



Universidad de Oviedo

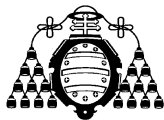
MASTER EN CIENCIAS ANALITICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**Síntesis y caracterización de nanopartículas de
carbono luminiscentes: Carbon Quantum Dots (CQDs)**

Jesús Cigales Canga

Julio 2016, Oviedo



José Manuel Costa Fernández Profesor del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado “Síntesis y caracterización de nanopartículas de carbono luminiscentes: Carbon Quantum Dots (CQDs)”

ha sido realizado por el alumno Jesús Cigales Canga bajo mi dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2015-16, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 12 de Julio de 2016

Fdo: José Manuel Costa Fernández

Agradecimientos

Quisiera aprovechar la ocasión para dirigir unas palabras de sincero agradecimiento a todas esas personas que, de una forma u otra, me han acompañado en uno de las etapas más duras en el ámbito profesional y que gracias a su ayuda he podido llegar hasta donde estoy ahora mismo.

En primer lugar, al director del proyecto, el Dr. José Manuel Costa Fernández. Por su talante y su tesón, por su positivismo a pesar de las adversidades, por sus ganas de superarse y de buscar nuevos retos. Gracias por acogerme en el grupo de investigación, espero haber estado a la altura de tal reto.

A D. Diego Bouzas Ramos, pieza clave del proyecto, gracias por el apoyo recibido durante las largas horas de análisis, por las enseñanzas transmitidas. por su entusiasmo y dedicación, por mostrarme lo bella que es la ciencia, pero sobre todo por su constancia y por su perseverancia ante las dificultades. Gracias amigo.

A los integrantes del grupo de investigación, por hacer mucho más amenas las tardes de duro trabajo y sobre todo por su ayuda desinteresada y hacerme sentir uno más entre vosotros, muchísimas gracias.

A la empresa, Industrial Química del Nalón S.A., por haberme permitido la utilización de uno de sus equipos, ya que sin éste habría sido imposible la realización de este trabajo.

A mis padres, Dña. María Pilar Canga Antuña y D. Juan Luis Cigales León. Gracias por vuestro apoyo incondicional, gracias por vuestros sabios consejos, gracias por hacer de mí una persona de bien, gracias por ayudarme a levantarme cuando tropezaba con un obstáculo. Recordad que, a veces las personas más pequeñas hacen cosas increíbles, sois increíbles.

Y finalmente, a mi novia, Dña. Sandra Rodríguez Álvarez, gracias por hacerme creer que lo conseguiría, por estar ahí siempre para apoyarme y sobre todo por escucharme cuando más lo necesitaba. Muchísimas gracias por hacer de cada día un nuevo reto con el que afrontar con positivismo.

A todos vosotros, mi más profundo y sincero agradecimiento.

Jesús Cigales Canga

Índice de contenidos

Resumen.....	1
1. Introducción	2
1.1. Nanopartículas: concepto y clasificación	2
1.2. Nanopartículas de Carbono	5
1.3. Carbon Quantum Dots	6
1.3.1. Antecedentes de los Carbon Quantum Dots	6
1.3.2. Propiedades de los Carbon Quantum Dots	9
1.3.3. Síntesis de los Carbon Quantum Dots	12
1.3.4. Caracterización de los Carbon Quantum Dots	14
1.4. Nanotecnología en salud	18
2. Objetivos	20
3. Procedimiento Experimental	21
3.1. Materiales y reactivos	21
3.2. Instrumentación	21
3.3. Procedimientos	22
3.3.1. Síntesis de Carbon Quantum Dots	22
3.3.2. Caracterización de los productos de síntesis mediante espectroscopía de fluorescencia	23
3.3.3. Caracterización de los Carbon Quantum Dots	24
3.3.4. Caracterización específica de los Carbon Quantum Dots dopados con nitrógeno	26
4. Resultados y discusión.....	30
4.1. Síntesis de Carbon Quantum Dots	30
4.2. Caracterización de los Carbon Quantum Dots	33
4.2.1. Efecto del pH en la intensidad de emisión de fluorescencia.....	33
4.2.2. Estudio de fotoestabilidad	33
4.2.3. Fotoactivación	35
4.3. Caracterización específica de Carbon Quantum Dots dopados con nitrógeno	37
4.3.1. Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución	37
4.3.2. Purificación de los Carbon Quantum Dots dopados con Nitrógeno	38
4.3.3. Rendimiento Cuántico de Fluorescencia	39

4.3.4. Dispersión Dinámica de la luz y Análisis de seguimiento de Nanopartículas	40
4.3.5. Fraccionamiento en flujo a través de campo de flujo asimétrico: estudio de la pureza de las NPs de Carbono	41
5. Conclusiones	47
6. Trabajos futuros.....	48
7. Bibliografía	50
8. Anexos.....	54

Resumen

Los nanomateriales, son un nuevo tipo de materiales cuyo interés ha estado en continuo crecimiento en las últimas décadas. Específicamente, las nanopartículas (NPs) semiconductoras o Quantum Dots (QDs), han sido ampliamente explotadas desde su descubrimiento hasta la fecha ya que, gracias a sus excepcionales características fotoluminiscentes pueden ser potencialmente útiles en numerosas aplicaciones bioanalíticas (p.ej. marcaje de biomoléculas en aplicaciones de imagen, desarrollo de nuevos inmunoensayos con sensibilidad mejorada, etc.).

Sin embargo, con el transcurso del tiempo y a medida que se alcanzó un mayor conocimiento sobre estas NPs metálicas, el número de referencias bibliográficas haciendo alusión a los posibles efectos tóxicos de los QDs más utilizados y estudiados (los basados en un núcleo de base Cd) en el ser humano ha ido en aumento. Por ello, con el objetivo de paliar posibles deficiencias que los QDs más utilizados presentan en cuanto a toxicidad y biocompatibilidad, han entrado con gran fuerza en escena distintos tipos de nanopartículas luminiscentes alternativas, compuestas por constituyentes menos tóxicos, entre los que se encuentran los denominados Carbon Quantum Dots (CQDs).

Los CQDs son nanopartículas esféricas de carbono (CNPs) que presentan magníficas propiedades luminiscentes y elevada biocompatibilidad. Gracias a la baja toxicidad que presumiblemente presentan, podrían llegar a ser muy útiles en el desarrollo de numerosas aplicaciones bioanalíticas y clínicas como nuevos inmunoensayos, técnicas de biomarcaje y liberación controlada de fármacos.

Este tipo de NPs presentan la propiedad de mejorar su rendimiento cuántico de fluorescencia cuando son dopadas con heteroátomos como el nitrógeno. Sin embargo, debido a que son NPs extremadamente novedosas, la información sobre ellas es bastante limitada. Por ello, en este Trabajo Fin de Máster se ha pretendido profundizar más acerca de la síntesis y caracterización de este tipo de CNPs tanto dopadas con nitrógeno como sin dopar, haciendo posteriormente un estudio más detallado de las CNPs dopadas con heteroátomos.

Por último, debido a que las síntesis de estas NPs suelen producir muestras con elevada polidispersividad, en el presente Trabajo Fin de Máster se ha utilizado durante su

caracterización la técnica “Fraccionamiento en flujo a través de campo de flujo asimétrico” con el objetivo de dar un paso más en la caracterización e identificación de las mismas.

1. Introducción

1.1. Nanopartículas: concepto y clasificación

Cuando en 1959 el premio Nobel de física, Richard Feynman, dio una conferencia en la que declaró la posibilidad de almacenar los 24 tomos de la enciclopedia en la punta de un alfiler o de incluso crear micromáquinas que fueran capaces de viajar dentro del cuerpo humano (nanorobots), a la mayoría de los científicos de la época les pareció unas afirmaciones muy difíciles de creer [1]. Sin embargo, hoy en día, tras décadas de exhaustiva investigación, muchas de las premisas de Feynmann se han hecho realidad. Aunque todavía se debe de profundizar enormemente en muchos de los aspectos y de matizar otros tantos, los avances que se han conseguido han sido asombrosos. Todos estos avances conforman lo que hoy se conoce como nanociencia y nanotecnología.

Resulta complejo elaborar una definición de Nanociencia y Nanotecnología, por lo cual existen múltiples definiciones posibles. Quizás una de las definiciones de la Nanociencia más completa y actual es la que considera esta disciplina como el estudio de los fenómenos y la manipulación de materiales a nivel atómico, molecular o macromolecular, donde las características o propiedades físicas o químicas difieren significativamente de las presentadas por el mismo material a una escala mayor [2]. Por otra parte, el término Nanotecnología se puede entender como el diseño, caracterización, producción y uso de estructuras, dispositivos y sistemas cuya forma y tamaño se controlan a escala nanométrica..

Los progresos científicos y tecnológicos conseguidos en los últimos años en este campo han permitido el desarrollo de nuevos conceptos, herramientas y técnicas para diseñar, fabricar y caracterizar materiales o dispositivos “nano” con gran precisión. Uno de los resultados del avance de la nanociencia y nanotecnología es la producción controlada de nanopartículas con inusuales propiedades químico-físicas. Las nanopartículas (NPs) son materiales con las tres dimensiones en el intervalo de 1-100 nm y que presentan propiedades físico-químicas diferentes a las que presenta el mismo material sintetizado a gran escala [3].

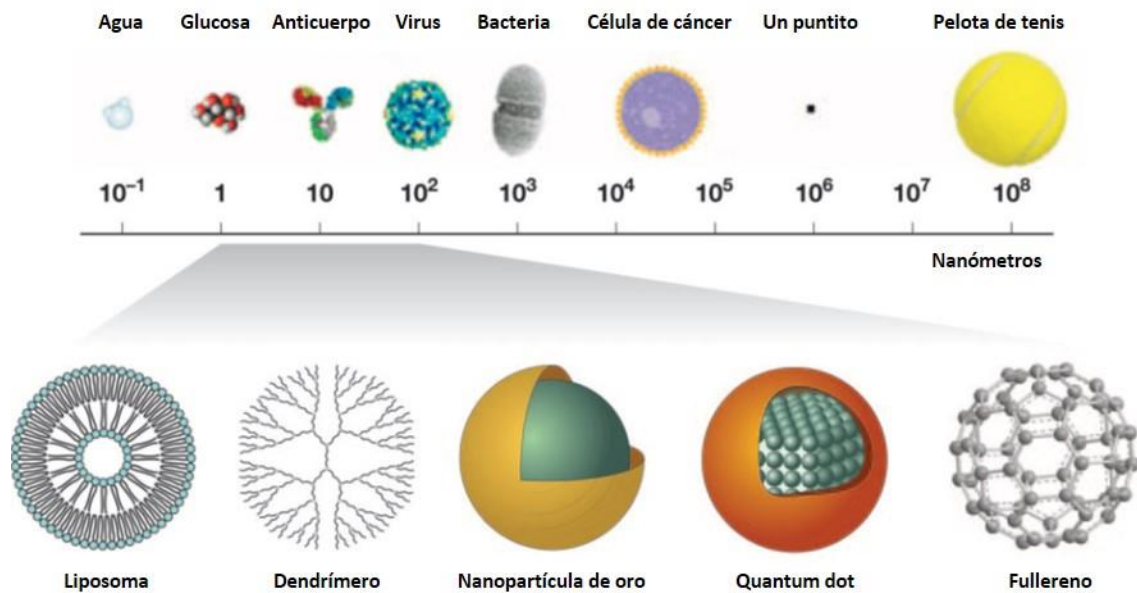


Figura 1. Las medidas de la nanotecnología. S. E. McNeil (2005).

Se pueden distinguir diferentes tipos de NPs en función del carácter organizacional de la materia que presentan:

- a)** Nanopartículas de carbono (CNPs): tienen forma esférica, elipsoidal o tubular. Entre sus propiedades, destacan por un reducido peso, elevada dureza, elasticidad y conductividad eléctrica. Dentro de este grupo destacamos los fullerenos, nanotubos, nanohilos y nanofibras de carbono.

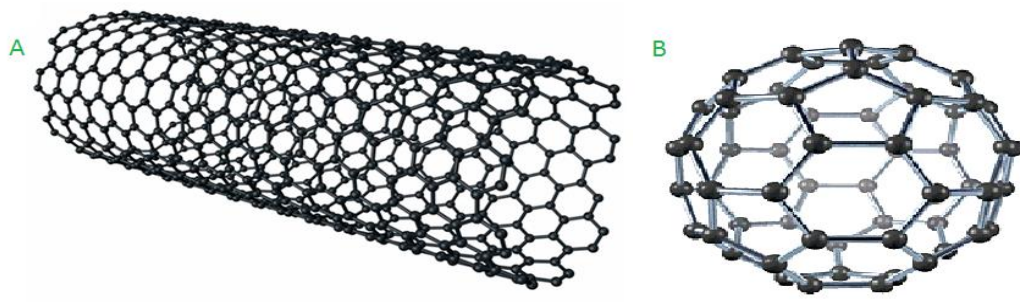


Figura 2. A) Nanotubo de Carbono. B) Fullereno. Imágenes tomadas de la página web “carbonallotropes”.

- b)** Nanopartículas semiconductoras: Este tipo de NPs se forman a partir de un precursor metálico con elementos pertenecientes a la familia del oxígeno. Una propiedad a destacar de estas NPs es la fotoluminiscencia, es decir, son capaces de absorber luz (fotones) para después emitirla a una longitud de onda diferente.

Esta propiedad se obtiene cuando las NPs son irradiadas con un haz de determinada longitud de onda, proporcionando los respectivos espectros de excitación y de emisión respectivamente. Dichos espectros están relacionados directamente con los niveles de energía en los cuales los electrones se encuentran confinados. Se caracterizan por ser muy útiles en numerosas aplicaciones bioanalíticas y se las conoce con el nombre de Quantum Dots (QDs) [4].

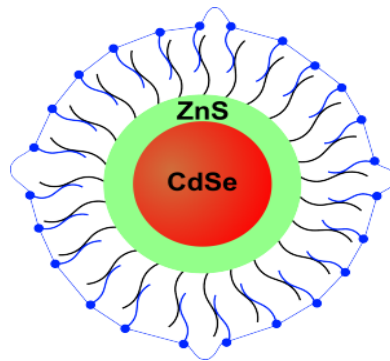


Figura 3. *Quantum dot core-shell (CdSe/ZnS) con polímero entrecruzado. Imagen adaptada de “Materials for Biosensor”, 2007.*

- c) Nanopartículas metálicas: Exhiben unas excelentes propiedades físicas, química y biológicas, que son intrínsecas a su tamaño nanométrico. Se caracterizan porque contienen un número exacto de electrones libres confinados en un espacio muy pequeño, lo que les da magníficas propiedades como la resonancia plasmónica [5].

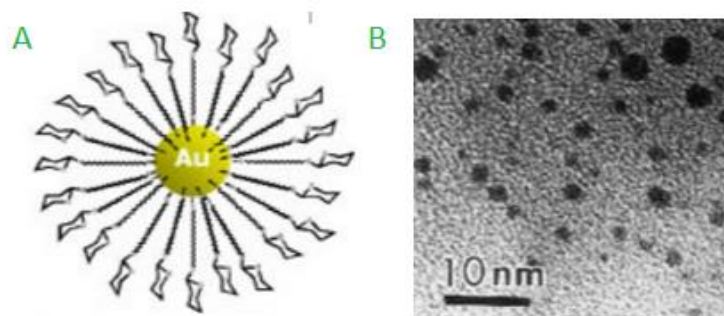


Figura 4. *A) Esquema de nanopartícula de Oro (AuNP). B) Imagen de AuNPs obtenidas mediante microscopio electrónico de transmisión. Imágenes tomadas del “Consejo Superior de Investigaciones Científicas” (CSIC).*

- d) Nanopartículas cerámicas: Poseen propiedades aislantes y elevada temperatura de fusión y resistencia a la compresión
- e) Nanopartículas poliméricas: Son polímeros nanométricos contruidos a modo de árbol en el que unas ramas crecen a partir de otras y así sucesivamente, reciben el nombre de dendrímeros. En las terminaciones de dichas ramas se pueden llevar a cabo modificaciones para ejecutar funciones químicas determinadas, presentando por tanto alta funcionalidad [6].

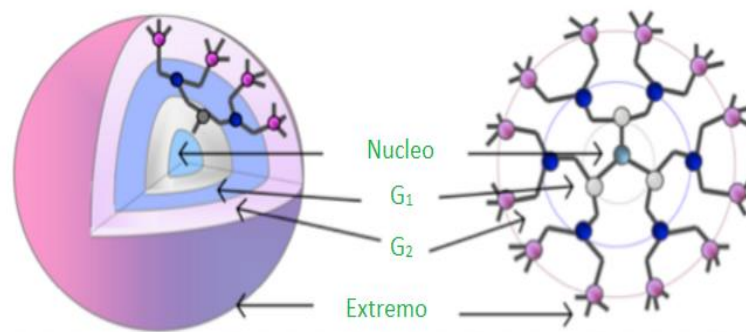


Figura 5. Esquema de una nanopartícula polimérica (dendrímico). Imágenes tomadas de la página del Programa Iberoamericano para la Ciencia y el Desarrollo (CYTED).

1.2. Nanopartículas de Carbono

El Carbono es comúnmente conocido como un material negro que hasta hace poco era imposible pensar que podría ser soluble en agua y, además, mostrar elevada fluorescencia. Sin embargo, cuando este material es sintetizado en tamaños nanométricos, sus propiedades son excepcionalmente diferentes con respecto a su semejante a gran escala [7].

Los nanomateriales de carbono pueden adoptar varias formas, entre las cuales los más conocidos son: buckminsterfullereno (C_{60}), nanotubos de carbono, nanodiamantes, nanofibras de carbono y grafeno. Recientemente se han descubierto otro tipo de NPs de este elemento, los Carbon Quantum Dots (CQDs), con excelente propiedades físico-químicas que pueden resultar de gran valor añadido para el desarrollo de metodologías fotoluminiscentes de análisis con superiores prestaciones a las tradicionales. En las siguientes líneas se profundizará más acerca de estas novedosas NPs

y de sus antecedentes, las nanopartículas semiconductoras (QDs), ya que, sin éstas últimas, sería imposible entender las propiedades de los CQDs.

1.3. Carbon Quantum Dots

1.3.1. Antecedentes de los Carbon Quantum Dots

Desde el descubrimiento de los QDs en 1981 por Alexei Ekimov, y especialmente tras la aparición en 1998 de dos trabajos en la revista Science demostrando la posibilidad de llevar a cabo la modificación de la superficie de este tipo de nanopartículas para hacerlas biocompatibles y estables en medios acuosos [8, 9], las referencias científicas de desarrollos de metodologías bioanalíticas utilizando estas NPs se han visto incrementadas exponencialmente con más de 4000 artículos durante la última década y más de 6000 publicaciones anuales en los últimos cinco años.

Los QDs o puntos cuánticos son NPs de materiales semiconductores. Normalmente contienen desde 100 hasta 100.000 átomos, con diámetros en el intervalo de 2-10 nanómetros (nm). Debido a su minúsculo tamaño, los QDs sufren una serie de efectos cuánticos como es la discretización de sus bandas de energía. Como propiedad interesante, estas NPs semiconductoras presentan confinamiento cuántico en las tres direcciones del espacio, debido a que los electrones están restringidos a moverse en regiones muy pequeñas, menores de 10 nm. El confinamiento cuántico se da cuando el diámetro del cristal es menor que su radio de Bohr e influye en que las propiedades de los QDs sean muy diferentes a las de los materiales macroscópicos [10].

Al ser nanocristales formados por materiales semiconductores poseen una banda de valencia (llena de electrones) y una banda de conducción (banda energética vacía) separadas por una diferencia energética llamada gap.

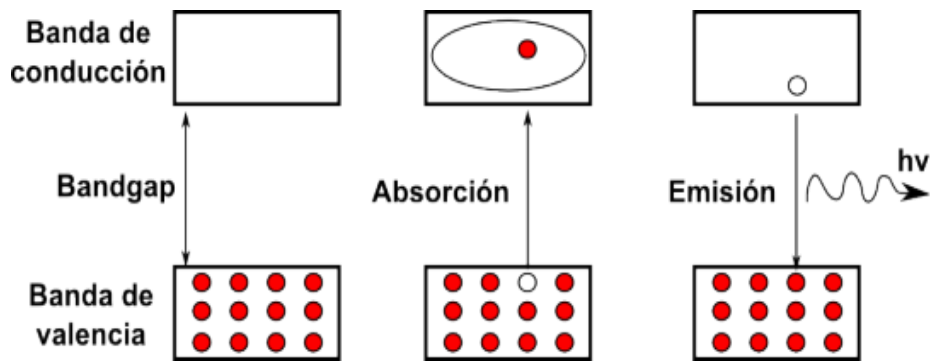


Figura 6. Emisión de luz tras excitación electrónica en un QD. Imagen adaptada de “Materials for Biosensors”, 2007.

El proceso luminiscente se produce cuando los electrones de la banda de valencia son excitados con un haz de determinada energía a la banda de conducción dejando huecos en la banda de valencia. Cuando dicha excitación finaliza, se produce una combinación radiativa entre los electrones y los huecos generados lo que provoca la emisión de fotones con una energía definida que viene determinada por la separación entre ambos niveles energéticos y, por tanto, dicha radiación tiene una longitud de onda característica. Se debe destacar que las NPs de mayor tamaño tienen gaps más pequeños, aumentando al disminuir el tamaño de las NPs. Es este motivo, uno de los más interesantes en aplicaciones biomédicas, ya que, controlando el tamaño de las nanopartículas, se puede controlar la longitud de onda de emisión, aspecto de especial interés en el desarrollo de aplicaciones de análisis multianalito [10].

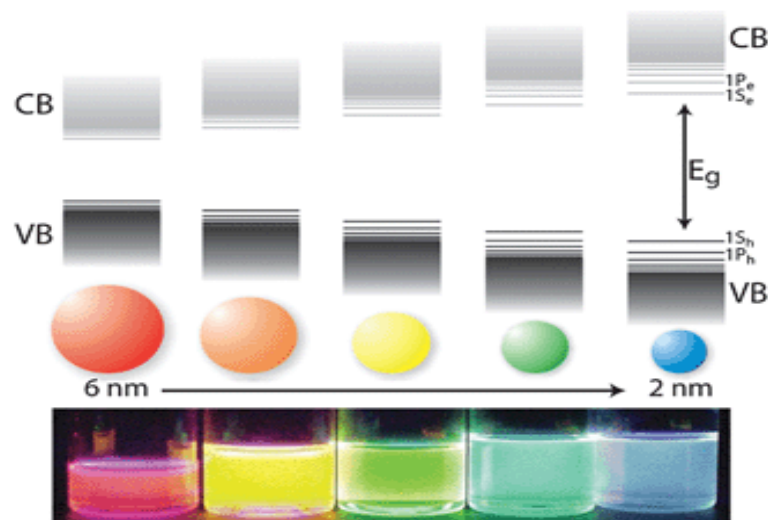


Figura 7. Fluorescencia de QDs de diferentes tamaños.

Dentro de la nanomedicina, los QDs han sido enormemente utilizados como sistemas para obtener imágenes biomédicas. Ésta es una de las aplicaciones con mayor potencial, ya que su pequeño tamaño posibilita el estudio de procesos biológicos en organismos, incluso in-vivo, permitiendo obtener información acerca de muchas enfermedades.

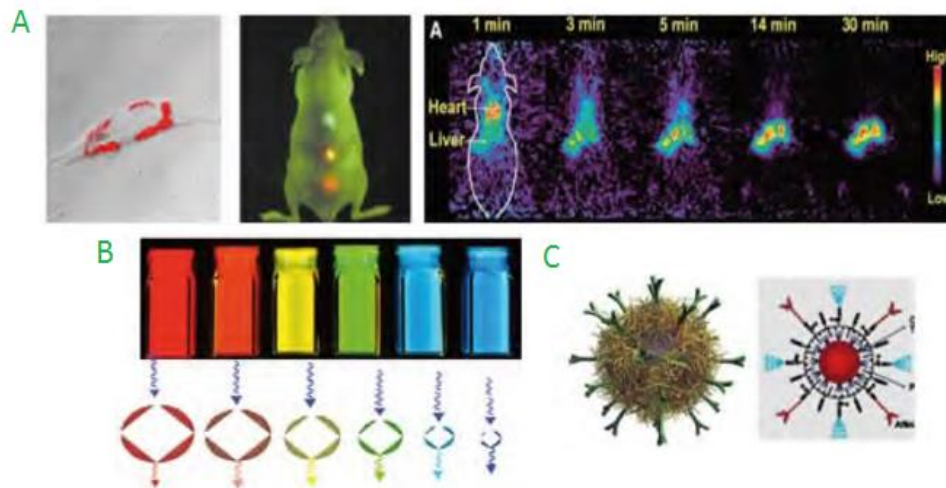


Figura 8. *A) Imágenes de experimentos en los que se han inyectado QDs en órganos y tejidos dañados. B) Diferentes disoluciones de QDs con diferentes colores en función del tamaño de los mismos. C) Esquema de un QD. Imágenes tomadas de X. Lan et al., 2014.*

Además, gracias a la investigación de las últimas décadas, se han desarrollado diferentes métodos que permiten la bioconjugación de dichas NPs con biomoléculas, lo que los hace muy útiles para la realización de inmunoensayos gracias a sus propiedades luminiscentes [11]. Por último, en la actualidad, se está estudiando la posibilidad de bioconjugarse también los puntos cuánticos con fármacos para que posteriormente sean liberados de forma selectiva dentro del cuerpo humano (Drug Delivery).

Sin embargo, a pesar del significativo interés que hay suscitado entorno a este tipo de NPs para uso biomédico, muchos investigadores afirman que los QDs nunca se podrán usar para tratar pacientes a causa de su potencial toxicidad debido a la presencia en el núcleo del nanocrystal de metales pesados como el cadmio [12].

Por ello, con el objetivo de reducir la toxicidad y aumentar la biocompatibilidad, un tipo de NP que está ganando mucho auge en los últimos años son los **Carbon Quantum Dots (CQDs)**.

Este trabajo se centra en las propiedades que este nuevo tipo de NPs tiene, la síntesis para su fabricación, su caracterización y por último su posible uso como herramienta en nanomedicina.

1.3.2. Propiedades de los Carbon Quantum Dots

Los CQDs son pequeñas NPs esféricas de carbono que poseen propiedades únicas hasta la fecha y están siendo enormemente explotadas en la actualidad con el objetivo de suplir deficiencias tales como toxicidad y baja biocompatibilidad que se han encontrado en las NPs fluorescentes ya existentes.

Fueron descubiertas por primera vez durante procesos de purificación de nanotubos de carbono de una sola capa mediante electroforesis en 2004, y más tarde mediante ablación láser de grafito en polvo y cemento en 2006 [13]. Su carácter biocompatible, benigno, abundante y barato [13], hace que se hayan empezado a estudiar con gran detalle para el desarrollo de aplicaciones bioanalíticas. Hay que destacar que, debido a que el carbono está considerado como un material con muy baja solubilidad en agua y una débil fluorescencia, los CQDs presentan unas propiedades optoelectrónicas muy interesantes. Por tanto, para conseguir estas excepcionales características, es necesario una síntesis adecuada que se detallará a lo largo de este documento.

Si son comparados con sus antecesores, los QDs, los CQDs difieren de estas últimas por su elevada solubilidad acuosa directamente tras la síntesis (las síntesis típicas de los QDs tienen lugar en medios orgánicos), fácil modificación superficial, elevada resistencia a la fotodescomposición y por ser elevadamente inertes [14]. Otra característica que hace de los CQDs unas partículas sumamente fascinantes es la baja toxicidad [15], por lo que, sumada a las anteriores propiedades, los sitúa como herramientas con un elevado potencial en aplicaciones biomédicas pues pueden ser usados en técnicas de bioimagen, biosensores y como medios para la liberación controlada de fármacos.

1.3.2.1. Propiedades ópticas

a. Absorción

Los CQDs muestran absorción óptica en la región ultravioleta del espectro, como posteriormente se mostrará en los espectros realizados en el transcurso del trabajo experimental recogido en esta memoria. La absorbancia de este tipo de NPs se atribuye a transiciones $\pi-\pi^*$ de los enlaces dobles de los carbono (C=C) y también debida a transiciones $n-\pi^*$ de los enlaces C=O [16].

b. Fluorescencia

Una de las características más importantes de estas partículas es su intensa emisión de luminiscencia (fluorescencia) intrínseca. Por ello es previsible que surjan multitud de aplicaciones de los CQDs como marcas en nanomedicina.

La fluorescencia es un tipo particular de luminiscencia que poseen las sustancias que son capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética a una longitud de onda diferente. La energía total emitida es siempre menor a la energía total absorbida y la diferencia entre ambas es disipada en forma de calor, esto es así ya que, en la mayoría de los casos la longitud de onda emitida es mayor (por lo tanto, menor energía) que la absorbida [17]. El mecanismo de fluorescencia típico implica tres pasos secuenciales, denominados: absorción, emisión no radiativa y emisión. El ciclo completo es muy breve y transcurre en tiempos del orden de los nanosegundos.

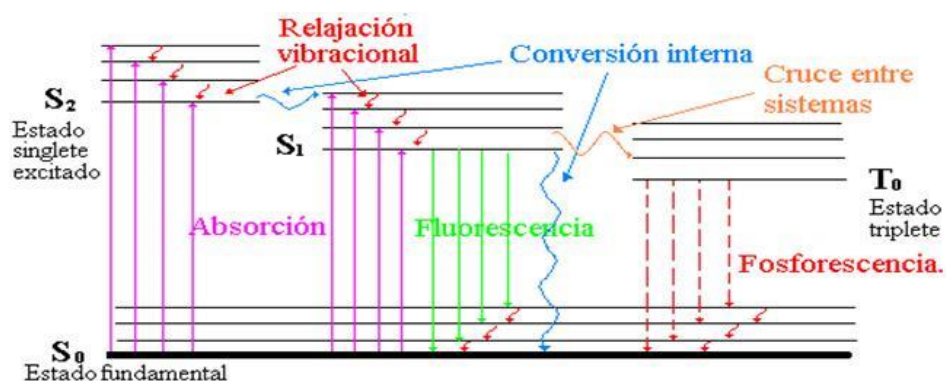


Figura 9. Diagrama de Jablonski.

El fenómeno de fluorescencia puede ser fácilmente entendido gracias al esquema representado en la Figura 8 (Diagrama de Jablonski). El proceso comienza por la excitación de un electrón desde su estado basal (S_0) a un nivel energético excitado de mayor energía (S_2) en un estado vibracional alto. Esta promoción se produce cuando la molécula absorbe energía en forma de un cuanto de luz (fotón). El electrón que se encuentra en un estado electrónico excitado puede ceder parte de su energía en forma de radiaciones vibracionales. Esta partícula atómica puede ir descendiendo entre los distintos niveles vibracionales cediendo a su vez parte de energía en forma de calor. Finalmente, los electrones en estados excitados (S_1) descienden hasta el estado basal emitiendo luz (Fluorescencia) o perdiendo energía por procesos no radiativos [18].

, Por otro lado, tal y como se recoge en el diagrama de Jablonski, cuando los electrones en un estado excitado singlete (S_1) sufren un cruce intersistemas y pasan a un estado excitado triplete (T_1) [19], el fenómeno luminiscente que se produce es el de la fosforescencia, caracterizado por tiempos de vida más largo. El trabajo realizado en el presente trabajo fin de Máster únicamente se centra en el fenómeno de la fluorescencia.

Entre las teorías que confirman la alta fluorescencia de los CQDs se encuentran teorías basadas en la presencia de grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas; del pasivado de la superficie; del número de fluoróforos en su composición con diferentes grados de conjugación π ; y de la recombinación entre electrones y huecos localizados dentro de los clusters de carbono sp^2 incrustados en una matriz con carbonos sp^3 [13].

Si bien se han descrito en la literatura científica diversos artículos en la que se habla que las propiedades fluorescentes de éstos dependen del tamaño de las nanopartículas (confinamiento cuántico) al igual que el utilizado para los QDs, no se podría entender completamente el proceso luminiscente de las nanopartículas de carbono si no se tuvieran en cuenta una teoría basada en efectos superficiales, pues es el carbono no es un elemento semiconductor [20, 21].

En este trabajo nos basamos en NPs de carbono sintetizadas a partir de dos precursores orgánicos (glucosa y sacarosa). Hay que mencionar que la mayoría de estas NPs fluorescentes, sintetizadas directamente a través de varias vías a partir de precursores sencillos (como los utilizados en este trabajo) tienen bajos rendimientos cuánticos de

fluorescencia. Con el objetivo de mejorar su fotoluminiscencia se han llevado a cabo diferentes estrategias tales como: reducción de la superficie de éstos; introducción de grupos carboxílicos; dopaje con sales inorgánicas (ZnO y ZnS); y modificación de las superficies de las nanoesferas con diferentes polímeros orgánicos [22].

Sin embargo, ninguna de estas estrategias ha mejorado tanto la fluorescencia como la adición de heteroátomos a la estructura de los CQDs. Por ello, de entre las distintas estrategias ensayadas hasta la fecha, parece ser esta última vía la más interesante para un aumento considerable del rendimiento cuántico de fluorescencia [23]. Este tipo de NPs de carbono reciben el nombre de CQDs-dopados.

El **dopaje con heteroátomos** es una vía altamente utilizada para modificar las propiedades fotoluminiscentes de los materiales con esta propiedad. Los elementos más utilizados hasta la fecha han sido: N, S y P. Sin embargo, el elemento más utilizado y con el que se han obtenido los mejores resultados ha sido con el Nitrógeno. Los CQDs dopados con nitrógeno reciben el nombre de: **N-CQDs**.

Al dopar con **nitrógeno** se induce un desplazamiento ascendente en el nivel de Fermi y los electrones en la banda de conducción. El nitrógeno inserta electrones en los CQDs y cambia la estructura electrónica local de los mismos, la cual aumentará enlazándose con iones, provocando que la capacitancia de los N-CQDs aumente considerablemente [24].

1.3.3. Síntesis de los Carbon Quantum Dots

La síntesis de CQDs puntos cuánticos de carbono normalmente incluye una polimerización, descomposición y carbonización de las moléculas. De forma general, este proceso ocurre en medios acuosos y, por tanto, los grupos funcionales finales en la superficie de los CQDs tienen carácter hidrofílico [22].

En este trabajo nos basamos en nanopartículas de carbono (CNPs) sintetizadas a partir de dos precursores orgánicos (glucosa y sacarosa). Es decir, estas moléculas poseen grupos $-OH$ y grupos $-C=O$, los cuales pueden deshidratarse a elevada temperatura. Para llevar a cabo la deshidratación y carbonización existen diversos métodos tales como

reacciones hidrotermales, combustiones, pirolisis ácida concentrada, carbonización en un microrreactor, microondas, etc. [16]. Los procesos de formación de este tipo de NPs son normalmente incontrolables, por lo que resultan en CQDs con elevada polidispersidad.

Sin embargo, en este proyecto se ha elegido la síntesis mediante ultrasonido, la cual es una vía de síntesis óptima para obtener CNPs a partir de compuestos orgánicos. Además, posee como ventajas un bajo precio y una elevada rapidez de síntesis. El proceso por el cual se lleva a cabo la síntesis bajo ultrasonido, recibe el nombre de sonicación, y al tipo de química que utiliza esta técnica Sonoquímica.

El uso de ultrasonido en reacciones químicas en disolución provoca una determinada activación basada en el proceso físico denominado cavitación. Este fenómeno físico implica un proceso en el cual una mecánica activación destruye las fuerzas de interacción entre las moléculas en la fase líquida. Al aplicar el ultrasonido, en primer lugar, se produce una compresión del líquido, para posteriormente, producir una expansión en la cual una caída repentina de presión forma pequeñas y oscilantes burbujas gaseosas. Estas burbujas se expanden con cada ciclo de ultrasonido aplicado hasta que éstas alcanzan un tamaño inestable y pueden finalmente colisionar unas con otras o colapsar [25].

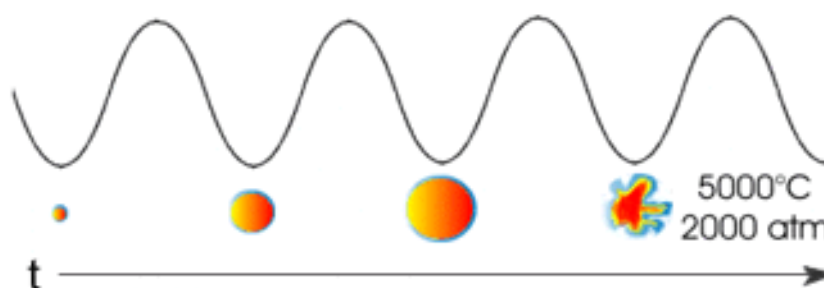


Figura 10. Esquema que resume la síntesis de una nanopartícula durante una síntesis asistida por ultrasonidos. A medida que transcurre el tiempo, el tamaño de las partículas aumenta con cada ciclo (de ultrasonidos) hasta que finalmente alcanzan un tamaño inestable.

Algunas reacciones para la generación de CQDs a partir de compuestos orgánicos se llevaron a cabo usando un baño de ultrasonidos convencional, sin embargo, la cantidad de energía que estos alcanzan se encuentra solamente entre 1 y 5 $\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$, y el control de la temperatura es más difícil.

Con el objetivo de minimizar el tiempo de síntesis y garantizar que la transmisión de energía ultrasónica sea la adecuada, en este proyecto se ha utilizado la síntesis por inmersión de ultrasonidos directamente en el recipiente de reacción. Las energías aplicadas en este caso pueden ser cien veces mayores que las aplicadas con baño de ultrasonido.

1.3.4. Caracterización de los Carbon Quantum Dots

La caracterización de los CQDs, con el objetivo de profundizar en las propiedades de este tipo de nanopartículas novedosas, se realizó mediante las técnicas e instrumentos que se explican a continuación:

a. Espectroscopía de fluorescencia

Es un tipo de espectroscopía electromagnética, la cual analiza la fluorescencia de una muestra. Esto involucra el uso de un haz de luz, comúnmente de luz ultravioleta, que excita a los electrones en las moléculas fluoróforas y causa posteriormente la emisión de luz.

Se utiliza para ello un fluorímetro, el cual es un dispositivo usado en laboratorio para medir parámetros de fluorescencia como la intensidad y la distribución de longitudes de onda del espectro de emisión después de la excitación por un determinado haz de radiación [26].

La medida de estos parámetros es útil para la identificación de la cantidad de ciertas moléculas en un medio, así como la presencia de las mismas. Son capaces de detectar concentraciones de moléculas fluorescentes tan bajas como 1 parte por billón (ppb).

b. Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es un instrumento que aprovecha los fenómenos físico-atómicos que se producen cuando un haz de electrones suficientemente acelerado colisiona con una muestra delgada convenientemente preparada. Cuando los electrones colisionan con la muestra, en función de su grosor y del

tipo de átomos que la forman, parte de ellos son dispersados selectivamente, es decir, hay una gradación entre los electrones que la atraviesan directamente y los que son totalmente desviados. Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes para formar una imagen final sobre un dispositivo de carga acoplada (CCD) que puede tener miles de aumentos con una definición inalcanzable para cualquier otro instrumento. La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes [27].

La imagen del TEM, tal como se ha descrito, ofrece información sobre la estructura de la muestra, tanto si ésta es amorfa o cristalina.

Por su parte, la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) es un modo de la proyección de imagen del TEM que permite la proyección de la imagen de la estructura de una muestra en una escala atómica. Gracias a su alta resolución, es de elevada utilidad para estudiar las características de materiales en el nivel de nano-escala.

c. Fraccionamiento en flujo a través de campo de flujo asimétrico (AF4)

En primer lugar, se ha de definir la técnica del fraccionamiento en flujo (FFF). Ésta es una técnica de separación en la que se aplica una fuerza (campo o gradiente) perpendicular a un canal en el que se desplazan las distintas especies en régimen laminar.

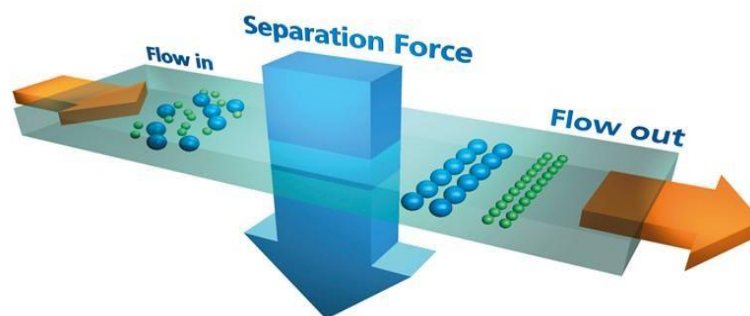


Figura 11. Representación del proceso de separación en FFF.

Cuando el flujo que transporta la muestra migra a través del canal de FFF, se aplica un campo externo perpendicular al eje del canal de fraccionamiento, lo que causa la retención de los analitos (**Figura 10**).

En comparación con los métodos cromatográficos, la ausencia de fase estacionaria evita interacciones irreversibles, por lo que se minimiza la posible degradación de los analitos de la muestra.

La AF4 es una técnica con gran proyección en la identificación y caracterización de NPs sintéticas. El instrumento utilizado en el presente proyecto cuenta con dos detectores acoplados en línea con la separación, uno de espectrofotometría UV-VIS y otro de fluorescencia.

Se caracteriza por ser una técnica simple, que no precisa de disolventes orgánicos o fases móviles con elevados contenidos salinos, que precisa de una instrumentación relativamente sencilla, aunque los fractogramas obtenidos habitualmente presentan con elevados tiempos de análisis (20-40 min.). Para garantizar una separación idónea es necesario controlar una serie de parámetros que incluyen: la fase móvil, la membrana, el campo externo aplicado y el espesor del canal de separación, entre otras.

Para llevar a cabo la separación se aplica un campo externo que consiste en un flujo secundario perpendicular al flujo portador. La separación se consigue por la retención de las partículas en el canal de separación, sin embargo, a diferencia de cromatografía, en este caso no existen interacciones química entre los analitos y la membrana. La separación únicamente se consigue variando los flujos utilizados. Es decir, la retención se produce por un equilibrio entre el movimiento de difusión de las partículas y la fuerza del campo generado [28].

El campo perpendicular aplicado induce a las partículas hacia una de las paredes del canal de separación denominada pared de acumulación, desde donde difunden en sentido opuesto al campo aplicado.

Por último, en función de los diferentes coeficientes de difusión de las partículas, la AF4 permite llevar a cabo una separación de las mismas por tamaños, de acuerdo a la ley de Stokes que relaciona el diámetro hidrodinámico con el coeficiente de difusión.

Sin embargo, como se ha explicado con anterioridad, esta técnica requiere del control de muchos parámetros y, además, su uso en CQDs no está aún extendida, por lo que el desafío llevado a cabo en esta etapa es aún más significativo si cabe.

d. Dispersión dinámica de luz

La dispersión dinámica de luz (DLS) es una técnica que es usada para determinar el perfil de distribución de tamaños de pequeñas partículas en suspensión o polímeros en disolución.

Se utiliza una fuente monocromática de luz, principalmente un láser, que pasa a través de un polarizador y posteriormente atraviesa la muestra. La luz dispersada, a continuación, se induce a pasar por un segundo polarizador donde es recogido por un fotomultiplicador y la resultante imagen es proyectada en una pantalla [29].

Esta dispersión de radiación permite obtener información de tamaño de proteínas, polímeros, micelas, carbohidratos y NPs. Si la muestra no es dispersa en cuanto a tamaño, el diámetro medio efectivo de las partículas puede ser determinado. Esta medida depende del tamaño del núcleo de las NPs, del tamaño de las estructuras de la superficie, de la concentración y del tipo de iones en el medio.

Debido a que esta técnica principalmente mide variación en la intensidad de la luz dispersada con el tiempo como consecuencia de la difusión de las NPs, el coeficiente de difusión de las NPs puede ser determinado.

Además, muestra la población de las partículas con sus diferentes diámetros, es decir, si una muestra es monodispersa, aparecerá únicamente una población mientras que, de ser polidispersa el sistema informático proporcionará diferentes poblaciones.

e. Análisis de seguimiento de nanopartículas

El análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, por sus siglas en inglés “nanoparticle tracking analysis”) es un método para visualizar y analizar partículas en líquidos que relaciona el movimiento Browniano con el tamaño de partícula. La tasa de movimiento es relacionada únicamente con la viscosidad y la temperatura del líquido, no está influenciada por la densidad de las partículas o el índice de refracción. Esta técnica permite la determinación de la distribución de tamaños de partículas pequeñas de aproximadamente 10-1000 nm en suspensión líquida.

La técnica usada a lo largo del presente Trabajo Fin de Master, en conjunción con un ultramicroscopio y un láser, permiten que las NPs moviéndose debido al movimiento

Browniano sean visualizadas. La luz dispersada por las partículas es capturada por un CCD. Posteriormente, el sistema informático del ordenador es usado para rastrear el movimiento de cada partícula de una zona a otra. La tasa de movimiento de las NPs es relacionada con una esfera equivalente al radio hidrodinámico que es calculada a través de la ecuación de Stokes-Einstein [30].

Se diferencia de la técnica de DLS en que la base del NTA son los vídeos a través de los cuales se efectúan los análisis. Por lo tanto, el análisis de seguimiento de NPs permite una caracterización exacta en tiempo real de eventos tales como agregación o disolución. Además, una característica muy importante del NTA, es que permite obtener la concentración de las NPs en suspensión por lo que está siendo enormemente explotada en la actualidad.

1.4. Nanotecnología en salud

A lo largo de la historia, la medicina y la ciencia han avanzado juntas con el objetivo de mejorar la calidad de vida de las personas. El boom de la nanociencia y nanotecnología con el comienzo del siglo XXI ha generado un desorbitado número de publicaciones y artículos en el ámbito de esta área de conocimiento. Con el paso de los años, la nanotecnología no solo se ha centrado en el desarrollo de la industria electrónica, sino también en la búsqueda de nuevos materiales con propiedades excelentes y nuevas estrategias para la síntesis de nanomateriales.

La irrupción de la nanotecnología en las ciencias de la salud ha dado lugar a una nueva disciplina denominada nanomedicina. Esta última rama de la nanotecnología ha emergido con gran fuerza dentro del sector científico en las últimas décadas y se prevén enormes avances en los próximos años que podrían causar un enorme impacto dentro de la sociedad actual.

Por ello, la medicina se presenta como un mercado potencial del mundo nano con aplicaciones tan revolucionarias que podrían incluso llegar a curar el cáncer o el Alzheimer, entre otras muchas enfermedades. Dentro de los objetivos de la nanomedicina

se debe destacar el desarrollo de herramientas para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades [31].

El hecho de que estos materiales tengan un elevado interés en medicina se debe a que, puesto que son suficientemente pequeños, pueden entrar en casi todos los espacios del cuerpo, tales como células u orgánulos. Además, las excepcionales propiedades optoelectrónicas de los nanomateriales hace que en muchas ocasiones sean altamente fluorescentes y puedan utilizarse como herramientas de diagnóstico en el desarrollo de técnicas de imagen molecular. Dentro de los nanomateriales utilizados en medicina podemos encontrar desde sensores construidos de pequeñas moléculas de interés bioquímico hasta NPs con propiedades fluorescentes.

Actualmente, la nanomedicina se centra principalmente en las siguientes áreas: el diagnóstico y nanobiosensores; desarrollo de nanosistemas de imagen; terapia basada en NPs; la liberación controlada de fármacos o nanoterapia; y, por último, la nanomedicina regenerativa.

Por este motivo, la motivación de esta investigación no es solamente llevar a cabo la síntesis de CQDs, sino también profundizar en el conocimiento acerca de su caracterización y así descubrir si sus propiedades los hacen óptimos para posible uso futuro como marcadores luminiscentes en el desarrollo de inmunoensayos con aplicaciones biomédicas.

2. Objetivos

El objetivo del presente trabajo ha sido optimizar la síntesis de nanopartículas de carbono fluorescentes y llevar a cabo una caracterización exhaustiva de los productos de la síntesis llevada a cabo empleando un abanico de técnicas analíticas complementarias.

Este objetivo científico tiene además un componente formativo importante, consistente en:

- 1.- familiarizarse con la síntesis de nuevas nanopartículas
- 2.- familiarizarse con el empleo de metodologías analíticas para la caracterización de nanopartículas

El objetivo general aquí planteado se ha abordado a partir de los siguientes objetivos específicos:

1.- Búsqueda de un método de síntesis de nanopartículas de carbono fluorescentes, a partir de un precursor orgánico (glucosa o sacarosa), empleando una sonda de ultrasonidos como catalizador del crecimiento de las nanopartículas con el objetivo de reducir los tiempos de las síntesis reportadas hasta la fecha (2-24 h).

2. Estudio del efecto del proceso de dopaje con N de los CQDs sobre los rendimientos cuánticos de las nanopartículas obtenidas. Para ello, se programan dos síntesis distintas de los CQDs: una utilizando NH_3 en la mezcla de precursores para generar N-CQDs, y otra con NaOH y HCl para producir CQDs sin dopar.

3.- En una tercera etapa se aborda la caracterización de los distintos tipos de nanopartículas sintetizadas, con el objetivo de profundizar en las propiedades ópticas de las mismas y descubrir si éstas podrían ser usadas en un futuro como marcas luminiscentes en el desarrollo de aplicaciones bioanalíticas.

3. Procedimiento Experimental

3.1. Materiales y reactivos

Para la síntesis de las NPs de carbono se utilizó:

1. D-(+)-glucosa ($C_6H_{12}O_6$) de la casa comercial “Sigma-Aldrich” (Schnelldorf, Germany).
2. D-(+)-sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$) de la casa comercial “Acros Organics” (Geel, Bélgica).
3. Amoníaco (28-30 %, NH_3) y ácido clorhídrico (37 %, HCl) de la casa comercial “Merck” (Darmstadt, Germany)
4. Hidróxido de sodio ($NaOH$) de la casa comercial “Fischer Chemical” (MA, USA).
5. Agua destilada/desionizada ultra-pura (18 $M\Omega$ cm) obtenido con un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

3.2. Instrumentación

La sonda de ultrasonidos utilizada fue una “**UIP500hdT**” (Hielscher - Ultrasound Technology) que trabaja a una frecuencia de ultrasonido de 20 kHz. Las ondas de ultrasonido a esta frecuencia crean una intensa cavitación en líquidos, óptima para la síntesis de CQDs. La sonda utilizada se muestra en la *Figura 13*.

El fluorímetro utilizado para las medidas fue un **espectrómetro de Fluorescencia Varian modelo Cary Eclipse**. Se compone de dos ranuras de Czemy-Turner (excitación y emisión) con doble monocromador, una fuente de luz de xenón de emisión continua entre 190 nm y 900 nm. Está dotado de rendijas de ancho fijo y filtros seleccionables.

El sistema utilizado para llevar a cabo los análisis mediante AF4 ha sido el **AF2000 Asymmetric flow field flow fractionation AF4 (Postnova, Alemania)**. Este sistema se basa en el principio del fraccionamiento en flujo mediante campos (FFF) en el que se usa un flujo perpendicular como fuerza para llevar a cabo la separación. Este

instrumento puede funcionar con diferentes fases móviles, a diferentes temperaturas de trabajo.



Figura 12. Imagen del instrumento de sonicación utilizado. Sonda de ultrasonidos inmersa en el recipiente de reacción.

3.3. Procedimientos

3.3.1. Síntesis de Carbon Quantum Dots

Se utilizaron dos precursores orgánicos, glucosa y sacarosa, para la síntesis de los CQDs.

En primer lugar, se prepararon 3 disoluciones de **glucosa** en distintos medios con el objetivo de obtener diferentes tipos de CQDs:

1. **N-CQDs**: 15 mL glucosa (1 M) + 15 mL NH_3 (30%).
2. **CQDs sin dopar**: 15 mL glucosa (1 M) + 15 mL NaOH (1 M).
3. **CQDs sin dopar**: 15 mL glucosa (1 M) + 15 mL HCl (37 %).

A continuación, se prepararon otras disoluciones exactamente igual que las anteriores, pero sustituyendo la glucosa por **sacarosa** y así poder estudiar las diferencias entre los dos tipos de CQDs obtenidos y averiguar cuáles eran los precursores más adecuados que dan lugar a las Nanopartículas de carbono con mejor calidad analítica.

Las disoluciones de **sacarosa** preparadas fueron las siguientes:

4. **N-CQDs:** 15 mL sacarosa (1 M) + 15 mL NH₃ (30%).
5. **CQDs sin dopar:** 15 mL sacarosa (1 M) + 15 mL NaOH (1 M).
6. **CQDs sin dopar:** 15 mL glucosa (1 M) + 15 mL HCl (37 %).

Tras la preparación de las disoluciones, todas ellas sufren el mismo tratamiento: se introduce cada disolución en un vaso de precipitados y éste a su vez en la sonda de ultrasonidos de forma que la sonda esté perfectamente sumergida en la disolución de partida.

Tabla 1. Programa utilizado para las síntesis de los diferentes CQDs. El tiempo de tratamiento con ultrasonidos fue de 30 minutos.

Potencia de sonicación	500 W
Frecuencia de ultrasonidos	40 kHz
Amplitud de sonicación	50 %

Pasado el tiempo de ultrasonidos, todas las disoluciones son filtradas para eliminar cualquier residuo que pueda interferir en los posteriores estudios.

3.3.2. Caracterización de los productos de síntesis mediante espectroscopía de fluorescencia

Una vez sintetizadas, se registraron los espectros de excitación/emisión de fluorescencia de las distintas NPs obtenidas empleando el procedimiento descrito en el apartado de “**Resultados y discusión**”, seleccionando posteriormente aquellas NPs que exhibieron las mejores propiedades luminiscentes. Gracias a este estudio se seleccionaron, las longitudes de onda de máxima excitación (λ_{exc}) y emisión (λ_{em}), de trabajo y, además, se compararon las intensidades máximas de fluorescencia entre los distintos tipos de NPs sintetizadas.

Con el objetivo de asegurar que las disoluciones anteriormente preparadas no poseían fluorescencia sin ser tratadas mediante ultrasonido, se prepararon **muestras blanco** de las mismas, es decir, disoluciones igualmente preparadas que las anteriores,

pero sin tratamiento mediante ultrasonido. Posteriormente, se estudiaron también mediante espectroscopía de fluorescencia (Ver “**Anexo**”). Estas disoluciones sin ultrasonido no poseían color en el momento de la preparación, pero, con el paso de los días, iban adquiriendo color y dejando de ser transparentes. Se pensó por tanto que se podrían haber generado CNPs en estas disoluciones. Por ello, en los posteriores ensayos, se estudió también los productos obtenidos partiendo de los mismos precursores pero sin llevar a cabo el tratamiento mediante exposición a ultrasonidos.

3.3.3. Caracterización de los Carbon Quantum Dots

Tras la selección del precursor orgánico que dió lugar a las NPs con mejores propiedades luminiscentes, se llevó a cabo la caracterización de los CQDs obtenidos a partir de éste precursor (sacarosa o glucosa) pero en medios diferentes:

- a. **N-CQDs**: Con tratamiento mediante ultrasonido.
- b. **N-CQDs**: Sin tratamiento mediante ultrasonido.
- c. **CQDs sin dopar**: Obtenidos a partir de NaOH y el precursor orgánico seleccionado con tratamiento mediante ultrasonido

Los obtenidos en HCl fueron descartados tal como se explica en el apartado “**Resultados y Discusión**” de este documento.

Tal y como se ha detallado en la introducción, la presencia de heteroátomos puede aumentar significativamente el rendimiento cuántico de fluorescencia de los CQDs. Es por ello que, este estudio sirvió para obtener información más detallada acerca de la diferencia entre **N-CQDs** y **CQDs sin dopar**.

Los análisis llevados a cabo para la caracterización de las NPs son los siguientes:

1. Espectroscopía ultravioleta-visible.

Estudiando los espectros de excitación y emisión de las NPs y comparando las intensidades máximas de fluorescencia entre los distintos tipos de NPs sintetizadas.

2. Efecto del pH en la intensidad de emisión de fluorescencia

Para ello, se prepararon diferentes disoluciones en tampón fosfato salino (PBS) a diferentes pHs (2-12) con el objetivo de seleccionar aquel que nos proporcione una intensidad de emisión de fluorescencia elevada.

Se utilizó PBS para este estudio, ya que, como se ha descrito a lo largo de la introducción de este trabajo, otro de los objetivos del mismo era estudiar la posible aplicación de los CQDs en inmunoensayos y en éstos, la mayoría de las bioconjugaciones son realizadas en este tipo de disoluciones.

3. Estudio de fotoestabilidad

Se introdujeron disoluciones de los CQDs en dos tipos de viales diferentes.

Por un lado, viales transparentes a la luz que se dejaron durante el transcurso del estudio en una meseta en el que les incidía luz natural a lo largo de todos los días. Por otro lado, viales opacos para que no penetrara la luz natural y se mantuvieron almacenados en un armario para minimizar cualquier radiación.

Para efectuar este estudio fue necesario el uso de una disolución de un fluoróforo que sirvió como patrón, con el objetivo de usar éste como sistema de referencia para contrarrestar cualquier variación en las medidas instrumentales a lo largo del estudio. El fluoróforo utilizado fue una disolución patrón de Quinina.

El estudio de fotoestabilidad duró 4 semanas.

4. Fotoactivación

Existen diversas publicaciones en las que se ha observado la variación de la intensidad de la señal luminiscente de NPs cuando se irradian de forma continua durante tiempos relativamente largos. Durante dicho proceso, conocido como “fotoactivación” se produce un incremento de la señal de nuestra especie fluorescente. De cara a diseñar un procedimiento analítico basado en CQDs es necesario estudiar si estas novedosas NPs poseen tal característica. Por ello en este estudio se evaluará la influencia del proceso de fotoactivación sobre la señal de luminiscencia de los CQDs con el tiempo.

Preparadas las disoluciones de cada uno de los CQDs finales, se realizaron dos tipos diferentes de estudios:

- a) **Monitorización continua de la fluorescencia de las NPs de carbonodurante 2 h (Time drive):** en éste estudio se recoge la señal a la longitud de onda de máxima emisión (λ_{em}) de la muestra que contiene NPs de carbono en suspensión cuando es excitada a la longitud de onda de máxima excitación (λ_{exc}) durante dos horas de manera continua.
- b) **Recogida de espectros de emisión de fluorescencia durante 1 h:** por su parte, en éste se recogen espectros de emisión de fluorescencia cada 0,01 segundos durante 1 h, excitando los CQDs a su λ_{exc} . Se diferencia del estudio anterior, en que en el anterior se mantiene λ_{em} constante, mientras que en éste se obtiene un espectro de emisión de fluorescencia barriendo todas las λ_{em} de las NPs

El objetivo de ambos experimentos era conocer la estabilidad de los CQDs cuando son irradiados con un haz de luz durante un tiempo determinado y así saber si se degradan con la misma a lo largo del tiempo.

3.3.4. Caracterización específica de los Carbon Quantum Dots dopados con nitrógeno

Los estudios detallados en los apartados anteriores se llevaron a cabo empleando los CQDs obtenidos tanto en amoniac (NH₃), en NaOH y los CQDs obtenidos sin tratamiento con ultrasonido en amoniac (NH₃).

Posteriormente, analizando los resultados obtenidos, se seleccionó dentro de estos tres tipos de CQDs, aquellos que de nuevo tenían un mayor rendimiento cuántico de fluorescencia, que teóricamente y experimentalmente se correspondieron con los N-CQDs, tal como se explica en el apartado de “**Resultados y Discusión**” del presente trabajo.

Para la caracterización más en profundidad de los **N-CQDs**, se llevaron a cabo los siguientes estudios:

- 1. Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta resolución.**

Utilizado para caracterizar los N-CQDs, obteniendo información acerca de su estructura y tamaño. Además, esta técnica se utilizó para confirmar si realmente se han obtenido las NPs buscadas.

Para tal ensayo, se utilizaron 10 μL de N-CQDs disueltos en 2 mL de H_2O . Se debe destacar el uso de ácido fosfotúngstico para tinción de las NPs ya que la rendija utilizada en el TEM era de carbono, por lo que, para que nuestras partículas no se confundieran con ésta, era necesaria una tinción con esta disolución.

2. Se purificaron los CQDs utilizando dos vías diferentes:

a) Purificación mediante membrana de **diálisis de 2 kDa de cut-off (MWCO)**.

Para ello se utilizaron los N-CQDs directamente sintetizados, los cuales se introdujeron en una membrana de diálisis. El buffer utilizado para llevar a cabo tal proceso ha sido PBS a pH 7,4. En primer lugar, se puso el compartimento con la membrana en un vaso de precipitados de forma que la ésta estuviera perfectamente sumergida y se aplicó una leve agitación. Transcurridas dos horas, se cambió el buffer por otro limpio, y se dejó que transcurriera la diálisis durante otras 24 h. Pasado este tiempo, se recogieron los N-CQDs purificados en 3 mL de PBS.

b) Purificación usando **Amicon Ultra de 3 kDa de cut-off (MWCO)**.

En este tipo de purificación, las CNPs son purificadas a través de amicones. Para ello se introducen las NPs en éstos y posteriormente en una centrífuga, la cual se programa a 10.000 rpm durante 20 min. (se repite el proceso 3 veces). Al final, se recogen los N-CQDs en un vial con 3 mL de PBS.

3. Cálculo del Rendimiento cuántico de fluorescencia.

El rendimiento cuántico o eficiencia cuántica de un fluoróforo Q (Quantum Yield) representa el número de fotones emitidos por una muestra respecto al número de fotones absorbidos.

En este trabajo, el rendimiento cuántico de las NPs sintetizadas se estima a través de la comparación con estándares de rendimiento cuántico conocido, en este caso un estándar de Quinina. La medida Q se logra mediante la comparación entre la fluorescencia integrada de la muestra de CQDs con la fluorescencia integrada del patrón de Quinina. La densidad óptica u absorbancia de las muestras debe mantenerse por debajo de las 0,1 unidades para evitar efectos de filtro interno, o bien la densidad óptica de la muestra y el fluoróforo de referencia debe estar por debajo de este valor a la longitud de onda que se corresponde con la longitud de onda de excitación.

La eficiencia cuántica de una muestra desconocida se calcula aplicando la ecuación:

$$Q = Q_R \frac{I}{I_R} \frac{OD_R}{OD} \frac{n^2}{n_R^2} \quad (1)$$

donde I es la intensidad de fluorescencia integrada, Q es el rendimiento cuántico, OD es la densidad óptica o absorbancia, y n es el índice de refracción del medio. El subíndice **R** se refiere al fluoróforo de referencia de rendimiento cuántico conocido

4. Dispersión dinámica de luz (DLS).

Utilizada para la obtener información acerca de los tamaños de los CQDs. La enorme fluorescencia de los CQDs podría generar resultados erróneos, por ello, con el objetivo de no concentrar demasiado la muestra, se diluyen 10 μ L de los CQDs en 3 mL de H₂O y posteriormente, se introducen en la cubeta para DLS correspondiente. El índice de refracción utilizado ha sido de 2,44.

5. Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).

Obtención de concentración y tamaño de CQDs en la muestra.

6. Fraccionamiento en flujo a través de campo de flujo asimétrico (AF4)

Se ha utilizado un sistema AF2000. El canal trapezoidal era de 27,5 cm de largo y entre 2 a 0,5 cm de ancho. El espaciador utilizado en todas las medidas tenía 350 μ m

de espesor. Se utilizaron membranas de ultrafiltración de polietersulfona (PES) de 10 kDa y de Celulosa Regenerada (RC) de 1 kDa.

La fase móvil empleada se ha ido variando a lo largo de los diferentes análisis que se han realizado con el objetivo de optimizar el proceso lo más posible. Se estudiaron distintos tipos programas de flujo perpendicular (*crossflow*) para aumentar la separación de las NPs. En la siguiente tabla se resume el programa óptimo seleccionado. Se usó un loop de inyección de 20 μ L. El eluyente se dirige desde el canal hasta los detectores utilizados, UV-vis y de fluorescencia.

4. Resultados y discusión

4.1. Síntesis de Carbon Quantum Dots

En esta investigación se propone una síntesis de CQDs mediante tratamiento con sonda de ultrasonido. Se debe destacar que la mayoría de las síntesis de este tipo de NPs con esta técnica emplea tiempos muy elevados (2-24h), mientras que aquí se propone una síntesis de los mismos en 30 minutos.

Se elige un tiempo de 30 minutos gracias a las características de la sonda de ultrasonidos utilizada, ya que esta tiene una potencia de 500 W, por otro lado, en esta síntesis los volúmenes utilizados para la preparación de los CQDs eran más bajos que los utilizados en otras publicaciones, reduciendo por lo tanto el tiempo de síntesis.

Los precursores orgánicos empleados han sido los siguientes: Glucosa y Sacarosa.

Los medios empleados para la formación de las CNPs fueron: NH_3 , NaOH y HCl.

El proceso de formación de los CQDs es el que sigue: Tras la preparación de las disoluciones explicadas en el apartado “**Parte Experimental**” de la presente Memoria, todas las disoluciones son introducidas en la sonda de ultrasonido.

Inicialmente todas las disoluciones son incoloras y transparentes, sin embargo, con el aumento del tiempo de reacción las disoluciones van adquiriendo diferentes colores: las de NH_3 adquieren una tonalidad amarillas y, las de NaOH y HCl se vuelven marrón oscuras. Debido a la sonicación, se alternan periodos de altas presiones y bajas presiones, llevando a la formación de pequeñas burbujas de vacío que provoca la polimerización de los precursores orgánicos, la carbonización y finalmente la formación de los CQDs. En el caso de las dopadas con nitrógeno, durante la etapa de carbonización de los carbohidratos, las NPs son dopadas con nitrógeno provocando un aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia.

Se debe destacar que, con el objetivo de obtener información comparable, se utilizó la misma cantidad de muestra de CQDs de los dos precursores orgánicos en cada medio y así poder seleccionar aquellos que mejores propiedades presentan.

Tras los tratamientos ultrasónicos oportunos y las medidas de fluorescencia y absorbancia, los espectros obtenidos para las diferentes síntesis de CQDs, tanto los obtenidos a partir de glucosa como los obtenidos a partir de sacarosa, son los que se recogen en el apartado “**Anexos**” de este proyecto.

A partir de los espectros de excitación y de emisión de fluorescencia tanto de los CQDs obtenidos con sacarosa y con glucosa, se pueden deducir las siguientes conclusiones.

Las intensidades máximas de emisión de los espectros obtenidos con los CQDs sintetizados a partir de sacarosa son más bajas que las correspondientes a los sintetizados a partir de glucosa. Probablemente el tiempo empleado en la formación de los CQDs a partir de una disolución de glucosa (30 min.) no ha sido suficiente para generar los CQDs a partir de una disolución de sacarosa. Por ello, se seleccionó la glucosa como precursor de los CQDs.

De los espectros de los CQDs obtenidos a partir de glucosa se pueden establecer sus $\lambda_{\text{excitación}}$ y $\lambda_{\text{emisión}}$.

Tabla 2. Longitudes de onda de máxima excitación y máxima emisión de los CQDs de glucosa.

Muestra	$\lambda_{\text{excitación}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emisión}}$ (nm)
CQDs (Glucosa + HCl)	400	460
CQDs (Glucosa + NaOH)	400	460
N-CQDs (Glucosa + NH ₃)	315	390 y 755

En vista a que, con el transcurso de los días, las disoluciones preparadas para los blancos fueron adquiriendo color, se decidió estudiar también los “**posibles N-CQDs**” obtenidos sin tratamiento con ultrasonido en medio amoniacal a partir de glucosa y así poder comparar las diferencias entre la síntesis mediante ultrasonido y sin éste.

Tabla 3. Longitudes de onda de máxima excitación y máxima emisión de los N-CQDs obtenidos sin ultrasonido.

Muestra sin ultrasonido	$\lambda_{\text{excitación}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emisión}}$ (nm)
N-CQDs (Glucosa + NH ₃)	315	390 y 755

Los espectros obtenidos para los **N-CQDs sin tratamiento con ultrasonido** se encuentran recogidos en el apartado “**Anexos**”. Si son comparados con los N-CQDs sintetizados mediante sonda de ultrasonidos se puede apreciar como la intensidad máxima de emisión de fluorescencia es mucho menor en los N-CQDs obtenidos sin tratamiento con ultrasonidos. Además, si se observan las bandas de ambos N-CQDs, se puede ver como los tratados ultrasónicamente presentan bandas mucho más limpias y definidas que sus correspondientes sin ultrasonido.

Estudiando en los distintos espectros obtenidos, tanto las intensidades máximas de fluorescencia como la forma de las bandas, se eligen para los posteriores estudios:

- 1. N-CQDs.** Obtenidos a partir de Glucosa y NH₃ con tratamiento de ultrasonido.
- 2. N-CQDs.** Obtenidos a partir de Glucosa y NH₃ sin tratamiento de ultrasonido.
- 3. CQDs sin dopar.** Obtenidos a partir de Glucosa y NaOH con tratamiento de ultrasonido.

Se ha decidido descartar los CQDs obtenidos a partir de ácido clorhídrico debido a la reducida estabilidad que presentaban. Se observó que con el transcurso de los días se iban formando precipitados viscosos..

Además, como ya se ha descrito previamente, el objetivo de este proyecto es estudiar posibles NPs que se puedan usar aplicaciones bioanalíticas. En este sentido los CQDs preparados en medios fuertemente ácido resultan poco útiles a la hora de llevar a cabo posibles futuras bioconjugaciones..

Para facilitar la interpretación de los resultados de la caracterización de los CQDs, éstos se encuentran divididos en dos apartados: **4.2. Caracterización de Carbon**

Quantum Dots de distinta naturaleza y 4.3. Caracterización específica de Carbon Quantum Dots dopados con nitrógeno.

4.2. Caracterización de los Carbon Quantum Dots

4.2.1. Efecto del pH en la intensidad de emisión de fluorescencia

Se estudió la emisión de fluorescencia de los CQDs en una disolución de PBS a diferentes pHs, con el objetivo de averiguar a qué pH la emisión era mayor.

Los espectros obtenidos así como las tendencias de la variación del pH en los N-CQDs, los CQDs sin dopar y los N-CQDs sin tratamiento con ultrasonidos se encuentran en el apartado “**Anexos**” de este documento.

Como se puede ver en los resultados obtenidos, las máximas intensidades de emisión de fluorescencia muestran un aumento progresivo hacia pHs básicos.

Tabla 4. pH de máxima emisión de cada tipo de CQDs sintetizados.

Muestra	pH
CQDs sin dopar	11
N-CQDs tras ultrasonido	11
N-CQDs sin ultrasonido	9

4.2.2. Estudio de fotoestabilidad

Tal como se recoge en el apartado “**Procedimiento Experimental**” de este proyecto, el estudio de fotoestabilidad duró cuatro semanas.

Los resultados obtenidos a lo largo de este estudio han sido los siguientes:

a. Fotoestabilidad de N-CQDs tras tratamiento con ultrasonido.

Debido a que los N-CQDs muestran dos bandas de máxima emisión de fluorescencia, el estudio de fotoestabilidad se ha realizado para cada banda de máxima emisión.

Los resultados obtenidos para la banda de $\lambda_{em}=390$ nm se muestran a continuación, mientras que los correspondientes a la banda de $\lambda_{em}=755$ nm se encuentran en el apartado “Anexos”.

a.1. Fotoestabilidad de los N-CQDs ($\lambda=390$ nm)

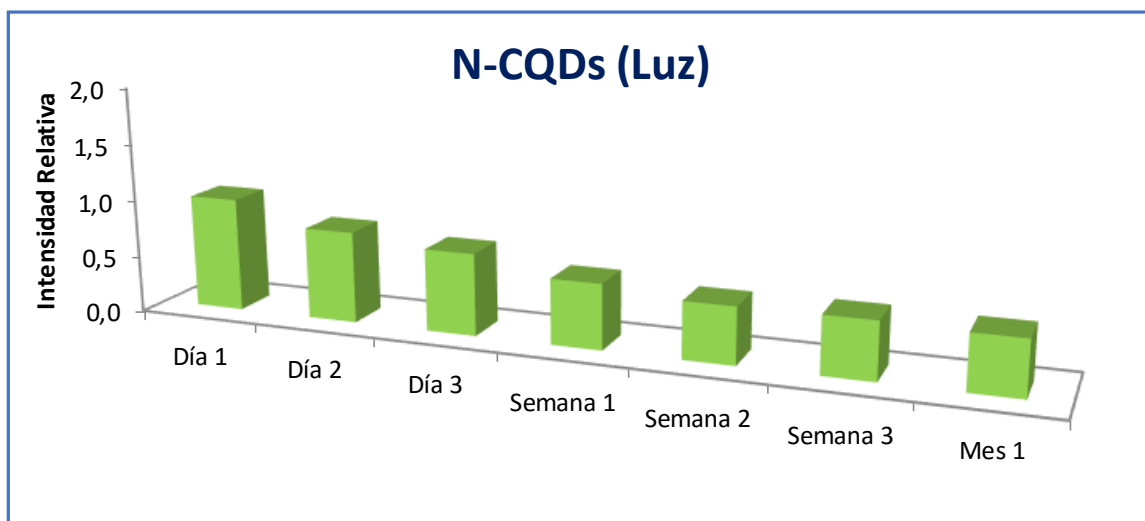


Figura 13. Estudio de fotoestabilidad de los N-CQDs expuestos a luz natural

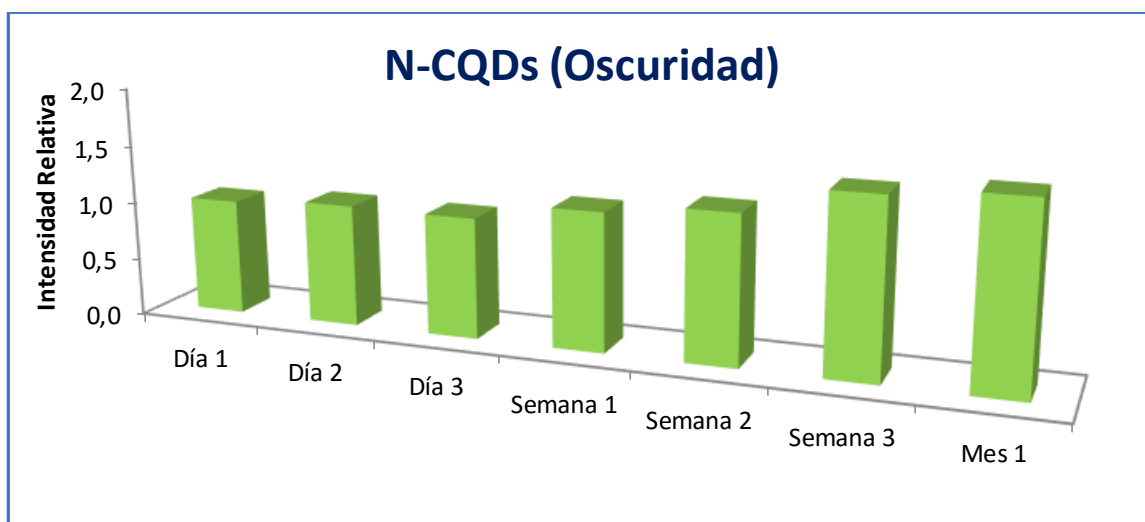


Figura 14. Estudio de fotoestabilidad de los N-CQDs reservados en oscuridad.

Los resultados obtenidos del estudio de fotoestabilidad tanto para los CQDs sin dopar como para los N-CQDs sin tratamiento con ultrasonidos se encuentran en el apartado “**Anexos**” de este documento.

El estudio llevado a cabo durante las 4 semanas ha permitido comprobar la estabilidad de los CQDs a lo largo del tiempo. Se pueden ver dos diferencias muy significativas en todos los CQDs estudiados:

1. Los CQDs expuestos a la luz muestran un claro descenso de la Intensidad Relativa de fluorescencia con el tiempo. Este hecho puede ser debido a una degradación de las NPs como consecuencia de la radiación.

2. Los CQDs que se encuentran guardados en viales opacos en la oscuridad presentan un aumento de la Intensidad Relativa de Fluorescencia a lo largo de las 4 semanas. Puede ser debido a que el tiempo de ultrasonidos empleado no haya sido suficiente para lograr que la reacción se complete y por ello, con el paso del tiempo, se siguen formando NPs. Otra explicación que podría dar lugar a este hecho es el suavizado de la superficie de las NPs y la eliminación, por tanto, de defectos de superficie llevando a un aumento de la Intensidad Relativa de Fluorescencia.

4.2.3. Fotoactivación

Este estudio se divide en dos partes:

a. *Monitorización continua de la fluorescencia de las NPs de carbonodurante 2 h (Time drive)Time Drive*

Se recogió la señal a la longitud de onda de máxima emisión (λ_{em}) de forma continua durante dos horas para las tres muestras de CQDs.

a.1. N-CQDs ($\lambda_{em}=390$ nm)

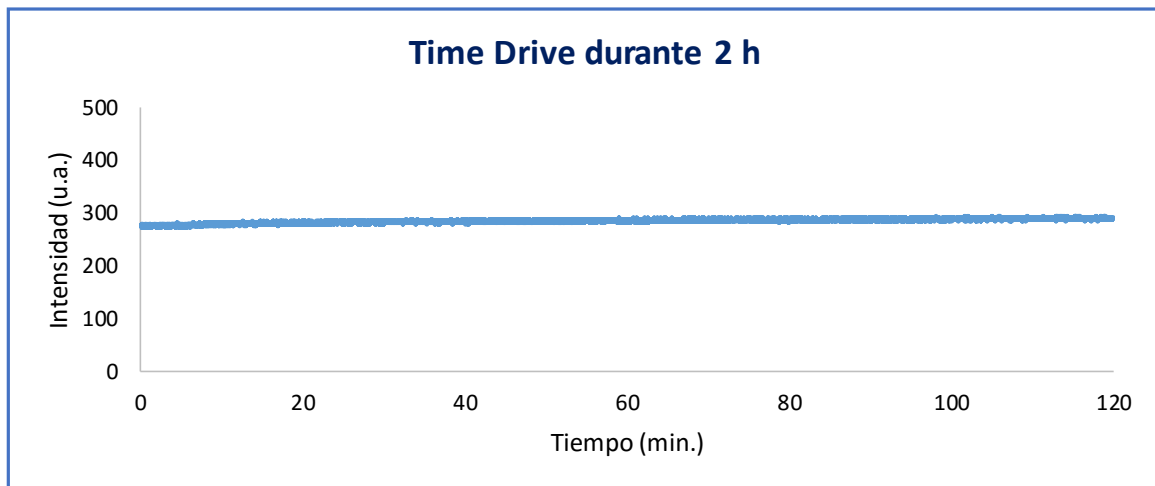


Figura 15. Time Drive de los N-CQDs ($\lambda_{em}=390$ nm).

La gráfica muestra que la estabilidad de los N-CQDs es muy elevada ya que prácticamente no hay fotodegradación tras dos horas de ensayo (no hay variaciones significativas de la emisión fotoluminiscente tras mantener la muestra irradiada con radiación VIS-UV durante dos horas)

b. Recogida de espectros durante 1 h.

b.1. N-CQDs

Los resultados obtenidos para los N-CQDs son los siguientes:

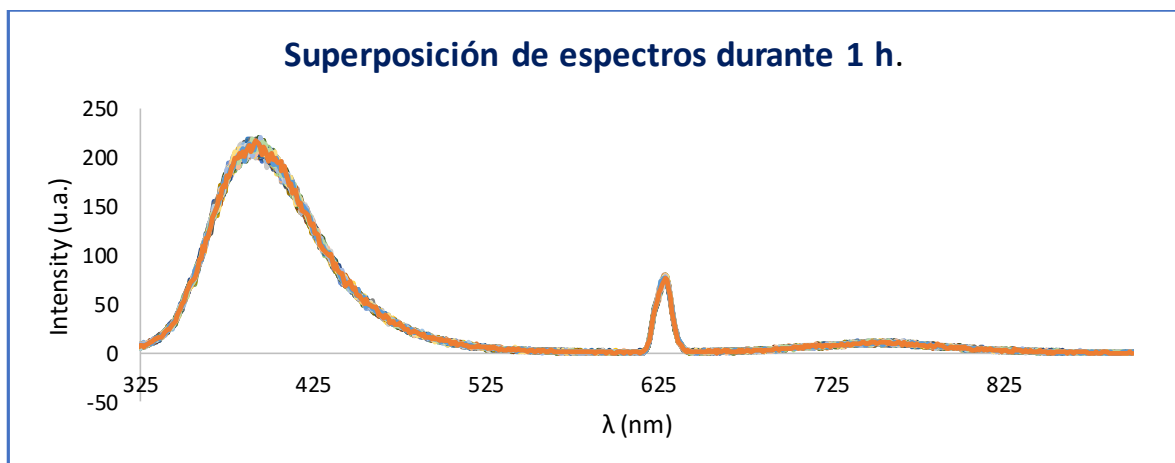


Figura 16. Espectros obtenidos para N-CQDs durante 1h. cada 60 segundos.

De nuevo, no se observan modificaciones significativas en los espectros de luminiscencia de los CQDs con el tiempo (ni en los perfiles ni en las intensidades de las bandas observadas) por lo que se confirma la elevada estabilidad de las NPs sintetizadas.

Los resultados obtenidos del estudio de fotoestabilidad para los **CQDs sin dopar**, los **N-CQDs ($\lambda_{em}=755$ nm)** y los **N-CQDs sin tratamiento con ultrasonidos** se encuentran en el apartado “**Anexos**”.

Una vez realizados ambos ensayos, se puede concluir que la estabilidad de los distintos tipos de CQDs sintetizados es elevada ya que no presentan efectos de fotodegradación.

4.3. Caracterización específica de Carbon Quantum Dots dopados con nitrógeno

Tras haber realizado diversos ensayos sobre los diferentes tipos de CQDs en diferentes medios, se ha decidido que, ya que los N-CQDs son aquellas NPs que presentan mayor intensidad de fluorescencia sean los elegidos para una caracterización más detallada.

4.3.1. Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución

Con el objetivo de profundizar en la caracterización de las N-CQDs, en primer lugar, se utilizó la microscopía electrónica de transmisión. Esta técnica permitió visualizar los CQDs y además calcular el tamaño de los mismos.

En la **Figura 17. A)** se pueden apreciar las CNPs. A juzgar por la imagen se ha considerado que dichas NPs se encontraban formando agregados. En el histograma representado en la **Figura 17. B)** muestra una población de NPs cuyo 40% tiene un tamaño medio de 3 nm. Según los resultados obtenidos mediante HRTEM, se obtiene que los CQDs presentan una forma esférica con un tamaño promedio de $3,0 \pm 0,3$ nm.

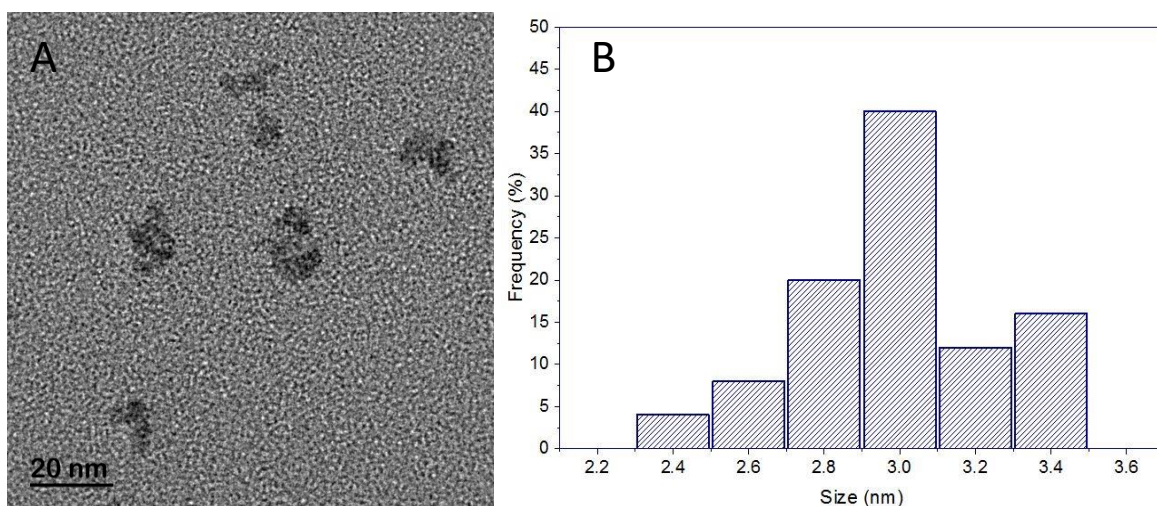


Figura 17. A) Imagen obtenida mediante HRTEM de los N-CQDs. B) Histograma que representa el porcentaje de los tamaños de las NPs obtenidas.

4.3.2. Purificación de los Carbon Quantum Dots dopados con Nitrógeno

Con el objetivo de eliminar impurezas y sustancias indeseables que pudieran generar resultados erróneos en las medidas de fluorescencia se ha llevado a cabo la purificación de los N-CQDs. Para ello, se utilizaron dos vías diferentes con el objetivo de seleccionar la más adecuada:

- a. Purificación mediante **diálisis con membrana de cut-off de 2kDa (MWCO)**.
- b. Purificación usando **ultracentrifugación mediante el empleo de Amicones cuyo cut-off es de 3 kDa (MWCO)**.

Una vez purificadas mediante ambos métodos, los N-CQDs son estudiados mediante sus espectros de emisión de fluorescencia. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

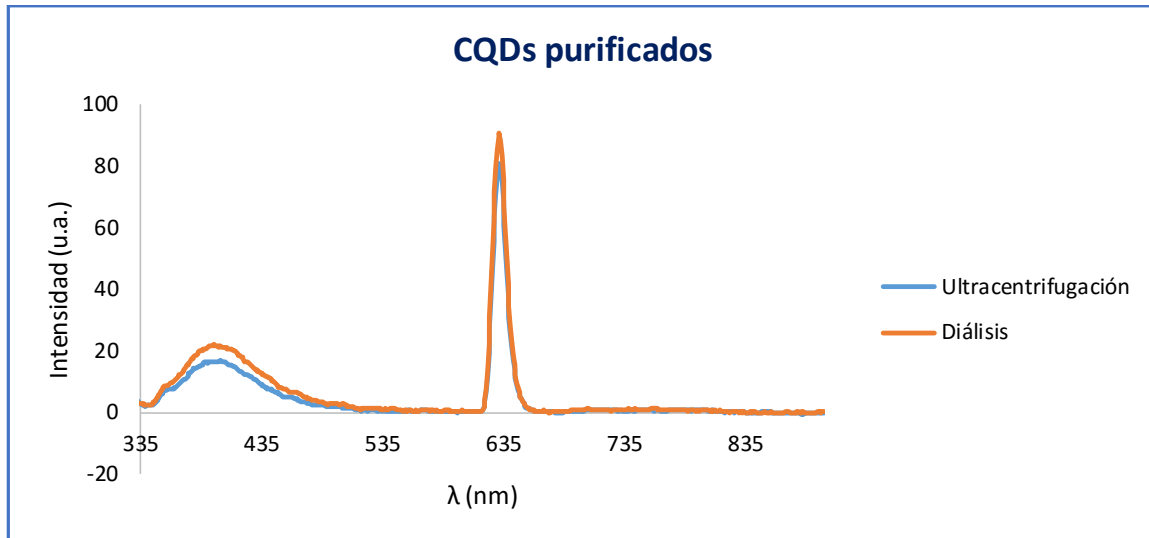


Figura 18. Comparación de los espectros de emisión de fluorescencia de los N-CQDs tras purificación mediante ultracentrifugación y mediante diálisis.

Los resultados muestran un pequeño incremento en la intensidad de emisión de fluorescencia de las muestras conteniendo N-CQDs tras purificación mediante diálisis. Esto podría explicar las predicciones teóricas ya que, para diálisis se utiliza una membrana con un tamaño de poro más pequeño que la utilizada con amicones, por lo que previsiblemente el número de NPs que se pierden a través de la membrana es menor.

4.3.3. Rendimiento Cuántico de Fluorescencia

Haciendo uso de la ecuación (1) del apartado “**Procedimiento Experimental**” de este trabajo, se calculó el rendimiento cuántico de: **CQDs sin dopar** (sintetizados a partir de glucosa y NaOH), **N-CQDs** (sin tratamiento con ultrasonidos), **N-CQDs** (con tratamiento con ultrasonido y sin purificar) y de los dos tipos de **N-CQDs purificados**.

Tabla 5. Rendimiento Cuántico obtenido para cada tipo de CQDs obtenidos.

Tipos de nanopartículas	Rendimiento cuántico (%)
CQDs sin dopar	3,68

N-CQDs (sin tratamiento con ultrasonido)	3,15
N-CQDs (sin purificar)	6,53
N-CQDs (purificados con diálisis)	6,65
N-CQDs (purificados con amicones)	5,78

Tras estudiar el rendimiento cuántico de todos los CQDs sintetizados y tratados, se puede concluir que los que mayor rendimiento cuántico tienen son los N-CQDs tras purificación mediante diálisis, ya que cuando éstos son purificados mediante amicones, el rendimiento cuántico disminuye. Probablemente lo que ocurre es que, en el caso de los amicones, la purificación es menos eficaz, quedando restos de precursores que no han reaccionado o subproductos de la síntesis que hacen que la relación fotones emitidos/absorbidos disminuya y por tanto, también el rendimiento cuántico. Además, como consecuencia del tamaño de poro, podría existir más pérdida de NPs al realizar la purificación mediante amicones. Los resultados experimentales concuerdan efectivamente con los resultados precedidos teóricamente.

4.3.4. Dispersión Dinámica de la luz y Análisis de seguimiento de Nanopartículas

Los resultados obtenidos tras ambas técnicas no permitieron generar conclusiones coherentes. Por un lado, tras analizar las muestras de N-CQDs por DLS, los resultados generados por el sistema no poseían la calidad óptima para poder considerar adecuadamente los mismos. Esto pudo ser debido a que la fluorescencia de los N-CQDs es tan elevada que la luz dispersada se mezcla con la radiación procedente de las NPs generando resultados erróneos en la medida de dispersión de luz. Además, indicaba que la mayor parte de las NPs obtenidas tenían un tamaño de 100 nm, mientras que los resultados obtenidos por HRTEM indicaban NPs entre 1-10 nm. Por ello con el objetivo de profundizar más a cerca de la caracterización se hará uso de la AF4.

Por su parte, el NTA presentó el mismo problema, elevada fluorescencia que generaba resultados erróneos. No se pudo obtener resultados acerca de la concentración de los CQDs en las muestras ya que tras el análisis con NTA se pudo ver que la señal generada era demasiado baja, lo que indicaba una concentración excesivamente baja de las NPs, generando, por tanto, resultados también erróneos y poco representativos.

4.3.5. Fraccionamiento en flujo a través de campo de flujo asimétrico: estudio de la pureza de las NPs de Carbono

Para profundizar más acerca de la caracterización de las NPs se utilizó AF4, con el objeto de obtener información acerca del tamaño de las mismas y distribución de posibles poblaciones de tamaños. Los detectores utilizados en esta técnica han sido UV-VIS y de fluorescencia.

Debido a que no existe ninguna publicación o estudio previo en la que se utilice AF4 como técnica para caracterizar CQDs, el proceso de optimización ha sido muy laborioso debido a que existen diversos parámetros que hay que optimizar.

Además, se debe destacar que, aunque no existen interacciones físicas entre las NPs y las membranas utilizadas, podrían existir ciertas interacciones electrostáticas, pues las membranas utilizadas tienen una carga neta superficial negativa al pH utilizado. Éste, es otro factor que se debe controlar con minuciosidad y por ello se han tenido que usar dos membranas diferentes con el objetivo de obtener los mejores resultados posibles.

Tal y como se recoge en el apartado “**Procedimiento Experimental**”, se han utilizado 0,2 mL/min. de flujo de inyección (*injection flow*), 3 min. tiempo de inyección (*injection time*), 1 min. de tiempo de transición (*transition time*) y 0,5 mL/min de flujo del detector (*detector flow*).

Posteriormente, para llevar a cabo las medidas se han elaborado diferentes programas de trabajo con distintas rampas usando diferentes flujos perpendiculares (*cross flow*). Éste es el parámetro clave en esta técnica y tal como se podrá ver a continuación, ha influido mucho en los estudios realizados, sobre todo en las recuperaciones obtenidas (*Recovery*).

Tabla 6. Ejemplo de uno de los métodos de inyección y de cross flow utilizados para las medidas de fraccionamiento en flujo mediante campo asimétrico (AF4) con un flujo a la salida del detector de 0,5 mL/min.

Programa de separación de Carbon Quantum Dots			
Etapa del programa	Tiempo (min)		Crossflow, Vc, mL/min.
Inyección/focalización	3	Flujo de Inyección, 0.2 mL/min	2
Tiempo de transición	1		
Separación	5	Constante	2
	5	Caída lineal	2 a 0
	1	Constante	0

Para obtener información sobre si durante el proceso de separación se producen pérdidas de N-CQDs a través de los poros de la membrana o retenciones de las NPs dentro del canal, se estudian las recuperaciones en cada ensayo realizado. Éstas se calculan de la siguiente manera: se inyecta la muestra que se pretende estudiar, pero, en este caso no se aplica cross flow para provocar que todo lo que se inyecta, llegue al detector. El procedimiento operativo es semejante a un Análisis por Inyección en Flujo (FIA). Posteriormente, se inyecta la muestra aplicando esta vez un cross flow determinado. Al aplicar cross flow, se puede producir que los N-CQDs se pierdan a través de los poros de la membrana o que éstos queden más retenidos en las membranas utilizadas, llegando por tanto menos muestra al detector. Finalmente calculando la relación de las áreas obtenidas tanto con fross flow como sin éste, se obtienen las recuperaciones de cada estudio.

La composición de la fase móvil es uno de los parámetros más importantes y flexibles en AF4, y debe ser elegido para asegurar la compatibilidad con el analito y mejorar el proceso llevado a cabo. Las propiedades de la fase móvil (composición, fuerza iónica, pH) directamente influyen en la doble capa de las NPs y la superficie de la membrana. Por ello, para membranas y NPs cargadas, se necesita una fase móvil con mayor fuerza iónica que compense el espesor de la doble capa permitiendo que los analitos se acerquen más a la superficie de la membrana, quedando más retenidos. Por

este motivo a lo largo de las pruebas realizadas, se han utilizado distintas concentraciones de acetato de amonio ($C_2H_3O_2NH_4$) y NaCl, con el objetivo de aumentar la fuerza iónica.

Por otro lado, sabiendo que los N-CQDs y las membranas utilizadas poseen carga superficial negativa a pHs negativos se piensa que es probable que existan ciertas interacciones electrostáticas entre las NPs y la membrana. Con el objetivo de minimizar en la medida de lo posibles tales interacciones, se deciden estudiar diferentes concentraciones de surfactante, dodecilsulfato sódico (SDS), en la fase móvil. El surfactante forma micelas alrededor de las NPs, haciendo que éstas difundan al centro del canal, minimizando las interacciones electrostáticas.

Debido a las propiedades que presentan las NPs y la membrana, en los distintos ensayos se han utilizado distintas concentraciones de sales y surfactantes, con el objetivo de optimizar el proceso de separación de la mejor manera posible.

a. Estudio de optimización 1

En primer lugar, se usó una membrana de Celulosa Regenerada (RC) con un tamaño de 10 kDa utilizando como fase móvil una disolución de 10 mM de acetato de amonio y 0,01 % de SDS en H_2O ultrapura, a pH 7,4. El cross flow que se ha utilizado ha sido de 1 mL/min.

El fractograma resultante es el que aparece a en el apartado “**Anexos**” de esta Memoria.

A la vista de los resultados se puede apreciar que no hay separación alguna entre el void peak (pico que se genera como consecuencia de un cambio de presión al aumentar el tip flow y disminuir el focus flow, haciendo que las especies no focalizadas correctamente eluyan sin ser retenidas por acción del flujo aplicado) y las NPs.

Con el objetivo de aumentar la separación entre el void peak y la muestra, se aumenta el flujo perpendicular, ya que al aumentar éste, los N-CQDs podrían quedar más retenidos sobre la membrana, aumentando así la separación con respecto al void peak. Sin embargo, no se ha conseguido llevar a cabo la separación a pesar de aumentar el cross flow.

Por otro lado, lo que sí se ha podido observar es que, a medida que el cross flow aumentaba, se obtenían menores recuperaciones (3-10%). Por ello, se ha pensado que el tamaño de las NPs podría ser tan pequeño que éstas se pierden a través del poro de la membrana utilizada.

Hay que destacar también que, ya que la parte de muestra que llega a los detectores es muy pequeña y las NPs eluyen junto al void peak, se dedujo que podía ser debido a que los N-CQDs prácticamente no quedaban retenidos con la membrana. El surfactante, tal como se ha explicado, forma micelas y provoca que las NPs difundan al centro del canal

Con el objetivo de mejorar los resultados se ha realizado el **Estudio de Optimización 2**.

b. Estudio de optimización 2

Para intentar minimizar la posible pérdida de NPs a través de membrana, se ha optado por cambiar la utilizada anteriormente por otra, cuyo tamaño de poro fuera más pequeño. Se elige, por tanto, una membrana de Polietersulfona (PES) de 1 kDa.

En este estudio se ha usado una fase móvil con 0,01 % de SDS en H₂O ultrapura, utilizando diferentes tipos de cross flow con el objetivo de intentar separar los N-CQDs del void peak y además obtener así los mejores recoveries posibles.

Los fractogramas correspondientes a la prueba 2, se encuentran en el apartado “Anexos”.

Tabla 7. Cross Flows utilizados y Recoveries obtenidos en cada ensayo.

Cross Flow (mL/min.)	Recovery (%)
1	70
2	35

Se puede ver como mejoran las recuperaciones obtenidas. Con esta membrana parece que el número de NPs que se pierden es menor que con la utilizada en el primer estudio. Sin embargo, en vista al fractograma resultante, se puede decir que las NPs prácticamente no interaccionan de nuevo con la membrana y éstas vuelven a eluir con el void peak.

c. Estudio de optimización 3

Buscando un aumento de la retención de las NPs en la membrana para intentar que los N-CQDs se separaran del void peak, se decide cambiar la composición de la fase móvil en este estudio aumentando la fuerza iónica de la disolución. Por ello se empleó una disolución portadora de 100 mM de acetato de amonio ($C_2H_3O_2NH_4$) en H_2O ultrapura a pH 9. La membrana utilizada fue la de PES de 1kDa, ya que con ésta se obtuvieron muchos mejores recuperaciones, tal como se muestra en el estudio 2.

Los fractogramas resultantes se encuentran en el apartado “**Anexos**”.

Tabla 8. Cross Flows utilizados y Recoveries obtenidos en cada ensayo

Cross Flow (mL/min.)	Recovery (%)
1	10
3	1

En vista a los resultados, se ha observado que no hay separación alguna, la muestra sale junto con el void peak también en este ensayo. De nuevo, se puede ver que, al aumentar el cross flow, el recovery disminuye hasta un 1%, lo que podría ser debido a pérdida de NPs a través de membrana o a que las NPs se pegan en este caso demasiado a la membrana llegando a no salir del canal como consecuencia del aumento de la fuerza iónica.

d. Estudio de optimización 4

Por último, se decide cambiar la fuerza iónica de la fase móvil. Para ello se ha utilizado una disolución 180 mM NaCl en H₂O ultrapura.

Los fractogramas resultantes al estudio 3, se encuentran en el apartado “**Anexos**” de este trabajo.

Tabla 9. Cross Flows utilizados y Recoveries obtenidos en cada ensayo

Cross Flow (mL/min.)	Recovery
2	40
1	45

Las recuperaciones obtenidas mejoran con respecto a los utilizados en el estudio previo, sin embargo hacen pensar que las NPs se hayan podido quedar pegadas en el canal como consecuencia del aumento de la fuerza iónica. No se ha observado separación alguna entre el void peak y los N-CQDs.

5. Conclusiones

Las principales conclusiones que se pueden extraer del presente Trabajo Fin de Máster se recogen a continuación:

1. Se ha realizado la síntesis de Carbon Quantum Dots de manera satisfactoria:
 - a) Tras haber realizado dos síntesis de las NPs a partir de dos precursores orgánicos distintos, se seleccionan los obtenidos a partir de glucosa al dar lugar este procedimiento de síntesis a NPs de carbono con mayor rendimiento cuántico.
 - b) Para conseguir obtener CQDs a partir de sacarosa se necesitan mayores tiempos de sonicación.
 - c) Se ha realizado la caracterización de los CQDs mediante el estudio de sus propiedades fotoluminiscentes obteniendo las longitudes de onda óptimas de excitación para observar correctamente las bandas de emisión de los distintos tipos de CQDs, estableciéndose como par de excitación/emisión óptimo: N-CQDs (315/390 nm), CQDs sin dopar (400/460 nm).
 - d) Se han realizado estudios de estabilidad, comprobando que los CQDs son estables en medios básicos, con respecto al tiempo y con respecto a la luz.
 - e) Se ha realizado también un estudio de su morfología mediante la técnica HRTEM obteniéndose que los CQDs presentan una forma esférica y un tamaño promedio de $3,0 \pm 0,3$ nm.
 - f) Tras los estudios de caracterización mediante AF4, se concluye que el tamaño de las NPs es tan pequeño que ha sido imposible la separación de los CQDs con respecto al void peak ya que prácticamente no existía interacción de las NPs con la membrana. Es necesario un estudio más a fondo, utilizando diferentes tipos de fases móviles para mejorar el proceso de separación. Por otro lado, de entre los ensayos realizados, aquel con el que se ha obtenido una mayor recuperación ha sido el procedimiento que hace uso de una membrana de 1 kDa utilizando una disolución acuosa SDS al 0,01 % (100 mM) obteniendo una recuperación del 70 %.

6. Trabajos futuros

Como trabajos futuros en esta línea de investigación se podrían destacar los siguientes aspectos:

6.1. Puesta en marcha de un inmunoensayo fotoluminiscente

Los inmunoensayos son tests bioquímicos que miden la presencia o concentración de una molécula en una solución a través del uso de un Ab o un antígeno (Ag). La molécula detectada en el inmunoensayo recibe el nombre de analito, el cual puede corresponder con diferentes tipos de moléculas de diferentes tamaños y tipos, mientras que el correspondiente Ab tenga las propiedades adecuadas para llevar a cabo el inmunoensayo.

En inmunoensayos clínicos, las NPs son generalmente empleadas ya que éstas presentan una elevada eficacia en la inmovilización de biomoléculas. Además, debido a las propiedades que las NPs presentan, pueden ser empleadas para el marcaje de moléculas biológicas y así generar una amplificación de la señal detectable, relacionando ésta posteriormente con la concentración de analito en la muestra [32].

Existen diferentes tipos de inmunoensayos basados en el uso de NPs. Entre ellos se destacan: inmunoensayos electroquímicos, inmunoensayos ópticos, inmunoensayos sensibles a la masa e inmunoensayos colorimétricos [33].

Como se ha explicado con antelación, las propiedades luminiscentes de los CQDs hacen que este tipo de NPs puedan llegar a ser utilizadas en inmunoensayos ópticos, los cuales comprenden: fluorescencia, quimioluminiscencia, electroquimioluminiscencia, resonancia de plasmón superficial y espectroscopía Raman.

Debido a las propiedades fluorescentes que este tipo de NPs poseen y que se cree que poseen elevada biocompatibilidad, cabe esperar que se puedan aplicar satisfactoriamente en inmunoensayos luminiscentes, concretamente en inmunoensayos fluorescentes o fluoroinmunoensayos.

En este tipo de inmunoensayos se utiliza la fluorescencia como metodología de medida de la reacción de reconocimiento Ag-Ab. Los fluoroinmunoensayos son uno de

los más comunes dentro del campo de los biosensores ópticos. Combinan la elevada sensibilidad de la fluorescencia con la selectividad de los inmunoensayos [33].

Sin embargo, el empleo de CQDs en inmunoensayos luminiscentes no está todavía muy explotado, por ello, la continuación furua de este trabajo es profundizar en el uso de estas NPs novedosas en fluoroinmunoensayos.

6.2. Caracterización de las NPs por fraccionamiento en flujo a través de campo de flujo asimétrico (AF4)

Los resultados obtenidos mediante AF4 en este Trabajo Fin de Máster muestran que es necesario un estudio más a fondo para optimizar el proceso de separación.

Por tanto, otra de las líneas de investigación por explotar en el futuro, es la optimización de dicho proceso, mediante el empleo de diferentes membranas y fases móviles.

Además, como se ha descrito anteriormente, una de las causas por las que el proceso de separación no ha sido satisfactorio puede ser debido al pequeño tamaño que las NPs presentan. Por ello, se buscará el recubrimiento de las NPs con polímeros que permitan aumentar el tamaño de las mismas y así posibilitar su estudio mediante AF4.

7. Bibliografía

- [1] R. P. Feynman, There's plenty of room at the bottom. *Caltech Engineering and Science*, 1960. **23**, 5: 22-36.
- [2] H. Brune, H. Ernst, A. Grunwald, W. Grünwald, H. Hofmann, H. Krug, P. Janich, M. Mayor, W. Rathgeber, G. Schmid, U. Simon V. Vogel, D. Wyrwa, F. Wütscher. *Nanotechnology: Assesment and Perspectives*; Springer: Berlin, Alemania, 2006.
- [3] E. K. Drexler; M. Minsky, *Engines of Creation. The Coming Era of Nanotechnology*, 1986: 171-190.
- [4] C. N. R. Rao; A. Müller; A. K. Cheetham, *The chemistry of Nanomaterials*, 2004, **2**: 15-17.
- [5] K. L. Kelly; E. Coronado; L. L. Zhao; G.C. SCHATZ, The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003, **107**, 3: 668-677.
- [6] J. M. Frechet, Functional polymers and dendrimers: reactivity, molecular architecture, and interfacial energy. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition-including Guide to Scientific Information*, 1994, **263**, 5154: 1710-1714.
- [7] J. C. E. da Silva; H. M. Gonçalves, Analytical and bioanalytical applications of carbon dots. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, **30**, 8: 1327-1336.
- [8] W. C. Chan; S. Nie, Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 1998, **281**, 5385, 2016-2018
- [9] M. Bruchez; M. Moronne; P. Gin; S. Weiss; A. P. Alivisatos, Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 1998, **281**, 5385, 2013-2016.
- [10] B. H. Juárez, Nanopartículas semiconductoras coloidales y aplicaciones. *Anales de Química*, 2011, **107**, 3.

-
- [11] F. Wang; W. B. Tan; Y. Zhang; X. Fan; M. Wang, Luminescent nanomaterials for biological labelling. *Nanotechnology*, 2005, **17**, 1: R1.
- [12] K. M. Tsoi; Q. Dai; B. A. Alman; W. C. Chan, Are quantum dots toxic? Exploring the discrepancy between cell culture and animal studies. *Accounts of chemical research*, 2012, **46**, 3: 662-671.
- [13] Y. Wang; A. Hu, Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications. *Journal of Materials Chemistry C*, 2014, **2**, 34: 6921-6939.
- [14] Y. P. Sun; P. Wang; Z. Lu; F. Yang; M. J. Meziani; G. E. LeCroy; Y. Liu; H. Qian, Host-Guest Carbon Dots for Enhanced Optical Properties and Beyond. *Scientific reports*, 2015, **5**.
- [15] A. Kundu; S. Nandi; P. Das; A.K. Nandi, Facile and green approach to prepare fluorescent carbon dots: Emergent nanomaterial for cell imaging and detection of vitamin B 2. *Journal of colloid and interface science*, 2016, **468**: 276-283.
- [16] S. Zhu; y. Song; X. Zhao; J. Shao; J. Zhang; B. Yang, The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective. *Nao Research*, 2015, **8**, 2: 355-381.
- [17] D. A. Skoog; D. M. West, Principles of instrumental analysis. *Philadelphia: Saunders College*, 1980, **158**: 760-766.
- [18] H. H. Jaffe; A. L. Miller, The fates of electronic excitation energy. *J. Chem. Educ*, 1966, **43**, 9: 469.
- [19] E. B. Pirestley; A. Haug, Phosphorescence spectrum of pure crystalline naphthalene. *The Journal of Chemical Physics*, 1968, **49**, 2: 622-629.
- [20] H. Li; X. He; Z. Kang; H. Huang; Y. Liu; J. Liu; S. Lian; C. H. A. Tsang; X. Yang; S. Lee, Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, **49**, 26: 4430-4434.
- [21] S. K. Bhunia; A. Saha; A. R. Maity; S. C. Ray; N. R. Jana, Carbon nanoparticle-based fluorescent bioimaging probes. *Scientific reports*, 2013, **3**.
-

-
- [22] A. Cayuela; C. Carrillo-Carrión; M. L. Soriano; W. J. Parak; M. Valcárcel, One-step synthesis and characterization of N-doped carbon nanodots for sensing in organic media. *Analytical chemistry*, 2016, **88**, 6: 3178-3185.
- [23] Y. Dong; H. Pang; H. B. Yang; C. Guo; J. Shao; Y. Chi; C. M. Li; T. Yu, Carbon-Based Dots Co-doped with Nitrogen and Sulfur for High Quantum Yield and Excitation-Independent Emission. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, **52**, 30: 7800-7804.
- [24] H. Li; X. He; Y. Liu; H. Huang; S. Lian; S. T. Lee, Z. Kang, One-step ultrasonic synthesis of water-soluble carbon nanoparticles with excellent photoluminescent properties. *Carbon*, 2011, **49**, 2: 605-609.
- [25] T.J. Mason, Ultrasound in synthetic organic chemistry. *Chemical Society Reviews*, 1997, **26**, 6: 443-451.
- [26] L. Hernández, C. González, Introducción al análisis instrumental, Editorial Ariel, 2002: 105.
- [27] D. B. Williams; C. B. Carter, The transmission electron microscope, *Transmission electron microscopy*. Springer Us, 1996: 3-17.
- [28] J. Gigault, J. M. Pettibone, C. Schmitt, V. A. Hackley, Rational strategy for characterization of nanoscale particles by asymmetric-flow field flow fractionation: A tutorial. *Analytica chimica acta*, 2014, **809**: 9-24.
- [29] W. I. Goldberg, Dynamic light scattering. *American Journal of Physics*, 1999, **67**, 12: 1152-1160.
- [30] B. Carr; M. Wright, Nanoparticle tracking analysis. *Innovations in Pharmaceutical Technology*, 2008, **26**: 38-40
- [31] L. M. Lechuga, Nanomedicina: ampliación de la nanotecnología en la salud. *Biotecnología Aplicada a la Salud Humana*, **9**: 100-102.
- [32] D. Tang; Y. Cui; G. Chen, Nanoparticle-based immunoassays in the biomedical field. *Analyst*, 2013, **138**, 4: 981-990.
-

[33] S. R. Mikkelsen; E. Cortón, Quantitative immunoassays with labels. *Bioanalytical Chemistry*, 2004: 99-127

8. Anexos

8.1. Síntesis de Carbon Quantum Dots

8.1.1. Carbon Quantum Dots obtenidos a partir de glucosa

a. N-CQDs. 15 mL glucosa (1 M) + 15 mL NH₃ (30%).

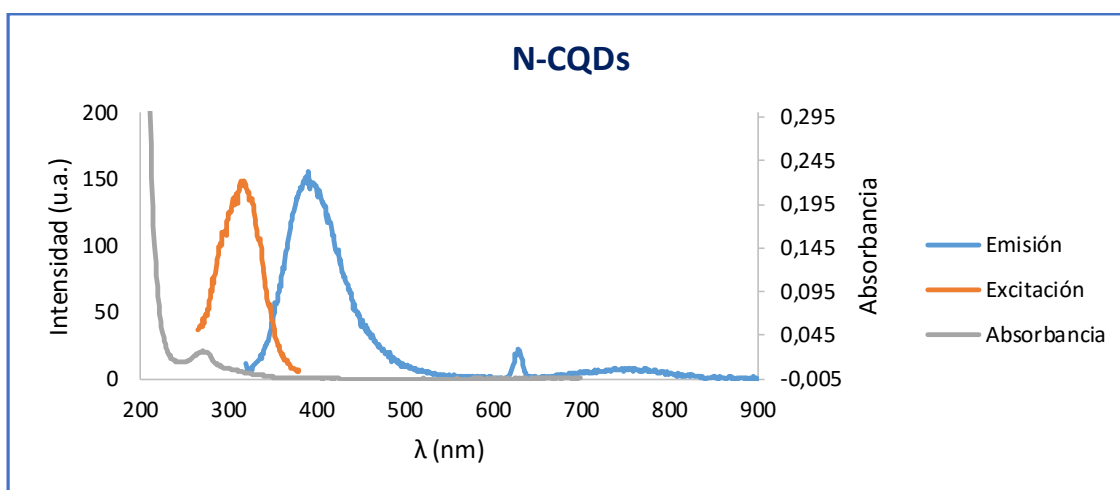


Figura 19. Espectros de emisión, excitación y absorción de los N-CQDs (glucosa y amoníaco).

Como se puede apreciar, los N-CQDs sintetizados presentan dos bandas de máxima emisión a 390 y a 755 nm.

b. CQDs sin dopar. 15 mL glucosa (1 M) + 15 mL HCl (37 %).

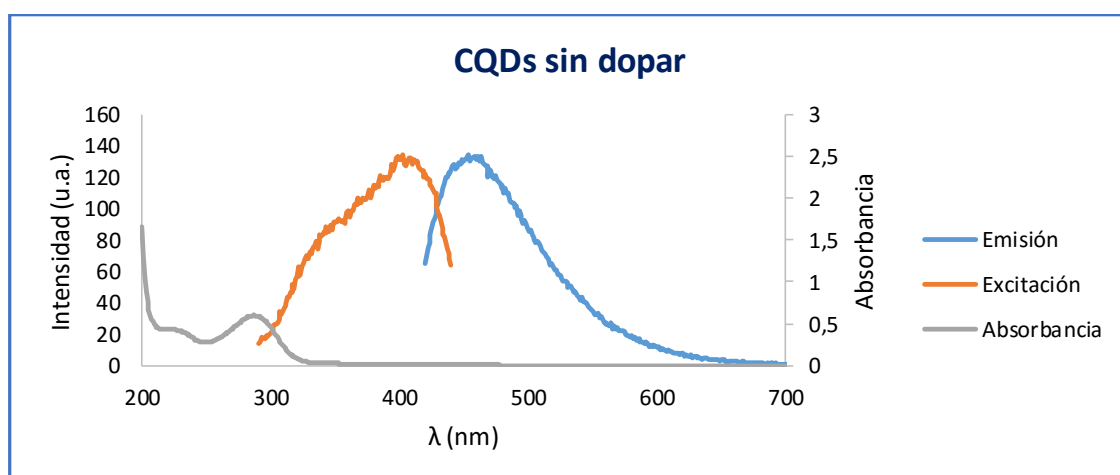


Figura 20. Espectros de emisión, excitación y absorción de los CQDs sin dopar (glucosa y ácido clorhídrico)

c. **CQDs sin dopar.** 15 mL glucosa (1 M) + 15 mL NaOH (1 M).

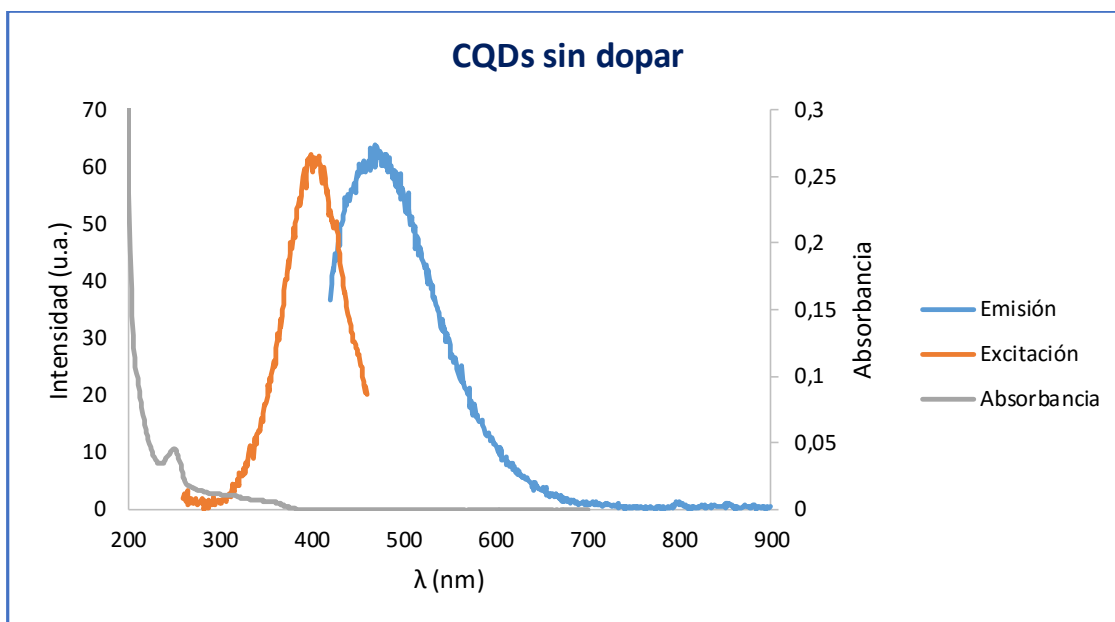


Figura 21. Espectros de emisión, excitación y absorción de los CQDs sin dopar (glucosa e hidróxido de sodio)

8.1.2. Carbon Quantum Dots obtenidos a partir de sacarosa

a. **CQDs dopados con N.** 15 mL sacarosa (1 M) + 15 mL NH_3 (30%).

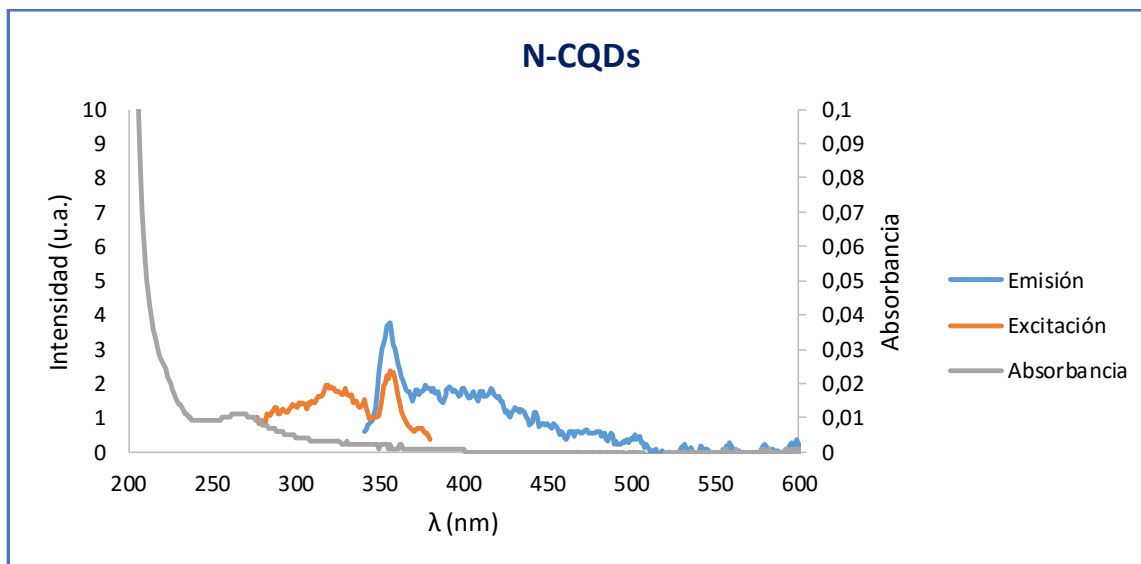


Figura 22. Espectros de emisión, excitación y absorción de N-CQDs (sacarosa y amoníaco).

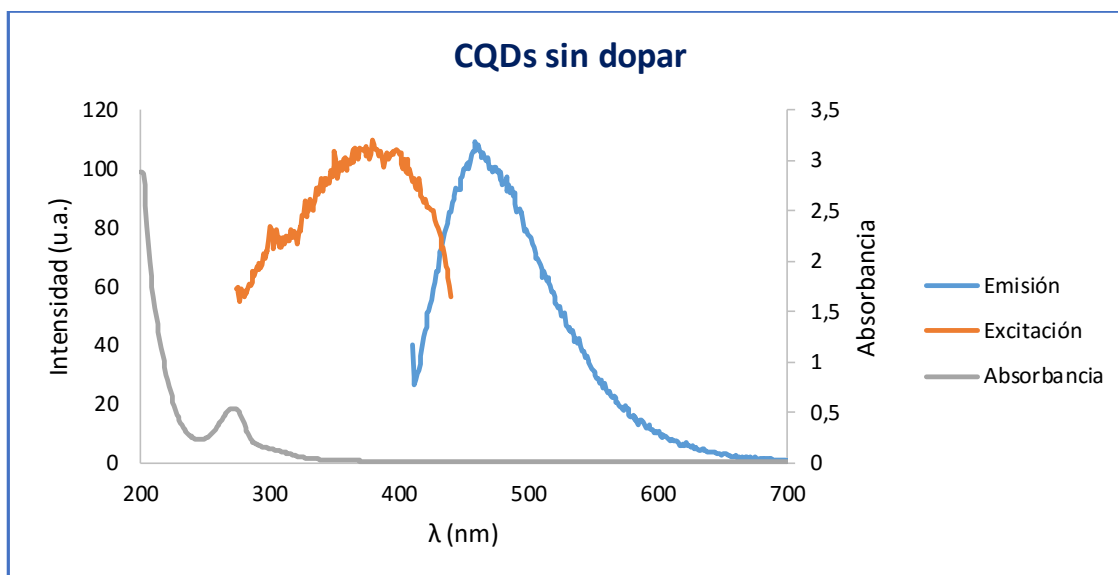
b. CQDs sin dopar: 15 mL sacarosa (1 M) + 15 mL HCl (37 %).

Figura 23. Espectros de emisión, excitación y absorción de CQDs sin dopar (sacarosa y ácido clorhídrico).

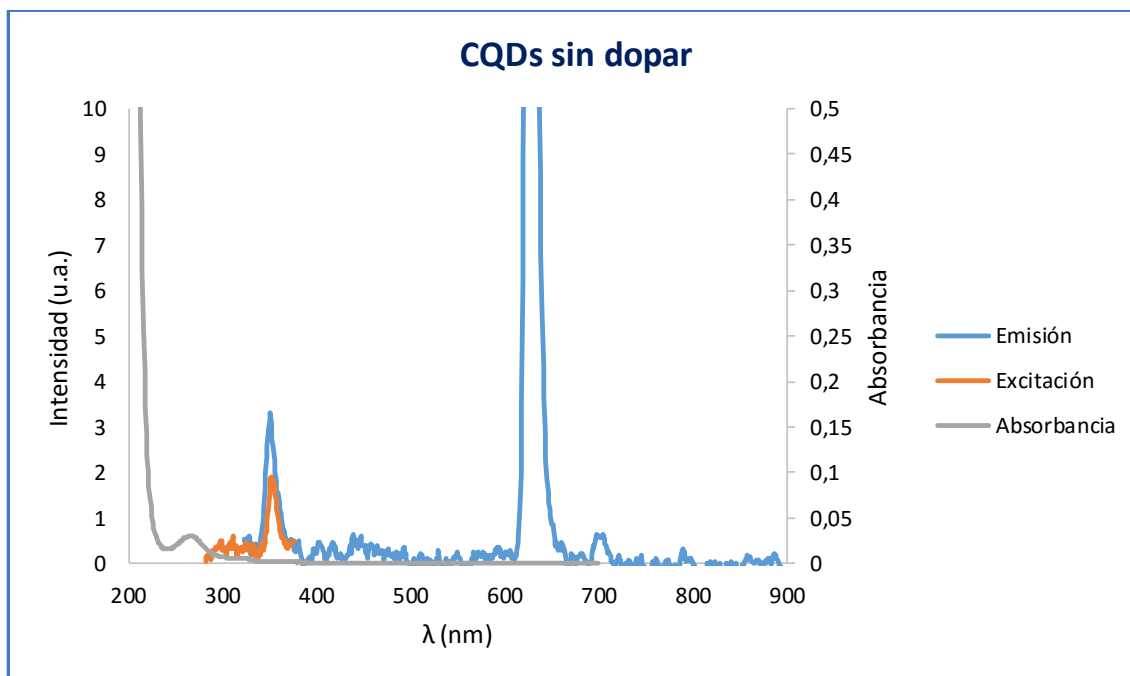
c. CQDs sin dopar. 15 mL sacarosa (1 M) + 15 mL NaOH (1 M).

Figura 24. Espectros de emisión, excitación y absorción de CQDs sin dopar (sacarosa e hidróxido de sodio).

8.1.3. N-CQDs obtenidos sin tratamiento con ultrasonidos

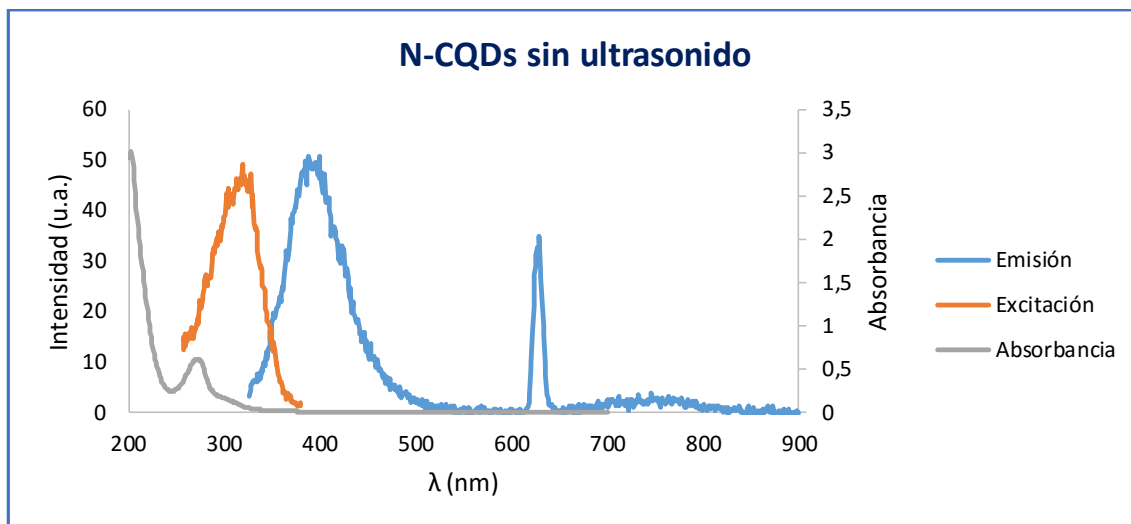


Figura 25. Espectros de emisión, excitación y absorbanza de los N-CQDs obtenidos sin ultrasonido.

8.1.4. Disoluciones Blanco

Con la finalidad de saber si las disoluciones preparadas para la síntesis de los CQDs poseían fluorescencia antes del tratamiento con ultrasonidos, se prepararon disoluciones blanco, cuyos espectros de excitación y emisión de fluorescencia se muestran en las próximas páginas.

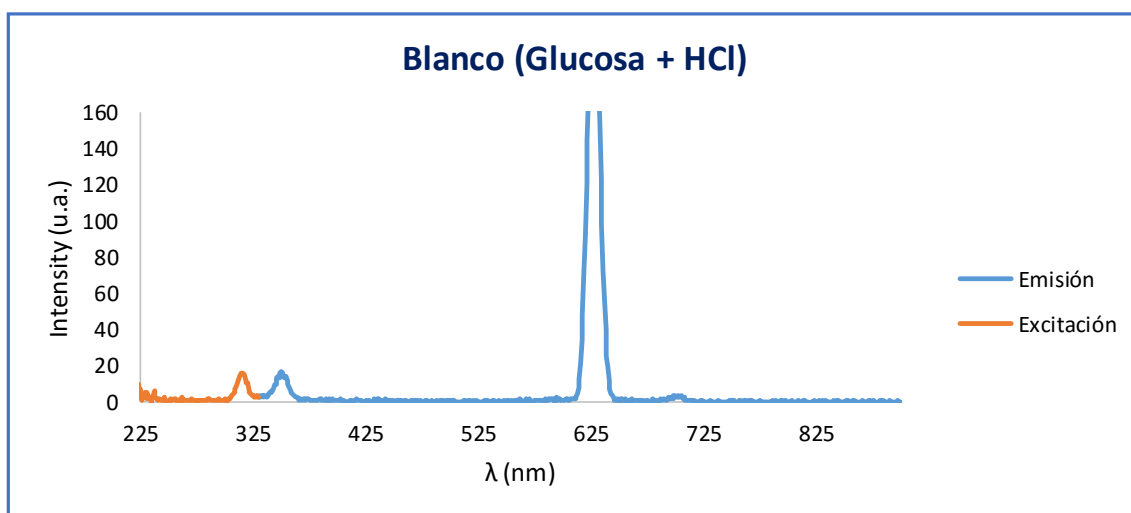


Figura 26. Espectros de excitación y emisión de la disolución blanco (15 mL glucosa (1 M) + 15 mL HCl (37%)).

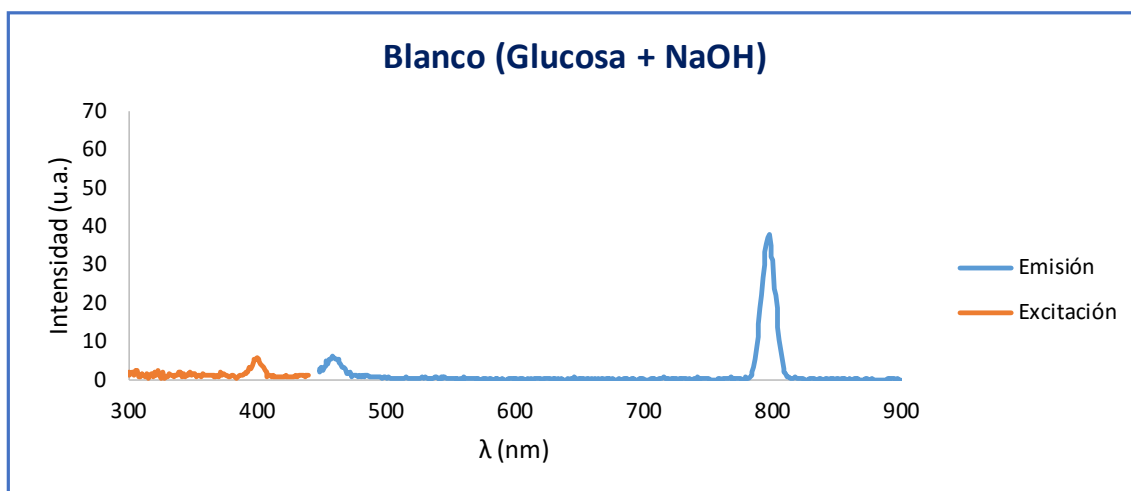


Figura 27. Espectros de excitación y emisión de la disolución blanco (15 mL glucosa (1 M) + 15 mL NaOH (1 M)).

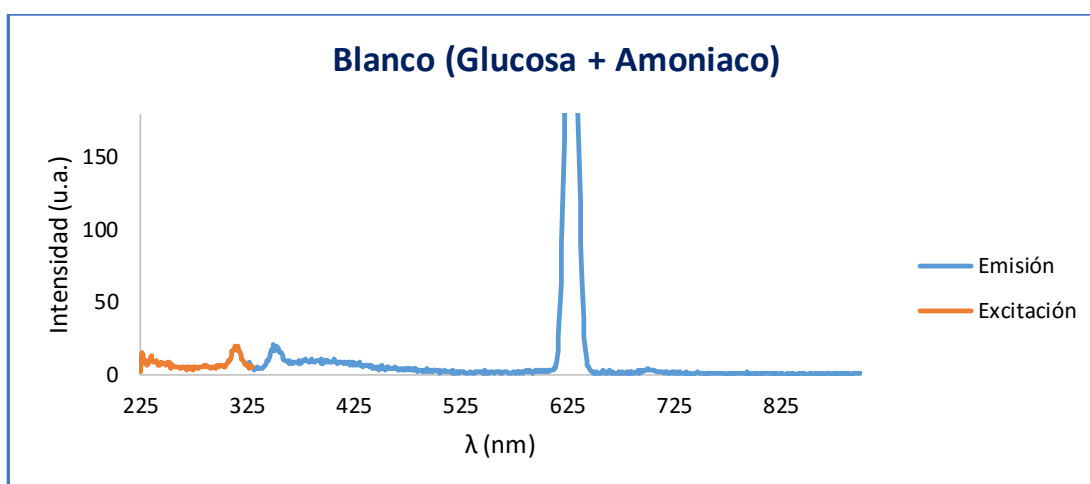


Figura 28. Espectros de excitación y emisión de la disolución blanco (15 mL glucosa (1 M) + 15 mL NH₃ (30%)).

8.2. Efecto del pH en la intensidad de emisión de fluorescencia

A continuación, se exponen los resultados del estudio del efecto del pH en los distintos tipos de CQDs sintetizados.

a. Efecto del pH en los N-CQDs con tratamiento de ultrasonidos.

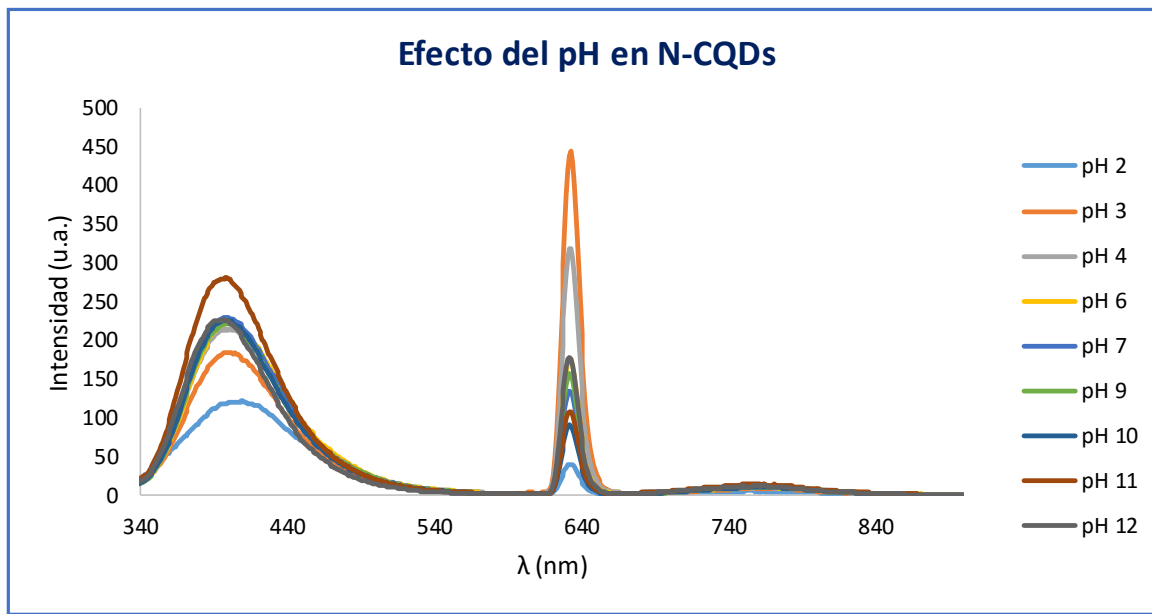


Figura 29. Superposición de espectros de emisión de fluorescencia a diferente pH.

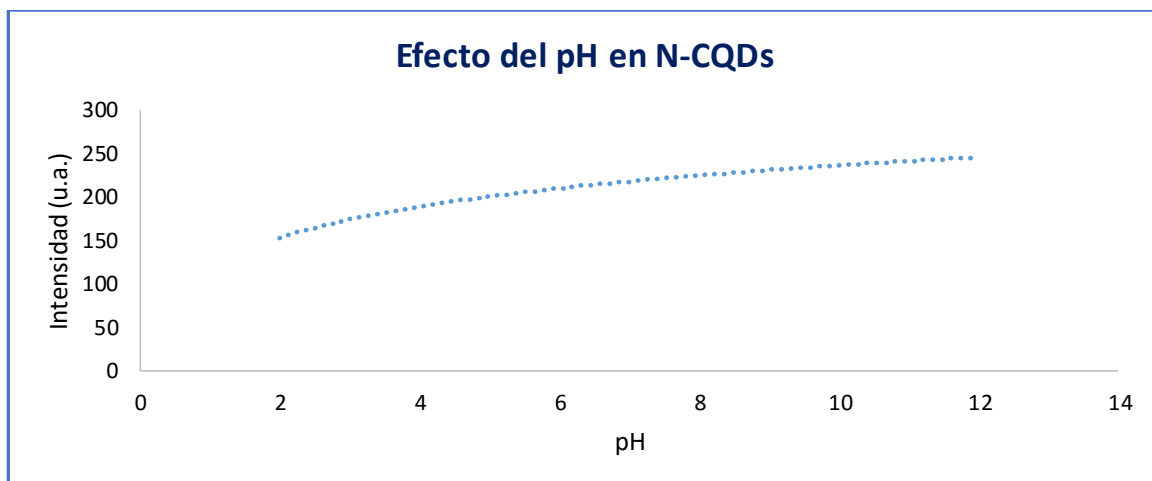


Figura 30. Tendencia de la variación de la intensidad máxima de emisión de fluorescencia en función del pH.

b. Efecto del pH en los CQDs sin dopar (sintetizados a partir de glucosa e hidróxido de sodio).

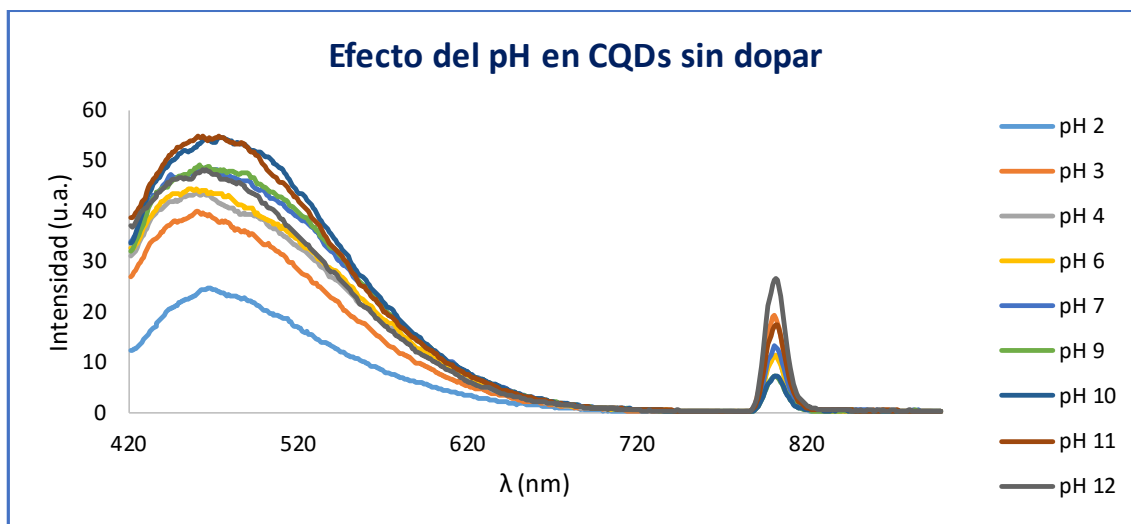


Figura 31. Superposición de espectros de emisión de fluorescencia a diferente pH de los CQDs sin dopar (sintetizados a partir de glucosa e hidróxido de sodio).

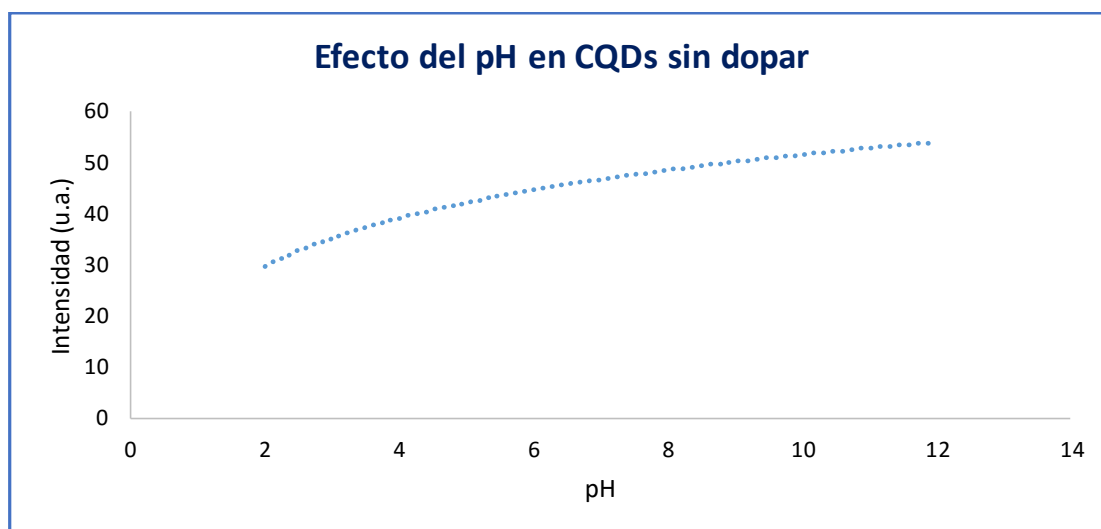


Figura 32. Tendencia de la variación de la intensidad máxima de emisión de fluorescencia en función del pH de los CQDs sin dopar (sintetizados a partir de glucosa e hidróxido de sodio).

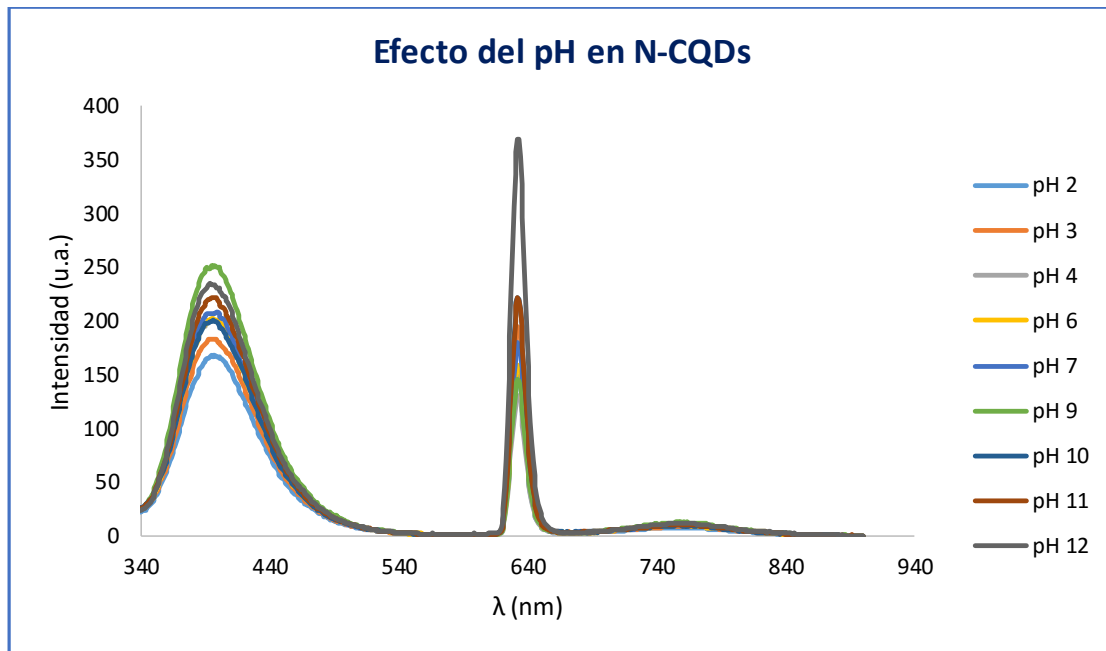
c. Efecto del pH en los N-CQDs sin tratamiento con ultrasonidos.

Figura 33. Superposición de espectros de emisión de fluorescencia a diferente pH de los N-CQDs sin tratamiento con ultrasonidos.

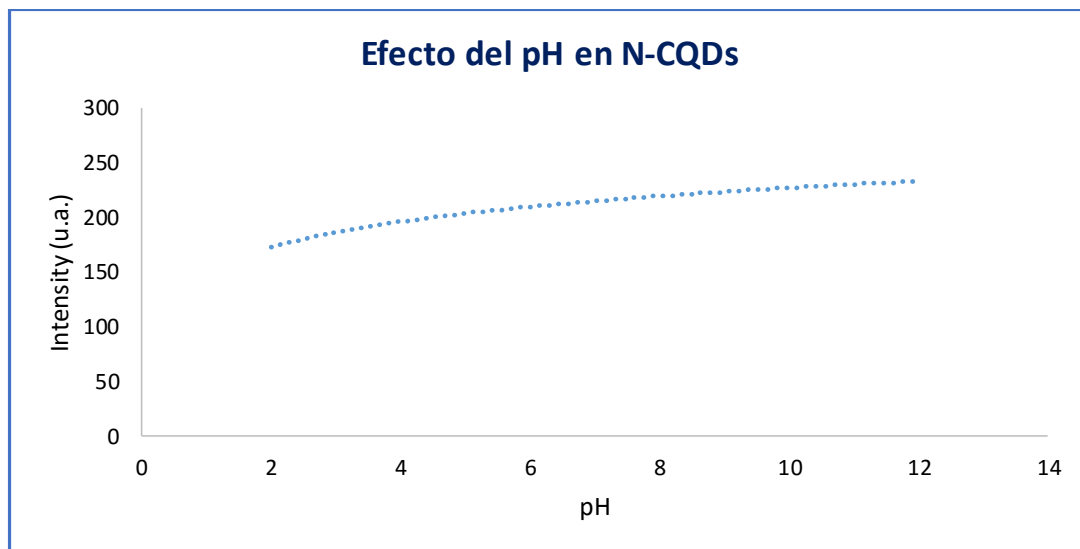


Figura 34. Tendencia de la variación de la intensidad máxima de emisión de fluorescencia en función del pH de los N-CQDs sin tratamiento con ultrasonidos.

8.3. Estudio de fotoestabilidad

a. Fotoestabilidad de CQDs sin dopar

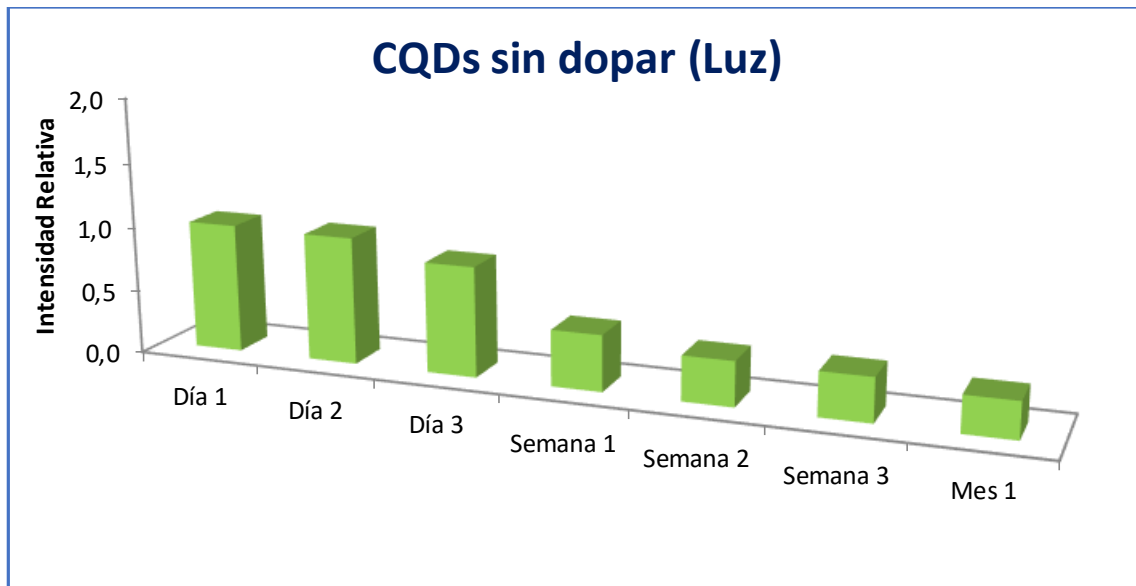


Figura 34. Estudio de fotoestabilidad de los CQDs sin dopar expuestos a luz natural.

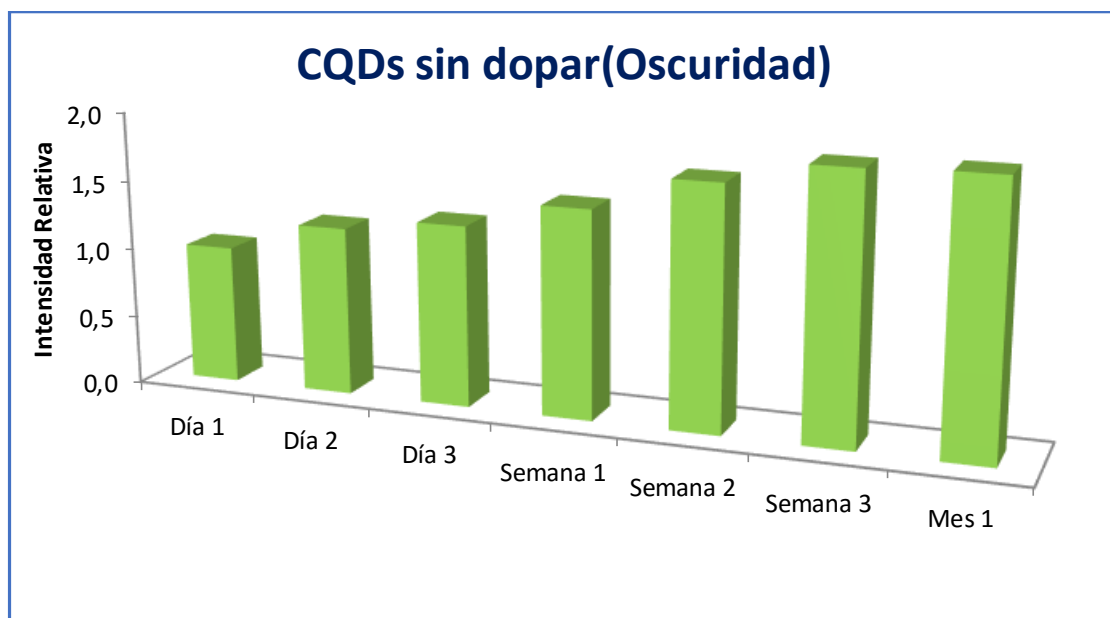


Figura 35. Estudio de fotoestabilidad de los CQDs sin dopar reservados en oscuridad.

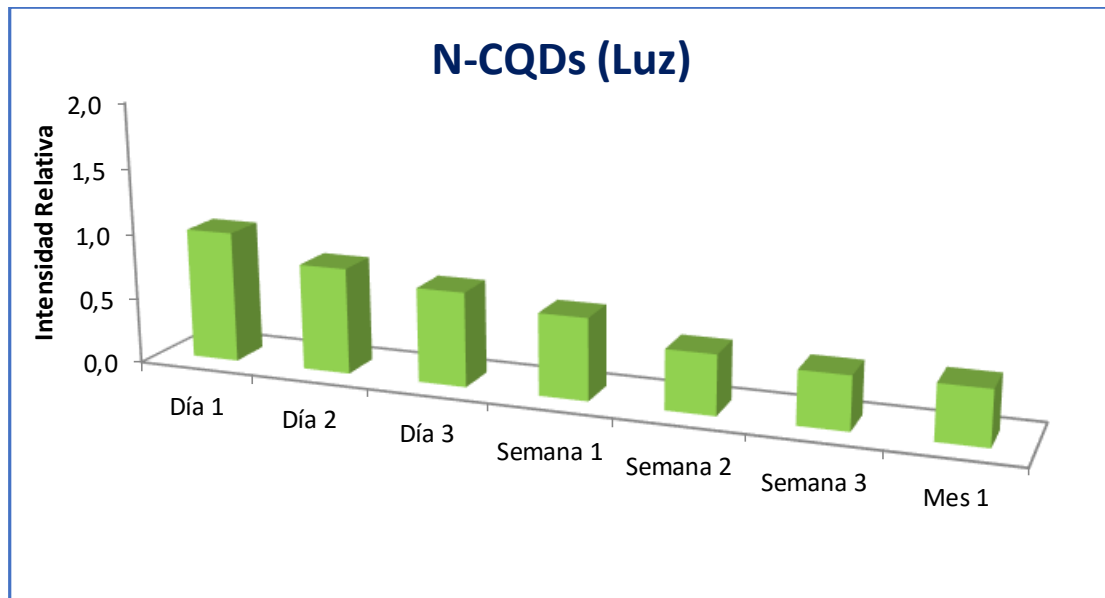
b. Fotoestabilidad de N-CQDs (banda de $\lambda_{em}=755$ nm)

Figura 36. Estudio de fotoestabilidad de los N-CQDs ($\lambda=755$ nm) expuestos a luz natural.

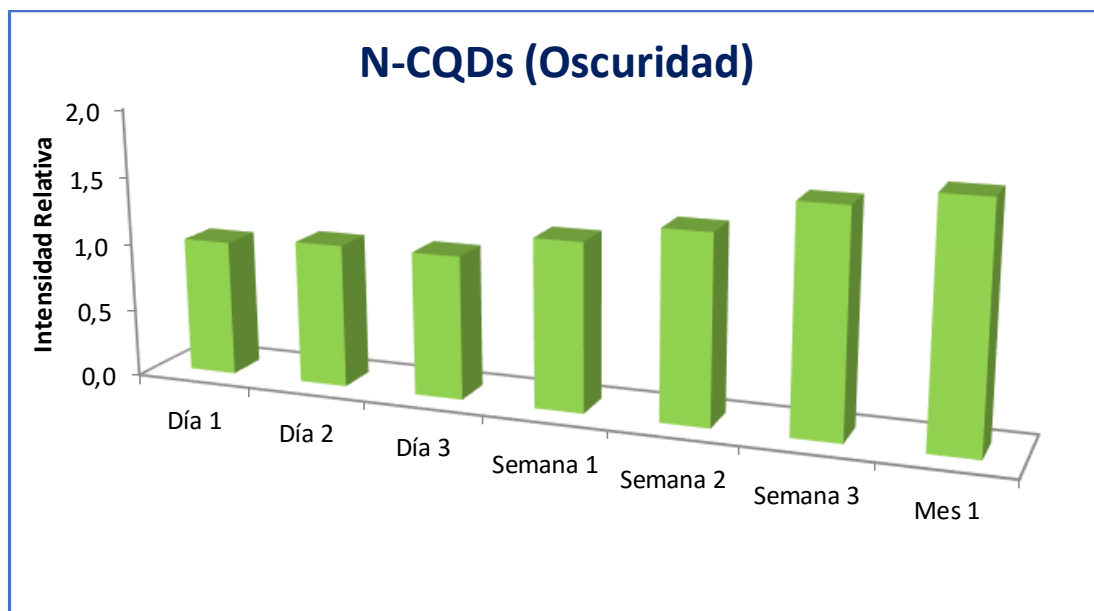


Figura 37. Estudio de fotoestabilidad de los N-CQDs ($\lambda=755$ nm) reservados en oscuridad.

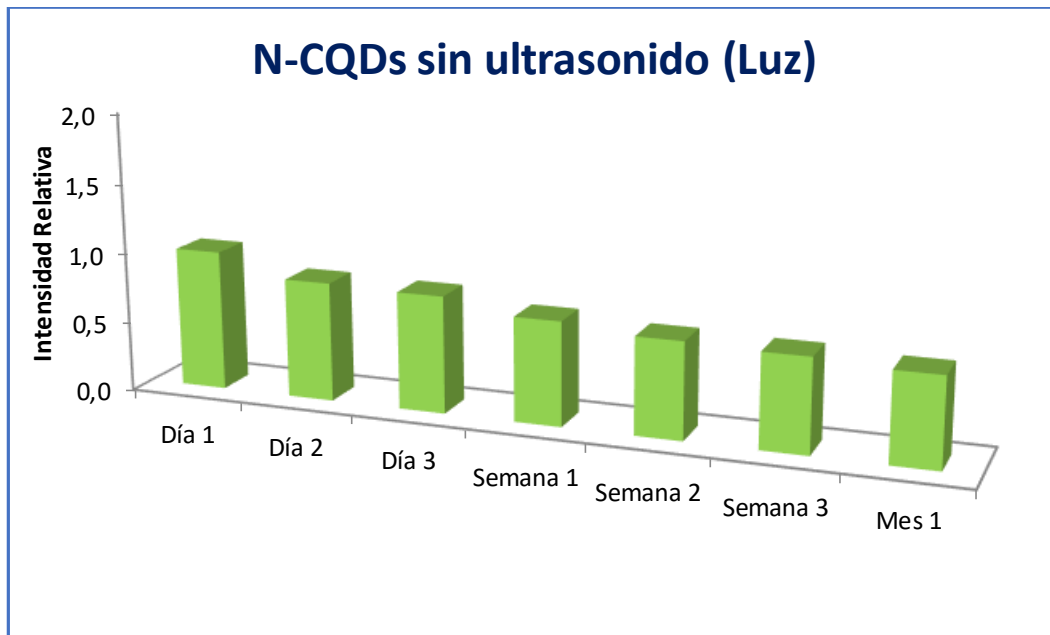
c. Fotoestabilidad de N-CQDs sin tratamiento con ultrasonido

Figura 38. Estudio de fotoestabilidad de los N-CQDs (sin tratamiento mediante ultrasonidos) expuestos a luz natural.

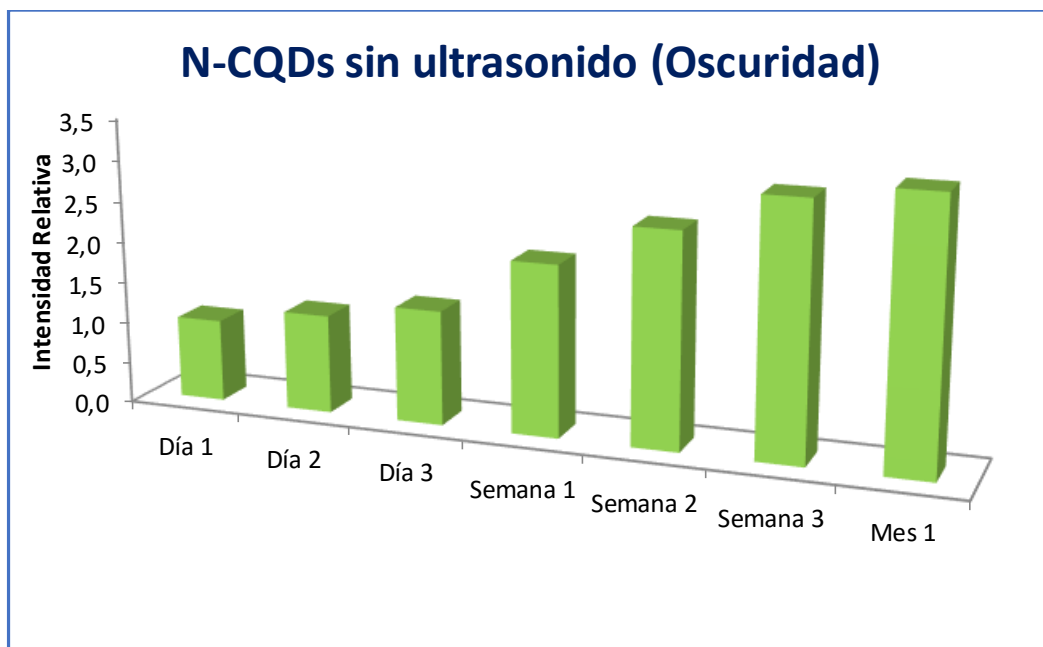


Figura 39. Estudio de fotoestabilidad de los N-CQDs (sin tratamiento mediante ultrasonidos) reservados en oscuridad.

8.4. Fotoactivación

a. Monitorización continua de la fluorescencia de las NPs de carbonodurante 2 h (Time drive)

a.1. CQDs sin dopar

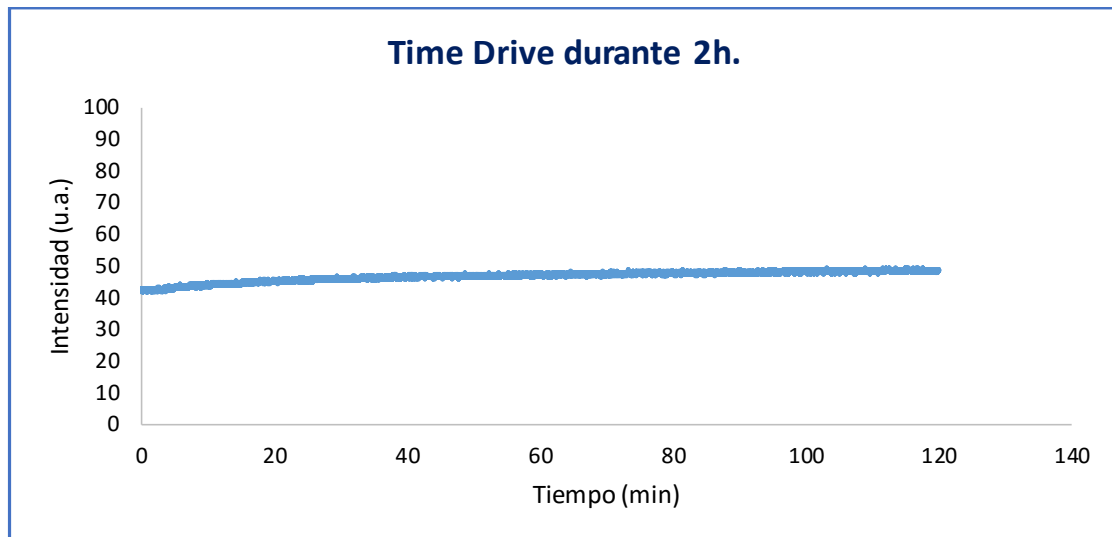


Figura 40. Time Drive de los CQDs sin dopar.

a.2. N-CQDs (banda a $\lambda=755$ nm)

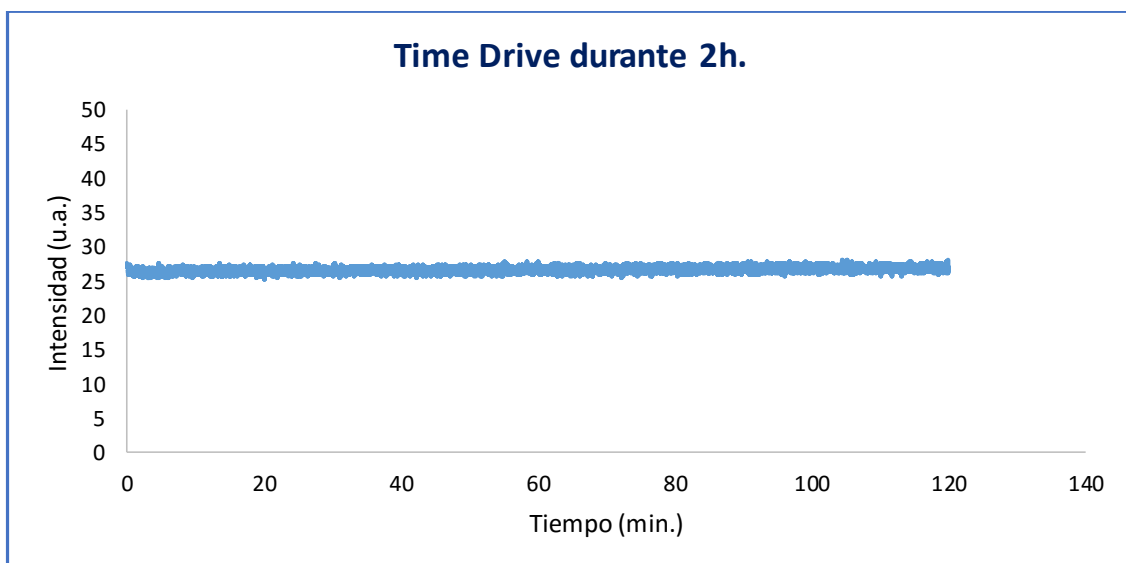


Figura 40. Time Drive de los N-CQDs (banda a $\lambda=755$ nm)

a.3. N-CQDs sin ultrasonido

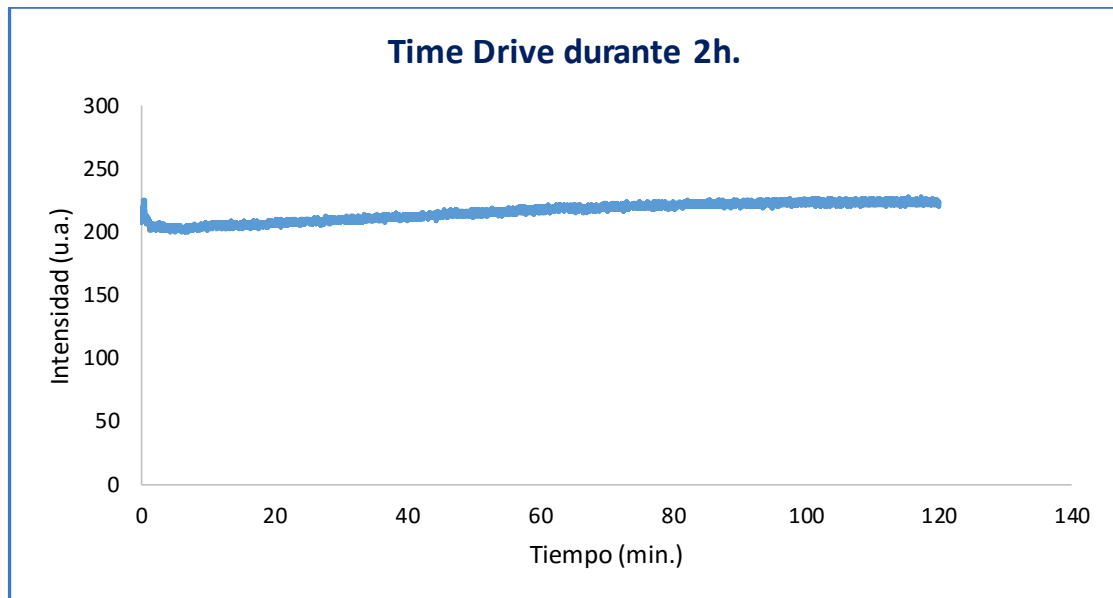


Figura 41. Time Drive de los N-CQDs sin tratamiento con ultrasonidos.

b. Recogida de espectros durante 1h.

b.1. CQDs sin dopar

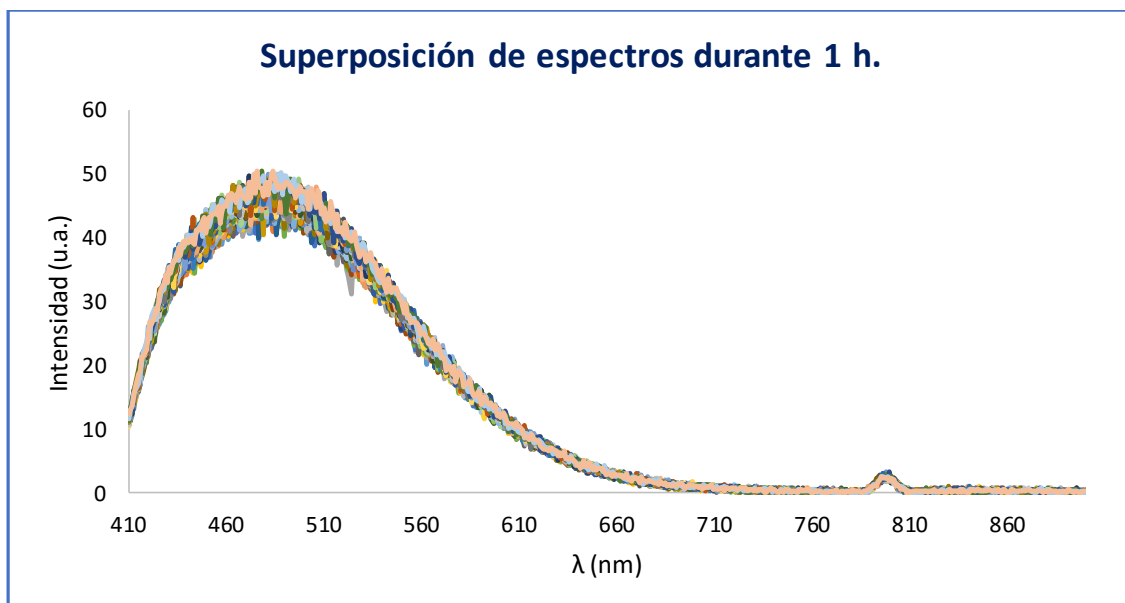


Figura 42. Espectros obtenidos para CQDs sin dopar durante 1h.

b.2. N-CQDs sin ultrasonido

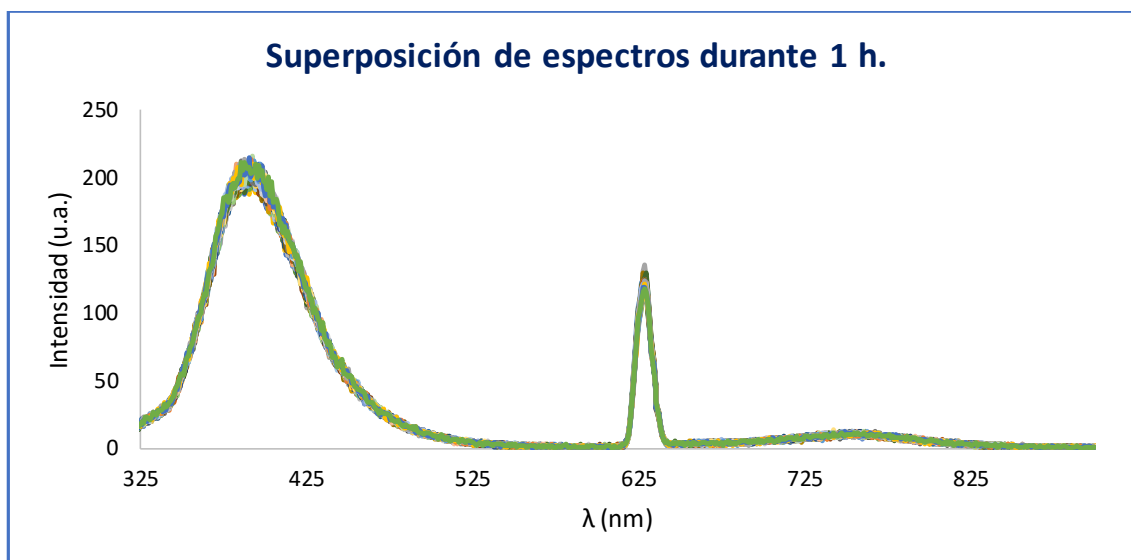


Figura 43. Espectros obtenidos para N-CQDs (sin ultrasonido) durante 1h.

8.5. Fraccionamiento en flujo a través de campo de flujo asimétrico: estudio de la pureza de las NPs de Carbono

6.1. Estudio de optimización 1

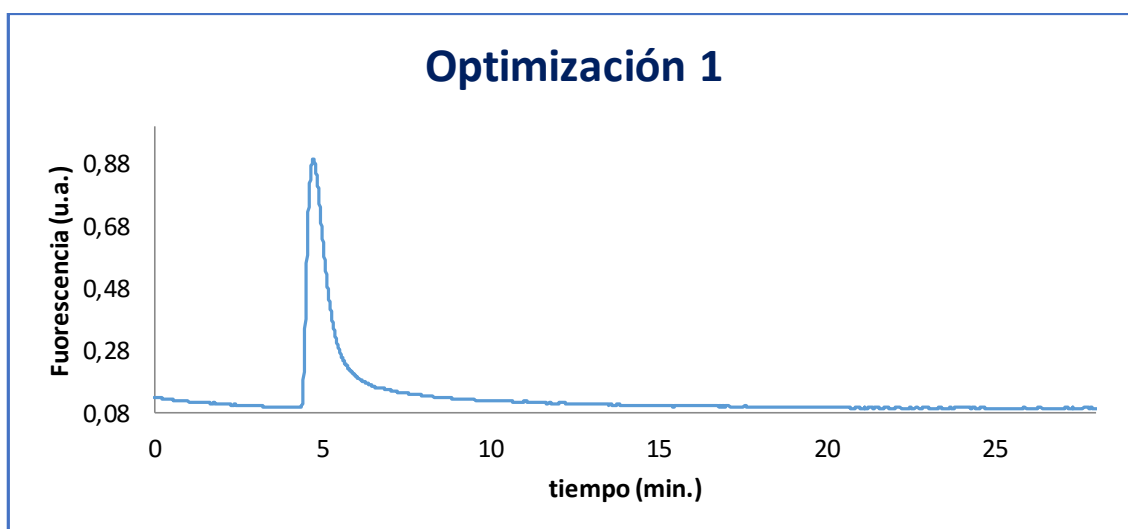


Figura 44. Fractograma de N-CQDs con membrana RC (10 kDa). Fase móvil: disolución acuosa de 10 mM de acetato de amonio y 0,01 % de SDS en H₂O ultrapura, a pH 7,4. Cross Flow de 1 mL/min.

6.2. Estudio de optimización 2

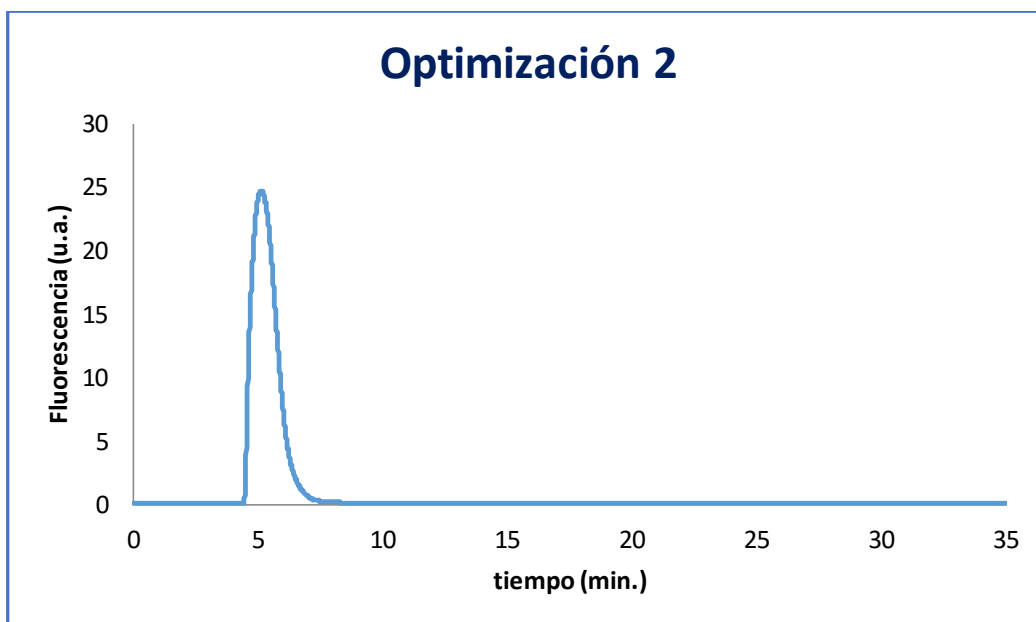


Figura 45. Fractograma de N-CQDs con membrana PES (1 kDa). Fase móvil: disolución acuosa al 0,01 % de SDS en H₂O ultrapura. Cross flow de 2 mL/min.

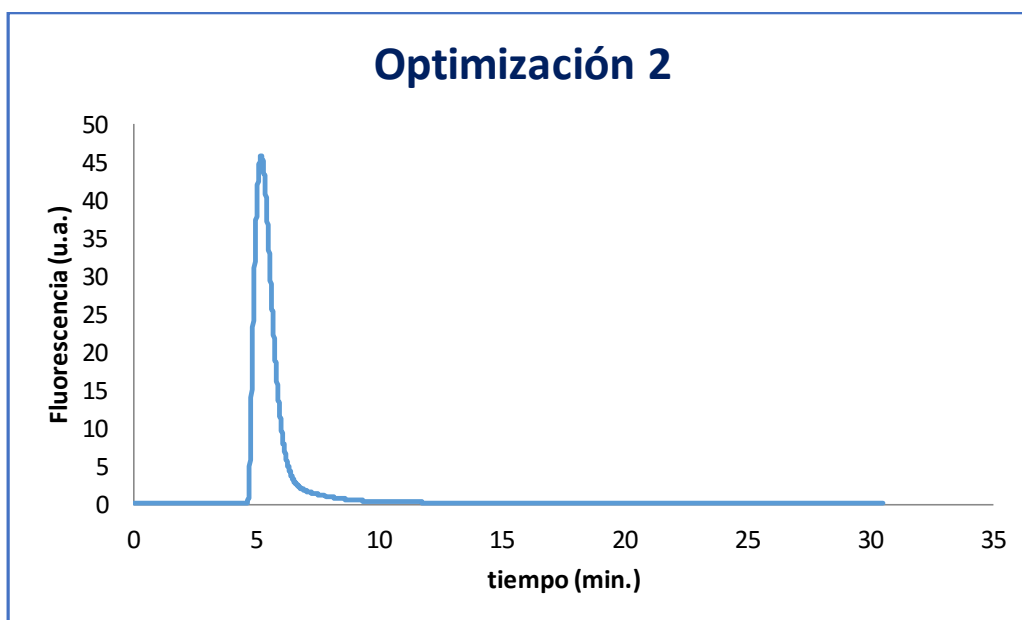


Figura 46. Fractograma de N-CQDs con membrana PES (1 kDa). Fase móvil: disolución acuosa al 0,01 % de SDS en H₂O ultrapura. Cross flow de 1 mL/min.

6.3. Estudio de optimización 3

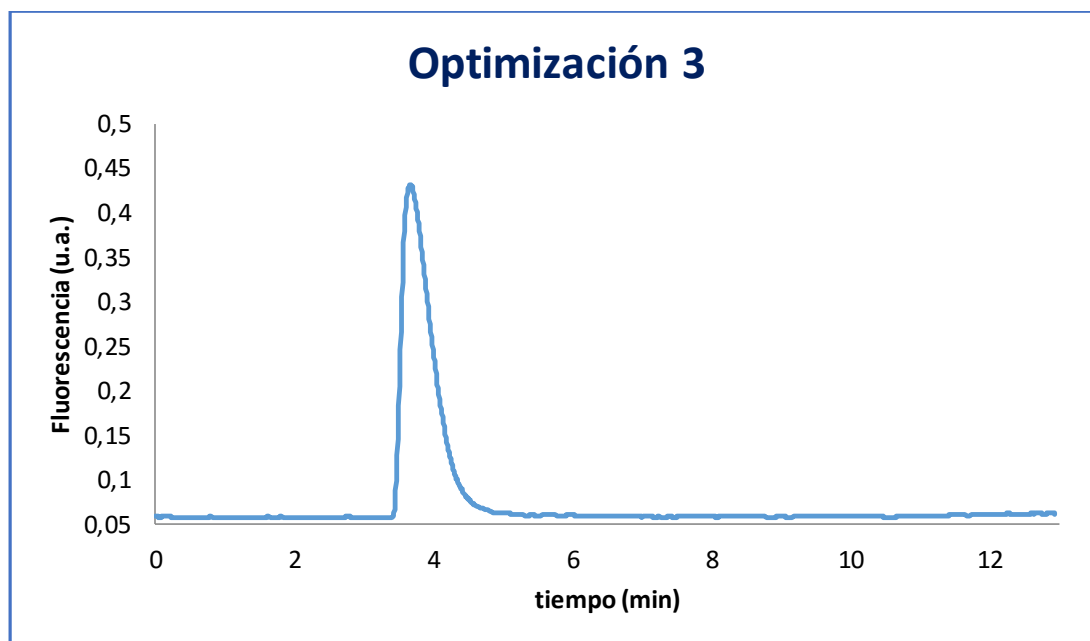


Figura 47. Fractograma de N-CQDs con membrana de PES (1 kDa). Fase móvil: disolución acuosa de 100 mM de acetato de amonio ($C_2H_3O_2NH_4$) en H_2O ultrapura a pH 9. Cross Flow de 3 mL/min.

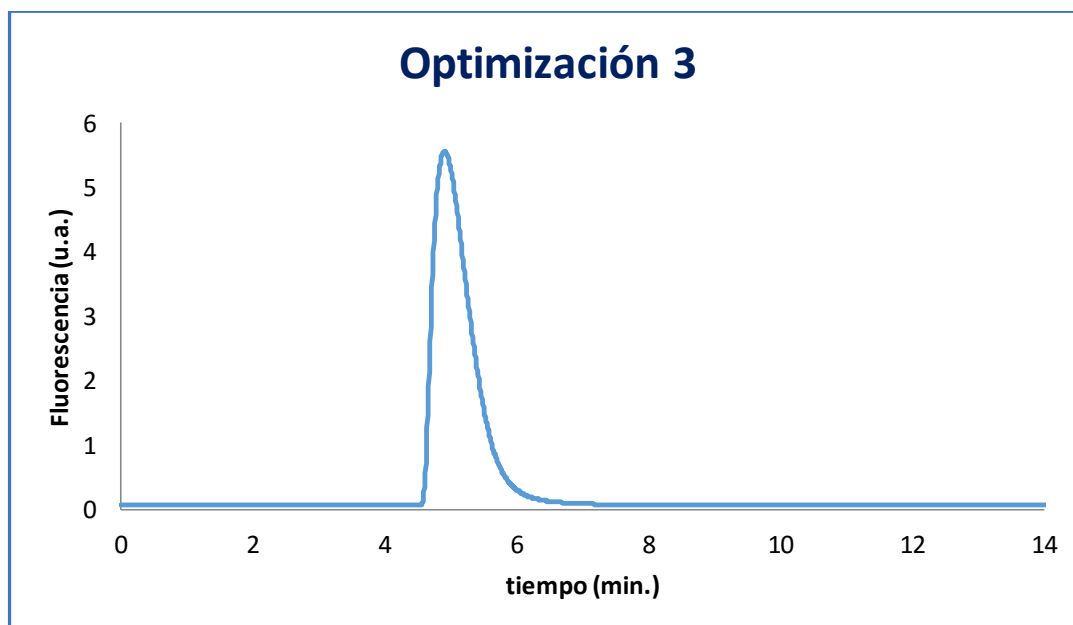


Figura 48. Fractograma de N-CQDs con membrana de PES (1 kDa). Fase móvil: disolución acuosa de 100 mM de acetato de amonio ($C_2H_3O_2NH_4$) en H_2O ultrapura a pH 9. Cross Flow de 1 mL/min.

6.4. Estudio de optimización 4

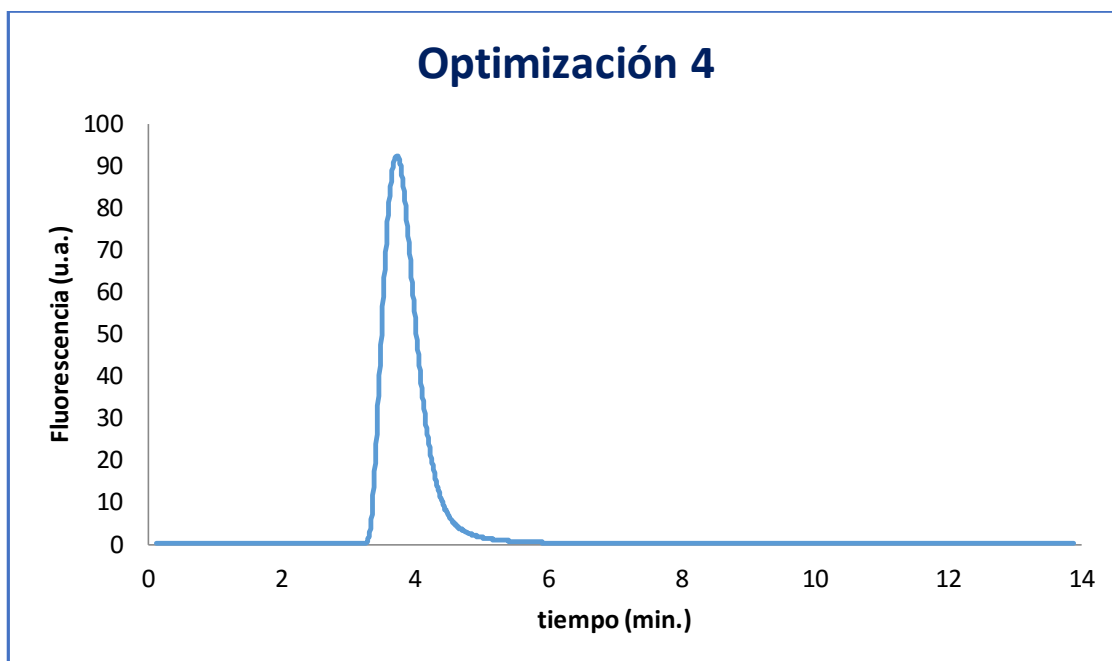


Figura 49. Fractograma de N-CQDs con membrana de PES (1 kDa). Fase móvil: disolución acuosa de 180 mM de NaCl en H₂O ultrapura a pH 9. Cross Flow de 2 mL/min.

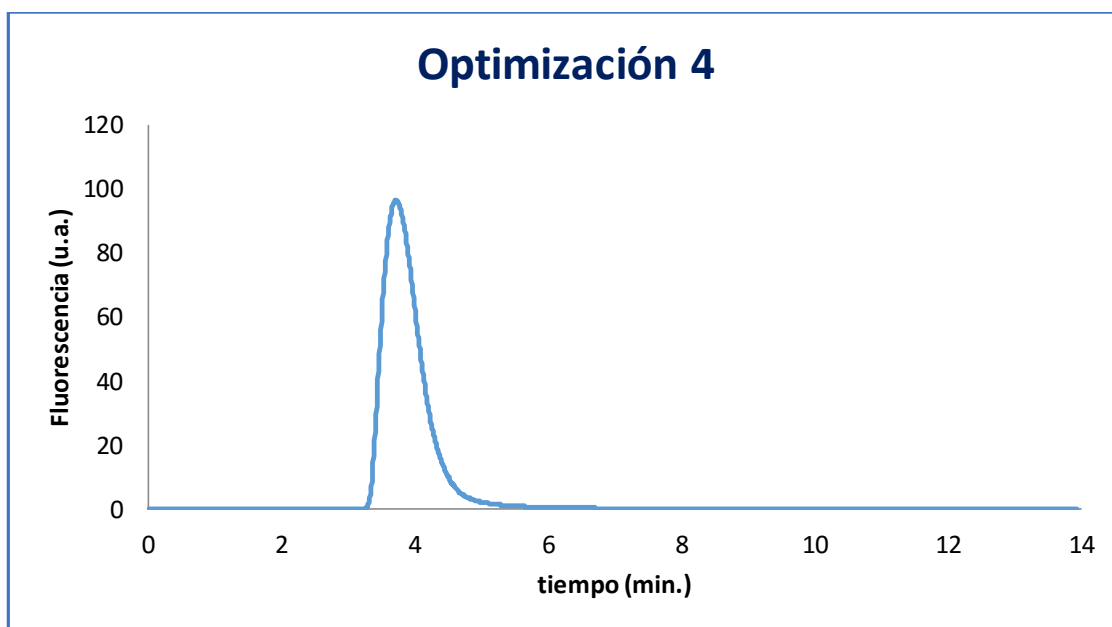


Figura 50. Fractograma de N-CQDs con membrana de PES (1 kDa). Fase móvil: disolución acuosa de 180 mM de NaCl en H₂O ultrapura a pH 9. Cross Flow de 1 mL/min.