UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

**Desarrollo de nanopartículas de silicio como
potenciales marcadores luminiscentes y agentes
terapéuticos en sistemas biológicos.**

Manuel José Llansola Portolés

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido desarrollado en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) y en Departamento Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA; bajo la dirección de la Dra. Mónica C. Gonzalez y la Dra. Mónica L. Kotler.

Año 2011

Llansola Portolés, Manuel José

Desarrollo de nanopartículas de silicio como potenciales marcadores luminiscentes y agentes terapéuticos en sistemas biológicos. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2012.

E-Book.

ISBN 978-950-34-0864-3

1. Nanotecnología. 2. Tesis. I. Título
CDD 539.72

Fecha de catalogación: 15/06/2012

***A mis tíos,
Tere y Pepe.***

Agradecimientos

A mis directoras, Mónica Kotler y Mónica Gonzalez, por brindarme su apoyo, su conocimiento científico y sobre todo por ser parte de mi familia en Argentina y no poder librarse de su becario ni las noches de navidad.

A mis tíos y primos, por quererme, por criarme desde niño y por darme siempre su amor y apoyo incondicional.

Al Dr. Reinaldo Pis Diez por ser casi que el tercer director de tesis, por estar siempre dispuesto a ayudarme con los cálculos teóricos y por mostrar un interés genuino hacia mi trabajo.

A mis compañeros del grupo LEAR: Daniel, Janina, Pedro, Valeria, Laura, Paula, María Laura, Gabriela, Marcela, Andrea, Lucho y Cristian por su apoyo, por su cariño, por ser amigos más que compañeros de trabajo y sobre todo por soportarme a partir de las cuatro de la tarde.

A Pili, por la paciencia que ha tenido los últimos meses, y por estar a mi lado dándome ánimos, ayudándome a verlo todo más fácil y haciéndome mejor persona.

A mis Amigos que me quieren aunque estén lejos: Rubén, Ana, Laura y Annelís.

A Jorge, Gaby, Gabriel, Facundo y Luciana, por quererme y hacerme sentir como en familia.

A Dorita y Pepe que vinieron a acompañarme en persona y darme ánimos.

A Nati, por su paciencia y buena voluntad al ayudarme con la realización e interpretación de los experimentos biológicos.

A mis compañeros del INIFTA, me sería imposible nombrar a todos. Siempre me hicieron sentir integrado y me ayudaron en lo que estuvo en su mano.

Al Dr. Rodríguez Nieto, por ayudarme en la parte electroquímica. A los Drs. Enrique San Román y Hernán B. Rodríguez por su colaboración con las medidas de fluorescencia. Al Lic. Pablo M. Jais y a la Dra. Andrea Bragas por su colaboración en los ensayos con irradiación bifotónica en su laboratorio del departamento de física de la UBA. A la Dra. Delia B. Soria por su ayuda en la medición los espectros de FTIR. A los Drs. Javier I. Amalvy y Pablo J. Peruzzo por los espectros FTIR-ATR y medidas de ángulo de contacto. A los Drs. Guillermo Benitez y Aldo Rubbert por las medidas de XPS. Al Dr. Alessandrini por las medidas de DLS. A los Drs. Antonio Arques y Lucas Santos Juanes por las medidas de TEM.

Al CONICET por concederme la beca doctoral.

Índice

Tabla de Siglas y Abreviaciones	7
Capítulo 1: Introducción y Objetivos	9
1.1. Nanotecnología – Aplicaciones y Riesgos	11
1.2. Materiales Semiconductores – Comportamiento en Función del Tamaño	15
1.2.1. Semiconductores de Band Gap Directo e Indirecto	15
1.2.2. Efecto del Tamaño	18
1.2.3. Fotofísica de las Nanopartículas	20
1.3. Nanopartículas de Silicio	22
1.3.1. Importancia del Desarrollo de las Nanopartículas Basadas en el Silicio	22
1.3.2. Estado Actual del Conocimiento	23
1.3.3. Potenciales Aplicaciones en los Sistemas Biológicos	26
1.4. Objetivos	28
Capítulo 2: Equipamiento, Materiales y Métodos	29
2.1. Solventes, Gases y Reactivos	31
2.2. Material Común de Laboratorio	33
2.3. Técnicas y Equipamiento	33
2.3.1. Estudios de Adsorción	33
2.3.2. Estudios de Absorción	33
2.3.3. Estudios de Composición Superficial	34
2.3.4. Estudios de Luminiscencia Estacionaria	36
2.3.5. Estudios de Luminiscencia Resuelta en el Tiempo	37
2.3.6. Emisión con Excitación Bifotónica	38
2.3.7. Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia	39
2.3.8. Determinación de Tamaños	45
2.3.9. Detección de Oxígeno Singulete	46
2.3.10. Detección del Radical Anión Superóxido	49
2.3.11. Estudios de Fotólisis flash	50

2.3.12. Sistema de Foto-Reducción, Separación y Detección de Mercurio.....	53
2.3.13. Análisis de Regresión Bilineal	56
2.4. Estudios Teóricos	57
2.4.1. Aproximación Mediante la Teoría del Funcional de la Densidad	57
2.4.2. Transiciones Electrónicas en el UV-Vis y Espectros Vibracionales	58
2.5. Ensayos y Protocolos Biológicos	59
2.5.1. Cultivo Celular	59
2.5.2. Incubación de Nanopartículas con las Células.	60
2.5.3. Ensayo de Rojo Neutro.....	60
2.5.4. Irradiación bifotónica en el Infrarrojo	62
<i>Capítulo 3: Síntesis, Modificación Superficial y Caracterización de Nanopartículas de Silicio</i>	63
3.1. Síntesis	65
3.1.1. Procedimiento	65
3.1.2. Determinación de la Concentración.....	73
3.2. Determinación de Tamaños y Distribución	73
3.3. Masa Molecular Relativa	75
3.3.1. Superficie Formada por Si-H	75
3.3.2. Superficie Formada por una capa de SiO ₂	76
3.4. Modificación Superficial	77
3.4.1. Cálculo de Terminaciones Si-H	77
3.4.2. Proceso de Modificación Superficial	78
3.5. Caracterización Superficial	81
3.5.1. Espectroscopia Infrarroja (FTIR y FTIR-ATR)	81
3.5.2. Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X.....	85
3.5.3. Estudios de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR).....	89
3.5.4. Angulo de Contacto, Mojabilidad y Energía Superficial	89
3.6. Conclusiones	91

Capítulo 4: Propiedades Fotofísicas de las Nanopartículas	93
4.1. Introducción	95
4.2. Espectros de Absorción	96
4.2.1. Corrección por Dispersión de Luz.....	96
4.2.2. Espectros de Absorción en Distintos Medios	98
4.3. Fluorescencia Estacionaria	100
4.3.2. Nanopartículas en Solventes Orgánicos	102
4.3.3. Nanopartículas en Suspensión Acuosa.....	108
4.3.4. Rendimiento Cuántico de Fluorescencia	111
4.4. Fluorescencia Resuelta en el Tiempo	114
4.5. Dependencia de Φ_{em} y τ con la Temperatura	122
4.6. Anisotropía Resuelta en el Tiempo	126
4.7. Análisis Bifotónicos	131
4.7.1. Espectro de Excitación de Nanopartículas en Tolueno	132
4.7.2. Espectro de Emisión	133
4.7.3. Espectroscopia de Correlación Fluorescente	134
4.8. Conclusiones	138
Capítulo 5: Generación de Especies Reactivas de Oxígeno y Propiedades Reductoras de las Nanopartículas	141
5.1. Introducción	143
5.1.1. Nanopartículas como Sensibilizadores de Especies Reactivas de Oxígeno	143
5.1.2. Nanopartículas con Comportamiento Reductor	147
5.2. Adsorción de N_2 y O_2 sobre las Nanopartículas	147
5.3. Efecto del O_2 Sobre la Emisión	151
5.4. Fluorescencia en Presencia de Átomos Pesados	153
5.5. Fluorescencia a 77 K	156
5.6. Generación de Oxígeno Singlete	159
5.6.1. Consumo de Oxígeno Molecular	159

5.6.2. Fosforescencia del $O_2(a^1\Delta_g)$ a 1270 nm	161
5.6.3. Mecanismo de Generación de $O_2(a^1\Delta_g)$	165
5.7. Generación del Radical Anión Superóxido	168
5.8. Reducción de Metilviologeno	170
5.9. Reducción de Mercurio (II)	173
5.10. Conclusiones	175
<i>Capítulo 6: Silicio Poroso Coloidal</i>	<i>177</i>
6.1. Síntesis y Separación del Silicio Poroso Coloidal	179
6.2. Morfología y Tamaño del Silicio Poroso Coloidal	179
6.3. Estudios de Luminiscencia	181
6.3.1. Fosforescencia Estacionaria	181
6.3.2. Fosforescencia Resuelta en el Tiempo	184
6.4. Generación de Oxígeno Singlete	185
6.5. Conclusiones	186
<i>Capítulo 7: Estudios Teóricos de las Nanopartículas de Silicio</i>	<i>187</i>
7.1. Introducción	189
7.2. Determinación de Geometrías	190
7.2.1. Aproximación a la Síntesis “Bottom-Up”	190
7.2.2. Aproximación a la Síntesis “Top-Down”	193
7.3. Modificación Superficial	196
7.3.1. Recubrimientos Realizados	196
7.3.2. Recubrimiento con Hidrógeno	196
7.3.3. Recubrimiento con Oxígeno	198
7.3.4. Recubrimiento con Carbono	199
7.3.5. Recubrimiento con Nitrógeno	201
7.4. Espectros Electrónicos UV-Visible	203
7.4.1. Influencia del Tamaño de la Nanopartícula	203
7.4.2. Influencia del Recubrimiento Superficial	204

7.5. Espectro Vibracional	208
7.5.1. Bandas de Absorción Relacionadas con los Enlaces Si-H	209
7.5.2. Bandas de Absorción Relacionadas con el Enlace Si-O	210
7.5.3. Bandas de Absorción Relacionadas con el Enlace Si-C.....	210
7.6. Conclusiones	211
<i>Capítulo 8: Incorporación y Citotoxicidad de NP-SiMMA en Cultivos de Células de Glioma C6</i>	213
8.1. Introducción	215
8.2. Citotoxicidad	216
8.2.1. Citotoxicidad de NP-SiMMA en Función del Tiempo de Incubación y la Concentración	216
8.2.2. Citotoxicidad de NP-SiMMA en función de la Concentración y el Tiempo de Irradiación	218
2.2. Conclusiones	223
<i>Capítulo 9: Conclusiones</i>	225
9.1. Conclusiones Generales	227
9.2. Perspectivas Futuras	229
<i>Bibliografía</i>	231

Tabla de Siglas y Abreviaciones

- $(e^- - h^+)$: Par hueco-electrón. Véase Excitón, Véase Excitón
- DFTB: Teoría del funcional de la densidad.
- EPR: Resonancia Paramagnética Electrónica.
- excitón: Nanopartícula en estado excitado.
- FA: Alcohol furfurílico.
- FCS: Espectroscopía de correlación fluorescente.
- FTIR: Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier.
- FWHM: Ancho de banda medio.
- $G(\tau)$: Función de autocorrelación temporal.
- HOMO: Orbital molecular de menor energía no ocupado.
- LUMO: Orbital molecular de mayor energía ocupado.
- MMA: Metacrilato de Metilo.
- NP: Nanopartículas de silicio.
- NP-Si: Nanopartículas de silicio sin recubrimiento superficial.
- NP-SiMe: Nanopartículas de silicio con recubrimiento superficial de -O-CH₃ y -CH₃.
- NP-SiMMA: Nanopartículas de silicio recubiertas con metacrilato de metilo.
- $O_2(^3\Sigma_g^-)$: Oxígeno molecular en estado triplete.
- $O_2(a^1\Delta_g)$: Oxígeno molecular en estado singlete.
- PCH: Histograma de cuenta de fotones.
- ROS: Especies reactivas de oxígeno.
- SPC: Silicio poroso coloidal.
- TEM: Microscopía de transmisión electrónica.
- XPS: Espectroscopía electrónica de Rayos X.

Capítulo 1:

Introducción y Objetivos

1.1. Nanotecnología - Aplicaciones y Riesgos

La nanotecnología es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales de tamaños del orden de los nanómetros. En los materiales con estos tamaños, los efectos de la mecánica cuántica adquieren gran relevancia y dotan a los sistemas de nuevas propiedades y características. La nanotecnología es una ciencia de gran diversidad que engloba desde la ampliación de dispositivos físicos convencionales hasta la generación de nuevos mecanismos basados en los fenómenos que se producen en la nanoescala.

El premio Nóbel de Física Richard Feynman, considerado como el padre de la nanociencia, en 1959 propuso fabricar productos en base a un reordenamiento de átomos y moléculas. Predijo que el trabajar con materiales y dispositivos a nivel nanométrico alteraría la forma en que está estructurada la ciencia haciendo confusos los límites entre la física, la química y la biología. En el año 1963 manifestó que la eliminación de las fronteras entre diferentes disciplinas traería muchos desafíos y nuevas direcciones en la organización de la educación y la investigación [Feynman 1963].

Desde la década de los 80, el concepto de nanociencia está estrechamente unido con Eric Drexler y sus aportes a la "nanotecnología molecular"; esto es, la construcción de nanomáquinas hechas de átomos y que son capaces de construir ellas mismas otros componentes moleculares. Desde entonces Eric Drexler, es considerado como uno de los mayores visionarios y ya en 1986, en su libro *Engines of Creation - The Coming Era of Nanotechnology* [Drexler 1986] introdujo las promesas y peligros de la manipulación molecular.

La concepción de nanotecnología se refería en sus inicios a la capacidad de crear estructuras construyendo dispositivos átomo a átomo mediante procesos de *bottom-up* para obtener productos con altas prestaciones controlando su diseño con precisión atómica. En la actualidad, la nanotecnología incorpora también las estructuras generadas a partir de compuestos mayores reduciendo su tamaño mediante distintos métodos conocidos como procesos *top-down*. Por tanto, se engloba bajo el término de nanotecnología cualquier tipo de estructura sintetizada tanto por métodos

bottom-up o *top-down* que tenga un tamaño inferior a los 100 nm y muestre propiedades novedosas.

La revolución originada por los dispositivos nanométricos es debida a la aparición de un gran número de fenómenos que tienen lugar al reducir el tamaño de algunos sistemas que parecían inimaginables en tamaños mayores. Entre ellos se incluyen efectos de mecánica cuántica como el confinamiento cuántico. Propiedades que no se manifiestan en tamaños micrométricos, llegan a ser dominantes cuando el tamaño alcanza la escala de los nanómetros. Adicionalmente, un gran número de propiedades mecánicas, eléctricas, ópticas y superficiales cambian cuando se comparan con los sistemas macroscópicos. Un ejemplo de estos cambios es el aumento del área superficial por volumen que altera las propiedades mecánicas, térmicas y catalíticas de los materiales. También se producen efectos por el tamaño nanométrico cuando sustancias opacas se vuelven transparentes (cobre), materiales estables se vuelven combustibles (aluminio) y algunos materiales cambian de color (oro) [Mody 2010, Murphy 2008].

En la actualidad, han empezado a desarrollarse sub-disciplinas como la nanobiotecnología. Esta disciplina híbrida puede servir para construir máquinas a escala atómica, las cuales puedan imitar sistemas biológicos, incorporarse en estos sistemas a nivel molecular o construir diminutas herramientas para estudiar el cambio de las propiedades estructurales átomo por átomo. A modo de ejemplo se nombran algunas de las aplicaciones basadas en la nanotecnología que se están desarrollando en la actualidad: bio-detección de patógenos, detección de proteínas, determinación de estructuras de ADN, ingeniería de tejidos, destrucción de tumores por calor, estudios patogénicos, separación de biomoléculas y células, marcadores biológicos fluorescentes, transporte y direccionamiento de medicamentos, células artificiales, diseño de proteínas, formación y crecimiento de nanoestructuras en sistemas vivos, biosensores, nanobiomotores, biomineralización, nanorobótica o nanocomputadoras [Ernest 2005].

El cáncer es una compleja enfermedad causada por mutaciones genéticas y la acumulación de múltiples alteraciones moleculares [Hahn 2002, Hanahan 2000]. Se podría definir como el crecimiento anormal y descontrolado de células que invaden los tejidos interrumpiendo las funciones vitales hasta producir la muerte. En la actualidad, los agentes terapéuticos no diferencian de forma apreciable entre células cancerígenas y normales. Esta falta de discriminación produce importantes efectos adversos de toxicidad

sistémica. Además, es común que el diagnóstico se produzca demasiado tarde, cuando las células cancerígenas se han metastatizado en el 60% de los pacientes [Menon 2000].

La nanotecnología se presenta como un campo interdisciplinario entre la biología, la química, la ingeniería y la medicina. Se espera que pueda servir para realizar importantes mejoras en la detección, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer [Ferrari 2005, Srinivas 2002]. En el Esquema 1 se ilustra como la nanotecnología puede ser aplicada contra el cáncer desde distintos enfoques por medio de el uso de imagen molecular, el diagnóstico, la detección temprana y el direccionamiento de las terapias.

Esquema 1: Aplicaciones de la nanotecnología en el cáncer.

En el campo de la biomarcación se espera que las nanopartículas puedan actuar como marcadores fluorescentes debido a sus características fotofísicas particulares. Estas presentan coeficientes de extinción de 10 a 50 veces mayores que los colorantes orgánicos, se puede controlar la longitud de onda de emisión con el tamaño; por ejemplo nanopartículas de CdSe/ZnS de aproximadamente 2 nm emiten en el azul mientras que las de 7 nm de diámetro emiten en el rojo [Yu 2003]. Sin embargo, hasta el momento estas partículas resultan tóxicas para el organismo y por lo tanto no son aptas para su empleo en el diagnóstico en humanos [Lovrić 2005a, Lovrić 2005b].

En el campo del diagnóstico molecular del cáncer aparecen potenciales aplicaciones de la nanotecnología utilizando las nanopartículas para cuantificar al conjunto de bio-marcadores en células sanas o cancerígenas, permitiendo una correlación entre las técnicas tradicionales histopatológicas y las técnicas de biología molecular. Estudios actuales sobre la detección

precoz del cáncer abordan el uso de dispositivos selectivos en el mercado de proteínas sobre expresadas en las células tumorales. Las nanopartículas pueden ser recubiertas con anticuerpos que les permiten ser dirigidas a las células cancerígenas pudiendo ser detectadas mediante señales ópticas. Este mismo procedimiento puede utilizarse en las terapias para dirigir los agentes terapéuticos a las células cancerígenas [Nie 2007]. Asimismo, utilizando la capacidad de detección y direccionamiento de las nanopartículas, se ha propuesto desarrollar terapias en las que la excitación con luz o radiación ionizante de las nanopartículas permita generar especies reactivas tóxicas a las células, tales como terapias fotodinámicas y terapias NEXT [Chi-Jen 2008].

Actualmente, nanopartículas de oro entre 2 y 50 nm se están desarrollando como posibles sensibilizadores y como transportadores de medicamentos y biomarcadores [Murphy 2008]. En esta misma línea se desarrollan nanopartículas de oro recubiertas con anticuerpos demostraron su efectividad en terapias foto-térmicas para líneas celulares de carcinoma (HSC 313 y HOC 3) y células epiteliales benignas (HaCaT) [El-Sayed 2006]. Nanopartículas de oro radiactivas han mostrado prometedores resultados en el tratamiento ratones con cáncer de próstata [Chanda 2010].

Las implicaciones positivas de la nanotecnología en el futuro están totalmente reconocidas y aceptadas. Se espera que la nanociencia sea capaz de generar una amplia variedad de nuevos materiales y dispositivos con aplicaciones en medicina, electrónica, biomateriales y producción de energía. Sin embargo, es importante considerar el riesgo en estos primeros estadios de desarrollo y prevenir el posible impacto negativo en la salud y el medio ambiente como consecuencia de una mala práctica. En la actualidad, las investigaciones se centran principalmente en las aplicaciones positivas de la nanotecnología, dejando de lado la investigación sobre las posibles consecuencias de su desarrollo masivo. Existen hasta el momento escasas publicaciones sobre el impacto del “descarte de los nanomateriales” en la salud [Park 2007] y el medio ambiente [Alvarez 2009, Dunphy Guzmán 2006].

Más allá del ámbito de la ciencia, la nanotecnología muestra numerosas implicaciones sociales, legales, culturales, éticas, religiosas, filosóficas y políticas. El desarrollo de la nanotecnología ha logrado introducir nuevos conceptos en medicina, comunicaciones, armamento, etc...; cuyas consecuencias son impredecibles y prácticamente imposibles de anticipar. Esto pone de manifiesto la preocupación por su efecto sobre la economía global y el desarrollo de armamentos en distintos países. Esto ha llevado a

distintos gobiernos como Estados Unidos (*National Nanotechnology Program* [EE.UU. 2011] o la Unión Europea (*Nanosciences and nanotechnologies: an action plan for Europe 2005-2009* [E.U. 2006]) a plantear la adopción de leyes especiales para esta nueva tecnología.

1.2. Materiales Semiconductores - Comportamiento en Función del Tamaño

1.2.1. Semiconductores de Band Gap Directo e Indirecto

Los sólidos inorgánicos cristalinos se dividen en función de su conductividad en tres clases: metales, semiconductores y aislantes. Los semiconductores poseen una conductividad eléctrica intermedia entre los conductores (metales) y aislantes (cerámicas). En estos sólidos macroscópicos las funciones de onda de los electrones (orbitales atómicos) se solapan para dar prácticamente niveles de energía continuos conocidos como bandas [Serway 2010]. Los semiconductores tienen una banda de valencia llena que está separada de la banda de conducción por una diferencia de energía (*band gap*) que se corresponde con la diferencia de energía entre el HOMO - LUMO para pequeñas moléculas. El *band gap* para los semiconductores está entre 0,5 y 3,5 eV, siendo en particular para el silicio de 1,12 eV. La excitación de los electrones de la banda de valencia a la de conducción en el silicio se logra por absorción de radiación con longitudes de onda < 1100 nm [Fahlman 2007] y este mismo valor de energía se emite en forma de fotón cuando los electrones pasan desde la banda de conducción a la banda de valencia [Rajeshwa 2002, Serway 2010].

En cristales, el estado de mínima energía en la banda de conducción (HOMO) y el estado de máxima energía en la banda de valencia (LUMO) están, cada uno de ellos, caracterizados por vectores k en la zona de Brillouin. El conjunto de estos vectores k representan el momento electrónico dipolar del sistema y por tanto la suma de estos vectores k tiene que conservarse cuando se producen transiciones de electrones [Joannopoulos 2008]. En estos sistemas se puede describir un electrón moviéndose a través de una red en un sólido como la modificación de la onda de un electrón libre bajo la influencia de cargas puntuales que representan los átomos. Para este modelo, el momento del electrón es proporcional al vector de onda k que se puede relacionar con la longitud de onda del electrón mediante la ecuación 1.

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (1)$$

Resolviendo la ecuación de Schrödinger para un electrón en términos de su longitud de onda (y por lo tanto del vector k), se encuentra que los niveles de energía en el caso unidimensional están definidos por la ecuación 2, donde E es la energía del electrón, m es su masa y k es su vector de onda.

$$E = \frac{h^2 k^2}{8\pi^2 m} \quad (2)$$

La estructura de bandas de energía puede expresarse en función del vector k . Según esta ecuación la forma de las bandas de energía es parabólica respecto a k . Los semiconductores en los que la mínima energía de transición entre la banda de conducción y la banda de valencia no necesita un cambio en este vector se denominan de transición directa o (*band gap* directo). Los semiconductores que necesitan un cambio en el vector k , entre ellos el silicio, para esta transición entre bandas se denominan de transición indirecta (*band gap* indirecto).

Las transiciones electrónicas con cambio de vector k están prohibidas formalmente, aunque defectos en la red cristalina y de la simetría pueden aumentar las probabilidades de estas transiciones. Cuando se irradia un semiconductor con fotones de mayor energía que su *band gap*, un electrón pasa de la banda de valencia a la banda de conducción, dejando una carga positiva denominada hueco. Este hueco se puede considerar como una partícula con su propia masa efectiva y carga en el interior del sólido. Es posible calcular la separación espacial entre un electrón y su hueco (un excitón) usando el modelo de Bohr (ecuación 3) donde r es el radio de la esfera definida por la separación tridimensional del par hueco-electrón; ϵ es la constante dieléctrica del semiconductor; m_r es la masa reducida del hueco-electrón; h es la constante de Planck y e es la carga de un electrón [Murphy 2002].

$$r = \frac{\epsilon \cdot h^2}{\pi \cdot m_r e^2} \quad (3)$$

La recombinación radiativa es un proceso donde un electrón que se encuentra en la banda de conducción neutraliza un hueco en la banda de valencia, liberando el exceso de energía como un fotón. Si el electrón está

cerca de la parte inferior de la banda de conducción y el hueco esta cerca de la parte superior de la banda de valencia (usualmente es así), este proceso es posible que se produzca de forma directa y se dice que el elemento tiene una transición de *band gap* directo. Al pasar el electrón de una banda a otra, la energía total del sistema se conserva por la liberación del fotón y el momento dipolar no cambia ya que los vectores k son los mismos. Un fotón con una energía cercana a la energía de transición tiene un momento cero.

Cuando la mínima diferencia de energía entre las dos bandas se produce para diferentes vectores k se dice que el elemento presenta transición indirecta (*band gap* indirecto) ya que para producirse la transición y cumplir la ley de la conservación del momento electrónico tiene que intervenir un fonón en el proceso. Las interacciones entre electrones, huecos, fonones y fotones son necesarias para satisfacer el principio de conservación de la energía y el momento del cristal. En estas transiciones el momento del fonón iguala la diferencia entre el momento del electrón y el momento del hueco. La participación del fonón hace este proceso mucho menos probable en cortos espacios de tiempo y como consecuencia la recombinación radiativa es mucho más lenta en transiciones indirectas ($\sim\mu s$) que en materiales con transiciones directas ($\sim ns$) [Kleinman 1965].

En el Esquema 2 se muestra cualitativamente como están distribuidas las bandas de energía en función del vector k . Para las transiciones directas, el mínimo de energía en la banda de conducción coincide con el momento cero, por tanto los fotones que tienen una energía mayor que la de transición se absorben directamente y se recombinan por la emisión de un fotón rápidamente. En el caso de *band gap* indirecto el mínimo de energía de la banda de conducción no se encuentra en el momento dipolar cero, por tanto, cada vez que se produce una transición (absorción o emisión) el proceso tiene que involucrar un fonón.

El hecho de que las recombinaciones radiativas con *band gap* indirecto son más lentas que las radiaciones con *band gap* directo tiene como consecuencia que en los elemento con *band gap* indirecto las recombinaciones radiativas son una pequeña proporción del total, siendo la mayoría no radiativas, teniendo lugar en puntos de defecto o bordes de grano. Por la misma razón, la luz con energía de los fotones cercana al *band gap* puede penetrar más en el material con *band gap* indirecto que en uno con *band gap* directo cuando la absorción de luz es debida a los electrones excitados a través del *band gap*.

Esquema 2: Estructura de bandas de valencia y emisión respecto al vector k para transiciones directas e indirectas.

Existen evidencias que indican que a medida que se disminuye el tamaño de las partículas de silicio se pasa de un *band gap* indirecto a un *band gap* directo [Kovalev 1998, Rosso-Vasic 2008b], atribuyendo importancia al grado de oxidación de la superficie de las nanopartículas y defectos superficiales favoreciendo las transiciones cuasi-directas [Kuntermann 2008].

1.2.2. Efecto del Tamaño

La disminución del tamaño de una partícula de semiconductor produce un aumento en el *band gap* y las bandas de energía llegan a ser un pseudo-continuo llegando a separarse en niveles de energía discretos. En cristales de tamaños comparables al radio de Borh las funciones de onda de los excitones están deslocalizadas sobre las partículas conociéndose este efecto como efecto de confinamiento cuántico [Kanemitsu 2002, Pradhan 2008]. Cada material tiene un radio de Bohr del excitón característico (Tabla 1) y este marca el tamaño máximo en el que se presenta este efecto [Fahlman 2007].

Tabla 1: Radio de Borh para distintos materiales semiconductores [Fahlman 2007].

Material	R_B (nm)	Material	R_B (nm)
Si	5,5	CdTe	10,0
CdS	2,8	ZnO	1,8
CdSe	6,1	PbS	40,0

Las partículas con tamaños menores que el radio del excitón de Bohr muestran efectos de confinamiento cuántico y por lo tanto fotoluminiscencia en el intervalo del visible del espectro electromagnético. A medida que las dimensiones del semiconductor se reducen hasta la escala nanométrica, el *band gap* aumenta de forma significativa debido al efecto de confinamiento cuántico, además se observa como las bandas de energía sufren una separación progresiva de los niveles energéticos que las forman mostrando transición hacia una estructura de niveles energéticos separados entre sí. En el Esquema 3 se muestra el efecto cualitativo de la variación del *band gap* a medida que cambia el tamaño del semiconductor, mostrándose para cristales macroscópicos, nanopartículas de 5 nm y nanopartículas de 1 nm [Murphy 2002].

Esquema 3: Variación de la energía del *band gap* y estructura de las bandas de semiconductores en función del tamaño.

El confinamiento cuántico en semiconductores con *band gap* directo ha sido ampliamente estudiado [Nirmal 1998] y se conoce que es producido por la relajación de las leyes de conservación de la energía y el momento dipolar, siendo responsable de los cambios en las propiedades ópticas y eléctricas de las nanopartículas de silicio. El concepto de confinamiento cuántico puede ser comprendido en términos del principio de incertidumbre de Heisenberg (ecuación 4).

$$\Delta p \cdot \Delta x \geq h \quad (4)$$

En cristales grandes de $\Delta x \sim 1$ cm, la incerteza del momento, Δp , es pequeña. Por tanto, el momento es un número cuántico bien definido y su conservación tiene que ser cumplida en las transiciones electrónicas. En el silicio, con transición indirecta de *band gap*, la recombinación de los electrones y los huecos requiere la creación y destrucción de fonones siendo esta transición no radiativa. Cuando el tamaño del cristal de silicio se aproxima a 1 nm, $\Delta x \rightarrow 1$ nm, Δp se expande deslocalizándose por una parte importante de la zona de Brillouin, la conservación del momento se relaja y las transiciones electrónicas (e.g. la absorción de un fotón con la formación de un par hueco-electrón ($e^- - h^+$) o su recombinación radiativa) son mucho más eficientes [Jutzi 2003].

1.2.3. Fotofísica de las Nanopartículas

Las nanopartículas de semiconductores de tamaños menores al radio de Bohr generan luminiscencia por transiciones energéticas de los electrones al igual que los colorantes orgánicos tradicionales. La diferencia radica en que en los semiconductores las transiciones electrónicas se producen entre bandas de energía, no niveles de energía discretos. El diagrama de energía de Perrin-Jablonski que se muestra en el Esquema 4 permite visualizar fácilmente los procesos que pueden tener lugar por la absorción de luz de una nanopartícula.

Las nanopartículas se pueden excitar mediante la absorción de un fotón que tenga suficiente energía para superar el *band gap* (*flecha azul*) o absorbiendo dos fotones a la vez en un intervalo menor a 10^{-15} segundos con la suma de energías superior al *band gap*, en este caso se denomina excitación bifotónica (*flechas rojas*) [He 2008].

Las nanopartículas pasan a un estado excitado singulete ($^1NP^*$). Esto implica que se excita un electrón a la banda de conducción y se genera un

huevo en la banda de valencia. El par ($e^- - h^+$) generado, denominado excitón, puede relajar por distintos mecanismos. En la relajación no radiativa el excitón se desactiva liberando calor al medio (flecha negra). Otro camino posible de desactivación al estado basal es emitiendo un fotón (línea verde). De forma parecida a los sistemas moleculares, que tienen bien definidas sus resonancias, los excitones pueden tener procesos de conversión interna desde estados energéticamente superiores a estados de menor energía por medio de acoplamientos vibracionales, ocurriendo este proceso normalmente en escalas de tiempo de pocas decenas de femtosegundos. Además, es posible el cruce entre sistemas cuando se producen en el material interacciones espín-orbital que normalmente tienen lugar en escalas de pocos cientos de picosegundos [Kovalev 2005a, Nirmal 1998].

Esquema 4: Diagrama de energía de Perrin-Jablonski [Celli 2010].

Por otra parte, también existe la posibilidad que el excitón reaccione con otras moléculas presentes en el medio actuando como oxidantes y/o reductores y dando lugar a la generación de ROS [Kovalev 2005a]. En nanopartículas ideales donde no existen defectos superficiales o internos de la red cristalina, la función de onda del electrón se deslocaliza entre toda la partícula mostrando, a su vez, una probabilidad de encontrar el electrón en la superficie despreciable, por tanto en este caso, el rendimiento cuántico de emisión debería ser cercano a uno y no presentarse efectos de *quenching* por especies químicas o el solvente que rodea la partícula [Nirmal 1998].

1.3. Nanopartículas de Silicio

1.3.1. Importancia del Desarrollo de las Nanopartículas Basadas en el Silicio

Las nanopartículas de elementos semiconductores y en especial las de silicio han despertado gran interés en la comunidad científica debido a sus múltiples potenciales aplicaciones. Como ya se mencionó, debido a su tamaño nanométrico, las nanopartículas de silicio presentan propiedades distintas de las que exhibe el silicio en forma atómica o formando cristales macroscópicos. Entre los elementos semiconductores, el silicio en forma de pequeñas estructuras nanométricas muestra perspectivas prometedoras como emisor de luz en dispositivos opto-electrónicos [Mialhe 2008] y fotónicos [Swihart 2007]. Cuando el silicio se encuentra formando nanoestructuras de diámetros menores de 5,5 nm, los requerimientos del momento electrónico dipolar se relajan como resultado del efecto de confinamiento cuántico, que a su vez, permite que sea un eficiente emisor de luz [Wilson 1993].

La fotoluminiscencia en nanoestructuras de silicio fue observada por primera vez en el año 1990 por Canham para el silicio poroso [Canham 1990]. A partir de este descubrimiento, los estudios sobre el silicio poroso y los cristales de silicio nanométricos han ido en aumento debido a sus propiedades fotofísicas únicas [Cullis 1997]. Esto se refleja en el creciente número de trabajos publicados cada año desde 1990 hasta el momento, representado en la Figura 1 [Scopus 2010].

Figura 1: Numero de publicaciones relacionadas con nanopartículas de silicio durante los últimos 20 años.

1.3.2. Estado Actual del Conocimiento

En la actualidad, no existe una descripción inequívoca de las nanopartículas de silicio, tanto desde el punto de vista de su morfología como de sus propiedades. Esto es consecuencia de la sensibilidad de sus propiedades al método de síntesis. A medida que el tamaño del cristal de silicio se reduce a unos pocos nanómetros (e.g. 1-10 nm), el confinamiento cuántico, el acoplamiento fonón-excitón, la degeneración de la banda de valencia, las interacciones de intercambio de espín electrón-hueco y las reglas de selección óptica sufren modificaciones que afectan fuertemente a la actividad óptica y electrónica [Smith 2005].

Existe una dependencia de la emisión con el tamaño, observándose el aumento de la luminiscencia hacia el UV a medida que el tamaño de las nanopartículas decrece. Un cambio en el tamaño de 4,8 a 2,8 significa un corrimiento del pico de emisión desde 900 a 610 nm [Ledoux 2000, Takeoka 2000]. Controlando el tamaño adecuado de nanopartícula, puede controlarse la longitud de onda de emisión luminiscente en el visible [English 2002]. Estudios realizados con nanopartículas de 4,1 nm de diámetro sintetizadas mediante pirolisis de silanos, muestran que el espectro de fotoluminiscencia

presenta perfiles casi gaussianos y cuando las partículas reducen su tamaño, mediante un tratamiento con HF, el máximo de emisión se desplaza hacia el UV y la amplitud del pico aumenta [Ledoux 2001]. En la Figura 2 se muestra cualitativamente como la luminiscencia en el espectro visible varía en función del tamaño de partícula.

Figura 2: Variación de la luminiscencia de las nanopartículas de silicio con el tamaño de partícula.

Además del tamaño de las nanopartículas existen evidencias en la literatura sobre como el número de defectos superficiales, su estado de oxidación y el recubrimiento influyen en la emisión. La misma superficie puede formar estados que tienen la capacidad de actuar como centros de recombinación para los excitones [Kuntermann 2008, Yang 1999]. Estudios llevados a cabo para nanopartículas de 1,0 a 1,5 nm de tamaño [Zhou 2003] demuestran que el oxígeno tiene una interacción directa con los orbitales de silicio cambiando de forma apreciable el HOMO y el LUMO respecto a las mismas partículas con terminaciones de hidrógeno. Por lo tanto, la emisión de las nanopartículas se desplaza desde los 3,0 eV (emisión en el azul) hacia los 2,0 eV (emisión en el amarillo-rojo) cuando son oxidadas. Para estos tamaños, el estado excitado muestra una mayor dependencia de los átomos superficiales que del volumen de silicio. El efecto de oxidación es opuesto al predicho por el modelo de confinamiento cuántico con el tamaño, el cual considera que solo el número de átomos de silicio en el corazón del cristal es responsable de la fotoluminiscencia. Si esto fuese así, el aumento de la capa de átomos de silicio oxidados a SiO_2 produce una disminución del número de átomos de silicio del núcleo y por lo tanto se produciría un desplazamiento de

la emisión hacia energías mayores. Estudios realizados comparando suspensiones estables de nanopartículas de silicio con una monocapa orgánica en su superficie de 5 nm de diámetro con emisión en el rojo ($\lambda_{em}^{max} \sim 600$ nm) y sometidas a una posterior oxidación ($\lambda_{em} \sim 460$ nm) están de acuerdo con el modelo de confinamiento cuántico dependiente del tamaño [Hua 2006]. La presencia de oxígeno en la superficie es una razón de evidente discrepancia.

Asimismo, también se observó como la luminiscencia de las nanopartículas puede ser apagada por la presencia de pequeñas cantidades de ácido, base o radicales. La disminución de la fotoluminiscencia en el rojo por pequeñas concentraciones de trietilamina o de amonio en solución se explica por un cambio en el estado de protonación del centro fotoluminiscente. Por el contrario, en el caso de partículas que emiten en el azul, la trimetilamina no desactiva la luminiscencia. Esto se interpreta como una indicación de que los centros involucrados en la emisión roja no contribuyen en la emisión azul [Fojtik 1994, 2006]. Se realizaron gran cantidad de cálculos teóricos con el fin de elucidar la naturaleza de la fotoluminiscencia [Allan 1996, Kimura 1999] observándose como esta depende de los procesos de síntesis y post-tratamiento [Delley 1995, Draeger 2004], así como de la naturaleza química del recubrimiento superficial [Wolkin 1999].

Cálculos teóricos usando la teoría de DFTB sobre la estructura electrónica de las partículas de ~ 1 nm con distintos recubrimientos superficiales muestran como la diferencia entre HOMO - LUMO varía en 3,2 y 3,3 eV, respectivamente cuando las partículas están totalmente recubiertas con hidrógeno ($Si_{35}H_{36}$) y cloro ($Si_{35}Cl_{36}$). Estos resultados correlacionan aceptablemente con los datos experimentales, aunque resta realizar estos cálculos con estructuras de mayor tamaño donde se espera que el recubrimiento no tenga tanta influencia en la nanopartícula [Martínez 2010]. Cálculos teóricos utilizando DFTB sin restricciones en la optimización de la geometría para nanopartículas de Si_{35} y Si_{66} muestran como la oxidación superficial disminuye el *band gap* en 2,4 eV para Si_{35} y en 1,5 eV para Si_{66} [Zhou 2003]. A pesar que estos estudios están de acuerdo en predecir como la oxidación de la superficie induce importantes cambios en las propiedades espectroscópicas, todavía queda mucho trabajo por hacer para comprender el efecto de la oxidación superficial y las propiedades ópticas de pequeñas partículas.

1.3.3. Potenciales Aplicaciones en los Sistemas Biológicos

Los compuestos nanoparticulados de elementos de los grupos II-VI [Alivisatos 2005] junto con los fluoróforos orgánicos (e.g. rodaminas, cianinas y fluoresceínas) están muy desarrollados como biomarcadores a nivel de investigación [Michalet 2005, Pelley 2009]. El principal obstáculo para su implementación real radica en que ambas familias de compuestos presentan importantes problemas asociadas a su naturaleza química. Los fluoróforos orgánicos tienen inconvenientes debido a su baja estabilidad, dificultad en la modulación de la longitud de onda de emisión y pequeño corrimiento de Stokes [Eckhoff 2006]. Como alternativa, aparecen las nanopartículas del grupo II-VI que muestran una mayor estabilidad y fácil modulación de la longitud de onda de emisión; sin embargo muestran graves problemas centrados principalmente en la liberación de iones altamente nocivos (e.g. Cd^{2+}) cuando los recubrimientos no son estables en el entorno biológico [Alivisatos 2005]. Para minimizar los efectos de disolución de estos iones, las partículas se recubren con una capa adicional de ZnS, la cual aumenta su tamaño haciéndolas menos accesibles a la incorporación por parte de las células y dificultando su eliminación del organismo [Kobayashi 2009]. A pesar de este recubrimiento, no se garantiza la estabilidad de las propiedades ni un efectivo y completo aislamiento de los elementos tóxicos que liberan las nanopartículas hacia el medio biológico [Alivisatos 2005, Lovrić 2005b].

A raíz de los significativos progresos realizados en los estudios de las nanopartículas del grupo II - VI se empezó a desarrollar el interés por las potenciales aplicaciones de las nanopartículas de silicio [Michalet 2005, Trindade 2001]. Estas nanopartículas presentan importantes ventajas sobre las partículas del grupo II - VI, ya que muestran las propiedades fluorescentes debido al confinamiento cuántico de los elementos semiconductores y no contienen elementos que puedan presentar toxicidad. Por otra parte, debido a su pequeño tamaño ($< 5 \text{ nm}$), estas partículas son capaces de penetrar las membranas celulares o los núcleos [Clarke 2006, Eckhoff 2006] siendo este un requisito para su utilización como biomarcadores.

La superficie de las nanopartículas de silicio es fácil de modificar con distintos agentes químicos que hacen posible su bio-conjugación [Buriak 2002]. En la bibliografía se postula que las partículas recubiertas con polímeros son bio-inertes [Reboredo 2005] y pueden conducir al desarrollo de detectores bio-compatibles de pequeños tamaños [Ding 2002]. La Tabla 2

compara algunas propiedades de las nanopartículas de silicio y de las binarias (CdSe, ZnS, InP, GaAs) con los fluoróforos orgánicos. En conjunto, las nanopartículas de silicio muestran características más favorables para su utilización como bio-marcadores que los otros compuestos [Eckhoff 2006].

Tabla 2: Comparación de las propiedades de los fluoróforos orgánicos, nanopartículas binarias y nanopartículas del grupo IV [Eckhoff 2006].

Tipo	Fluoróforos Orgánicos	Nanopartículas Binarias	Nanopartículas Grupo IV
Ejemplos	Fluoresceína Rodamina	CdSe, InP, GaAs	Silicio, Germanio
Tamaño	0,5 -10 nm	10 - 20 nm	1 - 10 nm
Φ_F	> 90 %	> 50 %	> 80 %
Fotoestabilidad	> 6 meses	No hay datos	Meses
Blanqueo	No hay datos	~ μ s	No hay datos
Citotoxicidad	No	Alta	Baja toxicidad inherente
Ventajas	Bien caracterizadas Homogéneas	Emisión regulable	Emisión regulable Estrecha banda de emisión
Desventajas	Pequeño corrimiento de Stokes	Gran tamaño (multicapa)	No bien caracterizadas
Otras propiedades	Estrecha excitación (marcador activo)	Amplio espectro excitación (marcador pasivo)	Bio-conjugables Interactivo marcador

1.4. Objetivos

Se plantea como hipótesis de esta tesis que: “las nanopartículas de silicio tienen potencial utilidad como marcadores biológicos y/o agentes terapéuticos”.

Para desarrollarla, en una primera etapa se realizó la síntesis de las nanopartículas con las cuales se llevaron a cabo todos los estudios posteriores. Para este objetivo se evaluaron distintos métodos de síntesis eligiendo el más adecuado para nuestra accesibilidad de equipos y adaptándolo a nuestros requerimientos específicos. Una vez obtenidas las nanopartículas se procedió a la modificación superficial con distintos agentes químicos, determinándose su adecuado recubrimiento y distribución de tamaños. Posteriormente se procedió a la caracterización de sus propiedades fotofísicas en función de los diferentes recubrimientos superficiales y del solvente en régimen por excitación mono- y bifotónica.

Se analizó la capacidad de las partículas de generar especies reactivas de oxígeno y de reducir diferentes especies químicas mediadas por la luz. Asimismo, se han planteado los mecanismos por los que se producen estos fenómenos.

Paralelamente a los estudios experimentales se han realizado cálculos teóricos para obtener las configuraciones geométricas más estables en función de su multiplicidad y su recubrimiento con átomos de distintos elementos. Se calculó el espectro electrónico UV-Vis y el espectro vibracional de las partículas de tamaños y recubrimientos similares a las obtenidas experimentalmente.

Se evaluó la toxicidad de las nanopartículas recubiertas con metacrilato de metilo en células C6 de glioma de rata en función de la concentración de partículas, del tiempo de incubación y de irradiación en el IR.

Capítulo 2:

Equipamiento, Materiales y Métodos

2.1. Solventes, Gases y Reactivos

En este trabajo se utilizaron los solventes que se describen en la Tabla 3 tal como se recibieron. Se procedió a reducir su contenido en agua mediante el uso de tamices moleculares de tamaño de malla 4 Å (Anedra). El agua calidad milli-Q ($>18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$, $< 20 \text{ ppb}$ de carbono orgánico) utilizada se obtuvo con un sistema de purificación de agua MILLI-Q® de filtros y resinas de intercambio iónico (Millipore®).

Tabla 3: Solventes

Reactivo	Fórmula	Pureza (%)	Marca
Agua deuterada	D ₂ O	99,9	Aldrich
Ciclohexano	C ₆ H ₁₂	> 99	U.V.E.
Cloroformo	CCl ₃ H	99,99	J.T.Baker
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	99,9	J.T.Baker
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	99,5	Carlo Erba
Metanol	CH ₃ OH	100	J.T.Baker
Tetracloruro de Carbono	CCl ₄	> 99	Sintorgan
Tolueno	C ₇ H ₈	99,98	J.T.Baker

Tabla 4: Reactivos utilizados

Reactivo	Fórmula	Pureza (%)	Marca
1,10-Fenanthrolina	C ₁₂ H ₈ N ₂	Analítico	Anedra
9,10-Difenilantraceno	9,10-DPA	> 97	Sigma-Aldrich
Ácido Acético Glacial	CH ₃ COOH	99	Tejon
Ácido Fluorhídrico	HF	48	Merck
Ácido Nítrico	HNO ₃	65,00	Anedra
Ácido orto-fosfórico	H ₃ PO ₄	85	Sigma-Aldrich

Reactivo	Fórmula	Pureza (%)	Marca
Ácido orto-fosfórico	H ₃ PO ₄	85	Riedel-de Haen
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	95-98	Cicarelli
Alcohol furfurílico	C ₅ H ₆ O ₂	99	Sigma-Aldrich
Alcohol Polivinílico	(C ₂ H ₄ O) _x	99	Aldrich
Azida de sodio	NaN ₃	-	Sigma-Aldrich
Cloroformo	CCl ₃ H	99,99	J. T. Baker
Cloruro de Mercurio	Cl ₂ Hg	96	Merck
Cloruro de Mercurio	HgCl ₂	96	Merck
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	99	Merck
Formaldehido	CH ₂ O	-	Biopack
Fosfato de potasio diácido	KH ₂ PO ₄	99,3	J. T. Baker
Fosfato de potasio monoácido	K ₂ HPO ₄	99,7	J. T. Baker
Hidroxido de potasio	KOH	85	Anedra
Hidroxido de sodio	NaOH	98,2	J. T. Baker
Ioduro de potasio	KI	99,8	Biopack
Metil Viologeno dicloruro	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ N ₂	98	Sigma-Aldrich
Permanganato de Potasio	KMnO ₄	Analítico	Mallinckrodt
Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂	30	Merck
<i>Rojo Neutro</i>	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	> 90	Invitrogen

Los gases se hicieron circular por una trampa inmersa en nitrógeno líquido para eliminar la humedad residual antes de ser usados. Los gases utilizados fueron: Nitrógeno (calidad cuatro bandas), Argón, Aire sintético y oxígeno suministrados por "La Oxígena S.A.", Argentina.

2.2. Material Común de Laboratorio

La determinación de masa se realizó mediante una balanza electrónica marca A&D modelo ER-182A de $\pm 0,1$ mg de precisión.

Se utilizó un equipo de ultrasonidos marca TESLAB S.R.L. Modelo TB04TA con una potencia de 160 W y una frecuencia de 40 kHz.

Las medidas potenciométricas se realizaron con un electrodo selectivo de pH (Consort C832) y un electrodo selectivo de O_2 multicanal (CONSORT C932) unido a un ordenador.

La intensidad aplicada durante la síntesis se reguló con un potencióstato LYP M6 con señal triangular para VC con control de corriente de $\pm 0,01$ mA.

2.3. Técnicas y Equipamiento

2.3.1. Estudios de Adsorción

Las isothermas de absorción se obtuvieron con equipamiento volumétrico de vidrio pirex conectado a un sistema de vacío mediante una bomba de aceite D4A-type Trivac Leybold Heraeus y una bomba difusora de Hg.

Las medidas de presión se llevaron a cabo usando dos transductores sensibles a diferentes intervalos de presión. Para bajas presiones se utilizó un modelo MKS 122AA-00010AB con un lector modelo MKS PDR-C-2C con un intervalo de sensibilidad de 0,001 a 10 mm Hg. Para altas presiones se utilizó un modelo OMEGA PX621 con un lector modelo PDR-5B con un intervalo de sensibilidad de 0,25 a 2300 mm Hg.

2.3.2. Estudios de Absorción

La absorción es el proceso mediante el cual un material incorpora la energía de un fotón. La ley de Lambert - Beer establece que la absorbancia es la dependencia logarítmica entre la transmisión (T) de luz a través de una sustancia y a su vez, también se define como el producto del coeficiente de absorción de la sustancia (ϵ) por su concentración y la distancia del camino óptico de la luz (ℓ) a través del material. Las ecuaciones 5 - 8 muestran las relaciones entre la absorbancia y el factor de absorción (P/P_0) que será

posteriormente utilizada para los cálculos de rendimientos cuánticos [Lakowicz 1999].

$$A(\lambda) = -\ln(T(\lambda)) \quad (5)$$

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot l \cdot c \quad (6)$$

$$1 - T(\lambda) = 1 - \frac{P(\lambda)}{P_0} \quad (7)$$

$$\frac{P(\lambda)}{P_0} = 1 - 10^{-A(\lambda)} \quad (8)$$

Donde $P(\lambda)$ es el poder radiante luego de pasar por el camino óptico l (también conocido como poder radiante transmitido) y P_0 es el poder radiante incidente.

Las medidas de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro de doble haz Cary 3 UV-Visible (Varian, Australia), con ancho de banda entre 0,2 y 4,0 nm según el ancho de rendija seleccionado y velocidad de barrido de 300 nm/min. Las muestras se emplazaron en celdas de cuarzo Hellma de 1,0 cm de camino óptico. Las soluciones saturadas de gas N₂, O₂ o Argón se realizaron burbujando durante 15 minutos. Las soluciones saturadas en aire se obtienen dejando la muestra abierta al ambiente.

2.3.3. Estudios de Composición Superficial

Infrarrojos por Transformada de Fourier

Los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) se obtuvieron con un equipo Bruker EQUINOX 25. Se registraron los espectros entre 4000 y 400 cm⁻¹ con resolución de 1 cm⁻¹. Los espectros de reflexión total infrarroja atenuada (ATR-FTIR) se obtuvieron mediante un equipo *Nicolet 380 spectrometer* usando un cristal de ZnSe con un ángulo de incidencia del haz de 45°. Se tomaron promedios de 64 medidas con una resolución de 4 cm⁻¹. Se utilizaron como soporte de las muestras tanto pastillas de KBr como cristales de silicio <100> con las muestras sembradas en su superficie.

La preparación de la pastilla se realiza prensando con una presión de 3 toneladas/cm² sobre una mezcla de KBr con nanopartículas previamente secadas en estufa a 40° C y 0,2 atm. Debido a la poca cantidad de muestra de

la que se dispone y teniendo en cuenta que el cristal de silicio es transparente a las energías en las que se mide el espectro infrarrojo se utilizó este como soporte. Para ello se realiza una siembra de la suspensión de partículas gota a gota y constantemente se evapora el solvente en atmosfera inerte de Argón a temperatura ambiente. Se añaden gotas de la muestra hasta la obtención de espectros con una relación señal/ruido adecuada. Se utilizó como blanco una oblea de cristal de silicio sin sembrar.

La ventaja de utilizar la pastilla de KBr como soporte radica en su sencilla y rápida preparación. Además, al tener gran cantidad de muestra los espectros se obtienen bien definidos y con una buena calidad señal/ruido. Este método no puede aplicarse cuando se dispone de unos pocos microgramos de muestra debido a la pobre relación señal /ruido. En este caso se utiliza la técnica de siembra.

Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X

La medidas de Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS) fueron obtenidas bajo ultra alto vacio con un espectrómetro XR50 Specs GmbH con Mg K(α) como fuente de excitación y un analizador de energía de media esfera PHOIBOS 100. Se calibró con Au4f 7/2 y Cu2p 3/2 con energías de enlace de 84,00 y 933,67 eV, respectivamente.

La preparación de la muestra se efectuó depositando 3 gotas (pipeta Pasteur) sobre un sustrato de Au-robax, partiendo de la mezcla líquida de aspecto límpido e incoloro que contenía nanopartículas de silicio junto con tolueno. La cantidad de mezcla utilizada sobre el sustrato corresponde a la mínima necesaria para la apreciación a simple vista de un depósito de aspecto claro.

Medidas del Ángulo de Contacto

El cambio de polaridad en la superficie de las partículas según su recubrimiento se determinó mediante medidas de ángulo de contacto de una gota de agua sobre las nanopartículas realizado con un gonómetro ramé-hart Modelo 500 (ramé-hart instrument co., USA) que utiliza el *Softward DROPimage Advanced v2.2* para analizar las imágenes. Los experimentos fueron realizados en atmosfera de aire y a temperatura ambiente.

El equipo consta de una superficie donde se deposita la muestra, una aguja perpendicular a este plano que deposita una gota que es iluminada por

una lámpara para obtener una buena imagen y una cámara fotográfica alineada a 90° con la superficie donde se deposita la gota. El ángulo que forma la gota con la superficie una vez depositada se determina a partir de la fotografía que realiza la cámara.

Figura 3: Gonómetro ramé-hart Modelo 500.

2.3.4. Estudios de Luminiscencia Estacionaria

Los espectros de excitación y emisión a temperatura ambiente se obtuvieron mediante un equipo JOBIN-YVON SPEX FLUOROLOG FL3-11 con LIFETIME TCSPC con 2 nm de ancho de rejilla de entrada y de salida. Se utilizó un paso de longitud de onda de barrido 1 nm y un tiempo de integración en cada paso de 0,3 segundos. Todos los espectros se corrigieron por la sensibilidad dependiente del detector y la fuente usando los espectros de patrones de calibración Camarina 115 y 9,10-DPA en ciclohexano [Lakowicz 2006] y por la dispersión Raman usando el espectro del solvente.

Los espectros de emisión estacionaria a 77 K se obtuvieron con un espectrofluorómetro PTI Modelo QM-1 spectrofluorimeter (London, Ontario, Canada) equipado con un accesorio Cold Finger Dewar. La detección de la luz emitida se realiza en ángulo de 90° mediante un tubo fotomultiplicador conectado a una PC.

Todas las medidas se realizaron después de someter a las suspensiones a un baño de ultrasonidos durante 30 minutos para asegurarnos que las partículas estaban totalmente desagregadas.

Figura 4: Espectrofluorómetro JOBIN-YVON SPEX FLUOROLOG FL3-11 con LIFETIME TCSPC.

2.3.5. Estudios de Luminiscencia Resuelta en el Tiempo

Medidas en el Dominio de Frecuencias

Las determinaciones de emisión y anisotropía resueltas en el tiempo se realizaron mediante la técnica de fluorometría en el dominio de frecuencias. Se utilizó un fluorómetro con modulación y multifrecuencia de correlación de fase basado en un compartimento auto muestreador ISS Koala, con LEDs modulables (280, 295, 370, 405, 471, 443, y 630 nm), y fotomultiplicador modulable Hamamatsu (hasta 500 MHz). Para los experimentos con las nanopartículas se utilizó como fuente de excitación un diodo emisor de $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$. La luz de excitación pasa a través de un filtro de $(405 \pm 10) \text{ nm}$. Cuando no se realizaron medidas de anisotropía los polarizadores se utilizaron en posición de ángulo mágico ($54,7^\circ$).

Medidas en el Dominio del Tiempo

Se realizaron determinaciones de emisión y anisotropía resuelta en el tiempo utilizando la técnica de fluorometría en el dominio del tiempo. Las medidas de tiempo de vida fueron llevadas a cabo mediante los siguientes equipos: un *single photon counting* correlacionado en el tiempo Edinburgh Instruments OB 900 con excitación LEDs a 375 nm y un *single photon counting* correlacionado en el tiempo JOBIN-YVON SPEX FLUOROLOG FL3-11 con LIFETIME TCSPC con excitación LED a 341 nm. El espectro resuelto en el tiempo del LED, utilizado para la posterior deconvolución de las señales del LED con las de la muestra, se determinó siguiendo las recomendaciones del fabricante usando una suspensión de sílica coloidal Ludox (SM-30, 30 % SiO₂ en agua a pH 10,2 con un diámetro de partícula medio de 7 nm y un área superficial de 345 m²/g, Sigma-Aldrich). El ajuste de los decaimientos de luminiscencia resueltos en el tiempo fue realizado optimizando los valores de Chi cuadrado para obtener los parámetros.

2.3.6. Emisión con Excitación Bifotónica

Los espectros de emisión con excitación bifotónica se obtuvieron utilizando un láser de Titanio:Zafiro (Ti:Za) *Kapteyn-Murnane Labs* bombeado con un láser de Nd:Vanadato 4,5 W. Este dispositivo permite generar pulsos de luz ultracortos (decenas de femtosegundos) de forma más sencilla que con otros láseres pulsados, y además permite sintonizarlos, modificando la longitud de onda central del pulso (el láser utilizado se sintonizó entre 772 nm y 803 nm, aproximadamente).

Como se observa en Figura 5 el haz de luz sale del laser de Titanio:Zafiro y es dirigido mediante un sistema de espejos y colimadores hacia la celda de la muestra. El haz es focalizado en el punto medio de la muestra y se recoge la emisión a 180° llevando paralelamente al monocromador el haz de excitación y el haz de emisión. En el monocromador se separan las distintas longitudes de onda y mediante un fotomultiplicador (PTM), un detector y una PC se obtiene la señal.

Figura 5: Montaje experimental para la excitación de las muestras de forma bifotónica y detección de la emisión.

2.3.7. Espectroscopia de Correlación de Fluorescencia

Fundamentos

La correlación de las fluctuaciones no es una técnica nueva. En 1911 Svedberg [Svedberg 1911] midió, a partir de la correlación en la cantidad de partículas, ecuación 9, el coeficiente de difusión de nanopartículas de oro en solución. Además demostró que la variación en la cantidad de partículas dentro de un volumen de observación abierto sigue una distribución de Poisson cuando las partículas no interactúan entre sí. En este experimento, el observador contaba a "ojo" la cantidad de partículas que entraban al volumen de observación por segundo, Figura 6. La evolución de la cantidad de partículas en función del tiempo se muestra en la Figura 6(a). Es claro que esta manera de representar los datos no permite obtener información de la dinámica de las partículas. Sin embargo, un análisis cuidadoso de las fluctuaciones de la señal permite enfatizar aspectos que no son evidentes en la serie temporal de los datos originales.

Figura 6: Datos del trabajo de Svedberg. (a) Cantidad de partículas detectadas en intervalos de 1,5 s de duración; (b) histograma de los datos [Estrada 2009].

La función de correlación temporal, $\tilde{G}(\tau)$, permite obtener el tiempo característico de las fluctuaciones. Esto se hace comparando la señal con una copia de la misma señal desfasada un tiempo, τ . En el experimento de Svedberg se usa la correlación en el número de partículas que se define como:

$$\tilde{G}(\tau) = \frac{\langle N(\tau) \cdot N(t + \tau) \rangle}{\langle N(\tau) \rangle^2} = \frac{\langle \delta N(\tau) \cdot \delta N(t + \tau) \rangle}{\langle N(\tau) \rangle^2} + 1 = G(\tau) + 1 \quad (9)$$

Donde $\delta N(\tau) = N(t) - \langle N(t) \rangle$ es la fluctuación con respecto al valor medio de la cantidad de partículas detectadas en el instante t , $\langle N(t) \rangle$ es el valor medio temporal de la cantidad de partículas, y donde, en general, $\langle \rangle$ significa promediar sobre todos los valores de t . En la literatura se suele hablar de la función de correlación para hacer referencia únicamente a la parte temporal de la ecuación 9, $G(\tau)$.

En su trabajo de 1911, Svedberg sugirió el uso de estas técnicas para el estudio de moléculas fluorescentes, sin embargo, pasaron 60 años hasta los primeros experimentos de este tipo. La espectroscopia de correlación de la fluorescencia (FCS) fue introducida originalmente por Elson, Magde y Webb a comienzos de los 70' [Magde 1972, 1974]. La FCS usa la función de correlación para caracterizar las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia originada en un volumen de observación. En un sistema en donde las moléculas solo

difunden, el análisis de las fluctuaciones permite determinar el coeficiente de difusión y la cantidad de moléculas en el volumen observado. Si se conocen la forma y el tamaño del volumen de observación, se puede calcular la concentración local de moléculas. Este método se utilizó para calibrar la concentración de muestras fluorescentes en solución y en membranas [Estrada 2009].

En los experimentos de FCS la señal de interés es la intensidad de fluorescencia, $I(t)$, y la correlación de la intensidad de fluorescencia se define como:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(\tau) \cdot \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(\tau) \rangle^2} \quad (10)$$

En un experimento típico de FCS se mide $I(t)$ como la cantidad de fotones detectados en intervalos de tiempo sucesivos. La Figura 7 muestra el esquema de un experimento de FCS donde la fluctuación de la señal es producida por la difusión de moléculas fluorescentes dentro del volumen de observación. Las posibles trayectorias de las moléculas, la serie temporal y la función de correlación también se muestran en la Figura 7.

Figura 7: Esquema de un experimento típico de FCS. El elipsoide representa el volumen de observación posibles trayectorias seguidas por las moléculas al atravesar el volumen de observación. (b): Serie temporal de la señal medida. Las moléculas son excitadas continuamente durante su residencia en el volumen de observación. Dada una molécula, la trayectoria determina la cantidad de fotones detectados por unidad de tiempo. (c): Función de correlación para la señal medida en (b). El tiempo característico obtenido es de 36 μ s [Estrada 2009].

En términos estadísticos, $G(\tau)$ da la probabilidad de detectar un fotón a $t = \tau$ si se detectó un fotón de la misma molécula a $t = 0$. Cuando los fotones detectados provienen de dos moléculas que no interactúan entre sí, es decir que no hay una correlación entre los fotones, este evento contribuye a una señal de fondo constante en $\tilde{G}(\tau)$. Si, en cambio, los fotones detectados provienen de la misma molécula (están correlacionados entre sí) dan lugar a una componente dependiente del tiempo en $\tilde{G}(\tau)$. Vale la pena notar que aún en el caso en que la cantidad de fotones emitidos por una molécula en el intervalo de tiempo ΔT sea perfectamente constante, debido a la naturaleza estocástica del proceso de detección, la cantidad de fotones detectados no será constante. La probabilidad de obtener n fotones en el intervalo de tiempo, Δt , fluctúa siguiendo una distribución de Poisson, ecuación 11.

$$\frac{\sqrt{\langle (n - \langle n \rangle)^2 \rangle}}{\langle n \rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle n \rangle}} \quad (11)$$

Donde $\langle n \rangle$ es el número medio de fotones detectados en el intervalo de tiempo Δt . Se puede demostrar que este ruido en la detección tampoco contribuye al comportamiento temporal de la correlación. Es decir, la dependencia temporal de $G(\tau)$, está determinada únicamente por los eventos que están correlacionados entre sí. Un cambio conformacional de las moléculas, la variación en la cantidad de moléculas presentes en el volumen de estudio, $\langle n \rangle$, o cualquier otro proceso fisicoquímico que tenga como consecuencia un cambio en las propiedades de emisión o de difusión de la molécula se pueden estudiar por FCS. Algunos de estos procesos se muestran en la Figura 8.

Cada uno de estos fenómenos tiene asociado un tiempo de correlación característico que puede ir desde algunas decenas de nanosegundos a varios segundos como se muestra a continuación. En la región de los nanosegundos aparecen los procesos de *antibunching*. El fenómeno de *antibunching* está vinculado al tiempo necesario para re-excitar a una molécula una vez que emitió un fotón. Esto produce una disminución en $G(\tau)$ a tiempos más cortos que el tiempo de vida del estado excitado emisor de la molécula. En la región de los ns aparecen los movimientos rotacionales de moléculas pequeñas en solución acuosa y a los μs , aparecen procesos rápidos de isomerización y

pasaje al triplete. A partir de algunas decenas de μs y hasta los segundos, los fenómenos de difusión dominan la forma de $G(\tau)$. En general, una molécula en solución está sometida a varios de estos procesos simultáneamente. En ese caso, cada uno aportará un tiempo característico diferente. Si además los tiempos característicos están suficientemente separados cada fenómeno se observará como un "hombro" en la función de correlación.

Figura 8: Fenómenos que pueden estudiarse por FCS y el intervalo temporal asociado: difusión, flujo, movimiento rotacional Browniano y reacciones. Figura modificada de [Schwille 2002, Valeur 2002].

Los procesos de excitación bifotónicos son adecuados para este tipo de análisis, ya que son necesarias mayores intensidades para inducir la excitación de los colorantes y el haz tiene que ser colimado en un punto generando volúmenes del sistema de los nL. Por lo tanto, el volumen de excitación efectivo está restringido a la porción central del punto focal donde la intensidad es la más alta, lo que permite observar la fluctuación de la emisión luminiscente de soluciones nanomolares de fluoróforos.

Bajo estas condiciones, las medidas de cuentas de fotones en el tiempo $P(t)$, traen fluctuaciones de luminiscencia, $\delta P(t)$, alrededor del valor medio que es auto-correlacionado con el tiempo. La función de correlación de luminiscencia $G(\tau)$ contiene la información de la amplitud de fluctuaciones así como su persistencia, lo cual trae la información de tamaño, brillo y densidad numérica [Akçakir 2000]. Las muestras se mantienen en equilibrio térmico para que el proceso muestre fluctuaciones estadísticas alrededor del estado

de equilibrio. A partir de la forma de la función de auto-correlación $G(\tau)$ se pueden obtener los coeficientes cinéticos correspondientes a cada una de las funciones (e.g. coeficiente de difusión y/o velocidades químicas) que determinan las dinámicas de su relajación.

De la expresión de $G(\tau)$ se derivan las constantes de las fluctuaciones cinéticas que en este caso se limitan al coeficiente de difusión, ya que no se registra reacción química en las partículas. En principio, cada uno de los coeficientes cinéticos para todos los procesos (solo coeficientes de difusión en nuestro caso) contribuyen al decaimiento de $G(\tau)$ y todos pueden ser determinados mediante el análisis de la función de correlación [Krichevsky 2002].

Cuando solo existe una sustancia emisora que difunda, la función de correlación obtenida se puede ajustar a la ecuación 12, donde se observa como la función de auto-correlación a tiempo cero $G(0)$ es la inversa del número medio de fluoróforos en el interior del volumen de análisis.

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \quad (12)$$

Diseño Experimental

Los experimentos se llevaron a cabo en los laboratorios del Dr. Gratton en Irvine (California) con un microscopio Olympus IX70 equipado con un dispositivo UPlus Sapo Olympus 60x, 1,20 V y un objetivo acoplado a un laser en el infrarrojo cercano Coherent Chameleon-Ultra femtosecond Ti-sapphire, un escáner en espejo Cambridge Technologies y un fotomultiplicador Hamamatsu H7422P-40. El laser genera pulsos de 150 fs de duración con una frecuencia de repetición de 80 MHz y 2,53 W a 774 nm.

La luz de excitación fue filtrada por un filtro 2 Schott RG715 para eliminar la luz de longitudes de onda menor de 715 nm. La luz emitida pasa por tres filtros (HQ 520 / 90M, un dicroico 435 / 70 M, y un 470 / 30M) para detectar la componente en el intervalo de 440 a 500 nm en un dispositivo de cuenta de fotones. Los datos se recolectaron con una frecuencia de 128 kHz y un tiempo de base de $7,81 \times 10^{-6}$ s para obtener 1023 ciclos en un tiempo total de 261,888 s.

Un anillo de Teflon de 1 - 2 mm de radio fue usado para evitar los efectos de evaporación. El volumen de excitación experimental se determina

utilizando la función de auto-correlación de la Rodamina 110, medida con el mismo montaje experimental y condiciones del foco, y tomando el coeficiente de difusión de la Rodamina 110 $D = 3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 / \text{s}$ [Müller 2003] y el foco del laser de $0,37 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro. Para el análisis de las señales se utilizaron los programas SimFCS and Globals desarrollados por la Universidad de California en Irvine (UCI). La relación de señal/ruido se define como las cuentas de fotones de moléculas excitadas en el volumen de foco dividido por la cuenta de fotones de la señal de fondo (e.g. solvente). Este valor es de ~ 20 para los experimentos de la Rodamina 110 y ~ 34 para los experimentos con las nanopartículas en las mismas condiciones.

2.3.8. Determinación de Tamaños

Microscopía de Transmisión Electrónica

Las imágenes de Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) fueron realizadas con un equipo *Philips CM-10 microscope* operando a 100 kV con cinco puntos diferentes en cada rejilla. Las muestras fueron preparadas recubriendo con una suspensión de nanopartículas de silicio en tolueno una rejilla de cobre de 300 de malla cubierta con carbón y evaporando el solvente en aire. Estas medidas fueron realizadas en la *Universidad Politécnica de Valencia*.

Dispersión Dinámica de Luz

Cuando la luz incide sobre partículas mucho menores de 250 nm se produce dispersión Rayleigh. Si la luz proviene de un laser, y por tanto es monocromática y coherente, se observa una fluctuación en la intensidad de la dispersión de luz dependiente del tiempo. Estas variaciones se deben a que las partículas presentan movimientos Brownianos en la suspensión. Se puede generar una función de autocorrelación en el tiempo de la intensidad de luz dispersada (ecuación 13).

$$\hat{I}(\tau) = \frac{\langle I(\tau) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(\tau) \rangle^2} \quad (13)$$

La función de correlación temporal se puede relacionar con el coeficiente de difusión de las partículas en el medio y mediante la ecuación de Stokes-Einstein relacionándose con el radio hidrodinámico de las partículas. Si se considera que la muestra tiene un único tamaño se puede

ajustar a una exponencial (ecuación 14) donde D es el coeficiente de difusión medio de la muestra. Si la muestra es polidispersa se utiliza el método numérico por ajuste de cumulantes, el cual realiza una suma de varias exponenciales obteniendo una distribución de tamaños [Koppel 1972].

$$\hat{I}(\tau) = e^{-cte \cdot D} \quad (14)$$

El arreglo experimental consta de un laser incidiendo sobre la muestra y un detector de la luz dispersada a 90 grados. Utilizando para todas las medidas solvente cloroformo a una temperatura de 25 °C. Los parámetros utilizados para el ajuste fueron: tiempo 15 s; ángulo de detección 89,99°; longitud de onda del laser 632,8 nm; índice de refracción del solvente 1,4460; temperatura 298,34 K y viscosidad del solvente 0,558 cp.

2.3.9. Detección de Oxígeno Singulete

Detección de Fosforescencia de Oxígeno Singulete

La presencia del oxígeno singulete ($O_2(a^1\Delta_g)$) se determinó mediante la detección de su fosforescencia a 1273 nm debida a la relajación radiativa desde el estado singulete de menor energía al estado triplete basal del oxígeno molecular. Para ello se utilizó una suspensión saturada en oxígeno de nanopartículas de silicio (50 µg/mL) con un laser Nd:YAG Surelite II Continuum laser (7 ns FWHM y 14 mJ por pulso a 355 nm). La radiación emitida se detectó en ángulo recto usando un amplificador Judson J 116/8sp y un detector de germanio (5 mm de diámetro) después de pasar por los filtros apropiados. Los decaimientos se promediaron y almacenaron en un osciloscopio (O) Agilent Infiniium 500MHz. Las medidas se realizaron irradiando a 355 nm en tolueno y agua deuterada, respectivamente. Los solventes utilizados fueron tolueno y agua deuterada (D_2O) con un pD de 6,4 calculado añadiendo 0,4 a los valores de pH medidos [Mártire 1993].

La Figura 9 muestra un esquema del montaje experimental donde se observa como el haz de luz emitido por el laser (L) pasa a través de un filtro (F) que corta la radiación por encima de 520 nm e irradia la muestra (M) que se encuentra en una celda de cuarzo (C) de 1 cm de camino óptico y se detecta la emisión con un detector de germanio (D). La salida del detector se acopla a un osciloscopio digital (O) y este a su vez a un ordenador.

Figura 9: Montaje experimental para la detección resuelta en el tiempo de la fosforescencia de oxígeno singlete a 1270 nm.

Detección mediante un Electrodo Sensible de Oxígeno Molecular

La formación de $O_2(a^1\Delta_g)$ por las nanopartículas de silicio fue detectada de forma indirecta mediante el monitoreo de consumo de oxígeno molecular en un reactor cerrado. El montaje experimental (Figura 10) consta de una lámpara Rayonet irradiando a una longitud de onda de 350 ± 20 nm en un reactor cerrado donde se sitúa el fotosensibilizador (en este caso las nanopartículas), un electrodo sensible de oxígeno molecular (Orion 97-0899) y el desactivador específico de $O_2(a^1\Delta_g)$ en suspensiones saturadas en aire.

La técnica se basa en medir el consumo de oxígeno triplete molecular ($O_2(^3\Sigma_g)$) en función del tiempo de irradiación, en un reactor cerrado mediante un electrodo sensible a la concentración de $O_2(^3\Sigma_g)$. Para tal propósito se realizan tres ensayos diferentes. En el primero se irradian suspensiones acuosas de nanopartículas y se mide el consumo de oxígeno. Si se registra algún consumo de oxígeno podría ser debido a que el oxígeno singlete generado estuviese reaccionando con la superficie de la propia nanopartícula. De lo contrario, la energía de excitación electrónica del oxígeno singlete es eficientemente convertida en energía vibracional de los enlaces terminales desactivándose por las moléculas de agua según la reacción 15, volviendo al estado basal del oxígeno y no consumiéndose.

En el segundo ensayo, se añade alcohol furfurílico (FA) a la suspensión anterior. Este reactivo es conocido por su eficacia en reaccionar con oxígeno singlete siguiendo la ecuación 16. Como consecuencia de esta reacción se elimina $O_2(^3\Sigma_g)$ del medio, siendo detectado este consumo por el electrodo.

El tercer ensayo se basa en añadir azida sódica (NaN_3) a la anterior solución en una concentración un orden de magnitud mayor que la de FA. El oxígeno singlete interacciona con la azida sódica siguiendo el esquema de reacción 17, desactivándose al estado basal del oxígeno por lo que este no se consume. Al existir una competencia por el $O_2(a^1\Delta_g)$ entre el alcohol furfurílico y la azida sódica, donde la NaN_3 se encuentra en mucha mayor proporción, se inhibe el consumo de $O_2(a^1\Delta_g)$ tal como se espera por la reacción 17.

Figura 10: Montaje experimental para la detección del consumo de oxígeno molecular

2.3.10. Detección del Radical Anión Superóxido

La generación de superóxido se determinó mediante la detección de agua oxigenada (H_2O_2) producida a partir de la reacción 18.

La concentración de H_2O_2 en las muestras de reacción se midió mediante un método enzimático-colorimétrico empleando un kit comercial Wiener para la determinación de colesterol [Allain 1974]. El kit comercial provee los siguientes reactivos: una solución de 4-aminofenazona (4-AF), una solución de fenol y una mezcla de enzimas (peroxidasa (POD), lipasa funcal y colesterol oxidasa (CHOD)). El método se basa en la reacción del H_2O_2 con una mezcla de 4-AF y fenol para dar como producto la quinonaimina (4-(p-benzoquinonamonoimino)-fenazona) que presenta un máximo de absorbancia a 505 nm ($\epsilon(505) = 5035$) [Carlos 2009]. La reacción catalizada por la POD se muestra en la Figura 11.

Figura 11: Reacción del H_2O_2 para dar quinonaimina.

Las determinaciones de H_2O_2 en la mezcla de reacción se realizaron de la siguiente manera: se preparó el reactivo de trabajo mediante la mezcla de las soluciones provistas por el kit comercial. Las concentraciones finales de las diferentes especies en el reactivo de trabajo fueron las siguientes: $[\text{4-AF}] = 1,5 \text{ mM}$; $[\text{fenol}] = 2,75 \text{ mM}$; $[\text{POD}] = 0,4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; $[\text{Lipasa}] = 6,0 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; $[\text{CHOD}] = 0,06 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. Posteriormente, $50 \mu\text{L}$ de la solución que contiene el H_2O_2 se agregó a 2 ml de la mezcla de reactivos. Transcurridos 15 minutos de incubación a temperatura ambiente se tomaron los espectros de absorción entre 400 y 600 nm. Es importante aclarar que las enzimas Lipasa y CHOD intervienen solamente en la secuencia de reacciones que involucra la determinación del colesterol, no afectando la determinación de H_2O_2 .

2.3.11. Estudios de Fotólisis flash

Fundamentos

El método de fotólisis *flash* (*flash-photolysis* en inglés) fue desarrollado por Norrish y Porter [Porter 1950] utilizado para la iniciación y el estudio de procesos fotoquímicos. En esta técnica se crea una situación de no equilibrio en la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo corto, generando intermediarios inestables en concentraciones relativamente altas. En la Figura 12 se muestra una traza cinética típica obtenida en los experimentos de fotólisis flash.

Figura 12: Traza cinética típica en un experimento de fotólisis flash.

Para convertir a absorbancia los valores de voltaje registrados por el equipo de flash fotólisis convencional, se ajusta antes de medir el 100% de transmitancia de la luz de análisis a cada longitud de onda al valor de un voltio utilizando un comparador diferencial conectado al osciloscopio. La respuesta detectada en el osciloscopio x es proporcional a la intensidad de la luz transmitida $I = K x$, donde la constante K depende de la sensibilidad del detector y la señal x está expresada en mV. Combinando esta ecuación con la ley de Lambert-Beer se obtiene:

$$\Delta A_t = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{x_0}{x}\right) = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c_t \quad (19)$$

Donde ΔA_t es el cambio de la absorbancia al tiempo t producido por el pulso de luz, $\varepsilon (\lambda)$ es el coeficiente de extinción molar de la especie transiente a la longitud de onda, $c (t)$ es la concentración molar al tiempo t , y l la longitud de la celda en centímetros. Como el transiente absorbe solo una pequeña fracción de luz, es necesario amplificar la ganancia del osciloscopio, por lo que la señal correspondiente al 0% de transmitancia no aparece en la pantalla. Para ajustar el valor de x_0 se toma el promedio de los valores medidos antes del flash.

$$\Delta A_t = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \log\left(\frac{\hat{x}_0}{x}\right) = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c_t \quad (20)$$

Diseño Experimental

El equipo de fotólisis *flash* consta de tres partes principales: un arreglo experimental para producir un corto e intenso pulso de luz, un reactor o celda de reacción y un sistema de detección, tal como se muestra en el Esquema 5 donde se describe un equipo de fotólisis *flash* convencional.

El equipo utilizado en este trabajo es un aparato Xenon Co, modelo 720 C, cuya óptica y electrónica fueron modificadas con el objeto de aumentar la sensibilidad de detección [San Roman 1982]. El pulso de luz se logra mediante la descarga de un banco de capacitores (Cap) que descargan sobre las lámparas de flash (L) que en nuestro caso consisten en 2 tubos de cuarzo llenos de xenón a presión moderada (Xenon Co. P/N 890-1128, FWHM $\leq 20 \mu s$) ubicados a ambos lados de la celda de reacción. El disparo está sincronizado con el osciloscopio. Las lámparas emiten entre 210 nm y 600 nm, con un

máximo alrededor de los 400 nm. La intensidad de la descarga de los capacitores del flash se encuentra entre los 0,8 y 7,2 kV.

La celda de reacción (C) es un cilindro de cuarzo con una camisa concéntrica del mismo material, que puede ser utilizada tanto para el control de temperatura como para el uso de filtros. Las ventanas de cuarzo de la celda son paralelas y poseen un diámetro interno de 1 cm. Para la realización del presente trabajo se empleó una celda con camino óptico "l" de 10 cm.

El equipo muestra los cambios de absorción en función del tiempo a una longitud de onda fija. Los espectros de absorción de los transientes se obtienen tomando el valor de absorbancia del ajuste de las trazas experimentales a un tiempo determinado para cada longitud de onda de análisis. Las trazas experimentales deben ser tomadas manteniendo las condiciones experimentales.

Esquema 5: Esquema del montaje experimental de fotólisis flash donde LA lámpara de análisis, C celda de reacción, L lámparas de flash, Cap capacitores, M monocromador, F fotomultiplicador, O osciloscopio, T trigger, PC computadora.

El método de detección empleado fue mediante la espectroscopia de absorción con la que pueden registrarse con alta sensibilidad las especies transientes generadas durante el flash. Se empleó una lámpara de análisis

(LA) de Xe de arco corto XBO-75 W/2 (Osram, Alemania) alimentada con una fuente a potencia constante. De esta forma se atenúan las fluctuaciones de impedancia que se producen en la lámpara por variaciones de trayectoria que experimenta el arco entre los electrodos. El haz de análisis proveniente de la lámpara es colimado y enfocado con lentes de cuarzo sobre la celda de reacción, ubicada entre las lámparas de flash.

La camisa de la celda fue rellena con un filtro para cortar toda la luz con longitud de onda de 300 nm. La luz de análisis emergente de la celda se hizo incidir sobre la rendija de un monocromador Bausch & Lomb (M). La detección de la señal luminosa y su conversión en señal electrónica se realizó mediante un fotomultiplicador RCA 1P28 (F). La señal del fotomultiplicador, se envía a la entrada diferencial de un osciloscopio Hewlett Packard HP 54600B (O) de 100 MHz, conectado a una PC por una interfase, permitiendo almacenar los datos para su posterior análisis. A partir de los valores de absorbancia resuelta en el tiempo que se obtienen es posible analizar el comportamiento cinético del proceso en estudio. Para evitar la acumulación de productos, cada solución fue irradiada con un único flash.

2.3.12. Sistema de Foto-Reducción, Separación y Detección de Mercurio

Foto-reducción y Separación

El procedimiento experimental para explorar la capacidad foto-reductiva de las nanopartículas sobre el mercurio (II), involucra la irradiación de una suspensión acuosa con nanopartículas y mercurio (II) disuelto como HgCl_2 seguida de la separación del mercurio (0) generado, de la suspensión de nanopartículas, para su cuantificación. El montaje experimental se muestra en el Esquema 6, consta de una celda donde se produce la foto-reducción (RF) y una celda donde se recoge y se oxida el Hg^0 (RO). El Hg^0 es transportado de la celda RF a la celda RO por arrastre con N_2 [Rocha 2000].

La celda RF consta de una ventana de cuarzo de 2 cm^2 por donde entra la luz de excitación de longitud de onda de $350 \pm 20 \text{ nm}$ con un flujo de $\sim 10^6$ moles de fotones por minuto. La celda tiene un volumen total constante de 50 mL donde se encuentra la suspensión de nanopartículas y el Hg^{2+} en solución. Esta muestra se irradia durante una hora en ausencia de oxígeno y agitación constante.

Una vez terminada la reacción se pasa una corriente de N_2 durante 10 minutos que arrastra el Hg^0 desde la celda RF a la celda RO donde se oxida el mercurio a Hg^{2+} y/o Hg^+ . La celda RO contiene una solución de $KMnO_4$ de concentración 0,2 g/L a pH 3 en un volumen total de 60 mL. Al pasar el Hg^0 por esta solución se vuelve a oxidar a Hg^{2+} de acuerdo a la reacción 21. El Hg^{2+} que no se ha reducido a Hg^0 queda en la celda RF.

Esquema 6: Diseño experimental de las celdas de irradiación y separación de mercurio.

Detección de Hg^{2+}

La detección del Hg^0 reducido por las nanopartículas se basa en su oxidación a Hg^{2+} y su posterior complejación como [1,10-fenantrolina - Hg^{2+} - eosina] de composición empírica $[Hg(o-fen.)_2]R$ donde R representa un anión eosina divalente. Se determina la fluorescencia del compuesto 1,10-fenantrolina-eosina en función de la concentración de Hg^{2+} . El mercurio presente en el medio es complejoado por este compuesto, lo que desactiva la fluorescencia del reactivo no complejoado. Cuando mayor es la concentración de Hg^{2+} menor es la fluorescencia.

Se obtiene una recta de calibración de intensidad de fluorescencia vs concentración de mercurio excitando la solución a 509 nm y midiendo la intensidad del pico de fluorescencia a 565 nm [Onyewuenyi 1994]. Esta recta de calibración se realiza usando como matriz la disolución con permanganato a pH = 4,5 a la que se añaden concentraciones conocidas de Hg^{2+} . Las muestras se prepararon con 0,05 M EDTA, tampón de acetato (pH 4,5), una solución de $2,5 \times 10^{-3}$ M de 1,10-fenantrolina y un solución recién preparada de 1% Polivinil Alcohol (PVA). Se mezclan las soluciones y se les añade una solución de eosina de $7,3 \times 10^{-4}$ M. Cabe destacar que se agregó una gota de H_2O_2 para eliminar el permanganato como MnO_2 . Se observa como rápidamente pasa del color rosa a un color marrón aportado por el precipitado de MnO_2 .

Es de importancia el orden de adición de los reactivos, por tanto siempre se realizó en el siguiente orden: 1 - Iones metálicos Hg^{2+} ; 2 - Matriz con manganeso; 3 - EDTA; 4 - Tampón de acetato; 5 - 1,10-fenantrolina; 6 - PVA; 7 - Eosina. Las concentraciones de patrones utilizadas fueron de 0,67 mg/L de Hg (II); 1,34 mg/L de Hg (II) y 6,67 mg/L de Hg (II). Se obtiene la recta de calibración que se muestra en la Figura 13 y que se ajusta a la ecuación 22.

$$(\text{Int})^{-1} = 1,2 \cdot 10^{-4} + 1,12 \cdot 10^{-5} \cdot C(\text{mg/L}) \quad (22)$$

Figura 13: Recta de calibración de fluorescencia en función de la concentración de mercurio (II).

2.3.13. Análisis de Regresión Bilineal

El análisis de regresión bilineal se basa en que para cada longitud de onda de excitación de la suspensión de nanopartículas se presenta un espectro de emisión. Para una sustancia pura existe una única forma, el espectro de emisión es invariante, permaneciendo independiente de la longitud de onda de excitación. Para fluoróforos de baja absorbancia ($\leq 0,05$), la intensidad de emisión en estado estacionario a una longitud de onda de emisión dada ($I(\lambda_m)$) es proporcional al coeficiente de absorción del fluoróforo a la longitud de onda de excitación ($\varepsilon(\lambda_x)$), y al factor $F(\lambda_m)$ que refleja la distribución de probabilidades de las transiciones desde el estado vibracional inferior del primer estado electrónico excitado hacia los niveles vibracionales del estado basal [Valeur 2002].

El análisis de regresión bilineal utiliza la linealidad de $I(\lambda_m)$ con $\varepsilon(\lambda_x)$ y $F(\lambda_m)$ y lo aplica a la matriz de emisión experimental para obtener información del mínimo número de especies "j", su emisión relativa y su espectro de absorción [Gonzalez 1989]. Usando los índices x y m para las longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente en una matriz de la forma $[i_{xm}] = [\varepsilon_{xj}] \cdot [f_{jm}]$, donde $[i_{xm}]$, $[\varepsilon_{xj}]$ y $[f_{jm}]$ representan las matrices de intensidad de emisión, coeficientes de absorción y $F(\lambda_m)$, respectivamente. El procedimiento se basa en alternar los cálculos de las matrices $[\varepsilon_{xj}]$ y $[f_{jm}]$ por múltiple regresión lineal iterativamente hasta que la convergencia se alcanza cuando la condición de cuadrados mínimos es aplicada para minimizar los elementos de la matriz error. De esta matriz, se obtiene la matriz de intensidad de emisión corregida $[i_{xm}^c]$. El número de especies se selecciona como el mínimo que muestra una aproximación razonable entre $[i_{xm}^c]$ y $[i_{xm}]$.

2.4. Estudios Teóricos

2.4.1. Aproximación Mediante la Teoría del Funcional de la Densidad

La optimización de las geometrías de los distintos compuestos generados y la determinación de los espectros vibracionales se realizó utilizando la Teoría del Funcional de la Densidad “Density functional tight binding” utilizando el programa DFTB+ [Aradi 2010, Aradi 2007]. Este es un método eficiente para tratar simulaciones de mecánica cuántica que aporta resultados representativos en tiempos computacionales tres órdenes de magnitud menor en comparación con otros métodos como BLYP, conjunto de bases cc-pVDZ, INDOS/S [Frauenheim 2002, Seifert 2007].

La idea básica del método es representar los autoestados de Kohn y Sham por una base mínima y construir el potencial efectivo de muchos cuerpos como una superposición de potenciales atómicos más una contribución de las densidades de carga. Todas las integrales involucradas se calculan en el contexto de la teoría del funcional de la densidad. La autoconsistencia se incluye iterando sobre las cargas de Mulliken en lugar de las densidades electrónicas y potenciales [Frauenheim 2002].

Tabla 5: Energías de los átomos y la multiplicidad en el estado fundamental.

Elemento	Multiplicidad	Energía (Eh)
Silicio	3	-1,116
Oxígeno	3	-3,141
Hidrógeno	2	-0,271
Carbono	3	-1,443
Nitrógeno	4	-2,258

Se calcula la estabilidad de las partículas mediante la ecuación 23, la cual mide la diferencia de energía entre los átomos en estado fundamental y la energía total del compuesto. Esta se utiliza para encontrar como cambia la estabilidad en función de los tamaños de las nanopartículas y de su recubrimiento.

$$E(\text{hartre} / \text{átomo}) = \frac{E_{Si_n R_x} + nE_{Si} + xE_R}{(n + x)} \quad (23)$$

Donde n es el número de silicios que conforman la partícula; R es el elemento que recubre la partícula y x es el número de átomos que forman el recubrimiento.

2.4.2. Transiciones Electrónicas en el UV-Vis y Espectros Vibracionales

Los espectros electrónicos se calculan mediante el programa FIREFLY, anteriormente PCGAMESS, de distribución gratuita [Granovsky 2011]. Se utilizó la teoría del funcional de la densidad [Hohenberg 1964, Kohn 1965, Parr 1989] para resolver las ecuaciones que determinan la estructura electrónica de los sistemas. El funcional de intercambio y correlación usado es B3LYP [Becke 1993, Lee 1988]. Con el fin de agilizar los cálculos, se utilizaron pseudopotenciales de tipo LANL2DZ, que representan el espacio de valencia por bases de calidad doble-zeta [Hay 1985a, b, Wadt 1985]. Las energías de las transiciones y las fuerzas de oscilador, que son tomadas como una medida de la intensidad de la banda, son calculadas en el contexto de la teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo, tal como está implementada en el programa FIREFLY.

Los espectros vibracionales se calculan en dos pasos. En el primero de ellos, se utiliza el programa DFTB+ para calcular la matriz hessiana a partir de la geometría optimizada previamente. En el segundo paso, se emplea el programa MODES. Este parte de la distribución de DFTB+, para diagonalizar la matriz mencionada, convertir sus autovalores en frecuencias de vibración armónicas e imprimir los autovectores con el fin de poder realizar animaciones de los modos normales para facilitar su asignación. Las visualizaciones se llevaron a cabo con el programa Gabedit, versión 2.3.5 [Allouche 2011].

2.5. Ensayos y Protocolos Biológicos

2.5.1. Cultivo Celular

Las células de glioma de rata C6 (ATCC- CCL107) fueron mantenidas en cultivo en monocapa. El medio empleado fue DMEM (Invitrogen/GIBCO™) suplementado con 10% SFB (Toulbey/ Bionos), 2,5 µg/mL Anfotericina B (Richet®), 100 µg/mL Estreptomicina (Rontag S.A), 100 U/mL Penicilina (Richet®) y 2 mM Glutamina. Las células fueron mantenidas en estufa a 37°C con 5% CO₂ y humedad saturada relativa. Se emplearon placas de cultivo estándar Tissue Culture Corning®.

Para el sembrado de las células se utilizó una cámara de Neubauer [Strober 2001] para calcular el número de células en una muestra. Este dispositivo consta de varios cuadrantes (L) de dimensiones 1 x 1 mm. Cada cuadrante de 1x1 mm está a su vez subdividido en 16 cuadrados lo cual facilita el conteo dentro del mismo. Cada cuadrante posee una altura de 0,1 mm, de modo que el volumen del cuadrante (L) queda definido en 0,1 mm³. Empleando un microscopio de contraste de fase invertido (Nikon Eclipse TS100) acoplado a una cámara digital (Nikon coolpix® VR), se cuentan las células que se encuentran en las posiciones marcadas en azul (Esquema 7). El número total de células/mL se obtiene multiplicando el número medio de células contado en los cuatro cuadrantes por 10⁴.

Esquema 7: Cámara de Neubauer.

2.5.2. Incubación de Nanopartículas con las Células.

La toxicidad de las nanopartículas en las células se evaluó a distintos tiempos de incubación y concentraciones comparando con células control que no fueron tratadas con nanopartículas. Se procedió de la siguiente manera para realizar las incubaciones.

1. Se parte de un cultivo de células C6 en monocapa.
2. Se lavan las células con PBS.
3. Se incuba 1 minuto en estufa a 37°C con Tripsina al 0,025%.
4. Se neutraliza con medio completo.
5. Se suspende y se siembran 100 μ L en la cámara de Neubauer para Contar las células.
6. Las células se siembran con una densidad de $2 \cdot 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos con medio de cultivo DMEM completo.
7. Se mantienen en estufa a 37°C hasta que las células lleguen a un 70-80% de confluencia, aproximadamente 24 horas.
8. Se retira el medio de cultivo.
9. Se hace un lavado con PBS.
10. Se añade medio de cultivo completo con la concentración correspondiente de nanopartículas.
11. Se incuban en estufa a 37°C durante el tiempo correspondiente al experimento.
12. Se procede con el ensayo de *Rojo Neutro*.

2.5.3. Ensayo de Rojo Neutro

El *Rojo Neutro* es un colorante que las células incorporan en función del grado de viabilidad de las mismas. La incorporación del colorante es por transporte activo y se acumula en los lisosomas. Si la célula está muerta o tiene su actividad metabólica disminuida, la incorporación del colorante es menor en comparación con una célula que posee metabolismo activo. De este

modo, la cantidad de colorante incorporado es proporcional al número de células viables que existen en la muestra, con excepción de los casos donde los procesos autofágicos se pongan de manifiesto [Borenfreund 1985, Zhang 1990].

Procedimiento

1. Una vez que las células han sido sometidas al tratamiento correspondiente, para evaluar el grado en que esas variables afectan a las células, se retira el medio de cultivo con el tratamiento.
2. Se hace un lavado con PBS.
3. Se prepara una única mezcla de medio de cultivo con *Rojo Neutro* a una concentración final de 50 µg/ml.
4. Se incuba 90 minutos en la estufa de cultivo a 37°C.
5. Se retira la mezcla de medio con *Rojo Neutro* de cada pocillo.
6. Se realiza un lavado rápido (menos de 2 minutos) con la solución A
7. Se coloca directamente a cada pocillo 200 µL de la solución B para solubilizar el colorante que ha quedado retenido en las células.
8. Se mide la absorbancia de cada pocillo a $\lambda_1 = 570$ nm y la absorbancia de base a $\lambda_2 = 690$ nm.
9. Se calculan las absorbancias finales restando cada λ_1 con su respectivo λ_2 y se refieren los resultados tomando la absorbancia de la situación control como el 100% de viabilidad.

Soluciones Utilizadas

La *solución A* sirve para eliminar los restos del colorante no incorporado y artefactos de adherencia del mismo a la superficie celular, simultáneamente promueve la fijación al sustrato. El lavado debe de ser breve, alrededor de un minuto y no más de dos minutos, ya que el formaldehído puede extraer el colorante si se deja expuesto durante más tiempo. Su composición es 40% de Formaldehído y 10% de CaCl₂ en agua.

La *solución B* se utiliza para solubilizar el colorante retenido en las células y poder luego determinar su concentración por absorbancia. Su composición es de ácido acético glacial 1% y etanol al 50 % en agua.

Mezcla Medio de Cultivo Completo con Rojo Neutro

1. Se prepara una única mezcla de medio de cultivo completo con *Rojo Neutro* a una concentración final de 50 µg/ml teniendo en cuenta que el volumen final por pocillo es de 200 µL.
2. Se incuba esta mezcla en baño a 37°C durante 10 minutos.
3. Se centrifuga a 2600 rpm durante 5 minutos para precipitar la posible formación de cristales.

2.5.4. Irradiación bifotónica en el Infrarrojo

Las células se siembran y se incuban según se discutió anteriormente y se mantienen en la estufa a 37° C durante el tiempo correspondiente al experimento. Transcurrido el tiempo de incubación se irradian bifotónicamente las muestras empleando un laser de Ti:Za (ver apartado 2.3.6) a una longitud de onda de 770 ± 39 nm y potencia entre 190 y 250 mW. En el Esquema 8 se muestra el montaje experimental diseñado para irradiar los cultivos celulares. Mediante un sistema de espejos se dirige el haz para que incida perpendicularmente sobre cada pocillo y se enfoca mediante un colimador. Una vez transcurrido el tiempo de irradiación se dejan las muestras en estufa a 37° C durante dos horas y posteriormente se realiza el ensayo *Rojo Neutro*.

Esquema 8: Diseño experimental de la irradiación de los cultivos celulares.

Capítulo 3:

**Síntesis, Modificación
Superficial y
Caracterización de
Nanopartículas de Silicio**

3.1. Síntesis

La síntesis de nanopartículas de silicio de tamaños menores de 10 nm se puede realizar utilizando distintos métodos *bottom-up* o *top-down*. Se debe valorar cuidadosamente el método a utilizar, ya que distintos métodos de síntesis dan lugar a la obtención de partículas con diferente morfología y superficie y por tanto con distintas propiedades finales. Entre los métodos de síntesis de nanopartículas descritos en la literatura se pueden resaltar los basados en la reducción química de silanos [Rosso-Vasic 2008b, Rosso-Vasic 2009], la ablación del cristal de silicio por laser pulsado [Du 2009], la descomposición asistida por plasma [Shen 2010] y los métodos electroquímicos de grabado [Eckhoff 2006]. Hasta el momento ningún método de síntesis se ha estandarizado ni catalogado como óptimo para la producción de nanopartículas debido a que cada uno de ellos genera partículas con diferente distribución de tamaños, estructura y composición superficial.

Las nanopartículas utilizadas en este trabajo se sintetizaron utilizando un método electroquímico *top-down* que consiste en generar nanoporos en un cristal de silicio mediante una solución de grabado que contiene ácido fluorhídrico. Esta solución disuelve el silicio genera huecos en la red cristalina mediante la aplicación de una diferencia de potencial entre los dos electrodos [Eckhoff 2006]. Se eligió este método de síntesis debido a su simplicidad y a la disponibilidad del equipamiento necesario.

3.1.1. Procedimiento

Características y Preparación del Cristal de Silicio

La síntesis de las nanopartículas se realiza utilizando como materia prima obleas de cristal de silicio con orientación cristalográfica $\langle 100 \rangle$ y dopadas con boro (*p-type*) con una resistividad entre 1 - 10 $\Omega \cdot \text{cm}$. Las dimensiones de las obleas son de 5 cm de radio y un espesor entre 600 y 700 micrómetros, se encuentran pulidas por las dos caras mostrando una apariencia gris metálica. Ambos lados del cristal están recubiertos por una delgada película polimérica que lo protege de la oxidación. En la Figura 14 se muestra el cristal de silicio antes de ser preparado para la síntesis.

Figura 14: Cristales de silicio <100> utilizados como materia prima para la síntesis de las nanopartículas.

Preparación del Cristal de Silicio

El cristal de silicio se corta, con una herramienta de punta de diamante, en cuadrados de 4,0 x 4,0 cm de lado para controlar que la superficie expuesta a la anodización siempre sea constante. De esta forma se mantiene la distancia que tiene que recorrer la corriente por el interior del cristal, ya que la intensidad que circula depende de la longitud recorrida por la corriente.

Una vez cortados los cristales y antes del proceso de anodización se prepara y acondiciona la oblea. En primer lugar se lija mecánicamente (lija al agua 1200) para eliminar la capa polimérica de protección. Posteriormente, se introduce durante 5 minutos en un baño compuesto por 30% de ácido fluorhídrico, 20% de etanol y 50% de agua destilada para eliminar el posible óxido de la superficie [Li 2003]. Una vez transcurrido este tiempo se extrae el cristal y se lava con abundante etanol y agua destilada quedando ya preparado para el ataque electrolítico. Este procedimiento deja el silicio totalmente expuesto al ataque del electrolito y evita la posible contaminación de la muestra con el polímero.

Diseño de Reactor

La síntesis se lleva a cabo en una celda electrolítica de teflón cilíndrica de 8 cm de altura y 4 cm de radio. La celda está compuesta por el cristal de silicio (ánodo), un mecanismo de inmersión del cristal en el electrolito y un electrodo de alambre de platino (cátodo). El cátodo se posiciona circularmente sobre la parte inferior de la celda para favorecer la distribución uniforme de corriente desde el platino hasta el electrodo de trabajo [Belomoin 2000, Rogozhina 2006, Valenta 2005, Yamani 1997].

El cristal de silicio está unido a un dispositivo que lo sumerge en el electrolito a una velocidad constante de 5 mm/h. Este dispositivo de inmersión es necesario debido a que la mayor densidad de corriente se encuentra en la triple interfase (electrolito - aire - cristal de silicio) siendo prácticamente despreciable el intercambio de electrones que se produce en el resto del cristal sumergido en el electrolito. Se asume que la reacción se produce en su totalidad en esta pequeña sección del cristal y es necesario que vaya avanzando y renovándose el área de reacción constantemente para optimizar el rendimiento de producción. La zona que ha reaccionado queda sumergida y deja de formar parte del proceso de anodización quedando las nanopartículas adheridas a las paredes del cristal hasta el final del proceso [Eckhoff 2006].

Se controla la intensidad de corriente que circula, ya que es uno de los factores de los que dependen la morfología y composición de las nanopartículas finales [Lehmann 2002]. La corriente de trabajo para las dimensiones de nuestro cristal se optimizó en 5 - 20 mA/cm que corresponde a una diferencia de potencial de ~ 8 Voltios. La unión entre el cristal de silicio y el circuito eléctrico es un punto crítico a tener en cuenta, ya que se pueden producir malas conexiones y por consiguiente un aumento de la resistividad. Esto supone un cambio en las relaciones Intensidad vs Potencial dando lugar a la generación de distintas distribuciones de tamaños de las nanopartículas.

La relación masa de nanopartículas (NP) formadas *versus* tiempo se mantiene constante siendo la producción de nanopartículas directamente proporcional al tiempo de síntesis. La Figura 15 (a) muestra un esquema del diseño del reactor donde se distingue la posición del alambre de platino. Las flechas marcan la dirección de la corriente y como se ataca la interfase quedando la parte del cristal atacada sumergida en el electrolito.

Figura 15: (a) Esquema de la celda electrolítica y (B) fotografía del montaje experimental y fotografías de soluciones de NP en suspensión de tolueno sin irradiar e irradiada con luz UV.

Una vez realizada la anodización, las nanopartículas quedan adheridas al cristal de silicio que presenta un color pardo con una estructura porosa y rugosa. El cristal anodizado se enjuaga cuidadosamente con metanol para retirar los rastros del electrolito, se deposita en tolueno seco y se burbujea con nitrógeno para evitar una mayor oxidación de la superficie. Una vez depositado en un recipiente cerrado con atmósfera inerte, se pone en un baño de ultrasonido durante dos horas para liberar completamente las nanopartículas en el solvente. El cristal de silicio queda totalmente limpio y nuevamente con el aspecto gris metálico pudiendo ser reutilizado en otras síntesis hasta su consumo total.

Reacciones Químicas de la Síntesis

La anodización electroquímica genera vacantes positivas sobre la superficie del cristal de silicio. En estas vacantes se produce el ataque por el ácido fluorhídrico formando poros e intersticios. El cristal de silicio en presencia de ácido fluorhídrico pasa a H_2SiF_6 , este proceso puede ser debido a la presencia de oxidantes químicos como el ácido nítrico o al impulso de una diferencia de potencial mediante una celda galvánica.

La ecuación 24 muestra la reacción química global que se produce [Lehmann 2002] entre el silicio cristalino, el ácido fluorhídrico y el ácido nítrico.

La ecuación 25 describe el proceso de disolución del silicio cuando se oxida utilizando como fuerza impulsora una diferencia de potencial con una celda electroquímica. La ecuación 26 muestra la reacción que ocurre en la celda electroquímica sobre el contra electrodo de platino.

La Figura 16 muestra un esquema con los pasos de la disolución del silicio [Lehmann 2002] cuando la fuerza impulsora es una diferencia de potencial que genera vacantes en la red de silicio y permite el ataque del ion flúor. (a) Inyección de un hueco y ataque sobre el enlace Si-H por el ión fluoruro; (b) Inyección de un hueco y segundo ataque sobre el enlace Si-H por el ión fluoruro; (c) Ataque del F^- en los enlaces Si-Si, el silicio que queda superficialmente forma enlaces Si-H y se produce una molécula de tetrafluoruro de silicio; (d) El tetrafluoruro de silicio reacciona con dos moléculas de HF para dar H_2SiF_6 y se disocia.

Figura 16: Mecanismo de la disolución del cristal de silicio mediante la generación de huecos en la red cristalina y ataque del ión fluoruro.

Composición del Electrolito

La composición del electrolito se optimizó para obtener el mayor rendimiento posible en la generación de las nanopartículas. Se variaron los componentes y la proporción de los mismos teniendo en cuenta las ecuaciones 24, 25, 26 y sus mecanismos de reacción. Se utilizó un volumen total de 300 mL para mantener siempre las mismas proporciones de reactivos en el electrolito con un cambio menor de un 10% debido a su consumo al avanzar la reacción.

El electrolito utilizado en los primeros ensayos estaba compuesto por ácido nítrico, metanol, ácido fluorhídrico y agua destilada. Cada uno de estos compuestos desarrolla una función específica en la reacción global de síntesis como se describe a continuación.

Tabla 6: Composición del electrolito inicial

Reactivos	%	V _T (300 mL)
HF	3	9
HNO ₃	50	150
CH ₃ OH	25	75
H ₂ O	22	66

El HF reacciona con el silicio cuando es oxidado ya sea siguiendo la ecuación 24 y/o 25 para formar H₂SiF₆. El ácido nítrico actúa como oxidante del silicio y junto al ácido fluorhídrico genera H₂SiF₆ de acuerdo con la ecuación 24. Es importante la relación entre ácido nítrico y el ácido fluorhídrico en la velocidad de disolución de silicio [Steinert 2007] alcanzándose un máximo en relaciones de concentración 1:1 para HF: HNO₃. Sin embargo, hay que tener en cuenta que una vez que el cristal de silicio está sumergido es necesario que deje de reaccionar para no consumir las nanopartículas generadas en la interfase, ya que con la presencia del HNO₃ siguen oxidándose [Li 2003].

Si se disminuye la relación HF/ HNO₃, el silicio se disuelve rápidamente como H₂SiF₆ y aumenta la formación de nanopartículas, pero como contrapartida las partículas formadas siguen reaccionando con el ácido nítrico una vez que abandonan la triple interfase y quedan sumergidas en el electrolito. En cambio, si la relación (HF/ HNO₃) aumenta el silicio se disuelve de forma uniforme, no se forman poros ni intersticios y por tanto no se forman nanopartículas. Como consecuencia de estas relaciones, es importante llegar a un compromiso entre estos dos efectos contrapuestos. El metanol cumple la función de surfactante, aumenta la afinidad del electrolito por la superficie del cristal de silicio propiciando que se moje bien todo el área y favorece una reacción uniforme durante el proceso.

El rendimiento de generación de nanopartículas estaba confinado a los primeros 10 mm sumergidos a partir de la triple interfase, ya que al contener ácido nítrico el electrolito, la superficie anodizada y sumergida en el baño electrolítico seguía reaccionando. Esto producía la disolución total de las nanopartículas y por tanto una limitación en la síntesis.

Para solucionar este problema, se eliminó el ácido nítrico evitando la reacción 24, permitiendo que solamente tenga lugar la reacción 25, es decir, se oxida el silicio solamente mediante la corriente eléctrica. En la Tabla 7 se muestran las cantidades de reactivos químicos que forman este electrolito y que se utilizaron para generar las nanopartículas utilizadas en este trabajo de tesis.

Tabla 7: Composición del electrolito con el que se sintetizaron las partículas utilizadas durante el trabajo de tesis.

Reactivos	%	V _T (300 mL)
HF	16	50
CH ₃ OH	16	50
H ₂ O	68	200

Purificación y Separación por Tamaños

El proceso de purificación y separación consiste en liberar las nanopartículas formadas que se encuentran adheridas sobre el cristal de silicio en un solvente libre de impurezas y separarlas por grupos de tamaños. Una vez terminado el proceso de síntesis, el cristal de silicio se lava con abundante metanol, se sumerge en tolueno burbujeado con nitrógeno para eliminar el oxígeno del medio y se introduce en un baño de ultrasonido durante dos horas. Posteriormente se saca el cristal de silicio quedando una suspensión amarillenta compuesta por dos distribuciones de tamaños distintas y bien definidas. La suspensión inicial de las nanopartículas se realiza siempre en tolueno debido a que es el solvente en el que las partículas son más estables y es adecuado para una posterior modificación superficial. Para los estudios en otros solventes se evapora el tolueno a baja presión (0,15 atm) y temperatura en el intervalo 40 - 50 °C. Cuando se tienen las partículas secas se vuelven a suspender en el solvente deseado.

Una vez obtenida la mezcla de nanopartículas y silicio poroso coloidal se procede a separarlas por tamaños, lo que puede realizarse mediante dos métodos distintos: filtración o centrifugación. El método de filtración consiste en pasar la suspensión a través de un filtro hidrofílico de 0,1 µm PVDF Durapore® VVPP Membrane Filters (Millipore®) para separar los distintos tamaños. En el filtro queda retenido el material particulado mayor a 100nm y pasan las nanopartículas de menor tamaño a una solución totalmente

homogénea y transparente. El método de centrifugación consiste en someter la suspensión durante 10 minutos a centrifugación con una fuerza de $10062 \times g$ que permite separar las nanopartículas que quedan en suspensión del silicio poroso coloidal que queda como sólido remanente en el fondo.

3.1.2. Determinación de la Concentración

La concentración de las nanopartículas en gramos por litro se estima midiendo un volumen determinado de suspensión, evaporando el solvente y pesando las nanopartículas que han quedado. De esta forma obtenemos la concentración en peso/volumen. Como el método de síntesis está estandarizado, una vez conocida la cantidad de nanopartículas por hora, se puede inferir una concentración aproximada controlando el tiempo de síntesis, ecuación 27.

$$m (\mu\text{g}) = 40 \cdot t (\text{horas}) \quad (27)$$

3.2. Determinación de Tamaños y Distribución

Se obtuvieron dos distribuciones de tamaños bien diferenciadas que se pueden separar perfectamente mediante filtrado con un tamaño de poro de 100 nm. Está en discusión la razón por la cual no se generan tamaños intermedios de nanopartículas entre 10 y 100 nm, aunque resultados similares con dos tipos de poblaciones separadas han sido encontrados por otros autores [Choi 2006, Kusová 2010]. Estudios realizados sobre nanopartículas sintetizadas electroquímicamente muestran como tienden a formarse tamaños discretos bien definidos [Belomoin 2002]. Todos los resultados expuestos en este trabajo están referidos a las nanopartículas de silicio (10 nm) y los resultados parciales para el silicio poroso coloidal (> 100 nm) se detallan en un capítulo dedicado exclusivamente a estos coloides.

Los tamaños de las nanopartículas se midieron empleando un microscopio de transmisión electrónica. Se hicieron 20 micrografías TEM para luego poder realizar un análisis estadístico utilizando el software *Image Tool* [Wilcox 2002]. En estas micrografías se observa el tamaño, la forma esférica de las nanopartículas y que no están aglomeradas. En la Figura 17 se muestran dos micrografías de nanopartículas recubiertas con metacrilato de metilo a distintos aumentos, las nanopartículas se resaltan en círculos rojos.

Estos resultados son comparables con los obtenidos por otros autores utilizando métodos electroquímicos, en los cuales se publico en la literatura nanopartículas de 1 nm de diámetro con luminiscencia en el azul [Belomoin 2000] o nanopartículas esféricas que conservan su estructura cristalina con tamaños entre 1,0 y 3,7 nm de diámetro pasando del azul al rojo a medida que aumentan los tamaños [Belomoin 2002].

La resolución de las micrografías obtenidas no permite distinguir si las partículas son cristalinas o amorfas. En la literatura se encuentran nanopartículas sintetizadas electroquímicamente con distribución cristalina (111) [Choi 2006]. Los estudios de optimización geométrica realizados durante este trabajo (ver capítulo 7) muestran como al partir de redes cristalinas, tal como es el caso de nuestro método de síntesis, las partículas conservan su estructura cristalina, solo modificándose y reorganizándose en la superficie. Por tanto, es consistente pensar que las partículas que se obtuvieron presentan un alto grado de cristalinidad. Sin embargo, se requeriría un estudio más basado en difracción de rayos X, para determinar la cristalinidad de estas partículas.

Figura 17: Micrografías TEM de las NP.

La distribución de tamaños de las nanopartículas se determinó analizando las micrografías de TEM con el software *Image Tool* y obteniendo el número de partículas en función de su diámetro, tomando intervalos cada 5 Å como se muestra en la Figura 18, en la que se representa el porcentaje de partículas según su tamaño. Los datos se pueden ajustar a una distribución gaussiana con el centro en 3,0 nm de diámetro y una varianza de 1,0 nm.

Figura 18: Distribución de tamaño de partículas.

3.3. Masa Molecular Relativa

A partir de la distribución de tamaños de las nanopartículas mostrada en la Figura 18 y la composición de las mismas se calcula la masa molecular relativa media. Se determinó la masa molecular relativa para dos hipótesis distintas, en el primero de los casos se consideró la partícula compuesta totalmente de silicio y con terminaciones de hidrógeno. En el segundo supuesto, se consideró una capa de dióxido de silicio recubriendo la nanopartícula.

3.3.1. Superficie Formada por Si-H

Utilizando la densidad de silicio (2330 kg/m^3) [Lide 2009] se calcula la masa de cada uno de los tamaños de las nanopartículas que se asumen esféricas. Una vez conocida la masa de cada uno de los tamaños de las nanopartículas mediante el porcentaje en número y el número de Avogadro se obtiene la masa molecular media de 72,2 kDalton.

$$Mr (\text{NP-Si}) = 7,22 \cdot 10^4 \text{ g/mol}$$

3.3.2. Superficie Formada por una capa de SiO₂

A partir de los datos obtenidos los espectros de XPS y FTIR (ver sección 3.5), se comprobó que la primera capa de las nanopartículas estaba oxidada y formada por SiO₂. Con estos datos se realizó un nuevo cálculo obteniendo una masa molecular en número aproximado. A partir de la densidad del silicio (2330 kg/m³) y del SiO₂ (2630 kg/m³) [Lide 2009] se calcula la masa de las nanopartículas tomando una capa de SiO₂ de 0,5 nm determinada a partir de la profundidad de la capa oxidada en los cálculos teóricos (ver capítulo 7).

Se calcula el volumen del corazón de silicio, el volumen de la capa de SiO₂ y la masa de cada partícula según su tamaño agrupándolas en intervalos de 0,5 nm. En la Tabla 8 se muestra el tamaño, el peso específico de cada tamaño, el volumen del corazón de silicio (V_{Si}), el volumen de la capa de SiO₂ (V_{SiO₂}), la masa de cada partícula según su tamaño y en la última columna se representa la masa de cada tamaño de partícula por el porcentaje en el que contribuye cada tamaño en la distribución (m_{NP}).

Tabla 8: Masa de una nanopartícula en función de su tamaño.

D (nm)	%	V _{Si} (nm ³)	V _{SiO₂} (nm ³)	m _{NP} (g)	m _{NP} (g) · %
1,5	3,7	1,0	2,5	9·10 ⁻²¹	3,4·10 ⁻²²
2,0	13,2	3,5	5,0	2·10 ⁻²⁰	2,8·10 ⁻²¹
2,5	16,9	8,4	8,4	4·10 ⁻²⁰	7,0·10 ⁻²¹
3,0	22,8	16,4	12,6	7·10 ⁻²⁰	1,6·10 ⁻²⁰
3,5	16,4	28,3	17,9	1·10 ⁻¹⁹	1,9·10 ⁻²⁰
4,0	11,6	44,9	24,1	2·10 ⁻¹⁹	2,0·10 ⁻²⁰
4,5	4,2	67,0	31,4	2·10 ⁻¹⁹	1,0·10 ⁻²⁰
5,0	4,2	95,4	39,8	3·10 ⁻¹⁹	1,4·10 ⁻²⁰
5,5	3,2	130,9	49,2	4·10 ⁻¹⁹	1,4·10 ⁻²⁰
6,0	1,1	174,2	59,8	6·10 ⁻¹⁹	6,0·10 ⁻²¹
6,5	1,6	226,2	71,6	7·10 ⁻¹⁹	1,1·10 ⁻²⁰
7,0	1,1	287,6	84,6	9·10 ⁻¹⁹	9,4·10 ⁻²¹

Posteriormente con la distribución de tamaños se calcula el porcentaje que cada tamaño aporta a la masa molecular relativa total y se obtiene una masa media de 1,291·10⁻¹⁹ g. Multiplicando este valor por el número de Avogadro se obtiene la masa molecular media de 77,7 kDalton para las nanopartículas recubiertas con una capa de óxido.

$$Mr(\text{NP-Si-SiO}_2) = 7,77 \cdot 10^4 \text{ g/mol}$$

3.4. Modificación Superficial

Las nanopartículas se recubrieron con distintas especies químicas: $-\text{CH}_3$ y metacrilato de metilo (MMA) mediante métodos fotoquímicos y térmicos. Posteriormente se estudiaron las propiedades que estos recubrimientos le confieren a las nanopartículas, así como el efecto de añejamiento en suspensiones en distintos solventes, tales como tolueno, cloroformo, tetracloruro de carbono, metanol y agua.

3.4.1. Cálculo de Terminaciones Si-H

Se necesita conocer la cantidad estequiométrica de metacrilato de metilo, metanol o cualquier otro grupo funcional necesario para recubrir la superficie de las nanopartículas. Esta cantidad se calcula a partir de la distribución de tamaños, la masa molecular relativa, la concentración de nanopartículas y el número medio de terminaciones obtenidas mediante los cálculos teóricos. Es decir, se calcula el número teórico de terminaciones que hay en la nanopartículas y se añade la cantidad de reactivo necesaria.

Utilizando los cálculos teóricos se obtiene la relación entre el tamaño de la partícula y los enlaces de los átomos superficiales capaces de reaccionar. La Figura 19 muestra la relación lineal entre terminaciones y el diámetro cuadrado de las nanopartículas. Una vez obtenida esta relación se puede calcular el número de terminaciones para cada diámetro. Con estos valores y la frecuencia de distribución de tamaños se obtienen las terminaciones medias por mol de nanopartículas.

$$N(\text{Si} - \text{H}) = 65,62 + 4,311 \cdot D^2 \quad R = 0,76 \quad (28)$$

Utilizando el tamaño medio de la distribución de partículas (3,5 nm) en la ecuación 28 se obtiene una cantidad de 118 terminaciones superficiales por partícula. Con el número de Avogadro y la masa molecular relativa media se puede calcular el número medio de moles de terminaciones por gramo resultando $5 \cdot 10^{-3}$ moles de Si-H/g.

Figura 19: Número de terminaciones superficiales de las nanopartículas en función del diámetro.

3.4.2. Proceso de Modificación Superficial

Preparación de las Muestras

Una vez sintetizadas las nanopartículas, se separan inmediatamente mediante filtración, se suspenden en tolueno seco y se burbujan con argón durante 15 minutos. Una estimación de la cantidad de nanopartículas en suspensión se calcula en función del tiempo de síntesis (ecuación 27). Este tiempo es de unas seis horas y corresponde concentraciones de $\sim 0,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$. Con este dato y tal como se ha explicado anteriormente se calcula la cantidad estequiométrica de reactivo necesario para la derivatización que resulta ser de $4 \cdot 10^{-5}$ moles de CH_3OH o MMA. Se derivatiza utilizando al menos 10 veces esta concentración de reactivo para asegurar un adecuado recubrimiento superficial.

Modificación Superficial con Metacrilato de Metilo

La modificación superficial con metacrilato de metilo se realiza añadiendo $10 \text{ } \mu\text{M}$ de este reactivo a la suspensión de nanopartículas que se encuentra en atmósfera inerte. La mezcla se ilumina durante 20 horas con una lámpara Rayonet Photochemical Reactor Lamp (RPR 3500 A, Southern N.E. Ultraviolet Co.) que emite a $(350 \pm 20) \text{ nm}$. Una metodología similar fue

empleada en anteriores trabajos publicados en la literatura con otros reactivos [Hua 2005, Li 2004a, Sato 2006].

Al irradiar la suspensión en el UV se rompe el enlace Si-H de 3,6 eV de energía, por lo que para producir la ruptura del enlace es suficiente emplear luz de 345 nm [Cheng 2000]. La irradiación inicia una reacción radicalaria como se muestra en las ecuaciones 29 - 33; cuyo mecanismo se postula teniendo en cuenta los posibles productos detectados por los espectros de infrarrojo en la sección 3.5.1.

Etapas de Iniciación

Etapas de Propagación

Etapas de Terminación

Modificación Superficial con Grupos Metilo y Metoxilo

La derivatización con grupos metilo (-CH₃) y metoxilo (-O-CH₃) se lleva a cabo mediante un procedimiento diferente. Se le añaden 40 mM de metanol a la solución de nanopartículas en tolueno y se mantiene un constante burbujeo con nitrógeno. Esta solución se calienta durante 4 horas a 90° C en agitación. Dependiendo del estado de oxidación de la superficie se puede producir la reacción 34 ó 35.

Tratamiento Post-Derivatización

Aún derivatizadas, las nanopartículas siguen sufriendo un proceso de oxidación de la superficie en los lugares donde no se derivatizaron los grupos Si-H. Durante este proceso, que puede durar hasta un mes, las propiedades fisicoquímicas van modificándose hasta alcanzar un punto a partir del cual se estabilizan y se mantienen constantes durante meses en suspensión, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Este mismo proceso se informó en la literatura para films de silicio poroso, el cual se oxida cuando se deja en el ambiente durante varios meses [Cullis 1997]. Es un efecto conocido la oxidación espontánea de las nanopartículas de silicio, que tiene lugar en horas, con la consiguiente pérdida de luminiscencia [Hua 2005].

Se observó que el calentamiento de una muestra de nanopartículas en suspensión de tolueno y ausencia de oxígeno a 90°C durante 8 horas, tiene el mismo efecto sobre las propiedades luminiscentes que el producido al ser almacenadas en esta misma suspensión a temperatura ambiente durante dos meses. Por lo tanto, este procedimiento se aplicó en forma rutinaria para optimizar y estabilizar las propiedades de todas las partículas. Los resultados que se muestran en este trabajo son referidos a nanopartículas estabilizadas mediante este método. Las suspensiones de nanopartículas son en todos los casos transparentes y límpidas. En la Figura 15 se muestra una suspensión de nanopartículas transparente cuando no están iluminadas y emitiendo en el azul cuando se excitan.

3.5. Caracterización Superficial

3.5.1. Espectroscopia Infrarroja (FTIR y FTIR-ATR)

Se realizaron espectros de infrarrojos por transformada de Fourier con el propósito de caracterizar los enlaces que componen la superficie de las nanopartículas. Debido a la poca cantidad de muestra que se obtiene en cada síntesis se tuvo que recurrir a varios métodos de preparación de la muestra (pastillas de KBr y sembrado sobre oblea de silicio) y a combinar técnicas de FTIR con técnicas de FTIR-ATR, descritos en el capítulo anterior.

Nanopartículas Sin Recubrimiento Superficial

La Figura 20 muestra el espectro de las nanopartículas de silicio sin recubrimiento superficial (NP-Si) utilizando una pastilla de KBr como soporte (línea roja) y se compara el espectro de nanopartículas de SiO_2 en el mismo soporte (línea negra). En ambos espectros aparecen bandas a 3400, 1630 y 800 cm^{-1} asignadas a grupos Si-OH y la banda a 1100 cm^{-1} asignada a vibraciones de Si-O-Si que son características de SiO_2 [Li 2004b, Ruiz 2007].

Figura 20: Espectro FTIR de NP-Si (línea roja) y NP-SiO₂ (línea negra). Grafico interior, detalle ampliado de las NP-Si.

Para el espectro de las nanopartículas de silicio se observan unos picos muy débiles y anchos a $2100 - 2250 \text{ cm}^{-1}$ y $2200 - 2300 \text{ cm}^{-1}$ atribuidos a los modos de estiramiento de Si-H_x y modos vibracionales de $\text{O}_x\text{Si-H}$ respectivamente (interior de la Figura 20). El pico a $\sim 900 \text{ cm}^{-1}$ puede ser asignado a los modos de *bending* para el Si-H. Estos resultados están de acuerdo con los observados en la literatura para superficies hidroxiladas en superficies de silicio [Bateman 1997, Kim 1999, Kravets 2005, Li 2004b, Sweryda-Krawiec 1999].

Cuando se añejan las partículas sin derivatizar, muestran un incremento en la intensidad de los picos debidos al Si-OH ($3400 - 3500$, 1630 and 800 cm^{-1}) y Si-O-Si (1100 cm^{-1}), y desaparecen los picos atribuidos a vibraciones $\text{O}_3\text{Si-H}$ [Belomoin 2000, Ma 2004] y a Si-H a 2100 cm^{-1} . Los espectros de las nanopartículas de silicio sintetizadas en este trabajo muestran un alto grado de oxidación superficial.

Nanopartículas Recubiertas con Grupos Metilo

El espectro de FTIR de las nanopartículas modificadas superficialmente con grupos $-\text{CH}_3$ y $-\text{O-CH}_3$ se obtuvo sembrando la muestra sobre un cristal de silicio. Las partículas obtenidas recubiertas mediante estos dos grupos se representan como NP-SiMe. La Figura 21 muestra los espectros obtenidos con recubrimiento de -Me (línea negra) en comparación con el espectro de NP-Si (línea roja). El espectro de las NP-SiMe muestra en el gráfico interior con la escala ampliada por debajo de 2500 cm^{-1} en una relación 1:5 para resaltar los picos más pequeños. Se observa un conjunto de picos alrededor de 2920 y 2850 cm^{-1} debido a los estiramientos C-H del grupo CH_3 , una pequeña absorción a 1470 cm^{-1} atribuidas a las vibraciones tipo tijera del Si-C [Rosso-Vasic 2008b, Sun 2005].

Una absorción ancha con un máximo alrededor de 1050 cm^{-1} debido a los estiramientos de los enlaces Si-O-Si [Bateman 1997] indica la oxidación de la superficie. No existe evidencia del estiramiento del -OH que se localiza en la región de los $3500 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ indicando la ausencia de metanol fisisorbido y de grupos superficiales Si-OH. Por tanto, se puede concluir que la reacción 34 se produjo en forma eficiente obteniendo un alto grado de recubrimiento de las nanopartículas con grupos $-\text{CH}_3$ y $-\text{O-CH}_3$.

Figura 21: Espectro FTIR de NP-SiMe (línea negra) y NP-Si (línea roja).

Nanopartículas Recubiertas con Metacrilato de Metilo

El espectro de ATR-IR de las nanopartículas recubiertas con metacrilato de metilo (NP-SiMMA) usando como referencia una oblea de silicio se muestra en la Figura 22. Se comparan espectros obtenidos con recubrimiento de - MMA (línea negra) con el espectro de NP-Si (línea roja). El espectro de las NP-SiMMA muestra picos a 2920 y 2850 cm^{-1} asignados al estiramiento del C - H del grupo CH_3 , a 1724 cm^{-1} debido al estiramiento de C=O en ésteres y a 1450 y 1370 cm^{-1} debido a la contribución de los modos de deformaciones de CH_3 en alcanos y ésteres respectivamente. La absorción a 1260 cm^{-1} se asigna a deformaciones de Si- CH_2 -CH y las absorciones a 1600 y 960 cm^{-1} pueden ser atribuidas a modos vibracionales de Si-C=C [Larson 1987].

Las ultimas bandas y la ausencia de señales a 2100 - 2200 cm^{-1} debido a Si-H, sugieren la presencia de un enlace covalente de los ligandos del metil éster con la superficie como se muestra en las estructuras propuestas en las reacciones 32 y 33. La presencia de picos a 1115 y 1055 cm^{-1} característicos de Si-O-Si en pequeñas partículas (y probablemente el de 830 cm^{-1}) [Chung 2009, Kravets 2005] son indicativos de una superficie de silicio oxidada. La ausencia de bandas alrededor de 3500 cm^{-1} claramente indica la ausencia de enlaces Si-OH.

Figura 22: Espectro FTIR de NP-SiMMA (línea negra) y NP-Si (línea roja).

Nanopartículas Recubiertas con Metacrilato de Metilo y Envejecidas en Agua

El espectro de FTIR de las NP-SiMMA obtenidas después de suspenderlas durante una semana en soluciones acuosas a pH 7 (Figura 23, línea roja) muestra importantes picos de absorción alrededor de 3500 cm^{-1} , ausentes en el espectro de FTIR de las partículas no envejecidas (Figura 23, línea negra). Este pico puede ser asignado al estiramiento de OH en Si-OH. Los picos más anchos a 1115 y 1055 cm^{-1} característicos de vibraciones Si-O-Si también se observan. Los otros picos debidos a vibraciones C-H de los grupos CH_3 (2920 y 2850 cm^{-1}), estiramiento del C=O (1724 cm^{-1}), modos de deformación del CH_3 en alcanos y ésteres (1450 and 1370 cm^{-1} , respectivamente), modos vibracionales del Si-C=C (1600 and 960 cm^{-1}), y deformación de Si-CH₂-CH (1260 cm^{-1}) atribuidos a enlaces covalentes del MMA a la superficie se siguen observando en suspensión acuosa.

La hidrólisis del grupo metil éster del MMA unido a la superficie da lugar a la formación de grupos terminales COOH. Esta posibilidad no puede descartarse debido a la absorción de C=O y OH carboxílicos en la zona de $(3100 - 2400)\text{ cm}^{-1}$. Sin embargo, los pequeños picos a 1724 cm^{-1} que podrían

asignarse al estiramiento del C=O no son concordantes con el gran pico de absorción debido al OH observado a 3500 cm^{-1} [Judge 2008, Lambert 1998]. Por lo tanto, los grupos COOH solos no pueden tenerse en cuenta para la fuerte absorción a 3500 cm^{-1} . La evidencia obtenida indica que las soluciones alcalinas catalizan la oxidación de la superficie de las partículas, tal como ocurre con el aumento de solubilidad de la sílice (SiO_2) a silicato alcalino en dispersiones coloidales a $\text{pH} > 10$ [Zhuravlev 2000].

Figura 23: Espectro FTIR de NP-SiMMA nuevas (línea negra) y envejecidas (línea roja).

3.5.2. Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X

Espectro de Exploración

El espectro de exploración de las nanopartículas recubiertas con metacrilato de metilo muestra la presencia de C, O, Si y Au (Figura 24). En las regiones de O1s, C1s, Si2p se obtuvieron espectros de alta resolución que permitieron obtener relaciones suponiendo una distribución homogénea de los elementos en el volumen muestreado. La presencia del pico debido al oro en la muestra es debido al sustrato utilizado para la medida.

El área bajo la curva de los picos obtenidos para el silicio, oxígeno y carbono nos da el porcentaje de cada átomo en la muestra y la relación respecto a los otros dos componentes (Tabla 9). La columna A (%) muestra el porcentaje de cada elemento. La elevada proporción de carbono respecto al silicio es debida a que las nanopartículas se encontraban en solución de tolueno y este puede quedar adsorbido sobre la superficie de las partículas [Mirji 2006], por lo tanto no se tomó en cuenta el espectro de alta resolución del pico de carbono.

Tabla 9: Relación de áreas obtenidas en el espectro de exploración para el silicio, carbono y oxígeno.

Región	A (%)	X/Si	X/C	X/O
Si _{2p}	3,02	1	0,03	0,31
O _{1s}	9,63	3,19	0,11	1
C _{1s}	87,17	28,86	1	9,05

Figura 24: Espectro XPS de exploración de NP-SiMMA.

Espectros de Alta Resolución

Se obtuvieron los espectros de alta resolución de Si2p, O1s y C1s y se realizó un análisis de los diferentes entornos mediante la deconvolución de los mismos. La región de Si2p (Figura 25) principalmente está formada por la contribución del pico a 102,6 eV (1,6 FWHM) el cual muestra un entorno local de silicio entre los enlaces Si-C y Si-O, publicado en la literatura con energía de enlace en 101 y 103,5 eV, respectivamente. Un pico a 102,5 eV se asigna a entornos Si(C,O) en polimetilsesquioxanos [Ma 2002], en vidrios de oxicarburos [Soraru 1996], y para entornos de Si-SiO₃ en films de SiO [Nguyen 1989]. En investigaciones sobre nanoalambres de silicio se atribuyen estas posiciones del silicio a estados oxidación Si⁴⁺ (103 eV) y Si³⁺ (102 eV) con lo cual indica la presencia de SiO_x [Peng 2011].

Figura 25: XPS de alta resolución del Si2p.

La Figura 26 muestra el espectro de alta resolución de O1s junto con la deconvolución en cuatro bandas distintas. Los resultados de la fracción de cada uno de estos picos se especifican en la Tabla 10. La región de O1s muestra la contribución de tres entornos diferentes para los átomos de oxígeno, se detalla la abundancia de cada pico como fracción del área total

en la Tabla 10. La contribución más importante (67%) con una energía de enlace de 532,7 eV puede ser atribuido a enlaces Si-O [Nguyen 1989].

El ratio de áreas de este último pico sobre el pico de Si2p soporta aproximadamente un ratio 1:2 de Si:O. Asumiendo que los átomos de oxígeno que quedan pertenecen al grupo éster del grupo orgánico unido a la superficie o al oxígeno de enlace entre la nanopartícula y el polímero. El pico con una energía de enlace de 531,3 y 530,1 eV puede ser atribuido a enlaces C-O-Si [Kim 2007] y a entornos C-O del éster [Jing 2002]. El pico con una energía de enlace de 528,8 eV puede ser atribuido a enlaces C=O del grupo éster [Kim 2007]. El ratio entre áreas de estos oxígenos y de silicio indica la unión de una molécula orgánica cada 3 átomos de silicio.

Tabla 10: Contribución de cada pico de Oxígeno.

Energía de Enlace (eV)	528,8	530,1	531,3	532,7
Fracción de Área	0,128	0,166	0,080	0,627

Figura 26: XPS de alta resolución del O1s.

Estos resultados junto con los obtenidos por FTIR indican que las nanopartículas tienen una superficie altamente oxidada con una capa de SiO₂ y metacrilato de metilo que lleva a la formación de una red de -O-Si-C-. Por tanto, se puede inferir a partir de los ratios de Si:O:C la siguiente composición superficial: Si₃O₆(C₅O₂H_y)₁, con y = 7 - 8.

3.5.3. Estudios de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR)

Se realizaron medidas de EPR de las NP-SiMMA en la oscuridad para determinar si las NP-SiMMA contenían defectos superficiales asociados a Si[•] y SiO[•] de los que frecuentemente se habla en la literatura [Kuntermann 2008, Peng 2011]. No se detectó ninguna señal de EPR en nuestras muestras de NP-SiMMA de concentración 500 µg/mL por lo que se descartó la presencia de defectos superficiales.

3.5.4. Angulo de Contacto, Mojabilidad y Energía Superficial

Cuando un volumen de líquido se pone en contacto con un sustrato solido, las fuerzas de capilaridad determinarán si se produce un film (mojabilidad total) o una gota con un Angulo de contacto finito (condición de mojabilidad parcial) [Mittal 2006]. El análisis de la forma de una gota es una de las más simples y eficientes técnicas para estudiar los fenómenos de mojabilidad, ya que la medida de los ángulos de contacto nos proporciona información valiosa de los sustratos.

Se realizaron estudios de mojabilidad de la superficie de las nanopartículas y se midió el ángulo de contacto de una gota de agua sobre una superficie recubierta por NP-Si y NP-SiMMA. La Figura 27 (derecha) muestra una fotografía de una gota mojando una superficie recubierta por NP-SiMMA con un ángulo de contacto de 105°, comparable con el ángulo de contacto de una gota sobre superficies de polipropileno (108°) o polietileno (88-103°) [Butt 2003], algo mayor que el determinado para films de metacrilato de metilo (94°) [Jarvis 1964]. La Figura 27 (izquierda) muestra la fotografía de una gota de agua sobre las NP-Si, el ángulo de contacto que se mide es de 65° grados correspondiente a una superficie más hidrofílica.

Estos resultados sugieren un alto grado de recubrimiento por el metacrilato de metilo ya que los valores de ángulo de contacto son similares a films de los polímeros. Asimismo, los valores menores < 90° observado por la superficie de las NP-Si [Sun 2005] sugieren una superficie hidrofílica

concordante con la capa de SiO_2 conteniendo grupos silanoles (Si-OH) superficiales.

Figura 27: Fotografía de una gota de agua sobre una superficie recubierta con NP-SiMMA (izquierda) y NP-Si (derecha).

3.6. Conclusiones

Se desarrolló y adaptó un método de síntesis electroquímica mediante el cual se obtuvieron nanopartículas de silicio libres de impurezas con una estrecha distribución de tamaños de (3 ± 1) nm de diámetro y terminaciones superficiales con enlaces Si-H. Estas partículas resultaron adecuadas para su posterior modificación y estudio. Como producto secundario de la síntesis se obtuvieron trozos de silicio poroso coloidal sobre los que se realizaron estudios comparativos con las nanopartículas.

Se derivatizaron las nanopartículas con metanol y con metacrilato de metilo utilizando distintos procedimientos, para posteriormente estudiar el cambio en algunas propiedades debidos a la modificación superficial de las nanopartículas.

Se caracterizó el recubrimiento superficial de las muestras mediante espectroscopia IR, XPS y ángulo de contacto. Estos experimentos sustentan el recubrimiento de las partículas por distintas moléculas.

Se observa que el método de síntesis optimizado permite obtener partículas luminiscentes, de 3 nm de diámetro, resultando su superficie fuertemente oxidada. La estandarización del método lleva a la síntesis de partículas con propiedades superficiales y tamaños reproducibles en los distintos lotes sintetizados a lo largo de los 4 años de trabajo experimental que involucró este trabajo de tesis.

Capítulo 4:

Propiedades Fotofísicas de las Nanopartículas

4.1. Introducción

La fotoluminiscencia de las nanopartículas de silicio de pequeño tamaño es una de las propiedades más interesantes de este material ya que puede ser fuente de posteriores aplicaciones y ser utilizada para obtener parámetros químicos y físicos de las partículas. La fotoluminiscencia varía con el tamaño desde el infrarrojo hasta el azul [Belomoin 2002, Choi 2007, Rosso-Vasic 2008b, Wolkin 1999] y muestra una fuerte dependencia con la naturaleza del recubrimiento [Hua 2006, Rogozhina 2006, Sweryda-Krawiec 1999], la oxidación [Belomoin 2000] y los defectos superficiales [Kuntermann 2008].

Se encuentran en la literatura estudios publicados sobre nanopartículas de silicio con diversas propiedades fotofísicas cuya correlación con los factores nombrados anteriormente no siempre es posible, tal como se muestra a continuación para con resultados de distintos autores. Se publicaron nanopartículas de ~ 1 nm de diámetro recubiertas con hidrógeno y éster de metilo, preparadas mediante un método electroquímico por anodización del cristal de silicio, muestran un espectro de luminiscencia con máximos alrededor de 320 o 380 nm con longitudes de onda de excitación a 270 y 320 nm, respectivamente [Rogozhina 2006]. Nanopartículas de 1,6 nm de diámetro medio y derivatizadas con octanos, sintetizadas a partir de una mezcla de silano/argón en un flujo continuo a presión atmosférica en un reactor de microdescargas, muestran estabilidad en aire y una luminiscencia con un máximo de emisión sobre los 420 nm y de excitación a 360 nm [Sankaran 2005]. Por otro lado, nanopartículas funcionalizadas con alquilos de $1,6 \pm 0,2$ nm de radio, sintetizadas mediante un método de reducción en solución en presencia de micelas, muestran espectros de emisión con $\lambda_{em}^{max} \sim 280 - 290$ nm con progresiones vibracionales $974 \pm 14 \text{ cm}^{-1}$ característicos de los fonones del SiC en fase masiva [Rosso-Vasic 2008b]. A su vez, nanopartículas recubiertas con "octano" de $3,9 \pm 1,3$ nm de diámetro sintetizadas a partir de la metátesis de NaSi con NH_4Br , muestran luminiscencia con $\lambda_{em}^{max} \sim 438$ nm por excitación a 360 - 400 nm [Zhang 2007].

4.2. Espectros de Absorción

Estudios publicados en la literatura muestran que las nanopartículas de silicio presentan un espectro de absorción por debajo de los 450 nm desplazándose hacia el UV a medida que el tamaño disminuye desde los 6 nm a los 2 nm de diámetro [Littau 1993]. Este efecto se discute en la literatura donde se muestra como suspensiones de partículas anodizadas utilizando una mezcla 10:1 de HF/HNO₃, presentan una disminución significativa de la absorbancia con la disminución del tamaño de las partículas [Choi 2006].

4.2.1. Corrección por Dispersión de Luz

En la determinación de los espectros de absorción de las NP debe de tenerse en cuenta la influencia de la dispersión de luz por las partículas. Ya que los espectros obtenidos directamente de las medidas en el espectrofotómetros son los espectros de atenuación [Eckhoff 2006, Rosso-Vasic 2008a]. Los espectros obtenidos con espectrofotómetros de uso común necesitan ser corregidos cuando se trabaja con material particulado en suspensión, ya que presentan una desviación debido a la dispersión de luz incidente que no alcanza al detector y por tanto es interpretado como absorción [Lakowicz 2006].

Los fenómenos de dispersión de luz pueden ser de naturaleza distinta dependiendo si los choques entre los fotones y las partículas son elásticos (se produce dispersión Raman) o inelásticos (se produce dispersión Rayleigh). En el caso de nanopartículas donde su tamaño es menor a un 10% de la longitud de onda incidente predomina el efecto Rayleigh. La luz dispersada a partir de la luz incidente es atribuida a la absorción pero no necesariamente excita la muestra y no genera emisión que pueda ser analizada. Dado que el espectro obtenido directamente del equipo empleado es de atenuación, hay que restarle la luz dispersada por las nanopartículas para obtener el espectro de absorción. La cantidad de luz dispersada se obtiene utilizando la ecuación 36, la cual describe la dependencia de la intensidad de luz dispersada con el ángulo de dispersión (θ), la distancia a la muestra de la luz dispersada (R), el índice de refracción de la muestra (n), el diámetro de la partícula (d) y la longitud de onda de luz dispersada (λ).

$$\frac{I}{I_0} = \frac{1 + \cos^2 \theta}{2R^2} \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \left(\frac{d}{2} \right)^6 \quad (36)$$

Trabajando a concentración constante y en el mismo equipo de medida, todos los parámetros de la ecuación 36 se mantienen constantes en la muestra, excepto la longitud de onda. Por lo tanto, se puede obtener la ecuación 37, en la que se relaciona la cantidad de luz dispersada con la inversa de la longitud de onda elevada a la cuarta potencia [Landes 2002].

$$\frac{I}{I_0} = b \cdot \left(\frac{1}{\lambda} \right)^4 \quad (37)$$

La intensidad de dispersión de luz se determina como se describe a continuación. Se obtiene el espectro de atenuación de la muestra y sabiendo que no existe absorción de las partículas por encima de los 450 nm se asigna toda la atenuación registrada en este intervalo a la dispersión de luz. Se utiliza el intervalo de curva de absorción entre 450 nm y 800 nm para ajustar la ecuación 37 y este ajuste se extrapola al resto del espectro. Una vez obtenida la atenuación y la dispersión, se restan los espectros y se obtiene el espectro de absorción.

Cuando el ajuste a la ecuación 37 es pobre, los espectros se ajustan a la ecuación 38, la cual tiene en cuenta la agregación de las partículas con un parámetro c que varía desde 4, para sistemas totalmente desagregados e ideales, hasta valores de -2,2 para sistemas de distribuciones y agregación muy irregulares [Timasheff 1966].

$$\frac{I}{I_0} = b \cdot \left(\frac{1}{\lambda} \right)^c \quad (38)$$

Correcciones similares fueron realizadas por distintos autores en la literatura para la obtención de los espectros de absorción [Eckhoff 2006].

4.2.2. Espectros de Absorción en Distintos Medios

Se determinaron los espectros de absorción para las NP-Si y NP-SiMMA en tolueno y en agua. Se comprobó que el espectro no variaba con la saturación con oxígeno, aire y argón; ni con la temperatura en el intervalo entre 273 y 323 K. Todos los espectros se corrigieron por dispersión de la luz y se realizaron para una concentración de $6 \cdot 10^{-6}$ mol/L de nanopartículas.

Nanopartículas en Suspensión de Tolueno

En la Figura 28 se muestran los espectros de atenuación obtenidos para las NP-SiMMA (línea negra) y dispersión de luz obtenida mediante el uso de la ecuación 37 (línea roja). En el gráfico interior se muestra el coeficiente de extinción molar en función de la longitud de onda de absorción. Los valores de absorbancia se mantienen constantes dentro del error experimental para las NP-SiMMA y las NP-Si en suspensiones de tolueno saturadas de argón, aire y oxígeno.

Figura 28: Espectros de NP-SiMMA en suspensión de tolueno saturada en argón: espectro de atenuación (línea negra); dispersión de luz (línea roja); gráfico interior: espectro de absorción. ϵ : coeficiente de extinción molar.

Nanopartículas en Suspensión Acuosa

Se midieron los espectros de absorción para las NP-Si y NP-SiMMA a distintas concentraciones de oxígeno. La Figura 29 muestra los espectros de atenuación, el espectro de dispersión de luz y el espectro de absorción representado como coeficiente de absorción molar para suspensiones acuosas de NP-SiMMA a pH 12 saturado con argón. Se calculó el espectro de dispersión de luz ajustando los datos a la ecuación 38 con un parámetro $c = -1,88$. Los espectros de absorción medidos para las suspensiones saturadas en argón, aire y oxígeno no muestran, dentro del error experimental, ninguna variación con la concentración de oxígeno disuelto en el medio. La diferencia en los valores de c para los espectros en tolueno y en agua pueden deberse a la mayor formación de agregados en agua debido a la menor afinidad del recubrimiento superficial con el medio.

Figura 29: Espectros de NP-SiMMA en suspensión acuosa a pH 12 saturada en argón: espectro de atenuación (línea negra); dispersión de luz (línea roja); grafico interior: espectro de absorción. ϵ : coeficiente de extinción molar.

4.3. Fluorescencia Estacionaria

Los espectros obtenidos deben corregirse para obtener la emisión real. Debe calibrarse la variación de intensidad de la lámpara de emisión en función de la longitud de onda y tener en cuenta la sensibilidad del detector y los efectos de filtro internos.

Calibración del Espectrofluórometro y Corrección por Filtro Interno

Se realiza la calibración del espectrofluorómetro usando colorantes patrón con propiedades bien definidas y estandarizadas en la literatura. En este caso se ha elegido Rodamina B, 9,10-difenilantraceno y Cumarina 153 [Lakowicz 2006]. La elección se ha basado en la disponibilidad de los colorantes y en que el intervalo de longitudes de onda para la calibración sea adecuado para los espectros de nuestras partículas.

La calibración de la excitación se realiza con Rodamina B en etilenglicol con una concentración de 3 g/L. El espectro ideal de excitación cuando se recoge la emisión a 630 nm es independiente de la longitud de onda de excitación entre 200 y 600 nm y por tanto deberíamos de obtener una línea recta. La Figura 30 muestra el espectro obtenido a partir del cual se realizan las correcciones.

Figura 30: Espectro de excitación de Rodamina B en etilenglicol de concentración de 3 g/L.

La calibración del espectro de emisión se realiza mediante el uso de dos colorantes con espectros de emisión que se encuentran en el mismo intervalo de longitudes de onda que la muestra a determinar. La Figura 31 muestra la emisión de la Cumarina 153 en metanol por excitación a 400 nm [Lakowicz 2006] y la emisión del 9,10-Difenilantraceno (9,10-DPA) en benceno por excitación a 385 nm [Heller 1974]. Se obtienen los espectros patrones, se normaliza y se comparan con el espectro de las nanopartículas para observar las posibles desviaciones del equipo de medida.

Figura 31: Espectro de fluorescencia de la Cumarina 153 en metanol (izquierda) y espectro de fluorescencia del 9,10-DPA en ciclohexano (derecha). La emisión patrón se representa en línea negra y la detectada por el equipo en línea roja.

Parte de la luz incidente en la muestra es absorbida en el camino óptico anterior al punto de excitación deseado. De igual forma, los fotones emitidos por la muestra tienen que recorrer un camino óptico en el cual también se producen efectos de atenuación. Estos efectos se corrigen con el espectro de absorción y utilizando la ecuación 39, la cual calcula la disminución de intensidad por fotones absorbidos por la misma muestra a cada longitud de onda [Lakowicz 2006].

$$F_{corr}(\lambda_{em}) = F_{obs}(\lambda_{em}) \cdot \text{anti log}\left(\frac{A(\lambda_{ex}) + A(\lambda_{em})}{2}\right) \quad (39)$$

Donde F_{corr} es la intensidad de fluorescencia real; F_{obs} es la intensidad de fluorescencia registrada por el equipo y A es la absorbancia de la muestra.

4.3.2. Nanopartículas en Solventes Orgánicos

Añejamiento de Nanopartículas Recién Sintetizadas

Los espectros de excitación y emisión de las partículas recién sintetizadas en suspensión de tolueno dependen fuertemente del tiempo transcurrido desde la síntesis y de la presencia de oxígeno en la solución. La Figura 32, muestra la evolución del espectro de emisión obtenido excitando las suspensiones de NP-SiMMA en tolueno a 360 nm a diferentes tiempos después de la síntesis. La banda de emisión centrada en 430 nm aumenta de intensidad con el tiempo sin desplazarse y sin perder resolución. El mismo comportamiento se observa cuando se añejan en metanol, cloroformo y CCl_4 aunque con menores intensidades del espectro de emisión. Con el fin de evitar el problema de la variación de las propiedades en el tiempo se realizó un tratamiento para acelerar el añejamiento de las partículas calentando las suspensiones en tolueno saturadas en argón durante cuatro horas a 80°C . Por ello, tal como se menciona anteriormente, todas las determinaciones realizadas en esta tesis se han realizado con las partículas estabilizadas.

Figura 32: Variación de la intensidad de emisión con el tiempo en suspensión de tolueno.

Reproducibilidad de la Emisión para Nanopartículas Sintetizadas en Diferentes Lotes

Las nanopartículas son muy sensibles a su tamaño y configuración estructural, por tanto, variaciones en cada una de las etapas de la síntesis pueden llevar a la formación de nanopartículas con espectros de emisión distintos. Para evaluar la importancia de estas variaciones, se compara en la Figura 33 el espectro emisión ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$) de NP-Si en suspensión de tolueno sintetizadas en tres lotes distintos realizados en un intervalo de 15 meses. Se observa una alta reproducibilidad en la posición de los máximos de las bandas del espectro, aunque aparecen pequeñas variaciones en la altura relativa de los tres máximos.

Figura 33: Comparación del espectro de emisión de NP-Si en suspensión de tolueno obtenidas en diferentes lotes durante un periodo de dos años: 07-02-2008 (negro); 16-04-2008 (rojo); 05-05-2009 (azul).

Dependencia de la Emisión con el Recubrimiento

La composición superficial es otro de los factores a tener en cuenta al estudiar las propiedades de las partículas. La Figura 34 muestra los espectros de emisión y excitación de suspensiones de NP-Si, NP-SiMe y NP-SiMMA en suspensión de tolueno. Las pequeñas diferencias observadas en las intensidades relativas de las bandas depende más del lote de síntesis que del tipo de recubrimiento superficial que posee cada partícula. Datos de la bibliografía muestran que el espectro de excitación - emisión de nanopartículas de 5 nm de radio, parcialmente oxidadas y orgánicamente recubiertas [Hua 2006] y nanopartículas de 3 - 4 nm recubiertas con octano [Zhang 2007] se presentan en la misma región.

Ambos espectros, de emisión y excitación, muestran picos con un espaciamiento constante de unos 0,2 eV; como se observa por la separación entre los mínimos en el espectro de la segunda derivada mostrado en el gráfico interior de la Figura 34. La estructura de los picos en la fotoluminiscencia de las nanopartículas de silicio electroquímicamente sintetizadas ha sido previamente publicada [Dobrovolskas 2009, Holmes 2001] y pueden ser atribuidos a dos factores. El primero de ellos es la contribución de poblaciones de nanopartículas con un número específico de átomos y configuración superficial [Dobrovolskas 2009]. El segundo factor se atribuye a la presencia de oxígeno en la superficie de las partículas [Holmes 2001]. La estructura fina de los picos no se ve afectada por la longitud de la cadena alquílica enlazada en la superficie ni por la longitud de onda de excitación [Dobrovolskas 2009], siendo esto coincidente con nuestras observaciones.

Para nanopartículas sintetizadas mediante reacciones químicas con precursores de silicio en solución, la resolución en los picos para los espectros de excitación y emisión se atribuyeron a la participación de las vibraciones de los átomos de silicio enlazados con moléculas causado por la localización del LUMO en la superficie [Rosso-Vasic 2008b]. En este caso, la excitación electrónica de las nanopartículas lleva a un desplazamiento de la densidad electrónica hacia la superficie de las nanopartículas, con el consiguiente cambio en la geometría. Esto se discutirá en la sección de anisotropía donde se mide la intensidad de estas alteraciones.

Las nanopartículas recubiertas con -OH, -Me y -MMA están formadas por redes superficiales de siloxanos y (excepto para NP-Si) no muestran vibraciones de 0,2 eV en sus espectros infrarrojos (picos a 1630 cm^{-1}) como se

vio en el capítulo 3. Esto sugiere que las redes de Si-SiO₂ pueden sufrir múltiples vibraciones no detectables por la absorción infrarroja pero que dan lugar a la resolución observada.

De los espectros de excitación y emisión, se observa un ancho de banda medio (FWHM) de ~ 70 nm y un corrimiento de Stokes de ~ 0,47 eV. Estudios experimentales y teóricos de nanopartículas de CdSe, indican que las partículas con picos de emisión anchos y un gran corrimiento de Stokes exhiben emisión originada en la recombinación de huecos y electrones atrapados en las irregularidades de la superficie [Landes 2002]. Estas observaciones, junto con la resolución de los picos en los espectros de excitación y emisión, indican que la luminiscencia de las nanopartículas está dominada en gran medida la composición superficial con una gran influencia de los grupos superficiales Si-SiO₂, los cuales están presentes en todas las nanopartículas sintetizadas.

Figura 34: Espectros de excitación (rojo) y emisión (negro) de suspensiones de tolueno de NP-SiMMA (líneas continuas), NP-Si (líneas discontinuas) y NP-SiMe (líneas punteadas). Grafico interior: segunda derivada de los espectros de la figura principal, de arriba abajo NP-SiMe, NP-SiMMA y NP-Si.

Dependencia de la Emisión con Solventes No Acuosos

Se midió la luminiscencia de suspensiones de partículas en varios solventes con distintas polaridades para observar cómo afectan estos a la emisión. Las partículas se encuentran inicialmente en una suspensión de tolueno, este solvente se evapora bajo condiciones suaves a una temperatura en un intervalo entre 40-50 °C y una presión de 0,15 atmósferas para no introducir modificaciones en las estructuras, recubrimientos y propiedades de las nanopartículas. Una vez que las partículas están secas, estas se vuelve a suspender en el solvente de trabajo (e.g. cloroformo, metanol, CCl_4). Como se observa en la Figura 35, la dispersión de las NP-SiMMA en metanol, CCl_4 , cloroformo o tolueno no cambia (dentro el error experimental) sus propiedades luminiscentes. La intensidad y forma del espectro se mantienen estables en presencia de aire durante 4 meses y en suspensiones saturadas en argón durante más de un año.

Figura 35: Espectros de excitación y emisión de NP-SiMMA en suspensión de cloroformo (línea negra); metanol (línea roja) y CCl_4 (línea azul).

Espectros de Excitación y Emisión de NP-SiMMA en Suspensión de Tolueno

Se estudiaron con mayor profundidad las propiedades de las NP-SiMMA en tolueno debido a que en este solvente las nanopartículas se comportan de forma muy estable, aún en suspensiones saturadas en aire, y no se forman aglomerados. Además, el tolueno es el solvente en el que las nanopartículas presentan los mayores rendimientos cuánticos de fluorescencia. La Figura 36 muestra la matriz excitación - emisión de las NP-SiMMA en suspensión de tolueno saturada en aire u argón. Se observa que la excitación ocurre entre 300 y 390 nm y la emisión en el intervalo de longitudes de onda entre 380 y 550 nm.

La presencia de oxígeno en el medio no muestra influencia sobre la resolución del espectro, sin embargo tiene un marcado efecto disminuyendo la emisión de las NP-SiMMA, siendo observado el mismo comportamiento en suspensiones de NP-Si y NP-SiMe. Las causas de esta desactivación de la luminiscencia por el oxígeno se discutirá en las siguientes secciones. El análisis bilineal [Gonzalez 1989] de la intensidad de esta matriz indica la existencia de una población bien definida de partículas con máximo de emisión en 430 nm cuyo espectro no depende de la longitud de onda de excitación.

Figura 36: Matriz Excitación - Emisión de NP-SiMMA en suspensiones de tolueno saturadas en aire (izquierda) y argón (derecha).

4.3.3. Nanopartículas en Suspensión Acuosa

Espectros de Excitación y Emisión

Se midieron las matrices de excitación - emisión a temperatura ambiente para suspensiones acuosas conteniendo 200 $\mu\text{g/mL}$ de NP-Si y NP-SiMMA. Los espectros obtenidos para estos dos tipos de nanopartículas son idénticos y no muestran cambios ni en la intensidad ni en la forma, mostrando que en suspensiones acuosas la emisión no se ve afectada por el recubrimiento con MMA. La Figura 37 muestra las matrices de excitación - emisión para suspensiones de NP-SiMMA saturadas en aire y en argón, observándose como la intensidad aumenta ligeramente cuando no hay oxígeno en el medio aunque las diferencias no son tan importantes como las observadas para suspensiones de tolueno. La longitud de onda de excitación en suspensiones acuosas varía respecto a las suspensiones en solventes orgánicos, mostrando el máximo en 340 nm.

Figura 37: Matriz Excitación - Emisión de nanopartículas en suspensiones acuosas saturadas en aire (izquierda) y argón (derecha).

Influencia del pH y la Concentración de Oxígeno

Se estudió la dependencia de la intensidad de emisión con el pH y la concentración de oxígeno disuelto. Para su ello se realizaron una serie de mediciones de fluorescencia de suspensiones de NP-SiMMA en medio acuoso modificando el pH y el porcentaje de oxígeno disuelto.

La Figura 38 (Izquierda) muestra el valor de la integral bajo la curva de emisión de suspensiones acuosas de NP-SiMMA saturadas en argón, aire y oxígeno a valores de pH de 2,0; 6,9 y 12,4. Estas suspensiones permanecieron durante de 24 horas en ausencia de luz a temperatura ambiente antes de medir su espectro de emisión. Se observa un claro efecto de la concentración de oxígeno sobre la emisión, presentando mayores emisiones a menor cantidad de oxígeno disuelto en el medio. El pH de la suspensión tiene una mayor influencia, ya que la emisión aumenta desde pHs ácidos hacia pHs básicos. Cuando estos mismos espectros se miden después de dos semanas la luminiscencia de las suspensiones a pH 6,9 alcanza los valores obtenidos para las suspensiones a pH 12,4; mientras que la luminiscencia de la suspensión inicialmente a pH 12,4 se mantiene en los valores ya alcanzados durante las primeras 24 horas.

Se estudió el efecto del cambio de pH y su reversibilidad en la emisión de las nanopartículas utilizando como referencia la intensidad máxima de las nanopartículas después de 24 horas a pH 12 (Figura 38 - derecha). Se mide el espectro de emisión y la intensidad de las suspensiones de NP-SiMMA a pH 12 (suspensión A) y a pH 2,7 (suspensión B). A continuación se cambia el pH de ambas soluciones llevando a pH 2,7 la suspensión A y llevando a pH 12,0 la suspensión B; dejándose almacenadas en la oscuridad a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se miden los espectros y la intensidad de emisión de ambas soluciones observándose como la luminiscencia de la suspensión A se mantiene prácticamente en el valor inicial mientras que la de la suspensión B aumenta su valor a más del doble. Posteriormente se vuelven a intercambiar los valores de pH observándose como la suspensión A continua estable en su emisión mientras que la suspensión B no vuelve a los bajos valores de emisión que tenía inicialmente a pH 2,0, sino que se mantiene en los valores que presentaba a pH 12.

La dependencia de la luminiscencia en función del pH y su irreversibilidad sugieren modificaciones permanentes en la superficie de las partículas debidas al solvente. En medios alcalinos estas reacciones se ven aceleradas. Estas observaciones junto con el espectro de infrarrojos (Figura 23) visto en el capítulo 3 para las NP-SiMMA en suspensión acuosa, indican que las soluciones alcalinas catalizan la hidroxilación de las partículas. El aumento de la solubilización de la sílice (SiO_2) en dispersiones coloidales de $\text{pH} > 10$ es una reacción conocida de la literatura [Zhuravlev 2000].

Una vez la superficie se modificó, el rendimiento cuántico de luminiscencia no muestra (dentro del error experimental) una variación con el añejamiento durante varios meses. Estas observaciones sugieren que la introducción de silanoles en la superficie de las NP-SiMMA está relacionada con un pequeño aumento en la intensidad de luminiscencia.

Figura 38: Izquierda: Variación en la intensidad de emisión de suspensiones acuosas de NP-SiMMA en función del pH y $[O_2]$. Derecha: Espectro de emisión a pH 2,7 (línea negra); a pH 12 (línea roja); suspensión pH 2,7 llevado a pH 12 (línea azul) y suspensión de pH 12 llevado a pH 2,7 (línea verde).

Al comparar los espectros de las NP-SiMMA en suspensiones de tolueno y en suspensiones acuosas saturadas en argón (Figura 39), se observa como en las suspensiones en agua disminuye considerablemente la emisión y se pierde la resolución en los picos de los espectros de emisión y excitación debido al efecto de solvatación. La sílice hidroxilada muestra una red de puentes de hidrogeno entre las moléculas de agua inmovilizadas en la superficie con los grupos hidroxilo (Si-OH) superficiales [Caregnato 2003]. Considerando que se forman grupos superficiales Si-OH en suspensiones acuosas de NP-SiMMA, las bandas de emisión desestructuradas que se observan pueden ser consecuencia de fluctuaciones en la estructura de solvatación de la superficie de la partícula (ensanchamientos no homogéneos).

Figura 39: Comparación de espectros de excitación y emisión entre NP-SiMMA en suspensión acuosa a pH 12 (línea negra) y en suspensión de tolueno (línea roja).

Es interesante notar, que el cambio de las NP-SiMMA de tolueno a agua, evaporación del agua y resuspensión en tolueno permite recuperar el espectro característico de las partículas en tolueno sugiriendo que el ensanchamiento y reducción en la emisión son efectos provocados exclusivamente por el efecto del solvente. Estas observaciones indican que el agua afecta la intensidad de emisión de las nanopartículas de dos formas contrapuestas. Por una parte, aumenta levemente la emisión mediante la hidroxilación irreversible de la superficie de la partícula, mientras que por la otra disminuye en forma considerable la emisión por *quenching* estático favoreciendo las transiciones no radiativas.

4.3.4. Rendimiento Cuántico de Fluorescencia

La determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia se ha realizado mediante el método del patrón conocido, utilizando como referencia 9,10 - DPA en ciclohexano ($\Phi_R = 0,90 \pm 0,04$) excitando a 360 nm y midiendo la emisión entre 380 y 600 nm [Lakowicz 2006]. El método consiste en la comparación de las respectivas áreas del espectro de emisión teniendo en cuenta la absorbancia a la longitud de onda de excitación y los coeficientes de refracción de las muestras. Esto nos permite calcular el rendimiento cuántico mediante la ecuación 40 [Lakowicz 1999] independizándonos de la configuración experimental.

$$\Phi = \Phi_R \times \frac{I}{I_R} \times \frac{1 - 10^{-A_R}}{1 - 10^{-A}} \times \left(\frac{n}{n_R} \right)^2 \quad (40)$$

Donde los subíndices R se refieren a los valores de la referencia; Φ es el valor de rendimiento cuántico de emisión; I es el área bajo la curva de emisión; A es la absorbancia a la longitud de onda de excitación y n es el índice de refracción del medio.

La absorbancia de las nanopartículas en suspensiones de tolueno saturada en argón fue utilizada en los cálculos para las suspensiones saturadas en aire y oxígeno para no introducir una nueva fuente de error debido a la interacción entre el tolueno y el oxígeno a las longitudes de onda de excitación [Scurlock 1989]. La absorbancia de cada compuesto tiene que encontrarse en valores menores de 0,05 para evitar tener que realizar correcciones por efecto de filtro interno.

Figura 40: Espectro de emisión del 9,10-DPA en ciclohexano (línea negra) y las NP-SiMMA en suspensión de tolueno saturada en argón (línea roja), aire (línea azul) y oxígeno (línea verde). Grafico interior: Espectro de absorción del 9,10-DPA en ciclohexano (línea negra) y NP-SiMMA en suspensión de tolueno (línea roja)

La Figura 40 muestra los espectros de emisión y absorción obtenidos para NP-SiMMA con distintas concentraciones de oxígeno y para la referencia 9,10-DPA. A partir de los espectros de emisión se determina el área bajo la curva y

se calcula la intensidad total de fluorescencia. La Tabla 11, muestra los valores de rendimientos cuánticos de emisión obtenidos para las nanopartículas en suspensiones saturadas en argón, oxígeno y aire. Se observa un efecto importante del oxígeno sobre el rendimiento cuántico de emisión.

Tabla 11: Rendimiento Cuántico de las nanopartículas con -OH y -MMA para distintas concentraciones de oxígeno disuelto en Tolueno y Agua.

% O ₂ v/v	NP-SiMMA Agua	NP-SiMMA Tolueno	NP-Si Tolueno
0	0,20 ± 0,02	0,76 ± 0,07	0,32 ± 0,06
22	0,18 ± 0,02	0,48 ± 0,07	0,27 ± 0,04
100	0,16 ± 0,02	0,44 ± 0,05	0,19 ± 0,06

Los rendimientos cuánticos de emisión con a longitudes de onda de excitación de las NP-SiMMA y NP-Si en suspensiones de tolueno saturadas en aire se mantienen constantes dentro del error experimental (Tabla 12). Rendimientos cuánticos de fluorescencia independientes de la longitud de onda de excitación son esperados para transiciones electrónicas que ocurren desde un único estado excitado, como en el caso de moléculas fluorescentes. Esta consideración estaría de acuerdo con la observación de un único tiempo de vida medio y un espectro de emisión independiente de la longitud de onda de excitación.

Los valores medidos de los rendimientos cuánticos son del orden de los encontrados en la bibliografía para otras nanopartículas de silicio a pesar de la diferencia en su cristalinidad [Sankaran 2005, Zhang 2007] y para partículas recubiertas con grupos alquilo [Rosso-Vasic 2008b]. Es importante resaltar como los mayores rendimientos cuánticos son observados para las nanopartículas cuando están recubiertas con MMA que para las nanopartículas sin modificar superficialmente.

Tabla 12: Rendimiento cuántico de las nanopartículas -OH y -MMA en tolueno saturado con aire a distintas longitudes de onda de excitación.

λ_{ex} (nm)	NP-SiMMA	NP-Si
340	0,40 ± 0,04	0,26 ± 0,03
350	0,43 ± 0,05	0,27 ± 0,03
360	0,45 ± 0,06	0,27 ± 0,04
370	0,48 ± 0,07	0,28 ± 0,04

4.4. Fluorescencia Resuelta en el Tiempo

La determinación de los tiempos de vida medios de los estados excitados de las nanopartículas se ha realizado utilizando dos técnicas diferentes que nos permiten seguir las emisiones en función del tiempo: espectroscopia de dominio temporal y espectroscopia de dominio de frecuencias. Se utilizaron ambas técnicas por motivos de disponibilidad en los diferentes momentos en los que se realizaron los experimentos y a la vez sirvieron para contrastar los resultados obtenidos mediante los dos métodos.

Espectroscopia en el Dominio de Frecuencias

Se obtuvieron curvas de modulación y de fase de suspensiones de NP-SiMMA y NP-Si en tolueno saturadas en aire, figuras 41 y 42, respectivamente. Los círculos en los gráficos corresponden a las curvas de fase y los cuadrados a las curvas de modulación; cada experimento se llevó a cabo por duplicado y se representa con colores azul y rojo. Las curvas obtenidas se ajustaron por el método de cuadrados mínimos a las ecuaciones 41 y 42 [Valeur 2002] con dos componentes de tiempos de vida. Los ajustes arrojan los mismos valores de tiempos de vida medios independientemente de utilizar la curva de fase o modulación.

$$\tan \Phi = \omega \cdot (\alpha_1 \cdot \tau_1 + \alpha_2 \cdot \tau_2) \quad (41)$$

$$M = \frac{1}{\sqrt{(1 + \omega^2 \cdot (\alpha_1 \cdot \tau_1 + \alpha_2 \cdot \tau_2)^2)}} \quad (42)$$

Donde Φ es la fase; ω es la frecuencia; M es el modulo; τ_i = tiempo de vida medio; α_i es el factor pre-exponencial para la especie emisora i , con la sumatoria sobre todas las especies igual a 1.

Los parámetros obtenidos del ajuste para las NP-Si en suspensión de tolueno saturada en aire sugieren un tiempo de vida corto ($1,1 \pm 0,1$) ns que contribuye en un 78 - 88 % de la luminiscencia total y uno más largo ($5,8 \pm 0,3$) ns responsable del restante porcentaje (22 - 12 %) de la luz emitida. Los parámetros obtenidos para las NP-SiMMA bajo las mismas condiciones son ($1,1 \pm 0,1$) ns con 95 - 97 % de contribución, y una pequeña contribución del 3-5% del tiempo más largo ($4,6 \pm 0,4$) ns.

Las diferencias observadas en la contribución del tiempo de vida largo de las NP-Si, junto con la comprobación visual de la tendencia a aglomerarse con el tiempo, indica que el tiempo de vida de $(4,6 \pm 0,4)$ ns puede ser debido a partículas aglomeradas. Por tanto, la escasa contribución de este tiempo de vida en suspensiones de NP-SiMMA indicaría que estas se mantienen más dispersas con menor tendencia a aglomerarse, como es de esperar debido a la mayor afinidad del recubrimiento de MMA por el solvente tolueno.

Figura 41: Curvas de modulación y de fase para NP-SiMMA en Tolueno.

Figura 42: Curvas de modulación y de fase para NP-Si en Tolueno.

Espectroscopia en el Dominio de Tiempos

Utilizando la espectroscopia en el dominio de tiempos se realizaron determinaciones de los tiempos de vida medios de las NP-Si y NP-SiMMA en tolueno, en agua, en tolueno con 2,5 M de ioduro de etilo y en agua con 0,1 M de KI. Para la obtención de los resultados se tuvo en cuenta el espectro temporal de la excitación (LED a 341 nm) mediante la deconvolución con los datos de los decaimientos. Los datos se ajustaron a decaimientos con uno o dos componentes según la bondad de la traza (ecuación 43) teniendo como condición para α la ecuación 44. Siendo $\alpha \times I_0$ la fracción de luz emitida debido al decaimiento con tiempo de vida τ_i .

$$I(t) = I_0 \cdot \sum \alpha_i \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (43)$$

$$1 = \sum_1^n \alpha_i \quad (44)$$

La Figura 43 muestra el decaimiento de las NP-SiMMA en suspensión acuosa saturada de argón donde se observa el ajuste al decaimiento con dos tiempos de vida. En la Figura 44 se muestra la emisión en el tiempo de NP-SiMMA en suspensión de tolueno saturada en argón a 77 K, en ella se observa como el decaimiento se puede ajustar a una exponencial de primer orden con tiempo de decaimiento $1,3 \pm 0,3$ ns.

Los experimentos de luminiscencia resuelta en el tiempo indican una rápida relajación del excitón hacia el estado basal, mostrándose en la Tabla 13 los resultados para las NP-Si en suspensiones de tolueno y agua saturadas en aire a temperatura ambiente. En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos para NP-SiMMA en tolueno a temperatura ambiente, añadiendo átomos pesados a la suspensión, y a 77 K. Las mismas medidas para NP-SiMMA en suspensiones acuosas se muestran en la Tabla 15.

Figura 43: Luminiscencia resuelta en el tiempo de suspensiones acuosas de NP-SiMMA saturadas en argón.

Figura 44: Luminiscencia resuelta en el tiempo a 77 K de suspensiones de NP-SiMMA en tolueno saturadas en argón.

Tabla 13: Tiempos de vida medios para 500 $\mu\text{g/mL}$ de NP-Si en suspensiones de tolueno y agua saturadas en aire a 293 K.

Condiciones	NP-Si Suspensión de Tolueno	NP-Si Suspensión Acuosa
τ_1 (ns)	$1,1 \pm 0,3$ ns (78-88)	$1,8 \pm 0,3$ ns (85)
τ_2 (ns)	$5,8 \pm 0,3$ ns (22-12)	$5,9 \pm 0,3$ ns (15)

Tabla 14: Tiempos de vida medios para 500 $\mu\text{g/mL}$ NP-SiMMA en suspensión de tolueno bajo distintas condiciones experimentales.

Condiciones		0 % O ₂ v/v	22 % O ₂ v/v	100 % O ₂ v/v
NP-SiMMA 293 K	τ_1 (ns)	$1,4 \pm 0,3$ ns (87,5)	$1,3 \pm 0,3$ ns (89,4)	$1,1 \pm 0,3$ ns (85,7)
	τ_2 (ns)	$9,5 \pm 0,3$ ns (12,5)	$7,6 \pm 0,3$ ns (10,6)	$5,8 \pm 0,3$ (15,3)
NP-SiMMA CH ₃ CH ₂ I 2,5 M; 293K	τ_1 (ns)	$1,0 \pm 0,3$ ns (85,2)	-	-
	τ_2 (ns)	$15,9 \pm 0,3$ ns (14,8)	-	-
NP-SiMMA 77 K	τ_1 (ns)	-	$1,3 \pm 0,3$ ns (100)	-

Tabla 15: Tiempos de vida medios para 500 $\mu\text{g/mL}$ NP-SiMMA en suspensión acuosa bajo distintas condiciones experimentales.

Condiciones		0 % O ₂ v/v	22 % O ₂ v/v	100 % O ₂ v/v
NP-SiMMA 293 K	τ_1 (ns)	$1,5 \pm 0,3$ ns (85)	$1,2 \pm 0,3$ ns (92)	$1,3 \pm 0,3$ ns (83)
	τ_2 (ns)	$8,1 \pm 0,3$ ns (15)	$7,6 \pm 0,3$ ns (8)	$6,9 \pm 0,3$ ns (17)
NP-SiMMA KI 0,1M; 293 K	τ_1 (ns)	$1,8 \pm 0,3$ ns (100)	-	-
NP-SiMMA 77K	τ_1 (ns)	-	$1,4 \pm 0,3$ ns (100)	-

Se observa como la luminiscencia tiene contribución de dos tiempos de vida. El tiempo de vida más corto de $1,3 \pm 0,3$ ns contribuye en un 85 - 90 % a la luminiscencia total, independientemente del solvente (agua o tolueno), de la derivatización de las partículas y de la concentración de oxígeno disuelto. Experimentos a bajas temperaturas y en suspensión acuosa en presencia de KI 0,1 M muestran la contribución de un único tiempo de decaimiento de 1,3 - 1,8 ns.

El tiempo de vida más largo, de 5 a 15 ns es sensible a las condiciones experimentales, mostrando dependencia con la concentración de oxígeno disuelto y con el solvente. La inversa del tiempo de vida, $1/\tau$ varía linealmente con la $[O_2]$, tal como se muestra en la Figura 45. Esta dependencia es la esperada por la ecuación 45 para el *quenching* dinámico de la luminiscencia por oxígeno molecular [Valeur 2002]. De la pendiente de las rectas de la figura 45 se puede obtener la constante de *quenching* dinámico (k_q) del oxígeno sobre la luminiscencia de suspensiones de NP-SiMMA en tolueno $(2 \pm 1) \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y agua $(5 \pm 2) \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \tau_0 \cdot k_q [O_2] \quad (45)$$

Donde τ_0 es el tiempo de vida en ausencia de oxígeno, k_q la constante de *quenching* dinámico, y $[O_2]$ la concentración de oxígeno disuelto.

Figura 45: (τ_0/τ) en función de $[O_2]$ para suspensiones de NP-SiMMA en tolueno (puntos negros) y agua (puntos rojos) saturadas con distintas presiones de oxígeno.

Los valores de la constante de *quenching* dinámico correspondientes al estado excitado con mayor tiempo de vida obtenidos para las suspensiones de NP-SiMMA en tolueno y agua, son iguales dentro del valor experimental. Estos valores muestran que el *quenching* dinámico del oxígeno sobre la emisión de fluorescencia de las nanopartículas es un proceso controlado por difusión.

Datos publicados en la literatura indican que el silicio poroso (SP) emite en el rojo con τ del orden del μ s. La oxidación superficial del SP provoca profundos cambios en la luminiscencia (emisión corrida hacia el visible) con decaimientos de 1-10 ns. Suspensiones en etanol de nanopartículas de silicio de 2 nm muestran emisión con máximo a 460 nm y τ de 1,3 ns [Kuntermann 2008]. Suspensiones en xileno de NP modificadas con grupos metilo de 2-3 nm presentan emisión a 560 nm con $\tau = 2$ ns [Kusová 2010] y cristales de silicio de 4,6 nm modificados superficialmente con octanotiol mostraron un decaimiento en 600 nm de 3,1 ns [English 2002]. De acuerdo a la evidencia encontrada en la literatura, la presencia de los dos tiempos de vida puede deberse a dos poblaciones de partículas de distinto tamaño y/o con distinto grado de oxidación superficial. Es de esperar que partículas con menor grado de oxidación y/o más grandes presenten mayor tiempo de vida. Dado que el 80-95 % de la luminiscencia se debe a la población de partículas que presentan un tiempo de decaimiento luminiscente de 1,3 ns, todas las conclusiones basadas en medidas de luminiscencia se referirán a esta población.

El decaimiento de la fotoluminiscencia < 10 ns y el alto rendimiento cuántico de emisión sugieren que la transición directa entre bandas está permitida [Nirmal 1998]. Este decaimiento rápido puede ser atribuido a una vía de transición que no involucra la participación de los fonones (vía indirecta) a diferencia del silicio poroso y el silicio en fase masiva [Groenewegen 2010].

Estudios teóricos realizados sobre la recombinación de excitones espacialmente confinados muestra que para tamaños menores de 2,0 nm, la fuerza del oscilador para transiciones directas (sin asistencia de fonones) domina sobre las transiciones asistidas por fonones [Hybertsen 1994]. Sin embargo, cálculos realizados usando DFTB teniendo en cuenta solo el efecto del tamaño muestran que los tiempos de vida medios obtenidos para partículas entre 1,0 y 1,5 son del orden de los microsegundos [Smith 2005]. Estos resultados junto con las observaciones experimentales que muestran

decaimientos del orden de los pocos nanosegundos apoyan la participación de otros efectos en el proceso de recombinación de los excitones, ya que además de la distribución de tamaños y la forma, los estados de energía superficiales pueden contribuir a atrapar los electrones en dinámicas de relajación del excitón ultracortas [Groenewegen 2010].

Estudios de absorción de transientes de nanopartículas excitadas en el femtosegundo mediante pulsos laser describen los posibles mecanismos mediante los cuales los excitones llevados a niveles de energía muy altos relajan hasta el estado de equilibrio desde donde se produce la recombinación. Así los electrones de valencia son transferidos mediante procesos de absorción a la banda de conducción, quedando un exceso de energía de excitación que genera un desequilibrio en las densidades electrónicas y de los huecos. A partir de estos estados el sistema empieza a relajar mediante varios procesos distintos: dispersión de fonones; captura de excitones por aquellas superficies que forman sumideros de energía en el recubrimiento amorfo de SiO_x y sumideros más profundos probablemente en la interfase Si-SiO_x . A partir de estas observaciones, se distinguen dos mecanismos de generación de fotoluminiscencia asignado a estados superficiales de la superficie amorfa oxidada (emisión sobre los 380 nm) y una recombinación radiativa de los excitones confinados cuánticamente (emisión sobre los 800 nm) [Kuntermann 2008].

En estudios publicados con nanoalambres de silicio excitando con rayos X en el borde Si K, se observó la participación de estos mecanismos como responsables de la luminiscencia. Dependiendo de la cantidad de defectos en la superficie SiO_x , de la temperatura y de los mecanismos de desactivación no radiativa, puede favorecerse uno u otro proceso [Rosenberg 2008]. Sin embargo, en los experimentos de EPR realizados no se detectaron defectos superficiales (normalmente radicales de $\text{Si}^\cdot$ y $\text{SiO}^\cdot$) y por tanto este mecanismo podría descartarse en la recombinación de los excitones de las nanopartículas sintetizadas en este trabajo. Estos resultados están de acuerdo con los altos rendimientos cuánticos de fluorescencia cercanos a 1 esperados para nanopartículas con ausencia de defectos (superficiales o internos) [Nirmal 1998].

Teniendo en cuenta el tamaño de 3,5 nm de diámetro de las nanopartículas, el rápido tiempo de vida medio de 1,3 ns menor del esperado para relajación radiativa de los excitones confinados cuánticamente, la aparición de la banda centrada en los 410 nm y la presencia de una capa

superficial de SiO₂, se puede concluir que la emisión luminiscente se genera en transiciones pseudodirectas debido a estados superficiales formados por las superficies oxidadas amorfas. El origen de los dos tiempos de vida no está claro y es un aspecto a estudiar en profundidad en una etapa posterior.

4.5. Dependencia de Φ_{em} y τ con la Temperatura

Las figuras 46 y 47 muestran las matrices de excitación - emisión de las nanopartículas en suspensiones de tolueno y agua, respectivamente, saturadas en argón. En ellas se observa como la intensidad de emisión disminuye con la temperatura sin mostrar cambios en la forma del espectro.

A partir de estos gráficos se calcularon los rendimientos cuánticos de emisión para cada temperatura siguiendo el método del patrón conocido descrito anteriormente y se tuvo en cuenta la variación del índice de refracción del solvente (η) con la temperatura [Bashkatov 2003, Rubio 2004], tal como se muestra en la Tabla 16.

Un rápido análisis nos permite observar que el $\ln\Phi$ depende linealmente con la inversa de la temperatura como se observa en las figuras 48 y 49. Por otro lado, el tiempo de vida del excitón en estas mismas soluciones no se ve afectado en el intervalo de temperaturas entre 77 y 298 K, como se mostró oportunamente en la Tabla 15.

Figura 46: Excitación - emisión de NP-SIMMA en suspensiones de tolueno a 273 y 313 K saturadas en argón.

Figura 47: Excitación - emisión de NP-SiMMA en suspensión acuosa a 283 y 323 K saturadas en argón.

Tabla 16: Rendimiento cuántico de emisión en función de la temperatura para NP-SiMMA en suspensiones de tolueno y agua saturadas en argón.

Suspensión de Tolueno			Suspensión Acuosa		
T (K)	Φ	n	T (K)	Φ	n
273	0,90	1,537	283	0,184	1,349
283	0,83	1,531	293	0,180	1,348
293	0,76	1,524	303	0,175	1,347
303	0,69	1,519	313	0,169	1,345
313	0,62	1,512	323	0,164	1,344

Figura 48: Gráfico del $\ln\Phi$ en función de la inversa de la temperatura para NP-SiMMA en suspensiones de tolueno saturadas en argón.

Figura 49: Gráfico del $\ln\Phi$ en función de la inversa de la temperatura para NP-SiMMA en suspensiones acuosas saturadas en argón.

Estas observaciones sugieren que la desactivación de la fluorescencia se produce mediante un *quenching* estático por el solvente. El quenching estático podría explicarse por la absorción de moléculas de solvente sobre la superficie de la partícula en equilibrio dinámico. Si se asume que la isoterma de Langmuir describe adecuadamente la adsorción de solvente sobre las nanopartículas, tal como se publicó para la adsorción de tolueno sobre superficies de SiO₂ poroso y Si/SiO₂ [Mirji 2006], la fracción de sitios de adsorción ocupados por el solvente (θ) está dado por la ecuación 46.

$$\theta = \frac{K \times [S]}{1 + K \times [S]} \quad (46)$$

Donde K es la constante de adsorción dinámica en el equilibrio para el solvente adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas y $[S]$ representa la concentración de las moléculas de solvente.

La energía de excitación obtenida por las partículas mediante la absorción de luz puede relajarse de forma no radiativa, debido a la presencia de moléculas de solvente, sin llegar a formar excitones. Como consecuencia, solo una fracción ($1-\theta$) de las partículas excitadas dará lugar a la formación del excitón, tal como se muestra en el Esquema 9. Luego, la intensidad de emisión luminiscente es $I \propto (e^- - h^+)$. Por lo tanto Φ , resulta proporcional a la

fracción de sitios de adsorción no recubierta por solvente ($1-\theta$). Considerando que θ está dada por la ecuación 46, se obtiene la ecuación 47 para Φ .

$$\Phi \propto \frac{1}{1 + K \times [S]} \quad (47)$$

Esquema 9: Caminos de desactivación de las nanopartículas mediante quenching por el solvente y generación del excitón.

La relación 47 explica las diferencias observadas entre los distintos solventes a una dada temperatura. Suspensiones de NP-SiMMA en agua y tolueno muestran el mismo tiempo de decaimiento luminiscente pero diferente eficiencia cuántica. Este comportamiento podría deberse a la diferente adsorción de las moléculas de agua y de tolueno sobre la superficie de las partículas, tal como se discutió anteriormente. El hecho de que el tiempo de vida es insensible al solvente sugiere una dependencia despreciable de las constantes k_r y k_{nr} con el solvente.

La ecuación 47 permite comprender el efecto de la temperatura sobre la eficiencia cuántica ya que la dependencia de la constante de adsorción dinámica en el equilibrio está dada por la expresión 48 [Atkins 2006], donde ΔH es la entalpia de adsorción del solvente sobre la partícula.

$$\frac{d(\ln K)}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (48)$$

Reemplazando la ecuación 48 en la ecuación 47 se obtiene la ecuación 49 que relaciona Φ con la temperatura.

$$\Phi \propto \frac{1}{1 + [S] \times A \times e^{\frac{\Delta H}{R \cdot T}}} \quad (49)$$

Si se cumple la condición $1 \ll [S] \times A \times \exp(-\Delta H/RT)$, se obtiene la ecuación 50 que predice que el $\ln \Phi$ depende linealmente con la inversa de la temperatura, tal como se observó experimentalmente, siendo el término b la constante de proporcionalidad.

$$\frac{1}{\Phi} = b \times e^{\frac{\Delta H}{R \cdot T}} \quad (50)$$

De las pendientes de las pendientes de las figuras 48 y 49, se obtienen $\Delta H = 6776 \pm 375 \text{ J mol}^{-1}$ para la adsorción de tolueno y $\Delta H = 2228 \pm 174 \text{ J mol}^{-1}$ para la adsorción de agua. Para entalpías de adsorción son esperables valores negativos; sin embargo, valores positivos de entalpías de adsorción se encuentra publicados en la literatura [Melmer 2010, Pabst 2008], y estos suelen implicar, en el caso de la adsorción de solutos dispersos en un solvente, la desorción del solvente para que tenga lugar la adsorción del soluto. Estudios publicados en la literatura sobre la adsorción de tolueno sobre SiO_2 [Mirji 2006], indican que el tolueno puede adsorberse con dos orientaciones distintas, una a través de los electrones aromáticos y otra donde los H del grupo metilo interaccionan con la superficie. En este último caso, estudios teóricos predicen que esta configuración puede llevar a la ruptura de un enlace C-H y el átomo de hidrógeno adherirse a la superficie. Es de esperar que las diferentes estructuras tengan distinta energía de interacción [Costanzo 2004], por tanto el valor positivo de la entalpía de absorción podría deberse a que la estructura más energética impediría la formación del excitón. Se requieren más estudios para esclarecer el efecto de la adsorción del solvente y de la temperatura sobre la intensidad de emisión luminiscente.

4.6. Anisotropía Resuelta en el Tiempo

Anisotropía en el Dominio de Frecuencias

Se realizaron determinaciones de anisotropía de las nanopartículas utilizando experimentos de dominios de frecuencias, a través de los cuales se obtuvo el tiempo de rotación Browniana (θ) y la anisotropía a tiempo cero

(r_0). La medida de anisotropía resuelta en el tiempo está relacionada con las orientaciones relativas de los momentos dipolares de las partículas en estado basal y excitado. Debido a la simetría de las partículas de silicio, se esperaría que no presentasen cambios de polaridad al ser excitadas, de forma similar a como ocurre con algunos fullerenos esféricos [Valeur 2002]. Sin embargo, estudios realizados sobre la polarización de nanopartículas de silicio durante su síntesis muestran una relación entre la forma de las partículas y el efecto de polarización [Polisski 1997], lo cual indicaría que a pesar de que las partículas sean esféricas en su conjunto, las irregularidades y asimetrías en su composición juegan un rol importante en el proceso de emisión.

La Figura 50 muestra la variación de anisotropía en el tiempo obtenida para suspensiones de NP-Si (línea azul) y NP-SiMMA (línea roja) en tolueno saturado en aire. Los círculos corresponden a las curvas de fase y los cuadrados a las curvas de modulación. Los resultados de anisotropía a tiempo cero (r_0) y el tiempo de rotación browniana (θ), obtenidos ajustando las ecuaciones 51 y 52, se detallan en la Tabla 17.

$$\tan \Phi = \omega \cdot \theta \quad (51)$$

$$M = \frac{1}{\sqrt{(1 + \omega^2 \cdot \theta^2)}} \quad (52)$$

Donde Φ es la fase; ω es la frecuencia y M es el módulo.

Figura 50: Anisotropía resuelta en el tiempo para suspensiones de NP-SiMMA en Tolueno saturadas de aire.

Los resultados muestran que la anisotropía de las NP-Si y las NP-SiMMA se puede ajustar a un decaimiento mono-exponencial y por tanto se infiere que la emisión principal se origina desde una población de partículas con tres ejes rotacionales perpendiculares idénticos [Valeur 2002], en concordancia con la forma esférica de las nanopartículas observada mediante los experimentos de TEM. Los dos tipos de partículas muestran, teniendo en cuenta el error experimental, el mismo valor de r_0 (0,25), un valor positivo y mayor que cero sugiriendo que el dipolo en el estado excitado está orientado en una dirección fija dentro de la partícula [Lakowicz 1999]. El mismo valor de anisotropía para NP-Si y NP-SiMMA indica que la orientación del dipolo en el estado excitado no depende del recubrimiento orgánico. Este resultado no es contradictorio con la influencia de la oxidación superficial, ya que ambas partículas presentan una capa de SiO_x . El valor de anisotropía a tiempo cero indica una orientación diferente en los momentos de los dipolos en el estado basal y el estado excitado, habiéndose encontrado valores similares de $r_0 = 0,22$ para dendrímeros de CdS [Lakowicz 1999].

Espectroscopia en el Dominio del Tiempo

Se han realizado experimentos en el dominio del tiempo (Figura 51), a través de los cuales se determinó el tiempo de rotación Browniano (θ) y la anisotropía a tiempo cero (r_0) para NP-Si y NP-SiMMA en suspensiones acuosas ajustándose a la ecuación 53 [Valeur 2002].

$$r(t) = r_0 \cdot e^{-\frac{t}{\theta}} \quad (53)$$

Donde r_0 es la anisotropía a tiempo cero; t es el tiempo y θ es el tiempo de rotación Browniano.

Tabla 17: Anisotropía a tiempo cero y tiempo de rotación browniana para NP-Si y NP-SiMMA en suspensión de tolueno y suspensión acuosa.

		r_0	θ (ns)
NP-Si	Suspensión en Tolueno	$0,25 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,01$
NP-SiMMA		$0,26 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01$
NP-Si	Suspensión Acuosa	$0,26 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,05$
NP-SiMMA		$0,27 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,03$

Figura 51: Anisotropía en función del tiempo de NP-SiMMA en suspensión acuosa.

Figura 52: Anisotropía en función del tiempo para las NP-Si en suspensión acuosa saturada en aire.

La ecuación 53 ajusta bien los datos obtenidos para las NP-SiMMA, siendo la anisotropía a tiempo cero (r_0) de $(0,27 \pm 0,01)$ y un tiempo de rotación (θ) de $(0,56 \pm 0,03)$ ns. Para las NP-Si (Figura 52), se obtiene una anisotropía a tiempo cero (r_0) de $(0,26 \pm 0,03)$ y un tiempo de rotación (θ) de $(0,40 \pm 0,05)$ ns.

Los resultados obtenidos muestran que la variación del momento dipolar del estado de emisión respecto del basal de las nanopartículas es independiente del solvente, ya que los datos de anisotropía a tiempo cero para las nanopartículas en agua son los mismos, dentro del error experimental, que los experimentos de dominio de frecuencias realizadas para nanopartículas en suspensión de tolueno. Por lo tanto, es de esperar que el solvente no afecte a las transiciones electrónicas que dan origen a la luminiscencia, tal como se discutió en el punto anterior.

El valor usual para partículas de alta simetría esférica está a 0,40. El valor aquí obtenido indica que las irregularidades de la superficie le restan simetría y son capaces de crear valles y picos en las densidades electrónicas que afectan al momento dipolar. Cálculos teóricos realizados mediante DFTB dependiente del tiempo con nanopartículas de silicio de tamaños $\sim 1,2$ nm muestran como las geometrías de las partículas se modifican cuando se encuentran en estados excitados perdiendo momentáneamente la simetría [Lopez del Puerto 2010] y por tanto modificando su momento dipolar.

A pesar que no se encontraron diferencias de r_0 con el solvente, sí se observaron diferencias para el tiempo de rotación browniano. Por tanto, se pone de manifiesto que las partículas cambian su superficie pudiendo ser rodeadas por el solvente o agregándose, sugiriendo que las transiciones se producen en el interior de la partícula donde no hay influencia del solvente sobre el momento dipolar de transición.

Estos resultados están sujetos a posibles errores debido a la despolarización por dispersión de luz y/o transferencia de energía entre partículas, lo cual requeriría estudios sistemáticos en función de la concentración de NP.

Determinación del Radio Hidrodinámico

A partir de los datos del tiempo rotación browniano de las nanopartículas se puede obtener el valor del radio hidrodinámico de las mismas. La dependencia del tiempo de rotación Browniano (θ) con el volumen (V) para

partículas esféricas esta dado por la teoría hidrodinámica de la difusión rotacional representada en la ecuación 54, donde k_B es la constante de Boltzman y η es la viscosidad a 298 K [Lakowicz 2006].

$$\theta = \frac{\eta \cdot V}{k_B \cdot T} \quad (54)$$

Se considera para las suspensiones de nanopartículas en tolueno una viscosidad η (303 K) = 554,2 $\mu\text{Pa}\cdot\text{s}$ [Lide 2009], a partir de la cual se obtiene un radio hidrodinámico medio de $1,1 \pm 0,1$ nm y $0,8 \pm 0,1$ nm para NP-Si y NP-SiMMA, respectivamente. La pequeña discrepancia entre los valores obtenidos para ambas partículas puede ser debida a que el mayor valor observado en el radio medio está influenciado por una mayor contribución de partículas aglomeradas o bien una esfera de hidratación no despreciable debido a la red de puentes de hidrógeno formados por los grupos Si-OH y las moléculas de agua. Se ha discutido anteriormente que las suspensiones de NP-Si muestran aglomeración y una contribución a la luminiscencia entre 22 - 12 % al total de luz emitida. Para las NP-SiMMA en suspensión acuosa (η (303K) = 797 $\mu\text{Pa}\cdot\text{s}$ [Lide 2009]) se obtiene un radio hidrodinámico de $0,85 \pm 0,1$ nm, coincidiendo con los valores determinados en tolueno.

Sin embargo, al contrastar estos valores con los tamaños obtenidos por TEM de $1,75 \pm 0,5$ nm se observan valores menores a los diámetros obtenidos por anisotropía. Estas discrepancias se pueden atribuir a procesos de despolarización distintos a la rotación. La transferencia de energía entre partículas aglomeradas puede causar un aumento en la velocidad de despolarización de las partículas que conlleva a obtener tiempos de rotación menores a los tiempos reales y por tanto a menores radios hidrodinámicos de las nanopartículas [Visser 1999].

4.7. Análisis Bifotónicos

El estudio de excitación multifotónica de nanopartículas de semiconductores es de interés debido a su gran potencial en aplicaciones biológicas y las comunicaciones ópticas. La radiación en el IR de muestras biológicas es menos dañino a los tejidos y permite discriminar la dispersión de la radiación incidente y obtener una mejor definición del volumen testado [Akcair 2000].

4.7.1. Espectro de Excitación de Nanopartículas en Tolueno

Los espectros de excitación se midieron detectando toda la luminiscencia para cada longitud de onda de excitación. Los espectros se normalizaron por la energía de excitación del laser. Se midió el espectro de excitación bifotónica para suspensiones de NP-SiMMA y NP-Si en tolueno (Figura 53) excitando en el intervalo de longitudes de onda desde 750 a 950 nm. Se observa como aumenta la emisión desde longitudes de onda de 850 nm hasta los 750 nm, no teniendo más información a longitudes de onda menores debido a las limitaciones del equipamiento. La energía donde termina el espectro de excitación bifotónica de 1,46 eV es exactamente la mitad de la energía donde termina el espectro de excitación monofotónica 2,92 eV. La resolución espectral con el pico a 1,63 eV en bifotónica se corresponde con el pico a 3,31 eV en monofotónica. A partir de estos datos, se puede inferir que el espectro de excitación bifotónica es muy similar al espectro de excitación monofotónica y por tanto las transiciones electrónicas que se producen parecen ser las mismas.

Figura 53: Espectro de excitación bifotonica de NP-SiMMA (línea roja) y NP-Si (línea negra) en suspensiones de tolueno saturadas en aire.

4.7.2. Espectro de Emisión

Suspensiones de Nanopartículas en Tolueno

Los espectros de emisión se midieron excitando a una longitud de onda de 760 nm en suspensiones de tolueno saturadas en argón y en aire para NP-SiMMA y NP-Si (Figura 54). Se observa un descenso de la emisión en presencia de oxígeno para las NP-SiMMA. En agua, esta diferencia es menor que en tolueno como es de esperar por la mayor disolución de O₂ en el solvente orgánico. Al normalizar y superponer los espectros con excitación mono- y bifotónica de las NPSi-MMA en suspensión de tolueno en argón se observa como el espectro de emisión monofotónica (línea azul) se superpone razonablemente, dentro del error experimental, al espectro obtenido excitando bifotónicamente (puntos negros).

Figura 54: Emisión de NP-SiMMA (izquierda) y NP-Si (derecha) con excitación bifotónica en suspensión de tolueno saturadas en aire (puntos rojos) o argón (puntos negros). Comparación con el espectro monofotónico en azul.

Suspensiones de Nanopartículas en Agua

La Figura 55 muestra el espectro de emisión de las NP-SiMMA en suspensiones acuosas saturadas en aire excitando bifotónicamente a 770 nm (puntos negros) y excitando monofotónicamente (línea roja). Se observa cómo, dentro del error experimental, los espectros tienen la misma forma. Estos resultados indican que las partículas excitadas mediante uno o dos fotones emiten desde el mismo estado. Resultados coincidentes se publicaron

para nanopartículas en cloroformo por excitación mono- (339 nm), bi- (778 nm) y tri- (1335 nm) fotónica, donde la forma y posición de los espectros de emisión obtenidos se mantienen constantes e independientes del modo de excitación [He 2008].

Figura 55: Comparación del espectro de emisión monofotónico y bifotónico para NP-SiMMA en suspensión acuosa saturada en aire.

4.7.3. Espectroscopia de Correlación Fluorescente

Se realizaron ensayos de espectroscopia de correlación de fluorescencia para suspensiones de NP-Si y NP-SiMMA en tolueno saturadas en aire. Siendo las nanopartículas las únicas especies presentes en la solución, la función de auto-correlación a $\tau = 0$, $G(0)$, es proporcional a la inversa del número de cromóforos que están emitiendo en el volumen focal según se mostró en el capítulo 2. La función de correlación de luminiscencia obtenida para NP-Si bajo irradiación a 774 nm se han podido ajustar bien a un solo cromóforo que difunde con un coeficiente de $(150 \pm 20) \times 10^{-12} \text{ m}^2 / \text{s}$. Experimentos con diluciones 1:10 mostraron similares valores de difusión y menores valores de $1/G(0)$.

Las funciones de auto-correlación para NP-SiMMA en suspensiones de tolueno fueron obtenidas excitando a diferentes longitudes de ondas, la Figura 56 muestra la función de correlación obtenida $G(\tau)$ en función de τ para NP-SiMMA a distintas longitudes de onda de excitación. Excepto para los experimentos a 774 nm, todas las curvas $G(\tau)$ se pudieron ajustar bien a una

única especie que difunde con un coeficiente de difusión medio de $(240 \pm 40) \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ en tolueno. A 774 nm, las curvas de correlación pudieron ser ajustadas solo si se consideraban dos especies diferentes difundiendo. Debido a que esta fue la única longitud de onda con diferente comportamiento, no se utilizó para posteriores cálculos. La Tabla 18 resume los valores determinados con los ajustes de las curvas obtenidas bajo las distintas condiciones experimentales.

Figura 56: $G(\tau)$ en función de τ para NP-SiMMA en suspensión de tolueno.

Las partículas pueden considerarse esféricas. Por lo tanto, la ecuación de Stokes - Einstein fue usada para el cálculo del radio hidrodinámico de la partícula utilizando viscosidad en tolueno $\eta = 554,2 \text{ } \mu\text{Pas}$ [Lide 2009] a 298 K. Se obtiene un radio hidrodinámico de $(2,6 \pm 0,3) \text{ nm}$ para NP-Si y un radio hidrodinámico de $(1,5 \pm 0,2) \text{ nm}$ para NP-SiMMA. Los valores para NP-SiMMA son los mismos a los obtenidos por TEM $(1,8 \pm 0,5) \text{ nm}$ dentro del error experimental, sin embargo el valor para las NP-Si es mayor, lo cual apoya la idea de una contribución de partículas aglomeradas en las suspensiones NP-Si.

El análisis de las amplitudes de las fluctuaciones de luminiscencia $\delta P(t)$ se realizó mediante un histograma de cuenta de fotones - *Photon Counting Histogram* (PCH). La Figura 57 muestra el histograma obtenido para un experimento típico, en el cual se representa la frecuencia de observación de fotones en función del número de fotones medidos en una ventana de tiempos adecuada ($\sim 8 \text{ ms}$). La desviación del histograma de la distribución ideal de

Poisson contiene información del número medio de partículas en el volumen excitado y del brillo molecular.

Figura 57: Histograma de cuenta de fotones para NP-SiMMA en suspensión de tolueno.

En la Tabla 18 se muestran los valores de densidad numérica, y valores de brillo obtenido en experimentos llevados a cabo bajo diferentes condiciones experimentales. Donde $\langle N \rangle$ se define según la ecuación 55, donde C es la concentración molar de las partículas; V_0 el volumen de excitación y N_A el número de Avogadro.

$$\langle N \rangle = C \times V_0 \times N_A \quad (55)$$

Análogamente a la definición de brillo en excitación monofotónica donde es el producto del coeficiente de absorción y el rendimiento cuántico de fluorescencia, el brillo de un fluoróforo bajo excitación bi-fotónica es una medida cuantitativa del producto de $\sigma_2 \times \Phi$, donde σ_2 es el coeficiente de absorción bifotónico. Debido a que el estado excitado desde el cual ocurre la emisión es idéntico para la excitación mono- y bifotónica, puede asumirse el mismo rendimiento cuántico de fluorescencia para ambas formas de excitación [Lebret 2008]. Por lo tanto, las medidas de brillo traen información de la sección de absorción bifotónica. Los valores de brillo medidos son dependientes de las propiedades intrínsecas de los fluoróforos y del diseño óptico, por lo tanto no están afectados por las concentraciones. De hecho, bajo idénticos montajes experimentales de excitación y emisión, el brillo

obtenido para suspensiones de diferentes concentraciones de nanopartículas son coincidentes, y los valores de $\langle N \rangle$ son correlacionados con la concentración de la suspensión como se muestra en la Tabla 18. Las diferencias en el número medio de partículas calculado como $1/G(0)$, independiente de la longitud de onda de excitación, pueden ser debidas a la variación del volumen focal en función de la longitud de onda [Chirico 2001].

Tabla 18: Valores de brillo, coeficientes de difusión y radio hidrodinámico obtenidos de medidas de FCS de suspensiones de NP-SiMMA y NP-Si en tolueno saturado en aire.

	λ_{ex} (Å) / nm	BR	$\langle N \rangle$	$1/G(0)$	D ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)	R_h (nm)
NP-SiMMA	750,0 (0,54)	0,094	1,6	150 ± 50	120 ± 80	$3,3 \pm 1$
	800,0 (0,54)	0,093	1,2	93,5	392,5	1,0
	826,0 (0,54)	0,028	1,2	$15 \pm 0,5$	245 ± 2	1,6
	840,0 (0,54)	0,023	1,0	23,5	206	1,9
	860,0 (0,54)	0,024	1,0	11	246	1,6
NP-Si	774,0 (1,00)	0,176	1,0	500	172	2,3
	774,0 (1,00) (*)	0,176(*)	0,09(*)	22(*)	136(*)	2,9(*)
Rodamina 110	800,0 (0,54)	0,131	0,75	-	-	-

Donde (*) se refiere a valores obtenidos diluyendo 1:10 la muestra de NP-Si; A es la absorbancia del filtro en el camino de excitación y BR es el brillo molecular expresado en cuentas $\cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{molécula}^{-1}$.

Para obtener los valores absolutos del brillo, se usó como patrón la rodamina 110 y su PCH medido a 800 nm bajo idénticas condiciones experimentales que las nanopartículas de silicio. El brillo absoluto de la rodamina 110 a 800 nm es de $\sigma_2\Phi \cong 40 \text{ GM}$ (unidades Göppert-Mayer, $1 \text{ GM} = 1 \times 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s} / \text{fotón}$) [Fisher 2005] , y el brillo medido con el montaje experimental de 0,131 cuentas $(\text{s molécula})^{-1}$. Por lo tanto, el brillo de las NPSi-MMA de 0,093 cuentas $\cdot (\text{s} \cdot \text{molécula})^{-1}$ a 800 nm corresponde a un brillo absoluto de 28 GM, con lo cual tomando el rendimiento cuántico de emisión en suspensiones saturadas en aire $\Phi \cong 0,44$ se obtiene $\sigma_2^{800\text{nm}} \cong 64 \text{ GM}$. El brillo obtenido es del orden de los publicados para fluoróforos orgánicos [Lebret 2008, Xu 1996].

4.8. Conclusiones

A continuación se resumen algunas observaciones importantes que se desprenden del análisis de los resultados en este capítulo.

Los espectros de absorción para NP-SiMMA y NP-Si en suspensión acuosa y en suspensión de tolueno a temperaturas entre 273 K y 313 K, no muestran diferencias con la temperatura ni con la concentración de oxígeno. Los coeficientes de extinción molar son comparables a los de los fluoróforos orgánicos.

Los espectros de excitación-emisión obtenidos a partir de partículas sintetizadas en diferentes lotes tienen una alta reproducibilidad en la posición de los máximos de las bandas del espectro y solo aparecen pequeñas variaciones en la altura relativa de los tres máximos. Esta observación indica que el proceso de síntesis estandarizado permite obtener lotes de partículas muy similares en tamaños y características superficiales.

Tanto en suspensiones en tolueno como acuosas, la posición y forma del espectro no muestra dependencia con el recubrimiento superficial, aunque la intensidad de emisión es mayor cuando las nanopartículas se encuentran derivatizadas con MMA.

La forma del espectro de excitación-emisión de las NP-SiMMA no muestra diferencias con los solventes orgánicos; en cambio en suspensión acuosa pierde la resolución espectral y disminuye la intensidad. El estudio del efecto del solvente sobre la emisión a distintas temperaturas permitió determinar que las moléculas de solvente pueden adsorberse sobre la superficie de las nanopartículas produciendo *quenching* estático.

En suspensiones acuosas, los OH^- catalizan la disolución del SiO_2 superficial a silicatos, resultando en un aumento ligero de la luminiscencia. El ensanchamiento y reducción en la emisión observados en agua son procesos reversibles debidos a la interacción del solvente adsorbido con los estados electrónicos.

El decaimiento de la luminiscencia pudo ajustarse a un modelo con dos tiempos de vida. Uno de ellos, de $1,3 \pm 0,3$ ns con una contribución a la emisión total entre el 85 y 100%, insensible a la $[\text{O}_2]$, al solvente, la temperatura y la presencia de átomos pesados. El segundo, de más larga vida, posee una contribución a la luminiscencia total menor del 15% y es sensible a

las condiciones experimentales. Estos diferentes decaimientos de la luminiscencia pueden atribuirse a una población de nanopartículas de mayor tamaño y/o de diferente grado de oxidación.

La concentración del oxígeno influye inversamente sobre la intensidad de luminiscencia. Este efecto se observa tanto en suspensiones en tolueno como en suspensiones acuosas, para todas las partículas. Sin embargo, los tiempos de vida que contribuyen mayoritariamente (> 85 %) a la luminiscencia no se ven afectados por la presencia de oxígeno. Estas observaciones indican la ocurrencia de un quenching estático por el oxígeno.

Los tiempos de vida del excitón en el intervalo de los nanosegundos son característicos de transiciones en el *band gap* directas, a diferencia de las transiciones que ocurren en el silicio en fase masiva que son de *band gap* indirecto. Esta desactivación del excitón mediante transiciones directas se pueden atribuir a estados superficiales generados por el SiO_x , capaces de crear trampas electrónicas y favorecer la rápida recombinación electrónica. Se descartó la participación en este proceso de defectos superficiales ya que no se detectaron en los experimentos de resonancia paramagnética electrónica.

Los valores de anisotropía obtenidos para las NP-SiMMA y NP-Si en suspensión de tolueno y agua saturada en aire indican una diferencia de orientación entre los momentos dipolares del excitón y la nanopartícula en estado basal.

Los espectros de excitación bifotónica y emisión coinciden con los obtenidos por excitación monofotónica, sugiriendo que las transiciones que se producen son las mismas. Los valores del brillo de las nanopartículas excitadas por dos fotones son comparables a los de los fluoróforos orgánicos como la rodamina 110.

Los resultados descritos en este capítulo evidencian una gran sensibilidad de las nanopartículas a la composición superficial, a las moléculas adsorbidas y al entorno en el que se encuentran.

Capítulo 5:

Generación de Especies Reactivas de Oxígeno y Propiedades Reductoras de las Nanopartículas

5.1. Introducción

5.1.1. Nanopartículas como Sensibilizadores de Especies Reactivas de Oxígeno

Oxígeno Singulete

El estado electrónico fundamental del oxígeno molecular ($O_2(X^3\Sigma_g^-)$) es paramagnético debido a dos espines electrónicos paralelos. Existen dos estados excitados energéticamente más próximos que surgen de la misma configuración electrónica pero con diferente paridad de espín $^1\Delta_g$ y el $^1\Sigma_g^+$ que poseen energías 94 y 158 $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ sobre el estado fundamental triplete $^3\Sigma_g^-$ respectivamente [DeRosa 2002]. El estado $^1\Sigma_g^+$ se desactiva rápidamente (130 ns en tetracloruro de carbono) a $^1\Delta_g$ de forma que el primero no tiene posibilidades de reaccionar [Wilkinson 1995a]. Por lo tanto, el término oxígeno singulete suele referir solo a la especie $O_2(^1\Delta_g)$. La transición del estado $^1\Delta_g$ al $^3\Sigma_g^-$ aún estando prohibida por las reglas de selección, ocurre a 1268,7 nm; lo que convierte al estado singulete en una especie de tiempo de vida relativamente largo.

El oxígeno singulete puede desactivarse en forma no radiativa, por transferencia de energía con el solvente (reacción 56), o en forma radiativa emitiendo luz de 1268,7 nm (reacción 57). También puede interaccionar con un sustrato, transfiriendo su exceso de energía mediante *quenching* físico (reacción 58) y finalmente reaccionar con un sustrato para dar lugar a la fotooxidación (ecuación 59). Se define la constante total de *quenching* (k_t) a la suma de los procesos físicos (k_q) y reactivos (k_r).

La energía necesaria para generar el estado $O_2(^1\Delta_g)$ usualmente es transferida mediante colisiones entre el oxígeno molecular y un compuesto que se encuentre en estado excitado (sensibilizador). La participación del sensibilizador para la generación de oxígeno singulete es necesaria ya que el proceso de excitación del oxígeno mediante absorción de luz no se produce debido a ser una transición prohibida por espín y por tanto de muy baja probabilidad.

La generación de oxígeno singulete tiene importantes aplicaciones en química medioambiental [David Gara 2009] y biológica; particularmente en terapia fotodinámica del cáncer [Braslavsky 1997]. Por tanto, es necesario desarrollar sensibilizadores bio-compatibles que presenten baja toxicidad inherente y alta eficiencia de generación de oxígeno singulete en entornos biológicos.

Radical Anión Superóxido

El radical anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) es el radical derivado por adición de un electrón al oxígeno molecular. Se encuentra en equilibrio (reacción 60) con el radical hidropéroxido con un pK de 4,88. Es uno de los aniones radicales más simples y uno de los más importantes tanto en química de fase acuosa del medio ambiente como en los procesos biológicos celulares [Muller 2007]. Esta especie es capaz de reaccionar con una gran variedad de sustratos debido a su naturaleza aniónica, radical y reductora. Las reacciones nucleofílicas y de transferencia de electrones son los caminos predominantes por los que reacciona [Danen Wayne 1978].

Esta especie reactiva de oxígeno ocupa un rol central en una amplia variedad de enfermedades, ya que participa muchos procesos metabólicos. El superóxido no es, como se pensó en el pasado, solo un tóxico que se produce como producto del metabolismo del oxígeno. Por el contrario, actualmente se ha postulado, junto con otros químicos, como un regulador de la oxidación-reducción del metabolismo de los genes. Estos mecanismos son vitales para el correcto funcionamiento de la célula [Joe 2000].

Sensibilizadores de Oxígeno Singulete

Se conoce como "sensibilizador" a la sustancia capaz de absorber radiación y producir alteraciones fotoquímicas o fotofísicas en las especies

circundantes. Según IUPAC, el sensibilizador no se debe consumir durante la reacción [Braslavsky 2007]. El sensibilizador en su estado fundamental (S^0) absorbe un fotón ($h\nu$) y alcanza un estado excitado singulete, 1S . Este estado suele relajarse a un nivel excitado de menor energía 1S (reacción 61). El entrecruzamiento de sistemas permite la generación del estado triplete del sensibilizador, 3S . Los tiempos de vida comparativamente mayores de los estados tripletes (del orden de los μs) respecto de los estados singuletes (del orden de los ns), permiten que estos estados interaccionen con otras especies presentes en la solución. Los estados tripletes de los sensibilizadores son capaces de reaccionar por dos tipos de mecanismos que involucran el oxígeno molecular como se muestra en el Esquema 10.

Esquema 10: Reacciones de sensibilizadores en estados tripletes tipo I y II.

El mecanismo tipo I involucra la transferencia electrónica entre el sensibilizador excitado y el sustrato, produciendo radicales libres, habitualmente el catión radical del sustrato y el anión radical del sensibilizador. Estos últimos radicales reaccionan con el oxígeno formando el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). En el mecanismo tipo II, se genera el oxígeno singulete $O_2(^1\Delta_g)$ por un proceso de transferencia de energía durante la colisión del sensibilizador excitado y el oxígeno molecular presente [Ergaieg 2008, Foote 1991]. Los mecanismos tipo I y II pueden ocurrir

simultáneamente, dependiendo del sensibilizador, el sustrato, el solvente, la concentración de oxígeno y la afinidad del sensibilizador y el sustrato [Tønnesen 2004].

Para que se produzca eficientemente la transferencia de energía al oxígeno en estado fundamental es necesario que el estado excitado del sensibilizador (donante) tenga un largo tiempo de vida medio con energías mayores a la energía de excitación del oxígeno triplete al oxígeno singulete ($> 94 \text{ KJ/mol}$). Los sensibilizadores que se utilizan en la generación fotoquímica de oxígeno singulete deben tener una pequeña separación espacial entre el donante y el O_2 , ser suficientemente solubles en el solvente o mezcla de solventes a utilizar, tener un alto rendimiento cuántico para la producción de oxígeno singulete, un alto coeficiente de absorción a la longitud de onda de excitación, debe ser un mal *desactivador* de oxígeno singulete.

Antecedentes Relacionados con las Nanopartículas

La literatura describe la capacidad del silicio poroso y de nanopartículas de CdSe de actuar como sensibilizadores de oxígeno singulete [Kovalev 2005b, Rioux 2009, Timoshenko 2009a]. Por tanto, es posible pensar que las nanopartículas de silicio también puedan actuar como sensibilizadores de oxígeno singulete. Los largos tiempos de vida del excitón publicados para la mayoría de los cristales de silicio son una gran ventaja para aplicaciones de fotosensibilización [Timoshenko 2009b]. Se plantea que la fotoexcitación de partículas de tamaños nanométricos está acompañada por la aparición de excitones confinados en la partícula de silicio, cuyo menor estado de energía triplete es capaz de transferir su energía eficientemente al estado basal de las moléculas de oxígeno adsorbidas en su superficie. A pesar de la débil interacción espín-orbital esperada para el silicio, se sugiere en la literatura un rápido proceso de cambio de espín que permite relajar el excitón desde el estado singulete al estado triplete prohibido [Kovalev 2005a, Timoshenko 2009b]. La fuerte dependencia con la temperatura de la población del estado triplete y singulete observada para el silicio poroso, sugiere una pequeña energía de separación entre estos niveles (E_{sep}) [Gross 2003, Timoshenko 2009b]. Cuando $k_{\text{B}}T \gg E_{\text{sep}}$, ambos estados pueden estar ocupados y el tiempo de decaimiento del excitón es controlado por el tiempo de decaimiento más rápido del estado singulete. A bajas temperaturas, $k_{\text{B}}T \ll E_{\text{sep}}$ y tanto el espectro de emisión como el tiempo de vida medio muestra la contribución del triplete.

Los espectros y tiempos de decaimiento mostrados en el capítulo 4 para suspensiones NP-SiMMA no presentan diferencias importantes a 298 y 77 K. Por lo tanto, puede esperarse que $E_{\text{sep}} > k_B T$ (0,0256 eV a temperatura ambiente) o bien el menor estado triplete no es un estado luminiscente. El tiempo de vida medio de las nanopartículas es de $\sim 1,3$ ns, consistente con una transición del *band gap* directa. La captura del excitón por el oxígeno no puede ser un proceso dominado por la difusión. Por ello, es de esperar que la desactivación del excitón sea estática [Valeur 2002]. Es decir, el oxígeno que ya se encuentra sobre la superficie cuando se produce el excitón. Esto solo es posible en el caso que exista una gran área superficial específica y el oxígeno se encuentre adsorbido sobre su superficie.

5.1.2. Nanopartículas con Comportamiento Reductor

Las nanopartículas de silicio presentan en su estado excitado una distribución de densidades electrónicas con separación de carga. Estas observaciones indicarían que las nanopartículas pueden participar en reacciones de transferencia de carga con moléculas adsorbidas sobre su superficie. Se han encontrado evidencias de reducción espontánea de iones Ag^+ y Au^{3+} disueltos en medio acuoso cuando se ponen en contacto con nanopartículas creadas por ablación laser [Yang 2009]. Por ello se estudió la capacidad de las nanopartículas de silicio de fotoreducir diversos compuestos.

5.2. Adsorción de N_2 y O_2 sobre las Nanopartículas

Estudios de adsorción de nitrógeno a baja temperatura sobre nanopartículas de silicio con una capa superficial de SiO_2 indican una multicapa de adsorción bajo la contribución dominante de fuerzas de Van Der Waals [Tutorskii 2005]. Sin embargo, otros estudios muestran que a temperatura ambiente tiene lugar la quimisorción de O_2 para distintas superficies de silicio [Miyamoto 1990, Nagatomi 1999, Wang 2009]. Por lo tanto, es importante entender las fuerzas de interacción que entran en juego en nuestro sistema. Para ello se realizaron experimentos de adsorción del O_2 y del N_2 a 77 K empleando como sustrato el conjunto de nanopartículas de 3 nm y el silicio poroso coloidal de 100-200 nm obtenidos en la síntesis sin derivatizar y derivatizados con metacrilato de metilo. Se realizaron los experimentos sin separar las distintas especies de silicio por la dificultad de

synthetizar gramos de nanopartículas de 3 nm que hubiese supuesto la inversión de enormes tiempos de síntesis.

Las isothermas de adsorción se realizaron dos veces para cada gas en cada una de las muestras observándose que los resultados eran reproducibles. Las isothermas se realizaron siguiendo una curva de presión desde 0 hasta un valor máximo para P/P_0 de 0,85 y posteriormente disminuyendo la presión hasta 0. Se obtuvieron valores de absorción en toda la curva para determinar la reversibilidad del proceso. Una vez trazadas las isothermas se ajustó a un modelo BET en el intervalo de P/P_0 entre 0 y 0,35 para tener la certeza que solo se analiza una monocapa adsorbida.

Las isothermas de adsorción se ajustan al modelo BET [Atkins 2006] según la ecuación 62 donde k es la constante de adsorción dada por la ecuación 63; v es el volumen de gas adsorbido; v_m es el volumen de una monocapa de moléculas adsorbidas a temperatura y presión estándar y P_0 es la presión de vapor del gas a 77 K. En este modelo se asume la fisisorción de moléculas sobre el sólido en múltiples capas sin interacción entre ellas, pudiendo ser aplicada la teoría de una monocapa de Langmuir para cada capa. Las entalpías de adsorción para todas las capas, excepto la primera, es igual a la entalpia de condensación del adsorbato [Brunauer 1938]. Realizando una transformación de variables a partir de la ecuación 62 se deduce la ecuación 64. De la representación de $((P/P_0)/(1-(P/P_0)) \cdot v^{-1})$ vs (P/P_0) se obtiene una recta de cuya pendiente y ordenada en el origen se calcula la constante de absorción y la superficie específica de las partículas, respectivamente.

$$\frac{v}{v_m} = \frac{c \frac{P}{P_0}}{(1 - \frac{P}{P_0}) \{1 - (1 - k) \frac{P}{P_0}\}} \quad (62)$$

$$k = e^{\frac{\Delta H_{des}^0 - \Delta H_{vap}^0}{RT}} \quad (63)$$

$$\frac{\frac{P}{P_0}}{v \cdot (1 - \frac{P}{P_0})} = \frac{1}{k \cdot v_m} + \frac{(k - 1)}{k \cdot v_m} \frac{P}{P_0} \quad (64)$$

Se muestran las isotermas de adsorción obtenidas para las NP-SiMMA (Figura 58) y NP-Si (Figura 59). La presión de vapor a 77 K utilizada en estos experimentos fue de 0,2 bar para O₂ y 1 bar para N₂ [Gas Encyclopedia 2010]. Se ajustaron los resultados a un modelo BET según la ecuación 64 realizándose la determinación en el intervalo de P/P_0 entre 0 y 0,35. Las rectas obtenidas se muestran en los gráficos interiores de las figuras 58 y 59.

Figura 58: Isoterma de adsorción de NP-SiMMA en nitrógeno (puntos negros) y oxígeno (puntos rojos). Grafico interior: ajuste al modelo BET.

Figura 59: Isoterma de adsorción de NP-Si en nitrógeno (puntos negros) y oxígeno (puntos rojos). Grafico interior: ajuste al modelo BET.

El proceso de adsorción observado para los tres tipos de partículas muestreadas es totalmente reversible para los dos gases, ya que, tanto en la etapa de aumento de la presión como durante la disminución de la presión, los datos de volumen de gas adsorbido son los mismos. Por lo tanto, cualquier modificación permanente de la superficie por N₂ u O₂ puede ser despreciada a estas temperaturas. Para los dos materiales se observa como el modelo BET es capaz de describir la fisisorción de O₂ y N₂ ya que los datos experimentales ajustan a una línea recta dentro del intervalo analizado. Estos resultados están de acuerdo con trabajos publicados en la literatura para la adsorción de gases sobre nanopartículas [Murzin 2007].

A partir de la pendiente y la ordenada en el origen se calcula la constante de equilibrio de adsorción para O₂ y para N₂. Los resultados mostrados en la Tabla 19 indican que hay una adsorción preferencial de las moléculas de O₂ sobre las de N₂ a 77 K en todas las partículas. En la literatura existen antecedentes sobre la capacidad de la sílice porosa o la sílice en gel, de recubrirse preferencialmente con moléculas de O₂ [Brunauer 1938].

Se calculó la superficie específica a partir del volumen de una monocapa, ν_m , obtenido con el modelo BET, y utilizando como co-área de nitrógeno un valor de 16,2 Å.

Tabla 19: Valores de superficie específica y coeficiente de adsorción.

	NP-Si	NP-SiMMA
Sup. Esp. (m ² /g)	168 ± 17	116 ± 12
K _{O2} (bar ⁻¹)	155 ± 33	100 ± 15
K _{N2} (bar ⁻¹)	77 ± 10	70 ± 20

La superficie específica estimada considerando partículas esféricas con el diámetro medio obtenido por TEM es de 240 m²/g. El valor estimado es un 40 a 50 % más alto que el medido experimentalmente. Esta diferencia puede deberse a la contribución del SPC de menor área. Los valores encontrados están de acuerdo con los publicados para silicio poroso sintetizado electroquímicamente con área superficial de 283 m²/g [Cisneros 2010].

La disminución del área superficial específica de las partículas derivatizadas con grupos orgánicos se ha observado en varios sistemas [Arce

2010b, Jitianu 2002]. Este efecto se debe a que las moléculas de nitrógeno se adsorben preferentemente sobre la superficie oxidada de las nanopartículas y se observa una débil adsorción sobre la superficie orgánica comparada con la de la superficie de sílice desnuda. La disminución del área superficial específica observada indica que la superficie está recubierta con los grupos orgánicos [Jal 2004].

Con los valores del área superficial específica que se detallan en la Tabla 19 es posible obtener la fracción de superficie recubierta por MMA, $f(\text{Si-MMA})$ a partir de la ecuación 65 [Arce 2010a]. Se obtiene el factor de superficie recubierta de las nanopartículas por MMA de $f(\text{Si-MMA}) = 0,3 \pm 0,1$. A pesar de estos valores corresponden a la muestra compuesta por silicio poroso coloidal y nanopartículas, se observa una aceptable correlación con los datos obtenidos por XPS (ver capítulo 3) donde se determinó una relación 1:3 de MMA:SiO₂.

$$f(NP - SiMMA) = \frac{S_{NP-Si} - S_{NP-SiMMA}}{S_{NP-Si}} \quad (65)$$

5.3. Efecto del O₂ Sobre la Emisión

El rendimiento cuántico de luminiscencia de las nanopartículas en tolueno y agua (no la forma del espectro), tiene una fuerte dependencia de la presencia del oxígeno molecular, como se muestra en el capítulo 4. La forma del espectro es independiente de la concentración de oxígeno, siendo necesario puntualizar que se detectó una sola especie responsable de la emisión. Además, el tiempo de vida medio del orden de 1 ns es demasiado corto para permitir que las moléculas de O₂ se acerquen a las nanopartículas por difusión. Bajos estas condiciones, solo se puede producir la desactivación de los excitones de forma estática [Valeur 2002] donde el oxígeno se encuentra adsorbido sobre la superficie de la partícula en el momento de la excitación. Un equilibrio de absorción dinámica de O₂ sobre las nanopartículas involucra una dependencia lineal de I_0/I con $[O_2]$ como se muestra en la ecuación de Stern-Volmer (ecuación 66), donde K es la constante de equilibrio de adsorción [Lakowicz 2006].

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K \cdot [O_2] \quad (66)$$

El *quenching* estático elimina una fracción de los excitones al momento de absorber la luz, por lo tanto la única fluorescencia detectada proviene de los excitones no desactivados estáticamente. Este mecanismo es consistente con la observación de que el tiempo de vida del excitón es independiente de la cantidad de *quencher*, tal como se muestra en el capítulo 4. Se observa como la desactivación no-radiativa de las nanopartículas por oxígeno es reversible, ya que se recupera el rendimiento cuántico de emisión cuando se desplaza el oxígeno de la muestra mediante argón.

La Figura 60 muestra como el radio de la luminiscencia total (área bajo la curva del espectro de emisión) en ausencia y presencia de oxígeno disuelto I_0/I , presenta una dependencia lineal con la concentración de oxígeno disuelto tanto en tolueno (puntos negros) como en agua (puntos rojos). El valor obtenido a partir del ajuste para NP-SiMMA en suspensión de tolueno es $K = (0,43 \pm 0,06) \text{ bar}^{-1}$ y en suspensión acuosa es de $K = (0,23 \pm 0,06) \text{ bar}^{-1}$.

Figura 60: I_0/I en función de $[O_2]$ a 298 K para NP-SiMMA en suspensión acuosa (puntos rojos) y suspensión de tolueno (puntos negros).

5.4. Fluorescencia en Presencia de Átomos Pesados

Las perturbaciones internas y externas de átomos pesados en las densidades electrónicas incrementan el acoplamiento espín-orbital por lo tanto favorecen las transiciones singulete-triplete [Kasha 1952, Kasha 1960]. Se define como efecto de átomo pesado al aumento de la velocidad de los procesos prohibidos por espín debido a la presencia de átomos de alto número atómico, bien unidos químicamente a la molécula excitada o en la solución. Se produce un acoplamiento espín-orbital que facilita el cruce entre sistemas y por lo tanto la generación de estados tripletes [Braslavsky 2007, Lakowicz 2006].

Se midió el espectro de luminiscencia, el tiempo de vida y la generación del oxígeno singulete de suspensiones de NP-SiMMA en presencia y ausencia de átomos pesados para observar cambios en la emisión, inducidos por la presencia de estos últimos. Se esperaba observar cambios en el espectro de emisión y por tanto la presencia de tripletes, que pudieran favorecer la generación de oxígeno singulete.

Se obtuvieron los espectros de las NP-SiMMA en suspensiones de tolueno saturadas en oxígeno, aire y argón. Estas medidas se realizaron por duplicado en ausencia y presencia de yoduro de etilo 2,5 M. La Figura 61 muestra los espectros de NP-SiMMA en suspensión de tolueno saturada en argón, aire y oxígeno. Al añadir el yoduro de etilo se produce una disminución en la intensidad de un 65% respecto al pico que aparece en la suspensión saturada de argón, manteniéndose la misma forma de los picos. La disminución de la intensidad de emisión en presencia de átomos de yodo indica que el estado desde donde se produce la fluorescencia es un singulete ya que la desactivación por átomos pesados se debe al paso de electrones desde los estados singuletes a los estados tripletes. La ausencia de nuevas bandas de emisión indica que el estado triplete es ópticamente no activo a longitudes de onda observables con el espectrofluorómetro a temperatura ambiente. La emisión de las nanopartículas cuando se encuentran en presencia de yoduro de etilo no muestra, dentro del error experimental, dependencia con la concentración de oxígeno disuelto.

Figura 61: Emisión de NP-SiMMA en presencia de yoduro de etilo 2,5 M (línea continua) y ausencia de yoduro de etilo (línea discontinua) para suspensiones saturadas en argón (negro), aire (rojo) y oxígeno (azul).

Los espectros de las NP-SiMMA en suspensiones acuosas saturadas en argón se midieron por duplicado en ausencia y presencia de yoduro de potasio de concentración 0,1 M en D₂O. La Figura 62 muestra los espectros obtenidos para estas muestras donde se observa que en presencia de átomos pesados la emisión se reduce alrededor de un 20% respecto de la observada en suspensiones saturadas en argón sin átomos pesados. El mismo comportamiento se presenta en las suspensiones saturadas en aire u oxígeno.

Se midieron los tiempos de vida media de $(1,3 \pm 0,3)$ ns para las suspensiones de tolueno con yoduro de etilo y suspensiones acuosas con yoduro de potasio, observándose como estos valores están de acuerdo con los tiempos de vida medio medidos previamente para NP-SiMMA en suspensiones de tolueno y acuosas. Por tanto, el paso de una fracción de electrones al estado triplete de menor energía no afecta a la reactividad del estado singulete a partir del cual se emite la fluorescencia, lo cual está de acuerdo con nuestras observaciones previas, de que debido al corto tiempo de vida del excitón, todas las interacciones con este deben de ocurrir en forma estática.

Figura 62: Emisión de NP-SiMMA en suspensión acuosa en presencia (línea continua) y ausencia (línea discontinua) de 0,1M KI para suspensiones saturadas en argón (negro) y aire (rojo).

Se realizaron experimentos para detectar la fosforescencia del oxígeno singulete a 1270 nm excitando con un pulso de laser a 355 nm (ver sección 5.6.2 de este capítulo). Debido a que los átomos pesados favorecen una mayor población de estados tripletes, se espera un aumento en fosforescencia del $O_2(a^1\Delta_g)$ en las soluciones de NP-SiMMA saturadas de oxígeno en tolueno con yoduro de etilo y en 0,1 M KI en D_2O . Por el contrario, se observó que la señal del oxígeno singulete desaparecía completamente en ambas suspensiones, concluyendo que en presencia de átomos pesados las NP-SiMMA no generan oxígeno singulete.

Sin embargo, se observa como en suspensiones acuosas la presencia de oxígeno desactiva parte de la luminiscencia generada a partir del estado singulete. Por tanto, es razonable pensar que en este tipo de suspensiones se pueden generar especies reactivas de oxígeno como el superóxido que no implican cambio de espín.

5.5. Fluorescencia a 77 K

Se realizaron medidas de fluorescencia de suspensiones de NP-SiMMA y NP-Si en agua y en tolueno saturadas en argón y aire a bajas temperaturas (77 K) con el propósito de observar nuevos picos de emisión que podrían ser atribuibles a la fosforescencia de estados tripletes del excitón. La detección de estos estados con energías mayores de 0,98 eV podría explicar fácilmente la generación de oxígeno singlete.

Es posible no observar estados tripletes a temperatura ambiente cuando estos poseen una diferencia de energía con el estado singlete $< k_B T$. Además, estos estados podrían ser desactivados de forma no radiativa por interacciones con el solvente. Estas limitaciones pueden ser superadas a temperaturas de 77 K, por tanto, se puede esperar que estados tripletes no observados a temperatura ambiente puedan observarse a bajas temperaturas.

Nanopartículas en Suspensiones de Tolueno

Se comparan los espectros de emisión obtenidos excitando a 360 nm para NP-Si y NP-SiMMA para observar las diferencias que muestran entre ambas a 77 K y respecto a los espectros obtenidos a temperatura ambiente. La Figura 63 muestra los espectros de las NP-SiMMA medidos a 77 K en suspensión de tolueno saturada en argón (línea negra) y saturada en aire (línea roja). Se observa un descenso de la emisión con la presencia de oxígeno en el medio al igual que ocurre a temperatura ambiente y un aumento en la resolución del espectro, tal como se espera a muy bajas temperaturas. Sin embargo no se detecta la aparición de nuevos picos de emisión atribuibles a un estado triplete no observable a temperatura ambiente.

El espectro de NP-Si medido a 77 K en suspensión de tolueno saturada en aire (línea roja) se muestra en el gráfico interior de la Figura 63. El espectro no muestra cambios respecto al de las NP-SiMMA y no aparecen nuevas bandas de emisión respecto al espectro obtenido a temperatura ambiente. Por tanto, se puede concluir que las NP-SiMMA y las NP-Si no presentan un estado triplete ópticamente activo a energías mayores de 1,37 eV (900 nm).

La Figura 64 compara la matriz de excitación - emisión de las NP-SiMMA en suspensión de tolueno en aire. Se observa como el análisis realizado para los espectros obtenidos excitando a 360 nm es válido en todo el intervalo de

excitación y emisión de las NP-SiMMA, viéndose como los picos están más definidos pero sin ninguna banda de emisión nueva.

Figura 63: Emisión a 77K de NP-SiMMA en suspensión de tolueno saturada en argón (línea negra) y aire (línea roja). Interior: Emisión a 77K de NP-Si en suspensión de tolueno saturada en aire (línea roja).

Figura 64: Comparación de las matrices de excitación - emisión de NP-SiMMA en suspensión de tolueno a 293 K y 77 K.

Con la intensidad total de luminiscencia a 77 K en presencia y ausencia de oxígeno y mediante la ecuación 66 se calcula la constante de adsorción del oxígeno a 77 K, obteniéndose un valor de $K_{ad} = 3,3 \pm 0,7 \text{ bar}^{-1}$.

Nanopartículas en Suspensión Acuosa

El espectro de luminiscencia de NP-SiMMA en suspensión acuosa presenta baja definición debido a la solidificación del agua que forma grandes cristales con bordes de grano muy irregulares que afectan al paso de la luz. Sin embargo, para las NP-SiMMA se observa una banda ancha con un máximo a 465 nm, 40 nm corrido hacia el rojo con respecto al observado a temperatura ambiente y coincidente con uno de los máximos de emisión que se observa en suspensiones de tolueno. Este desplazamiento se puede explicar como consecuencia que el agua cuando se encuentra en estado líquido solvata la partícula y puede modificar el *band gap* de las nanopartículas. Sin embargo, a 77 K el proceso de solvatación no ocurre, ya que el agua está en estado sólido y no puede reorganizarse, y la emisión aumenta desde este estado cercano al estado Franck - Condon. Por lo tanto, de los espectros observados no se obtuvo evidencia de nuevas bandas atribuibles a estados tripletes ópticamente activos.

Figura 65: Emisión de NP-SiMMA en suspensión acuosa a 77 K.

5.6. Generación de Oxígeno Singulete

En estos ensayos se detecto la generación de oxígeno singulete ($O_2(a^1\Delta_g)$) mediante dos técnicas distintas. La primera de ella es la detección del consumo de oxígeno molecular con irradiación continua de suspensiones de nanopartículas en ausencia y presencia de alcohol furfurílico y azida sódica. Paralelamente, se llevaron a cabo experimentos de detección de la fosforescencia de $O_2(a^1\Delta_g)$ resuelta en el tiempo a 1270 nm.

5.6.1. Consumo de Oxígeno Molecular

Los datos de consumo de oxígeno se representan como $\ln(C/C_0)$ en función del tiempo de irradiación donde C es la concentración de oxígeno disuelto y C_0 es la concentración de oxígeno disuelto a tiempo cero.

Suspensiones Acuosas de NP-SiMMA

Los resultados de las experiencias donde se mide el consumo de O_2 en suspensiones acuosas de NP-SiMMA se muestran en la Figura 66.

Figura 66: Logaritmo de consumo de oxígeno en función del tiempo de irradiación para suspensiones acuosas de NP-SiMMA (puntos negros); NP-SiMMA + FA (puntos rojos) y NP-SiMMA + FA + N_3^- (puntos azules).

Se observa cómo no se consume oxígeno en el tiempo de irradiación cuando solamente se encuentra en el reactor la suspensión de nanopartículas (puntos negros). Al añadir alcohol furfurílico a la suspensión anterior (puntos rojos) se observa consumo de oxígeno. El logaritmo del consumo de O_2 es lineal con el tiempo tal como sería de esperar para reacciones de primer orden. Al añadir azida sódica (puntos azules) nuevamente se inhibe el consumo de oxígeno. El consumo de oxígeno al añadir alcohol furfurílico y la inhibición con la azida sódica evidencian la presencia de oxígeno singlete generado por las nanopartículas. Asimismo, se pone de manifiesto una reactividad despreciable entre las NP-SiMMA y $O_2(a^1\Delta_g)$ apoyada por el consumo insignificante de oxígeno singlete en las suspensiones de nanopartículas solas en agua.

Suspensiones Acuáticas de NP-Si

El consumo de oxígeno en suspensiones acuáticas de NP-Si saturadas en aire se muestran en la Figura 67. Se observa cómo en este caso se registra consumo de oxígeno en el tiempo cuando solamente se encuentra en el reactor la suspensión de nanopartículas (puntos negros).

Figura 67: Logaritmo de consumo de oxígeno en función del tiempo de irradiación para suspensiones acuáticas de NP-Si (puntos negros); NP-Si + FA (puntos rojos) y NP-Si + FA + N_3^- (puntos azules).

Al añadir alcohol furfurílico (puntos rojos) el consumo de oxígeno aumenta. Al añadir azida sódica (puntos azules) se inhibe el consumo de oxígeno singlete por el alcohol furfurílico y vuelve a registrarse el descenso en la concentración del experimento solo con nanopartículas. Estos resultados indican que estas nanopartículas se oxidan por la acción de la irradiación UV-Vis en una reacción que no necesariamente involucra al $O_2(a^1\Delta_g)$.

Una posible explicación a estas observaciones puede ser la existencia enlaces superficiales (e.g. Si-H) capaces de reaccionar con el O_2 llevando a la oxidación de la superficie. Una comprobación que este tipo de reacciones no involucra al $O_2(a^1\Delta_g)$ es el hecho que cuando se añade la acida sódica se mantiene el consumo de O_2 en valores del orden del experimento con nanopartículas solas. Las reacciones 67 a 70 permiten comprender el mecanismo de la reacción. La reacción se inicia por homólisis del enlace si-H (reacción 67). Las reacciones 68 y 69 llevan a la oxidación de la superficie de las nanopartículas. La reacción 70 da lugar a la generación del radical anión superóxido.

5.6.2. Fosforescencia del $O_2(a^1\Delta_g)$ a 1270 nm

El $O_2(a^1\Delta_g)$ presenta emisión de fosforescencia alrededor de los 1270 nm en la mayoría de los solventes, dependiendo de estos el tiempo de vida medio. Esta fosforescencia puede ser detectada con resolución temporal mediante un detector de germanio y un osciloscopio, tal como se describió en el capítulo 2.

La Figura 68 muestra las trazas de emisión de $O_2(a^1\Delta_g)$ en suspensiones de tolueno (izquierda) y de D_2O (derecha) saturadas con oxígeno. Del decaimiento de estas trazas se obtiene el tiempo de vida medio del oxígeno singlete en tolueno $\tau_A = 20 \mu s$, del orden del publicado en la bibliografía para soluciones en tolueno [Okamoto 1993]. El corto tiempo de vida de

emisión de oxígeno singlete en agua ($\tau_{\Delta} = 3,5 \mu s$ [Wilkinson 1995b]), no permite medidas con el equipamiento del que se dispone, por tal razón se realizaron medidas en D_2O donde el tiempo de vida del oxígeno singlete es mayor ($\tau_{\Delta} = 68 \mu s$ [Wilkinson 1995b]). La formación de oxígeno singlete en suspensiones de D_2O se evidencia por las trazas a 1270 nm mostrando $\tau_{\Delta} = (68 \pm 15) \mu s$. Los tiempos de vida observados en D_2O y tolueno están de acuerdo con los publicados para estos solventes. Esta observación apoya la evidencia de que el $O_2(a^1\Delta_g)$ no reacciona con las NP-SiMMA, ya que de reaccionar, los tiempos de vida medios serían menores.

Figura 68: Fosforescencia a 1273 nm resuelta en el tiempo del $O_2(a^1\Delta_g)$ generado por NP-SiMMA en suspensión de tolueno (izquierda) y suspensión acuosa (derecha).

Rendimientos Cuánticos de Generación de $O_2(a^1\Delta_g)$

Se determinó la fosforescencia total de $O_2(a^1\Delta_g)$ generado por las NP-SiMMA en suspensiones de tolueno saturadas en oxígeno (I_{Δ}) y por la referencia de 9,10-DPA ($I_{\Delta R}$) en tolueno [Brauer 1984]. Se realizaron los ensayos bajo similar absorbancia a 355 nm y el mismo montaje experimental. Con estos valores se determinó el rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete (Φ_{Δ}), mediante la ecuación 71. Considerando el rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete para la referencia en tolueno, $\Phi_{\Delta R} = 0,8$ [Scaiano 1989], se obtiene el rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete para NP-SiMMA en suspensión de tolueno $\Phi_{\Delta} = 0,15 \pm 0,04$.

En suspensión de D₂O se estimó un valor de $\Phi_{\Delta} = 0,03 \pm 0,01$ para NP-SiMMA utilizando como referencia TMPyP [Wilkinson 1993a].

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta R} \times \frac{\int I_{\Delta}(t)dt}{\int I_{\Delta R}(t)dt} \times \frac{1 - 10^{-A_R}}{1 - 10^{-A}} \quad (71)$$

Donde los subíndices *R* se refieren a los valores de la referencia; Φ_{Δ} es el valor de rendimiento cuántico de generación de oxígeno singulete; $\int I_{\Delta}(t)dt$ es el área bajo la curva; *A* es la absorbancia.

Fosforescencia de O₂(a¹Δ_g) en función de la concentración de O₂(³Σ_g) disuelto

La dependencia de la fosforescencia de emisión con la concentración del oxígeno disuelto en suspensiones de NP-SiMMA en tolueno se representa en la Figura 69 con los puntos negros y puede ser descrita por la ecuación 75. Para la obtención de esta ecuación se considera que el total de emisión de fosforescencia es proporcional a una constante del instrumento (*A*), a la probabilidad de transferencia de energía hacia las moléculas adsorbidas (*P*) y a la fracción de la superficie cubierta por moléculas de O₂ (*θ*), como se muestra en la ecuación 72.

$$I_{\Delta} = A \cdot P \cdot \theta \quad (72)$$

La isoterma de Langmuir (ecuación 73) relaciona la concentración de oxígeno en el medio con la cantidad de moléculas adsorbidas sobre el sólido. Por tanto, si sustituimos *θ* en la ecuación 72 por la ecuación 73, se obtiene la relación entre la intensidad total de fluorescencia y la cantidad de oxígeno en el medio.

$$\theta = \frac{K \cdot [O_2]}{1 + K \cdot [O_2]} \quad (73)$$

$$I_{\Delta} = \frac{A \cdot P \cdot K \cdot [O_2]}{1 + K \cdot [O_2]} \quad (74)$$

Considerando, *a* = *A*·*P*·*K* y *b* = *K* se llega a la ecuación 75 que relaciona la cantidad de oxígeno disuelto en el medio con la intensidad de fosforescencia total del oxígeno singulete.

$$I_{\Delta} = \frac{a[\text{O}_2]}{1+b[\text{O}_2]} \quad (75)$$

Del ajuste de la curva a una expresión como la mostrada en la ecuación 75 se obtiene $K = (0,6 \pm 0,1) \text{ bar}^{-1}$. Dentro del error experimental, este valor de K está de acuerdo con el valor encontrado para la desactivación de la luminiscencia por el oxígeno adsorbido en suspensiones de tolueno $K_{ad} = (0,43 \pm 0,06) \text{ bar}^{-1}$ (ver capítulo 5 - sección 5.3). Por lo tanto, existe una fuerte evidencia de la transferencia de energía desde las partículas excitadas a las moléculas de oxígeno adsorbidas en la superficie.

Figura 69: Intensidad de fosforescencia del oxígeno singlete frente a la concentración de oxígeno en suspensiones de NP-SiMMA en tolueno a temperatura ambiente.

Utilizando el valor de la constante de equilibrio a temperatura ambiente se calcula el incremento de energía libre de Gibbs mediante la ecuación 76, obteniéndose un valor de $\Delta_{ad}G_{293K}^0 = 1275 \text{ J/mol}$.

$$\Delta_{ad}G^0 = -R \cdot T \cdot \ln(K_{ad}) \quad (76)$$

Utilizando la ecuación 77 [Atkins 2006] y con las dos constantes de adsorción conocidas a dos temperaturas, $K_{ad}(293 \text{ K}) = 0,6$ y $K_{ad}(77 \text{ K}) = 3,3$; se calcula una aproximación del calor de adsorción del O_2 sobre la superficie de las partículas obteniéndose como resultado $\Delta_{ad}H^0 = -1480 \text{ J/mol}$, este valor de entalpía está de acuerdo con la absorción física del oxígeno sobre la superficie.

$$\ln\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = \frac{\Delta_{ad}H^0}{R}\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right) \quad (77)$$

5.6.3. Mecanismo de Generación de $O_2(a^1\Delta_g)$

Estudios encontrados en la literatura [Kovalev 2005a] sugieren que los estados superiores e inferiores de excitones de cristales de silicio de tamaños del orden del radio de Bohr son un singlete ópticamente activo que controla el tiempo de decaimiento, y un triplete ópticamente pasivo con $E_{sep} < k_B T$.

Los resultados obtenidos en los experimentos de emisión con presencia de átomos pesados y a 77 K son consistentes con la existencia de un estado triplete excitado con $E < 0,98$ eV. Estos experimentos demuestran que la emisión se produce desde un estado singlete que es desactivado por la presencia del yodo llevando al excitón a un estado triplete no observado a temperatura ambiente ni a 77 K. Sería de esperar que el oxígeno singlete se generase con mayor eficiencia cuando los excitones son llevados a estados tripletes, en cambio no se observa generación de oxígeno singlete en este caso. Por ello, el estado triplete debe de encontrarse a energías menores de 0,98 eV (1270 nm) en concordancia con la no observación de emisión debidas a estos estados en el Visible-IR cercano.

Se propone un mecanismo donde la desactivación del excitón, en su estado singlete $^1(e^- - h^+)$, por el oxígeno genera un triplete de baja energía (ecuación 78), es un mecanismo posible permitido por el espín. Esta reacción está limitada a una diferencia de energía entre singlete - triplete mayor a 0,98 eV [Schweitzer 2003] de forma de tener la energía suficiente para excitar al oxígeno a $O_2(a^1\Delta_g)$. La energía vibracional cero del estado excitado de las partículas $\Delta E_{0,0} \sim 3,1$ eV permite tal requerimiento. El oxígeno singlete formado puede desorberse de la superficie de la partícula, como indican los tiempos de vida del $O_2(a^1\Delta_g)$ del orden esperado para su relajación en los solventes puros.

El rendimiento cuántico de emisión de las nanopartículas en tolueno saturado en argón indica que el 76% de los excitones en el estado singlete son capaces de emitir siguiendo la reacción 79 y el resto relajarse por caminos no-radiativos hasta el estado basal (reacciones 80). El cruce entre sistemas (ISC) hacia el estado triplete y posterior relajación desde este estado y la

desactivación con oxígeno sin cambio de espines para generar el radical anión superóxido (según la reacción 81) son posibles mecanismos de relajación.

Esquema 11: Separación de energías entre niveles de energías y mecanismos posibles de relajación del excitón.

Debido al tiempo de relajación de 1 ns de los excitones, la reducción en Φ_{em} por la presencia de oxígeno (0,44 en aire) puede solo ser justificada por la desactivación de los excitones por las moléculas de oxígeno fisisorbidas en la superficie de la partícula al momento de formarse, como se ha discutido anteriormente. Por lo tanto, el rendimiento cuántico de oxígeno singulete engloba las reacciones 78, 79, 80 y 81 está dado por la ecuación 82 [Wilkinson 1993b].

$$\Phi_{\Delta} = f_{\Delta}^S \cdot P_S^{O_2} \quad (82)$$

Donde $P_S^{O_2}$ es la fracción de excitones singletes desactivados por oxígeno, y f_{Δ}^S es la fracción de excitones singletes desactivados por oxígeno que produce oxígeno singulete. La ecuación 83 muestra la relación entre la fracción de excitones singletes desactivados por oxígeno y el rendimiento cuántico de emisión en presencia y ausencia de oxígeno.

$$P_S^{O_2} = \left(\frac{I_{em}^0 - I}{I_{em}^0} \right) = \left(\frac{\Phi_{em}^0 - \Phi}{\Phi_{em}^0} \right) \quad (83)$$

Por tanto, conociendo $P_S^{O_2}$ se puede despejar la fracción de excitones singuletes desactivados por oxígeno que producen oxígeno singulete a partir de las ecuaciones 82 y 83 en función del rendimiento cuántico de generación de oxígeno singulete y el rendimiento cuántico de emisión en presencia y ausencia de oxígeno, como se muestra en la ecuación 84.

$$f_{\Delta}^S = \frac{\Phi_{\Delta}}{\left(\frac{\Phi_{em}^0 - \Phi_{em}}{\Phi_{em}^0} \right)} \quad (84)$$

Tabla 20: Valores $P_S^{O_2}$, Φ_{Δ} y f_{Δ}^S para NP-SIMMA en suspensiones de tolueno y agua.

	$P_S^{O_2}$	Φ_{Δ}	f_{Δ}^S
Tolueno	$0,42 \pm 0,07$	$0,15 \pm 0,04$	$0,40 \pm 0,10$
Agua	$0,20 \pm 0,07$	$0,03 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$

Los resultados obtenidos indican que la desactivación por oxígeno de los excitones singuletes no genera cuantitativamente oxígeno singulete. La reacción 81 capaz de generar radical anión superóxido puede ser la causa para tal comportamiento, como se sugiere en la literatura [Schweitzer 2003, Wilkinson 1993b] para sensibilizadores con fuertes interacciones de transferencia de carga con O_2 . Estos muestran un incremento significativo en k_Q y simultáneamente un descenso en la producción de $O_2(a^1\Delta_g)$ con el incremento de la polaridad del solvente.

Además, los radicales libres pueden ser generados por nanopartículas fotoexcitadas tanto en configuraciones de espín singulete o triplete por caminos reductivos (involucrando la transferencia de electrones) y oxidativos (involucrando la transferencia de huecos). El tiempo de vida observado indica que cualquier reacción que involucra excitones ($e^- - h^+$) requiere que el electrón - aceptor o el electrón - donante se encuentre físicamente localizado cerca de la partícula. Es importante señalar que la función de onda del electrón penetra significativamente en los alrededores de la solución mientras que la de los huecos no [Cooper 2010], por tanto los donantes deben estar

más fuertemente adsorbidos en las nanopartículas para que la reacción ocurra.

5.7. Generación del Radical Anión Superóxido

La generación de oxígeno singlete por moléculas orgánicas e inorgánicas suele ir acompañada de la generación del radical anión superóxido $O_2^{\bullet-}$ [DeRosa 2002]. Además existen estudios que muestran como el polvo de silicio es capaz de reducir moléculas orgánicas adsorbidas en soluciones acuosas [Lichtin 1984]. Por tanto, se propone que el excitón puede reducir al oxígeno adsorbido a superóxido de acuerdo a la reacción 85.

La energía libre de Gibbs asociado con la transferencia electrónica foto-inducida entre el donante de electrones excitado (NP-SiMMA) y un aceptor (O_2) está dado por la ecuación 86 [Braslavsky 2007].

$$\Delta_{ET}G^0 = N_A \left\{ e \left[E^0(NP^+ / NP) - E^0(O_2 / O_2^{\bullet-}) \right] + w(NP^+ - O_2^{\bullet-}) \right\} - \Delta E_{0,0} \quad (86)$$

Donde e es la carga elemental $1,602 \times 10^{-19}$ C; N_A es la constante de Avogadro $6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$; $E^0(O_2 / O_2^{\bullet-}) = -330 \text{ mV vs SHE}$ [Wardman 1989]; $\Delta E_{0,0} \sim 318 \text{ kJ mol}^{-1}$ en suspensiones acuosas. El termino de trabajo de Coulomb calculado mediante la ecuación 87 es $N_A \cdot W(h^+ - O_2^{\bullet-}) \approx -1 \text{ kJ mol}^{-1}$, es el esperado para dos cargas opuestas separadas a una distancia de 1,5 nm (radio de la partícula) en suspensiones acuosas con una permitividad estática relativa de 80 [Lide 2009]. Este término es despreciable respecto a las otras contribuciones.

$$N_A \cdot W(h^+ - O_2^{\bullet-}) = N_A \cdot \frac{1}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon \cdot \epsilon_0} \cdot \frac{q_+ \cdot q_-}{r} \quad (87)$$

El potencial estándar para la banda de conducción de NP-SiMMA, $E^0(NP^+/NP) \sim -1,5 \text{ V}$, está de acuerdo con lo predicho por los cálculos teóricos del las bandas de energía en los bordes de nanopartículas [Hill 1995] y con el valor de $-1,20 \text{ V vs NHE}$ medido para silicio poroso en acetonitrilo [Rehm 1996].

$$\Delta_{ET}G^0 = N_A \cdot 1,602 \cdot 10^{-19} \text{C} \cdot (-1,5 \cdot V + 0,330 \cdot V) - 318 \cdot 10^3 \frac{\text{J}}{\text{mol}} \quad (88)$$

Se estima una energía libre de Gibbs $\Delta_{ET}G^0 \cong -430 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ a 1 atm y 298 K. Estos valores indican que la formación del radical anión superóxido es una reacción termodinámicamente posible. Con estos antecedentes se sospecha la posible generación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ por irradiación de las NP-SiMMA en suspensión acuosa. Por ello se realizaron experimentos con el propósito de determinar la capacidad de las NP-SiMMA de reducir al O_2 . Es interesante notar que se propuso la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en los primeros estadios de la adsorción de oxígeno en superficies de silicio amorfo para luego dar lugar a la formación de Si-O-Si [Nagatomi 1999]. Debido a las limitaciones experimentales para observar directamente la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en experimentos de fotólisis *flash*, se procedió a determinar la generación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ mediante la detección del agua oxigenada formada a partir de la recombinación de $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Una suspensión acuosa de 50 $\mu\text{g/mL}$ de NP-SiMMA saturada en aire se irradió durante 30 minutos con una lámpara Rayonet de emisión (350 ± 20) nm. Se realiza una dilución 200 μL de la solución irradiada en 2 mL de la solución con el kit Colestat y se mide una absorbancia a 505 nm de 0,0485. Esta absorbancia corresponde a una concentración de H_2O_2 de $1,06 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. La estequiometría de la reacción del $\text{O}_2^{\cdot-}$ para generar H_2O_2 es 2:1, por lo tanto se obtiene una concentración de anión superóxido de $2,12 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ que corresponde en un volumen de 3 mL a $6,36 \cdot 10^{-7}$ moles de $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Si se determina la intensidad de fotones total que llega a la muestra, se puede calcular el rendimiento cuántico de generación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ según la ecuación 89.

$$\Phi_{\text{O}_2^{\cdot-}} = \frac{n_{\text{O}_2^{\cdot-}}}{I_T \cdot t \cdot (1 - 10^{-\epsilon_{350} \cdot c})} \quad (89)$$

Donde $n_{\text{O}_2^{\cdot-}}$ son los moles de superóxido ($6,36 \cdot 10^{-7}$ moles de $\text{O}_2^{\cdot-}$) en el volumen de muestra; I_T es la intensidad de fotones que llegan a la muestra ($1,88 \cdot 10^{-9}$ moles de fotones/s); ϵ_{350} es el coeficiente de extinción molar de

las NP-SiMMA en suspensión acuosa a 350 (2449 M⁻¹ cm⁻¹); t es el tiempo de irradiación (1800 s) y $\Phi_{O_2^{\bullet-}}$ es el rendimiento cuántico de generación del radical anión superóxido.

Se obtiene un valor de $\Phi_{O_2^{\bullet-}} = (0,12 \pm 0,05)$. Se calcula la fracción de excitones singuletes que generan el radical anión superóxido $f_{O_2^{\bullet-}}^s$ con el rendimiento cuántico de emisión en presencia y ausencia de oxígeno, como se muestra en la ecuación 90 de forma análoga a como se calculo la fracción para oxígeno singulete.

$$f_{O_2^{\bullet-}}^s = \frac{\Phi_{O_2^{\bullet-}}}{\left(\frac{\Phi_{em}^0 - \Phi_{em}}{\Phi_{em}^0} \right)} \quad (90)$$

Se obtiene un valor de $f_{O_2^{\bullet-}}^s = (0,6 \pm 0,3)$; este resultado indica que en suspensión acuosa una fracción importante de los excitones desactivados por oxígeno generan el radical anión superóxido.

5.8. Reducción de Metilviologeno

El metilviológeno (MV²⁺) es un herbicida ampliamente utilizado en la actualidad, de rápida acción, no selectivo y altamente tóxico para los mamíferos y el ser humano. Además, el MV²⁺ es una sustancia fácilmente reducible a su radical catión (MV^{•+}) que puede detectarse fácilmente por métodos ópticos. Por tanto es un compuesto adecuado para observar la capacidad de las nanopartículas de reducir otras sustancias además del O₂. El mecanismo propuesto para la formación del radical catión metilviologeno se muestra en la reacción 91.

La energía libre de Gibbs asociado con la transferencia electrónica foto-inducida entre el donante de electrones excitado (NP-SiMMA) y un aceptor (MV²⁺) está dado por la ecuación 92 [Braslavsky 2007].

$$\Delta_{ET}G^0 = N_A \left\{ e \left[E^0(NP^+ / NP) - E^0(MV^{2+} / MV^{\bullet+}) \right] + W(NP^+ - MV^{\bullet+}) \right\} - \Delta E_{0,0} \quad (92)$$

Donde e es la carga elemental $1,602 \times 10^{-19}$ C; N_A es la constante de Avogadro $6,02 \times 10^{23}$ mol $^{-1}$; $E^0(MV^{2+}/MV^{\bullet+}) = -448$ mV vs SHE [Wardman 1991]; $\Delta E_{0,0} \sim 318$ kJ mol $^{-1}$ en suspensiones acuosas. El termino de trabajo de Coulomb calculado mediante la ecuación 87, $N_A \cdot W(h^+ - O_2^{\bullet-}) \approx +2$ kJ mol $^{-1}$ se espera para una carga positiva (NP $^+$) y dos cargas positivas (MV $^{2+}$) opuestas separadas a una distancia de 1,5 nm (radio de la partícula) en suspensiones acuosas con una permitividad estática relativa de 80 [Lide 2009]. Por lo tanto, este término es despreciable respecto a las otras contribuciones.

$$\Delta_{ET}G^0 = N_A \cdot 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C} \cdot (-1,5 \cdot V + 0,448 \cdot V) - 318 \cdot 10^3 \frac{\text{J}}{\text{mol}} \quad (93)$$

Se estima una energía libre de Gibbs $\Delta_{ET}G^0 \cong -442$ KJ·mol $^{-1}$ a 1 atm y 298 K. Estos valores indican que la formación del radical catión metilviologeno es una reacción termodinámicamente posible.

El desarrollo experimental para explorar la capacidad foto-reductiva de las NP-SiMMA sobre metilviológeno se realizó mediante experimentos de fotólisis *flash* convencional. Estos se llevaron a cabo irradiando ($\lambda > 300$ nm) NP-SiMMA tanto en suspensiones de tolueno como de agua, ambas saturadas de argón. Estas suspensiones contenían $1 \cdot 10^{-4}$ M de metilviologeno (MV $^{2+}$). El radical (MV $^{\bullet+}$) puede ser convenientemente detectado por su fuerte absorción a 605 nm ($\epsilon = 13400$ M $^{-1}$ cm $^{-1}$) y 398 nm ($\epsilon = 42000$ M $^{-1}$ cm $^{-1}$) [Watanabe 1982]. Se hicieron ensayos de referencia con la misma solución pero en ausencia de NP-SiMMA, los que no mostraron formación de transientes en el intervalo de longitudes de onda entre 300 y 700 nm. La formación del radical se observa solo con experimentos en suspensión acuosa, como se muestra en la Figura 70 con un tiempo de vida medio inusual para MV $^{\bullet+}$ de 1,6 ms, del orden observado para este radical anclado a superficies de sílica gel [Mao 1995]. La emisión de suspensiones acuosas de NP-SiMMA en presencia de MV $^{2+}$ se reduce considerablemente como se muestra en gráfico interior de la Figura 70. Por tanto, estas observaciones sugieren que ambos procesos, la reducción foto-inducida de MV $^{2+}$ y la luminiscencia de emisión, comparten el mismo estado excitado precursor.

Figura 70: Decaimiento del radical catión MV^+ en solución de tolueno (triángulos) y solución acuosa (círculos negros). Gráfico interior: Espectro de emisión de suspensiones de NP-SiMMA solas (línea roja) y con metilviológeno (línea negra).

El MV^{2+} se absorbe químicamente sobre las superficies principalmente compuestas por siloxanos ($\equiv Si-O-Si \equiv$) y silanoles ($\equiv Si-OH$) [Mao 1995]. Estudios fotoquímicos con el MV^{2+} adsorbido sobre superficies de sílica gel muestran la generación del radical MV^+ foto-inducida cuando hay una absorción química de MV^{2+} en los sitios negativos de estas superficies [Mao 1995]. Considerando que los grupos superficiales $Si-OH$ se forman en las suspensiones de las partículas en agua, un mecanismo similar involucrando la interacción de luz con MV^{2+} adsorbido químicamente puede también tener lugar durante la fotólisis de las suspensiones acuosas de NP-SiMMA. Para evaluar la contribución de este mecanismo, se realizaron ensayos comparativos con nanopartículas de SiO_2 de 7 nm de diámetro totalmente hidroxiladas [Caregnato 2003] conteniendo concentraciones de nanopartículas del orden usado con las NP-SiMMA, bajo idénticas condiciones experimentales. Estos experimentos no muestran, dentro del error experimental, generación de MV^+ . Por lo tanto, la fotólisis de MV^{2+} adsorbido no puede ser una reacción importante en la superficie de NP- SiO_2 hidroxiladas, aunque la adsorción parece jugar un rol en la estabilidad del radical MV^+ .

Las suspensiones de NP-SiMMA en tolueno no muestran en la superficie grupos Si-OH, y por lo tanto se espera que MV^{2+} no se adsorba fuertemente en la superficie de las partículas. La reducción MV^{2+} no se observa en tolueno y remarca la importancia de la adsorción del sustrato en el proceso de reducción foto-inducida. Como se discutió con anterioridad, debido al corto tiempo de vida del excitón, solo se puede producir la reacción cuando el MV^{2+} se encuentre adsorbido sobre las partículas.

5.9. Reducción de Mercurio (II)

El mercurio es un contaminante altamente tóxico para los organismos vivos. Sin embargo, existen diferencias en su grado de toxicidad según los distintos estados de oxidación. Las aguas contaminadas con mercurio inorgánico pueden presentar Hg^0 y principalmente Hg^{2+} formando complejos [Fitzgerald 1997]. El Hg^0 está presente en el agua como un gas disuelto y si se encuentra en concentraciones superiores a la de saturación se evapora. El Hg^0 no forma complejos y no es bioacumulable en organismos acuáticos. En cambio la forma iónica Hg^{2+} es reactiva y forma complejos estables con compuestos orgánicos e inorgánicos que presentan una gran toxicidad (e.g. metilmercurio) [Fitzgerald 1997]. Por lo tanto se evaluó la capacidad de reducir Hg^{2+} por las nanopartículas.

Se propone que el primer paso de la reducción debería producirse según la reacción 94. El Hg^+ formado puede posteriormente ser reducido por otro excitón o encontrarse con otro Hg^+ para desproporcionarse según se muestra en la ecuación 95.

La energía libre de Gibbs asociado con la transferencia electrónica foto-inducida entre el donante de electrones excitado (NP-SiMMA) y el aceptor (Hg^{2+}) está dado por la ecuación 96 [Braslavsky 2007].

$$\Delta_{ET}G^0 = N_A \left\{ e \left[E^0(NP^+ / NP) - E^0(Hg^{2+} / Hg^0) \right] + W(NP^+ - Hg^{2+}) \right\} - \Delta E_{0,0} \quad (96)$$

Donde $E^0(Hg^{2+} / Hg^+) = - 850 \text{ mV vs SHE}$ [Lide 2009] en solución acuosa. Como se discutió anteriormente para el MV^{2+} , el término de trabajo de

Coulomb calculado mediante la ecuación 87 es despreciable respecto a las otras contribuciones (+2 kJ mol⁻¹).

$$\Delta_{ET}G^0 = N_A \cdot 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ C} \cdot (-1,5\text{V} + 0,850\text{V}) - 318 \cdot 10^3 \frac{\text{J}}{\text{mol}} \quad (97)$$

Se estima una energía libre de Gibbs $\Delta_{ET}G^0 \cong -380 \text{ KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ a 1 atm y 298 K. Estos valores indican que la reducción del Hg²⁺ es termodinámicamente posible.

Se realizan tres ensayos para comprobar experimentalmente la reducción del mercurio: dos blancos y una medida, detallado en la Tabla 21. El blanco N°1 consiste en una solución sin nanopartículas y se realiza el proceso de separación para determinar si existe Hg⁰ en la solución. El blanco N°2 consiste en realizar todo el procedimiento sin irradiar la muestra, para observar el efecto de las nanopartículas sobre el mercurio. El 3^{er} experimento consiste en la irradiación de la mezcla y la determinación del mercurio reducido.

Tabla 21: Variables de cada experimento para determinar reducción de mercurio.

Experimento	hν	NP-SiMMA (mg/L)	[Hg ²⁺] _{inicial} (mg/L)	[Hg ²⁺] _{detectado} (mg/L)
1	Si	0	134	< 0,75
2	No	20	134	1,2 ± 0,5
3	Si	20	134	2,5 ± 0,5

Los resultados obtenidos muestran que no existe Hg⁰ en la muestra inicial o que su concentración está por debajo del límite de detección del método (0,75 mg de Hg²⁺/L). El blanco 2 muestra una concentración de 1,2 ± 0,5 mg de Hg⁰/L generado sin irradiación. Finalmente, el experimento 3 mostró que la irradiación aumenta la capacidad de las partículas de reducir al Hg²⁺ generando 2,6 ± 0,5 mg de Hg⁰/L.

La reducción completa del Hg²⁺ a Hg⁰ en el sistema estudiado involucra la reducción por un electrón a Hg⁺ como se observa en la reacción 94, es posible que haya mercurio Hg⁺ en el primer reactor reducido por las nanopartículas que no fueron arrastradas por la corriente de nitrógeno. Se comprobó la presencia de iones Hg⁺ en la solución añadiendo KCl a la solución de forma que la aparición de un precipitado de Cl₂Hg₂ indicaría la presencia del ion Hg⁺ (reacciones 98 y 99). A simple vista, no se observó la formación de

precipitado, por tanto, se puede asumir que se no se producen iones Hg^+ en cantidades importantes.

5.10. Conclusiones

En este capítulo se realizó un estudio exhaustivo de la interacción del oxígeno con las nanopartículas de silicio. Se determinaron las constantes de adsorción y parámetros termodinámicos. Se observa como el oxígeno disminuye la intensidad de la fluorescencia de la partícula y que dicha reducción involucra un mecanismo sobre la superficie de la partícula que lleva a la generación de oxígeno singulete y del radical anión superóxido. Se calculó la eficiencia de la fotosensibilización de oxígeno singulete, donde Φ_Δ a pesar de ser pequeño, es de importancia para muchas aplicaciones biológicas.

Se realizaron experimentos a bajas temperaturas y en presencia de átomos pesados que permitieron obtener algunas conclusiones sobre la multiplicidad de espín y la energía de los estados excitados involucrados. Estos experimentos apoyan la ocurrencia de una transferencia de energía desde el estado singulete excitado de las NP-SiMMA hacia el O_2 para dar $\text{O}_2(a^1\Delta_g)$ y un estado triplete excitado de energía $< 0,98$ eV como principal mecanismo de fotosensibilización.

Por último, se resaltó la capacidad de las nanopartículas cuando se irradian con luz UV de reducir compuestos contaminantes como el metilviológeno y el mercurio (II).

Capítulo 6:

Silicio Poroso Coloidal

6.1. Síntesis y Separación del Silicio Poroso Coloidal

En el proceso de síntesis electroquímica discutido en el capítulo 3, el electrolito disuelve al silicio formando poros en el cristal de silicio de dos tamaños distintos, los nanométricos a partir de los cuales se forman las nanopartículas y los mesoporos a partir de los cuales se forma el silicio poroso coloidal (SPC). El SPC se separa de las nanopartículas mediante filtración con un tamaño de poro de 100 nm. El SPC separado forma suspensiones poco estables de aspecto anaranjado aglomerándose y precipitando en pocos minutos.

6.2. Morfología y Tamaño del Silicio Poroso Coloidal

Se obtuvieron micrografías TEM del SPC retenido en el filtro de 100 nm en las que se observan pedazos de silicio con superficie de forma irregular. La Figura 71 muestra imágenes representativas del SPC. Debido a la pobre estadística de número de partículas de que se disponía, la distribución de tamaños de determinó por la técnica de *Dispersión Dinámica de Luz*.

Figura 71: Micrografías TEM de SPC.

El radio hidrodinámico medio se obtuvo mediante la técnica de Dispersión Dinámica de Luz para la que se ajustó la función de autocorrelación temporal utilizando tres tipos de ajustes: exponencial, por cumulantes de segundo orden y por cumulantes de tercer orden [Cao 2003]. El ajuste mediante una exponencial corresponde a un tiempo de relajación proporcional al tamaño medio de una partícula Browniana y se obtiene el radio hidrodinámico. Utilizando el método de cumulantes se tiene en cuenta la polidispersidad y se obtiene una distribución de tamaños. Los resultados de cada ajuste se muestran en la Tabla 22, la distribución de tamaños a partir del ajuste de cumulantes de tercer orden se representa en la Figura 72.

Tabla 22: Distribución de tamaños del SPC obtenidas por dispersión dinámica de luz ajustando los resultados a una exponencial, a cumulantes de segundo orden y a cumulantes de tercer orden.

Tipo de Ajuste	R_h (nm)	Ampl. (nm)
Exponencial	203	-
Cum. 2 ^{do} orden	187	85
Cum. 3 ^{er} orden	189	71

Figura 72: Distribución de tamaño de partículas obtenido mediante el método de cumulantes de tercer orden.

6.3. Estudios de Luminiscencia

6.3.1. Fosforescencia Estacionaria

Evolución en el Tiempo

El SPC muestra una variación en intensidad y posición del espectro de emisión desde el momento que es sintetizado hasta unos meses después donde la emisión disminuye considerablemente. Las muestras se mantienen suspendidas en atmosfera inerte de argón y a diferencia de las nanopartículas de silicio, las muestras de SPC no se sometieron a ningún tratamiento de añejamiento.

La evolución del espectro de emisión del SPC en tolueno cuando se excita a 300 nm (máximo del espectro de excitación) se muestra en la Figura 73. Se observa claramente como la emisión aumenta alrededor de un 100% de forma prácticamente lineal durante los primeros seis días, transcurrido este tiempo mantiene la máxima emisión durante unos 10 días aproximadamente y luego empieza a perder intensidad hasta alcanzar una emisión casi despreciable sobre los 80 días. A su vez, el pico de emisión se va desplazando hacia el UV. Para evaluar este efecto se representan los espectros con las intensidades normalizadas, observándose como el máximo del espectro se desplaza desde los 660 nm hasta los 560 nm donde se estabiliza hasta que desaparece la emisión en el tiempo.

La Figura 74 muestra la variación del SPC en suspensión de cloroformo con el tiempo por un periodo de 42 días y en el gráfico interior se muestran los espectros con la intensidad normalizada. El patrón de comportamiento seguido por la intensidad y la posición del espectro es prácticamente idéntica con la única salvedad que todo el ciclo desde la síntesis hasta la desaparición de la emisión ocurre en 42 días, la mitad de tiempo que en tolueno. Esta variación se puede atribuir a la oxidación de la superficie según se describe en la literatura [Koropecki 2004].

Figura 73: Espectro de emisión de SPC en suspensión de tolueno.

Figura 74: Espectro de emisión de SPC en suspensión de cloroformo.

Espectro de Excitación - Emisión

La luminiscencia observada en el rojo para el SPC no muestra resolución vibracional. Debido a que la emisión del SPC cambia con el tiempo, los espectros que se muestran son los obtenidos en el periodo en que el SPC presenta su máxima emisión.

La Figura 75 muestra la matriz de excitación - emisión para el SPC en suspensión de tolueno (izquierda) y agua (derecha). Se observa como el corrimiento de Stokes es mucho mayor que en las nanopartículas ya que el espectro de excitación se encuentra entre 260 y 380 nm con el máximo en 300 nm y la emisión se presenta sobre los 600 nm. Este gran corrimiento es típico de transiciones indirectas donde se sugiere la participación de los fonones para que tenga lugar la transición desde la banda de conducción a la banda de valencia (ver capítulo 1).

La matriz de excitación - emisión para el SPC en suspensión acuosa muestra como la intensidad disminuye hasta un 20 % y el espectro de excitación se desplaza unos 30 nm hacia el UV respecto al espectro en tolueno. Este comportamiento se correlaciona con el que presentan las nanopartículas en suspensión acuosa como se mostró en el capítulo 4.

Figura 75: Matrices de excitación - emisión de SPC en suspensión de tolueno (izquierda) y en suspensión acuosa (derecha).

6.3.2. Fosforescencia Resuelta en el Tiempo

Se realizaron ensayos de fosforescencia resuelta en el tiempo para SPC en suspensión de tolueno en el dominio de tiempos. Se excitó con un LED a 470 nm de ancho de pulso de 2 nanosegundos y obtenido en una ventana de tiempo adecuada en el microsegundo. Se realizó un barrido en todo el espectro de emisión observándose que los tiempos de vida medios de la fosforescencia dependen de la longitud de onda de emisión como se informa en la literatura [Tsybeskov 1994].

La Figura 76 muestra una matriz normalizada donde se representa para cada longitud de onda el decaimiento de la emisión. Esta matriz se ha realizado midiendo los decaimientos desde 450 nm a 640 nm cada 5 nm. Todas las longitudes de onda se pudieron ajustar a un decaimiento mono-exponencial con un chi-cuadrado entre 1,00 y 1,04. Los tiempos de vida medio crecen linealmente con la longitud de onda de emisión y el tiempo de vida medio (grafico interior), observándose como este varía de 0,6 μ s a 450 nm hasta los 8,0 μ s en 640 nm.

La dependencia de la longitud de onda de emisión con el ancho de las paredes de los canales del sílicio poroso se encuentra bien documentado en la literatura [Cullis 1997, Garcia 2003]. Según lo esperado por la teoría del confinamiento cuántico, las paredes más delgadas emiten hacia el UV (cerca de 450 nm), y las paredes más gruesas emiten hacia el IR. Este mismo comportamiento permite explicar la dependencia de tiempo de vida media de los estados emisores con la longitud de onda de emisión donde las paredes más angostas presentan decaimientos de emisión más rápidos. Según la teoría del confinamiento cuántico, paredes de los poros más gruesas presentan transiciones menos probables ya que la diferencia del vector k en el *band gap* aumenta con el tamaño.

Figura 76: Emisión del SPC resuelta en el tiempo en el intervalo de longitudes de onda de 450 a 650 nm.

6.4. Generación de Oxígeno Singulete

Se describe en la literatura como el silicio poroso es capaz de comportarse como fotosensibilizador de oxígeno singulete [Timoshenko 2009a].

Se determinó la generación de oxígeno singulete utilizando el método con irradiación continua (ver capítulo 2, punto 0). La Figura 77 muestra el consumo de O_2 donde se representa $\ln(C_0/C)$ frente al tiempo de irradiación. Se observa consumo de oxígeno en el tiempo cuando solamente se encuentra en el reactor la suspensión el SPC (línea negra). Al añadir alcohol furfurílico (puntos rojos) el consumo de oxígeno aumenta. Al añadirse azida sódica (puntos azules) se inhibe el consumo de oxígeno singulete y no se registra ningún consumo de oxígeno tal como también se observó para suspensiones de nanopartículas. Este comportamiento indica que el SPC se oxida por la acción de la luz UV-Visible en una reacción que involucra al oxígeno en su estado fundamental.

Figura 77: Consumo de O_2 en función del tiempo de irradiación para suspensiones acuosas saturadas en aire de SPC (negro); suspensiones de SPC + FA (rojo) y suspensiones de SPC + FA + N_3^- (azul).

6.5. Conclusiones

Mediante micrografías TEM y estudios de dispersión dinámica de luz se determinó que las partículas de SPC tenían un tamaño de 190 ± 70 nm y son esféricas. El SPC tiene una gran cantidad de túneles, irregularidades e intersticios que son los responsables de la emisión, ya que partículas de tamaños en el orden de los cientos de nanómetros no tienen la capacidad de emitir en el visible.

Se determinaron los espectros de emisión y excitación en suspensiones de tolueno y agua a temperatura ambiente, observándose al igual que para las nanopartículas, que existe una disminución de la emisión en agua. Se realizaron observaciones de variación del tiempo de vida en función de la longitud de onda de emisión. Los resultados indican que el espectro de emisión obtenido está generado por la contribución de varios tamaños en los intersticios de los poros y que cada uno de estos tamaños presenta un *band gap* distinto.

Se demostró la capacidad del silicio poroso coloidal de generar oxígeno singlete en suspensiones acuosas cuando se irradia con luz UV.

Capítulo 7:

Estudios Teóricos de las Nanopartículas de Silicio

7.1. Introducción

Los estudios de modelado teóricos son una herramienta imprescindible para la completa comprensión de los fenómenos que tienen lugar en sistemas complejos. Existen numerosos estudios en la literatura sobre el modelado de nanopartículas de silicio de distintas características cuyo objetivo de determinar la influencia de parámetros como el tamaño de las nanopartículas y la cobertura superficial. Para ello se emplearon distintos métodos como TD-DFTB, TD-DFT/B3LYP, Δ SCF/QMC, TD-DFT/BP, TD-DFT/B3LYP, MR-MP2, GGA-PBE [Wang 2007].

Se obtienen resultados muy variables en función del procedimiento utilizado para el cálculo, de la misma forma que sucede con la inconsistencia de los resultados experimentales para nanopartículas obtenidas por distintas rutas de síntesis. El efecto de las condiciones de preparación sobre las propiedades ópticas y estructurales se investigaron mediante métodos DFTB y FPMD, demostrando como la síntesis a altas temperaturas pueden producir nanopartículas metaestables con diferentes estructuras a las cristalinas generadas por métodos *top-down* [Draeger 2004].

Todos los estudios teóricos están de acuerdo de forma cualitativa (ya que se obtienen distintos valores de *band gap*) en que a medida que disminuye el tamaño aumenta la energía de transición HOMO-LUMO debido al confinamiento cuántico. Esto genera procesos no asistidos por fonones y por tanto mucho más rápidos [Kovalev 1998, Sieck 2000]. El recubrimiento superficial también se estudió realizando simulaciones de Montecarlo. Se ha demostrado que el confinamiento cuántico del corazón de las nanopartículas es solamente uno de los mecanismos responsables de la emisión, ya que los recubrimientos de las superficies se tienen que tener en cuenta para explicar las propiedades de estos sistemas. Estudios llevados a cabo para nanopartículas recubiertas con hidrógeno hasta 1,8 nm y sustituyendo uno de estos átomos por H, F, Cl, OH, O, S o CH₂ muestran cambios en la diferencia de energía entre el LUMO y el HOMO [Puzder 2002].

Los estudios realizados en este trabajo se centran en modelar las geometrías de partículas con el mismo número de átomos mediante dos procedimientos distintos que involucran la generación de las nanopartículas de dos puntos de partida de la geometría dependiendo del método de síntesis. El objetivo de estos estudios es el de mostrar las diferencias obtenidas cuando

se siguen distintas rutas de obtención. A los agregados de silicio conformados se les determina su estabilidad energética para estados de multiplicidad electrónica singulete y triplete. Estos compuestos presentan la superficie con enlaces de silicio insaturados que no sería posible en la realidad excepto en condiciones de alto vacío, pero los resultados de estabilidad de las partículas obtenidos son representativos para el estudio de la variación de la estabilidad en función del tamaño. Posteriormente, se recubren las nanopartículas totalmente con átomos de hidrógeno, oxígeno, carbono y nitrógeno; determinándose como afecta este recubrimiento a la estabilidad de la partícula, a su geometría, a los espectros electrónicos y espectros vibracionales comparando estos resultados con los obtenidos experimentalmente.

7.2. Determinación de Geometrías

7.2.1. Aproximación a la Síntesis “Bottom-Up”

Se realizó una aproximación del crecimiento de nanopartículas sintetizadas a partir de métodos “*bottom-up*”. Se obtuvieron los resultados de partículas de tres átomos hasta un tamaño de 40 átomos de silicio. La simulación se llevó a cabo añadiendo átomo a átomo y optimizando entre cada adición la geometría espacial para simular la generación de nanopartículas a partir de síntesis químicas en las cuales se parte de un precursor tipo SiCl_4 , se van adicionando átomos de silicio a la partícula hasta obtener las nanopartículas [Rosso-Vasic 2008a].

El procedimiento de crecimiento de una nanopartícula con n átomos de silicio se describe a continuación. Se utiliza como partícula de partida la geometría obtenida en el caso $\text{Si}(n-1)$. Sobre esta geometría se crea una superficie esférica a una distancia de 2,6 Å de los átomos de silicio más externos. Desplazándonos en las posiciones angulares θ y φ , se crean 100 puntos diferentes a partir de los cuales empezar el cálculo de optimización suponiendo que el átomo en las rutas de síntesis experimental se agrega en ese punto. Se optimizan las geometrías de los 100 posibles casos y se elige el compuesto con menor energía, es decir, el más estable como partícula $\text{Si}(n)$. Tomando esta como punto de partida, se sigue el mismo procedimiento para generar la partícula $\text{Si}(n+1)$.

La Figura 78 muestra una representación de la geometría para distintos tamaños de nanopartículas obtenidas por el método de crecimiento. Se estudiaron los agregados desde 2 hasta 40 átomos de silicio y se observa como a medida que aumenta el número de átomos las partículas van perdiendo la esfericidad para formar agregados en forma alargada.

Figura 78: Geometrías de nanopartículas de silicio de distintos tamaños obtenidas simulando el método de síntesis bottom-up.

La Figura 79 representa la energía por átomo de las distintas nanopartículas, la cual nos da una idea de su estabilidad. Vemos como se muestra una tendencia a formar agregados más estables a medida que aumenta el número de átomos. Hasta los 15 átomos el aumento de estabilidad es muy pronunciado y a partir de este sigue disminuyendo la energía con algunos mínimos locales de forma más suave. Solamente, a partir del átomo 35 se registra un aumento de la energía que se puede interpretar como que al ser partículas tan alargadas empiezan a perder estabilidad relativa. Esta energía tiende hacia la energía de las partículas obtenidas a partir de configuraciones cristalinas como se verá a continuación. Los valores numéricos se muestran en la Tabla 23.

Figura 79: Variación de la estabilidad de las nanopartículas generadas mediante el método “bottom-up” en función del número de átomos para estados singletes (línea negra) y tripletes (línea roja).

Tabla 23: Datos de la estabilidad de las nanopartículas en función del número de átomos para estados singletes y tripletes

Si (n)	E _{Singlete} (Eh/átomo)	E _{Triplete} (Eh/átomo)	Si (n)	E _{Singlete} (Eh/átomo)	E _{Triplete} (Eh/átomo)
4	-0,124	-0,116	23	-0,158	-0,157
5	-0,136	-0,131	24	-0,159	-0,158
6	-0,144	-0,140	25	-0,158	-0,158
7	-0,144	-0,144	26	-0,158	-0,157
8	-0,148	-0,146	27	-0,158	-0,157
9	-0,151	-0,148	28	-0,158	-0,157
10	-0,146	-0,152	29	-0,159	-0,158
11	-0,154	-0,151	30	-0,159	-0,159
12	-0,154	-0,151	31	-0,159	-0,158
13	-0,154	-0,152	32	-0,159	-0,159
14	-0,157	-0,155	33	-0,159	-0,159
15	-0,156	-0,154	34	-0,159	-0,159
16	-0,157	-0,156	35	-0,158	-0,157
17	-0,158	-0,156	36	-0,157	-0,157
18	-0,157	-0,156	37	-0,156	-0,155
19	-0,157	-0,156	38	-0,155	-0,155
20	-0,157	-0,156	39	-0,156	-0,156
21	-0,157	-0,157	40	-0,152	-0,152

7.2.2. Aproximación a la Síntesis “Top-Down”

La simulación de las geometrías obtenidas a partir de procesos de síntesis “*top-down*” se realiza partiendo de un número de átomos definido generados por un programa desarrollado en el grupo de Química Teórica del CEQUINOR que permite crear porciones de sólidos cristalinos en los tres tipos de redes cúbicas.

A tal efecto, se construyeron agregados de diferente tamaño basados en una estructura cúbica centrada en las caras con dos átomos por punto de red. Estos trozos de red cristalina nanométricos se pueden considerar representativos de la nanopartículas en el instante que es arrancada del cristal de silicio mediante el ataque electroquímico con el ácido fluorhídrico. A partir de esta geometría inicial se han realizado las optimizaciones de geometrías desde partículas de 5 hasta 240 átomos de silicio. Con este tipo de nanopartículas se realizan el resto de estudios, ya que corresponden al modelo de síntesis utilizado para las nanopartículas estudiadas en este trabajo de tesis.

La Figura 80 muestra los resultados de algunas de las geometrías obtenidas partiendo de una red cristalina de silicio. Vemos como, a diferencia de las síntesis “*bottom-up*”, tienden a crear partículas esféricas y conservar parte de la estructura cristalina original. En las partículas de mayor tamaño se observa como los átomos centrales no cambian su posición respecto a la red cristalina de partida y solo se reorganizan los átomos más superficiales.

En la Figura 81 muestra la energía por átomo de las nanopartículas, observándose una estabilización de las nanopartículas a medida que aumenta el número de átomos que conforman la nanopartícula. La energía de las partículas con multiplicidad electrónica 1 se representa en rojo y en negro las de multiplicidad 3. El gráfico interno muestra una visión general de la tendencia desde la energía de la nanopartícula formada con 5 átomos. Debido al tamaño de los agregados, no se observan diferencias apreciables entre las configuraciones singulete y triplete y excepto entre las partículas Si_{71} y Si_{99} , las diferencias se encuentran dentro del error de cálculo. Los valores numéricos de las energías se muestran en la Tabla 24, siendo la primera columna el número de silicios que forman las nanopartículas y las siguientes la energía por átomo.

Figura 80: Geometrías de nanopartículas de silicio de distintos tamaños obtenidas simulando el método de síntesis top-down.

Figura 81: Variación de la estabilidad de las nanopartículas generadas mediante método "top-down" en función del número de átomos para estados singletes (puntos rojos) y tripletes (puntos negros). Gráfico interno: tendencia desde el silicio con 5 átomos.

Tabla 24: Datos de la variación de la estabilidad de las nanopartículas generadas mediante método "top-down" en función del número de átomos para estados singletes y tripletes.

Si (n)	E_{Singlete} (Eh/átomo)	E_{Triplete} (Eh/átomo)	Si (n)	E_{Singlete} (Eh/átomo)	E_{Triplete} (Eh/átomo)
5	-0,081	-0,079	141	-0,156	-0,156
17	-0,135	-0,137	153	-0,157	-0,157
29	-0,149	-0,149	161	-0,154	-0,154
35	-0,140	-0,140	185	-0,158	-0,158
47	-0,140	-0,140	209	-0,158	-0,158
71	-0,147	-0,151	221	-0,161	-0,160
87	-0,144	-0,147	227	-0,160	-0,160
99	-0,150	-0,151	236	-0,160	-0,160
123	-0,154	-0,154	240	-0,159	-0,159

7.3. Modificación Superficial

7.3.1. Recubrimientos Realizados

Una vez obtenidas las configuraciones geométricas más estables de las nanopartículas se ha procedido a modificar su superficie mediante la adición de distintos átomos con el fin de emular los recubrimientos realizados experimentalmente y comprobar cómo afectan estos a las propiedades ópticas de las partículas.

Los átomos añadidos fueron hidrógeno debido a que es el primer recubrimiento que estas tienen una vez sintetizadas. Posteriormente, se sustituyeron los hidrógenos por oxígenos. Asimismo, también se realizaron cálculos con recubrimientos de carbonos y de nitrógenos como aproximación a las nanopartículas modificadas con metacrilato de metilo y aminas.

Se realiza una aproximación considerando que la máxima influencia sobre las bandas del silicio las tiene el átomo más cercano en la superficie y es despreciable la contribución de los átomos más alejados del recubrimiento. Esto nos permite evitar cálculos de moléculas recubiertas con cadenas largas. En todos estos casos se calcula mediante DFTB la configuración geométrica más estable y la energía de las partículas considerando solamente estados singuletes. Los átomos representados en los dibujos de las geometrías siguen el mismo código de colores para todo el capítulo.

- Silicio → Amarillo

- Oxígeno → Rojo

- Hidrógeno → Negro

- Carbono → Cian

- Nitrógeno → Azul Oscuro

7.3.2. Recubrimiento con Hidrógeno

Se simularon las partículas recubriéndolas con átomos de hidrógeno, el criterio que se siguió fue sustituir cada enlace libre de silicio por un átomo. La Figura 82, muestra la geometría de las partículas para distintos tamaños y vemos como la adición de hidrógeno apenas afecta la geometría de las partículas sin recubrimiento que se muestran en la Figura 80.

Figura 82: Geometrías de nanopartículas de silicio recubiertas con hidrógeno de distintos tamaños obtenidas simulando el método de síntesis top-down.

Figura 83: Estabilidad de nanopartículas de silicio recubiertas con hidrógeno de distintos tamaños obtenidas simulando el método de síntesis top-down.

En la Figura 83 se compara la estabilidad de las partículas sin recubrir y las partículas con una monocapa de hidrógeno en función de su tamaño para partículas en estado singulete. Se observa claramente como la línea negra correspondiente al recubrimiento aparece en energías mayores y por tanto se puede concluir que la capa de hidrógeno resta estabilidad a las nanopartículas.

7.3.3. Recubrimiento con Oxígeno

El segundo elemento del que se ha estudiado el efecto de recubrir las nanopartículas es el oxígeno. Experimentalmente se observa una rápida oxidación de la superficie de las partículas cuando se encuentran en presencia de oxígeno, por lo que el efecto de este elemento es de gran importancia.

El oxígeno ejerce un mayor efecto sobre la conformación estructural de la partícula, las estructuras están distorsionadas respecto a las obtenidas con recubrimientos de hidrógeno. Esta distorsión puede ser debida a la repulsión electroestática entre los oxígenos y disminuye la simetría de las partículas. Este efecto se observa al comparar la Figura 84 en donde se muestran las geometrías de las nanopartículas con oxígeno con la Figura 80.

Figura 84: Geometrías de nanopartículas de silicio recubiertas con oxígeno de distintos tamaños obtenidas simulando el método de síntesis top-down.

Además, es importante señalar que los oxígenos que inicialmente se encontraban distribuidos uniformemente, muestran una tendencia a agruparse y a unirse a átomos de silicio que ya poseían una unión oxígeno. Esto genera que algunos silicios no presenten enlaces con el oxígeno mientras que otros muestran más de uno.

Figura 85: Estabilidad de nanopartículas de silicio recubiertas con oxígeno de distintos tamaños obtenidas simulando el método de síntesis top-down.

En la Figura 85, se compara la estabilidad de las partículas oxidadas frente a las partículas sin recubrir. Se observa claramente, como la oxidación tiene un efecto de estabilización de las nanopartículas. Este efecto, es mucho más marcado si comparamos las partículas recubiertas con oxígeno con las recubiertas con hidrógeno, estando totalmente de acuerdo con los datos experimentales y la tendencia de estas a oxidarse rápidamente.

7.3.4. Recubrimiento con Carbono

El recubrimiento con átomos de carbono se realiza como aproximación al recubrimiento experimental con metacrilato de metilo. Se considera que solamente los elementos de la primera capa enlazados tienen una influencia importante sobre la configuración de la partícula de silicio. Hay que tener en cuenta que es una aproximación que nos permite evitar la modelización de nanopartículas recubiertas con 60 metacrilatos de metilo para el caso de 60 silicios, es decir más de 1000 átomos, lo cual es un cálculo que excede los límites de este trabajo.

La Figura 86, muestra las geometrías más estables para los distintos tamaños de nanopartículas cuando se recubren con carbono. Comparando la geometría con los recubrimientos anteriores (H y O) se observa un comportamiento intermedio entre el recubrimiento de hidrógeno que apenas alteraba la geometría de las nanopartículas sin recubrir y el comportamiento del oxígeno que tenía una gran influencia sobre las mismas, con tendencia a agruparse entre sí. Posiblemente, la similitud entre carbono y silicio hace que se comporte en cierta medida como una extensión de la red inicial, no mostrando efectos marcados.

Figura 86: Geometría de nanopartículas de silicio recubiertas con carbono de distintos tamaños obtenidas simulando el método de síntesis top-down.

El recubrimiento de carbono estabiliza las partículas, un comportamiento similar al encontrado para el recubrimiento con oxígeno, haciéndolas mucho más estables que las partículas hidrogenadas. En la Figura 87, se muestra la comparación entre las partículas sin recubrir (línea negra) y las recubiertas con carbonos (línea verde). La tendencia que muestran apunta a que estabilizan las partículas aunque estas parecen ser más afines por el oxígeno.

Figura 87: Estabilidad de nanopartículas de silicio recubiertas con oxígeno de distintos tamaños obtenidas simulando el método de síntesis top-down.

7.3.5. Recubrimiento con Nitrógeno

Se muestran las geometrías optimizadas de las nanopartículas en la Figura 88 y se observa como la estabilidad de la nanopartícula es máxima respecto a las partículas sin recubrir y al resto de los recubrimientos estudiados. Por otra parte, el efecto de los átomos de nitrógeno en la superficie es muy notable sobre las geometrías de las partículas, modificando su configuración y situándose no solo en la superficie, sino también en intersticios de las partículas de mayor tamaño.

La estabilidad de estos compuestos se representa en la Figura 89, donde se comparan las partículas sin recubrir con las recubiertas con nitrógeno. Estas partículas son las de menor energía por átomo de todas las estudiadas, sugiriendo que los recubrimientos con aminas pueden formar un recubrimiento muy estable y adecuado para modificar este tipo de nanopartículas.

Figura 88: Geometría de nanopartículas de silicio recubiertas con nitrógeno de distintos tamaños obtenidas simulando el método de síntesis top-down.

Figura 89: Estabilidad de nanopartículas de silicio recubiertas con nitrógeno de distintos tamaños obtenidas simulando el método de síntesis top-down.

7.4. Espectros Electrónicos UV-Visible

Se calculan las transiciones electrónicas entre los distintos niveles energéticos de las partículas y se obtiene la probabilidad de dichas transiciones. Para poder simular un espectro electrónico comparable a los que se observan en régimen experimental, se dibujan distribuciones de gauss tomando como media la energía, la probabilidad determina la intensidad y se asigna una dispersión de 0,25 eV. Este valor de dispersión se determinó comparando el ancho de pico de las partículas Si_{35} con el espectro experimental y modificando la varianza de las distribuciones hasta obtener una buena superposición de picos.

7.4.1. Influencia del Tamaño de la Nanopartícula

La Figura 90 muestra los espectros electrónicos normalizados por la intensidad total de emisión de cuatro tamaños diferentes de nanopartículas: 17, 29, 35 y 47 átomos. Se observa como de forma general a medida que va aumentando la cantidad de átomos que conforman la partícula, el espectro se va desplazando desde el UV hacia el IR.

Figura 90: Espectros de emisión UV-Visible de nanopartículas en función de su tamaño.

El espectro de las nanopartículas de 17 átomos de silicio tiene un máximo con tres hombros entre 200 y 400, a partir de esta cantidad de onda la emisión desciende hasta los 900 nm mostrando dos pequeñas bandas a 500 y 750 nm. Al añadir una capa nueva capa de silicios (Si_{29}) el espectro se divide en dos picos bien diferenciados, el más intenso sigue posicionado entre los 200 y 400 nm y otra nueva banda aparece con un máximo sobre los 750 nm. La adición de la siguiente capa de silicios (Si_{35}) siguen mostrando dos picos pero se observa cómo están prácticamente juntos, uno sobre los 320 nm y el segundo sobre los 450 nm. La siguiente capa añadida (Si_{47}) muestra ya un espectro con un solo pico muy ancho con distribución no gaussiana con un máximo sobre los 440 nm pero con una emisión importante que llega hasta los 900 nm.

7.4.2. Influencia del Recubrimiento Superficial

El cambio en el *band gap* de las nanopartículas del mismo tamaño debido a los diferentes recubrimientos superficiales está ampliamente descrito en la literatura por estudios teóricos que consideran nanopartículas pasivadas con O y H de tamaños menores de 1,2 nm [Puzder 2003] y experimentalmente con nanopartículas de 1 nm que muestran importantes diferencias en los espectros de emisión dependiendo de su recubrimiento con alcanos o aminas [Rosso-Vasic 2008a]. Sin embargo, existe una gran controversia entre los resultados obtenidos. Estudios de DFTB determinaron dependencia del corrimiento de Stokes con el tamaño que decrece a partir de 1,0 eV en silicio poroso [Von Behren 2000] y para nanopartículas desde Si_5 hasta Si_{35} pasivadas con hidrógeno donde existe un corrimiento máximo de 4,4 eV y a partir de ahí decrece a medida que aumenta el tamaño hasta 1,48 eV [Lopez del Puerto 2010]. Se han encontrado resultados experimentales concordantes en estudios con silicio poroso mostrando un corrimiento de Stokes de 1,1 eV sobre la excitación a 3,1 eV [Wu 2000].

Recubrimiento de Oxígeno a Distintos Tamaños

Se estudió la influencia del recubrimiento de las nanopartículas formadas por 35 silicios (1,2 nm) cuando estas se recubren con oxígenos de forma parcial, saturando la mitad de los enlaces superficiales libres (semi-oxidada), y cuando se recubre completamente (oxidada). Se utilizó como comparación el espectro obtenido para las nanopartículas de 35 silicios recubiertas con

hidrógeno, ya que este recubrimiento es el que supuestamente se obtiene durante los primeros pasos de síntesis.

La *Figura 91* muestra los tres espectros normalizados en los que se observa un claro corrimiento hacia el infrarrojo a medida que aumenta la oxidación. Las partículas oxidadas muestran un corrimiento del pico de emisión de 0,27 eV hacia el IR respecto a la posición del pico de $\text{Si}_{35}\text{H}_{18}$ (4,11 eV). Al oxidar completamente la superficie ($\text{Si}_{35}\text{O}_{18}$) se produce un corrimiento de 0,39 eV hacia el IR.

Figura 91: Espectros de emisión UV-Visible de nanopartículas Si35 en función del grado de oxidación superficial.

La oxidación sobre la superficie de la partícula muestra efectos en la forma del espectro. La partícula de Si_{35}O_8 muestra una modificación en el espectro, desaparecen los pequeños picos que aparecían en el espectro de $\text{Si}_{35}\text{H}_{18}$ y aparece una única banda con máximo en 3,9 eV. Cuando la partícula se recubre completamente aparecen cambios más relevantes, mostrando un pico importante y angosto a 334 nm (3,7 eV) y otros dos picos a 510 nm (2,4 eV) y 730 nm (1,7 eV). Estos picos podrían estar relacionados con el tipo de enlace Si-O, ya que en la literatura se describe como para partículas de 1,1 nm, cuando un oxígeno entra en la red superficial ($\text{Si}_{35}\text{H}_{34}\text{O}$) cambia

significativamente el *band gap* dependiendo de si forma enlaces simples Si-O-Si con un *band gap* de 3,1 eV o enlaces dobles Si=O 2,2 eV [Puzder 2003]. No existen estudios de esta naturaleza para superficies totalmente recubiertas con oxígeno, pero es consistente atribuir la naturaleza de los picos a distintos tipos de enlace Si-O en la superficie, ya que al observar el compuesto se distinguen enlaces Si=O y Si-O-Si.

Recubrimiento de Oxígeno, Hidrógeno, Carbono y Nitrógeno en nanopartículas de 1,2 nm

La determinación de la influencia de los distintos recubrimientos superficiales sobre el espectro UV-Visible se realizó usando las nanopartículas de 35 silicios (1,2 nm) con sus enlaces saturados completamente (18 enlaces) con oxígeno, hidrógeno, carbono o nitrógeno. Estas nanopartículas fueron optimizadas previamente como se muestra en la sección 7.3 de este capítulo.

La Figura 92 muestra los espectros normalizados obtenidos para los cuatro compuestos. Se observa como las nanopartículas recubiertas con hidrógeno muestran el espectro mas hacia el UV desplazándose hacia el visible con la adición de oxígeno como se ha discutido en el punto anterior. La pasivación con carbonos muestra un corrimiento del espectro hacia el IR de 1 eV respecto de Si₃₅H₁₈. Distintos resultados experimentales publicados para nanopartículas de Si₂₉ donde el cambio del recubrimiento de hidrógeno por alcanos de distinta longitud de cadena muestra cambios mínimos en el valor del *band gap* manteniéndose alrededor de los 2,5 eV [Reboredo 2005]. Por el contrario los resultados obtenidos en nuestros cálculos (ver Figura 92) son consistentes con los estudios experimentales publicados para nanopartículas de 1 nm, las cuales cambian el máximo de emisión dependiendo de la longitud de la cadena alquílica [Rosso-Vasic 2008a]. Experimentos realizados con nanopartículas de 1 nm modificadas con -COOH muestran un pequeño corrimiento de la banda de emisión hacia el IR de 0,2 eV [Rogozhina 2006]. Corrimientos de picos de emisión de 0,23 eV se publicaron para partículas sintetizadas por ablación laser de 5 nm recubiertas con octano [Li 2004a].

El recubrimiento con nitrógeno (Si₃₅H₁₈) exhibe el mayor corrimiento del pico de emisión hacia el IR respecto del pico de Si₃₅H₁₈, con una diferencia de energía entre ambos máximos de ~1,6 eV. Estos resultados son comparables a los obtenidos mediante DFT para nanopartículas Si₃₅H₃₆ recubiertas en su superficie totalmente con grupos amino (Si₃₅(NH₂)₃₆). La diferencia de *band gap* entre ambas es de 1,9 eV [Martínez 2010]. Estudios experimentales con

nanopartículas de 1 nm sintetizadas electroquímicamente demuestran como al eliminar la capa de óxido superficial y derivatizarlas con butilamina el máximo del pico de emisión se corre alrededor de 0,6 eV [Rogozhina 2001], observándose en nuestros cálculos una diferencia de 1,2 eV entre el *band gap* de $\text{Si}_{35}\text{O}_{18}$ y $\text{Si}_{35}\text{N}_{18}$.

Figura 92: Espectros de emisión UV-Visible de nanopartículas Si_{35} en función del recubrimiento superficial con hidrógeno, oxígeno, carbono o nitrógeno.

Efecto de Enlaces Libres en Silicios Superficiales

Tal como se dijo anteriormente (ver capítulo 4), en la literatura se postula que la existencia de defectos en la superficie de las partículas influye en su emisión. Se calcularon los espectros de emisión para nanopartículas Si_{35} con los enlaces superficiales libres y pasivados con hidrógenos. La Figura 93 compara los espectros UV-Visible obtenidos observándose como la presencia de insaturaciones en la superficie afecta al espectro tanto en la posición como en la forma. El máximo de emisión se desplaza desde 4,1 eV para las partículas pasivadas hasta los 2,9 eV para las partículas con defectos superficiales.

Esta importante variación del *band gap* pone de manifiesto la importancia de los defectos superficiales en la emisión de las nanopartículas y está de acuerdo con los resultados experimentales obtenidos para las partículas estudiadas en este trabajo, apoyando la teoría de que no presentan defectos superficiales como se vio en los experimentos de EPR. Además, las observaciones que la posición ni la forma del espectro de emisión no cambian en el tiempo sugiere que en ningún momento las nanopartículas presentan enlaces insaturados, ya que de lo contrario, al reaccionar se observaría una variación en el espectro.

Figura 93: Espectros de emisión UV-Visible de nanopartículas Si_{35} cuando la superficie esta pasivada con hidrógeno o enlaces de silicio insaturados.

7.5. Espectro Vibracional

Se calcularon las bandas de absorción IR en el intervalo de 400 cm^{-1} y 4000 cm^{-1} de las nanopartículas de 5, 17, 29, 35 y 71 átomos de silicio sin recubrimiento superficial y las nanopartículas totalmente recubiertas con hidrógeno, oxígeno, carbono. Estos resultados se compararon para los distintos tamaños de partícula viéndose como en tamaños nanométricos se

presentan diferencias importantes en los espectros obtenidos para compuestos con los mismos enlaces. Con las nanopartículas de mayor tamaño, y por tanto las más similares a las nanopartículas utilizadas experimentalmente, se comparó la posición donde aparece cada banda teórica y las asignadas experimentalmente en el capítulo 3.

Los resultados de las bandas de las nanopartículas compuestas solamente por silicio y sin ningún átomo en la superficie no se puede comparar con ningún compuesto experimental ya que no es posible obtener estos compuestos en nuestras condiciones experimentales, sin embargo se utilizaron para asignar las bandas que corresponden a los enlaces Si-Si y no confundirlas con las bandas que aparecen cuando se recubren las partículas.

Se observa que a medida que aumentan los tamaños entre nanopartículas formados por 5 átomos de silicio (0,42 nm) y 71 átomos de silicio (1,5 nm) no hay una correlación entre las bandas obtenidas y los enlaces a los cuales se podrían asignar. Una vez que las nanopartículas alcanzan tamaños mayores de 1,20 nm (Si₃₅ y Si₇₁) las bandas se unifican dentro del error de cálculo y son comparables con las bandas experimentales mostradas en el capítulo 3.

7.5.1. **Bandas de Absorción Relacionadas con los Enlaces Si-H**

Las nanopartículas con terminaciones de hidrógeno presentan bandas sobre los $\sim 900\text{ cm}^{-1}$ que pueden ser asignadas a los modos de doblado para el Si-H. Esta banda aparece en los cálculos para las Si₅H₁₇, Si₂₉H₂₄ y Si₇₁H₆₀. Las bandas observadas experimentalmente en las posiciones 2100 - 2200 cm^{-1} atribuidas a modos de estiramiento de Si-H_x aparecen en prácticamente todos los compuestos calculados excepto en el de Si₂₉H₂₄, mostrándose ambas bandas para el compuesto Si₇₁H₆₀.

Tabla 25: Bandas de absorción teóricas relacionadas con el enlace Si-H.

Si ₀₅ H ₁₇ (cm ⁻¹)	Si ₁₇ H ₁₂ (cm ⁻¹)	Si ₂₉ H ₂₄ (cm ⁻¹)	Si ₇₁ H ₆₀ (cm ⁻¹)
847 2140	2222	987	891 2079 - 2222

7.5.2. Bandas de Absorción Relacionadas con el Enlace Si-O

Las nanopartículas con una monocapa de SiO₂ presentan bandas sobre los 830, 1100, 1115 y 1055 cm⁻¹ características de Si-O-Si. Estas bandas no aparecen en los cálculos realizados con nuestros modelos, aunque todos ellos presentan bandas cercanas sobre los 1300 nm pudiendo ser asignadas a bandas desplazadas por efecto del tamaño. Las bandas observadas experimentalmente en las posiciones 3400, 1630 and 800 cm⁻¹ son asignadas a grupos Si-OH y aparecen en todos los compuestos calculados excepto en el de Si₂₉O₂₄, apareciendo ambas bandas para el compuesto Si₇₁O₆₀. Estas vibraciones se asignan a modos vibracionales del silicio, ya que no hay en el modelo enlaces O-H atribuibles a estas vibraciones.

Tabla 26: Bandas de absorción teóricas relacionadas con el enlace Si-O.

Si ₀₅ O ₁₇ (cm ⁻¹)	Si ₁₇ O ₁₂ (cm ⁻¹)	Si ₂₉ O ₂₄ (cm ⁻¹)	Si ₃₅ O ₁₈ (cm ⁻¹)
1371; 1659; 2938; 3471 - 3862	1423; 3536 -3646	3156 - 3995	1448; 3053 -3686

7.5.3. Bandas de Absorción Relacionadas con el Enlace Si-C

Las nanopartículas recubiertas con carbonos presentan bandas sobre los 960 y 1600 cm⁻¹ que son asignadas a modos vibracionales de Si-C=C. La banda a 1260 cm⁻¹ se asigna a deformaciones de Si-CH₂-CH.

La banda a 900 cm⁻¹ aparece en los cálculos para las Si₁₇C₁₂, Si₂₉C₂₄. Por otro lado, la banda a 1600 aparece en todos los compuestos dentro del error de cálculo. La última banda asignada experimentalmente aparece a 1470 cm⁻¹ y es atribuida a las vibraciones de tijera del Si-C, esta banda aparece en los compuestos Si₀₅C₁₇ y Si₂₉C₂₄.

Tabla 27: Bandas de absorción teóricas relacionadas con el enlace Si-C.

Si ₀₅ C ₁₇ (cm ⁻¹)	Si ₁₇ C ₁₂ (cm ⁻¹)	Si ₂₉ C ₂₄ (cm ⁻¹)
1219 - 1563	933 - 1274	969 - 1190 - 1439 - 1645

7.6. Conclusiones

Los estudios teóricos realizados muestran una gran correlación con los datos experimentales, tanto los obtenidos en el trabajo de tesis como los que se encuentran en la literatura de otros autores.

Se demostró la diferencia en la geometría de las partículas según el método de síntesis y por tanto sus diferencias en cuanto al resto de las propiedades. Se encontró la geometría óptima para partículas hasta un tamaño de 2,1 nm de diámetro (240 átomos de silicio) y se recubrieron con una capa de los átomos para determinar cómo afecta la composición superficial sobre las propiedades de las nanopartículas. Se observaron diferencias significativas tanto en la estabilidad (energía por átomo) como en la geometría final de las partículas según el recubrimiento.

Se obtuvieron los espectros electrónicos para transiciones entre estados de energía singulete - singulete y se demostró que, tal como se observa en los desarrollos experimentales, a mayor tamaño de las nanopartículas menor *band gap*. Al recubrir estos espectros con átomos de hidrógeno, carbono y oxígeno los espectros cambian considerablemente poniendo de manifiesto el efecto del recubrimiento sobre las transiciones electrónicas.

Se calcularon las bandas de absorción vibracionales para los compuestos hasta Si₇₁ y se comparan entre sí para ver el efecto del tamaño. Las partículas más grandes, que más se acercan en tamaño con las sintetizadas en el laboratorio, muestran resultados coincidentes con los observados experimentalmente.

Capítulo 8:

**Incorporación y
Citotoxicidad de NP-SiMMA
en Cultivos de Células de
Glioma C6**

8.1. Introducción

Las nanopartículas de silicio se postulan como potenciales marcadores biológicos y/o sensibilizadores en terapias fotodinámicas por presentar propiedades físicas y químicas particulares, las cuales fueron exhaustivamente estudiadas a lo largo de este trabajo. A pesar de las grandes expectativas referentes a los posibles usos de las nanopartículas para el mejoramiento de los diagnósticos médicos u otras aplicaciones en el campo de la salud, se ha de tener en cuenta que las nanopartículas poseen una toxicidad intrínseca que debe de ser evaluada antes de realizar el traslado a pruebas *in vivo* [Murphy 2008].

En general, se conoce que las nanopartículas de semiconductores de los grupos II-VI presentan citotoxicidad y por lo tanto necesitan ser recubiertas (ver capítulo 1, sección 1.3). Paralelamente, diferentes estudios demuestran que las nanopartículas de elementos metálicos también presentan este problema en los organismos vivos. Por ejemplo, las nanopartículas de oro esféricas desnudas resultan ser altamente tóxicas en líneas celulares HeLa, y deben ser recubiertas con polietilenglicol (PEG) con el objeto de reducir este efecto [Niidome 2006]. Ensayos realizados en células PC12 expuestas a concentraciones crecientes de nanopartículas de óxido de hierro (desde 0,15 hasta 15 mM en hierro), evidencian una citotoxicidad dependiente de la dosis, reflejada en una disminución de la viabilidad y en la pérdida de su capacidad para diferenciarse en respuesta al factor de crecimiento nervioso [Pisanic II 2007]. Se ha demostrado que las nanopartículas de plata de tamaños de alrededor de 56 nm administradas por vía oral a ratas F344, durante un periodo de 13 semanas, presentan toxicidad a partir de una dosis de 30 mg/kg [Kim 2010].

En función de dichos antecedentes, resulta de fundamental interés estudiar la toxicidad de las nanopartículas de silicio. Para tal fin, se evaluó la citotoxicidad en células C6 de glioma de rata. Esta línea celular se eligió teniendo en cuenta que entre los tumores sólidos, los gliomas representan una de las estirpes más resistentes a las terapias actuales. Esto puede deberse en parte a la cantidad de alteraciones genéticas, epigenéticas y moleculares que controlan el ciclo celular así como a la exacerbada respuesta protectora frente al estrés oxidativo que presentan estas células y a su bien conocida resistencia a la apoptosis [Franco-Hernandez 2007]. Los pacientes portadores

de este tipo de tumores, tratados según los esquemas estándar (resección seguida de radioterapia) poseen una expectativa de vida de un año desde el momento de su diagnóstico [Florence Lefranc 2006]. Es por ello que se impone realizar nuevas contribuciones que permitan mejorar el diagnóstico y/o tratamiento de este tipo de tumores.

8.2. Citotoxicidad

La incorporación de las nanopartículas en las células es un factor de importancia para evaluar su grado de toxicidad, lo cual es fundamental en el diseño de posteriores aplicaciones. La misma se ve afectada por el tamaño de las nanopartículas, la hidrofobicidad y la naturaleza química de su superficie. En el presente estudio se trabajó con tiempos de incubación para los cuales ya hemos descripto la incorporación de las nanopartículas de silicio a las células C6 [David Gara 2011]. Asimismo, se utilizaron concentraciones que presentan toxicidad para otras nanopartículas de semiconductores del grupo II-VI [Lovrić 2005b] y para nanopartículas de silicio desnudas comerciales [Garabano 2010]. Los métodos empleados para estudiar la viabilidad celular fueron el ensayo cuantitativo de *Rojo Neutro* y el análisis microscópico.

8.2.1. Citotoxicidad de NP-SiMMA en Función del Tiempo de Incubación y la Concentración

Se ha estudiado la citotoxicidad de las NP-SiMMA en las células C6 para distintas concentraciones y tiempos de incubación. Considerando que la incorporación de las nanopartículas a las células es inmediata [David Gara 2011], los tiempos de incubación evaluados fueron 4, 12 y 24 horas. También en base a resultados previos [Garabano 2010], se seleccionaron las concentraciones de NP-SiMMA a estudiar (10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$). Todos los ensayos se llevaron a cabo en forma paralela con los correspondientes controles de células sin nanopartículas, en las mismas condiciones. Las células se sembraron como se describió anteriormente y los tratamientos se dispusieron según se observa en el Esquema 12. Los ensayos se realizaron con 12 réplicas para cada condición.

En la Figura 94 se muestran los valores de la viabilidad celular medida por el ensayo de Rojo Neutro en función de la concentración, para todos los

tiempos de incubación. Se observa que, dentro del error experimental, no existe una disminución en el porcentaje de viabilidad respecto del control, para ninguna de las condiciones estudiadas. Por lo tanto se puede concluir que hasta una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ y 24 horas de incubación, las NP-SiMMA no presentan citotoxicidad en células de glioma C6.

Esquema 12: Distribución de las muestras en la placa multipocillos.

Figura 94: Comparación de la viabilidad de células C6 incubadas durante 4, 12 y 24 horas con NP-SiMMA a distintas concentraciones.

En forma paralela, los cultivos fueron evaluados mediante microscopía de contraste de fase, en las mismas condiciones que en el ensayo anterior. La Figura 95 muestra los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones de nanopartículas a 4 horas de incubación. En ningún caso se observa que la exposición a nanopartículas haya ocasionado una disminución en el número de células. Tampoco se aprecian cambios en la morfología ni

signos de muerte celular. Los mismos resultados se obtuvieron para los tiempos de incubación de 12 y 24 horas, en concordancia con lo observado mediante el ensayo de Rojo Neutro.

Figura 95: Células C6 incubadas durante 4 horas con NP-SiMMA a distintas concentraciones. Magnificación 20x.

8.2.2. Citotoxicidad de NP-SiMMA en función de la Concentración y el Tiempo de Irradiación

Es deseable que para la utilización de estas partículas como sensores ópticos por irradiación infrarroja no se produzcan procesos de generación de radicales que maten a las células. En este sentido, resulta de importancia evaluar el daño que diferentes concentraciones de nanopartículas ejercen sobre la célula en presencia de irradiación IR.

Efecto de la Concentración y el Tiempo de Irradiación

Se realizaron experimentos con el fin de estudiar el efecto de diferentes concentraciones de nanopartículas y distintos tiempos de irradiación bifotónica en el infrarrojo (770 nm) sobre la morfología celular. El sistema utilizado para el estudio no permitía realizar replicas de cada condición ya que hubiera implicado tiempos tan largos que resultan impracticables cuando se trabaja con cultivos celulares.

Las muestras se prepararon siguiendo los protocolos descritos anteriormente. El tiempo de incubación se mantuvo constante en cuatro horas y transcurrido el mismo se irradiaron los pocillos. Una vez finalizada la irradiación, las placas se dejaron en la estufa durante 2 horas para luego realizar el análisis de la morfología celular. La Tabla 28 muestra el número de ensayo que corresponde a cada tiempo de irradiación y concentración de nanopartículas.

Empleando un microscopio laser confocal acoplado a una cámara, se obtuvieron imágenes de las células después del tratamiento. Las mismas se muestran en la Figura 96. La irradiación de las células conteniendo nanopartículas no resultó en una disminución en el número de células ni en cambios morfológicos consistentes con muerte celular, en ninguno de los casos analizados. Por lo tanto no se puede concluir que la irradiación tenga un efecto visible sobre las células para las concentraciones y los tiempos ensayados.

Tabla 28: Tiempos de irradiación y concentración de nanopartículas empleados en cada experimento.

Ensayo	Tiempo Irradiación (min)	Concentración (mg/L)
Control	0	0
2	10	0
3	20	0
4	0	10
5	10	10
6	20	10
7	0	50
8	10	50
9	20	50

Figura 96: Células C6 incubadas durante 4 horas con NP-SiMMA a distintas concentraciones y diferentes tiempos de irradiación.

En base a los resultados obtenidos, se realizaron posteriormente experimentos empleando un tiempo de irradiación mayor y variando la concentración de nanopartículas. En este caso se realizaron dos réplicas de cada condición. La Tabla 29 muestra las condiciones utilizadas para cada ensayo en cuanto a concentración de nanopartículas, tiempo de irradiación, potencia del laser y longitud de onda de irradiación.

Las células con las nanopartículas se incubaron durante cuatro horas y posteriormente se irradiaron durante 30 minutos. Los pocillos control, no irradiados, se dejaron fuera de la incubadora durante dicho tiempo para reproducir las condiciones. Una vez terminadas las irradiaciones las células se mantuvieron durante 30 minutos en la incubadora y transcurrido este tiempo se determinó la viabilidad mediante el ensayo de *Rojo Neutro*.

Tabla 29: Tiempos de exposición a la irradiación, concentración de NP-SiMMA, potencia del laser y longitud de onda de irradiación para cada ensayo.

Ensayo	IR (min)	C ($\mu\text{g/mL}$)	P (mW)	λ (nm)
Control	0	0	-	-
2	0	10	-	-
3	0	50	-	-
4	30	0	250	770 ± 39
5	30	10	190	778 ± 40
6	30	50	190	778 ± 40

En la Figura 97 se muestran los resultados obtenidos en los que se observa que, dentro del error experimental, no existe disminución de la viabilidad en el intervalo de concentraciones y tiempos de irradiación ensayados. Para obtener conclusiones definitivas sobre la viabilidad se necesitarían realizar más ensayos y mejorar el diseño experimental que en nuestro caso estuvo limitado por la potencia del laser utilizado. Se puede afirmar que en las condiciones en las que se produce la excitación bifotónica, donde el volumen focal es del orden de los μm , no se producen especies reactivas de oxígeno que afecten a la viabilidad celular.

Figura 97: Viabilidad de células C6 incubadas durante 4, 12 y 24 horas a distintas concentraciones de NP-SiMMA e irradiación bifotónica durante 30 minutos.

1.4. Conclusiones

Los experimentos descritos en el presente capítulo permiten concluir que las NP-SiMMA no son citotóxicas para las células C6 hasta concentraciones de 50 $\mu\text{g/mL}$ y tiempos de exposición de 24 horas. Estos resultados son prometedores al contrastarlos con la citotoxicidad correspondiente a las nanopartículas de los grupos II-VI como son las nanopartículas de CdTe que producen citotoxicidad a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ con 24 horas de incubación [Lovrić 2005b].

La irradiación bifotónica en el IR con intensidades de luz del orden de las utilizadas en los microscopios de fluorescencia no afecta la viabilidad celular, lo que implica que las NP-SiMMA podrían ser aptas para su utilización como marcadores biológicos luminiscentes.

Capítulo 9:

Conclusiones

9.1. Conclusiones Generales

Esta tesis se realizó en base a la hipótesis inicial que propone que las nanopartículas de silicio tienen una potencial utilidad como marcadores biológicos y/o agentes terapéuticos. Con el fin de verificar esta hipótesis se cumplieron los siguientes objetivos:

- Se desarrolló un método de síntesis de nanopartículas de silicio modificando y optimizando métodos electroquímicos propuestos en la literatura. Este método permite obtener nanopartículas esféricas de 3 nm con una estrecha distribución de tamaños. Se comprobó una alta reproducibilidad en las características y tamaños de las partículas en los distintos lotes obtenidos a lo largo de toda la tesis.
- Se modificaron superficialmente las nanopartículas con metanol y metacrilato de metilo. La estructura química superficial de las partículas se verificó mediante técnicas de FTIR, XPS, EPR y medidas de ángulo de contacto.
- Se estudiaron las propiedades fotofísicas de las nanopartículas en suspensiones de solventes orgánicos (principalmente tolueno) y acuosos a distintos pH, concentración de oxígeno variable, presencia de átomos pesados y diferentes temperaturas. Para este fin se utilizaron métodos de fluorescencia con irradiación continua y resuelta en el tiempo, anisotropía resuelta en el tiempo y espectroscopia de correlación de fluorescencia. Estas técnicas permitieron calcular parámetros fisicoquímicos como el rendimiento cuántico de fluorescencia, tiempo de vida medio, brillo, coeficiente de absorción en procesos mono- y bifotónicos, velocidad de rotación, radio hidrodinámico y coeficiente de difusión en medio acuoso.
- Se demostró que las nanopartículas generan oxígeno singlete y radical superóxido y se propusieron los mecanismos de reacción. Además, se estableció la capacidad de las nanopartículas de reducir distintos contaminantes ambientales como el mercurio (II) y el metilviológeno cuando se excitan con luz UV.
- Se realizaron ensayos de emisión y emisión resuelta en el tiempo con silicio poroso coloidal de radio hidrodinámico de 100-200 nm. Se observó una dependencia lineal del tiempo de vida de la luminiscencia con la

longitud de onda de emisión debido al tamaño variable de las paredes de los poros. Se demostró la capacidad del silicio poroso coloidal de generar oxígeno singlete en suspensiones acuosas cuando se irradia con luz UV.

- Se realizaron estudios teóricos utilizando la teoría de la densidad de funcionales. Se determinó la conformación estructural y estabilidad de las nanopartículas en función de su tamaño, de los defectos superficiales y de recubrimientos con H, O, N, C. Se obtuvieron los espectros UV-Vis y espectros infrarrojos observándose como guardan una correlación con los resultados experimentales.
- Se realizaron estudios de citotoxicidad de las nanopartículas recubiertas con metacrilato de metilo en cultivos celulares de la línea C6 de glioma de rata. La toxicidad se evaluó en función de la concentración de nanopartículas, del tiempo de incubación y del tiempo de exposición a la irradiación IR. En ninguno de los casos se detectó citotoxicidad.

Los resultados aquí expuestos permiten concluir que las propiedades de las nanopartículas de silicio no se pueden explicar meramente por efecto del confinamiento cuántico debido a su pequeño tamaño. Por el contrario, se observa una gran dependencia con el recubrimiento superficial, con las moléculas adsorbidas a su superficie y con el medio en el que se encuentran. Como se ha discutido a lo largo de este trabajo, la superficie oxidada de las nanopartículas desempeña un rol en la relajación del excitón, reduciendo su tiempo de vida al orden de los nanosegundos. Si bien las nanopartículas de silicio exhiben propiedades ópticas similares a los colorantes y/o fotosensibilizadores, presentan la capacidad adicional de transferir energía y/o carga a las moléculas adsorbidas sobre su superficie. Por tanto, es sumamente importante considerar los fenómenos superficiales para entender el comportamiento y las propiedades de las nanopartículas.

Las nanopartículas de silicio desarrolladas en este trabajo poseen un pequeño tamaño, son fáciles de modificar superficialmente, poseen altos rendimientos cuánticos de emisión, muestran altos valores de brillo por excitación bifotónica y presentan baja citotoxicidad en células C6 de glioma de rata. En conjunto, estas propiedades las convierten en compuestos muy prometedores para su empleo como marcadores biológicos. Su capacidad de generar especies reactivas a partir de la transferencia de energía y/o carga

entre sus estados excitados y moléculas adsorbidas en su superficie, sugiere su potencial utilidad como agentes terapéuticos en el tratamiento del cáncer.

9.2. Perspectivas Futuras

Los resultados obtenidos han permitido a mi grupo de trabajo ampliar sus investigaciones hacia el desarrollo del uso de las nanopartículas como agentes terapéuticos contra el cáncer, en combinación con la radiación ionizante. A futuro se planea derivatizar las partículas con moléculas que permitan direccionarlas específicamente hacia las células tumorales, para evaluar su capacidad como biomarcadores y agentes terapéuticos.

Bibliografía

- [Akcair 2000] Akcair, O.; Therrien, J.; Belomoin, G.; Barry, N.; Muller, J. D.; Gratton, E.; Nayfeh, M., Detection of luminescent single ultrasmall silicon nanoparticles using fluctuation correlation spectroscopy. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, 76 (14), 1857-1859.
- [Alivisatos 2005] Alivisatos, A. P.; Gu, W.; Larabell, C., Quantum Dots As Cellular Probes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2005**, 7 (1), 55-76.
- [Alvarez 2009] Alvarez, P. J. J.; Colvin, V.; Lead, J.; Stone, V., Research Priorities to Advance Eco-Responsible Nanotechnology. *ACS Nano* **2009**, 3 (7), 1616-1619.
- [Allain 1974] Allain, C. C.; Poon, L. S.; Chan, C. S. G.; Richmond, W.; Fu, P. C., Enzymatic determination of total serum cholesterol. *E. Clin. Chem.* **1974**, 20, 470-475.
- [Allan 1996] Allan, G.; Delerue, C.; Lannoo, M., Nature of Luminescent Surface States of Semiconductor Nanocrystallites. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, 76 (16), 2961.
- [Allouche 2011] Allouche, A.-R., Gabedit—A graphical user interface for computational chemistry softwares. *J. Comput. Chem.* **2011**, 32 (1), 174-182.
- [Aradi 2010] Aradi, B. Density Fuctional Based Thight Binding. <http://www.dftb-plus.info/>.
- [Aradi 2007] Aradi, B.; Hourahine, B.; Frauenheim, T., DFTB+, a Sparse Matrix-Based Implementation of the DFTB Method†. *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111 (26), 5678-5684.
- [Arce 2010a] Arce, V. B. Modificación y caracterización de nanopartículas de sílice. Reactividad con estados excitados. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, 2010a.
- [Arce 2010b] Arce, V. B.; Rosso, J. A.; Oliveira, F. J. V. E.; Airoidi, C.; Soria, D. B.; Gonzalez, M. C.; Allegretti, P. E.; Mártire, D. O., Generation of Chemisorbed Benzyl Radicals on Silica Nanoparticles. *Photochem. Photobiol.* **2010b**, 86 (6), 1208-1214.
- [Atkins 2006] Atkins, P.; De Paula, J., *Atkins Physical Chemistry*. 8 ed.; Oxford University Press: New York, 2006; p 1097.
- [Bashkatov 2003] Bashkatov, A. N.; Genina, E. A., Water refractive index in dependence on temperature and wavelength: a simple approximation. *Optical Technologies in Biophysics and Medicine IV.* **2003**, 5068, 393-395.
- [Bateman 1997] Bateman, J. E.; Horrocks, B. R.; Houlton, A., Reactions of water and methanol at hydrogen-terminated silicon surfaces studied by transmission FTIR. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1997**, 93, 2427 - 2431.
- [Becke 1993] Becke, A. D., Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98 (7), 5648-5652.

- [Belomoin 2000] Belomoin, G.; Therrien, J.; Nayfeh, M., Oxide and hydrogen capped ultrasmall blue luminescent Si nanoparticles. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, *77* (6), 779-781.
- [Belomoin 2002] Belomoin, G.; Therrien, J.; Smith, A.; Rao, S.; Twesten, R.; Chaieb, S.; Nayfeh, M. H.; Wagner, L.; Mitas, L., Observation of a magic discrete family of ultrabright Si nanoparticles. *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *80* (5), 841-843.
- [Borenfreund 1985] Borenfreund, E.; Puerner, J. A., A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Methods in Cell Science* **1985**, *9* (1), 7-9.
- [Braslavsky 2007] Braslavsky, S. E., Glossary of terms used in photochemistry 3rd. edition: (IUPAC Recommendations 2006). *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79* (3), 293-465.
- [Braslavsky 1997] Braslavsky, S. E.; Müller, M.; Mártire, D. O.; Pörting, S.; Bertolotti, S. G.; Chakravorti, S.; Koç-Weier, G.; Knipp, B.; Schaffner, K., Photophysical properties of porphycene derivatives (18 π porphyrinoids). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1997**, *40* (3), 191-198.
- [Brauer 1984] Brauer, H. D.; Acs, A.; Drews, W.; Gabriel, R.; Ghaeni, S.; Schmidt, R., Generation of $^{1}O_2$ from oxygen quenching of the lowest excited singlet and triplet states of some aromatic compounds. *J. Photochem.* **1984**, *25* (2-4), 475-488.
- [Brunauer 1938] Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E., Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60* (2), 309-319.
- [Buriak 2002] Buriak, J. M., Organometallic Chemistry on Silicon and Germanium Surfaces. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (5), 1271-1308.
- [Butt 2003] Butt, H.-J.; Graf, K.; Kappl, M., *Physics and Chemistry of Interfaces*. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA: 2003.
- [Canham 1990] Canham, L. T., Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution of wafers. *Appl. Phys. Lett.* **1990**, *57* (10), 1046-1048.
- [Cao 2003] Cao, A., Light Scattering. Recent Applications. *Anal. Lett.* **2003**, *36* (15), 3185 - 3225.
- [Caregnato 2003] Caregnato, P.; Mora, V. C.; Le Roux, G. C.; Martire, D. O.; Gonzalez, M. C., A Kinetic Study of the Reactions of Sulfate Radicals at the Silica Nanoparticle–Water Interface. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (25), 6131-6138.
- [Carlos 2009] Carlos, L. Estudio de la eficiencia de degradación de contaminantes empleando tecnologías de oxidación avanzada: Procesos Fenton y foto-Fenton. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, 2009.
- [Celli 2010] Celli, J. P.; Spring, B. Q.; Rizvi, I.; Evans, C. L.; Samkoe, K. S.; Verma, S.; Pogue, B. W.; Hasan, T., Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring, and Optimization. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2795-2838.

[Cisneros 2010] Cisneros, R.; Pfeiffer, H.; Wang, C., Oxygen Absorption in Free-Standing Porous Silicon: A Structural, Optical and Kinetic Analysis. *Nanoscale Research Letters* **2010**, 5 (4), 686-691.

[Clarke 2006] Clarke, S. J.; Hollmann, C. A.; Zhang, Z. J.; Suffern, D.; Bradforth, S. E.; Dimitrijevic, N. M.; Minarik, W. G.; Nadeau, J. L., Photophysics of dopamine-modified quantum dots and effects on biological systems. *Nat. Mater.* **2006**, 5, 409-417.

[Cooper 2010] Cooper, D. R.; Dimitrijevic, N. M.; Nadeau, J. L., Photosensitization of CdSe/ZnS QDs and reliability of assays for reactive oxygen species production. *Nanoscale* **2010**, 2, 8.

[Costanzo 2004] Costanzo, F.; Sbraccia, C.; Luigi Silvestrelli, P.; Ancilotto, F., Proton-transfer reaction of toluene on Si(1 0 0) surface. *Surf. Sci.* **2004**, 566-568 (Part 2), 971-976.

[Cullis 1997] Cullis, A. G.; Canham, L. T.; Calcott, P. D. J., The structural and luminescence properties of porous silicon. *J. Appl. Phys.* **1997**, 82 (3), 909-965.

[Chanda 2010] Chanda, N.; Kan, P.; Watkinson, L. D.; Shukla, R.; Zambre, A.; Carmack, T. L.; Engelbrecht, H.; Lever, J. R.; Katti, K.; Fent, G. M.; Casteel, S. W.; Smith, C. J.; Miller, W. H.; Jurisson, S.; Boote, E.; Robertson, J. D.; Cutler, C.; Dobrovolskaia, M.; Kannan, R.; Katti, K. V., Radioactive gold nanoparticles in cancer therapy: therapeutic efficacy studies of GA-198AuNP nanoconstruct in prostate tumor-bearing mice. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* **2010**, 6 (2), 201-209.

[Cheng 2000] Cheng, K.; Lee, J.; Lyding, J. W., Experimental evidence of Si-H bond energy variation at SiO₂-Si interface. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, 77 (21), 3388-3390.

[Chi-Jen 2008] Chi-Jen, L.; et al., Enhanced x-ray irradiation-induced cancer cell damage by gold nanoparticles treated by a new synthesis method of polyethylene glycol modification. *Nanotechnology* **2008**, 19 (29), 295104.

[Chirico 2001] Chirico, G.; Bettati, S.; Mozzarelli, A.; Chen, Y.; Müller, J. D.; Gratton, E., Molecular heterogeneity of O-acetylserine sulfhydrylase by two-photon excited fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys. J.* **2001**, 80 (4), 1973 - 1985.

[Choi 2006] Choi, J. Synthesis, characterization, and Bio-conjugation of Silicon Nanocrystal. University of Maryland, Maryland, 2006.

[Choi 2007] Choi, J.; Wang, N. S.; Reipa, V., Photoassisted Tuning of Silicon Nanocrystal Photoluminescence. *Langmuir* **2007**, 23 (6), 3388-3394.

[Chung 2009] Chung, T. H.; Kang, M. S.; Chung, C. J.; Kim, Y., Effects of process parameters on the properties of silicon oxide films using plasma enhanced chemical vapor deposition with tetramethoxysilane. *Current Applied Physics* **2009**, 9 (3), 598-604.

[Danen Wayne 1978] Danen Wayne, C.; Warner R, J. A. Y.; Arudi Ravindra, L., Nucleophilic Reactions of Superoxide Anion Radical. In *Organic Free Radicals*, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY: 1978; Vol. 69, pp 244-257.

- [David Gara 2009] David Gara, P. M.; Bosio, G. N.; Arce, V. B.; Poulsen, L.; Ogilby, P. R.; Giudici, R.; Gonzalez, M. C.; Mártire, D. O., Photoinduced Degradation of the Herbicide Clomazone Model Reactions for Natural and Technical Systems. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85* (3), 686-692.
- [David Gara 2011] David Gara, P. M.; Garabano, N. I.; Llansola Portolés, M. J.; Moreno, S.; Dodat, D.; Casas, O. R.; Gonzalez, M. C.; Kotler, M. L., ROS enhancement by silicon nanoparticles in X-ray irradiated aqueous suspensions and in glioma C6 cells. **2011**.
- [Delley 1995] Delley, B.; Steigmeier, E. F., Size dependence of band gaps in silicon nanostructures. *Appl. Phys. Lett.* **1995**, *67* (16), 2370-2372.
- [DeRosa 2002] DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J., Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *233-234*, 351-371.
- [Ding 2002] Ding, Z.; Quinn, M. B.; Haram, A. K.; Pell, L. E.; Korgel, B. A.; Bard, A. L., Electrochemistry and Electrogenated Chemiluminescence from Silicon Nanocrystal Quantum Dots. *Science* **2002**, *296*, 1293-1297.
- [Dobrovolskas 2009] Dobrovolskas, D.; Mickevicius, J.; Tamulaitis, G.; Reipa, V., Photoluminescence of Si nanocrystals under selective excitation. *J. Phys. Chem. Solids* **2009**, *70* (2), 439-443.
- [Draeger 2004] Draeger, E. W.; Grossman, J. C.; Williamson, A. J.; Galli, G., Optical properties of passivated silicon nanoclusters: The role of synthesis. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120* (22), 10807-10814.
- [Drexler 1986] Drexler, K. E., *Engines of Creation. The Coming Era of Nanotechnology*. Anchor Books: New York, 1986.
- [Du 2009] Du, J.; Tu, H.; Wang, L., Non-agglomerated silicon nanoparticles on (0 0 1) silicon substrate formed by PLA and their photoluminescence properties. *Materials Science and Engineering: B* **2009**, *159-160*, 61-65.
- [Dunphy Guzmán 2006] Dunphy Guzmán, K. A.; Taylor, M. R.; Banfield, J. F., Environmental Risks of Nanotechnology: National Nanotechnology Initiative Funding, 2000–2004. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40* (5), 1401-1407.
- [E.U. 2006] E.U. Nanosciences and nanotechnologies: an action plan for Europe 2005-2009 <http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//TEXT+TA+P6-TA-2006-0392+0+DOC+XML+V0//EN>.
- [Eckhoff 2006] Eckhoff, D. A. Optical characterization of ultrasmall, hydrogen-terminated and carboxyl-functionaized silicon nanoparticles in aqueous environments. University of Illinois, Urbana-Champaign, 2006.
- [EE.UU. 2011] EE.UU. Office of the Law Revision Counsel. <http://uscode.house.gov/>.
- [El-Sayed 2006] El-Sayed, I. H.; Huang, X.; El-Sayed, M. A., Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer letters* **2006**, *239* (1), 129-135.

- [English 2002] English, D. S.; Pell, L. E.; Yu, Z.; Barbara, P. F.; Korgel, B. A., Size Tunable Visible Luminescence from Individual Organic Monolayer Stabilized Silicon Nanocrystal Quantum Dots. *Nano Lett.* **2002**, 2 (7), 681-685.
- [Ergaieg 2008] Ergaieg, K.; Chevanne, M.; Cillard, J.; Seux, R., Involvement of both Type I and Type II mechanisms in Gram-positive and Gram-negative bacteria photosensitization by a meso-substituted cationic porphyrin. *Solar Energy* **2008**, 82 (12), 1107-1117.
- [Ernest 2005] Ernest, H.; Shetty, R., Impact of Nanotechnology on Biomedical Sciences: Review of Current Concepts on Convergence of Nanotechnology With Biology. *Journal of Nanobiotechnology Online* **2005**.
- [Estrada 2009] Estrada, L. C. Espectroscopia de Correlacion de Fluorescencia en la nanoescala. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 2009.
- [Fahlman 2007] Fahlman, B. D., *Materials Chemistry*. 2 ed.; Springer: Dordrecht, 2007.
- [Ferrari 2005] Ferrari, M., Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 161.
- [Feynman 1963] Feynman, R., *Six Easy Pieces*. Addison-Wesley Pub. Co.: Menlo Park CA, 1963.
- [Fisher 2005] Fisher, J. A. N.; Salzberg, B. M.; Yodh, A. G., Near infrared two-photon excitation cross-sections of voltage-sensitive dyes. *J. Neurosci. Methods* **2005**, 148 (1), 94-102.
- [Fitzgerald 1997] Fitzgerald, W. F.; Mason, R. P., *Mercury and Its Effects on Environment and Biology, Metal Ions in Biological Systems*. Marcel Dekker: 1997; Vol. 34.
- [Florence Lefranc 2006] Florence Lefranc, M. D.; Kiss, R., Autophagy, the Trojan horse to combat glioblastomas. *Neurosurgery Focus* **2006**, 20 (3), E7.
- [Fojtik 1994] Fojtik, A.; Henglein, A., Luminescent colloidal silicon particles. *Chem. Phys. Lett.* **1994**, 221 (5-6), 363-367.
- [Fojtik 2006] Fojtik, A.; Henglein, A., Surface Chemistry of Luminescent Colloidal Silicon Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110 (5), 1994-1998.
- [Foote 1991] Foote, C. S., Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* **1991**, 54 (5), 659-659.
- [Franco-Hernandez 2007] Franco-Hernandez, C.; Martinez-Glez, V.; Rey, A. J., Biología molecular de los glioblastomas. *Neurocirugía* **2007**, 18, 373-382.
- [Frauenheim 2002] Frauenheim, T.; et al., Atomistic simulations of complex materials: ground-state and excited-state properties. *J. Phys.: Condens. Matter* **2002**, 14 (11), 3015.
- [Garabano 2010] Garabano, N. I.; David Gara, P.; Casas, O.; Gonzalez, M. C.; Kotler, M. L., Incorporación y citotoxicidad de nanopartículas de silicio en células C6 de glioma de rata. Efecto de la radiación ionizante y generación de especies reactivas de oxígeno. *Medicina* **2010**, 70 (2), 65.

- [Garcia 2003] Garcia, C.; Garrido, B.; Pellegrino, P.; Ferre, R.; Moreno, J. A.; Pavesi, L.; Cazzanelli, M.; Morante, J. R., Absorption cross-sections and lifetimes as a function of size in Si nanocrystals embedded in SiO₂. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures* **2003**, *16* (3-4), 429-433.
- [Gas Encyclopedia 2010] Gas Encyclopedia. <http://encyclopedia.airliquide.com/encyclopedia.asp>.
- [Gonzalez 1989] Gonzalez, M. C.; San Roman, E., Photochemistry of aqueous solutions of triphenyltetrazolium chloride. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93* (9), 3536-3540.
- [Granovsky 2011] Granovsky, A. A. Firefly version 7.1.G. <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html>.
- [Groenewegen 2010] Groenewegen, V.; Kuntermann, V.; Haarer, D.; Kunz, M.; Kryschi, C., Excited-State Relaxation Dynamics of 3-Vinylthiophene-Terminated Silicon Quantum Dots. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (27), 11693-11698.
- [Gross 2003] Gross, E.; Kovalev, D.; Künzner, N.; Diener, J.; Koch, F.; Timoshenko, V. Y.; Fujii, M., Spectrally resolved electronic energy transfer from silicon nanocrystals to molecular oxygen mediated by direct electron exchange. *Physical Review B* **2003**, *68* (Copyright (C) 2010 The American Physical Society), 115405.
- [Hahn 2002] Hahn, W. C.; Weinberg, R. A., Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *5*, 331.
- [Hanahan 2000] Hanahan, D.; Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57.
- [Hay 1985a] Hay, P. J.; Wadt, W. R., Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *J. Chem. Phys.* **1985a**, *82* (1), 299-310.
- [Hay 1985b] Hay, P. J.; Wadt, W. R., Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg. *J. Chem. Phys.* **1985b**, *82* (1), 270-283.
- [He 2008] He, G. S.; Zheng, Q.; Yong, K.-T.; Erogbogbo, F.; Swihart, M. T.; Prasad, P. N., Two- and Three-Photon Absorption and Frequency Upconverted Emission of Silicon Quantum Dots. *Nano Lett.* **2008**, *8* (9), 2688-2692.
- [Heller 1974] Heller, C. A.; Henry, R. A.; McLaughlin, B. A.; Bliss, D. E., Fluorescence spectra and quantum yields. Quinine, uranine, 9,10-diphenylanthracene, and 9,10-bis(phenylethynyl)anthracenes. *J. Chem. Eng. Data* **1974**, *19* (3), 214-219.
- [Hill 1995] Hill, N. A.; Whaley, K. B., Size Dependence of Excitons in Silicon Nanocrystals. *Phys. Rev. Lett.* **1995**, *75* (6), 1130.
- [Hohenberg 1964] Hohenberg, P.; Kohn, W., Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review* **1964**, *136* (3B), B864.

- [Holmes 2001] Holmes, J. D.; Ziegler, K. J.; Doty, R. C.; Pell, L. E.; Johnston, K. P.; Korgel, B. A., Highly Luminescent Silicon Nanocrystals with Discrete Optical Transitions. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (16), 3743-3748.
- [Hua 2006] Hua, F.; Erogbogbo, F.; Swihart, M. T.; Ruckenstein, E., Organically Capped Silicon Nanoparticles with Blue Photoluminescence Prepared by Hydrosilylation Followed by Oxidation. *Langmuir* **2006**, *22* (9), 4363-4370.
- [Hua 2005] Hua, F.; Swihart, M. T.; Ruckenstein, E., Efficient Surface Grafting of Luminescent Silicon Quantum Dots by Photoinitiated Hydrosilylation. *Langmuir* **2005**, *21* (13), 6054-6062.
- [Hybertsen 1994] Hybertsen, M. S., Absorption and emission of light in nanoscale silicon structures. *Phys. Rev. Lett.* **1994**, *72* (10), 1514.
- [Jal 2004] Jal, P. K.; Patel, S.; Mishra, B. K., Chemical modification of silica surface by immobilization of functional groups for extractive concentration of metal ions. *Talanta* **2004**, *62* (5), 1005-1028.
- [Jarvis 1964] Jarvis, N. L.; Fox, R. B.; Zisman, W. A., *Contact Angle, Wettability and Adhesion*. American Chemical Society: Washington, 1964; p 317-340
- [Jing 2002] Jing, S.-Y.; Lee, H.-J., Chemical Bond Structure on Si-O-C Composite Films with a Low Dielectric Constant Deposited by Using Inductively Coupled Plasma Chemical Vapor Deposition. *Journal of the Korean Physical Society* **2002**, *41* (5), 769-773.
- [Jitianu 2002] Jitianu, A.; Crisan, A.; Meghea, A.; Raub, I.; Zaharescu, M. J., *Mater. Chem.* **2002**, *12* (1401).
- [Joannopoulos 2008] Joannopoulos, J. D.; Johnson, S. G.; N. Winn, J.; D. Meade, R., *Photonic Crystals: Molding the Flow of Light*. 2 ed.; Princeton University Press: New Jersey, 2008; p 305.
- [Joe 2000] Joe, M. M., The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine* **2000**, *108* (8), 652-659.
- [Judge 2008] Judge, K.; Brown, C. W.; Hamel, L., Sensitivity of Infrared Spectra to Chemical Functional Groups. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (11), 4186-4192.
- [Jutzi 2003] Jutzi, P.; Schubert, U., *Silicon Chemistry - From the Atom to Extended Systems*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co: Weinheim, 2003.
- [Kanemitsu 2002] Kanemitsu, Y., Efficient light emission from crystalline and amorphous silicon nanostructures. *J. Lumin.* **2002**, *100* (1-4), 209-217.
- [Kasha 1952] Kasha, M., Collisional perturbation of spin-orbital coupling and the mechanism of fluorescence quenching. a visual demonstration of the perturbation. *J. Chem. Phys.* **1952**, *20* (1), 71-74.
- [Kasha 1960] Kasha, M., Paths of Molecular Excitation. *Radiat. Res. Suppl.* **1960**, 243-275.
- [Kim 2007] Kim, C. Y.; Kim, S. H.; Navamathavan, R.; Choi, C. K.; Jeung, W. Y., Characteristics of low-k SiOC(-H) films deposited at various substrate

- temperature by PECVD using DMDMS/O₂ precursor. *Thin Solid Films* **2007**, *516* (2-4), 340-344.
- [Kim 1999] Kim, N. Y.; Laibinis, P. E., Improved Polypyrrole/Silicon Junctions by Surficial Modification of Hydrogen-Terminated Silicon Using Organolithium Reagents. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (30), 7162-7163.
- [Kim 2010] Kim, Y. S.; Song, M. Y.; Park, J. D.; Song, K. S.; Ryu, H. R., Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology* **2010**, *7* (1), 20.
- [Kimura 1999] Kimura, K., Blue Luminescence from Silicon Nanoparticles Suspended in Organic Liquids. *J. Cluster Sci.* **1999**, *10* (2), 359-380.
- [Kleinman 1965] Kleinman, L., Theory of Phonon-Assisted Tunneling in Semiconductors. *Physical Review* **1965**, *140* (2A), A637.
- [Kobayashi 2009] Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y., New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chem. Rev.* **2009**, *110* (5), 2620-2640.
- [Kohn 1965] Kohn, W.; Sham, L. J., Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review* **1965**, *140* (4A), A1133.
- [Koppel 1972] Koppel, D. E., Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants. *J. Chem. Phys.* **1972**, *57* (11), 4814-4820.
- [Koropecski 2004] Koropecski, R. R.; Arce, R. D.; Schmidt, J. A., Photo-oxidation effects in porous silicon luminescence. *Physical Review B* **2004**, *69* (20), 205317.
- [Kovalev 2005a] Kovalev, D.; Fujii, M., Silicon Nanocrystals: Photosensitizers for Oxygen Molecules. *Adv. Mater.* **2005a**, *17* (21), 2531-2544.
- [Kovalev 2005b] Kovalev, D.; Gross, E.; Diener, J.; Timoshenko, V.; Fujii, M., Photoluminescence fatigue effect in luminescent porous silicon induced by photosensitized molecular oxygen. *physica status solidi (c)* **2005b**, *2* (9), 3188-3192.
- [Kovalev 1998] Kovalev, D.; Heckler, H.; Ben-Chorin, M.; Polisski, G.; Schwartzkopff, M.; Koch, F., Breakdown of the k-Conservation Rule in Si Nanocrystals. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *81* (13), 2803.
- [Kravets 2005] Kravets, V. G.; Meier, C.; Konjhodzic, D.; Lorke, A.; Wiggers, H., Infrared properties of silicon nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **2005**, *97* (8), 1-5.
- [Krichevsky 2002] Krichevsky, O.; Bonnet, G., Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Reports on Progress in Physics* **2002**, *65* (2), 251.
- [Kuntermann 2008] Kuntermann, V.; Cimpean, C.; Brehm, G.; Sauer, G.; Kryschi, C.; Wiggers, H., Femtosecond transient absorption spectroscopy of silanized silicon quantum dots. *Physical Review B* **2008**, *77* (11), 115343.

[Kusová 2010] Kusová, K.; Cibulka, O. e.; Dohnalová, K. i.; Pelant, I.; Valenta, J.; Fucíková A.; Židek K.; Lang, J.; English, J. i.; Matejka P.; Štěpánek P.; Bakardjieva, S., Brightly Luminescent Organically Capped Silicon Nanocrystals Fabricated at Room Temperature and Atmospheric Pressure. *ACS Nano* **2010**, null-null.

[Lakowicz 2006] Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3 ed.; Springer Science+Business Media: New York, 2006.

[Lakowicz 1999] Lakowicz, J. R.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z.; Murphy, C. J., Luminescence Spectral Properties of CdS Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103 (36), 7613-7620.

[Lambert 1998] Lambert, J. B.; Shuvell, H. F.; Lightner, D. A., *Organic Structural Spectroscopy*. Prentice Hall, Inc.: Upper Saddle River, NJ, 1998.

[Landes 2002] Landes, C. F.; Link, S.; Mohamed, M. B.; Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A., Some properties of spherical and rod-shaped semiconductor and metal nanocrystals. *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74 (9), 1675-1692.

[Larson 1987] Larson, G. L.; Arkles, B.; Anderson, R., *Silicon Compounds: Register and Review*. Petrarch Systems: 1987.

[Lebret 2008] Lebret, V.; Raehm, L.; Durand, J.-O.; Smaïhi, M.; Gérardin, C.; Nerambourg, N.; Werts, M. H. V.; Blanchard-Desce, M., Synthesis and Characterization of Fluorescently Doped Mesoporous Nanoparticles for Two-Photon Excitation. *Chem. Mater.* **2008**, 20 (6), 2174-2183.

[Ledoux 2001] Ledoux, G.; Gong, J.; Huisken, F., Effect of passivation and aging on the photoluminescence of silicon nanocrystals. *Appl. Phys. Lett.* **2001**, 79 (24), 4028-4030.

[Ledoux 2000] Ledoux, G.; Guillois, O.; Porterat, D.; Reynaud, C.; Huisken, F.; Kohn, B.; Paillard, V., Photoluminescence properties of silicon nanocrystals as a function of their size. *Physical Review B* **2000**, 62 (23), 15942.

[Lee 1988] Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Review B* **1988**, 37 (2), 785.

[Lehmann 2002] Lehmann, V., *Electrochemistry of Silicon: Instrumentation, Science, Materials and Applications*. Wiley-VCH: 2002; p 286.

[Li 2004a] Li, X.; He, Y.; Swihart, M. T., Surface Functionalization of Silicon Nanoparticles Produced by Laser-Driven Pyrolysis of Silane followed by HF-HNO₃ Etching. *Langmuir* **2004a**, 20 (11), 4720-4727.

[Li 2003] Li, X.; He, Y.; Talukdar, S. S.; Swihart, M. T., Process for Preparing Macroscopic Quantities of Brightly Photoluminescent Silicon Nanoparticles with Emission Spanning the Visible Spectrum. *Langmuir* **2003**, 19 (20), 8490-8496.

[Li 2004b] Li, Z. F.; Swihart, M. T.; Ruckenstein, E., Luminescent Silicon Nanoparticles Capped by Conductive Polyaniline through the Self-Assembly Method. *Langmuir* **2004b**, 20 (5), 1963-1971.

- [Lichtin 1984] Lichtin, N. N. Light driven photocatalytic process. 4427509, 1984.
- [Lide 2009] Lide, D. R., *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press. Inc.: Boca Raton, 2009.
- [Littau 1993] Littau, K. A.; Szajowski, P. J.; Muller, A. J.; Kortan, A. R.; Brus, L. E., A luminescent silicon nanocrystal colloid via a high-temperature aerosol reaction. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97 (6), 1224-1230.
- [Lopez del Puerto 2010] Lopez del Puerto, M.; Jain, M.; Chelikowsky, J. R., Time-dependent density functional theory calculations for the Stokes shift in hydrogenated silicon clusters. *Physical Review B* **2010**, 81 (3), 035309.
- [Lovrić 2005a] Lovrić, J.; Bazzi, H. S.; Cuie, Y.; Fortin, G. R. A.; Winnik, F. M.; Maysinger, D., Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. *Journal of Molecular Medicine* **2005a**, 83 (5), 377-385.
- [Lovrić 2005b] Lovrić, J.; Cho, S. J.; Winnik, F. M.; Maysinger, D., Unmodified Cadmium Telluride Quantum Dots Induce Reactive Oxygen Species Formation Leading to Multiple Organelle Damage and Cell Death. *Chem. Biol.* **2005b**, 12 (11), 1227-1234.
- [Ma 2002] Ma, J.; Feng, Q. Y.; Shi, L. H.; Xu, J., Preliminary Study on Pyrolysis of Polymethylsilsesquioxane by FT-IR and XPS. *Chin. Chem. Lett.* **2002**, 13 (1), 75 - 78.
- [Ma 2004] Ma, L. B.; Ji, A. L.; Liu, C.; Wang, Y. Q.; Cao, Z. X., Low temperature growth of amorphous Si nanoparticles in oxide matrix for efficient visible photoluminescence. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* **2004**, 22 (6), 2654-2657.
- [Magde 1972] Magde, D.; Elson, E. L.; Webb, W. W., Thermodynamics fluctuations in a reacting system: Measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters* **1972**, 29, 705-708.
- [Magde 1974] Magde, D.; Elson, E. L.; Webb, W. W., Fluorescence Correlation Spectroscopy II: An experimental realization. *Biopolymers* **1974**, 13, 29-61.
- [Mao 1995] Mao, Y.; Thomas, J. K., Chemical Reactions of Molecular Oxygen in Surface-Mediated Photolysis of Aromatic Compounds on Silica-Based Surfaces. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99 (7), 2048-2056.
- [Martínez 2010] Martínez, A.; Alonso, J. C.; Sansores, L. E.; Salcedo, R., Electronic Structure of Silicon Nanocrystals Passivated with Nitrogen and Chlorine. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114 (29), 12427-12431.
- [Mártire 1993] Mártire, D. O.; Evans, C.; Bertolotti, S. G.; Braslavsky, S. E.; García, N. A., Singlet molecular oxygen [O₂(¹Δ_g)] production and quenching by hydroxybiphenyls. *Chemosphere* **1993**, 26 (9), 1691-1701.
- [Melmer 2010] Melmer, M.; Stangler, T.; Premstaller, A.; Lindner, W., Solvent effects on the retention of oligosaccharides in porous graphitic carbon liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217 (39), 6092-6096.

- [Menon 2000] Menon, U.; Jacobs, I. J., Recent developments in ovarian cancer screening. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **2000**, *12*, 39.
- [Mialhe 2008] Mialhe, P.; Toufik, H.; Tahchi, M.; Toufik, N.; Tazibt, W., Silicon for optoelectronic. *Journal of Electron Devices* **2008**, *6*, 3.
- [Michalet 2005] Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S., Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science* **2005**, *307* (5709), 538-544.
- [Mirji 2006] Mirji, S. A.; Halligudi, S. B.; Sawant, D. P.; Patil, K. R.; Gaikwad, A. B.; Pradhan, S. D., Adsorption of toluene on Si(1 0 0)/SiO₂ substrate and mesoporous SBA-15. *Colloids Surf., A* **2006**, *272* (3), 220-226.
- [Miskoski 1993] Miskoski, S.; García, N. A., Influence of the peptide bond on the singlet molecular oxygen-mediated (O₂[Δ g]) photooxidation of histidine and methionine dipeptides. A kinetic study. *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57* (0031-8655).
- [Mittal 2006] Mittal, K. L., *Contact Angle, Wettability and Adhesion*. VSP: Boston, 2006; Vol. 4.
- [Miyamoto 1990] Miyamoto, Y.; Oshiyama, A., Atomic and electronic structures of oxygen on Si(100) surfaces: Metastable adsorption sites. *Physical Review B* **1990**, *41* (Copyright (C) 2010 The American Physical Society), 12680.
- [Mody 2010] Mody, V.; Siwale, R.; Singh, A.; Mody, H., *Introduction to metallic nanoparticles*. 2010; Vol. 2, p 282-289.
- [Muller 2007] Muller, F. L.; Lustgarten, M. S.; Jang, Y.; Richardson, A.; Van Remmen, H., Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biol. Med.* **2007**, *43* (4), 477-503.
- [Müller 2003] Müller, J. D.; Gratton, E., High-Pressure Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophys. J.* **2003**, *85* (4), 2711-2719.
- [Murphy 2002] Murphy, C. J.; Coffey, J. L., Quantum Dots: A Primer. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2002**, *56* (1).
- [Murphy 2008] Murphy, C. J.; Gole, A. M.; Stone, J. W.; Sisco, P. N.; Alkilany, A. M.; Goldsmith, E. C.; Baxter, S. C., Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (12), 1721-1730.
- [Murzin 2007] Murzin, D. Y., On the validity of Langmuir adsorption on supported nanoparticles. *React. Kinet. Catal. Lett.* **2007**, *91* (1), 37-43.
- [Nagatomi 1999] Nagatomi, T.; Harada, Y.; Niwa, M.; Takai, Y.; Shimizu, R., Oxygen adsorption and reaction on alpha-silicon. *Surf. Interface Anal.* **1999**, *27* (8), 776-782.
- [Nguyen 1989] Nguyen, T. P.; Lefrant, S., XPS study of SiO thin films and SiO-metal interfaces. *J. Phys.: Condens. Matter* **1989**, (31), 5197.
- [Nie 2007] Nie, S.; Xing, Y.; Kim, G. J.; Simons, J. W., Nanotechnology Applications in Cancer. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2007**, *9* (1), 257-288.

- [Niidome 2006] Niidome, T.; Yamagata, M.; Okamoto, Y.; Akiyama, Y.; Takahashi, H.; Kawano, T.; Katayama, Y.; Niidome, Y., PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *J. Controlled Release* **2006**, *114* (3), 343-347.
- [Nirmal 1998] Nirmal, M.; Brus, L., Luminescence Photophysics in Semiconductor Nanocrystals. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *32* (5), 407-414.
- [Okamoto 1993] Okamoto, M.; Tanaka, F., Volume of activation for the radiationless deactivation of singlet oxygen in aromatic hydrocarbons. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97* (1), 177-180.
- [Onyewuenyi 1994] Onyewuenyi, N.; Moran, G. *Determination of trace amounts of Mercury (II) by Total Fluorescence Quenching using 1,10-phenanthroline and eosin*; Analytical Chemistry Department: Kensington (Australia), 1994.
- [Pabst 2008] Pabst, M.; Altmann, F., Influence of Electrosorption, Solvent, Temperature, and Ion Polarity on the Performance of LC-ESI-MS Using Graphitic Carbon for Acidic Oligosaccharides. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (19), 7534-7542.
- [Park 2007] Park, S.; Lee, Y. K.; Jung, M.; Kim, K. H.; Chung, N.; Ahn, E.-K.; Lim, Y.; Lee, K.-H., Cellular Toxicity of Various Inhalable Metal Nanoparticles on Human Alveolar Epithelial Cells. *Inhalation Toxicol.* **2007**, *19* (s1), 59-65.
- [Parr 1989] Parr, R. G.; Yang, W., *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*. Oxford University Press: 1989.
- [Pelley 2009] Pelley, J. L.; Daar, A. S.; Saner, M. A., State of Academic Knowledge on Toxicity and Biological Fate of Quantum Dots. *Toxicol. Sci.* **2009**, *112* (2), 276-296.
- [Peng 2011] Peng, C.; Gao, J.; Wang, S.; Zhang, X.; Zhang, X.; Sun, X., Stability of Hydrogen-Terminated Surfaces of Silicon Nanowires in Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem. C* **2011**, null-null.
- [Pisanic Ii 2007] Pisanic Ii, T. R.; Blackwell, J. D.; Shubayev, V. I.; Fiñones, R. R.; Jin, S., Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials* **2007**, *28* (16), 2572-2581.
- [Polisski 1997] Polisski, G.; Averboukh, B.; Kovalev, D.; Koch, F., Control of silicon nanocrystallite shape asymmetry and orientation anisotropy by light-assisted anodization. *Appl. Phys. Lett.* **1997**, *70* (9), 1116-1118.
- [Porter 1950] Porter, G., Flash Photolysis and Spectroscopy. A New Method for the Study of Free Radical Reactions. *The Royal Society* **1950**, *200* (1061), 284-300.
- [Pradhan 2008] Pradhan, S.; Chen, S.; Zou, J.; Kauzlarich, S. M., Photoconductivity of Langmuir-Blodgett Monolayers of Silicon Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112* (34), 13292-13298.
- [Puzder 2002] Puzder, A.; Williamson, A. J.; Grossman, J. C.; Galli, G., Surface Chemistry of Silicon Nanoclusters. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *88* (9), 097401.

- [Puzder 2003] Puzder, A.; Williamson, A. J.; Grossman, J. C.; Galli, G., Computational Studies of the Optical Emission of Silicon Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (9), 2786-2791.
- [Rajeshwa 2002] Rajeshwa, K., *Fundamentals of Semiconductor Electrochemistry and Photoelectrochemistry*. 2002; Vol. 6, p 608.
- [Reboredo 2005] Reboredo, F. A.; Galli, G., Theory of alkyl-terminated silicon quantum dots. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (3), 1072-1078.
- [Rehm 1996] Rehm, J. M.; McLendon, G. L.; Fauchet, P. M., Conduction and Valence Band Edges of Porous Silicon Determined by Electron Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (18), 4490-4491.
- [Rioux 2009] Rioux, D.; Laferrière, M.; Douplik, A., Silicon nanoparticles produced by femtosecond laser ablation in water as novel contamination-free photosensitizers *J. Biomed. Opt.* **2009**, *14* (02), 5.
- [Rocha 2000] Rocha, J. C.; Junior, É. S.; Zara, L. F.; Rosa, A. H.; dos Santos, A.; Burba, P., Reduction of mercury(II) by tropical river humic substances (Rio Negro) -- A possible process of the mercury cycle in Brazil. *Talanta* **2000**, *53* (3), 551-559.
- [Rogozhina 2001] Rogozhina, E.; Belomoin, G.; Smith, A.; Abuhassan, L.; Barry, N.; Akcakir, O.; Braun, P. V.; Nayfeh, M. H., Si--N linkage in ultrabright, ultrasmall Si nanoparticles. *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *78* (23), 3711-3713.
- [Rogozhina 2006] Rogozhina, E. V.; Eckhoff, D. A.; Gratton, E.; Braun, P. V., Carboxyl functionalization of ultrasmall luminescent silicon nanoparticles through thermal hydrosilylation. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16* (15), 1421-1430.
- [Rosenberg 2008] Rosenberg, R. A.; Shenoy, G. K.; Kim, P. S. G.; Sham, T. K., Temporal- and Site-Specific Determination of the Origin of the Luminescent Bands in Silicon Nanowires. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112* (36), 13943-13946.
- [Rosso-Vasic 2008a] Rosso-Vasic, M. Synthesis and Photophysics of Functionalized Silicon Nanoparticles. Wageningen University, Wageningen, 6703 HB (The Netherlands), 2008a.
- [Rosso-Vasic 2008b] Rosso-Vasic, M.; Spruijt, E.; Lagen, B. v.; Cola, L. D.; Zuilhof, H., Alkyl-Functionalized Oxide-Free Silicon Nanoparticles: Synthesis and Optical Properties. *Small* **2008b**, *4* (10), 1835-1841.
- [Rosso-Vasic 2009] Rosso-Vasic, M.; Spruijt, E.; Lagen, B. v.; Cola, L. D.; Zuilhof, H., Alkyl-Functionalized Oxide-Free Silicon Nanoparticles: Synthesis and Optical Properties. *Small* **2009**, *5* (23), NA.
- [Rubio 2004] Rubio, J. E. F.; Arsuaga, J. M.; Taravillo, M.; Baonza, V. G.; Cáceres, M., Refractive index of benzene and methyl derivatives: temperature and wavelength dependencies. *Experimental Thermal and Fluid Science* **2004**, *28* (8), 887-891.
- [Ruiz 2007] Ruiz, A. E.; Caregnato, P.; Arce, V. B.; Schiavoni, M. d. I. M.; Mora, V. C.; Gonzalez, M. C.; Allegretti, P. E.; Mártire, D. O., Synthesis and Characterization of Butoxylated Silica Nanoparticles. Reaction with Benzophenone Triplet States. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (21), 7623-7628.

- [San Roman 1982] San Roman, E.; Aramendia, P. F.; Schumacher, H., *J. Anal. Asoc. Quim. Arg.* **1982**, 70, 887.
- [Sankaran 2005] Sankaran, R. M.; Holunga, D.; Flagan, R. C.; Giapis, K. P., Synthesis of Blue Luminescent Si Nanoparticles Using Atmospheric-Pressure Microdischarges. *Nano Lett.* **2005**, 5 (3), 537-541.
- [Sato 2006] Sato, S.; Swihart, M. T., Propionic-Acid-Terminated Silicon Nanoparticles: Synthesis and Optical Characterization. *Chem. Mater.* **2006**, 18 (17), 4083-4088.
- [Scaiano 1989] Scaiano, J. C., *CRC Handbook of Organic Photochemistry* CRC Press, Inc.: Boca Raton, 1989; Vol. 2, p 229-251.
- [Scopus 2010] Scopus Scopus.
- [Scurlock 1989] Scurlock, R. D.; Ogilby, P. R., Singlet molecular oxygen (1.DELTA.gO2) formation upon irradiation of an oxygen (3.SIGMA.g-O2)-organic molecule charge-transfer absorption band. *J. Phys. Chem.* **1989**, 93 (14), 5493-5500.
- [Schwarzenbach 2002] Schwarzenbach, R. P.; Gschwend, P. M.; Imboden, D. M., *Environmental organic chemistry*. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2002.
- [Schweitzer 2003] Schweitzer, C.; Schmidt, R., Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chem. Rev.* **2003**, 103 (5), 1685-1758.
- [Schwille 2002] Schwille, P.; Haustein, E., Fluorescence Correlation Spectroscopy. An Introduction to its Concepts and Applications. Biophysics Textbook Online: Göttingen, 2002.
- [Seifert 2007] Seifert, G., Tight-Binding Density Functional Theory: An Approximate Kohn–Sham DFT Scheme. *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111 (26), 5609-5613.
- [Serway 2010] Serway, R. A.; Jewett, J. W., *Physics for Scientists and Engineers with Modern Physics*. 8 ed.; Brooks/Cole: Belmont, 2010.
- [Shen 2010] Shen, P.; Uesawa, N.; Inasawa, S.; Yamaguchi, Y., Stable and color-tunable fluorescence from silicon nanoparticles formed by single-step plasma assisted decomposition of SiBr₄. *J. Mater. Chem.* **2010**, 20 (9), 1669-1675.
- [Sieck 2000] Sieck, A. Structure and physical properties of silicon clusters and of vacancies in bulk silicon. Univertisty Paderborn, 2000.
- [Smith 2005] Smith, A.; Yamani, Z. H.; Roberts, N.; Turner, J.; Habbal, S. R.; Granick, S.; Nayfeh, M. H., Observation of strong direct-like oscillator strength in the photoluminescence of Si nanoparticles. *Physical Review B* **2005**, 72 (20), 205307.
- [Sorarù 1996] Sorarù, G. D.; D'Andrea, G.; Glisenti, A., XPS characterization of gel-derived silicon oxycarbide glasses. *Mater. Lett.* **1996**, 27 (1-2), 1-5.
- [Srinivas 2002] Srinivas, P. R.; Barker, P.; Srivastava, S., Nanotechnology in early detection of cancer. *Lab. Invest.* **2002**, 82, 657.

- [Steinert 2007] Steinert, M.; Acker, J.; Oswald, S.; Wetzig, K., Study on the Mechanism of Silicon Etching in HNO₃-Rich HF/HNO₃ Mixtures. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (5), 2133-2140.
- [Strober 2001] Strober, W., *Monitoring Cell Growth*. John Wiley & Sons, Inc.: 2001.
- [Sun 2005] Sun, Q.-Y.; de Smet, L. C. P. M.; van Lagen, B.; Giesbers, M.; Thune, P. C.; van Engelenburg, J.; de Wolf, F. A.; Zuilhof, H.; Sudholter, E. J. R., Covalently Attached Monolayers on Crystalline Hydrogen-Terminated Silicon: Extremely Mild Attachment by Visible Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (8), 2514-2523.
- [Svedberg 1911] Svedberg, T.; Inouye, K., Eine neue Methode zur prufung der gultigkeit des Boyle-Gay-Lussacschen Gesetzes fur kolloide losungen. *Zeitschr. f. Physik. Chemie.* **1911**, *77*, 145-191.
- [Sweryda-Krawiec 1999] Sweryda-Krawiec, B.; Cassagneau, T.; Fendler, J. H., Surface Modification of Silicon Nanocrystallites by Alcohols. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (44), 9524-9529.
- [Swihart 2007] Swihart, M. T., *Nanotechnology in Biology and Medicine, Methods, Devices, and Applications*. CRC Press (T. Vo-Dinh): Boca Raton, 2007; Vol. 4.
- [Takeoka 2000] Takeoka, S.; Fujii, M.; Hayashi, S., Size-dependent photoluminescence from surface-oxidized Si nanocrystals in a weak confinement regime. *Physical Review B* **2000**, *62* (24), 16820.
- [Timasheff 1966] Timasheff, S. N., Turbidity as a criterion of coagulation. *J. Colloid Interface Sci.* **1966**, *21* (5), 489-497.
- [Timoshenko 2009a] Timoshenko, V., Light-Induced Generation of Singlet Oxygen in Porous Silicon. 2009a; pp 125-139.
- [Timoshenko 2009b] Timoshenko, V., *Sensors for Environment, Health and Security*. M.-I. Baraton: Dordrecht, Germany, 2009b; p 125- 129.
- [Tønnesen 2004] Tønnesen, H. H., *Photostability of Drugs and Drug Formulations*. 2 ed.; CRC Press: 2004.
- [Trindade 2001] Trindade, T.; O'Brien, P.; Pickett, N. L., Nanocrystalline Semiconductors: Synthesis, Properties and Perspectives. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 3843-3858.
- [Tsybeskov 1994] Tsybeskov, L.; Vandyshchev, J. V.; Fauchet, P. M., Blue emission in porous silicon: Oxygen-related photoluminescence. *Physical Review B* **1994**, *49* (Copyright (C) 2010 The American Physical Society), 7821.
- [Tutorskii 2005] Tutorskii, I. A.; Belogorokhov, A. I.; Ishchenko, A. A.; Storozhenko, P. A., Structure and Adsorption Properties of Nanocrystalline Silicon. *Colloid J.* **2005**, *67* (4), 491-496.
- [Valenta 2005] Valenta, J.; Janda, P.; Dohnalová, K.; Niznansky, D.; Vácha, F.; Linnros, J., Colloidal suspensions of silicon nanocrystals: from single

nanocrystals to photonic structures. *Optical Materials* **2005**, 27 (5), 1046-1049.

[Valeur 2002] Valeur, B., *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*. Wiley-VCH: Weinheim, Germany 2002.

[Visser 1999] Visser, N. V.; Hink, M. A.; van Hoek, A.; Visser, A. J. W. G., Comparison Between Fluorescence Correlation Spectroscopy and Time-Resolved Fluorescence Anisotropy as Illustrated with a Fluorescent Dextran Conjugate. *J. Fluoresc.* **1999**, 9 (3), 251-255.

[Von Behren 2000] Von Behren, J.; Wolkin-Vakrat, M.; Jorné, J.; Fauchet, P. M., Correlation of Photoluminescence and Bandgap Energies with Nanocrystal Sizes in Porous Silicon. *J. Porous Mater.* **2000**, 7 (1), 81-84.

[Wadt 1985] Wadt, W. R.; Hay, P. J., Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi. *J. Chem. Phys.* **1985**, 82 (1), 284-298.

[Wang 2007] Wang, X.; Zhang, R. Q.; Niehaus, T. A.; Frauenheim, T.; Lee, S. T., Hydrogenated Silicon Nanoparticles Relaxed in Excited States. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111 (34), 12588-12593.

[Wang 2009] Wang, Y.; Dierre, B.; Sekiguchi, T.; Yao, Y. Z.; Yuan, X. L.; Xu, F. J.; Shen, B., Surface effects on the luminescence degradation of hydride vapor-phase epitaxy-grown GaN induced by electron-beam irradiation. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* **2009**, 27 (4), 611-613.

[Wardman 1989] Wardman, P., Molecular mechanisms of oxygen and "electron-affinic" radiosensitizers. *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.* **1989**, 16 (1), 286-287.

[Wardman 1991] Wardman, P., The reduction potential of benzyl viologen: an important reference compound for oxidant/radical redox couples. *Free Radical Res. Commun.* **1991**, 14 (1), 57-67.

[Watanabe 1982] Watanabe, T.; Honda, K., Measurement of the extinction coefficient of the methyl viologen cation radical and the efficiency of its formation by semiconductor photocatalysis. *J. Phys. Chem.* **1982**, 86 (14), 2617-2619.

[Wilcox 2002] Wilcox, C. D.; Dove, S. B.; McDavid, W. D.; Greer, D. B. UTHSCSA ImageTool. <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>.

[Wilkinson 1993a] Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B., Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1993a**, 22 (1), 113-262.

[Wilkinson 1995a] Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B., Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. An Expanded and Revised Compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995a**, 24 (2), 663-677.

- [Wilkinson 1993b] Wilkinson, F.; McGarvey, D. J.; Olea, A. F., Factors governing the efficiency of singlet oxygen production during oxygen quenching of singlet and triplet states of anthracene derivatives in cyclohexane solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1993b**, *115* (25), 12144-12151.
- [Wilkinson 1995b] Wilkinson, F.; Worrall, D. R.; Williams, S. L., Primary Photochemical Processes of Anthracene Adsorbed on Silica Gel. *J. Phys. Chem.* **1995b**, *99* (17), 6689-6696.
- [Wilson 1993] Wilson, W. L.; Szajowski, P. F.; Brus, L. E., Quantum confinement in size-selected, surface-oxidized silicon nanocrystals. *Science* **1993**, *262* (5137), 1242-1244.
- [Wolkin 1999] Wolkin, M. V.; Jorne, J.; Fauchet, P. M.; Allan, G.; Delerue, C., Electronic states and luminescence in porous silicon quantum dots: The role of oxygen. *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *82* (1), 197-200.
- [Wu 2000] Wu, X. L.; Xiong, S. J.; Fan, D. L.; Gu, Y.; Bao, X. M.; Siu, G. G.; Stokes, M. J., Stabilized electronic state and its luminescence at the surface of oxygen-passivated porous silicon. *Physical Review B* **2000**, *62* (12), R7759.
- [Xu 1996] Xu, C.; Webb, W. W., Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, *13* (3), 481-491.
- [Yamani 1997] Yamani, Z.; Thompson, W. H.; AbuHassan, L.; Nayfeh, M. H., Ideal anodization of silicon. *Appl. Phys. Lett.* **1997**, *70* (25), 3404-3406.
- [Yang 1999] Yang, C.-S.; Bley, R. A.; Kauzlarich, S. M.; Lee, H. W. H.; Delgado, G. R., Synthesis of Alkyl-Terminated Silicon Nanoclusters by a Solution Route. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (22), 5191-5195.
- [Yang 2009] Yang, S.; Cai, W.; Liu, G.; Zeng, H.; Liu, P., Optical Study of Redox Behavior of Silicon Nanoparticles Induced by Laser Ablation in Liquid. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (16), 6480-6484.
- [Yu 2003] Yu, W. W.; Qu, L. H.; Guo, W. Z.; Peng, X. G., Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854-2860.
- [Zhang 1990] Zhang, S.-Z.; Lipsky, M. M.; Trump, B. F.; Hsu, I.-C., Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Cell Biology and Toxicology* **1990**, *6* (2), 219-234.
- [Zhang 2007] Zhang, X.; Neiner, D.; Wang, S.; Louie, A. Y.; Kauzlarich, S. M., A new solution route to hydrogen-terminated silicon nanoparticles: synthesis, functionalization and water stability. *Nanotechnology* **2007**, (9), 095601.
- [Zhou 2003] Zhou, Z.; Brus, L.; Friesner, R., Electronic Structure and Luminescence of 1.1- and 1.4-nm Silicon Nanocrystals: Oxide Shell versus Hydrogen Passivation. *Nano Lett.* **2003**, *3* (2), 163-167.
- [Zhuravlev 2000] Zhuravlev, L. T., The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Colloids Surf., A* **2000**, *173* (1-3), 1-38.