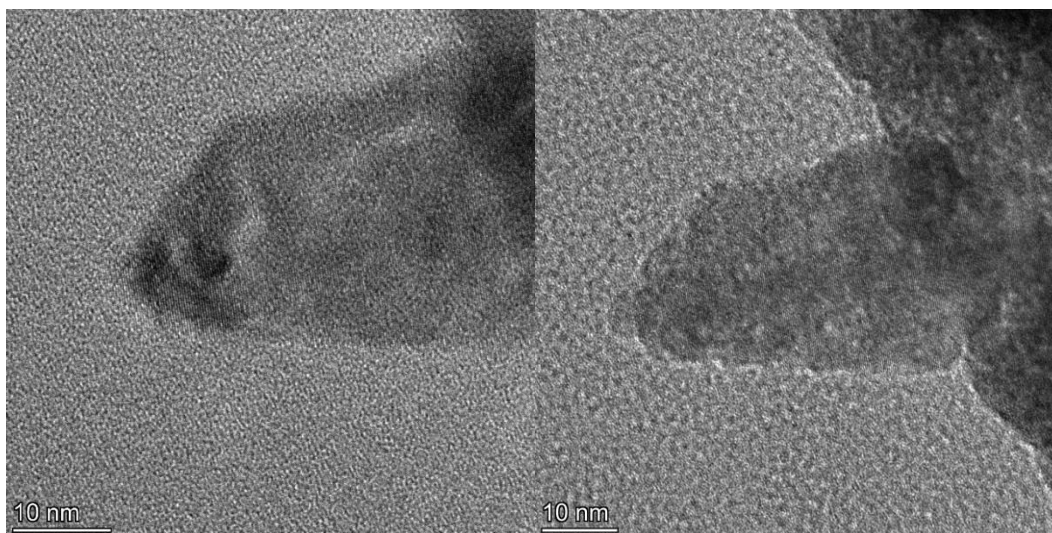


Fig 11. Imágenes HRTEM de ZnO a distintas magnificaciones

Se pueden observar dos pares de señales a partir de la imagen FFT (Fig 12) de una de las imágenes HRTEM y la distancia interplanar obtenida es de 0.2479 nm, siendo este valor muy cercano a la distancia interplanar del plano (101) que se obtuvo de XRD indicando que ambas zonas analizadas pertenecen al mismo plano cristalino, por ende, a la misma fase cristalina, descartando que hay varias fases cristalinas¹⁰⁵.

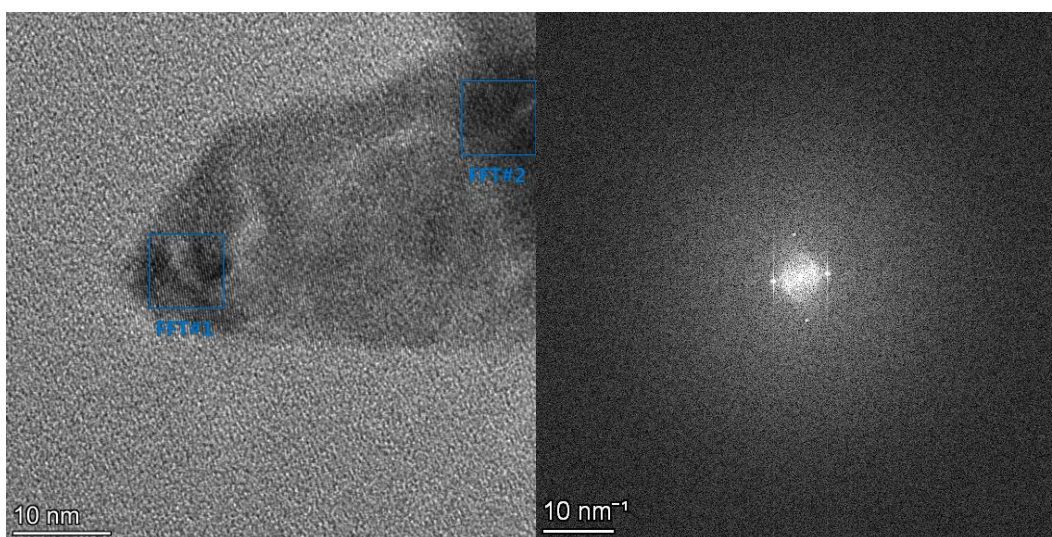


Fig 12. Imagen FFT de ZnO obtenida a partir de la imagen HRTEM.

Continuando el análisis con técnicas del equipo de TEM, se obtuvieron las siguientes imágenes de STEM (Fig 13) y STEM/EDX (Fig 14) de la muestra de ZnO, donde

inicialmente se puede observar la presencia de huecos o cavidades dentro de las partículas de zinc, estos huecos tienen un tamaño menor a 10 nm aproximadamente, siendo esto información muy útil ya que, esto podría ser una de las maneras en las cuales los GQD podrían formar un nanocomposito con el ZnO^{106} .

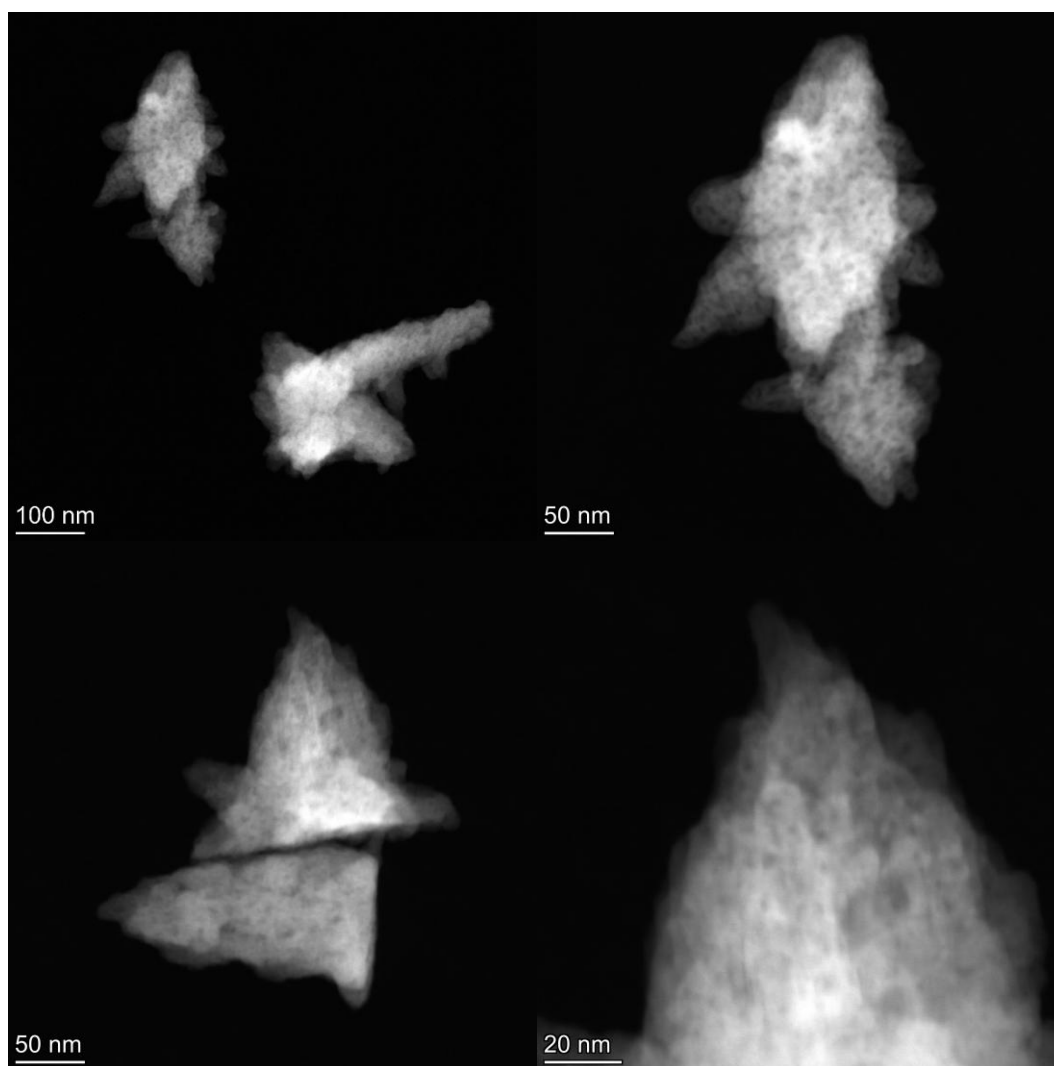


Fig 13. Imágenes STEM de ZnO a distintas magnificaciones

A partir de esta técnica se pudo realizar un análisis elemental para corroborar que los elementos presentes en el material son Zn y O y no alguno otro como carbono debido al precursor o alguna impureza indeseada, para ello se realizó la técnica STEM/EDX, donde se observa la presencia de estos dos elementos tanto en el mapeo como en el espectro de energía.

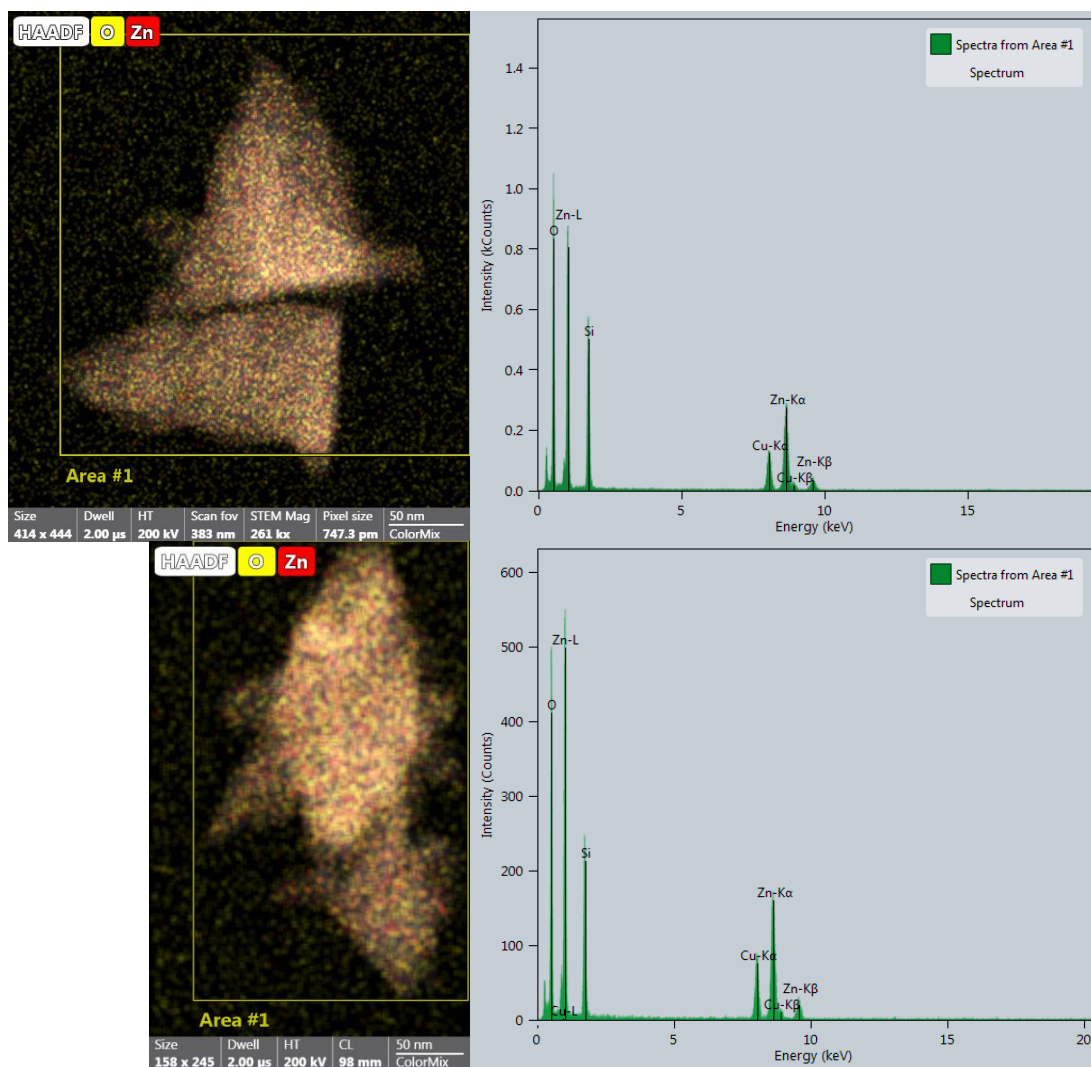


Fig 14. Imágenes STEM/EDX junto con su espectro de energía.

2. Síntesis GO y GQD

Para la síntesis del GO se necesita asegurar su correcta oxidación y la exfoliación adecuada para que el material sea el ideal para obtener los GQD, es por esta razón que, se requiere caracterizar por técnicas como UV-Vis, FTIR y XRD para tener la certeza de la síntesis del material.

Iniciando las caracterizaciones del GO, se realizó la espectroscopía UV-Vis para encontrar las bandas de absorción del material, esperando tener dos bandas procedentes de los enlaces C=O y C=C ya que, hay que recordar que el óxido de grafeno es una estructura de carbonos

con hibridación sp^2 y que puede presentar grupos funcionales como carbonilos, cetonas o incluso lactonas¹⁰⁷. Como se esperaba, en la fig 15, se observa una banda a 258 nm que se atribuye a la transición $\pi-\pi^*$ del enlace $C=C$, mientras que, la banda a 320 nm se atribuye a la transición $n-\pi^*$ de enlaces $C=O$ que podrían ser debido a los grupos funcionales mencionados.

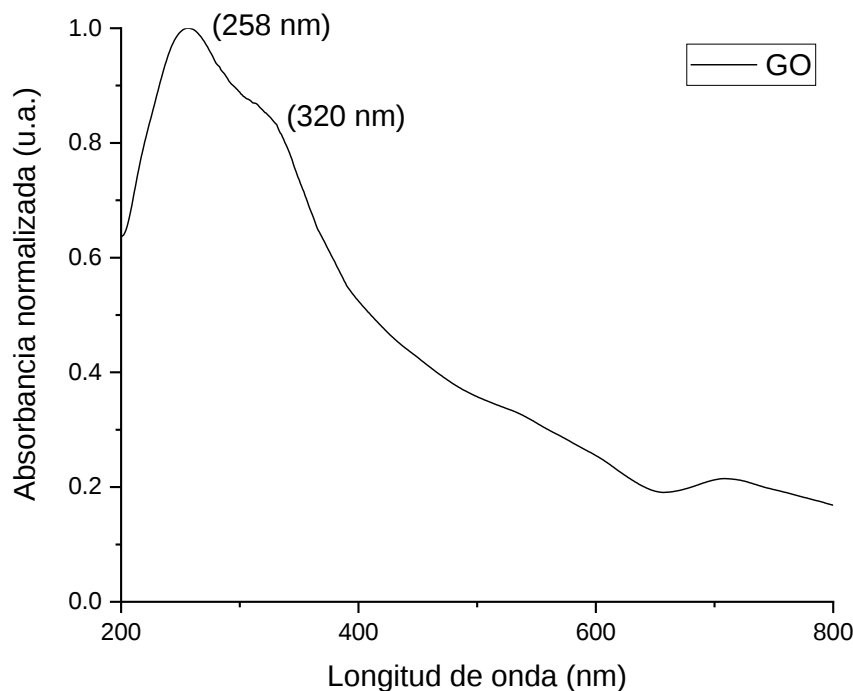


Fig 15. Espectro de absorción UV-Vis de GO

Para conocer los grupos funcionales presentes en la estructura del GO se realizó la técnica de caracterización de FTIR, obteniendo información sobre las distintas bandas de vibración (Fig 16) que se pueden atribuir a los enlaces O-H a 3226 cm^{-1} , a 1721 cm^{-1} se encuentra la vibración del enlace $C=O$, mientras que, a 1586 cm^{-1} y 1166 cm^{-1} se encuentran los enlaces $C=C$ y $C-O$, respectivamente, por último, se encuentra la vibración del enlace $C-O-C$ a 1034 cm^{-1} . De acuerdo con la literatura¹⁰⁸, este tipo de grupos funcionales es habitual en el GO, por lo que, son grupos funcionales esperados al realizar la síntesis del GO.

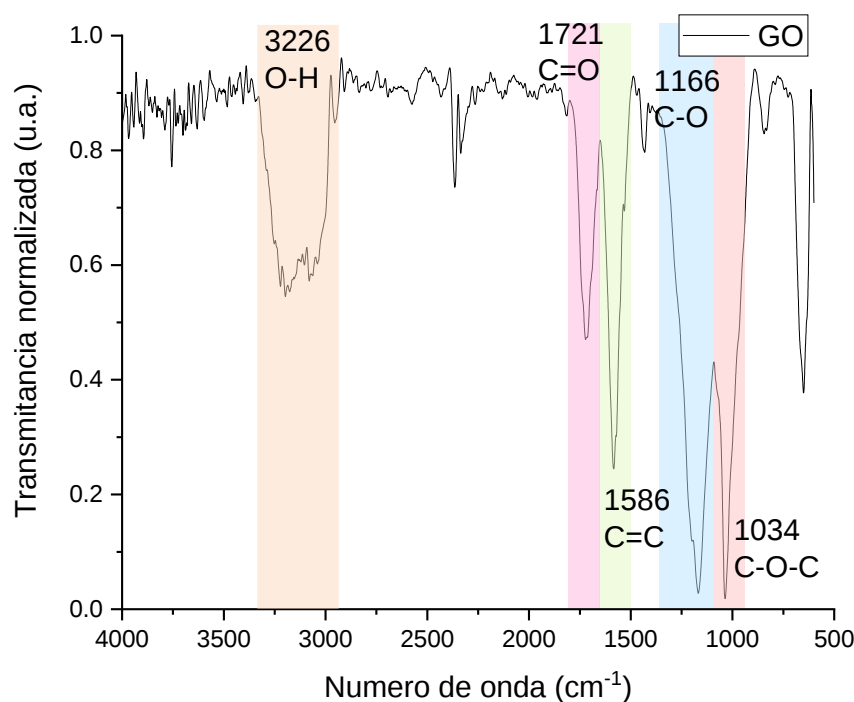


Fig 16. Espectro de infrarrojo de GO

Con las técnicas previas se puede decir que el GO tiene una correcta oxidación ya que está la presencia de distintos enlaces entre carbono y oxígeno, sin embargo, no es suficiente para discernir entre óxido de grafeno y óxido de grafito, se requiere caracterizar por la técnica XRD para observar si el ordenamiento que presenta es de grafito o de grafeno (Fig 17), durante el análisis de este material por dicha técnica se pudieron obtener dos picos de difracción a 12° y 42.5° , siendo los planos (001) y (002), respectivamente, estas dos reflexiones se presentan solamente en estructuras de grafeno¹⁰⁹, siendo un indicativo de su obtención, sin embargo, algo que tiene que observarse es la desaparición de un pico a 26° característico del plano (002) del grafito, algo que se puede apreciar ya que no se encuentra dicho pico de difracción en el difractograma obtenido para el GO.

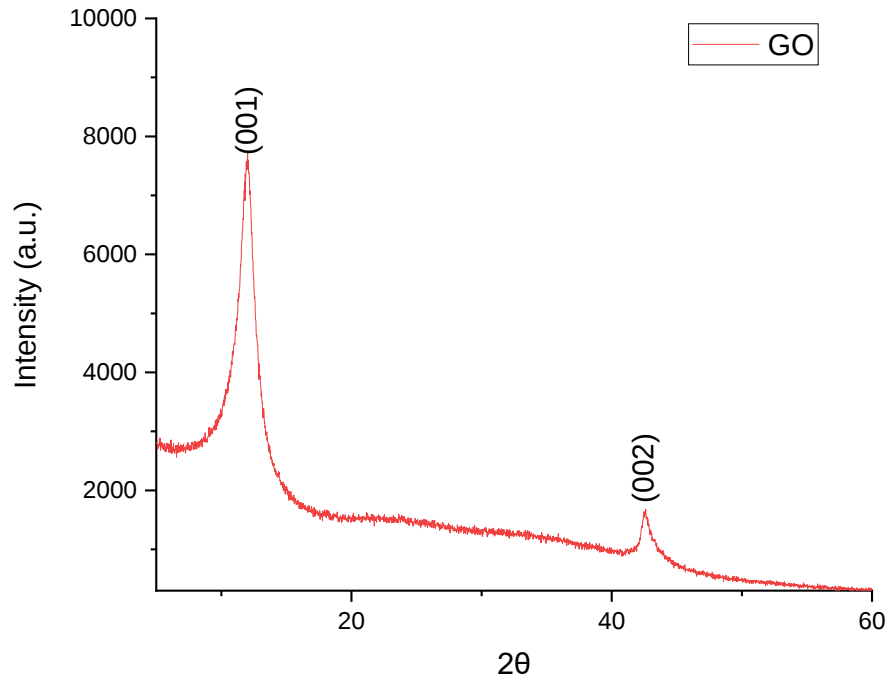


Fig 17. Difractograma de GO

Por último, el material fue caracterizado por PL para conocer la fluorescencia que este material presenta, dicha técnica será la utilizada para realizar la detección del LPS, es por esto que se requiere conocer si la fluorescencia que este material presenta es ideal para utilizarse en la detección de otras especies o si por el contrario, no tiene una fluorescencia adecuada para realizar estos análisis y es necesaria la obtención de los GQD¹¹⁰.

En el espectro de emisión que se muestra a continuación (Fig 18), se pueden ver intensidades muy bajas, esto podría deberse a que la solución se encuentra a bajas concentraciones o no presenta una fluorescencia adecuada para utilizarse en la detección del material, sin embargo, se utilizaron distintas concentraciones así como se analizó el material sólido y en ambas situaciones el comportamiento es el mismo, es por esta razón que el material no presenta las condiciones adecuadas para su uso como sensor.

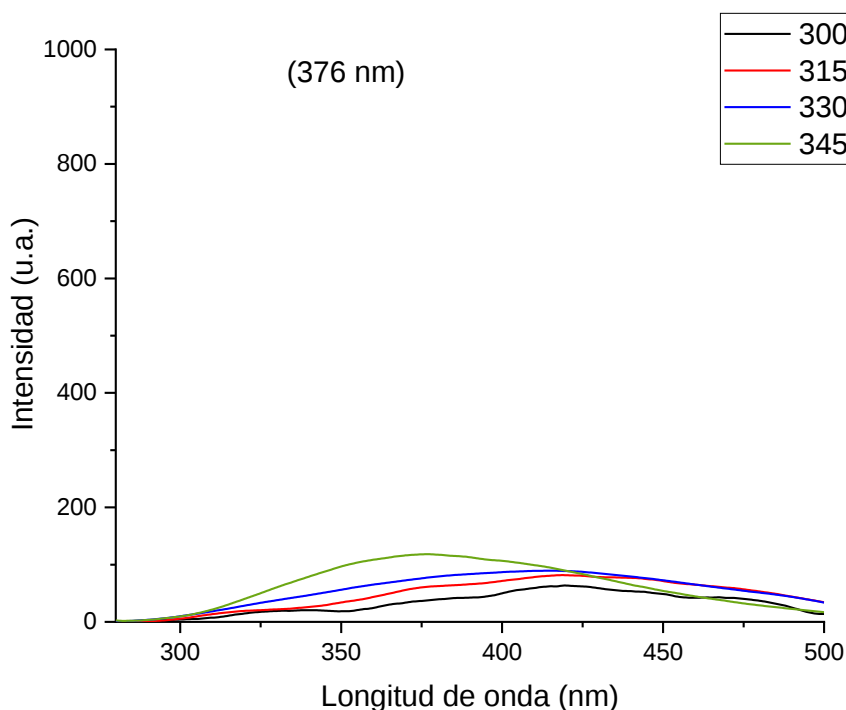


Fig 18. Espectro de emisión de GO a distintas longitudes de onda de excitación.

Con los resultados obtenidos por PL puede observarse que el GO no es un material candidato para la detección de otras sustancias, es por esta razón que se planteó la síntesis de GQD, dicho material presenta un fenómeno conocido como confinamiento cuántico, el cual le confiere de propiedades únicas con respecto al material macroscópico¹¹¹, hay que recordar que los GQD sigue siendo un material de grafeno, con dimensiones mucho menores a lo habitual y por esta razón presenta este efecto cuántico. Para corroborar dicho planteamiento se caracterizó por las técnicas de UV-Vis, PL y TEM.

La primera técnica realizada fue UV-Vis, la razón es para observar si se puede apreciar la presencia de las transiciones de los enlaces C=O además del C=C que es de esperarse que esté presente, el motivo es debido a que al tener distintos grupos funcionales con oxígeno puede generar interacciones electrostáticas entre los GQD y ZnO¹¹², aunado a esto, se ha reportado que los grupos OH pueden favorecer la interacción entre los GQD y los aptámeros a utilizar para la detección del LPS de *salmonella*.

En el espectro de absorción (Fig 19) de dicha técnica se logra apreciar una banda a 229 nm que se atribuye a la transición π - π^* del enlace C=C, comportamiento que se esperaba tener, sin embargo, la banda a 320 nm que se obtuvo en el espectro de GO presenta una gran disminución, se muestra como una muy pequeña señal, esto puede deberse a que la solución que se analizó no tiene la concentración adecuada para dicho análisis¹¹³, sin embargo, esto contradice los resultados obtenidos por PL ya que, presenta una gran fluorescencia que se discutirá a continuación.

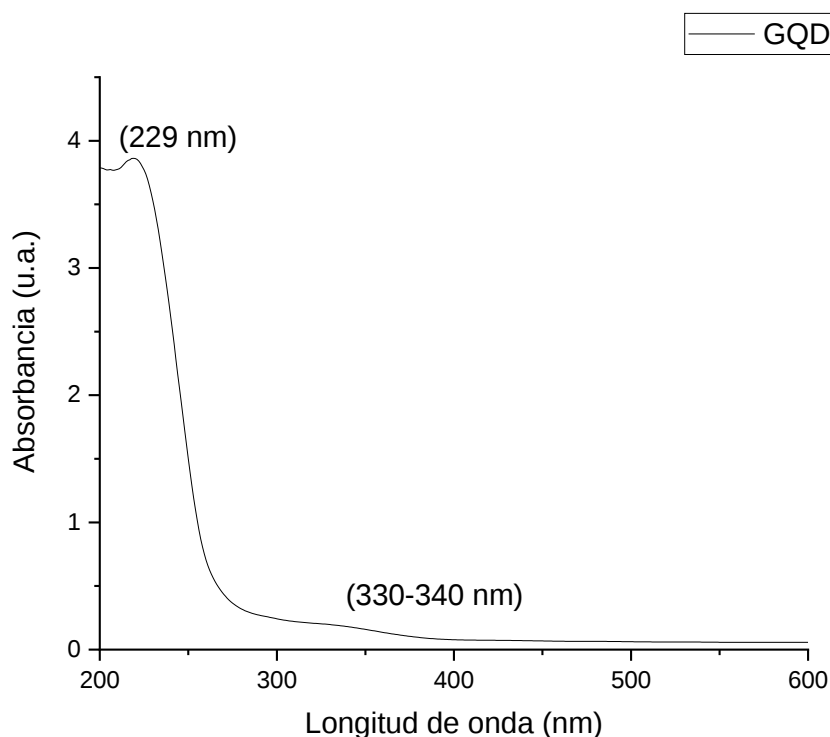


Fig 19. Espectro de absorción UV-Vis de GQD.

Como se mencionó anteriormente, a través de PL se observó una clara saturación en la señal de fluorescencia obtenida, es por esta razón que se tuvo que diluir la solución para obtener señales observables mediante el uso del equipo de PL, sin embargo, este comportamiento hizo que las otras técnicas de caracterización tuvieran ciertos inconvenientes como el mencionado anteriormente en UV-Vis. Continuando con la caracterización por PL (Fig 20), se obtuvo un espectro de excitación donde se encontró la longitud de onda de máxima excitación, a 318 nm, sin embargo, al realizar distintos espectros de emisión (Fig 21), se

encontró que a 330 nm se obtiene una mayor respuesta¹¹⁴, esto podría deberse a que, en el espectro de emisión, a esa longitud de onda también hay una señal intensa. Algo importante a mencionar sobre los resultados obtenidos en el espectro de emisión a diferentes longitudes de onda es respecto a que la onda de fluorescencia se encuentra a niveles cercanos al visible, cercano al color azul, y esto podría ser visible al utilizar una lámpara UV para observar ese color azul en la solución¹¹⁵.

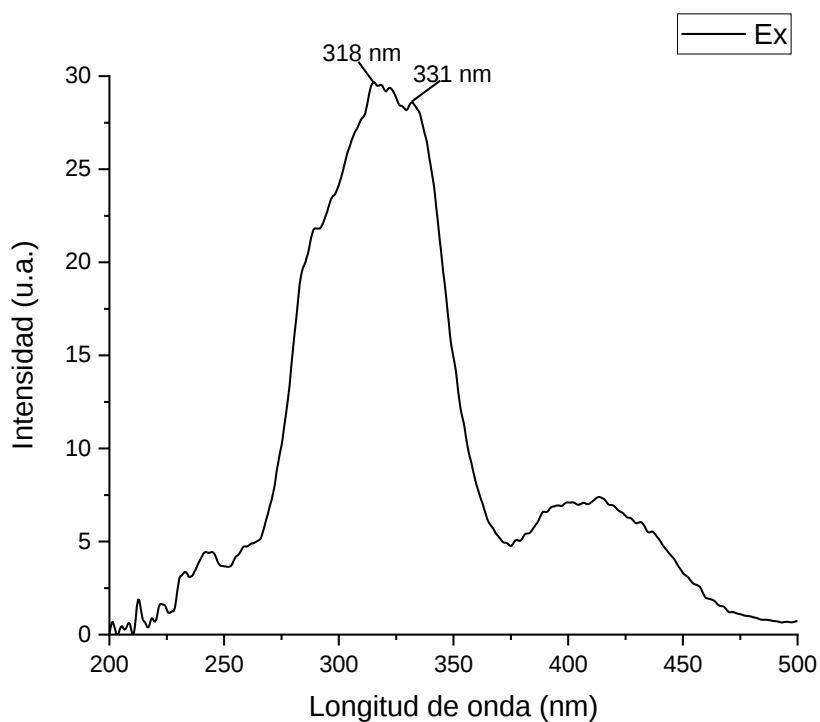


Fig 20. Espectro de excitación de GQD

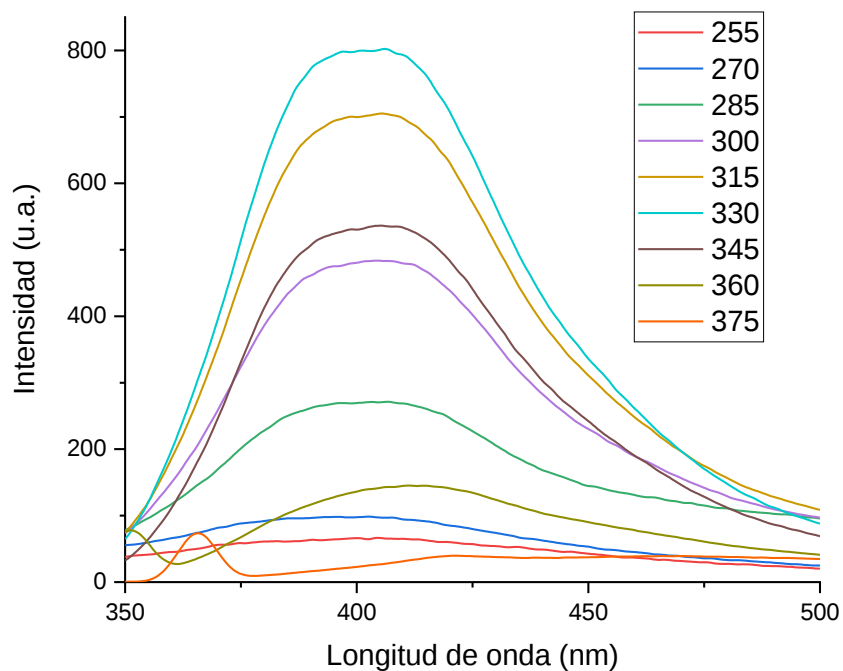


Fig 21. Espectro de emisión de GQD a diferentes longitudes de onda de excitación.

Sobre la caracterización morfológica se lograron obtener las siguientes imágenes de HRTEM (Fig 22) para los GQD las cuales son útiles ya que puede observarse el diámetro de los puntos cuánticos y tener una idea de las capas de grafeno que conforman debido al contraste que presentan en TEM-BF¹¹⁶.

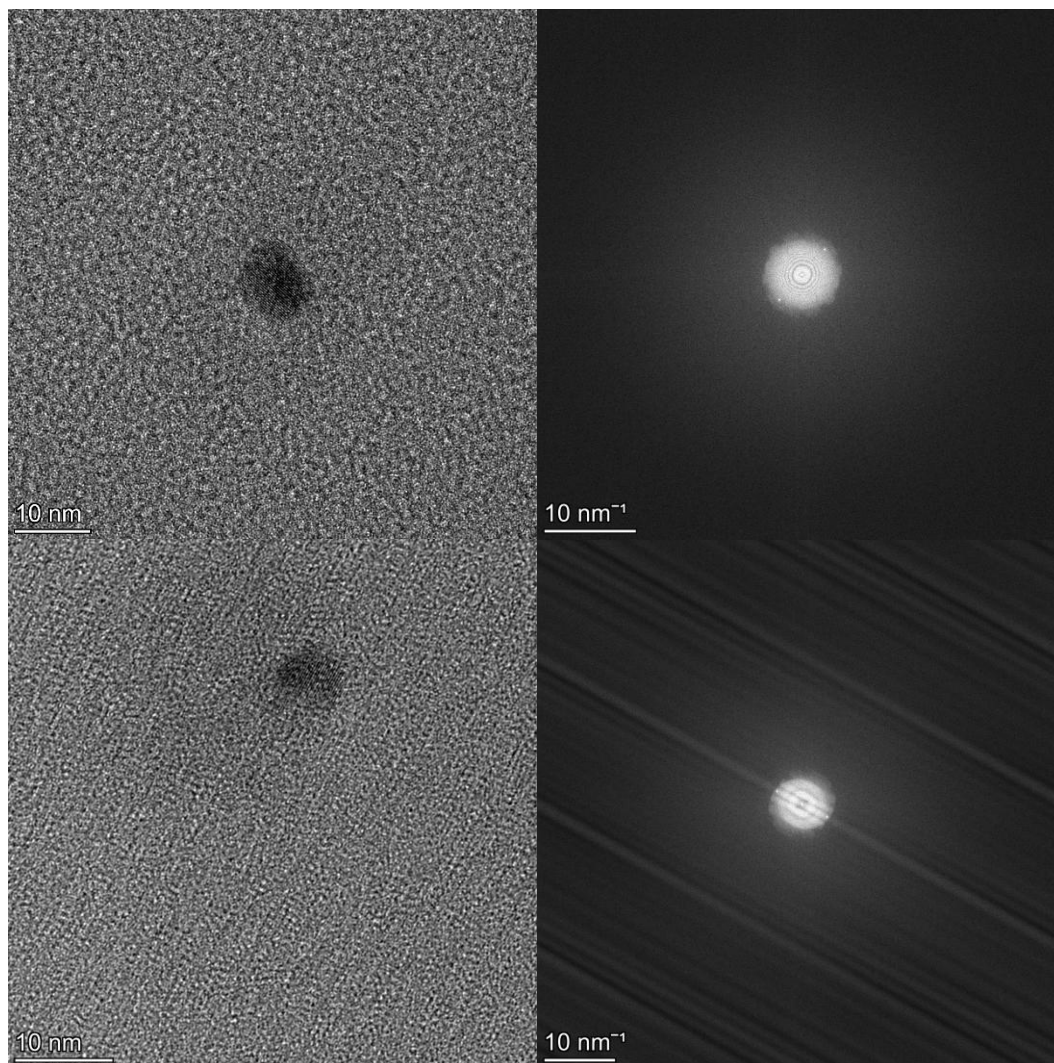


Fig 22. Imágenes HRTEM y FTT para GQD.

Como se puede observar en las imágenes de TEM, los GQD presentan cristalinidad al ser visible una red cristalina, al transformar esta información se obtiene la imagen de FFT, la cual es útil para obtener el valor de distancia interplanar, siendo un aproximado de 0.241 nm, esto concuerda con el plano (001) del grafeno¹¹⁷, indicando que este material continua teniendo un ordenamiento muy similar al material macroscópico, sin embargo, algo importante a considerar es lo siguiente, estas partículas analizadas tienen un tamaño de 10 y 12 nm respectivamente, al analizar partículas de menor tamaño como la que se muestra a continuación (Fig 23), puede observarse que las partículas no presentan una cristalinidad aparente, esto puede deberse a algunas razones, los GQD pocas o una sola capa de grafeno,

por lo cual, la cristalinidad es muy difícil de observar, o que estas partículas de menor tamaño presentan ciertos defectos que lo vuelven un material con un ordenamiento menor u amorfo.

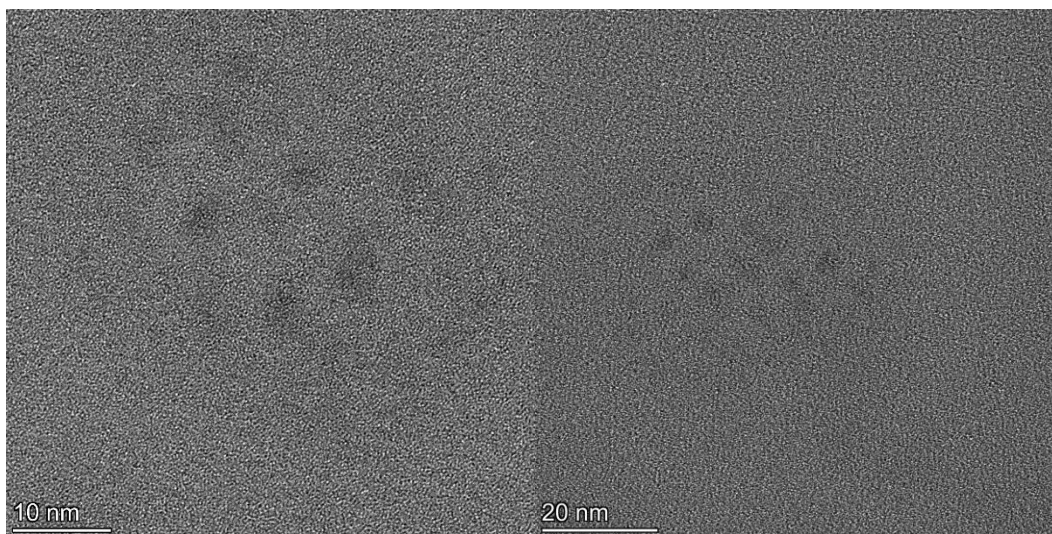


Fig 23. Imagen HRTEM de GQD a diferentes magnificaciones.

En las imágenes de TEM pueden verse partículas de menor tamaño, aproximadamente 4 a 6 nm, lamentablemente, lo que se observa es que dichas partículas no presentan una cristalinidad aparente al tener un menor tamaño, por ende, podrían tener una menor cantidad de capas de grafeno y sea este el motivo por el cual presenta un menor contraste.

Caracterización GQD/ZnO

La obtención de imágenes de TEM o HRTEM del nanocomposito de ZnO/GQD no fue posible y se atribuye a la diferencia entre el contraste del zinc como elemento metálico con el carbono del grafeno, a pesar de tener cristalinidad tal vez el tamaño de los GQD no permite observarlo en las partículas de ZnO.

Por otro lado, el material se caracterizó por PL (Fig 24), obteniendo los siguientes espectros de emisión para distintas relaciones de GQD/ZnO. Algo evidente en los resultados es lo siguiente, el ZnO tiene un efecto que hace disminuir la intensidad de fluorescencia de los GQD, sin embargo, no se sabe con certeza el motivo por el cual sucede esto, lo que si puede interpretarse es que a menor concentración de ZnO que se agrega para formar el nanocomposito, hay una menor disminución de la fluorescencia.

Una de las razones podría ser debido a la diferencia de tamaños entre el ZnO y los GQD, otra razón podría llegar a ser la superposición de los espectros de emisión y absorción entre los materiales.

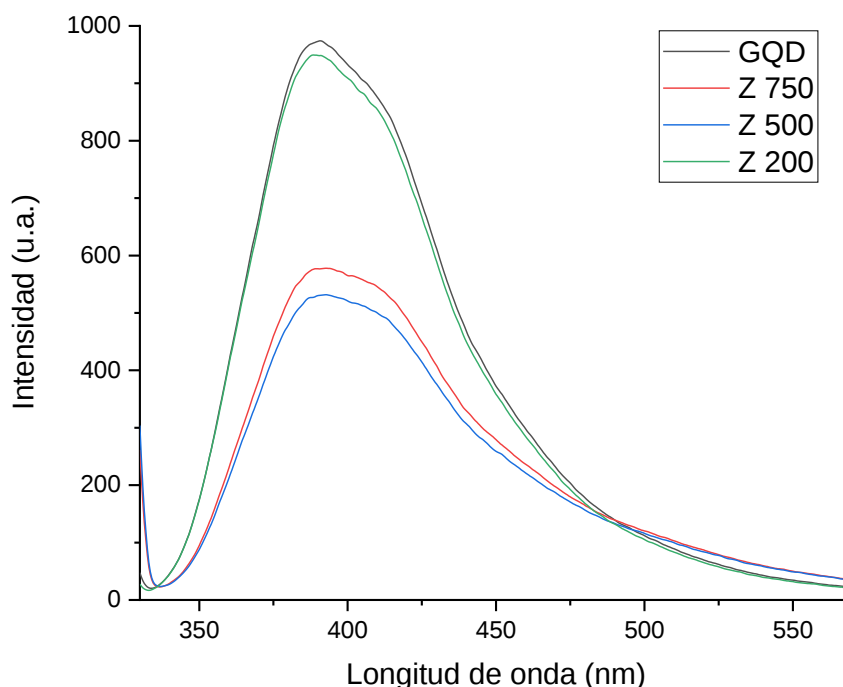


Fig 24. Espectro de emisión para GQD y GQD/ZnO a diferentes concentraciones a una λ_{ex} de 330 nm.

Con esta información obtenida, se decidió utilizar la concentración de 200 μ L (68 μ M) de ZnO para continuar con la investigación del comportamiento con el aptámero y posteriormente la detección del LPS de *S. typhi*.

Algo que se esperaba al agregar el aptámero al GQD/ZnO era no observar una variación o una ligera disminución en la fluorescencia debido al enlace entre los GQD y el aptámero, en la siguiente (Fig 25). Se puede observar el espectro de emisión donde, como se esperaba, si hay una ligera disminución en la intensidad, esto se atribuye a que se pierden un poco de átomos que se mantengan libres para realizar los procesos de recombinación o que hay una transferencia de electrones entre los GQD y el Apt, esto debido a que no se tiene la certeza del tipo de enlaces que están formando estos dos materiales.

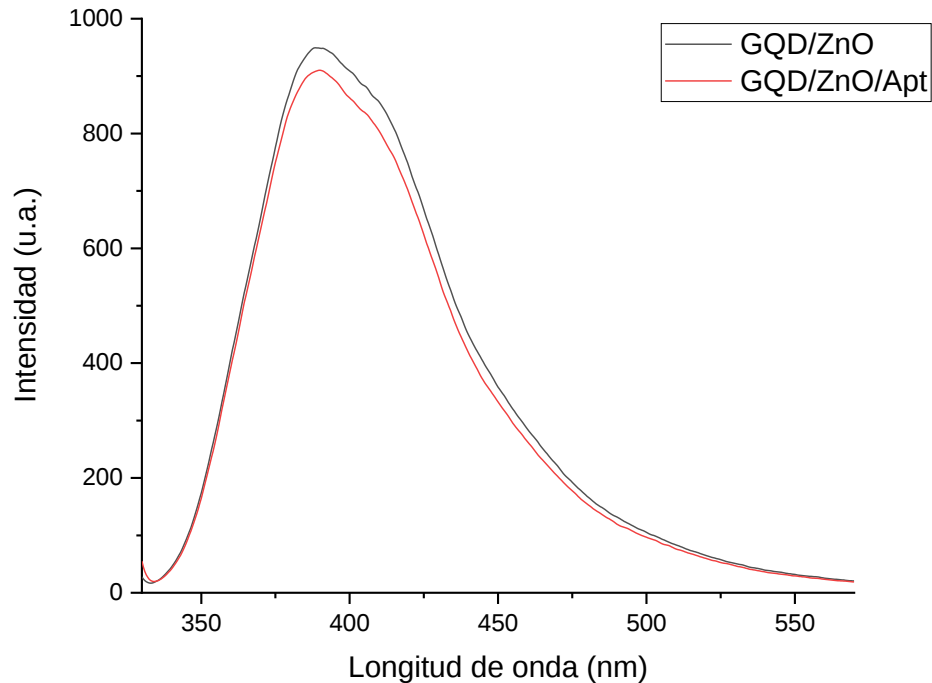


Fig 25. Espectro de emisión de GQD/ZnO y GQD/ZnO/Apt a una λ_{ex} de 330 nm.

Detección de LPS de *S. typhi* utilizando GQD/ZnO/Apt

Por último, para la detección del LPS de *S. typhi* se esperaba que el LPS al interactuar con el Apt, lograra de cierto modo alejar los GQD del ZnO, haciendo que el efecto de disminución de su fluorescencia no fuera aparente, sin embargo, los resultados obtenidos que se muestran a continuación (Fig 26). Muestran algo distinto, esto podría deberse a que las interacciones entre el ZnO y GQD son mas fuertes de lo que se esperaba y el LPS se ancla en todo el sistema que está alrededor de los GQD y por esto pudiera ser la disminución de la fluorescencia, o que hay algún tipo de transferencia de electrones con el LPS y los GQD que, de nuevo, disminuya la intensidad.

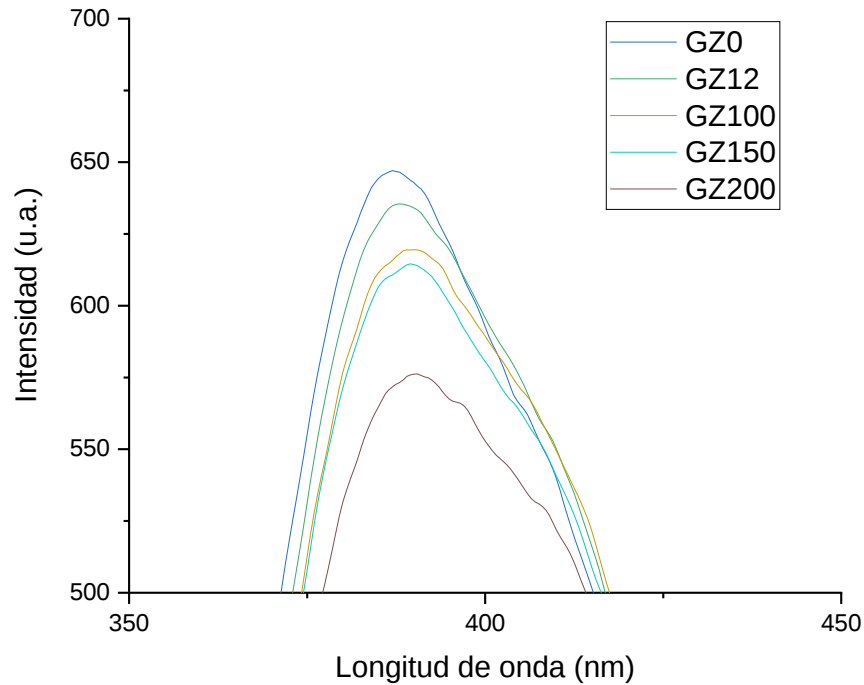


Fig 26. Espectro de emisión de GQD/ZnO/Apt/LPS a una λ_{ex} de 330 nm.

Afortunadamente, la disminución de la fluorescencia se comporta de manera lineal con respecto al incremento en la concentración del LPS, hecho que hace posible obtener una curva de calibración y obtener un LOD (Fig 27).

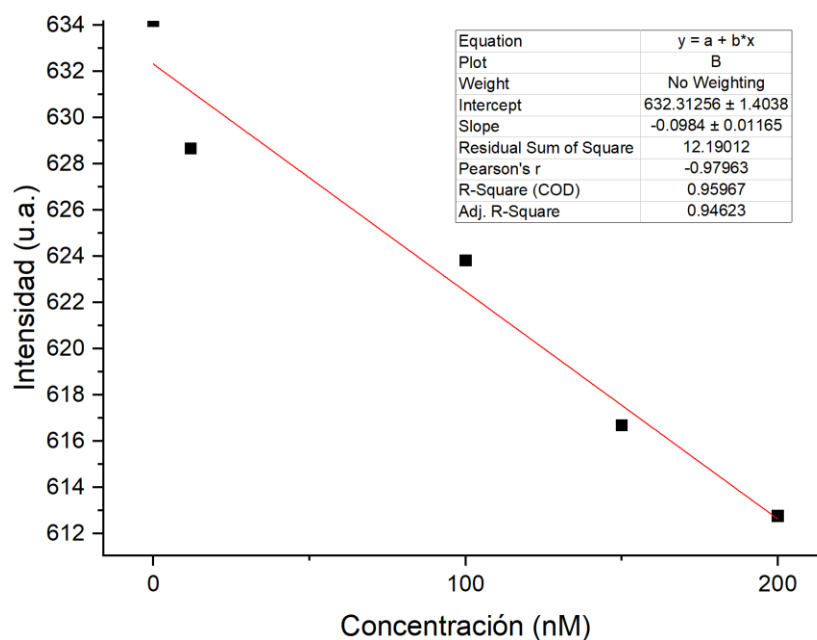


Fig 27. Gráfica de Linealidad para LPS de *S. typhi*.

Se tomaron los valores de intensidad de fluorescencia y de concentración de LPS para realizar un método de regresión lineal y obtener una recta la cual se puede utilizar para obtener el LOD de 0.355 nM de acuerdo con la ecuación $LOD = \frac{3 \times \sigma_{pendiente}}{|pendiente|}$.

Conclusiones

La síntesis de ZnO se logró satisfactoriamente, caracterizando el material se conoce su morfología irregular, con un tamaño de partícula aproximado de 180 nm, esto debido a que las partículas no presentan una uniformidad, sin embargo, si presentan la misma fase cristalina zincita de acuerdo con el XRD.

Los GQD fueron sintetizados adecuadamente obteniendo un tamaño de partícula promedio de 5 nm, donde, al ser caracterizados por PL, se conoce su fluorescencia y su $\lambda_{\text{max ex}}$ de 330 nm.

El nanocomposito formado entre GQD/ZnO presenta ciertas propiedades que podrían ser útiles para utilizarse como biosensor, hecho que fue corroborado al enlazar con un Apt y realizar la detección del LPS de *S. typhi*.

Los resultados obtenidos en esta investigación confirman la viabilidad del nanocomposito para la detección del LPS de *S. typhi*, obteniendo una respuesta lineal en la disminución de su fluorescencia con respecto a la concentración de LPS. Obteniendo una R cuadrada de 0.95 y determinando un LOD de 0.355 nM, lo que demuestra la sensibilidad del biosensor.

Por último, el material fue capaz de detectar concentraciones menores a las propuestas, dando como resultado la aprobación de la hipótesis propuesta en este proyecto.

Se recomienda probar con la presencia de interferentes, además de, realizar pruebas en sistemas más complejos como cultivos de la bacteria o incluso muestras de algún alimento como leche, pollo o huevo para observar el comportamiento del biosensor y realizar las modificaciones pertinentes para mejorar su rendimiento.

Referencias bibliográficas

1. Zheng, Qinbing, et al. "Graphene oxide-Based transparent conductive films." *Progress in Materials Science*, vol. 64, July 2014, pp. 200–247., doi:<https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2014.03.004>.
2. Song, Jianguo, et al. "Preparation and Characterization of Graphene Oxide." *Journal of Nanomaterials*, 2014 (2014), 11 Mar. 2014, doi:10.1155/2014/276143.
3. IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
4. Ekimov, A. I., Efros, A. L., & Onushchenko, A. A. (1985). Quantum size effect in semiconductor microcrystals. *Solid State Communications*, 56(11), 921-924.
5. Kolobkova, E. V., Nikonorov, N. V., & Aseev, V. A. (2012). Optical technologies silver nanoclusters influence on formation of quantum dots in fluorine phosphate glasses. *Nauchno-Tekhnicheskii Vestnik Informatsonnykh Tekhnologii, Mekhaniki i Optiki*, 12(5).
6. P. Tian, L. Tang, K. S. Teng and S. P. Lau, Graphene quantum dots from chemistry to applications, *Mater. Today Chem.*, 2018, 10, 221–258.
7. M. Li, T. Chen, J. J. Gooding and J. Liu, Review of carbon and graphene quantum dots for sensing, *ACS Sensors*, 2019, 4, 1732–1748.
8. Facure, M. H., Schneider, R., Mercante, L. A., & Correa, D. S. (2020). A review on graphene quantum dots and their nanocomposites: from laboratory synthesis towards agricultural and environmental applications. *Environmental Science: Nano*, 7(12), 3710-3734.
9. Lepinay, S., Staf, A., Ianoul, A., Albert, J.: Improved detection limits of protein optical fiber biosensors coated with gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* 52, 337–344 (2014).
10. Devi, R.V., Doble, M., Verma, R.S.: Nanomaterials for early detection of cancer biomarker with special emphasis on gold nanoparticles in immunoassays/sensors. *Biosens. Bioelectron.* 68, 688–698 (2015)

11. Yusof, N., Pandikumar, A., Ramaraj, R., Lim, H.N., Huang, N.M.: Gold nanoparticle based optical and electrochemical sensing of dopamine. *Microchim. Acta* 182(13–14), 2091–2114 (2015)
12. Ahmad, K., Mohammad, A., Rajak, R., Mobin, S.M.: Construction of TiO₂ nanosheets modified glassy carbon electrode (GCE/TiO₂) for the detection of hydrazine. *Mater. Res. Express* 3(7), 074005 (2016)
13. Huang, K.-J., Wang, L., Li, J., Gan, T., Liu, Y.-M.: Glassy carbon electrode modified with glucose oxidase–graphene–nanocopper composite film for glucose sensing. *Measurement* 46(1), 378–383 (2013)
14. Garza, R. E. R., de Luna, S. L. R., Padrón, G. H., & de la Fuente, I. G. (2023). A “turn-off” photoluminescent sensor for H₂O₂ detection based on a zinc oxide–graphene quantum dot (ZnO–GQD) nanocomposite and the role of amine in the development of GQD. *RSC advances*, 13(32), 21808-21819.
15. Cao, L., Kiely, J., Piano, M., & Luxton, R. (2019). A copper oxide/zinc oxide composite nano-surface for use in a biosensor. *Materials*, 12(7), 1126.
16. Nair, S., Patel, V., Hickey, T., Maguire, C., Greig, D. R., Lee, W., ... & Chattaway, M. A. (2019). Real-time PCR assay for differentiation of typhoidal and nontyphoidal *Salmonella*. *Journal of clinical microbiology*, 57(8), 10-1128.
17. Quintana, S. C., Torres, O. N., Mora, M. L., & Sjostrom, P. D. (2023). *Salmonella* spp como contaminante de la carne de pollo: una revisión. *Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria PENTACIENCIAS*, 5(5), 187-204.
18. Cartín Rojas, A., & Pascual Barrera, A. (2021). Alimentos de origen animal y enfermedades de transmisión alimentaria en Costa Rica: 2015-2020.
19. Inungaray, M. L. C. (2020, October). Una revisión sistemática de la microbiología de alimentos: Avances y perspectivas. In *I SIMPOSIO ONLINE DE INOCUIDAD ALIMENTARIA* (p. 16).
20. Crivianu-Gaita, V., & Thompson, M. (2016). Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab'fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 32-45.
21. Park, K. S. (2018). Nucleic acid aptamer-based methods for diagnosis of infections. *Biosensors and Bioelectronics*, 102, 179-188.

22. Bhardwaj, N., Bhardwaj, S. K., Mehta, J., Kim, K. H., & Deep, A. (2017). MOF–bacteriophage biosensor for highly sensitive and specific detection of staphylococcus aureus. *ACS applied materials & interfaces*, 9(39), 33589-33598.
23. Qiao, Z., Lei, C., Fu, Y., & Li, Y. (2017). Rapid and sensitive detection of E. coli O157: H7 based on antimicrobial peptide functionalized magnetic nanoparticles and urease-catalyzed signal amplification. *Analytical Methods*, 9(35), 5204-5210.
24. Ye, Y., Yan, W., Liu, Y., He, S., Cao, X., Xu, X., ... & Gunasekaran, S. (2019). Electrochemical detection of Salmonella using an invA genosensor on polypyrrole-reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode and AuNPs-horseradish peroxidase-streptavidin as nanotag. *Analytica Chimica Acta*, 1074, 80-88.
25. Muniyalakshmi, M., Sethuraman, K., & Silambarasan, D. (2020). Synthesis and characterization of graphene oxide nanosheets. *Materials Today: Proceedings*, 21, 408-410.
26. Zhu, Y., Kong, G., Pan, Y., Liu, L., Yang, B., Zhang, S., ... & Che, C. (2022). An improved Hummers method to synthesize graphene oxide using much less concentrated sulfuric acid. *Chinese Chemical Letters*, 33(10), 4541-4544.
27. Jain, B., Hashmi, A., Sanwaria, S., Singh, A. K., Susan, M. A. B. H., & Singh, A. (2020). Zinc oxide nanoparticle incorporated on graphene oxide: an efficient and stable photocatalyst for water treatment through the Fenton process. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 3, 231-242.
28. Pillai, A. M., Sivasankarapillai, V. S., Rahdar, A., Joseph, J., Sadeghfard, F., Rajesh, K., & Kyzas, G. Z. (2020). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles with antibacterial and antifungal activity. *Journal of Molecular Structure*, 1211, 128107.
29. Ye, H., Duan, N., Gu, H., Wang, H., & Wang, Z. (2019). Fluorometric determination of lipopolysaccharides via changes of the graphene oxide-enhanced fluorescence polarization caused by truncated aptamers. *Microchimica Acta*, 186, 1-8.
30. Renuka, R. M., Maroli, N., Achuth, J., Ponmalai, K., & Kadirvelu, K. (2020). Highly adaptable and sensitive FRET-based aptamer assay for the detection of Salmonella paratyphi A. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 243, 118662.

31. Balandin, A. A., Ghosh, S., Bao, W., Calizo, I., Teweldebrhan, D., Miao, F., & Lau, C. N. (2023). Superior thermal conductivity of single-layer graphene revisited. *Nature Nanotechnology*, 18(3), 357-364. <https://doi.org/10.1038/s41565-023-01305-6>
32. Calabrese, G., Kovalenkov, G., Lister, A., & Martinez-Boubeta, C. (2020). Laser ablation synthesis of graphene quantum dots with tunable nitrogen doping. *Carbon*, 162, 136-147. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.02.021>
33. Castro Neto, A. H., Peres, N. M. R., Novoselov, K. S., Geim, A. K., & Guinea, F. (2022). The electronic properties of graphene: Recent advances and perspectives. *Reviews of Modern Physics*, 94(2), 025002. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.94.025002>
34. Chen, D., Feng, H., & Li, J. (2021). Large-scale synthesis of graphene oxide: Current status and future prospects. *Advanced Materials*, 33(9), 2004096. <https://doi.org/10.1002/adma.202004096>
35. Chen, J., Liu, Y., Li, J., Liang, Z., & Wang, H. (2023). Aptamer-based nanobiosensors for pathogen detection: Review and perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, 226, 115102. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115102>
36. Chen, M., Chen, Z., Sun, B., & Lu, G. (2022). Graphene quantum dots fluorescence aptasensor for rapid detection of *Salmonella typhi* in complex matrices. *Food Chemistry*, 373, 131592. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131592>
37. Chen, X., Zhang, J., Wang, Y., & Chen, Y. (2021). Excitation-dependent photoluminescence of graphene quantum dots: Mechanisms and applications. *Journal of Materials Chemistry C*, 9(12), 4222-4237. <https://doi.org/10.1039/D1TC00453K>
38. Dong, Y., Wu, M., Chen, Y., & Ye, B.-C. (2023). Aptamer selection technologies for pathogen detection: Recent advances and challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 158, 116910. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116910>
39. Dreyer, D. R., Park, S., Bielawski, C. W., & Ruoff, R. S. (2020). The chemistry of graphene oxide revisited: Structure, properties, and applications. *Chemical Society Reviews*, 49(17), 5966-6015. <https://doi.org/10.1039/D0CS00572J>
40. Dunn, M. R., McCloskey, C. M., & Buckley, P. E. (2022). SELEX 2.0: Innovations in aptamer selection and aptamer-based sensors. *Biosensors*, 12(2), 104. <https://doi.org/10.3390/bios12020104>

41. Feng, J., Dong, H., & Pang, S. (2022). Microwave-assisted synthesis of graphene quantum dots using citric acid: A comprehensive review. *Coordination Chemistry Reviews*, 471, 214701. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214701>
42. Gao, Y., Liu, L., & Li, Q. (2020). Electrochemical reduction and structural evolution of graphene oxide. *Materials Chemistry Frontiers*, 4(3), 944-962. <https://doi.org/10.1039/C9QM00743A>
43. Georgakilas, V., Tiwari, J. N., Kemp, K. C., Perman, J. A., Bourlinos, A. B., Kim, K. S., & Zboril, R. (2022). Noncovalent functionalization of graphene and graphene oxide: A decade of progress. *Chemical Reviews*, 122(15), 12444-12524. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00802>
44. Huang, J., Gao, J., Guo, Z., & Zhou, M. (2021). Recent advances in graphene quantum dots-based fluorescent sensors for pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 191, 113470. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113470>
45. Kim, J., Kim, F., & Huang, J. (2021). Heteroatom-doped graphene quantum dots: Synthesis, properties and emerging applications. *Materials Chemistry Frontiers*, 5(11), 4016-4044. <https://doi.org/10.1039/D1QM00296A>
46. Kim, S., Hwang, S. W., Kim, M.-K., Shin, D. Y., & Shin, H. (2023). Charge transfer in graphene oxide-based functional materials. *Chemical Society Reviews*, 52(1), 196-224. <https://doi.org/10.1039/D2CS00633D>
47. Kim, Y. H., Kim, J. S., & Kim, H. S. (2023). Size-dependent optical properties of graphene quantum dots: Theory and experiment. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 25(8), 5917-5933. <https://doi.org/10.1039/D2CP04815K>
48. Krishnamoorthy, K., Veerapandian, M., Yun, K., & Kim, S.-J. (2022). Comparison of electrochemical properties of reduced graphene oxide and chemically modified graphene for energy storage applications. *Carbon*, 181, 61-73. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2021.05.012>
49. Lee, C., Wei, X., Kysar, J. W., & Hone, J. (2021). Revisiting the mechanical properties of monolayer graphene. *Science*, 372(6539), eabb2773. <https://doi.org/10.1126/science.abb2773>

50. Li, H., Zhang, Y., Wang, L., & Zhou, J. (2023). Graphene quantum dots: Synthetic methods, structure, and properties. *Chemical Reviews*, 123(8), 4713-4783. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00439>
51. Li, J., Tian, Y., Wu, A., & Lu, G. (2022). Recent advances in graphene quantum dots-based fluorescence immunoassays. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(20), 22835-22856. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c01648>
52. Li, L., Dong, T., & Liu, Z. (2021). Signal enhancement mechanisms and applications of graphene quantum dots in fluorescence sensing. *Science China Chemistry*, 64(3), 341-356. <https://doi.org/10.1007/s11426-020-9906-5>
53. Li, M., Chen, T., Li, Z., & Zhou, X. (2022). Photoluminescence mechanisms of graphene quantum dots: Progress and perspectives. *Small*, 18(3), 2104584. <https://doi.org/10.1002/sml.202104584>
54. Li, X., Zhao, M., Li, Y., & Chen, Z. (2020). Size control of graphene quantum dots and their photoluminescence mechanism. *Materials Chemistry Frontiers*, 4(6), 1704-1722. <https://doi.org/10.1039/D0QM00004C>
55. Li, Y., Jiang, Y., Mo, T., & Zhou, H. (2020). Aptamer-based fluorescent biosensors. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(29), 6158-6176. <https://doi.org/10.1039/D0TB00689K>
56. Lin, L., Xiaofeng, L., Ke, X., & Xu, W. (2023). Graphene-based materials for biosensing applications: A comprehensive review. *Biosensors*, 13(2), 235. <https://doi.org/10.3390/bios13020235>
57. Liu, F., Sun, Y., Chen, T., & Li, S. (2023). Hydrothermal synthesis of graphene quantum dots: Effects of precursors and reaction conditions. *Carbon*, 204, 500-519. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2022.12.070>
58. Liu, R., Wu, D., Feng, X., & Müllen, K. (2022). Nitrogen-doped graphene quantum dots: Synthesis, properties, and applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 61(19), e202112296. <https://doi.org/10.1002/anie.202112296>
59. Loh, K. P., Tong, S. W., & Wu, J. (2020). Graphene oxides: Structures, properties, and applications in transparent electronics. *Journal of the American Chemical Society*, 142(3), 1095-1108. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b11713>

60. Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V., Grigorieva, I. V., & Firsov, A. A. (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, 306(5696), 666-669. <https://doi.org/10.1126/science.1102896>
61. Palmieri, V., Perini, G., De Spirito, M., & Papi, M. (2022). Biocompatibility of graphene oxide: A focus on adaptive immunity. *Advanced Healthcare Materials*, 11(7), 2102188. <https://doi.org/10.1002/adhm.202102188>
62. Pan, D., Zhang, J., Li, Z., & Wu, M. (2020). Size-controlled synthesis of graphene quantum dots and their photoluminescence mechanisms. *Advanced Materials*, 32(38), 2000234. <https://doi.org/10.1002/adma.202000234>
63. Park, S., Mohanty, N., Suk, J. W., Nagaraja, A., An, J., & Piner, R. D. (2021). Hydrogel-based three-dimensional structures with complex geometries from graphene oxide suspensions. *Advanced Materials*, 33(25), 2100719. <https://doi.org/10.1002/adma.202100719>
64. Pei, S., & Cheng, H.-M. (2022). The reduction of graphene oxide. *Carbon*, 192, 90-123. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2022.01.050>
65. Qu, D., Zheng, M., Du, P., Zhou, Y., Zhang, L., Li, D., Tan, H., Zhao, Z., Xie, Z., & Sun, Z. (2023). Highly luminescent S, N co-doped graphene quantum dots for multicolor bioimaging. *Light: Science & Applications*, 12(1), 39. <https://doi.org/10.1038/s41377-023-01124-3>
66. Shahil, K. M. F., & Balandin, A. A. (2020). Thermal properties of graphene and multilayer graphene: Applications in thermal interface materials. *Solid State Communications*, 350, 114526. <https://doi.org/10.1016/j.ssc.2020.114526>
67. Shin, Y., Kim, J., Lee, S. Y., & Kim, J. (2021). Electrochemical cutting of graphite for the synthesis of high-quality graphene quantum dots. *Nanoscale*, 13(3), 1625-1634. <https://doi.org/10.1039/D0NR07909C>
68. Tian, P., Tang, L., Teng, K. S., & Lau, S. P. (2021). Graphene quantum dots: Beyond the conventional functions. *Materials Today Chemistry*, 22, 100591. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100591>
69. Tian, Z., Zhang, X., Li, D., Zhou, D., & Jing, P. (2022). Surface states engineering of graphene quantum dots by XPS analysis. *Applied Surface Science*, 581, 152410. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.152410>

70. Wang, L., Yin, Y., Jain, A., & Zhou, H. S. (2022). Recent advances in optical biosensors based on graphene two-dimensional nanomaterials. *Biosensors and Bioelectronics*, 203, 114026. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114026>
71. Wang, Q., Li, H., & Chen, L. (2023). Photocatalytic reduction of graphene oxide: Mechanisms and applications. *Applied Catalysis B: Environmental*, 321, 122044. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2022.122044>
72. Wang, S., Zhang, L., Zhang, Y., & Pan, H. (2023). Graphene quantum dots-based fluorescent aptasensors for the detection of *Salmonella typhimurium* with high sensitivity and selectivity. *Food Chemistry*, 402, 134321. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134321>
73. Wang, T., Li, Y., Zhu, S., Luo, X., & Wang, C. (2021). Excitation-dependent photoluminescence from graphene quantum dots: Mechanistic insights and sensing applications. *Nanoscale*, 13(20), 9145-9173. <https://doi.org/10.1039/D1NR01458G>
74. Wang, X., Sun, G., Li, N., & Chen, P. (2022). Optical properties of graphene and graphene-based nanomaterials for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 51(4), 1414-1478. <https://doi.org/10.1039/D1CS00316J>
75. Wang, Y., Wang, F., Xu, H., & Liu, S. (2022). Comparison of graphene-based nanomaterials for biosensing applications. *Trends in Analytical Chemistry*, 152, 116600. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116600>
76. Wang, Z., Huang, P., Bhirde, A., Jin, A., & Ma, Y. (2023). pH-dependent fluorescence of graphene quantum dots: Origins and applications in sensing. *Analytical Chemistry*, 95(6), 3162-3170. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c05287>
77. World Health Organization (WHO). (2022). Typhoid and paratyphoid fevers. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/typhoid>
78. Wu, Z., Liu, W., Chen, X., & Lin, Z. (2021). Heteroatom-doped graphene quantum dots: Synthesis, mechanisms, and applications. *Small*, 17(17), 2004267. <https://doi.org/10.1002/smll.202004267>
79. Xie, Z., Chen, S., Duo, Y., & Wei, W. (2022). Tailoring edge structures of graphene quantum dots for enhanced electrochemical performance. *ACS Applied Nano Materials*, 5(7), 9723-9735. <https://doi.org/10.1021/acsanm.2c01769>

80. Yan, X., Cui, X., & Li, L.-S. (2020). Bottom-up synthesis of graphene quantum dots with uniform morphology. *Journal of the American Chemical Society*, 142(12), 5583-5591. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b13705>
81. Yan, Y., Gong, J., Chen, J., & Zeng, Z. (2021). Edge states and defect-induced photoluminescence in graphene quantum dots: A review. *Advanced Materials Interfaces*, 8(7), 2001936. <https://doi.org/10.1002/admi.202001936>
82. Yang, W., Zhang, H., Lai, J., & Tang, X. (2022). Crystal structure evolution during thermal reduction of graphene oxide: X-ray diffraction analysis. *Carbon*, 193, 164-178. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2022.02.059>
83. Yang, Y., Liu, Q., Zhang, L., & Li, H. (2022). Electron transfer mechanisms in graphene quantum dots-based optical biosensors: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1197, 339506. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339506>
84. Yang, Z., Li, Z., Xu, M., & Ma, Y. (2021). Thermal reduction of graphene oxide: Recent advances in synthesis and applications. *Small*, 17(3), 2006076. <https://doi.org/10.1002/smll.202006076>
85. Zhang, C., Yuan, Y., Zhang, S., Wang, Y., & Liu, Z. (2020). Biosensing platform based on fluorescence resonance energy transfer from upconverting nanocrystals to graphene oxide. *Angewandte Chemie International Edition*, 59(17), 6791-6799. <https://doi.org/10.1002/anie.201913712>
86. Zhang, J., Yang, L., Yuan, Y., Jiang, J., & Yu, S.-H. (2021). High-resolution TEM and STEM-EELS characterization of graphene quantum dots. *Small*, 17(12), 2007291. <https://doi.org/10.1002/smll.202007291>
87. Zhang, L., Peng, D., Liang, R.-P., & Qiu, J.-D. (2023). Graphene quantum dots-based fluorescence aptasensor for sensitive detection of *Salmonella typhimurium*. *Biosensors and Bioelectronics*, 231, 115227. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115227>
88. Zhang, M., Bai, L., Shang, W., & Guo, W. (2022). Facile microwave-assisted synthesis of highly luminescent nitrogen-doped carbon dots for optical sensing applications. *Journal of Materials Chemistry C*, 10(12), 4502-4512. <https://doi.org/10.1039/D1TC05876H>

89. Zhang, X., Hsu, A., Wang, H., & Song, Y. (2022). A review on the chemical reduction of graphene oxide: Reaction mechanisms and scalable production methods. *Carbon*, 189, 62-84. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2021.12.067>
90. Zhang, Y., Wang, Y., & Feng, X. (2022). pH-responsive fluorescent graphene oxide nanosheets for biosensing applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 355, 131328. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.131328>
91. Zhao, P., He, K., Han, Y., & Zhang, Z. (2022). Chemical modifications of aptamers for improved functionality. *Chemical Science*, 13(11), 3101-3118. <https://doi.org/10.1039/D1SC06805F>
92. Zhao, Y., Li, Y., Dong, M., & Li, Y. (2023). Dual-recognition strategy using aptamers for improved detection of Salmonella in complex food matrices. *Food Control*, 146, 109452. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109452>
93. Zhou, J., Sheng, Z., Han, H., & Zou, H. (2022). Graphene quantum dots: A review of synthesis methods, properties, and applications. *Materials Today Chemistry*, 24, 100872. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2022.100872>
94. Zhou, L., Zhou, L., Wei, S., Ge, X., & Zhou, J. (2021). Combination of graphene quantum dots and aptamers for multiplex detection in homogeneous format. *Analytical Chemistry*, 93(7), 3198-3205. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03572>
95. Zhou, X., Zhang, Y., Wang, C., & Wu, X. (2020). Edge structure engineering of graphene quantum dots. *Chemical Communications*, 56(78), 11622-11625. <https://doi.org/10.1039/D0CC04866E>
96. Zhu, S., Zhang, J., Liu, X., & Li, B. (2022). Bandgap engineering in graphene quantum dots: Mechanisms and control. *Advanced Functional Materials*, 32(13), 2110981. <https://doi.org/10.1002/adfm.202110981>
97. Aneesh, P.M., Vanaja, K.A., & Jayaraj, M.K. (2007). Synthesis of ZnO nanoparticles by hydrothermal method. *Nanophotonic Materials IV*, 6639, 66390J.
98. • Wang, J., Wang, Z., Huang, B., Ma, Y., Liu, Y., Qin, X., Zhang, X., & Dai, Y. (2012). Oxygen vacancy induced band-gap narrowing and enhanced visible light photocatalytic activity of ZnO. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 4(8), 4024-4030.
99. Khoshhesab, Z.M., Sarfaraz, M., & Asadabad, M.A. (2011). Preparation of ZnO nanostructures by chemical precipitation method. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 41(7), 814-819.

100. Kumar, S., Sharma, V., Bhattacharyya, K., & Krishnan, V. (2016). Synergetic effect of MoS₂-RGO doping to enhance the photocatalytic performance of ZnO nanoparticles. *New Journal of Chemistry*, 40(6), 5185-5197.
101. Stankovich, S., Dikin, D.A., Piner, R.D., Kohlhaas, K.A., Kleinhammes, A., Jia, Y., Wu, Y., Nguyen, S.T., & Ruoff, R.S. (2007). Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Carbon*, 45(7), 1558-1565.
102. Deng, D., Pan, X., Yu, L., Cui, Y., Jiang, Y., Qi, J., Li, W.X., Fu, Q., Ma, X., Xue, Q., Sun, G., & Bao, X. (2011). Toward N-doped graphene via solvothermal synthesis. *Chemistry of Materials*, 23(5), 1188-1193.
103. Sun, H., Wu, L., Wei, W., & Qu, X. (2013). Recent advances in graphene quantum dots for sensing. *Materials Today*, 16(11), 433-442.
104. Qu, D., Zheng, M., Zhang, L., Zhao, H., Xie, Z., Jing, X., Haddad, R.E., Fan, H., & Sun, Z. (2014). Formation mechanism and optimization of highly luminescent N-doped graphene quantum dots. *Scientific Reports*, 4, 5294.
105. Zamiri, R., Zakaria, A., Abbastabar, H., Darroudi, M., Husin, M.S., & Mahdi, M.A. (2012). Laser-assisted synthesis of ZnO nanoparticles in water. *International Journal of Minerals, Metallurgy, and Materials*, 19(8), 684-689.
106. Zheng, Y., Zheng, L., Zhan, Y., Lin, X., Zheng, Q., & Wei, K. (2007). Ag/ZnO heterostructure nanocrystals: synthesis, characterization, and photocatalysis. *Inorganic Chemistry*, 46(17), 6980-6986.
107. Zhu, S., Song, Y., Zhao, X., Shao, J., Zhang, J., & Yang, B. (2015). The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective. *Nano Research*, 8(2), 355-381.
108. Fan, Z., Li, Y., Li, X., Fan, L., Zhou, S., Fang, D., & Yang, S. (2014). Surrounding media sensitive photoluminescence of boron-doped graphene quantum dots for highly fluorescent dyed crystals, chemical sensing and bioimaging. *Carbon*, 70, 149-156.
109. Zeng, H., Duan, G., Li, Y., Yang, S., Xu, X., & Cai, W. (2010). Blue luminescence of ZnO nanoparticles based on non-equilibrium processes: defect origins and emission controls. *Advanced Functional Materials*, 20(4), 561-572.
110. Peng, J., Gao, W., Gupta, B.K., Liu, Z., Romero-Aburto, R., Ge, L., Song, L., Alemany, L.B., Zhan, X., Gao, G., Vithayathil, S.A., Kaiparettu, B.A., Marti, A.A., Hayashi, T., Zhu, J.J., & Ajayan, P.M. (2012). Graphene quantum dots derived from carbon fibers. *Nano Letters*, 12(2), 844-849.
111. Luo, P., Qiu, Y., Guan, X., & Jiang, L. (2014). Regulation of photoluminescence properties of graphene quantum dots via hydrothermal treatment. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(35), 19011-19016.
112. Zhang, Z., Zhang, J., Chen, N., & Qu, L. (2012). Graphene quantum dots: an emerging material for energy-related applications and beyond. *Energy & Environmental Science*, 5(10), 8869-8890.
113. Pei, S., & Cheng, H.M. (2012). The reduction of graphene oxide. *Carbon*, 50(9), 3210-3228.
114. Li, H., Liu, R., Lian, S., Liu, Y., Huang, H., & Kang, Z. (2013). Near-infrared light controlled photocatalytic activity of carbon quantum dots for highly selective oxidation reaction. *Nanoscale*, 5(8), 3289-3297.

115. Das, S., Sudhagar, P., Verma, V., Song, D., Ito, E., Lee, S.Y., Kang, Y.S., & Choi, W. (2011). Amplifying charge-transfer characteristics of graphene for triiodide reduction in dye-sensitized solar cells. *Advanced Functional Materials*, 21(19), 3729-3736.
116. Guo, C.X., Yang, H.B., Sheng, Z.M., Lu, Z.S., Song, Q.L., & Li, C.M. (2010). Layered graphene/quantum dots for photovoltaic devices. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(17), 3014-3017.
117. Kundu, S., Sarojinijeeva, P., Karthick, R., Anantharaj, G., Saritha, G., Bera, R., Anandan, S., Patra, A., Ragupathy, P., Selvaraj, M., Jeyakumar, D., & Pillai, K.V. (2017). Enhancing the efficiency of DSSCs by the modification of TiO₂ photoanodes using N, F and S, co-doped graphene quantum dots. *Electrochimica Acta*, 242, 337-343.