

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**  
**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN FÍSICA**



**DISEÑO, CONSTRUCCIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE**  
**NANOTERMÓMETROS FLUORESCENTES PARA**  
**APLICACIONES BIOMÉDICAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTNER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS (FÍSICA)**

**P R E S E N T A**

**M.N. FRANCISCO ALEJANDRO PEDROZA MONTERO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. MARTÍN RAFAEL PEDROZA MONTERO**

**HERMOSILLO, SONORA**

**JUNIO 2022**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



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

# Índice

Agradecimientos .....	iv
Lista de abreviaturas .....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
1 Introducción .....	1
2 Marco Teórico.....	6
2.1 Termometría y Nanotermometría.....	6
2.2 Espectroscopía de Fluorescencia .....	10
2.3 Nanotermómetros Fluorescentes.....	13
2.3.1 Nanodiamantes Fluorescentes.....	14
2.3.2 Factores Influyentes en la Fluorescencia de Nanotermómetros Fluorescentes .....	18
3 Resultados Experimentales .....	21
3.1 Hipótesis .....	21
3.2 Objetivos Generales .....	21
3.3 Objetivos Particulares .....	21
3.4 Materiales y Métodos.....	22
3.4.1 Nanodiamantes Fluorescentes.....	22
3.4.2 Análisis de Datos.....	22
3.5 Técnicas Experimentales.....	26
3.5.1 Espectroscopía de Fluorescencia.....	26
3.6 Resultados .....	28
3.6.1 Estructura Electrónica de Nanodiamantes Fluorescentes con Centros de Color NV ...	28
3.6.2 Espectros de Excitación de Nanodiamantes Fluorescentes .....	30
3.6.3 Espectro de Emisión de Nanodiamantes Fluorescentes .....	32
3.6.4 Nanotermometría Fluorescente Asistida por Nanodiamantes de Distintos Tamaños ..	34
3.6.5 Efecto de la Concentración en la Fluorescencia de Nanodiamantes Fluorescentes .....	37
3.6.6 Nanotermometría Fluorescente con Nanodiamantes a Concentraciones Fijas.....	42
3.6.7 Citotoxicidad/Viabilidad Celular de Nanodiamantes Fluorescentes.....	49
4 Conclusiones .....	52

5 Perspectivas.....55  
6 Referencias.....56

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad de Sonora y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme permitido realizar este proyecto de tesis.

Agradezco de igual forma el esfuerzo realizado por el Comité Tutorial de Tesis para el desarrollo de este trabajo de investigación.

De igual manera, agradezco a mi familia por su apoyo incondicional durante mis estudios. Ellos son quienes me han enseñado el buen camino para lograr mis metas. Muchas gracias por estar ahí para aconsejarme y enseñarme desde joven. Muchas gracias Naín, Sarina, Iraseli, Francisca, Martín, Guadalupe y Guadalupe.

Por otra parte, le extiendo mi más sincero agradecimiento a todos mis maestros, quienes me animaron a seguir estudiando y no dejar atrás mis sueños. Gracias por seguir profesando con la voz del conocimiento.

## Lista de abreviaturas

CVD	Deposición por Vapor Químico
DMEM	Medio de Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad Óptica
DWF	Factor de Debye-Waller
EOR	Extensión de Resección
FBS	Suero Fetal Bovino
FND	Nanodiamantes Fluorescentes
FOM	Figura de Mérito
FRET	Transferencia de Energía Resonante de Förster
FWHM	Anchura a Media Altura
HMX	Octógeno
HPHT	Alta Presión, Alta Temperatura
ITS-90	Escala de Temperatura Internacional (1990)
MTT	Bromuro 3-(4-5, dimetitiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NV	Nitrogeno-Vacancia
ODMR	Resonancias Magnéticas Ópticamente Detectadas
RDX	Ciclotrimetileno Trinitramina / Hexógeno
SNOM	Microscopía Óptica de Escaneo de Campo Cercano
TNT	Trinitrotolueno
ZPL	Línea de Fonón Cero

## Resumen

En este trabajo, se presenta el diseño, construcción e implementación de nanotermómetros fluorescentes para aplicaciones biomédicas mediante el uso de la fluorescencia de nanodiamantes con centros de color NV. Es bien conocido que existen limitantes en términos del uso de nanotermómetros en sistemas biológicos, los principales siendo la biocompatibilidad, la resolución espacial y la incertidumbre de medición. La metodología presentada está basada en el análisis de espectros de emisión de nanodiamantes excitados con luz láser, donde tras observar el comportamiento de las bandas de emisión de los centros de color NV se obtuvo un modelo lineal para la intensidad en función la temperatura dentro del rango de temperaturas de 30 – 45 °C con una resolución espacial del orden del tamaño de nanopartícula, con una precisión de 0.1 °C y baja incertidumbre en las mediciones de alrededor de 0.01 °C. Además, un estudio de distintas concentraciones de nanodiamantes en términos de su actividad fluorescente se investigó en el rango de 0.1 – 10 mg/mL con el fin de determinar qué concentración de nanodiamantes suspendidos en agua posee una emisión de mayor intensidad, con el cual se encontró la concentración de 5 mg/mL como la más intensa. Adicionalmente, se realizó un ajuste con los datos experimentales de intensidad para predecir la intensidad fluorescente dando como resultado un modelo no lineal que sigue una expresión de cuarto orden respecto de la concentración, con una figura de mérito, FOM = 0.03 – 0.04 (3 – 4 %). Finalmente, se realizó un ensayo de viabilidad celular para distintas concentraciones de nanodiamantes donde se encontró una alta viabilidad celular (95 – 100%) para las concentraciones de 0.5 mg/mL y 0.1 mg/mL, tomando como prueba de control el agua miliQ. Con este trabajo se demuestra que los nanodiamantes fluorescentes son excelentes nanotermómetros y son especialmente atractivos para su internalización en sistemas biológicos.

## **Abstract**

This work presents the design, construction and implementation of fluorescent nanothermometers for biomedical applications by means of the fluorescence from nanodiamonds with NV colour centres. It is well known that there exists limitations in terms of the use of nanothermometers in biological systems, the main being biocompatibility, spatial resolution and uncertainty of measurement. The methodology presented is based upon the analysis of emission spectra from nanodiamonds excited with a laser; whereby observing the behavior of emission bands of the NV colour centres, a linear model was obtained for the intensity as a function of the temperature in the range of 30 – 45 °C with a spatial resolution in the nanoparticle size order, with a precision of 0.1 °C and a low uncertainty of measurements of around 0.01 °C. Furthermore, a study of different nanodiamonds' concentrations in terms of their fluorescent activity was investigated in the range of 0.1 – 10 mg/mL with the purpose of determining which concentration of nanodiamonds suspended in water possess the maximum intensity, in which it was found that the concentration of 5 mg/mL was the most intense. Additionally, a non-linear fit of the experimental observations of intensity was executed to predict the fluorescence intensity following an expression of a fourth order polynomial with respect to concentration, with a figure of merit, FOM = 0.03 – 0.04 (3 – 4 %). Finally, a cell viability essay was carried out for different concentrations of nanodiamonds, where high cell viability (95 – 100%) was found for the concentrations of 0.5 mg/mL and 0.1 mg/mL, taking miliQ water as a control sample. With this work it is demonstrated that fluorescent nanodiamonds are excellent nanothermometers and are especially attractive for their internalization in biological systems.



# 1 Introducción

Hoy en día, la necesidad de poder medir la temperatura de un sistema físico de manera precisa y localizada juega un rol importante en la física del estado sólido, biomedicina, biología y química, etcétera; donde su cuantificación es clave para la correcta operación de dispositivos basados en semiconductores, determinación de procesos biológicos genéticos<sup>1,2</sup> o reacciones químicas<sup>3</sup>, diagnósticos médicos, por mencionar algunos. Específicamente, en éstos últimos, uno de los problemas que más aqueja a la población mundial es el cáncer y la cantidad de muertes que esta enfermedad ha dejado a través del tiempo. Actualmente, más de 19 millones de personas padecen esta enfermedad trayendo consigo 10 millones de pacientes fallecidos, convirtiéndose en la segunda causa de muerte a nivel global anunciado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Inclusive, estas estadísticas se estiman que los fallecimientos van en aumento y llegarán a ser un 50% mayores para el año 2040<sup>4</sup>. Para mitigar esta desgracia es de vital importancia la temprana detección del cáncer. Cabe señalar que, a pesar de que algunos tipos de cáncer tienen distintos ritmos de evolución para sus etapas, su detección a tiempo puede ofrecer un 80-100% de supervivencia, siempre y cuando las técnicas para su temprana detección lo permitan o estén disponibles. La mayoría de los casos de cáncer que acaban en muerte se deben en gran parte a la falta o mala capacidad de detección a nivel hospitalario. Es decir, la instrumentación médica está limitada en términos del diagnóstico y principalmente, se atribuye a que los aparatos que actualmente están disponibles en el mercado tienen una resolución espacial de detección bastante baja. Las técnicas como tomografías, radiografías, por mencionar algunas, tienen la posibilidad, en el mejor de los casos, de detectar tumores cancerígenos con un diámetro de 1 cm como mínimo detectable, si hablamos de imágenes bidimensionales, dejando así una limitante capacidad de detectar un tumor canceroso hasta que ocupa un volumen de 1 cm<sup>3</sup> en el tejido humano. Sin lugar a duda, esto representa una problemática enorme, porque aun considerando que los pacientes se realicen chequeos regularmente, la instrumentación médica está imposibilitada para otorgar un diagnóstico mucho antes de que los tumores crezcan considerablemente. Dicho esto, es importante destacar que la velocidad de reproducción de las células tumorales

para los distintos tipos de cáncer también es variable, así como su agresividad trayendo consigo muertes aceleradas en algunos pacientes, es decir, diagnosticándolo tardíamente debido a la falta de mejores técnicas de exploración. Por lo tanto, el hincapié de progresar en la instrumentación es mandatorio y extremadamente necesario.

Una dificultad adicional, que surge del hecho de que, a pesar de tener ubicado el tumor y su tamaño aproximado, es la delimitación precisa de los bordes tumorales; es decir, existe una interfase entre el tejido dañado y el tejido sano en la que se vuelve muy complicado delimitar el tumor al momento de realizar su remoción. Esta interfase es más difícil de precisar en microscopios, tomografías, resonancias magnéticas e incluso con técnicas novedosas de imagenología ya que su espesor es más delgado que el tumor mismo. Por ello, para asegurar la completa remoción tumoral se considera tomar un rango mayor al observado, a este se le denomina extensión de resección (EOR)<sup>5</sup> y en algunos casos puede llegar a ser 9 veces más grande que el área observada para el tumor cancerígeno con la finalidad de asegurar que el tumor sea removido por completo. Sin embargo, se ha observado que en algunos pacientes puede llegar a ser una variable importante que predispone la recurrencia del cáncer<sup>6</sup>. Es evidente el inconveniente que esta técnica representa ya que el proceso cicatrización celular, además de traer consigo muerte celular, también representa un problema al momento de que el paciente se tiene que realizar quimioterapias y radioterapias que pueden devenir en carcinomas celulares<sup>7</sup>. Finalmente, otra característica con la que cuentan las células cancerígenas es que se ha encontrado que su agresividad depende de la temperatura<sup>8</sup>, dándonos información referente a la actividad metabólica intracelular y a su vez, una guía para determinar el grado de daño causado en los tejidos, así como su clasificación de peligrosidad con un diagnóstico, preciso y en general, más completo. En este sentido la temperatura de las células no solamente nos proporciona el grado de agresividad, sino que también nos puede ayudar a discriminar células cancerígenas de las células sanas. Una célula humana sana tiene una temperatura interna del orden de 36.5 a 37.5 grados Celsius<sup>9</sup> mientras que una célula cancerosa posee una temperatura mayor de alrededor de 39 a 43 grados Celsius<sup>10</sup> e inclusive, existen estudios donde la actividad mitocondrial en el proceso metabólico se mantiene alrededor de los 50 °C<sup>11</sup>. Existen en la literatura experimentos reportados para determinar esta diferencia de temperaturas a nivel intracelular,

sin embargo, hasta hace poco se comenzó a considerar el efecto de la alta toxicidad que poseen al ser utilizadas con niveles bajos de concentración sobre todo si se trata de nanopartículas metálicas<sup>12-16</sup>.

En estos términos, la importancia de poder realizar diagnósticos basados en la temperatura para tumores que cuenten con un tamaño del orden de micrómetros, incluso del orden de cientos de nanómetros, con una delimitación de la interfase tumor-células sanas que incluya la posibilidad de detectar la agresividad como función de la temperatura, y, sobre todo con una técnica que no sea costosa es lo que representa el estado del arte de esta investigación. Finalmente, lo que se propone en este trabajo, es una técnica basada en el uso de nanodiamantes fluorescentes, utilizando concentraciones altamente viables para evitar la muerte celular con el fin de realizar termometría a escala nanométrica.

Recientemente, se han investigado nanopartículas capaces de fungir como nanotermómetros; sin embargo, pocas poseen las características de biocompatibilidad y dispersión en soluciones fisiológicas<sup>17</sup>, las cuales son deseables para su uso en el campo biomédico. Otras limitantes que suelen ser consideradas son el control de propiedades superficiales de nanopartícula y su vectorización intracelular<sup>18</sup> para fines de encapsulación o de entrega de fármacos. Del gran número de nanopartículas modernamente investigadas, las estructuras de nanocarbono reciben especial atención debido a su potencial uso en forma de nano dispositivos para su uso en la biomedicina y la ingeniería de dispositivos nanoestructurados<sup>19-21</sup>.

Los nanodiamantes son materiales basados en estructuras nanoscópicas de diamante que poseen propiedades mecánicas y químicas superiores en cuanto a dureza, estabilidad química, funcionalización superficial y conductividad térmica respecto del resto de las nanopartículas basadas en carbono<sup>22,23</sup> u otro material<sup>24,25</sup> y presentan una citotoxicidad baja al nivel celular<sup>26,27</sup>. Además, debido a que poseen una carga superficial<sup>28</sup> y una razón de superficie-volumen grande<sup>29</sup> demuestran ser nanopartículas con capacidades de carga y descarga de una gran variedad de compuestos terapéuticos<sup>30-34</sup>. Adicionalmente, estas nanopartículas han sido demostradas biológicamente estables en soluciones acuosas<sup>35,36</sup>, permitiéndoles prevenir reacciones de apoptosis o estrés-inflamatorias celulares<sup>37</sup>.

Los diamantes en bulto y nanodiamantes pueden contener defectos luminiscentes conocidos como centros de color debido a distintas impurezas embebidas en la red cristalina<sup>38,39</sup>. De todos los centros de color conocidos para el diamante, el centro de color de nitrógeno-vacancia (NV) es el que se destaca del resto por poseer una fluorescencia intensa y estable que se extiende desde el espectro visible al infrarrojo cercano<sup>39</sup> que a su vez se amplía y decrece en intensidad a medida que el tamaño de partícula disminuye<sup>40-42</sup>. Su fluorescencia es comprendida por líneas de emisión características en 575 nm y 637 nm correspondientes a los estados de carga NV<sup>0</sup> y NV<sup>-</sup>, respectivamente, dando lugar a dos posibles estructuras electrónicas embebidas en el mismo centro<sup>43-45</sup>. Adicionalmente, la población de cada estado de carga puede ser modulada mediante la longitud de onda de excitación y potencia<sup>46</sup>. Asimismo, la excitación con radiación de 450-575 nm da origen a que los centros de color continuamente se alternen en sus dos estados de carga<sup>47</sup>. Estudios adicionales concluyen que al excitar nanodiamantes con una longitud de onda de 532 nm las probabilidades de encontrar el centro de color NV en la configuración NV<sup>0</sup> y NV<sup>-</sup> son de 30% y 70%, respectivamente<sup>46,48</sup>. Es importante remarcar que estas propiedades ópticas son la clave esencial para fabricar nanotermómetros de nanodiamantes fluorescentes biocompatibles, y sobre todo, adecuados para imagenología y mediciones de temperatura en sistemas biológicos<sup>49,50</sup>.

La importancia de la implementación de nanotermómetros fluorescentes biocompatibles surge de la característica de que muchos procesos celulares son dependientes de la temperatura<sup>11,51,52</sup>. Aunado a esto, otros estudios han demostrado como células cancerosas exhiben una temperatura superior a aquella de células sanas debido a un incremento metabólico<sup>52,53</sup>. Por ello es que la captación de datos precisos de la temperatura local en sistemas biológicos es necesario para entender su comportamiento dinámico y estado general<sup>54</sup>. En estos sistemas se prefiere de la utilización de un método no invasivo para realizar termometría celular en la escala micrométrica. La nanotermometría fluorescente ha sido propuesta como solución a este problema, la cual hace uso de materiales fluorescentes como puntos cuánticos<sup>55-57</sup>, cristales dopados con tierras raras<sup>58-60</sup>, compuestos orgánicos<sup>61-63</sup> y nanodiamantes<sup>64-66</sup> para determinar la temperatura sin contacto. No obstante, existen dudas respecto a la toxicidad de los cristales dopados con tierras raras<sup>67</sup>; debido a esto, los

nanodiamantes son preferidos por su biocompatibilidad<sup>68</sup>. Otra ventaja que poseen los nanodiamantes es que sus centros de color NV permanecen inmóviles a temperatura ambiente, confiriéndoles de una estabilidad y sensibilidad<sup>64</sup>. Es así como la nanotermometría basada en nanodiamantes fluorescentes se vuelve una excelente alternativa para caracterizar estructuras intracelulares térmicamente. La gran mayoría de los trabajos reportados para este fin involucran el uso de resonancia de espín de electrónico del estado de carga NV<sup>-</sup> al aplicar un campo magnético externo<sup>65,69,70</sup>. Las resonancias magnéticas ópticamente detectadas (ODMR) del estado de carga NV<sup>-</sup> a distintas temperaturas logran medir la temperatura local con una baja incertidumbre: desde 0.01 °C hasta 0.001 °C<sup>71</sup>, con una resolución espacial de 20 nm<sup>72,73</sup>; sin embargo, la implementación de esta técnica hace uso de un microscopio óptico equipado con uno o más resonadores magnéticos, los cuales son de difícil implementación en un microscopio convencional y requieren de un análisis de datos distinto al propuesto en este trabajo<sup>74,75</sup>. Por otro lado, existe la técnica llamada microscopia óptica de escaneo de campo cercano (SNOM) que hace uso de una fibra óptica acoplada a un microscopio de fuerza atómica permitiendo la iluminación y colección de luz de campo cercano<sup>76</sup>. Esta técnica logra la estimación de la temperatura con una incertidumbre de 0.1 – 1 °C<sup>76,77</sup> con una resolución espacial de ~50 nm<sup>78</sup> y es conveniente para el estudio de espectros de emisión altamente localizados. Estas resoluciones están principalmente limitadas a la cantidad de luz que transporte la fibra óptica al detector, la cual es indicada alrededor de 5 mW para la excitación local y de 100-300 nW para la luz incidente en el detector<sup>77</sup>, sin que ésta sufra daño. Asimismo, otra limitante de esta técnica es que la punta se encuentra muy cerca de la muestra; esto es, al ocurrir un calentamiento de ésta, puede alterar la geometría de la muestra lo cual afectaría la señal dispersada. En contraste, el establecimiento de escalas termométricas basadas en la fluorescencia de nanodiamantes admite incertidumbres de medición tan altas como  $\pm 1$  °C<sup>42</sup> y tan bajas como  $\pm 0.01$  °C con una resolución espacial del tamaño de nanopartícula, sin importar qué estado de carga se seleccione para su estimación. Otros ejemplos similares al desarrollado en este trabajo son la nanotermometría usando el factor de Debye-Waller (DWF)<sup>65,79</sup>, la detección de intensidad, ancho y posición debajo de cada línea de emisión<sup>80</sup>, la detección de corrimientos espectrales<sup>66</sup> y la caracterización electrónica mediante fotoluminiscencia o espectroscopia Raman<sup>74</sup>.

## 2 Marco Teórico

### 2.1 Termometría y Nanotermometría

La termometría es la ciencia que se encarga del estudio de la medición de temperatura en sistemas físicos por medio de un termómetro. Cualquier cambio térmico en un termómetro permite la cuantificación de la temperatura a través de la asociación de una propiedad física del termómetro; por ejemplo, la dilatación del mercurio en un capilar de vidrio o la resistencia eléctrica de un conductor. Muchos termómetros han sido descubiertos con el paso del tiempo y recientemente muchas de estas tecnologías han sido implementadas para la nanoescala. Existen diversos tipos de termometría y se categorizan mediante el tipo de interacción física que conlleva su medición.

Un termómetro es un instrumento que basa su medición de temperatura del sistema en el cambio de una propiedad física del termómetro bajo criterios de equilibrio térmico. Existen diversos tipos de termómetros y son caracterizados por si requieren contacto o no-contacto con el sistema para realizar una medición de la temperatura.

Existen muchas aplicaciones donde es de interés poder medir el valor de la temperatura en la nanoescala, algunas de estas aplicaciones incluyen los dispositivos basados en semiconductores de estado sólido, la óptica, las dinámicas de micro fluidos, las reacciones químicas, los procesos biomédicos y la nanomedicina<sup>36,81-83</sup>.

Un termómetro o abstractamente un sistema medidor de la temperatura consta de:

1. Un transductor. Es el dispositivo encargado de convertir las variaciones térmicas en una señal de la propiedad física medible.
2. Un método que transmite la señal medida.
3. Un procesamiento de señal.
4. Una forma de visualización de datos.
5. Un método para grabar los datos.

Se usa una calibración para asociar un valor de la propiedad física en un valor de temperatura de referencia y así considerar lo significativo que es la temperatura contra los cambios en la señal medida. Los sistemas de medición de temperatura pueden ser clasificados de acuerdo

al contacto físico entre el transductor y el medio de interés resultando en la clasificación de métodos invasivos, métodos semi-invasivos y métodos no invasivos.

En términos cualitativos, la temperatura puede ser percibida como la sensación de caliente o frío de un cuerpo. Por otra parte, cuantitativamente la temperatura es derivada del Segundo principio de la Termodinámica en términos de una razón de cambio de entropía con la energía interna del sistema. Esta última definición establece que la temperatura es una propiedad que determina si un sistema está en equilibrio térmico con otro. En la nanoescala, los problemas son derivados principalmente desde esta definición de la temperatura; es decir, las lecturas de temperatura macroscópicas no son equivalentes con las lecturas de temperatura nanoscópicas. En aplicaciones prácticas, los sistemas son vistos desde un estado de no equilibrio y es difícil determinar las condiciones para cumplir el estado de equilibrio en una manera local del sistema.

Una escala de temperatura es requerida para la asignación de valores numéricos para los distintos cuerpos a distintas temperaturas. La escala de temperatura termodinámica es definida por medio de motores de calor perfectos. La unidad para la temperatura termodinámica es el Kelvin. Como los motores de calor perfectos no existen se desarrolló la Escala de Temperatura Internacional de 1990 (ITS-90) para aproximar la temperatura termodinámica. La escala que establece la ITS-90 es construida a partir de traslapar distintas observaciones físicas con la temperatura (como el vapor de agua, el punto triple del agua, calibración de termopares, etcétera) y representa la temperatura termodinámica con una desviación estándar de error. Esto permite la medición de la temperatura y con error estandarizado<sup>84</sup>. La mayoría de los termómetros usados en los laboratorios son dispositivos que han sido calibrados previamente por los lineamientos de la escala ITS-90 o bien han sido calibrados con valores de temperatura conocidos.

Algunos ejemplos básicos son los termómetros de líquido contenido en vidrio, termopares y termistores; sin embargo, éstos forman parte de los termómetros conocidos como no luminiscentes ya que basan su medición en la dilatación de un capilar, el voltaje entre dos conductores y la resistencia de un conductor, respectivamente. Es posible separar a los diversos métodos termométricos o termómetros entre los que involucran una interacción distinta a la óptica (no luminiscentes) y los que sí (luminiscentes). Los termómetros pueden

ser clasificados de acuerdo a si son caracterizados por ecuaciones de estado bien establecidas que relacionan directamente a la temperatura (primarios) o si requieren de calibración (secundarios).

Los métodos no luminiscentes más avanzados hasta la fecha son aquellos basados en la microscopia de barrido térmico mediante el uso de un microscopio de fuerza atómica y una punta termistora que permita la visualización por contraste de conductividad térmica<sup>85,86</sup>. Otro método en esta categoría es la termometría asistida por nanotubos de carbono donde se usan las dilataciones térmicas del diámetro o largo del nanotubo para medir la temperatura<sup>87</sup>.

Los métodos luminiscentes aplicados a la nanotermometría hacen uso de nanopartículas luminiscentes y alguna técnica espectroscópica para su detección. Diversos nanotermómetros han sido descubiertos y sintetizados a través del tiempo en forma de puntos cuánticos fluorescentes<sup>55-57</sup>, fósforos termográficos<sup>63,88</sup>, nanotermómetros fluorescentes biocompatibles<sup>58</sup>, nanopartículas metálicas núcleo-coraza<sup>89,90</sup>, entre otros. Tras la estimulación óptica del nanotermómetro y la detección de su espectro de fluorescencia es posible relacionar dicho espectro con la temperatura local del nanotermómetro mediante la identificación de bandas que demuestren variaciones o tendencias durante incrementos o decrementos de temperatura y puedan ser correlacionadas para estimar el valor de la temperatura local del nanotermómetro. Cada termómetro en específico involucra un número de consideraciones que caracterizan su uso en la práctica: 1) la incertidumbre de medición, 2) el rango de temperatura, 3) la perturbación térmica, 4) el nivel de contacto, 5) el tamaño del sensor, 6) la respuesta transitiva de medición, 7) la protección del sensor, 8) la disposición como material en la naturaleza y 9) el costo neto de producción<sup>76</sup>.

En particular para aplicaciones en la nanoescala distintos métodos termométricos pueden ser usados; sin embargo, la disposición específica de un método es dictado por lo pequeño que sea el termómetro, el tipo de material y los requerimientos específicos que conlleven su selección. Sin importar la elección, se requiere analizar la incertidumbre asociada con cada medición. Un análisis simplificado podría ser adecuado para evaluar cambios térmicos asociados con interacciones del termómetro con el medio de interés. Esto puede involucrar la elaboración de ecuaciones que establezcan la dinámica térmica del medio por sí solo y aquella del medio con el termómetro incluido, de manera que se pueda evaluar



si la presencia del termómetro altera los intercambios térmicos significativamente y si es capaz de distinguir los cambios térmicos involucrados en forma de una señal medible y cuantificable. De esta manera, se pretende hacer uso de los nanodiamantes fluorescentes con la intención de poder medir dentro del ambiente biológico la temperatura a nivel celular con el fin de localizar células con comportamientos metabólicos que operen a distinta temperatura de las células sanas además de conocer el rango de alcance de las mismas así brindando una solución alternativa a los médicos cirujanos una mejor herramienta a la hora de remover tejido en una cirugía; o bien, para la detección temprana de distintas patologías.

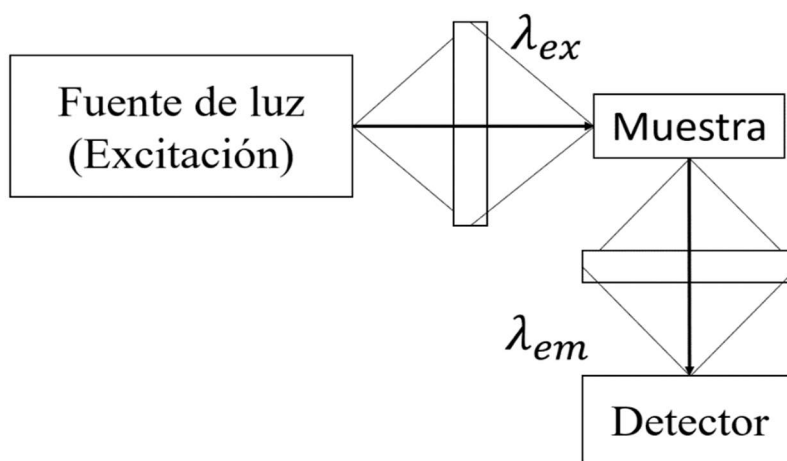
## 2.2 Espectroscopía de Fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno físico donde un material absorbe energía en forma de radiación electromagnética y luego emite parte de esa energía, pero en diferente longitud de onda. En otras palabras, el material emite luz, de uno o más colores, al ser excitada con otro color (usualmente de mayor energía y modulado en longitud de onda). En general, la fluorescencia forma parte de la fotoluminiscencia (luminiscencia estimulada ópticamente), donde es posible la observación de espectros de excitación y emisión de luz que permiten la caracterización electrónica del material. Los espectros de excitación exhiben la intensidad fluorescente de emisión fijada a una longitud de onda mediante el escaneo de un rango de longitudes de onda de excitación; por otra parte, los espectros de emisión muestran la intensidad fluorescente en un rango de longitudes de onda de emisión mediante la excitación con una longitud de onda fija.

Comúnmente se nombran a los materiales fluorescentes como fluoróforos, fósforos, marcadores reactivos, reactivos fluorescentes o tintes fluorescentes. En la naturaleza existen muchos materiales fluorescentes encontrados como trazas de impurezas en minerales, cristales y otros formados dentro de la corteza terrestre, como los diamantes. Existen otros tipos de materiales fluorescentes sintetizados por el hombre y son usualmente encontrados en relojes, señalamientos y juguetes.

El arreglo experimental para la espectroscopía de fluorescencia más común consiste en la excitación fotónica del fluoróforo o muestra con una longitud de onda fija y la detección de la emisión fluorescente en un rango de longitudes de onda perpendicularmente al haz de excitación, mostrado en la Figura 1. Gracias a los avances en la física del estado sólido se ha permitido la fabricación de lámparas de excitación estables en un rango de longitudes de onda, láseres, monocromadores, rendijas de difracción, espejos y detectores basados en semiconductores fotosensibles capaces de resolver longitudes de onda en el ultravioleta (UV), visible e infrarrojo y; a su vez, posibilitan la construcción de mejores arreglos ópticos en forma de espectrofotómetros modulares.

La espectroscopía de fluorescencia en general posee una resolución temporal en el orden de nanosegundos y una resolución espectral desde el UV lejano, el espectro visible y hasta el infrarrojo (desde 180 nm hasta 900 nm, expandible hasta 2500 nm). Estas características soportan la detección de emisiones fluorescentes que ocurren en el orden de nanosegundos y logran elucidar la estructura electrónica y vibracional del material en cuestión y, adicionalmente, provee de un espectro de fluorescencia que identifica al material.



*Figura 1: Diseño simplificado de un espectrómetro. Este dispositivo consiste en su forma más básica de una fuente de excitación (lámpara o luz láser) para la excitación de la muestra, un accesorio para el montaje de la muestra y un detector de luz (tubo fotomultiplicador o CCD).*

La forma más común de describir los procesos de absorción y emisión de luz es mediante un diagrama de Jablonski como el mostrado en la Figura 2. En estos diagramas se presenta el modelo de los estados de energía de algún fluoróforo o material (estado base, primer estado excitado, segundo estado excitado, etcétera) y permite ilustrar los procesos de absorción y emisión de luz atribuidos principalmente a la estructura electrónica del material.

En general, el proceso de absorción de fotones en los materiales ocurre en la escala de los femtosegundos ( $1\text{fs} = 10^{-15}\text{ s}$ ) y excita electrones en su estado base a distintos niveles energéticos superiores. Un electrón de la muestra que fue excitado de su estado base a un estado excitado puede relajarse vibracionalmente o realizar una conversión interna, ambas relajaciones no radiativas del orden de  $10^{-12}$  segundos, donde si se relaja vibracionalmente hasta el nivel vibracional más bajo del estado excitado puede relajarse radiativamente al

estado base o algún nivel vibracional del estado base emitiendo un fotón fluorescente con energía igual a la diferencia entre los niveles encargados en su emisión. Otro proceso que se puede observar a tiempos más grandes es la fosforescencia, que ocurre cuando un electrón excitado se relaja vibracionalmente al nivel vibracional más bajo del estado excitado y realiza una conversión interna a un estado vibracional del tipo triplete, donde tras haber perdido energía se relaja al estado base emitiendo un fotón fosforescente cuyo tiempo de relajación tiene una duración de segundos o minutos, siendo ésta ordenes de magnitud superior a los tiempos de la fluorescencia.

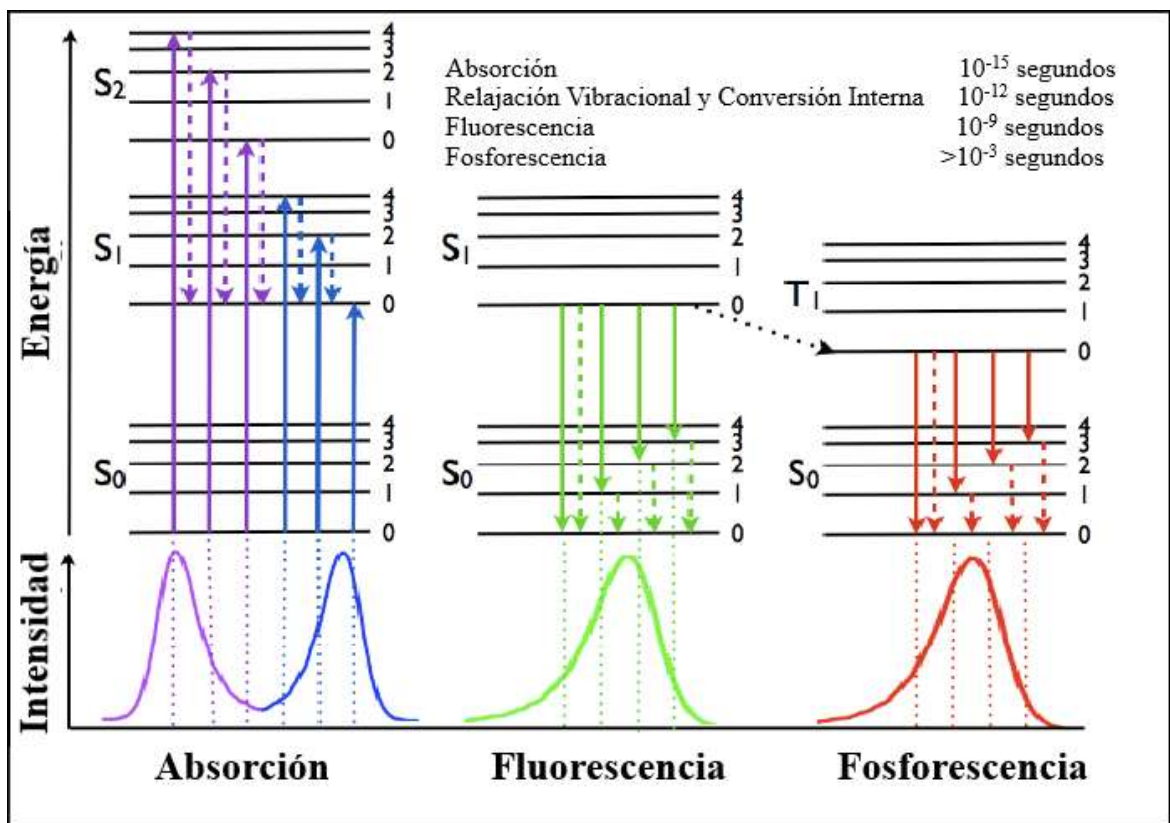


Figura 2: Diagrama de Jablonski que ilustra las posibles transiciones electrónicas que puede realizar un electrón de la muestra al ser excitada. Los tiempos de transición son identificados en la esquina superior derecha. Las líneas solidas dirigidas hacia arriba representan una absorción y las que son dirigidas hacia abajo representan una emisión. Las líneas de color segmentadas representan relajaciones vibracionales y la línea segmentada negra corresponde con una conversión interna.

### 2.3 Nanotermómetros Fluorescentes

Los nanotermómetros fluorescentes son sensores de temperatura de tamaños nano (1-100 nm) que presentan propiedades ópticas sensibles a la temperatura y se caracterizan por: 1) su morfología, 2) su tamaño, 3) su estructura cristalina, 4) su composición química, 5) su funcionalización superficial y 6) sus impurezas embebidas en la red atómica que los compone.

Cualquier nanotermómetro fluorescente puede ser estudiado por medio de la espectroscopía de fluorescencia donde principalmente se correlacionan espectros de fluorescencia con la estructura electrónica y vibracional del nanotermómetro en un rango espectral limitado por el detector (por ejemplo, de 180 nm a 900 nm). Es común la observación de bandas definidas en la región visible del espectro electromagnético atribuidas a impurezas en la estructura cristalina del nanotermómetro y son caracterizadas por añadir una estructura electrónica adicional a la de su red cristalina. Actualmente, existen diversos nanotermómetros fluorescentes disponibles. Por ejemplo, existen aquellos basados en: nanodiamantes<sup>42,64-66,80</sup>, nanopartículas metálicas (oro o plata o core-shell)<sup>90,91</sup>, polímeros<sup>92,93</sup>, proteínas fluorescentes<sup>94,95</sup>, nanopartículas orgánicas<sup>76,96</sup> y aquellos basados en nanopartículas dopadas con tierras raras<sup>97-99</sup>. Todos estos nanotermómetros poseen un espectro de excitación y emisión característico que permite su identificación uno de otro.

El desempeño de los nanotermómetros fluorescentes demuestra entonces ser un desafío en términos de resolución espacial y resolución espectral; sin embargo, su biocompatibilidad es un requerimiento esencial para su internalización en medios celulares. La adición de nanopartículas en medios celulares resulta ser impredecible. Podría cambiar el ambiente químico celular, su morfología o la función celular del medio. Este tipo de fenómenos son de peculiar análisis debido a que el objetivo principal es poseer de un nanotermómetro fluorescente biocompatible que no altere el ambiente químico celular ni dañe a las células.

### 2.3.1 Nanodiamantes Fluorescentes

Los Nanodiamantes Fluorescentes (FNDs) se distinguen del resto de los nanotermómetros porque exhiben propiedades luminiscentes debido a los centros de color embebidos en su red cristalina; además, son químicamente estables, son biocompatibles en concentraciones específicas<sup>100</sup> y es posible realizar una funcionalización superficial<sup>101</sup>, convirtiéndolos en una plataforma multifunción.

Los centros de color son formados debido a distintas impurezas de nitrógeno, boro, germanio, níquel o silicio en la estructura cristalina del nanodiamante<sup>38,102</sup>. En general, la impureza más común en el diamante es el nitrógeno y a su vez, forma centros de color del tipo NV, que emiten una fluorescencia dentro del espectro electromagnético visible en forma de dos bandas, en 575 nm y 637 nm<sup>65,103</sup>.

Los nanodiamantes fabricados por el hombre fueron producidos por primera vez realizando detonaciones de explosivos ricos en carbono como el trinitrotolueno (TNT), octógeno (HMX) o ciclotrimetileno trinitramina (RDX) en un ambiente deficiente de oxígeno para evitar la oxidación del carbono, dando lugar a lo que hoy en día se conoce como Nanodiamantes por Detonación<sup>104,105</sup>. Otros métodos de síntesis han sido estudiados como lo son la ablación láser<sup>106</sup>, la trituración de monocristales de diamante<sup>107</sup>, la síntesis de alta presión y alta temperatura (HPHT)<sup>106</sup>, la deposición por vapor químico (CVD), la formación asistida por micro plasma de etanol a presión atmosférica<sup>108</sup>, la cloración de carburos<sup>59</sup>, la irradiación iónica de grafito<sup>109</sup>, el crecimiento mediante la irradiación electrónica de capas de carbono sobre nanodiamante<sup>110</sup> y la cavitación ultrasónica<sup>111</sup>. Hasta la fecha, la síntesis por detonación de explosivos sigue siendo la más eficiente y produce toneladas de nanodiamantes al año.

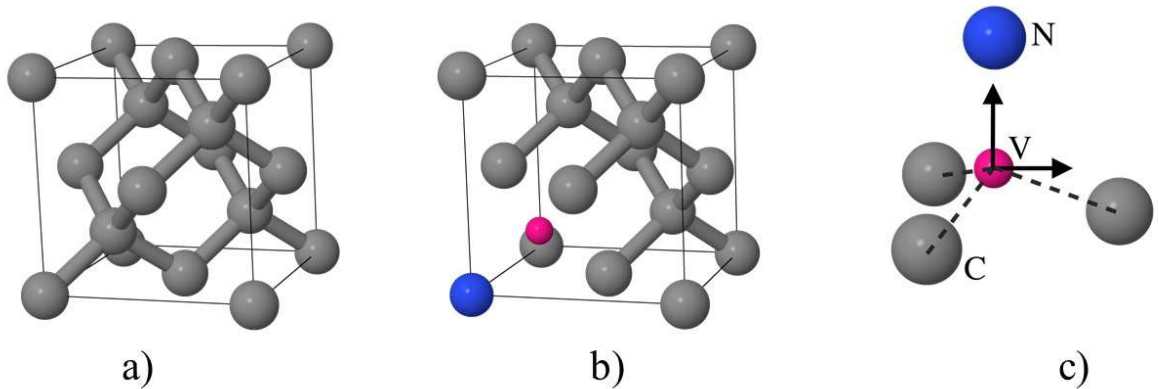
El diamante (y el nanodiamante) es conocido por ser el material más duro conocido por el hombre. Esto se debe a sus altas energías de enlaces electrónicos entre carbono-carbono de alrededor de 285.1 eV<sup>112</sup> con una separación de aproximadamente de 0.15 nm con un ángulo de 109.5°<sup>113</sup>, correspondientes a un enlace híbrido sp<sup>3</sup>. Estos materiales poseen una estructura cristalina cúbica simple centrada en las caras, tienen una densidad de: 3.51g/cm<sup>3</sup> para el diamante<sup>114,115</sup> y 3.3 g/cm<sup>3</sup> para el nanodiamante<sup>116</sup>, son transparentes con

un índice de refracción de 2.417, dispersan la radiación efectivamente y su conductividad térmica es de  $2000 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$  <sup>117</sup>.

Algunas aplicaciones modernas de los nanodiamantes son en superficies metálicas y en lubricantes <sup>118</sup> y en productos de cuidado de la piel como bloqueadores solares. Otras aplicaciones importantes de los nanodiamantes yacen en su uso como biomarcadores y bioetiquetas fluorescentes <sup>27</sup> para fines antirrobo <sup>119</sup>. El uso de sus centros de color para la detección de campos electromagnéticos atómicos ha sido estudiado <sup>120</sup> y se ha explorado su uso para la detección de gradientes térmicos en células vivas <sup>121</sup>. Existen estudios de cómo los nanodiamantes portan una capa acuosa en su superficie <sup>122,123</sup> lo cual añade una propiedad adicional a su biocompatibilidad. Por otra parte, también se ha reportado su uso como portadores de pequeñas moléculas como ácidos nucleicos y proteínas <sup>124</sup>. Otras aplicaciones que aprovechan de las propiedades del nanodiamante surgen en el sector ortopédico, oftalmológico y dental donde su uso terapéutico es explotado <sup>83,125,126</sup>.

La presencia de centros de color en la red cristalina del nanodiamante les provee de un mecanismo fluorescente que es ópticamente detectado en la región visible del espectro electromagnético. En particular el centro de color NV es de interés ya que es el centro de color más común. Específicamente, los centros de color NV son un defecto puntual en la red del diamante que constan de: una sustitución de un carbono por un nitrógeno seguido por una vacancia atómica. Este centro de color no altera la estructura cristalina del diamante, pertenece al grupo de puntos con simetría  $C_{3v}$  y permite la inicialización y lectura de subniveles de spin mediante la estimulación óptica <sup>127,128</sup>. A través de los años han surgido aplicaciones basándose en la medición de spin para su uso en la computación cuántica <sup>129</sup>.

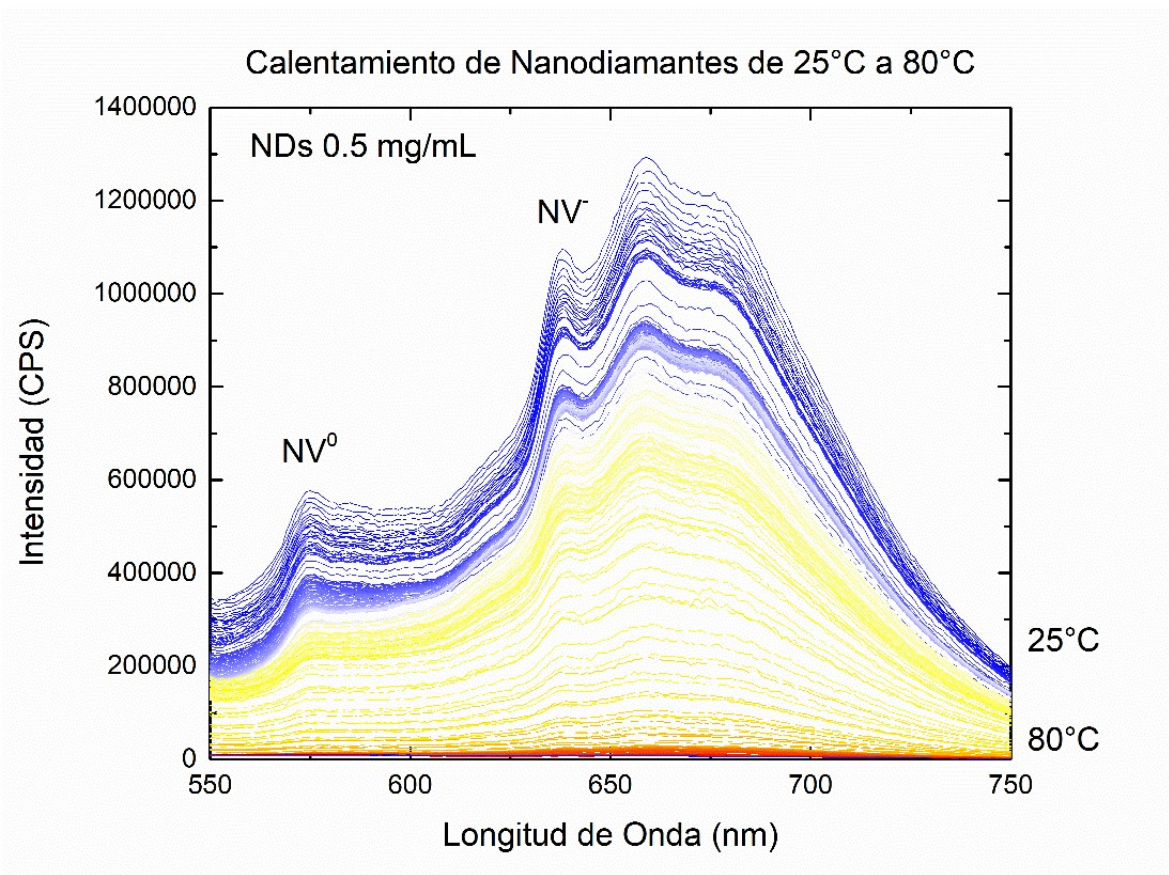
El centro de color NV tiene 3 carbonos vecinos a la vacancia como se muestra en la Figura 3 donde cada carbono aporta de un electrón y el nitrógeno aporta dos electrones al centro de color NV. La descripción de 5 electrones corresponde a la estructura electrónica del centro de color de carga neutro,  $NV^0$ . Este centro al atrapar otro electrón de los alrededores de la red o de otro centro de color NV se convierte en el centro de color cargado negativamente  $NV^-$ . Estos estados de carga del centro de color NV emiten una fluorescencia detectable en 575 nm y 637 nm respectivamente<sup>65</sup>. Estos dos estados de carga son responsables de dos posibles estructuras electrónicas en el nanodiamante, y permiten el salto de una estructura a otra mediante la pérdida o ganancia de un electrón en el centro de color<sup>46</sup>.



*Figura 3: Estructura cristalina del a) diamante y b) del centro de color NV. c) Centro de color NV conformado por 3 carbonos, 1 nitrógeno y 1 vacancia. La modificación de dos carbonos por un nitrógeno y una vacancia no altera la estructura cristalina cubica centrada en las caras del diamante.*

Existen 3 estados de carga conocidos en el centro de color NV embebidos en los nanodiamantes:  $NV^+$ ,  $NV^0$  y  $NV^-$ . Solo los estados de carga  $NV^0$  y  $NV^-$  presentan fluorescencia en el rango visible de espectro electromagnético<sup>65,120,127</sup>. El poco conocido estado de carga  $NV^+$  ha sido reportado<sup>130,131</sup> pero poco se conoce de sus aplicaciones convencionales. Estos 3 estados de carga llevan a cabo recombinaciones electrónicas entre sí, lo que significa que es posible que un determinado centro de color  $NV^-$  pierda un electrón y se convierta en un centro de color  $NV^0$ <sup>46</sup>.





*Figura 4: Espectros de emisión de nanodiamantes en solución acuosa a distintas temperaturas. Este conjunto de espectros exhibe como la fluorescencia proveniente de nanodiamantes se modifica mediante cambios de la temperatura local de los nanodiamantes. Asimismo, es posible observar cómo las posiciones de emisión se conservan fijas ( $NV^0$ : 575 nm y  $NV^-$ : 637 nm), mientras que la intensidad y anchura se modifican durante el calentamiento de los nanodiamantes. Esta colección de espectros se obtuvo mediante un calentamiento de 25 °C a 80 °C, con pasos de 0.2 °C, una tolerancia de 0.1 °C, 20 minutos de equilibrio térmico y un tiempo de integración de detección de 0.1 segundos*

### 2.3.2 Factores Influyentes en la Fluorescencia de Nanotermómetros Fluorescentes

Como se mencionó previamente en la Sección 2.2, el proceso de fluorescencia depende de que un sistema absorba energía en forma radiación electromagnética. Mientras esto ocurre, dentro del material pueden pasar distintos tipos de recombinaciones electrónicas en distintos niveles energéticos conocidas también como transiciones electrónicas.

En el caso del nanodiamante existen las transiciones que pueden ser de carácter no radiativo y las transiciones de carácter radiativo. Las transiciones no radiativas se desglosan en relajaciones vibracionales y conversiones internas que ocurren sin la emisión de fotones en su proceso de relajación. Por otra parte, las transiciones radiativas conllevan la emisión de fotones fluorescentes o fosforescentes durante el proceso de relajación.

Las relajaciones vibracionales ocurren cuando la energía absorbida es transformada en forma de colisiones vibracionales (calor) y sus tiempos de vida son del orden de  $10^{-12}$  segundos.

Las conversiones internas son transiciones electrónicas que ocurren entre dos niveles de energía electrónicos (el nivel más bajo del estado excitado y el nivel más alto del otro estado electrónico) y tienen tiempos de vida similares a los de las relajaciones vibracionales.

La fluorescencia ocurre mediante la relajación radiativa de un electrón en cualquiera de los estados excitados hacia el estado base y tiene tiempos de vida del orden de  $10^{-9}$  segundos. La fosforescencia puede durar desde segundos hasta minutos y ocurre mediante una conversión interna de un nivel excitado a un nivel triplete perdiendo un poco de energía y liberando el resto en forma de un fotón fosforescente.

Se han observado bandas fluorescentes que tienen longitudes de onda más largas o más cortas que la energía de la banda responsable de la excitación y se conocen como bandas de corrimiento Stokes y Anti-Stokes<sup>132</sup>, respectivamente. Además, existe una radiación resonante, o fluorescencia resonante, radiación que es emitida sin cambio en la longitud de onda que la radiación de excitación. Esto se debe a que la diferencia de energía entre los estados vibracionales es aproximadamente la misma, tanto para el estado base como para el estado excitado o bien absorbe y emite casi las mismas longitudes de onda resonantes. Como consecuencia, frecuentemente los espectros de absorción y emisión de radiación son

observados como imágenes espejo una de otra, con un traslape que ocurre en su línea de resonancia<sup>133</sup>.

Existen diversos factores que alteran la actividad fluorescente molecular, la siguiente lista describe los factores más comunes que ocurren y afectan la fluorescencia de fósforos en general:

- **Rendimiento Cuántico:** Es el cociente entre número de moléculas fluorescentes y el número de moléculas excitadas<sup>134</sup>. Moléculas altamente fluorescentes aproximan esta relación a 1 (significando que cada molécula excitada también es una molécula fluorescente) y las moléculas no fluorescentes prácticamente aproximan un valor a 0.
- **Temperatura:** La eficiencia cuántica de la fluorescencia disminuye en muchas moléculas con el aumento de temperatura, debido a que este aumento térmico incrementa la frecuencia de colisiones entre moléculas y además incrementa la probabilidad de un proceso donde los estados electrónicos excitados pasen a estados electrónicos de menor energía (a veces, el estado base). En este proceso, la energía electrónica es eventualmente convertida en calor y depende de que tantas colisiones moleculares ocurren en un dado tiempo<sup>133</sup>. Suele ser nombrada como *Quenching* de Colisión.
- **Quenching:** El *quenching* es cualquier proceso que disminuya la intensidad fluorescente de una molécula y se debe a procesos aleatorios y pueden provenir de transferencias de energía, colisiones o incluso modificaciones al estado excitado de la molécula debido al medio que la rodea<sup>135</sup>. Cada nanotermómetro fluorescente indica una interacción química específica por lo que cada uno tendrá su quenching específico debido al ambiente físico local.
- **Quenching Térmico:** El *quenching térmico* es la disminución de la eficiencia cuántica de algún fluoróforo sometido a alguna temperatura alta debido al incremento de transiciones electrónicas no radiativas a esa temperatura. Estas transiciones no radiativas suceden con mayor probabilidad a medida que la temperatura aumenta y favorecen el retorno de los electrones excitados del fluoróforo al estado base mediante relajaciones no radiativas.

- **Instrumentación:** Con el avance del tiempo y la tecnología se ha permitido la realización de distintos componentes como fuentes de luz, rejillas de difracción, espejos y detectores que a su vez han permitido la observación de nuevas características espectroscópicas antes no percatadas por límites espectrales o de saturación de señal. Consecuentemente, el uso de distintas piezas en un arreglo espectroscópico brindará de la observación de resultados específicos a dichas piezas.

## **3 Resultados Experimentales**

### **3.1 Hipótesis**

Es posible utilizar la fluorescencia de nanodiamantes fluorescentes de manera controlada con el fin de estimar la temperatura en sistemas biológicos celulares considerando la suspensión, concentración, el número de centros nitrógeno-vacancia, así como las interacciones electrónicas no radiativas.

### **3.2 Objetivos Generales**

Estudiar la actividad fluorescente de los nanodiamantes mediante la variación de tamaño de partícula, temperatura y concentración.

Establecer un modelo matemático que aproxime con mejor precisión la temperatura local de los nanodiamantes en términos de su actividad fluorescente para fines de bioimagen fluorescente y termometría en la nano y micro escala.

### **3.3 Objetivos Particulares**

1. Caracterización fluorescente de nanodiamantes de distintos tamaños.
2. Caracterización fluorescente de nanodiamantes a distintas concentraciones.
3. Caracterización fluorescente de nanodiamantes a distintas temperaturas.
4. Establecer un modelo termométrico que estime correctamente la temperatura local del nanodiamante en términos de sus líneas de fonón-cero de Nitrógeno-Vacancia (NV).
5. Estudiar la biocompatibilidad de los nanodiamantes en términos de su concentración en soluciones acuosas.

### **3.4 Materiales y Métodos**

#### **3.4.1 Nanodiamantes Fluorescentes**

Los Nanodiamantes Fluorescentes fueron adquiridos de la empresa Sigma Aldrich (número de pieza 900174-5mL) con las características siguientes: más de 900 centros de color NV por partícula, un tamaño promedio de 100 nm, suspendidos en agua desionizada, hidroxilados y en concentración de 1 mg/mL (0.1% w/v).

Para la reconcentración de soluciones acuosas de nanodiamantes se secó 1 mL de FNDs de concentración inicial 1 mg/mL en un horno (ThermoScientific Lindberg Blue M V0914A) a una temperatura constante de 70 °C por un total de 48 horas hasta que solo polvo (1 mg) quedará como sedimento al fondo del frasco. A este polvo se le añadió un volumen de 100 mL de agua miliQ y se agitó con la ayuda de un Vortex, resultando en una concentración inicial de 10 mg/mL. Posteriormente, las concentraciones siguientes se obtuvieron mediante la adición de agua y agitación utilizando el mismo proceso para obtener de manera secuencial cada una de las concentraciones en mg/mL :10, 7.5, 5, 2.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.1, que fueron utilizadas para este trabajo de investigación.

#### **3.4.2 Análisis de Datos**

El análisis de todos los datos, así como las gráficas obtenidas y los ajustes realizados fueron procesados utilizando el software Origin (OriginLab, Northhampton, MA, EE. UU.). Asimismo, fue utilizado para extraer los datos relacionados con la intensidad relativa, anchura a media altura (FWHM) y así como la posición de las líneas de fonón cero de ambos estados de carga de los centros de color NV ( $NV^0$ , 575 nm y  $NV^-$ , 637 nm). Este análisis consistió en lo siguiente: una corrección de línea base al espectro que fue ajustada debajo de cada línea de fonón cero y bandas laterales. Después fue sustraída del mismo con la finalidad de obtener solamente los picos fluorescentes y sus intensidades relativas. Como paso final, una función Gaussiana es ajustada a cada una de las bandas con la finalidad de obtener la anchura y posición de cada pico.

Para efecto de brindar una explicación más detallada de este proceso, en la Figura 5a se muestra un espectro de emisión de fluorescencia obtenido para una concentración de nanodiamantes de 1 mg/mL suspendidos en agua miliQ grabado con una excitación láser de 532 nm. En la parte inferior de esta gráfica es posible observar el espectro filtrado proveniente de la substracción de la línea base al espectro experimental. De igual forma, en la Figura 5b se muestran las posiciones ajustadas para cada uno los estados de carga de los centros de color mediante funciones Gaussianas. Por lo tanto, realizando este tratamiento de los datos es posible obtener la información detallada de cada uno de los picos asociados a los estados de carga. Un detalle cuya mención es relevante es que el coeficiente de absorción del agua tiene una franja de transparencia en la región visible del espectro<sup>136</sup>, lo cual indica que poca o nada de luz visible es absorbida por las moléculas de agua. Esto como consecuencia permite la excitación de nanodiamantes suspendidos en agua con cualquier longitud de onda visible sin ser atenuada significativamente por el agua. Adicionalmente, otro aspecto importante que es necesario considerar es como el momento dipolar eléctrico las moléculas de agua presenta una actividad anómala para la temperatura de 60 °C. Se ha reportado cómo el plasmón de resonancia superficial de nanopartículas de oro y plata se corre espectralmente al azul para temperaturas de recocido en agua mayores de 60 °C<sup>137</sup>. Esta actividad es atribuida a ligeros cambios estructurales del agua, la cual realiza cambios de una configuración de baja temperatura (0-60 °C) con un valor de  $\mu_{fría} = 2.18 D$ , muy cercano al momento dipolar del hielo, a una configuración de alta temperatura (60-100 °C) con  $\mu_{caliente} = 1.87 D$ , el cual es idéntico al momento dipolar del vapor de agua. Este tipo transformaciones a la carga eléctrica neta alrededor de las moléculas del agua podría a su vez afectar la forma en que se atenúa el frente de onda de la luz incidente antes de excitar alguna nanopartícula, como un nanodiamante, y como consecuencia detectar ligeros cambios en el espectro de fluorescencia.

Los ajustes lineales de la intensidad relativa en términos de la temperatura fueron analizados acorde a la ecuación  $I(T) = I_0 + I_1T$ , donde  $I$  es la intensidad relativa medida en unidades arbitrarias,  $I_0$  es una constante,  $I_1$  es la pendiente de la recta y  $T$  es la temperatura en grados Celsius. Además, se calcularon los valores de calidad ajuste de  $R^2$  para la corroboración de una dispersión de datos lineal y precisión de estimación.

Los ajustes no lineales de la intensidad relativa en términos de la concentración demostraron una dispersión de datos de cuarto de orden, ajustadas mediante la ecuación  $I(c) = I_0 + I_1c + I_2c^2 + I_3c^3 + I_4c^4$ , donde  $I$  es la intensidad relativa en unidades arbitrarias,  $I_0, I_1, I_2, I_3, I_4$  son constantes y  $c$  es la concentración en mg/mL. Adicionalmente se verificó este ajuste calculando el valor de ajuste  $R^2$ .



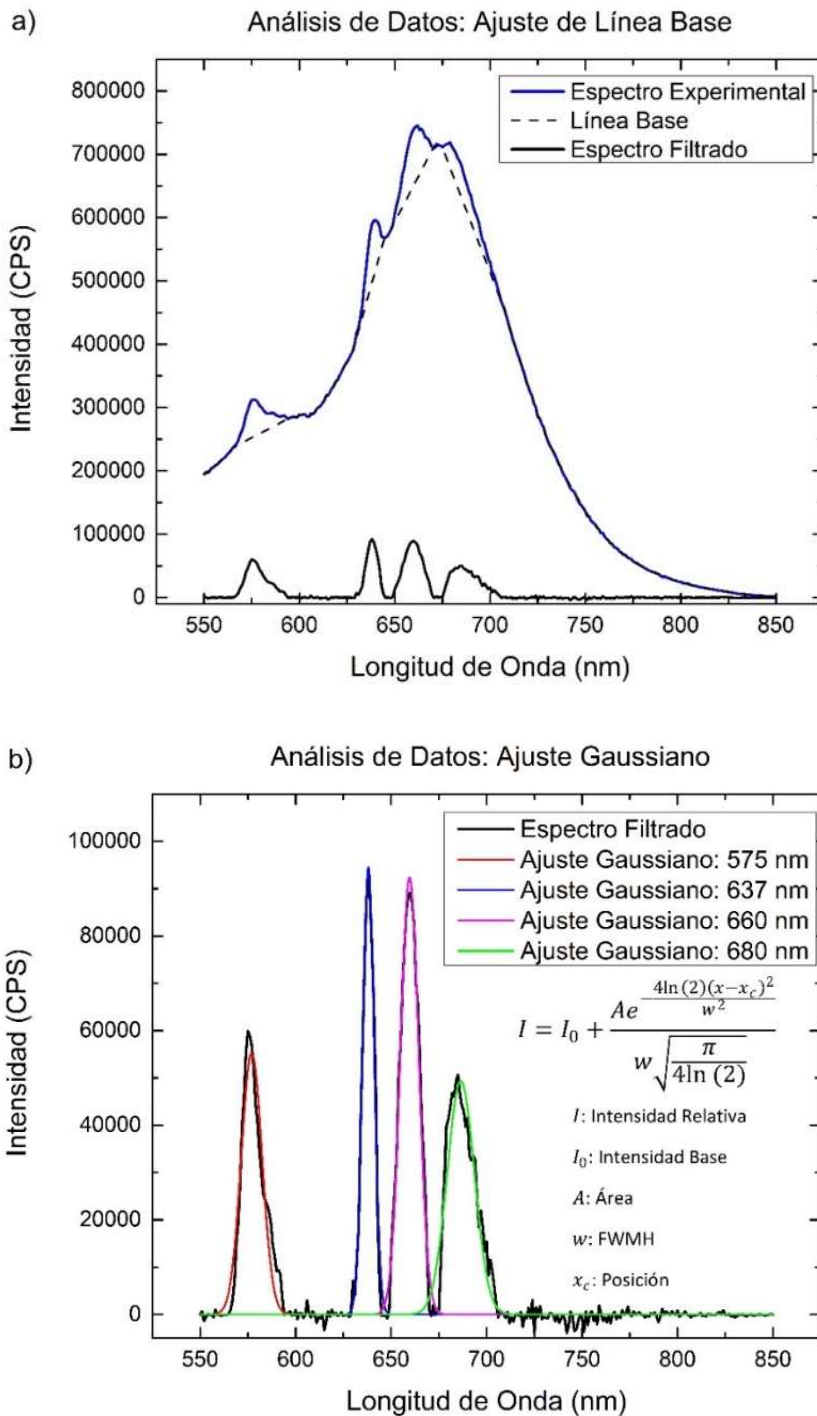


Figura 5: Análisis de datos correspondiente a los espectros de emisión de nanodiamantes. El ajuste y substracción de la línea base se muestra en a), dando como resultado un espectro filtrado compuesto solamente por las bandas de emisión de los nanodiamantes. Estas bandas fueron ajustadas mediante una función Gaussiana mostrado en b), de las cuales se extrajeron su intensidad relativa, anchura y posición para su interpretación.

## 3.5 Técnicas Experimentales

### 3.5.1 Espectroscopía de Fluorescencia

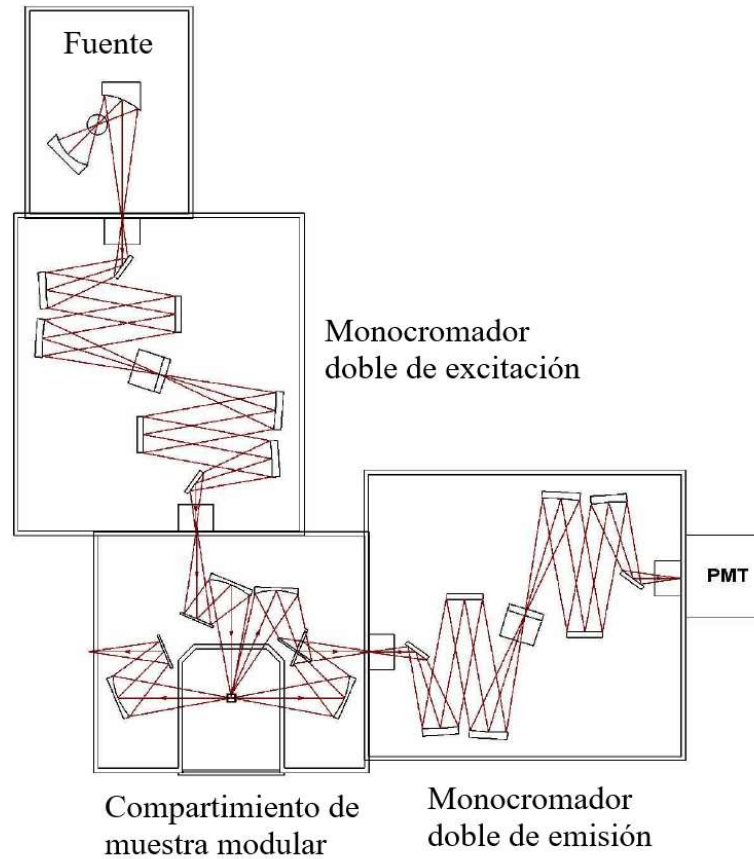
Para poder observar y grabar espectros de excitación y espectros de fluorescencia es necesario el uso de un espectrómetro, descrito en la sección 2.2. El espectrómetro Fluorolog 3 FL3-22 posee de un doble monocromador de excitación y de emisión, una lámpara de xenón de 450 W y un tubo fotomultiplicador Hamamatsu R928P como detector de fotones (en cuentas por segundo, CPS). Este equipo se controla digitalmente desde el software propietario FluorEssense, permitiendo realizar escaneos de excitación, de emisión y de matriz excitación-emisión.

Los espectros de excitación se obtienen mediante la detección fija de una longitud de onda de emisión versus un rango de longitudes de onda de excitación. Estos espectros contienen información relevante a la estructura electrónica de los estados excitados involucrada en la fluorescencia de la longitud de onda fija detectada. Por ejemplo, el pico más alto (o máximo) de un espectro de excitación, significa que a esa longitud de onda se observa una fluorescencia de intensidad máxima de la banda de emisión fija. Análogamente, para el caso de que del pico de excitación es un mínimo, se observa que a esa determinada longitud de excitación la intensidad de la fluorescencia es mínima.

Un espectro de emisión (o fluorescencia) se obtiene de manera análoga a los de excitación. En esta ocasión, la longitud de onda de excitación es fija (has difractado colimado de la lámpara o mediante la excitación láser externa) y se detecta un rango de longitudes de onda de emisión. Estos espectros contienen información relevante a la estructura electrónica del material en forma de bandas de emisión de luz que pueden o no ser observadas dada la longitud de onda excitación.

El equipo Fluorolog 3 FL3-22 permite la observación de excitación o emisión de luz en el rango espectral de 180-900 nm, con la capacidad de realizar un barrido en una rejilla (de unidades nanómetro de grosor), sobre el rango especificado, con una resolución de pasos de décimas o centésimas de nanómetro. Por otro lado, el control de la temperatura de la muestra se controló digitalmente mediante el uso de un sistema de enfriamiento líquido Temperature Bath F-3030 y el accesorio de montaje de pieza Single-Position Thermostatted

Cell Holder FL-1027, ambos de Horiba Scientific. El software FluorEssense admite la configuración del rango térmico en forma de temperatura inicial y final, paso de temperatura, tolerancia de temperatura y tiempo de equilibrio térmico una vez alcanzado el punto de temperatura.



*Figura 6: Arreglo experimental óptico del espectrómetro modular Fluorolog 3 FL3-22. Este equipo cuenta con una fuente de excitación en forma de una lámpara de xenón de 450 W de potencia de iluminación, un doble monocromador de excitación y de emisión y un tubo fotomultiplicador Hamamatsu R928P como detector.*

### 3.6 Resultados

Los resultados mostrados a continuación son relevantes a la termometría fluorescente basada en nanodiamantes fluorescentes para fines biomédicos y de bioimagen. Los nanodiamantes fluorescentes demuestran ser nanotermómetros fluorescentes caracterizados por escalas termométricas lineales desprendidas de la fluorescencia de sus dos estados de carga de nitrógeno-vacancia ( $NV^0$  y  $NV^-$ ). Estas escalas tienen a su vez una precisión térmica del orden de centésimas de Celsius ( $10^{-2}$  °C), son resueltas espacialmente hasta el tamaño de nanopartícula de 35 nm, 70 nm o 100 nm y permanecen invariantes ante cambios de concentración de nanodiamantes en solución acuosa.

#### 3.6.1 Estructura Electrónica de Nanodiamantes Fluorescentes con Centros de Color NV

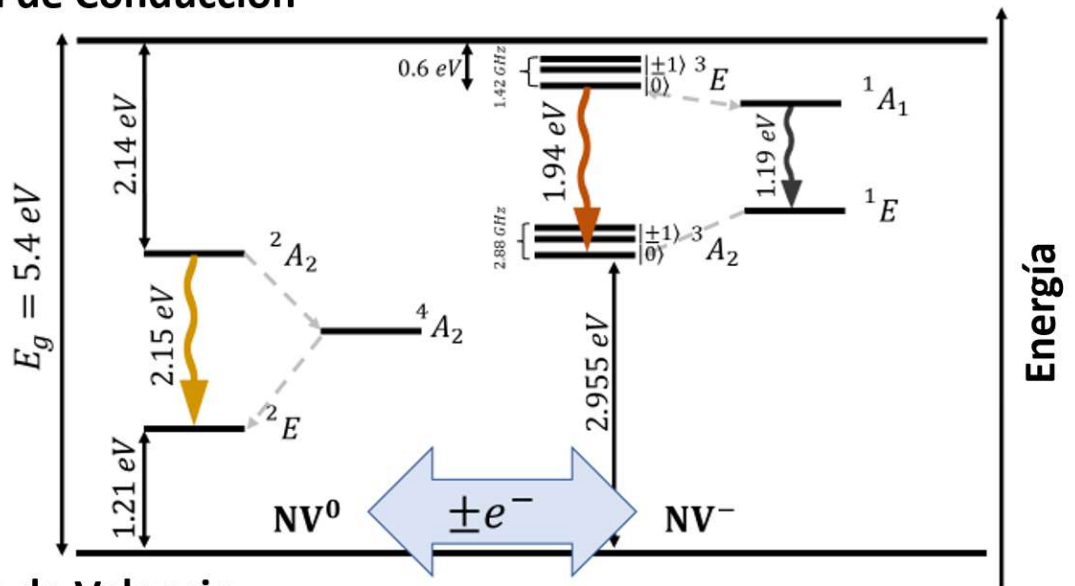
La fluorescencia proviene de la emisión de fotones por parte de los centros de color NV tras que uno de sus electrones absorbe la suficiente energía para saltar a estados electrónicos excitados superiores, donde pueden perder un poco de energía en forma de calor, relajación vibracional, conversión interna; o bien, decayendo directamente al estado base (o alguno de sus subniveles vibracionales) emitiendo un fotón de energía equivalente a la diferencia energética relativa entre los dos niveles electrónicos (estado excitado y estado base). También existe la fluorescencia retardada, o fosforescencia, que involucra la absorción de energía, una conversión interna a un estado electrónico triplete y luego la emisión espontánea de un fotón durante la transición al estado base.

Las transiciones electrónicas son caracterizadas por sus tiempos de vida y por si son radiativas o no radiativas, mostrado en la Figura 2. Las transiciones radiativas conllevan la emisión de fotones tras relajaciones al estado base molecular involucrado, y las transiciones no radiativas (como las relajaciones vibracionales y conversiones internas) no involucran la emisión de fotones durante su recombinación.

El diagrama de Jablonski para nanodiamantes con centros de color NV fluorescentes se muestra en la Figura 7. Los dos estados de carga de los centros de color NV desprenden dos estructuras electrónicas embebidas en el cristal del nanodiamante y pueden ser moduladas mediante la pérdida o ganancia por parte del centro. Las transiciones radiativas

${}^2A_2$ - ${}^2E$  ( $NV^0$ ) y  ${}^3E$ - ${}^3A_2$  ( $NV^-$ ) son aquellas involucradas en la fluorescencia de los centros de color NV en el diamante. Se destaca asimismo que el estado base y excitado del estado de carga  $NV^-$  son tripletes (dando lugar a dos líneas de fonón lateral en 660 y 680 nm, respectivamente), mientras que el estado de carga que posee el centro  $NV^0$  es un doblete. Ambas estructuras electrónicas poseen de estados metaestables ( $NV^0$ :  ${}^4A_2$  y  $NV^-$ :  ${}^1A_1$  y  ${}^1E$ ) que apantallan la fluorescencia mediante conversiones internas a estos niveles electrónicos; sin embargo, el estado de carga  $NV^-$  es el único que contiene una transición radiativa  ${}^1A_1$ - ${}^1E$  que favorece la emisión de un fotón infrarrojo de 1042 nm de longitud de onda dentro de su estructura metaestable.

### Banda de Conducción



### Banda de Valencia

Figura 7: Diagrama de Jablonski de los centros de color NV en nanodiamantes. Las flechas curvas de color denotan las transiciones radiativas (fluorescencia) de los centros. La pérdida o ganancia de un electrón puede modular el estado de carga de los centros de color NV.

### 3.6.2 Espectros de Excitación de Nanodiamantes Fluorescentes

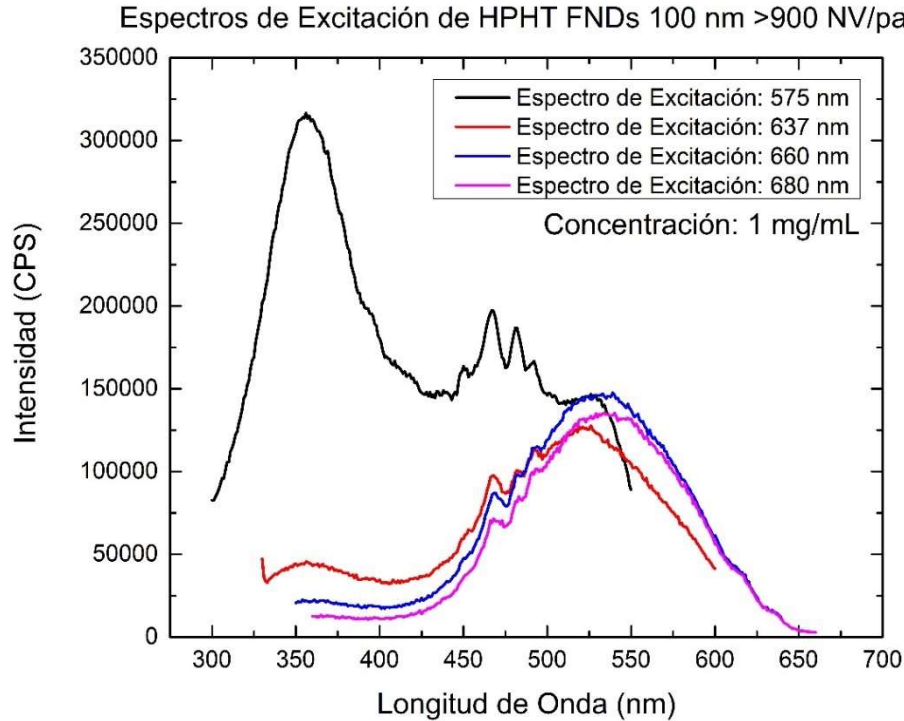
Los nanodiamantes fluorescentes poseen un amplio espectro de emisión fluorescente en el rango de 550-850 nm. Este espectro está compuesto de las bandas fluorescentes descritas en la sección anterior y mostradas en el diagrama de Jablonski de la Figura 7. Estas bandas fluorescentes pueden ser excitadas a distintas intensidades emisivas en función de la longitud de onda de excitación. En la Figura 8 se muestran los espectros de excitación de las 4 bandas de emisión principales de los nanodiamantes fluorescentes concentrados a 1 mg/mL. Sus posiciones espectrales se localizan en 575 nm, 637 nm, 660 nm y 680 nm, correspondientes al estado de carga  $NV^0$ ,  $NV^-$  y sus dos bandas laterales, respectivamente.

Los espectros de excitación de nanodiamantes concentrados a 1 mg/mL fueron grabados usando el espectrómetro Fluorolog 3 FL3-22 equipado con la lámpara de xenón y un tubo fotomultiplicador. El escaneo de excitación con la lámpara se fijó desde 300 nm hasta 650 nm en pasos de 1 nm con una rejilla de 5 nm de grosor y un tiempo de integración de 0.1 s, para cada banda de emisión fijada en 575, 637, 660 y 680 nm, con una rejilla en el detector de 5 nm de grosor. La temperatura durante las mediciones se mantuvo fija a 25 °C con ayuda de los accesorios de enfriamiento líquido.

El espectro de excitación del centro de color  $NV^0$  (línea negra) se comprende principalmente por una banda amplia de alrededor de 120 nm de ancho centrada en 356 nm y, además, se observan 4 picos localizados en 450, 467, 482 y 492 nm, que permiten la fluorescencia del centro de color  $NV^0$ . Adicionalmente, la excitación con fotones de longitud de onda  $>532$  nm hacen que la fluorescencia rápidamente disminuya comparada con el resto del espectro.

El espectro de excitación del centro de color  $NV^-$  (línea roja) tiene características distinguibles comparadas con el espectro de excitación  $NV^0$ : la desaparición de la banda de excitación en 356 nm hasta casi ruido de fondo y la aparición de una banda amplia de alrededor de 180 nm de ancho centrada en 523 nm. Además, se observan 3 picos de excitación localizados en 467, 482 y 492 nm. Los espectros de excitación de las dos líneas de fonón lateral (660 nm: línea azul y 680 nm: línea rosa) son muy similares al espectro de excitación  $NV^-$ , ambas poseen aproximadamente la misma intensidad emisiva, tienen el mismo ancho

de banda de alrededor de 180 nm centrados en 523 nm y poseen de los mismos tres picos localizados en 467, 482 y 492 nm.



*Figura 8: Espectros de excitación de nanodiamantes fluorescentes concentrados a 1 mg/mL en agua. Se fijó la detección de emisión de las bandas 575 nm (línea negra), 637 nm (línea roja), 660 nm (línea azul) y 680 nm (línea rosa) a través de un escaneo de longitudes de onda de excitación para obtener un espectro que traza qué longitudes de onda de excitación permiten la mayor o menor intensidad de emisión de dicha banda de emisión fija.*

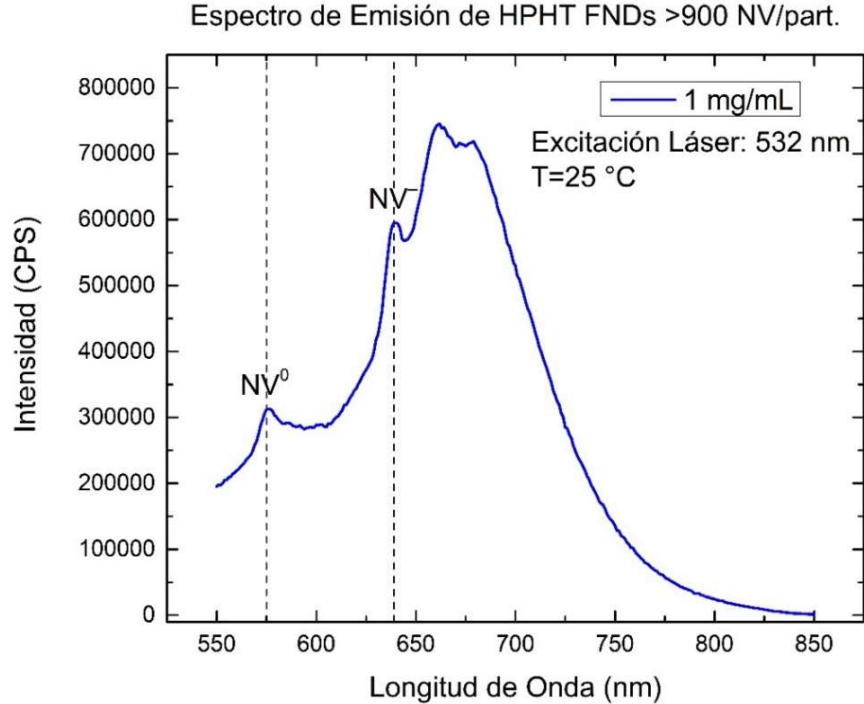
La excitación de estos nanodiamantes con un láser de 523 nm permitiría la máxima emisión del estado de carga  $NV^-$  y sus bandas laterales, pero también significaría que el estado de carga  $NV^0$  emitiría a su mínimo, alrededor de 2x menos intenso comparado con la excitación de 356 nm. Por otra parte, si se usara un láser de 356 nm como fuente de excitación se observaría entonces como el estado de carga  $NV^0$  emite en su máximo de intensidad fluorescente mientras que el estado de carga  $NV^-$  emitiría alrededor de 7x menos comparado con la excitación de 523 nm. Adicionalmente estos espectros muestran la estructura electrónica de niveles energéticos superiores al estado excitado encargado de la fluorescencia del centro de color NV ( $NV^0: {}^2A_2$  y  $NV^-: {}^3E$ ) encargados en la relajación radiativa observada para cada estado de carga.

### 3.6.3 Espectro de Emisión de Nanodiamantes Fluorescentes

La excitación de una muestra con distintas longitudes de onda afecta la forma en que la muestra emite luz. No cualquier longitud de onda será absorbida por la muestra ni tampoco cualquier longitud de onda será emitida. La absorción de luz por una muestra promueve electrones a estados excitados, que en su caso decaen rápidamente a estados de menor energía debido a pérdidas en forma de calor o por medio de una transición electrónica a un estado electrónico de menor energía; donde puede entonces perder el resto de su energía saltando al estado base liberando el exceso de energía en forma de un fotón. Este proceso es conocido como fluorescencia y es característico de la estructura electrónica de la muestra.

El espectro de emisión de nanodiamantes fluorescentes de 100 nm de tamaño, concentrados a 1 mg/mL y  $>900$  NV/partícula se muestra en la Figura 9. Este espectro fue grabado mediante la excitación láser de 532 nm a temperatura constante de 25 °C. Las características principales que lo componen son: las dos bandas de emisión debido al centro de color NV ( $NV^0$ : 575 nm y  $NV^-$ : 637 nm). Se observa asimismo dos bandas laterales al estado de carga  $NV^-$  (660 nm y 680 nm) y el ruido de fondo debido a la estructura de los nanodiamantes (tamaño promedio, geometría de nanodiamante e impurezas de carbonos en forma grafitica). Estos resultados son congruentes con lo reportado en la literatura en términos de la posición de la banda y transiciones radiativas asociadas para el estado de carga  $NV^0$  ( ${}^2A_2-{}^2E$ )<sup>127</sup> y el estado de carga  $NV^-$  ( ${}^3E-{}^3A_2$ )<sup>113</sup>. En adición a lo anterior, la emisión de ambos estados de carga poseen de estructura de bandas laterales, donde el estado de carga neutro presenta solo ruido vibracional después de 575 nm sin mostrar una banda lateral dominante y el estado de carga negativo presenta dos bandas laterales en 660 nm y 680 nm, separadas por 20 nm o 55 meV, atribuidas principalmente a su estructura de estados triplete<sup>138</sup>. Comparativamente, la separación de estas últimas dos bandas es reportada como 63 meV para nanodiamantes con centros de color NV fabricados mediante deposición de vapor químico<sup>44</sup> y 65 meV mediante cálculos computacionales de primeros principios<sup>138</sup>. Estas contribuciones producen la observación de un espectro de emisión que se expande





*Figura 9: Espectro de emisión de nanodiamantes fluorescentes concentrados a 1 mg/mL. Se usó una excitación láser de 532 nm de longitud de onda. Este espectro muestra 2 bandas características de los nanodiamantes con centros de color NV en 575 nm y 637 nm y, además, posee de 2 bandas laterales en las posiciones de 660 nm y 680 nm.*

desde 550 nm hasta 850 nm<sup>38</sup> dentro del rango visible del espectro electromagnético. Comparativamente, se puede apreciar como este espectro de emisión de nanodiamantes HPHT es muy parecido a aquél proveniente de nanodiamantes tipo Ib con centros de color NV implantados por bombardeo de iones de He<sup>+</sup> a 40 keV<sup>69</sup>, dando lugar a un perfil espectral similar, atribuido principalmente a la cantidad y distribución de centros NV en la red del diamante. Esta fluorescencia es muy intensa, comúnmente del orden de millones de cuentas por segundo para concentraciones de 1 mg/mL.

Un detalle importante a recalcar de estos resultados es que solo un espectro de fluorescencia no da una medida directa de la temperatura debido a que la intensidad fluorescente depende de la intensidad de excitación. Por ello, en este trabajo fue necesaria la observación sistemática de distintos espectros fluorescentes a distintas temperaturas conocidas, con la finalidad de obtener el modelo termométrico que mejor ajustara a los datos observados.

### 3.6.4 Nanotermometría Fluorescente Asistida por Nanodiamantes de Distintos Tamaños

Como se mencionó en las Secciones 2.3.2 y 3.3.3, distintos factores pueden dar lugar a la observación de ligeras alteraciones al espectro de emisión de nanodiamantes, principalmente debido a su tamaño y geometría de nanopartícula, ver Figura 10. El uso de nanodiamantes de tamaño <100 nm es necesario para la internalización intracelular de éstos y permitiría la medición de la temperatura intracelular de manera localizada y precisa mediante la observación del espectro de fluorescencia de esas zonas. Además, la cantidad de centros de color NV que pueda alojar cada nanodiamante influye en la intensidad de la fluorescencia. Numéricamente se puede comparar con el valor numérico  $R^2$  reportado en la Figura 11, donde la fluorescencia de nanodiamantes de 35 nm y 70 nm de tamaño pierden linealidad, atribuido principalmente a que poseen de una menor cantidad de centros de color NV, lo que resulta en una intensidad de emisión en promedio menor comparados con los de 100 nm.

Se dispusieron de nanodiamantes Sigma Aldrich de distintos tamaños (35, 70 y 100 nm), cada uno con su respectiva cantidad de centros de color para observar su espectro de emisión a distintas temperaturas y establecer escalas termométricas basadas en la fluorescencia de sus centros de color NV, ver Tabla 1.

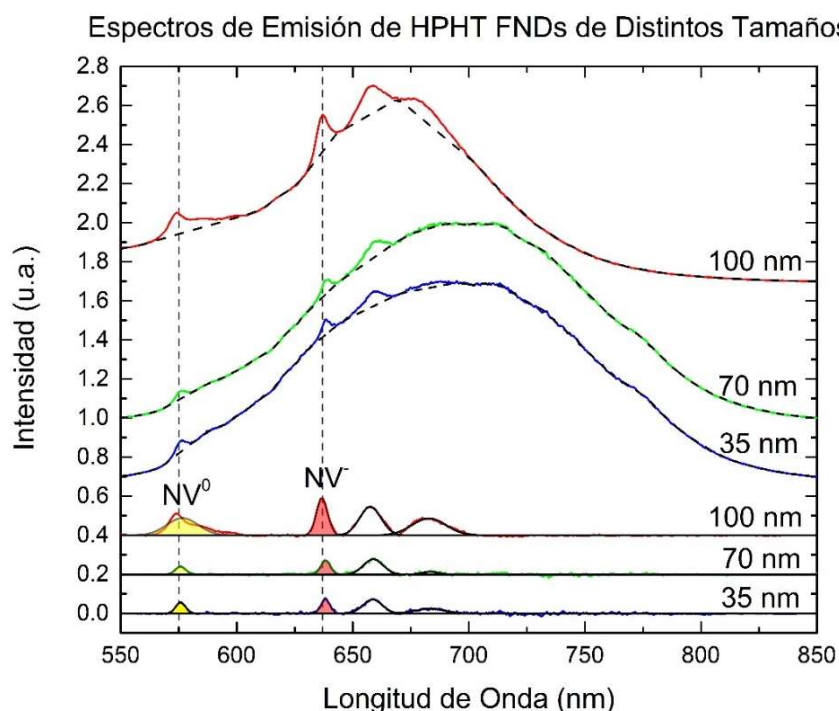
*Tabla 1: Nanodiamantes de distintos tamaños y con distintas cantidades de centros de color obtenidos del fabricante Sigma Aldrich. Estos nanodiamante son fabricados mediante un proceso HPHT y poseen una determinada cantidad de centros NV por partícula. Son contenidos en un vial de 5 mL a una concentración inicial de 1 mg/mL.*

Número de Pieza	Concentración	NV/partícula	Tamaño
900172-5mL	1 mg/mL	$\leq 4$	35 nm
798169-5mL	1 mg/mL	>300	70 nm
900174-5mL	1 mg/mL	>900	100 nm

El espectro de emisión de los nanodiamantes de 35 nm y 70 nm se capturó con un microscopio Olympus BX41 (Japón) equipado con un detector de InGaAs y un objetivo de 10x y NA 0.25, un láser OBIS de 532 nm usando 20 mW de potencia continua como fuente de excitación. El láser fue dirigido mediante una serie de espejos hacia el microscopio y luego enfocado a la muestra. La temperatura fue controlada mediante una placa de calentamiento en el rango de 25 °C a 60 °C en pasos de 1 °C con 20 minutos de equilibrio térmico. La

emisión fue capturada en el rango de 550 nm a 850 nm en pasos de 1 nm, con una rejilla de 2 nm de grosor y 0.1 segundos de integración.

El espectro de emisión de los nanodiamantes de 100 nm se capturó usando un Fluorolog-3 de Horiba Scientific modelo FL3-22 (Japón) equipado con un tubo fotomultiplicador Hamamatsu R928P y un láser OBIS de 532 nm con 20 mW de potencia continua como fuente de excitación. El control de la temperatura se realizó mediante un sistema de enfriamiento líquido F-3030 y la pieza de montaje FL-1027, ambas de Horiba Scientific. El software FluorEssense permitió el escaneo de emisión de luz en un rango de 25 °C a 60 °C con pasos de 1 °C con una tolerancia de 0.1 °C y 20 minutos de equilibrio térmico. El espectro de emisión se capturó en el rango de 550 nm a 850 nm con pasos de 1 nm, una rejilla de 2 nm de grosor y 0.1 segundos de tiempo de integración.



*Figura 10: Espectros de emisión de nanodiamantes fluorescentes de distintos tamaños a 25 °C. Las líneas sólidas de color superiores son los espectros de emisión normalizados, las líneas punteadas negras superiores representan la línea base de fondo, las líneas sólidas de color inferiores son los espectros filtrados, las líneas sólidas negras inferiores representan los ajustes con curvas Gaussianas y las áreas coloreadas corresponden a la fluorescencia de los centros de color NV.*

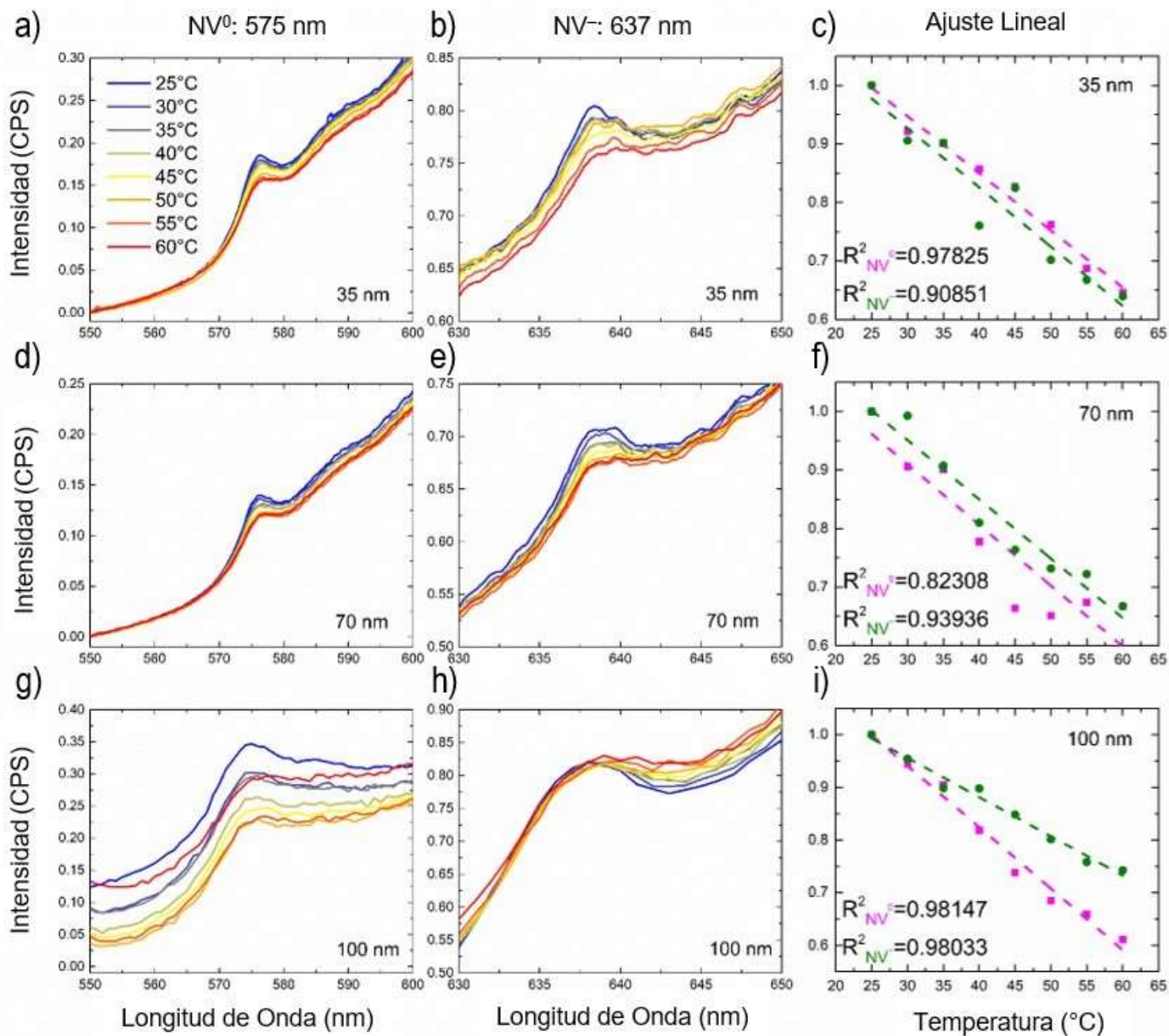


Figura 11: Espectros de emisión de ambos estados de carga del centro de color NV de nanodiamantes de 35 nm (a,b), 70 nm (d,e) y 100 nm (g,h) en el rango de temperatura de 25 °C a 60 °C. La dependencia de la intensidad fluorescente con la temperatura se muestra en (c,f,i) obtenida mediante normalización y ajuste Gaussiano. Un ajuste lineal resulta en el cálculo de calidad mediante  $R^2$  para cada estado de carga por cada tamaño.

### 3.6.5 Efecto de la Concentración en la Fluorescencia de Nanodiamantes Fluorescentes

En este punto se han analizado los datos concernientes a la emisión y excitación de los centros NV que contienen los nanodiamantes fluorescentes, así como su dependencia para distintos tamaños de partícula. Adicionalmente, con la finalidad de comprender más a fondo las características de los nanodiamantes, se precisó realizar un estudio para conocer el comportamiento de los espectros de fluorescencia como función del grado de concentración en las muestras.

Cabe recalcar que este análisis se realizó con las muestras que contienen el grado de concentración en el siguiente rango decreciente: 10, 7.5, 5, 2.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.1, todas en mg/mL en solución acuosa (agua miliQ). El arreglo experimental fue el mismo mencionado previamente utilizando el Fluorolog 3 FL3-22 con una excitación láser de 532 nm a 20 mW de potencia de emisión. El barrido fue desde los 550 a 850 nm, con pasos de 1 nm en la rejilla de 5 nm de grosor utilizando 0.1 s de tiempo de integración.

Una vez establecidas estas condiciones para el experimento, se realizaron las mediciones de la intensidad de emisión (en cuentas por segundo) como función de la longitud de onda (en nanómetros) para cada una de las muestras. Los espectros de emisión observados se muestran en la Figura 12. La dispersión de datos exhibe una pendiente positiva para concentraciones bajas (0.1-5 mg/mL), alcanzando una intensidad fluorescente máxima en la concentración de 5 mg/mL. Por otro lado, para concentraciones altas (7.5-10 mg/mL) se observa una disminución en la intensidad de los espectros de fluorescencia, exhibiendo una pendiente negativa. Adicionalmente, un detalle a remarcar, es que es posible observar que la concentración de 0.5 mg/mL es igual o más fluorescente que la concentración de 10 mg/mL, siendo esta última 20 veces más concentrada.

Espectros de Emisión de HPHT FNDs a Distintas Concentraciones

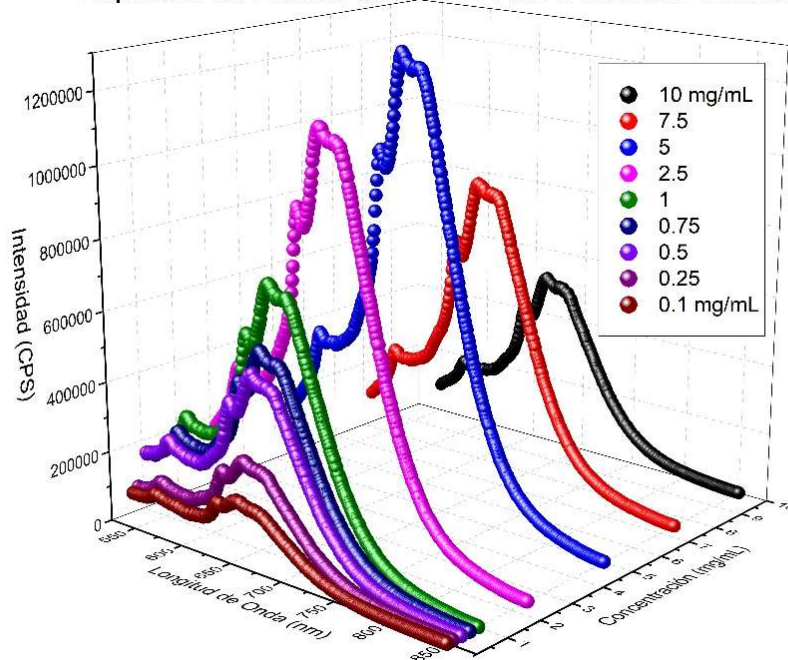


Figura 12: Espectros de emisión de nanodiamantes fluorescentes a distintas concentraciones en el rango de 0.1 a 10 mg/mL graficados en 3D. Estos espectros exhiben como la intensidad fluorescente de nanodiamantes se ve afectada a través de cambios en la concentración, mostrando un incremento desde la concentración de 0.1 a 5 mg/mL, para después comenzar a disminuir en intensidad hasta la concentración de 10 mg/mL.

Asimismo, este comportamiento no lineal, se puede observar en la Figura 13a donde la intensidad fluorescente aumenta hasta alcanzar un máximo y luego disminuye. De manera análoga, este comportamiento es observado para el área debajo de cada línea de fonón cero como lo muestra la Figura 13b. Por añadidura, este conjunto de observaciones experimentales fue analizado mediante un polinomio de cuarto orden alcanzando valores de  $R^2$  tan altos como 0.98 para las intensidades y áreas de ambos estados de carga. Adicionalmente, no se observó ningún desplazamiento espectral de las bandas NV a través del rango de concentraciones observado. Comparativamente, la concentración experimental de 5 mg/mL se observó como la más fluorescente de todas mientras que el análisis numérico estima que este máximo de intensidad ocurre alrededor de 3.83 mg/mL. Cabe resaltar, que un aspecto particular de estos resultados es que la intensidad relativa del estado de carga  $NV^-$  es mayor que  $NV^0$ ; sin embargo, el área que engloba la emisión  $NV^-$  es menor que la de  $NV^0$ . Esto significa que el ancho de banda es más amplio para el estado de carga  $NV^0$  (18 nm) y el

estado de carga  $NV^-$  posee de un ancho más estrecho (9 nm). Esto puede ser corroborado al observar la Figura 12, donde se puede apreciar como la emisión del estado de carga  $NV^0$  se extiende mucho más que la emisión del estado de carga  $NV^-$ . Con la finalidad de validar la calidad de los ajustes no lineales para la intensidad relativa y área debajo de la banda, se utilizó el criterio de Figura de Mérito<sup>139</sup> (FOM). El valor de FOM fue calculado mediante la ecuación  $FOM = \frac{\sum_1^n |y_{Exp} - y_{Ajustado}|}{\sum_1^n |y_{Exp}|}$ , donde  $y_{Exp}$  es el valor de intensidad relativa medido experimentalmente,  $y_{Ajustado}$  es el valor de intensidad relativa estimado por el modelo y  $n$  corresponde con el número de mediciones realizadas. Esta figura de mérito nos brinda un porcentaje asociado al error intrínseco del ajuste; asegurando que para porcentajes menores a 2.5 % el modelo predice con bastante precisión los datos experimentales. Por otro lado, si el FOM se encuentra en un rango de 2.5 – 3.5 % el ajuste describe bien el comportamiento de los datos con una ligera desviación en los extremos. Asimismo, un FOM superior al 10 % indicaría un modelado erróneo, así como una pobre estadística. En nuestro caso, se encontró que el conjunto de espectros de emisión de nanodiamantes a distintas concentraciones poseen

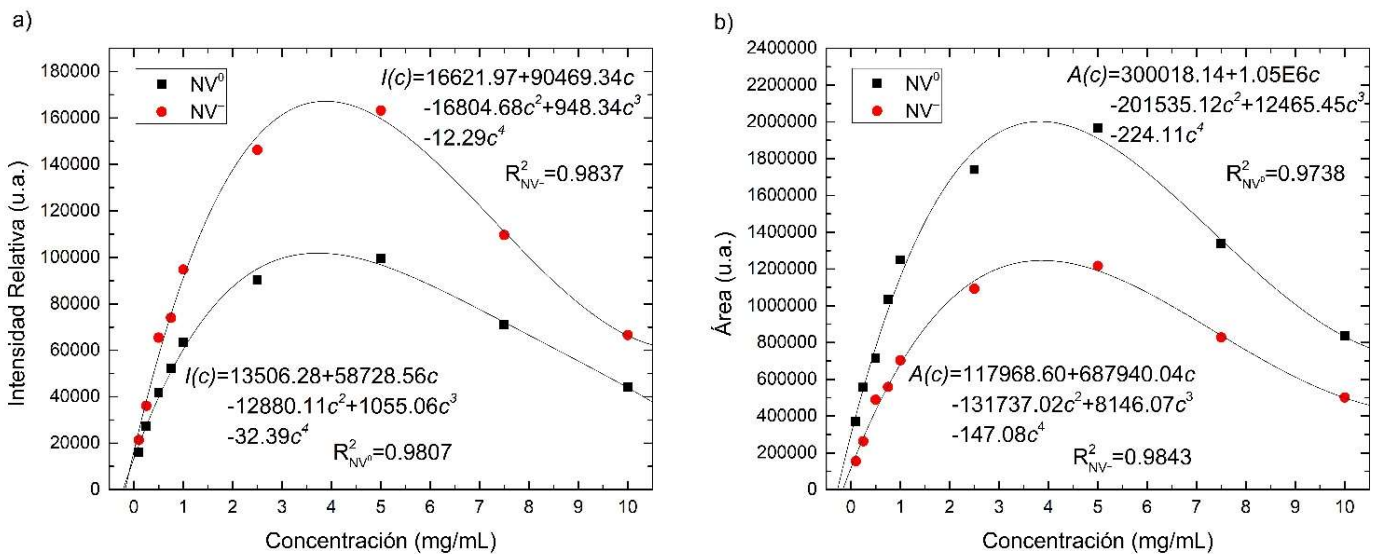


Figura 13: a) Intensidad relativa máxima para los centros  $NV^0$  (cuadros negros) y  $NV^-$  (círculos rojos) junto con el ajuste polinomial (línea continua) y b) Área debajo de la banda para cada estado de carga del centro de color NV y el ajuste polinomial a los datos. Se indica la ecuación de ajuste no lineal y su valor de  $R^2$  para cada estado de carga del centro de color NV.

un FOM = 3 – 4 % para la intensidad y área de ambos estados de carga, por lo que podemos concluir que el ajuste no lineal propuesto es pertinente para los datos analizados.

En resumen, las propiedades relacionadas con la emisión de fluorescencia de los centros NV en los nanodiamantes fluorescentes, no presentan diferencia significativa para las distintas concentraciones utilizadas, es decir, sus características espectrales se conservan. Sin embargo, el comportamiento no lineal en las intensidades y áreas en función de la concentración, es un resultado de mucho interés y queda como perspectiva del trabajo abriendo la posibilidad de realizar estudios adicionales tales como explicar el tipo de *quenching* que está ocurriendo dentro de los nanodiamantes. Esto puede deberse a distintos fenómenos, entre los más comunes se encuentra el fenómeno de transferencia de energía de resonancia Förster (FRET); el cual asocia una transferencia de energía no-radiativa entre dos fluoróforos que se encuentran a una distancia específica del orden nanómetros<sup>140</sup>, siendo un proceso de corto alcance. De esta manera, se obtiene una superposición entre los espectros de emisión del fluoróforo donador y el de excitación del fluoróforo aceptor. Aunque aún existe fluorescencia en este fenómeno, la eficiencia de la transferencia de energía de FRET depende del inverso de la sexta potencia de la distancia a la que se encuentran los fluoróforos<sup>141</sup>, siendo esta una interacción de campo cercano y una cantidad extremadamente sensible en las mediciones. Asimismo, esta hipótesis encaja bastante bien con el efecto de *quenching* observado ya que, al modificar la concentración, en esencia, estamos variando la distancia entre los nanodiamantes fluorescentes. Por otro lado, existe el *quenching estático* en el cual las moléculas tienden a formar compuestos<sup>142</sup>, ya sea por contacto o por formación de puentes de hidrógeno, previo a ser excitadas. Por lo tanto, este proceso ocurre a distancias cortas, similares a las de FRET; sin embargo, se convierten en un tipo de impureza ya que estos compuestos se vuelven no fluorescentes. Aunado a esto, otra hipótesis a validar sería estudiar el *quenching colisional*, o dinámico. Este tipo de *quenching* ocurre cuando un fluoróforo excitado entra en contacto (choca) con otra molécula u otro fluoróforo transfiriendo la energía de forma no-radiativa favoreciendo así su retorno al estado base sin emitir fluorescencia<sup>143</sup>. Este proceso ocurre a distancias ordenes más grandes que FRET y el *quenching colisional*. Otra posible hipótesis a validar es el *quenching* asociado a la interacción con grupos hidroxilo (-OH) del agua<sup>144</sup>, donde se ha demostrado como la



presencia de estos grupos moleculares disminuye, apaga y retarda la fluorescencia en distintos compuestos fluorescentes. Finalmente, es una buena opción querer explorar alguna de las hipótesis mencionadas, pero están fuera del alcance de este trabajo de investigación.

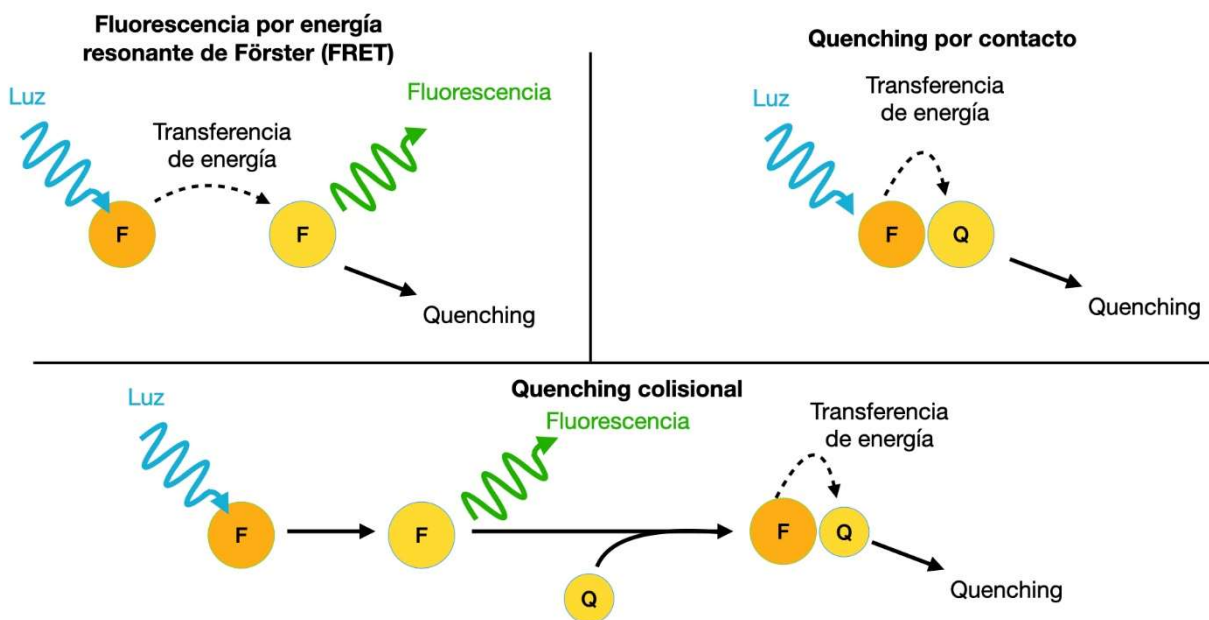


Figura 14: Distintos procesos de quenching y sus mecanismos de acción. Fluorescencia y quenching del tipo FRET (arriba-izquierda), quenching por contacto (arriba-derecha) y quenching colisional (abajo). Los círculos de color con letra F representan fluoróforos y los círculos de color con letra Q representan un frenador de fluorescencia (quencher).

### 3.6.6 Nanotermometría Fluorescente con Nanodiamantes a Concentraciones Fijas

Con el objetivo de analizar el comportamiento de estos sistemas dejando constante el medio de suspensión, se seleccionaron los nanodiamantes de 100 nm de tamaño mencionados en la Sección 3.3.4 (distintos tamaños) y 3.3.5 (100 nm, distintas concentraciones) para su estudio termométrico fluorescente a concentraciones fijas. En la Figura 10 (línea superior roja) se observa que los nanodiamantes de 100 nm exhiben la mayor intensidad fluorescente respecto a sus contrapartes de menor tamaño (70 nm y 35 nm). Estos nanodiamantes coinciden con tener una mayor cantidad de centros de color NV por nanopartícula ( $>900$ ) mientras que los otros poseen de  $>300$  o  $\leq 4$ , respectivamente. Otra característica que separa a los nanodiamantes de 100 nm es exhiben una mayor y más amplia fluorescencia del estado de carga  $NV^0$ , ver Figura 10 (línea inferior roja), lo cual permite la implementación de ambos estados de carga ( $NV^0$ : 575 nm y  $NV^-$ : 637 nm) para la estimación de la temperatura.

La fluorescencia de la concentración de 0.5 mg/mL es tan fluorescente o más que aquella de 10 mg/mL y, además, posee la cualidad de ser casi o igual de biocompatible como el agua al internalizarse en células HeLa. Es decir, una solución acuosa de nanodiamantes al 0.5 mg/mL tiene aproximadamente el mismo efecto en la viabilidad celular de células HeLa que haber administrado agua miliQ pura. La segunda concentración de 0.1 mg/mL marca el límite de viabilidad celular, siendo ésta virtualmente idéntica que el agua miliQ al ser internalizada en células HeLa. Por estas razones, se fijaron las concentraciones de 0.5 y 0.1 mg/mL para su estudio termométrico a concentración fija en un rango de temperatura biológico. La fluorescencia de ambas concentraciones a distintas temperaturas resulta en la observación de escalas termométricas lineales para ambos estados de carga NV y demostraron un error tan bajo como  $\pm 0.01$  °C al aproximar cualquier temperatura del rango estudiado.

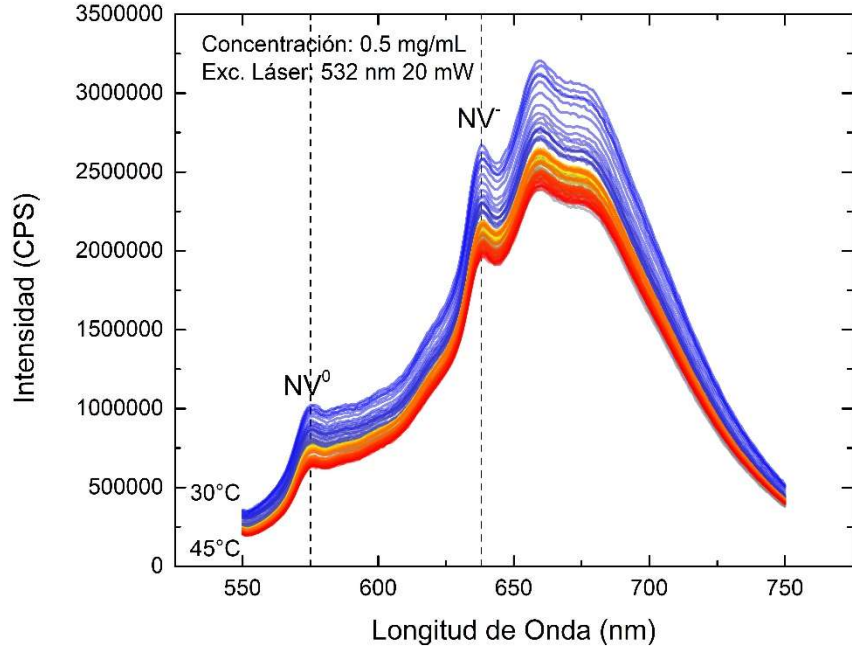
Para la observación de los espectros de emisión a distintas temperaturas de ambas concentraciones de 0.5 y 0.1 mg/mL, se fijó el software FluorEssense para un escaneo de emisión de luz dentro del rango de 550 nm a 850 nm en pasos de 1 nm con una rejilla de 5 nm de grosor, excitando con luz láser de 532 nm con 20 mW de potencia continua con 0.1 segundos de tiempo de integración en el detector. La temperatura se fijó dentro del rango térmico biológico de 30 °C a 45 °C en pasos de 0.1 °C con una tolerancia de 0.02 °C y 30

minutos de tiempo de equilibrio térmico. El análisis de las bandas fluorescentes se realizó de acuerdo al método propuesto en la Sección 3.1.2, Análisis de Datos, usando una normalización de 0 a 1 de los espectros experimentales. En la Figura 15a,b se muestran los espectros de emisión de nanodiamantes fluorescentes en solución acuosa a las concentraciones de 0.5 (a) y 0.1 (b) mg/mL, respectivamente, en el rango de temperatura establecido. En las Figuras 16a,b,c y 17a,b,c se despliegan los resultados del análisis de datos realizado, donde se puede apreciar como cualquiera de estas dos concentraciones posee una tendencia lineal para la intensidad relativa de emisión. Además, la posición y ancho de banda permanecen casi constantes a través de todo el rango térmico estudiado.

La dispersión de datos de la Figura 16a de intensidad relativa exhibe una tendencia lineal respecto de la temperatura en el rango usado para la concentración de 0.5 mg/mL. Los valores de ajuste lineal  $R^2$  de 0.9596 ( $NV^0$ ) y 0.9330 ( $NV^-$ ) indican una alta correlación lineal entre la intensidad de la emisión de cualquier estado de carga del centro de color NV. La posición de emisión no se mueve ante cambios de temperatura, como se puede apreciar en la Figura 16b. El ancho de banda exhibe un comportamiento casi estático, demostrando de manera similar a la posición, no cambiar significativamente con cambios de temperatura, mostrado en la Figura 16c. Estas características espectrales brindan entonces de una emisión estable, sin cambios en la posición ni en el ancho de banda, que varía linealmente con la temperatura dentro de un rango biológico (30 °C a 45 °C) con errores de estimación tan pequeños como centésimas de Celsius ( $\pm 0.01$  °C).

La dispersión de datos de la Figura 17a muestra un comportamiento lineal para la concentración de 0.1 mg/mL, similar al de 0.5 mg/mL; sin embargo, en el ajuste lineal se denota como las rectas poseen una pendiente negativa más grande y a su vez proporcionan de valores de ajuste de  $R^2$  de 0.9023 ( $NV^0$ ) y 0.9143 ( $NV^-$ ), que corresponden con una alta correlación lineal entre la intensidad relativa normalizada respecto de la temperatura. La Figura 17b muestra como al disminuir de 0.5 a 0.1 mg/mL la posición en la que se localizan las emisiones tienden a moverse ligeramente, fluctuando aproximadamente un mismo valor numérico. La Figura 17c muestra un ensanchamiento del ancho de banda, pero al igual que la posición, fluctúa alrededor de un valor constante.

a) Espectros de Emisión de HPHT FNDs a Distintas Temperaturas



b) Espectros de Emisión de HPHT FNDs a Distintas Temperaturas

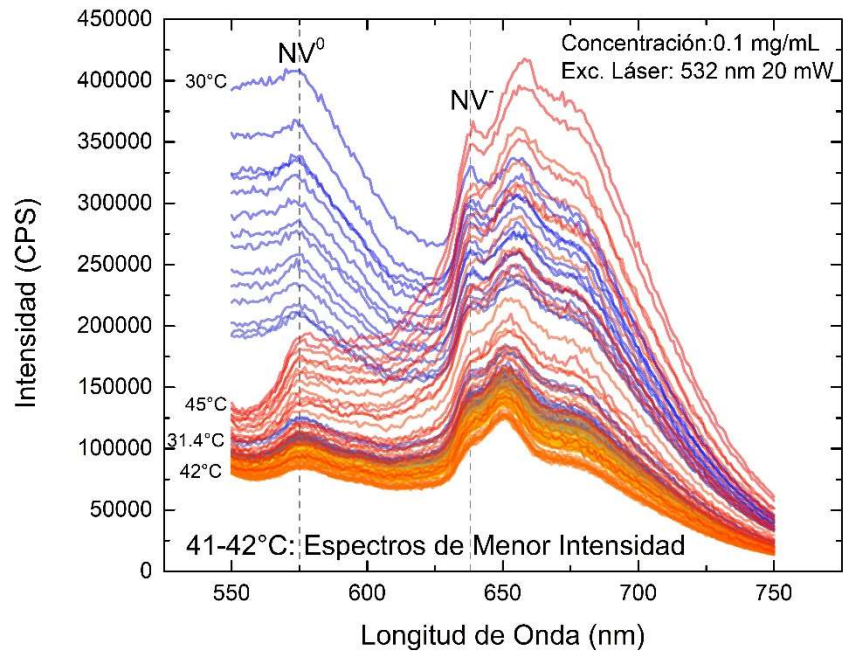


Figura 15: Espectros de emisión de nanodiamantes fluorescentes en el rango térmico de 30 °C a 45 °C concentrados a a) 0.5 mg/mL y b) 0.1 mg/mL. La diferencia principal es como para la concentración de 0.5 mg/mL los espectros se acumulan verticalmente hasta alcanzar un mínimo global, mientras que la concentración de 0.1 mg/mL exhibe un comportamiento similar hasta los 42 °C, donde después de esta temperatura el espectro vuelve a aumentar en intensidad.

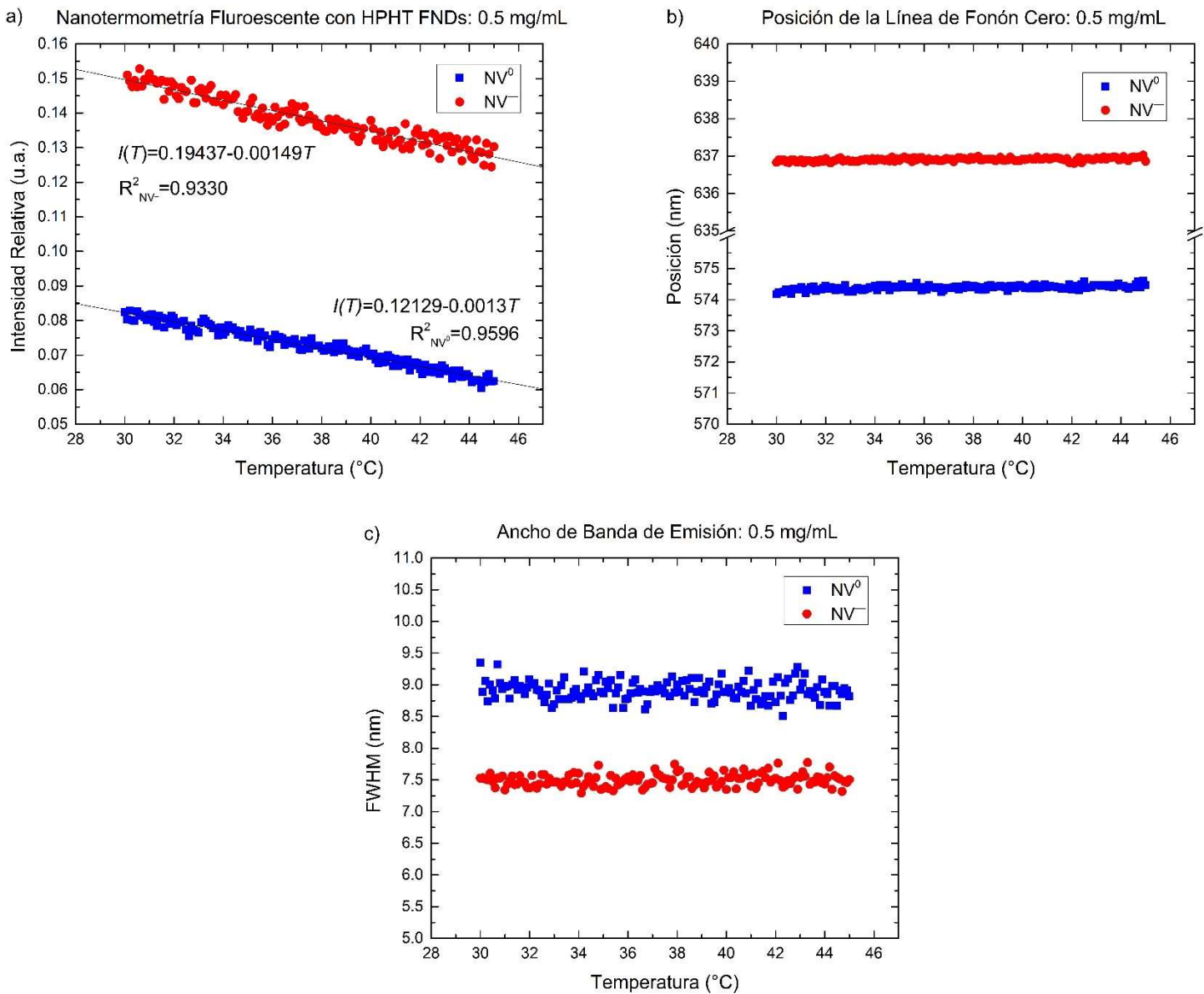
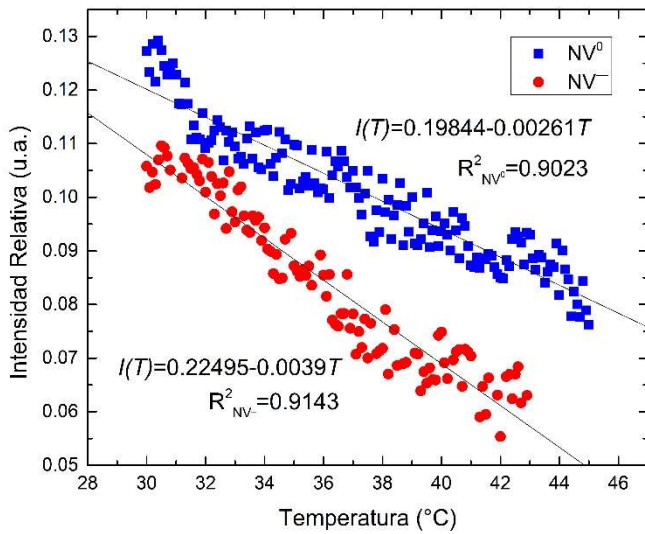
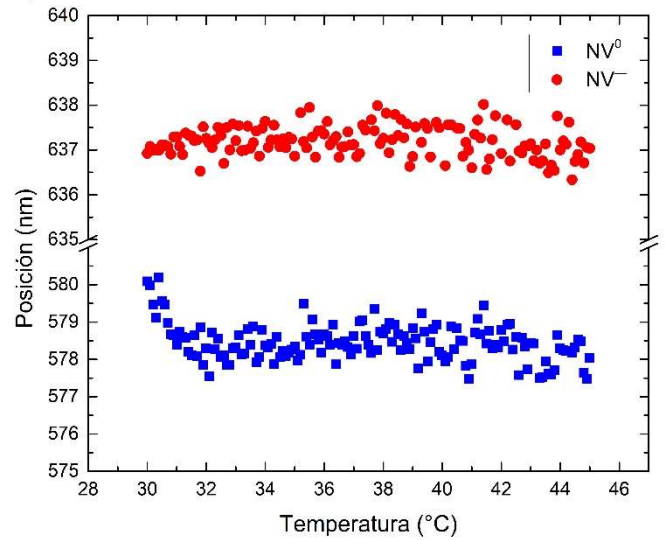


Figura 16: Características espectrales de la emisión de nanodiamantes concentrados a 0.5 mg/mL en forma de a) la Intensidad Relativa normalizada, b) la Posición de banda y c) el Ancho Completo a la Mitad del Máximo (FWHM). Se indican las ecuaciones de ajuste lineal y su valor de  $R^2$  para la intensidad relativa para ambos estados de carga del centro de color NV. La intensidad relativa de cada estado de carga se comporta lineal ante cambios térmicos en el rango de 30-45 °C, demostrando valores de ajuste cercanos a la unidad para la concentración de 0.5 mg/mL. Las posiciones de línea de fonón cero y sus anchuras permanecieron constantes durante la variación de la temperatura.

a) Nanotermometría Fluorescente con HPHT FNDs: 0.1 mg/mL



b) Posición de la Línea de Fonón Cero: 0.1 mg/mL



c) Ancho de Banda de Emisión: 0.1 mg/mL

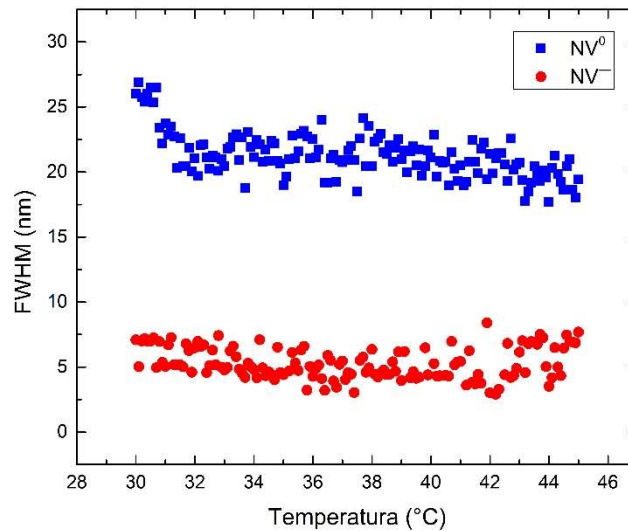


Figura 17: Características espectrales de la emisión de nanodiamantes concentrados a 0.1 mg/mL en forma de a) la Intensidad Relativa normalizada, b) la Posición de banda y c) el Ancho Completo a la Mitad del Máximo (FWHM). Se indican las ecuaciones de ajuste lineal y su valor de  $R^2$  para la intensidad relativa para ambos estados de carga del centro de color NV. Al variar la concentración a 0.1 mg/mL se denota como los valores de intensidades relativas cambiaron, demostrando ahora una mayor intensidad relativa para el estado de carga NV<sup>0</sup>. Además, se logró observar cómo las posiciones y sus anchuras se mueven ligeramente durante los cambios de temperatura. Esto se traduce en una fluorescencia detectada en posiciones ligeramente distintas con anchuras alrededor de 2 veces más grandes comparado con la concentración de 0.5 mg/mL.

Con la finalidad de demostrar que tan sensible es la fluorescencia proveniente de los nanodiamantes respecto a cambios de temperatura, se calculó su sensibilidad de acuerdo con la ecuación:  $S = \frac{1}{I} \frac{dI}{dT}$ , donde  $S$  es la sensibilidad en  $^{\circ}C^{-1}$ ,  $I$  es la intensidad de la fluorescencia en cuentas por segundo ( $CPS$ ) y  $T$  es la temperatura en  $^{\circ}C$ . El valor  $S$  puede ser multiplicado por 100% para obtenerlo en unidades de  $\%/^{\circ}C$ . Adicionalmente, se calculó el error absoluto promedio de la estimación de temperatura de la forma  $\varepsilon = |T_{Real} - T_{Estimada}|$ , donde  $\varepsilon$  es el error absoluto en  $^{\circ}C$ ,  $T_{Real}$  es el valor de temperatura real del sistema de enfriamiento medido en  $^{\circ}C$  y  $T_{Estimada}$  es la temperatura estimada por el ajuste lineal correspondiente en  $^{\circ}C$ . Este error cuantifica la desviación del valor real de la temperatura local de los nanodiamantes respecto del valor estimado por el ajuste lineal. Para las concentraciones de nanodiamantes de 0.5 y 0.1 mg/mL se encontró que poseen una sensibilidad promedio de 0.275 ( $NV^0$ ) y 0.325 ( $NV^-$ )  $\%/^{\circ}C$  y un error absoluto promedio de 0.3884 ( $NV^0$ ) y 0.4251 ( $NV^-$ )  $^{\circ}C$ . Estos valores de sensibilidad se relacionan con nanotermómetros altamente sensibles al ambiente local térmico de la nanopartícula; por otra parte, su error absoluto promedio indica que su incertidumbre de medición yace bien por debajo de 1  $^{\circ}C$ , encontrándose en el orden de décimas de  $^{\circ}C$ . En la Tabla 2 se comparan los resultados de esta sección con los obtenidos para otro tipo de nanopartículas, donde se puede apreciar como los nanodiamantes sobresalen por tener una sensibilidad muy baja y un error absoluto tan bueno como la de nanopartículas de ER Thermo Yellow.

*Tabla 2: Comparación de Sensitividad y Error Absoluto promedio para distintos tipos de nanopartículas. Se proporciona el mecanismo de acción correspondiente a la estimación de la temperatura para cada tipo. Los nanodiamantes resultan ser los que tienen una sensitividad más baja que el resto, correspondiente a ligeros cambios de intensidad respecto a cambios térmicos. El error absoluto promedio resultó ser tan bueno como el encontrado para el material ER Thermo Yellow.*

<b>Tipo de Nanopartículas</b>	<b>Mecanismo de Acción</b>	<b>Sensitividad (%/°C)</b>	<b>Error Absoluto (°C)</b>	<b>Referencia</b>
Nanodiamantes con Centros NV	Intensidad	0.275 (NV <sup>0</sup> ), 0.325 (NV <sup>-</sup> )	0.3884 (NV <sup>0</sup> ), 0.4251 (NV <sup>-</sup> )	Este Trabajo
Ag/Ag <sub>2</sub> S Core-Shell NPs	Intensidad	2	–	145
QD655	Posición de Banda	6.3	0.098	146
TTA-UCNPs + NaYF <sub>4</sub> :Nd	Cociente de Intensidad	7.1	0.1	147
LiLaP <sub>4</sub> O <sub>12</sub> :1% Nd	Posición de Banda	0.47	1.05	148
ER Thermo Yellow	Intensidad	–	0.2	146
Rodamina B	Cociente de Intensidad	1	1	149
Au Nanorods	Intensidad	–	3.8	150
Poly-TICT@AIE BODIPY	Intensidad	17.06	0.04	151



### 3.6.7 Citotoxicidad/Viabilidad Celular de Nanodiamantes Fluorescentes

El interés principal de cuantificar la viabilidad celular de nanodiamantes en soluciones acuosas es poder determinar qué concentración afecta al medio biológico y cuáles permanecen tan biocompatibles como el agua miliQ. Por ejemplo, una concentración alta de nanodiamantes podría inducir cambios al ambiente bioquímico local del sistema y podría, a su vez, degradar la proliferación celular e incluso causar apoptosis. Por otra parte, el uso de una concentración baja o muy diluida podría no emitir la suficiente luz para ser detectable.

La citotoxicidad celular se define como la modificación de funciones celulares para ser dañinas frente a otras, esto es, la capacidad de interactuar con otras células y destruirlas. Existen diversas pruebas de citotoxicidad para determinar los efectos tóxicos de fármacos o compuestos químicos en distintos sistemas biológicos. Para este trabajo se usó el método de reducción metabólica del bromuro 3-(4-5, dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazán, polvo de color morado insoluble en agua. Este método es usado para medir la supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido y con ello es posible calcular el porcentaje de viabilidad celular en términos de la densidad óptica (DO) de cada uno de los ensayos como:

$$Viabilidad\ Celular\ (\%) = \frac{DO_{Células\ Tratadas}}{DO_{Control}} * 100\%$$

Donde la DO de células tratadas se refiere al ensayo proveniente de un pocillo con nanodiamantes y la DO de control se refiere al pocillo sin nanodiamantes añadidos. Este tipo de ensayos permiten la observación de los cambios inducidos en el medio celular en presencia de algún estimulante, como pueden ser los nanodiamantes.

Para este trabajo se usó la línea celular HeLa, estas células fueron cultivadas en una placa estéril de 96 pocillos con DMEM (Medio de Eagle Modificado de Dulbecco) suplementado con FBS (Suero Fetal Bovino) al 10%, piruvato de sodio (1 mM), penicilina (10 ug/mL) y streptomycin (0.1 mg/mL) a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y 80% de humedad. Para estudiar la interacción de los nanodiamantes con este cultivo celular, las células HeLa fueron lavadas con PBS (tampón de fosfato salino) con el fin de eliminar el medio biológico no adherido y metabolizado de cada pozo. Los nanodiamantes de 100 nm concentrados a 1, 0.5 y 0.1 mg/mL fueron diluidos usando DMEM en una solución 1:10 y se usó la concentración

de 0 mg/mL como control de viabilidad. En este punto, las soluciones de nanodiamantes fueron añadidas a cada pocillo, realizando 4 réplicas por ensayo de concentración. Después de 24 h de incubación, las soluciones de nanodiamantes fueron removidas del medio. El MTT fue diluido en DMEM (100  $\mu$ L, 12 mM) y luego fue añadido a cada pocillo, incubando por 2 h. El reactivo MTT fue cuidadosamente removido y 100  $\mu$ L de DMSO (dimetilsulfóxido) fueron añadidos para solubilizar los cristales de formazán formados. Finalmente, la absorbancia en 570 nm de cada pocillo fue medida usando un espectrofotómetro UV (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Las células de control negativo (sin estímulo) fueron cultivadas usando el medio de cultivo completo y las células de control positivo (con estímulo) fueron tratadas con 10% de DMSO para causar muerte celular.

Los resultados relevantes al ensayo descrito son exhibidos en la Figura 18a, donde es posible observar cómo nanodiamantes concentrados en agua a 1 mg/mL pueden afectar al medio de cultivo hasta en un 85% de viabilidad celular. Por otro lado, concentraciones de 0.5 mg/mL resultan en un 95% de viabilidad celular, siendo casi tan biocompatible como el agua miliQ. Adicionalmente, nuestros ensayos demostraron que una concentración de 0.1 mg/mL es indistinguible del agua miliQ, ambas logrando un 100% de viabilidad celular. Aunado a

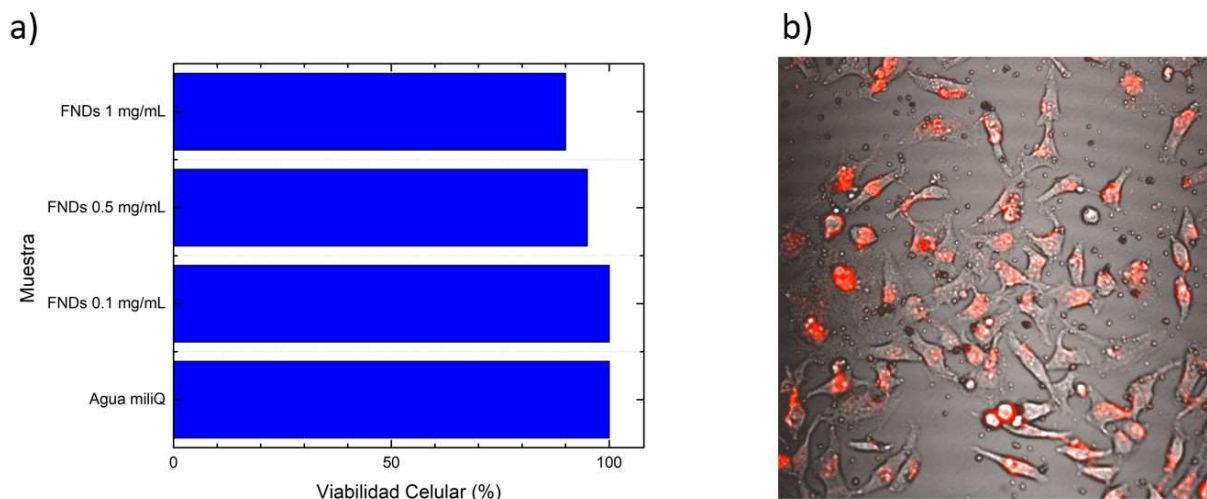


Figura 18: a) Comparación de la viabilidad celular (en porcentaje) de nanodiamantes concentrados a 1, 0.5, 0.1 mg/mL respecto al agua miliQ (control). b) Imagen de microscopía confocal fluorescente usando células HeLa y nanodiamantes concentrados a 0.1 mg/mL. La concentración de 0.1 mg/mL demostró ser tan biocompatible como el agua miliQ. El contraste en rojo es la fluorescencia proveniente de los nanodiamantes funcionalizados dentro de las células.

esto, se realizó una prueba preliminar mediante el uso de un microscopio confocal de fluorescencia usando la concentración de 0.1 mg/mL con células HeLa, mostrado en la Figura 18b. Es posible observar cómo los nanodiamantes se dispersan sobre el medio celular y logran adherirse a su superficie, permitiendo la observación de la morfología celular mediante contraste fluorescente.

Con estos resultados se demuestra que el estudio realizado con nanodiamantes fluorescentes otorga una ventaja para la construcción de nanotermómetros fluorescentes con la seguridad de ser altamente compatibles dentro del medio celular y lograr una adhesión celular con fines de aplicación biomédicas y de imagenología celular por medio de contraste térmico.

## 4 Conclusiones

De los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se mencionan las siguientes conclusiones:

- El estudio realizado en este trabajo muestra que es posible obtener concentraciones de nanodiamantes que resultan altamente viables en términos de biocompatibilidad, así como sus propiedades ópticas y funcionalización superficial. Con esto, es posible internalizar los nanodiamantes en tejido exitosamente sin degradarlo, y, además, direccionarlo mediante su funcionalización a áreas específicas dentro de las células para posteriormente visualizarlas en un microscopio dándonos una aplicación directa para realizar imagenología médica a nivel celular.
- Los distintos tamaños de nanodiamantes (35, 70 y 100 nm) no mostraron diferencia significativa en cuanto a la modificación de su espectro de emisión fluorescente y fueron utilizados para establecer las escalas termométricas lineales. Asimismo, este resultado brinda la posibilidad de utilizar nanodiamantes de distintos tamaños para distintos tipos de imagenología, por mencionar algunos ejemplos, los tamaños grandes (100 nm) podrían ser utilizados para su difusión superficial en células mientras que los tamaños más pequeños (35 y 70 nm) serían utilizados especialmente para su internalización intracelular, dando lugar a lo que se conoce como nanotermometría fluorescente mediante el uso de nanodiamantes.
- La fluorescencia de los nanodiamantes resultó ser linealmente proporcional respecto de la temperatura local de los nanodiamantes suspendidos en agua. Este comportamiento se conservó a través de distintos tamaños de nanopartícula, cantidad de centros de color NV y concentración; indicando un amplio rango de dilución de los nanodiamantes sin perder sus características de nanotermómetros, y teniendo una viabilidad celular del 95 – 100%. Inclusive, estas características, muestran la posibilidad de hacer un uso óptimo de los nanodiamantes al mismo tiempo que se abarata el costo de las técnicas de nanotermometría.
- Los espectros de emisión de nanodiamantes concentrados a 10 mg/mL hasta 0.1 mg/mL demostraron emitir una fluorescencia no lineal respecto de la concentración. Para concentraciones bajas (0.1-2.5 mg/mL) se tiene una pendiente positiva, pero, una vez

alcanzado el máximo, ésta se vuelve negativa, decayendo para concentraciones grandes (5-10 mg/mL). La dispersión de datos demuestra ser no lineal y a su vez fue ajustado con un polinomio de cuarto orden. Esto sugiere que la intensidad relativa de ambos estados de carga puede ser expresada en términos de la concentración. Esta aproximación tiene su aplicación práctica en la observación de células mediante la microscopia confocal fluorescente, donde el uso de alguna concentración grande (e.g. 10 mg/mL) podría resultar en una saturación del detector y observar “blanco” y viceversa con alguna concentración baja (e.g. 0.01 mg/mL).

- Debido al interés de poder estimar la temperatura celular (de alrededor de 37 °C) se caracterizaron los espectros de emisión de las concentraciones biocompatibles de 0.5 mg/mL y 0.1 mg/mL dentro de un rango térmico biológico de 30 °C a 45 °C, con pasos finos de 0.1 °C, con una tolerancia de no más de 0.02 °C y con 30 minutos de tiempo de equilibrio térmico en esa temperatura, acumulando 151 espectros en el rango térmico. La concentración de 0.5 mg/mL exhibe una fluorescencia que disminuye a través de todo el rango espectral detectado durante el calentamiento. La intensidad fluorescente relativa de ambos estados de carga trazó una tendencia de datos lineal y se observó adicionalmente como su posición y ancho permanecen casi estáticos dentro del rango de temperatura. Por otra parte, la concentración de 0.1 mg/mL exhibe una fluorescencia que también disminuye a través de calentamientos con la excepción de que es alrededor de 7.5x menos intensa (en su máximo) que la de 0.5 mg/mL y tiende a aumentar en intensidad después de 42 °C, traslapándose con aquellos <42 °C. Ambas concentraciones poseen la cualidad de estimar la temperatura de una manera lineal con errores de estimación de  $\pm 0.01$  °C, lo que permite la medición de la temperatura con 2 dígitos después del punto de precisión. Aunado a esto, esta técnica en términos de sus errores de estimación es comparable con las de ODMR y SNOM.
- Los nanodiamantes fluorescentes utilizados, se comportan como nanotermómetros primarios debido a las escalas lineales establecidas para la intensidad en función de la temperatura. Además, pueden ser calibrados mediante la observación sucesiva de su espectro de emisión a temperatura fija (por ejemplo, la temperatura

de laboratorio), o bien a través de un rango térmico como los usados en este trabajo. Esto puede ser implementado en la microscopia confocal fluorescente donde las imágenes construidas por contraste fluorescente pueden transformadas a imágenes de contraste térmico, permitiendo el monitoreo de la temperatura en células o sistemas biológicos. Adicionalmente, ya que estos nanotermómetros poseen de dos marcadores fluorescentes debido a sus dos estados de carga del centro de color NV, es posible implementar dos posibles estimadores de la temperatura mediante el uso de filtros ópticos para observar una imagen con doble contraste de intensidad. Esto permite estimar dos temperaturas locales mediante el uso de un solo tipo de nanopartícula.

- Finalmente, los nanodiamantes demostraron ser altamente biocompatibles partiendo con un 85% de viabilidad celular para una concentración de 1 mg/mL, 95% para la de 0.5 mg/mL y 100% para la concentración de 0.1 mg/mL. Este resultado, nos otorga la posibilidad de construir estos nanotermómetros basados en nanodiamantes fluorescentes con poco material abaratando el costo de producción debido a la baja concentración requerida para ello.

## 5 Perspectivas

- **Fenómeno del quenching.** Una de las perspectivas a mediano plazo sería el investigar a fondo cuál es la razón del *quenching* en la fluorescencia de los nanodiamantes fluorescentes mediante modelos teóricos utilizando simulación computacional con el fin de analizar si es un efecto de tipo FRET, de formación de aglomerados debido a la concentración, impurezas en el material o simplemente un fenómeno asociado a un *quenching* colisional por las moléculas en las que están suspendidos los nanodiamantes al ser excitadas en el experimento.
- **Nanotermometría Raman.** Realizar unas correcciones al modelo de temperatura lineal propuesto utilizando la técnica de termometría Raman. Para tal fin, es necesario realizar espectroscopía Raman a distintas temperaturas, esto con la finalidad de analizar cómo se comportan las bandas asociadas a las intensidades Raman de los nanodiamantes como una función de la temperatura, concentración y tamaño de partícula. En principio, esto es posible debido a la alta resolución espectral que poseen los espectrómetros Raman, (posibilidad de detectar con precisión dos picos adyacentes).
- **Nanotermómetros *in vitro*.** Análogo al método para analizar la citotoxicidad de los nanodiamantes, es posible hacer uso de varias células cancerosas tales como las HeLa para cáncer cervicouterino, AGS para cáncer de estómago, H1299 para cáncer de pulmón, sólo por mencionar algunas, para analizar y mejorar el funcionamiento de los nanotermómetros propuestos en este trabajo.
- **Clasificación de agresividad.** Realizar experimentos con distintos tipos de líneas celulares cancerígenas para generar una base datos con las eficiencias de los nanotermómetros, los rangos de operación (de temperatura) para distintas células cancerígenas, y de ser posible generar una clasificación de la agresividad de éstas mismas basados en la intensidad de fluorescencia o temperatura. Con esta clasificación podría realizarse un mapeo respecto a qué tipo de cáncer es y en que etapa se encuentra en un diagnóstico temprano de la enfermedad.

## 6 Referencias

1. Humphries, S. A physical explanation of the temperature dependence of physiological processes mediated by cilia and flagella. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 14693–14698 (2013).
2. Politis, S. N., Mazurais, D., Servili, A., Zambonino-Infante, J.-L., Miest, J. J., Sørensen, S. R., Tomkiewicz, J. & Butts, I. A. E. Temperature effects on gene expression and morphological development of European eel, *Anguilla anguilla* larvae. *Public Library of Science* **12**, e0182726 (2017).
3. The Effect of Temperature on Reaction Rates. *Chemistry LibreTexts* <https://chem.libretexts.org/@go/page/24271> (Accesado 8 Mar, 2022) (2015).
4. Estadísticas del cáncer - Instituto Nacional del Cáncer. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas> (2020).
5. Orringer, D., Lau, D., Khatri, S., Zamora-Berridi, G. J., Zhang, K., Wu, C., Chaudhary, N. & Sagher, O. Extent of resection in patients with glioblastoma: limiting factors, perception of resectability, and effect on survival: Clinical article. *Journal of Neurosurgery* **117**, 851–859 (2012).
6. Sugiura, H., Takahashi, M., Katagiri, H., Nishida, Y., Nakashima, H., Yonekawa, M. & Iwata, H. Additional Wide Resection of Malignant Soft Tissue Tumors: *Clinical Orthopaedics and Related Research* **394**, 201–210 (2002).
7. Scharnagl, E., Smola, M. G., Hellbom, B. A., Pierer, G. & Hoflehner, H. Scar tissue cancer: observations and results of 23 cases. *Langenbeck's Archives of Surgery* **376**, 341–345 (1991).



8. Otsuka, K., Yamamoto, Y. & Ochiya, T. Uncovering temperature-dependent extracellular vesicle secretion in breast cancer. *Journal of Extracellular Vesicles* **10**, 15 (2020).
9. Okabe, K. & Uchiyama, S. Intracellular thermometry uncovers spontaneous thermogenesis and associated thermal signaling. *Communications Biology* **4**, 1377 (2021).
10. Zhang, Y., Zhan, X., Xiong, J., Peng, S., Huang, W., Joshi, R., Cai, Y., Liu, Y., Li, R., Yuan, K., Zhou, N. & Min, W. Temperature-dependent cell death patterns induced by functionalized gold nanoparticle photothermal therapy in melanoma cells. *Scientific Reports* **8**, 8720 (2018).
11. Chrétien, D., Bénit, P., Ha, H.-H., Keipert, S., El-Khoury, R., Chang, Y.-T., Jastroch, M., Jacobs, H. T., Rustin, P. & Rak, M. Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 °C. *Public Library of Science Biology* **16**, 27 (2018).
12. Kong, B., Seog, J. H., Graham, L. M. & Lee, S. B. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. *Nanomedicine* **6**, 929–941 (2011).
13. Zhou, H., Sharma, M., Berezin, O., Zuckerman, D. & Berezin, M. Y. Nanothermometry: From Microscopy to Thermal Treatments. *ChemPhysChem* **17**, 27–36 (2016).
14. Santos, N. M., Gomes, A. S., Cavalcante, D. G. S. M., Santos, L. F., Teixeira, S. R., Cabrera, F. C. & Job, A. E. Green synthesis of colloidal gold nanoparticles using latex from *Hevea brasiliensis* and evaluation of their in vitro cytotoxicity and genotoxicity. *IET Nanobiotechnology* **13**, 307–315 (2019).
15. Huang, L., Himawan, E., Belhadj, S., Pérez García, R. O., Paquet Durand, F., Schipper, N., Buzgo, M., Simaite, A. & Marigo, V. Efficient Delivery of Hydrophilic Small

- Molecules to Retinal Cell Lines Using Gel Core-Containing Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutics* **14**, 74 (2021).
16. Elnady, A., Sorour, N. M. & Abbas, R. N. Characterization, cytotoxicity, and genotoxicity properties of novel biomediated nanosized-silver by Egyptian *Streptomyces roseolus* for safe antimicrobial applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **38**, 47 (2022).
  17. Zhang, X., Wang, S., Liu, M., Hui, J., Yang, B., Tao, L. & Wei, Y. Surfactant-dispersed nanodiamond: biocompatibility evaluation and drug delivery applications. *Toxicology Research* **2**, 335 (2013).
  18. Neves, A. R. & Reis, S. *Nanoparticles in Life Sciences and Biomedicine*. (Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2018).
  19. Panwar, N., Soehartono, A. M., Chan, K. K., Zeng, S., Xu, G., Qu, J., Coquet, P., Yong, K.-T. & Chen, X. Nanocarbons for Biology and Medicine: Sensing, Imaging, and Drug Delivery. *Chemical Reviews* **119**, 9559–9656 (2019).
  20. Pan, M., Annamalai, K. & Tao, Y. Applications of Nanocarbons in Bio-Medical Devices. *Recent Innovations in Chemical Engineering* **08**, 1–1 (2016).
  21. Wang, X., Nakamoto, T., Dulińska-Molak, I., Kawazoe, N. & Chen, G. Regulating the stemness of mesenchymal stem cells by tuning micropattern features. *Journal of Materials Chemistry B* **4**, 37–45 (2016).
  22. Vaijayanthimala, V., Tzeng, Y.-K., Chang, H.-C. & Li, C.-L. The biocompatibility of fluorescent nanodiamonds and their mechanism of cellular uptake. *Nanotechnology* **20**, 425103 (2009).

23. Perevedentseva, E., Mona, J., Chia-Liang, C., S. Chaughule, R. & C. Watabe, S. *Applications of nanomaterials*. (American Scientific Publishers, 2013).
24. Mitura, S., Mitura, K., Niedzielski, P., Louda, P. & Danilenko, V. Nanocrystalline diamond, its synthesis, properties and applications. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering* **16**, 9 (2006).
25. Nunn, N., Torelli, M., McGuire, G. & Shenderova, O. Nanodiamond: A high impact nanomaterial. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **21**, 1–9 (2017).
26. Hui, Y. Y., Cheng, C.-L. & Chang, H.-C. Nanodiamonds for optical bioimaging. *Journal of Physics D: Applied Physics* **43**, 374021 (2010).
27. Yu, S. J., Kang, M. W., Chang, H. C., Chen, K. M. & Yu, Y. C. Bright fluorescent nanodiamonds: No photobleaching and low cytotoxicity. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 17604–17605 (2005).
28. Manus, L. M., Mastarone, D. J., Waters, E. A., Zhang, X.-Q., Schultz-Sikma, E. A., MacRenaris, K. W., Ho, D. & Meade, T. J. Gd(III)-Nanodiamond Conjugates for MRI Contrast Enhancement. *Nano Letters* **10**, 484–489 (2010).
29. Schrand, A. M., Huang, H., Carlson, C., Schlager, J. J., Ōsawa, E., Hussain, S. M. & Dai, L. Are Diamond Nanoparticles Cytotoxic? *The Journal of Physical Chemistry B* **111**, 2–7 (2007).
30. Yeap, W. S., Chen, S. & Loh, K. P. Detonation Nanodiamond: An Organic Platform for the Suzuki Coupling of Organic Molecules. *Langmuir* **25**, 185–191 (2009).
31. Gao, G., Guo, Q. & Zhi, J. Nanodiamond-Based Theranostic Platform for Drug Delivery and Bioimaging. *Small* **15**, 1902238 (2019).

32. Ali, M. S., Metwally, A. A., Fahmy, R. H. & Osman, R. Nanodiamonds: Minuscule gems that ferry antineoplastic drugs to resistant tumors. *International Journal of Pharmaceutics* **558**, 165–176 (2019).
33. Garg, S., Garg, A., Sahu, N. K. & Yadav, A. K. Synthesis and characterization of nanodiamond-anticancer drug conjugates for tumor targeting. *Diamond and Related Materials* **94**, 172–185 (2019).
34. Terada, D., Genjo, T., Segawa, T. F., Igarashi, R. & Shirakawa, M. Nanodiamonds for bioapplications—specific targeting strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1864**, 129354 (2020).
35. Chang, Y.-R., Lee, H.-Y., Chen, K., Chang, C.-C., Tsai, D.-S., Fu, C.-C., Lim, T.-S., Tzeng, Y.-K., Fang, C.-Y., Han, C.-C., Chang, H.-C. & Fann, W. Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds. *Nature Nanotechnology* **3**, 284–288 (2008).
36. Xing, Y. & Dai, L. Nanodiamonds for nanomedicine. *Nanomedicine* **4**, 207–218 (2009).
37. Schrand, A. M., Lin, J. B., Hens, S. C. & Hussain, S. M. Temporal and mechanistic tracking of cellular uptake dynamics with novel surface fluorophore-bound nanodiamonds. *Nanoscale* **3**, 435–445 (2011).
38. Alkahtani, M. H., Alghannam, F., Jiang, L., Almethen, A., Rampersaud, A. A., Brick, R., Gomes, C. L., Scully, M. O. & Hemmer, P. R. Fluorescent nanodiamonds: past, present, and future. *Nanophotonics* **7**, 1423–1453 (2018).
39. Jelezko, F. & Wrachtrup, J. Single defect centres in diamond: A review. *physica status solidi (a)* **203**, 3207–3225 (2006).

40. Wilson, E. R., Parker, L. M., Orth, A., Nunn, N., Torelli, M., Shenderova, O., Gibson, B. C. & Reineck, P. The effect of particle size on nanodiamond fluorescence and colloidal properties in biological media. *Nanotechnology* **30**, 385704 (2019).
41. Shershulin, V. A., Sedov, V. S., Ermakova, A., Jantzen, U., Rogers, L., Huhlina, A. A., Teverovskaya, E. G., Ralchenko, V. G., Jelezko, F. & Vlasov, I. I. Size-dependent luminescence of color centers in composite nanodiamonds: Size-dependent luminescence of color centers in nanodiamonds. *physica status solidi (a)* **212**, 2600–2605 (2015).
42. Pedroza-Montero, F., Santacruz-Gómez, K., Acosta-Elías, M., Silva-Campa, E., Meza-Figueroa, D., Soto-Puebla, D., Castaneda, B., Urrutia-Bañuelos, E., Álvarez-Bajo, O., Navarro-Espinoza, S., Riera, R. & Pedroza-Montero, M. Thermometric Characterization of Fluorescent Nanodiamonds Suitable for Biomedical Applications. *Applied Sciences* **11**, 4065 (2021).
43. Fedyanin, D. Y. & Agio, M. Ultrabright single-photon source on diamond with electrical pumping at room and high temperatures. *New Journal of Physics* **18**, 073012 (2016).
44. Su, Z., Ren, Z., Bao, Y., Lao, X., Zhang, J., Zhang, J., Zhu, D., Lu, Y., Hao, Y. & Xu, S. Luminescence landscapes of nitrogen-vacancy centers in diamond: quasi-localized vibrational resonances and selective coupling. *Journal of Materials Chemistry C* **7**, 8086–8091 (2019).
45. Vervald, A., Burikov, S., Borisova, N., Vlasov, I., Laptinskiy, K., Laptinskaya, T., Shenderova, O. & Dolenko, T. Fluorescence properties of nanodiamonds with NV centers in water suspensions: Fluorescence properties of ND-NV in water. *physica status solidi (a)* **213**, 2601–2607 (2016).

46. Aslam, N., Waldherr, G., Neumann, P., Jelezko, F. & Wrachtrup, J. Photo-induced ionization dynamics of the nitrogen vacancy defect in diamond investigated by single-shot charge state detection. *New Journal of Physics* **15**, 1–9 (2013).
47. Beha, K., Batalov, A., Manson, N. B., Bratschitsch, R. & Leitenstorfer, A. Optimum Photoluminescence Excitation and Recharging Cycle of Single Nitrogen-Vacancy Centers in Ultrapure Diamond. *Physical Review Letters* **109**, 097404 (2012).
48. Waldherr, G., Beck, J., Steiner, M., Neumann, P., Gali, A., Frauenheim, Th., Jelezko, F. & Wrachtrup, J. Dark States of Single Nitrogen-Vacancy Centers in Diamond Unraveled by Single Shot NMR. *Physical Review Letters* **106**, 157601 (2011).
49. Claveau, S., Bertrand, J.-R. & Treussart, F. Fluorescent Nanodiamond Applications for Cellular Process Sensing and Cell Tracking. *Micromachines* **9**, 247 (2018).
50. Petrini, G., Moreva, E., Bernardi, E., Traina, P., Tomagra, G., Carabelli, V., Degiovanni, I. P. & Genovese, M. Is a Quantum Biosensing Revolution Approaching? Perspectives in NV-Assisted Current and Thermal Biosensing in Living Cells. *Advanced Quantum Technologies* **3**, 2000066 (2020).
51. Pandey, P. C., Shukla, S., Pandey, G. & Narayan, R. J. Nanostructured diamond for biomedical applications. *Nanotechnology* **32**, 132001 (2021).
52. Bai, T. & Gu, N. Micro/Nanoscale Thermometry for Cellular Thermal Sensing. *Small* **12**, 4590–4610 (2016).
53. Karnebogen, M., Singer, D., Kallerhoff, M. & Ringert, R.-H. Microcalorimetric investigations on isolated tumorous and non-tumorous tissue samples. *Thermochimica Acta* **229**, 147–155 (1993).

54. Suzuki, M., Tseeb, V., Oyama, K. & Ishiwata, S. Microscopic Detection of Thermogenesis in a Single HeLa Cell. *Biophysical Journal* **92**, L46–L48 (2007).
55. van Sark, W. G. J. H. M., Frederix, P. L. T. M., Bol, A. A., Gerritsen, H. C. & Meijerink, A. Blueing, bleaching, and blinking of single CdSe/ZnS quantum dots. *ChemPhysChem* **3**, 871–879 (2002).
56. Nakamura, M., Ozaki, S., Abe, M., Matsumoto, T. & Ishimura, K. One-pot synthesis and characterization of dual fluorescent thiol-organosilica nanoparticles as non-photoblinking quantum dots and their applications for biological imaging. *Journal of Materials Chemistry* **21**, 4689–4695 (2011).
57. Somogyi, B. & Gali, A. Computational design of in vivo biomarkers. *Journal of Physics Condensed Matter* **26**, (2014).
58. Vetrone, F., Naccache, R., Zamarrón, A., Juarranz de la Fuente, A., Sanz-Rodríguez, F., Martínez Maestro, L., Martín Rodríguez, E., Jaque, D., García Solé, J. & Capobianco, J. A. Temperature Sensing Using Fluorescent Nanothermometers. *American Chemical Society Nanotechnology* **4**, 3254–3258 (2010).
59. Welz, S., Gogotsi, Y. & McNallan, M. J. Nucleation, growth, and graphitization of diamond nanocrystals during chlorination of carbides. *Journal of Applied Physics* **93**, 4207–4214 (2003).
60. Drabik, J., Cichy, B. & Marciniak, L. New Type of Nanocrystalline Luminescent Thermometers Based on  $\text{Ti}^{3+}/\text{Ti}^{4+}$  and  $\text{Ti}^{4+}/\text{Ln}^{3+}$  ( $\text{Ln}^{3+}=\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ) Luminescence Intensity Ratio. *The Journal of Physical Chemistry C* **122**, 14928–14936 (2018).
61. Lupton, J. M. A molecular thermometer based on long-lived emission from platinum octaethyl porphyrin. *Applied Physics Letters* **81**, 2478–2480 (2002).

62. Wu, Y., Liu, J., Ma, J., Liu, Y., Wang, Y. & Wu, D. Ratiometric Nanothermometer Based on Rhodamine Dye-Incorporated F127-Melamine-Formaldehyde Polymer Nanoparticle: Preparation, Characterization, Wide-Range Temperature Sensing, and Precise Intracellular Thermometry. *American Chemical Society Applied Materials & Interfaces* **8**, 14396–14405 (2016).
63. Heyes, A. L. On the design of phosphors for high-temperature thermometry. *Journal of Luminescence* **129**, 2004–2009 (2009).
64. Kucsko, G., Maurer, P. C., Yao, N. Y., Kubo, M., Noh, H. J., Lo, P. K., Park, H. & Lukin, M. D. Nanometre-scale thermometry in a living cell. *Nature* **500**, 54–58 (2013).
65. Plakhotnik, T., Doherty, M. W., Cole, J. H., Chapman, R. & Manson, N. B. All-optical thermometry and thermal properties of the optically detected spin resonances of the NV-center in nanodiamond. *Nano Letters* **14**, 4989–4996 (2014).
66. Tsai, P.-C., Epperla, C. P., Huang, J.-S., Chen, O. Y., Wu, C.-C. & Chang, H.-C. Measuring Nanoscale Thermostability of Cell Membranes with Single Gold-Diamond Nanohybrids. *Angewandte Chemie International Edition* **56**, 3025–3030 (2017).
67. Montes-Frausto, J. B., Juarez-Moreno, K., Can-Uc, B. & Hirata-Flores, G. A. Synthesis and cytotoxic effects of SrAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> persistent luminescence nanoparticles co-doped with Eu<sup>2+</sup>/Dy<sup>3+</sup> ions. *Optical Materials Express* **6**, 1488 (2016).
68. Acosta-Elías, M., Sarabia-Sainz, A., Pedroso-Santana, S., Silva-Campa, E., Santacruz-Gomez, K., Angulo-Molina, A., Castaneda, B., Soto-Puebla, D., Barboza-Flores, M., Melendrez, R., Álvarez-García, S. & Pedroza-Montero, M. Carboxylated nanodiamond and re-oxygenation process of gamma irradiated red blood cells: Re-oxygenation process of gamma irradiated red blood cells. *physica status solidi (a)* **212**, 2437–2444 (2015).



69. Hsiao, W. W.-W., Hui, Y. Y., Tsai, P.-C. & Chang, H.-C. Fluorescent Nanodiamond: A Versatile Tool for Long-Term Cell Tracking, Super-Resolution Imaging, and Nanoscale Temperature Sensing. *Accounts of Chemical Research* **49**, 400–407 (2016).
70. Fujiwara, M., Sun, S., Dohms, A., Nishimura, Y., Suto, K., Takezawa, Y., Oshimi, K., Zhao, L., Sadzak, N., Umehara, Y., Teki, Y., Komatsu, N., Benson, O., Shikano, Y. & Kage-Nakadai, E. Real-time nanodiamond thermometry probing in vivo thermogenic responses. *Science Advances* **6**, 10 (2020).
71. Fujiwara, M. & Shikano, Y. Diamond quantum thermometry: from foundations to applications. *Nanotechnology* **32**, 482002 (2021).
72. Weimin C., C. *EPR of Free Radicals in Solids II*. vol. 25 (Springer Netherlands, 2012).
73. Boretti, A. & Castelletto, S. Nanometric resolution magnetic resonance imaging methods for mapping functional activity in neuronal networks. *MethodsX* **3**, 297–306 (2016).
74. Yang, M., Yuan, Q., Gao, J., Shu, S., Chen, F., Sun, H., Nishimura, K., Wang, S., Yi, J., Lin, C.-T. & Jiang, N. A Diamond Temperature Sensor Based on the Energy Level Shift of Nitrogen-Vacancy Color Centers. *Nanomaterials* **9**, 1576 (2019).
75. Yue, Y. & Wang, X. Nanoscale thermal probing. *Nano Reviews* **3**, 11586 (2012).
76. Brites, C. D. S., Lima, P. P., Silva, N. J. O., Millán, A., Amaral, V. S., Palacio, F. & Carlos, L. D. Thermometry at the nanoscale. *Nanoscale* **4**, 4799 (2012).
77. Christofferson, J., Maize, K., Ezzahri, Y., Shabani, J., Wang, X. & Shakouri, A. Microscale and Nanoscale Thermal Characterization Techniques. *Journal of Electronic Packaging* **130**, (2008).
78. Cricenti, A. Scanning near-field optical microscopy (SNOM). *physica status solidi (c)* **5**, 2615–2620 (2008).

79. Plakhotnik, T., Aman, H. & Chang, H.-C. All-optical single-nanoparticle ratiometric thermometry with a noise floor of  $0.3 \text{ K Hz}^{-1/2}$ . *Nanotechnology* **26**, 245501 (2015).
80. Plakhotnik, T. Diamonds for quantum nano sensing. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **21**, 25–34 (2017).
81. del Rosal, B., Ximendes, E., Rocha, U. & Jaque, D. In Vivo Luminescence Nanothermometry: from Materials to Applications. *Advanced Optical Materials* **5**, 1600508 (2017).
82. Martín Rodríguez, E., López-Peña, G., Montes, E., Lifante, G., García Solé, J., Jaque, D., Diaz-Torres, L. A. & Salas, P. Persistent luminescence nanothermometers. *Applied Physics Letters* **111**, 081901 (2017).
83. Ho, D., Wang, C.-H. K. & Chow, E. K.-H. Nanodiamonds: The intersection of nanotechnology, drug development, and personalized medicine. *Science Advances* **1**, e1500439 (2015).
84. Mangum, B. W. & Furukawa, G. T. *Guidelines for realizing the International Temperature Scale of 1990 (ITS-90)*. 196 (1990).
85. Neumann, P., Jakobi, I., Dolde, F., Burk, C., Reuter, R., Waldherr, G., Honert, J., Wolf, T., Brunner, A., Shim, J. H., Suter, D., Sumiya, H., Isoya, J. & Wrachtrup, J. High-Precision Nanoscale Temperature Sensing Using Single Defects in Diamond. *Nano Letters* **13**, 2738–2742 (2013).
86. Hamian, S., Yun, J., Park, I. & Park, K. Quantitative probing of tip-induced local cooling with a resistive nanoheater/thermometer. *Applied Physics Letters* **109**, 253114 (2016).

87. Monea, B. F., Ionete, E. I., Spiridon, S. I., Ion-Ebrasu, D. & Petre, E. Carbon Nanotubes and Carbon Nanotube Structures Used for Temperature Measurement. *Sensors* **19**, 2464 (2019).
88. Khalid, A. H., Kontis, K. & Behtash, H. Z. Phosphor thermometry in gas turbines: Consideration factors. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part G: Journal of Aerospace Engineering* **224**, 745–755 (2010).
89. Zhou, S., Jiang, G., Li, X., Jiang, S., Wei, X., Chen, Y., Yin, M. & Duan, C. Strategy for thermometry via Tm<sup>3+</sup>-doped NaYF<sub>4</sub> core-shell nanoparticles. *Optics Letters* **39**, 6687 (2014).
90. Sun, H., Sun, X., Yu, M., Mishra, A. K., Huang, L. & Lian, J. Silica-Gold Core-Shell Nanosphere for Ultrafast Dynamic Nanothermometer. *Advanced Functional Materials* **24**, 2389–2395 (2014).
91. Lan, Y., Wang, H., Chen, X., Wang, D., Chen, G. & Ren, Z. Nanothermometer Using Single Crystal Silver Nanospheres. *Advanced Materials* **21**, 4839–4844 (2009).
92. Shakirova, J. R., Shevchenko, N. N., Baigildin, V. A., Chelushkin, P. S., Khlebnikov, A. F., Tomashenko, O. A., Solomatina, A. I., Starova, G. L. & Tunik, S. P. Eu-Based Phosphorescence Lifetime Polymer Nanothermometer: A Nanoemulsion Polymerization Approach to Eliminate Quenching of Eu Emission in Aqueous Media. *American Chemical Society Applied Polymer Materials* **2**, 537–547 (2020).
93. Uchiyama, S., Matsumura, Y., de Silva, A. P. & Iwai, K. Fluorescent Molecular Thermometers Based on Polymers Showing Temperature-Induced Phase Transitions and Labeled with Polarity-Responsive Benzofurazans. *Analytical Chemistry* **75**, 5926–5935 (2003).

94. Savchuk, O. A., Silvestre, O. F., Adão, R. M. R. & Nieder, J. B. GFP fluorescence peak fraction analysis based nanothermometer for the assessment of exothermal mitochondria activity in live cells. *Scientific Reports* **9**, 7535 (2019).
95. Nakano, M., Arai, Y., Kotera, I., Okabe, K., Kamei, Y. & Nagai, T. Genetically encoded ratiometric fluorescent thermometer with wide range and rapid response. *Public Library of Science ONE* **12**, e0172344 (2017).
96. Cao, W., Cui, Y., Yang, Y. & Qian, G. Dyes Encapsulated Nanoscale Metal–Organic Frameworks for Multimode Temperature Sensing with High Spatial Resolution. *American Chemical Society Materials Letters* **3**, 1426–1432 (2021).
97. Hou, B., Jia, M., Li, P., Liu, G., Sun, Z. & Fu, Z. Multifunctional Optical Thermometry Based on the Rare-Earth-Ions-Doped Up-/Down-Conversion Ba<sub>2</sub>TiGe<sub>2</sub>O<sub>8</sub>:Ln (Ln=Eu<sup>3+</sup>/Er<sup>3+</sup>/Ho<sup>3+</sup>/Yb<sup>3+</sup>) Phosphors. *Inorganic Chemistry* **58**, 7939–7946 (2019).
98. Perrella, R. V. & de Sousa Filho, P. C. High-sensitivity dual UV/NIR-excited luminescence thermometry by rare earth vanadate nanoparticles. *Dalton Transactions* **49**, 911–922 (2020).
99. Kshatri, D. S. & Khare, A. Optical properties of rare earth doped strontium aluminate (SAO) phosphors: A review. *Optics and Spectroscopy* **117**, 769–783 (2014).
100. Pedroso-Santana, S., Sarabia-Saínz, A., Fleitas-Salazar, N., Santacruz-Gómez, K., Acosta-Elías, M., Pedroza-Montero, M. & Riera, R. Deagglomeration and characterization of detonation nanodiamonds for biomedical applications. *Journal of Applied Biomedicine* **15**, 15–21 (2017).
101. Jung, H.-S. & Neuman, K. C. Surface Modification of Fluorescent Nanodiamonds for Biological Applications. *Nanomaterials* **11**, 153 (2021).

102. Thiering, G. & Gali, A. Color centers in diamond for quantum applications. in *Semiconductors and Semimetals* vol. 103 1–36 (Elsevier, 2020).
103. Pedroza Montero, F. A. Fluorescent Nanodiamonds based Thermometry. (University of Sonora, 2018).
104. Danilenko, V. V. On the history of the discovery of nanodiamond synthesis. *Physics of the Solid State* **46**, 595–599 (2004).
105. Dolmatov, V. Y. Detonation-synthesis nanodiamonds: synthesis, structure, properties and applications. *Russian Chemical Reviews* **76**, 339–360 (2007).
106. Guo-Wei, Y., Jin-Bin, W. & Qui-Xiang, L. Preparation of nano-crystalline diamonds using pulsed laser induced reactive quenching. *Journal of Physics: Condensed Matter* **10**, 7923 (1998).
107. Boudou, J. P., Curmi, P. A., Jelezko, F., Wrachtrup, J., Aubert, P., Sennour, M., Balasubramanian, G., Reuter, R., Thorel, A. & Gaffet, E. High yield fabrication of fluorescent nanodiamonds. *Nanotechnology* **20**, (2009).
108. Kumar, A., Ann Lin, P., Xue, A., Hao, B., Khin Yap, Y. & Sankaran, R. M. Formation of nanodiamonds at near-ambient conditions via microplasma dissociation of ethanol vapour. *Nature Communications* **4**, 1–8 (2013).
109. Daulton, T. L., Kirk, M. A., Lewis, R. S. & Rehn, L. E. Production of nanodiamonds by high-energy ion irradiation of graphite at room temperature. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* **175–177**, 12–20 (2001).
110. Banhart, F. & Ajayan, P. M. Carbon onions as nanoscopic pressure cells for diamond formation. *Nature* vol. 382 433–435 (1996).

111. Galimov, É. M., Kudin, A. M., Skorobogatskiĭ, V. N., Plotnichenko, V. G., Bondarev, O. L., Zarubin, B. G., Strazdovskiĭ, V. V., Aronin, A. S., Fisenko, A. V., Bykov, I. V. & Barinov, A. Y. Experimental corroboration of the synthesis of diamond in the cavitation process. *Doklady Physics* **49**, 150–153 (2004).
112. Rendler, T. Fluorescent nanodiamonds as a sensor and life science probe. (University of Stuttgart, 2017).
113. Kehayias, P. Exploring Basic Properties and Applications of Nitrogen-Vacancy Color Centers in Diamond. (Thesis Commons, 2018).
114. Lang, A. R. Dilatation, density and nitrogen content in type Ia diamonds: previous work and proposed experiments. *Journal of Physics D: Applied Physics* **26**, 2239–2244 (1993).
115. Kaiser, W. & Bond, W. L. Nitrogen, A Major Impurity in Common Type I Diamond. *Physical Review* **115**, 857–863 (1959).
116. Nanodiamond. *NeuNano*  
<http://neunano.com/en/index.php/products/nanomaterail/carbon-compounds/nanodiamond>.
117. Sankaran, K. J., Lin, Y.-F., Jian, W.-B., Chen, H.-C., Panda, K., Sundaravel, B., Dong, C.-L., Tai, N.-H. & Lin, I.-N. Structural and Electrical Properties of Conducting Diamond Nanowires. *American Chemical Society Applied Materials & Interfaces* **5**, 1294–1301 (2013).
118. Shenderova, O., Vargas, A., Turner, S., Ivanov, D. M. & Ivanov, M. G. Nanodiamond-Based Nanolubricants: Investigation of Friction Surfaces. *Tribology Transactions* **57**, 1051–1057 (2014).

119. Shenderova, O., Vlasov, I., Ciftan Hens, S. A. & Borjanovic, V. Enhancement of Photoluminescence of Nanodiamond Particles. 28 (2010).
120. Doherty, M. W., Manson, N. B., Delaney, P., Jelezko, F., Wrachtrup, J. & Hollenberg, L. C. L. The nitrogen-vacancy colour centre in diamond. *Physics Reports* **528**, 1–45 (2013).
121. Schirhagl, R., Chang, K., Loretz, M. & Degen, C. L. Nitrogen-Vacancy Centers in Diamond: Nanoscale Sensors for Physics and Biology. *Annual Review of Physical Chemistry* **65**, 83–105 (2014).
122. Petit, T., Yuzawa, H., Nagasaka, M., Yamanoi, R., Osawa, E., Kosugi, N. & Aziz, E. F. Probing Interfacial Water on Nanodiamonds in Colloidal Dispersion. *Journal of Physical Chemistry Letters* **6**, 2909–2912 (2015).
123. Sapsford, K. E., Algar, W. R., Berti, L., Gemmill, K. B., Casey, B. J., Oh, E., Stewart, M. H. & Medintz, I. L. Functionalizing nanoparticles with biological molecules: Developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chemical Reviews* **113**, 1904–2074 (2013).
124. Vaijayanthimala, V., Lee, D. K., Kim, S. V., Yen, A., Tsai, N., Ho, D., Chang, H. C. & Shenderova, O. Nanodiamond-mediated drug delivery and imaging: Challenges and opportunities. *Expert Opinion on Drug Delivery* **12**, 735–749 (2015).
125. Huang, H., Pierstorff, E., Osawa, E. & Ho, D. Active Nanodiamond Hydrogels for Chemotherapeutic Delivery. *Nano Letters* **7**, 3305–3314 (2007).
126. Lee, D.-K., Kee, T., Liang, Z., Hsiou, D., Miya, D., Wu, B., Osawa, E., Chow, E. K.-H., Sung, E. C., Kang, M. K. & Ho, D. Clinical validation of a nanodiamond-embedded

- thermoplastic biomaterial. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, E9445–E9454 (2017).
127. Manson, N. B., Beha, K., Batalov, A., Rogers, L. J., Doherty, M. W., Bratschitsch, R. & Leitenstorfer, A. Assignment of the NV<sup>0</sup> 575 nm zero-phonon line in diamond to a <sup>2</sup>E-<sup>2</sup>A<sub>2</sub> transition. *Physical Review B* **87**, 155209 (2013).
128. Holzgrafe, J., Beitner, J., Kara, D., Knowles, H. S. & Atatüre, M. Error corrected spin-state readout in a nanodiamond. *npj Quantum Information* **5**, 13 (2019).
129. Rong, X., Geng, J., Shi, F., Liu, Y., Xu, K., Ma, W., Kong, F., Jiang, Z., Wu, Y. & Du, J. Experimental fault-tolerant universal quantum gates with solid-state spins under ambient conditions. *Nature Communications* **6**, 1–7 (2015).
130. Pfender, M., Aslam, N., Simon, P., Antonov, D., Thiering, G., Burk, S., Fávoro De Oliveira, F., Denisenko, A., Fedder, H., Meijer, J., Garrido, J. A., Gali, A., Teraji, T., Isoya, J., Doherty, M. W., Alkauskas, A., Gallo, A., Grüneis, A., Neumann, P. & Wrachtrup, J. Protecting a Diamond Quantum Memory by Charge State Control. *Nano Letters* **17**, 5931–5937 (2017).
131. Hauf, M. V., Grotz, B., Naydenov, B., Dankerl, M., Pezzagna, S., Meijer, J., Jelezko, F., Wrachtrup, J., Stutzmann, M., Reinhard, F. & Garrido, J. A. Chemical control of the charge state of nitrogen-vacancy centers in diamond. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics* **83**, 1–4 (2011).
132. Zhu, X., Su, Q., Feng, W. & Li, F. Anti-Stokes shift luminescent materials for bio-applications. *Chemical Society Reviews* **46**, 1025–1039 (2017).



133. PerkinElmer. An Introduction to Fluorescence Spectroscopy. <https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fundamentals/Fluorescence%20Spectroscopy.pdf> (2000).
134. Braslavsky, S. E. Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry* **79**, 293–465 (2007).
135. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer US, 1999).
136. Beć, K. B. & Huck, C. W. Breakthrough Potential in Near-Infrared Spectroscopy: Spectra Simulation. A Review of Recent Developments. *Frontiers in Chemistry* **7**, 22 (2019).
137. del Valle, J. C., Camarillo, E., Martinez Maestro, L., Gonzalo, J. A., Aragón, C., Marqués, M., Jaque, D., Lifante, G., Solé, J. G., Santacruz-Gómez, K., Carrillo-Torres, R. C. & Jaque, F. Dielectric anomalous response of water at 60 °C. *Philosophical Magazine* **95**, 683–690 (2015).
138. Alkauskas, A., Buckley, B. B., Awschalom, D. D. & Van de Walle, C. G. First-principles theory of the luminescence lineshape for the triplet transition in diamond NV centres. *New Journal of Physics* **16**, 073026 (2014).
139. Balian, G. & Eddy, G. W. Figure-Of-Merit (FOM), An Improved Criterion Over The Normalized Chi-Squared Test For Assessing Goodness-Of-Fit Of Gamma-Ray Spectral Peaks. *Nuclear Instruments and Methods* 389–395 (1976).
140. Schneckenburger, H. Förster resonance energy transfer—what can we learn and how can we use it? *Methods and Applications in Fluorescence* **8**, 013001 (2019).
141. Cheng, P.-C. The Contrast Formation in Optical Microscopy. in *Handbook Of Biological Confocal Microscopy* (ed. Pawley, J. B.) 162–206 (Springer US, 2006).

142. Genovese, D., Cingolani, M., Rampazzo, E., Prodi, L. & Zaccheroni, N. Static quenching upon adduct formation: a treatment without shortcuts and approximations. *Chemical Society Reviews* **50**, 8414–8427 (2021).
143. English, C., Kitzhaber, Z., Williams, J. & Myrick, M. Challenges of Spectrofluorometry, Part 2: Instrument-Specific Concerns. <https://www.spectroscopyonline.com/view/key-errors-avoid-consideration-fluorescence-quenching-data> (2021).
144. Maillard, J., Klehs, K., Rumble, C., Vauthey, E., Heilemann, M. & Fürstenberg, A. Universal quenching of common fluorescent probes by water and alcohols. *Chemical Science* **12**, 1352–1362 (2021).
145. Ruiz, D., del Rosal, B., Acebrón, M., Palencia, C., Sun, C., Cabanillas-González, J., López-Haro, M., Hungría, A. B., Jaque, D. & Juarez, B. H. Ag/Ag<sub>2</sub>S Nanocrystals for High Sensitivity Near-Infrared Luminescence Nanothermometry. *Advanced Functional Materials* **27**, 1604629 (2017).
146. Zhou, J., Del Rosal, B., Jaque, D., Uchiyama, S. & Jin, D. Advances and challenges for fluorescence nanothermometry. *Nature Methods* **17**, 967–980 (2020).
147. Xu, M., Zou, X., Su, Q., Yuan, W., Cao, C., Wang, Q., Zhu, X., Feng, W. & Li, F. Ratiometric nanothermometer in vivo based on triplet sensitized upconversion. *Nature Communications* **9**, 2698 (2018).
148. Marciniak, Ł., Bednarkiewicz, A., Hreniak, D. & Streck, W. The influence of Nd<sup>3+</sup> concentration and alkali ions on the sensitivity of non-contact temperature measurements in ALaP<sub>4</sub>O<sub>12</sub>:Nd<sup>3+</sup> (A=Li, K, Na, Rb) nanocrystalline luminescent thermometers. *Journal of Materials Chemistry C* **4**, 11284–11290 (2016).

149. Ye, F., Wu, C., Jin, Y., Chan, Y.-H., Zhang, X. & Chiu, D. T. Ratiometric Temperature Sensing with Semiconducting Polymer Dots. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 8146–8149 (2011).
150. Carattino, A., Caldarola, M. & Orrit, M. Gold Nanoparticles as Absolute Nanothermometers. *Nano Letters* **18**, 874–880 (2018).
151. Xue, K., Wang, C., Wang, J., Lv, S., Hao, B., Zhu, C. & Tang, B. Z. A Sensitive and Reliable Organic Fluorescent Nanothermometer for Noninvasive Temperature Sensing. *Journal of the American Chemical Society* **143**, 14147–14157 (2021).