

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
INSTITUTO UNIVERSITARIO MIXTO DE TECNOLOGÍA QUÍMICA



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**



**INSTITUTO DE
TECNOLOGÍA
QUÍMICA**



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**Preparación y propiedades fotofísicas
de materiales grafénicos y puntos
cuánticos basados en carbono.
Aplicaciones en nanotecnología.**

Tesis Doctoral

Presentada por:

Hermenegildo Garcia i Baldoví

Dirigida por:

**Mercedes Álvaro Rodríguez
Rosa Belén Ferrer Ribera**

Valencia, Julio 2016

Dedicado a mis abuelos porque estarán orgullosos de mi. Para Rosalia, Juan y Severino que hace tiempo que nos dejaron pero siempre permanecerán en nuestros corazones. Y a mi abuela Josefina que con su cariño mantiene la familia unida.

Agradecimientos.

La apariencia física y orgánica de nuestro organismo viene dada, en parte, por el ambiente y pero sobre todo por la genética que hemos heredado de nuestros progenitores, y se conoce como fenotipo, pero la parte psicológica, emocional y nuestra personalidad es el resultado de todas las interacciones con otras personas que hemos vivido a lo largo de nuestro viaje. Por tanto, nuestra forma de ser ha sido moldeada por todas las personas que hemos conocido y no podemos negar que somos lo que somos gracias a ellas. Por eso sé, que no hubiera llegado tan lejos sin recibir el amor de mis padres y hermanos, el consejo y cuidado de mis abuelos, el cariño de todos mis tíos y primos hermanos, el afecto de mi princesa y el apoyo incondicional de mis amigos de “cuadrilla”. Entre todos me habéis hecho el hombre que soy y nunca seré capaz de expresaros suficientemente la gratitud que siento por ello.

Primeramente me gustaría agradecer de igual manera a mis dos directoras de Tesis por su apoyo y comprensión en los momentos difíciles y por compartir mis alegrías en los momentos buenos. A **Mercedes Álvaro Rodríguez** a estas alturas la considero más como parte de mi familia que como mi Jefa y me ha enseñado que con paciencia e insistiendo todo se puede conseguir. A **Rosa Belén Ferrer Ribera** le debo más que mi tesis, me levanto cuando estuve desesperado y me enseñó a no rendirme y por supuesto me enseñó todo lo que sé de fotoquímica

En los agradecimientos la gente suele nombrar uno a uno todas las personas que han sido de relevancia durante su tesis. Yo debo admitir que soy una persona muy despistada y seguro que me dejo a alguna persona y no quisiera que se sintiera ofendido/a, por esa razón os doy las gracias por adelantado a todos/as.

No puedo dejar escapar la ocasión para expresar mi gratitud especialmente a:

-**Rafa Ballesteros**: que fue mi director de tesina y me hizo ver que la ciencia está hecha para locos pensadores y soñadores como nosotros.

- **Raúl Herance** que me enseñó todo lo que sé de bioquímica y lo considero como un hermano mayor.

- **Pedro Atienzar** que nos pasamos el rato de hablando de ciencia y sin él no habría podido trabajar en el ITQ tan bien como lo he hecho.

- **A Maykel de Miguel de La Torre**: que me inició en la fotoquímica de laboratorio y me hizo descubrir los encantos de Lisboa.

- **Moorthy**: que cada poco tiempo nos honra con su visita, gran persona y compañero.

- **Mireia Buaki**: que podía tener un día bueno o malo pero siempre te regalaba una sonrisa contagiosa alegrándote el día.

- **Manolo Adelantado**: contigo siempre tuve mucha confianza, gracias por ayudarme con la informática.

-**Sara Iborra**: has sido un gran apoyo durante mi tesis y a pesar de las veces que he ido a marearte siempre me ayudaste y me guiaste para no perderme en la niebla de la burocracia.

-**Nazila Kamaly**: por tan calida acogida en tu laboratorio en el verano del 2015 en Boston y sobretodo por una nueva y duradera amistad.

Además debo agradecer a mis compañeros de laboratorio **Andrea, Adrián, Juan Carlos, Juan Fran, Julio, Majo Miquel, Premkumar y Sergio** por los buenos momentos, por todas las “rubias” que nos hemos tomado y por todas las noches que hemos vivido. Y no puedo olvidarme de mis compañeros del ITQ como son **Fran, Marcos La Torre, Abdessamad, Amparo, Esther,**

Iván, Diego, Josep, Malonda y Ferrán con los que no han faltado risas y conversaciones divertidas para amenizar las jornadas de trabajo.

No pueden faltar mis agradecimientos para todos los técnicos de los servicios de análisis del ITQ pero en especial a *Rosa Torrero* por su amabilidad, dedicación y por haberme hecho sentir como en casa, el servicio técnico y de mecanización del ITQ y a los miembros del servicio de informática del ITQ, también al servicio de administración del ITQ por su paciencia y finalmente, no podría olvidarme de los miembros del servicio de microscopía de la UPV en especial a *Manolo, Ximo, Alicia y Merche*. A todos ellos gracias.

También debo agradecer a mis profesores que me han alimentado la pasión por el conocimiento desde el colegio Maria Auxiliadora (*Bea, Consuelo, Marisales, Rafa*) y en el instituto Joan Fuster (*Carmen, Tere, Felipe y Boro*). Tampoco debería faltar **Emilio Palomares** porque lo considero como un instructor mas que ha contribuido mas de lo que cree a que hoy este aquí

Cualquiera que me haya conocido bien a lo largo de mi tesis sabrá o habrá notado un cambio en mí actitud a mitad tesis. Un cambio para mejor en lo personal y en lo profesional. Esta metamorfosis fue debido a lo que yo llamo el “*factor B*”. A principios de 2014 conocí a la chica más increíble del mundo y a la mujer de mí vida. Su nombre es *Bianca*. Recuerdo muy bien que después de “conquistarla” empecé a creer a en mí mismo otra vez y a crearme capaz de todo. Julieta me has hecho mejor persona y me alegras la vida en cada sonrisa, mil millones de gracias.

Como no, *mi Padre Hermenegildo García Gómez* no podía faltar en estos agradecimientos. Ya que sin él no estaría aquí. Debo decir que de él no solo heredé sus genes, sino también el amor por la ciencia. Y para un chico tan curioso como yo fue un lujo tener un Padre y “mentor” tan inteligente que desde niño ha iluminado mi camino con su sabiduría infinita. No solo es merecedor de un Jaime I sino también de toda mi admiración y afecto. Siempre ha querido lo mejor para mí y orientarme de la mejor manera, a pesar de lo cabezón que soy empeñándome en equivocarme una y otra vez.

A mi Madre, *M^o Vicenta Baldoví Seguí*, no podre nunca agradecerle suficientemente todo lo que ha hecho por mí. Una mujer inteligente, fuerte, dinámica y luchadora que me enseñado a actuar con lógica y justicia. Que además de madre también ha sido profesora y amiga. Como química que es, ha entendido mi pasión por la investigación y siempre me ha empujado a perseguir mis metas sin importar lo lejos que estén ni si son una locura. Tampoco debo olvidarme de agradecer a Pepe todo lo que ha hecho por mi familia, es una gran persona que trajo paz y armonía a mi casa sin pedir nada a cambio por eso es lo considero uno más.

Para terminar no puedo dejar de agradecer a todos mis familiares todo lo que han hecho por mi y el cariño que me han dado como mi “tía lejana” pero próxima en mi corazón *Presenta* que me cuido de niño y la quiero en el alma; a mis tíos *Carlos María, Juan Esteban, Rosalía, M^a Jesús y Jose* que siempre están ahí cuando los necesito y se preocupan por mí. A mis primos hermanos, que los quiero mucho y ellos a mi *Marina y Javi*. A mi abuela Josefina que ahora es el pilar de la familia Baldoví y la queremos muchísimo todos. A mis abuelos *Juan y Rosalía* que siempre los tengo presente en mi corazón y a mi abuelo *Severino* que me enseñó el noble oficio de la agricultura y que lo echo de menos a él y a sus consejos y reproches. Finalmente acabare agradeciendo a mis hermanos *Alberto y María* todos los momentos inolvidables que hemos vivido, todo el apoyo que me han brindado y hacerles saber que lo que más valoro de todo es nuestra unidad. No podría haber tenido unos hermanos mejores. Tampoco me olvidaré de ti *Nicolás*, siempre serás el “*pequeño*” pero estoy seguro que seras “grande” como el que mas. Tienes toda la vida por delante y yo curiosidad por ver cómo creces.

No es la sangre y la carne, si no el corazón, lo que nos hace familia. Os quiero familia!

Símbolos y abreviaturas.

Eu(OAc)₃	Acetato de Europio (III)
HBr	Ácido bromhídrico
HCl	Ácido clorhídrico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
HF	Ácido Fluorhídrico
ARN	Ácido ribonucleico
PTCA	Ácido tetracarboxílico de perileno
HI	Ácido Yodhídrico
BSA	Albúmina de suero bovino
Å	Amstrong
AFM	Atomic force microscopy / Microscopía de fuerza atómica
Br	Bromo
C	Carbono
C-NOR	Carbon nanoonion rings / Anillos de nanocebolla de carbono
C-NOR(Eu)	Carbon nanoonion rings with Europium/ Anillos de nanocebolla de carbono utilizando Europio
C-dots	Carbon quantum dots / Puntos cuánticos de carbono
Ca⁺	Catión de calcio
Eu³⁺	Catión de europio
Ag⁺	Catión de plata
CVD	Chemical vapor deposition / Deposición química por vapor
k_q	Constante de desactivación

DCFA-DA	Diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína
CO₂	Dióxido de carbono
2D	Dos dimensiones
D.O.	Densidad óptica
ϕ_{em}	Eficiencia cuántica de emisión = ϕ_f
ϕ_f	Eficiencia cuántica de fluorescencia
ϕ_{cs}	Eficiencia cuántica de separación de cargas
$\Delta J/J_0$	El coeficiente entre el diferencial de la absorbancia, a una determinada longitud de onda, del material excitado menos su absorbancia en el estado fundamental, y la absorbancia del material a dicha longitud de onda en su estado fundamental a una determinada temperatura
e⁻	Electrón
eV	Electrón voltios
RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear / Nuclear magnetic resonance
UV-Vis	Espectroscopía de absorción ultravioleta visible / ultravioleta visible
PHZ	Fenotiacina
E_{fb}	Flat band energy / Energía de banda plana
F	Flúor
FTIR-ATR	Fourier transform infrared spectroscopy by attenuated total reflectance / Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier con atenuación total de radiación
°C	Grados Celsius
G-Gs	Grafeno / Grafenos
(Br)G	Grafeno dopado con bromo
(Cl)G	Grafeno dopado con cloro
(F)G	Grafeno dopado con flúor

(X)G	Grafeno dopado con halógeno / Grafeno halogenado
(N)G	Grafeno dopado con nitrógeno
(N,O)G	Grafeno dopado con nitrógeno y oxígeno
(I)G	Grafeno dopado con yodo
g	Gramos
GPa	Gigapascales
GHz	Gigahercios
OH	Hidroxilo
H₂	Hidrógeno gas
HR-TEM	High-resolution transmission electron microscopy / Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución
HOMO	Highest occupied molecular orbital / Orbital molecular ocupado de más alta energía.
h	Hora
h⁺	Huecos / Protones
IR	Infrarrojo
Kg	Kilogramos
λ	Longitud de onda
λ_{em}	Longitud de onda emisión
λ_{max}	Longitud de onda máxima
λ_{ex}	Longitud de onda excitación
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital / Orbital molecular no ocupada de más baja energía
m	Metro
m²	Metro cuadrado
MeOH	Metanol

MV	Metil viológeno
μs	Microsegundo
mL	Mililitro
mg	Miligramo
mJ	Milijulio
mW	Milivatios
min	Minuto
M	Molar
nm	Nanómetro
NP - Np	Nanopartícula
ns	Nanosegundo
N	Nitrógeno
N₂	Nitrógeno gas
TMPD	N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina
Ω	Ohmios
GO	Óxido de grafeno
rGO	Óxido de grafeno reducido
GO'	Óxido de grafeno sin liofilizar
TiO₂	Óxido de titanio
O	Oxígeno
O₂	Oxígeno gas
PET 400	Polietilenglicol de peso molecular medio 400 g/mol
E_{ox}	Potencial de oxidación
V vs NHE	Potencial respecto el electrodo de hidrógeno normalizado
PI	Propidium iodide / Yoduro de propidio

ROS	Reactive oxygen species / Especies reactivas de oxígeno
s	Segundos
CsSe	Seleniuro de cesio
STS	Staurosporine / Estaurosporina
CdS	Sulfuro de cadmio
PbS	Sulfuro de plomo
CdTe	Telurio de cadmio
PET	Tereftalato de polietileno
Tg	Termogravimetría
τ	Tiempo de vida medio
τ_0	Tiempo de vida medio inicial
T.A.S	Transient absorption spectroscopy / Espectroscopía de absorbancia de transición
3D	Tres dimensiones
TEOA	Trietanolamina
u.a	Unidades aleatorias
V	Voltio
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy / Espectroscopía de fotodetección de rayos X
I	Yodo

Índice.

Capítulo 1: Fundamentos teóricos..... 17

1.0- Introducció.	3
1.1- Propiedades del grafeno.	5
1.2- Interés del grafeno frente a otras formas alotrópicas del carbono.....	8
1.3- Métodos de preparación de grafeno.	10
1.3.1- Síntesis de películas de grafeno por deposición química en fase de vapor.	10
1.3.2- Síntesis de material grafénico obtenido vía química.....	13
1.3.3- Sintesis de películas de grafeno y carbono turbostrático a partir de biopolímeros. ..	17
1.4- Materiales grafénicos aplicados en fotocatalisis.	23
1.5- Puntos cuánticos: Nanopartículas de Carbono.	27
1.5.1- Confinamiento cuántico en nanoparticulas.	29
1.5.2- Aplicaciones de los puntos cuánticos.....	29
1.5.3- Sintesis de puntos cuánticos de carbono.	33
1.6- Referencias.....	38

Capítulo 2: Objetivos 43

Bloque I: Estudio fotofísico y fotoquímico de materiales basados en grafeno para su uso como fotocatalizadores..... 45

Capítulo 3: Estudio del estado transitorio de separación de cargas fotoinducido en suspensiones de óxido de grafeno y óxido de grafeno reducido..... 47

3.1- Introducción.	47
3.2- Resultados y discusión.	49
3.3- Conclusiones.	64

3.4- Referencias.....	65
Capítulo 4: Influencia de la cantidad de dopantes en las propiedades fotoelectroquímicas de grafenos co-dopados con N y O.....	69
4.1- Introducción.....	69
4.2-Resultados y discusión.....	70
4.2.1- Medidas electroquímicas.....	74
4.3- Conclusiones.....	81
4.4- Referencias.....	82
Capítulo 5: Generación fotocatalítica de hidrógeno a partir de mezclas metanol-agua usando óxidos de grafenos reducidos conteniendo halógenos.....	84
5.1- Introducción.....	84
5.2- Resultados y discusión.....	86
5.2.1- Actividad fotocatalítica de las muestras (X)G para generación de hidrógeno en mezclas metano-agua.....	94
5.2.3- Detección del estado de separación de cargas con técnicas espectroscópicas con resolución temporal.....	99
5.3- Conclusiones.....	104
5.4- Referencias.....	105
Bloque II: Síntesis de nanopartículas basadas en carbono y sus aplicaciones en nanotecnología.....	109
Capítulo 6: Puntos cuánticos de carbono de elevada fotoluminiscencia obtenidos por pirólisis de cationes amonios cuaternarios encapsulados en la zeolita ITQ-29.....	111
6.1- Introducción.....	111
6.2- Resultados y discusión.....	113
6.3- Conclusiones.....	126
6.4- Referencias.....	127

Capítulo 7: Anhídrido del ácido Perilentetracarboxílico como precursor de puntos cuánticos fluorescentes de carbono con estructura de nanocébolla. 131

7.1- Introducción.	131
7.2- Resultados y discusión.	132
7.2.1 – Estudio toxicológico y biocompatibilidad celular para las muestras C-NOR y C-NOR(Eu).	145
7.3- Conclusiones.	156
7.4- Referencias.	157

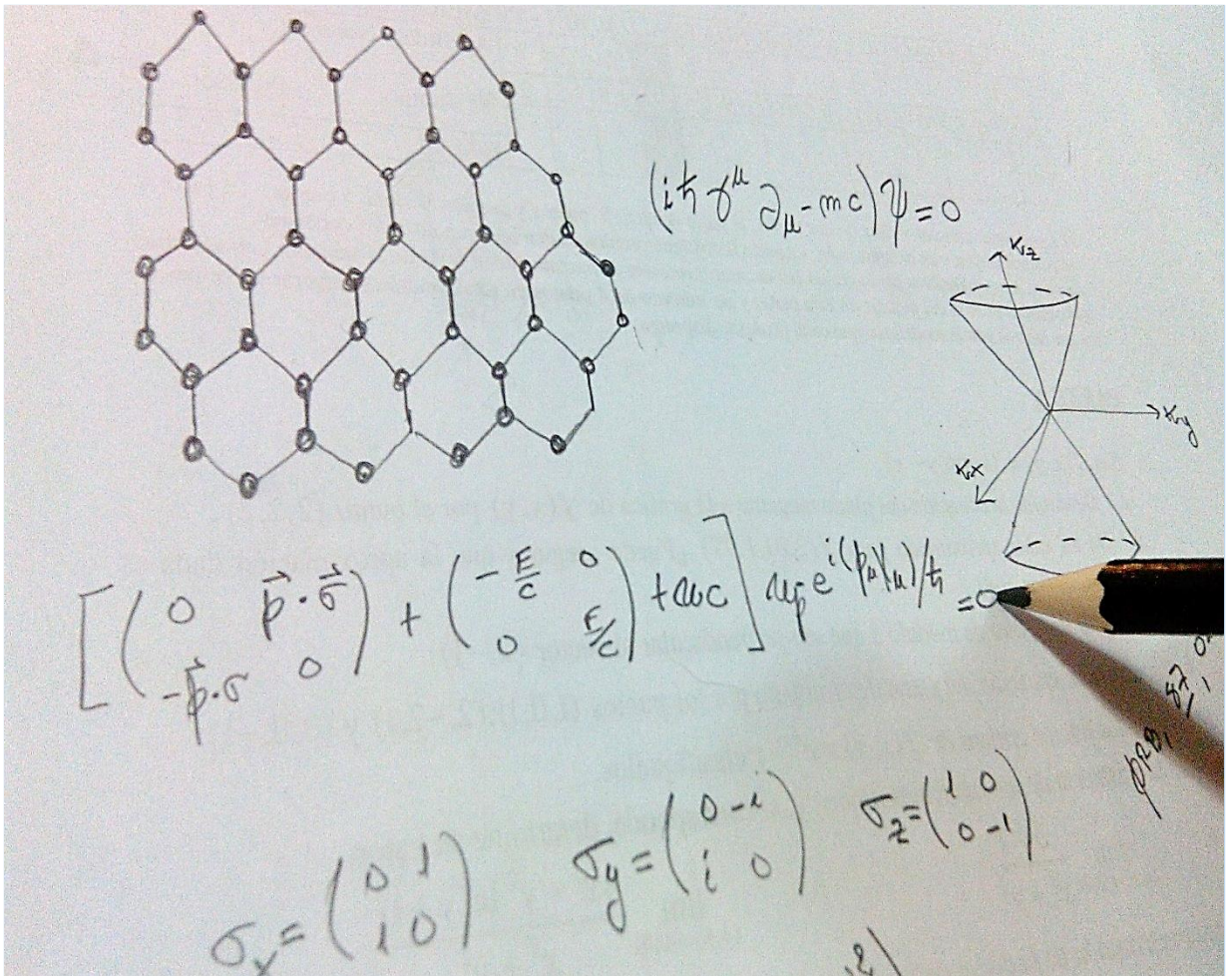
Capítulo 8: Procedimiento experimental. 161

8.1- Técnicas de caracterización y análisis.	163
8.1.1- Microscopía electrónica de transmisión.	163
8.1.2- Microscopía electrónica de barrido.	164
8.1.3- Microscopía de fuerza atómica y perfilometría óptica.	164
8.1.4- Microscopía óptica.	165
8.1.5- Análisis elemental por combustión.	165
8.1.6- Análisis termogravimétrico.	165
8.1.7- Espectroscopía de Plasma ICP-OES.	166
8.1.9- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear ¹ H y ¹³ C.	167
8.1.11- Espectroscopía de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis).	167
8.1.12- Espectroscopia de Fluorescencia.	168
8.1.13- Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier medida por el método de reflexión de atenuación total (FTIR-ATR).	169
8.1.14- Dispersión dinámica de luz y potencial Z.	169
8.1.15- Espectroscopía de absorción de transición (T.A.S.).	169
8.2- Procedimientos experimentales electroquímicos.	174
8.2.1- Mediciones fotoelectroquímicas.	174
8.2.2- Determinación del potencial de banda plana.	175

8.3- Procedimientos experimentales en fotoquímica.....	175
8.3.1- Cálculo de los rendimientos cuánticos de fluorescencia.....	175
8.3.2- Rendimiento cuántico relativo de separación de cargas.....	177
8.3.3- Tiempos de vida de emisión de fluorescencia.....	177
8.3.4- Experimentos de desactivación.....	178
8.3.5- Fotogeneración de H ₂ a partir de una disolución agua–metanol.....	180
8.4- Procesos experimentales bioquímicos.....	181
8.4.1- Cultivo celular.....	181
8.4.2- Microscopia confocal de fluorescencia.....	182
8.4.3-Ensayo de viabilidad por el test MTT.....	182
8.4.4- Citometría estática por fluorescencia.....	183
8.4.5- Medida de inducción de apoptosis.....	185
8.4.6- Experimento de producción de especies de oxígeno reactivos.....	186
8.4.7- Presentación de los datos y los resultados de los análisis estadísticos.....	187
8.5- Síntesis de materiales.....	188
8.5.1- Síntesis del óxido de grafeno (GO).....	188
8.5.2- Síntesis de óxido de grafeno reducido (rGO).....	188
8.5.3- Síntesis de suspensiones de grafenos dopados con nitrógeno y oxígeno [(N,O)G].....	188
8.5.4- Síntesis de películas de grafenos dopados con nitrógeno y oxígeno.....	189
8.5.5- Síntesis de la zeolita ITQ-29.....	189
8.5.6- Síntesis de los puntos de carbono (C-dots) en la matriz de la zeolita ITQ-29 y su extracción.....	190
8.5.7- Síntesis de los anillos de nanocébolla de carbono (C-NOR) y su purificación.....	190
8.6- Referencias.....	192
Capítulo 9: Conclusiones.....	193
9.1- Conclusiones.....	193
9.2- Conclusions.....	195
Resúmenes de la Tesis Doctoral.....	197
Publicaciones.....	205

Capítulo 1:

Fundamentos teóricos.



Capítulo 1

Fundamentos teóricos.

1.0- Introducción.

El grafito es un material conocido desde hace más de 500 años (ya en el año 1500 se tenía constancia de la existencia de un yacimiento muy puro en Borrowdale en Gran Bretaña). En 1924 mediante difracción de rayos X, fue resuelta su estructura por dos grupos simultáneamente.[1] Aunque siempre se creyó que estas capas de grafito no se podían producir de manera aislada, recientemente se ha procedido a estudiar en detalle las propiedades de cada una de estas capas consecutivas. En 2004 Andre Geim, Konstantine Novoselov, y sus colaboradores mostraron que no sólo era posible aislar una de estas capas que componen la estructura de grafito, sino que además eran estables. Cada una de estas láminas aisladas es lo que se conoce como grafeno.

Los experimentos iniciales sobre las propiedades físicas de las capas de grafito atrajeron el interés de toda la comunidad científica, demostrando por primera vez las propiedades electrónicas y ópticas de estas monocapas [2,3], obtenidas por exfoliación manual de grafito y utilizando cinta adhesiva se consiguió el aislamiento de láminas de grafeno tras varias exfoliaciones consecutivas. Estos estudios pioneros fueron decisivos para la concesión del premio Nobel de Física en el año 2010 a Geim y Novoselov [4] por su “groundbreaking experiments regarding two dimensional material graphene”. Visto en perspectiva, parece increíble como un material conocido desde hace más de cien años ha dado lugar a una revolución en los últimos 10 años en campos tan diferentes como la microelectrónica, la ciencia de materiales, la catálisis e incluso en biomedicina.[5-12]

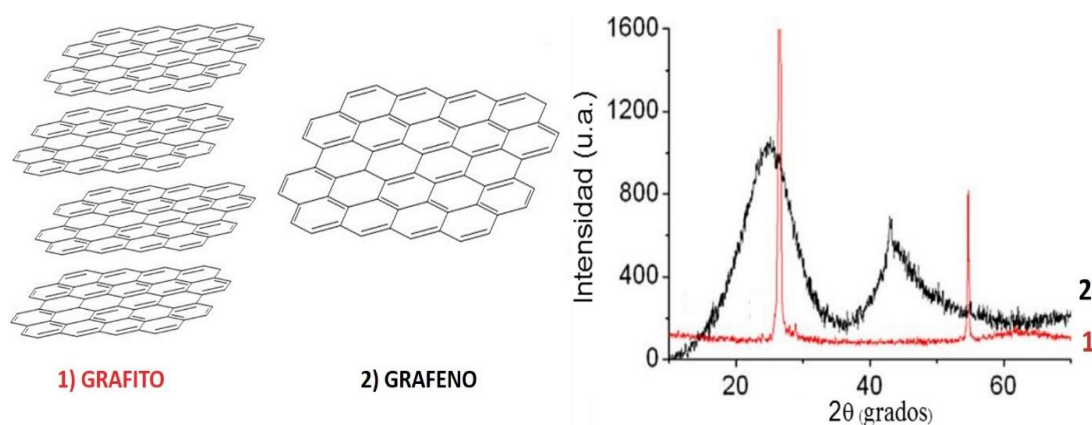


Figura 1.1- Representación de la estructura del (1) grafito y del (2) grafeno y comparación de los respectivos espectros de difracción de rayos X.

Desde el punto de vista estructural, el grafeno está formado por una capa de un único átomo de espesor, y constituida por átomos de carbono con hibridación sp^2 dispuestos en geometría hexagonal y con una distancia de enlace aproximada de 1.42 Å. Unas de las características más importantes del grafeno es estar constituido por una única capa de grafito, que representa el límite físico de miniaturización de este material bidimensional (2D), por lo que el espesor del grafeno es de 0.34 nm y representa el valor mínimo del espesor de cualquier material, no existiendo en principio limitación en el tamaño lateral. El solapamiento de los orbitales atómicos p_z de cada uno de los átomos carbono perpendiculares a la superficie del grafeno, da lugar a un sistema de orbitales moleculares π y π^* antienlazantes en un número tan elevado como átomos de carbono forman la lámina de grafeno, que al representar sus niveles de energía, idealmente resulta en una anchura entre la banda de valencia y de conducción de 0 eV. Estos enlaces π deslocalizados extendidos, son los responsables del comportamiento “metálico” del grafeno. Además, cabe destacar que en este material la densidad electrónica se distribuye por igual sobre y debajo de la película de grafeno.

1.1- Propiedades del grafeno.

Este orbital π extendido es responsable de las *propiedades eléctricas* del grafeno, como por ejemplo, su conductividad eléctrica, que puede llegar a ser tan elevada o incluso muy superior a la de los materiales utilizados para conducir la electricidad (como el cobre o el aluminio), y una resistividad intrínseca de $10^{-8} \Omega \cdot m$, menor incluso que la de la plata, que es el metal conocido con menor resistividad.

Este sistema de orbitales π deslocalizados en el grafeno, genera una nube electrónica responsable de la elevada movilidad de los electrones por su superficie, comportándose como cuasipartículas con masa efectiva nula y con una velocidad constante de $10^6 m \cdot s^{-1}$ (unas 300 veces menor que la velocidad de la luz en el vacío). Además, el comportamiento del electrón sobre el grafeno no está regido por la ecuación de Schrödinger, sino por la ecuación relativista de Dirac.[13] Por otro lado, es destacable la elevada concentración de electrones por unidad de superficie ($10^{12} e^{-} \cdot cm^2$), exhibiendo a temperatura ambiente una movilidad de carga sorprendente ($15-200 \cdot 10^3 cm^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$).[3, 14-16] Esta conducción “balística” de los electrones en el grafeno, hace que estos puedan responder a campos eléctricos o magnéticos alternos de alta frecuencia en el rango GHz. Todas estas propiedades electrónicas del grafeno podrían ser útiles en la preparación de dispositivos electrónicos ultrarrápidos para la transmisión de información, postulándose como el sustituto ideal de silíceo en la fabricación de dispositivos electrónicos. De hecho, la multinacional IBM fabrica prototipos de transistores de grafeno que trabajan a una frecuencia de 100 GHz, es decir, 10 veces más rápido que los transistores actuales.

La empresa coreana Samsung, que es la propietaria de una serie de patentes sobre la preparación de películas de grafeno en superficies metálicas por deposición química de vapor[17], ha descrito pantallas de grafeno de longitudes en el rango del metro, siendo además un objetivo de la empresa, la preparación de bobinas de plástico conteniendo grafeno en su superficie mediante la técnica denominada “Royo a Royo” en inglés “Roll to Roll”. Estos datos demuestran, que a pesar del espesor subnanométrico, en principio el grafeno no tendría limitación en cuanto a las dimensiones laterales que podría presentar. La existencia de orbitales π extendidos en el grafeno es el origen de una fuerte interacción atractiva de tipo $\pi-\pi$ entre láminas dando lugar a su apilamiento.

Aunque el grafeno es una lámina de un átomo de espesor, se aceptan como materiales relacionados aquellos que están constituidos por el apilamiento de algunas capas de grafito. Se deja de considerar grafeno y el material se describe mejor como nanopartículas de grafito cuando

el número de láminas de grafeno apiladas supera las 20, lo que conduce a materiales laminares de una espesor entorno a los 10 nm.

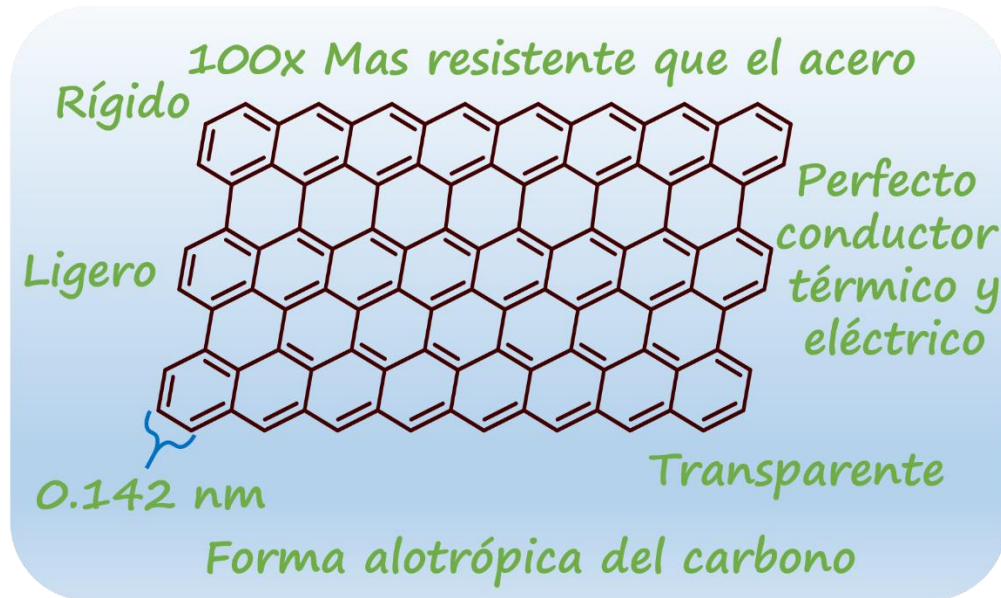


Figura 1.2- Ilustración mostrando la estructura del grafeno y algunas de sus principales propiedades.

Otras propiedades físicas destacables del grafeno son sus **propiedades térmicas**, similares a las que presentan elementos metálicos, tales como una elevada conductividad térmica ($5000 \text{ W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) a través del esqueleto de la lámina de grafeno.[18, 19] Sin embargo, el flujo térmico tendría limitaciones en la dirección del eje Z perpendicular al plano del grafeno ($6 \text{ W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) debido a las relativas débiles interacciones existentes entre las capas de grafito (Van der Waals). También es digno de mención, la existencia del fenómeno termoeléctrico por el cual diferencias de temperatura en determinadas zonas de la lámina, dan lugar a corrientes eléctricas que son de las más altas que se pueden originar en cualquier material.[20-22]

Además de las sorprendentes propiedades electrónicas y térmicas del grafeno, este material presenta otras propiedades físicas y químicas únicas. Entre ellas son destacables sus **propiedades mecánicas** que han sido medidas mediante técnicas como microscopía de fuerza atómica. Se ha llegado a determinar la resistencia a la tracción (130 GPa) y el módulo de Young del grafeno (1 TPa),[23] que se encuentran entre los valores más altos de todos los materiales siendo aproximadamente 100000 mayor al valor del módulo de Young del acero o de otros materiales (1 m^2 puede soportar 4 Kg de peso). Además, es un material ultraligero con una densidad 0.77 mg/m^2 (1 m^2 pesaría solamente 0.77 mg). Estas propiedades mecánicas, sugieren como aplicación evidente del grafeno su uso como aditivos en “composites” de polímeros plásticos para aumentar su resistencia, como ya se hace en otros materiales de carbono.[24]



Figura 1.3- Demostración de las propiedades elásticas del grafeno y su resistencia a la rotura que hacen que este material puede soportar elevadas presiones.

El grafeno también posee *propiedades ópticas* notables, que van a ser importantes en la presente Tesis Doctoral. La propiedad óptica más relevante del grafeno es su transparencia y poseer un espectro óptico de absorción “neutro” en el rango completo de longitudes de onda del ultravioleta al visible. La existencia de transiciones electrónicas a cualquier longitud de onda como consecuencia del gran número de orbitales atómicos, hacen que éste absorba (o transmita) por igual cualquier fotón en el rango de longitudes de onda del visible. Así, una forma simple de diferenciar películas de grafeno frente a películas con varias capas de grafeno, es medir la transmitancia de estas películas. Se ha descrito que una lámina de grafeno transmite el 99% de las radiaciones en cualquier longitud de onda entre 300-800 nm, por lo que las películas de grafeno son totalmente inobservables visualmente debido a su transparencia.[25] Sin embargo películas de dos láminas de grafeno presentan una transmitancia sensiblemente inferior en torno al 95%, como consecuencia del solapamiento de orbitales π entre dos láminas que se origina en el apilamiento. Esta transmitancia disminuye significativamente al aumentar el número de capas y se hace visualmente observable en capas de grafito sobre sustratos transparentes, como cuarzo o vidrio cuando el número de capas es 3 o 4. Películas de 4 o más capas sobre soportes transparentes presentan una apariencia visual de color gris, que se oscurecen gradualmente hacia el negro a medida que aumenta el número de capas de grafito, disminuyendo dramáticamente su transparencia.

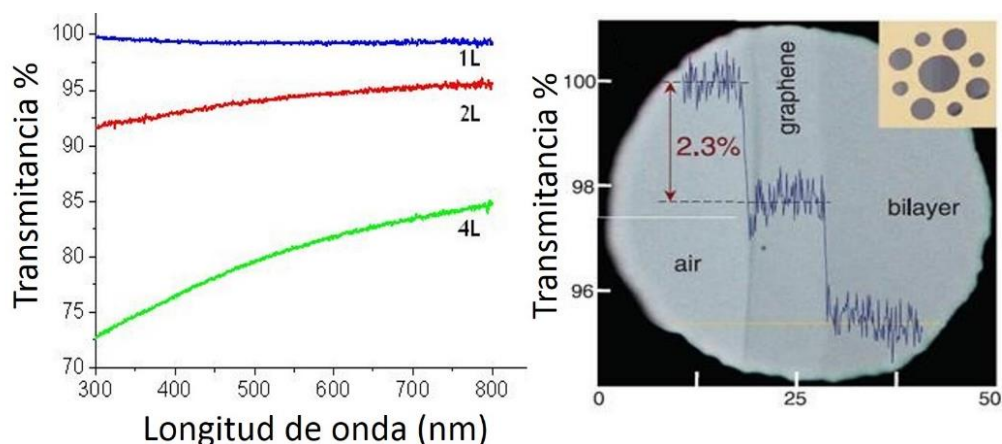


Figura 1.4- En esta figura se representa a la izquierda, un espectro de transmitancia de muestras de una única capa de grafito (**1L**), 2 capas (**2L**) y 4 capas (**4L**). A la derecha un ejemplo ilustrativo de la transparencia de una película de grafeno (**graphene**) y de una película de lámina de grafito formada por dos capas (**bilayer**).[25]

Desde el punto de vista químico, el grafeno está constituido solo por el elemento carbono, siendo una forma alotrópica de este elemento (ver Figura 1.4). Desde el descubrimiento de los fullerenos [26] en los años 80, ha existido una línea de investigación constante dirigida al estudio de las propiedades físicas y químicas de esta forma alotrópica del carbono (ver Figura 1.4).

1.2- Interés del grafeno frente a otras formas alotrópicas del carbono.

Además de los fullerenos que fueron descubiertos en 1985 por Harold Kroto, Robert Curl y Richard Smalley, en 1991 se descubrieron los nanotubos de carbono [27] y en 2005 los nanocuernos de carbono. Por tanto, no era de extrañar que la posibilidad de disponer de grafeno originara nuevos campos de investigación en química tratando de preparar estos materiales, estudiar su reactividad, la síntesis de derivados y su aplicación en distintas áreas de la Química y la Física. Especialmente destacable es la relación que existe entre los nanotubos de carbono de pared única y el grafeno puesto que esta forma alotrópica tiene una única capa y corresponde idealmente a una lámina de grafeno plegada sobre si misma formando un cilindro. De hecho, se ha descrito que la rotura química de nanotubos de carbono de pared única es una forma de conseguir grafenos con una relación de aspecto similar a cintas (gran longitud y pequeña anchura).

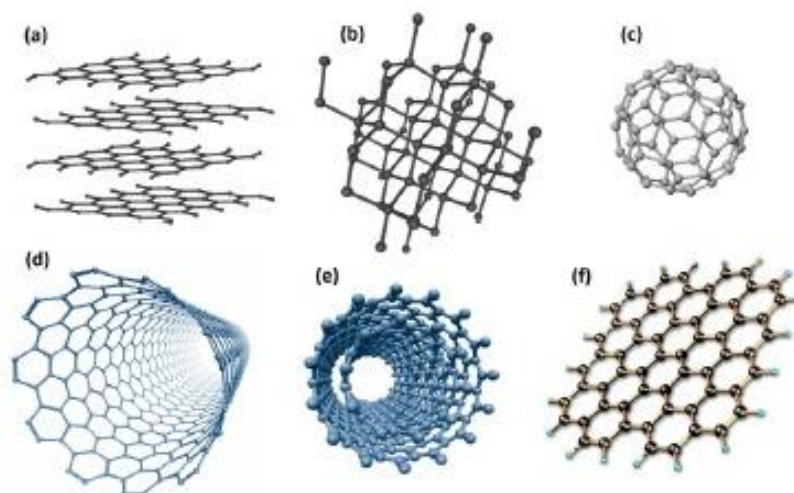


Figura 1.4- Estructura de distintas formas alotrópicas del carbono. (a) Grafito, (b) Diamante, (c) Fullerenos, (d) Nanotubo de carbono de pared única, (e) Nanotubo de varias paredes y (f) Grafeno.[28]

Con respecto a otras formas alotrópicas del carbono, el grafeno presenta la enorme ventaja de ser más fácil de preparar en grandes cantidades (por lo menos a escala de gramos) y por tanto hace posible el estudio de sus propiedades físicas y químicas a mayor escala. Por el contrario, la preparación de fullerenos en pequeñas cantidades requiere el uso de electrodos de grafito que se someten a descargas con altos valores de corriente, requiriéndose dispositivos especiales para llevar a cabo el proceso y siendo necesaria además, la purificación del residuo proveniente de la erosión del electrodo del grafito por cromatografía para separar los distintos tipos de fullerenos. En el caso del grafeno, se pueden preparar por diferentes métodos cantidades superiores a los gramos de este material, sin necesidad de purificación cromatográfica y mediante el empleo de métodos físicos o químicos. La mayor disponibilidad de grafeno queda reflejada en el hecho del precio de algunos de estos materiales, que es muy inferior al coste de los fullerenos o al de los nanotubos de carbono de pared única. En el caso de nanotubos de carbono la dificultad consiste en conseguir la producción de estos materiales a partir de un catalizador de tamaño nanométrico de manera que se forme una única pared en el tubo. En este proceso de fabricación de nanotubos de pared única existe un parámetro denominado “rendimiento de producción” que indica cuantos gramos de nanotubos de carbono de pared única se puede obtener por gramo de catalizador. Los valores de rendimiento habitualmente descritos son significativamente inferiores a la unidad, siendo el proceso de separación del catalizador uno de los factores limitantes del proceso. Además, puesto que el catalizador es metálico y está en gran exceso, el empleo de estos materiales no está recomendado para algunas aplicaciones donde la presencia de metales, incluso al nivel de trazas, es indeseada.

A continuación, se describirán de forma breve los principales procedimientos de preparación de grafeno y con mayor detalle el procedimiento original que ha sido descrito por nuestro grupo y mediante el cual se han preparado las muestras en el presente estudio.

1.3- Métodos de preparación de grafeno.

1.3.1- Síntesis de películas de grafeno por deposición química en fase de vapor.

La exfoliación mecánica utilizando cinta adhesiva y empleando grafito de alta cristalinidad da lugar a muestras de grafeno altamente conductoras, con un bajo contenido en oxígeno y en defectos y una elevada cristalinidad, resultando adecuados para medir sus propiedades físicas debido a la buena calidad de las muestras. Sin embargo, el proceso de exfoliación manual no es adecuado para su industrialización, donde preparan los grafenos con baja densidad de defectos mediante la técnica de deposición química en fase de vapor (CVD de sus siglas en inglés)[29, 30]. La figura 1.5 muestra un esquema ilustrando la fabricación de grafeno mediante CVD. En esta técnica, se introduce una superficie metálica monocristalina de cobre o níquel, exponiendo típicamente las caras (1 1 1) en la cámara de deposición y se somete a un pretratamiento con H₂ a temperaturas elevadas a fin de limpiar la superficie de estos metales de los óxidos que se encuentran inevitablemente en su superficie. Posteriormente, sin extraer la lámina metálica de la cámara, se procede al cambio en la composición del gas, introduciéndose junto al H₂ la cantidad adecuada de un precursor de carbono, como por ejemplo, el CH₄. Un requerimiento en el precursor de carbono es la ausencia del elemento oxígeno en su composición, siendo por tanto los hidrocarburos los precursores más comúnmente empleados. Estos hidrocarburos, en contacto con la superficie metálica a temperaturas superiores a 1500 °C, se descomponen espontáneamente dando lugar a carbono elemental que se deposita sobre el metal e H₂ gas. Este carbono es el que se organiza dando lugar a la capa de grafeno.

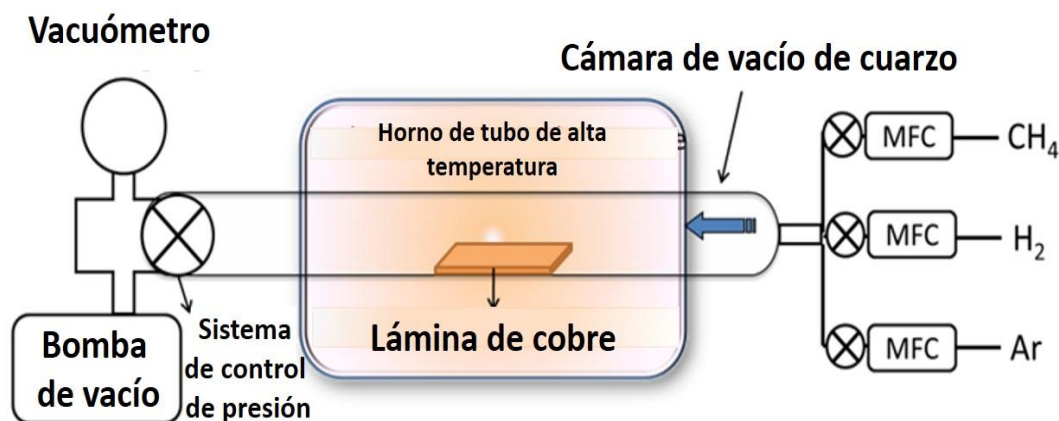
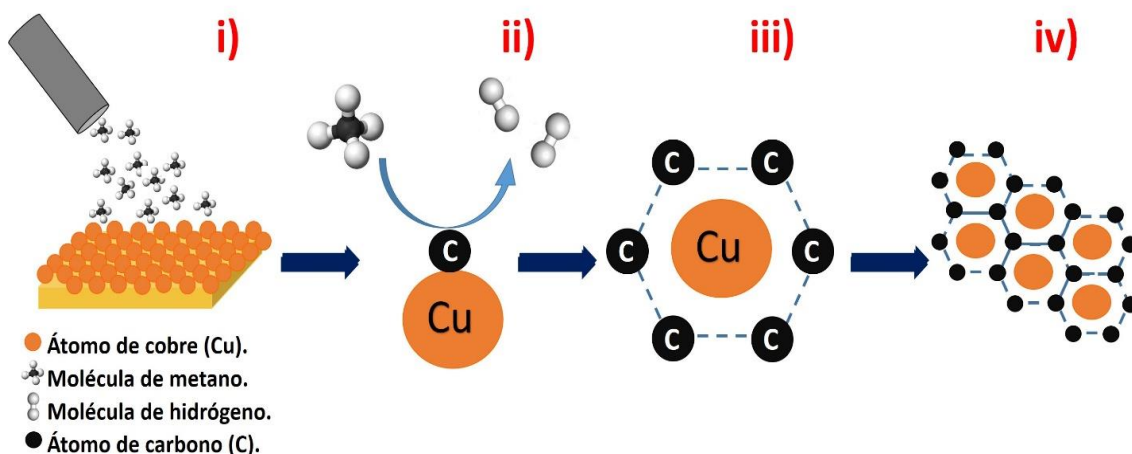


Figura 1.5- Esquema de la síntesis de grafeno mediante la técnica de CVD. Los gases que se introducen varían según sea la etapa de pretratamiento (H_2 diluido en N_2) o de formación de grafeno (N_2 , CH_4 e H_2). El sustrato se refiere a una lámina metálica, generalmente de níquel o cobre.

Mediante el control de los parámetros de operación, se puede llegar a preparar por CVD monocapas de grafito cristalino sobre el sustrato metálico.

El mecanismo de formación de grafeno mediante la técnica de CVD ha sido objeto de numerosos estudios. Se considera que el punto clave es la actividad catalítica del metal como centro deshidrogenante. De hecho, tanto el níquel como el cobre son catalizadores habituales en reacciones de hidrogenación de compuestos orgánicos con enlaces múltiple y, por tanto, son también catalizadores de deshidrogenación de estos compuestos. Otro punto importante en el mecanismo es la baja “solubilidad” del carbono en el metal. En el caso concreto del cobre, se sabe que este metal no es miscible ni se “disuelve” en carbono, por lo que a medida que el proceso de deshidrogenación va teniendo lugar, el carbono se segrega en una fase diferente al metal, concretamente en su superficie debido a la menor densidad. Un tercer punto en el mecanismo de formación de grafeno por CVD es el ordenamiento de los átomos formando una red hexagonal del grafeno. Se sabe que este ordenamiento hexagonal deriva del “efecto plantilla” que ejercen los átomos metálicos superficiales.[29] Así, cada átomo metálico se va rodeando de hasta seis átomos de carbono formando una corona, y cuando estos átomos de carbono se van uniendo químicamente originan el grafeno.



Esquema 1.1- Descripción del mecanismo de formación de una película de grafeno sobre una lámina de cobre mediante el proceso CVD, en varias etapas: (i) La lámina de cobre se calienta a vacío a 1500 °C. y se dosifica un hidrocarburo como el metano. (ii) El hidrocarburo entra en contacto con el átomo de cobre se piroliza, resultando en la formación de hidrógeno y carbono atómico que se deposita sobre el átomo de cobre. (iii) Vista perpendicular de estos átomos de carbono que se van ordenando sobre el átomo de cobre en forma hexagonal gracias al efecto plantilla que ejerce el átomo de cobre. (iv) Finalmente sobre cada átomo de cobre ocurre lo mismo, generándose una película de carbonos en todos los átomos de cobre y con el tiempo estos átomos de carbono se van enlazando espontáneamente generando una lámina de grafeno sobre el “mar” de átomos de cobre.[29]

Una forma alternativa de expresar el mecanismo de formación de grafeno sobre metales consiste en indicar que el carbono crece de forma epitaxial sobre la cara (1 1 1) del metal, es decir adopta la misma geometría de la superficie metálica (1 1 1). Esta hipótesis acerca de la generación de grafeno sobre superficies, se confirma empleando láminas metálicas con otra cara cristalográfica y observado que el crecimiento de grafeno esta desfavorecido para estas caras. El esquema 1.1 ilustra el mecanismo aceptado de formación de grafeno por CVD.

Mientras que por técnicas de deposición química de vapor se puede conseguir la preparación de películas de grafito monocapa de gran calidad respecto a la conducción eléctrica y movilidad electrónica, con un contenido en oxígeno despreciable, este procedimiento resulta extremadamente costoso puesto que requiere de un equipamiento delicado, un tiempo de síntesis largo y la cantidad de grafeno formado es muy baja. Por ello, la técnica de CVD se considera que es adecuada para la preparación de muestras de grafeno con aplicaciones en microelectrónica.

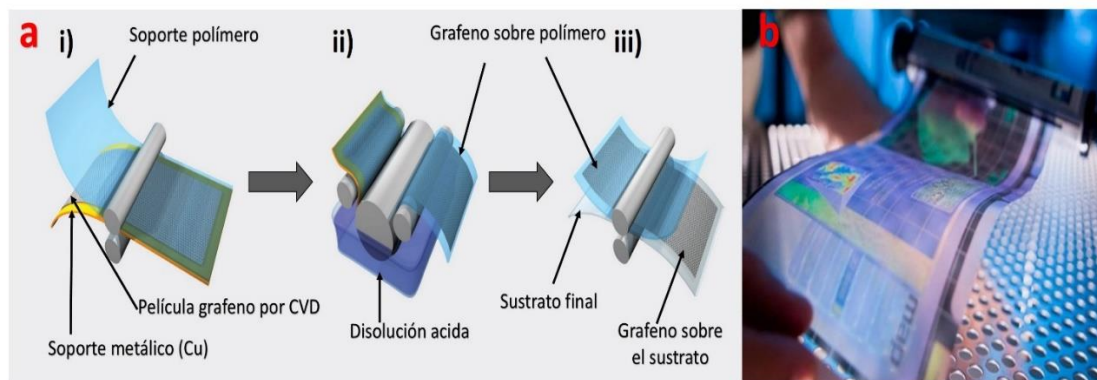


Figura 1.6- (a) Proceso de fabricación de películas de grafeno “roll to roll” para dispositivos electrónicos. Esta simplificado en tres pasos: **i)** Pegado de un soporte polimérico sobre la película de grafeno y cobre. **ii)** Dilución del soporte metálico. **iii)** Adherencia de la lámina de grafeno sobre sustrato final. (b) Una pantalla flexible de grafeno/PET.[30]

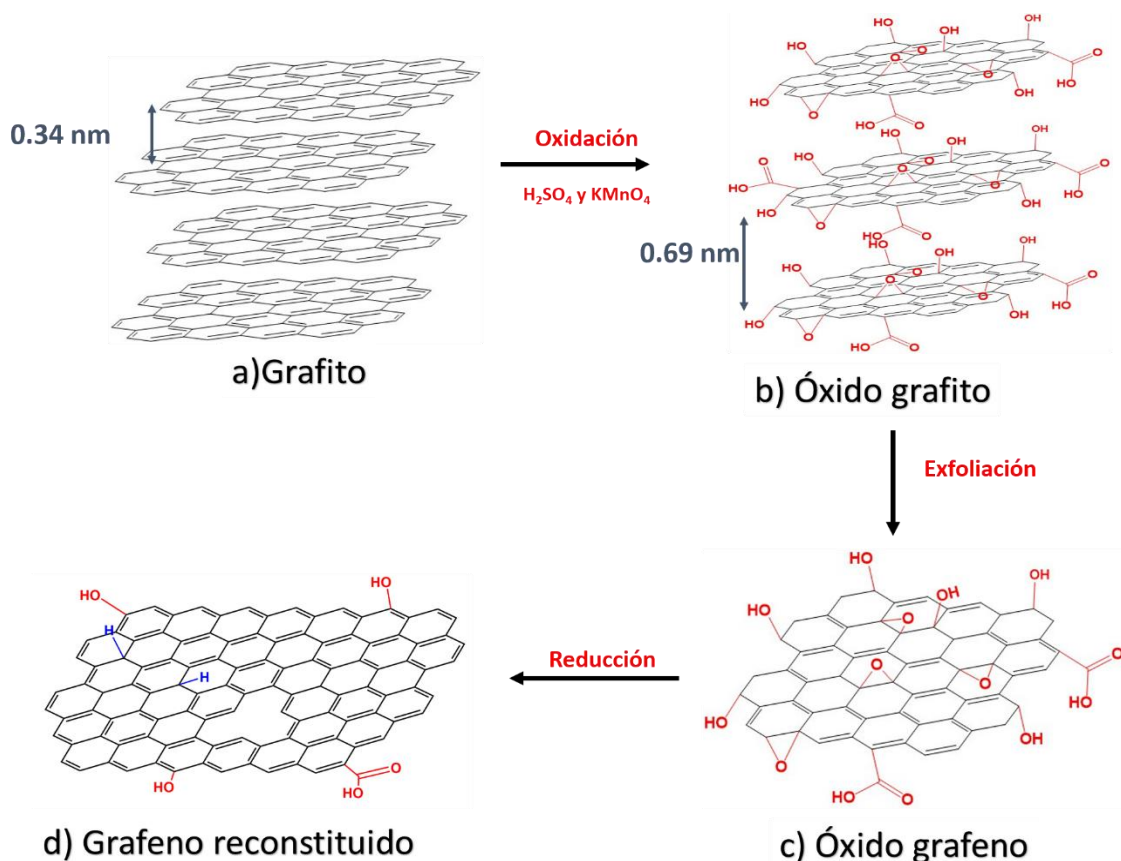
1.3.2- Síntesis de material grafénico obtenido vía química.

En contraste con la técnica de CVD, es posible preparar cantidades de grafeno del orden de gramos en un único proceso a partir de grafito que es sometido a oxidación química profunda, exfoliación y reducción. El proceso consiste en favorecer la exfoliación de capas de grafito mediante su transformación previa en óxido de grafito (GO), ya que la exfoliación directa de las capas en el grafito está muy desfavorecida. Desde los estudios iniciales de Hummers y Offeman sobre la oxidación de grafito con permanganato potásico en ácido sulfúrico concentrado y su transformación cuantitativa en óxido de grafito,[31] el interés por efectuar la exfoliación del grafito de forma eficiente condujo a Ruoff y colaboradores a suponer que la exfoliación debería ser considerablemente más fácil en el óxido de grafito que en el mismo grafito.[32] Esta facilidad de exfoliación del óxido de grafito comparada con el grafito, se debería a la combinación de dos efectos. Por un lado, la disminución de interacciones π entre las capas debido a la oxidación y a su transformación en óxido de grafito. En segundo lugar, esta transformación produce un aumento en la distancia interplanar de las capas constitutivas del material que pasa de 0.34 nm para el grafito al doble en el caso del óxido de grafito 0.69 nm. La mayor distancia entre las láminas es un factor entre las capas que contribuye decisivamente a la facilidad de exfoliación, viniendo a resultar que el tratamiento por ultrasonidos de lugar a la obtención del óxido de grafeno disperso en agua, mientras que el mismo proceso en el grafito es muy ineficiente.

La caracterización mediante técnicas de microscopía de fuerza atómica de los elementos presentes en la suspensión acuosa tras la exfoliación completa del óxido de grafito revela que se trata predominantemente de monocapas de GO.[32] Además, estas suspensiones acuosas de GO

son persistentes de forma indefinida tras su preparación sin producirse el reapilamiento de las láminas de GO en óxido de grafito. Esta elevada estabilidad de suspensiones de GO dispersadas en agua se debe a su elevado potencial Z. El potencial Z mide la densidad de cargas superficiales de las partículas coloidales presentes en una fase líquida. En el caso del GO, se trata de una gran cantidad de grupos carboxílicos que tras su disociación en agua a pH neutro dan lugar a grupos carboxilatos con carga negativa y que debido a su alta densidad establecen una interacción repulsiva de tipo culómbico con otras láminas de GO dispersadas. De esta manera, la transformación de G en GO permite la exfoliación completa de estas láminas en agua debido a su elevado contenido en grupos funcionales oxigenados y, en particular, en grupos carboxílicos.

El esquema 1.2 resume la transformación de grafito en óxido de grafito por oxidación química, la exfoliación del óxido de grafito en un medio acuoso, la formación de dispersiones de GO y su posible transformación en un tipo de grafeno, que contiene una cantidad residual de oxígeno y que se denomina generalmente GO reducido (rGO, de sus siglas en inglés). Además, el esquema presenta una estructura posible para el óxido de grafeno que es compatible con los datos analíticos y espectroscópicos característicos de estos materiales.



Esquema 1.2- La imagen ilustra un esquema de formación de grafeno a partir del grafito. El proceso empieza con la oxidación del grafito a óxido de grafito, seguido de la exfoliación a láminas de GO y finalmente su reducción a rGO.[31, 33, 34]

Como se puede ver en el Esquema 1.2, una de las características del GO más fundamental es su elevado contenido en oxígeno, que puede llegar a variar entre el 40 y el 60% en peso, dependiendo de las condiciones de oxidación a las que se somete al grafito.

Además de la oxidación del grafito con permanganato potásico en medio fuertemente ácido, se han descrito otras condiciones de oxidación donde se emplea clorato potásico y ácido nítrico concentrado como oxidantes (oxidación de Brodie).[35] Una de las modificaciones más recientes en las condiciones de oxidación que ha sido descrita por Tour y colaboradores,[33, 36] consiste en la sustitución del ácido sulfúrico por ácido polifosfórico de mayor viscosidad que el ácido sulfúrico, lo que presenta ventajas en cuanto a la manipulación de las muestras y produce un elevado grado de oxidación.

El GO presenta, al igual que G, una morfología 2D con un esqueleto carbonado fundamentalmente y donde algunos átomos de carbono tienen con hibridación sp^3 y están enlazados a uno o varios oxígenos (ver Esquema 1.2). Debido a esta estructura y a la existencia del esqueleto carbonado con grupos oxigenados que pueden sufrir eliminación, el GO presenta una elevada tendencia a reducirse disminuyendo notablemente el contenido en oxígeno y dando lugar a un material considerablemente más hidrofóbico que es mucho menos soluble en agua y que se denomina óxido de grafeno reducido (rGO).[34, 37]

Así, mientras es posible conseguir suspensiones acuosas de GO en agua de varios miligramos por mililitro, la solubilidad el rGO es como mucho un orden de magnitud inferior, siendo en principio el G mucho más hidrofóbico.

Se han descrito en la bibliografía tratamientos químicos y físicos de reducción del GO a rGO.[31] Así, la adición de hidracina a temperatura ambiente en disoluciones de GO produce su reducción a rGO. Otros agentes reductores para la conversión de GO en rGO son hidruros metálicos como por ejemplo, borohidruro de sodio. Mientras que la reducción química requiere la adición de reactivos que pueden contaminar las muestras y genera subproductos, se han descrito tratamientos físicos que también producen la reducción de contenido de oxígeno del GO.[38-42] Entre ellos, el más simple es el descrito por Tour y colaboradores, y consiste en el tratamiento hidrotermal en un autoclave de disoluciones acuosas de GO a temperaturas entre 150 y 200 °C, donde se produce la reducción del contenido de oxígeno por evolución de gases, fundamentalmente CO_2 y, donde al final del proceso, se produce la separación espontánea de rGO en la capa superior de la fase acuosa debido a su menor solubilidad.

En la presente Tesis Doctoral, las muestras de GO y rGO que han sido estudiadas y cuya preparación se describe con detalle en la parte experimental, se han obtenido siguiendo los procedimientos de Tour para la oxidación de grafito y tratamiento hidrotermal para la reducción a rGO.[34]

Las muestras de rGO suponen una situación intermedia entre el GO con un contenido en oxígeno alrededor al 50% y de G de calidad electrónica obtenido por CVD con un contenido de oxígeno de 0%. Análisis elemental de combustión y medidas de termogravimetría indican que las muestras de rGO obtenidas por tratamiento hidrotérmal tienen un contenido de oxígeno residual inferior al 15% y, valores típicos están en torno al 10%. La presencia de oxígeno residual crea defectos en las láminas con presencia de grupos oxigenados residuales que disminuyen la movilidad electrónica y la conductividad eléctrica del rGO comparada con el G de elevada calidad. Estos desorden, defectos y la presencia de oxígeno, se pueden caracterizar en espectroscopía Raman por la aparición de una banda característica en torno a 1350 cm^{-1} (banda D) cuya intensidad relativa respecto a la banda característica del carbono grafítico a 1560 cm^{-1} (banda G) proporciona una estimación cuantitativa de una concentración de defectos.[43] La figura 1.7 muestra un espectro característico de rGO empleado en el presente estudio, donde se puede medir una intensidad relativa de la banda G frente a la D de 1.15. La banda 2D ($\sim 2.600\text{ cm}^{-1}$) que aparece en un grafeno de una lámina es también sensible al número de láminas y muestra una estructura más compleja (a menudo un doblete) con el aumento de láminas.

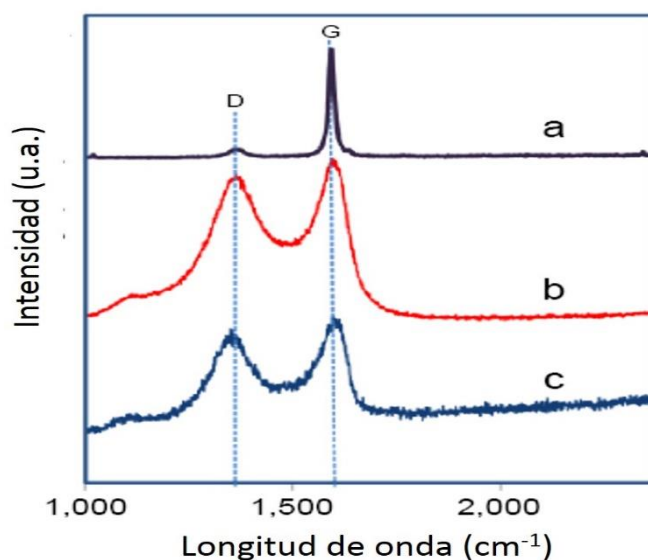


Figura 1.7- Espectros Raman registrados para el: (a) grafito, (b) óxido de grafeno y (c) grafeno reducido. Las líneas discontinuas marcan donde aparecen las bandas D y G muy comunes en materiales grafénicos laminares.

Además de espectroscopía Raman, la espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS de sus siglas en Inglés) proporciona igualmente información cualitativa y cuantitativa de la densidad de defectos y del contenido en oxígeno de las muestras de G y rGO en particular. Así, el análisis del pico 1s correspondiente al carbono y su descomposición en componentes individuales, permite establecer la proporción relativa entre carbono grafénico que aparece a una energía de enlace de 284.5 eV, y carbono enlazado a oxígeno que aparece entre 285.5 y 287.5 eV

dependiendo del número y tipo de enlaces con oxígeno del carbono. La Figura 1.7 presenta un ejemplo representativo del pico C 1s en XPS junto con su deconvolución en sus componentes individuales. Esta Figura permite apreciar individualmente los cambios en la forma y posición de esta banda C 1s en función del contenido en oxígeno de la muestra. Además, la información proporcionada por el pico C 1s se complementa con la observación del pico O 1s, que igualmente aparece en XPS en torno a 531 eV y que además, puede calibrarse para que proporcione la relación atómica con respecto al contenido en carbono en base a la intensidad relativa de los picos C 1s y O 1s.

1.3.3- Síntesis de películas de grafeno y carbono turbostrático a partir de biopolímeros.

El procedimiento de preparación del G que ha sido ampliamente utilizado en la presente Tesis Doctoral, se ha desarrollado y patentado por nuestro grupo en 2012,[44] y consiste en el tratamiento térmico en ausencia de oxígeno a temperaturas entre 900 y 1500 °C (pirólisis) de muestras de biopolímeros naturales con propiedades filmogénicas.[44, 45] En la Figura 1.8 se puede observar un esquema de este proceso. Entre estos biopolímeros naturales filmogénicos, los que han sido más ampliamente utilizados son el alginato, quitosano y carragenano.[46, 47] Estos tres biopolímeros naturales tienen en común que son polisacáridos con unidades de hexosa que tiene la capacidad de formar películas de espesor nanométrico, libres de defectos y roturas con muy baja rugosidad, sobre una gran variedad de superficies que incluyen superficies metálicas, cerámicas y vidrios. Esta capacidad filmogénica es, en cierta manera, entendible considerando que la función natural de estos biopolímeros es la formación de la piel o la cutícula de insectos, crustáceos o plantas marinas. Así, por ejemplo, en animales invertebrados, la superficie externa está formada en casi todas las especies por quitina que es, tras desacetilación parcial, el precursor del quitosano, siendo la principal diferencia entre ambos la total insolubilidad en agua que presenta la quitina frente a la solubilidad en medios ácidos que presenta el quitosano. La figura 1.9 presenta la estructura de estos biopolímeros naturales empleados en la síntesis de G en la presente Tesis Doctoral, con indicación de los monómeros correspondientes. Además, según el precursor del grafeno pueden estar presentes diferentes heteroátomos produciendo el “dopaje” del grafeno disminuyendo su conductividad.

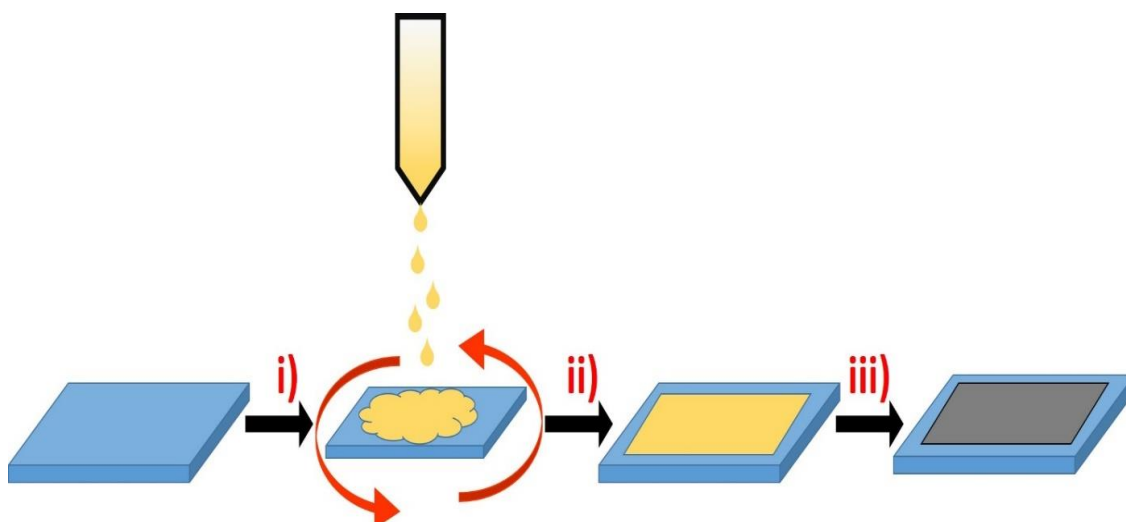


Figura 1.8- Esta imagen es un esquema de la fabricación de films de carbono turbostrático sobre un sustrato tipo cuarzo a partir de una disolución acuosa de biopolímero: **(i)** Limpieza del sustrato a fondo utilizando disolventes tras su recocido a 300 °C, **(ii)** Deposición de una película de biopolímero por recubrimiento por centrifugación, y **(iii)** Pirólisis de la película a 900 °C.

Conviene hacer notar que otros biopolímeros, debido a su diferente estructura, no poseen la capacidad de formar películas uniformes sin rugosidad de dimensiones nanométricas, que es la principal característica responsable de la formación de G mediante este método. Por ejemplo, el almidón suspendido en agua forma grumos o partículas sobre la superficie, y la mayoría de di, oligo y polisacáridos, tales como la sacarosa, forman cristales en lugar de películas continuas y homogéneas. La Figura 1.10 presenta una imagen obtenida mediante perfilometría óptica de las películas de biopolímero que son capaces de generar G cuando son sometidas a pirólisis.

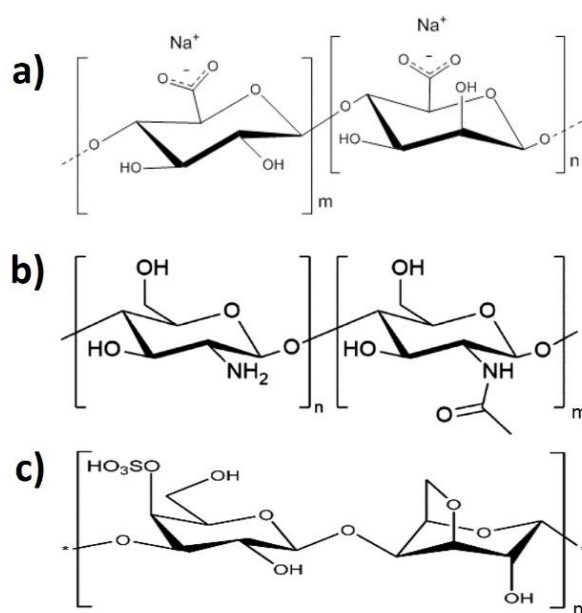


Figura 1.9- Estructuras simplificadas de los biopolímeros naturales tipo polisacáridos que han sido utilizados para la preparación de G en nuestro grupo: (a) alginato sódico, (b) quitosano y (c) carragenano.

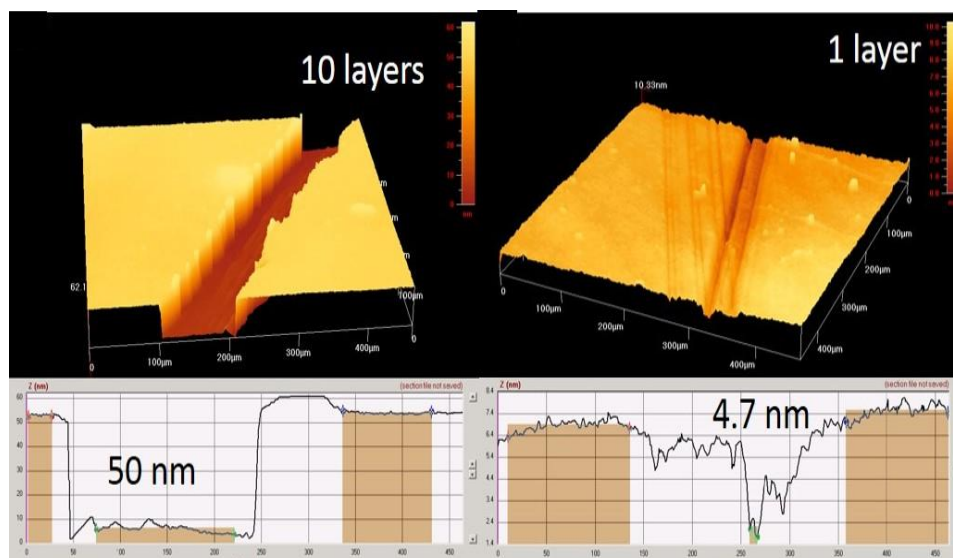
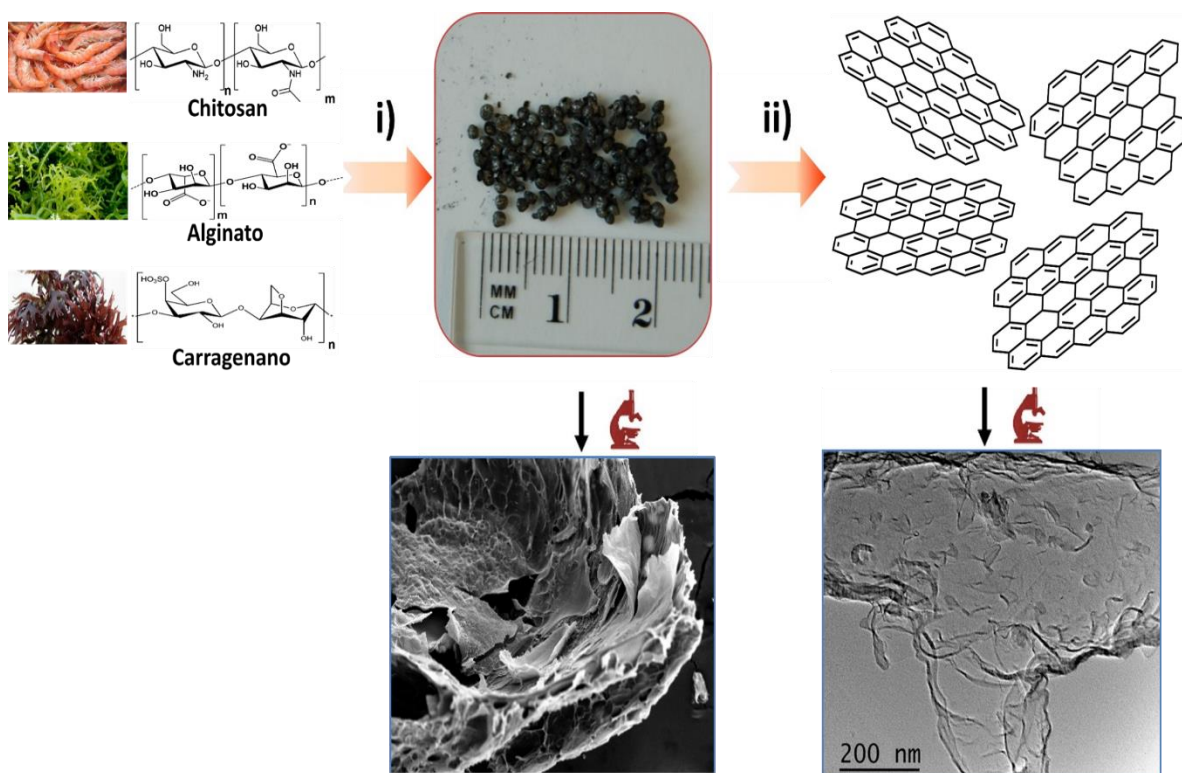


Figura 1.10- Imágenes de perfilometría óptica de las películas de quitosano sobre cuarzo. La imagen de la izquierda corresponde a una película de biopolímero de 50 nm que generara en su pirólisis una película de aproximadamente 10 láminas de grafeno. La imagen de la derecha corresponde a una película de 4.7 nm que al pirolizarse dará una única capa de lámina de grafeno de espesor.[44]

Una propiedad conocida de los polisacáridos es su tendencia a generar residuos de carbono cuando son sometidos a tratamientos térmicos o químicos de deshidratación.[48, 49] De hecho, el término de carbohidrato o hidrato de carbono alude a esta propiedad. En general, el tratamiento térmico de polisacáridos en ausencia de oxígeno da lugar a residuos carbonosos con mayor o menor grado de grafitización. Este tipo de residuos se suelen denominar residuos carbonosos grafiticos turbostráticos, indicando que el material de carbono presenta dominios con estructura similar al grafito, pero que estos “estratos” representan giros, dislocaciones y defectos que impiden su apilamiento y la consecución de cristalinidad que son características que se encuentran en el grafito.

De esta manera, cuando películas nanométricas de un biopolímero filmogénico tal como el quitosano se pirolizan sobre un sustrato adecuado, se observa la formación de un residuo de carbono de naturaleza grafitica al menos en ciertas regiones. Una observación general es la reducción del espesor de las películas de biopolímero en proceso de pirólisis por un factor de 3 o más cuando se transforma en carbono, dependiendo de las condiciones de pirólisis. Así, si se piroliza una película de quitosano de un espesor de 10 nm se obtiene residuos con estructura de G de espesores de en torno a 3 nm y que corresponden a unas 8 capas de G. La pirólisis de películas de quitosano más delgadas ha permitido establecer la formación de G monocapa a partir

de pirólisis de alginato y quitosano. El esquema 1.4 resume los estudios llevados a cabo y que demuestran la formación de grafeno por tratamiento pirolítico de biopolímeros filmogénicos.



Esquema 1.4- Proceso de síntesis de grafeno a partir de disoluciones acuosas de biopolímero: (i) Pirólisis del biopolímero a 900 – 1000 °C para formar carbono turbostrático. (ii) Exfoliación del carbono turbostrático por ultrasonidos en disolución acuosa. (a) Es la imagen del carbono turbostrático tomada por SEM. (b) Imagen tomada mediante la técnica de HR-TEM de una lámina de grafeno deslaminada exfoliada.[47]

La demostración convincente de que cuando la película de precursor tiene espesor de unos pocos nanómetros da lugar a grafeno, se basa en la combinación de la información proporcionada por, al menos, cinco técnicas complementarias, incluyendo la espectroscopía Raman y XPS previamente comentadas, junto con técnicas de microscopía electrónica y de fuerza atómica, medidas de transmitancia, de conductividad eléctrica y análisis químico de combustión. Así, en las películas de G obtenidas por pirólisis de polisacáridos la técnica de AFM muestra que el espesor tras la pirólisis es inferior a 1 nm, y en otros casos se pueden preparar películas entre 1 y 4 nm de espesor. La técnica de microscopía electrónica de alta resolución (HR-TEM) muestra la morfología del grafeno con la característica presencia de arrugas y dobleces, y a mayor amplificación, el alineamiento de los átomos de carbono que tiene lugar en el grafeno. La Figura 1.11 muestra una imagen del grafeno que se obtiene utilizando como precursor el alginato de sodio. Si se trata de una muestra de grafeno de pocas capas la técnica HR-TEM permite medir el

número de capas al observar secciones transversales, estando el espaciado entre las capas de 0.34 de acuerdo con la distancia interplanar para apilamientos de grafeno.

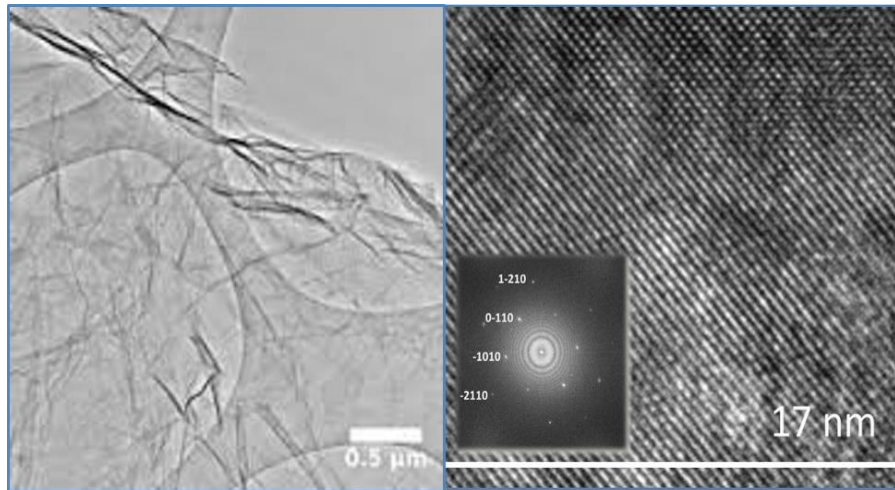


Figura 1.11- Imágenes de HR-TEM a dos diferentes magnificaciones: a la izquierda vemos una lámina de grafeno obtenida utilizando alginato de sodio como precursor del material y después de someter a ultrasonidos el residuo carbonoso para exfoliar las películas de grafeno. La imagen muestra el bajo contraste de la lámina de grafeno que es observable gracias a la presencia de arrugas en la lámina. A la derecha se muestra el alineamiento de los átomos en la misma lámina.

La pirólisis de biopolímeros naturales puede llevarse a cabo no solo en películas de espesores nanométricos tal como se acaba de describir, sino también para partículas de muestras con apariencia de polvos. En este caso, se obtienen partículas de carbono grafitico turbostrático tal como se muestra en el Esquema 1.4 y en la Figura 1.11. De forma sorprendente, la exfoliación por ultrasonidos de estos residuos carbonosos da lugar a la preparación de suspensiones de grafeno.

Se ha propuesto que la pirólisis de estos biopolímeros da lugar a materiales donde existen regiones grafiticas pero que debido a su baja cristalinidad y ordenamiento incompleto de las láminas grafeno, estas son considerablemente más fáciles de exfoliar que cuando se parte de grafito. Considerando el rendimiento como la masa de residuo carbonoso grafitico turbostrático que es posible exfoliar, se obtienen valores de rendimiento entorno al 60% para materiales que provienen de la pirolisis del quitosano y del alginato. Estos valores de rendimientos son sumamente elevados si se compara con la eficiencia de exfoliación del grafito que es mucho menor que el 1%. Las técnicas de imagen AFM y HR-TEM sobre las partículas presentes en la suspensión acuosa muestran, sin lugar a dudas, que el material dispersado son paquetes de grafeno de unas pocas láminas de espesor, lo cual está de acuerdo igualmente con la información obtenida por espectroscopía Raman y XPS. La Figura 1.12 muestra una colección de imágenes y espectros para este tipo de muestras.

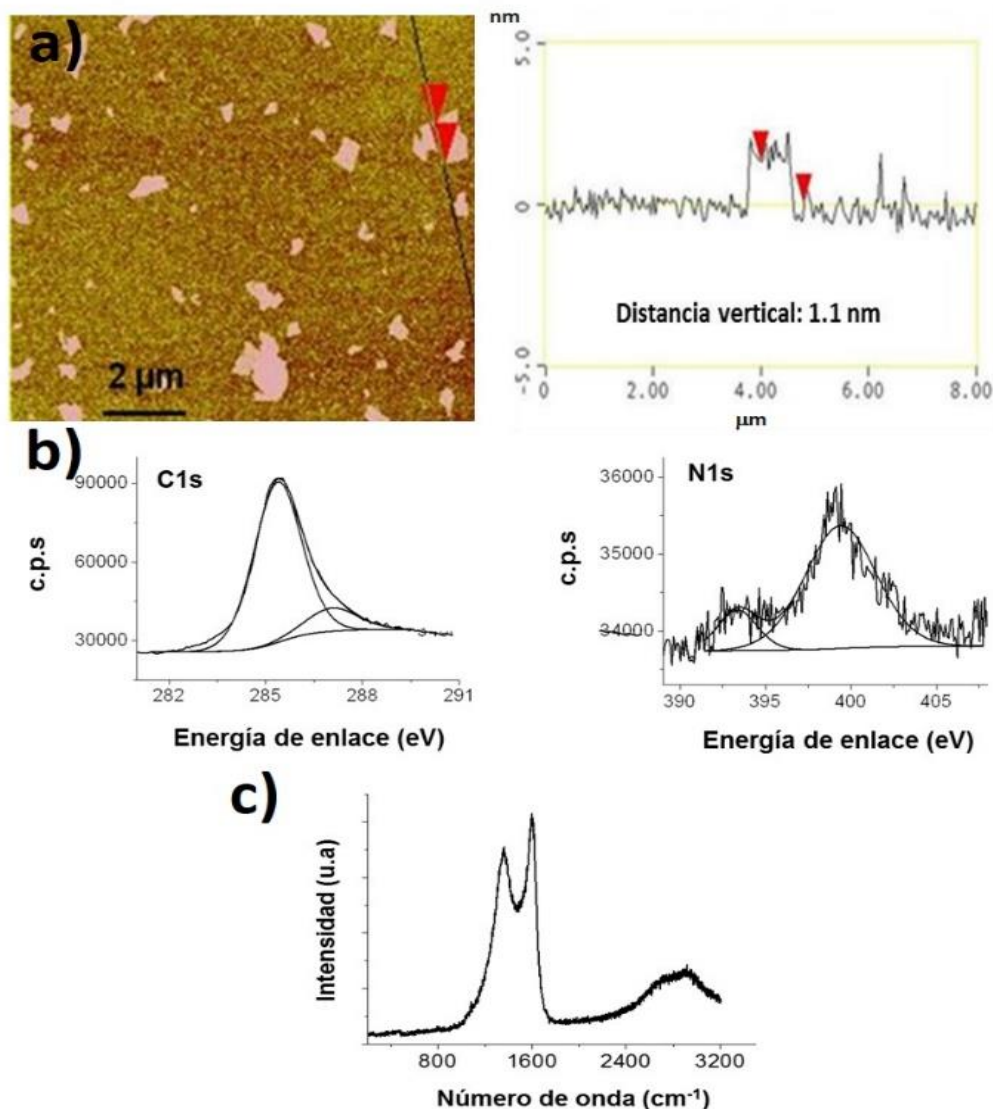


Figura 1.12- (a) Imagen frontal de AFM de láminas de rGO (izquierda) y altura de la partícula de rGO (derecha) que corresponde al trazado negro que se observa en el panel de la izquierda. (b) Picos de alta resolución correspondiente al C 1s y N 1s de los espectros de XPS de una muestra de rGO a partir del biopolímero quitosano. (c) Espectro Raman de una muestra de grafeno proveniente del quitosano.

Una característica notable que será de relevancia en la presente Tesis Doctoral, es la presencia en las muestras obtenidas por pirólisis de un contenido de oxígeno residual. El origen del oxígeno presente en el grafeno obtenido por pirólisis es la eliminación incompleta durante la pirólisis de este elemento presente en el biopolímero. Por consiguiente, las muestras de grafeno pirolítico son similares en cuanto a comparación química a muestras de rGO que se obtienen por reducción del GO. Por otra parte, dependiendo de la composición atómica del grafeno biopolímero empleado en la preparación de grafeno, se pueden encontrar presentes igualmente otros heteroátomos. Especial interés en la presente Tesis Doctoral tiene la presencia de nitrógeno en las muestras de grafenos provenientes de la pirólisis del quitosano (grafenos nitrogenados

abreviado como (N)G). Estudios sobre la influencia de la temperatura de pirólisis sobre el contenido de nitrógeno en las muestras de grafeno indican que, a mayor temperatura en el rango comprendido entre 900 y 1500 °C, menor es el contenido en este elemento, que varía entre un 7% para temperaturas bajas, hasta valores por debajo del 1% a medida que la temperatura de pirólisis y el tiempo del tratamiento aumentan.

La técnica de XPS proporciona una información muy valiosa sobre la naturaleza de los átomos de nitrógeno (N)G. Así, el pico que aparece en torno a 400 eV en XPS correspondiente al N 1s, varía en forma y posición dependiendo de la distribución de los átomos de nitrógeno entre diferentes familias en el grafeno, incluyendo nitrógeno grafénico (átomos de nitrógeno reemplazando carbonos en la red de grafeno), nitrógenos piridínicos y nitrógenos pirrólicos.[50] También es posible caracterizar nitrógenos unidos a carbono y oxígeno de tipo N-Oxido o nitrona.[51] Tal como se verá en capítulo 4, la distribución y proporción de los átomos de nitrógeno juega un papel relevante en las propiedades fotoquímicas de (N)G.

1.4- Materiales grafénicos aplicados en fotocatalisis.

Se considera que el grafeno y materiales relacionados pueden tener gran número de aplicaciones en campos tan diversos como aditivos de polímeros,[7, 10, 24] fotocatalizadores,[6, 7, 52] nuevas energías,[6-8, 53] microelectrónica[8, 19] e incluso en biomedicina.[6, 11] Pero teniendo en cuenta los objetivos de la presente tesis doctoral, no es necesario detenerse en describir el elevado número de aplicaciones posibles. Sin embargo, entre ellas existen propiedades que derivan de la capacidad de interactuar con la luz absorbiendo en algunos materiales fotones de energía suficiente para promover un estado de separación de cargas que lleve a la generación de electrones (e^-) y huecos de electrones (h^+).

Recientemente, la fotocatalisis se está encaminando hacia la preparación de combustibles alternativos a los combustibles fósiles.[54-57] Como consecuencia del sistema de vida actual, primero ligada a un mayor consumo de energía y a una población cada vez más numerosa, además del aumento de la contaminación ambiental y los efectos cada vez más palpables del cambio climático, se requieren nuevas fuentes de energía sostenibles y limpias. En este sentido, los fotocatalizadores podrían contribuir a solucionar el problema aprovechando la luz solar para conseguir almacenar parte de la energía de la radiación solar en combustibles renovables.[58] Estos materiales aprovecharían la luz solar que llega a la superficie terrestre, formada por tres porciones: una pequeña proporción de luz en la zona del ultravioleta, (en torno al 4 % entre 400 y 360 nm), una proporción mucho mayor (en torno al 48 %) de luz de longitud de onda en la zona del visible y el resto de radiación solar pertenece a la zona del infrarrojo.[59]

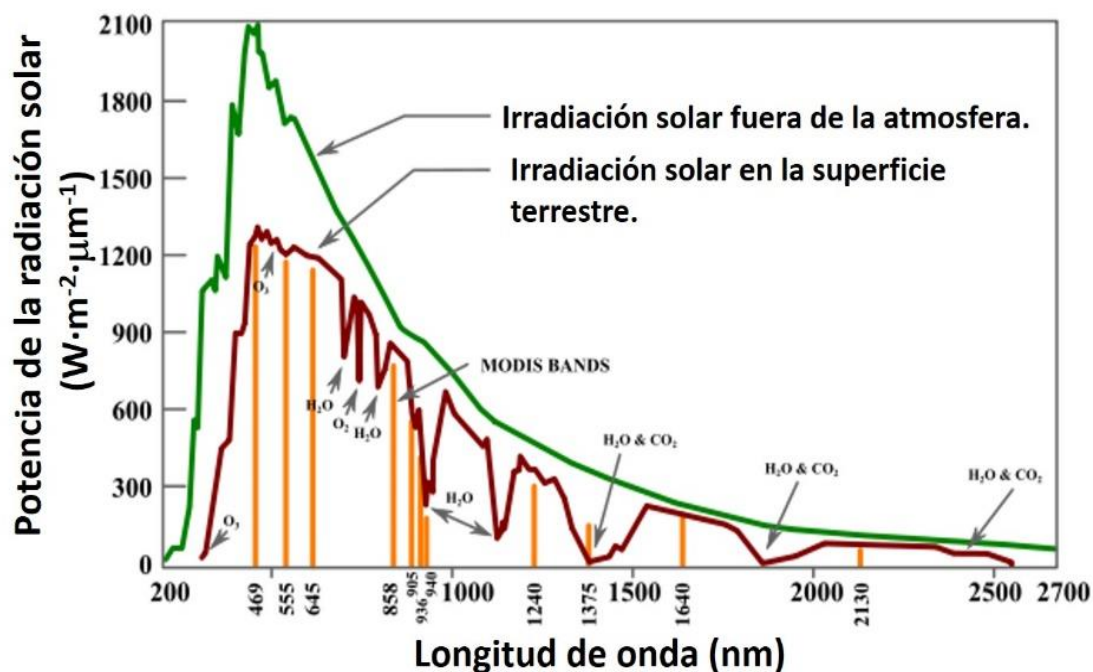


Figura 1.13- Comparación del espectro solar sobre el nivel de la superficie terrestre y fuera de la atmósfera.

Así, mientras el grafeno es desde el punto de vista teórico un material conductor (ancho de banda igual a 0 eV) [30], la presencia de defectos puede determinar que se abra un ancho de banda entre las bandas de valencia y conducción pasando de un comportamiento de conductor a semiconductor.

En efecto, partiendo de la teoría de orbitales moleculares y más en concreto de la teoría de Hückel para compuestos aromáticos, que describe la posición y distribución de orbitales π y π^* , se llega a la conclusión de que en un modelo ideal, el solapamiento de innumerables orbitales atómicos p_z , tal como se da en el grafeno, debiera conducir a un sistema continuo de orbitales π y π^* que irían aproximándose en energía de modo que los orbitales HOMO y LUMO lleguen a tocarse, por lo que no habría separación entre la banda de valencia y conducción. Esta situación, para el grafeno ideal sufriría una distorsión si el grafeno presentara defectos. Estos defectos pueden ser debidos a la presencia de vacantes de átomos de carbono en la estructura (huecos o agujeros en el grafeno cuando las vacantes incluyen varios átomos de carbono), o a la presencia de heteroátomos reemplazando al carbono (dopaje) y a la existencia de grupos oxigenados localizados fundamentalmente en la periferia de las láminas del material.

La situación más clara ocurre al comparar grafeno ideal obtenido por CVD y el GO donde se da un cambio de conductor a aislante. La situación intermedia constituida por rGO o por grafenos dopados corresponde a materiales semiconductores con anchura de banda más o menos pequeña.

La Figura 1.14 ilustra estas diferencias en la energía entre la banda de valencia y la banda de conducción. Los materiales semiconductores poseen aplicaciones en muchos campos, siendo uno de ellos la fotocatalisis.[60-63] El interés del grafeno en fotocatalisis deriva de la consideración de que la mayoría de semiconductores son materiales constituidos por metales, algunos de ellos metales críticos de los que existen recursos limitados y que frecuentemente no son fáciles de modificar o preparar. En contraste, el uso de grafeno como semiconductor sería sostenible cuando este proviene de la biomasa que es un recurso renovable y permitiría adaptar sus propiedades a los valores deseados mediante la aplicación de conceptos como dopaje, funcionalización y creación de defectos que podrían ser fácilmente aplicables en la síntesis de estos materiales.[64] Además, una ventaja añadida de los grafenos con respecto a otros semiconductores es que el grafeno constituye el límite de miniaturización y por tanto, la máxima eficacia en eficiencia económica y atómica de un material. En efecto, en el grafeno todos los átomos están en la superficie y todos los átomos pueden interactuar al estar accesibles al entorno que les rodea. En contraste, un semiconductor convencional posee un elevadísimo porcentaje de átomos ocupando posiciones interiores de las partículas y que no son accesibles desde el exterior.

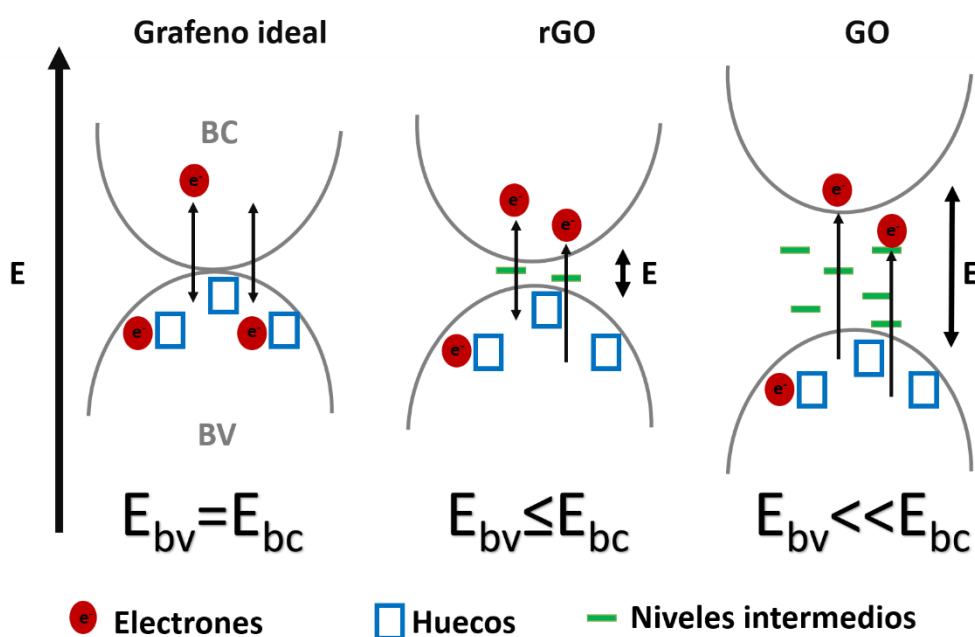
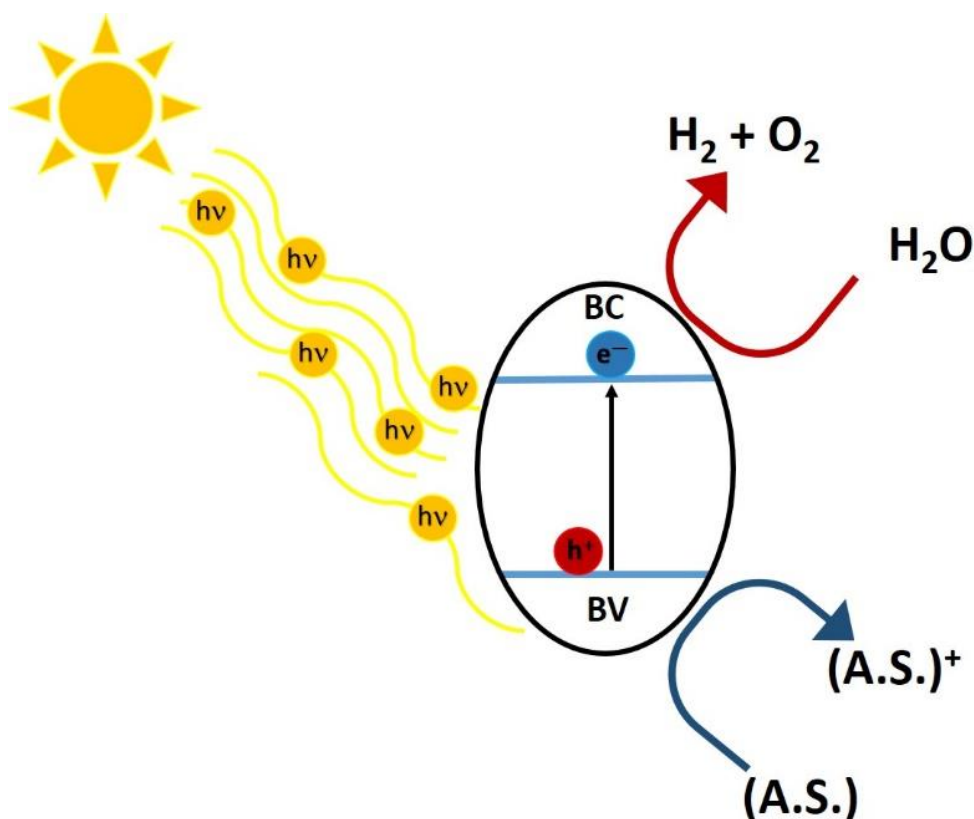


Figura 1.14- Esquema de los niveles electrónicos para distintos tipos de materiales (a) Conductor, (b) semiconductor con estrecho band-gap y (c) semiconductor con una gran energía que separa las bandas de valencia y conducción. Este modelo puede utilizarse para razonar el comportamiento electrónico en grafenos y sus derivados. (a) Para un material conductor como el grafeno ideal ocurrirá que la banda de conducción se solapara con la de valencia y existirá una libre circulación electrónica entre las bandas. (b) Corresponde a un grafeno reducido o reconstituido y sería similar al comportamiento electrónico que ocurre en un material semiconductor. Ilustra que existe una pequeña separación entre las bandas de valencia y de conducción debido a la presencia de defectos estructurales (perdida de aromaticidad puntual).

También vemos que han surgido niveles intermedios debidos a la aparición de defectos, dopajes o dominios aislados. Esto ocurre porque la reconstitución a grafeno a partir del GO no es perfecta. Estos niveles energéticos intermedios pueden generar efectos de atrapamiento electrónicos. (c) Ejemplo de los niveles electrónicos de un material derivado de grafeno con alto porcentaje dopaje como es el caso del grafeno halogenado o con numerosos defectos estructurales como es el caso del GO. Este dopaje puede incrementar la heterogeneidad de dominios en la lámina de grafeno generando niveles energéticos intermedios o defectos estructurales por pérdida de aromaticidad y provoca un incremento de la energía entre la banda de Valencia y la de Conducción.

Por lo que respecta a la fotocatalisis, el proceso da lugar a la transformación de energía luminosa en energía química mediante la generación, por un cortísimo periodo de tiempo, de estados excitados o de separación de carga que pueden conducir a reacciones químicas. En los casos relacionados en la presente Tesis Doctoral, una aplicación de la fotocatalisis de especial relevancia es la conversión de energía solar en combustibles. En especial, la aplicación que será objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral consiste en la conversión de energía solar en hidrógeno por fotorreducción de agua en presencia de agentes sacrificiales dadores de electrones.[52, 65-67] El resumen del proceso se refleja en el Esquema 1.5. Como se aprecia la absorción de un fotón del fotocatalizador da lugar a un estado transitorio de separación de cargas e^-/h^+ . Para que un fotocatalizador sea capaz de reducir la molécula de agua a H_2 y oxidarla a O_2 (“water splitting”), el nivel más bajo de la CB debe ser más negativo que el potencial redox de H^+/H_2 (0 V vs NHE, pH =0), mientras que el nivel más alto de la VB debe ser más positivo que el potencial redox de O_2/H_2O (1.23 V). En el caso de que estos e^- tengan potenciales de reducción suficientes, podrían transferirse a protones o moléculas de agua viniendo a resultar la formación de H_2 . Por otro lado, los h^+ deben consumirse a la misma velocidad mediante procesos de oxidación. Dependiendo de los potenciales de oxidación, los procesos que pueden ocurrir son la oxidación del agua a oxígeno o la oxidación de un compuesto químico tales como aminas o alcoholes.[68-70]



Esquema 1.5- Ilustración del mecanismo de funcionamiento de la fotocatalisis, absorbiendo la energía de los fotones que producen la promoción de los electrones desde la “Banda de Valencia” (BV) hasta la “Banda de Conducción” (BC) de mayor energía. Si los electrones tienen suficiente energía pueden promover la fotólisis del agua produciendo H_2 . El fotocatalizador recupera el electrón que ha cedido gracias a la presencia de un agente sacrificante (A.S.) que se oxida restaurando la carga electrónica del fotocatalizador.

1.5- Puntos cuánticos: Nanopartículas de Carbono.

Además de grafeno y materiales 2D relacionados, existe como se ha comentado anteriormente, un interés general en otras formas alotrópicas de carbono.[28, 71-74] Este interés, viene motivado por las ventajas que derivan de la sustitución de metales, a veces tóxicos y dañinos para el medio ambiente u otras veces de elevado coste y de los que existen cantidades limitadas. En este contexto sobre nuevos materiales de interés basados principalmente en carbono como elemento predominante, otro tipo de materiales que recientemente están atrayendo mucha atención son las nanopartículas de carbono (C-dots). Estos C-dots podrían ser una alternativa

medioambientalmente más benigna a los puntos cuánticos basados en metales de transición y, particularmente, al sulfuro y seleniuro de cadmio.[75-77] Los puntos cuánticos, se caracterizan por ser nanopartículas de una estrecha distribución de tamaños en el rango de unos pocos nanómetros y donde operan fenómenos de confinamiento cuántico.[78-80]

Así, los puntos cuánticos de seleniuro de cadmio se caracterizan por un rendimiento cuántico de emisión elevado, por la ausencia de procesos de fatiga en la emisión (ausencia de bleaching o blinking) y por una emisión con una anchura de banda notablemente estrecha en torno a treinta nanómetros y, cuya posición varía dependiendo de tamaño promedio de los puntos cuánticos.[77, 80] De esta manera, se pueden obtener puntos cuánticos que presentan distintos colores de emisión y que cubren prácticamente todo el rango de longitudes de onda de la zona del visible. La Figura 1.15.b presenta espectros de emisión descritos en la bibliografía para puntos cuánticos de CdSe de diferentes tamaños.

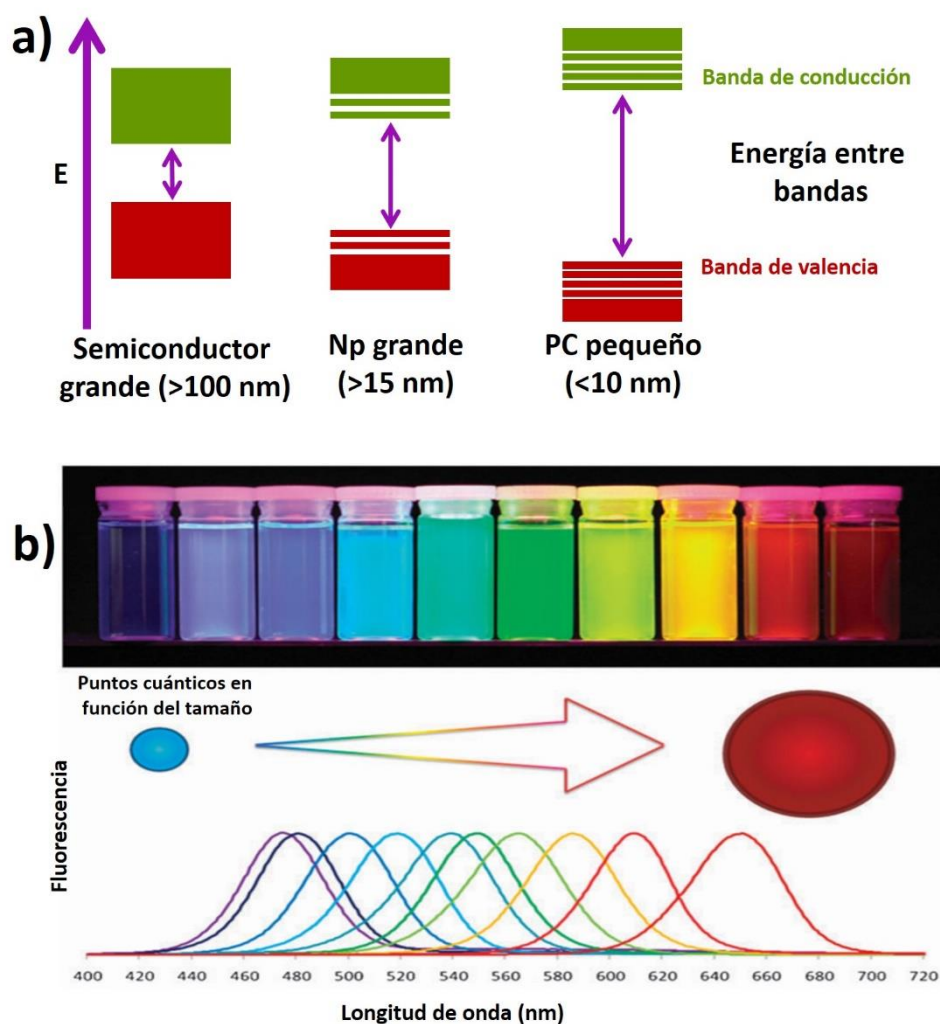


Figura 1.15- (a) Un material semiconductor con tamaño de partícula grande (bulto) tiene una banda de valencia, poblada de electrones, que está separada de la banda de conducción por una determinada energía.

En nanopartículas (Np) las bandas de valencia y de conducción se van dividiendo en niveles energéticos discretos, más parecido a niveles energéticos moleculares y, además, a medida que decrecen, el tamaño de partícula aumenta la diferencia de energía entre el nivel energético de valencia más alto y el nivel energético de conducción más bajo en energía. Este fenómeno alcanza su mayor expresión en los puntos cuánticos (PC), y a medida que va decreciendo el tamaño de partícula va aumentando el grado de confinamiento cuántico de las cargas eléctricas. **(b)** En la Figura 1.15, vemos la emisión de diferentes tamaños PC de CdSe en disolución. Abajo tenemos espectros de emisión registrados para puntos cuánticos de CdSe de distinto tamaño, como se indica en la figura, cuando estas nanopartículas son excitadas a 400 nm.[82]

1.5.1- Confinamiento cuántico en nanopartículas.

En materiales semiconductores, el nivel inferior de la banda de valencia (BV) está poblada por electrones, mientras que el nivel superior de la banda de conducción (BC) permanece casi vacío. De manera que los electrones pueden saltar de la BV a la BC, pasando por la banda de energía, o la banda prohibida (band-gap). De tal manera que las bandas cargadas opuestamente, el electrón excitado y el hueco cargado positivamente, se unen mediante fuerzas de Coulomb electrostáticas, dando lugar a una cuasi-partícula eléctricamente neutra conocida como *excitón*.

Los efectos de confinamiento en un semiconductor sobre los niveles de energía electrónica son significativos, es decir, en un semiconductor común, los niveles de energía dentro de las BV y BC, están tan compactas que pueden considerarse como si fuesen bandas continuas. Los electrones que son excitados hacia la banda de conducción pero rápidamente se relajan y pasan de nuevo a la banda de valencia. En el caso de los puntos cuánticos, existen los mismos procesos de la formación del excitón y su recombinación que en los materiales semiconductores, sin embargo hay una gran diferencia en la densidad de los estados debido a la disminución del tamaño de partícula esto hace que los niveles de energía en lugar de continuas pasen a ser discretas, lo que implica que existe una separación pequeña y finita entre los niveles de energía y además aumenta la energía de la banda prohibida que separa BV y BC de modo que a medida que disminuye el tamaño de las partículas aumenta la energía del band-gap. Estos efectos sobre el banda de conducción son pueden apreciarse en la Figura 1.15.

Para comprender mejor el incremento de la banda prohibida en los puntos cuánticos en comparación con los semiconductores, primero se tendrán que entender los conceptos de: banda prohibida, excitón, radio de Bohr y confinamiento cuántico para los puntos cuánticos.

La banda prohibida de un semiconductor es por definición[83] la energía necesaria para crear par electrón-hueco en reposo con respecto a la red y lo suficientemente separados de manera que la

atracción coulombica sea insignificante. Un excitón es una cuasipartícula (o excitación elemental) que ocurre en las partículas cuando se excitan y un electrón pasa de la BV a la BC y un hueco con carga opuesta queda ligado al electron través de la interacción coulombica atrayéndolo de nuevo. Pueden formarse dos tipos generales de excitones dependiendo de la fuerza de esa interacción: *excitón Wannier* correspondiente una interacción coulombica más débil que da lugar excitones grandes; y el *excitón de Frenkel* con interacciones coulombicas fuertes generando excitones más pequeños. En algunos materiales semiconductores grandes o de bulto el tiempo de vida de vida de este excitón puede variar de nanosegundos a milisegundos. Para partículas de semiconductores grandes, la dimensión del excitón se puede calcular teóricamente mediante el radio de Bohr[83, 84].

$$a_B = \frac{\hbar^2 \kappa}{\alpha e^2}, \quad \alpha = \frac{m_e m_h}{(m_e + m_h)}$$

Equación 1.1- Cálculo del radio de Bohr de un excitón formado en un material semiconductor.

El *radio del excitón de Bohr* (a_B) se utiliza a menudo para evaluar el grado de confinamiento de un nanocrystal semiconductor con radio a . en el análisis de datos experimentales, es necesario considerar tres diferentes regímenes: $a > a_B$, $a \sim a_B$, y $a < a_B$, que corresponden al *confinamiento débil*, *confinamiento intermedio* y *regímenes de confinamiento fuerte*, respectivamente, de la Ecuación 1.1 \hbar está definida como la constante de Planck, h dividido por 2π , κ es la constante dieléctrica, m_e y m_h corresponden a la masa efectiva del electrón y del hueco respectivamente, e está definida como la carga elemental y a es el radio del nanocrystal semiconductor. Sin embargo, si el radio de un nanocrystal semiconductor se reduce más que su radio de Bohr del excitón, se dice que el excitón está fuertemente confinado en un volumen limitado y que la estructura electrónica tridimensional de electrones y huecos se modificará drásticamente. El término de confinamiento cuántico, describe el confinamiento del excitón dentro de los límites físicos del semiconductor. Para los puntos cuánticos que se encuentran en el régimen de confinamiento fuerte, las propiedades ópticas son las más afectadas y por ello las más estudiadas.

Brus[84] desarrolló una relación aproximada entre el tamaño de partícula y su banda prohibida resultante, como lo muestra la ecuación 1.2, E_g^{QD} es la banda prohibida teórica del punto cuántico, E_g^{bulk} es la banda prohibida (band-gap) del material en bulto, h es la constante de Planck, r es el radio de la nano-partícula, m_0 es la masa del electrón, m_e^* es la masa efectiva del electrón en el material, m_h^* es la masa efectiva del hueco en el material, e es la carga del electrón, ϵ_0 es la permitividad del vacío y ϵ es la permitividad del material.

$$E_g^{QD} = E_g^{bulk} + \frac{h^2}{8m_0 r^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1.8e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon r}$$

Ecuación 1.2- El primer término se basa en las propiedades del material semiconductor, el segundo en el confinamiento del excitón como las partículas en una caja, y el tercero se basa en la atracción de Coulomb entre el electrón y el hueco.

Si bien no es el mejor ajuste a los valores experimentales, lo que se observa de la ecuación es que la banda prohibida y la longitud de onda de la luz emitida, cambia de manera significativa con pequeños cambios en el tamaño de la nanopartícula.[85]

1.5.2- Aplicaciones de los puntos cuánticos.

Generalmente los puntos cuánticos se someten a tratamientos que producen la pasivación de la superficie externa con la reducción de defectos y que conducen a mayores rendimientos cuánticos de emisión, particularmente en medios acuosos y a una mayor estabilidad. El agua, debido a la elevada energía de vibración del enlace OH, es en general, un inhibidor de emisión para muchos compuestos y materiales fotoluminiscentes debido a la transferencia de energía desde el excitón a los enlaces OH. Este proceso de inhibición observado en medio acuoso, se reduce significativamente si se recubren a las nanopartículas emisivas con una capa protectora inerte que evita el contacto directo entre el núcleo emisor donde tiene lugar el confinamiento del excitón con la fase acuosa. Agentes de recubrimiento pueden ser moléculas orgánicas que actúen como ligandos de metales y que se colocan en la superficie de la partículas tales como el óxido de trioctilfosfina o amonios cuaternarios. En otros casos, la capa protectora consiste en una capa delgada de óxido o sulfuro de otro metal de unos pocos nanómetros que recubre el núcleo del punto cuántico formando una heteroestructura núcleo-corteza (“core-shell” en inglés).[83, 84]

Unas de las aplicaciones de los puntos cuánticos están basada en sus excelentes propiedades de fotoluminiscencia, y consiste en la aplicación de los puntos cuánticos para conseguir imágenes de sistemas biológicos y de células en particular.[85] El tamaño nanométrico de los puntos cuánticos permite que las partículas atraviesen membranas celulares y membranas de orgánulos, y una vez internalizadas su presencia puede ser fácilmente detectada mediante microscopía de fluorescencia. Además, los puntos cuánticos de sulfuro de cadmio y de otros metales tienen afinidad por ciertas biomoléculas tales como ADN, ARN y otros ácidos nucleicos, uniéndose por interacciones fuertes en ciertos casos.[86] Debido a esta asociación y mediante medidas de fotoluminiscencia y de microscopía es posible realizar un seguimiento de estas biomoléculas conjugadas con puntos cuánticos fluorescentes. La Figura 1.16 ilustra estas aplicaciones de los puntos cuánticos en bioimagen.

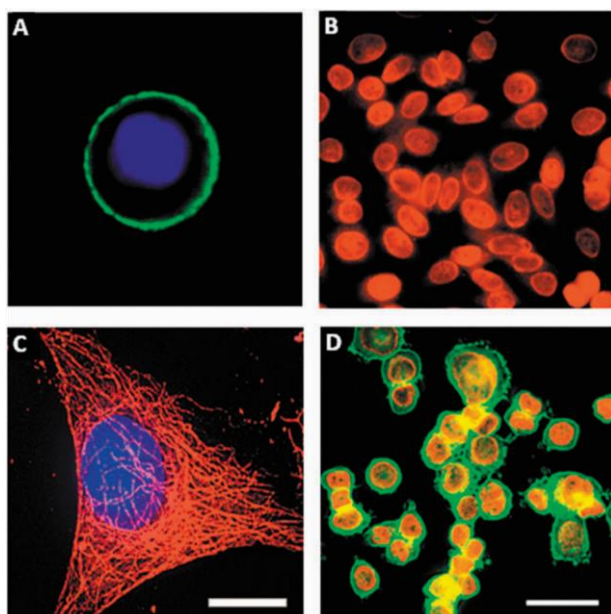


Figura 1.16- Marcaje selectivo de orgánulos en la superficie y dentro de las células usando puntos cuánticos tipo CdSe/ZnS como sonda. Según las molécula o agente que recubre estos puntos cuánticos se puede modificar el objetivo a los que se adhieren las nanopartículas.[82]

Otras aplicaciones de los puntos cuánticos metálicos también se basan en la fluorescencia, y van desde su uso como sensores de análisis hasta la preparación de dispositivos optoelectrónicos, electroluminiscentes e incluso como fotocatalizadores debido a sus propiedades semiconductoras.[87, 88]

En vista de las propiedades especiales de los puntos cuánticos metálicos y de la tendencia general a desarrollar alternativas basadas en carbono a materiales metálicos, es razonable pensar que sería de gran interés desarrollar nanopartículas de carbono (C-dots) que fueran altamente fotoluminiscentes. Un ejemplo de que las nanopartículas de carbono (C-dot) pueden sustituir a los puntos cuánticos metálicos en algunas aplicaciones se observa en el uso de estas nuevas nanopartículas en biomedicina, como puede verse en las fotografías tomadas por un microscopio óptico confocal de fluorescencia mostradas en la Figura 1.16, en el que se usan nanopartículas de carbono sintetizadas en nuestro laboratorio como marcadores luminosos en un cultivo celular. Existe en la literatura especializada varias revisiones que describen la preparación de C-dots y sus propiedades fotoluminiscentes.[89-91] Así, se ha descrito que el humo proveniente de la combustión de velas de cera contiene un hollín que está constituido fundamentalmente por C-dots. Sin embargo, este procedimiento, aún siendo simple, no permite disponer de cantidades suficientes de C-dots para su aplicación. En general, los humos contienen nanopartículas de carbono muchas de ellas con características de C-dots. La Figura 1.17 muestra imágenes de microscopía publicadas en la bibliografía de los C-dots obtenidos en la quema de velas de cera, donde puede observarse la morfología y el tamaño de estas nanopartículas de carbono.[92]

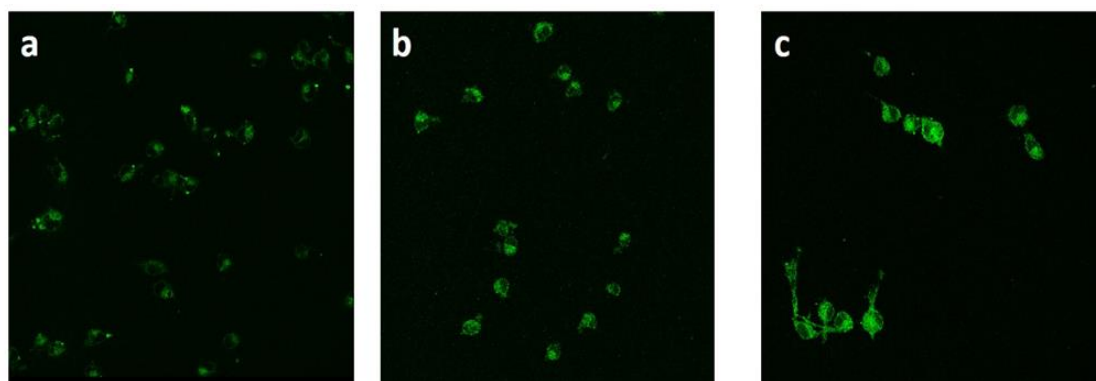


Figura 1.17- Imágenes de fluorescencia ($\lambda_{em} > 600$ nm) tomadas en un microscopio confocal por iluminación con un láser a 500 nm, mostrando nanopartículas de carbono (C-Dots) con diferente comportamiento en su internalización en células HeLa. De izquierda a derecha: (a) C-dots, (b) C-dots/PEG, (c) C-dots/BSA.

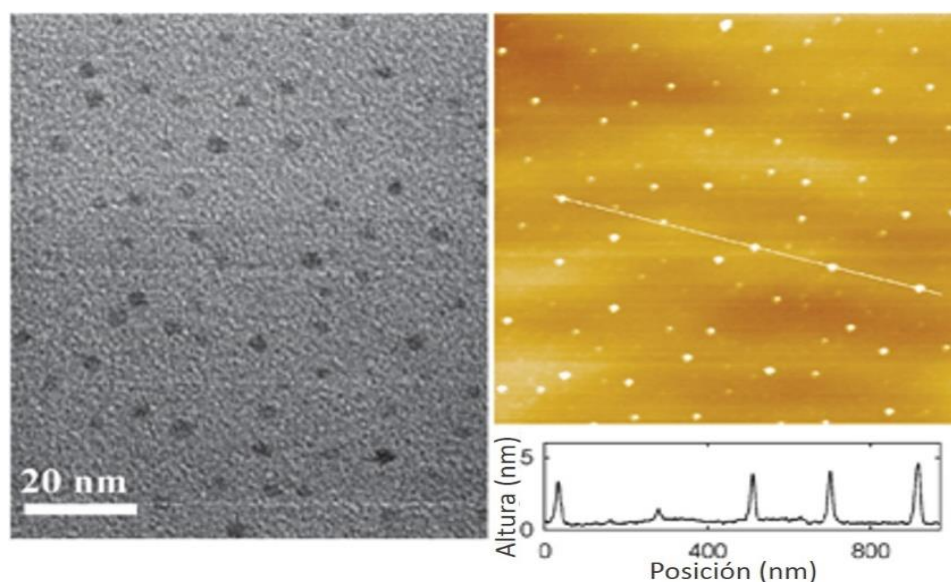
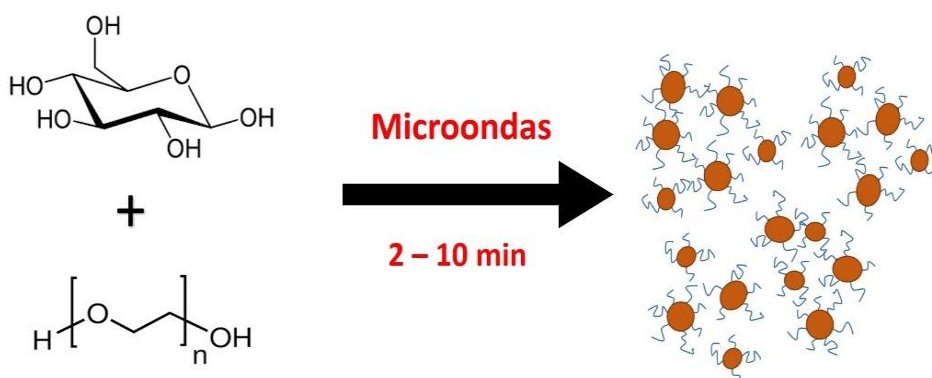


Figura 1.18- Imagen tomada de la bibliografía que muestra a la izquierda una imagen de TEM y a la derecha una imagen tomada en AFM y debajo una medida transversal de la imagen donde se puede percibir la altura de las NPs.[92]

1.5.3- Síntesis de puntos cuánticos de carbono.

El procedimiento más general para la preparación de estos materiales nanoparticulados de carbono amorfo fotoluminiscentes consiste en el tratamiento térmico de materiales precursores en medios viscosos. El tratamiento térmico preferido suele consistir en el calentamiento con microondas por periodos de tiempo cortos en atmósfera ambiente.[89] Entre los medios más comunes para preparar C-dots se encuentra el tratamiento térmico de disoluciones acuosas, pero es más general el empleo de polietilenglicoles (PEG) con peso molecular en el rango de 2000 a

5000 Dalton o bien aceites que presenten puntos de fusión bajos. Una de las ventajas del empleo de polietilenglicol es que los C-dots obtenidos por este medio se encuentran recubiertos por una capa de este polímero, lo que les hace solubles o dispersables en gran número de medios y, particularmente, en agua que es el disolvente en ensayo celulares. Además, la presencia de polietilenglicol dota a estas nanopartículas de una gran biocompatibilidad. Se sabe además que el recubrimiento de los C-dots con polietilenglicol influye positivamente en las propiedades fotoluminiscentes de estos materiales y particularmente en sus rendimientos cuánticos de emisión. Otros precursores adecuados de C-dots son mono u oligosacáridos tales como, por ejemplo, la glucosa.[93] Así, el Esquema 1.6 describe uno de los procedimientos de preparación de C-dots más habitualmente empleado y que se basa el tratamiento de la glucosa en polietilenglicol (PM 2000) en microondas a temperatura de 400 °C durante tres minutos.

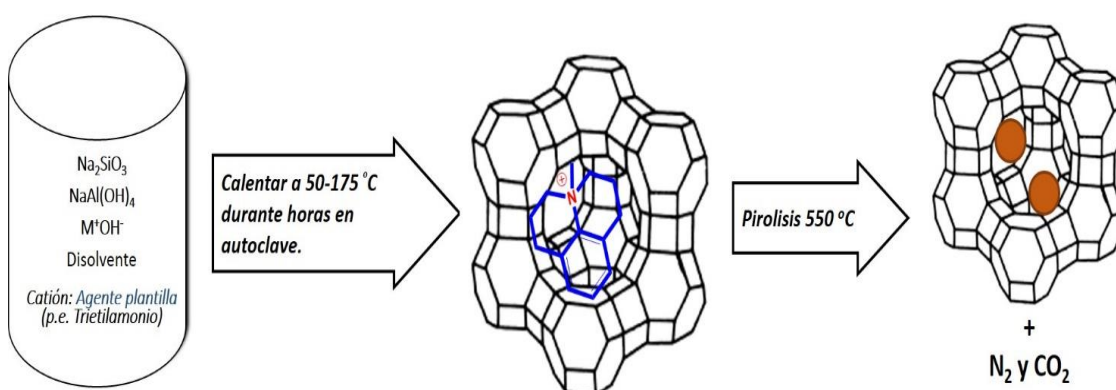


Esquema 1.6- Resumen del proceso de síntesis de nanopartículas de carbono recubiertos de PEG a partir de una mezcla de glucosa y polietilenglicol (PM 2000) utilizando microondas.[93]

La estructura de los C-dots está poco definida. El paradigma más ampliamente aceptado es el de admitir que los C-dots están formados por carbono amorfo, tanto con hibridación sp^3 como sp^2 , donde existen gran número de defectos que consisten en vacantes de carbono y donde pueden estar presentes heteroátomos. Un aspecto de gran importancia en los C-dots es el tamaño de las nanopartículas y su distribución.[89, 90] Se han descrito nanopartículas de C-dots en torno a 2-10 nm.[94] En cambio, son más habituales las muestras que presentan tamaños superiores a decenas de nanómetros y con una amplia distribución de tamaños.[95] Se sabe que la naturaleza, el tamaño de los C-dots y el tipo de recubrimiento influyen en sus propiedades.[91, 94] Entre estas propiedades la más relevante es su capacidad de exhibir fotoluminiscencia en la zona de longitudes de onda del visible al ser excitadas en la región ultravioleta. De forma más habitual la fotoluminiscencia aparece entre longitudes de onda de 400 a 550 nm presentando, en general, de una anchura de banda amplia. Una de las características importantes de los C-dots es su rendimiento cuántico de emisión, que en los mejores casos descritos en la bibliografía se encuentra a una longitud de onda de excitación óptima en torno a 0.1-0.6, y con anchuras de

bandas entre 60 y 100 nm. Estos valores son aún insatisfactorios cuando se comparan con los que se pueden conseguir con puntos cuánticos metálicos. [89, 91, 96-99]

Es evidente que existe una línea de investigación muy intensa encaminada a aumentar el rendimiento cuántico de los C-dots y a reducir el ancho de banda de las emisiones. En general se cree, y existen ciertos datos que lo apoyan, que la anchura de la banda de emisión refleja la distribución de las nanopartículas de C-dots en varios tamaños, y también la poca homogeneidad en la naturaleza de los centros emisivos. Por tanto, las estrategias para mejorar las propiedades fotoluminiscentes de los C-dots se basan en procedimientos de preparación que den lugar a una distribución de tamaño de partículas estrecha y en también conseguir una uniformidad de los centros emisivos mediante la selección de los precursores y mediante la optimización de las condiciones de síntesis de los C-dots. Este será uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral donde emplearemos el auto ensamblaje de compuestos orgánicos que actúen como agentes plantilla en la síntesis de zeolitas y utilizaremos su confinamiento en las cavidades de estos materiales porosos para la preparación de C-dots. El Esquema 1.7 ilustra esta estrategia.



Esquema 1.7- Estrategia seguida en el Capítulo 6 para la preparación de C-dots por pirólisis del agente plantilla autoensamblado en el interior de una matriz rígida de zeolita. El agente plantilla que aparece en el esquema es *4-metil-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H-pirido[3.2.1-ij]quinolinio*. [100]

Otra de las estrategias a seguir en este trabajo de Tesis Doctoral, irá encaminada a la preparación de C-dots a partir de precursores moleculares que posean un elevado rendimiento cuántico de emisión con el fin de que el C-dot resultante pueda igualmente presentar rendimientos de emisión elevados. Uno de los objetivos en la investigación de los C-dots, es preparar estos materiales con elevada eficiencia de emisión y estrecha anchura de banda de absorción, y con longitudes de onda de emisión máximas controlables en el rango del visible entre 400 y 800 nm. Particularmente importante es preparar materiales C-dots que emitan a longitudes de onda larga

en la zona entre 600 y 800 nm. En este sentido los avances han sido muy limitados siendo la longitud de onda del máximo de emisión más larga descrita en torno a 600 nm.

Conviene indicar aquí, que unas de las características más generales de los C-dots es la variación de la longitud de onda de emisión en función de la longitud de onda de excitación. A medida que la longitud de onda de la excitación en la banda de absorción se desplaza a valores mayores, la longitud de onda de emisión sufre igualmente un desplazamiento a longitudes de onda más largas, aunque los rendimientos cuánticos y la anchura de banda varíen en función de la longitud de onda de excitación. Esta variación de la longitud de onda de emisión en función de la excitación es, en parte, reflejo de la enorme anchura de banda de emisión, y deriva de la presencia en el material de una distribución de centros emisivos con diferente energía.

El mecanismo de emisión más comúnmente aceptado en los C-dots consiste en admitir que la emisión proviene de un proceso de recombinación de electrones y huecos e^-/h^+ . Estos electrones y huecos se generarían en el proceso de excitación fotoquímica, y requieren de la presencia de centros dadores de electrones y centros aceptores de electrones. La rigidez en el C-dot haría difícil la relajación no emisiva por vibración.

Por tanto, una de las posibles formas de aumentar el rendimiento cuántico de emisión y de ejercer un cierto control en la longitud de onda es el dopaje de los C-dots con heteroátomos. De hecho, uno de los objetivos de este trabajo consiste en la preparación de C-dots que van a contener en su composición elemental átomos de nitrógeno.

También en esta Tesis Doctoral, se ha descrito la preparación de C-dots donde la introducción de nitrógeno como agente dopante, dando lugar a estas nanopartículas con un rendimiento cuántico superior a 0.3.[100]

Aunque se acepta como creencia general que los materiales basados en carbono son biocompatibles debido a que las biomoléculas contienen este elemento, está claro que es necesario evaluar la biotoxicidad de los C-dots. Debido a su tamaño nanométrico, es de esperar que estas nanopartículas de carbono sean fácilmente internalizables en células y orgánulos. Sin embargo, la morfología y las propiedades de la superficie pueden ser responsables de biotoxicidad. La fotoluminiscencia podría servir como táctica para establecer la internalización de estas nanopartículas en células mediante el empleo de microscopía de fluorescencia confocal. Así, uno de los objetivos de los capítulos 6 y 7 será obtener imágenes celulares que demuestren la internalización de los C-dots en el interior de células vivas. Por otra parte, el final de uno de los capítulos de esta tesis iría encaminado al estudio de la biotoxicidad de algunas muestras de estos C-dots en función de la línea celular, la concentración del medio de cultivo y la forma de preparación de estos C-dots.

Por consiguiente, la presente Tesis Doctoral tiene el elemento carbono y materiales nanométricos como campo de estudio, abarcando desde sólidos laminares tipo grafeno hasta C-dots. Los principales objetivos de la Tesis combinan la síntesis y preparación de algunos de estos materiales y su caracterización por técnicas de microscopía y espectroscopía, junto con la determinación de sus propiedades fotofísicas (Capítulos 3, 4 y 5). En el caso de los C-dots (Capítulo 6 y 7), se emplearán técnicas de fotoluminiscencia y se llevarán a cabo estudios iniciales que demuestren su biocompatibilidad, toxicidad y su aplicabilidad para técnicas de bioimagen.

Por tanto, la presente Tesis Doctoral combina métodos de síntesis, técnicas de microscopía y caracterización, junto con medidas fotofísicas incluyendo espectroscopía de especies transitorias y técnicas de biomedicina que van desde cultivos celulares hasta ensayos de viabilidad celular y activación de apoptosis y estrés oxidativo.

1.6- Referencias.

1. Bernal, J.D., *The structure of graphite*. Proc. R. Soc. London, Ser. A, 1924. **106**: p. 749-73.
2. Geim, A.K. and K.S. Novoselov, *The rise of graphene*. Nature Materials, 2007. **6**(3): p. 183-191.
3. Geim, A.K., *Graphene: Status and Prospects*. Science, 2009. **324**(5934): p. 1530-1534.
4. *Physics Nobel prize*, in http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/2010/. 2010.
5. Rao, C.N.R., et al., *Graphene: The New Two-Dimensional Nanomaterial*. Angewandte Chemie-International Edition, 2009. **48**(42): p. 7752-7777.
6. Georgakilas, V., et al., *Noncovalent Functionalization of Graphene and Graphene Oxide for Energy Materials, Biosensing, Catalytic, and Biomedical Applications*. Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.), 2016: p. Ahead of Print.
7. Kuila, T., et al., *Chemical functionalization of graphene and its applications*. Prog. Mater. Sci., 2012. **57**(7): p. 1061-1105.
8. Li, J., et al., *Applications of carbon nanotubes and graphene in the energy storage batteries*. Huaxue Jinzhan, 2014. **26**(7): p. 1233-1243.
9. Santhanam, K.S.V., *Applications of Graphene and Graphene-Oxide Based Nanomaterials Sekhar Chandra Ray*. MRS Bull., 2016. **41**(2): p. 165.
10. Singh, V., et al., *Graphene based materials: Past, present and future*. Prog. Mater. Sci., 2011. **56**(8): p. 1178-1271.
11. Skoda, M., et al., *Graphene: one material, many possibilities-application difficulties in biological systems*. J. Nanomater., 2014: p. 890246/1-890246/11, 12 pp.
12. Navalon, S., et al., *Carbocatalysis by graphene-based materials*. Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.), 2014. **114**(12): p. 6179-6212.
13. Gusynin, V.P. and S.G. Sharapov, *Transport of Dirac quasiparticles in graphene: Hall and optical conductivities*. Los Alamos Natl. Lab., Prepr. Arch., Condens. Matter, 2005: p. 1-25, arXiv:cond-mat/0512157.
14. Castro Neto, A.H., et al., *The electronic properties of graphene*. Reviews of Modern Physics, 2009. **81**(1): p. 109-162.
15. Castro Neto, A.H., et al., *The electronic properties of graphene*. Rev. Mod. Phys., 2009. **81**(1): p. 109-162.
16. Morozov, S.V., et al., *Giant Intrinsic Carrier Mobilities in Graphene and Its Bilayer*. Phys. Rev. Lett., 2008. **100**(1): p. 016602/1-016602/4.
17. Ahn, J., et al., *Touch panel including graphene and method of manufacturing the same*. 2015, Google Patents.
18. Balandin, A.A., et al., *Superior Thermal Conductivity of Single-Layer Graphene*. Nano Lett., 2008. **8**(3): p. 902-907.
19. Yan, Z., D.L. Nika, and A.A. Balandin, *Review of thermal properties of graphene and few-layer graphene: applications in electronics*. arXiv.org, e-Print Arch., Condens. Matter, 2015: p. 1-31.
20. Dora, B. and P. Thalmeier, *Magnetotransport and thermoelectricity in Landau-quantized disordered graphene*. Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys., 2007. **76**(3): p. 035402/1-035402/9.
21. Wei, P., et al., *Anomalous Thermoelectric Transport of Dirac Particles in Graphene*. Phys. Rev. Lett., 2009. **102**(16): p. 166808/1-166808/4.
22. Hinz, A., *Thermoelectrical properties of Graphene*. 2013. p. No pp.
23. Lee, C., et al., *Measurement of the Elastic Properties and Intrinsic Strength of Monolayer Graphene*. Science (Washington, DC, U. S.), 2008. **321**(5887): p. 385-388.

24. Ren, C., et al., *Research and application of graphene composites*. Xiandai Huagong, 2015. **35**(1): p. 32-35.
25. Nair, R.R., et al., *Fine Structure Constant Defines Visual Transparency of Graphene*. Science (Washington, DC, U. S.), 2008. **320**(5881): p. 1308.
26. Kroto, H.W., et al., *C60: buckminsterfullerene*. Nature (London), 1985. **318**(6042): p. 162-3.
27. Iijima, S., *Growth of carbon nanotubes*. Materials Science and Engineering: B, 1993. **19**(1-2): p. 172-180.
28. King, R.B. *Novel concepts in carbon allotrope structures*. 1997. Research Studies Press.
29. Li, X., et al., *Large-Area Synthesis of High-Quality and Uniform Graphene Films on Copper Foils*. Science (Washington, DC, U. S.), 2009. **324**(5932): p. 1312-1314.
30. Bae, S., et al., *Roll-to-roll production of 30-inch graphene films for transparent electrodes*. Nat. Nanotechnol., 2010. **5**(8): p. 574-578.
31. Hummers, W.S. and R.E. Offeman, *PREPARATION OF GRAPHITIC OXIDE*. Journal of the American Chemical Society, 1958. **80**(6): p. 1339-1339.
32. Dikin, D.A., et al., *Preparation and characterization of graphene oxide paper*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 457-460.
33. Marcano, D.C., et al., *Improved Synthesis of Graphene Oxide*. ACS Nano, 2010. **4**(8): p. 4806-4814.
34. Choudhary, S., H.P. Mungse, and O.P. Khatri, *Hydrothermal Deoxygenation of Graphene Oxide: Chemical and Structural Evolution*. Chem. - Asian J., 2013. **8**(9): p. 2070-2078.
35. Brodie, B.C., *Researches on the atomic weight of graphite*. Quart. J., Chem. Soc., London, 1860. **12**: p. 261-268.
36. Kosynkin, D.V., et al., *Longitudinal unzipping of carbon nanotubes to form graphene nanoribbons*. Nature (London, U. K.), 2009. **458**(7240): p. 872-876.
37. Stankovich, S., et al., *Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide*. Carbon, 2007. **45**(7): p. 1558-1565.
38. Park, S., *Chemically modified graphenes oxide and reduction of graphene oxide*. Hwahak Sekye, 2010. **50**(11): p. 25-27.
39. Jiang, K., et al., *Graphene oxide and reduced graphene oxide: synthesis, photoluminescence, and biotechnological applications*. Rev. Nanosci. Nanotechnol., 2013. **2**(3): p. 171-183.
40. Wu, J., *Progress of reduction methods of graphene oxide*. Huagong Jinzhan, 2013. **32**(6): p. 1352-1356.
41. He, F., et al., *Research progress on reduction of graphene oxide*. Huagong Xinxing Cailiao, 2014. **42**(11): p. 11-12, 19.
42. Aunkor, M.T.H., et al., *The green reduction of graphene oxide*. RSC Adv., 2016. **6**(33): p. 27807-27828.
43. Ferrari, A.C. and J. Robertson, *Resonant Raman spectroscopy of disordered, amorphous, and diamondlike carbon*. Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys., 2001. **64**(7): p. 075414/1-075414/13.
44. DELGADO, S.J.M., et al., *Procedimiento para la preparación de películas de grafeno ó materiales grafénicos sobre sustratos no metálicos*. 2013, Google Patents.
45. Barrejon, M., et al., *Covalent functionalization of N-doped graphene by N-alkylation*. Chem. Commun. (Cambridge, U. K.), 2015. **51**(95): p. 16916-16919.
46. Primo, A., et al., *High-yield production of N-doped graphitic platelets by aqueous exfoliation of pyrolyzed chitosan*. Carbon, 2014. **68**: p. 777-783.
47. Primo, A., et al., *From biomass wastes to highly efficient CO2 adsorbents: graphitisation of chitosan and alginate biopolymers*. ChemSusChem, 2012. **5**(11): p. 2207-14.
48. Takahashi, H., *Carbonization phenomena. III. Carbonization of carbohydrates*. Nippon Kagaku Zasshi, 1948. **69**: p. 97-100.

49. Lian, P., et al., *Method for preparing graphene-based nanocomposite with three-dimensional porous structure*. 2014, Kunming University of Science and Technology, Peop. Rep. China . p. 12pp.
50. Titantah, J.T. and D. Lamoén, *Carbon and nitrogen 1s energy levels in amorphous carbon nitride systems. XPS interpretation using first-principles*. *Diamond Relat. Mater.*, 2007. **16**(3): p. 581-588.
51. Arenillas, A., et al., *CO₂ removal potential of carbons prepared by co-pyrolysis of sugar and nitrogen containing compounds*. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 2005. **74**(1-2): p. 298-306.
52. Min, S. and G. Lu, *Dye-Sensitized Reduced Graphene Oxide Photocatalysts for Highly Efficient Visible-Light-Driven Water Reduction*. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2011. **115**(28): p. 13938-13945.
53. Wang, X., L.J. Zhi, and K. Mullen, *Transparent, conductive graphene electrodes for dye-sensitized solar cells*. *Nano Letters*, 2008. **8**(1): p. 323-327.
54. Hammarstrom, L. and S. Hammes-Schiffer, *Artificial Photosynthesis and Solar Fuels*. *Acc. Chem. Res.*, 2009. **42**(12): p. 1859-1860.
55. Faunce, T., *Towards Global Artificial Photosynthesis (Global Solar Fuels): Energy, Nanochemistry, and Governance*. *Aust. J. Chem.*, 2012. **65**(6): p. 557-563.
56. Styring, S., *Artificial photosynthesis for solar fuels*. *Faraday Discuss.*, 2012. **155**(Artificial Photosynthesis): p. 357-376.
57. Yamazaki, Y., H. Takeda, and O. Ishitani, *Photocatalytic reduction of CO₂ using metal complexes*. *J. Photochem. Photobiol., C*, 2015. **25**: p. 106-137.
58. Centi, G. and S. Perathoner, *Towards Solar Fuels from Water and CO₂*. *ChemSusChem*, 2010. **3**(2): p. 195-208.
59. Moyal, D., et al., *Comparison of UVA protection afforded by sunscreens with a high sun protection factor*. *Eur. J. Dermatol.*, 2002. **12**(4): p. ii-iii.
60. Martha, S., P. Chandra Sahoo, and K.M. Parida, *An overview on visible light responsive metal oxide based photocatalysts for hydrogen energy production*. *RSC Adv.*, 2015. **5**(76): p. 61535-61553.
61. Wang, X., *Design and research progress of semiconductor-based heterostructures for photocatalytic hydrogen generation*. *Huagong Xinxing Cailiao*, 2015. **43**(5): p. 14-18.
62. Jiao, W., et al., *Recent progress in red semiconductor photocatalysts for solar energy conversion and utilization*. *Nanotechnol. Rev.*, 2016. **5**(1): p. 135-145.
63. Ameen, S., et al. *Metal oxide semiconductors and their nanocomposites application towards photovoltaic and photocatalytic*. 2014. Scrivener Publishing LLC.
64. Hang, Z., et al., *Application of graphene composite materials in photocatalysis*. *Huagong Xinxing Cailiao*, 2015. **43**(7): p. 200-202.
65. Schniepp, H.C., et al., *Functionalized single graphene sheets derived from splitting graphite oxide*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2006. **110**(17): p. 8535-8539.
66. Yeh, T.F., et al., *Graphite Oxide as a Photocatalyst for Hydrogen Production from Water*. *Advanced Functional Materials*, 2010. **20**(14): p. 2255-2262.
67. Zhang, N., Y.H. Zhang, and Y.J. Xu, *Recent progress on graphene-based photocatalysts: current status and future perspectives*. *Nanoscale*, 2012. **4**(19): p. 5792-5813.
68. Chang, D.W. and J.-B. Baek, *Nitrogen-Doped Graphene for Photocatalytic Hydrogen Generation*. *Chem. - Asian J.*, 2016. **11**(8): p. 1125-1137.
69. Ballesteros-Garrido, R., et al., *Photocatalytic hydrogen generation from water-methanol mixtures using halogenated reconstituted graphenes*. *J. Mater. Chem. A*, 2013. **1**(38): p. 11728-11734.
70. Latorre-Sanchez, M., A. Primo, and H. Garcia, *P-Doped Graphene Obtained by Pyrolysis of Modified Alginate as a Photocatalyst for Hydrogen Generation from Water-Methanol Mixtures*. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013. **52**(45): p. 11813-11816.
71. Cataldo, F., *Carbon allotropy and carbon black*. *Kautsch. Gummi Kunstst.*, 2001. **54**(1-2): p. 22-28.

72. Donnet, J.-B., *Carbon allotropes: a large family*. Actual. Chim., 2006. **295-296**: p. 115-118.
73. Falcao, E.H.L. and F. Wudl, *Carbon allotropes: beyond graphite and diamond*. J. Chem. Technol. Biotechnol., 2007. **82**(6): p. 524-531.
74. Schloegl, R., *Carbon in catalysis*. Adv. Catal., 2013. **56**: p. 103-185,, 11 plates.
75. Ekimov, A.I., A.L. Efros, and A.A. Onushchenko, *Quantum size effect in semiconductor microcrystals*. Solid State Commun., 1985. **56**(11): p. 921-4.
76. Ekimov, A.I. and A.L. Efros. *Spectroscopic studies of the quantum size effect in semiconductor microcrystals*. 1986. Akad. Nauk SSSR, Fiz.-Tekh. Inst.
77. Ekimov, A.I., et al., *Stark quantum size effect in semiconductor microcrystals*. Zh. Tekh. Fiz., 1989. **59**(3): p. 202-4.
78. Reed, M.A., et al., *Observation of discrete electronic states in a zero-dimensional semiconductor nanostructure*. Phys. Rev. Lett., 1988. **60**(6): p. 535-7.
79. Haug, H. and S.W. Koch, *Quantum Theory of the Optical and Electronic Properties of Semiconductors*. 1990: World Scientific. 408 pp.
80. Norris, D.J. and M.G. Bawendi, *Measurement and assignment of the size-dependent optical spectrum in CdSe quantum dots*. Phys. Rev. B: Condens. Matter, 1996. **53**(24): p. 16338-16346.
81. Cahay, M., et al., *Quantum Confinement VI: Nanostructured Materials and Devices. (Proceedings of the Sixth International Symposium held 5-6 September 2001, in San Francisco, California.) [In: Proc. - Electrochem. Soc., 2001; 2001-19]*. 2001: Electrochemical Soc. 398 pp.
82. Zrazhevskiy, P., M. Sena, and X. Gao, *Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery*. Chem. Soc. Rev., 2010. **39**(11): p. 4326-4354.
83. Alivisatos, A.P., *Birth of a Nanoscience Building Block*. ACS Nano, 2008. **2**(8): p. 1514-1516.
84. Brus, L.E., *A simple model for the ionization potential, electron affinity, and aqueous redox potentials of small semiconductor crystallites*. J. Chem. Phys., 1983. **79**(11): p. 5566-71.
85. Coe, S., et al., *Electroluminescence from single monolayers of nanocrystals in molecular organic devices*. Nature (London, U. K.), 2002. **420**(6917): p. 800-803.
86. Farias, G.d.A. and J. Soares de Sousa. *Core-shell quantum dots*. 2011. CRC Press.
87. Vasudevan, D., et al., *Core-shell quantum dots: Properties and applications*. J. Alloys Compd., 2015. **636**: p. 395-404.
88. Yildiz, I. and F.M. Raymo. *Biocompatible CdSe-ZnS core-shell quantum dots*. 2013. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.
89. Guo, Y., Y. Hu, and Z. Deng, *DNA Directed Self-Assembly of Fluorescent Colloidal Semiconductor Quantum Dots and Plasmonic Metal Nanoparticles Heterogeneous Nanomaterials*. Chin. J. Chem., 2016. **34**(3): p. 259-264.
90. Gaponik, N.P., et al. *Chemically grown II-VI semiconductor quantum dots for optoelectronic and photonic applications*. 2001. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
91. Zhang, F., et al., *Cadmium-based quantum dots. Preparation, surface modification, and applications*. J. Nanosci. Nanotechnol., 2014. **14**(2): p. 1409-1424.
92. Baker, S.N. and G.A. Baker, *Luminescent Carbon Nanodots: emergent Nanolights*. Angew. Chem., Int. Ed., 2010. **49**(38): p. 6726-6744, S6726/1-S6726/5.
93. Lim, S.Y., W. Shen, and Z. Gao, *Carbon quantum dots and their applications*. Chem. Soc. Rev., 2015. **44**(1): p. 362-381.
94. Zheng, X.T., et al., *Glowing Graphene Quantum Dots and Carbon Dots: Properties, Syntheses, and Biological Applications*. Small, 2015. **11**(14): p. 1620-1636.
95. Wang, X., et al., *Photoinduced electron transfers with carbon dots*. Chem. Commun. (Cambridge, U. K.), 2009(25): p. 3774-3776.

96. Zhu, H., et al., *Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties*. Chem. Commun. (Cambridge, U. K.), 2009(34): p. 5118-5120.
97. Hu, S., et al., *Tunable Photoluminescence Across the Entire Visible Spectrum from Carbon Dots Excited by White Light*. Angew. Chem., Int. Ed., 2015. **54**(10): p. 2970-2974.
98. Baldovi, H.G., et al., *Perylenetetracarboxylic anhydride as a precursor of fluorescent carbon nanoion rings*. Nanoscale, 2015. **7**(29): p. 12484-12491.
99. Binetti, E., et al., *Tuning light emission of PbS nanocrystals from infrared to visible range by cation exchange*. Sci. Technol. Adv. Mater., 2015. **16**(5): p. 1-10.
100. Altintas, Y., et al., *Highly Efficient Cd-Free Alloyed Core/Shell Quantum Dots with Optimized Precursor Concentrations*. J. Phys. Chem. C, 2016. **120**(14): p. 7885-7892.
101. Sukanya, D. and P. Sagayaraj, *A simple and facile synthesis of MPA capped CdSe and CdSe/CdS core/shell nanoparticles*. AIP Conf. Proc., 2015. **1665**(1, Solid State Physics): p. 050028/1-050028/3.
102. Warnement, M.R. and S.J. Rosenthal, *Fluorescent quantum dots: properties and applications*. Springer Ser. Fluoresc., 2005. **3**(Fluorescence Spectroscopy in Biology): p. 263-274.
103. Baldovi, H.G., et al., *Highly fluorescent C-dots obtained by pyrolysis of quaternary ammonium ions trapped in all-silica ITQ-29 zeolite*. Nanoscale, 2015. **7**(5): p. 1744-1752.

Capítulo 2:

Objetivos

Como se ha venido comentando en el capítulo de introducción, el *carbono* es el elemento central en la presente Tesis Doctoral. El objetivo general es por una parte es la síntesis y estudio fotofísico de materiales derivados del grafeno, así como su aplicación como fotocatalizadores. Y por otro lado, la preparación y caracterización de materiales nanoparticulados basados en puntos cuánticos de carbono C-dots, avanzando en el conocimiento de sus propiedades fotofísicas y explorando algunas posibles aplicaciones, como sensores y en biomedicina.

De esta manera, los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1- *Caracterización de los estados de separación de cargas* que se generan por absorción de fotones en *óxido de grafeno* y *óxido de grafeno reducido*. Se persigue determinar las diferencias propiedades de los estados de separación de carga correspondiente, siendo importante establecer el comportamiento cinético de estos estados en la escala de tiempos de microsegundos que es la escala de tiempos relevante en procesos fotoquímicos tales como la fotocatalisis.
- 2- *Preparación tanto en forma de polvo como de película de grafenos* conteniendo *diferentes proporciones nitrógeno como agente dopante*, a fin de establecer la influencia que el contenido de heteroátomos juega en las propiedades y tiempos de vida

- del estado de separación de cargas de estos materiales. Se pretende proporcionar evidencia experimental que apoye cálculos teóricos que predicen una variación en los potenciales de las bandas de conducción y de valencia dependiendo de los contenidos de nitrógeno.
- 3- *Preparación y estudio de los estados de separación de carga de los grafenos conteniendo halógenos* en su composición. Se pretende establecer cómo la naturaleza y contenido de halógeno influye en los rendimientos cuánticos de los estados excitados y en sus tiempos de vida. Esta información fotofísica se aplicará al desarrollo de un grafeno conteniendo halógenos que posea *actividad fotocatalítica en la generación de hidrógeno a partir de agua conteniendo agentes dadores de electrones*.
 - 4- *Preparación de nanopartículas de carbono por pirólisis en atmósfera inerte de Zeolitas* conteniendo agentes directores de estructura autoensamblada en el interior de las cavidades de estos aluminosilicatos microporosos. Además las *nanopartículas de carbono* se extraerán del material inorgánico y se caracterizarán desde el punto de vista de su morfología y de sus propiedades fotoluminiscentes. Finalmente, se aplicará el nuevo material nanoparticulado en el interior de la matriz de zeolita como *sensor de gases*.
 - 5- *Preparación de nanomateriales de carbono estructurado (C-NOR)* mediante tratamiento térmico en polietilenglicol de perilenos sustituidos. Se pretende establecer si los *elevados rendimientos cuánticos de emisión* de estos precursores tiene o no, reflejo en las propiedades emisoras de las nanopartículas que eventualmente se pudieran formar por ensamblaje de esta molécula orgánica. Establecimiento de la *internalización en células de los materiales nanoestructurados de carbono C-NOR* mediante microscopía confocal de fluorescencia y *evaluación de la biocompatibilidad* de estas nanopartículas en diferentes líneas celulares cancerígenas humanas.

En el caso de que se cumplan los objetivos de la presente Tesis Doctoral, se habrá avanzado en el conocimiento y aplicación de materiales nanométricos de carbono en campos que van desde la fotocatalisis para generación de combustibles solares a la bioimagen y biomedicina. Estos objetivos, se conseguirán mediante el estudio de las propiedades, fotofísicas como los rendimientos cuánticos de emisión y el establecimiento de los tiempos de vida de estados transitorios, contribuyendo al desarrollo de materiales sostenibles basados en un elemento abundante, como es el carbono y su aplicación a campos tan importantes como el de energías renovables y la biomedicina.

Bloque I: Estudio fotofísico y fotoquímico de materiales basados en grafeno para su uso como fotocatalizadores.



Capítulo 3:

Estudio del estado transitorio de separación de cargas fotoinducido en suspensiones de óxido de grafeno y óxido de grafeno reducido.

3.1- Introducción.

El óxido de grafeno (GO) y el óxido de grafeno reducido (rGO) han sido usados en un amplio rango de aplicaciones que van desde películas conductoras,[1] materiales optoelectrónicos,[2] componentes activos en supercondensadores,[3,4] sensores[5] y catalizadores libres de metales.[6] El GO se obtiene de forma reproducible por oxidación química profunda del grafito y exfoliación posterior del óxido de grafito resultante.[7-9] El GO contiene un elevado porcentaje de oxígeno en su composición que puede llegar a ser similar al del carbono. Por su parte el rGO se obtiene por reducción física o química del GO y posee un contenido en oxígeno residual que, generalmente, es inferior al 15%.[10-13] El estudio de las propiedades fotofísicas del GO y rGO podría proporcionar información sobre las transiciones electrónicas, la movilidad de transportadores de carga y el comportamiento de huecos y electrones en estos materiales

grafénicos y podría servir para entender el comportamiento optoelectrónico de grafenos lo que podrían conducir incluso a la preparación de materiales más eficientes.

Estudios de inhibición de la fluorescencia en moléculas sonda empleando grafeno (G) como inhibidor indican que G puede interactuar tanto con moléculas dadoras de electrones como aquellas otras que sonceptoras, poseyendo de esta manera los grafenos un comportamiento dual.[14] Se ha propuesto que este comportamiento del rGO como inhibidor de fluorescencia opera a través de un mecanismo de transferencia de carga.[13, 15-17] En la literatura sobre el tema se han publicado estudios sobre las propiedades de fluorescencia tanto de estado estacionario como con resolución temporal para el GO y rGO.[18-27] Igualmente se han descrito estudios de espectroscopia de absorción transitoria en la escala de tiempos de femtosegundos tanto para el GO como para rGO.[28-31] Estos estudios por destello láser han revelado que tras excitación fotoquímica, la cinética de relajación ultrarrápida tanto en el GO como en rGO está dominada por el atrapamiento de electrones generados en la excitación. El ajuste del perfil temporal de la señal transitoria a una función multiexponencial donde contribuyen componentes con varios tiempos de vida indica la existencia de diferentes excitones. Se ha observado que el estado de separación de cargas del rGO se desactiva más rápido que en el GO y que para el rGO, la distribución de tiempos de vida depende de su contenido de oxígeno. Estos datos están de acuerdo con la mayor movilidad de electrones en rGO respecto a GO. Sin embargo, no existen estudios sobre la caracterización de los estados de separación de carga de GO y rGO que alcanzan la escala de tiempo de microsegundos. Esta escala de tiempos de microsegundos es relevante para racionalizar la reactividad de GO y rGO con especies presentes en el medio.

El presente capítulo proporciona evidencia experimental en apoyo de la generación fotoquímica de estados de separación de carga desapareciendo en la escala de tiempos de microsegundos cuando se irradian con un pulso de laser suspensiones de GO y rGO. Se describirá que los tiempos de vida y los rendimientos cuánticos relativos del estado de separación de cargas para suspensiones de rGO son mayores que para el GO, situación que contrasta con el comportamiento descrito basado en estudios de femtosegundo. Estos tiempos de vida más largos y rendimientos cuánticos mayores observados en rGO podrían ser ventajosos para aplicaciones de estos materiales en fotocatalisis y dispositivos optoelectrónicos donde los grafenos están actuando como portadores de carga. En el presente capítulo demostraremos que, de acuerdo con los estudios basados en fluorescencia, el rGO posee un comportamiento dual aceptando y donando electrones, y que sus propiedades fotofísicas dependen del grado de exfoliación del material.

3.2- Resultados y discusión.

La muestra de GO del presente estudio se obtuvo por exfoliación del óxido de grafito resultante de la oxidación de Hummers de una muestra de grafito comercial de acuerdo con procedimientos descritos en la literatura.[7, 8] Por su parte la muestra rGO se obtuvo por reducción hidrotérmica del GO a 150 °C en autoclave.[32-34] La Figura 3.1 muestra espectros Raman típicos para GO y rGO que coinciden con los espectros descritos en la bibliografía para estos materiales.[8, 12, 20, 35-38] Ambos espectros presentan las bandas G y D esperadas. La banda G en rGO aparece en un valor de número de onda más próximo al del grafito (1580 cm^{-1}) comparada con la banda que aparece para GO. Esta variación en el número de onda está de acuerdo con el proceso de reducción de GO en el tratamiento hidrotérmico y la reconstitución parcial de la lámina de grafeno. La presencia de la banda D en ambas muestras alrededor de 1350 cm^{-1} indica la presencia de defectos, fundamentalmente grupos oxigenados en ambas muestras.

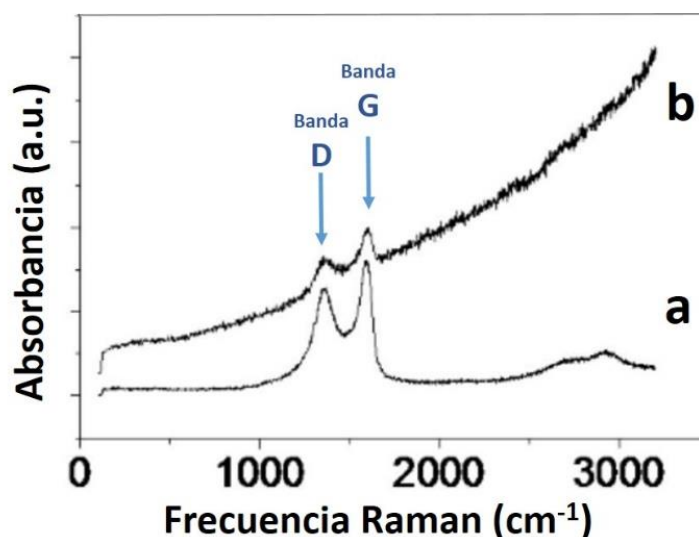


Figura 3.1- Espectros Raman registrados para rGO (a) y para GO (b). Empleando como fuente de excitación un láser que emite en el visible a 612 nm.

A fin de obtener información de las propiedades ópticas de las muestras de GO y rGO objeto de estudio, se registraron igualmente los espectros de absorción UV-Vis e IR. Los espectros de absorción UV-Vis para el GO y rGO registrados por transmitancia en suspensiones de GO y rGO se presentan en la Figura 3.2. Estos espectros indican que la muestra de GO posee una débil absorción en la región del visible. Sin embargo, tras reducción, la muestra de rGO formada aumenta claramente la absorción en la región del visible. La disminución de la población de grupos oxigenados cuando la muestra de GO se transforma en rGO se puede poner en evidencia de una forma convincente comparando los espectros IR de las muestras GO y rGO, los cuales se presentan en la Figura 3.3. Análisis químico elemental y XPS indican igualmente la disminución de contenido en oxígeno al convertir GO en rGO.[32, 35]

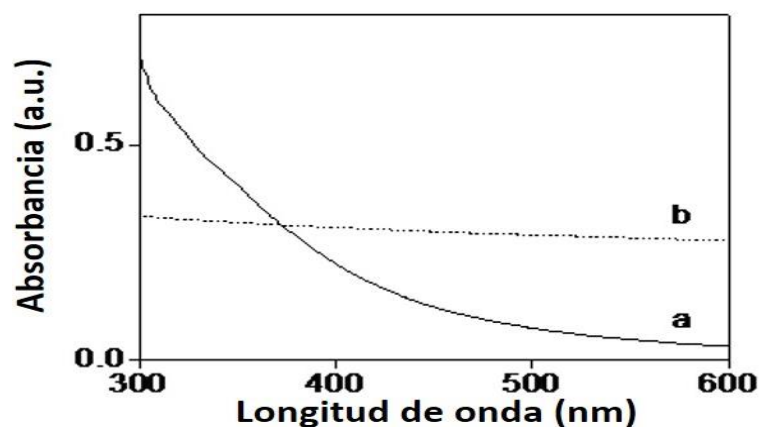


Figura 3.2- Espectro de absorción UV-Visible de suspensiones en acetonitrilo 0.2 mg/ml de GO (a) y rGO (b).

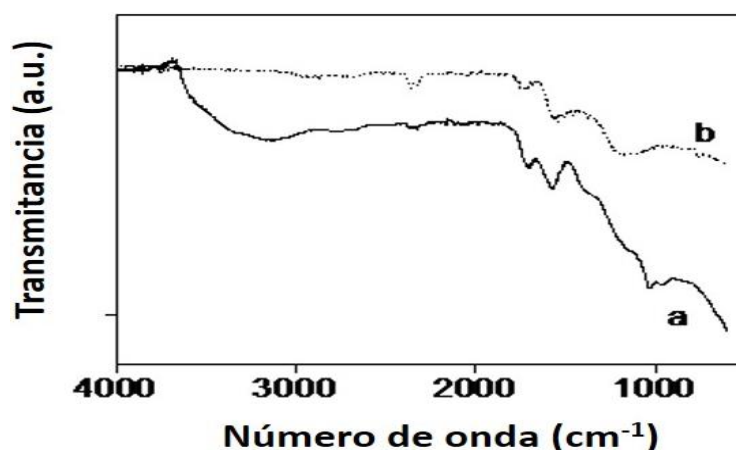


Figura 3.3- Espectro de infrarrojo registrado para las muestras GO (a) y rGO (b). Se utilizó la técnica infrarrojo por transformada de Fourier medidas en modo de reflexión total atenuada (siglas en ingles FTIR-ATR) que permite examinar la muestra directamente en estado líquido o solido sin más preparación.

A fin de determinar el comportamiento fotofísico de las muestras de GO y rGO, en la escala de tiempo de microsegundos, mediante la técnica de destello laser se usó un equipo de laser pulsado de nanosegundo. Estos materiales se suspendieron en acetonitrilo mediante la aplicación de ultrasonidos las suspensiones y fueron purgadas con un gas inerte con el propósito de eliminar la presencia de otros gases disueltos en el disolvente que puedan interferir en la señal real de la muestra como el oxígeno. Las Figuras 3.4 y 3.5 muestran espectros de absorción transitoria para suspensiones en acetonitrilo de GO y rGO cuando éstas son irradiadas con un láser de 355 nm en atmósfera de argón.

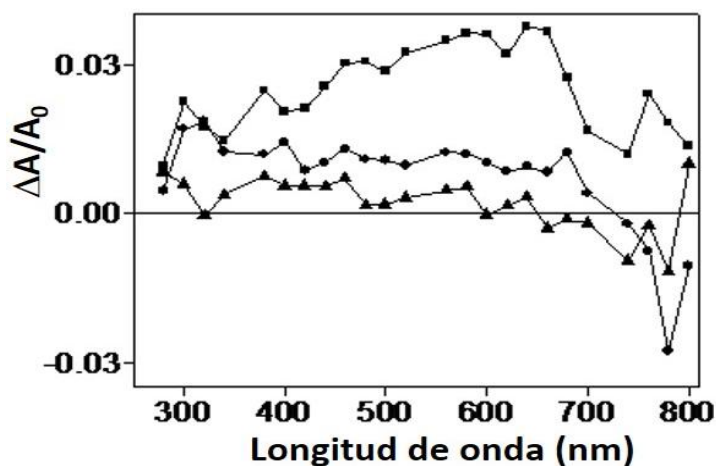


Figura 3.4- Espectros de absorción transitoria registrados a 0.1 (■), 0.2 (●) y 0.5 (▲) μ s tras excitación con un láser pulsado de 355 nm para una suspensión de GO (0.2 mg/mL) en acetonitrilo purgada con argón.

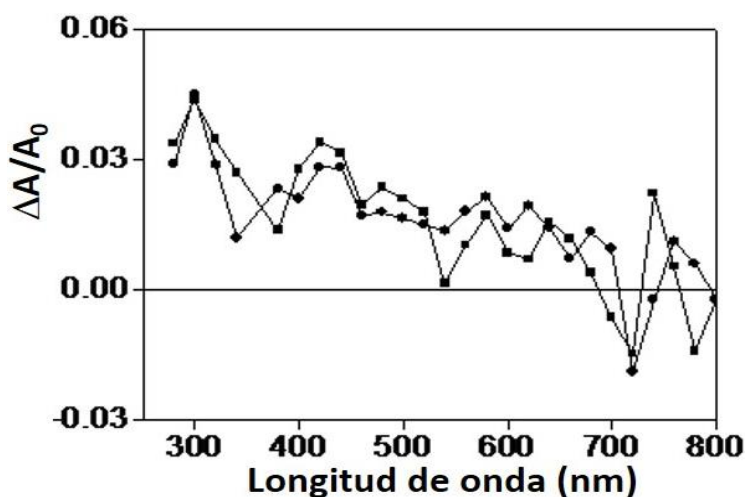


Figura 3.5- Espectros de absorción transitoria registrados a 0.2 (■) y 0.5 (●) μ s, tras excitación con un pulso de láser de 355 nm de una suspensión de rGO en acetonitrilo (0.2 mg/mL) purgada con argón.

Para la muestra de GO los espectros de absorción transitoria presentan una banda de absorción ancha que cubre completamente toda la zona de longitudes de onda que se puede registrar, observándose un máximo relativo a 670 nm. Para la muestra de rGO, los espectros de absorción transitoria se caracterizan por una absorción continua en el rango completo de longitudes de onda que puede ser medido en el equipo, disminuyendo gradualmente la absorción en intensidad hacia la región de longitudes de onda largas. Todas las señales medidas a diferentes longitudes de onda entre 300 y 800 nm poseen el mismo perfil temporal. La Figuras 3.6 y 3.7 muestran algunos de estos perfiles temporales medidos para las suspensiones de GO y rGO. Esta coincidencia de perfil temporal sugiere que todo rango de absorción posee una distribución uniforme y en la misma proporción de especies transitorias.

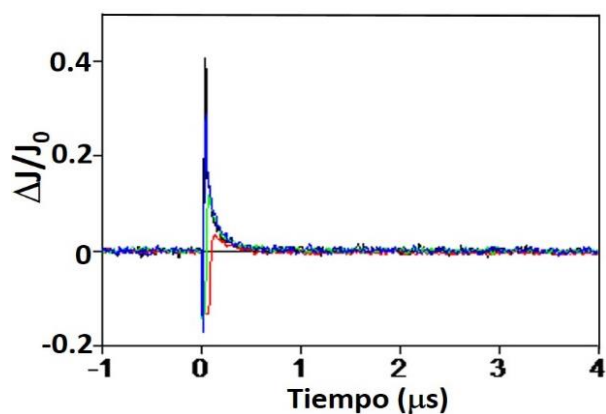


Figura 3.6- Perfil temporal de las señales registradas a 320 (negro), 420 (rojo), 520 (verde), y 620 (azul) nm, (0.2 mg/mL), para una suspensión de GO en acetonitrilo y purgado con argón previamente.

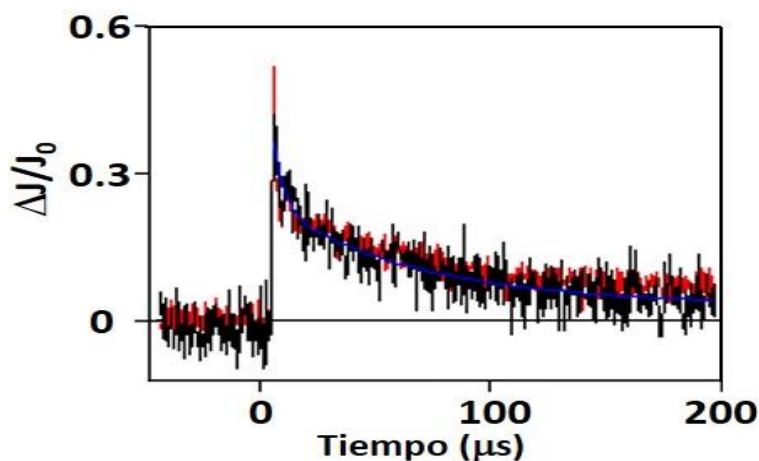


Figura 3.7- Perfil temporal de las señales registradas a 320 (negro) y a 420 (rojo) nm (junto con el correspondiente ajuste a una cinética de decaimiento exponencial de segundo orden en azul) para una suspensión de rGO en acetonitrilo (0.2 mg/mL) previamente purgado con argón.

Los perfiles temporales de la señal medida a 420 nm para suspensiones de GO y rGO en acetonitrilo fueron muy diferentes (Figura 3.8). Para la muestra de GO el perfil temporal pudo ajustarse adecuadamente a una cinética de primer orden con un solo componente de tiempo de vida muy corto que se estimó en 180 ns. Para la suspensión de rGO la desaparición de la señal transitoria presenta dos regímenes, el primero de ellos con una cinética más rápida, y que dura menos de 1 μ s y el segundo consistiendo en una desaparición mucho más lenta y que tiene lugar durante cientos de microsegundos. La Figura 3.9 presenta el perfil temporal para la señal registrada para las suspensiones de rGO y GO en acetonitrilo, así como el mejor ajuste de la señal a cinéticas es la suma de dos exponenciales y de primer orden de desaparición exponencial respectivamente. En el caso del rGO la contribución relativa de estos dos regímenes se puede estimar a partir de la intensidad relativa de las señales inmediatamente después del pulso del

láser y a 1 μs estimándose que es del 54 y 46% para el decaimiento rápido y lento respectivamente.

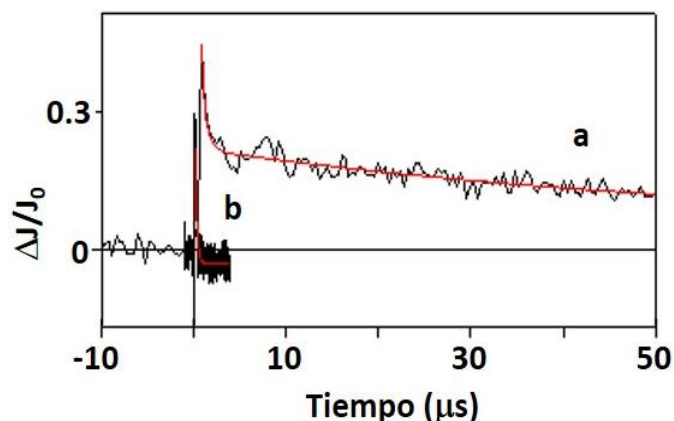


Figura 3.8- Perfiles temporales de la señal registrada a 420 nm para una suspensión en acetonitrilo y purgada con argón de (a) rGO y (b) GO (ambas muestras tienen una concentración aproximada 0.2 mg/mL). La línea roja corresponde al mejor ajuste a una cinética de desaparición primer orden de la señal de GO.

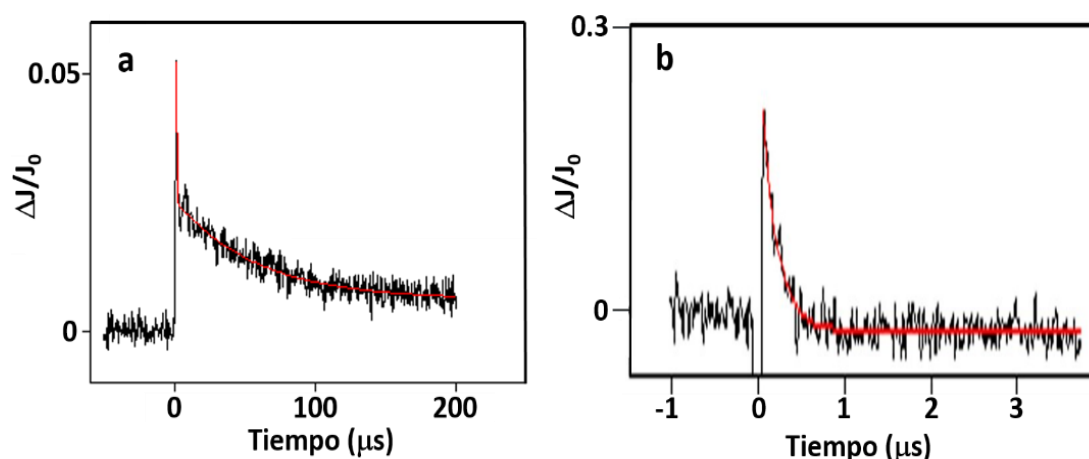


Figura 3.9- Perfil temporal de la señal registrada a 420 nm para una suspensión en acetonitrilo de rGO (a) y GO (b) purgado con argón (ambas muestras tienen una concentración aproximada 0.2 mg/mL). La línea roja corresponde al mejor ajuste a una cinética de desaparición exponencial de primer orden.

Este comportamiento fotofísico en la escala de tiempo de microsegundos contrasta con la dinámica de relajación ultrarrápida en la escala de tiempos de femtosegundos que ha sido descrita tanto para GO como rGO.[28, 39] Así Gosh y colaboradores han descrito que la dinámica de relajación en la escala de tiempos de femtosegundos en muestras de GO está controlada por el atrapamiento de electrones generados fotoquímicamente en defectos formados durante la exfoliación del óxido de grafito. Grupos funcionales oxigenados presentes en GO tales como ácidos carboxílicos, grupos carbonilo y epóxidos serían los centros que actuarían atrapando los electrones generados en el proceso de excitación fotoquímica. Experimentos mediante el empleo

de inhibidores apoyan la propuesta de que los defectos y grupos funcionales oxigenados son principalmente los centros que atrapan los electrones generados fotoquímicamente. La dinámica de relajación de las muestras de rGO excitadas en escala de tiempos inferior a los nanosegundos es considerablemente más rápida que la de muestra de GO y se parece significativamente a la que presentan muestras de grafeno sin defectos.[40] Estos estudios de femtosegundo indican que incluso tras la reducción del GO una pequeña fracción de centros oxigenados que permanece en las muestras de rGO puede jugar un papel determinante en la fotofísica de estos materiales. Conviene hacer notar que los procesos de apilamiento que puede sufrir la muestra de rGO no pueden tener influencia en la dinámica de relajación en la escala de tiempos más corta que nanosegundos, puesto que el apilamiento requiere difusión y movimiento de las láminas de rGO en el medio líquido y estos procesos tienen lugar en escala de tiempos mucho mayores que nanosegundos, típicamente de microsegundos e incluso tiempos más largos.

En un precedente relacionado donde se estudió el espectro de absorción transitoria de puntos cuánticos de grafeno en la escala de tiempo de microsegundos,[41] se observó que el perfil temporal de la señales se ajustaba a la suma de dos decaimientos exponenciales consecutivas, atribuyendo este hecho a la generación fotoquímica del estado de separación de cargas con electrones en la banda de conducción y huecos en la banda de valencia y a su recombinación posterior siguiendo dos mecanismos diferentes. De esta manera los autores propusieron que el perfil temporal indicaría que existen dos mecanismos principales de recombinación, uno de ellos correspondiendo a la anihilación de electrones y huecos geminales (recombinación teniendo lugar en el mismo centro donde ocurre su formación) que sería rápida y otra recombinación al azar ocurriendo tras la migración de las cargas fuera del punto inicial donde ocurrió el evento de separación de cargas.

Basándonos en estos precedentes proponemos que la especie transitoria de tiempo de vida corta observada por nosotros para GO en la escala de microsegundos podría corresponder al estado de separación de cargas generado fotoquímicamente en el que los electrones serían inmediatamente atrapados por grupos funcionales oxigenados y los huecos positivos desaparecerían en una escala de tiempos inferior al microsegundo. En apoyo a esta propuesta, se observó que la señal transitoria era inhibida completamente por adición de metanol (ver Figura 3.10).

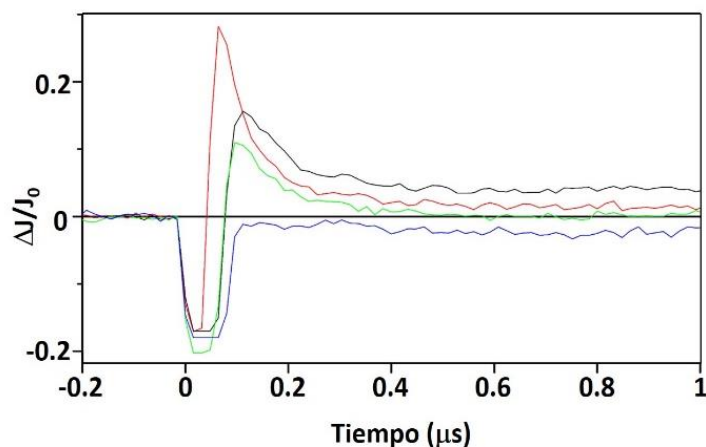


Figura 3.10- Perfil temporal de la desaparición de la señal de transitoria registrada a 420 nm para una suspensión en acetonitrilo de GO (0.2 mg/mL) purgada en argón (**negro**) y desactivado con oxígeno (**rojo**), dicloroetano (**verde**) o metanol (**azul**).

Las muestras de rGO contienen un porcentaje de oxígeno mucho menor que las de GO por consiguiente son mucho mejor conductoras de electrones. Por ello para estas muestras es razonable asignar la señal transitoria de tiempos de vida más cortos en la escala de microsegundos a la recombinación de huecos y electrones geminales puesto que los electrones tendrían una probabilidad menor de ser atrapados en centros oxigenados tras su generación debido a la menor densidad de estos centros. En esta interpretación, el componente de la señal transitoria de tiempos de vida más largos se atribuiría a la migración de las cargas fuera de lugar donde se generaron y atrapamiento de electrones en algún grupo funcional oxigenado que todavía permanece en la estructura de rGO. En apoyo de esta posibilidad se observó que la intensidad de la señal crece tras la adición tanto de metanol (*inhibidor de huecos*) como de oxígeno (*Inhibidor de electrones y de excitones*) (Ver Figura 3.11).

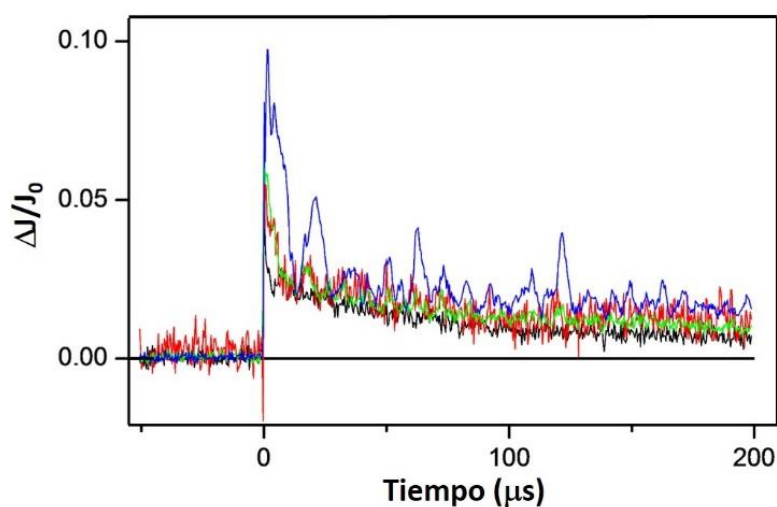


Figura 3.11- Perfil temporal de la cinética de desaparición medida a 420 nm para suspensiones de acetonitril de rGO (0.2 mg/mL) purgada con argón (**negro**) y desactivado con oxígeno (**rojo**), dicloroetano (**verde**) y metanol (**azul**).

Las medidas de tamaño de partícula, tanto por difusión de haz de laser en suspensión como de microscopia de fuerza atómica tras evaporación del disolvente se resumen en las Figuras 3.12 y en la Tabla 3.1. Los valores obtenidos indican que el tiempo de vida del estado de separación de carga para el rGO, el cual varía con el tiempo transcurrido tras la preparación de la muestra y el tratamiento con ultrasonidos se encuentra fuertemente influido por el estado de agregación de las láminas gráficas que se produce debido al inevitable reapilamiento que tiene lugar en las muestras de rGO suspendidas en acetonitrilo tras su preparación.

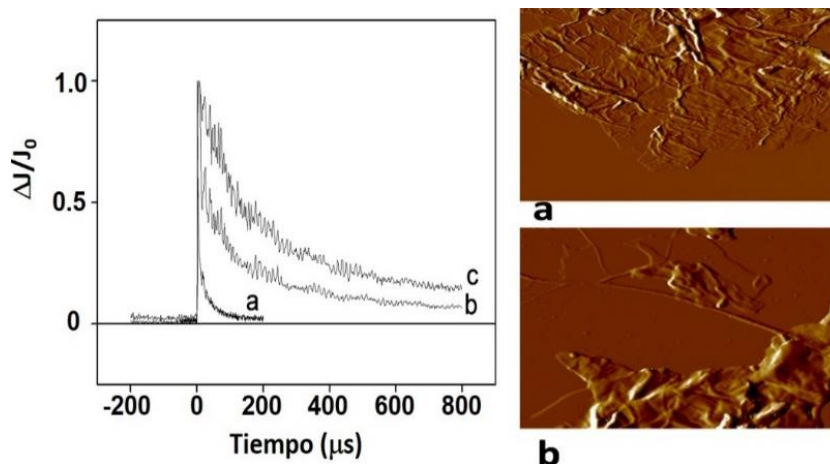


Figura 3.12- Panel izquierdo: perfiles temporales de la señal medida a 420 nm para una suspensión acetonitrilo de rGO (0.2 mg/mL) purgada en argón, tras la sonicación 0 horas, 1 hora después y 2 horas después. Panel derecho: imágenes de AFM de una muestra de rGO presente en una suspensión de acetonitrilo en función del tiempo transcurrido tras su preparación por tratamiento de ultrasonidos. (a) Justo inmediatamente después de la preparación, (b) 2h tras la preparación. El espesor de las láminas de las imágenes a y b son 0.4 y 4 nm respectivamente.

Tabla 3.1- Potencial Z y tamaño de partícula de una suspensión de rGO justo después de su preparación por tratamientos con ultrasonidos (a), 1 h (b) y 2 h (c) de la preparación.

Muestra	Potencial Z (mV)	Distribución de tamaño
a	-37.9 ± 5	214 ± 30
b	-40 ± 5	240 ± 30
c	-38 ± 5	300 ± 20

Así como puede verse en la Figura 3.12 cuando la suspensión en acetonitrilo es sometida a ultrasonidos inmediatamente antes de registrar el perfil temporal de la señal transitoria, el tiempo de vida del estado de separación de cargas es menor que cientos de microsegundos. Sin embargo, cuando las mismas medidas se llevan a cabo transcurrida una hora del tratamiento de ultrasonidos se observa que el tiempo de vida del estado de separación de cargas aumenta al doble o más, atribuyéndose este hecho a la agregación de las láminas. A partir de una hora los cambios en el perfil temporal de la señal transitoria son mucho menores que los que se observan en los primeros

60 min lo que indicaría que la suspensión de rGO está estacionaria en ese intervalo de tiempo. En contraste con el comportamiento de rGO, no se observan cambios en los tiempos de vida del estado de separación de cargas para el GO en función del tiempo transcurrido tras el tratamiento con ultrasonidos (Ver Figura 3.13). Esta falta de influencia del tiempo transcurrido en la preparación de las muestras de GO en la señal transitoria indicaría que el GO no sufre reapilamiento. Esto se debe debido a que su deslaminación es más efectiva dada la enorme cantidad de grupos carboxílicos y grupos polares que poseen las láminas de GO y desde el principio hay mayoritariamente láminas de GO deslaminadas en suspensión. Esta mayor estabilidad de las suspensiones de GO con respecto a rGO, está de acuerdo con la presencia de una elevada densidad de carga negativa en el GO como consecuencia de su alto contenido en grupos funcionales oxigenados, particularmente grupos carboxilatos.

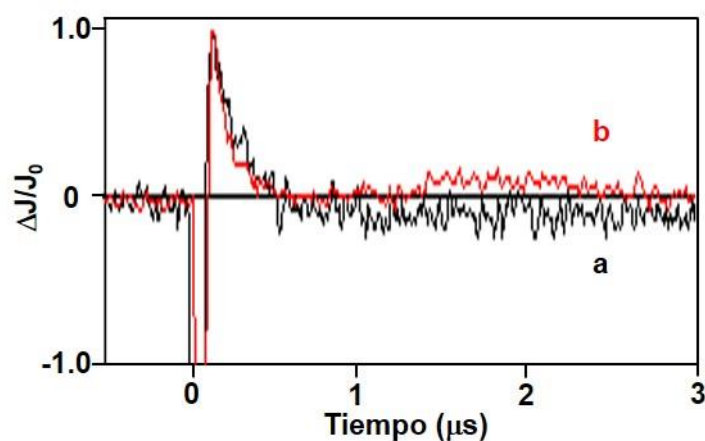


Figura 3.13- Perfil temporal de la cinética de decaimiento medida a 420 nm para suspensiones en acetonitrilo de GO purgadas con argón, en función del tiempo transcurrido desde la sonicación de la muestra: (a) inmediatamente después del tratamiento con ultrasonicar (b) 1 hora después preparar la suspensión.

En general la influencia o no del tiempo de preparación de las muestras en la señal transitoria está de acuerdo con la facilidad de exfoliación y con la estabilidad de las suspensiones para el GO y rGO, este último presentando una mayor tendencia a sufrir un cierto grado de reapilamiento. Debido a esta notable influencia del tiempo transcurrido desde la preparación de las muestras sobre las señales transitorias las medidas que se presentan en este capítulo para el rGO se llevaron a cabo inmediatamente tras la preparación de las suspensiones. A pesar de la precaución en el uso de suspensiones de rGO sometidas a ultrasonidos justo antes de las medidas fotofísicas, el diferente comportamiento frente al apilamiento que presentan las muestras de GO y rGO puede ser una de las razones por las que el comportamiento fotoquímico en la escala de tiempo microsegundos es diferente en las dos muestras, complicando la asignación de las

diferencias en las cinéticas de relajación exclusivamente a la composición química de los de materiales.

Se calcularon valores relativos de rendimientos cuánticos de generación del estado de separación de cargas (Φ_{cs}) para muestras en suspensiones de acetonitrilo de GO y rGO. Tomando como referencia la intensidad de la señal de rGO y usando suspensiones con la misma absorción óptica a la longitud de onda del láser (absorbancia 0.2), se estableció que el valor relativo de Φ_{cs} para el GO es entorno al 10% del valor medido para rGO. Esta estimación se basa en la relación entre las señales $\Delta J/J_0$ respectivas inmediatamente tras el pulso del láser. El valor más elevado de Φ_{cs} para rGO respecto a GO se puede relacionar con la disminución del contenido de oxígeno en la muestra de rGO respecto a GO y el aumento de la movilidad electrónica en la muestra de rGO respecto a GO que favorecen la rápida migración de las cargas. La movilidad de las cargas de rGO debe ser mucho mayor que en GO, puesto que rGO posee una conductividad eléctrica medible, mientras que muestras de GO se comportan como un material aislante sin una conductividad eléctrica apreciable por técnicas convencionales. Esto implicaría que la movilidad de las cargas favorece tiempos de vida del estado de separación de cargas más largos debido a una mayor dificultad en la recombinación y a un mayor éxito en la separación.

A fin de conseguir información sobre el estado de separación de cargas de rGO, se llevaron a cabo experimentos de inhibición de la especie transitoria usando aminos como agentes dador es de electrones o metil viologeno como aceptor de electrones. Desgraciadamente el tiempo de vida de la señal de GO en nuestras condiciones es demasiado, corto como para permitir llevar a cabo estudios similares de inhibición para suspensiones de GO debido a que el tiempo de vida de la señal transitoria está próximo al límite de resolución temporal de nuestro equipo. Se usaron aminos con diferentes valores de potencial redox tales como trietanolamina (TEOA), fenotiacina (PHZ) y N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) a fin de correlacionar la eficiencia de la inhibición con la capacidad donadora de electrones de las mismas. La adición de las aminos causó la inhibición de la señal correspondiendo al estado de separación de cargas para la suspensión de rGO tal como puede observarse en las Figuras 3.14 – 3.16.

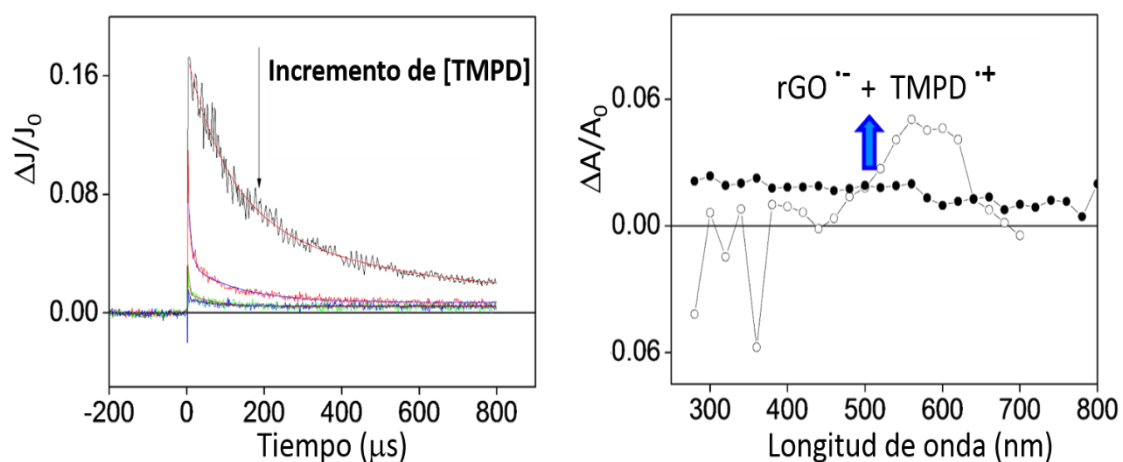


Figura 3.14- Panel izquierdo: perfiles temporales de la señal registrada a 420nm para una suspensión de rGO en acetonitrilo (0.2 mg/mL) purgada con argón (**negro**) y tras la adición de alícuotas de 25 μL de una disolución 0.04 M de TMPD en acetonitrilo (señales coloreadas). Parte izquierda: espectros de absorción obtenidos a 13 μs tras excitación, con un pulso de laser de 355 nm para una suspensión de rGO en acetonitrilo purgada con argón antes (\bullet) y después (\circ) la adición de TMPD (6.7×10^{-4} M).

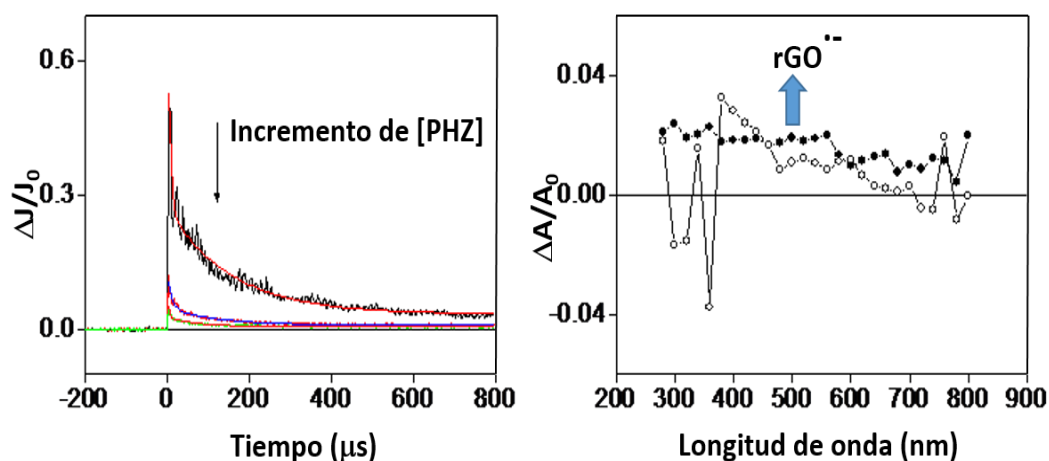


Figura 3.15- Panel izquierdo: perfiles temporales de decaimientos registrados a 420 nm para una suspensión de rGO en acetonitrilo (0.2 mg/mL) purgada con argón (**negra**) y después de las sucesivas adiciones de alícuota 19 μL una disolución de PHZ en acetonitrilo 0.04 M (coloreadas). Panel derecho: espectro de absorción de la especie transitoria medida a 13 μs después de un pulso de laser a 355 nm para una suspensión de rGO en acetonitrilo purgada en argón (\bullet) y después de la adición de 38 μL de PHZ (5×10^{-4} M) (\circ).

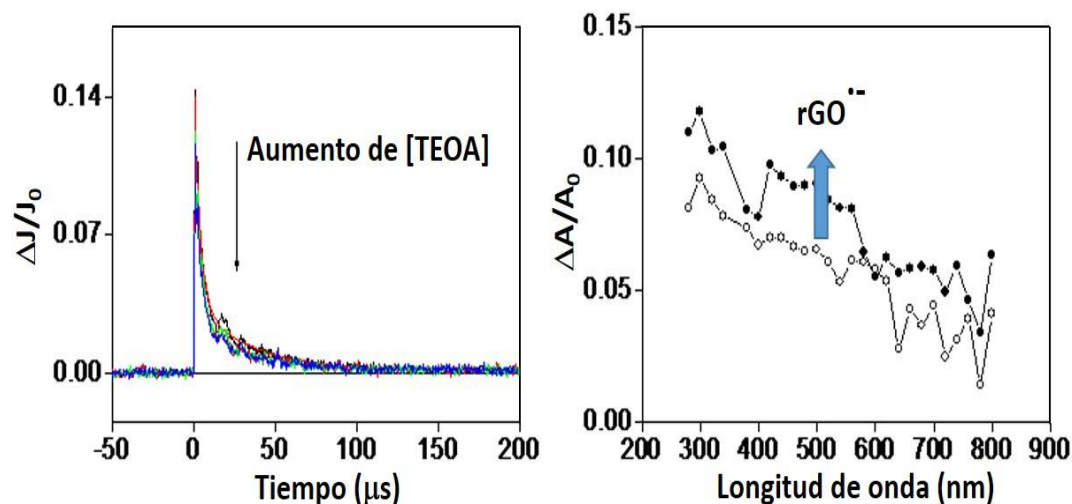
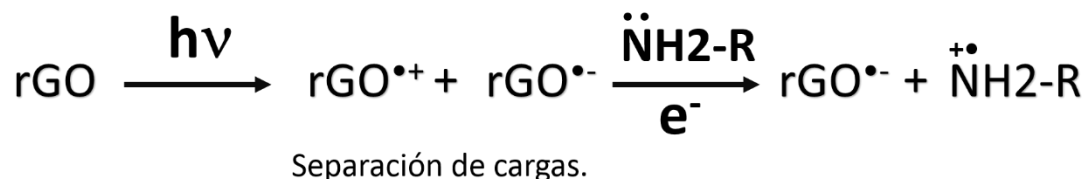


Figura 3.16- Panel izquierdo: cinéticas de desaparición de la señal registrada a 420 nm para una suspensión de rGO en acetonitrilo (0.2 mg/mL) purgada con argón (**negro**) y tras la adición de alícuotas de 10 μL TEOA en acetonitrilo 0.05 M (coloreadas). Panel derecho: espectros de absorción medidas a 13 μs tras excitación con un pulso de láser de 355 nm de una suspensión de rGO en acetonitrilo purgada con argón antes (\bullet) y después (\circ) la adición de 30 μL de TEOA ($5 \cdot 10^{-4}$ M).

Los espectros de absorción transitoria para suspensiones de rGO medidos tras la adición de las aminas mostraron siempre la banda de absorción del anión radical del rGO que aparece alrededor de 520 nm y que había sido descrita anteriormente por Rao et al.[42] En el caso de TMPD se observó la aparición de una banda de absorción intensa a 550 nm y que puede ser atribuible a la formación de $\text{TMPD}^{+\bullet}$ (ver Figura 3.14). En base a esta observación, se propone que tiene lugar un proceso de transferencia electrónica fotoinducida (PET de sus siglas en inglés) donde electrones de la amina son transferidos al rGO en estado excitado causando la inhibición de la aparición de la señal correspondiente al estado de separación de cargas en rGO. Particularmente eliminar la absorción óptica de los huecos positivos del rGO que son los que aparentemente contribuyen más a la señal en la zona espectral medida en los experimentos. Los resultados del estudio de inhibición de las aminas indican claramente que muestras de rGO pueden actuar como aceptores de electrones. Para cuantificar la inhibición del estado de separación de cargas de rGO por diferentes aminas, se calculó la constantes de velocidad de inhibición del proceso PET mediante el gráfico Stern-Volmer correspondiente.[43]

Equación química 3.1- Se describe de forma esquemática la reactividad del estado de separación de cargas de la muestra rGO con los dadores de electrones que son las aminas.



Al aumentar las cantidades de amina añadida como dador de electrones en una suspensión en acetonitrilo de rGO se observó, tras excitación con un pulso de laser a 355 nm, una disminución del tiempo de vida de la señal transitoria medida a 420 nm; la señal desaparecía mucho más rápido, (ver Figuras 3.15 y 3.16) Los valores de τ se ajustan a la ecuación 3.1 donde τ_0 corresponde al tiempo de vida del estado de separación de cargas del rGO en ausencia de aminas, τ es el tiempo de vida de separación de cargas del rGO tras la adición de la concentración [Q] de la amina y k_q es la constante de inhibición del estado de separación de cargas del rGO (ver Figuras 3.17). Los valores calculados de k_q para las tres aminas empleadas se recogen en la Tabla 3.2. Es interesante hacer notar que estos valores k_q son mucho menores que el valor de k_q correspondiente a un proceso controlado por difusión (alrededor de $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Aunque estos valores de k_q aparentes menores de lo esperado podrían reflejar las grandes dimensiones de rGO (mayor que $1 \mu\text{m}^2$) al que corresponderían coeficientes de difusión mucho menores de los habituales para moléculas orgánicas. Un menor coeficiente de difusión limitara igualmente el valor de la constante de inhibición k_q . Se representaron los valores estimados de k_q frente los valores del potencial de oxidación de las aminas (E_{ox}) ver tabla 3.2, obteniéndose el gráfico que se muestra en la Figura 3.18. Como puede verse en esta figura, los valores de k_q disminuye al aumentar los valores de E_{ox} de la amina, un hecho que estaría de acuerdo con la existencia de un mecanismo de inhibición basado en la transferencia electrónica entre la amina y el estado de separación de cargas fotoinducido de rGO.

Ecuación 3.1- Ecuación de Stern-Volmer para el tiempo de vida.[43]

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \cdot \tau_0 [Q]$$

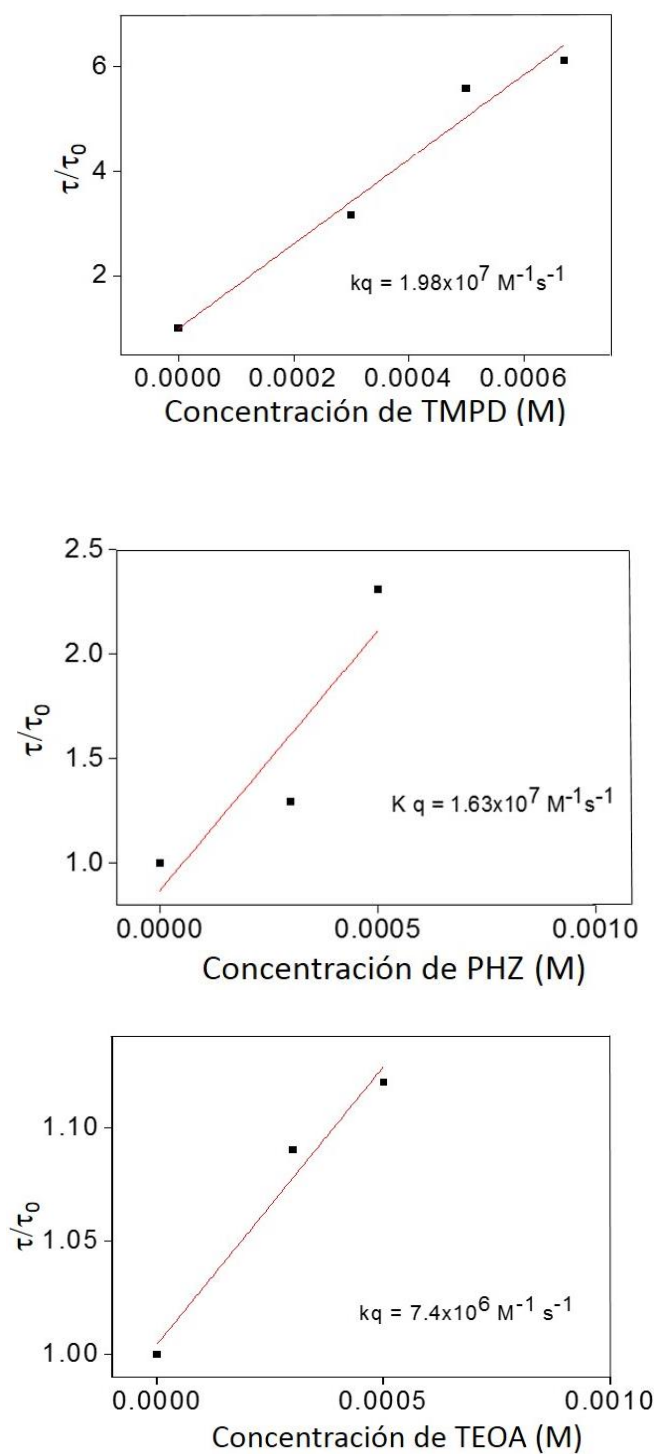


Figura 3.17- Gráficas de Stern-Volmer para calcular el valor de la constante de inhibición, k_q , del estado de separación de cargas fotoinducida para las diferentes aminas estudiadas (de arriba a abajo: **TMPD**, **PHZ** y **TEOA**). El valor de k_q se calcula a partir de dividir la pendiente de la recta obtenida por el tiempo de vida en segundo de la muestra sin amina.

Tabla 3.2- Valores de las constantes de inhibición (k_q) del estado de separación de cargas fotoinducido de rGO por diferentes aminas así como los potenciales de oxidación de las mismas (E_{ox}). ^a[44], ^b[45], ^c[46]

Aminas	k_q ($M^{-1}s^{-1}$)	E_{ox} (V vs NHE)
TEOA	7.40×10^6	1.14 ^a
PHZ	1.63×10^7	0.83 ^b
TMPD	1.98×10^7	0.36 ^c

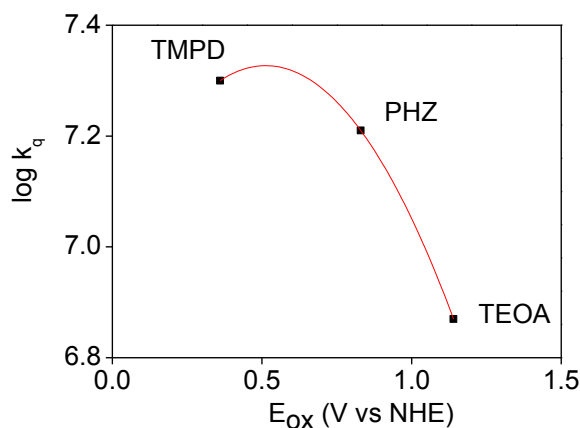
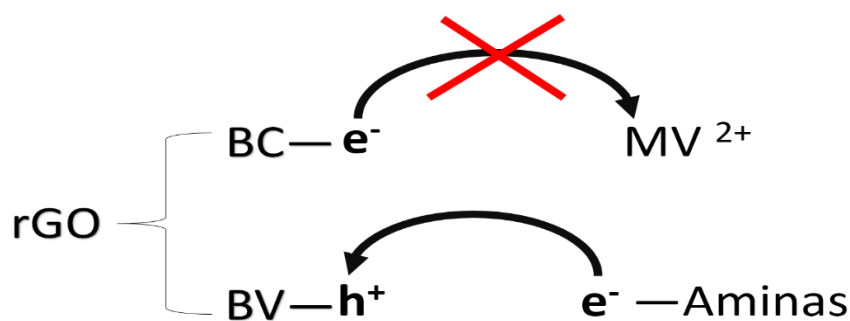


Figura 3.18- Relación entre los valores de E_{ox} de la amina y la velocidad de inhibición del estado de separación de cargas fotoinducido de rGO (k_q). La línea roja corresponde a un ajuste arbitrario de los puntos experimentales.

Sin embargo, cuando se añade el metil viologeno (MV^{2+}) a una suspensión de rGO no se observó inhibición en el estado de separación de cargas del rGO. Más aun, las bandas de absorción características de la especie reducida MV^{+*} catión radical no pudieron ser detectadas. Estos hechos indican que el estado de separación fotoinducido del rGO no es inhibido por MV^{2+} . MV^{2+} es un catión que posee se comporta como especie aceptora de electrones y que posee un potencial redox de -0.45 V frente NHE.[47] Por consiguiente cabe inferir que el potencial del electrón en el estado de separación de cargas fotoinducido del rGO no posee fuerza reductora suficiente para generar el catión radical MV^{+*} . Esta observación esta, sin embargo, de acuerdo con los resultados descritos Kapoor et al,[48] que indican que no existe transferencia electrónica entre MV^{+*} y GO.

Ecuación química 3.2- Esquematiza la reactividad del estado de separación de cargas del rGO. Vemos que el electron promocionado a la banda de conducción (BC) no tiene suficiente potencial para reducir el MV^{2+} en cambio el hueco generado en la separación de cargas si que puede reaccionar con un dador de electrones como son las aminas.



Separación de cargas.

3.3- Conclusiones.

Los estudios de espectroscopia de absorción transitoria en la escala de tiempos de microsegundos para muestras de suspensiones de GO y rGO en acetonitrilo presentados en este capítulo demuestran que los estados de separación de carga fotoinducida alcanzan la escala de tiempo de microsegundos. La comparación del comportamiento de muestras de rGO y GO indican que los tiempos de vida para este estado transitorio en el rGO son más largos y se forman con mayor rendimiento cuántico que en el caso de GO. Se ha observado que los perfiles temporales de desaparición de la señal transitoria y los valores exactos de los tiempos de vida dependen considerablemente del estado de agregación para la muestra de rGO y que esta agregación cambia con el tiempo transcurrido tras la preparación de la muestra, particularmente en los primeros minutos. El estado de separación de cargas es capaz de reaccionar con aminas mediante un mecanismo de transferencia electrónica, habiéndose cuantificado la inhibición mediante los valores de las constantes de inhibición k_q . Estos valores de k_q están en el rango $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y siguen la tendencia esperada en función del potencial redox de la amina. En contraste, los electrones en la banda de conducción de RGO parecen presentar un potencial de reducción inferior 0.45 V frente NHE y son incapaces de migrar a MV^{2+} que es un aceptor de electrones habitual.

3.4- Referencias.

1. Eda, G., G. Fanchini, and M. Chhowalla, *Large-area ultrathin films of reduced graphene oxide as a transparent and flexible electronic material*. Nat. Nanotechnol., 2008. **3**(5): p. 270-274.
2. Loh, K.P., et al., *Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications*. Nat. Chem., 2010. **2**(12): p. 1015-1024.
3. Mackey, P.J., et al. *Graphene-based ultracapacitors for aeronautics applications*. 2014. American Chemical Society.
4. Stoller, M.D., et al., *Graphene-Based Ultracapacitors*. Nano Lett., 2008. **8**(10): p. 3498-3502.
5. Morales-Narvaez, E. and A. Merkoci, *Graphene Oxide as an Optical Biosensing Platform*. Adv. Mater. (Weinheim, Ger.), 2012. **24**(25): p. 3298-3308.
6. Navalon, S., et al., *Carbocatalysis by graphene-based materials*. Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.), 2014. **114**(12): p. 6179-6212.
7. Hummers, W.S. and R.E. Offeman, *PREPARATION OF GRAPHITIC OXIDE*. Journal of the American Chemical Society, 1958. **80**(6): p. 1339-1339.
8. Dikin, D.A., et al., *Preparation and characterization of graphene oxide paper*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 457-460.
9. Zhu, Y.W., et al., *Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications*. Advanced Materials, 2010. **22**(35): p. 3906-3924.
10. Park, S., et al., *Aqueous Suspension and Characterization of Chemically Modified Graphene Sheets*. Chemistry of Materials, 2008. **20**(21): p. 6592-6594.
11. Park, S. and R.S. Ruoff, *Chemical methods for the production of graphenes*. Nature Nanotechnology, 2009. **4**(4): p. 217-224.
12. Stankovich, S., et al., *Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide*. Carbon, 2007. **45**(7): p. 1558-1565.
13. Liu, J.H., et al., *Reduced graphene oxide as capturer of dyes and electrons during photocatalysis: surface wrapping and capture promoted efficiency*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2011. **13**(29): p. 13216-13221.
14. de Miguel, M., M. Alvaro, and H. Garcia, *Graphene as a Quencher of Electronic Excited States of Photochemical Probes*. Langmuir, 2012. **28**(5): p. 2849-2857.
15. Liu, Y. and C.Y. Liu, *Investigation on fluorescence quenching of dyes by graphite oxide and graphene*. Applied Surface Science, 2011. **257**(13): p. 5513-5518.

16. Ramesha, G.K., et al., *Graphene and graphene oxide as effective adsorbents toward anionic and cationic dyes*. Journal of Colloid and Interface Science, 2011. **361**(1): p. 270-277.
17. Sharma, P. and M.R. Das, *Removal of a Cationic Dye from Aqueous Solution Using Graphene Oxide Nanosheets: Investigation of Adsorption Parameters*. Journal of Chemical and Engineering Data, 2013. **58**(1): p. 151-158.
18. Sun, X., et al., *Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery*. Nano Res., 2008. **1**(3): p. 203-212.
19. Luo, Z., et al., *Photoluminescence and band gap modulation in graphene oxide*. Appl. Phys. Lett., 2009. **94**(11): p. 111909/1-111909/3.
20. Cuong, T.V., et al., *Photoluminescence and Raman studies of graphene thin films prepared by reduction of graphene oxide*. Mater. Lett., 2010. **64**(3): p. 399-401.
21. Shukla, S. and S. Saxena, *Spectroscopic investigation of confinement effects on optical properties of graphene oxide*. Appl. Phys. Lett., 2011. **98**(7): p. 073104/1-073104/2.
22. Eda, G., et al., *Blue Photoluminescence from Chemically Derived Graphene Oxide*. Adv. Mater. (Weinheim, Ger.), 2010. **22**(4): p. 505-509.
23. Subrahmanyam, K.S., et al., *Blue light emitting graphene-based materials and their use in generating white light*. Solid State Commun., 2010. **150**(37-38): p. 1774-1777.
24. Xin, G., et al., *Tunable photoluminescence of graphene oxide from near-ultraviolet to blue*. Mater. Lett., 2012. **74**: p. 71-73.
25. Chien, C.-T., et al., *Tunable Photoluminescence from Graphene Oxide*. Angew. Chem., Int. Ed., 2012. **51**(27): p. 6662-6666, S6662/1-S6662/10.
26. Shang, J., et al., *The origin of fluorescence from graphene oxide*. Sci. Rep., 2012. **2**: p. srep00792, 8 pp.
27. Exarhos, A.L., M.E. Turk, and J.M. Kikkawa, *Ultrafast Spectral Migration of Photoluminescence in Graphene Oxide*. Nano Lett., 2013. **13**(2): p. 344-349.
28. Kaniyankandy, S., et al., *Ultrafast Relaxation Dynamics in Graphene Oxide: Evidence of Electron Trapping*. J. Phys. Chem. C, 2011. **115**(39): p. 19110-19116.
29. Liu, Z.-B., et al., *Ultrafast Dynamics and Nonlinear Optical Responses from sp²- and sp³-Hybridized Domains in Graphene Oxide*. J. Phys. Chem. Lett., 2011. **2**(16): p. 1972-1977.
30. Ruzicka, B.A., et al., *Femtosecond pump-probe studies of reduced graphene oxide thin films*. Appl. Phys. Lett., 2010. **96**(17): p. 173106/1-173106/3.
31. Zhao, X., et al., *Ultrafast carrier dynamics and saturable absorption of solution-processable few-layered graphene oxide*. Appl. Phys. Lett., 2011. **98**(12): p. 121905/1-121905/3.

32. Dhakshinamoorthy, A., et al., *Doped Graphene as a Metal-Free Carbocatalyst for the Selective Aerobic Oxidation of Benzylic Hydrocarbons, Cyclooctane and Styrene*. Chem. - Eur. J., 2013. **19**(23): p. 7547-7554.
33. Meng, L.-Y. and S.-J. Park, *Synthesis of Graphene Nanosheets via Thermal Exfoliation of Pretreated Graphite at Low Temperature*. Adv. Mater. Res. (Zuerich, Switz.), 2010. **123-125**(Pt. 2, Multi-Functional Materials and Structures III): p. 787-790.
34. Zangmeister, C.D., *Preparation and Evaluation of Graphite Oxide Reduced at 220°C*. Chem. Mater., 2010. **22**(19): p. 5625-5629.
35. Espinosa, J.C., et al., *Graphenes as Efficient Metal-Free Fenton Catalysts*. Chem. - Eur. J., 2015. **21**(34): p. 11966-11971.
36. Chen, W.-F., L.-F. Yan, and P.R. Bangal, *Chemical Reduction of Graphene Oxide to Graphene by Sulfur-Containing Compounds*. J. Phys. Chem. C, 2010. **114**(47): p. 19885-19890.
37. Saito, R., et al., *Raman spectroscopy of graphene and carbon nanotubes*. Advances in Physics, 2011. **60**(3): p. 413-550.
38. Malard, L.M., et al., *Raman spectroscopy in graphene*. Physics Reports-Review Section of Physics Letters, 2009. **473**(5-6): p. 51-87.
39. Zhang, J., et al., *Transient charge and energy balance in graphene induced by ultrafast photoexcitation*. J. Phys.: Condens. Matter, 2013. **25**(31): p. 314201, 14 pp.
40. Shang, J., et al., *Femtosecond UV-pump/visible-probe measurements of carrier dynamics in stacked graphene films*. Appl. Phys. Lett., 2010. **97**(16): p. 163103/1-163103/3.
41. Atienzar, P., et al., *Preparation of Graphene Quantum Dots from Pyrolyzed Alginate*. Langmuir, 2013. **29**(20): p. 6141-6146.
42. Matte, H.S.S.R., et al., *Quenching of fluorescence of aromatic molecules by graphene due to electron transfer*. Chem. Phys. Lett., 2011. **506**(4-6): p. 260-264.
43. Valeur, B. and Editor, *Molecular Fluorescence - An Introduction: Principles and Applications, 1st Edition 2000*. 2000: Wiley-VCH. 250 pp. (approx.).
44. Ruiz, G., et al., *Bimolecular photoinduced electron transfer in the Marcus inverted region involving the [Re(CO)₃(4-phenylpyridine)₃]⁺ metal-to-ligand charge transfer excited state, amines and their corresponding radical products*. J. Photochem. Photobiol., A, 1997. **107**(1-3): p. 47-54.
45. Barra, M., et al., *Photophysical and photochemical studies of phenothiazine and some derivatives: exploratory studies of novel photosensitizers for photoresist technology*. Chem. Mater., 1991. **3**(4): p. 610-16.

46. Bock, C.R., et al., *Estimation of excited-state redox potentials by electron-transfer quenching. Application of electron-transfer theory to excited-state redox processes.* J. Am. Chem. Soc., 1979. **101**(17): p. 4815-24.
47. Wardman, P., *Reduction potentials of one-electron couples involving free radicals in aqueous solution.* J. Phys. Chem. Ref. Data, 1989. **18**(4): p. 1637-755.
48. Chadha, R., et al., *Interaction of reduced graphene oxide with free radicals and silver clusters.* Chem. Phys. Lett., 2012. **529**: p. 54-58.

Capítulo 4:

Influencia de la cantidad de dopantes en las propiedades fotoelectroquímicas de grafenos co-dopados con N y O.

4.1- Introducción.

Como se ha venido comentando en capítulos anteriores, la introducción de heteroátomos en las láminas de grafeno reemplazando ciertos átomos de carbono (dopaje químico) con elementos tales como nitrógeno,[1] boro [2] o azufre es considerado una estrategia válida para modificar y controlar las propiedades mecánicas, físicas y químicas del grafeno. En particular, el dopaje con nitrógeno puede mejorar las prestaciones del grafeno en aquellas aplicaciones que requieran control de las propiedades de estabilidad, movilidad electrónica y reactividad química.[2-5] Cálculos a nivel *ab initio* han predicho que el grafeno dopado con nitrógeno debe presentar una separación de las bandas de conducción y valencia cuya anchura debería aumentar con el nivel de dopaje con nitrógeno, alcanzando una asíntota para valores en torno al 10 % en peso en contenido de nitrógeno.[2] Es un objetivo del presente capítulo aportar evidencias experimentales que apoyen estas predicciones y establecer cómo las propiedades fotofísicas y

electroquímicas se ven influenciadas por el porcentaje de elementos dopantes, en el caso concreto del presente capítulo, nitrógeno y oxígeno.

Se han descrito en la bibliografía varios métodos para la preparación de grafenos dopados con nitrógeno (*N*)G, entre los que se incluyen deposición de nitrógeno por haz de electrones,[6] arco eléctrico en atmósfera de nitrógeno,[7] y plasma de nitrógeno.[8, 9] Además de nitrógeno molecular se ha empleado amoníaco, hidracina o piridina como fuentes precursores de nitrógeno en estos procesos de dopaje de grafeno.[10]

Tal como se ha comentado en la introducción, nuestro grupo de investigación describió en 2012 [11] un procedimiento nuevo y conveniente para la preparación de grafeno co-dopado con nitrógeno y oxígeno basado en la pirólisis de muestras de quitosano a temperaturas entre 800 y 1000 °C en ausencia de oxígeno. El procedimiento sirve tanto para la preparación de suspensiones de (*N,O*)G en agua o disolventes orgánicos, como para la preparación de películas de una, pocas o muchas capas de grafeno en soportes arbitrarios que puedan someterse a temperaturas de pirólisis. Como se ha comentado, una de las principales ventajas del proceso es utilizar un desecho de biomasa como precursor de simultáneamente carbono y nitrógeno para formar (N)G, pudiendo controlar el contenido de nitrógeno por debajo del valor máximo en torno al 7 % variando la temperatura de pirólisis. A medida que la temperatura y severidad de la pirólisis aumenta el contenido de nitrógeno del grafeno disminuye.

Así en el presente capítulo, empleando este método pirolítico se han preparado una serie de muestras donde el contenido de nitrógeno (N) y oxígeno (O) varía por debajo de los valores límites, estudiando a continuación las propiedades fotofísicas y electroquímicas de estos materiales a fin de determinar la influencia del contenido de elementos dopantes nitrógeno/oxígeno en las propiedades fotofísicas y electroquímicas.

4.2-Resultados y discusión.

Las muestras de (N,O)G del presente estudio se obtuvieron por pirólisis de muestras comerciales de quitosano sometidas a temperaturas entre 800 y 1200 °C. La lista de las muestras preparadas, las temperaturas de tratamiento y los datos analíticos más relevantes se resumen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1.- Lista de las muestras (N,O)G preparadas en el presente estudio indicando las temperaturas de preparación y los contenidos de nitrógeno y oxígeno.

Muestra	T (°C) ^a	Porcentaje elemental (%) ^d		Porcentaje del tipo de Nitrogeno (%)			
		N	O	Piridínico ^c	Pirrólico ^c	Grafitico ^c	N-O ^c
(N,O 1, 9%)-G	1200	1.4	9	36	-	34.4	29.6
(N,O 5, 13%)-G	1000	5	13	33.1	10.6	42.8	13.5
(N,O 7, 15%)-G	900	7	15	17.1	33	41.8	8
(N,O 1, 8%)-G-film ^e	1200	1	8 ^d	40	60	-	-
(N,O 1.5, 9.5%)-G-film ^e	1100	1.5	9.5 ^d	29	71	-	-
(N,O 2, 10.5%)-G-film ^e	900	2	10.5 ^d	21	79	-	-
(N,O 4.7, 12.5%)-G-film ^e	800	4.7	12.5 ^d	38	-	-	-

^a Temperaturas de pirólisis. ^b Contenido de nitrógeno y oxígeno determinados por análisis elemental. ^c Porcentaje de nitrógeno piridínico, pirrólico, grafitico o cuaternario y oxidado. ^d Contenido de nitrógeno determinado por XPS. ^e Muestras preparadas como películas sobre sustratos de cuarzo. Notar que las diferentes condiciones de pirólisis dan lugar a contenidos de nitrógeno y oxígeno menores cuando las muestras se preparan como película respecto a las muestras preparadas como polvo.

Como se ha indicado en la introducción de este capítulo nuestro propósito es conseguir datos experimentales que muestren como el dopaje con nitrógeno y oxígeno altera el potencial de banda plana y las propiedades fotofísicas del grafeno. El control de las propiedades electrónicas del grafeno que se conseguía variando el contenido en agente dopante podría tener relevancia desde el punto de vista de la aplicación de estos materiales como fotocatalizadores. Si fuera posible adaptar la anchura de banda al espectro de radiaciones solares. La variación de las propiedades electrónicas mediante dopaje tendría también interés en el desarrollo de materiales semiconductores para dispositivos optoelectrónicos con eficiencias de separación de cargas mayores y tiempos de vida más largos que los actuales.

Las muestras de (N,O)G del presente capítulo se prepararon por acondicionamiento del quitosano a 200 °C durante 2 h en atmósfera con flujo de argón seguido de tratamiento térmico en un rango de temperaturas entre 800 y 1200 °C. Los contenidos de C y N en las muestras de (N,O)G resultantes se determinaron por análisis elemental de combustión, mientras que el contenido de oxígeno se calculó por diferencia de la suma de estos valores a 100. Además la espectroscopia XPS proporciona una confirmación adicional de estos valores determinado por análisis elemental de combustión. La Tabla 4.1 resume los datos analíticos del contenido de nitrógeno y oxígeno observándose que, como era de esperar, estos porcentajes disminuyen a medida que aumenta la temperatura de pirólisis. Esta tendencia del porcentaje de elementos dopantes con la temperatura de pirolisis está de acuerdo con la bibliografía[10, 11] e indican que la muestra (N,O)G sufre una gradual mejora con reducción de defectos a medida que la temperatura de pirólisis aumenta. Conviene, sin embargo, indicar en la estructura que incluso la muestra de (N,O)G sometida a 1200 °C contiene un porcentaje residual de N y O. Este comportamiento del quitosano en la

pirólisis contrasta con el de otros compuestos conteniendo nitrógeno tales como proteínas que provienen del destilado de granos de cereales, las cuales cuando se usan como precursores de (N)G y se tratan a temperaturas superiores a 900 °C sufren la completa eliminación de nitrógeno.[10]

Conviene también indicar que dada la naturaleza del proceso de preparación de las muestras de grafeno a partir de quitosano, la presencia simultáneamente de N y O es inevitable, aunque ambos elementos varían en el mismo sentido al aumentar la temperatura de pirólisis. La técnica de XPS proporciona datos relevantes respecto a la naturaleza de los tipos de carbono y la presencia de nitrógeno y oxígeno en las muestras de grafeno tras la carbonización del quitosano. Las Figuras 4.1 y 4.2 presentan algunos de los picos de XPS medidos para estas muestras.

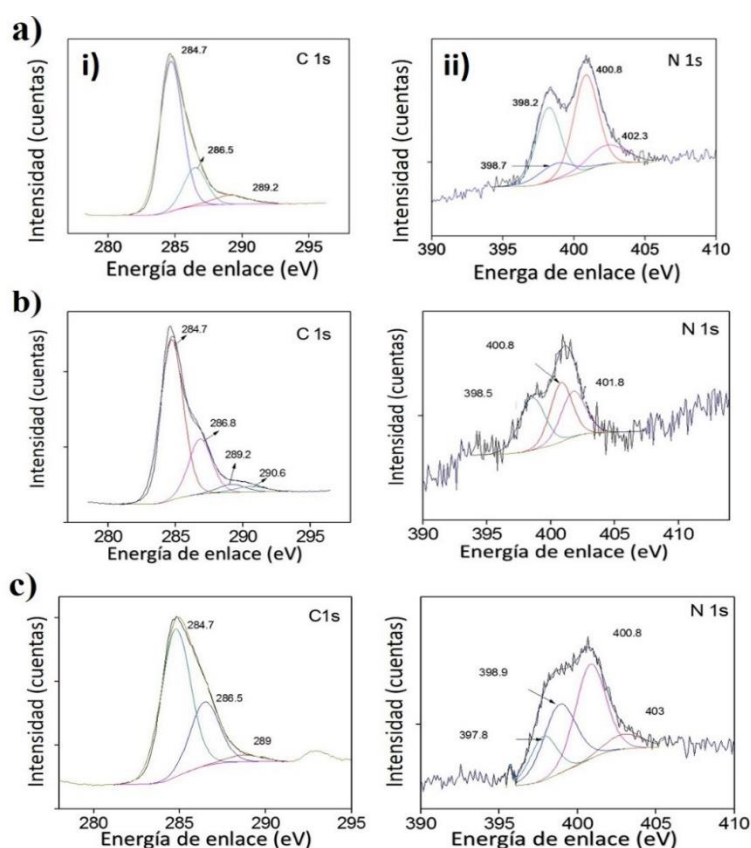


Figura 4.1- Picos experimentales para C 1s (i) y N 1s (ii), y la mejor descomposición en componentes individuales registrados en el espectro XPS para la muestra (a) (N,O;5,13%)G, (b) (N,O 1,9%)G y (c) (N,O 7,15%)G.

El pico de XPS correspondiente a la señal C1s puede ser descompuesto en cuatro o tres componentes, dependiendo de la muestra de (N,O)G en particular. Todas las muestras de (N,O)G [(N,O;7,15 %)G, (N,O;5,13 %)G (N,O;1,9%)G; donde (N,O;X,Y%)G representa (N,O)G co-dopado por X % de N e Y% de O] presentan un pico a 284,7 eV, el cual es atribuible al sp^2

grafítico (284-285 eV de acuerdo con la bibliografía [12]), y alrededor de 286 eV el cual se puede atribuir a C sp² enlazado a N (285-287 eV de acuerdo con la referencia[12]), confirmándose de esta manera que la muestra contiene nitrógeno como elemento dopante. Los otros picos a 289 y 290 eV se atribuyen a C sp² enlazados a O.(16) Por otra parte, el pico N 1s se detecta en todas las muestras (N,O)G. Este pico N 1s puede ser descompuesto en varios componentes dependiendo de la muestra con valores de energía de enlace de 398.2, 398.7, 400.8 y 402 eV que corresponden a átomos de nitrógeno del tipo piridínico, pirrólico, grafítico y oxidado respectivamente, de acuerdo con los datos de la bibliografía.[13] Todas las muestras tienen estos tipos de nitrógeno, pero difieren notablemente en su proporción relativa que en cada muestra es diferente. La Tabla 4.1 contiene también el porcentaje de los diferentes tipos de nitrógeno para cada muestra de (N,O)G de acuerdo con las medidas XPS. Estos datos sobre los diferentes porcentajes de las distintas familias de grupos funcionales de nitrógeno serán relevantes al intentar racionalizar los experimentos de destello láser y la inhibición de la señal por compuestos dadores y aceptores de electrones. Para muestras preparadas en forma de polvo, el contenido total de nitrógeno determinado por XPS está de acuerdo con los datos obtenidos por análisis elemental de combustión. Sin embargo para muestras preparadas como películas sobre sustratos de cuarzo el contenido de nitrógeno sólo se pudo determinar mediante medidas de XPS, debido a que no es posible introducir estos materiales rígidos en la cámara de análisis de combustión.

La morfología y estructura microscópica de las muestras (N,O)G se determinó mediante técnicas de microscopia. La Figura 4.3 presenta imágenes de la muestra (N,O)G donde se puede observar la morfología del grafeno, sus dimensiones y la presencia de arrugas en las láminas que son hechos distintivos comunes a los grafenos constituidos por unas pocas láminas. Los espectros de Raman de las muestras (N,O)G presentaron en todos los casos las bandas características para estos materiales, a saber, la banda tipo G a 1590 cm⁻¹ y la banda tipo D que se registró 1360 cm⁻¹. [14, 15] La Figura 4.4 presenta un espectro característico para este tipo de muestras (N,O)G. La relación de intensidades de la banda G respecto la banda D (I_G/I_D) fue de 1.9 para las tres muestras. [(N,O;7,15 %)G, (N,O;5,13 %)G (N,O;1,9%)G]. Este valor de I_G y I_D es comparativamente mayor que el encontrado para otros grafenos análogos descritos en la bibliografía para otras muestras (I_G/I_D para (N,O)G descritos en la bibliografía esta en torno a 0.87) [15] lo que demostraría que las muestras (N,O)G preparadas en el presente capítulo tienen un menor porcentaje de defectos, que otras análogas ya estudiadas. Conviene recordar que de acuerdo con los valores I_G/I_D todas las muestras tendrían la misma naturaleza gráfica y la misma cantidad de defectos independientemente de su contenido de N y O. La relación I_G/I_D prácticamente constante para todas las muestras preparadas en el presente capítulo demostraría que las variaciones del contenido de elementos dopantes en el rango de proporciones estudiado en el presente capítulo tiene una influencia pequeña en la calidad de las láminas de grafeno. Esta

comparación es útil en aquellos casos en la que la cantidad de defectos es dominada por la periferia de las láminas de grafeno. La baja intensidad de la banda 2D podría ser debida a la presencia de N y O como agentes dopantes en la lámina de grafeno.

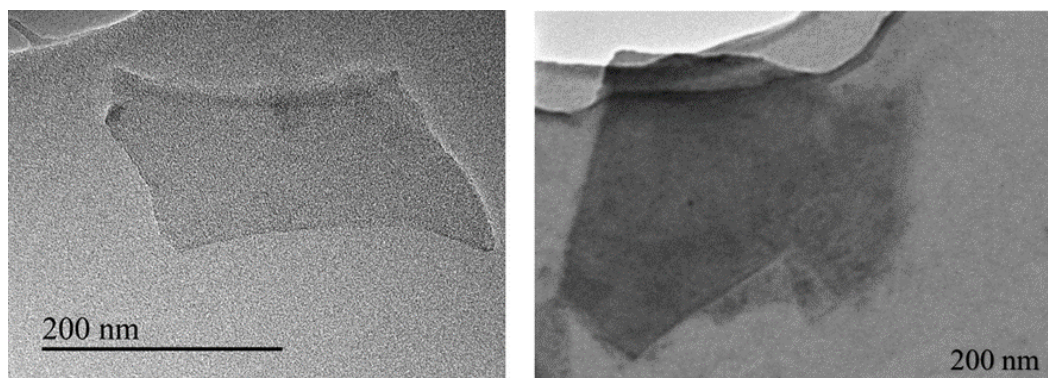


Figura 4.3- Imágenes de microscopia electrónica de transmisión de la muestra (N,O 5, 13%)G.

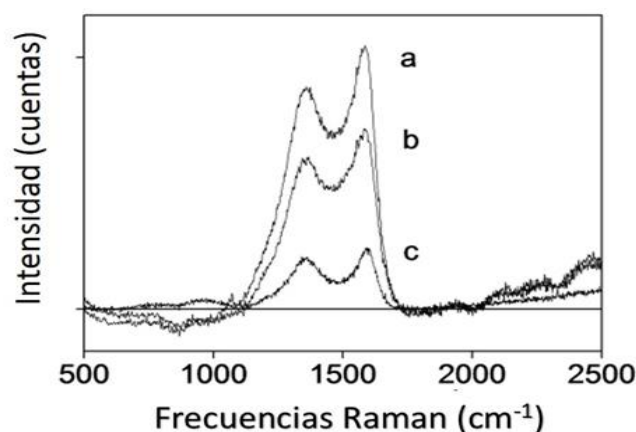


Figura 4.4- Espectros de Raman de muestras (N,O)G con diferente contenidos de N y O: (a) (N,O;7,15%)G, (b) (N,O;5,13%)G y (c) (N,O1,9%)G.

4.2.1- Medidas electroquímicas.

El potencial de banda plana (E_{fb} de las siglas en inglés para flat-band) para la serie de películas de (N,O)G de diferentes valores de contenido en N y O fueron medidas variando el voltaje de polarización desde 0.5 y 0 V. Conviene indicar que estas medidas electroquímicas sólo se pueden realizar para las muestras de películas de (N,O)G y no en muestras en suspensión o en forma de polvo. Antes de medir las películas de (N,O)G fueron activadas a 110 °C durante una 1 h a fin de eliminar o reducir, antes de llevar a cabo la medida, la cantidad de agua que permanece

absorbido. Estudios previos por espectroscopia de infrarrojo (IR) revelan que este tratamiento es suficiente para llevar a cabo la completa eliminación del agua, como lo demuestra la ausencia de absorción detectable alrededor de 3500 cm^{-1} correspondiente a las posibles bandas de vibración OH debida al agua.[11]

Los valores de potencial de banda plana (E_{fb}) se obtuvieron por irradiación con luz monocromática en el máximo de absorción para cada muestra de película de (N,O)G (alrededor de 300 nm). La Figura 4.5 muestra la variación de E_{fb} frente al porcentaje de N para las diferentes películas de (N,O)G. Conviene indicar que el porcentaje de dopaje de N y O siguen las mismas tendencias en las muestras de (N,O)G objeto de estudio y por tanto se obtendría un gráfico análogo si se representara E_{fb} frente al contenido de O. Se observa en la Figura 4.5 que los valores de E_{fb} aumentan con el porcentaje de N y O, aproximándose a una asíntota para contenidos de agente dopante elevados. El valor de E_{fb} está directamente relacionado con la posición de la banda de valencia del material. Cálculos teóricos del nivel Fermi teórico por la teoría de densidad funcional (DFT), predicen este tipo de comportamiento para la energía de la banda de valencia de modelos de grafenos dopados con N.[2] Cálculos ab-initio predicen que las propiedades electrónicas de la lámina de grafeno dependen de la simetría y localización de los átomos del elemento dopante y estos parámetros determinan la posición de las bandas en el grafeno. El ancho de banda debe ser mayor cuando los átomos dopantes están colocados en idénticas posiciones en el modelo que simulan la lámina de grafeno. Este hecho es debido al reforzamiento de la ruptura de la simetría del grafeno ideal cuando el agente dopante se encuentra distribuido de forma regular sobre la lámina. Los cálculos teóricos predicen que el ancho de banda debería aumentar con el contenido de nitrógeno alcanzándose una asíntota para valores elevados entorno al 10 %.[1, 2, 16]

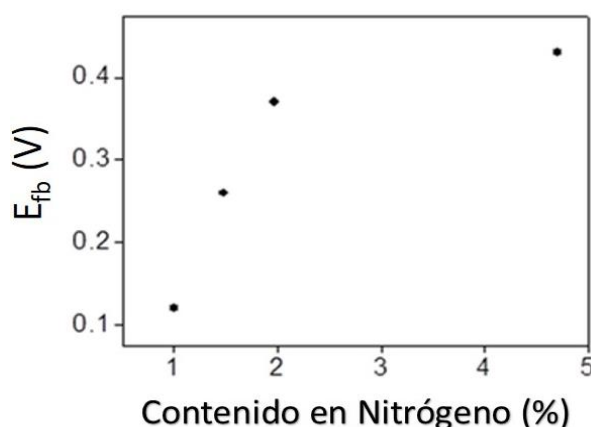


Figura 4.5- Valores de potenciales de banda plana (E_{fb}) medidos experimentalmente para la serie de películas de (N,O)G frente al contenido de N determinado por XPS.

Los espectros de absorción transitoria en la escala de tiempos de microsegundos (μs) fueron medidos en disoluciones de acetonitrilo de las muestras (N,O;1,9%)G, (N,O;5,13%)G y (N,O;7,15%)G tras ser excitadas con un pulso láser de longitud de onda 355 nm. Espectros transitorios representativos se muestran en la Figura 4.6. Para todas las muestras el espectro de absorción transitoria está dominado por una banda de absorción continua que cubre por completo el rango de longitudes de onda desde 300 a 800 nm. Todas las señales transitorias registradas a diferentes longitudes de onda mostraron perfiles temporales coincidentes (ver Figura 4.6). Este hecho indicaría que el continuo de absorción tiene una distribución homogénea de las mismas especies transitorias o que se trata de una única especie. En base a los precedentes descritos en la bibliografía se asignó esta absorción transitoria continua al estado de separación de cargas, observándose para cada longitud de onda una contribución a la absorción tanto de electrones deslocalizados como huecos positivos en la banda de valencia.[17, 18]

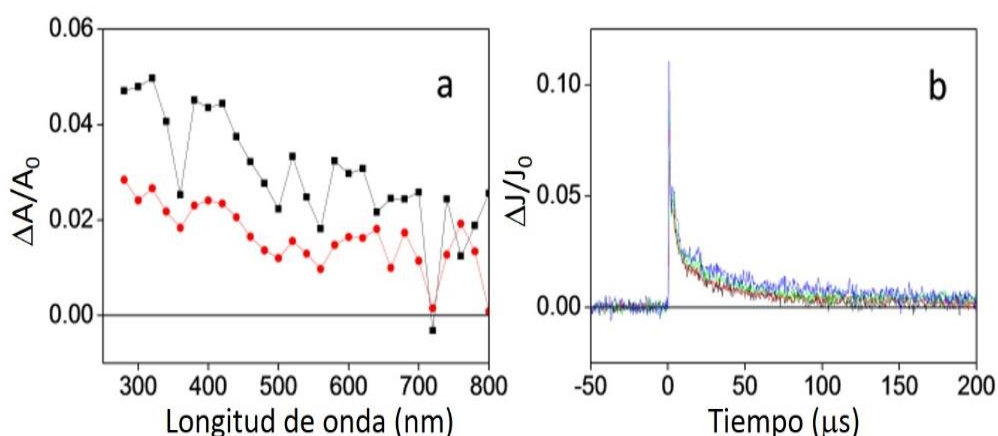


Figura 4.6- (a) Espectros de absorción transitoria registradas a 4 (■) y 10 (●) μs después de excitar con un pulso de láser de 355 nm y (b) perfil temporal de desaparición de la señal transitoria medida a 320 (negro), 420 (rojo), 520 (verde) y 630 (azul) nm para una suspensión de (N,O 5, 13%)G en acetonitrilo purgada con flujo de argón 5 min antes de medir.

La Figura 4.7 muestra el perfil temporal de la señal medida a 420 nm para la serie de suspensiones en acetonitrilo de las muestras (N,O)G preparadas de manera que presentan el mismo valor de absorbancia a 355 nm. Los rendimientos cuánticos relativos de generación fotoquímica del estado de separación de cargas (Φ_{SC}) se resumen en la Tabla 4.2. Los valores de Φ_{SC} fueron determinados a partir de la relación entre la intensidad de absorción para cada muestra medida inmediatamente tras el pulso del láser, siendo los valores más altos de absorción los medidos para la muestra (N,O;5,13%)G los cuales se consideran de forma arbitraria como 100 % de rendimiento.

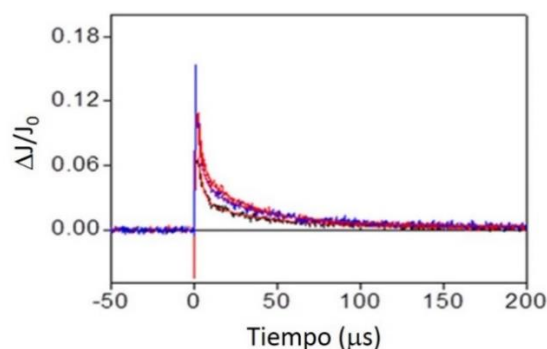


Figura 4.7- Perfil temporal de desaparición la señal monitorizadas a 420 nm para suspensiones en acetonitrilo purgadas en argón con la misma absorbancia a 355 nm de las muestras: (N,O 1, 9%)G (**negro**), (N,O 5, 13%)G (**rojo**) y (N,O 7, 15%)G (**azul**).

Los tiempos de vida del estado de separación de cargas se estimaron a partir del ajuste del perfil temporal de la señal registrado 420 nm a una cinética de primer orden. Estos valores de tiempos de vida también están recogidos en la Tabla 4.2. Como puede verse en esa Tabla, los porcentajes de N y O para las muestras (N,O)G influyen tanto en los tiempos de vida de separación de carga como en los valores de Φ_{SC} relativos, pero de una forma diferente. Cuando el porcentaje de N y O aumenta, el valor de Φ_{SC} alcanza un máximo, mientras el tiempo de vida del estado de separación de cargas sufre una disminución notable por encima del 1 y el 9 % de contenido en N y O, respectivamente. Podría ser que los agente dopantes estén relacionado con los centros donde se originan la separación de cargas así como que estos heteroátomos intervengan en procesos de recombinación.

Tabla 2- Eficiencia cuántica relativa de la separación de cargas (Φ_{sc}) y el componente de tiempo de vida largo del estado de separación de cargas o del estado excitado para serie de muestras (N,O)G suspendido en acetonitrilo.

Muestras	$\Phi_{s.c.}$ (%)	τ (μ S)
(N,O 1, 9%)-G	61	43.1
(N,O 5, 13%)-G	100	34.4
(N,O 7, 15%)-G	92	35.5

La Figura 4.8 muestra un gráfico de los valores de Φ_{SC} relativos y tiempos de vida del estado de separación de cargas frente al porcentaje de nitrógeno y un gráfico similar se obtendría si los mismos valores Φ_{SC} y tiempos de vida se representaran frente al porcentaje de oxígeno. La comparación de estos gráficos con el que representa los valores de E_{th} frente al porcentaje de nitrógeno (ver Figura 4.5) parece llevar a la conclusión que ambos parámetros siguen una tendencia similar frente al dopaje con heteroátomos. En contraste, los tiempos de vida del estado de separación de cargas disminuyen a medida que aumenta el porcentaje de con nitrógeno en el rango estudiado. De estos resultados se puede concluir que las medidas de las propiedades

fotofísicas son útiles para conocer y racionalizar el comportamiento como semiconductores como semiconductor de grafenos dopados con heteroátomos, en el caso que nos ocupa, nitrógeno y oxígeno.

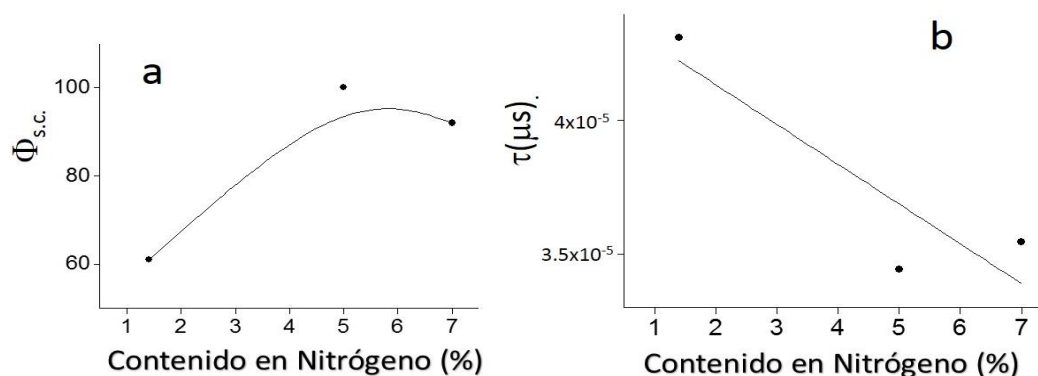


Figura 4.9- (a) Comparación de la eficiencia cuántica relativa de separación de cargas (Φ_{sc}) dependiendo del porcentaje de nitrógeno y (b) Tiempo de vida de la separación de cargas en escala de microsegundos (μs) dependiendo del porcentaje de nitrógeno para las muestras de (N,O)G en suspensión de acetonitrilo purgadas con argón tras ser excitadas con un pulso de laser a 355 nm.

A fin de obtener alguna información sobre la reactividad del estado de separación de cargas, se llevaron a cabo experimentos para determinar la influencia en el perfil temporal de la señal transitoria de la presencia de oxígeno y metanol que son conocidos inhibidores de electrones (e^-) y huecos positivos (h^+) respectivamente. La Figura 4.9 muestra la variación de los perfiles temporales de la señal en la escala de tiempo de microsegundos cuando la irradiación se lleva a cabo en presencia de estas especies inhibidoras.

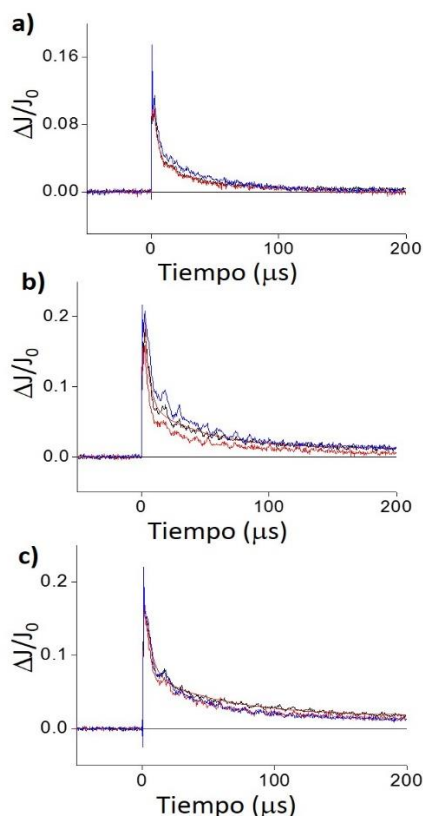
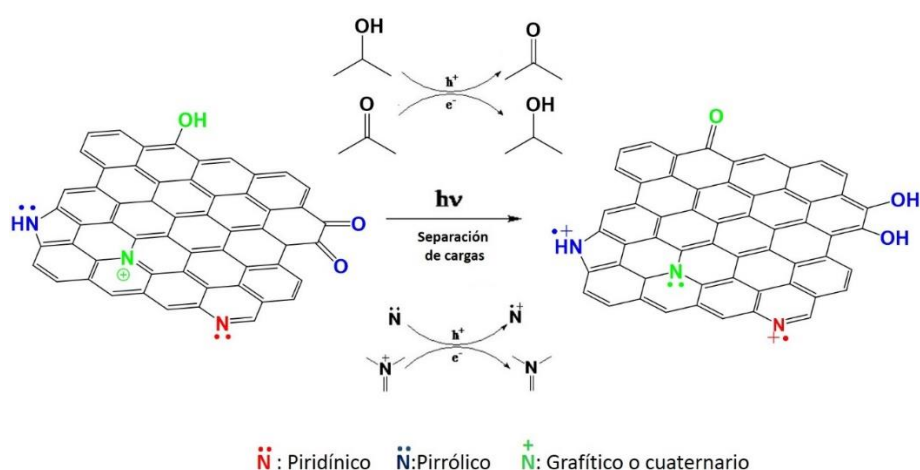


Figura 4.8- Perfil temporal de la señal de desaparición medidas monitorizada a 420 nm para suspensiones en acetonitrilo de las muestras (a) (N,O 1, 9%)G, (b) (N,O 5, 13%)G and (c) (N,O 7, 15%)G purgados con argón (**negro**) o en presencia de oxígeno (**rojo**) y metanol (**azul**) como inhibidores de electrones y huecos, respectivamente.

Se observó que para la muestra (N,O;1,9%)G la presencia de oxígeno no influye en la señal, mientras que en contraste, la presencia de metanol aumenta tanto la intensidad de la señal transitoria como su tiempo de vida. Por otra parte para la muestra (N,O;5,13%)G la presencia de oxígeno inhibe la señal transitoria mientras que la adición de metanol aumenta la intensidad y el tiempo de vida de esta señal. Estos datos sugieren que la especie transitoria responsable principal de la absorción observada son los e^- situados en la banda de conducción. Para la muestra (N,O;7,15%)G tanto la presencia de oxígeno y como de metanol disminuyen el tiempo de vida de la señal transitoria.

La racionalización de un comportamiento de inhibición del estado de separación de cargas diferente para cada muestra en función del contenido de agente dopante no es obvia ni simple, puesto que como se acaba de indicar cada una de las tres muestras estudiadas exhibe un comportamiento específico. Una propuesta que permitiría justificar un comportamiento diferente del estado de separación de cargas en cada una de las muestras de (N,O)G se basa en considerar la diferente distribución del agente dopante en familias que corresponden a grupos funcionales distintos. Así, como se ha comentado anteriormente, de acuerdo con los datos de XPS, los átomos de nitrógeno se distribuyen en diferentes grupos funcionales que se pueden denotar como

piridínicos, pirrólicos, grafíticos y N-óxidos. Entonces podría ocurrir que el comportamiento de cada uno de estos tipos de nitrógeno en el estado de separación de cargas fuera diferente. Así, parece razonable proponer que los átomos de nitrógeno piridínicos y pirrólicos que poseen un par de electrones sobre el átomo de nitrógeno se comportan como buenos dadores de electrones y actúan como centros donde se pueden localizar los huecos positivos. En contraste, los átomos de nitrógenos grafíticos o cuaternarios que poseen carga positiva y no poseen electrones solitarios, serían centros adecuados para atrapar electrones de la banda de conducción. Por consiguiente según aumentase o disminuyese la proporción relativa de uno u otro tipo de centro, todos ellos correspondiendo a átomos de nitrógeno, se estaría aumentando o disminuyendo los centros donde se generan o se atrapan de electrones, respectivamente. De igual manera los átomos de oxígeno formando parte de grupos carboxílicos o subestructuras análogas a la hidroquinona actuarían como centros dadores de electrones, mientras que subestructuras de tipo quinona o grupos carbonilos actuarían como grupos atrapadores de electrones. De esta manera también los átomos de oxígeno podrían presentar un comportamiento dual como atrapadores de electrones o huecos según el grupo funcional. El esquema 4.1 ilustra nuestra propuesta sobre el comportamiento dual que los elementos dopantes pueden ejercer en el proceso de separación de cargas que tiene lugar tras la excitación fotoquímica y que dependen de la naturaleza del grupo funcional en el que se encuentra formando parte los átomos de nitrógeno y oxígeno. De acuerdo con esta propuesta, los valores de Φ_{SC} relativos se correlacionarían mejor con la población de átomos de nitrógeno grafítico, la cual aumenta para (N,O;1,9%)G y es similar para las muestras (N,O;5,13%)G y (N,O;7,15%)G. Por otra parte los tiempos de vida del estado de separación de cargas disminuirían a medida que aumenta el porcentaje de átomos de nitrógeno grafíticos que soportan carga positiva.



Esquema 4.1- Propuesta para racionalizar la influencia de los elementos dopantes en las propiedades fotofísicas basados en la estructura de grafeno conteniendo diferentes familias de átomos dopantes según el grupo funcional. El esquema indica también como según el grupo funcional un mismo heteroátomo puede participar en procesos de separación de cargas fotoinducida dando o aceptando electrones.

4.3- Conclusiones.

En el presente capítulo se han preparado una serie de muestras de grafeno dopado con N y O en diferentes proporciones que fueron obtenidas variando las condiciones de pirólisis del quitosano.

Se encontró que el porcentaje de dopaje ejerce una influencia sobre las propiedades fotofísicas y fotoelectroquímicas del grafeno modificando los potenciales de banda plana y los rendimientos cuánticos de separación de cargas. Se ha establecido que ambos parámetros aumentan a medida que aumentan los porcentajes de nitrógeno en (N,O)G. En contraste los tiempos de vida del estado de separación de cargas sigue la tendencia inversa.

Se ha determinado que de acuerdo con los cálculos teóricos existentes el contenido de N y O influye en la energía de banda plana para la banda de valencia del grafeno como semiconductor y además en los rendimientos cuánticos relativos de generación del estado de separación de cargas (Φ_{SC}) y en los tiempos de vida de estos estados de separación de carga (τ) observados en la escala de microsegundos. El comportamiento de agentes inhibidores se ve influido por el contenido de agente dopante y por la distribución de estos heteroátomos entre grupos funcionales diferentes que poseen comportamiento opuesto como aceptores o dadores de electrones.

De esta manera los estudios llevados a cabo en este capítulo proporcionan evidencia experimental sobre la influencia que el porcentaje de agente dopante y su localización en la lámina de grafeno ejercen sobre el comportamiento semiconductor de estos materiales, y que están acuerdo con los cálculos teóricos. La distribución de elementos dopantes también influye en las propiedades fotofísicas del grafeno dopado y este hecho se refleja en el comportamiento fotocatalítico del material. Así se ha descrito recientemente que (N)G posee una notable eficiencia para la generación fotocatalítica de hidrógeno en mezclas metanol/agua irradiadas con luz UV-Vis.[19] Para una de estas muestras (N)G obtenida por pirólisis del quitosano a 900 °C el número de ciclos en la generación de hidrógeno fue de 12.5 considerando que todos los átomos de nitrógeno en el material actúan de igual manera como centros catalíticos.[19] El conocimiento adquirido en el presente capítulo indica que no todos los heteroátomos presentes en el grafeno actúan igual sino que a veces podrían tener comportamientos opuestos. El conocimiento detallado del comportamiento de los elementos dopantes en función de su distribución en diferentes grupos funcionales podría llevar a la preparación en un futuro de materiales basados en grafeno dopado optimizados para su uso en dispositivos optoelectrónicos y como fotocatalizadores más eficientes.

4.4- Referencias.

1. Geng, D., et al., *Nitrogen doping effects on the structure of graphene*. Appl. Surf. Sci., 2011. **257**(21): p. 9193-9198.
2. Rani, P. and V.K. Jindal, *Designing band gap of graphene by B and N dopant atoms*. RSC Adv., 2013. **3**(3): p. 802-812.
3. Cao, H., et al., *Low-temperature preparation of nitrogen-doped graphene for supercapacitors*. Carbon, 2013. **56**: p. 218-223.
4. Mehrali, M., et al., *Preparation, characterization, viscosity, and thermal conductivity of nitrogen-doped graphene aqueous nanofluids*. J. Mater. Sci., 2014. **49**(20): p. 7156-7171.
5. Jeong, H.M., et al., *Nitrogen-doped graphene for high-performance ultracapacitors and the importance of nitrogen-doped sites at basal planes*. Nano Lett., 2011. **11**(6): p. 2472-2477.
6. Zhang, C., et al., *Synthesis of nitrogen-doped graphene using embedded carbon and nitrogen sources*. Adv. Mater. (Weinheim, Ger.), 2011. **23**(8): p. 1020-1024.
7. Li, N., et al., *Large scale synthesis of N-doped multi-layered graphene sheets by simple arc-discharge method*. Carbon, 2009. **48**(1): p. 255-259.
8. Moon, J., et al., *One-Step Synthesis of N-doped Graphene Quantum Sheets from Monolayer Graphene by Nitrogen Plasma*. Adv. Mater. (Weinheim, Ger.), 2014. **26**(21): p. 3501-3505.
9. Park, S.H., et al., *High concentration of nitrogen doped into graphene using N₂ plasma with an aluminum oxide buffer layer*. J. Mater. Chem. C, 2014. **2**(5): p. 933-939.
10. Jin, H., et al., *A facile method for preparing nitrogen-doped graphene and its application in supercapacitors*. J. Power Sources, 2015. **273**: p. 1156-1162.
11. Primo, A., et al., *From biomass wastes to large-area, high-quality, N-doped graphene: catalyst-free carbonization of chitosan coatings on arbitrary substrates*. Chem. Commun. (Cambridge, U. K.), 2012. **48**(74): p. 9254-9256.
12. Titantah, J.T. and D. Lamoen, *Carbon and nitrogen 1s energy levels in amorphous carbon nitride systems. XPS interpretation using first-principles*. Diamond Relat. Mater., 2007. **16**(3): p. 581-588.
13. Arenillas, A., et al., *CO₂ removal potential of carbons prepared by co-pyrolysis of sugar and nitrogen containing compounds*. J. Anal. Appl. Pyrolysis, 2005. **74**(1-2): p. 298-306.
14. Wei, D., et al., *Synthesis of N-Doped Graphene by Chemical Vapor Deposition and Its Electrical Properties*. Nano Lett., 2009. **9**(5): p. 1752-1758.

15. Cuong, T.V., et al., *Photoluminescence and Raman studies of graphene thin films prepared by reduction of graphene oxide*. Mater. Lett., 2010. **64**(3): p. 399-401.
16. Wang, S.J., et al., *Fabrication of highly conducting and transparent graphene films*. Carbon, 2010. **48**(6): p. 1815-1823.
17. de Miguel, M., M. Alvaro, and H. Garcia, *Graphene as a Quencher of Electronic Excited States of Photochemical Probes*. Langmuir, 2012. **28**(5): p. 2849-2857.
18. Atienzar, P., et al., *Preparation of Graphene Quantum Dots from Pyrolyzed Alginate*. Langmuir, 2013. **29**(20): p. 6141-6146.
19. Lavorato, C., et al., *N-Doped Graphene Derived from Biomass as a Visible-Light Photocatalyst for Hydrogen Generation from Water/Methanol Mixtures*. Chem. - Eur. J., 2014. **20**(1): p. 187-194.

Capítulo 5:

Generación fotocatalítica de hidrógeno a partir de mezclas metanol-agua usando óxidos de grafenos reducidos conteniendo halógenos.

5.1- Introducción.

Como se ha venido comentando en el capítulo de introducción, la estructura de grafeno y sus propiedades se pueden modificar, adaptándolo a las especificaciones deseadas mediante funcionalización química. La preparación de derivados de grafenos donde la lámina de carbono posee enlazados covalentemente sustituyentes, hace posible el acceso a una gran variedad de materiales relacionados con el grafeno pero que podrían exhibir propiedades diferentes a la del material constituido exclusivamente por carbono.[1-11]

En este contexto gran número de las estrategias que han sido descritas para obtener materiales grafénicos sustituidos se basan en el empleo del óxido de grafeno (GO) como material de partida,

puesto que el GO se puede obtener en cantidades suficientes mediante oxidación química de grafito, seguida de exfoliación del óxido de grafito resultante.[12-14] Desde el punto de vista químico el GO puede ser considerado como una lámina 2D de carbonos con hibridación sp^2 y sp^3 conteniendo altos porcentajes de oxígeno presente en diferentes grupos funcionales tales como alcoholes, ácidos carboxílicos, cetonas, epóxidos y fenol.[15, 16] Estos grupos funcionales oxigenados pueden ser transformados mediante reacciones generales en derivados mediante sustitución de los grupos OH o por apertura del anillo de epóxido. Generalmente esta funcionalización de GO va acompañada de la reducción parcial de la lámina de GO, recuperándose en parte la aromaticidad de la lámina de carbono, dando lugar a un grafeno imperfecto con un contenido en oxígeno residual que generalmente se denota óxido de grafeno reducido (rGO).[12, 14, 17, 18]

En el presente capítulo se describe la aplicación de una estrategia de funcionalización para la obtención de grafeno conteniendo átomos de halógeno [(X)G]. Estos materiales se van a preparar con el objetivo de evaluar sus propiedades fotocatalíticas en la generación de hidrógeno a partir de mezclas metanol-agua.

Cálculos teóricos predicen que el ancho de banda entre las bandas de conducción y de valencia que para el caso de grafeno ideal es de 0 eV, debería aumentar al introducir átomos de halógeno en la estructura. Por consiguiente la funcionalización de G con átomos de halógeno sería una estrategia efectiva para modificar las propiedades electrónicas y fotocatalíticas de G.[19, 20]

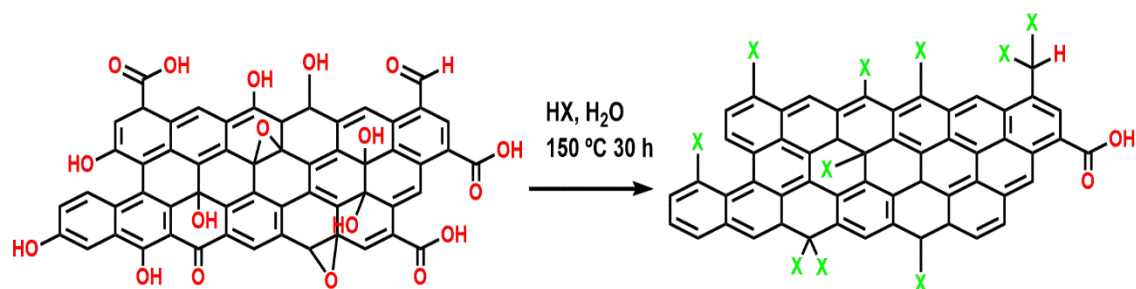
Esta variación en la energía del ancho de banda como consecuencia de la presencia de átomos de halógeno podría conducir a una cierta actividad fotocatalítica para estos materiales (X)G que no posee el material de referencia con estructuras de grafeno ideal. De hecho, el uso de materiales basados en grafeno como fotocatalizadores para la producción de hidrógeno es un tema de mucho interés actualmente considerando la gran disponibilidad del carbono como elemento y la sostenibilidad de materiales que contengan carbono y provengan de la transformación de la biomasa.[21-24]

En el presente capítulo se ha determinado la actividad fotocatalítica para la generación de hidrógeno a partir de mezclas metanol-agua para una serie de materiales (X)G, donde X es flúor, cloro, bromo o yodo. El papel del metanol es el de actuar como agente de sacrificio donador de electrones haciendo posible el proceso de reducción del agua a hidrógeno. Los resultados de actividad fotocatalítica que se describirán en este capítulo se han complementado con un estudio de espectroscopia de absorción transitoria empleando como fuente de excitación un láser UV pulsado de nanosegundos que ha permitido la detección espectroscópica del estado de separación de cargas en los materiales (X)G tras excitación. El propósito de este capítulo es mostrar como

reacciones simples a partir de GO pueden dar lugar a materiales con propiedades fotocatalíticas de interés.

5.2- Resultados y discusión.

La síntesis de los materiales de óxido de grafeno reducido halogenados (abreviamos con (X)G) se llevó a cabo por calentamiento de una suspensión acuosa de GO con el haluro de hidrógeno correspondiente (HF, HCl, HBr y HI) en un autoclave, lavándose a continuación la muestra repetidas veces con agua para eliminar restos de los reactivos.[25] El proceso y la transformación química esperada se indican en el esquema 5.1. Este método de halogenación a partir de GO es considerablemente más conveniente que otros previamente descritos en la literatura y que se basan en una onda de choque térmico alcanzando los 1000 °C manteniendo esta temperatura durante 12 min produciéndose la halogenación de G por exposición a una atmósfera presurizada del halógeno correspondiente.[26]



Esquema 5.1- Procedimiento de preparación (X)G.

Además de (X)G se ha preparado también una muestra de control de rGO obtenida por tratamiento de GO en las mismas condiciones hidrotermales en autoclave, pero en ausencia de cualquier halogenuro de hidrógeno, siguiendo exactamente el mismo protocolo que el empleado en la preparación de (X)G. Esta muestra de control corresponde al tipo de muestras denominadas rGO puesto que es conocido que el tratamiento hidrotermal de GO produce la reducción parcial de la muestra de GO inicial por evolución de CO₂, aumentando la conjugación en el material resultante y tendiendo hacia la formación de una lámina de G pero donde aún existe un contenido residual de oxígeno en la composición. Por tanto rGO debe poseer mucha menor movilidad electrónica que las muestras ideales de G y debería poseer una anchura de banda diferente de 0 eV que podría hacer posible su comportamiento como semiconductor.

Las muestras de (X)G y rGO obtenidas siguiendo el proceso del Esquema 1 se caracterizaron por análisis elemental de combustión, termogravimetría (TG), y mediante espectroscopias Raman, IR y XPS. La composición elemental de las muestras preparadas se resume en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1- Composición elemental de las muestras objeto de estudio en el presente capítulo. ^a determinado por comparación de los datos de XPS para el pico C 1s y los datos obtenidos por análisis elemental por combustión.

	C %	H %	X ^a (%)
GO	43,50	1,80	-
rG	66,60	0,86	-
(F)G	57,94	0,86	4.38
(Cl)G	65,73	1,21	2.28
(Br)G	68,56	0,68	5.36
(I)G	71,14	0,29	4.33

Los perfiles de TG presentan características similares para todas las muestras tal como puede verse en la Figura 5.1. Estos perfiles de TG presentan una pequeña pérdida de peso a temperaturas de alrededor a 150 °C atribuible a la desorción de agua y de otras posibles moléculas volátiles presentes en la superficie de las muestras (X)G al continuar el aumento de temperatura, la descomposición y combustión de las láminas de grafeno empieza a ocurrir en el rango de temperaturas entre 380 y 600 °C.

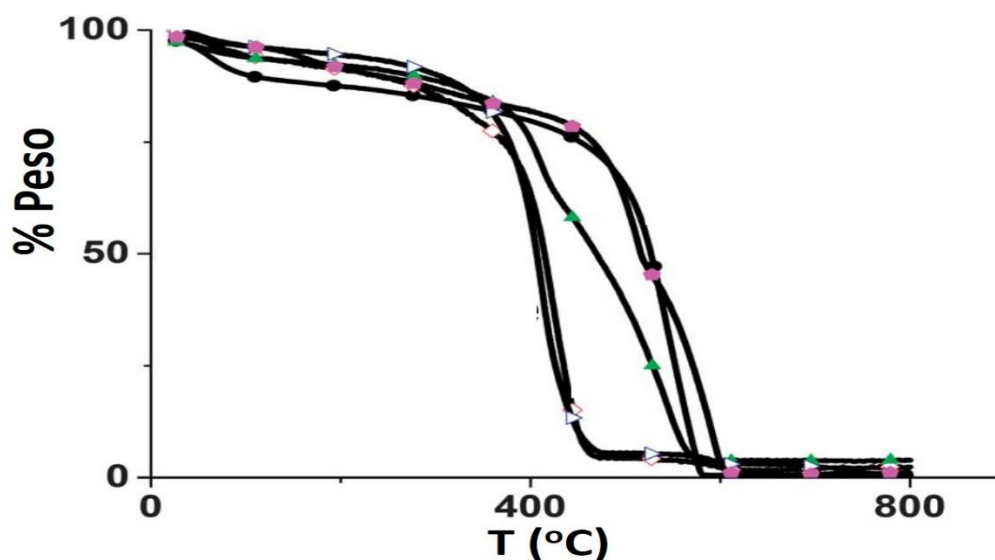


Figura 5.1- Perfiles TG obtenidos en aire para los materiales (I)G (●), (Br)G (▷), (F)G (◊), (Cl)G (▲) y rG (○).

Esta pérdida de peso a temperaturas superiores a 380 °C conduce prácticamente a la desaparición de todo el material. Así el peso residual tras el calentamiento de la muestra a 800 °C bajo aire

varió entre 0.5 y 3% para las muestras de (I)G y (F)G, respectivamente. Este peso residual se corresponde probablemente con la presencia de sales de haluro no volátiles depositadas en la muestra. En este sentido se debe comentar que también la muestra de rGO presenta un peso residual de 0.5% tras ser calentada a 800 °C (ver figura 5.1), lo que podría ser debido incluso a impurezas presentes en la muestra de GO y que dejarían un peso residual tras la descomposición de carbones a 800 °C. Quizás el material residual resultante tras la combustión de estas muestras de (X)G y rGO sean haluros metálicos o hidróxidos de Sodio generados durante tratamiento de autoclave de GO y la posterior neutralización de la disolución.

La presencia de halógenos en la muestra de (X)G no tuvo ninguna influencia en los espectros Raman en la serie de grafenos preparados halogenados. La Figura 5.2 presenta los espectros Raman para la serie de (X)G. La falta de influencia del halógeno en el espectro de Raman no es, sin embargo, inesperada si se tiene en cuenta que la espectroscopia Raman proporciona información principalmente del esqueleto carbonado de los materiales grafénicos y que es relativamente insensible a la presencia de otros grupos funcionales. Conviene indicar que la adquisición de los espectros Raman se llevó a cabo con suficiente cuidado para evitar la descomposición térmica de la muestra durante el proceso de adquisición, comprobándose que la señal de la muestra fresca se reproduce tras la exposición al haz de láser del equipo Raman (2W de potencia) por periodos prolongados.

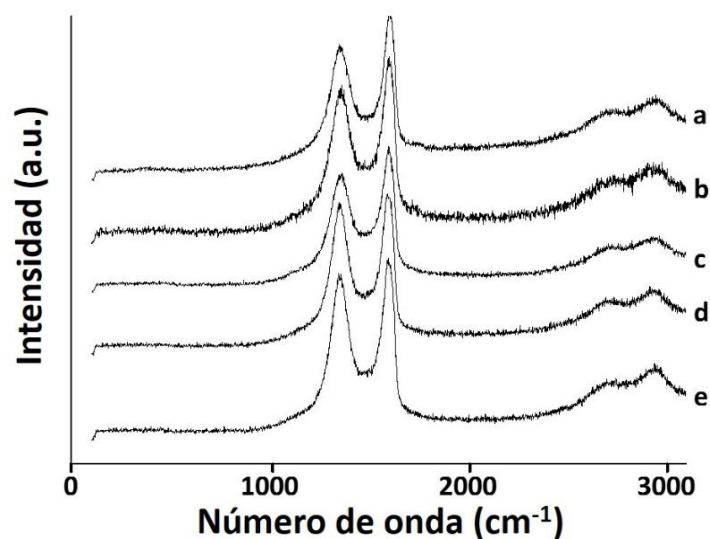


Figura 5.2- Espectros de Raman para las muestras objeto de estudio en el presente capítulo. De arriba abajo: (a) RGO, (b) (F)G, (c) (Cl)G, (d) (Br)G y (e) (I)G.

Estos espectros Raman presentan las dos bandas G y D características de materiales grafénicos y que en el presente caso aparecieron en torno a 1610 y 1360 cm^{-1} , respectivamente. Estas dos

bandas junto con el armónico denominado 2D que aparece en torno a 2800 cm^{-1} son características de materiales rGO.

La espectroscopia de IR es una técnica adecuada para determinar la presencia de grupos funcionales de GO y sus derivados. El tratamiento de halogenación influye notablemente en el espectro de IR del GO de partida, conduciendo de forma general a una disminución considerable de la intensidad de las bandas que aparecen en el espectro de GO. Este hecho general ocurre igualmente en la muestra de rGO, tal como se encuentra descrito en la literatura.[27] Estos cambios tan notables en el espectro de IR al tratar la muestra GO indican la desaparición masiva de los grupos OH, ácidos carboxílicos (1722 cm^{-1}) y epóxidos, como se deduce de la disminución de intensidad de las bandas de IR correspondientes. Por otra lado, la banda atribuible a dobles enlaces C=C que aparece a 1622 cm^{-1} en GO también disminuye en intensidad y se desplaza hacia valores de números de ondas más pequeños, un hecho que es compatible con la reconstitución parcial de la estructura ideal de grafeno. La Figura 5.3 muestra los espectros IR para las muestras estudiadas en el presente capítulo.

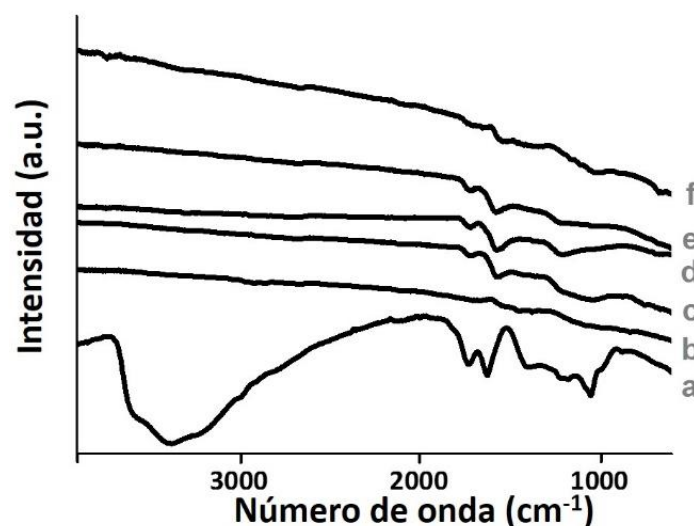


Figura 5.3- Espectros de IR para los materiales (X)G. Espectros que corresponden de abajo a arriba: (a) GO inicial, (b) rGO, (c) (F)G, (d) (Cl)G, (e) (Br)G y (f) (I)G.

La vibración de los enlaces C-X en compuestos aromáticos debe aparecer en la región entre 1250 y 500 cm^{-1} , disminuyendo el valor del número de onda para esta vibración a medida que la masa atómica del halógeno aumenta.[28] Estas bandas de vibración fueron, sin embargo, muy débiles para las muestras (X)G, lo que parece estar de acuerdo con el contenido en X relativamente bajo para estas muestras, siendo observables para el caso de Cl(G) y Br(G) a 930 y 600 cm^{-1} . [26, 28, 29] Para la muestra (I)G, la banda de vibración C-I se registró a 500 cm^{-1} y para la muestra (F)G la vibración C-F podría estar solapada por otras bandas de vibración de 1150 cm^{-1} correspondientes al enlace C-O.

La conductividad eléctrica de las muestras (X)G se midió para obleas prensadas de estos materiales. Se obtuvieron valores de resistencia eléctrica entre 60 y 100 Ω lo que indica la naturaleza conductora de las muestras con una cierta resistividad que podría ser reflejo de un comportamiento semiconductor de las mismas.

Evidencia experimental concluyente que indica la presencia de halógenos en (X)G se obtuvo por aplicación de técnicas ampliamente usadas en caracterización de superficies, como análisis elemental por microscopia electrónica de transmisión (TEM) o de barrido (SEM) y XPS. De hecho imágenes de TEM y SEM muestra la morfología laminar esperada para materiales de grafeno, especialmente la presencia de arrugas que son características de materiales con un alto grado de exfoliación. Además las imágenes de SEM detectan la presencia del halógeno correspondiente para cada muestra. Así la Figura 5.4 muestra imágenes seleccionadas de SEM y TEM para las muestras (X)G, mientras que la figura 5.5 muestra el análisis elemental obtenido mediante la técnica EDS acoplada a la microscopia electrónica de barrido.[30] El contenido de halógeno pudo ser determinado cuantitativamente a partir del análisis en SEM para varias imágenes representativas de las muestras.

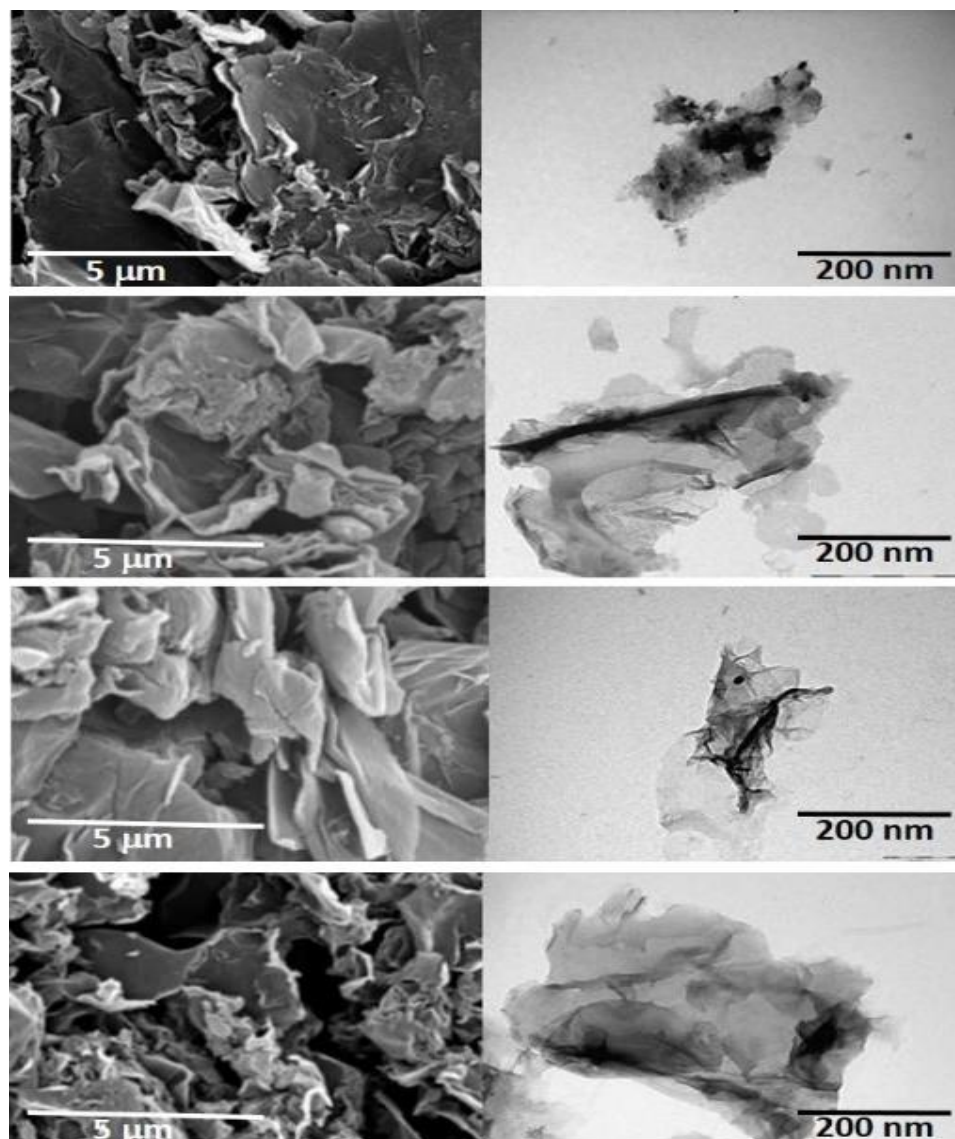


Figura 5.4- Imágenes seleccionadas de SEM (izquierda) y TEM (derecha) para las muestras (X)G. De arriba abajo: (F)G, (Cl)G, (Br)G, (I)G.

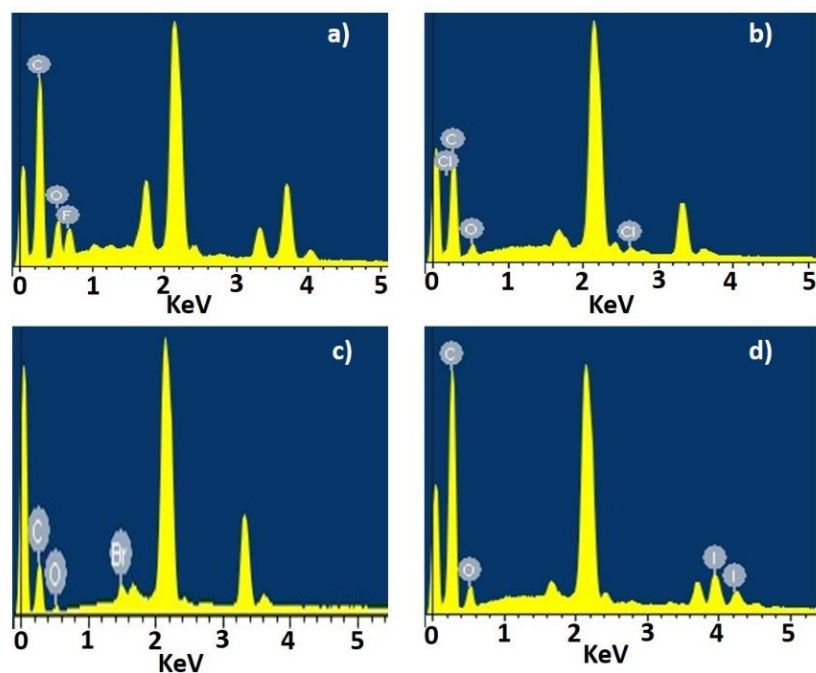


Figura 5.5- Espectros obtenidos mediante la técnica de EDS durante la captura de las imágenes en SEM. Siendo a) (F)G, b) (Cl)G, c) (Br)G, d) (I)G.

En la mayoría de los casos la dispersión en los valores del contenido del halógeno para diferentes imágenes correspondientes a regiones diferentes de la muestra fue bajo, generalmente del 3% como máximo. Por otra parte el contenido promedio de halógeno fue, de acuerdo con los datos de EDS, notablemente reproducible de una muestra a otra para reacciones diferentes en todos los casos excepto para el caso de (F)G que exhibió una mayor dispersión en los valores de contenido del F. Mediante la técnica TEM se realizó un mapeado submicrométrico de la distribución de Cl en las láminas de (Cl)G, llegándose a la conclusión de que este halógeno se encuentra distribuido uniformemente en las láminas de G. Además para la muestra (Cl)G los modelos de difracción de electrones indican que se trata de un material con ordenamiento cristalino constituido por dominios pequeños.

El análisis por XPS de las muestras (X)G mostró un buen acuerdo con los datos previamente descritos basados en microscopía.[31] En todos los casos se detectó por XPS la presencia del halógeno correspondiente en una proporción atómica que varió entre el 2 y el 5 %. La figura 5.6 muestra los picos C 1s de alta resolución y los picos correspondientes a los diferentes halógenos para las muestras (X)G objeto de estudio.

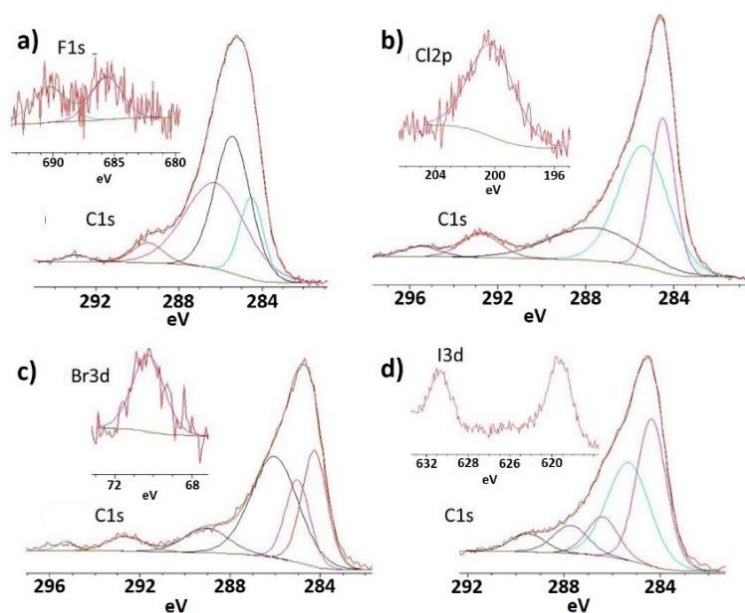


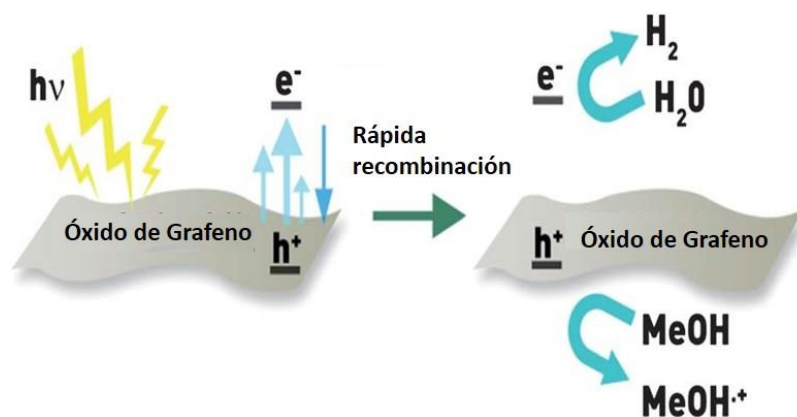
Figura 5.6- Picos de C 1s y X np, de XPS de alta resolución, para las muestras **a)** (F)G, **b)** (Cl)G, **c)** (Br)G, **d)** (I)G.

Es interesante hacer notar que la descomposición de los picos de alta resolución C 1s en componentes individuales se ajusta razonablemente bien con los valores esperables para este tipo de muestras siendo el componente predominante el carbono grafénico que aparece a una energía de enlace de 284.5 eV.[32, 33] La intensidad de la señal de carbono aumentó en el orden (I)G < (Br)G < (Cl)G < (F)G. La Figura 5.6 muestra el análisis de los picos de XPS en componentes individuales y la estimación en contenido del halógeno cuyo valor se indica en la tabla 5.1. Ambos valores medidos por análisis de combustión o XPS, en contenido en carbono y halógeno, están de acuerdo y confirman la composición elemental. Para el caso el pico C 1s se observaron varios componentes a valores de energía de enlace mayores de 284.5 y que son atribuibles a la existencia de carbonos enlazados a oxígeno que estarían presentes principalmente como grupos carboxílicos en la periferia o como defectos debidos a la reconstitución incompleta de la lámina de G. La baja proporción de carbono enlazados a halógenos y que poseen valores típicos de energía de enlace en el rango entre 286 y 289 eV fue también detectable en XPS.[26] La presencia de halógeno se confirma por la detección en XPS de los picos correspondientes para cada halógeno. Más aún las energías de enlace para cada halógeno están de acuerdo con los valores esperados para halógenos enlazados a carbono y son significativamente diferentes de las energías de enlaces de sales como por ejemplo NaX cuya energía de enlace del Cl 2p_{3/2} es 198 eV mientras que valores típicos de energías de enlace C-Cl están alrededor de 200 eV.[34] En el presente estudio la energía de enlace medida para Cl 2p_{3/2} en la muestra (Cl)G fue de 200.8 eV que además coincide con el valor previamente descrito en la bibliografía para átomos de cloro enlazados a grafenos.[26] De manera análoga la energía de enlace para los electrones 3p de Br es de 67 eV mientras que el valor en la posición del pico medido para átomos de Bromo en la

muestra (Br)G fue de 70.4 eV, que además está en el rango esperado para valores de energías de enlace en compuestos que tienen uniones C-Br que está descrito en torno a 70 eV.

5.2.1- Actividad fotocatalítica de las muestras (X)G para generación de hidrógeno en mezclas metanol-agua.

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo, el objetivo del presente estudio es determinar la influencia que la naturaleza del halógeno en un material (X)G ejerce sobre su actividad fotocatalítica para la generación de hidrógeno. El objetivo a largo plazo es el de preparar fotocatalizadores eficientes basados en grafeno. Mientras que G es una material conductor, GO se comporta como un sólido semiconductor existiendo una separación de energía entre el máximo de la banda de valencia y el mínimo de la banda de conducción.[2, 3, 35, 36] Se ha descrito que dependiendo del grado de oxidación, la separación en energía entre las bandas de conducción puede variar y estas diferencias se reflejan frecuentemente en la eficiencia del material como fotocatalizador.[24, 37, 38] Estudios previos han descrito ya la actividad fotocatalítica de muestra de GO para la generación de hidrógeno.[21, 24] Al absorber un fotón de energía superior al ancho de banda, la mayoría de los semiconductores alcanzan un estado transitorio de separación de cargas generado por la promoción de un electrón desde la banda de valencia a la banda de conducción con la creación de un hueco positivo en la banda de valencia. Los electrones en la banda de conducción pueden efectuar la reducción de agua a hidrógeno. El proceso es particularmente eficiente en presencia de compuestos donadores de electrones que inhiban rápidamente los huecos positivos restaurando la neutralidad en el semiconductor de forma inmediata. El Esquema 5.2 resume los eventos elementales que ocurren por absorción de luz en GO.



Esquema 5.2- Mecanismo de generación fotocatalítica de hidrógeno por reducción del agua usando GO como semiconductor y metanol como agente dador de electrones.

La hipótesis en el presente capítulo es la de que la presencia de halógenos a través de efectos inductivos sobre los carbonos a los que están enlazados podría modificar la energía de las bandas de conducción y de valencia pudiendo aumentar la eficiencia de los grafenos resultantes para su empleo como fotocatalizador.

Sin embargo, tal como se ha ido indicando en los párrafos anteriores centrados en la caracterización estructural de los materiales (X)G, el proceso de halogenación del GO va acompañado de forma inevitable de un alto grado de reconstitución de la lámina de G y por consiguiente la estructura original y la energía de las bandas en el GO es afectada por un porcentaje considerable de constitución de G que puede ser mayor que el efecto introducido por la presencia de halógenos.

Los experimentos para medir la actividad fotocatalítica en las muestras de (X)G se hicieron por duplicado usando fuentes de luz UV monocromática (355 nm 350 mW) suspendiendo la muestra de (X)G correspondiente en una mezcla 70:30 de agua:metanol que fue purgada previamente con nitrógeno a fin de evitar la presencia de oxígeno que es indeseable en este experimento. El error estimado de las medidas basado en los valores medios fue del ± 5 % del valor absoluto. La Figura 5.8 muestra el perfil temporal de la evolución de hidrógeno en $\mu\text{mol/g}$ del catalizador para la serie de muestras (X)G objeto de estudio. Se ha incluido como control la actividad de la muestra rGO obtenida tratando GO con el mismo procedimiento experimental que se sigue para las muestras de (X)G pero en ausencia de haluro de hidrógeno. Por consiguiente, la muestra de rGO debe tener la misma estructura que las muestras (X)G pero sin contener halógeno en su composición. A fin de proporcionar otra comparación válida, el estudio incluye también el comportamiento fotoquímico de una muestra de óxido de titanio (el nombre comercial TiO_2 P25 que corresponde a una mezcla de formas cristalográficas de rutilo y anatasa) que es el catalizador de referencia en la mayoría de estudios en este campo. La comparación de la actividad de los diferentes catalizadores se llevó a cabo para suspensiones con la misma densidad óptica para todos los materiales a 355 nm (D.O. = 0.2).

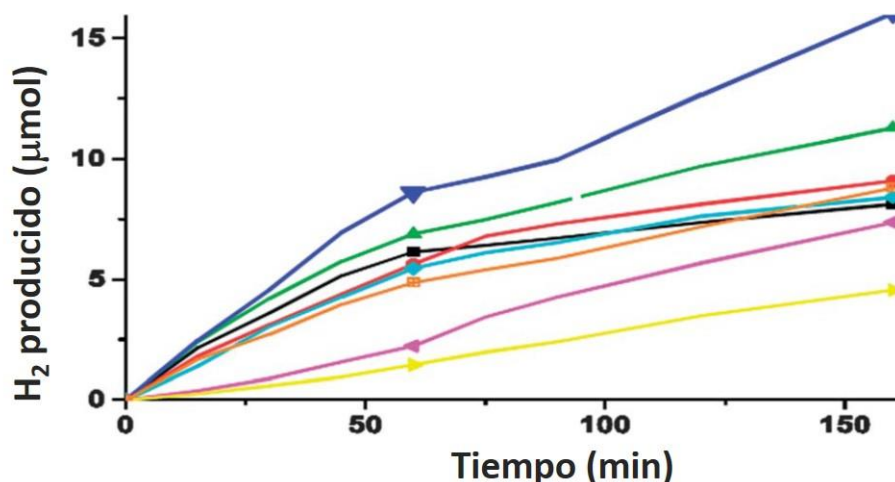


Figura 5.7- Perfil temporal de generación fotocatalítica de hidrógeno utilizando las muestras (X)G como fotocatalizadores. Perfil temporal de generación fotocatalítica de hidrógeno utilizando las muestras (X)G como fotocatalizadores. Los símbolos corresponden de arriba abajo a: (■) (Cl)G, (▲) (F)G, (▲) (I)G, (▲) (rGO), (■) TiO₂ P25, (■) (Br)G, (■) GO, (■) GO'.

Como puede verse en la Figura 5.7, la muestra de control rGO es la que presenta la actividad fotocatalítica más baja, un comportamiento que no es totalmente inesperado si se considera que la muestra rGO es la que debe exhibir el mayor carácter metálico debido a la reconstitución de las láminas de G. Basados en el volumen total de hidrógeno generado a las 2h de irradiación, el orden de actividad fotocatalítica aumenta en la serie siguiendo el *orden* $rGO < (Br)G < TiO_2 P25 < (I)G < (F)G < (Cl)G$. El rendimiento cuántico aparente para la generación de hidrógeno considerando todos los fotones emitidos por el láser para la muestra más activa (Cl)G fue del 0.33 % con una velocidad de producción de hidrogeno de $5.6 \mu mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$. Está claro sin embargo que el rendimiento cuántico real debe ser significativamente más alto puesto que solo una fracción pequeña de los fotones emitidos por el láser son absorbidos por la muestra y sería esta fracción de fotones absorbidos, o incluso menor aun, la que debería considerarse a la hora de determinar el rendimiento cuántico real. La Tabla 5.2 indica las velocidades iniciales de reacción para la generación de hidrógeno para las muestras estudiadas en las condiciones de reacción.

Tabla 5.2- Velocidades iniciales de generación de hidrógeno.

	GO	GO'	P25	rGO	(I)G	(Br)G	(F)G	(Cl)G
$V_i(\mu mol/min)$	0,02	0,04	0,08	0,09	0,09	0,10	0,11	0,14

^a GO* se refiere a una muestra de GO liofilizada.

Cuando se emplean materiales derivados del grafeno como fotocatalizadores un aspecto de máxima importancia es la estabilidad del material en condiciones de reacción. Para estudiar la estabilidad del fotocatalizador se adicionó catión Ag^+ a las disoluciones acuosas tras la reacción fotocatalítica para los catalizadores (Cl)G, (Br)G y para (I)G, no observándose la detección de ningún precipitado lo que indica que la concentración de haluros X^- debe estar por debajo del límite que produce la precipitación de los correspondientes haluros de plata insolubles. Para el caso de fotocatalizador (F)G se llevó a cabo un ensayo similar pero empleando el catión Ca^{2+} puesto que el fluoruro cálcico es una sal insoluble en agua. Aunque no se observó la formación de haluros en la fase acuosa por rotura de los enlaces C-X durante el transcurso de la reacción, sí que ocurrió la formación de agregados por apilamientos de las láminas de (X)G que se observan visualmente por la precipitación de material carbonoso en las condiciones de reacción. Sin embargo la comparación de las imágenes de TEM para la muestra (Cl)G antes de irradiación y transcurridas 1, 3 y 6 h de irradiación, no permite observar cambios en la morfología 2D de las láminas de grafeno (ver Figura 5.8) lo que sugiere que la agregación del fotocatalizador ocurre solo de forma parcial y que el material que permanece en solución no sufre alteración morfológica en condiciones de la generación fotocatalítica de hidrógeno.

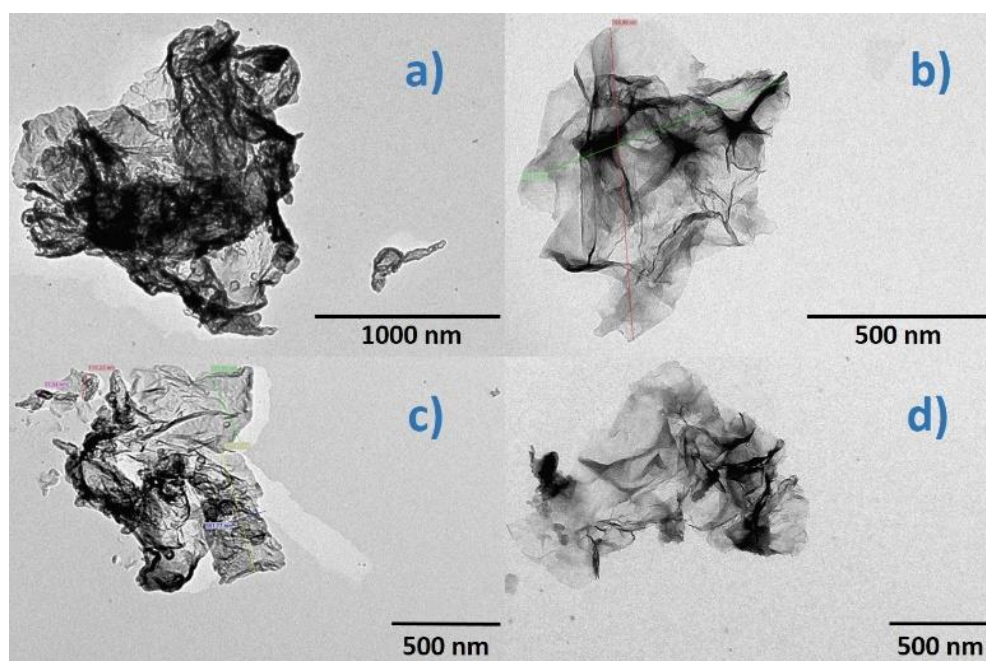


Figura 5.8- Imágenes representativas de TEM de la muestra (Cl)G antes de ser irradiada con el laser (a), y después de 1 h (b) a las 3 h (c) y finalmente después de 6 horas de irradiación (d).

En contraste con la información proporcionada por microscopía, los espectros Raman de la muestra más activa (Cl)G tras irradiación exhiben algunos picos de vibración nuevos a 2950 cm^{-1} que indican la creación de enlaces C-H durante el curso de la reacción fotocatalítica.

Probablemente la aparición de enlaces C-H indica la hidrogenación parcial de grafeno con el hidrógeno que se genera en el proceso. La Figura 5.9 presenta estos espectros Raman de muestras irradiadas. Por consiguiente, todos los datos de caracterización disponibles indican la existencia de un cierto grado de agregación por apilamiento de las láminas de (Cl)G y una cierta hidrogenación de la lámina de grafeno por el hidrógeno generado durante el transcurso de la radiación, aunque sin llegar a ocasionar roturas de enlace C-X ni cambios en la morfología de la lámina.

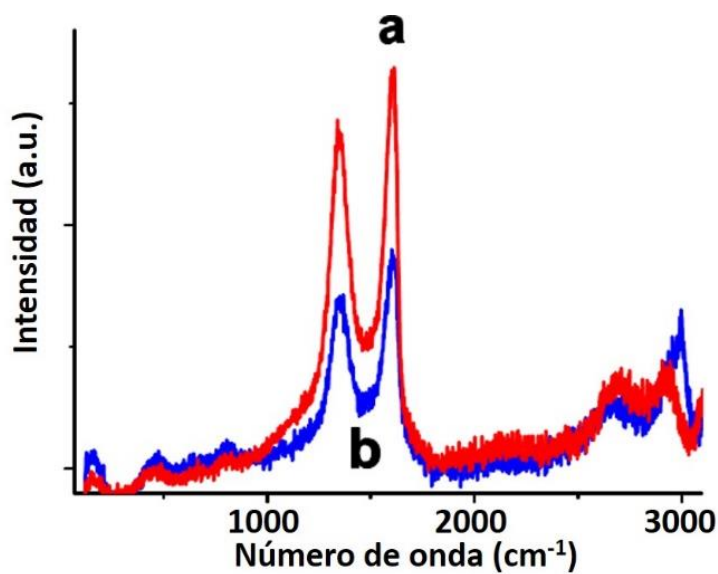


Figura 5.9- Espectros Raman de la muestra (Cl)G antes (a) y después de 6 horas de irradiación (b). Notar el aumento de intensidad de la señal Raman a 2950 cm^{-1} tras someter la muestra (Cl)G a irradiación.

Los datos fotocatalíticos anteriores indican claramente que el proceso de halogenación de G y la naturaleza del halógeno ejerce una influencia en la actividad de estos materiales como fotocatalizadores. La electronegatividad del halógeno unido covalentemente a G debe probablemente alterar la energía de las bandas de conducción y de valencia. Presumiblemente el potencial de reducción de la banda de conducción debe aumentar debido a la halogenación, favoreciendo de esta manera la reducción fotocatalítica de agua y la generación de hidrógeno. Así la actividad fotocatalítica aumenta por un factor de 7 del GO al (Cl)G. Además de la presencia de halógeno, otra causa que podría también contribuir a la actividad fotocatalítica sería la reconstitución parcial de la lámina de grafeno como consecuencia del tratamiento por HX y que la presencia de este rGO junto con la de (X)G condujera a una sinergia que aumentara la actividad fotocatalítica similar al proceso que ha sido descrito al combinar partículas metálicas con semiconductores e incluso al combinar grafeno con TiO_2 . [39, 40]

5.2.3- Detección del estado de separación de cargas con técnicas espectroscópicas con resolución temporal.

El estudio llevado a cabo en esta Tesis Doctoral sobre la actividad fotocatalítica de muestras de grafeno halogenado (X)G se completó con medidas espectroscópicas de absorción transitoria para suspensiones acuosas de (X)G, con el objeto de determinar si es posible la detección de especies transitorias que puedan ser atribuibles al estado de separación de cargas fotoinducidas.[23]

Como puede verse en la Figura 5.10 la fotólisis de soluciones acuosas de (X)G purgadas con una corriente de argón usando un pulso de láser de 355 nm da lugar en todos los casos a la detección de una señal transitoria que decae en la escala de tiempos de microsegundos.

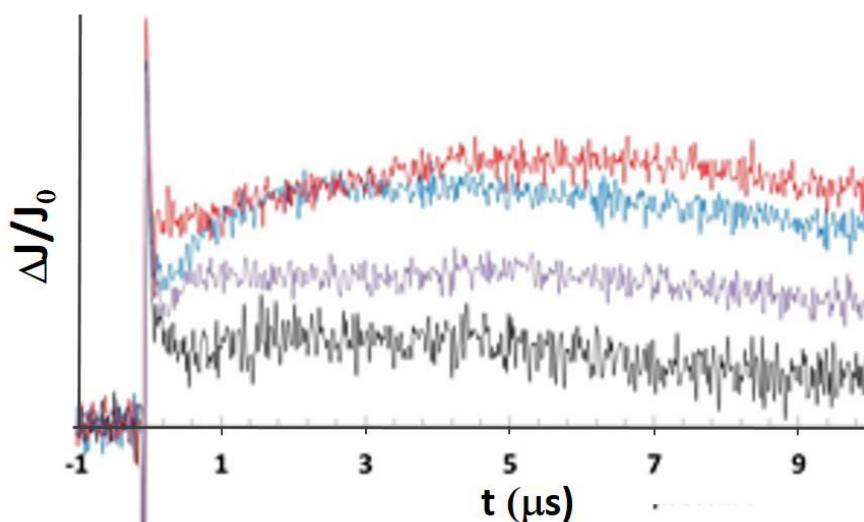


Figura 5.10- Perfiles temporales registrados para suspensiones acuosas de las muestras (X)G (con una absorbancia de 0.3 a 355 nm) medidos a 745 nm tras excitación con un pulso del láser a 355 nm (duración del pulso 7 ns, energía del pulso 30 mW). Las señales corresponden de arriba abajo: (F)G (—), (Cl)G, (—) (Br)G, (—) (I)G (—).

Los perfiles temporales de estas señales presentan una desactivación muy rápida para tiempos más cortos de un microsegundo, que van seguidas de un crecimiento que tiene lugar en los siguientes 4 μ s, produciéndose finalmente un decaimiento mucho más lento que se prolonga más allá de decenas de micros (ver Figura 5.10). La Tabla 5.3 resume los valores de constantes de velocidad para la etapa de crecimiento y para la etapa de desaparición lenta que son los regímenes que pueden ser medidos adecuadamente con nuestro equipo de láser de nanosegundos. Una interpretación razonable de estas cinéticas sería la existencia de varios mecanismos de recombinación e^-/h^+ y que podrían corresponder a la recombinación geminal (decaimiento en menos de un microsegundo), migración de cargas fuera del punto donde se formaron

(crecimiento de la señal) y recombinación no geminal tras migración de cargas y encuentro al azar.

Los espectros de absorción de especies transitorias para todas las muestras (X)G exhiben pequeñas diferencia dependiendo de la naturaleza del halógeno, pero son fundamental coincidentes en todos los casos. Estos espectros resueltos en tiempo están caracterizados por una absorción continua en todo el rango espectral. La Figura 5.11 muestra espectros representativos que ilustran el tipo de espectros transitorios que fueron registrados. Conviene hacer notar que la intensidad de la señal medida a los mismos tiempos tras el pulso del láser coincide razonablemente bien con el orden de actividad fotocatalítica mostrado en la Figura 5.8, es decir, la intensidad de la señal transitoria sigue el orden: (Br)G < (I)G < (F)G < (Cl)G. La pequeña discrepancia en el orden entre la actividad fotocatalítica y la intensidad de la señal se debe al hecho de que aunque el estado de separación de cargas es el proceso elemental clave en la generación de hidrógeno, existen también otros parámetros como tiempos de vida, movilidad de las cargas, potenciales de reducción y facilidad de transferencia electrónica al agua que juegan igualmente un papel importante en la evolución de hidrógeno.

Tabla 5.3- Tiempos de vida velocidad de crecimiento y desaparición para señal transitoria registrada en disoluciones acuosas de las muestras (X)G purgadas en argón con excitación de un pulso del láser con un longitud de onda de 355 nm.

	t vida desaparición (μs)	t vida crecimiento (μs)
(F)G	0,038	1,21
(Cl)G	0,0483	2,99
(Br)G	0,1219	nd
(I)G	0,07223	nd

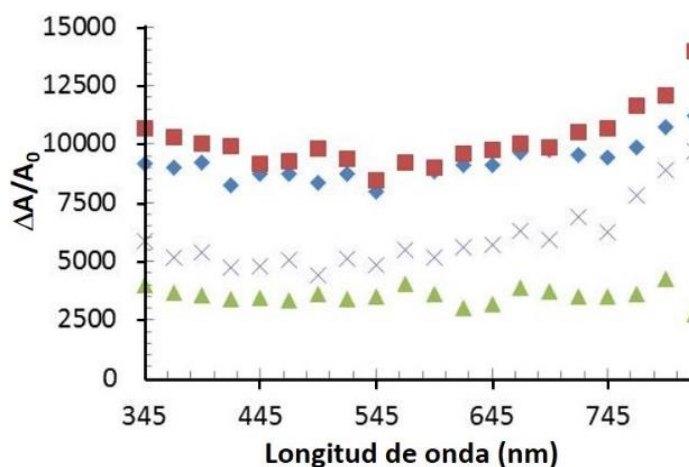


Figura 5.11- Espectros de especies transitorias medido a los 5 microsegundos tras excitación de un pulso de láser de 355 nm para disoluciones acuosas purgadas en argón de las muestras (X)G: (F)G siendo (◆), (Cl)G siendo (■), (Br)G siendo (▲) y (I)G siendo (✕).

Para cada una de las muestras (X)G los perfiles temporales de la señal fueron casi coincidentes en todo el rango de longitudes de onda medido, lo que sugiere que estas señales corresponden a una única especie en todas las longitudes de onda o a especies que desaparecen por recombinación entre ellas.

A fin de proporcionar una evidencia que permita conseguir alguna información sobre la naturaleza de las especies transitorias detectadas con el equipo de destello láser, se llevaron a cabo experimentos de inhibición. Esta información es particularmente relevante para las muestras que presentan una actividad fotocatalítica mayor que son (F)G y (Cl)G. Así se observó que la presencia de metanol, un agente dador de electrones comúnmente empleado en estos estudios, produce un aumento significativo en la intensidad de la señal (alrededor de 1.7 veces la señal en ausencia de metanol) además de un aumento en el tiempo de vida de la etapa lenta de la señal transitoria (ver Figuras 5.12 y 5.13).

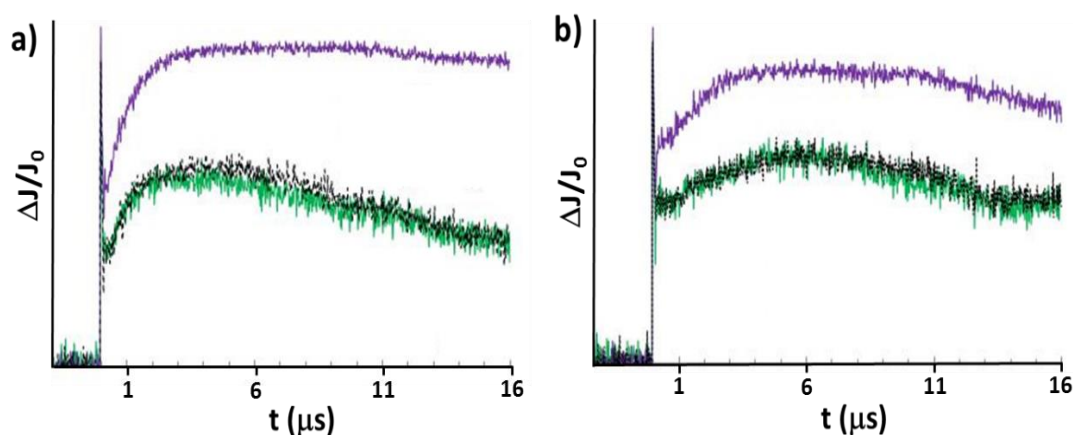


Figura 5.12- Perfiles temporales de las señales de la muestra (a) (F)G y (b) (Cl)G (con una absorbancia de 0.3 a 355 nm) medidos a 745 nm tras excitación con un pulso del láser a 355 nm (duración del pulso 7 ns, potencia del pulso 30 mW) medidos bajo flujo de Argón (—), Oxígeno(---) y tras adición de 10 μ l de MeOH (—) como inhibidor de huecos

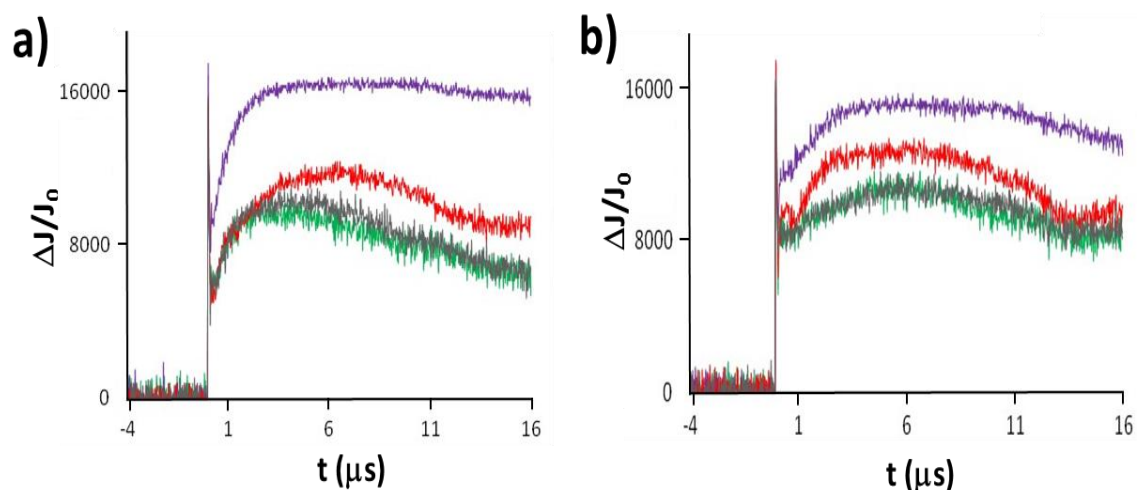


Figura 5.13- Señales normalizadas de los perfiles de decaimiento registradas a 745nm para especies transitorias registradas para (a) (F)G y (b) (Cl)G (con una absorbancia de 0.3 a 355 nm). Las señales corresponden a diferentes agentes de inhibición: argón (—), oxígeno (—), metanol (—) y metanol + oxígeno (—).

Basándonos en el comportamiento descrito del GO como semiconductor que tras absorción de un cuanto de energía luminosa genera un estado de separación de cargas [16, 17, 37] y la influencia del metanol en el perfil temporal de la señal transitoria, es razonable proponer que los espectros transitorios corresponden a la absorción de electrones generados fotoquímicamente que estarían localizados en la banda de conducción de las muestras (X)G. De acuerdo con esta interpretación la presencia de metanol aumentaría el número de electrones en la banda de conducción debido a la habilidad de este reactivo de inhibir los huecos positivos (h^+) en los grafenos, evitándose de esta manera su recombinación con e^- . Esta inhibición de h^+ produciría simultáneamente una prolongación del tiempo de vida de los electrones fotogenerados puesto que su recombinación con huecos sería más improbable. El Esquema 5.3 ilustra nuestra propuesta.

5.3- Conclusiones.

Los datos presentados en este capítulo muestran que es posible variar y en su caso aumentar la actividad como fotocatalizador para la generación de hidrógeno a partir de mezcla agua- metanol modificando una muestra de rGO con átomos de halógeno. La reacción de GO con HX en autoclave da lugar de una forma conveniente de muestras (X)G con un porcentaje de halógeno variable y esto afecta a las propiedades del material (X)G como semiconductor. De la serie de muestras preparadas la más eficiente para la generación de hidrogeno en nuestros caso ha sido la muestra que contenía cloro, siendo siete veces más activa que el GO de partida y más activa que el fotocatalizador de referencia TiO₂ P25. Se requieren estudios adicionales para optimizar el porcentaje de halógeno de las muestras (X)G y obtener una compresión más completa de como la naturaleza y contenido de halógeno influye en la actividad fotocatalítica de las muestras de (X)G resultantes.

En resumen los datos espectroscópicos en la escala de tiempos de microsegundos permiten racionalizar la actividad fotocatalítica para la generación de hidrógeno observada para las muestras (X)G en mezclas agua-metanol como derivadas del comportamiento de (X)G como semiconductor y de la existencia de la separación de cargas fotoinducida con rendimientos de separación de cargas aparentes y rendimientos cuánticos en función de la naturaleza del halógeno.

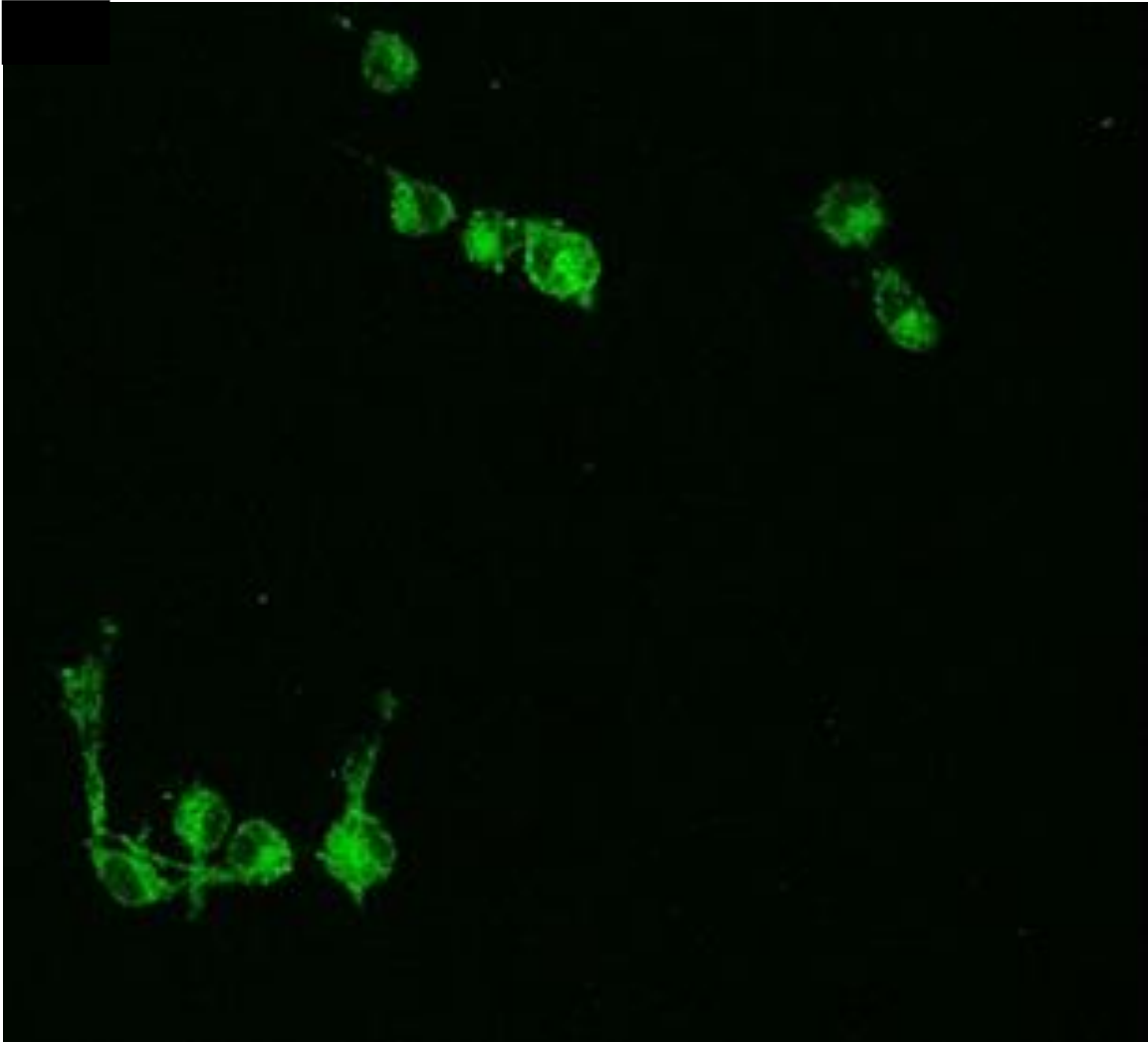
5.4- Referencias.

1. Zhu, Y.W., et al., *Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications*. Advanced Materials, 2010. **22**(35): p. 3906-3924.
2. Eda, G. and M. Chhowalla, *Chemically Derived Graphene Oxide: Towards Large-Area Thin-Film Electronics and Optoelectronics*. Advanced Materials, 2010. **22**(22): p. 2392-2415.
3. Huang, X., et al., *Graphene-Based Materials: Synthesis, Characterization, Properties, and Applications*. Small, 2011. **7**(14): p. 1876-1902.
4. Katsukis, G., et al., *Interfacing Nanocarbons with Organic and Inorganic Semiconductors: From Nanocrystals/Quantum Dots to Extended Tetrathiafulvalenes*. Langmuir, 2012. **28**(32): p. 11662-11675.
5. Malig, J., N. Jux, and D.M. Guldi, *Toward Multifunctional Wet Chemically Functionalized Graphene Integration of Oligomeric, Molecular, and Particulate Building Blocks that Reveal Photoactivity and Redox Activity*. Accounts of Chemical Research, 2013. **46**(1): p. 53-64.
6. Bai, H., C. Li, and G.Q. Shi, *Functional Composite Materials Based on Chemically Converted Graphene*. Advanced Materials, 2011. **23**(9): p. 1089-1115.
7. Compton, O.C. and S.T. Nguyen, *Graphene Oxide, Highly Reduced Graphene Oxide, and Graphene: Versatile Building Blocks for Carbon-Based Materials*. Small, 2010. **6**(6): p. 711-723.
8. Loh, K.P., et al., *The chemistry of graphene*. Journal of Materials Chemistry, 2010. **20**(12): p. 2277-2289.
9. Malig, J., et al., *Towards Tunable Graphene/Phthalocyanine-PPV Hybrid Systems*. Angewandte Chemie-International Edition, 2011. **50**(15): p. 3561-3565.
10. Ragoussi, M.E., et al., *Linking Photo- and Redoxactive Phthalocyanines Covalently to Graphene*. Angewandte Chemie-International Edition, 2012. **51**(26): p. 6421-6425.
11. Rao, C.N.R., et al., *Graphene: The New Two-Dimensional Nanomaterial*. Angewandte Chemie-International Edition, 2009. **48**(42): p. 7752-7777.
12. Hernandez, Y., et al., *High-yield production of graphene by liquid-phase exfoliation of graphite*. Nature Nanotechnology, 2008. **3**(9): p. 563-568.
13. Paredes, J.I., et al., *Graphene oxide dispersions in organic solvents*. Langmuir, 2008. **24**(19): p. 10560-10564.
14. Schniepp, H.C., et al., *Functionalized single graphene sheets derived from splitting graphite oxide*. Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(17): p. 8535-8539.

15. Dreyer, D.R., et al., *The chemistry of graphene oxide*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**(1): p. 228-240.
16. Gao, W., et al., *New insights into the structure and reduction of graphite oxide*. Nature Chemistry, 2009. **1**(5): p. 403-408.
17. Eda, G., G. Fanchini, and M. Chhowalla, *Large-area ultrathin films of reduced graphene oxide as a transparent and flexible electronic material*. Nature Nanotechnology, 2008. **3**(5): p. 270-274.
18. Park, S. and R.S. Ruoff, *Chemical methods for the production of graphenes*. Nature Nanotechnology, 2009. **4**(4): p. 217-224.
19. Karlicky, F., R. Zboril, and M. Otyepka, *Band gaps and structural properties of graphene halides and their derivatives: A hybrid functional study with localized orbital basis sets*. Journal of Chemical Physics, 2012. **137**(3).
20. Singh, R. and G. Bester, *Hydro-, Chloro- and Fluorographene Structures: A Density Functional Based Study*, in *International Conference on Advances in Condensed and Nano Materials*, S.K. Tripathi, et al., Editors. 2011.
21. Min, S. and G. Lu, *Dye-Sensitized Reduced Graphene Oxide Photocatalysts for Highly Efficient Visible-Light-Driven Water Reduction*. The Journal of Physical Chemistry C, 2011. **115**(28): p. 13938-13945.
22. Xiang, Q. and J. Yu, *Graphene-Based Photocatalysts for Hydrogen Generation*. The Journal of Physical Chemistry Letters, 2013. **4**(5): p. 753-759.
23. Yeh, T.F., et al., *Graphite Oxide as a Photocatalyst for Hydrogen Production from Water*. Advanced Functional Materials, 2010. **20**(14): p. 2255-2262.
24. Latorre-Sanchez, M., et al., *Visible-Light Photocatalytic Hydrogen Generation by Using Dye-Sensitized Graphene Oxide as a Photocatalyst*. Chemistry-a European Journal, 2012. **18**(52): p. 16774-16783.
25. Wang, Z., et al., *Synthesis of fluorinated graphene with tunable degree of fluorination*. Carbon, 2012. **50**(15): p. 5403-5410.
26. Poh, H.L., et al., Chem. Eur. J., 2013. **19**: p. 2655-2662.
27. Wang, S.J., et al., *Fabrication of highly conducting and transparent graphene films*. Carbon, 2010. **48**(6): p. 1815-1823.
28. Bellamy, L.J., *The Infrared Spectra of Complex Molecules*. 3rd Ed. ed. Vol. 1. 1975, London: Chapman and Hall Ltd.
29. Gopalakrishnan, K., et al., *Reversible chemical storage of halogens in few-layer graphene*. Rsc Advances, 2010. **2**(4): p. 1605-1608.
30. 2, n.

31. 1, n.
32. Sun, C.Q., et al., *Coordination-Resolved C-C Bond Length and the C 1s Binding Energy of Carbon Allotropes and the Effective Atomic Coordination of the Few-Layer Graphene*. *Journal of Physical Chemistry C*, 2009. **113**(37): p. 16464-16467.
33. Widenkvist, E., et al., *Mild sonochemical exfoliation of bromine-intercalated graphite: a new route towards graphene*. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 2009. **42**(11).
34. Naumkin, A.V., et al. *NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database* NIST Standard Reference Database 20, Version 4.1 2012; Available from: <http://srdata.nist.gov/xps/Default.aspx>.
35. Stankovich, S., et al., *Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide*. *Carbon*, 2007. **45**(7): p. 1558-1565.
36. Dikin, D.A., et al., *Preparation and characterization of graphene oxide paper*. *Nature*, 2007. **448**(7152): p. 457-460.
37. Xiang, Q.J., J.G. Yu, and M. Jaroniec, *Graphene-based semiconductor photocatalysts*. *Chemical Society Reviews*, 2012. **41**(2): p. 782-796.
38. Yeh, T.-F., et al., *Graphite Oxide as a Photocatalyst for Hydrogen Production from Water*. *Advanced Functional Materials*, 2010. **20**(14): p. 2255-2262.
39. Goyal, V. and A.A. Balandin, *Thermal properties of the hybrid graphene-metal nano-micro-composites: Applications in thermal interface materials*. *Applied Physics Letters*, 2012. **100**(7).
40. Shahil, K.M.F. and A.A. Balandin, *Graphene-Multilayer Graphene Nanocomposites as Highly Efficient Thermal Interface Materials*. *Nano Letters*, 2012. **12**(2): p. 861-867.

Bloque II: Síntesis de nanopartículas basadas en carbono y sus aplicaciones en nanotecnología.



Capítulo 6:

Puntos cuánticos de carbono de elevada fotoluminiscencia obtenidos por pirólisis de cationes amonio cuaternarios encapsulados en la zeolita ITQ-29.

6.1- Introducción.

Como se ha venido comentando en la introducción las nanopartículas fluorescentes poseen un amplio rango de aplicación que va desde moléculas sonda fotoluminiscentes hasta sensores químicos, sistemas imagen y bioimagen, fotocatalisis y materiales electroluminiscentes.[1-7] Debido al gran potencial y a las posibilidades de controlar su síntesis así como la disponibilidad de sus precursores, la obtención de puntos cuánticos de carbono o nanopartículas de carbono (C-dots) fluorescentes constituyen un campo de investigación de gran interés en la actualidad.[8] Los C-dots fluorescentes podrían ser una alternativa viable a los puntos cuánticos convencionales basados en sulfuros o calcogenuros de metales de transición que en los casos más ampliamente estudiados tales como CdS, CdSe, CdTe y PbS presentan una alta toxicidad.[9-15]

Dos metodologías generales, bien “de arriba a abajo” [11-16] o de “abajo a arriba” [17, 18] han sido aplicadas para la síntesis de C-dots. Entre estas metodologías sintéticas descritas para la preparación de C-dots fluorescentes, las que han atraído más atención debido a su simplicidad han sido las que se basan en la carbonización de precursores moleculares o poliméricos en condiciones hidrotermales,[19-21] y también por otros tratamientos como ablación por láser,[16, 17, 22] y descarga por arco eléctrico.[23] Uno de los problemas principales en la síntesis de C-dots es la formación de nanopartículas (NP) que presentes una distribución de tamaño de partícula estrecha y con propiedades físicas uniformes. Generalmente la carbonización hidrotermal se lleva a cabo en una fase líquida homogénea y el control de las dimensiones de los C-dots solo es posible mediante optimización de las condiciones experimentales de síntesis.


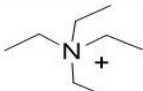

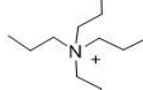

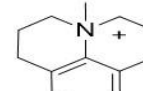

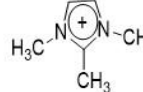
En el presente Capítulo hemos aprovechado el espacio confinado definido por una matriz rígida de zeolita con estructura LTA para preparar C-dots que exhiben una elevada fluorescencia. Puesto que un gran número de zeolitas se preparan empleando agentes directores de estructura para controlar la polimerización de la sílice y la creación de canales y cavidades de dimensiones nanométricas [24-26] especulamos que tras las síntesis del material las moléculas orgánicas atrapadas en el interior de la matriz inorgánica podrían ser precursores adecuados para la preparación de C-dots con una distribución de tamaños uniforme. Las zeolitas son sólidos cristalinos donde la localización y posición de los componentes orgánicos en el interior del sistema microporoso está definido estrictamente. Por consiguiente el sólido puede ser considerado como una matriz rígida que determina el confinamiento durante el proceso de carbonización del agente director de estructura partiendo de un estado inicial definido que se origina por el auto ensamblaje de estos compuestos y que proporcionan compartimentalización que permitiría la separación de los puntos cuánticos en el proceso de carbonización. Además el proceso puede llevarse a cabo en estado sólido en ausencia de cualquier disolvente. La influencia en las propiedades de fotoluminiscencia de los C-dots debido a la posible interacción superficial con las moléculas de disolvente podría minimizarse de esta manera.

La estabilidad térmica y la falta de reactividad química de la estructura de la zeolita en tratamientos térmicos podría ser la causa de una menor interferencia en la formación de los puntos cuánticos de carbono por pirólisis de zeolitas conteniendo agente director de estructura. Existen precedentes en la literatura en los cuales aluminofosfatos cristalinos tales como AIPO-5 con una estructura monodireccional constituidos por canales paralelos conteniendo iones tripropilamonio han sido usados en la preparación de C-dots,[27] pero se ha descrito que este material ALPO es más adecuado para la formación de nanotubos de carbono de pared única con un tamaño de diámetro muy pequeño en vez de exhibir preferencia por los puntos cuántico.[28-34] De esta manera parece que la topología de los microporos condiciona la morfología 0D ó 1D de las estructuras de carbono que se forman.

6.2- Resultados y discusión.

En el presente capítulo se han seleccionado cuatro zeolitas diferentes todas ellas en su forma pura sílice y que contienen un agente director de estructura tras su síntesis. Estas zeolitas presentan tamaño de poro grande (zeolita Beta), medio (silicalita) o pequeño (ITQ-29 o ITQ-12). La Tabla 6.1 resume las principales características estructurales de estas cuatro zeolitas junto con la estructura química del catión de amonio cuaternario empleado para su síntesis. Las cuatro zeolitas fueron preparadas en su forma totalmente sílicea a fin de evitar la interacción de los agentes directores de estructura con posibles centros ácidos que se generasen en las formas conteniendo aluminio.

Tabla 6.1- Geometría, tamaño de poro y estructura química del catión de amonio cuaternario presente en las zeolitas usadas en el presente capítulo.

Zeolita	Estructura	Geometría del poro	Agente director de estructura
Beta (BEA)		Ovalo tridimensional cajas (0.7×1.1 nm ²).	
ZSM-5 (MF)		Bidireccional con dos intersecciones y con canales (0.54×0.56 nm ²).	
ITQ-29 (LTA)		Cavidades largas (1.4 nm) conectados a través de pequeñas cavidades circulares de 0.5 nm.	
ITQ-12 (ITW)		Cajas largas oblongas (0.39×9.6×0.85 nm ³) con cavidades elípticas (0.39×4.1 nm ²).	

Todos los intentos de formar C-dots usando zeolitas de poro grande (0.7 nm) o medio (0.54 nm) fueron infructuosos. Al aumentar la temperatura del tratamiento térmico en el rango de 350 a 700 °C en estos dos tipos de zeolitas, se observó la eliminación completa de la sal de amonio cuaternario tal y como se deduce del análisis químico de combustión en los sólidos que se recuperan tras la pirólisis. La falta de formación de C-dots puede ser debida a la combinación de una serie de factores entre los que se incluyen la mayor dimensión de los poros que facilita la difusión hacia el exterior de las sales de amonio cuaternario y sus productos de descomposición y la estructura cuaternaria de los iones de amonio usados como plantilla que se trata de compuestos alifáticos, más fáciles de descomponer y volatilizar. En contraste, en el caso

de las zeolitas de poro pequeño existirá una mayor restricción a la salida de compuestos orgánicos de su estructura, ya que únicamente gases como el N₂, O₂ y CO₂ puedan difundir libremente por ella. Además, los agentes directores de estructura en este caso son compuestos aromáticos que presentan una mayor estabilidad estructural. Así, la zeolita ITQ-29 presenta una estructura cristalina cubica tipo LTA donde se observó la formación de puntos cuánticos de carbono. De esta manera una muestra de zeolita ITQ-29 donde existen cavidades grandes de tamaño 1.4 nm que presentan aperturas de muy pequeño diámetro de 0.41 nm, da lugar por pirolisis a sólidos que presentaban una fotoluminiscencia muy intensa que sugería la presencia de C-dots. La zeolita ITQ-29 pura sílice que contiene tras su síntesis una mezcla de dos agentes directores de estructura, tetrametilamonio y 4-metil-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H-Pirido(3.2.1-ij) quinolinio (ver estructura en Tabla 1) fue sometida a tratamiento térmico en atmósfera inerte a tres temperaturas diferentes a saber 450, 550 y 750 °C durante periodos de tiempo diferentes, dio lugar a materiales con elevada fotoluminiscencia (Tabla 6.2). Se determinó que un tratamiento térmico de 24 h era en nuestras condiciones, adecuado para preparar muestras que poseen una intensidad de emisión considerable.

Tabla 6.2- Influencia del tiempo de tratamiento en la intensidad de fotoluminiscencia de muestras de zeolitas ITQ-29 pirolizadas a tres temperaturas diferentes.^a

Tiempo (h)	Intensidad de emisión (cuentas)			
	T (°C)	350	550	750
3	-	-	-	-
12	-	< 500	3856	3856
24	< 500	9778	5868	5868
72	6194	3912	< 500	< 500

^aLas rayas corresponden a ensayos donde no se observa fotoluminiscencia.

El contenido de carbono de las muestras de ITQ-29 pirolizadas durante 24 h se determinó por análisis elemental de combustión. La Tabla 6.3 presenta los valores de contenido de carbono, nitrógeno, hidrógeno para muestras de zeolita ITQ-29 tras su síntesis y después de ser sometida al tratamiento térmico bajo atmosfera inerte a la temperatura indicada. La muestra 2 (ver Tablas 2 y 3) fue el sólido que exhibió la mayor intensidad de fotoluminiscencia lo que indica que las condiciones del tratamiento térmico son las óptimas para conseguir C-dots con una mayor intensidad de emisión. Esta mayor intensidad de emisión podría ser debida al mayor contenido en carbono del sólido, a la composición en los C-dots que posee un contenido de nitrógeno bajo pero aún detectable, y/o una mayor densidad de centros emisores generados bajo estas condiciones.

Tabla 6.3- Datos analíticos de las muestras ITQ-29 tras su síntesis y posterior tratamiento de pirolisis en atmósfera de argón a diferentes temperaturas.

Muestra ITQ-29	T (°C)	C %	N %	H%
0 (as-synthesised)	-	18.17	2.09	2.61
1	350	16.64	1.98	2.18
2	550	14.64	1.59	0.84
3	750	0.39	0.08	0.05

Como puede verse en la Tabla 6.3, la tendencia general es que el contenido en carbono disminuye al aumentar la temperatura de pirolisis. Temperaturas de 750 °C conducen a la casi completa eliminación de la materia orgánica en la zeolita.

Un ajuste más fino de la temperatura de pirolisis a fin de conseguir muestras con aún mayor intensidad de fluorescencia se llevó a cabo en el rango de temperaturas entre 450 y 600 °C. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.4. Como se observa en esta Tabla, todas las muestras de ITQ-29 sometidas a tratamientos de pirólisis fueron altamente luminiscentes, Siendo 550 °C la temperatura que alcanza mayor intensidad de emisión. La disminución del contenido de materia orgánica (550 a 600 °C), la variación de la composición elemental (contenido en nitrógeno) y la estructura de los C-dots (de 450 a 550 °C) podrían ser las causas responsables de estas variaciones en la intensidad relativa de emisión dependiendo de la temperatura del tratamiento.

Tabla 6.4- Intensidades de emisión relativas (longitud de onda de excitación 300 nm) junto con datos de análisis elemental para muestras de ITQ-29 sometidas a pirolisis bajo argón durante 24 h a la temperatura indicada.

T (°C)	Intensidad de emisión (cuentas)	Porcentaje %		
		C	N	H
450	4291	16.02	1.79	1.31
500	6118	15.34	1.70	1.15
550	9778	14.64	1.59	0.84
600	8075	12.78	1.46	0.65

Conviene comentar que se observó una eliminación similar de materia *orgánica* para muestras de zeolitas de poro medio y grande, pero a temperaturas considerablemente más bajas, lo que parece que no hace posible la formación de C-dots, cuya generación requiere temperaturas iguales o superiores a 450 °C. Podría ocurrir que el éxito en el proceso de carbonización de la Zeolita ITQ-29 derive de la combinación de una geometría de poros consistente en grandes cavidades con pequeñas ventanas que no permiten la salida del agente director de estructura ni de sus productos de descomposición (ver Tabla 6.1) y, por otro lado, la estructura rígida policíclica del catión de amonio cuaternario derivado del quinolinio que le impide adaptar su

conformación para escapar por las ventanas sin antes sufrir una degradación considerable. Estas hipótesis fueron apoyadas por ensayos en los que otras zeolitas de poro pequeño a saber la ITQ-12 con una red de tipo ITW (ver tabla 6.1) fue sometida a pirolisis a 550 °C durante 24 h en las mismas condiciones en las que se trató la zeolita ITQ-29, la muestra de zeolita ITQ-12 sometida al tratamiento de pirolisis exhibió una intensa emisión azul (longitud de onda del máximo de emisión a 430 nm) indicando que se forman en el proceso especies del tipo C-dots fotoluminiscentes, como ya habíamos observado para el caso de la zeolita ITQ-29. La cantidad de C-dots formados se cuantifica adecuadamente mediante el porcentaje de carbono en el sólido tras la pirolisis y fue de 9.52 % para la ITQ-12, con una intensidad relativa de emisión de las muestras ITQ-12 pirolizadas similar a las que se determinan para las muestras de zeolita ITQ-29 pirolizadas en las mismas condiciones.

El análisis termogravimétrico (TG) de las muestras pirolizadas incluidas en la Tabla 6.2. se comparó con el de la muestra de la zeolita tras su síntesis (muestra nº **0**, ver Figura 6.1). Los perfiles de TG estuvieron de acuerdo con los datos de análisis elemental de combustión, mostrando que la muestra pirolizada a 750 °C no contiene prácticamente ningún material orgánico (curva 3 en Figura 6.1.), mientras que en el caso de las muestra **0** correspondiente a la zeolita tras su síntesis ó el material **1** obtenido por pirolisis a 350 °C, la calorimetría diferencial de barrido presentó varios procesos de descomposición. En contraste la calorimetría diferencial de barrido para la muestra más fluorescente, muestra **2**. (Curva 2 en Figura 6.1) presenta un único pico de combustión bien definido cuyo máximo se encuentra a 630 °C lo que significa que la materia orgánica residual tras la carbonización posee propiedades uniformes bien definidas con respecto a su combustión aeróbica.

Evidencia firme de que la pirolisis a 550 °C conduce la formación de C-dots atrapados por la matriz microporosa de la zeolita ITQ-29 se obtuvo mediante microscopia óptica de fluorescencia y espectroscopia de emisión. Microscopia óptica por fluorescencia muestra que las partículas de zeolitas sometidas a pirolisis a 550 °C presentan una intensa fluorescencia amarilla cuando son iluminadas con luz azul (Figura 6.2. c). La muestra **2** emite incluso cuando es iluminada con luz de 500-550 nm que es a partir de esta longitud de onda donde presenta mayor penetración en tejidos y, por tanto, es de mayor interés en biología. Este comportamiento de fotoluminiscencia contrasta notablemente con el que presentan las otras muestras de zeolitas **0** y **1**; indicando que el catión amonio de tipo quinolinio ha sufrido transformación en las condiciones de pirolisis.

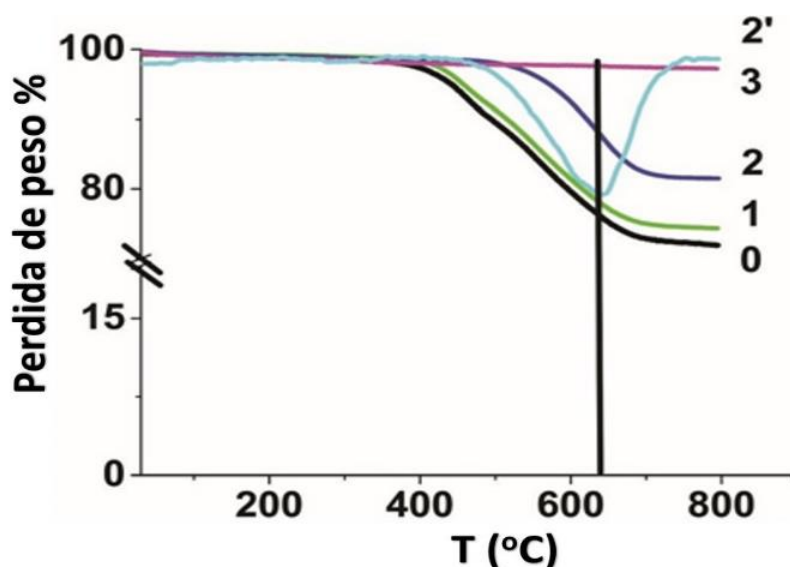


Figura 6.1- Perfiles termogravimétricos para las muestras ITQ-29. Siendo la numeración de las muestras igual que en la Tabla 6.3. El perfil de termogravimetría medido para la muestra **2** se indica igualmente en la figura (curva **2'**) a fin de mostrar la uniformidad del residuo carbonizado presente en la muestra ITQ-29 sometida al tratamiento a 550 °C. La línea vertical a la temperatura de 630 °C, corresponde al máximo de la curva de calorimetría diferencial. El valor negativo de esta curva indica combustión de la materia orgánica.

Los espectros de fotoluminiscencia se registraron excitando la muestra **2** a diferentes longitudes de onda en el rango entre 300 y 500 nm. La Figura 6.3 muestra los espectros de absorción y emisión registrados para esta muestra. La variación de los espectros de emisión en función de la longitud de onda de excitación es una de las principales características que distinguen a los C-dots, respecto a otras especies fotoluminiscentes.[8] Hay que indicar que en nuestro caso los C-dots contienen algún porcentaje de nitrógeno tal como indican los datos de análisis elemental y que hay precedentes en la literatura química, publicaciones que muestran que el dopaje con nitrógeno aumenta la intensidad de emisión en los C-dots.[35]

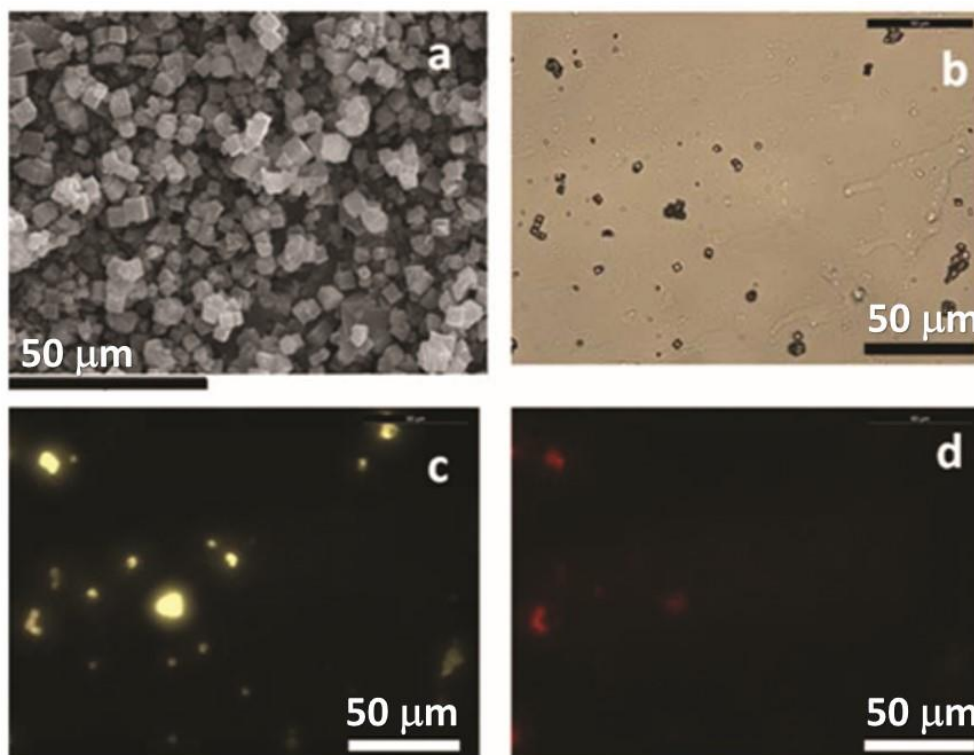


Figura 6.2- (a) Imagen de la muestra de zeolita ITQ-29 obtenida por microscopía electrónica de barrido. La barra de escala corresponde a 50 μm . Imágenes tomadas con microscopio óptico de la muestra 2, (b) utilizando el campo claro, (c) imagen tomada utilizando el campo oscuro, iluminada con luz azul ($\lambda < 400$ nm) y detectando la imagen con un filtro que permite el paso de longitudes de onda mayores de 450nm y (d) imagen tomada utilizando el campo oscuro, iluminada con luz verde ($\lambda < 500$ nm) y detectando la imagen con un filtro que permite el paso de longitudes de onda mayores de 550nm. Es importante comentar que el color de la zeolita bajo luz blanca es marrón.

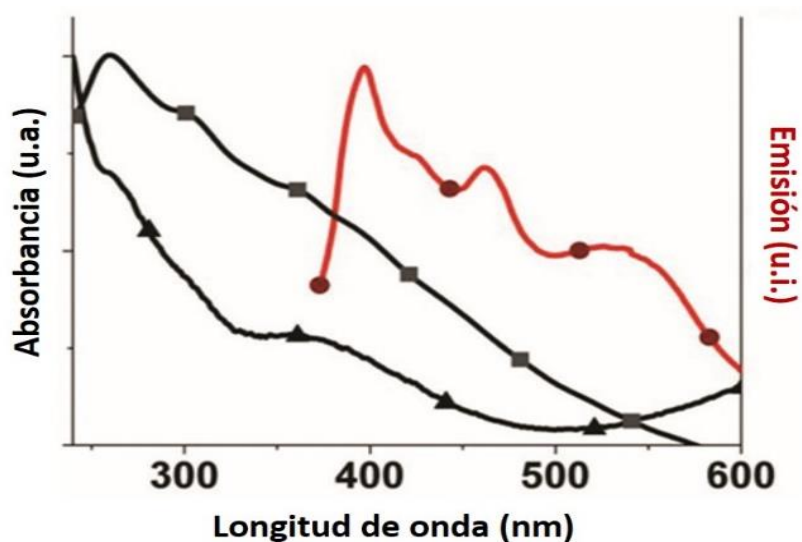


Figura 6.3- Espectro de absorción de UV-Vis medido para muestras de zeolita ITQ-29, ($0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en acetonitrilo. Las curvas corresponden a las muestras 0 (▲) y 2 (■) y el espectro de emisión registrado para la muestra 2 (●), $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en acetonitrilo excitando a 300 nm.

A fin de confirmar firmemente la formación de C-dots en el interior de la zeolita ITQ-29, la muestra **2** se sometió a la disolución del silicato, mediante una disolución de ácido fluorhídrico concentrado. Existen precedentes trabajando con polímeros del tipo poliacetileno que son notablemente inestables, así como de otros polímeros conductores, que han mostrado que el tratamiento con HF permite la disolución de la zeolita sin alterar la estructura de estos polímeros orgánicos conductores que en principio, tienen mayor reactividad.[36, 37] En general los compuestos orgánicos son más estables frente al tratamiento con HF que la red de aluminosilicato de la zeolita. En particular la zeolita pura sílice ITQ-29 es un material fácilmente atacable por HF.[38] Sin embargo, hay que tomar en consideración que la digestión con HF concentrado, incluso a temperaturas próximas a la temperatura ambiente, podría producir alteraciones en el residuo carbonado original particularmente en lo que respecta a la morfología, tamaño y propiedades fotoluminiscentes del residuo libre, comparado con los C-Dots atrapados en los microporos. A fin de determinar posibles cambios en los C-Dots durante el proceso de disolución de la zeolita, se estudió la influencia del pH de una disolución acuosa en la que se suspende la muestra **2** en su espectro de emisión, observando cambios poco significativos en la longitud de onda del máximo de emisión, siendo el cambio más sobresaliente el que la intensidad del pico a 450 nm casi desaparece completamente a valores de pH ácidos.

Tras disolver la zeolita, el líquido resultante fue extraído con acetato de etilo a fin de recuperar el residuo carbonoso derivado de la pirólisis del agente plantilla que puede ser soluble en disolventes orgánicos. Hay que hacer notar que la alta concentración de sales inorgánicas y la presencia de HF hacen imposible el estudio directo de la disolución resultante tras el ataque de la zeolita con HF, por la mayoría de las técnicas y que el HF corroe los materiales de vidrio ó cuarzo empleados en espectroscopia. El contenido disuelto en acetato de etilo tras extracción de la disolución acuosa formada al disolver la zeolita fue fuertemente fotoluminiscente, lo que parece indicar que este procedimiento experimental para recuperar el residuo conteniendo C-Dots es adecuado. La Figura 6.4 muestra los espectros de absorción UV-visible y de emisión de los C-Dots recuperados al disolver la muestra de zeolita **2**.

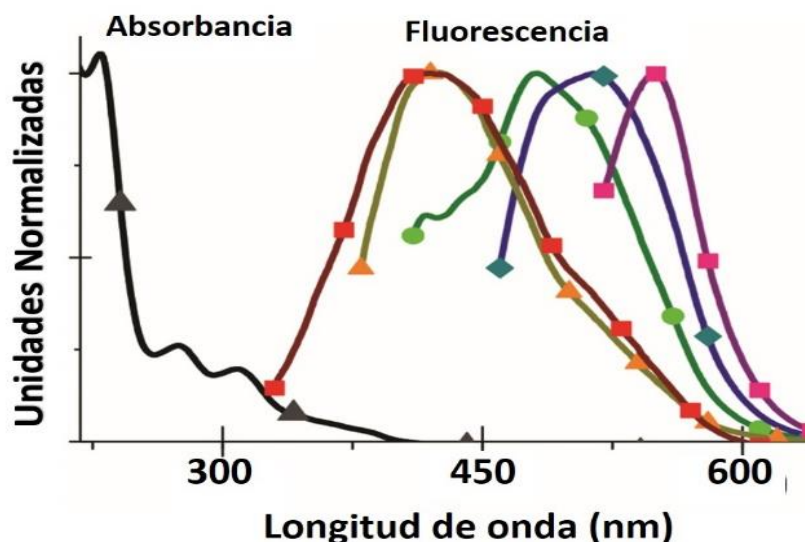


Figura 6.4- Espectro de absorción (\blacktriangle) y una serie de espectros de emisión registrados a excitar a 300 (\blacksquare), 350 (\blacktriangle), 400 (\bullet), 450 (\blacklozenge) y 500 nm (\blacksquare) de los C-Dots extraídos al disolver en acetato de etilo la muestra de zeolita 2. La concentración de los C-Dots fue de 0.1 mg/mL^{-1} y la calibración de la línea de base se llevó a cabo usando disolvente acetonitrilo puro. Los espectros han sido normalizados para su mejor presentación.

La Figura 6.4 muestra el espectro de absorción de este extracto soluble en disolventes orgánicos y que se caracteriza por la presencia de cuatro bandas de absorción, una de ellas ancha entre 320 y 410 nm, y tres máximos relativos a 230, 275 y 308 nm. Es digno de comentar que en los precedentes en la literatura los espectros de absorción de C-dots no presentan bandas bien definidas, lo que contrasta con el extracto obtenido al disolver la muestra de zeolita 2.[8] Podría ser que la formación de C-dots por pirolisis del agente plantilla en el espacio confinado definido por las cavidades de la zeolita ITQ-29 en torno a 1.4 nm, fuera el factor responsable para la formación de C-dots con una distribución de tamaños más uniforme que las que se obtienen en los procedimientos de preparación en disolución. Existen precedentes en la literatura que muestran que el tamaño de partícula homogéneo en el caso puntos cuánticos de MoS_2 de unos pocos nanómetros, conduce a bandas de absorción definidas contrastando con los espectros de absorción continuos y sin bandas aparentes que se registran para muestras de este mismo tipo de puntos cuánticos que poseen una distribución de tamaño ancha.[39, 40] En general, bandas de absorción definidas parecen corresponder con muestras de C-dots con estructura y distribución de partícula definida.

Como era de esperar el material extraído con acetato de etilo fue fuertemente fotoluminiscente, observando que la posición del máximo de emisión (λ_{em}) se desplaza hacia el rojo a medida que la longitud de onda de excitación aumenta en el rango aproximado entre 300 y 550 nm. La longitud de onda de excitación determina igualmente el desplazamiento de Stokes y la anchura de la emisión. Así, el desplazamiento de Stokes varía entre 50 y 90 nm cuando la longitud de

onda de excitación es entre 350 y 400 nm. Además la anchura del pico a mitad de altura varía entre 100 y 40 nm cuando la longitud de onda de excitación es 400 o 500 nm, respectivamente. Tal como se ha comentado en el capítulo de introducción, esta influencia en la longitud de onda de excitación sobre el espectro de fotoluminiscencia es una de las principales características específicas que poseen los C-dots,[8] que los hacen diferentes del resto de materiales fotoluminiscentes y, más en particular, de los calcogenuros metálicos con tamaños de puntos cuánticos.

Una evidencia concluyente a favor de la formación de C-dots en el proceso de pirólisis de los agentes directores de estructura atrapados en la zeolita ITQ-29 se obtuvo mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM) del material presente en la disolución en la muestra de la zeolita y extraído posteriormente con acetato de etilo.

La figura 6.5 muestra dos imágenes seleccionadas de HR-TEM a dos magnificaciones diferentes de la muestra extraída con acetato de etilo tras la disgregación de la muestra de zeolita **2**. Como puede verse en esta Figura, el extracto orgánico contiene NP de tamaños comprendidos entre 5-9 nm. Estos valores son mucho mayores que los que podrían esperarse teniendo en cuenta la dimensión de las cavidades de zeolita ITQ-29 (1.4 nm) y podrían reflejar un aumento de tamaño durante la disolución de la zeolita en HF concentrado y en su posterior extracción con disolvente orgánico. Alternativamente las dimensiones de los C-Dots considerablemente mayores de las cavidades de la zeolita ITQ-29 podrían ser debidas a fenómenos de difusión del agente plantilla dentro de los poros que conectan varias cavidades a medida que el C-Dots se está formando. Esta segunda posibilidad parece menos probable en base a la estructura de la zeolita ITQ-29 y las dimensiones de sus poros. En cualquier caso, estas imágenes obtenidas por HR-TEM proporcionan un apoyo firme a la formación de NPs en el proceso de pirólisis del agente plantilla encapsulado en el interior de la zeolita ITQ-29. La aglomeración aparente de los C-Dots en la figura 6.5 ha tenido que ocurrir, al menos en parte, durante la evaporación del disolvente en el proceso de preparación de la muestra sobre la rejilla de cobre.

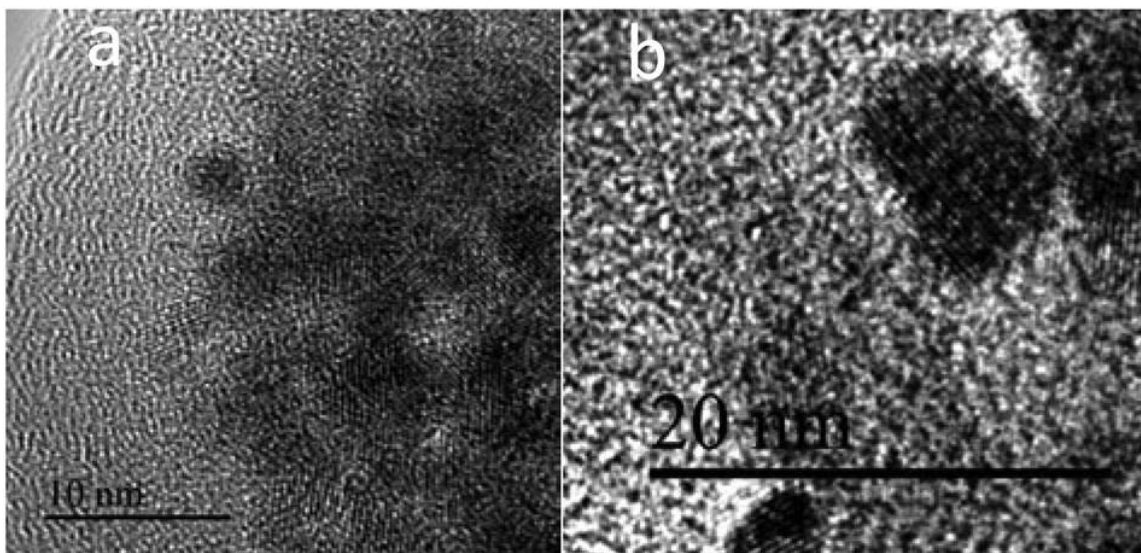


Figura 6.5- Imágenes de HR-TEM al depositar sobre una rejilla de cobre recubierta por carbono una gota de una suspensión de C-Dots en acetonitrilo que ha sido previamente sometida a tratamiento por ultrasonidos. Estos C-Dots provienen de la muestra **2** sometida a pirólisis a 550 °C.

A fin de determinar el tamaño de las partículas presentes en la suspensión coloidal, se llevaron a cabo medidas de distribución de tamaños mediante la técnica de dispersión dinámica de un haz de láser para una suspensión de C-dots en acetonitrilo. Se observó una distribución monomodal centrada a 380 nm. Puesto que la dimensión de las partículas en la fase líquida es mucho mayor que el tamaño de partícula determinado por HR-TEM es razonable suponer que bien existe un cierto grado de agregación de las NPs de C-dots cuando éstas se encuentran suspendidas en una fase líquida, o bien el diámetro observado corresponde a la dimensión de la NP de C-dot más las moléculas de disolvente fuertemente asociadas a la superficie del C-dot.

Una de las cuestiones que permanecen por resolver en los C-dots es como conseguir aumentar los rendimientos cuánticos de fotoluminiscencia. Valores típicos para los rendimientos cuánticos de fotoluminiscencia de los C-dots (Φ_{fl}) son inferiores a 0.1, aunque en algún caso aislado se ha descrito que el Φ_{fl} aumenta al pasivar la superficie de los C-dots, llegando a valores de 0.6.[8] En el presente caso, se procedió a determinar el Φ_{fl} cuando la muestra de C-dots se suspendió en disolvente orgánico y se excitó a 350 nm, mediante la comparación de la intensidad de emisión medida para el C-dots con la de una disolución con la misma densidad óptica a 350 nm utilizando como patrón antraceno ($\Phi_{fl} = 0.3$).[41] El valor de Φ_{fl} obtenido en esta medida para los C-dots extraídos tras disolver la zeolita ITQ fue de 0.4. Este valor de Φ_{fl} es comparativamente elevado, particularmente considerando que los C-dots provenientes de la zeolita no han sido sometidos a una funcionalización de su superficie como, por ejemplo, mediante la unión covalente de cadenas de polietilenglicol (PEG) que tienen por objeto la pasivación de su superficie y que es un

procedimiento habitual para aumentar los valores de Φ_{fl} que han permitido alcanzar rendimientos de fotoluminiscencia 0.6.[8, 42] Podría ocurrir que Φ_{fl} de los C-dots cuando estos se encuentran encapsulados en el interior de la zeolita fuera incluso superior a 0.4, aunque desafortunadamente la falta de transparencia de muestras opacas como la muestra **2** no permite la determinación de los valores absolutos de Φ_{fl} antes de disolver la estructura de la zeolita y proceder a la extracción de los C-dots. Conviene además resaltar que, de acuerdo con el análisis químico, los C-dots obtenidos por pirólisis de los derivados de quinolinio contienen nitrógeno y que existe un precedente reciente describiendo que el dopaje con átomos de nitrógeno puede servir para aumentar los valores de Φ_{fl} . [35] Es bastante probable que, también en el presente caso, los valores elevados de Φ_{fl} puedan ser debidos, al menos en parte, al dopaje de los C-dots con nitrógeno.

Para obtener información adicional sobre la posible influencia de la presencia de nitrógeno como agente dopante en la fotoluminiscencia, se llevó a cabo el análisis por XPS de la muestra de zeolita ITQ-29 tras su síntesis y la muestra **2** resultante tras la pirolisis a 550 °C. La Figura 6.6 presenta los picos experimentales de XPS para el C 1s y el N 1s, así como la deconvolución de estos picos en sus componentes primarios. Indicándose los valores de energía de enlace y la proporción atómica relativa de cada tipo de componente individual. La asignación de los componentes individuales para cada pico se llevó a cabo en base a los valores de energía de enlace comparándolos con los valores descritos en la literatura, [43, 44] aunque cabe indicar que la energía de enlace para átomos de carbono enlazadas a oxígeno serían similares a los valores para átomos de carbono enlazadas a nitrógeno que es el elemento presente en la estructura de la sal de amonio cuaternario (Ver Tabla 6.1).

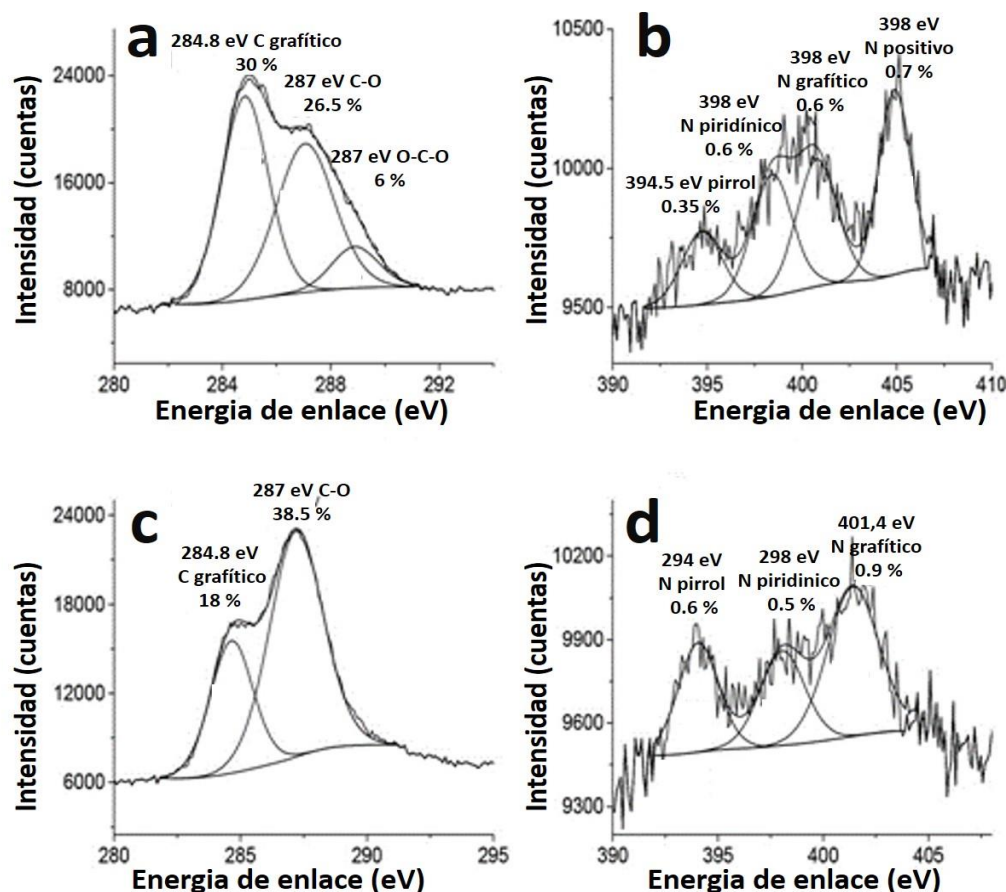


Figura 6.6- Picos de XPS de C 1s (a y c) y N 1s (b y d) y la mejor deconvolución en componentes individuales medidos para las muestras **0** (a y b) y **2** (c y d).

Como era de esperar el proceso de pirólisis da lugar a cambios drásticos en la forma y posición de los picos de XPS para el carbono y el nitrógeno. Aunque la composición atómica relativa de C (aproximadamente 60%) y N (aproximadamente 2%) no parece cambiar por el tratamiento térmico, la naturaleza de los átomos de C y N sufre una variación considerable como consecuencia de la pirólisis. Así el componente atribuible a los átomos de nitrógeno cargados positivamente que se observa en la muestra **0** desaparece completamente en la pirólisis estando totalmente ausente en la muestra **2**. Por el contrario la muestra **2** presenta un aumento en los porcentajes de átomos grafiticos (átomos de nitrógeno sp^2 enlazados a 3 carbonos sp^2) y N de tipo pirrólico. También en el pico C 1s se observó un aumento relativo en el porcentaje de átomos grafiticos en la muestra **2** respecto a la muestra **0**, estableciéndose que un porcentaje de átomos C están enlazados a átomos N.

De esta manera los datos de XPS muestran que los C-dots se encuentran dopados con nitrógeno y que una proporción elevada de estos átomos carbono se encuentra enlazados a átomos de nitrógeno. De acuerdo con esta información, el origen de la fotoluminiscencia podría ser la recombinación emisiva de electrones y huecos presumiblemente atrapados en defectos en la

estructura de los C-dots que es el mecanismo más comúnmente aceptado para racionalizar la emisión en este tipo de NPs.[8]

La emisión intensa de los C-dots generados en la pirolisis de la zeolita ITQ-29 conteniendo iones quinolinio como agente de estructura puede aplicarse para el desarrollo de sensores basados en el fenómeno de fluorescencia. Considerando que el mecanismo de fluorescencia es el que se acaba de comentar en el párrafo anterior, es decir la recombinación emisiva de e^-/h^+ , y que el oxígeno debería actuar como un inhibidor de esta emisión debido al atrapamiento de los e^- lo que haría imposible el proceso de recombinación de cargas, cabría anticipar que las muestras tras la pirolisis de la ITQ-29 pudieran ser sensores de oxígeno. De acuerdo con nuestra hipótesis, aquellas muestras de C-dots con una elevada fluorescencia como son los C-dots obtenidos en el presente capítulo podrían servir como sensores de oxígeno, los cuales poseen diferentes aplicaciones como en el envasado de alimentos, detección de fugas en depósitos sellados o determinar la presencia de oxígeno disuelto en combustible.[45, 46] En el presente caso se sometió una disolución de C-dots en acetonitrilo a ciclos consecutivos de exposición a corrientes de nitrógeno y de oxígeno alternativamente. La Figura 6.7 muestra la variación de la intensidad de emisión medida a 500 nm por excitación a 350 nm dependiendo de la naturaleza del gas (flujo $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). Como puede verse en esa Figura el nitrógeno aumenta la intensidad de emisión hasta un máximo que corresponde a un valor de $16.500.000 \pm 60000$ cuentas, mientras la presencia de oxígeno disminuye el valor de intensidad hasta un número de cuentas de $12.240.000 \pm 20.000$ cuentas. Este proceso cíclico en la intensidad de emisión fue casi completamente reversible y reproducible para ciclos consecutivos, tal como se puede observar en la Figura 6.7.

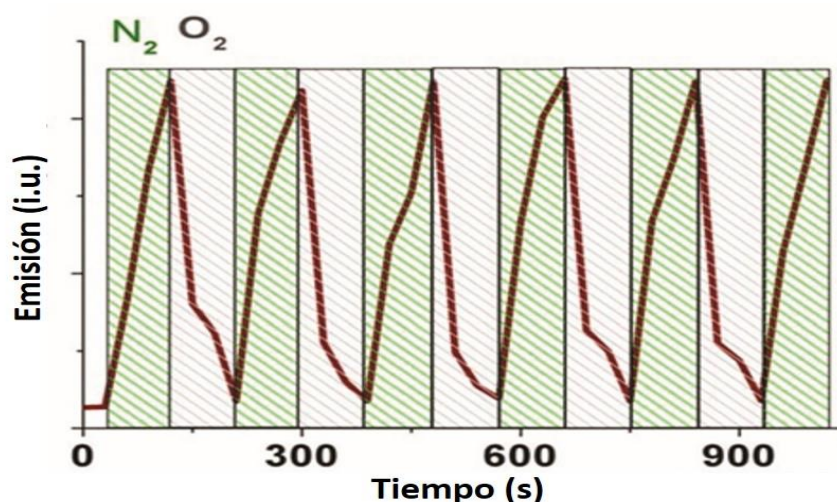


Figura 6.7- Variación de la intensidad de fotoluminiscencia medida a 500 nm ($\lambda_{\text{ex}}=350$ nm) en función de la naturaleza N_2 o O_2 de un flujo de gas ($0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ de gas puro) tal como se indica en la figura, medido en una cubeta de cuarzo que contiene una disolución en acetonitrilo de C-dots (densidad óptica a 350 nm de 0.3 a.u.) obtenida por extracción por una muestra de zeolita ITQ-29 sometida a pirolisis a 550°C (muestra 2).

6.3- Conclusiones.

En el presente Capítulo se ha presentado como dependiendo de la geometría y dimensiones de los microporos, así como de la naturaleza del agente director de estructura, zeolitas de poro pequeño presentando cavidades grandes y conteniendo iones amonio cuaternario rígidos forman C-Dots altamente fluorescentes cuando se someten a pirólisis a temperaturas adecuadas. Así se ha descrito que la zeolita ITQ-29 pura sílice es un precursor adecuado para este propósito, contrastando el comportamiento de esta zeolita con el de zeolitas de poro medio y grande que no dan lugar a la formación de C-dots en cantidades significativas. Tras la pirólisis a 550 °C la muestra resultante de la zeolita ITQ-29 emite fotoluminiscencia amarilla al ser iluminada con luz azul e incluso fotoluminiscencia roja por iluminación con luz verde. Los C-dots atrapados en los poros de la zeolita pueden ser recuperados por disolución de la estructura de la zeolita con HF concentrado y extracción posterior del líquido resultante con disolventes orgánicos hidrofóbicos. Los rendimientos cuánticos medidos para los C-dots extraídos de zeolita ITQ-29 pirolizadas a 550 °C fueron de 0.4 para muestras que presentan una distribución de tamaño de partícula entre 4 y 9 nm. Estos C-dots pueden actuar como sensores de oxígeno basados en las variaciones en la intensidad de la fotoluminiscencia en función de la concentración de este gas.

Considerando el elevado número de zeolitas conocidas y la posibilidad de sintetizar algunas de ellas en un amplio rango de composiciones, los resultados obtenidos permiten abrir una nueva línea de investigación encaminada a la búsqueda de zeolitas con propiedades óptimas para la preparación de C-dots altamente fluorescentes.

6.4- Referencias.

1. An, B.K., et al., *Enhanced emission and its switching in fluorescent organic nanoparticles*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(48): p. 14410-14415.
2. Chen, Y.F. and Z. Rosenzweig, *Luminescent CdS quantum dots as selective ion probes*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(19): p. 5132-5138.
3. Link, S. and M.A. El-Sayed, *Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals*. International Reviews in Physical Chemistry, 2000. **19**(3): p. 409-453.
4. Liong, M., et al., *Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery*. Acs Nano, 2008. **2**(5): p. 889-896.
5. Medintz, I.L., et al., *Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing*. Nature Materials, 2005. **4**(6): p. 435-446.
6. Resch-Genger, U., et al., *Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels*. Nature Methods, 2008. **5**(9): p. 763-775.
7. Sapsford, K.E., L. Berti, and I.L. Medintz, *Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: Beyond traditional donor-acceptor combinations*. Angewandte Chemie-International Edition, 2006. **45**(28): p. 4562-4588.
8. Zhu, S., et al., *Highly Photoluminescent Carbon Dots for Multicolor Patterning, Sensors, and Bioimaging*. Angewandte Chemie-International Edition, 2013. **52**(14): p. 3953-3957.
9. Cao, L., et al., *Carbon dots for multiphoton bioimaging*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(37): p. 11318-+.
10. Esteves da Silva, J.C.G. and H.M.R. Goncalves, *Analytical and bioanalytical applications of carbon dots*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2011. **30**(8): p. 1327-1336.
11. Shen, J., et al., *Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices*. Chemical Communications, 2012. **48**(31): p. 3686-3699.
12. Sun, Y.P., et al., *Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(24): p. 7756-7757.
13. Sun, Y.-P., et al., *Doped Carbon Nanoparticles as a New Platform for Highly Photoluminescent Dots*. Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(47): p. 18295-18298.
14. Wang, F., et al., *White light-emitting devices based on carbon dots' electroluminescence*. Chemical Communications, 2011. **47**(12): p. 3502-3504.

15. Yang, S.-T., et al., *Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents*. Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(42): p. 18110-18114.
16. Atienzar, P., et al., *Preparation of Graphene Quantum Dots from Pyrolyzed Alginate*. Langmuir, 2013. **29**(20): p. 6141-6146.
17. Wang, Y., et al., *Practical access to bandgap-like N-doped carbon dots with dual emission unzipped from PAN@PMMA core-shell nanoparticles*. Journal of Materials Chemistry C, 2013. **1**(46): p. 7731-7735.
18. Yang, Y., et al., *Bottom-up fabrication of photoluminescent carbon dots with uniform morphology via a soft-hard template approach*. Chemical Communications, 2013. **49**(43): p. 4920-4922.
19. Liu, Y., et al., *One-step microwave-assisted polyol synthesis of green luminescent carbon dots as optical nanoprobes*. Carbon, 2014. **68**: p. 258-264.
20. Rajendran, R., et al., *One-Pot Microwave Synthesis of Fluorescent Carbogenic Nanoparticles from Triton X-100 for Cell Imaging*. European Journal of Inorganic Chemistry, 2014. **2014**(2): p. 392-396.
21. Zhang, Y.-Y., et al., *A new hydrothermal refluxing route to strong fluorescent carbon dots and its application as fluorescent imaging agent*. Talanta, 2014. **117**: p. 196-202.
22. Habiba, K., et al., *Luminescent graphene quantum dots fabricated by pulsed laser synthesis*. Carbon, 2013. **64**: p. 341-350.
23. Su, Y., et al., *Facile synthesis and photoelectric properties of carbon dots with upconversion fluorescence using arc-synthesized carbon by-products*. Rsc Advances, 2014. **4**(10): p. 4839-4842.
24. Cundy, C.S. and P.A. Cox, *The hydrothermal synthesis of zeolites: History and development from the earliest days to the present time*. Chemical Reviews, 2003. **103**(3): p. 663-701.
25. Davis, M.E. and R.F. Lobo, *ZEOLITE AND MOLECULAR-SIEVE SYNTHESIS*. Chemistry of Materials, 1992. **4**(4): p. 756-768.
26. Cundy, C.S. and P.A. Cox, *The hydrothermal synthesis of zeolites: Precursors, intermediates and reaction mechanism*. Microporous and Mesoporous Materials, 2005. **82**(1-2): p. 1-78.
27. Wang, Y., et al., *Luminescent carbon dots in a new magnesium aluminophosphate zeolite*. Chemical Communications, 2013. **49**(79): p. 9006-9008.
28. Wang, Z., et al., *Superconductivity in 4-Angstrom carbon nanotubes-a short review*. Nanoscale, 2010. **4**(1): p. 21-41.

29. Lortz, R., et al., *Superconducting characteristics of 4-angstrom carbon nanotube-zeolite composite (vol 106, pg 7299, 2009)*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(22): p. 9121-9121.
30. Wang, Z., et al., *Superconducting resistive transition in coupled arrays of 4 angstrom carbon nanotubes*. Physical Review B, 2010. **81**(17).
31. Zhai, J.P., et al., *Fabrication of smallest single-walled carbon nanotubes in molecular sieves: A comparison between SAPO-11 and AlPO4-11*. Microporous and Mesoporous Materials, 2009. **124**(1-3): p. 15-19.
32. Zhai, J.P., et al., *Study of the mechanism of carbonization of template in silicon-substituted aluminophosphate zeolite crystals*. Journal of Physical Chemistry C, 2008. **112**(31): p. 11702-11706.
33. Zhai, J.P., et al., *Catalytic effect of metal cations on the formation of carbon nanotubes inside the channels of AlPO4-5 crystal*. Carbon, 2006. **44**(7): p. 1151-1157.
34. Li, Z.M., et al., *Synthesis of 4 angstrom single-walled carbon nanotubes in catalytic Si-substituted AlPO4-5 molecular sieves*. Applied Physics Letters, 2004. **85**(7): p. 1253-1255.
35. Dong, Y., et al., *Carbon-Based Dots Co-doped with Nitrogen and Sulfur for High Quantum Yield and Excitation-Independent Emission*. Angewandte Chemie-International Edition, 2013. **52**(30): p. 7800-7804.
36. Alvaro, M., et al., *Complete filling of zeolite frameworks with polyalkynes formed in situ by transition-metal ion catalysts*. Chemistry of Materials, 2005. **17**(10): p. 2546-2551.
37. Cardin, D.J., et al., *Polymerization of alkynes in the channels of mesoporous materials containing Ni and Zn cations: Almost complete filling of the voids*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(13): p. 3141-3142.
38. Corma, A., et al., *Supramolecular self-assembled molecules as organic directing agent for synthesis of zeolites*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 287-290.
39. Wilcoxon, J.P., P.P. Newcomer, and G.A. Samara, *Synthesis and optical properties of MoS2 and isomorphous nanoclusters in the quantum confinement regime*. Journal of Applied Physics, 1997. **81**(12): p. 7934-7944.
40. Jeong, S., et al., *Well-Defined Colloidal 2-D Layered Transition-Metal Chalcogenide Nanocrystals via Generalized Synthetic Protocols*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(44): p. 18233-18236.
41. Gilbert, A., *Handbook of Photochemistry. Second Edition, Revised and Expanded*. By S. L. Murov, I. Carmichael and G. L. Hug. J. Chem. Soc., Faraday Trans., 1995. **91**(6): p. 1056-7.

42. Wang, X., et al., *Bandgap-Like Strong Fluorescence in Functionalized Carbon Nanoparticles*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010. **49**(31): p. 5310-5314.
43. Primo, A., et al., *From biomass wastes to large-area, high-quality, N-doped graphene: Catalyst-free carbonization of chitosan coatings on arbitrary substrates*. *Chem. Commun.*, 2012. **48**: p. 9254-9256.
44. Primo, A., et al., *High-yield production of N-doped graphitic platelets by aqueous exfoliation of pyrolyzed chitosan*. *Carbon*, 2014. **68**(0): p. 777-783.
45. Bunn, H.F. and R.O. Poyton, *Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia*. *Physiological Reviews*, 1996. **76**(3): p. 839-885.
46. Hrapovic, S., et al., *Electrochemical biosensing platforms using platinum nanoparticles and carbon nanotubes*. *Analytical Chemistry*, 2004. **76**(4): p. 1083-1088.

Capítulo 7:

Anhídrido del ácido Perilentetracarboxílico como precursor de puntos cuánticos fluorescentes de carbono con estructura de nanocébolla.

7.1- Introducción.

Existe mucho interés actualmente en la síntesis de nanopartículas (NPs) de carbono que sean altamente fluorescentes (puntos cuánticos de carbono) que puedan reemplazar puntos cuánticos basados en metales tóxicos en aplicaciones de bioimagen y biomedicina. El empleo de carbono como sustitutivo de compuestos conteniendo metales tóxicos debería aumentar la biocompatibilidad de los puntos cuánticos.[1, 2] La mayoría de los estudios sobre la preparación de nanopartículas de carbono fluorescentes emplean precursores orgánicos que contiene átomos de carbono sp^3 no aromáticos.[2-6] El tratamiento térmico en polietilenglicol (PEG) a temperaturas de 400 °C se ha descrito como un procedimiento para generar NPs de carbono.[7-10] En otros estudios el PEG es usado como un aditivo en la preparación de puntos de carbono

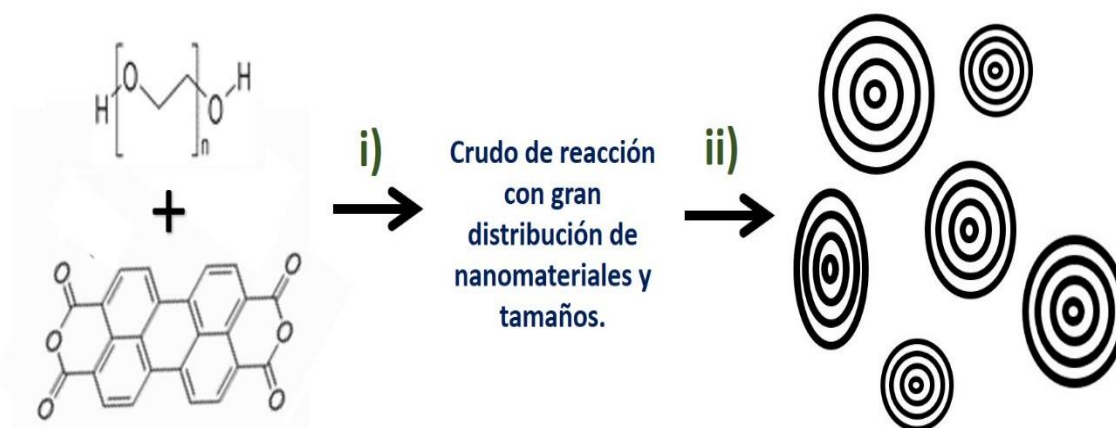
(C-dots) fluorescentes a fin de recubrir y proteger su superficie, lo que resulta generalmente en un aumento de la intensidad de emisión.[11-13] Estudios describiendo el empleo de compuestos aromáticos como precursores de nanopartículas de carbono son, sorprendentemente, considerablemente más raros.[1, 2, 14]

Los compuestos aromáticos como precursores de los puntos de carbono deberían ofrecer en principio una preorganización de los átomos de carbono en un ordenamiento molecular rígido, el cual podría preservarse durante el tratamiento térmico que conduce a la formación de los puntos cuánticos de carbono. Además, la rigidez de los compuestos aromáticos podría ser muy interesante como estrategia general para aumentar la densidad electrónica en este tipo de Nps y aumentar los rendimientos cuánticos de emisión al desfavorecer procesos de desactivación no emisivos, la mayoría de los cuales requieren de relajación por vibración y cambios conformacionales de los estados excitados, que no serían posibles cuando no exista libertad conformacional en la molécula.

En el presente capítulo se describirá que el dianhídrido del ácido perilentetacarboxílico (PTCA) es un precursor adecuado para la obtención de puntos cuánticos de carbono con estructura definida por círculos concéntricos de diámetros nanométricos y con una altura muy inferior al diámetro, lo que hace que la morfología de esas nanopartículas recuerde a la de aros de cebolla (“Carbon NanoOnions Rings”, C-NOR de la abreviatura en inglés). Como se indicara en el presente capítulo las nanopartículas del material C-NOR poseen una morfología definida y de una elevada uniformidad exhibiendo una alta eficiencia de emisión que podría ser empleada en aplicaciones para la obtención de imágenes en biomedicina.

7.2- Resultados y discusión.

El material C-NOR constituido por nanopartículas planas se preparó a partir de PTCA cuya estructura molecular se indica en el esquema 7.1. El proceso de preparación incluye la suspensión de PTCA de PEG de baja masa molecular media ($M_w < 400$ Da) la mezcla se introduce en un horno-mufla precalentado a 400 °C y entonces se deja que la mezcla se vaya enfriando lentamente hasta temperatura ambiente por exposición al aire. El tiempo necesario para el enfriamiento del horno es alrededor de 20 horas.



Esquema 7.1- Procedimiento de preparación de la muestra C-NOR. (i) Tratamiento en un horno precalentado a 400 °C y enfriamiento lento hasta alcanzar la temperatura ambiente (20 °C) por exposición al aire. (ii) Purificación de la mezcla cruda de reacción mediante cromatografía por gel de sílice a fin de separar los C-NOR y con un rango estrecho de tamaños, de otros nanoprodutos carbonaceos producidos durante la carbonización.

Se prepararon en las mismas condiciones dos muestras denominadas C-NOR y C-NOR(Eu), pero una de ellas en ausencia y otra en presencia de $\text{Eu}(\text{OAc})_3$ como ácido de Lewis a fin de promover la condensación entre los grupos funcionales anhídrido del PTCA y la de los ácidos carboxílicos generados a partir de ellos con los grupos hidroxilos del PEG de bajo peso molecular. En la literatura existen varios ejemplos mostrando que los cationes de los metales de las tierras raras pueden actuar como catalizadores del tipo ácido de Lewis en reacciones de esterificación y esta función es la que se espera pueda ocurrir también durante la preparación del material C-NOR(Eu).[15, 16] La selección de $\text{Eu}(\text{OAc})_3$ se basó también en la posibilidad de detectar la presencia de iones Eu^{3+} en el material mediante la observación de la fotoluminiscencia atómica característica de este lantánido.[17-19] En comparación, el uso de cloruro de zinc como ácido de Lewis para favorecer durante el proceso de formación de C-NOR la esterificación del PEG da lugar bajo las mismas condiciones a mezclas de reacción negras, pero donde la presencia de partículas de C-NOR fue igualmente observada.

Tras la formación de las muestras C-NOR(Eu), el líquido negro viscoso en el que se transforma el PEG se purificó mediante cromatografía convencional en sílica gel usando secuencialmente etilacetato y acetonitrilo como eluyentes. El curso de la separación cromatográfica se sigue adecuadamente por detección de la fluorescencia de las distintas fracciones. Conviene indicar que aunque las muestras de NPs no son sometidas generalmente a purificación cromatográfica, al menos en el presente caso nuestra observación ha sido que la cromatografía convencional en sílica gel es una técnica adecuada para purificar partículas de C-NOR, consiguiéndose una distribución de tamaños más estrecha. El eluyente seleccionado en estas separaciones cromatográficas fue el acetonitrilo el cual fue elegido en base a la elución del crudo de reacción en cromatografía en capa fina. El procedimiento de purificación cromatográfica proporciona

muestras de C-NOR constituidas por nanopartículas con una morfología definida y con propiedades reproducibles como se demostró llevando a cabo varios ensayos independientes para la preparación de estos materiales. C-NOR, obteniendo consistentemente resultados idénticos en cuanto a morfología de las partículas y distribución de tamaños.

La comparación de muestras de C-NOR antes y después de la purificación cromatográfica revela que la consecuencia más notable del tratamiento cromatográfico es una distribución del tamaño de partícula más estrecha para la fracción C-NOR purificada comparada con la muestra cruda (Figura 7.1). Podría ser incluso posible que la selección de otros eluyentes y fase estacionaria que pudieran ser más apropiadas viniera a resultar en una distribución de tamaño de partícula incluso más estrecha.

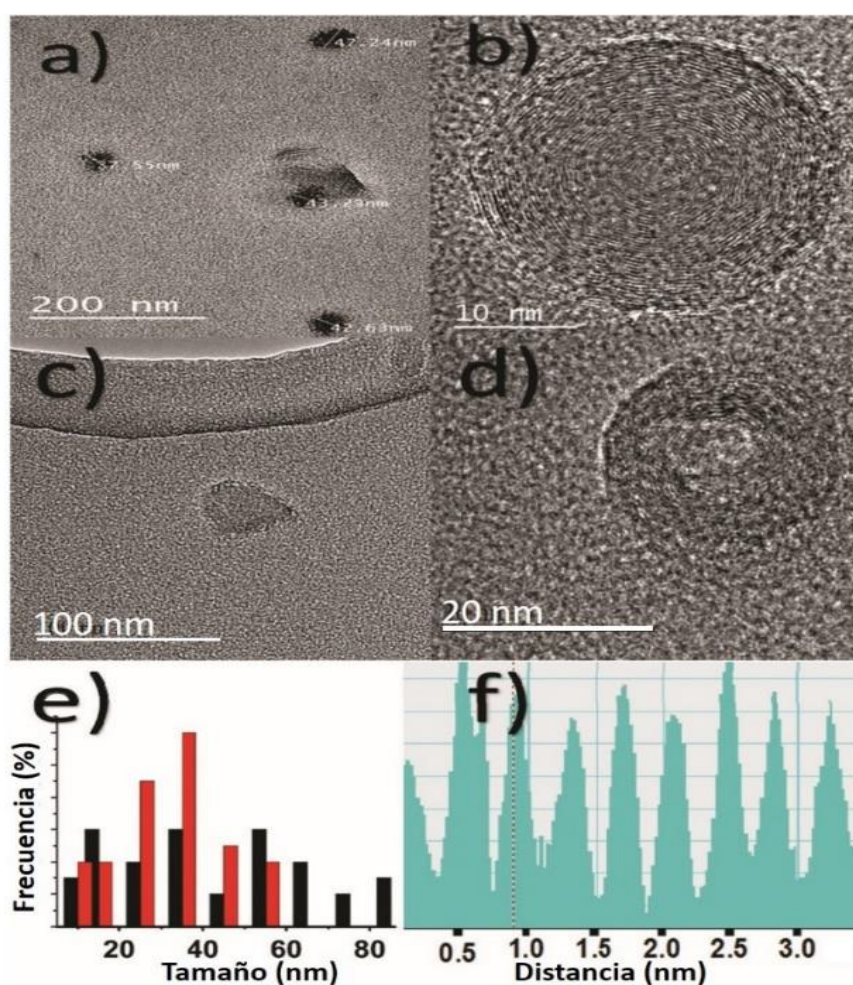


Figura 7.1- Imágenes de TEM seleccionadas formadas para la muestra C-NOR (Paneles (a) y (b) y C-NOR(Eu) (Paneles (c) y (d)) a dos diferentes magnificaciones. (e) Distribución estadística para la muestra C-NOR antes (**negro**) y después (**rojo**) de purificación por cromatografía en columna de sílica gel. (f) Medida de la distancia interlaminar para la partícula de C-NOR mostrada en el panel b) y que corresponde al valor de la distancia interlaminar en el grafito.

Las dimensiones nanométricas y la morfología del material, como anillos concéntricos de una altura pequeña comparada con su diámetro, para los materiales C-NOR obtenidos mediante el

tratamiento térmico del PTCA fueron establecidos mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes que se muestran en la Figura 7.1 permiten establecer la distribución del tamaño de partícula. Es interesante resaltar que estas imágenes de TEM permiten distinguir diferentes capas concéntricas en las partículas con un distancia interlaminar estimada de 0.34 nm para anillos consecutivos (ver panel f) en Figura 7.1). Este espaciado interlaminar corresponde a la distancia entre dos láminas de grafeno contiguas en el grafito.

El valor de esta distancia interlaminar permite excluir que cadenas de PEG pudieran estar intercaladas entre los diferentes anillos de las partículas de C-NOR. Es importante hacer notar que NPs con idéntica morfología y distribución de tamaño de partícula muy similar fueron obtenidas igualmente cuando la síntesis de estos materiales se llevó a cabo tanto en presencia de $\text{Eu}(\text{OAc})_3$ como en presencia de ZnCl_2 por lo que la posible catálisis de estos ácidos de Lewis no juega papel alguno en la organización de las nanopartículas de C-NOR. Considerando que el PTCA es el precursor de las nanopartículas de C-NOR la formación de estos objetos nanométricos con una morfología tan definida pudo racionalizarse asumiendo que el apilamiento de moléculas de PTCA en una forma concéntrica daría lugar a la formación de objetos de mayores dimensiones con forma circular o elíptica.

La altura de las partículas de C-NOR se determina con gran exactitud mediante medidas de AFM que para el caso del equipo empleado posee una resolución vertical subnanométrica. La Figura 7.2 presenta una vista frontal de un campo relativamente grande del material C-NOR tomada por AFM donde son visibles un elevado número de NPs. Esta misma Figura 7.2 presenta dos imágenes, una en 3D y otra con el perfil de alturas que muestran la extrema uniformidad de la altura de las partículas de C-NOR que tiene un valor de 2.5-3 nm.

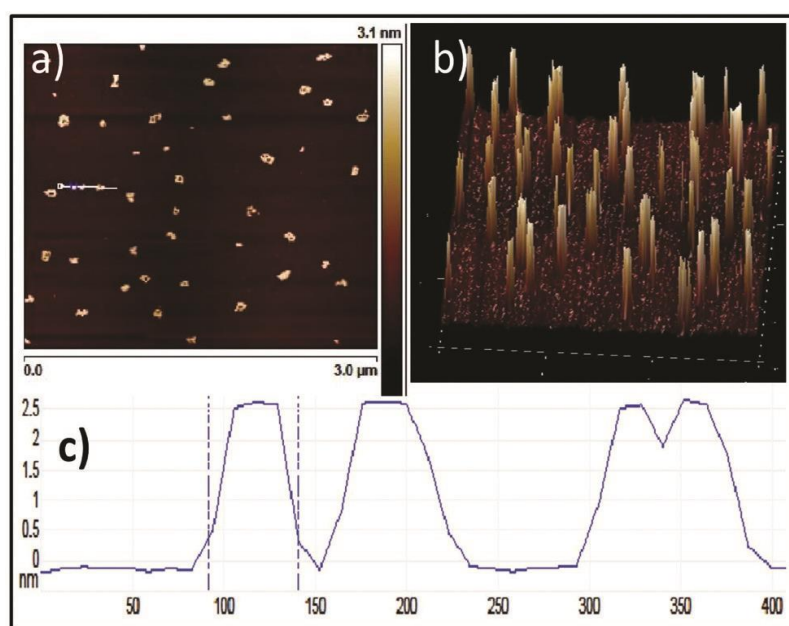


Figura 7.2- (a) Vista frontal y en 3D (b) de una imagen de AFM representativa para la muestra C-NOR después de purificación cromatográfica en la que se puede observar la presencia de NPs con una alta uniformidad en altura. (c) Medida de la altura vertical de cuatro NPs indicadas en la imagen a con una línea horizontal en blanco.

Este valor de altura es superior al que modelos de mecánica molecular estiman para el PTCA la cual es una molécula plana que posee una dimensión del eje mayor entre los oxígenos de anhídrido de 1.5 nm. En base a este dato, se propone que el tratamiento térmico empleado en la obtención de C-NOR conduce a la organización de unidades de PTCA para maximizar interacciones π - π (espaciado entre láminas correspondiente a este apilamiento), mientras que cadenas de PEG que derivatizan al PTCA a través de los grupos carboxílicos localizados en las zonas superiores e inferiores serían las responsables de la mayor altura de las nanopartículas de C-NOR respecto a las dimensiones del PTCA.

En relación a la morfología de las partículas de C-NOR conviene hacer notar que se ha descrito en la literatura que presiones extremadamente fuertes (8 GPa) y temperaturas elevadas (1300 °C) ejercidas sobre cristales de muestras sólidas de perileno conducen a la formación de partículas de diamante impurificadas por la presencia de un porcentaje menor de partículas de carbono de tamaño nanométrico entre las que han sido identificadas esferas con morfología de cebolla (15-30 nm de diámetro), así como otras partículas con forma similar a cintas gráficas.[20-24] Se ha observado que bajo estas condiciones de presiones extremadamente altas la mayoría de compuestos aromáticos policíclicos condensados, empezando por naftaleno y siguiendo por antraceno, pentaceno y coroneno, dan lugar, además de diamante, a partículas nanométricas en menor proporción, algunas de las cuales presentan una morfología similar a la del C-NOR que se ha caracterizado en el presente capítulo por TEM y AFM.

Hay que resaltar que en los precedentes descritos en la bibliografía la forma de las NPs ha sido considerada esférica basándose en imágenes de TEM. Además objetos nanoparticulados similares han sido igualmente caracterizados en experimentos donde se consigue la fusión del grafito a presiones y temperaturas ultraelevadas (5-30 GPa, 5000-6000 °C), o en una llama o por acción de un láser pulsado de alta potencia.[25-27] Podría ser que el tratamiento térmico en PEG llevado a cabo en el presente estudio diera lugar a un proceso de autoensamblaje similar, viniendo a resultar NPs análogas pero formadas en condiciones muchísimo más suaves. Por otra parte la forma esférica asumida en base a imágenes de TEM debería confirmarse mediante medidas de AFM. De hecho existe una gran similitud entre la figura de TEM mostrada en la Figura 7.1 para objetos planos con la que ha sido publicada en los precedente bibliográficos para NPs que fueron consideradas como esféricas.

Una de las propiedades más interesantes de los puntos cuánticos de carbono así como de otros tipos de carbono nanoparticulado es la observación en este tipo de materiales de una

fotoluminiscencia de elevada intensidad.[1, 7, 28, 29] En el presente caso, a pesar de que NPs análogas a las de C-NOR han sido previamente descritas en la bibliografía, no existe información disponible acerca de NPs con morfología de cebolla o de las nanoesferas análogas.

En la presente tesis doctoral tal como se viene comentando, tenemos interés en la preparación de formas de carbono nanoparticulado que puedan tener aplicación en técnicas de imagen para sistemas biológicos lo cual requiere que sean partículas con dimensiones de nanómetros y una alta intensidad de fluorescencia, particularmente para longitudes de emisión en la zona del rojo. Por este motivo se procedió a determinar el espectro de absorción ultravioleta visible de muestras purificadas de C-NOR y C-NOR(Eu) antes de determinar la fotoluminiscencia de estos materiales. La Figura 7.3 presenta los espectros UV para las muestras de C-NOR y C-NOR(Eu) dispersadas en acetonitrilo. Como puede verse en esta Figura 7.3 las muestras exhiben unas bandas de absorción característica en la región del visible a $\lambda_{\max}=440$ nm superpuesta a una absorción de fondo que crece hacia la zona del UV. La comparación de la forma y composición de esta banda a 440 nm presente tanto en C-NOR como en C-NOR(Eu) con la del precursor PTCA indica que para las muestras de C-NOR la posición de la absorción en el visible está significativamente desplazada hacia el azul y que aparece a una posición intermedia entre la posición de las bandas de absorción del PTCA ($\lambda_{\max}=520$ nm) y la del perileno ($\lambda_{\max}=420$ nm). Además en el caso de C-NOR la banda de absorción carece de la estructura fina vibracional característica de estos dos compuestos aromáticos policíclicos. Considerando el valor de λ_{\max} medido para el PTCA y el perileno, podría ser que la banda de absorción registrada tanto para el C-NOR como para el C-NOR(Eu) correspondiera a una distribución de derivados del PTCA generados durante el tratamiento térmico. Parece, sin embargo, que la absorbancia de la banda característica a 440 nm es mayor cuando se emplea Eu^{3+} como catalizador ácido de Lewis, comparada con la mezcla después del tratamiento térmico de PTCA en ausencia de ácidos de Lewis. Esta diferente intensidad en el espectro de absorción del UV-Vis indicaría una cierta influencia de Eu^{3+} como ácido de Lewis en el proceso de tratamiento térmico promoviendo reacciones que son catalizadas por ácidos, probablemente entre el grupo anhídrido del PTCA, los ácidos carboxílicos que pudieran derivar y los grupos hidroxilos del PEG. Además los ésteres carboxílicos formados a partir del PTCA parcialmente descarboxilado y el PEG serían candidatos potenciales que podrían justificar el valor de λ_{\max} de la banda de absorción presente en el C-NOR(Eu). El PTCA podría al hidrolizarse dar lugar a cuatro ácidos carboxílicos, uno o varios de los cuales podría ser eliminado en el tratamiento térmico con PEG, con el consiguiente cambio en λ_{\max} del perileno resultante.

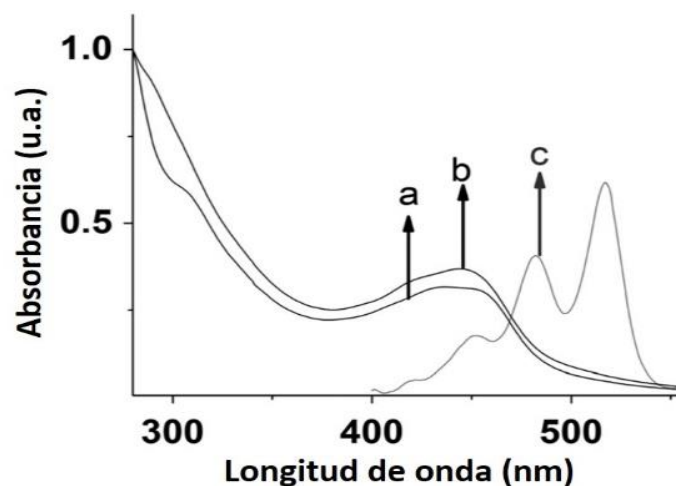


Figura 7.3- Espectro de absorción para las muestras C-NOR (a) y C-NOR(Eu) (b) tras la purificación cromatográfica. La figura muestra también (c) el espectro de absorción UV-vis para una disolución de PTCA en acetonitrilo.

La excitación de suspensiones de C-NOR y C-NOR(Eu) permite la observación de una emisión intensa. Es importante destacar un desplazamiento en la posición de la banda de emisión dependiendo de la longitud de onda de excitación en el rango entre 300 y 570 nm. Este comportamiento donde λ_{em} depende de λ_{ex} es considerado como característico de los puntos cuánticos de carbono y ha sido atribuido a la recombinación radiante de pares electrón/hueco localizados en diferentes centros del material. Esta interpretación asume que los puntos cuánticos de carbono poseen una distribución de sitios donde los electrones y huecos pueden estar localizados con diferente energía.

En el caso del presente estudio, el máximo de Intensidad de emisión se registra cuando las muestras de C-NOR y C-NOR(Eu) se excitan entre 350 y 400 nm. La Figura 7.4 muestra una serie de espectros de emisión registrados a diferentes longitudes de onda de excitación. Un punto importante a discutir es si la emisión registrada para los materiales C-NOR y C-NOR(Eu) corresponde a la emisión del PTCA o de algún posible derivado o si, por el contrario, se trata de una emisión característica de un material con dimensiones de punto cuántico. En este sentido, hay que indicar que λ_{em} para C-NOR y C-NOR(Eu) aparece desplazada con respecto a la posición de λ_{em} del PTCA. Además la emisión de C-NOR y C-NOR(Eu) carece casi por completo de la estructura fina vibracional presente en PTCA. Es digno de hacer notar al lector que la excitación a 300 ó 350 nm de C-NOR presenta un hombro en el lado de longitudes de onda largo. Por otro lado, en el caso de C-NOR(Eu) se registró algo de estructura vibracional en la banda de emisión, aunque la estructura fina observada fue mucho menos pronunciada que la que se registra en para PTCA. Todos estos hechos parecen descartar que la emisión observada para C-NOR corresponda a una emisión residual del PTCA que pudiera estar presente como una posible impureza en el material. Además merece ser comentado que no se observó la emisión atómica que sería

esperable en el caso de que iones Eu^{3+} estuvieran presentes en C-NOR (Eu). La ausencia de emisión característica de los iones Eu está de acuerdo con la ausencia de Eu en la muestra C-NOR(Eu) determinada independientemente mediante análisis químico elemental por ICP-OS.

El rendimiento cuántico de emisión (Φ_{em}) para las muestras C-NOR y C-NOR(Eu) medidas en metanol tras excitación a 420 nm fue similar para ambas muestras. Estimándose unos valores de rendimiento cuántico de 0.47 y 0.49 para C-NOR y C-NOR(Eu) respectivamente. Como patrón se utilizó una disolución diluida de perileno. Estos valores de (Φ_{em}) comparan favorablemente con gran número de valores descritos en la bibliografía para rendimientos cuánticos de carbono y están entre los más altos para este tipo de nanopartículas.[2, 30]

Los tiempos de vidas de emisión para muestras para muestras de C-NOR y C-NOR(Eu) tras su purificación a longitudes de excitación de 350 nm fueron similares para ambas muestras dando valores de tiempos de vida media estimados a partir del mejor ajuste de los perfiles temporales de emisión en acetonitrilo a una cinética de decaimiento de primer orden de alrededor de 5.5 ns.

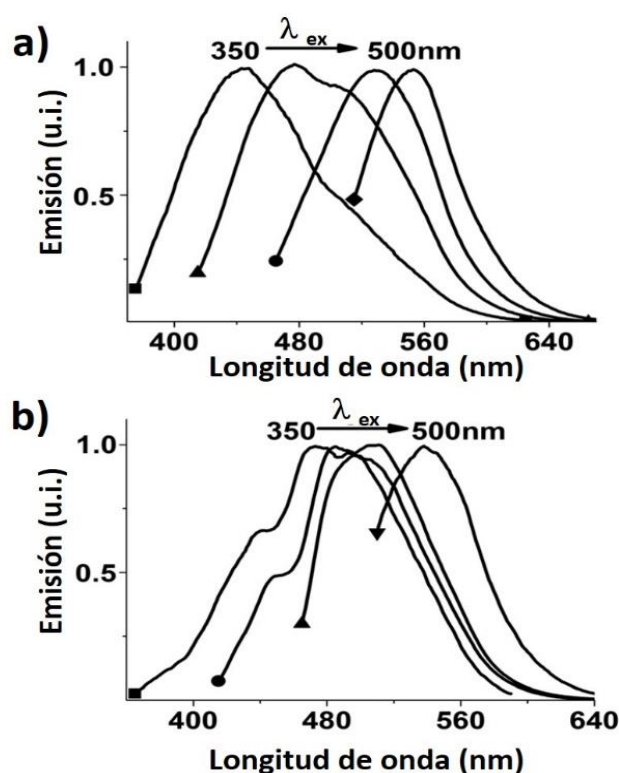
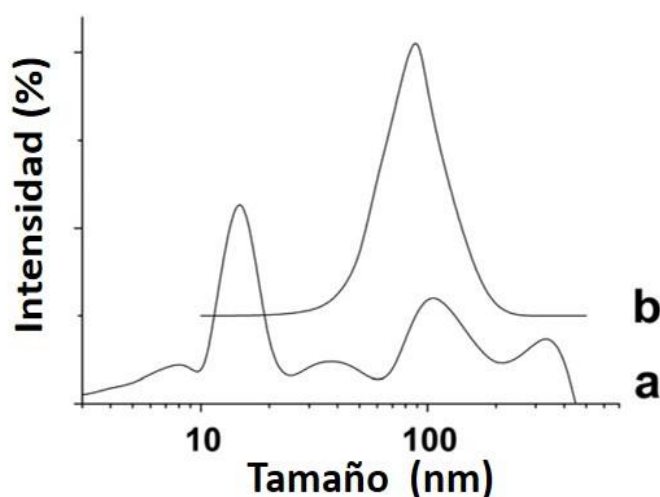


Figura 7.4- Espectros de emisión normalizados registrados para las muestras C-NOR (a) y C-NOR(Eu) (b) en dispersiones en acetonitrilo excitando a diferentes longitudes de onda: 350 (■), 400 (▲), 450 (●) y 500 (◆).

Con anterioridad a su purificación cromatográfica la distribución del tamaño de partícula del crudo obtenido en la preparación de C-NOR presentaba al menos cinco componentes principales como evidencia el análisis de dispersión dinámica de un haz de laser (DLS) donde la distribución

de tamaños varía entre menos de 10 nm hasta 430 nm. La Figura 7.5 presenta el gráfico de abundancia frente al tamaño de partícula medido para la muestra C-NOR por DLS antes de su purificación. El potencial Z del crudo inmediatamente tras la preparación del C-NOR fue -16.4 mV, valor relativamente pequeño que indicaría que se trata de una dispersión coloidal relativamente inestable.



Figuras 7.5- Perfil de distribución de tamaños en una dispersión coloidal de C-NOR medida por DLS antes (a) y tras de su purificación (b).

En contraste, tras su purificación cromatográfica, la fracción recogida presenta una distribución de tamaño de partícula medida por DLS monodispersa con un pico único centrado a 85 nm y un potencial electroquímico de -29.5 mV. Por lo tanto tras su purificación la fracción recogida es considerablemente más uniforme en tamaño y está constituida por partículas coloidales con mayor carga, por tanto con mayor estabilidad frente a su aglomeración y precipitación. La Figura 7.5 presenta igualmente el perfil de distribución de tamaño de partícula para la muestra C-NOR purificada, obtenida por medida de DLS. Merece ser comentado que los tamaños de partículas medidas por DLS son generalmente mucho mayores que los que se determinan para las mismas partículas secas mediante medidas de TEM. Este hecho es bien conocido y es atribuible a varios fenómenos incluidos la solvatación de las NPs por moléculas de disolvente y la aglomeración parcial de partículas suspendidas formando una única entidad o clusters en el seno de la fase líquida, pero que en realidad está constituida por la suma de partículas de menor tamaño.

Por otra parte, también es digno de mención el mayor potencial electroquímico de las partículas de C-NOR tras su purificación lo que corresponde a la presencia de una mayor densidad de cargas negativas en la superficie de la fracción purificada C-NOR con respecto al promedio de la mezcla C-NOR obtenida directamente tras su preparación.

Observaciones similares fueron igualmente establecidas para las muestras C-NOR(Eu) que poseen un comportamiento parecido. Los datos obtenidos sobre distribución de tamaño de partículas y estabilidad indican que la purificación por cromatografía con sílica gel es un procedimiento adecuado para mejorar la uniformidad y propiedades de los crudos de reacción obtenidos tras el tratamiento térmico.

Después de su purificación, las fracciones, C-NOR y C-NOR(Eu) obtenidas fueron caracterizadas espectroscópicamente presentando ambas muestras espectros muy similares. Así las bandas de absorción más intensas que se registran en espectroscopia de infrarojos (IR) corresponden al PEG y aparecen a números de onda de 3500, 2950, 1480 y 1000 cm^{-1} . Estas bandas son atribuibles a las vibraciones de tensión de los grupos OH y CH_2 , a la torsión del grupo CH_2 y a la vibración de alargamiento del enlace C-O, respectivamente. Por consiguiente, la información más importante que proporciona la espectroscopia de IR es la presencia de un elevado porcentaje de PEG, tanto en la muestra purificada C-NOR como en la análoga de C-NOR(Eu). Además de PEG, ambas muestras purificadas cromatográficamente, C-NOR y C-NOR(Eu) exhiben bandas de vibración de mucha menor intensidad que se corresponden con vibraciones de grupos carbonilo apareciendo en torno a 1730 cm^{-1} y que son atribuibles a grupos ésteres carboxílicos. Además se observa una banda a 1610 cm^{-1} que se corresponde con la vibración de tensión de anillos aromáticos sustituidos observándose pequeñas variaciones en la posición e intensidad de los picos de IR entre los dos tipos de muestras C-NOR y C-NOR(Eu). La Figura 7.6 presenta los espectros de IR para las muestras estudiadas, así como el espectro de IR del PEG 400 original empleado en la preparación de estas NPs de carbono.

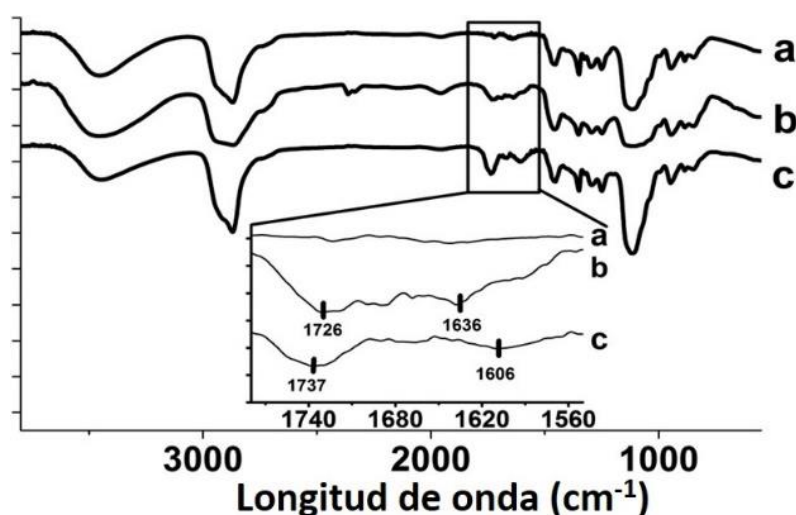


Figura 7.6- Espectros de IR del PEG (a), C-NOR purificado (b) y C-NOR(Eu) purificado (c). El recuadro muestra la expansión de la región de vibración del grupo carbonilo donde se puede observar la existencia de varias bandas de vibración a diferentes longitudes de onda para las muestras purificadas de C-NOR (b) y C-NOR(Eu) (c) que no están presentes en el PEG (a). Los valores de número de onda se indican en el recuadro.

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de las muestras purificadas de C-NOR y su interpretación como correspondiente a la combinación en el mismo espectro de señales provenientes del PEG y del PTCA están completamente de acuerdo con los componentes empleados en la preparación de las muestras y con los comentarios anteriores sobre los espectros de IR. De esta manera además de un conjunto de picos de gran intensidad correspondiente a los grupos CH_2 del PEG que aparecen de alrededor de 3.5 ppm los espectros de RMN ^1H registrados en disolución de CD_3Cl para las muestras purificadas de C-NOR y C-NOR(Eu), se observan en la región aromática la presencia de dos dobles dobles centrados a 7.60 y 7.70 ppm que corresponden a los protones aromáticos de los derivados de PTCA formados en la síntesis. En los espectros de RMN ^{13}C se observó la presencia de una señal a 161 ppm correspondiente a los carbonilos de los grupos ésteres, lo que indica que los grupos anhídrido presentes en la molécula de PTCA precursora se han convertido principalmente en grupos éster durante el tratamiento térmico con PEG. La Figura 7.7 presenta espectros seleccionados de RMN ^1H registrados para la muestra C-NOR purificada y que son representativos de la serie de espectros obtenidos para estas muestras.

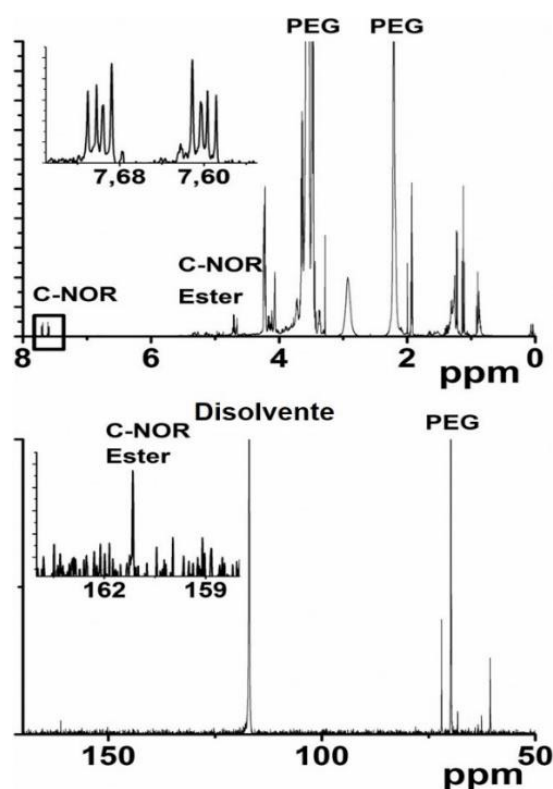


Figura 7.7- espectros RMN ^1H (a) y de ^{13}C (b) registrados para la muestra C-NOR purificada. Los picos más relevantes debidos al PEG, disolvente (CD_3CN) y C-NOR se han indicado en la figura. Los recuadros muestran expansiones de ciertas regiones de los espectros.

En resumen, la combinación de la información proporcionada por TEM junto con los datos espectroscópicos de IR y RMN sugieren que las cadenas de PEG deben estar recubriendo y rodeando las partículas de C-NOR y C-NOR(Eu) purificadas, pero que estas cadenas no deberían estar situadas en el interior de las NPs.

Como se ha venido comentando en la introducción de la presente Tesis Doctoral unas de las principales aplicaciones de los puntos cuánticos de carbonos fluorescentes es en la obtención de imágenes de células y tejidos. Con el fin de proporcionar datos preliminares que demuestren la posibilidad de tal tipo de aplicación para las partículas C-NOR y C-NOR(Eu), se llevaron a cabo estudios a fin de determinar la biocompatibilidad de las muestras C-NOR y de su habilidad para su internalización en células. La biocompatibilidad celular se estudió para líneas celulares de hepatocitos (Hep3B) que se cultivaron durante 3h en un medio que contenía C-NOR y a continuación tras eliminar la presencia de C-NOR al renovar el medio se continuó la incubación durante 24 horas en ausencia de C-NOR. Las diferencias en la actividad celular entre controles y las células Hep3B expuestas a las NPs de C-NOR se determinaron usando el test de actividad MTT. El ensayo MTT está basado en la habilidad de las células vivas de reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio al formazan correspondiente.[31, 32] El ensayo MTT está basado en el hecho de que la reducción del tetrazolio a formazan establece que los enzimas de la mitocondria de carácter reductasa están activos, y por tanto, sirve para establecer la actividad bioquímica correcta de estos orgánulos celulares clave en la actividad celular. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7.8. Como puede verse en ella, un tiempo de contacto de 3 horas reduce ligeramente la viabilidad celular respecto a las muestras control en torno al 95% para el caso de la muestra purificada y en torno al 90% para el caso de la muestra C-NOR(Eu).

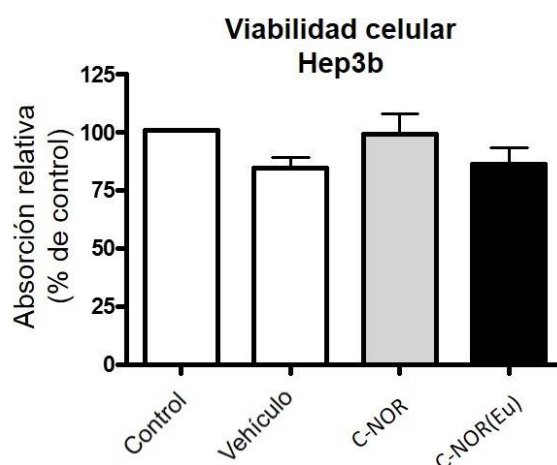


Figura 7.8- Análisis de la viabilidad basados en el ensayo MTT de células Hep3B en crecimiento exponencial determinado tras 24 h de cultivo y 3 h de exposición a NPs purificadas de C-NOR y C-NOR(Eu). Los datos han sido tratados estadísticamente, presentándose la media \pm S.E.M., $n=5-6$ aplicando el test t Student respecto al grado de confianza estadístico.

Tras haber obtenido datos sobre la biocompatibilidad sobre la muestra C-NOR con células Hep3b de hepatocitos humanos, este mismo tipo de células se cultivó en presencia de C-NOR y C-NOR(Eu) durante 24 h y tras este periodo de incubación las células fueron analizadas por microscopia confocal de fluorescencia tratando de detectar la internalización en la célula de este

tipo puntos cuánticos de carbono. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7.9 donde se muestran una serie de imágenes confocales obtenidas incrementando una micra en la posición vertical al tomar cada imagen sucesiva. La superposición de estas imágenes tomadas con diferente foco en el eje Z permite obtener información tridimensional a partir de imágenes de microscopía, las cuales son esencialmente imágenes 2D. Como puede verse en la Figura 7.9, se observó la presencia de NPs verdes fluorescentes a diferentes valores de ordenada vertical. Estas NPs corresponderían a los puntos cuánticos C-NOR presentes en el medio de cultivo y las imágenes demostrarían firmemente que ambos tipos de muestras C-NOR y C-NOR(Eu) son capaces de traspasar la membrana celular.

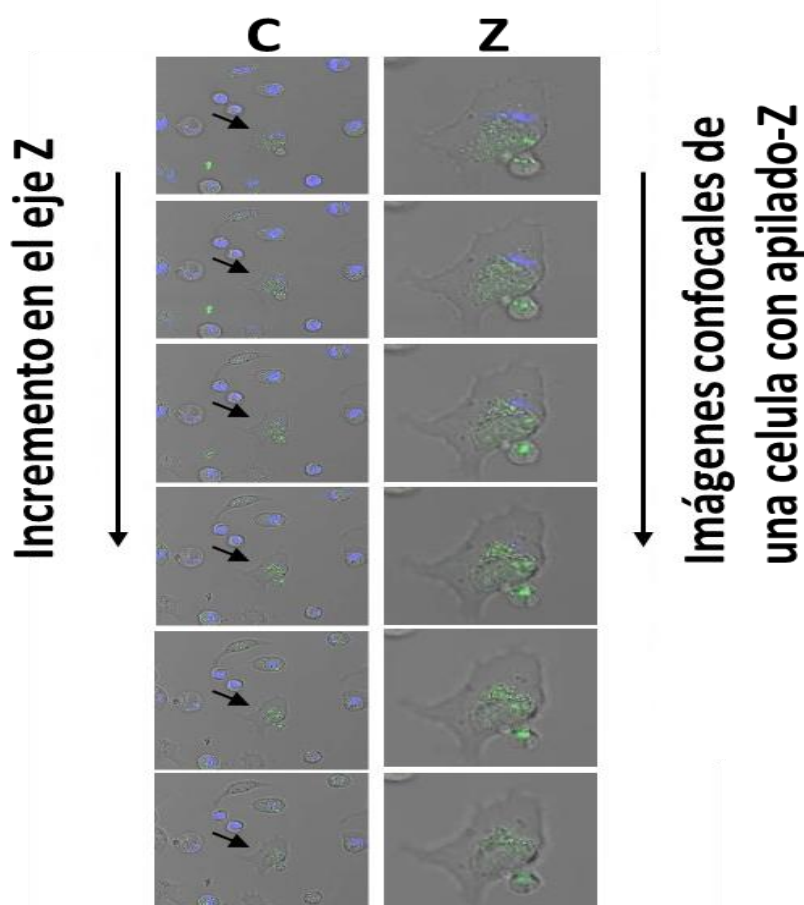


Figura 7.9- Imágenes de microscopía confocal en el eje Z tomadas en el modo de superposición empleando luz de 480 nm para iluminación y un filtro de corte de 520 nm para la captura y que muestran la localización de las partículas C-NOR (color verde) en células de hepatocito humano Hep3B cuyo núcleo ha sido teñido con el colorante de Hoechst. Parte izquierda de C1 a C6 con incrementos de $1.18 \pm 0.2 \mu\text{m}$ de arriba a abajo. Las imágenes de la derecha corresponden a un aumento centrado en una única célula (imágenes Z1 a Z6 tomadas con incremento de $1.18 \pm 0.2 \mu\text{m}$ de arriba abajo). La flecha apunta a la célula seleccionada para establecer la internalización. El color azul es debido al colorante de Hoechst que sirve para localizar el núcleo celular.

7.2.1 – Estudio toxicológico y biocompatibilidad celular para las muestras C-NOR y C-NOR(Eu).

Después de realizar un estudio preliminar de biocompatibilidad celular y de comprobar por microscopia confocal que las nanopartículas C-NOR pueden internalizarse dentro de la celular atravesando la membrana celular y con el fin de evaluar la posible utilización de estas nanopartículas como agentes de sensibilización en bioimagen y sus posibles usos en el futuro en biología, realizamos un estudio toxicológico y de biocompatibilidad. Empleando tres concentraciones diferentes. Se usaron modelos celulares comunes como células de hepatoma humano (Hep3B) y células de carcinoma cervical humano (HeLa). Y se realizaron los siguientes experimentos:

- 1- Viabilidad celular y proliferación, mediante el test MTT.
- 2- Análisis del ciclo celular por citometría estática por fluorescencia.
- 3- Medidas de inducción de apoptosis.
- 4- Evaluación del estrés oxidativo celular por producción de especies de oxígeno reactivas.

7.2.1.1- Viabilidad celular y proliferación, mediante el test MTT.

La toxicidad de las muestras C-NOR y C-NOR(Eu) se caracterizó empleando tres concentraciones (10 , 20 y $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y varios periodos de incubación. Con respecto con la proliferación y viabilidad celular la Figura 7.10.a muestra los efectos del tratamiento de las células con C-NOR y C-NOR(Eu) en su supervivencia y proliferación (HeLa panel inferior y Hep3B en el panel superior). Experimentos de citometría estática contando células que evolucionan durante tres días indicaron diferencias significativas entre la proliferación de las células tratadas con el vehículo y con aquellas que además tenían presentes en el medio las NPs de carbono. Específicamente se observó que ambas NPs reducían la proliferación en ambas líneas celulares, Hep3B y HeLa en un valor que depende de la concentración de las NPs y del tiempo de incubación. Este efecto se observa de forma evidente ya a las 24 h para concentraciones más elevadas de C-NOR y C-NOR(Eu) y se reproduce consistentemente para un periodo de cultivo de 72 h.

Como puede deducirse de los datos presentados en la Figura 7.10, comparados con las muestra de control cultivadas añadiendo el disolvente pero en ausencia de NPs, la presencia de las concentraciones más altas de C-NOR(Eu) conducen a una disminución de aproximadamente del 80% en el conteo de células a las 72 h, mientras que la reducción del número de células tratadas a la misma concentración de C-NOR fue del 70%. El efecto de inhibición que ejercen estas NPs

es algo mayor para la línea celular HeLa, donde la adición del vehículo PBS + 5% de DMSO no tiene ningún efecto observable. Conviene indicar que ninguna de las NPs afecta significativamente a la viabilidad celular como indican los ensayos MTT que se muestran en la Figura 7.10.b aunque se notó una cierta tendencia de disminución de viabilidad especialmente en la línea celular HeLa.

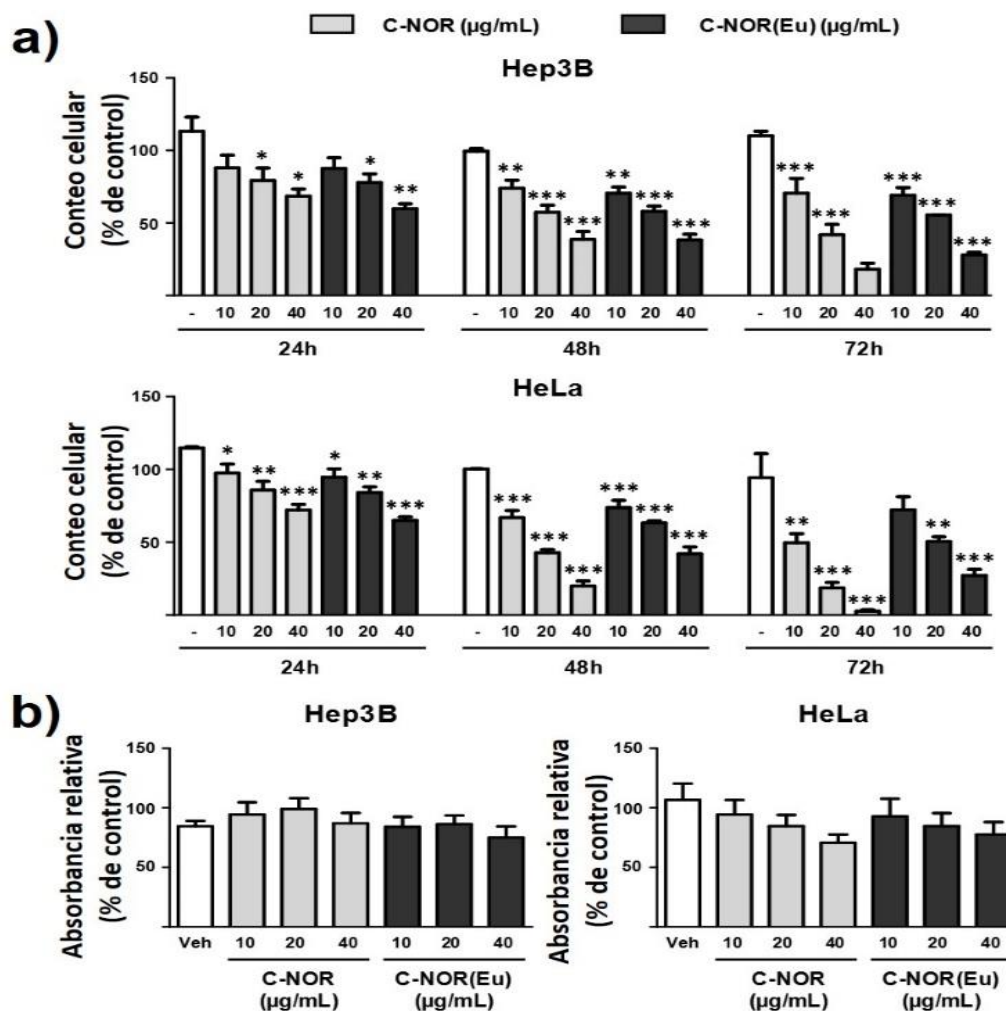


Figura 7.10- Efecto de la presencia de NPs de C-NOR y C-NOR(Eu) en la proliferación celular y viabilidad. Los histogramas muestran el conteo de células a 24, 48 y 72 h por citometría estática (a) y viabilidad determinada mediante el ensayo por MTT de células creciendo exponencialmente tras 24 h de incubación (b). Las células Hep3B y HeLa fuera tratadas con concentraciones de C-NOR y C-NOR(Eu) de 10, 20 y 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ o con el vehículo (PBS + 5% DMSO) los datos (promedio \pm desviación estándar, n=4) fueron analizados por el test ANOVA de comparación múltiple seguido del test Newman-Keuls. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

A fin de determinar de forma más convincente si estos efectos son debidos o no a la presencia de NPs y el tiempo mínimo para su aparición se llevaron a cabo experimentos similares incubando células solo durante 3 h y refrescando a este tiempo el medio de cultivo con una mezcla nueva sin contener NPs. Los datos obtenidos serán de interés para entender mejor si el origen de la toxicidad de las muestras C-NOR y C-NOR(Eu) es el contacto ocasional o

continuado con las células y es de relevancia para prever toxicidad en ciertos tejidos, como el hígado donde las NPs deberían permanecer usualmente por periodos de tiempo más prolongados que en otros tejidos. La Figura 7.11 demuestra que la inhibición observada en el conteo de células es claramente menos severa cuando la exposición a las NPs se limita a 3 horas observándose sólo efectos estadísticamente significativos a concentraciones altas. Para estos ensayos a tiempos de incubación cortos, el efecto causado por las NPs fue muy similar para ambas líneas celulares y también para ambos tipos de NPs. Por otra parte, tampoco se observaron cambios significativos en los ensayos de MTT con respecto al control, aunque para la concentración más elevada de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de C-NOR(Eu) parece observarse una disminución en la viabilidad celular de las células Hep3B (Figura 7.11.b). Estos datos son necesarios en estudios farmacocinéticos, en los que se establece los mecanismos de eliminación de estas NPs en el cuerpo y también para prever los efectos toxicológicos en órganos diferentes, según el tiempo de residencia de las NPs.

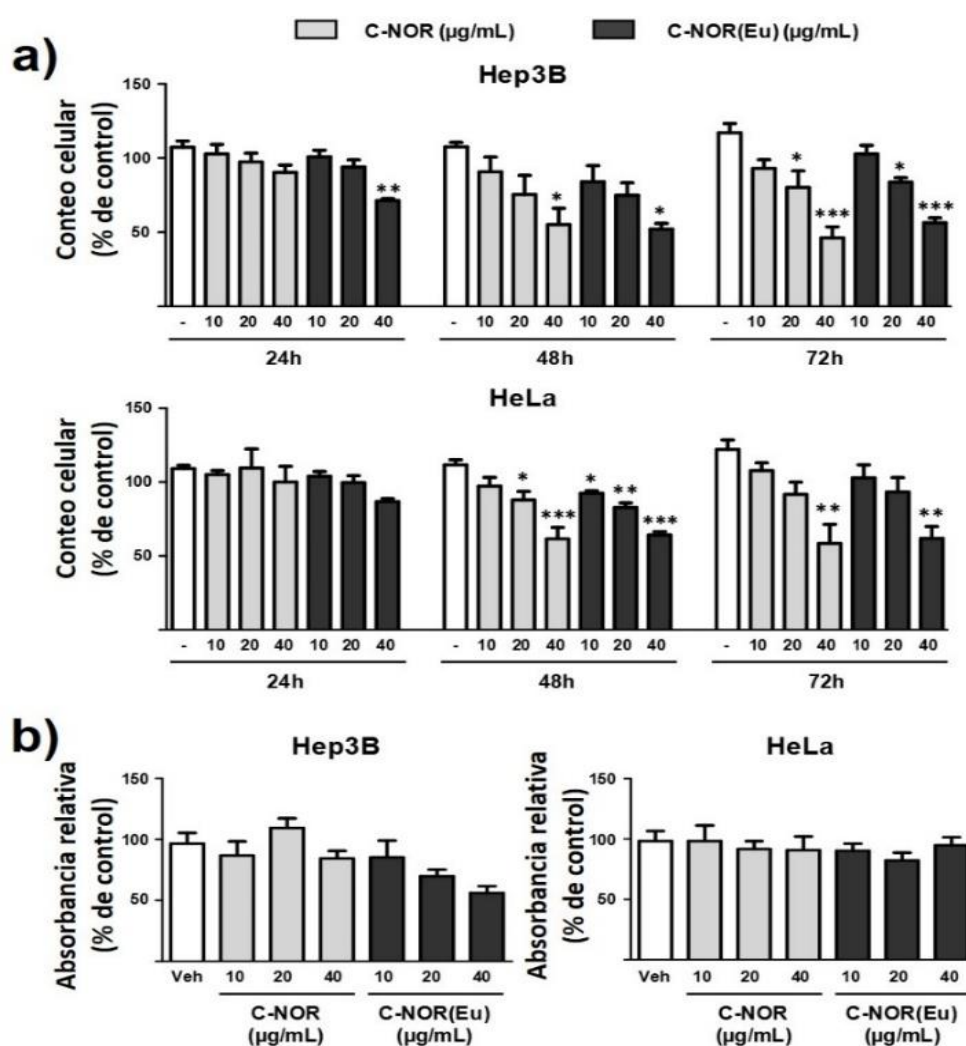


Figura 7.11- Efectos de las NPs de C-NOR y C-NOR(Eu) en la proliferación celular y viabilidad después de una exposición de 3 h. (a) Los histogramas muestran el conteo celular hasta 72 h después del contacto por citometría estática y (b) viabilidad determinada mediante ensayos MTT de células con crecimiento exponencial tras 24 h de incubación. La células Hep3B y HeLa se trataron con tres concentración de C-

NOR y C-NOR(Eu) (10, 20 y 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) o con el vehículo (PBS + 5 % DMSO) durante 3 h procediendo a renovar el medio una vez transcurrido este tiempo. Los datos (promedio \pm desviación estándar, $n=4$) fueron analizados por el test ANOVA de comparación múltiple seguido por el test Newman-Keuls. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

7.2.1.2- Análisis del ciclo celular por citometría estática por fluorescencia.

Estos datos apuntan a que la presencia de NPs debe influir de alguna manera en el ciclo celular. Para estudiar con mayor detalle cómo afectan las NPs al ciclo celular, se llevó a cabo un análisis determinando la fluorescencia total del colorante de Hoescht presente en el núcleo por citometría estática. La distribución de fluorescencia en los núcleos para ambos tipos de células mostró una clara alteración en este parámetro que se caracteriza por una reducción del pico G1 y un aumento sustancial en la subpoblación de G2/M. Estos efectos se provocan por exposición a partículas de C-NOR como de C-NOR(Eu) y son función de la concentración cuando se determina el efecto tras 24 h de incubación, especialmente en células Hep3B. Estos efectos sugieren que este periodo de incubación de 24h produce un daño severo en la proliferación celular (ver Figura 7.12. que corresponde al promedio de 5 experimentos diferentes). Sin embargo, estos efectos desaparecen casi por completo cuando las NPs están presentes en el medio de cultivo sólo por un periodo de 3 h de incubación en vez de todo el tiempo requerido en el experimento (24 horas) (Figura 7.13). Por tanto, parece que el daño en el núcleo celular se produce cuando la exposición de las células es por un periodo superior a las 3h.

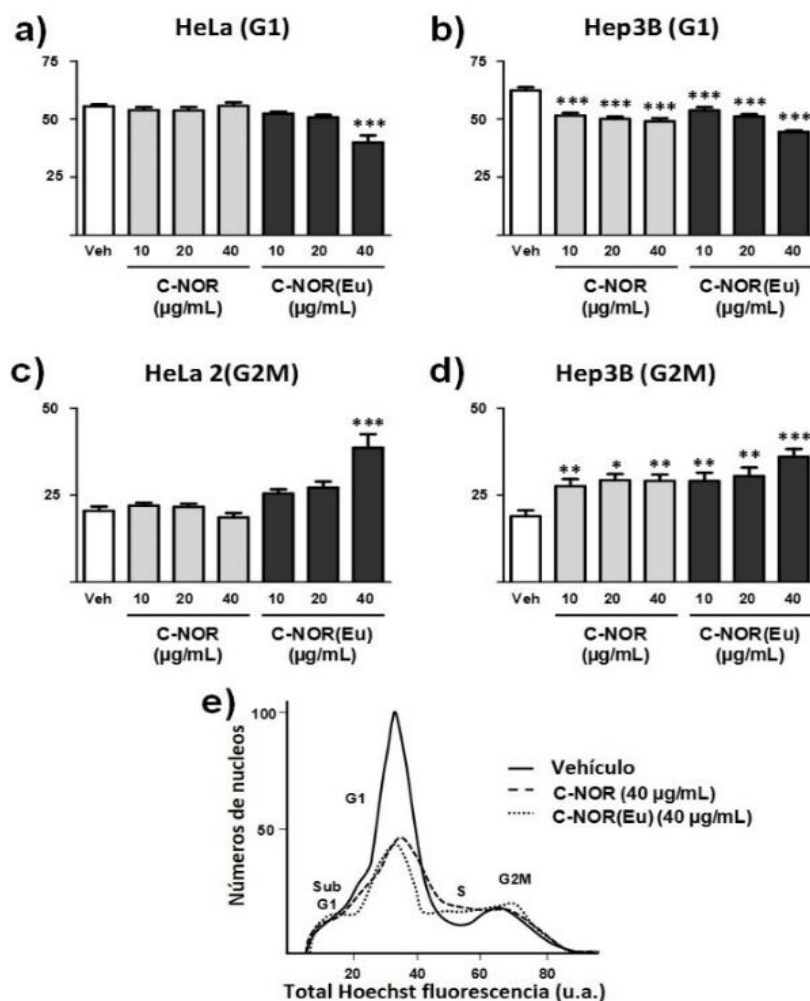


Figura 7.12- Análisis del ciclo celular por citometría estática basada en la fluorescencia del colorante de Hoechst para células HeLa y Hep3B tratadas durante 24 h con las NPs C-NOR y C-NOR(Eu). Los histogramas muestran el porcentaje de células en diferentes fases del ciclo celular: G1 (**a** y **b**) y G2M (**c** y **d**). Las células se trataron con concentraciones de C-NOR y C-NOR(Eu) a 10, 20 y 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ o con el vehículo (PBS + 5% DMSO) durante 24 h. Los datos (media aritmética \pm desviación estándar de medida $n=5$) se analizaron por el test de comparación múltiple de una vía ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. (e) Citogramas representativos basados en el análisis del ciclo celular en células incubadas con vehículo o con la concentración de C-NOR o C-NOR(Eu) más alta (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

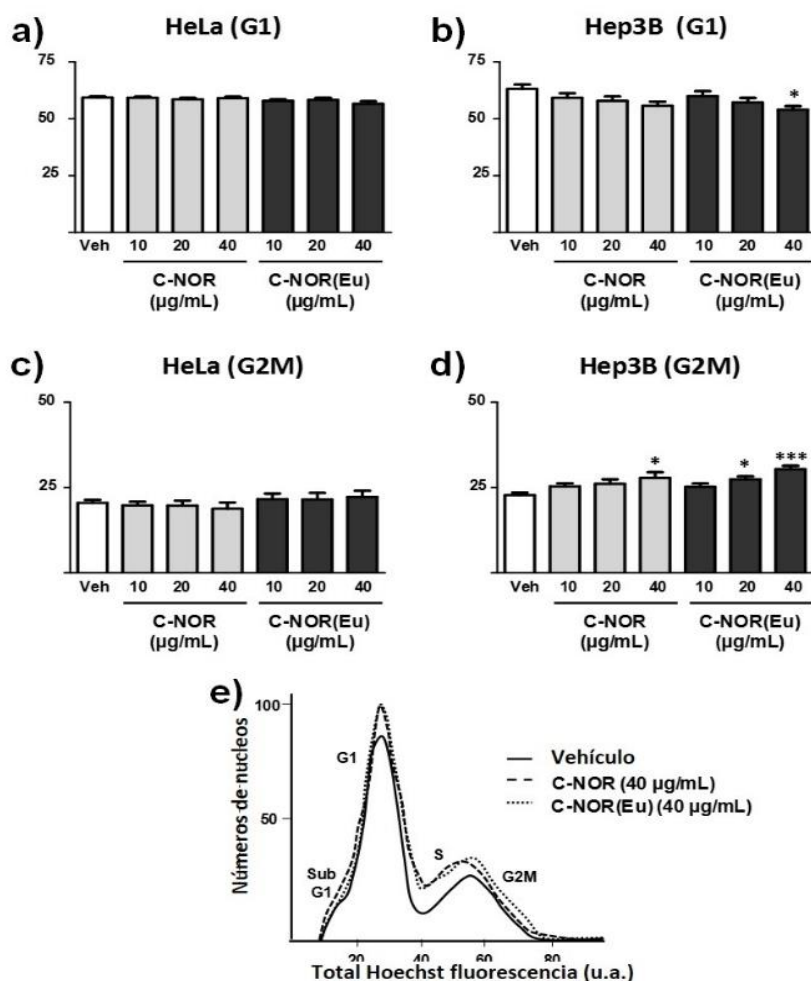


Figura 7.13- Análisis del ciclo celular por citometría estática basada en la fluorescencia del colorante de Hoechst para núcleos de células HeLa y Hep3B tratadas durante 3 h por los C-NOR y C-NOR(Eu). Los histogramas muestran el porcentaje de células en diferentes fases del ciclo celular: G1 (**a** y **b**) y G2M (**c** y **d**). Las células se trataron con concentraciones de C-NOR y C-NOR(Eu) a 10, 20 y 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ o con el vehículo (PBS + 5% DMSO) durante solo 3 h refrescando el medio a continuación. Los datos (media aritmética \pm desviación estándar de medida $n=5$) se analizaron por el test de comparación múltiple de una vía ANOVA seguido por el test de Newman-Keuls. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. (**e**) Citogramas representativos basados en el análisis del ciclo celular en células incubadas con vehículo o con la más alta concentración de C-NOR o C-NOR(Eu) (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

7.2.1.3- Medidas de inducción a la apoptosis.

A fin de completar los resultados obtenidos en los experimentos de proliferación, se pensó en estudiar si la presencia de NPs tipo C-NOR causaban o no apoptosis.

La apoptosis es una destrucción o muerte celular programada, provocada por el mismo organismo, con el fin de autocontrolar su desarrollo y crecimiento. La apoptosis tiene una función muy importante en los organismos, pues hace posible la destrucción de las células dañadas, evitando la aparición de enfermedades como el cáncer. La apoptosis es un proceso

ordenado que ocurre en diversas etapas que implica cambios superficiales en la membrana celular tales como pérdida de asimetría de fosfolípidos en su membrana plasmática desplazando a los pseudo-fosfolípidos como la fosfatidilserina (PS) a la capa externa de la membrana celular, esto ocurre incluso antes de que se produzca la muerte celular. La anexina V es una proteína que en presencia de Ca^{2+} se unen a los fosfolípidos cargados negativamente como la PS en la membrana celular. Así mediante la combinación de isocianato de fluoresceína (CIF) con anexina V se pueden contar las células dañadas o en pleno proceso de apoptosis. El yoduro de propidio (PI) solo reacciona con células muertas. La coloración simultánea de células con los dos colorantes permite mediante un análisis de dos variable (emisión CIF-Anexina V y PI-Anexina V) determinar el estado de una célula. La Figura 7.14 es un esquema del estado de las células según la emisión del colorante.

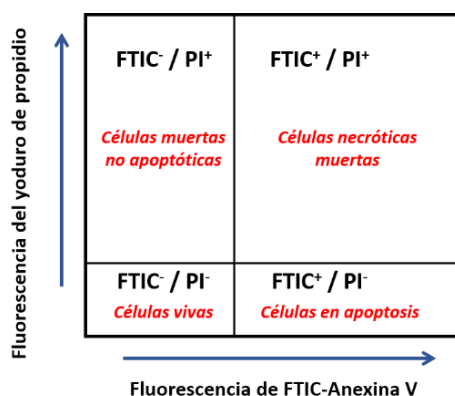


Figura 7.14- Esquema del citograma típico que muestra las cuatro subpoblaciones posibles de acuerdo a los posibles resultados para los marcadores fluorescentes FTIC-Anexina V (fluorescencia verde) y FTIC-PI (fluorescencia roja). El subíndice + significa que se observa la emisión del cromoforo correspondiente.

Como en los ensayos anteriores, se llevaron a cabo dos series de experimentos mediante microscopia de fluorescencia acoplada con citometría estática analizando varios parámetros típicos indicativos del fenómeno de apoptosis a las 24 h de exposición a las NPs. En uno de estos experimentos se mantuvieron las NPs durante todo el periodo de incubación, mientras que en otro se incubaron las células con las NPs durante solo 3 h procediendo a renovar el medio de cultivo transcurrido este tiempo. Ambos experimentos se llevaron a cabo para las concentraciones de C-NOR y C-NOR(Eu) más elevadas empleadas en el presente estudio ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Se eligió esta concentración porque tal como se ha comentado anteriormente a estas concentraciones elevadas, se observan diferencias estadísticas significativas para los experimentos de viabilidad y proliferación comentados en ambos tipos de NPs y por consiguiente debería poder observarse diferencias claras en procesos de apoptosis con respecto a los controles.

La Figura 7.14 resume los resultados posibles del análisis bi-variable Annexin V/PI para células en crecimiento exponencial sometidos a una exposición durante un tiempo determinado a un agente, en este caso las nanocebollas de carbono. Resultados similares se obtuvieron para

cultivos de líneas celulares como Hep3B y HeLa en condiciones de crecimiento exponencial, comentándose a continuación los resultados para Hep3B. Se definieron y evaluaron 4 subpoblaciones celulares diferentes, a saber, células vitales (doble test negativo, Annexin V⁻/PI⁻), apoptóticas (Annexin V⁺/PI⁻), necróticas o en la fase apoptótica final (Annexin V⁺/PI⁺) y células dañadas (Annexin V⁻/PI⁺).

A efectos de comparación se llevó a cabo un experimento representativo en el cual se estudiaron también células tratadas con estaurosporina (STS) al 0.5 μ M, que es un agente apoptótico de referencia. Como se observa en la Figura 7.16, los efectos ejercidos por las NPs C-NOR son diferentes a los de STS de referencia tal como demuestran los diagramas de barras que representan los porcentajes de células incluidas en cada subpoblación. También se observó que con respecto al control, que corresponde al cultivo con el vehículo (PBS + 5% DMSO), las células incubadas con NPs poseen también un comportamiento diferente. Específicamente este test de apoptosis revela que cuando se emplean las concentraciones más altas de NPs C-NOR Y C-NOR(Eu) existe una población significativa, aunque pequeña, de células con comportamiento (Annexin V⁺/PI⁻) que corresponde a la fase inicial de apoptosis. También las subpoblaciones de células con características Annexin V⁻/PI⁺ y Annexin V⁺/PI⁺ fueron superiores en presencia de concentraciones elevadas de C-NOR Y C-NOR(Eu) a las del control con vehículo, siendo este aumento de población más evidente para las células tratadas con C-NOR(Eu).

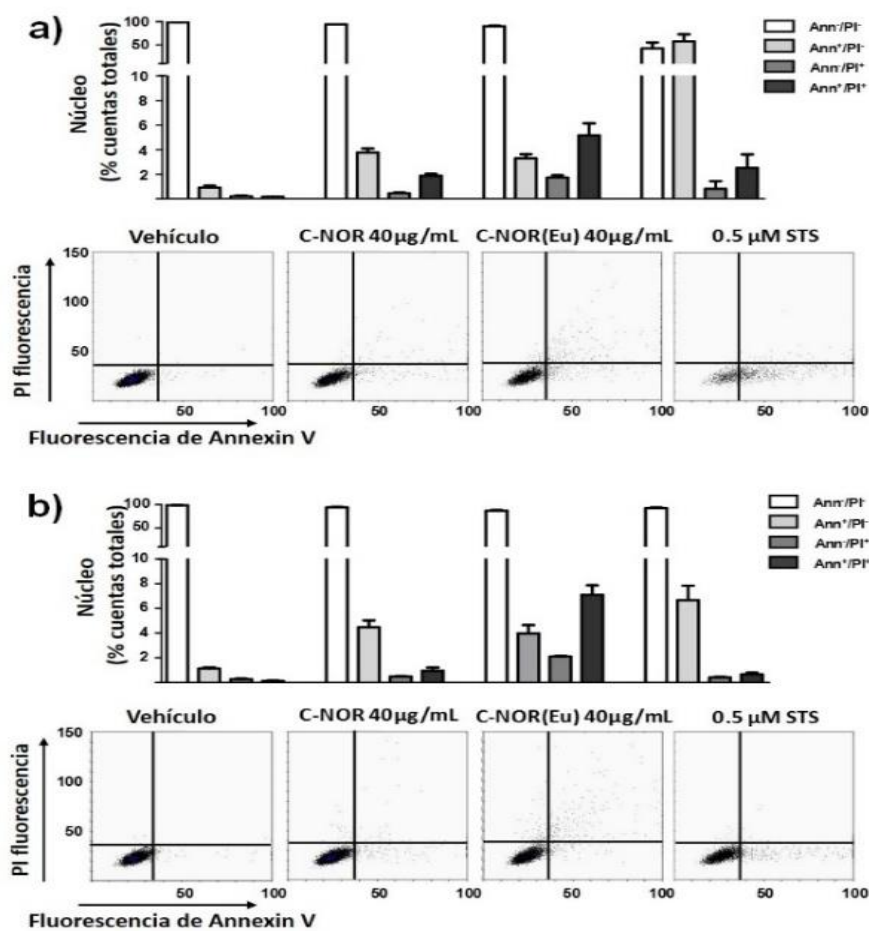


Figura 7.15- Experimento de medida de apoptosis para células Hep3B a las 24 h de incubación tras haber estado en contacto con nanopartículas C-NOR o con el agente de referencia para provocar la apoptosis STS. Los diagramas de barras representan el porcentaje de cada subpoblación celular en cada una de las condiciones estudiadas. Los histogramas representativos del análisis bi-variable Annexin V/PI siendo el vehículo (PBS + 5% DMSO), para C-NOR ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), C-NOR(Eu) ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y $0.5 \mu\text{M}$ de STS muestran la existencia de 4 subpoblaciones celulares: vital (Annexin V⁻/PI⁻), fase inicial de apoptosis (Annexin V⁺/PI⁻), necrótica o en fase apoptótica final (Annexin V⁻/PI⁺) y células dañadas (Annexin V⁺/PI⁺). **(a)** Las células Hep3B fueron incubadas durante 24 h o **(b)** durante solo 3 h procediendo a renovar el medio de cultivo con la composición estándar. Los diagramas presentan los valores medios con su error estándar medio obtenidos para cuatro medidas independientes (valor medio \pm SEM N=4).

Es interesante comentar que las NPs de C-NOR ó C-NOR(Eu) provocan un carácter proapoptótico con solo 3 h de exposición, aunque la cuantificación de la subpoblación celular afectada fue muy pequeña y de poca importancia si se compara con exposición a STS que es el agente de apoptosis de referencia. Así la exposición a STS produce un aumento de la subpoblación de células con comportamiento Annexin V⁺/PI⁻ al 57.4 % frente a solo 0.9% de las células de control tratadas solo con el vehículo. Para el caso de C-NOR y C-NOR(Eu) la inducción de apoptosis resultó ser del 3.8% y 3.3%, respectivamente, que es un valor comparativamente pequeño respecto a STS aunque estadísticamente significativo.

Además, el estudio de la morfología nuclear indica que las C-NOR y C-NOR(Eu) no inducen el proceso de apoptosis clásico que se determina por dos características comunes, a saber, condensación de la cromatina y fragmentación celular, parámetros que pueden ser evaluados mediante cuantificación del área y de la intensidad de fluorescencia del colorante de Hoechst previamente absorbido en el núcleo.

Así, las imágenes obtenidas para las células incubadas con NPs no revelaron cambios estadísticamente significativos en estos parámetros de área celular e intensidad de fluorescencia con respecto a los ensayos control llevados a cabo exclusivamente con vehículo. Es importante hacer notar que la incubación con altas concentraciones de C-NOR(Eu) inducen, por otro lado, un aumento significativo en la fluorescencia de PI, lo que sugiere que estas células están sometidas a algún tipo de daño o estrés oxidativo.

7.3.1.4- Evaluación del estrés oxidativo celular por producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Finalmente se llevaron a cabo estudios adicionales para caracterizar el perfil toxicológico de las nanopartículas de C-NOR Y C-NOR(Eu) mediante la evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante microscopía de fluorescencia. Se añadió rotenona que genera condiciones análogas de estrés oxidativo. La rotenona es un inhibidor del complejo I de la mitocondria, esto produce un aumento de ROS y desencadena la muerte celular por apoptosis. El nivel intracelular de ROS se determinó usando un procedimiento patrón que consiste en medir la fluorescencia intracelular del diacetato de 2,7- diclorodihidro fluoresceína (DCFH-DA), la oxidación de esta molécula sonda por las especies activas de oxígeno conlleva a la desaparición de la fluorescencia.

Se observó que la exposición de células a C-NOR o C-NOR(Eu) durante un periodo de 24 h no da lugar a un aumento significativo de la fluorescencia de diacetato de dicloro-dihidro fluoresceína (DCFH-DA), con la excepción de la exposición de C-NOR a las más altas concentraciones ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Los resultados se muestran en la Figura 7.16. En contraste la adición de rotenona en concentración de $25 \mu\text{M}$ produjo un aumento evidente en la intensidad de fluorescencia DCFH-DA, lo que está de acuerdo con la actividad de la rotenona estimulando la generación de ROS. En consecuencia, se puede concluir que las nanopartículas C-NOR y C-NOR(Eu) no causan la generación de especies ROS dañinas en concentraciones estadísticamente significativas.

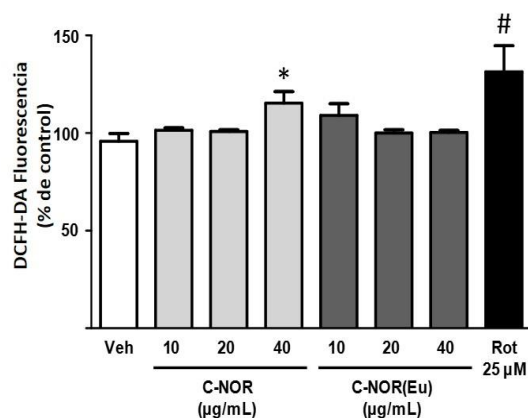


Figura 7.16 - Efecto de la presencia de NPs C-NOR y C-NOR(Eu) en la producción de ROS. Medidas de intensidad de fluorescencia de la molécula sonda DCFH-DA en células Hep3B tratadas con concentraciones crecientes de C-NOR y C-NOR(Eu) indicadas en la Figura durante 24 h. La Figura incluye también el resultado obtenido para la rotenona a concentración 25 μM como control positivo. Los datos (valor promedio \pm SEM $n=4$) se analizaron mediante el test de comparación múltiple de una vía ANOVA seguido del test Newman-Keuls. * $p<0.05$. Los datos del efecto de la rotenona fueron analizados independientemente por el test Student t-test # $p<0.05$.

7.3- Conclusiones.

Se ha mostrado como el calentamiento del PTCA a 400 °C en el seno de PEG de bajo peso molecular produce el auto ensamblaje de estas moléculas y su esterificación, dando lugar a la formación de objetos nanométricos que tienen una morfología que recuerda a los aros de una cebolla de dimensiones nanométricas y que está constituida por el apilamiento de moléculas aromáticas. Estas NPs pueden ser purificadas convenientemente por cromatografía en sílica gel, lo que permite obtener fracciones con distribución de tamaño de partícula más homogénea, en torno a 40 nm medida por HR-TEM.

Estas partículas de C-NOR son altamente fluorescentes alcanzando el rendimiento cuántico de emisión más elevado cuando son excitadas a 420 nm, siendo el valor de Φ_{em} medido en estas condiciones del 49%. La influencia de Eu^{3+} en el tratamiento térmico parece ser simplemente el favorecer la formación de estos objetos nanométricos al actuar como ácidos de Lewis que catalizan la esterificación entre los grupos carboxílicos y el PEG. Estas partículas de C-NOR son biocompatibles con células Hep3B y pueden ser internalizadas manteniendo su estructura.

En el contexto de la presente línea de investigación encaminada a la preparación de puntos cuánticos de carbono, nuestra contribución ha consistido en describir un protocolo para la preparación de objetos nanométricos de carbono estructurados y que presentan una morfología bien definida. Exhiben una estructura y morfología sumamente definidas y que está constituida por compuestos aromáticos policíclicos condensados organizándose con forma de aros de cebolla y presentan propiedades fluorescentes y compatibilidad biológica diferentes de las del precursor molecular. Por consiguiente nuestro resultado puede abrir nuevas estrategias en el desarrollo de formas nanométricas de carbono con elevada fotoluminiscencia basadas en la organización de moléculas aromáticas por tratamiento térmico con PEG.

El estudio toxicológico para las dos series de las nanopartículas para C-NOR Y C-NOR(Eu) con morfología de aros de cebolla han mostrado que estas NPs no influyen en la viabilidad celular y su proliferación a bajas concentraciones por períodos de incubación cortos, mientras que para altas concentraciones ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y largos periodos de incubación (24 h) se observa un efecto notable en la reducción de la proliferación celular que llega al 50 %. Los ensayos de apoptosis han mostrado que a altas concentraciones C-NOR aumenta a un valor del 4 % la población de células en estados iniciales de apoptosis y que este efecto no parece ser atribuible a daños aparentes en la morfología celular o al aumento del estrés oxidativo. Para concentraciones inferiores en torno a $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ la influencia de la presencia de nanopartículas C-NOR y C-NOR(Eu) en la proliferación y viabilidad celular es mínima incluso en periodos de exposición prolongados.

7.4- Referencias.

1. Sun, Y.P., et al., *Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence*. Journal of the American Chemical Society, 2006. **128**(24): p. 7756-7757.
2. Baker, S.N. and G.A. Baker, *Luminescent Carbon Nanodots: emergent Nanolights*. Angew. Chem., Int. Ed., 2010. **49**(38): p. 6726-6744, S6726/1-S6726/5.
3. Liu, J.-H., et al., *Fluorescent carbon dots and nanodiamonds for biological imaging: preparation, application, pharmacokinetics and toxicity*. Curr. Drug Metab., 2012. **13**(8): p. 1046-1056.
4. Luo, P.G., et al., *Carbon "quantum" dots for optical bioimaging*. J. Mater. Chem. B, 2013. **1**(16): p. 2116-2127.
5. Luo, P.G., et al., *Carbon-based quantum dots for fluorescence imaging of cells and tissues*. RSC Adv., 2014. **4**(21): p. 10791-10807.
6. Wang, Y. and A. Hu, *Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications*. J. Mater. Chem. C, 2014. **2**(34): p. 6921-6939.
7. Fan, R.-J., et al., *Photoluminescent carbon dots directly derived from polyethylene glycol and their application for cellular imaging*. Carbon, 2012. **71**: p. 87-93.
8. Jaiswal, A., S.S. Ghosh, and A. Chattopadhyay, *One step synthesis of C-dots by microwave mediated caramelization of poly(ethylene glycol)*. Chem. Commun. (Cambridge, U. K.), 2013. **48**(3): p. 407-409.
9. Kong, W., et al., *High-bright fluorescent carbon dots and their application in selective nucleoli staining*. J. Mater. Chem. B, 2014. **2**(31): p. 5077-5082.
10. Mitra, S., et al., *Room temperature and solvothermal green synthesis of self passivated carbon quantum dots*. RSC Adv., 2014. **3**(10): p. 3189-3193.
11. Lai, C.-W., et al., *Facile synthesis of highly emissive carbon dots from pyrolysis of glycerol; gram scale production of carbon dots/mSiO₂ for cell imaging and drug release*. J. Mater. Chem., 2012. **22**(29): p. 14403-14409.
12. Sachdev, A., et al., *A novel one-step synthesis of PEG passivated multicolour fluorescent carbon dots for potential biolabeling application*. RSC Adv., 2013. **3**(38): p. 16958-16961.
13. Selim, K.M.K., et al., *Reduced cytotoxicity of insulin-immobilized CdS quantum dots using PEG as a spacer*. Nanoscale Res. Lett., 2014. **6**(1): p. 528/1-528/9.
14. Lopez, C., et al., *Microwave-assisted synthesis of carbon dots and its potential as analysis of four heterocyclic aromatic amines*. Talanta, 2015. **132**: p. 845-850.

15. Ma, Y., et al., *Recent developments of Lewis acids catalysis: Lanthanide catalysts with long perfluoro-chain in organic chemistry*. Current Organic Chemistry, 2007. **11**(6): p. 559-576.
16. Yu, G.X., et al., *Esterification over rare earth oxide and alumina promoted SO₄²⁻/ZrO₂*. Catalysis Today, 2009. **148**(1-2): p. 169-173.
17. Matthews, L.R. and E.T. Knobbe, *Luminescence behavior of europium complexes in sol-gel derived host materials*. Chem. Mater., 1993. **5**(12): p. 1697-700.
18. Pandya, S., J. Yu, and D. Parker, *Engineering emissive europium and terbium complexes for molecular imaging and sensing*. Dalton Trans., 2006(23): p. 2757-2766.
19. Werts, M.H.V., R.T.F. Jukes, and J.W. Verhoeven, *The emission spectrum and the radiative lifetime of Eu³⁺ in luminescent lanthanide complexes*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2002. **4**(9): p. 1542-1548.
20. Davydov, V.A., et al., *Nano-sized carbon structures in the thermal conversions of hydrocarbons at high pressures*. Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct., 2006. **14**(2-3): p. 425-428.
21. Davydov, V.A., et al., *Nanosized carbon forms in the processes of pressure-temperature-induced transformations of hydrocarbons*. Carbon, 2006. **44**(10): p. 2015-2020.
22. Bogdanov, K., et al., *Annealing-induced structural changes of carbon onions: High-resolution transmission electron microscopy and Raman studies*. Carbon, 2014. **73**: p. 78-86.
23. Kuznetsov, V.L., et al., *Onion-like carbon from ultra-disperse diamond*. Chemical Physics Letters, 1994. **222**(4): p. 343-348.
24. Dubitsky, G.A., et al., *Effect of high pressures and temperatures on carbon nano-onion structures: comparison with C₆₀*. Russian Chemical Bulletin, 2011. **60**(3): p. 413-418.
25. Borgohain, R., et al., *Controlled synthesis, efficient purification, and electrochemical characterization of arc-discharge carbon nano-onions*. Carbon, 2014. **66**: p. 272-284.
26. Hou, S.-S., D.-H. Chung, and T.-H. Lin, *High-yield synthesis of carbon nano-onions in counterflow diffusion flames*. Carbon, 2009. **47**(4): p. 938-947.
27. Pervolaraki, M., et al., *Ultrafast pulsed laser deposition of carbon nanostructures: Structural and optical characterization*. Appl. Surf. Sci., 2013. **278**: p. 101-105.
28. Xiu, Y., et al., *Preparation and Tunable Photoluminescence of Carbogenic Nanoparticles Confined in a Microporous Magnesium-Aluminophosphate*. Inorganic Chemistry, 2010. **49**(13): p. 5859-5867.
29. Zhu, S., et al., *Highly Photoluminescent Carbon Dots for Multicolor Patterning, Sensors, and Bioimaging*. Angewandte Chemie-International Edition, 2013. **52**(14): p. 3953-3957.

30. Zheng, X.T., et al., *Glowing Graphene Quantum Dots and Carbon Dots: Properties, Syntheses, and Biological Applications*. Small, 2015. **11**(14): p. 1620-1636.
31. Ignatius, A.A. and L.E. Claes, *In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L,DL-lactide) and poly(L-lactide-coglycolide)*. Biomaterials, 1996. **17**(8): p. 831-9.
32. Sung, H.-W., et al., *In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring crosslinking reagent for biological tissue fixation*. J. Biomater. Sci., Polym. Ed., 1999. **10**(1): p. 63-78.

Capítulo 8

Procedimiento experimental.

8.1- Técnicas de caracterización y análisis.

8.1.1- Microscopía electrónica de transmisión

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se tomaron utilizando un microscopio Philips CM 300 FEG operando a 100 kV, mientras que las imágenes de TEM de alta resolución (HR-TEM) se llevaron a cabo con un microscopio JEOL JEM 2100F operando a 200 kV. La preparación de las muestras se llevó a cabo depositando una gota de una dispersión del material suspendido en agua o en un disolvente orgánico (diclorometano, acetonitrilo, etanol) que tienen la ventaja de ser más volátiles, sobre una rejilla de cobre (300 mesh) recubierta con una película de grafito.

8.1.2- Microscopía electrónica de barrido.

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos no transparentes al rayo de electrones, dando información morfológica sobre las partículas del material analizado. A partir de él se producen distintos tipos de imágenes que se generan para la muestra y se utilizan para examinar la morfología de zonas microscópicas, su homogeneidad y distribución de tamaño de partícula, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas. Las principales características del SEM son la alta resolución ($\sim 100 \text{ \AA}$), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras. Las muestras fueron caracterizadas por un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5410 a 20 KV. Los análisis elementales por EDX que sirve para determinar la composición elemental de las partículas observadas, se realizaron con un sistema de EDAX de Oxford Instruments acoplado a estos microscopios. Para la preparación de las muestras, éstas se adhirieron sobre un soporte portamuestras que se recubre con una cinta adhesiva conductora de doble cara y se metalizaron en su superficie anterior con una fina capa de oro mediante pulverización catódica con el objeto de hacer la superficie conductora.

8.1.3- Microscopía de fuerza atómica y perfilometría óptica.

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es una técnica que permite estudiar las características físicas superficiales de una muestra y es de especial utilidad para determinar el espesor de películas finas sobre un sustrato, midiendo la diferencia de altura entre el sustrato y la superficie de la película. En nuestro caso utilizamos este equipo para estudiar la altura de las películas de los materiales sintetizados. Se llevaron a cabo con un instrumento Multimode Nanoscope 3^a que posee resolución vertical subnanométrica y horizontal de unos 5 nm. Se prepararon suspensiones bien dispersas en etanol de las muestras y se depositó una gota sobre un sustrato de mica que es liso y no presenta rugosidad a nivel atómico. Tras evaporación del disolvente se procedió al

barrido en modo “tapping”. El espesor de los films de grafeno dopado sobre sustrato de cuarzo se determinó con un perfilómetro óptico AMBIOS, con resolución nanométrica.

8.1.4- Microscopía óptica.

Esta técnica se usa fundamentalmente para la observación de objetos en la escala de los micrómetros. Además se tiene la opción de tomar imágenes en campo oscuro tras excitar la muestra con tres longitudes de onda diferentes (400, 450 y 500 nm) permitiendo observar la emisión de fluorescencia del objeto. El aparato utilizado fue un microscopio óptico Leica siendo un modelo DM 4000B con un módulo de alimentación ebq 100 ISOLATED, cuya resolución está en torno a una micra.

8.1.5- Análisis elemental por combustión.

Esta técnica permite determinar la proporción de los distintos elementos químicos (como el carbono, nitrógeno, hidrógeno, sulfuro) que forman parte de la muestra susceptible de sufrir combustión en atmosfera de oxígeno. Midiendo las cantidades de los distintos gases que se desprende en la combustión de la muestra. El equipo utilizado es de la casa EuroVector y el modelo del aparato es un EuroEA 3000. La exactitud del instrumento es del orden de 0,01%. Y la cantidad de muestra requerida para un análisis es de aproximadamente 1 mg.

8.1.6- Análisis termogravimétrico.

Este tipo de análisis tiene como objetivo estudiar los procesos de descomposición térmica de la materia orgánica y su estabilidad dependiendo de la temperatura y atmósfera a la que está expuesta. Los análisis termogravimétricos (TGA) de los compuestos se llevaron a cabo con un aparato Mettler Toledo TGA/SDTA 851 en el rango de temperaturas de 20 °C a 900 °C a una velocidad de 10 °C·min⁻¹ y un flujo de aire de 30 mL·min⁻¹. Y la cantidad de muestra requerida para un análisis es de aproximadamente 1 mg.

8.1.7- Espectroscopía de Plasma ICP-OES.

El plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización que junto a un espectrofotómetro de emisión óptico (OES) constituye el equipo de ICP-OES.

En esta técnica, la introducción continua de la muestra líquida y un sistema de nebulización forma un aerosol que es transportado por el argón a la antorcha del plasma, sometida a una ionización por inducción por radiofrecuencia. En el plasma, debido las altas temperaturas generadas, los analitos son atomizados e ionizados generándose los espectros de emisión atómicos de líneas características. Los espectros son dispersados por la red de difracción y el detector sensible a la luz se encarga de medir las intensidades de las líneas. Mediante un calibrado es posible determinar la concentración del elemento analizado en base a la intensidad de alguna de sus líneas de emisión características. El equipo utilizado para realizar los análisis es de la casa Variant y modelo 715 E. El procedimiento para analizar las muestras es el siguiente: se disgregan 30 mg de una muestra utilizando 5 ml de una disolución HCl/HNO₃/HF con una proporción (3:1:1) durante 24 h a temperatura ambiente, finalmente el licor resultante de la disgregación se diluye hasta 60 gramos con agua milli Q y se inyecta en el aparato.

La calibración se lleva a cabo inyectando disoluciones de concentración conocida en el rango de magnitud que se espera encontrar en las muestras.

8.1.8- Espectroscopia fotoelectrones emitidos por rayos X.

Es una espectroscopia baja resolución espacial que habitualmente se utiliza para estimar la estequiometría (con un error del 10% aproximadamente), estado químico y la estructura electrónica de los elementos que existen en un material. Los espectros XPS se obtiene irradiando con rayos X (habitualmente con un ánodo de Al o Mg) y al mismo tiempo se miden la energía cinética y el número de electrones que escapan de la superficie del material analizado. Se requieren condiciones de ultra-alto vacío debido a que a presiones mayores la tasa de adsorción por contaminación sobre la muestra puede ser del orden de varias monocapas atómicas por segundo, impidiendo la medición. Los espectros fotoelectrónicos de rayos X (XPS) se registraron en un espectrómetro SPECS equipado con un detector Phoibos 150 9MCD utilizando una fuente no monocromática de rayos X (Al y Mg) operando a 200 W. Las muestras se evacuaron en una precámara del espectrómetro a 10⁻⁹ mbar. Las relaciones de intensidad de los componentes fueron obtenidos del área de la señal correspondiente tras la substracción del fondo mediante un ajuste no lineal tipo Shirley y corregidos por la función de transmisión del espectrómetro. La

cuantificación y tratamiento de los espectros se llevó a cabo empleando el software Casa que acompaña al equipo.

8.1.9- Espectroscopía de resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C .

La resonancia magnética nuclear (RMN) es un método espectroscópico basado en las propiedades magnéticas de los núcleos que poseen spin nuclear distinto de cero. En la presente tesis se han realizado espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , ambos con número cuántico de spin $\frac{1}{2}$. La espectroscopía de RMN sirve para determinar la estructura química y grupos funcionales de las moléculas estudiadas. Los espectros de RMN de muestras en disolución se registraron en un espectrómetro de RMN Advance III de la casa Bruker de 400 MHz, utilizando disolventes deuterados comprados en Sigma-Aldrich. Los valores de desplazamiento químico (δ) se indican en la escala de ppm y los valores de acoplamiento (J) en Hz.

8.1.10- Espectroscopía Raman.

La espectroscopía vibracional Raman es una técnica de caracterización muy útil para materiales carbonosos y que se realiza directamente sobre el material a analizar bien como polvo o dispuesto en film, sin necesidad de ninguna preparación previa. El análisis se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente debida a la interacción con los estados vibracionales del material, experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos de los materiales analizados e independientes de la frecuencia de la luz incidente. Las medidas de espectroscopia Raman se llevaron a cabo utilizando un instrumento Renishaw in Via Raman Microscope a temperatura ambiente con un láser de ion argón de 514.5 nm como fuente de excitación acoplado a un microscopio óptico Olympus que permite determinar la zona de la muestra expuesta al haz láser. Se registraron espectros Raman de diferentes regiones de las muestras a fin de confirmar su homogeneidad.

8.1.11- Espectroscopía de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis).

La absorción en el UV-Vis corresponde a la región de longitudes de onda del espectro electromagnético comprendida entre 200 y 800 nm. Esta espectroscopía ofrece información

sobre la diferencia de energía entre los orbitales frontera produciendo saltos electrónicos (espectro electrónico). Esta información está relacionada con la estructura molecular.

Las medidas de espectroscopía por reflectancia difusa UV-Vis-NIR de las muestras sólidas se realizaron en un espectrofotómetro Cary 5 Varian. El estudio por reflectancia difusa de los sólidos opacos se realizó utilizando una esfera integradora, obteniéndose espectros cuya intensidad viene expresada en unidades de reflectancia (R) en tanto por cien, tomando como 100% la reflectancia del BaSO₄ en todo el rango de longitudes de onda. El espectro de absorción se obtiene representando 1/R, o bien la función Kubelka-Munk ($F(R) = (1-R)^2/2R$), frente a la longitud de onda.

Los espectros de Transmitancia UV-Vis fueron tomados utilizando una cubeta de cuarzo de 10 mm · 10 mm con un volumen de 4 mL. Las muestras fueron medidas utilizando un aparato Jasco-650. La concentración óptima para las medidas de concentración se considera cuando su máximo de absorción está entre el rango 0.3 y 1 unidades de absorción (u.a.).

8.1.12- Espectroscopia de Fluorescencia.

Este tipo de espectroscopía permite detectar la emisión luminosa de los estados excitados singlete y triplete de moléculas y materiales siempre que estos estados excitados se desactiven cuando retornan la molécula a su estado fundamental por emisión de fotones. Un espectrómetro de fluorescencia consta de una lámpara de excitación, que puede ser de Xenón o Mercurio, la cual genera un haz que atraviesa la muestra. Se selecciona la longitud de onda de excitación utilizando un monocromador y para evitar interferencias con la fuente de luz de excitación se registra las emisiones de fluorescencia perpendiculares (90 °) respecto a la luz de excitación.

Los espectros fueron tomados utilizando cubetas de borde plano de cuarzo con cuatro caras pulidas de 10 mm · 10 mm con una capacidad de 4 mL. Las muestras tenían una absorbancia en torno a 0.3 u.a. a la longitud de onda de excitación cuando fueron registradas todas medidas de emisión. El aparato utilizado para realizar estas medidas es un JASCO Spectrofluorimeter FP-8500.

8.1.13- Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier medida por el método de reflexión de atenuación total (FTIR-ATR)

La absorción en el FTIR se produce por interacción de la radiación incidente con los niveles vibracionales de las moléculas. La intensidad de la absorción depende de las variaciones que produce la oscilación en el momento dipolar. El aparato utilizado para registrar los espectros es Bruker Tensor 27. Este aparato permite hacer FTIR-ATR y examinar la muestra directamente en estado líquido o sólido sin más preparación lo que significa una gran ventaja. Las muestras se prepararon depositando un poco de polvo de las muestras o soluciones conteniendo el analito, haciendo previamente un blanco con el disolvente o analizar una muestra soportada en silicio que es transparente a las radiaciones IR.

8.1.14- Dispersión dinámica de luz y potencial Z.

Es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión o macromoléculas. Se pueden medir el tamaño de partícula y la carga eléctrica de las partículas (potencial Z). Las muestras son suspensiones diluidas, en agua destilada y se sonicaron antes de realizar las medidas para asegurar su completa suspensión. El equipo utilizado para medir la distribución de tamaño de partícula y el potencial Z es un ZetaSizer Malvern Instrument.

8.1.15- Espectroscopía de absorción de transición (T.A.S.).

8.1.15.1- Fundamento teórico de la técnica.

Esta técnica es también conocida como “*Espectroscopia de destello laser*” es una extensión de la espectroscopia de absorción que permite registrar estos espectros con resolución temporal desde picosegundos hasta milisegundos. El tipo de radiación que utiliza esta técnica es una emisión LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*). Las características más importantes de la radiación láser son su monocromaticidad, polarización efectuándose la vibración electromagnética del láser en el mismo plano y todas las ondas tienen la misma fase (las crestas y valles de las ondas de luz concuerdan a lo largo de todo el haz de luz).

La espectroscopia de absorción de especies transitorias consiste en la irradiación de la muestra con un pulso o destello láser muy corto (**5 ns** en nuestro sistema) y se utiliza este haz para excitar la muestra y así poder estudiar los estados intermedios que se generan tras su excitación.

Entre los láseres más comúnmente utilizados como fuentes de excitación se encuentran los láseres de estado sólido pulsados ya que permiten resoluciones temporales en la escala de nanosegundos (10^{-9} s) e incluso de picosegundos (10^{-12} s). El láser más usado es el de Nd-YAG que puede proporcionar a partir de la longitud de onda primaria monocromáticas otras longitudes de onda de 266, 355, 532 y 1064 nm. El comportamiento temporal de estas especies producidas es seguido mediante espectroscopia de absorción, por un segundo pulso de luz UV-Visible procedente de la lámpara de análisis, sincronizado con el destello del láser, y cuyo haz pasa a través de la muestra en ángulos cercanos a 90° con respecto al pulso del láser de excitación, y cuya duración se ajusta al menor tiempo posible para que no produzca la fotólisis de la muestra bajo observación. Típicamente la desviación del pulso de la lámpara es de 1-5ms. Mediante el uso de un monocromador es posible obtener los perfiles temporales de la señal en el rango longitudes de onda correspondiente al espectro UV-Visible que cubre desde 200 a 800nm. Típicamente el detector es un tubo fotomultiplicador de electrones con un número de diodos entre 4 y 6 y con un voltaje máximo de operación de 1 kV. El voltaje del fotomultiplicador es ajustado automáticamente durante el experimento por el programa a fin de obtener una señal de la magnitud adecuada.

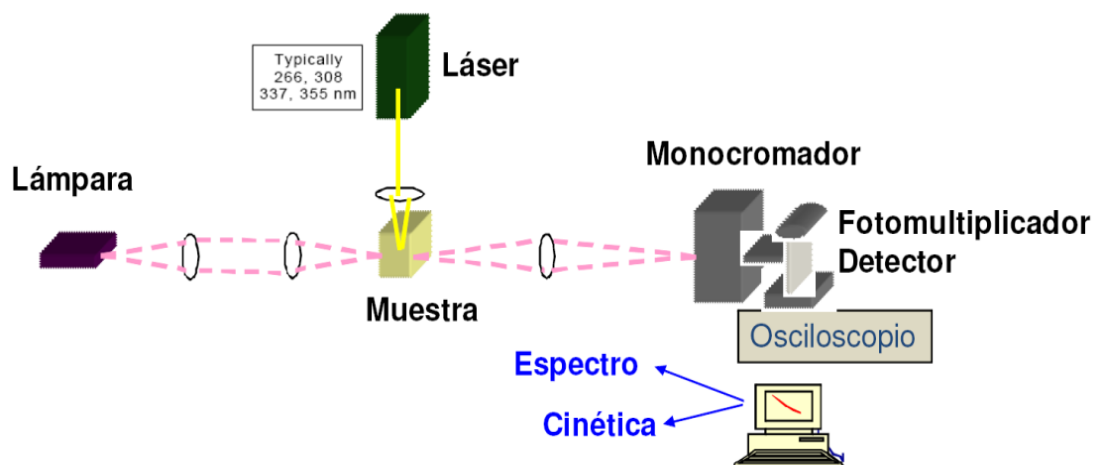


Figura 8.1- Esquema de un equipo de espectroscopia de absorción del estado transitorio (TAS) donde se indican los principales componentes.

La dinámica de los intermedios producidos fotoquímicamente se expresa en términos de diferencia relativa de densidades ópticas ($\Delta A/A$ o $\Delta D.O./D.O.$) que es la diferencia entre las absorbancias de la muestra excitada (M^*) y sin excitar (M) a la longitud de onda monitorizada dividida por el valor de la absorbancia inicial, de forma que la señal medida se corresponde con

las variaciones en absorbancia de la muestra respecto al haz de prueba que atraviesa la muestra antes y después del pulso de excitación. En la figura 8.2 puede verse el diagrama de Jablonsky que resume las transiciones electrónicas más probables en una molécula orgánica tras su excitación y una aproximación en la escala de tiempos en la que ocurren. En la Figura 8.3 podemos ver un ejemplo real de la señal obtenida mediante esta técnica tras la excitación de la muestra por destello laser

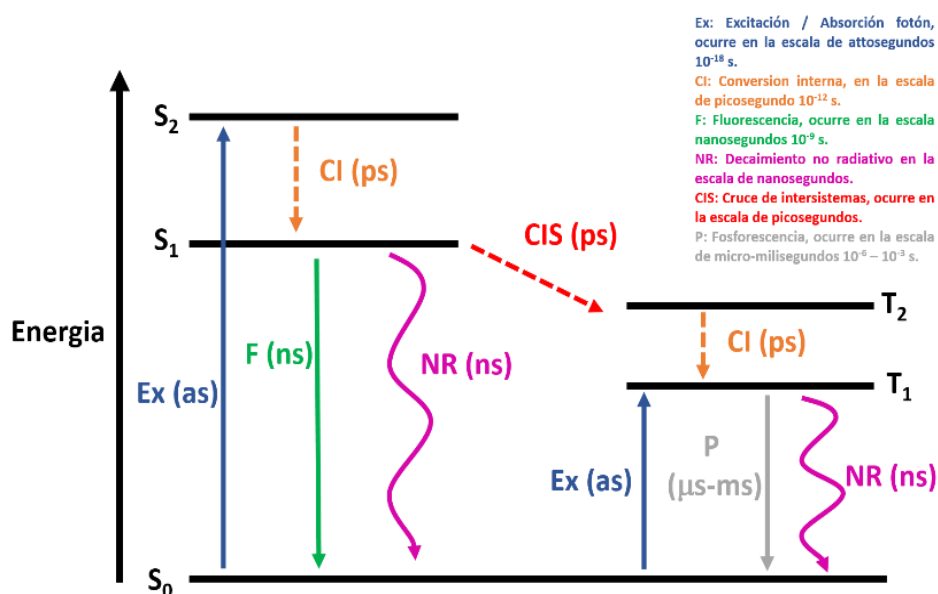


Figura 8.2 – Corresponde a una simplificación del diagrama de Jablonsky. Este diagrama muestra los posibles “camino electrónicos” que puede ocurrir en una molécula orgánica tras su excitación y la escala de tiempos a la que ocurren estas transiciones. El electrón con exceso de energía liberará esta energía extra mediante varios procesos (*radiativos, térmicos o relajación interna*) hasta volver a su estado fundamental. Para un sólido como el grafeno este gráfico sería mucho más complicado debido a que en la misma lámina de grafeno coexisten muchos dominios diferentes. Mediante la técnica de espectroscopia de destello laser empleada para los análisis en esta tesis doctoral, se han podido estudiar los sucesos ocurridos en la escala de pocos nanosegundos a milisegundos, midiendo la absorbancia de las especies excitadas hasta que se relaja otra vez al estado fundamental.

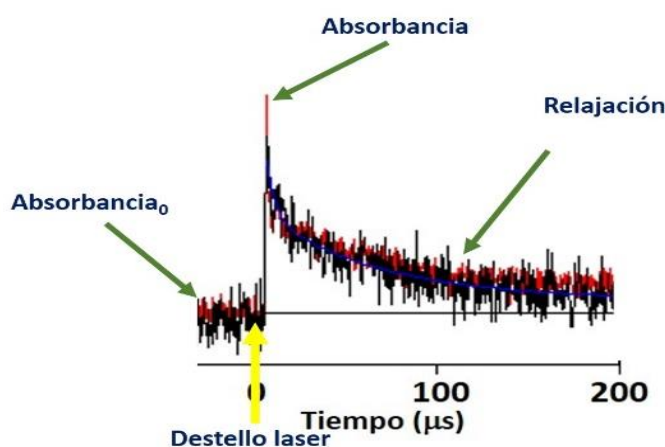


Figura 8.3- Racionalización de una señal de decaimiento tras la excitación por destello laser. Primero, el equipo monitoriza la absorbancia inicial de la muestra antes del destello laser. Después del destello laser (que tiene una duración de 5 ns por pulso de laser), el equipo observa un cambio en la absorbancia respecto a la inicial si la muestra ha sido excitada. Posteriormente se observa una pérdida en la absorbancia debido a que el estado excitado empieza a decaer o relajarse hasta alcanzar otra vez la absorbancia inicial (Estado fundamental del material). Debido a la limitación del equipo utilizado no se pueden observar sucesos que ocurran antes de la escala de nanosegundos, para ello habría que utilizar otro equipo con un destello laser más corto como un femtolaser.

De esta forma, la absorción de la muestra antes, durante y después del pulso de radiación es así registrada por el fotodetector en función del tiempo transcurrido desde la excitación. El detector convierte los cambios de la intensidad de luz en una señal eléctrica que queda registrada en un osciloscopio para, al final, ser transferidos a un ordenador que controla el experimento y transforma la señal eléctrica en cambios de absorbancia a lo largo del tiempo. En la Figura 8.1 vemos un esquema de los componentes de un equipo de TAS y de la obtención de la señal.

Las especies transitorias están caracterizadas por su espectro de absorción; la naturaleza química de dichas especies se pueden asignar mediante el estudio de su reacción con sustancias inhibidoras de triplete, dadoras o aceptoras de electrones, protones o incluso atrapadores de radicales libres.

8.1.15.2- Equipo y procedimiento experimental.

Las medidas del espectro de las especies transitorias fueron llevadas a cabo utilizando los armónicos de un láser tipo Nd:YAG de la marca Quantel Brilliant acoplado a un módulo mFLP-122 Luzchem. Este detector está constituido por una lámpara de cerámica Xenon de 300 W y un monocromador de 125 mm, un osciloscopio Tektronix TDS-2100C además de un fotomultiplicador y alimentador de energía, soporte para las muestras, fibra-óptica y el paquete de programas que permiten controlar el experimento y manipular los datos, desarrollado en LabVIEW environment por National Instruments. El equipo del láser tiene un generador de pulsos de 5V con una programación de la frecuencia y retraso del disparo. El tiempo de captura del detector/digitalizador es de 3 ns a una frecuencia de 300 MHz (toma de medida 2.5 GHz), siendo estos parámetros los que limitan la respuesta del sistema, junto con la duración del pulso de láser (5ns). El haz de luz de muestreo llega a la muestra a través de una fibra óptica. Una fibra óptica recoge parte de la radiación del pulso del láser y sincroniza el módulo de detección del sistema LFP. Las muestras fueron medidas utilizando una cubeta de cuarzo de 10 mm x10 mm con un volumen de 4 mL después de haber sido purgada con argón o con el gas agente de desactivación deseado (O₂, N₂O etc) durante 15 min. Cuando los agentes desactivantes son líquidos (metanol,

trietilamina, trietanolamina etc), estos previamente diluidos (1M) se añaden una pequeña alícuota de pocos microlitros con una jeringuilla y se purga con argón, también durante 15 min.

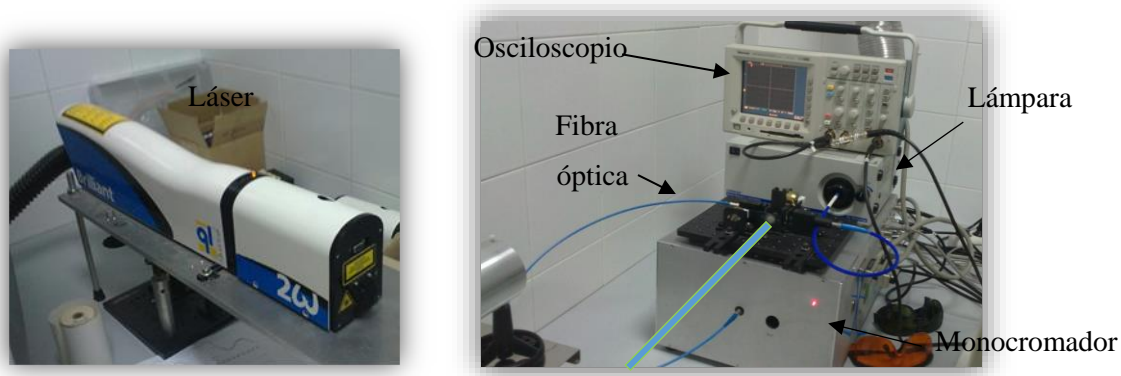


Figura 8.5- Imagen del láser y del equipo que registra las medidas.

8.1.15.3- Racionalización de las transiciones electrónicas observadas para materiales derivados del grafeno.

En la presente tesis doctoral se ha caracterizado la fotofísica de materiales derivado del grafeno. Para nuestro caso particular se han realizado medidas de suspensiones diluidas (D.O.= 0.2-0.3 u.a) de partículas de grafeno suspendido en acetonitrilo (debido a que no absorbe en las regiones donde excitamos y tampoco interacciona fuertemente con la muestra). Estas partículas actúan como semiconductores el diagrama de Jablonsky, aunque puede servir de orientación, no representa totalmente las transiciones electrónicas que ocurren en este tipo de sistemas. Eso es debido al incremento de niveles energéticos LUMO Y HOMO que se solapan y que aumentan a media que aumenta el tamaño de la partícula generando una banda de Valencia poblada de electrones y una banda de Conducción donde hay “huecos” o niveles electrónicos vacantes donde pueden alojarse los electrones excitados. Por este motivo sería difícil esperar que las transiciones electrónicas observadas en moléculas disueltas fueran comparables a las señales que obtenemos en este tipo de sistemas.

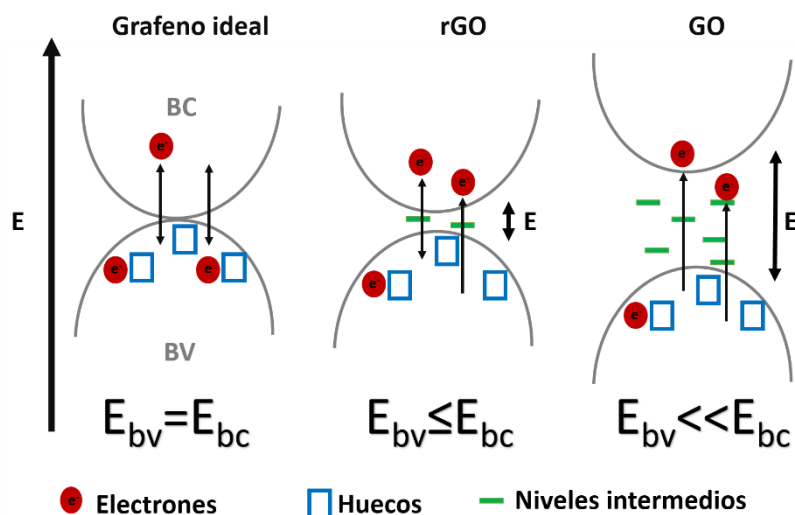


Figura 8.6- Esquema de los niveles electrónicos para distintos tipos de materiales (a) Conductor, (b) semiconductor con estrecho bang-up y (c) semiconductor con una gran separación entre las bandas de conducción y valencia. Este modelo puede utilizarse para razonar el comportamiento electrónico en grafenos y sus derivados. (a) Para un material conductor como el grafeno ideal ocurrirá que la banda de Valencia se solapara con la de Conducción y existirá una libre circulación electrónica entre las bandas. (b) Corresponde a un grafeno reducido o reconstituidos. Ilustra que existe una pequeña separación entre las bandas de Valencia y de Conducción debido a la presencia de defectos estructurales (pérdida de aromaticidad puntual). También vemos que han surgido niveles intermedios debido a la aparición de defectos, dopajes o dominios aislados. Esto ocurre porque la reconstitución a grafeno a partir del GO no es perfecta. Estos niveles energéticos intermedios pueden generar efectos de atrapamiento electrónicos. (c) Ejemplo de los niveles electrónicos de un material derivado de grafeno con alto porcentaje de dopaje como es el caso del grafeno halogenado o con numerosos defectos estructurales como es el caso del GO. Este dopaje puede incrementar la heterogeneidad de dominios en la lámina de grafeno generando niveles energéticos intermedios o defectos estructurales por pérdida de aromaticidad provocando el aumento de energía entre la banda de Valencia y la de Conducción.

8.2- Procedimientos experimentales electroquímicos.

8.2.1- Mediciones fotoelectroquímicas.

Las mediciones fotoelectroquímicas se llevaron a cabo utilizando una lámpara de 150 W de xenón como fuente de luz y un monocromador modelo de PTI 101. La corriente eléctrica se midió con un potenciostato 7050 Amel que está conectado eléctricamente con el electrodo de

FTO sobre el que se deposita la muestra y actúa como electrodo de trabajo con un alambre de platino ("Trallero y Schlee") como contraelectrodo. El electrodo de trabajo se puede iluminar con el haz monocromático proveniente de la lámpara. En todos los casos, la irradiación se fijó en el máximo de absorción de la luz para la muestra (N)G, alrededor de 300 nm. Los experimentos se llevaron a cabo dentro de una cubeta de cuarzo (10 mL) que contenía una solución 0,1 M de KCl como electrolito. El sistema se purgó con nitrógeno durante al menos 15 min antes de la medición.

8.2.2- Determinación del potencial de banda plana.

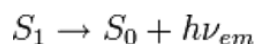
El potencial de banda plana (E_{FB}) se determinó estableciendo el potencial umbral de aparición de fotocorriente. Típicamente, cuando se ponen en contacto la superficie del electrodo semiconductor y una solución, la banda superficie del material sufre una deformación en la interfaz entre ambas fases para formar un campo eléctrico. De acuerdo con el mecanismo de generación de la fotocorriente, los electrones fotogenerados migran dando lugar a la fotocorriente por efecto de campo eléctrico. Cuando se aplica una polarización inversa, se puede compensar la parte del campo eléctrico. Como la corriente se aproxima a cero, la tensión externa en este momento se asume que es igual a la banda plana. El método consiste en medir la respuesta de fotocorriente bajo múltiples ciclos de encendido/apagado de la iluminación que varían el sesgo en un rango de potenciales externos donde se incluye el valor de E_{FB} . Por lo tanto, la determinación de este inicio se llevó a cabo variando la polarización en el rango entre 0.5 y 0 V variando el potencial 0.02 V por cada ciclo de encendido y apagado.

8.3- Procedimientos experimentales en fotoquímica.

8.3.1- Calculo de los rendimientos cuánticos de fluorescencia.

La fluorescencia ocurre cuando un electrón de un átomo, molécula o nanoestructura en un estado energético excitado superior se relaja a su estado electrónico fundamental. El proceso ocurre tras

la absorción de energía por radiación electromagnética por parte de la especie enigma. Las siguientes ecuaciones resumen el proceso.



Esquema 8.1- Proceso de fluorescencia que tiene lugar tras la excitación de una molécula por absorción de un fotón ($h\nu_{ex}$). La fluorescencia ($h\nu_{em}$) responde a la desactivación de la especie excitada por emisión de un fotón.

El rendimiento cuántico de un proceso de fluorescencia es una manera de establecer la eficacia del mecanismo y se define como la relación entre los fotones emitidos y los fotones absorbidos.

$$\Phi_{fl} = \frac{\text{Fotones emitidos}}{\text{Fotones absorbidos}}$$

Ecuación 8.1- Ecuación de la eficiencia cuántica de fluorescencia.

En el caso práctico para facilitar el cálculo de la eficiencia cuántica se utilizan patrones que tienen valores de rendimientos cuánticos conocidos que debe cumplir la condición fundamental de tener la banda de absorción y de emisión en una región del espectro UV-Vis que coincida con las de la especie a estudiar.

$$\Phi_{fl} = \Phi_p \cdot \frac{I}{I_p}$$

Ecuación 8.2- Cálculo de la eficiencia cuántica de fluorescencia Φ_{fl} , basado en las comparaciones de las intensidades de fluorescencia de las muestras con un patrón de rendimiento cuántico conocido, Eficiencia cuántica del patrón Φ_p . Intensidad de emisión del patrón I_p y la intensidad de emisión de material a estudiar I , excitada a la misma longitud de onda que el patrón.

En el caso de la presente Tesis Doctoral, se ha utilizado este procedimiento para caracterizar la eficiencia cuántica de fluorescencia de las muestras de nanopartículas de carbono sintetizadas en los capítulos 4, 6 y 7. En estos capítulos se prepararon disoluciones en acetonitrilo con la misma absorbancia (0.3 u.a.) a la longitud de onda de excitación $\lambda_{ex} = 350$ nm y se ha utilizado antraceno como patrón ($\Phi_{fl} = 0.3$ a 350nm, en disolventes orgánicos polares). El espectrofotómetro de fluorescencia utilizado para realizar estos cálculos es el mismo equipo utilizado para hacer los registros de las emisiones de fluorescencia.

8.3.2- Rendimiento cuántico relativo de separación de cargas.

La determinación del rendimiento relativo cuántico de separación de cargas (Φ_{sc}) en los Capítulos 3 y 4 se llevó a cabo después de registrar en todas las muestras las señales de desaparición de los estados excitados a la misma longitud de onda para muestras de los diferentes grafenos a concentración para los cuales la absorción a la longitud de onda del láser(355nm) fueron todas de 0,3 u.a.. Después se comparan los valores máximos de las intensidades de las señales ($\Delta J/J_0$) eligiéndose la muestra con el valor más alto de ($\Delta J/J_0$) como valor de referencia para las demás muestras. Las muestras fueron medidas exactamente en las mismas condiciones y en la misma sesión con idéntica potencia de láser. Las muestras fueron suspendidas en acetonitrilo y purgadas con argón durante 10 min.

$$\Phi_{sc} = \frac{(\Delta J/J_0)}{(\Delta J/J_0)_{max}} \cdot 100$$

Ecuación 8.3- Cálculo de la eficiencia cuántica relativa de separación de cargas a partir de los valores de intensidad máxima de la señal transitoria para diferentes muestras con la misma absorbancia y en las mismas condiciones.

Para la determinación de los rendimientos cuánticos relativos Φ_{sc} se utilizó el mismo equipo que en las medidas de espectroscopia de absorción de especies transitorias y una cubeta de cuarzo de 10 mm · 10 mm con un volumen de 4 mL.

8.3.3- Tiempos de vida de emisión de fluorescencia.

El tiempo de vida de la fluorescencia depende básicamente del tiempo promedio que permanece la molécula en su estado de excitación antes de emitir un fotón. Los tiempos típicos de decaimiento del estado excitado se encuentran en la escala de nanosegundos. El tiempo de vida de un fluoróforo es un parámetro importante para las aplicaciones prácticas de la fluorescencia tales como el desarrollo de sensores o la obtención de imágenes.

El tiempo de vida de emisión se calcula ajustando el perfil temporal de la señal de emisión a un decaimiento exponencial de primer orden y se toma el valor de tiempo correspondiente al momento en que la intensidad de emisión es la mitad de la inicial.

$$\tau_{1/2} = - \frac{\ln(1/2)}{k}$$

Ecuación 8.4- Expresión matemática que relaciona el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) con la constante de desaparición de la señal (k) para una cinética de primer orden.

El procedimiento experimental para realizar las medidas del tiempo de vida empleado en el capítulo 7 utiliza un aparato de conteo de fotones emitidos EasyLife X. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 10 mm · 10 mm con un volumen de 4 mL y se ajustaron las absorciones de las muestras a 0.3 u.a. Luego se registraron las emisiones utilizando un fotodiodo led que emite luz de manera monocromática de 400 nm. Se utilizó un filtro de corte que deja pasar únicamente al detector longitudes de onda superiores a 400 nm para asegurar que la señal recibida por el detector corresponde realmente a la emisión. Luego se representó el perfil temporal de decaimiento de la señal y se calculó el tiempo de vida ajustándolo a un decaimiento exponencial de primer orden.

8.3.4- Experimentos de desactivación.

Procesos tales como la fluorescencia y la fosforescencia son ejemplos de procesos de desactivación intramolecular (desactivación por emisión de fotones). Una desactivación intermolecular es donde la presencia de otra especie química acelera la velocidad de relajación de un compuesto o material en su estado excitado. En general, este proceso. En el proceso de inhibición ocurren las siguientes etapas.

Absorción de luz:	$M + h\nu \rightarrow M^*$	I_A
Fluorescencia/Estado excitado:	$M^* \rightarrow M + \text{Energía}$	$k_F [M^*]$
Decaimientos por relajación interna:	$M^* \rightarrow M$	$\Sigma k_i [M^*]$
Desactivación mediante agente desactivante:	$M^* + Q \rightarrow M + Q$	$k_q [M^*] [Q]$

Cumpléndose la ecuación 8.5

$$\frac{I_f^0}{I_f} = 1 + k_0 \cdot \tau_0 \cdot [Q]$$

Ecuación 8.5- Ecuación de Stern-Volmer que relaciona entre la intensidad de emisión de la molécula antes (I_f^0) y después (I_f) de la adición de una concentración $[Q]$ de agente desactivante.

Existen dos tipos de desactivación o inhibición:

-**Inhibición dinámica** puede corresponder a una transferencia de energía o electrónica entre una especie excitada y un desactivador (Q).

-**Inhibición estática** ocurre cuando se forma un complejo no fluorescente en el estado fundamental entre la molécula emisora y la molécula desactivadora.

Para poder distinguir que tipo de inhibición está actuando de manera dominante, se determina el tiempo de vida del estado excitado en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de desactivador. Si al añadir concentraciones crecientes de inhibidor el tiempo de vida del estado excitado se va acortando gradualmente, estaría actuando una desactivación dinámica mientras que si no varía el tiempo de vida del estado excitado el mecanismo de desactivación sería estático.

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \cdot \tau_0 [Q]$$

Ecuación 8.6- Influencia de la presencia de inhibidor en los tiempos de vida del estado excitado.

De esta manera, una forma de dilucidar el tipo de desactivación que actúa en un proceso, consiste en representar τ_0/τ frente [Q], obteniéndose una línea recta tal como se indica en la figura 8.7:

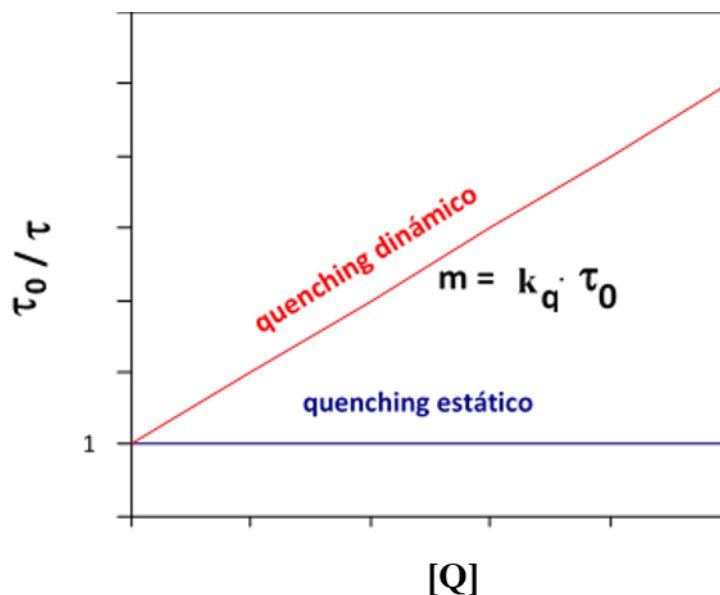


Figura 8.7- Gráfico que permite diferenciar entre los dos tipos de desactivación en base a la influencia o no de la concentración de inhibidor en los tiempos de vida de las especies transitorias.

Además se puede utilizar esta representación matemática para el cálculo de k_q a partir de la pendiente de la recta generada. k_q es una medida cuantitativa de la fuerza de la interacción entre el estado transitorio y la especie inhibidora.

Este procedimiento ha sido el empleado en el Capítulo 3 al estudiar el comportamiento aceptor de electrones con una de las muestras de G, utilizando como dadores de electrones las siguientes aminas: trietanolamina, fenotiacina y N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina. Los experimentos de inhibición utilizan el mismo equipo de destello laser que el que se emplea para las medidas de espectroscopia de absorción de especies transitorias. Las disoluciones se colocan en una cubeta de cuarzo de 10 mm x 10 mm con un volumen total de 4 mL, y que pueden ser selladas con un caucho. El proceso para determinar el tipo de inhibición consiste en registrar las señales de los decaimientos del estado excitado en la longitud de onda donde el valor de $\Delta J/J_0$ es el máximo posible en la muestra. Se añade en la misma cubeta en alícuotas de concentraciones conocidas de las aminas mencionadas. En cada adición, se agita bien la muestra y se purga durante al menos 10 min con argón a fin de evitar la presencia de aire que haya podido acceder al interior de las cubetas. Tras la adición y purga se procede a medir el perfil temporal de la señal de decaimiento en la misma longitud de onda. Este proceso se repite varias veces y finalmente representamos las constantes de velocidad o los tiempos de vida relativos calculándose la constante de k_q a partir de la pendiente de la línea recta que resulta del mejor ajuste de los valores experimentales.

8.3.5- Fotogeneración de H₂ a partir de una disolución agua–metanol.

Para este experimento, realizado en el capítulo 5, se utiliza como fuente de irradiación el tercer armónico (355 nm) de un láser pulsado de Nd-YAG (5 ns FWHM, 350 mW). El fotorreactor era un recipiente cilíndrico de cuarzo (volumen total 55 ml) con una entrada y salida que lleva válvulas independientes que permite el sellado del reactor, tiene acoplado un manómetro para determinar la presión del recipiente. El sistema se purga antes de la irradiación con un flujo de argón durante 30 min a fin de garantizar la ausencia de oxígeno que inhibiría completamente la reacción. La solución fotocatalítica (30 mL) que contiene 30% v/v de metanol como agente donador de electrones sacrificial, se agitó con un imán continuamente durante la irradiación. Todos los experimentos se realizaron a la misma potencia láser y usando soluciones de fotocatalizador ópticamente ajustados a un valor de absorbancia de 0,2 en la longitud de onda de láser (355 nm). Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente y el porcentaje de hidrógeno desprendido en el fotorreactor durante la irradiación se determinó por cromatografía de gases (columna GS_MOL de 15 m 0.55 mm TCD utilizando un detector de J & W Scientific). Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado con un error estimado de 5%. Los rendimientos cuánticos aparentes se calcularon a partir del número de moles de hidrógeno formados en 2 h multiplicado por dos y dividido por el número de fotones emitidos en este

momento. El número de fotones se calculó multiplicando la potencia del láser (350 mW) por el tiempo en segundos y se divide por la energía de un solo fotón de 355 nm



Figura 8.8- Fotografía del reactor fotocatalítico empleado en la determinación de actividad fotocatalítica de las muestras de (X)G para la generación de H₂.

8.4- Procesos experimentales bioquímicos.

8.4.1- Cultivo celular.

Los experimentos fueron realizados con células humanas Hep3B y HeLa. Los reactivos empleados para el cultivo celular fueron adquiridos de GIBCO (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Las dos líneas celulares fueron cultivadas en DMEM con alta concentración de glucosa ($4.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Al medio de cultivo se le añadió 10% suero bovino fetal inactivada por calor, penicilina (50 unidades por mL) y estreptomina ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Las células se mantuvieron en una incubadora (IGO 150, Jouan, Saint-Herblain Cedex, France) a 37 °C bajo una atmósfera humidificada del 5% de CO₂ + 95% aire (AirLiquide).

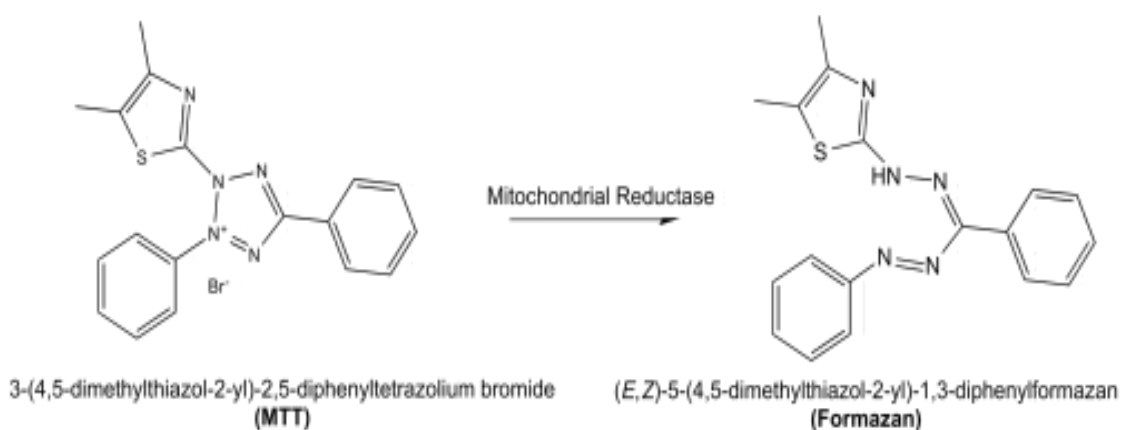
8.4.2- Microscopia confocal de fluorescencia.

Las imágenes se obtuvieron utilizando la línea celular Hep3B sembrando 10000 células por pozo en Nunc 8-well. El tratamiento con C-NOR y C-NOR(Eu) se llevó a cabo durante 24 h a una concentración de $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en un medio de cultivo Eagle modificado con glucosa de Dulbecco (Gibco) con 10% de suero bobino fetal (Gibco), $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de penicilina, $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estreptomina (Gibco) y $2\mu\text{M}$ L-glutamina (Gibco). Transcurrido ese tiempo, el medio es eliminado, las células lavadas dos veces con HBSS (Sigma) y las células se incuban durante otros 30 min a temperatura ambiente con $2.5 \mu\text{M}$ del colorante Hoechst (Molecular Probes), un marcador fluorescente de color azul que interacciona preferentemente con las cadenas de ácido nucleicos presentes en el núcleo celular. Finalmente las células se lavan un mínimo de dos veces con HBSS e inmediatamente después se capturan las imágenes con el microscopio confocal.

Las imágenes de microscopia de confocal fueron adquiridas usando un escáner laser confocal Leica TCS-SP2 equipado con láseres de argón y de helio-neón acoplados a un microscopio invertido Leica DM1RB. Las longitudes de onda utilizadas para excitar a los fluoróforos fueron: 351 y 364 nm para Hoechst y 488 nm para las muestras C-NOR o C-NOR(Eu). La detección de fluorescencia se realizó en el rango de 400–470 nm para Hoechst y 507–610 nm para las muestras C-NOR o C-NOR(Eu). Las serie de imágenes de la sección-Z fueron obtenidas con incrementos progresivos desde el fondo hasta arriba de $1.18 \pm 0.2 \mu\text{m}$.

8.4.3-Ensayo de viabilidad por el test MTT.

La biocompatibilidad fue determinada utilizando el test MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-dipreniltetrazolio) el cual es un ensayo colorimétrico basado en la habilidad de las células vivas en reducir la sal soluble de tetrazolio amarilla a cristales azules de formazan.



Ecuación química 8.1- Describe la reacción que produce la enzima mitocondrial cuando entra en contacto con Bromuro de de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-dipreniltetrazolio.

Esta reducción tiene lugar sólo cuando la enzima reductasa mitocondrial está activa y es, por tanto, un marcador de la viabilidad celular relacionada con la función mitocondrial. Estos ensayos se realizaron en el Capítulo 7. Para estos experimentos, las células fueron sembradas en una placa de 96 pozos (Falcon, BD) a 10 000 células por pozo.

El tratamiento se realizó añadiendo en el medio $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de C-NOR y C-NOR(Eu) con un tiempo de exposición de 3 h utilizando la línea celular de hepatocitos Hep3B en la figura 7.8. Transcurrido ese tiempo, el medio de cultivo se refrescó y se continuó el cultivo celular durante un periodo total de 24 h, realizándose un conteo celular por citometría estática.

En otros ensayos se analizó el efecto sobre las líneas celulares Hep3B y HeLa de la exposición a las muestras C-NOR y C-NOR(Eu) a diferentes concentraciones ($10, 20$ y $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 24 h. Transcurrido el tiempo requerido, el medio se refrescó y se realizó un conteo celular por citometría estática. Se realizó una muestra de control negativo (células no tratadas) llamada vehículo que fue sometido a las mismas condiciones de cultivo, pero tratado exclusivamente con PBS + 5% DMSO.

Otros ensayos analizaron el efecto sobre las líneas celulares Hep3B y HeLa de la exposición a las muestras C-NOR y C-NOR(Eu) a diferentes concentraciones ($10, 20$ y $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 3 h. Transcurrido ese tiempo, el medio se refrescó y se continuó el cultivo celular durante un periodo total de 24 h realizándose un conteo celular por citometría estática. Se realizó una muestra de control negativo (células no tratadas) llamada vehículo que fue sometido a las mismas condiciones de cultivo, pero tratado exclusivamente con PBS + 5% DMSO.

El reactivo MTT (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) fue añadido (20 mL por pozo) en las últimas 4 h de tratamiento. Las células fueron suspendidas en DMSO ($100 \mu\text{L}$ por pozo, 5 min , 37°C), midiéndose la absorbancia usando un espectrofotómetro lector de placas “Multiscan” (Thermo Labsystems, ThermoScientific, Rockford, IL, USA). Los resultados fueron obtenidos siguiendo las instrucciones proporcionadas por el kit.

8.4.4- Citometría estática por fluorescencia.

La citometría es una técnica que analiza las características de las células. Hay varios tipos de métodos en citometría para realizar diferentes estudios incluyendo: el tamaño de células, cantidad de células por unidad de superficie, la morfología celular, fase del ciclo vital de la célula, contenido e DNA y la existencia o no de proteínas específicas en la superficie del citoplasma. La *citometría estática* es una de las técnicas de citometría más antiguas en la cual la

captación de imágenes se produce manteniendo las células en reposo y se analizan las células utilizando un microscopio óptico. Las células son tintadas habitualmente con fluoróforos para marcar los orgánulos, proteínas o ADN de las células analizadas después. El empleo de las cámaras digitales y sistemas informáticos hace posible que esta técnica actualmente proporciona una información muy útil.

En el capítulo 7 se analizó el efecto sobre la proliferación celular (comparación del conteo de células por unidad de superficie a diferentes tiempos) de las líneas Hep3B y HeLa a la exposición de las muestras C-NOR y C-NOR(Eu) a diferentes concentraciones (10, 20 y 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 24 h. Transcurrido el tiempo requerido, el medio se refrescó y se continuó el cultivo celular durante un periodo total de 24, 48, 72 h, y realizándose un conteo celular por citometría estática. Se realizó una muestra de control negativo (células no tratadas) llamada vehículo que fue sometida a las mismas condiciones de cultivo, pero tratada exclusivamente con PBS + 5% DMSO.

En el capítulo 7. Se analizó también el efecto sobre la proliferación celular de las líneas Hep3B y HeLa a la exposición de las muestras C-NOR y C-NOR(Eu) a diferentes concentraciones (10, 20 y 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 3 h. Transcurrido este el medio se refrescó y se continuó el cultivo celular durante un periodo total de 24, 48, 72 h, llevándose a cabo un conteo celular por citometría estática. Se realizó una muestra de control negativo (células no tratadas) llamada vehículo que fue sometido a las mismas condiciones de cultivo y tratado con PBS + 5% DMSO. Experimentos de extorsión a nanopartículas d C-NR y C-NOR(Eu) que se presentan en el capítulo 7, fueron hechos por duplicado en placas de 48 pozos, utilizándose el conteo celular como método de análisis para evaluar el efecto de la concentración (10, 20, 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en el medio y el tiempo de exposición (24 y 3 h respectivamente) de las muestras C-NOR y C-NOR(Eu) en las fases del ciclo celular (G1 Y G2M). Se realizó una muestra de control negativo (células no tratadas) llamada vehículo que fue sometida a las mismas condiciones de cultivo y tratado con PBS + 5% DMSO.

Para realizar los citogramas basados en el análisis ciclo celular mostrados en el capítulo 7, las células fueron incubadas con vehículo y con la concentración más alta de C-NOR y C-NOR(Eu) (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante 24 h ó 3 h respectivamente, en la línea celular Hep3B. Finalmente se realizó el conteo de los núcleos por citometría. Se realizó una muestra de control negativo (células no tratadas) llamada vehículo que fue sometida a las mismas condiciones de cultivo y tratado con PBS + 5 % DMSO.

Se utilizó como fluoróforo el colorante de Hoechst que es marcador del nucleo celular y como vehículo (PBS + 5 % DMSO). Las imágenes fueron registradas por microscopía de fluorescencia

(IX81, Olympus, Hamburg, Germany) que permite la manipulación de imágenes mediante un programa adecuado para medidas de citometría estática “ScanR” versión 2.03.2 (Olympus).

Fases del ciclo celular

Fase G1: Etapa de crecimiento, en esta etapa la célula empieza la síntesis de proteína y ARN. Duplica su masa y expresa sus genes según su fenotipo particular.

Fase S: Etapa de síntesis, en esta etapa empieza la replicación del ADN, al final de esta etapa el núcleo será el doble de grande y con el doble de ADN que la principio.

Fase G2M: Es la tercera fase de crecimiento del ciclo celular en la que continúa la síntesis de proteínas y ARN. Al final de este período se observa al microscopio cambios en la estructura celular, que indican el principio de la división celular. Termina cuando la cromatina empieza a condensarse al inicio de la mitosis.

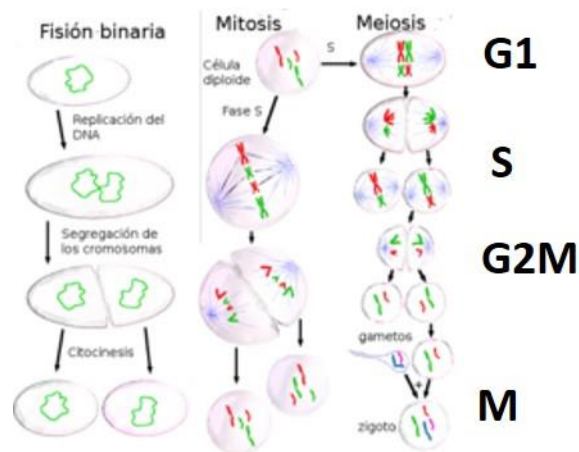


Figura 8.9- Esquema de las cuatro etapas del ciclo celular.

8.4.5- Medida de inducción de apoptosis.

La apoptosis es una destrucción o muerte celular programada, provocada por el mismo organismo con el fin de autocontrolar su desarrollo y crecimiento. La apoptosis está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. La apoptosis tiene una función muy importante en los organismos, pues hace posible la destrucción de células dañadas, evitando de esa manera la aparición de enfermedades que como el cáncer, consecuencia de una replicación indiscriminada de células dañadas.

El test de apoptosis permite determinar si las células que sufren una exposición a altas concentraciones de nanopartículas C-NOR y C-NOR(Eu) sufren algún tipo de daño celular grave que lleve a la activación de la muerte celular programada.

A este fin se realizó un test en el capítulo 7 bivalente Anexina V / análisis PI (Anexina V-FITC kit de detección de apoptosis, Abcam , Cambridge , Reino Unido). La realización de este Test requiere la incubación de las células con la concentración más alta de C- NORs ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), por un periodo de 24 o 3 h de incubación con los C-NORs. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo es refrescado con HBSS que contiene el colorante específica de cromatina Hoechst 33342 ($1 \mu\text{M}$) y Anexina V- fluoresceína ($0.9 \mu\text{l}$ / pocillo) con el fin de detectar la exteriorización de fosfatidil serina, procediéndose a la incubación durante 20 min a 37°C . La fosfatidilserina (PS) sólo se distribuye en el interior de la bicapa lipídica de la membrana celular, y en apoptosis temprana, la fosfatidilserina de la membrana celular (PS) desde el rollo de membrana lipídica hacia el exterior. Entonces, se añadió yoduro de propidio ($0.3 \mu\text{l}/\text{pocillo}$) durante 10 min para teñir el núcleo de las células dañadas o muertas porque no puede travesar la membrana intacta del núcleo. Se utilizó un inhibidor de la proteína quinasa ampliamente utilizado, estaurosporina (STS $0.5 \mu\text{M}$, Sigma-Aldrich) como control proapoptótico. Se realizó una muestra de control negativo (células no tratadas), llamada vehículo, que fue sometida a las mismas condiciones de cultivo, pero añadiendo PBS + 5% DMSO.

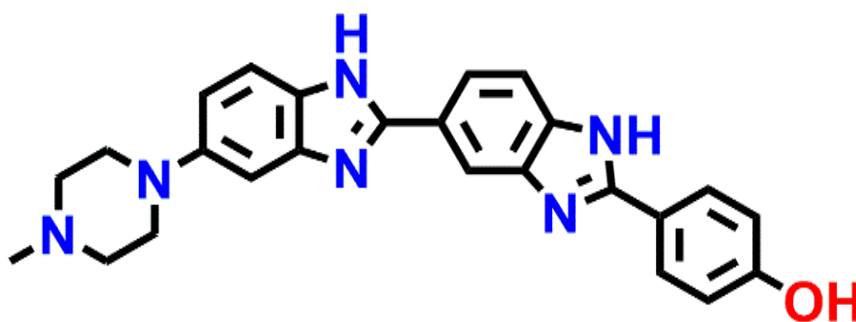


Figura 8.10– Muestra la imagen molecular de un colorante (Hoechst 33258) del grupo de colorantes Hoechst para tinter células. Varían de unos a otros la polaridad y grupos funcionales que modifican la preferencia por la adherencia a ciertas proteínas o orgánulos en el interior de la célula.

8.4.6- Experimento de producción de especies de oxígeno reactivos.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas en inglés reactive oxygen species) incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Estas especies se forman de manera natural como subproductos del metabolismo celular del oxígeno y en épocas de estrés ambiental sus niveles pueden alcanzar concentraciones elevadas pudiendo resultar en daños significativos de las estructuras celulares. Estos niveles enormemente elevados se conocen como estrés oxidativo.

Normalmente las células son capaces de defenderse a sí mismas contra los daños de las especies ROS mediante el uso de enzimas y con pequeñas moléculas antioxidantes. Los efectos que el estrés oxidativo puede causar sobre las células incluyen la muerte celular programada y la necrosis, además de acciones defensivas como es el caso de las plaquetas que participan en la reparación de heridas y homeostasis de la sangre que liberan especies reactivas del oxígeno a fin de reclutar más plaquetas en los sitios de lesión.

En nuestro caso se realizó este experimento en el capítulo 7 con el objetivo de evaluar si una exposición a las concentraciones más altas de C-NORs produce un aumento del estrés oxidativo en la célula. Los ensayos incluyeron una muestra como control positivo en el que se sometió a las células a una exposición con rotenona que propicia el estrés oxidativo.

Los niveles totales de ROS intracelular se evaluaron en células Hep 3B utilizando la sonda fluorescente DCFH-DA (2',7'diacetato de dicloro-dihidrofluoresceína, 2.5 μ M, Sigma - Aldrich Chemicals), que se añadió junto con el colorante Hoechst 33342 (1 μ M) al medio de cultivo durante los últimos 30 minutos de tratamiento. La rotenona (25 μ M , Sigma-Aldrich Chemicals) , que es un complejo de I inhibidor se utilizó como control positivo.

8.4.7- Presentación de los datos y los resultados de los análisis estadísticos.

El análisis estadístico se realizó según el método ANOVA de una vía, seguido por una prueba de comparación múltiple de Newman- Keuls o el t-test de Student (software GraphPad Prism v.3.02, La Jolla, CA). Todos los valores que proporcionan corresponden a la media \pm SEM , y la significación estadística fue * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ (para la prueba ANOVA) , o # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y P ### < 0.001 (para t-test) . En la mayoría de los casos, los datos se representan como porcentaje de control, con el control negativo (células sin tratar) siendo considerado 100 %.

8.5- Síntesis de materiales.

8.5.1- Síntesis del óxido de grafeno (GO).

El óxido de grafeno se preparó mediante oxidación química de grafito, según el método de Hummers.[1] Una mezcla de 2 g de grafito en polvo comercial (Sigma Aldrich) y 1 g de NaNO_3 se añadió a H_2SO_4 concentrado (48 mL, 18 M) y la mezcla se enfrió a 0 °C. La suspensión se mantuvo en agitación vigorosa mientras se añadió lentamente KMnO_4 (6 g) en tres porciones para mantener la temperatura de reacción por debajo de 20 °C. Transcurrida 1 h tras la última adición la mezcla se calentó a 35 °C y se mantuvo en agitación a esta temperatura durante 1h. Después se añadió lentamente agua (92 mL), observándose un aumento de la temperatura a 98 °C y la suspensión resultante se mantuvo a esta temperatura durante 20 min. La suspensión se diluyó a 280 mL por adición de agua, seguido de adición de H_2O_2 (9 mL, 35 %). Después del tratamiento con el peróxido de hidrógeno, la suspensión se volvió amarillenta. Tras enfriar al aire, la suspensión se filtró y se lavó con HCl (1:10, 37%) y posteriormente con agua. El sólido se suspendió en agua y se exfolió por tratamiento en un baño de ultrasonidos (400 W) durante 2 h hasta obtener una suspensión acuosa de láminas de GO.

8.5.2- Síntesis de óxido de grafeno reducido (rGO).

Una vez sintetizadas las láminas de óxido de grafeno por el método de Hummers, éstas se reducen hidrotermalmente en autoclave entre 150 y 200 °C.[2] Cuanto mayor sea la temperatura a la que se somete la muestra, mayor será el grado de reducción de las láminas de óxido de grafeno iniciales.

8.5.3- Síntesis de suspensiones de grafenos dopados con nitrógeno y oxígeno [(N,O)G].

El quitosano proveniente de las pieles de crustáceos es un producto disponible comercialmente (Sigma-Aldrich). El quitosano se piroliza en atmósfera de argón usando el siguiente programa de temperatura: 200 °C durante 2 h, y después subida a 10 °C·min⁻¹ hasta 800-1200 °C manteniendo esta temperatura durante 6 h.[3] El sólido constituido por un residuo de grafito

turbostrático se sometió a deslaminación por tratamiento por ultrasonidos de alta potencia (750 W) durante 2 h para obtener una dispersión homogénea de G.

8.5.4- Síntesis de películas de grafenos dopados con nitrógeno y oxígeno.

Antes de la deposición, el cuarzo se trató para aumentar la hidrofiliidad de su superficie, sumergiéndolo en HCl 1 M durante 24 h, lavándose a continuación con agua milli-Q e isopropanol. Una vez limpio, se depositó una disolución acuosa de quitosano purificado por filtración (1.12 g disueltos en 25 mL de agua con 0.3 M de ácido acético) sobre el cuarzo por deposición por giro (velocidad de giro de 4000 rpm durante 60 s). Tras la deposición de la película de quitosano, el film se seca a 80 °C durante 1 h. Seguidamente, la película de quitosano se piroliza a 800-1200 °C durante 2 h bajo atmósfera de argón. Se prepararon otras películas de (N)G con diferentes de concentraciones de heteroátomos en sustratos de cuarzo aumentando las aumentando el tiempo de pirolisis. A mayor tiempo y temperatura de pirolisis, menor porcentaje de heteroátomos en la película de (N)G. La composición atómica de las películas de (N,O)G fue analizada utilizando la técnica de XPS ya descrita. El porcentaje de oxígeno en las muestras se determinó por XPS. El pico C 1s se puede descomponer en dos picos a 284.5 y 286.5 eV. Estas energías de enlace coinciden muy bien los valores reportados para sp^2 C en grafito y sp^2 C unidos a átomos de N. El pico de N 1s en XPS se puede descomponer en dos componentes a energías de unión de 398.5 y 400.7 eV que de acuerdo con la literatura corresponden a nitrógeno de piridina y átomos de nitrógeno positivo en compuestos policíclicos condensados (401.2 eV en la referencia [4])

8.5.5- Síntesis de la zeolita ITQ-29.

Todos los productos químicos utilizados han sido proporcionados por Aldrich. En particular, la zeolita pura sílice ITQ-29 (estructura de LTA) se sintetizó de acuerdo con un procedimiento descrito en la ref. [5] a partir de un gel de la siguiente composición molar: SiO_2 : 0,25 ROH: 0,25 TMAOH: 0.5 HF: 3 H₂O. El gel se prepara por hidrólisis de ortosilicato de tetraetilo (TEOS) en una solución acuosa de hidróxido de 4-metil-2,3,6,7-tetrahidro(1H,5H)-pirido[3,2,1-ij]quinolinio (ROH) y el hidróxido de tetrametilamonio (TMAOH). La mezcla se mantuvo bajo agitación hasta que el etanol formado en la hidrólisis del TEOS y el exceso de agua se evapora de manera que se llegue a la composición de gel indicada anteriormente. Finalmente, se añadió una solución acuosa de HF (50%) y la mezcla se introdujo en un autoclave de acero revestido de

teflón y se calentó a 125 ° C durante 5 días. A continuación, el autoclave se enfrió, y se filtró la mezcla, lavándose el sólido recogido con agua destilada y secándose a 100 ° C para dar el puramente silíceo zeolita ITQ-29.

8.5.6- Síntesis de los puntos de carbono (C-dots) en la matriz de la zeolita ITQ-29 y su extracción.

La muestra de zeolita ITQ-29 se comprimió a 3 Ton cm⁻² y la oblea se trituró y se tamizó, recogiendo granos de polvo desde 200 hasta 400 μm. La pirolisis de estas zeolitas granuladas (0.5 g) se llevó a cabo en un horno tubular de cuarzo dispuesto verticalmente (1.5 cm de diámetro interno) por el que se circula constantemente con un flujo de nitrógeno (3 mL·min⁻¹). La temperatura dentro del reactor se mide con un termopar. El polvo de zeolita se dispone en un vidrio poroso montado en el interior del reactor y el sistema se calienta con un horno eléctrico a 10 °C·min⁻¹ desde la temperatura ambiente hasta la temperatura requerida en el experimento que se mantiene durante 24 h. Al final de la pirolisis, la muestra se recupera y se almacena en condiciones ambiental dentro de viales tapados.

Los intentos de extraer los puntos de carbono directamente de la zeolita ITQ- 29 con acetato de etilo fueron infructuosos, siendo necesario disolver la zeolita antes de poder recuperar el residuo de carbono. La zeolita (50 mg) se disolvió a temperatura ambiente bajo agitación magnética en 5 ml de solución acuosa de HF (30% en peso) acidificada con dos gotas de HNO₃ concentrado. Después de 24 h, la solución se neutralizó con solución de NaOH 1 M y el licor resultante se extrajo con un embudo de decantación con dos alícuotas de 5 ml de acetato de etilo.

8.5.7- Síntesis de los anillos de nanocébolla de carbono (C-NOR) y su purificación.

En 8 ml de PEG 400 (Fluka analítica, Mr = 380-420 g·mol⁻¹, número CAS: 25322-68-3): se suspenden 100 mg de PTA comercial (128-69-8 Sigma-Aldrich, número CAS) en ausencia (C-NOR) o adicionando 100 mg de Eu(OAc)₃ · 3H₂O (Sigma Aldrich, número CAS: 62667-64-5, C-NOR(Eu)). La mezclas resultantes se agitaron magnéticamente durante 1 h a temperatura ambiente.

Después de la homogeneización, las mezclas se colocaron en viales de vidrio Pyrex abiertos (20 mL de capacidad) y se calentaron en un horno previamente precalentado a 400 °C. El horno se dejó enfriar lentamente (-20 °C · h⁻¹), a temperatura ambiente siendo aproximadamente 20 h de

tiempo necesario para su enfriamiento. Después del tratamiento térmico, la mezcla de color negro presentó una disminución significativa de volumen. Este residuo se diluyó con acetonitrilo (0.5 mL) y se sometió a purificación por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente acetonitrilo conteniendo una proporción creciente de metanol de 0 a 50 %. Se recogió la fracción fluorescente eluido, eliminándose el disolvente a presión reducida para obtener un aceite viscoso (entre 50 y 70 mg) que corresponde a C-NOR ó C-NOR (Eu) dependiendo de la ausencia o la presencia de $\text{Eu}(\text{OAc})_3$ durante la síntesis.

8.6- Referencias.

- [1] W.S. Hummers, R.E. Offeman, *J Am Chem Soc* **1958**, *80*, 1339.
- [2] D.C. Marcano, D.V. Kosynkin, J.M. Berlin, A. Sinitskii, Z. Sun, A. Slesarev, L.B. Alemany, W. Lu, J.M. Tour, *ACS Nano* **2010**, *4*, 4806.
- [3] A. Primo, P. Atienzar, E. Sanchez, J. M. Delgado, H. García, *Chem. Commun.* 2012, 48, 9254-9256.
- [4] J. T. Titantah, D. Lamoen, *Diamond Relat. Mater.* 2007, 16, 581-588.
- [5] A. Corma, F. Rey, J. Rius, M. J. Sabater and S. Valencia, *Nature* **2004**, 431(7006), 287–290.

Capítulo 9:

Conclusiones.

9.1- Conclusiones.

De acuerdo con los objetivos planteados, en la presente Tesis Doctoral se han sintetizado y han sido objeto de estudio materiales cuya composición es fundamentalmente el elemento carbono, bien con estructura de grafeno o bien como nanopartícula de carbono. En particular se han llegado a las siguientes conclusiones:

1^a- Los tiempos de vida del estado de separación de cargas del *óxido de grafeno* están en la escala de microsegundos muy cortos, mientras que los del *óxido de grafeno reducido* se prolongan durante cientos de microsegundos. En el caso del *óxido de grafeno reducido*, se ha observado que el apilamiento de las láminas que tiene lugar sobre todo en los primeros minutos tras la preparación de la muestra juega un papel en los tiempos de vida de estos estados.

2^a- Se han preparado muestras de *grafenos conteniendo nitrógeno y oxígeno* en diferentes porcentajes y se ha observado que la fotocorriente, tiempos de vida del estado de separación de cargas y los rendimientos cuánticos de generación de estos estados depende del contenido en estos heteroátomos. No ha sido posible, sin embargo, establecer una correlación lineal entre el porcentaje de heteroátomo y sus propiedades fotofísicas, proponiéndose que cada heteroátomo puede tener un comportamiento dual, como dador o aceptor de electrones, dependiendo del grupo funcional del que forme parte en el grafeno.

3^a- Se han preparado *grafenos dopados con halógenos*, siendo el que contiene cloro el que presenta propiedades fotofísicas más adecuadas para su empleo como *fotocatalizador*. Se ha determinado que la superioridad del cloro como fotocatalizador es consecuencia no sólo de su electronegatividad, sino también de la cantidad introducida en el proceso de preparación. Se ha medido experimentalmente que el grafeno dopado con *cloro es capaz de generar hidrógeno* cuando se irradian suspensiones acuosas en presencia de metanol como agente sacrificante.

4^a- Se han preparado nanopartículas de carbono dopadas con nitrógeno (C-Dots) por pirólisis de la *zeolita ITQ-29* conteniendo *(4-metil-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H-pirido[3.2.1-ij]quinolinio)* como agente director se estructura. La extracción de estos C-Dots mediante la destrucción del silicato ha permitido establecer que el tamaño promedio de estas nanopartículas es de 5 nm y que poseen un *rendimiento cuántico de emisión de 0.4*. Aunque se consideraron otras zeolitas conteniendo otros agentes directores de estructuras como precursores, sólo se tuvo éxito con las zeolitas ITQ-29 y ITQ-12. Las demás zeolitas fueron ineficientes para generar nanopartículas de carbono de manera análoga a la zeolita ITQ-29, debida a los tamaños de poro y a que los agentes directores de estructura no eran moléculas aromáticas.

5^a- Se han preparado *nanopartículas con morfología de aros de cebolla* constituidas por capas concéntricas de 3 nm de altura y distancia interlaminar de 0.34 nm por tratamiento de *dianhídrido de perilen-3,4:9,10-tetracarboxílico* en polietilenglicol 400. El *rendimiento cuántico de emisión* de estas nanopartículas fue de *0.45*.

Se ha establecido que las *nanopartículas de carbono con morfología de aros de cebolla* provenientes del *dianhídrido de perilen-3,4:9,10-tetracarboxílico* comercial tienen la *capacidad de ser internalizados en células y son detectables* mediante microscopía de fluorescencia. La toxicidad de estas nanopartículas depende de su concentración en el medio de cultivo. La presencia de estas nanopartículas influye en la disminución de la proliferación de las células en crecimiento exponencial pero no en su viabilidad, no siendo responsables de inducir estrés oxidativo celular, aunque originan fenómenos de apoptosis celular en un porcentaje bajo pero estadísticamente significativo.

9.2- Conclusions.

According to the goals of this Doctoral Thesis, it had been synthesized and also studied the materials that its composition is based fundamentally by carbon and with structure of graphene or with structure of nanoparticles with size distribution between 5 and 60 nm. In particular we arrived to the following conclusions:

1st- It has been prepared graphene oxide and reduced graphene oxide and we studied the photophysics of this materials. The life time of the separation charge state of graphene oxide in the scale of microsecond is quite short, whereas the reduced graphene oxide has been observed to have two types of kinetics, one of them of hundreds of microseconds. In the case of reduced graphene oxide, it has been observed a stacking of layers that take place in the first minutes after the preparation of the sample and it plays a role in the life time of these states.

2nd- It has been prepared samples of graphenes doped with nitrogen and oxygen in different percentages and it has been observed the photocurrent, and life time of separation charge state. Also it has been seen that the quantum efficiency in the generation of charge separation depends on the percentages of these heteroatoms. However it has not been possible to establish a linear correlation between the percentages of heteroatom and his photophysics properties, so we propose that each heteroatom can have dual behavior (electron acceptor or electron donor) depending on the functional group that is formed in the graphene sheet.

3rd- It has been prepared doped graphene with halogens, and it has been the chlorine doped graphene sample the one that showed the best photophysical properties to be used as photocatalyst. It has been determined that the superiority of chlorine sample as photocatalysis is consequence not only because its electronegativity, but also the quantity introduced during the preparation. Finally, it has been measured experimentally that graphene doped with chlorine it is able to generate hydrogen when we irradiate aqueous suspension in presence of methanol as a sacrificial agent.

4th- It has been prepared nanoparticles of carbon doped with nitrogen (C-Dots) by pirolisis of zeolite ITQ-29 containing (4-metil-2,3,6,7-tetrahidro-1H,5H-pirido[3.2.1-ij]quinolio) as structural director agent. The extraction of C-Dots has been done dissolving the silicate framework and it has been establish the size average in 5 nm and measured the quantum efficiency of emission of 0.4. Although it has been considered others zeolites with others structure directors agents as precursors of C-Dots, we only have success with zeolites ITQ-29 and ITQ-12. The other zeolites were inefficient for carbon nanoparticles generation because of pore size and also because the respectives structural director agents were not aromatics molecules.

5th- We have prepared nanoparticles with onion rings morphology constituted by concentric layers of 3 nm tall and with an interlayer distance of 0.34 nm by treatment of a mixture to dianhydride of perilen-3,4,9,10-tetracarboxylic acid with polyethylenglicol 400. The emission quantum efficiency of this nanoparticles was 0.45.

It has been established that carbon nanoparticles with onion rings morphology can be able of internalized inside living cells and they can be detectable with microscopic fluorescent. The toxicity of this nanoparticles depends on the concentration in the culture medium. The presence of this type of nanoparticles have an influence in the cell proliferation and a certain effect in the cell growth. But not in the cell viability, not inducing cell oxidative stress although it can origin a low percentage of apoptosis when we use high concentration of this nanoparticles.

Resúmenes de la Tesis Doctoral.

Resumen.

En esta Tesis Doctoral, se han estudiado las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de nuevos nanomateriales basados en carbono como son los derivados de grafeno (GO, rGO, grafenos (N,O) codopados y grafenos reconstituidos halogenados) y dos tipos diferentes de nanopartículas de carbono (C-dots y C-NOR). Estos materiales se han aplicado en la generación fotocatalítica de hidrógeno, como sensores de gases y en técnicas de bioimagen.

En una primera etapa, se ha caracterizado el material con distintas técnicas espectroscópicas y de microscopía y, a posteriori, se ha estudiado el comportamiento de estos materiales como semiconductores. Mediante las técnicas de espectroscopía de fluorescencia y de absorbancia, y mediante la espectroscopía de absorbancia de transición, se ha comprobado la generación del estado de separación de cargas tras su excitación.

Las distintas estrategias utilizadas en la modificación del grafeno, van dirigidas a conseguir sistemas con tiempos de vida del estado de separación de cargas elevados que permitan aprovechar la energía absorbida de la luz.

Se ha observado que el tiempo de vida y el rendimiento cuántico de la separación de cargas es mayor en el rGO que en el GO. Y también, se ha observado la capacidad del rGO como agente aceptor de electrones que depende del potencial redox para una eficiente transferencia electrónica.

Para los grafenos (N,O)-codopados, que han sido preparados por pirólisis del quitosano natural, se ha demostrado que existe una relación directa entre el porcentaje de dopantes y la energía de la banda de conducción y el rendimiento cuántico de la separación de cargas. Además, se exploró el comportamiento aceptor y dador de estos nuevos materiales. Después de los experimentos de inhibición y XPS, concluimos que estos materiales tienen un comportamiento electrónico dual aceptor-dador debido a la presencia de restos residuales de N. Lo que significa que en estos grafenos existen, al mismo tiempo grupos funcionales diferentes que actúan como aceptores o dadores de electrones.

Para el caso de los grafenos reconstituidos halogenados se ha demostrado la influencia de la naturaleza del halógeno en la generación del estado de separación de cargas. El tiempo de vida del estado de separación de cargas obtenido en estos materiales se encuentra en la escala de los microsegundos, lo cual resulta esperanzador para su posible aplicación en fotocatalisis y en dispositivos optoelectrónicos. Por este motivo, utilizamos estos materiales como fotocatalizadores para la generación de hidrógeno a partir de una mezcla metanol agua, y los rendimientos más altos fueron para la muestra (Cl) G que fueron siete veces más elevados que el GO de partida.

Se han preparado nanopartículas de carbono empleando dos metodologías distintas. En un caso, se han utilizado zeolitas de distinto tamaño de poro como plantillas, siendo las de tamaño de poro pequeño con agentes directores de estructura voluminosos, como la ITQ-29 y ITQ-12, las más adecuadas para obtener puntos de carbono fotoluminiscentes. La pirólisis del agente director de estructura de estas zeolitas da lugar a puntos cuánticos de carbono con tamaños de partícula entre 5 y 12 nm y, un rendimiento de fotoluminiscencia cuántica de 0.4 que fueron utilizados como sensores de oxígeno fluorescentes. La otra metodología consiste en la síntesis de nanomateriales de carbono a partir de un recocido de una mezcla de PTCA y PEG bajo atmósfera de aire. Se obtienen nanoobjetos de 2.5 nm de altura y con un tamaño medio de 40 nm. La morfología de los C-NOR es de círculos concéntricos similar a una cebolla. Estas nanopartículas pueden internalizarse en las células de carcinoma humano HeLa y Hep 3B y presentan propiedades fotoluminiscentes interesantes, de la misma manera que en disolución. Demostraron una notable biocompatibilidad, afectando de manera poco perceptible a la viabilidad celular a

cortos periodos de exposición según la prueba MTT. Con el fin de abordar el posible uso de esta nanopartículas en bioimagen y su toxicidad, se realizó un estudio toxicológico completo in vitro. Se realizaron evaluaciones de viabilidad, proliferación, estudios de generación de apoptosis y estrés oxidativo tras la exposición limitada o continua variando las concentraciones. Se observó que ambas nanopartículas no mostraron toxicidad en las dos situaciones a baja concentración, aunque cierta toxicidad se ha determinado a concentraciones superiores bajo exposición continua. Estos resultados apoyan la posible utilización de nanopartículas C-NOR y C-NOR(Eu) como agentes sensibilizadores para bioimagen.

Resum.

En aquesta tesi doctoral s'han estudiat les propietats fotofísiques i fotoquímiques de nous nanomaterials basats en carboni com són els derivats de grafè (GO, rGO, grafens (N,O) codopats i grafenos reconstituïts halogenats) i dos tipus diferents de nanopartícules de carboni (C-dots i C-NOR). Aquests materials s'han aplicat en la generació fotocatalítica d'hidrogen, com a sensors de gasos i en tècniques de bioimatge.

En una primera etapa, s'ha caracteritzat el material amb diferents tècniques espectroscòpiques i de microscòpia, i a posteriori, s'ha estudiat el comportament d'aquests materials com a semiconductors. Mitjançant les tècniques d'espectroscòpia de UV-Vis i d'absorbància de transició (T.A.S.) s'ha comprovat la generació de l'estat de separació de càrregues després de la seva excitació.

Les diferents estratègies utilitzades en la modificació del grafè van dirigides a aconseguir sistemes amb temps de vida de l'estat de separació de càrregues elevats que permetin aprofitar l'energia absorbida de la llum.

S'ha observat que el temps de vida i el rendiment quàntic de la separació de càrregues és més gran en el rGO que al GO. I també s'ha observat la capacitat del rGO com a agent acceptor d'electrons que depèn del potencial redox per a una eficient transferència electrònica.

Per als grafens (N,O)-codopats, que han estat preparats per piròlisi del quitosan natural, s'ha demostrat que existeix una relació directa entre el percentatge de dopants i l'energia de la banda de conducció i el rendiment quàntic de la separació de càrregues. A més, es va explorar el comportament acceptor i donador d'aquests nous materials. Després dels experiments d'inhibició i XPS, vam concloure que aquests materials tenen un comportament electrònic dual acceptor-donador a causa de la presència de restes residuals de N. El que vol dir que en aquests grafenos hi ha al mateix temps grups funcionals diferents que actuen com acceptores o donadors d'electrons.

Per al cas dels grafens reconstituïts halogenats s'ha demostrat la influència de la naturalesa de l'halogen en la generació de l'estat de separació de càrregues.

El temps de vida de l'estat de separació de càrregues obtingut en aquests materials es troba en l'escala dels microsegons, la qual cosa resulta esperançador per a la seva possible aplicació en fotocàlisi i en dispositius optoelectrònics. Per aquest motiu, utilitzarem aquests materials com a fotocatalitzadors per a la generació de hidrogen a partir d'una mescla metanol-aigua y els rendiments més alts van ser per la mostra (Cl)G que van ser set vegades més elevades que el GO de partida.

S'han preparat nanopartícules de carboni emprant dues metodologies diferents. En un cas s'han utilitzat zeolites de diferent grandària de porus com plantilles, sent les de mida de porus petit amb agents directors d'estructura voluminosos, com la ITQ-29 i ITQ-12, les més adequades per obtenir punts de carboni fotoluminiscent. La piròlisi de l'agent director d'estructura d'aquestes zeolites dona lloc a punts quàntics de carboni amb mides de partícula entre 5 i 12 nm i un rendiment de fotoluminescència quàntica de 0.4 que van ser emprats com a sensors d'oxigen fluorescents. L'altra metodologia consisteix en la síntesi de nanomaterials de carboni i a partir d'un recuit d'una barreja de PTCA i PEG sota atmosfera d'aire. S'obté nanoobjectes de 2.5 nm d'alçada i amb una longitud mitjana de 40 nm. La morfologia dels C-NOR és de cercles concèntrics similar a una cebeta. Aquestes nanopartícules poden internalitzar-se en les cèl·lules de carcinoma humà HeLa i Hep 3B, i presenten propietats fotoluminiscent interessants, de la mateixa manera que en dissolució. Van demostrar una notable biocompatibilitat afectant de manera poc perceptible a la viabilitat cel·lular a curts períodes d'exposició segons la prova MTT. Per tal d'abordar el possible ús d'aquesta nanopartícules en bioimatge i la seva toxicitat, es va realitzar un estudi toxicològic complet in vitro. Es van realitzar avaluacions de viabilitat, proliferació, estudis de generació d'apoptosi i estrès oxidatiu després de l'exposició limitada o contínua amb diferents concentracions. Es va observar que les dos nanopartícules no van mostrar toxicitat en les dues situacions a baixa concentració, encara que certa toxicitat s'ha determinat a concentracions superiors sota exposició contínua. Aquests resultats donen suport a la possible utilització de nanopartícules C-NOR i C-NOR(Eu) com a agents sensibilitzadors per bioimatge.

Abstract.

In this Doctoral Thesis, it has been studied the photophysical and photochemical properties of new nanomaterials based on carbon as graphene derivatives (GO, rGO, graphene (N,O)-codoped and graphene reconstituted halogenated) and two different types of carbon nanoparticles (C-dots and C-NOR). These materials have been applied in the photocatalytic hydrogen generation, such as gas sensors and bioimaging techniques.

In a first stage, the material was characterized with different spectroscopic and microscopic techniques, and subsequently it was studied the behavior of these materials as semiconductors. Using the techniques of absorbance and fluorescence spectroscopy, and transition absorbance spectroscopy experiments has proven generation of charge separation state after excitation.

The different strategies used in the modification of graphene are aimed at getting systems with higher lifetimes of charge separation to harness the energy absorbed from light.

It has been observed that the lifetime and quantum yield of charge separation is greater in rGO than GO. And we also observed that rGO can act as good electron acceptor, depending on the redox potential of the reducer specie the electron transfer efficiency can be more efficient.

For graphenes (N,O)-codoped, which were prepared by pyrolysis natural chitosan, it has shown that there is a direct relationship between the percentage of dopants and the energy of the conduction band and the quantum yield of charge separation state. Moreover, in this Chapter we have explored the electron acceptor-donor activity of this materials. After quenching experiments and XPS analysis we concluded that this materials have a dual acceptor-donor behavior due to the presence of N residual moieties. This fact means that in these graphene derivatives we have the presence of electron-acceptor or electron-donor functional groups at the same moment.

In the case of reconstituted graphenes halogenated it has been shown the influence of the nature of the halogen in the generation charge separation. The charge separation lifetime obtained in these materials is in the scale of microseconds which is encouraging for possible application in photocatalysis and optoelectronic devices. For this reason, we use these materials as photocatalysts for hydrogen generating from a methanol-water mixture and yields were higher for the sample (Cl)G that were seven times higher than the starting GO.

Nanoparticles have been prepared using two different carbon methodologies. In one case they have been used zeolites with different pore size as templates, being those of small pore size with a directing agents with large structure, such as ITQ-29 and ITQ-12, were the most suitable for production of photoluminescent carbon dots. Pyrolysis of structure directing agent of these zeolites results in carbon quantum dots with particle sizes between 5 and 12 nm and

photoluminescence quantum yield of 0.4 to that were used as photoluminescent oxygen sensors. Another methodology involves the synthesis of carbon nanomaterials from annealing of a mixture of PTCA and PEG under air atmosphere. Nanoobjects are obtained with height of 2.5 nm and with an average size of 40 nm. The morphology of the C-NOR is similar to an onion formed by concentric circles. These nanoparticles can be internalized in the human carcinoma HeLa cells and Hep 3B and they have interesting photoluminescent properties, in the same way as in solution. They showed a remarkable biocompatibility affecting in a very low way to cell viability to short periods of exposure according to the test MTT. In order to address the possible use of this nanoparticles in bioimaging a complete toxicology study was performed in vitro. It was performed feasibility assessments, proliferation, apoptosis studies generation and oxidative stress experiments after continuous and limited exposure, and also varying concentrations. It was observed that both nanoparticles showed no toxicity in the two situations at low and higher concentration, although some toxicity was determined at higher concentrations under continuous exposure. These results support the potential use of nanoparticles C-NOR and C-NOR(Eu) as bioimaging agents.

Publicaciones.

De la presente Tesis Doctoral forman parte las siguientes publicaciones:

Capítulo 3.

-Photoinduced charge Separation on the microsecond timescale in graphene oxide and reduced graphene oxide suspensions.

Baldovi, Herme G.; Alvaro, Mercedes; Ferrer, Belen; Garcia, Hermenegildo
Publicado en: ChemPhysChem (2016), 17(7), 958-962. Language: English.

Capítulo 4.

-Influence of dopant loading on the photo- and electrochemical properties of (N, O)-co-doped graphene.

Baldoví HG, Albarracín F, Álvaro M, Ferrer B, García H
Publicado en: Chemphyschem (2015);16(10):2094-8 Language: English.

Capítulo 5

-Photocatalytic hydrogen generation from water-methanol mixtures using halogenated reconstituted graphenes.

Ballesteros-Garrido, Rafael; **Baldovi, Herme G.**; Latorre-Sanchez, Marcos; Alvaro, Mercedes; Garcia, Hermenegildo
Publicado en: Journal of Materials Chemistry A: Materials for Energy and Sustainability (2013), 1(38), 11728-11734. Language: English.

Capítulo 6.

-Highly fluorescent C-dots obtained by pyrolysis of quaternary ammonium ions trapped in all-silica ITQ-29 zeolite.

Baldovi Herme G; Valencia Susana; Alvaro Mercedes; Asiri Abdullah M; Garcia Hermenegildo
Publicado en: Nanoscale (2015), 7(5), 1744-52. Language: English.

Capítulo 7.

-Perylenetetracarboxylic anhydride as a precursor of fluorescent carbon nanoion rings.

Baldovi Herme G; Herance Jose Raul; Manuel Victor Victor; Alvaro Mercedes; Garcia Hermenegildo
Publicado en: Nanoscale (2015), 7(29), 12484-91. Language: English.

-Toxicological properties of two fluorescent carbon quantum dots with onion ring morphology and their usefulness as bioimaging agents.

Blas-Garcia, Ana; **Baldovi, Herme G.**; Polo, Miriam; Victor, Victor M.; Garcia, Hermenegildo; Herance, Jose Raul
Publicado en: RSC Advances (2016), 6(36), 30611-30622. Language: English.

Otras publicaciones:

- Generation of MoS₂ quantum dots by laser ablation of MoS₂ particles in suspension and their photocatalytic activity for H₂ generation.

Pendiente de publicación en Journal of Nanoparticle Research. (2016)

-Phthalocyanine-gold nanoparticle hybrids: modulating quenching with a silica matrix shell.

Baldovi, Herme G.; Blas-Ferrando, Vicente M.; Ortiz, Javier; Garcia, Hermenegildo; Fernandez-Lazaro, Fernando; Sastre-Santos, Angela

Publicado en: ChemPhysChem (2016). Language: English.

-Visible light photocatalytic activity for hydrogen production from water-methanol mixtures of open-framework V-doped mixed-valence titanium phosphate.

Serra, Marco; **Baldovi, Herme G.**; Albarracin, Ferran; Garcia, Hermenegildo

Publicado en: Applied Catalysis, B: Environmental (2016), 183, 159-167. Language: English.

-Ceria nanoparticles with rhodamine B as a powerful theranostic agent against intracellular oxidative stress

Apostolova, Nadezda; Rovira-Llopis, Susana; **Baldovi, Herme G.**; Navalon, Sergio; Asiri, Abdullah M.; Victor, Victor M.; Garcia, Hermenegildo; Herance, Jose Raul

Publicado en: RSC Advances (2015), 5(97), 79423-79432. Language: English.

-Doped Framework Iron Hydroxyl Phosphate as Photocatalyst for Hydrogen Production from Water /Methanol Mixtures

Serra, Marco; **Baldovi, Herme G.**; Alvaro, Mercedes; Garcia, Hermenegildo

Publicado en: European Journal of Inorganic Chemistry (2015), 2015(25), 4237-4243. Language: English.

-Novel methodology for labelling mesoporous silica nanoparticles using the 18F isotope and their in vivo biodistribution by positron emission tomography

Rojas, Santiago; Gispert, Juan Domingo; Menchon, Cristina; **Baldovi, Herme G.**; Buaki-Sogo, Mireia; Rocha, Milagros; Abad, Sergio; Victor, Victor Manuel; Garcia, Hermenegildo; Herance, Jose Raul

Publicado en: Journal of Nanoparticle Research (2015), 17(3), 1-9. | Language: English.

-Understanding the Origin of the Photocatalytic CO₂ Reduction by Au- and Cu-Loaded TiO₂: A Microsecond Transient Absorption Spectroscopy Study

Baldovi, Herme G.; Neatu, Stefan; Khan, Anish; Asiri, Abdullah M.; Kosa, Samia A.; Garcia, Hermenegildo

Publicado en: Journal of Physical Chemistry C (2015), 119(12), 6819-6827. | Language: English.

-Transient absorption spectroscopy and photochemical reactivity of CAU-8

Baldovi, Herme G.; Kruger, Martin; Reinsch, Helge; Alvaro, Mercedes; Stock, Norbert; Garcia, Hermenegildo

Publicado en: Journal of Materials Chemistry C: Materials for Optical and Electronic Devices (2015), 3(15), 3607-3613. Language: English.

-Visible-light photoresponse of gold nanoparticles supported on TiO₂ : a combined photocatalytic, photoelectrochemical, and transient spectroscopy study.

Baldovi Herme G.; Albarracin Ferran; Atienzar Pedro; Ferrer Belen; Alvaro Mercedes; Garcia Hermenegildo

Publicado en: Chemphyschem (2015), 16(2), 335-41. Language: English.


-Microsecond Transient Absorption Spectra of Suspended Semiconducting Metal Oxide Nanoparticles

Baldovi, Herme G.; Ferrer, Belen; Alvaro, Mercedes; Garcia, Hermenegildo

Publicado en: Journal of Physical Chemistry C (2014), 118(17), 9275-9282. Language: English.

- **Photophysical evidence of charge-transfer-complex pairs in mixed-linker 5-amino/5-nitroisophthalate CAU-10.**

Ferrer, Belén; Alvaro, Mercedes; **Baldovi, Hermenegildo G.**; Reinsch, Helge; Stock, Norbert.
Publicado en: *Chemphyschem* (2014), 15(5), 924–928.



Preparación y propiedades fotofísicas de materiales grafénicos y puntos cuánticos basados en carbono. Aplicaciones en nanotecnología.

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

INSTITUTO UNIVERSITARIO MIXTO DE TECNOLOGÍA

QUÍMICA
(UPV-CSIC)



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE
TECNOLOGÍA
QUÍMICA



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CSIC

2016

Preparación y propiedades fotofísicas de
materiales grafénicos y puntos cuánticos
basados en carbono. Aplicaciones en
nanotecnología.

Tesis Doctoral

Presentada por:

Hermenegildo García i Baldoví

Dirigida por:

Mercedes Alvaro Rodríguez

Rosa Belén Ferrer Ribera

Valencia, Julio 2016

Hermenegildo García Baldoví