

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE QUIMICAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA FISICA



Tesis Doctoral

**Caracterización y propiedades catalíticas de
clústeres cuánticos subnanométricos**

David Buceta Fernández

Director:

Manuel Arturo López Quintela

Santiago de Compostela 2011

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE QUIMICAS

DEPARTAMENTO DE QUIMICA FISICA

Caracterización y propiedades catalíticas de clústeres cuánticos subnanométricos.

Memoria presentada por el Licenciado David Buceta Fernández
para optar al grado de Doctor en Químicas

Santiago de Compostela, 2011

Fdo.: David Buceta Fernández

Santiago de Compostela, 2011

**MANUEL ARTURO LOPEZ QUINTELA,
CATEDRÁTICO DE QUIMICA DEL DEPARTAMENTO
DE QUIMICA FISICA DE LA UNIVERSIDAD DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA**

CERTIFICA:

La presente tesis titulada: **“Caracterización y propiedades catalíticas de clústeres cuánticos subnanométricos”** que presenta David Buceta Fernández para optar al grado de Doctor en Química, ha sido realizada bajo mi dirección, en el Departamento de Química Física de la Facultad de Químicas de la Universidad de Santiago de Compostela, y hallándose concluida, autorizo su presentación para que sea evaluada por el tribunal correspondiente:

Y para que así conste, firmo en la presente en Santiago de Compostela, Septiembre, 2011.

Fdo. Manuel Arturo López Quintela

“When science can’t play a role, Imagination plays rock’n’roll”

V. Taubec

A mi madre
Y a mis hermanos

Agradecimientos

Cuando te sientas delante de una hoja que, salvo el título que dicta Agradecimientos, por lo demás está en blanco, automáticamente empiezas a hacer un balance de todos estos años de la gente que ha estado contigo, y de la gente que te ha tendido manos para ayudarte a recorrer el camino. Y realmente te das cuenta que son muchos, y seguramente pueda ser considerado una injusticia el sintetizar y elegir a unos pocos para rellenar esta página... Pero necesitaría, quizás, otra tesis, para exponer todo con su debida forma.

En primer lugar quiero agradecerse a **Arturo**, por varias razones. Por un lado por su forma de ver la ciencia, altamente contagiosa, por esa emoción y ese genio (del bueno) que le caracterizan, y por imprimirle a todo un color alucinante. Por otro lado, y más importante, por su empatía, nobleza y bondad, y por lo bien que SIEMPRE se portó conmigo.

A **Maricarmen**, sería mi madre científica, por siempre estar ahí, en cualquier situación y de cualquier forma, porque nunca hay una negativa en su boca, en definitiva, porque me ayudó muchísimo.

A **Fernando**, por sus maravillosas ideas.

A **Chema** (*Domo arigato gozaimazu!*) y a **Eldara** (*Oren Ishi*), porque sé que siempre puedo contar con ellos para cualquier cosa, por ser los que se encargaron, en varias ocasiones, no solo de regalarme risas y momentos increíbles, si no de agarrarme en mis levitaciones, y traerme de vuelta a la tierra.

A **Fran** y **Villa**, porque todos estos años no se separaron de mí, son importantísimos en mi vida.

A **Jose** y **Romain**, por noches en el laboratorio, por cafeses a cualquier hora, por conversaciones que te evaden de la realidad, a veces a varias dimensiones, ¿no es así?

A **Leonor**, **Very** y **Sara**, decir que esta tesis no sería lo mismo sin vuestras aportaciones, me estaría quedando corto, y mucho. Pero lo que tampoco sería lo mismo, son las risas, las discusiones, todos esos momentos que disfrutamos, a horas intempestivas, o en la distancia...

A **Misa**, por un lado aprendí muchísimo de él, y más que espero seguir aprendiendo. Por el otro, encontré a un amigo de verdad, allí en LI, y esto último es mucho más importante.

A **Ratko**, por lo que me enseñó, por esa sonrisa que tiene, y por nunca matarme cuando salían chorradas por mi boca...

A **Anuska**, por escucharme y aguantarme cuando se me da por descargar, sé que siempre estás.

A todo el **G4**, sois, maravillosos no, lo siguiente.

A **Javi**, porque soy un pesado, lo sé, pero él siempre sonrío, siempre tiene palabras buenas, es sencillamente genial.

A **Cronos**, por haber relativizado el tiempo tantas veces.

A **tí**, porque siempre estuviste conmigo, incluso cuando no podías, nunca me has abandonado.

A toda la **gente** de Japón, de Argentina, de NY, de todos esos lugares del mundo, que fueron sede de este trabajo.

A **Iria, Marcos, Nerio, Paula, Noe, Bea, Manolo, Ana, Elena, Jaco, Chucu, Anxo, Bea, Ramón, Mauro, Carol, Carlos, Ruth, Sara, Mary, Yuri...** Y toda esa gente que seguramente no esté poniendo aquí de forma injusta, pero que tendrían que estar, pero (seguramente por cansancio) no me acuerdo de poner ahora. Vosotros sois los que habéis convertido estos años en maravillosos.

Al **Ministerio de Educacion**, por otorgarme la beca FPU.

A **Diana**, por tener la habilidad de cargar con mochilas pesadas, a veces demasiado, por querer librarme de cualquier problema para que pudiese acabar, por ser sencillamente genial. Te quiero.

A **Dani**, porque llevamos juntos tanto tiempo que somos más que hermanos, porque está ahí pase lo que pase, y por encargarse de todo lo que se está encargando, para que yo no lo haga. Te quiero.

A mi **madre**, porque en definitiva ella es la culpable de esta situación. Sin duda ninguna. Ella fue la que sembró en mí este amor por la ciencia, el amor por estudiar, y por seguir adelante. Ella fue siempre un estándar en el que me fije para llegar a donde esto, y me fijaré para seguir hacia donde vaya. Por todos los valores que me fuiste inculcando, por enseñarme, básicamente, a pensar y ver el mundo. Te quiero.

Como decía antes, es muy difícil meter a todo el mundo aquí, en solo dos carillas, y me di cuenta que **REALMENTE** no me puedo quejar, de ninguna manera, pues se portó todo el mundo impresionantemente bien conmigo.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Microscopio de Fuerzas Atómicas
AQCs	Clústeres atómicos cuánticos subnanométricos
BG	<i>Bandgap</i>
CA	Carbón activado
CB	Banda de conducción
CV	Voltamperometría cíclica
DFT	Teoría del funcional de densidad
DOS	Densidad de estados
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAS	Síndrome de alcoholismo fetal
GC	Carbono vítreo
GC-RDE	Electrodo rotatorio de carbono vítreo
HOR	Reacción de electrooxidación de hidrogeno
LDI-TOF	Desorción/ionización laser- tiempo de vuelo
LSV	Voltametría de barrido lineal
m/z	Relación masa carga
MALDI	Desorción/ionización laser asistida por matriz
NP	Nanopartícula
NRK	Células renales de rata común
ORR	Reacción de electroreducción de oxígeno
PBS	Tampón fosfato salino
RDE	Electrodo de disco rotatorio
RHE	Potencial de referencia de hidrogeno
STM	Microscopio de efecto túnel
TAE	Tris acetato EDTA
TGA	Análisis termogravimétrico
UV-Vis	Ultravioleta Visible
VB	Banda de valencia

Prefacio

¿Un prefacio en una tesis?

Al menos resulta extraño... ¿verdad?

Porque lo cierto es que cuando uno abre un libro como el que ahora tengo entre mis manos no espera sumergirse en un relato emocionante. No se le pasa por la cabeza encontrar una historia de aventuras y misterio... o de guerreros surcando caminos imposibles y devastados paisajes para alcanzar su meta.

Sin embargo, estamos mucho más cerca de todas esas historias de lo que pensamos. Lo que ocurre es que, a veces, por culpa de la formalidad de las palabras, del peso de los hechos y de la minuciosidad de los procedimientos experimentales, nos alejamos de la esencia de lo que estamos leyendo.

Y es una pena.

Porque una tesis no es sólo esfuerzo, tiempo y un trabajo bien hecho. Una tesis es un increíble acto creativo. Es una parte de la búsqueda de la Utopía y del ejercicio del idealismo. En ella encontramos la visión y la interpretación personal de un fragmento de este mundo.

Y por eso cada una de estas páginas está impregnada de la fascinación y curiosidad de quien soñó, pensó e imaginó durante muchos días y noches... Quien fue capaz de emocionarse hasta lo increíble con la búsqueda y el descubrimiento. Y quien encontró en la belleza de hacer Ciencia... luz a raudales.

Él es nuestro héroe de la historia. Aquel que propuso la búsqueda y el camino. Quien viajó por zonas de su mente hasta para él insospechadas... quien dudó, se preguntó, se contestó y volvió a dudar... quien se sintió desfallecer en momentos de duda y oscuridad... de desgarró y enajenación. Pero que no se rindió.

Él es quien nos entrega hoy su obra para que revivamos esa experiencia única...

La de vivir la Ciencia como creación y belleza.

No perdamos la oportunidad de disfrutarla.

Contenido

OBJETIVOS	1
INTRODUCCION	5
1. “Nano”: Un oxímoron.....	7
2. Clústeres cuánticos subnanométricos: ¿Qué son exactamente?	10
3. Estructura de los clústeres.....	16
4. Propiedades de clústeres metálicos.....	21
4.1. Fotoluminiscencia	21
4.2. Catálisis	24
5. Síntesis de clústeres metálicos.....	25
5.1. <i>Top-down</i>	25
5.2. <i>Bottom-up</i>	26
MATERIALES Y METODOS	31
1. METODOS	33
1.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis.....	33
1.2. Fluorescencia	34
1.3. MALDI (Matrix- Assisted Laser Desorption/Ionization) y LDI-TOF (Laser Desorption/Ionization)	35
1.4. Microscopia de fuerzas atómicas (AFM).....	37
1.5. Análisis termogravimétrico (TGA)	38
1.6. Voltamperometria Ciclica (CV).....	38
1.7. Electrodo de disco rotatorio (RDE).....	41
1.8. Método de síntesis electroquímica.....	44
2. EXPERIMENTAL GENERAL	47
2.1. Técnicas de caracterización	47
2.2. Estudios electroquímicos: <i>Procedimientos generales</i>	49
2.3. HOR sobre AuAQC: Una electrocatálisis en 2D	51
2.4. Bioelectrocatalisis: Una conexión entre células electroquímicas y biológicas.....	54
2.5. Purificación: La búsqueda del clúster puro	58
HOR SOBRE AuAQC: UNA ELECTROCATALISIS EN 2D	65
1. Introducción	67
2. Estudio de los clústeres de oro: Caracterización	69
3. Electrocatalisis de oxidación de hidrógeno (HOR)	75
3.1. HOR sobre hilo de Au y nanopartículas de Au.....	75
3.2. HOR sobre AuAQC.....	79
3.3. HOR sobre HClO ₄	85

Contenido

3.4. Activación electroquímica de los clústeres: Cuestión de niveles energéticos	88
3.5. De la sal a la metaestabilidad	93
3.6. Conclusiones	94
BIOELECTROCATALISIS: UNA CONEXION ENTRE CELULAS ELECTROQUIMICAS Y BIOLÓGICAS	95
1. Introducción	97
2. Estudio de los clústeres de plata: Caracterización	99
3. Bioelectrocatalisis	106
3.1. Electrocatálisis de la oxidación de etanol en diferentes medios	106
3.2. Introduciéndonos en el medio biológico: Los clústeres de plata previenen las alteraciones inducidas por el alcohol en cultivos de células de mamíferos	113
3.3. Los clústeres oxidan el etanol solamente en presencia de células	116
3.4. Los clústeres son también citoprotectores en astrocitos de rata	117
3.5. Probando otros agentes tóxicos: Los clústeres de plata previenen alteraciones inducidas por otros alcoholes, pero no aquellas inducidas por los peróxidos	118
3.6. Tratando de entender la bioelectrocatalisis: Mecanismo	122
4. Conclusiones	125
PURIFICACION: LA BUSQUEDA DEL CLUSTER PURO	127
1. Introducción	129
2. Separación por electroforesis	129
2.1. Comprobación de la viabilidad del método	130
2.2. En busca de luz: Experimentos con clústeres fluorescentes	131
2.3. Efecto de los AgFAQs sobre la agarosa: el fin de una relación y sus inesperadas consecuencias.	136
2.4. Conclusiones y trabajo futuro	139
3. Separación mediante complejación selectiva	141
3.1. Objetivo, los iones: Extracción en disolventes orgánicos	141
3.2. Objetivo, clústeres: Una diálisis con ADN	161
4. Conclusiones generales	186
CONCLUSIONES GENERALES	187
REFERENCIAS	191
Referencias	193

Índice de Figuras

Figura 1- Gráfica del número de publicaciones en nanotecnología desde 1990 a 2004 ⁹	9
Figura 2- Inversión pública en nanotecnología reportada entre 1997-2005 ¹⁰	9
Figura 3- Relación de la variación de propiedades con el tamaño	10
Figura 4- Evolución de la dispersión frente al número de átomos de la partícula ¹³	12
Figura 5- Evolución del "band gap" y el DOS con el número de átomos de una partícula, desde el material masivo hasta los clústeres de pequeño tamaño	14
Figura 6- Espectro de absorción de (a) Ag NP (b) clústeres de plata de gran tamaño y (c) clústeres de plata de pequeño tamaño ¹⁸	15
Figura 7- Tabla periódica 3D dependiente del tamaño ¹⁸	17
Figura 8- (a) Ocupación de niveles de energía para esferas 3D, armónicos, intermedios y de pozo cuadrado. (b) Potencial efectivo de una esfera de Jellium correspondiente a Na40, están representada la ocupación electrónica de los niveles energéticos ²⁰	18
Figura 9- Comparación esquemática de los bandgaps de diferentes clústeres de Ag y Cu y aquellos que presentan ciertos semiconductores bien conocidos ¹⁸	19
Figura 10- Análisis de la estructura electrónica de clústeres de Au. La proyección del momento angular de la densidad de estados electrónica (PLDOS) para el núcleo de oro en (a) Au11(PH3)7Cl3, (b) Au11(PH3)7(SCH3)3, (c) Au39(PH3)14Cl6- and (d) Au102(p-MBA)44. El 0 de energía corresponde al medio de la transición HOMO-LUMO (línea discontinua). Cada uno de los estados electrónicos presentan un ajuste Gaussiano de 0,07 eV (0,03 en d). El número de capa cerrada está indicado en cada caso. Para más detalles, referencia ²¹	21
Figura 11- Estructuras calculadas teóricamente para clústeres de hasta 14 átomos. Se muestran los datos de simetría, estados electrónicos y energías relativas (eV) de la estructura de mínima energía{{60 Li,Xi-Bo 2007}}	23
Figura 12- Emisión azul, observada para clústeres de Cu de menos de 14 átomos, a una excitación de 296 nm ²⁶	24
Figura 13- Absorción inespecífica de clústeres de Au protegidos con DHLA no conjugados por células endoteliales humanas. El núcleo celular fue tratado para emitir en el azul. La fluorescencia roja corresponde a los clústeres. Más información Ref ²⁸	25
Figura 14- Esquema representativo de los dos tipos de ataques posibles en la formación de clústeres por etching de nanopartículas protegidas con ácido mercaptosuccínico ³⁴	27
Figura 15- Representación esquemática del método bottom-up ¹⁸	28
Figura 16- Representación esquemática de la variación de la energía libre en la síntesis de nanopartículas ¹⁸	29
Figura 17- Barridos de potencial directo e inverso	41
Figura 18- Voltamperometría cíclica del par redox Fe2+/Fe3+	42
Figura 19- Esquema cualitativo de (a) las velocidades tangencial y radial del fluido en las inmediaciones del disco y (b) líneas de flujo resultantes ⁴⁶	44
Figura 20- Variación de i con $\omega^{1/2}$ en RDE, para una reacción electroquímica de cinética lenta ⁴⁶	46
Figura 21-: Modelo para la estabilización de clústeres metálicos con iones tetrabutilamonio	48
Figura- 22 Espectro de absorción en UV-Vis de la muestra de AuAQC. En la ampliación se muestran las bandas discretas que aparecen alrededor de 280 nm	74
Figura 23- Espectros de emisión de AuAQC a diferentes longitudes de onda de excitación	74
Figura 24- Espectros LDI-TOF. (A), positivo y (B), negativo	76

Indice de Figuras

Figura 25- Imágenes de AFM de la disolución acuosa de clústeres de oro depositados en mica. A la derecha detalle 3D de una isla individual	77
Figura 26- Imágenes de AFM (2D y 3D) de mica limpia	77
Figura 27- Perfil voltamétrico de un hilo de oro policristalino en HClO_4 0,1M. Velocidad de barrido: 10 mV/s	78
Figura 28- Barrido 70 de un hilo de oro policristalino en HClO_4 0,1M saturado con H_2 . Velocidad de barrido: 10 mV/s	79
Figura 29- Perfil voltamétrico de AuNPs de 30 nm en HClO_4 0,1M. Velocidad de barrido: 10 mV/s	80
Figura 30- Barrido 70 de AuNps/C en HClO_4 0,1M saturado con H_2 . Velocidad de barrido: 10 mV/s	80
Figura 31- Diferentes barridos de la HOR sobre AuAQC/GC en HClO_4 0,1M saturado con H_2 . Velocidad de barrido: 10 mV/s. Velocidad de rotación: 1600 rpm	82
Figura 32- Perfil voltamétrico de AuAQC en HClO_4 0,1M. Velocidad de barrido: 10 mV/s. Ampliación mostrando la zona de adsorción de OH sobre el electrodo modificado con AuAQC	83
Figura 33- HOR sobre AuAQC/GC en HClO_4 0,1M saturado con H_2 . Velocidad de barrido: 10 mV/s. Velocidades de rotación: indicadas en la gráfica	84
Figura 34- Representaciones de Levich de las corrientes de oxidación medidas a diferentes potenciales	85
Figura 35- Representaciones de Koutecky-Levich de las corrientes de oxidación medidas a diferentes potenciales	86
Figura 36- Representaciones de j_{kin} frente al potencial (E)	87
Figura 37- Perfil voltamétrico de HAuCl_4/GC en HClO_4 0,1M. Velocidad de barrido: 10 mV/s	88
Figura 38- Sucesivas voltametrías de HAuCl_4/GC en HClO_4 0,1M saturada con H_2 . Velocidad de barrido: 10 mV/s	88
Figura 39- Sucesivas voltametrías de HAuCl_4/GC en HClO_4 0,1M saturada con H_2 . Velocidad de barrido: 10 mV/s. Velocidad de rotación: 1600 rpm	89
Figura 40- Desactivación en barridos sucesivos de HAuCl_4/GC en HClO_4 0,1M saturada con H_2 . Velocidad de barrido: 10 mV/s. Velocidad de rotación: 1600 rpm	90
Figura 41- Representación esquemática del comportamiento electrocatalítico de clústeres de pequeño, medio y gran tamaño, así como de nanopartículas y metal masivo	91
Figura 42- Imágenes de AFM de la disolución acuosa de clústeres de plata depositados en mica (rugosidad media ~ 150 pm). Debajo de cada una de las imágenes puede verse el histograma de tamaños correspondiente. A la derecha de cada imagen puede verse el perfil de los fragmentos seleccionados	102
Figura 43- Espectro de absorción UV-Visible de la muestra de AgAQC	104
Figura 44- Espectros de emisión de los clústeres de plata a una longitud de onda de excitación de 230 nm	104
Figura 45- Voltamograma cíclico de la muestra de clústeres de plata (AgAQC) en H_2SO_4 1M. Velocidad de barrido: 20 mV/s	106
Figura 46- Voltamogramas cíclicos de la muestra de (arriba) clústeres de plata (AgAQC) sin iones y (abajo) de AgNO_3 , comparados con carbono vítreo en H_2SO_4 1M. Velocidad de barrido: 20 mV/s	107
Figura 47- Voltamograma cíclico de la muestra de clústeres de plata (AgAQC) sin iones comparado con carbono vítreo en H_2SO_4 1M. Velocidad de barrido: 20 mV/s	108
Figura 48- Electrocatalisis de la oxidación de etanol sobre clústeres de plata (AgAQC). Voltametrías de barrido lineal para diferentes concentraciones de etanol en medio ácido (A, H_2SO_4 1M) y básico (B, NaOH 1M) Velocidad de barrido: 50 mV/s	109

Índice de Figuras

Figura 49-(A) Blanco. Voltametrías de barrido lineal en una disolución blanco para diferentes velocidades de barrido. (B) Voltametrías de barrido lineal para la electrooxidación de etanol en medio ácido a diferentes velocidades de barrido. (C) Dependencia de la velocidad de barrido 0,5 V mostrando un control difusivo	110
Figura 50-(A) Blanco. Voltametrías de barrido lineal en una disolución blanco para diferentes velocidades de barrido. (B) Voltametrías de barrido lineal para la electrooxidación de etanol en medio básico a diferentes velocidades de barrido. (C) Dependencia de la velocidad de barrido 0,4 V mostrando un control difusivo.	111
Figura 51- Representación esquemática del comportamiento electrocatalítico de clústeres de plata de pequeño y medio tamaño frente a la electrooxidación de alcoholes	112
Figura 52-Electrocatalisis de la oxidación de etanol sobre clústeres de plata (AgAQC)s. Voltametrías de barrido lineal para diferentes concentraciones de etanol en medio fisiológico (PBS 1 M) con ampliación de la zona de interés electrocatalítico. Velocidad de barrido: 50 mV/s	114
Figura 53- (A) Las células expuestas a etanol (200 mM) fueron incubadas en la ausencia y presencia de clústeres (1 µg/ml) durante 30 min. La morfología celular y la organización del citoesqueleto de actina (F-actina) fueron evaluadas por microscopia de epifluorescencia usando FITC-phalloidin. La activación de la caspasa fue evaluada usando inmunofluorescencia por la presencia de fragmentos proteolíticos de caspasa-3. Barra de escalado, 20 µm. (B) Análisis cuantitativo de los resultados del panel A de la relación células redondeadas/células totales (C) Relación entre actina globular y filamentosa para células sin exponer y expuestas a etanol con y sin clústeres. (D) Análisis de inmunoblot para las células sin exponer y expuestas a etanol con y sin clústeres. La activación de la caspasa-3 fue evaluada usando antibióticos contra los fragmentos de caspasa-3. La α -tubulina fue usada como control	117
Figura 54- Determinación de la concentración de etanol (200 mM inicial) en el medio de cultivo con AgAQC)s (1 µg/ml) después de 30 min en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de células NRK	118
Figura 55-(A) Células de astrocitos de rata no expuestas (control) y células expuestas a etanol (500 mM) fueron incubadas en la ausencia y presencia de clústeres (1 µg/ml) durante 30 min. La morfología celular y la organización del citoesqueleto de actina (F-actina) fueron evaluadas por microscopia de epifluorescencia usando FITC-phalloidin. Barra de escalado, 20 µm. (B) Análisis cuantitativo de los resultados del panel A de la relación células redondeadas/células totales	120
Figura 56-Electrocatalisis de la oxidación de metanol (izquierda) y butanol (derecha) sobre clústeres de plata (AgAQC)s. Voltametrías de barrido lineal para diferentes concentraciones de ambos alcoholes a diferentes concentraciones en medio fisiológico (PBS 1 M) con ampliación en la zona de interés electrocatalítico. Velocidad de barrido: 50 mV/s	121
Figura 57-(A) Células NRK no expuestas (control) y células expuestas a metanol (50 mM) y butanol (25 mM) fueron incubadas en la ausencia y presencia de clústeres (1 µg/ml) durante 30 min. La morfología celular y la organización del citoesqueleto de actina (F-actina) fueron evaluadas por microscopia de epifluorescencia usando FITC-phalloidin. Barra de escalado, 20 µm. (B) Análisis cuantitativo de los resultados del panel A de la relación células redondeadas/células totales	122
Figura 58-Electrocatalisis de la reducción de peróxido de hidrogeno sobre clústeres de plata (AgAQC)s. Barridos de reducción de la voltametría cíclica para medio ácido (H_2SO_4 1 M) y fisiológico (PBS 1 M) en atmósfera de N_2 sin H_2O_2 (línea negra) y con peróxido (línea turquesa) y en atmósfera de O_2 sin H_2O_2 (línea punteada) y con H_2O_2 (líneas naranja, ácido, y morada, PBS). Velocidad de barrido: 50 mV/s	123
Figura 59-(A) Células NRK no expuestas (control) y células expuestas a H_2O_2 (250 µM) fueron incubadas en la ausencia y presencia de clústeres (1 µg/ml) durante 30	

Indice de Figuras

<i>min. La morfología celular y la organización del citoesqueleto de actina (F-actina) fueron evaluadas por microscopia de epifluorescencia usando FITC-phalloidin. Las flechas rojas indican típica morfología redondeada producida por el H₂O₂. Barra de escalado, 20 µm. (B) Análisis cuantitativo de los resultados del panel A de la relación células redondeadas/células totales</i>	123
Figura 60- Mecanismo propuesto para el proceso de bioelectrocatalisis	126
Figura 61- Espectro de absorción UV-Visible de AgFAQCs	134
Figura 62- Espectros de emisión y excitación de AgFAQCs	134
Figura 63- Imágenes de AFM de AgFAQCs depositados en mica (rugosidad media ~150 pm). (arriba) Imágenes 3D. (abajo) Imágenes 2D. Bajo cada una de las imágenes puede verse el histograma correspondiente en nanómetros. A la derecha de cada imagen puede verse el perfil de los fragmentos seleccionados, en picómetros	135
Figura 64- Imagen de la fluorescencia mostrada por los AgAQFCs depositados en un portaobjetos de vidrio	136
Figura 65- Electroforesis de AgFAQCs en geles 3 geles diferentes de agarosa a 1,5% en disoluciones electrolíticas de NaCl, NaClO ₄ y TAE a 60 V y (A) 20 min y (B) 40 min. Se muestra en la parte derecha la posición de los electrodos negativo y positivo	137
Figura 66- Geles de agarosa tras electroforesis de AgFAQCs sin glicerol en: (arriba) NaCl 1 mM. A los 10 min Izquierda: Emisión fluorescente en GelDoc® y Derecha: Imagen con luz blanca. (abajo) TAE 1mM. Izquierda: 20 min y Derecha: 40 min	141
Figura 67- Disoluciones con diferentes relaciones de Rodanina e iones. Izquierda-derecha: 1:0,25/1:0,5/1:0,75/1:1/1:1,5/1:2/1:3/1:4	144
Figura 68- Detalle de la formación del precipitado rojo, así como del cambio de color en la disolución de diferentes disoluciones de Rh:Ag ⁺ tras 48 h. Izquierda-derecha: 1:0,25/1:0,5/1:0,75/1:1/1:1,5/1:2/1:3/1:4	145
Figura 69- Espectros de UV-Vis de las disoluciones Rodanina e iones con diferentes relaciones (arriba) antes de la centrifugación y (abajo) después de la centrifugación	146
Figura 70- Imagen de electroforesis en TAE de Rodanina, Rodanina con AgFAQCs y Rodanina con iones	147
Figura 71- Espectros de la fase acuosa resultante de la extracción de clústeres de plata con ciclohexano: absorción de (negro) la fase acuosa y de (rojo) la muestra inicial	149
Figura 72- Espectro de absorción de (negro) la fase orgánica resultante de la extracción de clústeres de plata con ciclohexano y de (rojo) la muestra inicial, en disolución acuosa	150
Figura 73- Espectros de absorción de las fases orgánicas resultante de dos extracciones con ciclohexano, una tras secarse con Na ₂ SO ₄ anhidro (negro) y la otra sin secarse (rojo)	152
Figura 74- Espectros de absorción de las fases acuosas (arriba) y orgánicas (abajo) resultantes de dos extracciones con ciclohexano, agitando con ultrasonidos (rojo) y la otra sin ultrasonidos (negro)	153
Figura 75- Espectro de absorción de (negro) la fase acuosa resultante de la extracción de clústeres de plata con diclorometano y de (rojo) la muestra inicial, en disolución acuosa	154
Figura 76- Espectro de absorción de (negro) la fase orgánica resultante de la extracción de clústeres de plata con diclorometano y de (rojo) la muestra inicial, en disolución acuosa	155
Figura 77- Espectro de absorción de (negro) la fase acuosa resultante de la extracción de clústeres de oro con ciclohexano y de (rojo) la muestra inicial, en disolución acuosa	158

Indice de Figuras

Figura 78- Espectro de absorción de (negro) la fase orgánica resultante de la extracción de clústeres de oro con ciclohexano y de (rojo) la muestra inicial, en disolución acuosa	159
Figura 79- Espectro de absorción de (negro) la fase acuosa resultante de la extracción de clústeres de oro con diclorometano y de (rojo) la muestra inicial, en disolución acuosa	160
Figura 80- Espectro de absorción de (negro) la fase orgánica resultante de la extracción de clústeres de oro con diclorometano y de (rojo) la muestra inicial, en disolución acuosa	161
Figura 81- Esquema de los procesos de interacción entre Rodanina, clústeres, iones y disolventes orgánicos	162
Figura 82- Electroforesis de (izquierda) ADN tratado con AgAQCs y (derecha) ADN libre	165
Figura 83- Espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión (exc=230 nm) de AgAQCs	166
Figura 84- Espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión (exc=230 nm) de AgAQC diluidos	167
Figura 85- Espectro de emisión (exc=230 nm) de AgAQC sin iones	168
Figura 86- Espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión (exc=230 nm) de AgAQC diluidos procedentes de AgNO ₃ (aq)	169
Figura 87- Variación de los espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión (exc=230 nm) de una disolución de AgNO ₃ a la luz, en función del tiempo	170
Figura 88- Variación de los espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión (exc=230 nm) de una disolución de AgAQC con iones a la luz, en función del tiempo	172
Figura 89- Variación de los espectros de emisión (exc=230 nm) de una disolución de AgNO ₃ almacenada a 4°C en vial opaco, en función del tiempo	173
Figura 90- Variación de los espectros de emisión (exc=230 nm) de una disolución de AgNO ₃ bajo una corriente de O ₂ en función del tiempo	174
Figura 91- Espectro de emisión (exc=230 nm) de AgAQC bajo una corriente de O ₂ (negro) inicial y (rojo) tras 20 h	175
Figura 92- Espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión (exc=230 nm) de ADN	176
Figura 93- Fotografía que muestra un cartucho de diálisis de 3,5 kDa sumergido en H ₂ O MiliQ con agitación. La muestra se encuentra en el compartimento central	178
Figura 94- Espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión (exc=230 nm) de la fase acuosa externa de la 1ª diálisis de ADN/AgAQC en H ₂ O tras 24 h	180
Figura 95- Espectro de emisión (exc=230 nm) de la fase acuosa externa de la segunda diálisis de ADN/AgAQC en H ₂ O tras 24 h	181
Figura 96- Espectros de emisión fluorescente (exc 230 nm) de la tercera y cuarta diálisis de ADN/AgAQC	181
Figura 97- Espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión (exc=230 nm) de los resultados de la extracción final de la diálisis de ADN/AgAQC en H ₂ O tras 24 h	183
Figura 98- Espectro de emisión fluorescente (exc 230 nm) de la primera diálisis de ADN/AgNO ₃	184
Figura 99- Espectro de emisión fluorescente (exc 230 nm) de la segunda diálisis de ADN/AgNO ₃	185
Figura 100- Espectro de emisión fluorescente (exc 230 nm) de la extracción final de la diálisis de ADN/AgNO ₃	185
Figura 101- Esquema del proceso de diálisis	188

OBJETIVOS



Objetivos

El objetivo general de esta tesis es tratar de buscar posibles relaciones entre el tamaño de clústeres metálicos subnanométricos y su actividad electrocatalítica en reacciones químicas de interés tecnológico. En este contexto se incluyen la caracterización de las propiedades fisicoquímicas de dichos clústeres, el diseño de nuevos protocolos para su purificación y la determinación de su actividad catalítica en reacciones seleccionadas por su interés en áreas de importancia actuales, como biomedicina y obtención energía.

Con este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar posibles correlaciones entre las propiedades físicas y químicas de clústeres de Au de pequeño número de átomos y su actividad catalítica frente a la electrooxidación de hidrógeno.
2. Elucidar los aspectos físicos y químicos que controlan la actividad bioelectrocatalítica de clústeres de Ag de pequeño número de átomos en la oxidación de etanol, metanol y butanol, así como en la reducción de peróxido de hidrógeno.
3. Optimizar el diseño de un protocolo de purificación escalable de clústeres subnanométricos de Ag y Au.

Para la correcta exposición de los resultados obtenidos, se divide este trabajo en 5 capítulos:

En el primer capítulo de Introducción se describe el estado del arte del tema y se establece la motivación del trabajo en el contexto actual de la problemática expuesta. Además, se comenta en ella las propiedades principales de los clústeres subnanométricos, actores principales de este trabajo.

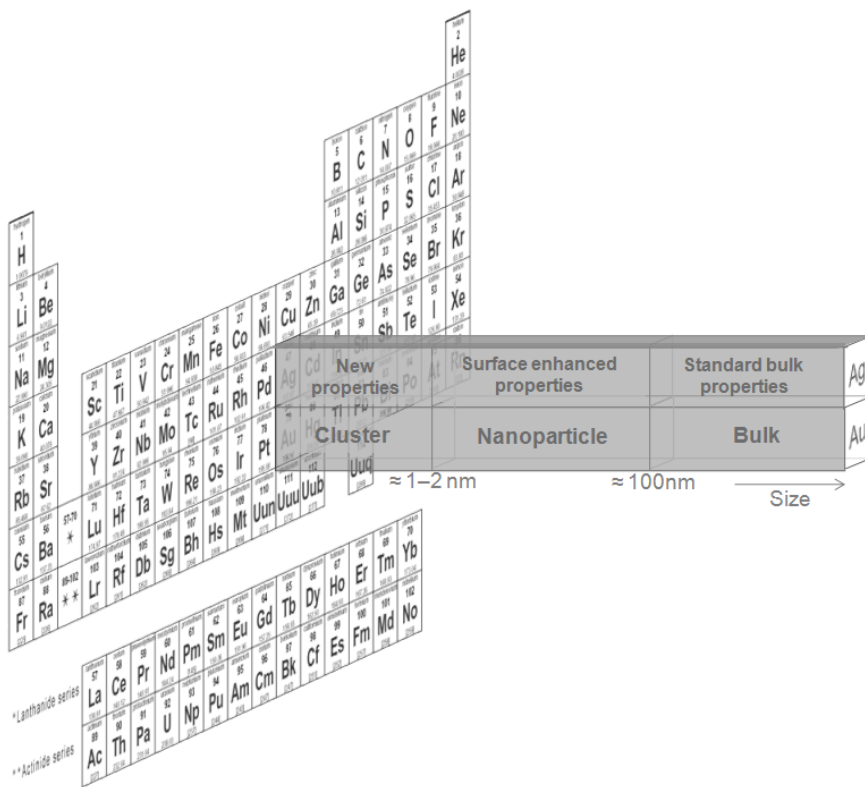
El segundo capítulo describe los materiales y métodos utilizados a lo largo del trabajo. En él se expone un *dossier* explicativo de las técnicas utilizadas, así como un resumen del proceso experimental seguido a lo largo de todo el trabajo.

El tercer capítulo titulado “HOR sobre AuAQC: Una electrocatálisis en 2D” está centrado en la caracterización y actividad electrocatalítica de clústeres planos de oro frente a la electrooxidación de hidrógeno.

El capítulo cuarto se titula: “Bioelectrocatalisis: Una conexión entre células electroquímicas y biológicas”. En primer lugar se exponen los resultados de la caracterización de los clústeres de Ag utilizados para, posteriormente, analizar su comportamiento electrocatalítico frente a diversas reacciones, primero en una celda electroquímica y luego en células mamíferas.

El quinto y último capítulo que tiene por título: “Purificación: La búsqueda del clúster puro” se describen los experimentos que se llevaron a cabo para el diseño de un protocolo general de purificación de clústeres.

INTRODUCCION



1. “Nano”: Un oxímoron

El prefijo *nano* se ha convertido en las últimas décadas en un oxímoron. Según la Real Academia de la lengua española, *nano*, del latín *nanus*, enano, significa una milmillonésima parte. Sin embargo, en el mundo científico da nombre a una disciplina que podría ser la revolución científica de nuestro tiempo, la nanotecnología.

“There is plenty of room at the bottom”, bajo este título Richard Feynman, premio Nobel de física en 1965, dejó perpleja a su audiencia en un discurso pronunciado en el encuentro anual de la American Physical Society, el 29 de Diciembre de 1959¹. En este discurso, encontrando su musa en los sistemas biológicos en los que la información se guarda a nivel molecular, expuso la importancia y necesidad del estudio de la materia a nivel “nanoscópico”.

Sin embargo, fueron los chinos y los egipcios², ya en el siglo V a.c., los primeros en sintetizar y utilizar nanopartículas en sus pociones curativas, cerámica, porcelana y cristal, sin siquiera saberlo³. También lo hicieron los míticos “alquimistas” árabes, quienes utilizaban una disolución de nanopartículas de oro en su famoso elixir de la juventud, o poción del oro potable. Pero quizás el ejemplo más conocido de esta índole sea la *Lycurgus cup*, que aún hoy puede ser admirada en el British Museum de Londres⁴.

En realidad, la nanotecnología está con nosotros desde nuestro nacimiento. Desde que salimos del útero, la matriz interna que nos llena, es un nanofluido, la sangre. Nuestro primer alimento contiene nanopartículas de caseína, la leche. Con el tiempo cambiaremos la leche por los refrescos, embotellados en PET, que contienen nanopartículas para conservar el sabor de los mismos, y prevenir su degradación por efecto de la luz UV. Más tarde, de vez en cuando, tomaremos una copa de whisky, que contiene nanopartículas en disolución⁵.

Lo difícil, por tanto, no era descubrir las nanopartículas, si no el darse cuenta de que estaban ahí. Es precisamente eso lo que convierte las palabras de Feynman en una genialidad para la posteridad.

Introducción

Sin embargo, en la época de Feynman, las intenciones podrían ser más o menos buenas, pero existían verdaderas limitaciones para el estudio y caracterización de nanoestructuras.

Tuvo que esperarse a la década de los 80, cuando un alemán y un suizo, Gerd Binnig y Heinrich Röhrer, revolucionaron el mundo de la microscopía con la invención de microscopio de efecto túnel (STM)⁶, lo que les llevó hacia el Nobel en 1986. El principio de funcionamiento de este microscopio se basa en un efecto mecanocuántico y consiste en detectar una corriente eléctrica túnel, no permitida clásicamente pero si cuánticamente, entre una punta de dimensiones atómicas y una superficie. Analizando la corriente cuando la punta se mueve paralelamente a la superficie se pueden visualizar átomos como entidades independientes, uno por uno.

La cosa no quedo ahí, tan sólo un par de años después, el mismo Binnig, esta vez con otros dos colaboradores, Christoph Gerber, de Suiza y Calvin Quate de California, dio un paso más con el desarrollo del microscopio de fuerzas atómicas (AFM)⁷, cuyo fundamento se explicará más adelante, considerado por muchos el pináculo de la tecnología en microscopía.

Ahora, que se tenían ojos capaces de “ver”, e incluso herramientas capaces de manipular la materia a nivel nanoscópico, es cuando se acuña lo que a partir de ahí se conocerá como nanopartícula, aunque fue Faraday el que, por primera vez, hizo uso del término, allá por el año 1857⁸.

Desde entonces, hasta nuestros días, la nanotecnología ha crecido en adeptos de forma exponencial. Esto puede verse reflejado tanto en el número de publicaciones por año, como en el dinero que se invierte en su investigación (Figura 1⁹ y Figura 2¹⁰).

Un ejemplo claro es el campo de la medicina. Hoy en día, de hecho, algunas de las aventuras narradas en el viaje alucinante de Isaac Asimov¹¹, no se considerarían ya de ciencia ficción. La manipulación de la materia a nivel “nanoscópico” ha permitido, entre muchos otros avances, el desarrollo de nanotransportadores, que permiten dirigir un fármaco determinado a la zona

Introducción

afectada de una forma localizada, sin afectar de forma apreciable a ningún órgano adyacente¹².

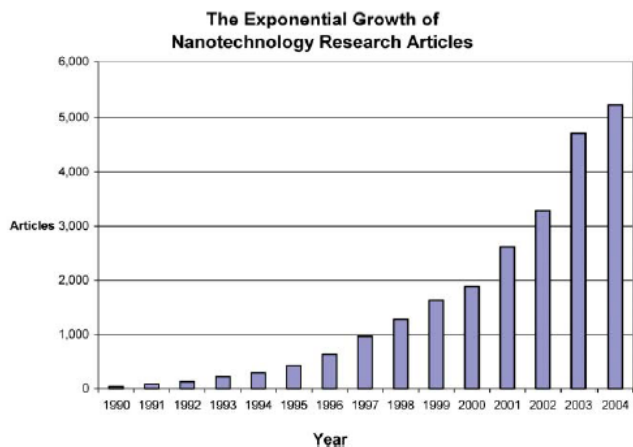


Figura 1- Grafica del número de publicaciones en nanotecnología desde 1990 a 2004⁹

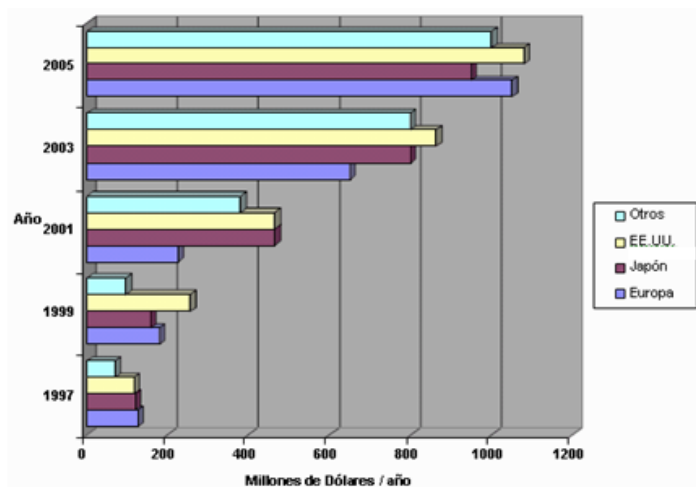


Figura 2- Inversión pública en nanotecnología reportada entre 1997-2005¹⁰

Pero una pregunta surge por sí sola, ¿por qué el gran auge de esta nueva disciplina?

Durante muchos años se creyó que las propiedades de un material deberían converger suavemente desde el caso atómico mecanocuántico a otro macroscópico clásico, de acuerdo con la figura:

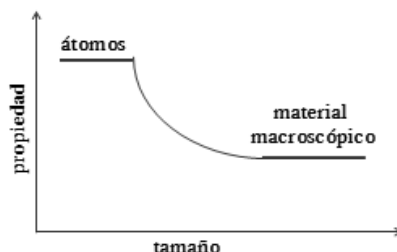


Figura 3- Relación de la variación de propiedades con el tamaño

Nada en especial se esperaba en esta zona de transición, pero dado que las propiedades de cada átomo y las colectivas de un material macroscópico no coinciden, se hizo necesario investigar experimentalmente lo que sucede en dicha zona. Por otra parte, los cálculos mecanocuánticos son extraordinariamente complejos, aún cuando se trate de su aplicación al cálculo de un reducido número de unidades atómicas como las que forman los nanomateriales.

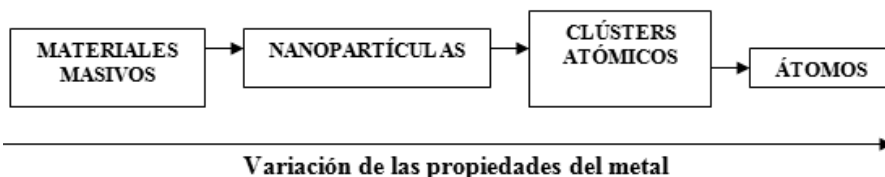
Sorprendentemente, sin embargo, se encontró que las propiedades en esta zona de transición eran totalmente nuevas, y que no tenían nada que ver con las del material macroscópico o las de los átomos. Ello es debido a la dependencia que tienen las propiedades electrónicas, ópticas, magnéticas, etc. de ciertos fenómenos espaciales, como el recorrido libre medio de los electrones o la longitud de onda de determinada radiación. En el momento en el que el tamaño de la partícula es comparable al de dichos fenómenos, las propiedades sufren variaciones, totalmente inesperadas, que dotan a estas partículas de características únicas y de importancia en muchas áreas, como la biotecnología, la industria electrónica, la catálisis, la medicina y la farmacología.

2. Clústeres cuánticos subnanométricos: ¿Qué son exactamente?

Una vez sumergidos definitivamente en el mundo de los nanomateriales, no llevó demasiado tiempo entender que podían encontrarse grandes diferencias en las propiedades de estos sistemas al cambiar el tamaño desde los cientos de nm hasta el límite cercano al nm. Se concluyó, así, que resultaba fundamental hacer una nueva división en función del tamaño. Surgen entonces dos términos

Introducción

bien diferenciados: las nanopartículas (NPs, desde $\approx 1\text{nm}$ hasta 100 nanómetros de tamaño) y los clústeres atómicos (menos de 100-200 átomos, es decir, menos de $\approx 1\text{ nm}$).



El reducido tamaño de las nanopartículas y de los clústeres otorga a estos materiales, en primer lugar, una elevada relación superficie-volumen no presente en el material masivo, lo cual les confiere una especial relevancia en determinadas aplicaciones.

La fracción de átomos en la superficie, o dispersión, es proporcional a esta relación superficie-volumen e inversamente proporcional al radio de la partícula lo que hace que sea inversamente proporcional a $N^{1/3}$ (siendo N el número de átomos de la partícula) (Figura 4)¹³.

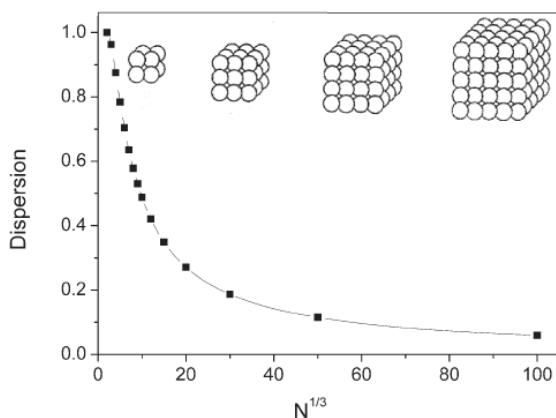


Figura 4- Evolución de la dispersión frente al número de átomos de la partícula¹³

En consecuencia, toda propiedad que dependa de dicha dispersión variará proporcionalmente a la inversa del radio o a $N^{-1/3}$. Sin embargo, existe un

Introducción

tamaño crítico, comparable a la longitud de onda de Fermi del electrón ($\approx 0,52$ nm para Au y Ag), en el que las propiedades cambian drásticamente en comparación a lo que se espera en el caso de que las mismas dependan únicamente de su relación superficie/volumen.

Por tanto, se hace necesario establecer una diferencia clara entre nanopartícula y clúster metálicos.

Se considera una *nanopartícula* (más de 100-200 átomos), cualquier partícula de metal masivo cuyas dimensiones se encuentran en la nanoescala. Estas partículas presentan, en la mayoría de los casos, una estructura tipo cor-corona, con un núcleo de metal masivo rodeado de una corona de átomos desordenados, cuyas propiedades dependen fundamentalmente de su relación superficie/volumen.

Un *clúster atómico metálico* (menos de 100-200 átomos), consiste en un grupo de átomos con una composición bien definida y una o muy pocas estructuras geométricas estables. Representan los componentes más elementales en la naturaleza, después de los átomos, y se caracterizan por su tamaño, comparable a la longitud de onda de Fermi de un electrón. Debido a este reducido tamaño, presentan efectos cuánticos lo que los convierte en puente entre los átomos y las nanopartículas o el metal masivo. Dichos efectos cuánticos, son los responsables de la aparición de propiedades químicas, ópticas o electrónicas totalmente nuevas, tales como magnetismo, fotoluminiscencia o actividad catalítica.

Cuando pasan a formar parte de un sólido, y dependiendo de su grado de solapamiento, los orbitales de un átomo pueden permanecer prácticamente inalterados (como en el caso de los gases nobles) o pueden combinarse para formar bandas continuas, como en el caso de conductores y semiconductores¹⁴.

Cada átomo contribuye con sus orbitales atómicos a una banda cuya densidad se incrementa ligeramente a medida que se van añadiendo más átomos a la estructura. Estas bandas están caracterizadas por lo que se llama densidad de estados (DOS, Density of states). Por tanto, para el material masivo el DOS será continuo. Sin embargo, al reducir drásticamente el número de átomos de una

Introducción

partícula, esta banda continua es paulatinamente reemplazada por niveles discretos de energía.

Se alcanza un umbral importante cuando la diferencia energética entre el mayor estado ocupado y el menor desocupado (*bandgap*, E_g) iguala a la energía térmica¹⁵. Cuando sucede esto, un aislante a bajas temperaturas pasa a ser un semiconductor y a altas temperaturas, un metal.

Otra evidencia del comportamiento cuasi-molecular de los clústeres es que, a diferencia de las nanopartículas, los clústeres están caracterizados por orbitales moleculares deslocalizados en lugar de por bandas, y que el *bandgap* se hace lo suficientemente grande como para recordar al HOMO-LUMO molecular^{16, 17}. Puede verse un esquema en la Figura 5

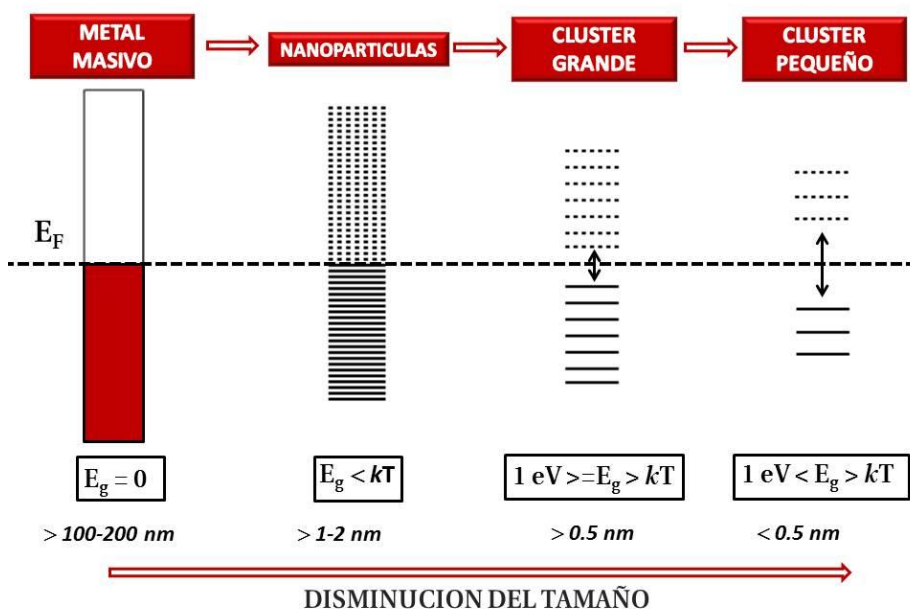


Figura 5- Evolución del “band gap” y el DOS con el número de átomos de una partícula, desde el material masivo hasta los clústeres de pequeño tamaño

En general, los clústeres se pueden dividir en dos grupos principales, clústeres grandes ($\approx 10-20$ hasta $100-200$ átomos) y clústeres pequeños (≈ 2 a $10-20$

Introducción

átomos). El *bandgap* de estos clústeres aumenta cuando se reduce el tamaño de los mismos.

Los clústeres grandes, están formados por un núcleo de metal protegido por una corona de ligandos fuertes, como dendrímeros, fosfinas o tioles. Su *bandgap* es menor o igual que 1 eV.

Los clústeres pequeños tienen un número muy bajo de átomos y están dispuestos de manera tal que prácticamente todos se encuentran en la superficie. Además, no necesitan ningún ligando fuerte como estabilizante. Su *bandgap* es mayor que 1 eV.

Un ejemplo claro de la variación que los efectos cuánticos introducen en las propiedades de los clústeres respecto a las nanopartículas puede encontrarse en sus propiedades ópticas.

La banda plasmónica superficial (SPB) es característica de nanopartículas metálicas. Esta es debida a la interacción entre los electrones presentes en la superficie de la partícula y el campo eléctrico oscilante que crea una onda electromagnética cuando la λ de De Broglie es del mismo orden que el tamaño de la partícula. En este caso las partículas se comportan electrónicamente como puntos de dimensión cuántica cero (o cajas cuánticas). De acuerdo con las reglas mecanocuánticas, los electrones que estén moviéndose libremente serán atrapados en la caja, dando una frecuencia de oscilación colectiva característica de la resonancia del plasma.

Es de esperar, por tanto, que el cambio en la densidad de estados energéticos sea determinante de las propiedades ópticas. En efecto, la banda plasmónica desaparece para tamaños menores de 1-2 nm, cuando entramos en la región de los clústeres, debido a la aparición del *bandgap*. Los electrones de conducción, antes libres, se encuentran ahora “atrapados” y el clúster pierde así su “carácter metálico” (Figura 6)¹⁸.

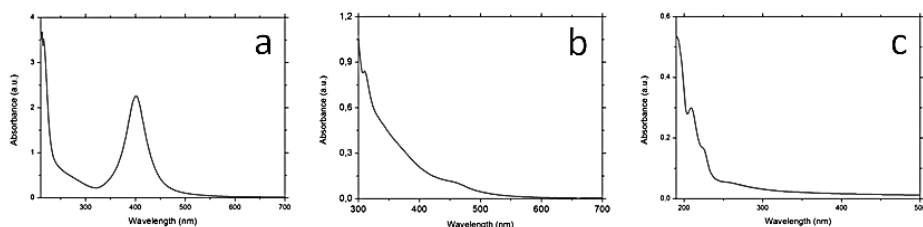


Figura 6- Espectro de absorción de (a) Ag NP (b) clústeres de plata de gran tamaño y (c) clústeres de plata de pequeño tamaño¹⁸

Como puede observarse en la Figura 6, existe una importante diferencia no sólo entre clústeres y nanopartículas, sino también entre diferentes tipos de clústeres. Por un lado, los clústeres grandes muestran un continuo aumento de la absorbancia, con pequeños hombros, a medida que decrece la longitud de onda. Este perfil de espectro es similar al presentado por semiconductores (Figura 6b). Los clústeres pequeños, por otro lado, presentan bandas bien definidas, recordando al comportamiento de átomos y moléculas (Figura 6c).

La espectroscopia de UV-Vis será, por tanto, una de las técnicas de caracterización más utilizadas en este trabajo, ya que permite la diferenciación no solo de clústeres y nanopartículas, sino también de diferentes tamaños de clústeres.

Queda claro, entonces, que existen importantes diferencias entre las propiedades de nanopartículas y clústeres. Además, la presencia de efectos cuánticos en estos últimos hace que las mismas no varíen con el tamaño de la forma en que lo hacían para nanopartículas. Este hecho puede representarse en una tabla periódica en 3D (Figura 7)¹⁸, en la que, entre los átomos y el material masivo de cada elemento, aparece todo un abanico de nuevos materiales con sus bien diferenciadas propiedades dependientes del tamaño.

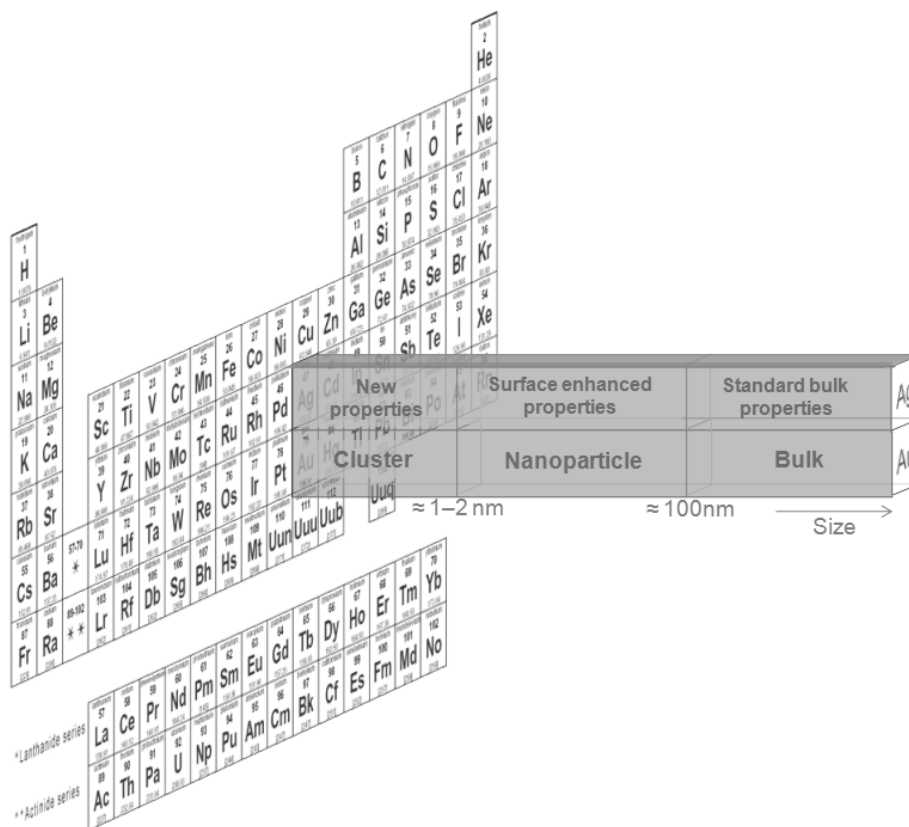


Figura 7- Tabla periódica 3D dependiente del tamaño¹⁸

3. Estructura de los clústeres

Resulta muy difícil realizar cálculos precisos de la estructura electrónica de clústeres metálicos, especialmente cuando son más grandes que solo unos pocos átomos y están estabilizados por algún ligando protector. Se pueden mitigar dichas dificultades con el uso de modelos simples, como el modelo de Jellium¹⁹.

Este modelo fue desarrollado en un principio para clústeres en la fase gas. En él se sustituye el clúster por una esfera cargada positivamente rodeada de electrones de valencia. Se considera que los electrones se mueven en un campo medio de potencial y que ocupan niveles de energía de acuerdo al principio de

Aufbau ($1S^2 | 1P^6 | 1D^{10} | 2S^2 1F^{14} | 2P^6 1G^{18} | \dots$), como se representa en la Figura 8²⁰. Este modelo permite hacer buenas aproximaciones y reproducir muchas de las características físicas de los clústeres.

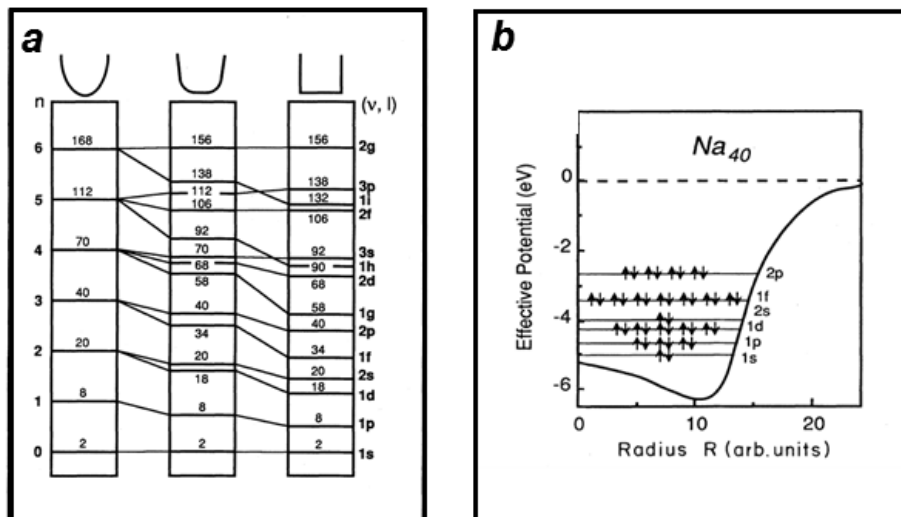


Figura 8- (a) Ocupación de niveles de energía para esferas 3D, armónicos, intermedios y de pozo cuadrado. (b) Potencial efectivo de una esfera de Jellium correspondiente a Na₄₀, están representada la ocupación electrónica de los niveles energéticos²⁰

La energía total en función del tamaño del clúster, calculada por esta aproximación, presenta ciertas discontinuidades correspondientes a estructuras electrónicas cerradas. Estos mínimos coinciden con los picos que aparecen en un espectro de masas del metal, asociados con clústeres excepcionalmente estables de cierto número de átomos y presentes en mayor abundancia: 8, 18, 20, 34, 40, 58, 92, 138..., conocidos como *números mágicos*.

Se comentó anteriormente la presencia del *bandgap* en los clústeres, típico de los semiconductores y similar al HOMO-LUMO que presentan las entidades moleculares. Este comportamiento semiconductor es particularmente acentuado para clústeres de pequeño tamaño, cuyos *bandgaps* pueden superar ampliamente el valor de 1 eV, como se muestra en la Figura 9 para clústeres de Ag y Cu¹⁸.

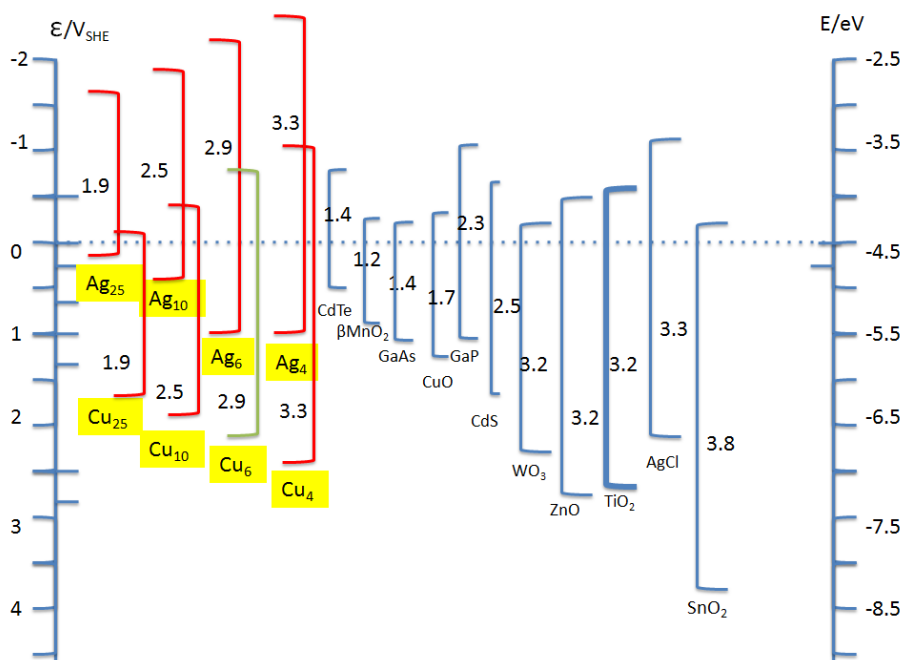


Figura 9- Comparación esquemática de los bandgaps de diferentes clústeres de Ag y Cu y aquellos que presentan ciertos semiconductores bien conocidos¹⁸

El *bandgap* depende no solo del tamaño del clúster, sino de los ligandos a los que se encuentra unido. En este sentido, se han realizado esfuerzos en los últimos años para encontrar modelos capaces de predecir el *bandgap* de clústeres de Au con diferentes ligandos en disolución.

En este caso, los clústeres están estabilizados electrónicamente por los ligandos que, o bien retiran carga del núcleo metálico, o bien están unidos mediante enlaces dativos.

La condición para una estructura electrónica cerrada²¹ formulada como $(L_S \cdot A_N X_M)^z$ es:

$$n^* = Nv_A - M - z \quad [\text{Eq. 1}]$$

donde n^* representa el número de electrones del núcleo metálico en una estructura cerrada, que coincide con uno de los *números mágicos* (los números mágicos se corresponden con estructuras electrónicas cerradas en un campo

Introducción

medio de potencial anarmónico y a la formación de clústeres estables); N es el número de átomos metálicos (A) en el clúster; v_A es la valencia atómica; M es el número de electrones extraídos por el ligando X (asumiendo 1 electrón por ligando); y z representa la carga total del complejo. Los ligandos débiles representados por L_s suelen ser necesarios como protección estérica superficial del núcleo del clúster.

Por tanto, el tratar de combinar: a) los mencionados *números mágicos* requeridos para una estabilidad electrónica de un clúster, b) los requerimientos para la Eq. 1, y c) el hecho de que los clústeres en disolución requieran una capa de ligando estéricamente completa, compatible con la estructura atómica del clúster, hace que los cálculos necesarios para satisfacer dichas condiciones sean extremadamente complejos.

Han aparecido en la bibliografía muy pocos estudios que plantean resolver la estructura de un clúster con métodos *ab initio*. Recientemente, Häkkinen y colaboradores consiguieron determinar, mediante cálculos de teoría del funcional densidad (DFT) a gran escala²¹, la estructura electrónica de $Au_{102}(p\text{-MBA})_{44}$ ($p\text{-MBA}$, ácido *para*-mercaptobenzoico, $SC_7O_2H_5$), y todos los clústeres con ligando tiolato formados por 102 átomos de oro, así como algunos clústeres más pequeños con ligandos fosfina-tiolato y fosfina-cloruro, como se muestra en la Figura 10.

En la Tabla 1 puede verse la variación del *bandgap* para diferentes tamaños de clúster y diferentes ligandos. Se muestran también en dicha tabla, a modo de comparación, los valores del *bandgap* calculados según el modelo de Jellium (para clústeres con tamaños de 25 átomos o superiores se aplica una corrección de -0.4 eV debido a la anarmonicidad mostrada por dichos clústeres)²². Por último se muestran también valores de *bandgap* calculados experimentalmente para clústeres aniónicos libres en fase gas por espectroscopía fotoelectrónica.

Introducción

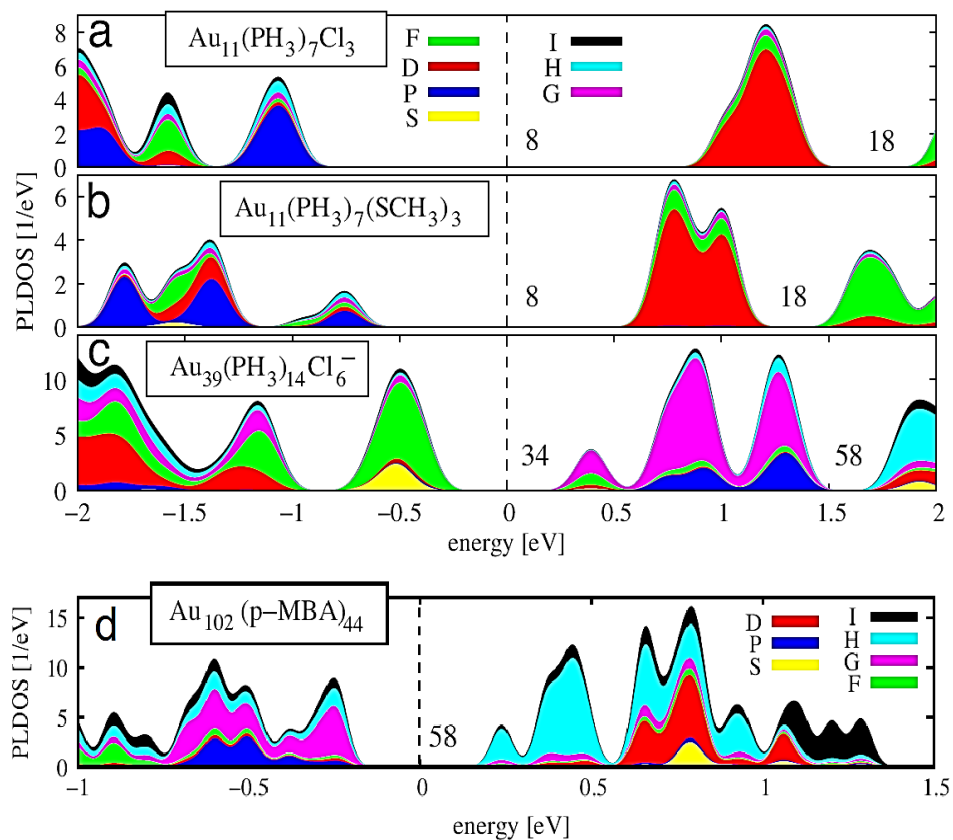


Figura 10- Análisis de la estructura electrónica de clústeres de Au. La proyección del momento angular de la densidad de estados electrónica (PLDOS) para el núcleo de oro en (a) $\text{Au}_{11}(\text{PH}_3)_7\text{Cl}_3$, (b) $\text{Au}_{11}(\text{PH}_3)_7(\text{SCH}_3)_3$, (c) $\text{Au}_{39}(\text{PH}_3)_{14}\text{Cl}_6^-$ and (d) $\text{Au}_{102}(\text{p-MBA})_{44}$. El 0 de energía corresponde al medio de la transición HOMO-LUMO (línea discontinua). Cada uno de los estados electrónicos presentan un ajuste Gaussiano de 0,07 eV (0,03 en d). El número de capa cerrada está indicado en cada caso. Para más detalles, referencia²¹

Puede observarse que, en general, el *bandgap* decrece a medida que se incrementa el número de átomos en un clúster, observándose por tanto una buena correlación entre los cálculos de DFT y el simple modelo de Jellium y mostrando, al mismo tiempo, que los ligando juegan un papel relativamente secundario.

Introducción

Capa cerrada	Experimental		Teórico		Modelo Jellium
	AQCs	Gap(eV)	Complejo AQCs	Gap (eV)	$E_g=5.32/N^{1/3}$ (eV)
8e (1S ² 1P ⁶)			Au ₁₁ (PH ₃) ₇ (SMe) ₃	1,5	2,4
8e			Au ₁₁ (PH ₃) ₇ Cl ₃	2,1	2,4
8e			Au ₁₃ (PH ₃) ₁₀ Cl ₂ ³⁺	1,8	2,3
8e			Au ₂₅ (SMe) ₁₈ ⁻	1,2	1,3*
34e (8e + 1D ¹⁰ 2S ² 1F ¹⁴)	Au34 ⁻	1,0	Au ₃₉ Cl ₆ (PH ₃) ₁₄ ⁻	0,8	1,0*
58e (34e + 2P ⁶ 1G ¹⁸)	Au58 ⁻	0,6	Au ₁₀₂ (p-MBA) ₄₄	0,5	0,6*
58e			Au ₁₀₂ (SMe) ₄₄	0,5	0,6*

Tabla1- Comparación (Ref.¹⁸ adaptada de la referencia²¹) del bangap calculado: a) experimentalmente, b) utilizando cálculos DFT y c) modelo de Jellium; para diferentes clústeres con diferentes ligandos.

Existen también numerosos estudios que demuestran que los clústeres de Au, Ag y Cu de menos de 13 átomos tienen una geometría plana^{23, 24} lo cual es determinante a la hora de predecir sus propiedades. En la Figura 11 se representan algunas de esas estructuras.

4. Propiedades de clústeres metálicos

Los clústeres metálicos subnanométricos presentan diversas propiedades únicas que los hacen de gran interés para un amplio número de aplicaciones. En este trabajo se comentarán en detalle dos de ellas: la fotoluminiscencia y la catálisis.

4.1. Fotoluminiscencia

El comportamiento molecular que presentan los clústeres de metales nobles de un pequeño número de átomos, y su *bandgap* similar al de los semiconductores, da lugar a la existencia de ciertas transiciones electrónicas cuya energía varía en función del tamaño del clúster²⁵.

Introducción

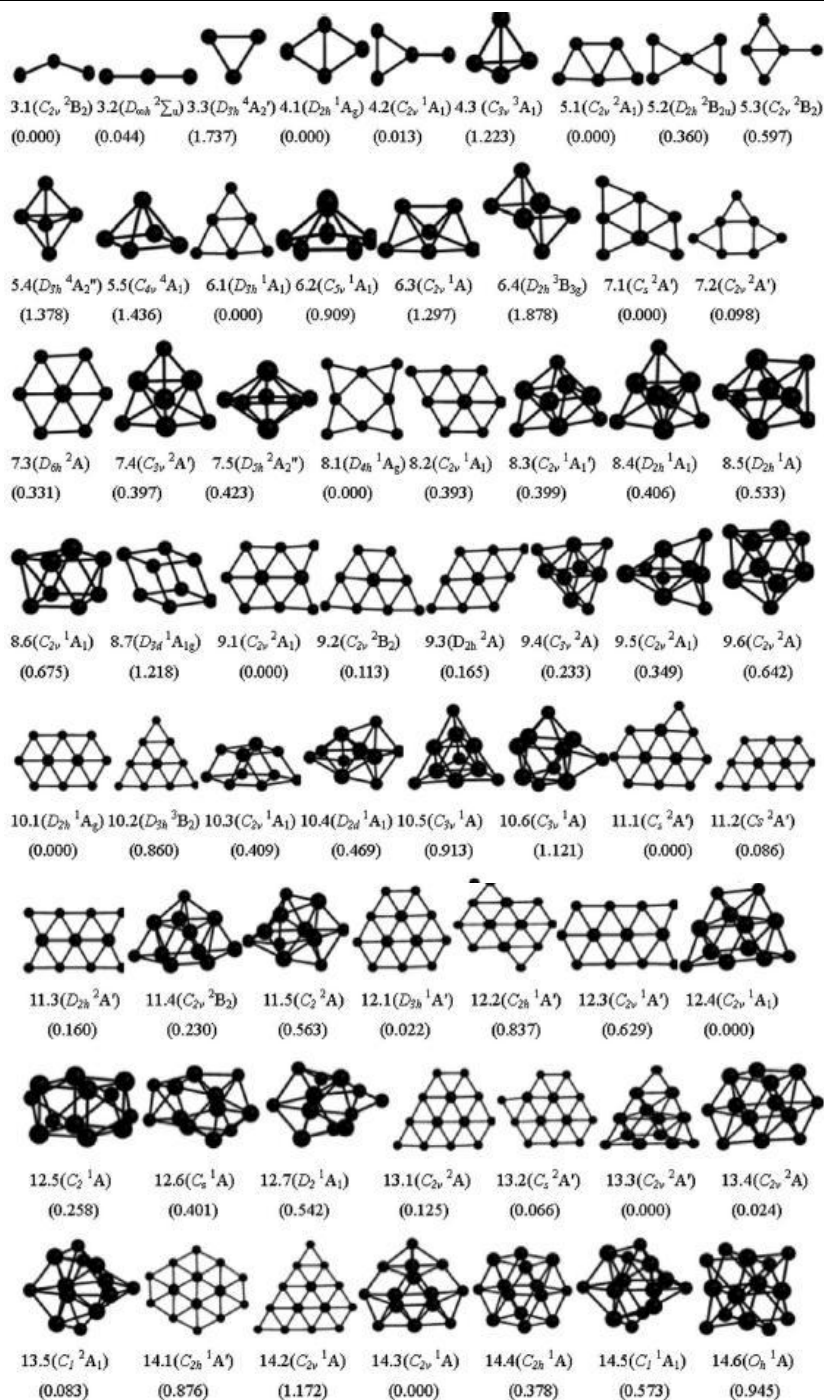


Figura 11-Estructuras calculadas teóricamente para clústeres de hasta 14 átomos. Se muestran los datos de simetría, estados electrónicos y energías relativas (eV) de la estructura de mínima energía{{60 Li,Xi-Bo 2007}}

Introducción

La aparición de transiciones ópticas con energías entre el UV-Visible y el infrarrojo cercano, hacen de los *quantum dots* de metales nobles unos sistemas con enormes potencialidades para su aplicación como marcadores fluorescentes en biología o fuentes de emisión en nanoelectrónica.

Por ejemplo, la Figura 12 muestra la fluorescencia de una disolución acuosa de clústeres de Cu de menos de 14 átomos excitados a 296 nm, que presentan rendimientos cuánticos de más del 10%²⁶. Estos clústeres han permanecido en disolución, estables, por más de dos años²⁷.

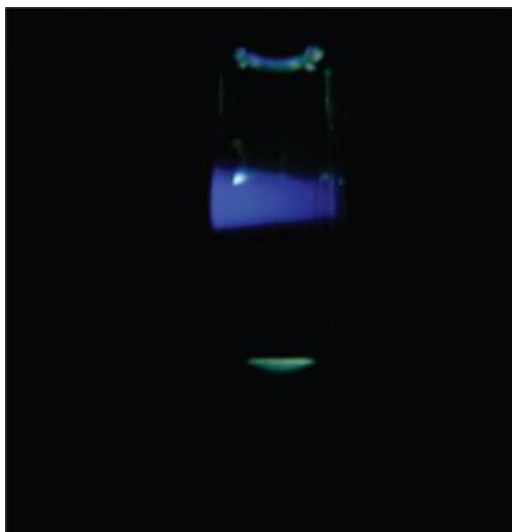


Figura 12- Emisión azul, observada para clústeres de Cu de menos de 14 átomos, a una excitación de 296 nm²⁶

Incluso en ciertos casos en los que el rendimiento cuántico es inferior al anteriormente comentado, los clústeres fluorescentes de metales nobles son una buena alternativa a la utilización de los *quantum dots* de semiconductores para marcación biológica. Esto no es solamente por su bajo radio hidrodinámico ni por su naturaleza inerte, sino también por su biocompatibilidad y porque presentan un valor muy bajo de fotoextinción, en comparación con otros fluoróforos orgánicos.

Clústeres de oro dispersables en agua han sido ya estudiados como posibles marcadores fluorescentes en experimentos biológicos. Recientemente, por

ejemplo, W. Parak y colaboradores describieron el uso de clústeres de oro estables protegidos con ácido dihidrolipoico (DHHLA) y conjugados con moléculas biológicamente importantes como el PEG (polietilenglicol), BSA (albúmina de suero biológico), avidina o estreptavidina (ver Figura 13)²⁸.

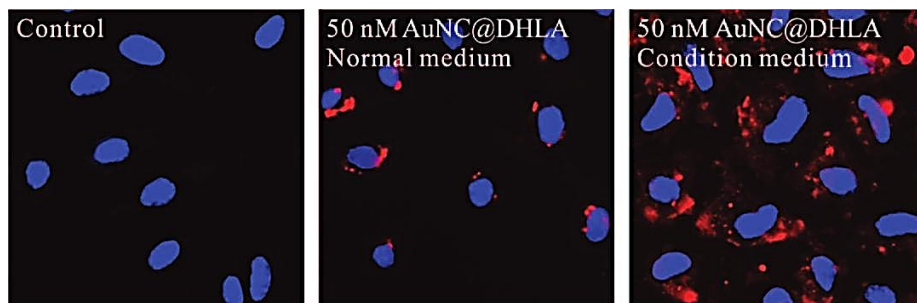


Figura 13- Absorción inespecífica de clústeres de Au protegidos con DHHLA no conjugados por células endoteliales humanas. El núcleo celular fue tratado para emitir en el azul. La fluorescencia roja corresponde a los clústeres. Más información Ref²⁸

4.2. Catálisis

Los clústeres de pequeño tamaño han demostrado tener una actividad catalítica no presentada previamente por su análogo masivo ni por las nanopartículas. Esto los hace muy prometedores para su posible aplicación como catalizadores.

Cálculos mecanocuánticos muestran que dicha actividad es debida al bajo número de coordinación de los átomos del clúster²⁹. Por otro lado, diversos tipos de clústeres metálicos han demostrado tener una gran y selectiva actividad catalítica cuando son depositados en un soporte adecuado.

Por ejemplo, clústeres de Pt de 8-10 átomos pueden ser utilizados como catalizadores para la deshidrogenación oxidativa del propano³⁰, mientras que clústeres de oro de 6-10 átomos mostraron ser extremadamente activos para la epoxidación de propeno³¹.

Recientemente, Harding *et al.*³² estudiaron el control de la reacción de oxidación de CO sobre Au₂₀ depositado en MgO, encontrando que el centro

catalítico en el clúster está caracterizado por una densidad electrónica alta que activa el O₂ adsorbido lo que facilita el enlace con CO.

Los clústeres subnanométricos han presentado también actividades electrocatalíticas diferentes de sus análogos de mayor tamaño³³. Sin embargo, este campo se encuentra todavía prácticimante inexplorado.

A lo largo de este trabajo se expondrán los esfuerzos realizados en la presente tesis doctoral para el estudio y entendimiento de la electrocatálisis que presentan los clústeres subnanométricos en algunas reacciones de interés.

5. Síntesis de clústeres metálicos

Al igual que ocurre con las nanopartículas, existen dos tipos bien diferenciados de síntesis para clústeres subnanométricos: *top-down* y *bottom-up*.

5.1. *Top-down*

En el tipo de síntesis *top-down* los clústeres se sintetizan a partir de precursores de mucho mayor tamaño, como nanopartículas o metal masivo. La técnica más comúnmente utilizada en este tipo de métodos es la de *etching* de nanopartículas. En esta técnica, los clústeres se forman como producto de la capacidad de *etching* de algunos ligandos (como los tioles) que, o bien van disgregando átomos de la superficie de la nanopartícula, o bien la rompen en fragmentos de menor tamaño. Esto permite obtener clústeres cuánticos estables caracterizados por *números mágicos* de capas cerradas.

Por ejemplo, se ha utilizado el *etching* de nanopartículas protegidas con ácido mercaptosuccínico con un exceso de glutatión para sintetizar clústeres de oro de pequeño tamaño con propiedades fotoluminiscentes (Figura 14)³⁴. En dicho trabajo se muestra como se pueden producir clústeres de 8 o 25 átomos a partir de nanopartículas de 4-5 nm. El tamaño del clúster final puede ajustarse variando el pH de 3 (clúster de 25 átomos) a 7-8 (8 átomos).

Los polímeros multivalentes coordinados, como la polietilenimina, pueden utilizarse también para el *etching* de nanocristales de oro, lo que permite

obtener clústeres de oro con muy buenas propiedades fluorescentes y solubles en agua³⁵.

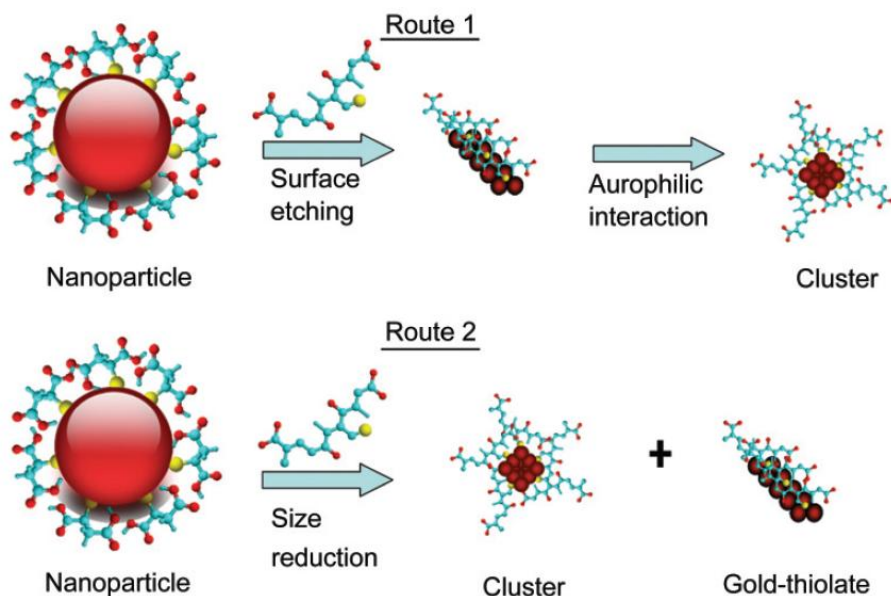


Figura 14- Esquema representativo de los dos tipos de ataques posibles en la formación de clústeres por etching de nanopartículas protegidas con ácido mercaptosuccínico³⁴

5.2. Bottom-up

A diferencia del caso anterior, en los métodos *bottom-up* los clústeres se sintetizan a partir de átomos o iones (Figura 15)¹⁸. En este caso la técnica a utilizar depende del tamaño de clúster y de la finalidad que interese. La síntesis de clústeres en disolución incluye la reducción de sales metálicas en presencia de ligandos de unión fuerte^{22, 36, 37} o jaulas³⁸, y el control cinético utilizado en síntesis en microemulsión³⁹⁻⁴¹ o en los métodos electroquímicos^{26, 33, 42}.

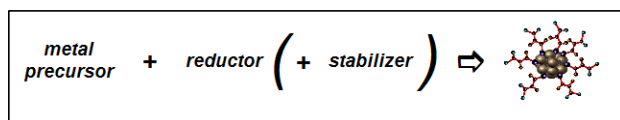


Figura 15- Representación esquemática del método bottom-up¹⁸

Introducción

El método electroquímico ha sido el utilizado por la empresa NANOGAP en la síntesis de los clústeres utilizados en este trabajo, y por tanto se explicará más en profundidad en el capítulo siguiente (en la página 44).

En la síntesis de clústeres de mayor tamaño se utiliza una gran variedad de ligandos protectores fuertes que controlan factores como el crecimiento y la estabilidad. El factor clave en la síntesis de clústeres pequeños es el control cinético, basado en bajas velocidades de reacción producidas por agentes reductores débiles o por bajas concentraciones (microemulsiones, método electroquímico...).

Generalmente se piensa que la síntesis de clústeres de muy pequeño tamaño es extremadamente complicada, debido al alto control de las condiciones requerido para detener la síntesis y aislar los clústeres en el momento que se forman.

Este pensamiento está basado en la teoría de nucleación y crecimiento, en base a la cual, los núcleos formados durante los primeros pasos de una reacción química son estables solamente a partir de un tamaño determinado, llamado núcleo crítico.

Agrupaciones que tengan un tamaño menor al núcleo crítico, se disolverán espontáneamente por su alta presión de Laplace. Por encima de ese tamaño, continúan creciendo para reducir su energía superficial por diversos mecanismos, como la autocatálisis, *Ostwald ripening*, etc. hasta que el crecimiento se detiene por la acción de ligandos protectores u otras estructuras.

Sin embargo estos argumentos, que pueden ser perfectamente aplicados para la síntesis de nanopartículas e incluso de clústeres de gran tamaño con la misma estructura del metal masivo, no son correctos cuando se refieren a clústeres de pequeño tamaño, como los producidos mediante el control cinético.

Como se mencionó previamente, un gran número de publicaciones, tanto teóricas como experimentales, muestran que los clústeres de pequeño tamaño pueden ser especialmente estables, gracias a su particular estructura electrónica y geométrica, diferente de la del metal masivo. En estos casos no pueden

Introducción

aplicarse los argumentos macroscópicos, expuestos en la teoría de nucleación y crecimiento.

Con el objetivo de explicar mejor este importante aspecto, en la Figura 16 se muestra un gráfico de la variación de la energía libre en el proceso de formación de una nanopartícula en disolución¹⁸.

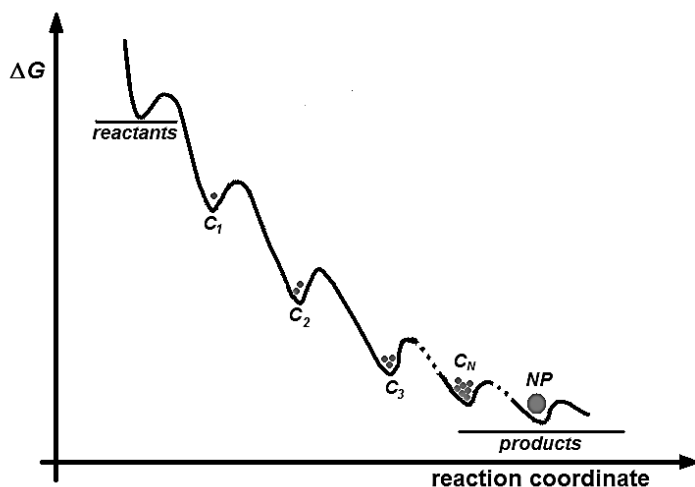


Figura 16- Representación esquemática de la variación de la energía libre en la síntesis de nanopartículas¹⁸

Los reactivos iniciales, en la parte superior de la curva, representan los iones metálicos en presencia de un reductor (o, por ejemplo, el cátodo donde tiene lugar la reducción en un proceso electroquímico). Los productos, en la parte inferior, representan las nanopartículas estables producidas. Una síntesis típica de nanopartículas suele producirse con una reducción rápida, lo que significa que la fuerza motriz (diferencia en los potenciales electroquímicos del catión metálico y del reductor) es más que suficiente para llevar el sistema de un máximo de energía (reactivos) a un mínimo (productos), representados como el primer núcleo estable (C_N) que tiene una estructura idéntica a la del metal masivo.

Sin embargo, cuando se utilizan condiciones suaves, se producen los clústeres estables intermedios C_2 , C_3 ...etc. Por tanto, con un control adecuado de la

Introducción

cinética de la reacción, es posible detenerla en un punto intermedio y obtener clústeres estables de pequeño tamaño.

Siguiendo este esquema, por ejemplo, se sintetizaron clústeres de plata de menos de 10 átomos en microemulsiones de bis(2-etilhexil) sulfocinato/isooctano/agua³⁹. La síntesis y aislamiento de clústeres de tan pequeño tamaño se consiguió utilizando un reductor suave como el hipofosfito de sodio. Los clústeres producidos por este método no solo demostraron ser estable durante años, sino que presentan interesantes propiedades paramagnéticas y una intensa fotoluminiscencia.

De la misma manera, utilizando síntesis electroquímica, pueden sintetizarse clústeres estables de tamaño muy pequeño y controlado. Por ejemplo, pueden sintetizarse clústeres de Au de 2 o 3 átomos recubiertos de PVP (N-vinil pirrolidona), por la oxidación de una lámina de oro en una disolución de PVP y la posterior reducción de los complejos Au-PVP formados⁴². Estos clústeres son los más pequeños que pueden formarse y presentan propiedades fluorescentes (Au₂) y paramagnéticas (Au₃).

Por el mismo método se pueden sintetizar clústeres de Cu de menos de 14 átomos. Estos clústeres pueden dispersarse en diferentes disolventes, son estables por meses y presentan propiedades fluorescentes similares a aquellos sintetizados en microemulsión⁴¹.

Finalmente, se ha de mencionar la utilización de *jaulas* para inhibir el crecimiento en la síntesis de clústeres de pequeño tamaño, método reportado recientemente por Royon *et al.*³⁸ En este trabajo se demostró que era posible sintetizar clústeres de plata por irradiación de una sal de plata presente en un cristal con pulsos laser.

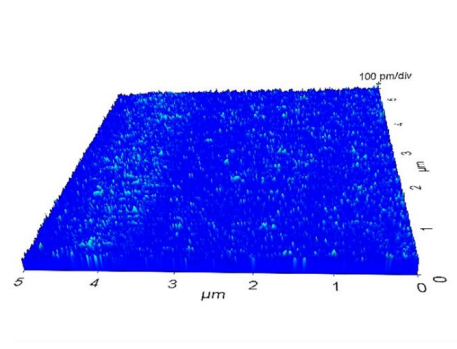
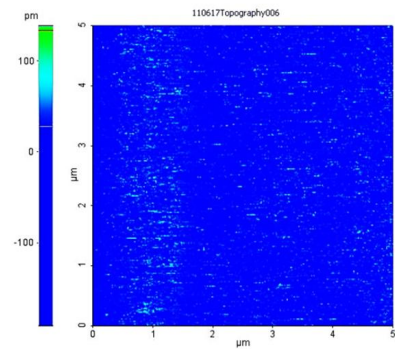
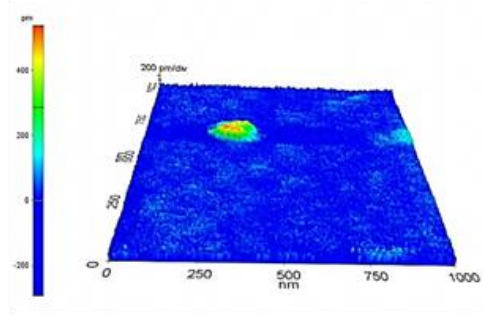
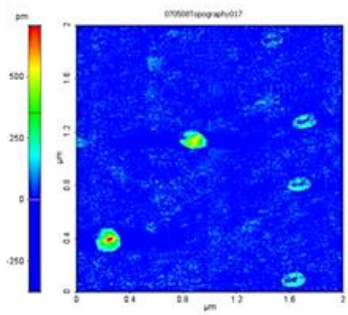
En resumen, se puede decir que la síntesis y aislamiento de clústeres de pequeño o gran tamaño estables es posible adaptando correctamente las técnicas comúnmente conocidas para la síntesis de nanopartículas.

Estos clústeres, debido a sus características moleculares, poseen propiedades totalmente nuevas que difieren de las de las nanopartículas o el metal masivo.

Introducción

Su estudio y caracterización es, por tanto, un área muy amplia, que ha sido motivación de este trabajo.

MATERIALES Y METODOS



1. METODOS

1.1. Espectroscopía de absorción UV-Vis

Esta técnica se basa en la interacción de la radiación con la materia. Cuando una molécula absorbe un fotón, su energía aumenta desde un estado de mínima energía (estado fundamental) hacia un estado excitado. Si una molécula emite un fotón, su energía disminuye. La radiación de microondas estimula el movimiento rotacional de las moléculas cuando absorben esa radiación, mientras que la radiación IR estimula el movimiento vibracional de las moléculas cuando la absorben. Cuando la radiación tiene energías que caen en el visible y el UV, pueden hacer que los electrones de ciertas moléculas y átomos pasen a orbitales electrónicos de mayor energía. Para átomos estas transiciones resultan en bandas de absorción muy estrechas localizadas en longitudes de onda específicas correspondientes a la diferencia en niveles de energía de las especies que absorben. Para moléculas, las energías rotacionales y vibracionales están superpuestas con los niveles de energía electrónicos por lo que pueden ocurrir muchas transiciones con diferentes energías. Esto produce un ensanchamiento y la formación de bandas, cuyo ancho es aún mayor en solución debido a las interacciones soluto-disolvente.

Para obtener información de un analito se mide la cantidad de energía absorbida como consecuencia de la excitación. Los resultados de este análisis suelen representarse en forma de un espectro (gráfico de la radiación absorbida en función de la frecuencia o de la longitud de onda).

La espectroscopía de la radiación electromagnética en la región de longitudes de 160-780 nm⁴³ es muy usada en los experimentos con nanopartículas de metales nobles debido a que la absorción de resonancia de plasma de las dispersiones coloidales de estos metales ocurre frecuentemente en la región visible^{44, 45}. Dicha absorción se observa cuando la frecuencia de incidencia del fotón coincide con la oscilación colectiva de los electrones de conducción. Es por este motivo que estas dispersiones suelen presentar colores diversos que dependen del tamaño y forma de la nanopartícula y de la extensión de la coagulación; estos cambios de color son muy usados para identificar los cambios químicos

ocurridos cuando los iones metálicos en disolución pasan a formar una dispersión de nanopartículas metálicas.

La espectroscopía de absorción molecular se basa en la medida de la transmitancia T o de la absorbancia A de disoluciones que se encuentren en cubetas transparentes que tienen un camino óptico de b cm. Normalmente, la concentración c de un analito absorbente está relacionada linealmente con la absorbancia como muestra la ecuación (Ley de Lambert-Beer):

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon b c$$

Ecuación 1: Ley de Lambert-Beer.

Esta ecuación proporciona información cuantitativa de cómo la atenuación de la radiación depende de la concentración de las moléculas que la absorben y de la distancia que recorre el rayo en el medio absorbente. Cuando la luz atraviesa una solución de analito, la intensidad de la radiación disminuye como consecuencia de la excitación del analito:

A = absorbancia de una disolución.

ϵ = absortividad molar (característico de la especie).

b = longitud de la trayectoria de la radiación en el medio absorbente.

c = concentración de las especies absorbentes

Estos espectros UV-vis (A frente a λ) son usados para identificar o confirmar la existencia de un compuesto y generalmente se realizan en disolución.

1.2. Fluorescencia

El fenómeno de fotoluminiscencia ocurre cuando una especie química, electrónicamente excitada, pierde su energía en forma parcial o total a través de la emisión de fotones. Los fenómenos luminiscentes más conocidos son la fluorescencia y la fosforescencia, y se distinguen por los estados excitados desde donde se produce la desactivación al estado fundamental. El fenómeno de

fluorescencia es un proceso rápido, del orden de algunos nanosegundos, mientras que la fosforescencia es un proceso mucho más lento, en general en el rango de los microsegundos.

La fluorescencia es un fenómeno no muy común, pero la fosforescencia es aún menos frecuente y está confinado a compuestos químicos muy específicos y bajo condiciones extraordinarias.

Uno de los aspectos más atractivos de esta técnica es su sensibilidad inherente, con límites de detección que son a menudo tres órdenes de magnitud más pequeños que los encontrados en espectroscopía de absorción.

Es por esta razón que la espectrometría de fluorescencia resulta una técnica muy poderosa en nanotecnología, en particular, cuando las concentraciones de trabajo son muy bajas y se encuentran por debajo de los límites de detección de otros métodos.

Ciertos clústeres de distintos metales y las nanopartículas suelen presentar propiedades fluorescentes, por lo que esta técnica resulta un método útil de caracterización, además de que permite establecer sus potenciales propiedades ópticas.

Además tanto la longitud de onda de emisión como la de excitación de estas partículas y clústeres dependen de su tamaño por lo que los espectros de fluorescencia resultan una herramienta poderosa de caracterización.

Debe tenerse en cuenta que el espectro de fluorescencia de una sustancia depende de su entorno, por lo que resulta importante establecer y controlar en qué condiciones se determinan las propiedades fluorescentes.

1.3. MALDI (Matrix- Assisted Laser Desorption/Ionization) y LDI-TOF (Laser Desorption/Ionization)

La espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization mass spectrometry with time of flight detector*) es una técnica de espectrometría de masas de ionización suave acoplada a un detector de tiempo de vuelo. La característica más importante de esta técnica es su

método suave de ionización que no necesita vaporización previa de la muestra y evita la fragmentación de las especies analizadas. Esto la hace ideal en la caracterización de biomoléculas y clústeres de pequeño tamaño.

En un primer paso la muestra es embebida en una matriz sólida, que a menudo consiste de un material orgánico y sales inorgánicas. Luego se irradia con un láser pulsado, el cual expulsa iones electrónicamente excitados de la matriz y cationes.

Las técnicas de ionización mediante láser se dividen en tres grupos: de ionización fotónica o multifotónica, de ablación y de desorción. MALDI es una técnica láser por desorción de ionización suave que no necesita una vaporización previa de la muestra. Para conseguir un proceso de ionización eficiente y suave se deben cumplir tres condiciones básicas:

- i. La ionización debe ser resonante, es decir, la longitud de onda del láser usado debe ser adecuada para conseguir la excitación electrónica o vibracional de la molécula usada. Para ello se usan láseres con emisión en el UV lejano o IR lejano, respectivamente.
- ii. El “punto caliente” producido debe ser de muy corta duración para evitar la descomposición térmica de la muestra, por lo que se usa un láser con pulsos de corta duración (1 a 100 nanosegundos).
- iii. La muestra debe ser dispersada previamente usando una matriz sólida o líquida, así, las moléculas de analito quedan aisladas entre sí y rodeadas de un gran número de moléculas de matriz, evitando de esta forma que ocurra la asociación entre moléculas de analito que provocaría la formación de complejos de alto peso molecular difíciles de desorber y de analizar. Además, la matriz absorbe el exceso de energía consiguiendo un proceso de ionización muy suave.

El analizador que se usa es de Tiempo de Vuelo =TOF (Time of Flight). Introducida la muestra con la matriz en una placa de MALDI se coloca en la fuente y se procede a un pulso intensivo de disparos láser, de longitud de onda corta, que provocan la ionización del analito. Una vez conseguida esta ionización y confinados todos los iones en la fuente, se aplica un voltaje de

extracción que hace que todos los iones salgan de la fuente de modo simultáneo. A continuación pasan por un campo electrostático acelerador lo que les hace adquirir una elevada energía cinética que los impulsa en la dirección del Tubo de Vuelo hacia el detector. Los iones de mayor m/z volarán a menor velocidad que los de menor m/z . El resultado es que los iones más pequeños alcanzan primero el detector, seguidos en el tiempo y de modo sucesivo, por los de mayor tamaño (suponiendo a todos de la misma carga). El tiempo usado en recorrer la longitud del Tubo de Vuelo es proporcional a la masa, o relación masa/carga de los iones por lo que el sistema de detección es capaz de distinguir o diferenciar las diferentes masas iónicas, con mayor resolución cuanto mayor sea su separación en el tiempo (cuanto mayor sea el Tubo de Vuelo), y cuanto menor sea la dispersión de energías de los iones formados en la fuente.

El LDI-TOF es equivalente al MALDI, solo que en este caso no se utiliza ninguna matriz.

1.4. Microscopía de fuerzas atómicas (AFM)

El Microscopio de fuerzas atómicas (AFM) consiste en un alero o *cantiléver* con una fina punta o *tip* al final que se usa para escanear la superficie de la muestra. El *cantiléver* es usualmente de algún derivado de silicio y el *tip* se encuentra formando una curvatura de radio del orden de nanómetros.

La técnica se basa en la medición de las fuerzas de interacción entre el *tip* y la muestra. Cuando el *tip* se aproxima a la superficie de la muestra, las fuerzas existentes entre ellos crean una deformación en el cantiléver de acuerdo con la ley de Hook. Con los equipos actuales de AFM pueden medirse con precisión fuerzas mecánicas de contacto, fuerzas de Van der Waals, capilares, electrostáticas, de enlace, magnéticas o de solvatación entre otras. También es posible medir también otras magnitudes utilizando tipos especiales de sondas.

La deformación del *cantiléver*, y por tanto la magnitud de la fuerza, es medida usualmente utilizando un láser puntual que se refleja desde la superficie del *cantiléver* a un detector con un conjunto de fotodiodos. Otros métodos de detección posibles son la interferometría óptica o el de *cantilevers* piezoselectivos, aunque este es menos sensible.

El AFM tiene diferentes modos de operación, los más usuales son el contacto y no contacto, M-AFM, que da información de las fuerzas magnéticas y el I-AFM, que da información sobre las características electrostáticas de la muestra.

Por su resolución, teóricamente del orden de 0,1 angstrom (aunque depende de la punta) así como por su versatilidad, es una de las técnicas microscópicas de vanguardia, y su utilización cada vez es mayor en la ciencia nanométrica.

1.5. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) mide la cantidad y velocidad de cambio de la masa de un material, como función de la temperatura o tiempo, en una atmósfera controlada. Las medidas termogravimétricas se usan principalmente para determinar la composición de materiales y predecir su estabilidad térmica. Por TGA pueden caracterizarse materiales que exhiben ganancia o pérdida de masa debido a descomposición, oxidación, desorción, absorción o vaporización.

El análisis Termogravimétrico nos puede dar información acerca de:

- Composición de sistemas multicomponentes
- Estabilidad Térmica
- Estabilidad Oxidativa
- Tiempo de vida estimado de un producto
- Cinética de descomposición de materiales
- Efecto de atmósferas corrosivas o reactivas sobre los materiales
- Contenido de humedad y volátiles

1.6. Voltamperometría Cíclica (CV)

La voltamperometría cíclica es probablemente la técnica electroanalítica más eficiente y versátil para el estudio mecanístico de las reacciones electródicas, y suele ser el primer experimento que se lleva a cabo en un estudio electroquímico. Constituye una extensión lógica de la voltamperometría de barrido lineal, que realiza una inversión en el sentido del barrido de potencial. De este modo, se aplica al electrodo indicador una señal de excitación triangular

como la que se muestra en la Figura 17, en la que el potencial se barre linealmente desde un valor inicial E_i hasta alcanzar un valor E_λ , potencial de inversión, al cual se invierte el sentido del barrido hasta alcanzar un potencial final E_f . Como es obvio, hasta alcanzar el potencial de inversión, la rampa de potencial es la característica de la voltamperometría de barrido lineal.

Aunque el barrido de potencial frecuentemente se termina al final del primer ciclo (E_f), puede continuarse realizando ciclos sucesivos, tal y como muestra la Figura 17, lo que justifica que se la llame “voltamperometría cíclica”. Por otra parte, si bien es posible utilizar una velocidad de barrido diferente en el barrido inverso, no suele emplearse.

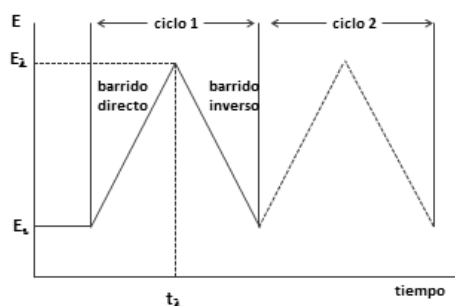


Figura 17- Barridos de potencial directo e inverso

En esta técnica se observan picos, en los barridos directo e inverso, que corresponden a procesos de reducción y oxidación. Si el proceso redox es totalmente reversible, la forma y magnitud de ambos picos es idéntica.

La Figura 18 muestra un ejemplo de voltamperometría cíclica, en un sistema reversible. Durante el barrido directo (hacia potenciales positivos en este caso) se alcanza un valor de potencial suficientemente positivo como para provocar la oxidación de Fe^{2+} . Esta oxidación da lugar a una corriente anódica que aumenta rápidamente, debido al rápido aumento de la velocidad de reacción en las proximidades del potencial de equilibrio, hasta que la concentración de Fe^{2+} en la superficie del electrodo se aproxima a cero. La corriente decae a continuación a medida que se produce el agotamiento de Fe^{2+} en las cercanías del electrodo debido a su rápida conversión en Fe^{3+} al aumentar el sobrepotencial. Después de invertir la dirección del barrido de potencial, la corriente neta es de oxidación,

hasta que el potencial aplicado se hace suficientemente negativo como para causar la reducción del Fe^{3+} acumulado. Dicha reducción viene señalada por la aparición de una corriente catódica. De nuevo, dicha corriente aumenta a medida que el potencial se hace menos positivo, hasta que la velocidad de reducción de Fe^{3+} provoca el agotamiento de esta especie en la región cercana al electrodo, produciéndose por tanto la aparición de un pico de corriente y su posterior disminución. Así, el fenómeno físico causante del pico durante el proceso de oxidación también da lugar a un pico de corriente durante la etapa de reducción (Figura 18)

Para obtener un voltamperograma cíclico se mide la corriente que pasa por el electrodo indicador en una disolución sin agitar durante el barrido de potencial.

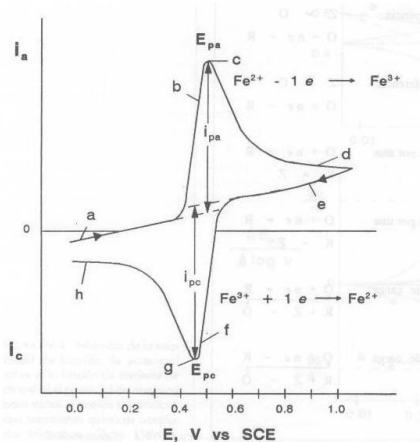


Figura 18- Voltamperometría cíclica del par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$

Tal como se ha indicado, durante el barrido hacia potenciales negativos ocurre la reducción, mientras que en el barrido hacia potenciales positivos ocurre la oxidación. Ambos picos en un proceso reversible están situados a cada lado del potencial formal E^0 :

$$\frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = E^0$$

El potencial formal es, conceptualmente, similar al potencial estándar de electrodo. Así, la ecuación de Nernst se puede escribir:

$$E_{O,R} = E_{O,R}^{0'} + RT \ln \frac{C_O}{C_R}$$

Donde $E_{O,R}$ es el potencial reversible del electrodo del sistema en el que las concentraciones de oxidante y reductor son C_O y C_R respectivamente, y:

$$E_{O,R}^{0'} = E_{O,R}^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{\gamma_O}{\gamma_R} \right)$$

Siendo γ_O y γ_R los coeficientes de actividad de ambas especies.

Si la voltamperometría comienza de un potencial hacia otro más positivo, se generará electroquímicamente en el medio la especie oxidada, mientras que en el barrido inverso esta especie será reducida. De manera que la voltamperometría cíclica es capaz de generar rápidamente una nueva especie durante el barrido directo y a continuación probar su existencia en el barrido inverso. Este es un aspecto muy importante de la técnica, que le confiere un gran poder de diagnóstico cualitativo para el estudio de las reacciones electródicas.

Esta es una técnica, en definitiva, cada vez más utilizada en todos los campos de la Química como método de estudio de los estados rédox, ya que permite barrer rápidamente un amplio intervalo de potenciales y analizar la respuesta tanto analítica como cinéticamente para especies oxidables o reducibles.

1.7. Electrodo de disco rotatorio (RDE)

En las reacciones electroquímicas puede existir una limitación por transferencia de masa de al menos una de las especies electroactivas, uno de los sistemas más utilizados para su estudio es el electrodo de disco rotatorio (RDE). Este sistema de electrodo ha sido ampliamente estudiado, y tanto la hidrodinámica de los procesos, como las ecuaciones de convección-difusión han sido resueltas de forma exacta y rigurosa⁴⁶.

Con este tipo de sistemas, si la velocidad de rotación es mucho mayor que la velocidad de barrido de la voltametría, se obtendrá solo la contribución de la especie electroactiva en condiciones en las que el proceso recibe suficiente

transferencia de masa hacia el electrodo, lo que permite dilucidar si esta o no controlado por difusión. De esta forma, es posible estudiar si una reacción determinada está, en la práctica, limitada por la difusión de la especie electroactiva (control difusivo) o, por el contrario, si está limitada por una transferencia electrónica lenta (control cinético)

Por resolución de las ecuaciones hidrodinámicas de los procesos sobre el disco, se han obtenido expresiones tanto de flujo radial como normal a la superficie del mismo, así como la concentración de especies en función de la distancia al electrodo. Como resultado se obtiene que la velocidad normal disminuye con la distancia al electrodo, y la radial pasa por un máximo, para luego volver a disminuir. Los cálculos indican existe una capa de disolución cuasiestacionaria en las inmediaciones del electrodo (Figura 19).

Una vez determinado el perfil de velocidades de flujo, pueden resolverse las ecuaciones de convección-difusión. Se considerará, por tanto, una condición de corriente límite en estado cuasiestacionario.

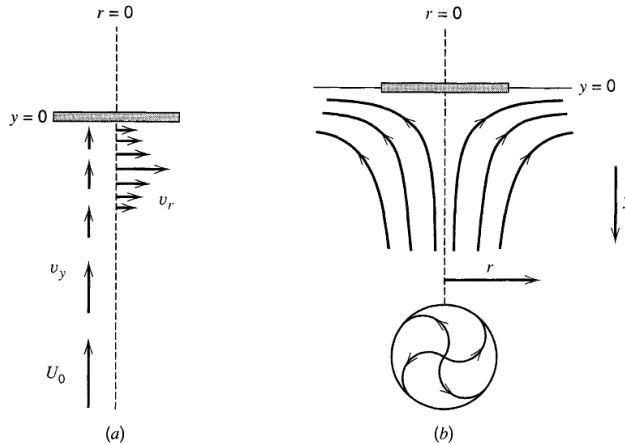


Figura 19- Esquema cualitativo de (a) las velocidades tangencial y radial del fluido en las inmediaciones del disco y (b) líneas de flujo resultantes⁴⁶

Por tanto, fijando la velocidad de rotación (ω) y para una velocidad estacionaria de flujo, se define la región de corriente límite por:

$$C_r(y=0) \approx 0 \quad \text{y} \quad \lim_{y \rightarrow \infty} C_r = C_r^*$$

donde C_r es la concentración de la especie electroactiva r ; y es la distancia al electrodo; y C_r^* es la concentración de la especie r en el seno de la disolución.

Con un pulso de potencial en esta región, se obtendrá una corriente similar a la que se obtendría en ausencia de convección. Sin embargo, es diferente a la obtenida en ausencia de rotación, que al aumentar el sobrepotencial tiende a 0, la corriente en el RDE tiende a un valor estacionario. Aplicando esto y las condiciones de corriente límite, puede obtenerse el valor de la corriente límite, dado por la ecuación de *Levich*.

$$i_L = 0,62nFAD_r^{2/3} \omega^{1/2} \nu^{1/6} C_r^*$$

donde ω es la velocidad de rotación en rad/s, ν es la viscosidad cinemática de la disolución en cm^2/s y D_r es el coeficiente de difusión de la especie r .

Por tanto, esta ecuación se aplica a toda condición limitada por el transporte de masa difusivo en el RDE, y predice que la corriente límite, i_L , es proporcional a C_r^* y $\omega^{1/2}$. Se puede definir entonces la constante de *Levich*, como $i_L/C_r^* \omega^{1/2}$, que es el análogo para RDE a la constante de la corriente de difusión en voltametría.

Esta constante tiene validez en condiciones de transferencia electrónica muy rápida (control difusional). Por tanto puede representarse i frente a $\omega^{1/2}$ (representación de *Levich*) obteniéndose una línea recta.

Sin embargo, en procesos con una transferencia electrónica lenta (control cinético), la representación de i frente a $\omega^{1/2}$ será una curva que tenderá al límite $i = i_k$ a medida que $\omega^{1/2} \rightarrow \infty$, siendo i_k la corriente en ausencia de cualquier efecto debido al transporte de materia (corriente cinética), como se representa en la Figura 20.

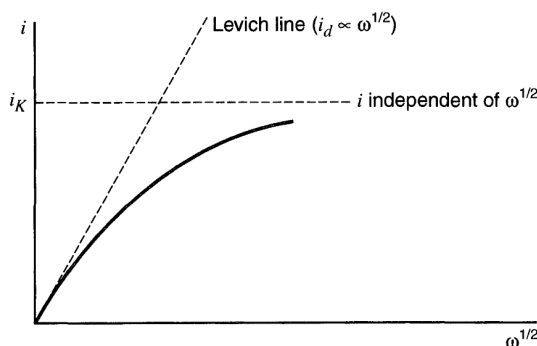


Figura 20- Variación de i con $\omega^{1/2}$ en RDE, para una reacción electroquímica de cinética lenta⁴⁶

En procesos de cinética lenta de primer orden, se podrá aplicar estrictamente la ecuación de *Koutecky–Levich*:

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{i_k} + \frac{1}{i_L} = \frac{1}{i_k} + \frac{1}{0,62nFAD_r^{2/3} \omega^{1/2} \nu^{1/6} C_r^*}$$

Por tanto, la representación de $\frac{1}{i}$ frente a $\frac{1}{\omega^{1/2}}$ debería dar una línea recta, cuya ordenada en el origen permitiría calcular los parámetros cinéticos ($\frac{1}{i_k}$).

A modo de resumen, utilizando el RDE pueden diferenciarse dos tipos de reacciones: Las controladas por difusión, en las que la transferencia electrónica es muy rápida, con representaciones de *Levich* lineales. Por otro lado, las que siguen un control cinético, con una transferencia electrónica lenta, cuyas representaciones de *Levich* no son lineales. Para las controladas por una cinética de primer orden, las representaciones de *Koutecky–Levich* son líneas rectas cuya ordenada en el origen permite calcular parámetros cinéticos.

1.8. Método de síntesis electroquímica

La electroquímica es un método interesante de síntesis de clústeres debido a que las condiciones de crecimiento se pueden establecer directamente en función del potencial o densidad de corriente aplicados, lo que permite

conseguir un buen control del tamaño final de las partículas por ajuste adecuado de dichos parámetros.

El método empleado para la síntesis fue propuesto inicialmente para nanopartículas por Reetz^{A7}, quien describió un procedimiento electroquímico que permitía obtener nanopartículas de Pd en el intervalo de tamaños de 2 a 4 nm. Este procedimiento se basa en una electrólisis efectuada en condiciones galvanostáticas en la que se disuelve anódicamente una lámina del metal de interés y los cationes se reducen sobre un cátodo inerte generando nanopartículas estabilizadas en presencia de sales de tetrabutilamonio. Las ventajas de este método son la elevada pureza de las nanopartículas obtenidas y el control del tamaño que se logra ajustando la densidad de corriente usada.

Para llevar a cabo este proceso se necesitan dos electrodos en una disolución electrolítica, la cual tiene que estar seca, libre de oxígeno y contener un electrolito soporte, como una sal de tetraalquilamonio, que actúa a su vez como estabilizador de las nanopartículas metálicas. El ánodo es un electrodo del metal del que se quieren preparar las nanopartículas en su forma masiva (electrodo de trabajo) y el cátodo es un electrodo de platino (contraelectrodo) Figura 21.

El proceso, básicamente, es el siguiente:



Se aplica una densidad de corriente constante sobre el ánodo para lograr la oxidación anódica con disolución del metal y formación de cationes (proceso

inverso al de electrodeposición). Inicialmente se forman una serie de complejos de este catión metálico con el ión amonio estabilizante que son transportados hasta las proximidades del cátodo, donde son reducidos para generar los llamados “ad-átomos”, los cuales sufren agregación en presencia de estabilizantes dando dispersiones de nanopartículas estabilizadas. Si se usa un disolvente que no es adecuado para dispersarlos, las nanopartículas pueden precipitar en el medio.

La formación de los ad-átomos tiene lugar según el siguiente mecanismo⁴⁸:

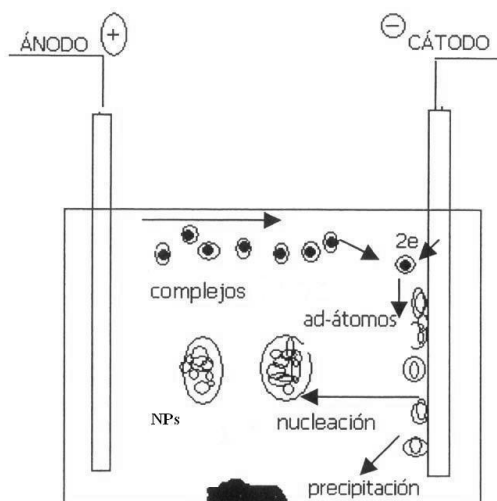
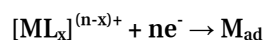
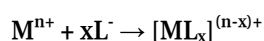


Figura 21-: Modelo para la estabilización de clústeres metálicos con iones tetrabutilamonio

Este método electroquímico se modificó para permitir la generación de clústeres (en primer lugar, en nuestro grupo de investigación^{26, 33, 42, 48} y con

posterioridad en la empresa NANOGAP). Actualmente permite sintetizar clústeres de varios metales entre los que se pueden mencionar Au, Ag, Pt y Cu, algunos de los cuales serán estudiados en este trabajo.

2. EXPERIMENTAL GENERAL

2.1. Técnicas de caracterización

2.1.1. Espectroscopía UV-Vis

Los espectros UV-Vis se realizaron en un espectrofotómetro de arreglo de diodos HEWLETT-PACKARD, modelo 8452A utilizando cubetas de cuarzo Hellma 111-QS de 1 cm de paso óptico.

Se midió en un rango de longitudes de onda entre 190 y 800 nm. Los espectros se tomaron utilizando como blanco el disolvente en el que se encuentra la muestra problema, H₂O MiliQ en todos los casos.

2.1.2. Espectroscopía de fluorescencia

Los estudios de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse Varian. Se utilizaron las mismas cubetas que para los análisis de UV-Vis.

Los estudios de fluorescencia 3D se llevaron a cabo realizando espectros de emisión entre 220 y 600 nm, excitando de 10 en 10 nm en un rango de longitudes de onda entre 190 y 300 nm. El resto de los espectros se midió en el rango de longitudes de onda de emisión y excitación indicadas en el experimento en cuestión.

Se tomaron, al igual que en el caso anterior, espectros de los blancos, y se sustrajeron de los de la muestra a la hora de representar los espectros.

2.1.3. AFM

Las medidas de AFM se llevaron a cabo utilizando un microscopio XE-100 de Park Systems. Se utilizaron puntas ACTA de silicio recubierto de aluminio de Park Systems, con una frecuencia de resonancia de 325 KHz y ≈ 10 nm de ancho.

Las medidas de AFM se llevaron a cabo con el objetivo de determinar la altura de los clústeres.

Para ello, se utilizó el modo de no contacto utilizando alta resolución en el desplazamiento vertical de la punta. La resolución en Z es de ≈ 10 pm, suficiente para la determinación precisa de la altura de los clústeres. Sin embargo, la resolución XY que posee el equipo, debido tanto a la vibración de la punta como al grosor de la misma (10 nm), no es suficiente para caracterizar dichos clústeres en esta dimensión.

Para la preparación de la muestra se depositaron 10 μ l de la disolución de clústeres en estudio sobre una placa de mica y se evaporó el disolvente. A continuación se lavó la superficie con agua Mili-Q y se purgó con N₂ para eliminar pequeñas partículas de polvo o artefactos.

Antes de llevar a cabo la medida de los clústeres se hizo un blanco con mica para comprobar su planaridad y limpieza.

2.1.4. Masas (LDI-TOF y MALDI-TOF)

Los espectros LDI-TOF y MALDI-TOF se obtuvieron utilizando un espectrómetro de masas BRUKER modelo Autoflex disponible en los servicios generales de la Universidad de Santiago de Compostela.

Ambos tipos de espectros se llevaron a cabo utilizando una longitud de onda láser de 337 nm y una frecuencia de repetición de 50 Hz. El espectro se adquirió en modo Reflector entre los 0 y 4 kDa de rango de masas. Las muestras se depositaron en una placa de acero y, después de su secado, se alinearon con el láser.

En el MALDI se utilizó DHB (2,5-ácido dihidroxibenzoico) como matriz.

2.1.5. Espectroscopía de Absorción Atómica

Los análisis de espectroscopía de absorción atómica fueron realizados por el Profesor Antonio Moreda, del grupo de investigación de la Profesora Pilar Bermejo Barrera, del departamento de química analítica de la facultad de química, en la Universidad de Santiago de Compostela.

2.1.6. Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis Termogravimétrico se realizó en una termobalanza Perkin Elmer TGA 7/DX utilizando crisoles de Pt. El mismo se utilizó para determinar el contenido de oro de la solución de AgAQCs, valor que fue comparado con el obtenido por espectroscopía de absorción atómica. Para realizar las medidas, los clústeres de Au se depositaron sobre carbón activo.

La deposición se realizó mezclando 160 ml de disolución de AgAQCs (4 mg) con 16 mg de carbón activo (20% wt) en un baño de ultrasonidos de Fisher Scientific, a una frecuencia de 35 kHz durante 6h a una temperatura de 30°C. Posteriormente se centrifugó la suspensión en una centrifuga Bhekman, y se secó a 60°C durante toda la noche.

Para llevar a cabo la medida se depositaron aproximadamente 4 mg del sólido Au/C en el crisol de Pt. La muestra se sometió a un calentamiento programado con una rampa de temperaturas de entre 50°C y 800°C a una velocidad de 10°C/min. La última etapa consistió en mantener la muestra a 800°C hasta masa residual constante, lo que aseguró la completa degradación del C. Todo el proceso fue realizado en atmósfera de O₂.

2.2. Estudios electroquímicos: Procedimientos generales

Las pruebas electroquímicas se realizaron utilizando un potenciostato-galvanostato Voltalab PGZ-100. Los electrodos de referencia utilizados fueron suministrados por la empresa Radiometer. El baño de ultrasonidos utilizado en todos los procesos, marca Fisher Scientific, se utilizó a una frecuencia de 35 kHz. Los electrodos de GC (carbono vítreo) utilizados fueron GC-RDE (adaptables para electrodo rotatorio) de PINE *instruments*, con un límite de rotación de 2500 rpm.

Todos los estudios electroquímicos se realizaron utilizando una celda electroquímica convencional de vidrio de un compartimento, compuesta por un disco de carbono vítreo ($\phi=5$ mm, $A=0,196$ cm²) recubierto con la muestra, como electrodo de trabajo, una lámina de platino como contraelectrodo y un electrodo de Ag/AgCl/KCl (3 M) como referencia. Todos los potenciales, salvo

Material es y Métodos

que se especifique lo contrario, se informan respecto al electrodo de referencia de hidrógeno (vs RHE).

Dado que las técnicas electroquímicas tienen un elevado grado de sensibilidad, debe evitarse la presencia de especies no deseadas capaces de interferir en las mediciones. Por este motivo, se llevó a cabo un estricto protocolo de limpieza del material de vidrio utilizado.

Para ello se sumergió el material de vidrio en ácido sulfúrico concentrado durante toda la noche. Posteriormente al aclarado, se hirvió en agua durante unas 3 horas para eliminar los sulfatos residuales. Por último, se lavó con abundante agua antes de su uso.

Previo a la deposición de la muestra sobre el electrodo de carbono vítreo se limpió la superficie con agua regia (HNO_3 y HCl 1:3). Este paso tiene como objetivo eliminar cualquier resto de metal que pueda haber difundido en el GC. Por último se realizó el lavado con abundante H_2O MilliQ.

Una vez limpio, el electrodo se pulió con vigorosidad utilizando papel de lija (#2000) seguido por dos mezclas de alúmina (0,3 μm y 0,05 μm) y agua sobre discos de pulir. A continuación, el electrodo se sumergió en un baño de ultrasonidos durante 10 min para eliminar los restos de alúmina y se lavó con abundante agua.

Tras el lavado se realizaron 3 voltametrías cíclicas (CV) en HClO_4 1M, entre 10 mV y 1700 mV vs RHE a 20 mV/s, para comprobar el estado del electrodo, con el fin de detectar cualquier posible impureza remanente.

Antes de depositar la muestra, se colocaron 5 μl de ácido sulfúrico concentrado sobre el electrodo limpio durante 5 minutos tras lo cual se lavó con abundante agua. El objetivo del tratamiento con ácido es hacer más hidrofílica la superficie del electrodo mejorar el grado de dispersión de la muestra.

Previo a la deposición, las muestras se introdujeron en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos para optimizar el grado de dispersión. Se utilizó agua con hielo para minimizar la velocidad de evaporación del solvente.

Por último se depositó la cantidad deseada de muestra sobre el electrodo y se dejó secar a temperatura ambiente cubierta de una cúpula de vidrio con una única salida lateral. Esto evita la contaminación y alarga el tiempo de evaporación, lo que permite optimizar la calidad del depósito

Todos los estudios electroquímicos se realizaron a temperatura ambiente.

2.3. HOR sobre AuAQCs: Una electrocatálisis en 2D

La muestra de clústeres de Au (AuAQCs) utilizada en este capítulo fue suministrada por la empresa NANOGAP. Se sintetizó en base a una modificación del método electroquímico. La muestra contiene una cantidad incierta de catión metálico en disolución.

2.3.1. Caracterización

La muestra de clústeres de oro se caracterizó utilizando: espectroscopía UV-Vis, espectroscopía de fluorescencia en 3D, AFM, LDI-TOF, espectroscopía de absorción atómica y TGA (Capítulo 3, sección 2)

2.3.2. Estudios electroquímicos

Se utilizaron en dichos estudios 4 tipos de muestras de oro: Hilo de Au policristalino, NPs de Au comerciales de E-TEK, AuAQCs y HAuCl₄.

Todos los estudios electroquímicos se realizaron siguiendo el método general descrito en la en la página 49.

Todas las muestras de oro fueron caracterizadas por voltametría cíclica. Para ello se utilizó HClO₄ 0,1M como electrolito soporte, se desoxigenó purgando Ar durante 30 min y se realizaron 3 barridos entre 200 mV y 1700 mV a 10 mV/s bajo atmósfera de Ar. Se comprobó la constancia en la respuesta voltamétrica haciendo estas medidas antes y después de los estudios de HOR. No se observó diferencia alguna en ninguno de los casos, por lo que se decidió hacer las mismas después de la HOR con el objetivo de mantener intacta la superficie del catalizador en el momento de medir su actividad.

2.3.3. Electrooxidación de hidrógeno

La electrooxidación de hidrógeno se estudió en medio ácido, utilizando como electrolito soporte HClO_4 0,1M. La disolución de HClO_4 0,1M se desoxigenó con Ar durante 30 min y a continuación se burbujeó H_2 durante 20 min. En todas las medidas realizadas se mantuvo la atmósfera de H_2 .

La velocidad utilizada en todos los casos, salvo que se especifique lo contrario, fue de 10 mV/s.

Las medidas para NPs de Au, AuAQCs y HClO_4 se realizaron utilizando un electrodo de disco rotatorio (RDE), con el objetivo de evitar el efecto de difusión de analito en las actividades medidas.

2.3.3.1. Electrooxidación de hidrogeno sobre hilo de Au policristalino

En este caso, a diferencia de lo descrito para el método general, el electrodo de trabajo fue un hilo de Au policristalino. Previamente a la utilización de este hilo, se lavó con HNO_3 para eliminar impurezas y luego con abundante H_2O MilliQ.

Una vez limpio, y saturada la disolución con H_2 , se realizaron 70 ciclos sucesivos de potencial entre -10 mV y 1400 mV a 10 mV/s.

Estas medidas fueron realizadas por triplicado.

2.3.3.2. Electrooxidación de hidrógeno sobre nanopartículas de 30 nm

Sobre el electrodo se depositaron 20 μl de disolución de NPs Au/C (1 mg/ml, 20% wt Au/C) siguiendo el procedimiento general explicado en la página 49.

Una vez limpio, y saturada la disolución con H_2 , se realizaron 70 ciclos sucesivos de potencial entre -10 mV y 1400 mV a 10 mV/s.

Estas medidas fueron realizadas por triplicado.

2.3.3.3. Electrooxidación de hidrogeno sobre clústeres de oro

Sobre el electrodo se depositaron 15 μl de disolución de clústeres de oro (25 mg/l, 0,5 μg) siguiendo el procedimiento general explicado en en la página 49 con el objetivo de conseguir una buena dispersión en el electrodo. Debido a la utilización de electrodo rotatorio, se decidió depositar una monocapa de

Nafion[®] (5 μ l, 0,025%) sobre la muestra seca para evitar posibles pérdidas de catalizador.

Una vez preparado el electrodo y saturada la disolución con H₂ se realizaron 40 voltametrías cíclicas entre -10 mV y 790 mV a 1600 rpm. A continuación, y con el objetivo de comprobar la estabilidad de la señal, se realizaron 70 voltametrías, en el mismo rango de potenciales, a 1600 rpm.

Por último, una vez estabilizada la medida, se analizó la dependencia de la densidad de corriente con la velocidad de rotación, para lo que se realizaron sucesivas voltametrías cíclicas a 225, 400, 625, 900, 1225, 1600 y 2025 rpm.

Estos experimentos fueron realizados por triplicado, utilizando en todos los casos muestra recién depositadas.

2.3.3.4. Electrooxidación de hidrógeno sobre sal de oro

Debido a la presencia de iones metálicos en la muestra de clústeres, se decidió estudiar el comportamiento de los mismos frente a la HOR.

Por tanto se depositó sobre el electrodo 40 μ l de disolución de HAuCl₄ (25 mg/l, 0,5 μ g) siguiendo el procedimiento general explicado en en la página 49. Debido a la utilización del electrodo rotatorio, se decidió depositar una monocapa de Nafion[®] (5 μ l, 0,025%) sobre la muestra seca para evitar posibles pérdidas de catalizador.

Una vez preparado el electrodo y saturada la disolución con H₂ se realizaron diferentes voltametrías cíclicas entre -10 mV y 790 mV a 1600 rpm. No se obtuvo respuesta, por lo que se decidió realizar 3 CV desde 0,2 V hasta 1,7 V, seguidos de 2 nuevos barridos entre -10 mV y 790 mV a 1600 rpm.

La aparición de señal al llevar a cabo estos barridos motivó la realización de nuevos ensayos. Con el objetivo de determinar la existencia de un posible proceso de activación a un potencial determinado, y obtener dicho potencial, se realizaron barridos sucesivos desde 0,2 V hasta 1,2 V, 1,4 V y 1,7 V.

Se logró activación solamente a 1,7 V, por lo que se realizaron 15 series de cronoamperometrías a 1,7 V durante 2 min seguidas de 2 CV entre -10 mV y 790 mV a 1600 rpm.

Por último, se realizaron 35 CV entre -10 mV y 790 mV a 1600 rpm para comprobar la estabilidad de la señal.

Estos experimentos, al igual que los anteriores, fueron realizados por triplicado, utilizando en todos los casos muestra recién depositada.

2.4. Bioelectrocatalisis: Una conexión entre células electroquímicas y biológicas

Las muestras de clústeres de Ag, AgAQC's y AgAQC's sin iones, utilizadas en este capítulo fueron suministradas por la empresa NANOGAP. Se sintetizaron de acuerdo a una variante del método electroquímico. La muestra contiene una cantidad incierta de catión metálico en disolución.

2.4.1. Caracterización

La muestra de clústeres de plata se caracterizó utilizando: espectroscopía UV-Vis, espectroscopía de fluorescencia, AFM, MALDI-TOF y espectroscopía de absorción atómica. (Capítulo 4, sección 2)

2.4.2. Estudios previos de Voltametría cíclica

Todos los estudios electroquímicos se realizaron siguiendo el método general descrito en la en la página 49.

Para la caracterización electroquímica de los AgAQC's se depositaron 20 μ l de disolución de AgAQC's (~99% superficie del GC cubierta, 0,5 μ g Ag) sobre GC. Se realizaron 3 CV en H₂SO₄ 1M desde -0,4 V a 1 V a una velocidad de 20 mV/s. Se realizaron las mismas CV con GC limpio a modo de comparación.

Para la caracterización de la disolución de clústeres sin iones, se depositaron 240 μ l de disolución 0,3 mg/l (~15% de la superficie del GC cubierta, 0,072 μ g Ag) de disolución de clústeres filtrados sobre GC. Se realizaron 3 CV en H₂SO₄ 1M desde -0,4 V a 1 V a una velocidad de 20 mV/s. Posteriormente, con el objetivo de ampliar el rango de potenciales de estudio, se realizaron 3 voltametrías desde -1

V a 1,6 V a una velocidad de 20 mV/s. En todos los casos, se realizaron las mismas CV con GC limpio a modo de comparación.

Para el análisis de las soluciones de AgNO_3 , se depositaron 240 μl de disolución 0,3 mg/l (~15% de la superficie del GC cubierta, 0,072 μg Ag) de disolución de clústeres filtrados sobre GC. Se realizaron 3 CV en H_2SO_4 1M desde -0,4 V a 1 V a una velocidad de 20 mV/s. Se realizaron las mismas CV con GC limpio a modo de comparación.

2.4.3. Bioelectrocatalisis

Los experimentos de electrocatalisis que se exponen a continuación se realizaron con vistas a su aplicación en sistemas biológicos. Dichos experimentos fueron realizados en colaboración con el grupo de investigación de Gustavo Egea, en la Universidad de Barcelona.

2.4.3.1. Electrooxidación de etanol en medio ácido y básico

Para los estudios en medio ácido, se utilizó como electrolito soporte H_2SO_4 1M, mientras que para los estudios en medio básico se utilizó NaOH 1M. Todos los experimentos para los clústeres de plata se realizaron en atmósfera de N_2 salvo que se especifique lo contrario. Todas las disoluciones utilizadas se desoxigenaron purgando N_2 durante 30 min salvo que se especifique lo contrario.

Sobre el electrodo se depositaron 20 μl de disolución de clústeres de plata (25 mg/l, 0,5 μg) siguiendo el procedimiento general explicado en la en la página 49, cantidad calculada para obtener una deposición cercana a la monocapa de clústeres.

Una vez preparado el electrodo se realizaron 30 CV entre -200 mV y 500 mV en una disolución de electrolito soporte (disolución blanco) a una velocidad de 75 mV/s. El objetivo de este paso es limpiar la superficie y obtener una voltametría con señal estable.

Posteriormente se realizó una voltametría de barrido lineal (LSV) entre -200 mV y 300 mV, a una velocidad de 50 mV/s, y se tomó como blanco ([etanol]=0 M). A continuación, se añadió el etanol necesario para alcanzar una concentración igual a 5 M, y se repitió la LSV en las mismas condiciones ([etanol]=5M).

También se realizó este experimento utilizando como electrodo de trabajo un electrodo de carbono vítreo limpio, sin modificar, para comprobar que la respuesta obtenida se debe a la presencia de los clústeres.

Con el objetivo de estudiar la actividad electrocatalítica en función de la concentración, y siempre utilizando disolución electrolito fresca y muestras nuevas, se repitió el mismo procedimiento para las concentraciones finales de etanol de 2 M y 1 M.

Tras medir la actividad electrocatalítica frente a la concentración, el paso siguiente fue comprobar su dependencia con la velocidad de reacción. Para ello utilizando una concentración de etanol fija ([etanol]=5M) se realizó el mismo procedimiento anterior variando la velocidad de las LSV a 20 mV/s y 10 mV/s. En todos los casos se utilizaron muestras nuevas y disolución de electrolito fresca. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Con el objetivo de determinar posibles pérdidas de catalizador, se realizaron experimentos depositando 5 μ l de Nafion[®] 0,025% (una monocapa) sobre los clústeres depositados y se repitieron los experimentos para 50 mV/s y diferentes concentraciones de etanol. Los resultados mostraron que no hay pérdida de catalizador, por lo que para los clústeres de plata, todos los experimentos se realizaron sin Nafion[®].

2.4.3.2. Electrooxidación de etanol en medio fisiológico

Una vez estudiadas la electrocatálisis en medio ácido y básico, el siguiente paso es el de comprobar si dicha electrocatálisis ocurre en medio fisiológico, en el que se encuentran las células vivas. Para ello se preparó una disolución tampón de fosfato salino, PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ y 2 mM KH₂PO₄ a pH 7.4). El PBS se utilizó como electrolito soporte en concentración 1M. Se realizaron experimentos de electrooxidación siguiendo la misma metodología explicada en la sección anterior pero, esta vez, para tres concentraciones bajas de etanol: 20 mM, 100 mM y 500 mM. Estas son las concentraciones de interés en el medio celular. La velocidad de barrido fue en todos los casos 50 mV/s.

Al igual que en caso anterior, los experimentos se realizaron por triplicado, hasta conseguir constancia de la medida.

2.4.3.3. Electrooxidación de metanol y butanol en medio fisiológico

Tratando de comprobar si la repuesta electrocatalítica se limita al etanol, o se puede extender a otros alcoholes primarios con efectos nocivos en el organismo, se estudió la actividad electrocatalítica de metanol y butanol.

Con dicho objetivo, y teniendo en cuenta la concentración usual en medio celular para el metanol, y la solubilidad en medios acuosos, para el butanol, se realizaron experimentos análogos a los explicados en las dos secciones anteriores. Se utilizó una única concentración de 50 mM de metanol y 25 mM de butanol.

Al igual que en los casos anteriores, los experimentos se realizaron por triplicado.

2.4.3.4. Electroreducción de oxígeno y peróxido de hidrogeno

En un afán por extender el potencial de los clústeres de plata al máximo, se amplió el estudio de electrocatálisis a otros agentes nocivos en las células como los peróxidos.

Para ello, tras las CV de limpieza y estabilización explicadas en la en la página 49, se realizaron voltametrías cíclicas a 50 mV/s entre +300 mV y -1100mV, tanto en medio ácido (H_2SO_4 1M) como en medio fisiológico (PBS 1M), en diferentes condiciones.

En primer lugar se realizó la CV en electrolito desoxigenado con N_2 , para luego burbujear O_2 durante 20 min y volver a repetir dicha CV. Posteriormente se añadió 0,25 mM de H_2O_2 y se volvieron a medir voltametrías análogas al caso anterior, con y sin O_2 en el medio.

2.4.3.5. Electrocatálisis en el medio celular

Los estudios de la electrocatálisis fueron realizados por el grupo de Gustavo Egea de la Universidad de Barcelona, colaboradores en este trabajo. Para más información de los métodos utilizados puede consultarse la publicación de J. Selva *et al.*⁴⁹

2.5. Purificación: La búsqueda del clúster puro

2.5.1. Separación por electroforesis

Los experimentos de electroforesis fueron realizados en colaboración con el grupo del profesor Fernando Domínguez, en la facultad de medicina de la Universidad de Santiago de Compostela.

En esta sección se realizaron electroforesis utilizando 3 tipos de geles de agarosa (Type II: Medium EEO, Sigma) 1,5% en TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 1 mM), NaCl 1mM y NaClO₄ 1mM.

Para la realización de la electroforesis los geles se sumergieron en todos los casos en la disolución electrolítica que los forma.

Todas las electroforesis se llevaron a cabo aplicando un potencial de 60V el tiempo indicado. Los geles fueron examinados en el GelDoc[®] a una longitud de onda de excitación de 254 nm.

2.3.1.1. Comprobación de la viabilidad del método

Con el objetivo de comprobar la viabilidad del método, se llevó a cabo la mezcla de disolución de AgAQCs con glicerol (7:3). Se obtuvieron espectros UV-Vis de la muestra antes y después de haber estado 5 min depositada en uno de los pocillos de un gel de 1,5% de agarosa sumergido en TAE.

Se realizaron tres tipos de experimentos de electroforesis variando las disoluciones de electrolito: TAE, NaCl y NaClO₄, a pH 8. Se depositaron 20 µl de mezcla AgAQC/glicerol (7:3) en 3 pocillos (extremos y medio) del gel. Se corrió la electroforesis durante 40 min. Se hicieron medidas a los 20 min y a los 40 min.

Estos experimentos se realizaron por duplicado.

2.3.1.2. En busca de luz: Experimentos con clústeres fluorescentes

La muestra de AgFAQC en H₂O fue suministrada por la empresa NANOGAP y fue caracterizada utilizando espectroscopía de UV-Vis, fluorescencia y AFM.

Con el objetivo de comprobar si la fluorescencia de los AgFAQC era detectada por el GelDoc[®] se depositaron 10 µl sobre un portaobjetos y se midió su señal.

Materialles y Métodos

Una vez comprobada la posibilidad de detección de los clústeres, se realizaron tres tipos de experimentos de electroforesis variando las disoluciones de electrolito: TAE, NaCl y NaClO₄, a pH 8. Se depositaron 20 µl de mezcla AgAQCs/glicerol (7:3) en 3 pocillos (extremos y medio) del gel. Se corrió la electroforesis durante 40 min. Se hicieron medidas a los 20 min y a los 40 min.

Estos experimentos se realizaron por duplicado.

2.3.1.3. Efecto de los AgFAQCs sobre la agarosa: el fin de una relación y sus inesperadas consecuencias

En primer lugar se determinó la posibilidad de utilizar los AgFAQCs en ausencia de glicerol, haciendo un experimento análogo al explicado en la sección 2.3.1.1.

Se realizaron experimentos de electroforesis en dos tipos de disolución electrolítica, NaCl y TAE. En NaCl se aplicó el potencial 10 min y se midió la fluorescencia, mientras que en TAE se aplicó 40 min y se midió la fluorescencia a 20 min y 40 min.

2.3.2. Separación mediante complejación selectiva

2.3.2.1. Objetivo, los iones: Extracción en disolventes orgánicos

2.3.2.1.1. Interacción de la Rodanina con iones

Se realizaron dos disoluciones stock de Rodanina (Rh) y AgNO₃ (122,45 mg/l y 50 mg/l respectivamente) en acetonitrilo. Se mezclaron diferentes cantidades de las mismas para obtener, en un volumen final de 5 ml, diferentes relaciones de Rodanina e iones:

Rh:Ag⁺ = 1:0/1:0,25/1:0,5/1:0,75/1:1/1:1,15/1:2/1:3/1:4

Inmediatamente después de preparadas, las muestras mostraron un color rojo intenso, de intensidad creciente con la concentración de Rodanina y se almacenaron durante 48 h con el fin de observar el cambio de color.

Posteriormente, se realizaron 9 disoluciones más de relación Rodanina/iones:

Rh:Ag⁺ = 1:0/1:1/1:1,5/1:2/1:3/1:4/1:5/1:6/0:1

Materiales y Métodos

Se caracterizaron todas las muestras utilizando espectroscopía de absorción UV-Vis. Se dejaron en reposo 4 h luego de lo cual se centrifugó a 9000 rpm durante 20 min. Se midió la absorción UV-Vis del sobrenadante de la centrifugación.

2.3.2.1.2. Interacción de la Rodanina con clústeres

Para comprobar la posible interacción de la Rodanina con los clústeres, se decidió hacer una electroforesis en TAE, de la misma manera explicada en la página 58.

En 3 pocillos se depositaron 20 μ l de 3 disoluciones, todas ellas mezcladas con glicerol (7:3): Rodanina en acetonitrilo (Stock); Rodanina en acetonitrilo (Stock) (7 μ l) y AgFAQCs (7 μ l); y Rodanina en acetonitrilo (Stock) (7 μ l) y AgNO₃ en H₂O (7 μ l).

Se corrió la electroforesis durante 20 min y se hicieron medidas de fluorescencia.

2.3.2.1.3. Extracciones con disolventes orgánicos

2.3.2.1.3.1. Método General

Las extracciones se llevaron a cabo utilizando ciclohexano y diclorometano. Todas las extracciones se realizaron con ambos disolventes para todas las muestras, por triplicado y siguiendo el mismo procedimiento general.

Una alícuota de 10 ml de la muestra se extrajo 3 veces con 10 ml de disolvente (3x10 ml) utilizando un embudo de decantación. La fase acuosa se llevó a un rotavapor para eliminar restos de disolvente orgánico y posteriormente se diluyó otra vez a 10 ml. Las fases orgánicas combinadas se concentraron en el rotavapor y se llevaron también a 10 ml. Ambas fases, acuosa y orgánica, se caracterizaron de la misma manera que la muestra inicial por espectroscopía UV-Vis.

2.3.1.1.1.1. Estudio del efecto del sulfato sódico anhidro

El estudio del efecto producido al secar la fase orgánica con sulfato sódico anhidro se llevó a cabo realizando una extracción con ciclohexano de acuerdo al método general.

Materiales y Métodos

Antes de la concentración en el rotavapor, a las fases orgánicas combinadas se le añadió sulfato sódico anhidro hasta que se observó que no se agregaba (señal de que no había trazas de agua).

Posteriormente, se filtró la disolución a gravedad utilizando un embudo con algodón y se concentró en el rotavapor para llevarla a 10 ml. La disolución se caracterizó de la misma manera que las anteriores.

2.3.1.1.1.2. Efecto del estudio de la extracción utilizando ultrasonidos

El estudio del efecto de la extracción utilizando ultrasonidos se llevó a cabo realizando una extracción con ciclohexano de acuerdo a lo descrito en el método general.

Luego de cada extracción, y previo a la separación de las fases, se llevó a cabo un tratamiento de ultrasonidos durante 20 minutos. Posteriormente se aplicó el procedimiento habitual. Las fases orgánicas combinadas, una vez llevadas a 10 ml, se caracterizaron por UV-Vis.

2.3.1.1.2. Objetivo, clústeres: Una diálisis con ADN

El ADN utilizado en este trabajo fue ADN genómico de *Bacillus licheniformis* extraído y purificado por el Dr. Jose Manuel Ageitos Martinez, del grupo del Prof. Tomas Gonzalez Villa, de la Facultad de farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, según el procedimiento explicado en la Tesis Doctoral⁵⁰

La concentración del ADN se midió por espectroscopía UV-vis utilizando el espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop ND-1000, que permite medir 2 µl de muestra directamente. Los valores se analizaron con el programa ND-1000 V3.7.

2.3.1.2.1. Visualización de la interacción: Electroforesis ADN-AgAQCs

Con el objetivo de comprobar la interacción del ADN y los AgAQCs, se mezclaron 2 disoluciones de ADN y AgAQCs de 17.5 mg/l durante 12h con agitación suave.

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% en TAE a 90 V. En uno de los pocillos se colocaron 20 µl de la mezcla ADN/AgAQCs y en el otro

Materiales y Métodos

ADN libre. Tras 40 min se tiñó el gel con bromuro de etidio, y se midió la fluorescencia.

2.3.1.2.2. Caracterización y estabilidad de las especies participantes en la diálisis

Se realizaron caracterizaciones por espectroscopía de absorción UV-Vis y fluorescencia de: AgAQC_s (17 mg/l y 0,2 mg/l de Ag total), AgNO_{3(aq)} (17 mg/l), AgAQC_s sin iones (0,1 mg/l) y ADN (100 mg/l, 50 mg/l, 17 mg/l, 2 mg/l, 0,1 mg/l y 0,05 mg/l)

2.3.1.2.3. Evolución a la luz

Para observar el comportamiento de las diferentes muestras a la luz, se depositaron 10 ml de AgAQC_s (17 mg/l y 0,2 mg/l de Ag total), AgNO_{3(aq)} (17 mg/l) y AgAQC_s sin iones (0,1 mg/l) en viales transparentes durante 34 h.

Se midieron espectros de UV-Vis y fluorescencia a tiempos: 0 h, 2h 30 min, 5h 45 min, 9h 15 min, 22h 45min y 33h 45min.

2.3.1.2.4. Evolución a 4°C

Para observar la evolución a 4°C de la muestra de AgNO_{3(aq)} (17 mg/l), se depositaron 10 ml en vial opaco y se almacenó en la nevera durante 34 h.

De la misma forma que antes se midieron espectros de UV-Vis y fluorescencia a tiempos: 0 h, 2h 30 min, 5h 45 min, 9h 15 min, 22h 45min y 33h 45min.

2.3.1.2.5. Evolución bajo una atmósfera de O₂

Para observar el comportamiento de las diferentes muestras bajo atmósfera de O₂, se depositaron 10 ml de AgAQC_s (17 mg/l y 0,2 mg/l de Ag total), AgNO_{3(aq)} (17 mg/l) y AgAQC_s sin iones (0,1 mg/l) en viales transparentes y se saturó la disolución por burbujeo de O₂ durante 20 min. Posteriormente las muestras se dejaron bajo la atmósfera del mismo gas.

La muestra de AgNO_{3(aq)} se almacenó 34 h. Se midieron espectros de UV-Vis y fluorescencia a tiempos: 0 h, 2h 30 min, 5h 45 min, 9h 15 min, 22h 45min y 33h 45min.

Las muestras de AgAQC_s y AgAQC_s sin iones se almacenaron 20h. Se midieron espectros UV-Vis y fluorescencia a los tiempos inicial y final.

Materiales y Métodos

2.3.1.2.6. La diálisis

Las diálisis se realizaron utilizando cartuchos de diálisis de Pierce (Slide-A-Lyzer[®]), de 3.5 kDa y de 7 kDa.

Se realizaron 2 diálisis con cada casete de ADN/AgAQCs y también de ADN/AgNO₃ como blanco.

Las muestras de diálisis de ADN/AgAAQCs y ADN/AgNO₃ se prepararon mezclando dos disoluciones, una de AgAQC o AgNO₃ (2,5 ml, 17 mg/l) y otra de ADN (2,5ml, 17 mg/l). Se mantuvieron con agitación suave durante 12 h.

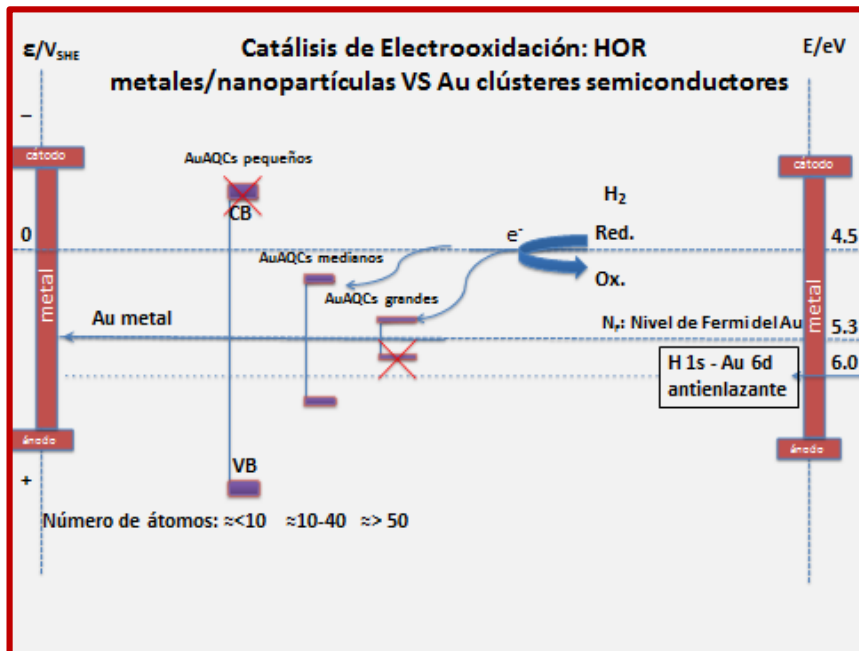
Todas las diálisis se llevaron a cabo siguiendo la misma metodología. El cartucho con la muestra problema se sumergió en 4 disoluciones diferentes por un período de 24 h cada una. 1- H₂O MiliQ; 2- H₂O MiliQ; 3- NaCl 1M; 4- NaCl 0,1M.

Tras haberse llevado a cabo las 4 diálisis, se extrajo la mezcla del interior de la membrana y se calentó a 95°C durante 6h, con el objetivo de desnaturalizar el ADN, separar la doble hebra y de esta forma liberar lo que en ella pudiera estar intercalado (AgAQC). Tras ese tiempo, la muestra se llevó a 0°C para impedir la renaturalización de la doble hélice, y evitar que los clústeres vuelvan a quedar atrapados. Una vez a 0°C, la muestra se introdujo nuevamente en el cartucho de diálisis, y se sumergió en H₂O durante otras 24 h.

Se midieron espectros de UV-Vis y de fluorescencia de todas las fases acuosas externas de la diálisis así como de la fase interna final.

Todas las fases acuosas se almacenaron en nevera, en viales opacos. 10 ml de cada una se dejaron a la luz durante 24 h en viales transparentes. Se midieron espectros de UV-Vis y fluorescencia a los tiempos inicial y final.

HOR SOBRE AuAQCs: UNA ELECTROCATALISIS EN 2D



1. Introducción

Lejos quedan los tiempos donde el oro era considerado el más noble de los metales y totalmente inactivo^{51,52}. Recientemente se ha encontrado que cuando se reduce el tamaño a menos de 10 nm, el oro es capaz de catalizar un gran número de reacciones, tales como oxidación de CO y otros compuestos orgánicos⁵³⁻⁵⁷, formación de enlaces C-C⁵⁸ e hidrogenaciones y deshidrogenaciones con gran selectividad⁵⁹⁻⁶¹, entre otras.

Desde los descubrimientos de la oxidación de CO a baja temperatura por Haruta *et al.*⁶² y de la hidroclicación de acetileno a cloruro de vinilo por Hutchings *et al.*⁶³, se han realizado numerosos esfuerzos, tanto teóricos⁶⁴⁻⁶⁶ como experimentales⁶⁶⁻⁶⁸, para tratar de entender los principios escondidos tras la actividad catalítica de nanopartículas de oro.

Por desgracia, a día de hoy no se tiene un concepto unificado sobre el origen de esta actividad catalítica, existiendo varias teorías contrapuestas. Sin embargo, la inmensa mayoría de las teorías existentes se ponen de acuerdo al asegurar que tanto la presencia de átomos con bajo número de coordinación, como una interacción adecuada con el soporte utilizado, son dos de los factores clave.

Una cuestión importante a resolver es la influencia del tamaño de partícula en la actividad catalítica, especialmente por debajo de los 5 nm⁶⁹. En un experimento reciente, Haruta y colaboradores trataron de dar una respuesta a esta pregunta⁷⁰. Demostraron que NP de oro de 1,3 nm (alrededor de 55 átomos) presentan unas 30 veces más actividad que NP de 5,5 nm frente a la disociación de hidrogeno. Sin embargo, cuando las actividades se normalizaron en función del número de átomos en la periferia de la partícula, ambos tamaños de NP mostraban una actividad similar. Este hecho, parece indicar que la actividad catalítica es debida a los átomos presentes en la periferia de la partícula, independientemente del tamaño de la misma.

A parte de factores geométricos (superficie/volumen), existen factores electrónicos que pueden tener una gran influencia en la actividad catalítica.

Estos factores electrónicos se hacen mucho más importantes cuando la partícula presenta un tamaño por debajo del nanómetro.

Tomando esto como base de partida, podemos hacernos la siguiente pregunta: ¿qué influencia puede tener en la actividad catalítica el hecho de que el tamaño de las partículas se encuentre en el intervalo subnanométrico? Esta pregunta viene motivada por el hecho de las nuevas propiedades que aparecen en partículas, o clústeres cuánticos atómicos (AQC), en este intervalo de tamaños, tal como se explicó en el capítulo de Introducción.

En el año 1985 Hutchings y colaboradores observaron una extraordinaria actividad catalítica en la oxidación de CO por clústeres de oro de 10 átomos y un tamaño de 0,5 nm⁷¹. Este hecho, aparentemente contrario a la supuesta escasa actividad catalítica del Au encontrada hasta entonces, abrió un debate en la comunidad científica acerca de las propiedades catalíticas de este metal, que a día de hoy aún no ha sido resultado.

Es necesario comentar que el avance en el estudio de la actividad catalítica de clústeres cuánticos subnanométricos, desde la aparición del estudio de Hutchings –algunos años más tarde corroborado por Haruta– estuvo limitando en gran medida por la dificultad de obtener AQC subnanométricos mediante métodos de síntesis sencillos por vía húmeda, tales como los que se desarrollaron en las últimas décadas para la síntesis de nanopartículas, que permitieron obtener partículas muy monodispersas tanto en tamaño como en forma.

En este trabajo se presenta un primer estudio de catálisis realizado con una muestra de clústeres de oro menores de 10 átomos sintetizados en disolución acuosa por la empresa NANOGAP.

Para este estudio se eligió la reacción de electrooxidación de hidrogeno (HOR), por los motivos que se mencionan a continuación.

El hidrogeno es el mejor combustible tanto desde el punto de vista de contenido energético, como de impacto ambiental. Por este motivo, la HOR se ha convertido en un tema de gran interés en el desarrollo de sistemas tales como las células de combustible. El mejor catalizador que se conoce hasta este momento para este tipo de reacciones es el Pt, pero tiene el inconveniente de

envenenarse fácilmente con el CO^{72} , subproducto de la reacción de producción de H_2 . Por ello, las propiedades catalíticas antes mencionadas de los clústeres de Au en la oxidación del CO, lleva inmediatamente a pensar en la posibilidad de que estos clústeres puedan desempeñar un papel importante como catalizadores de la HOR.

Pese a los descubrimientos de Hutchings y colaboradores, no existen prácticamente estudios experimentales de HOR sobre clústeres de oro. Más concretamente, que sepamos, solamente existe un estudio realizado por Lee *et al.*⁷³ de la HOR realizada con oro nanométrico.

Conviene indicar finalmente que, Zanchet *et al.* mostraron muy recientemente, mediante estudios teóricos, que los clústeres planos de Au presentaban muy buena actividad frente a la disociación de H_2^{74} .

Por todo ello, al objeto de determinar el comportamiento catalítico de clústeres de pequeño tamaño en la reacción de HOR, se realizaron estudios de esta reacción en presencia de clústeres de menos de 10 átomos, cuyos resultados serán explicados en este capítulo.

2. Estudio de los clústeres de oro: Caracterización

La muestra de clústeres de oro fue sintetizada por la empresa NANOGAP utilizando una variante del método electroquímico propuesto inicialmente por Reetz⁴⁷, y modificado posteriormente en el grupo de investigación^{26, 33, 42, 48} en el que se enmarca la presente tesis doctoral (Materiales y métodos, sección 1.8). Conviene indicar que no se ha utilizado ningún tipo de surfactante en dicha síntesis y que las disoluciones utilizadas contienen, únicamente, clústeres de Au, sal de Au y cloruro sódico (1 mM) utilizado como electrolito soporte.

En primer lugar, el trabajo se centró en la caracterización de los clústeres de oro, con el objetivo de determinar la estabilidad y el tamaño de los mismos. A tal efecto, y siguiendo el procedimiento visto en la página 51, los clústeres de oro se

caracterizaron utilizando espectroscopía de absorción atómica, análisis termogravimétrico (TGA), microscopia de fuerzas atómicas (AFM), espectroscopía UV-Vis, espectroscopía de fluorescencia y espectrometría de masas por desorción/ionización láser (LDI-TOF).

Las medidas de espectroscopía de absorción atómica dieron como resultado una concentración de átomos de oro en la muestra de 25 mg/l, resultados concordantes con los obtenidos por TGA.

La espectroscopía UV-Visible es una de las técnicas de caracterización más utilizadas para nanoestructuras de oro. Las nanopartículas de oro esféricas presentan una banda plasmónica alrededor de 520 nm⁷⁵. Esta banda se ve desplazada a longitudes de onda mayores a medida que la partícula ve incrementado su tamaño o cambia de forma, apareciendo en este caso nuevas bandas plasmónicas como consecuencia de la asimetría de forma. Así mismo, la posición de la banda plasmónica cambia dependiendo del poder oxidante o reductor del ligando unido a dicha partícula. Sin embargo, para partículas menores de ~1,5 nm (Introducción, sección 2), dicha banda plasmónica desaparece. A medida que se reduce el tamaño, primero aparecen bandas de absorción continuas decrecientes, con pequeños hombros, similares a las de los semiconductores. Esto es típico de clústeres grandes, mientras que para clústeres de pequeño tamaño aparecen bandas de absorción bien definidas que recuerdan a las bandas de absorción moleculares^{33, 76}.

La Figura- 22 presenta el espectro de absorción UV-Vis de la muestra de clústeres de oro tal como fue recibida en el laboratorio (Au inicial), mostrando una única banda de absorción, que termina en 320 nm, típica de algunos clústeres con comportamiento semiconductor (Introducción, sección 3). Se observan también tres bandas bien diferenciadas a 220 nm, 265 nm y 270 nm, características, por tanto, de clústeres de pequeño tamaño. No se observa banda plasmónica alguna, por tanto no existen partículas en disolución mayores de 1,5 nm.

Se puede realizar una primera estimación del *bandgap* de estos clústeres, con comportamiento típicamente semiconductor, a partir del valor de la longitud de onda en el que comienza a crecer la banda de absorción, es decir, alrededor de

320 nm (3,9 eV). Aplicando el modelo de Jellium¹⁹, se puede obtener, a partir de este valor del *bandgap*, que el número de átomos, N, que contienen por término medio los clústeres es:

$$N=[E_F/(E_g + \delta)]^3 = 2 \text{ o } 3 \text{ átomos}$$

siendo E_F = energía del nivel de Fermi del Au (5,3eV), E_g = *bandgap* de los clústeres (3,9 eV) y δ = factor anarmónico ($\approx 0,4V$). La corrección introducida en este modelo a través del factor anarmónico, tiene en cuenta la influencia que tienen los ligandos en el *bandgap* (Introducción, sección 3). En la Tabla 1 se mostraron los valores de los *bandgaps* para algunos clústeres de oro con diferentes ligandos calculados a partir del modelo de Jellium y su comparación con los valores derivados mediante cálculos “*ab initio*” utilizando la teoría del funcional de densidad. Los cálculos teóricos permiten obtener, por ejemplo, que el valor del *bandgap* del clúster Au₁₁ varía fuertemente con el ligando, teniendo un valor de 1,5 eV para ligandos tiolato (SMe₃) y 2,1 eV para ligandos Cl.

Por otro lado, tal como se mencionó anteriormente, el modelo de Jellium es una estimación muy simple que no tiene en cuenta la interacción de posibles ligandos u otros efectos sobre el *bandgap* y, por lo tanto, proporciona el mismo valor en los dos casos, 2,4 eV. Debido a que los clústeres de oro utilizados en este trabajo se encuentran en un medio que contiene NaCl, es muy probable que se encuentren unidos a iones Cl⁻ y que, por lo tanto, su valor de *bandgap* difiera del obtenido por el modelo de Jellium. Por esta razón, al objeto de minimizar el error cometido al no tener en cuenta los ligandos en este modelo se puede introducir un factor de corrección, mediante la anarmonicidad del potencial usado en el modelo de Jellium, que tenga en cuenta la diferente interacción de los ligandos.

Se puede observar asimismo en la tabla anterior que, salvo los casos de mayor influencia de los ligandos, el modelo de Jellium proporciona una buena aproximación del tamaño del *bandgap* de los clústeres y, por lo tanto, puede ser utilizado para la estimación aproximada del tamaño del clúster a partir de su *bandgap*.

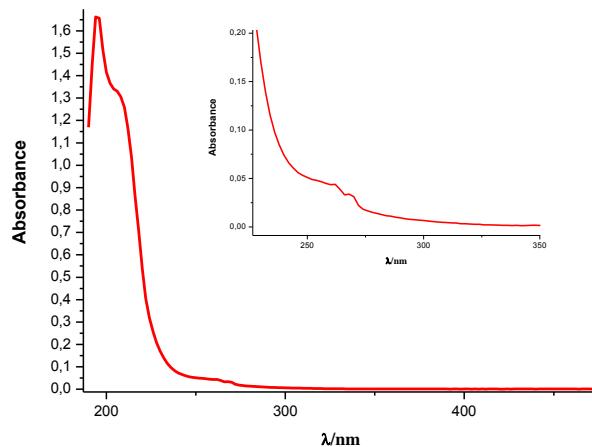


Figura- 22 Espectro de absorción en UV-Vis de la muestra de AuAQC. En la ampliación se muestran las bandas discretas que aparecen alrededor de 280 nm

La Figura 23 presenta los espectros de emisión fluorescente de la muestra de clústeres de oro a varias longitudes de onda de excitación entre 230 y 300 nm.

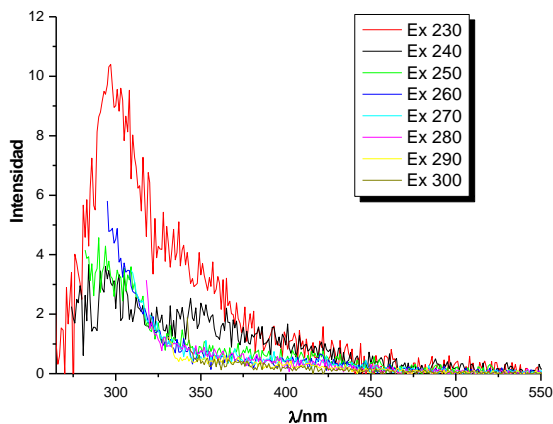


Figura 23- Espectros de emisión de AuAQC a diferentes longitudes de onda de excitación

Pueden apreciarse dos bandas de emisión, una muy clara centrada a 300 nm (4,16 eV) y otra, menos intensa, sobre 350 nm (3,5 eV). Ambas muestran el máximo de excitación a 230 nm. Realizando una estimación según el modelo de Jellium, al igual que en el caso anterior, se obtiene como resultado que dichas

emisiones se corresponden con Au₂ y Au₃ respectivamente, lo que esta de acuerdo con los resultados de espectroscopía UV-Vis.

En la Figura 24 pueden verse los espectros LDI-TOF en modos positivo y negativo. Estos espectros muestran la presencia de tres picos mayoritarios a $m/z = 467$, 591 y 984 , correspondientes con [Au₂NaClO], Au₃ y Au₅ respectivamente (donde m es la masa y z es la carga). Pueden observarse también, pero con menor intensidad, dos picos a $m/z = 1182$ y 1378 correspondientes a Au₆ y Au₇, así como trazas de $m/z = 1575$ y 1173 , correspondientes a Au₈ y Au₉. No se detectaron más picos a mayores valores de m/z , permitiéndonos limitar el tamaño máximo de los clústeres presentes en disolución a Au₉.

Por tanto, los resultados de la espectrometría de masas están en concordancia con los de espectroscopia UV-Vis y de fluorescencia, mostrando la presencia de Au₂, Au₃ y Au₅ como especies mayoritarias, y, en mucha menor medida, de Au₆ y Au₇.

Las técnicas espectroscópicas empleadas no permiten diferenciar si los clústeres poseen estructuras 2D o 3D. Sin embargo, existen estudios teóricos que muestran que la estructura más favorable de los clústeres de menos de 13 átomos, es una estructura plana o 2D^{23,24}. Para confirmar este aspecto se decidió realizar una nueva caracterización mediante medidas de microscopía de fuerzas atómicas (AFM) de los clústeres depositados en una superficie de mica.

En la Figura 25 puede observarse, por esta técnica, la presencia de los clusteres depositados sobre una superficie de mica (como comparación se muestra en la Figura 26 una imagen de AFM de una superficie de mica limpia). La excelente resolución Z del AFM (≈ 10 pm) permite la determinación de la altura de estas islas de Au con resolución atómica. Dicha determinación muestra la presencia de una distribución bimodal, con valores de $0,3$ nm y $0,5$ nm, correspondiéndose con 1 o 2 átomos de Au de altura. Teniendo en consideración estos resultados, pueden asociarse estas islas a agrupaciones de clústeres 2D, o planos. Las islas de 2 átomos de altura pueden deberse a bicapas de clústeres 2D, ya que si fueran clústeres 3D, tendrían que tener una altura superior. Por lo tanto, se comprueba que los clústeres presentes en disolución son planos, o 2D.

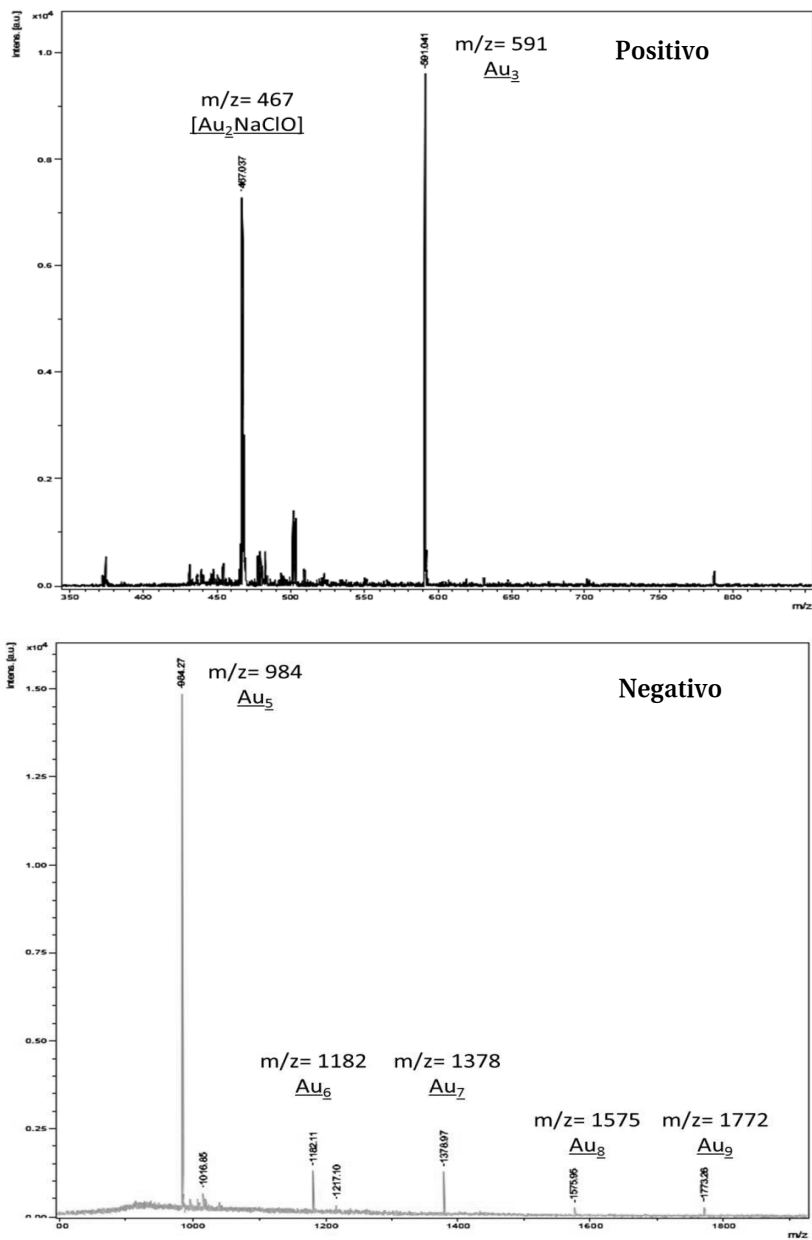


Figura 24- Espectros LDI-TOF. (A), positivo y (B), negativo

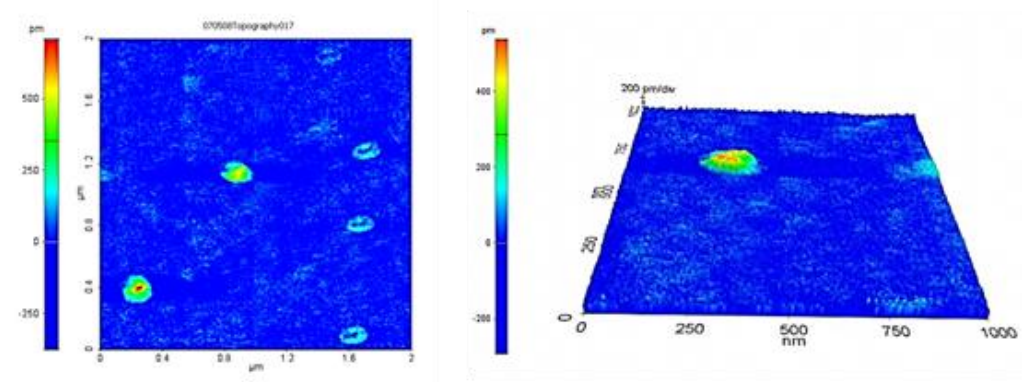


Figura 25- Imágenes de AFM de la disolución acuosa de clústeres de oro depositados en mica. A la derecha detalle 3D de una isla individual

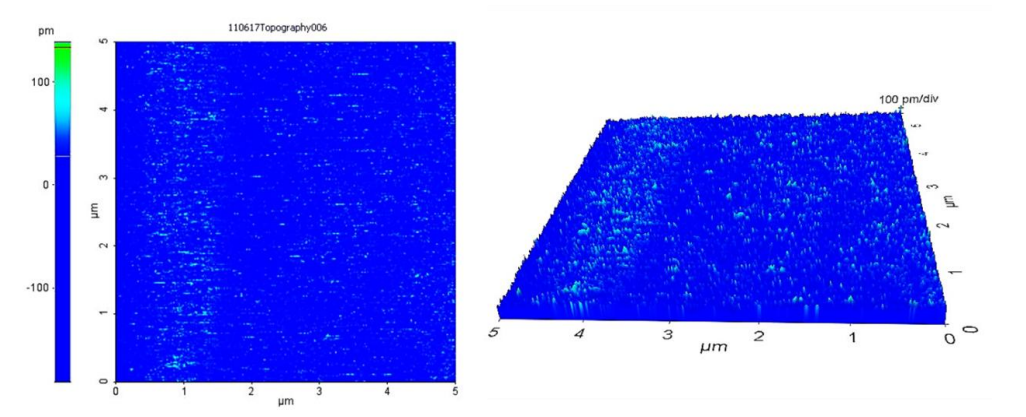


Figura 26- Imágenes de AFM (2D y 3D) de mica limpia

3. Electrocatálisis de oxidación de hidrógeno (HOR)

En la siguiente sección se describirá el comportamiento electrocatalítico que exhiben los AuAQC respecto a la HOR y se comparará su comportamiento con el que presentan una sal de oro, AuNPs e hilo de Au.

3.1. HOR sobre hilo de Au y nanopartículas de Au

Como se vio anteriormente en la introducción, no existe en la bibliografía ningún estudio que demuestre la actividad electrocatalítica frente a la HOR del oro masivo ni de las nanopartículas de gran tamaño. El único ejemplo que se conoce se limita a nanopartículas de 4 nm, que tienen que ser activadas utilizando ultrasonidos y electroquímicamente. Estas partículas no muestran prácticamente actividad si no se realizan dichas activaciones⁷³.

Por lo tanto, se decidió comprobar en primer lugar la actividad de un hilo de Au (oro masivo) y nanopartículas de 30 nm en la HOR, siguiendo el procedimiento explicado en la en la página 52.

En primer lugar, se realizó una voltametría cíclica (CV) en HClO_4 0,1M, con el objetivo de comprobar el estado del hilo de oro, ya que será el mismo medio que se utilice más adelante para examinar la HOR. Se pueden observar en la Figura 27 los picos de adsorción de OH, típicos del Au, alrededor de 1 V, y los picos correspondientes a la formación de óxidos sobre los diferentes dominios cristalinos por encima de 1,4 V, así como el pico de reducción de los mismos a 1,15 V⁷⁷.

Posteriormente se sumergió 1cm del hilo de Au en una disolución de HClO_4 0,1M saturada con H_2 , y se realizaron sucesivos ciclos de potencial entre -10 mV y 1400 mV respecto al electrodo de referencia de hidrogeno (RHE).

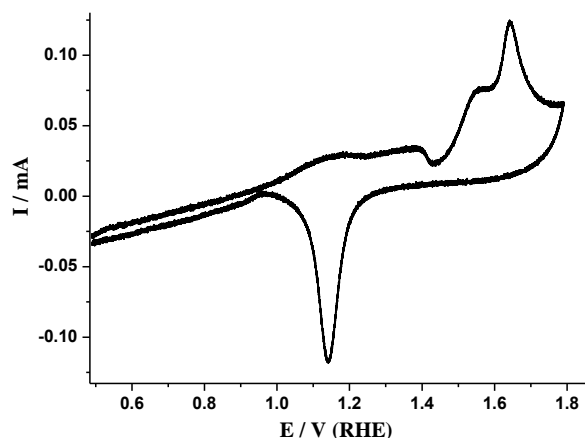
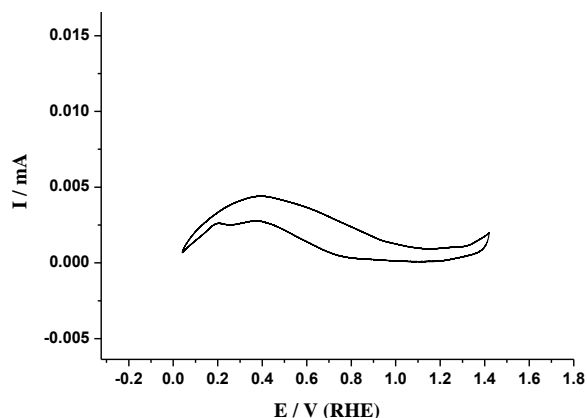


Figura 27- Perfil voltamétrico de un hilo de oro policristalino en HClO_4 0,1M.

Velocidad de barrido: 10 mVs

Puede verse en la Figura 28 como tras 70 ciclos no se encuentra actividad apreciable en el intervalo de potenciales seleccionado, obteniéndose unas corrientes muy bajas, incluso teniendo en cuenta la gran superficie de oro sumergido. Por tanto se demuestra la inactividad del oro masivo frente a la HOR.



*Figura 28- Barrido 70 de un hilo de oro policristalino en HClO₄ 0,1M saturado con H₂.
Velocidad de barrido: 10 mV/s*

Para el estudio electroquímico de las nanopartículas de Au se utilizaron AuNPs de 30 nm (suministradas por la empresa E-Tek Inc. depositadas en carbón activo) y se depositaron sobre GC-RDE. Al igual que en el caso anterior, se realizó primero un estudio por CV para caracterizar la superficie (Figura 29).

El perfil voltamétrico de las AuNPs utilizadas se corresponde con el típico para nanopartículas de oro, observándose la reducción de las especies oxidadas a 1,15 V⁷³.

Como puede verse en la Figura 30, de forma similar a lo observado en el caso del hilo de Au, en 70 barridos de potencial entre -10 mV y 790 mV en una disolución de HClO₄ 0,1M saturada con H₂, no se observa ninguna actividad electrocatalítica frente a la HOR.

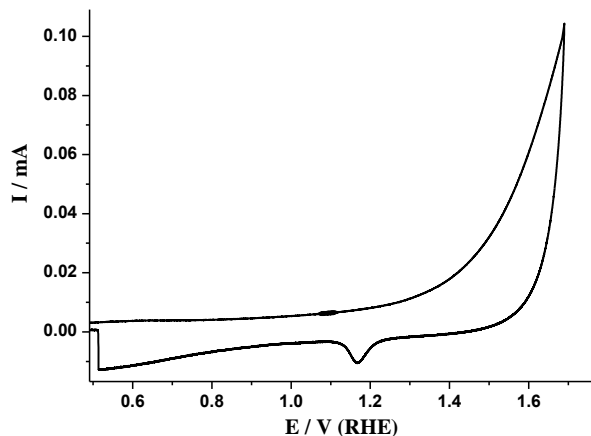


Figura 29- Perfil voltamétrico de AuNPs de 30 nm en HClO_4 0,1M. Velocidad de barrido: 10 mV/s

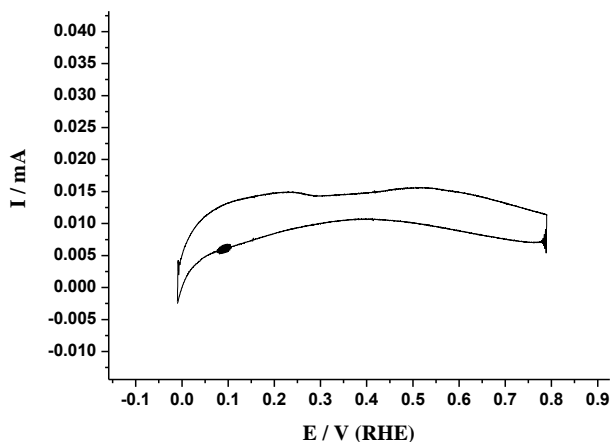


Figura 30- Barrido 70 de AuNps/C en HClO_4 0,1M saturado con H_2 . Velocidad de barrido: 10 mV/s

Una posible explicación a la falta de actividad, tanto del oro masivo como de las nanopartículas de gran tamaño (30 nm), puede encontrarse en la publicación de Conway y colaboradores⁷⁸. En dicha publicación, se argumenta que la reacción de oxidación del hidrogeno tiene lugar a través de un estado intermedio que implica la disociación del mismo. Se atribuye la inactividad del Au masivo a la incapacidad de éste para disociar el enlace H-H, siendo de este modo inactivo frente a la oxidación.

3.2. HOR sobre AuAQCs

Una vez estudiada la HOR sobre hilo de Au policristalino y nanopartículas de 30 nm, el siguiente paso consistió en el estudio de la misma sobre AuAQC.

Debido a que nuestro principal interés se centra en la actividad intrínseca de los AuAQC sin ningún tipo de interacción con el soporte, se decidió utilizar un soporte inerte, en este caso, un electrodo rotatorio de carbono vítreo (GC-RDE). Por tanto, se depositó una gota de disolución de clústeres de Au (15 μl , 0,375 μg de Au total) sobre un electrodo de GC. En contraste con una superficie completamente plana como es la de la mica (Figura 26), la superficie del carbono vítreo es muy rugosa por tratarse de hojas de grafeno interconectadas y orientadas al azar^{79, 80}. El área geométrica del electrodo de disco rotatorio del carbono vítreo (GC-RDE) es de $\sim 0,2 \text{ cm}^2$. El área de mica impregnada fue aproximadamente del mismo tamaño. Suponiendo que la disolución de AuAQC penetra unos 10 nm en el GC se impregnarían $3,6 \text{ cm}^2$ de GC con dicha concentración de clústeres (el área superficial volumétrica del GC es $1800 \text{ m}^2 \text{ cm}^{-3}$)⁸¹, lo que indicaría que la superficie ocupada por los clústeres sería 18 veces mayor que el área geométrica. Como la profundidad de esta penetración depende de la hidrofiliidad del GC, se procedió a la oxidación del GC antes de depositar los clústeres, al objeto de aumentar dicha hidrofiliidad. Por otro lado, la ausencia de cualquier tipo de surfactante o estabilizador en la dispersión de AuAQC permite mantener inalterada la hidrofiliidad del sistema, por lo que se espera que los AuAQC probablemente penetren más de 10 nm.

Por otro lado, la uniformidad del depósito formado depende de la velocidad de evaporación de la gota de disolución depositada sobre el GC. Cuanto más lenta sea esta evaporación, mayor uniformidad tendrá el depósito formado⁸².

Por tanto, una combinación de una gran área de impregnación, una evaporación lenta y baja concentración de AuAQC (menos de $1,18 \mu\text{g cm}^{-2}$), contribuye a disminuir la probabilidad de la formación de agregados de los clústeres que iría en detrimento de su actividad catalítica, si es que la hubiera ya que, teniendo en cuenta los resultados anteriormente mostrados en este capítulo y los comentados en la bibliografía, para partículas de 4 nm ⁷³, la existencia de esos agregados debería influir solamente en una disminución de

HOR sobre AuAQCs

las actividades catalíticas, porque al aumentar su tamaño y hacerse similares a las nanopartículas serían inactivos en el intervalo de potenciales en el que se pretende trabajar.

La HOR se estudió mediante CV en el intervalo de -10 mV a 790 mV, en una disolución de HClO_4 0,1M saturada con H_2 . Se utilizó para ello un sistema de electrodo rotatorio (RDE) y la velocidad de rotación fue fijada a 1600 rpm.

En la Figura 31 puede verse la actividad para diferentes ciclos consecutivos. La actividad es prácticamente indetectable para los primeros ciclos pero aumenta con ciclos consecutivos de potencial hasta alcanzar un valor estacionario a partir del ciclo 34, alcanzando valores de densidad de corriente de $5,030 \text{ mA/cm}^2$ a 260 mV. Este hecho indica que tiene lugar algún proceso de activación en este intervalo de potenciales.

Las densidades de corriente están normalizadas utilizando el área electroactiva de Au sobre el electrodo. Este valor fue calculado a partir del pico de reducción presente en la CV de los AuAQC depositados sobre GC, realizada en una disolución blanco de HClO_4 0,1M antes de las medidas electrocatalíticas (Figura 32). Por integración del pico de reducción, se obtiene la carga del proceso, y utilizando un factor de conversión de $420 \mu\text{C cm}^{-2}$, característico de las especies de Au, se obtiene el área electroactiva⁸³.

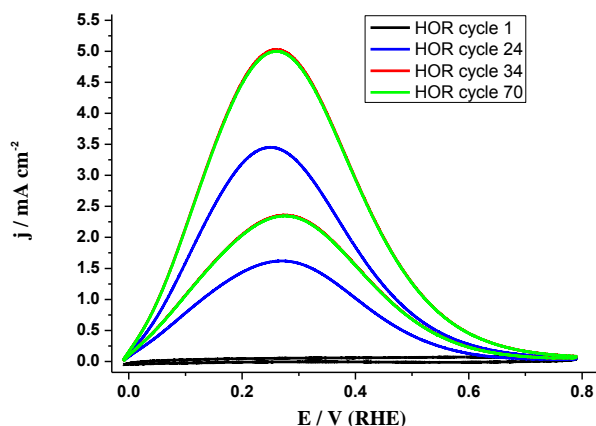


Figura 31- Diferentes barridos de la HOR sobre AuAQC/GC en HClO_4 0,1M saturado con H_2 . Velocidad de barrido: 10 mV/s. Velocidad de rotación: 1600 rpm

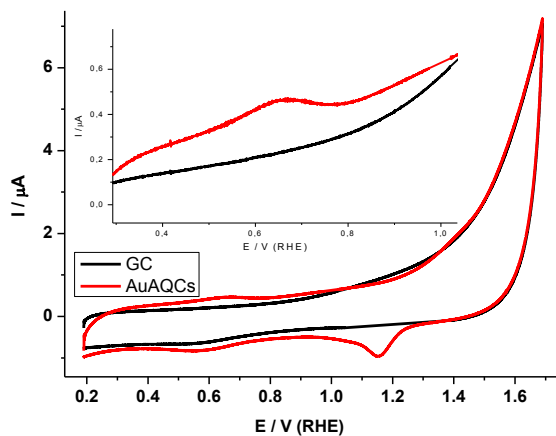


Figura 32- Perfil voltamétrico de AuAQC en HClO_4 0,1M. Velocidad de barrido: 10 mV/s. Ampliación mostrando la zona de adsorción de OH sobre el electrodo modificado con AuAQC

Una vez estabilizada la densidad de corriente, se realizaron ciclos de potencial a diferentes velocidades de rotación, con el objetivo de obtener información sobre la cinética del proceso.

En la Figura 33 puede verse la dependencia de la densidad de corriente con la velocidad de rotación. Puede observarse un máximo a 260 mV y una disminución de la densidad de corriente a potenciales mayores que alcanza valores prácticamente nulos por encima de 800 mV. Por otro lado, se observa que los barridos catódicos de potencial no alcanzan valores de densidad de corriente tan altos como los anódicos.

Este decrecimiento de la densidad de corriente, así como la histéresis en los ciclos de potencial, indican un cambio significativo de la superficie del catalizador con la consecuente inhibición de la HOR.

Las nanopartículas y los clústeres 2D son considerablemente más reactivos que sus equivalentes masivos, entre otras razones, porque tienden a compensar su incremento de energía superficial con uniones fuertes a agentes pasivantes, tales como oxígeno o especies hidroxílicas.

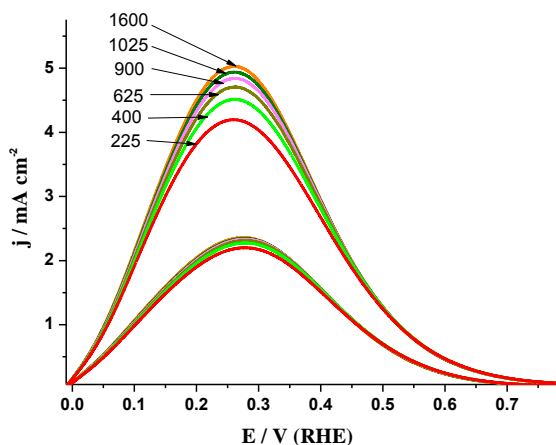


Figura 33- HOR sobre AuAQC/GC en HClO_4 0,1M saturado con H_2 . Velocidad de barrido: 10 mV/s. Velocidades de rotación: indicadas en la gráfica

La CV de la Figura 33 muestra claramente un proceso de oxidación que tiene lugar alrededor de 250 mV, (ver ampliación). El proceso de inhibición observado en la HOR podría estar asociado a la adsorción de OH^- , que comienza a partir de 0,3V (Figura 32). Este hecho está de acuerdo con lo observado en las representaciones de Levich, donde la corriente límite no sigue una dependencia lineal con la raíz cuadrada de la velocidad de rotación a ningún potencial (Figura 34).

La no linealidad de las representaciones de Levich, indica que no existe control por difusión y que, por tanto, puede tratarse de adsorción de especies sobre el electrodo que inhiben la reacción. Un fenómeno análogo ha sido publicado con anterioridad para nanopartículas de Au en el mismo electrolito⁷³, así como para otros metales, como el Ru⁸⁴.

Al analizar la dependencia de la densidad de corriente con la velocidad de rotación puede observarse una tendencia no lineal en la misma. Este resultado sugiere un importante control cinético de la HOR sobre AuAQC. Aun no siendo lineales a potenciales bajos, las rectas de Koutecky-Levich (j^{-1} vs. $\omega^{-1/2}$) son perfectamente lineales a potenciales mayores de 150 mV, con pendientes prácticamente constantes, como puede verse en la Figura 35.

HOR sobre AuAQCs

De estas representaciones podemos deducir la existencia de una corriente difusiva con una contribución cinética constante en las proximidades del máximo.

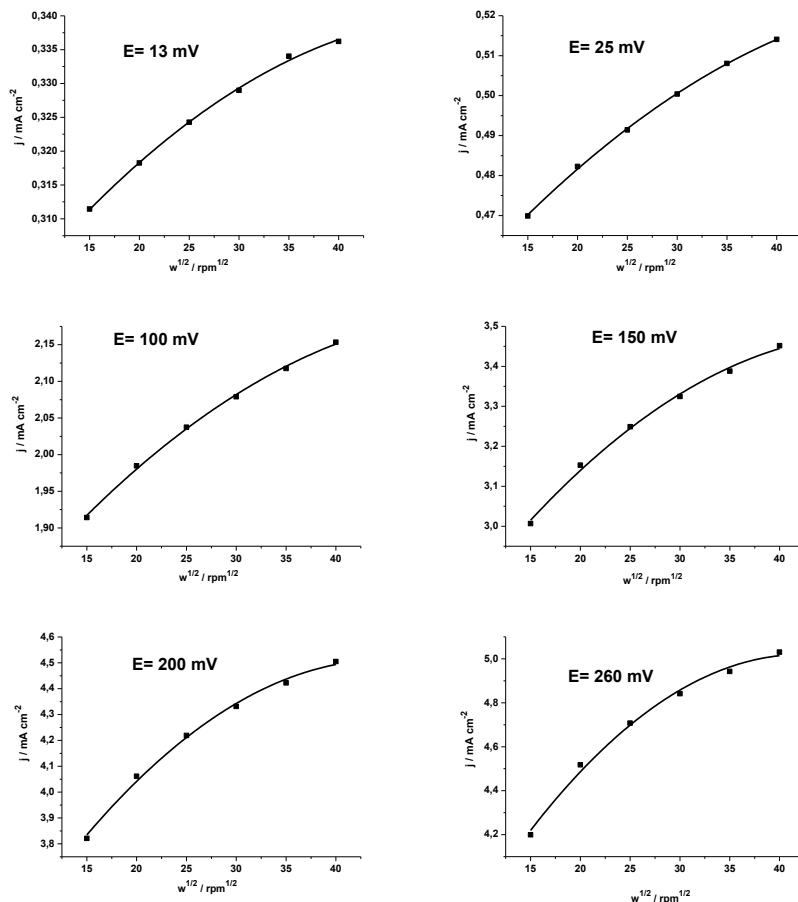


Figura 34- Representaciones de Levich de las corrientes de oxidación medidas a diferentes potenciales

Por otra parte, la pendiente de las representaciones de Koutecky-Levich no varían con el potencial, demostrando de esta forma la validez del tratamiento aplicado. Este hecho sugiere una cinética favorable. Puede hablarse entonces de un control mixto en la reacción de HOR sobre AuAQCs.

La inversa de la ordenada en el origen de las representaciones de Koutecky-Levich a un valor dado de potencial, es la corriente que debería haber sido obtenida a ese potencial en ausencia de efectos de transporte de materia (j_{kin}).

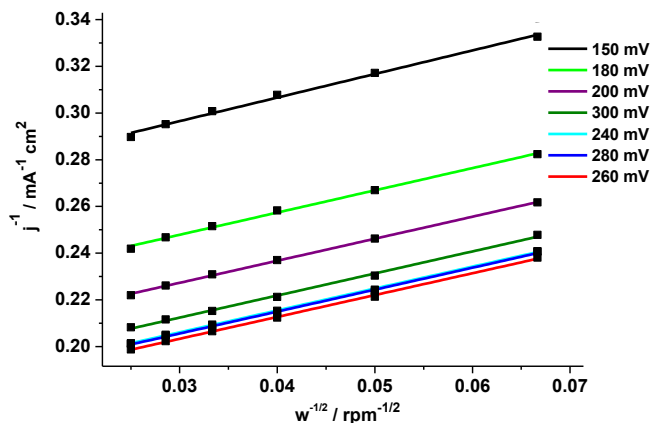


Figura 35- Representaciones de Koutecky-Levich de las corrientes de oxidación medidas a diferentes potenciales

En la Figura 36 se muestran los valores de j_{kin} frente al potencial. Como puede verse, la forma de la curva es muy parecida a la expuesta en la Figura 33, donde las corrientes de oxidación alcanzan un máximo a 260 mV. Por ello, y en concordancia con lo observado hasta ahora, este máximo no puede ser asociado a limitaciones en el transporte de materia, sino a algún proceso de inhibición sobre la superficie del catalizador, probablemente asociado a la adsorción superficial de OH^- .

No se realizó un test de estabilidad específico de la HOR sobre AuAQCs, sin embargo después de 70 ciclos la actividad permanece constante.

Es importante resaltar la gran diferencia encontrada entre los máximos de densidad de corriente para los AuAQCs y para las nanopartículas de 4nm estudiadas por Lee *et al.*⁷³. La de los clústeres es de 5,030 mA/cm^2 mientras que la de las nanopartículas es de 1,280 mA/cm^2 . Esto indica claramente la mayor eficiencia catalítica de los clústeres que las nanopartículas.

A la vista de estos resultados se puede plantear una serie de cuestiones, como por ejemplo: ¿Qué proceso de activación tiene lugar con los clústeres?. ¿Por qué,

al contrario de lo que sucede con las nanopartículas, es suficiente este intervalo de potenciales y no es necesario llegar a potenciales más catódicos?...

Estas preguntas, no sólo son importantes por su interés científico básico sino que resultan fundamentales por el impacto que pueden tener a la hora de diseñar cualquier sistema electrocatalítico basado en oro con potenciales aplicaciones tecnológicas.

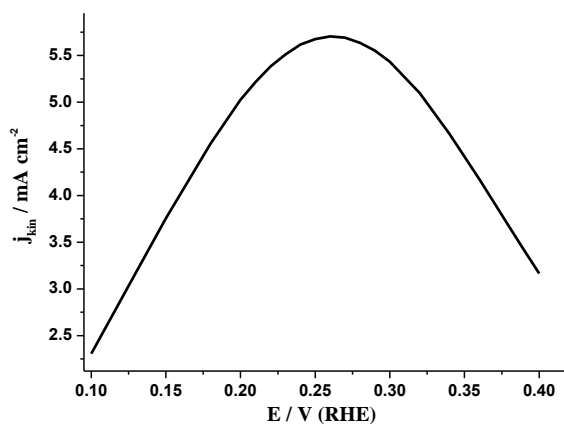


Figura 36- Representaciones de j_{kin} frente al potencial (E)

3.3. HOR sobre H_{AuCl}₄

Debido a que la disolución de partida de AuAQCs contiene también sal de oro es necesario realizar una comprobación de su actividad frente a la HOR.

Para tal propósito, y siguiendo la metodología explicada en la en la página 53, se utilizó un electrodo GC-RDE modificado H_{AuCl}₄ (6,10 $\mu\text{g/cm}^2$). En primer lugar, y al igual que en los estudios anteriores, se registro la CV de H_{AuCl}₄/GC cuyos resultados se muestran en la Figura 37. De la misma manera que para el estudio de los AuAQCs, para el cálculo de las densidades de corriente se utilizó el área del pico de reducción de especies oxidadas de Au .

La actividad frente a la HOR se midió de la misma manera y en el mismo intervalo que para el caso de los AuAQCs. Sucesivos ciclos en el intervalo de potenciales estudiados para los clústeres no muestran actividad alguna, por lo que se comprueba que la actividad vista anteriormente es debida a la acción de

HOR sobre AuAQCs

los clústeres. Sin embargo, extendiendo el intervalo de potenciales hasta 1,7 V, se puede apreciar un aumento de las corrientes en el barrido catódico, lo que indica la presencia de un pico de HOR similar al observado para los clústeres.

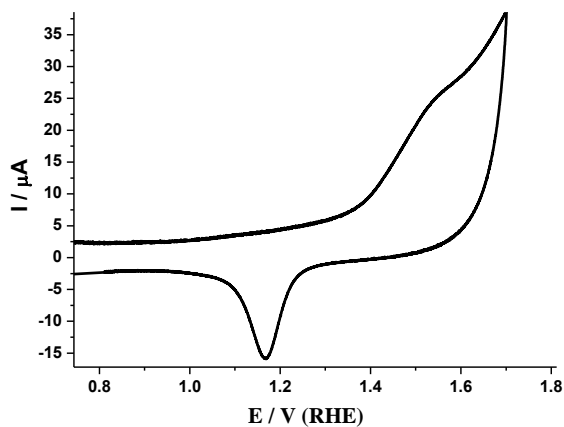


Figura 37- Perfil voltamétrico de HAuCl_4/GC en HClO_4 0,1M. Velocidad de barrido: 10 mV/s

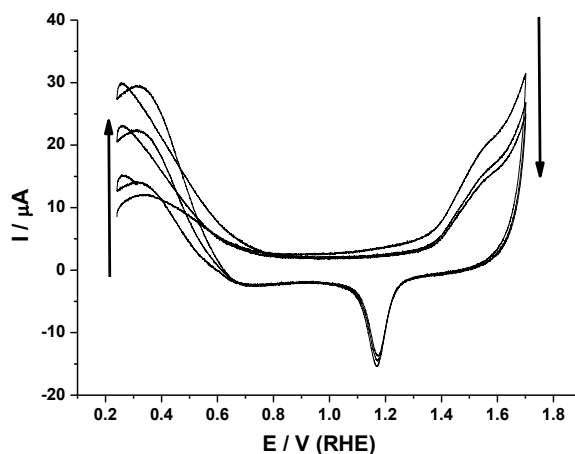


Figura 38- Sucesivas voltametrías de HAuCl_4/GC en HClO_4 0,1M saturada con H_2 . Velocidad de barrido: 10 mV/s

Se realizaron entonces barridos sucesivos hasta 1,2 V, 1,4 V y 1,7 V, observándose que únicamente cuando se llega hasta los 1,7 V tiene lugar esta activación. Se observó una disminución del pico de oxidación de las especies de

Au correlacionada con un incremento en la actividad catalítica frente a la HOR (Figura 38).

En vista de ello, se estudió el proceso de activación de HAuCl_4/GC llevando a cabo sucesivas amperometrías a 1,7 V durante 2 min en HClO_4 0,1M saturado con H_2 , seguido de voltametrías entre -10 mV y 790 mV a 1600 rpm. Se puede observar un claro aumento de la actividad frente a la HOR después de cada amperometría. Esta actividad se estabiliza en un valor de $2,825 \text{ mA/cm}^2$, después de alrededor de 13 amperometrías, como puede verse en la Figura 39.

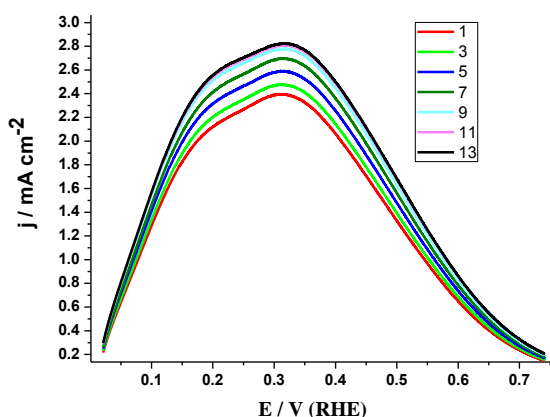


Figura 39- Sucesivas voltametrías de HAuCl_4/GC en HClO_4 0,1M saturada con H_2 .
Velocidad de barrido: 10 mV/s. Velocidad de rotación: 1600 rpm

Pueden apreciarse en la Figura 39 dos máximos diferentes en la curva de HOR, uno de ellos alrededor de 200 mV y el otro alrededor de 325 mV. Este hecho podría indicar la existencia de dos centros activos diferentes.

Una posible evidencia de la existencia de dos tipos de centros activos puede obtenerse analizando los valores máximos de densidad de corriente obtenidos para la sal y los clústeres, siendo $2,825 \text{ mA/cm}^2$ y $5,030 \text{ mA/cm}^2$ respectivamente. Puede verse que la actividad mostrada por la sal es intermedia entre la de los clústeres y la determinada por Lee *et al.*⁷³ para nanopartículas de 4 nm ($1,280 \text{ mA/cm}^2$). Por tanto, se podría pensar que el proceso de activación

de los iones consiste en la formación de partículas con tamaños intermedios entre los tamaños subnanométricos de los AQCs y los 4 nm, o bien una mezcla de dos especies. La disminución de la corriente de oxidación que se aprecia en la Figura 38 apoya la formación de clústeres activos frente a la HOR.

Además de la diferencia del proceso de activación y de la actividad catalítica máxima que existe entre la sal y los clústeres, otra diferencia significativa se aprecia cuando se realizan barridos sucesivos sin ningún proceso de activación a 1,7 V. Mientras que para los clústeres la aplicación de barridos sucesivos da como resultado corrientes constantes, para la sal, una vez activada, puede observarse (Figura 40) una disminución de la corriente y una pérdida casi completa de la actividad al cabo de 30 barridos.

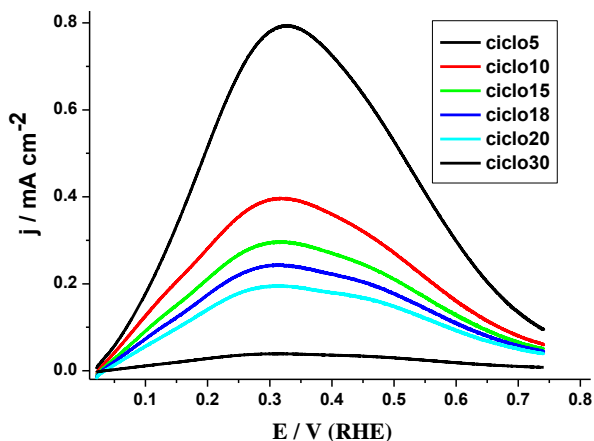


Figura 40- Desactivación en barridos sucesivos de HAuCl_4/GC en HClO_4 0,1M saturada con H_2 . Velocidad de barrido: 10 mV/s. Velocidad de rotación: 1600 rpm

3.4. Activación electroquímica de los clústeres: Cuestión de niveles energéticos

La primera pregunta que surge respecto al comportamiento electrocatalítico observado para AuAQCs es: ¿por qué tienen que ser activados los clústeres para la HOR?

Para encontrar una respuesta a esta pregunta, debemos fijarnos en las propiedades semiconductoras de los AQCs, teniendo en cuenta el valor del *bandgap* obtenido para los clústeres aquí estudiados. Como se demostró al

HOR sobre AuAQCs

principio de este capítulo, los clústeres utilizados se componen de muy pocos átomos y, por tanto, el valor de su bandgap es relativamente grande.

Como estamos tratando con una reacción de electrooxidación es lógico pensar que el bandgap puede tener una gran influencia en dicha reacción. En la Figura 41 se puede ver un esquema de cómo las propiedades electrónicas de los clústeres están relacionados con la HOR.

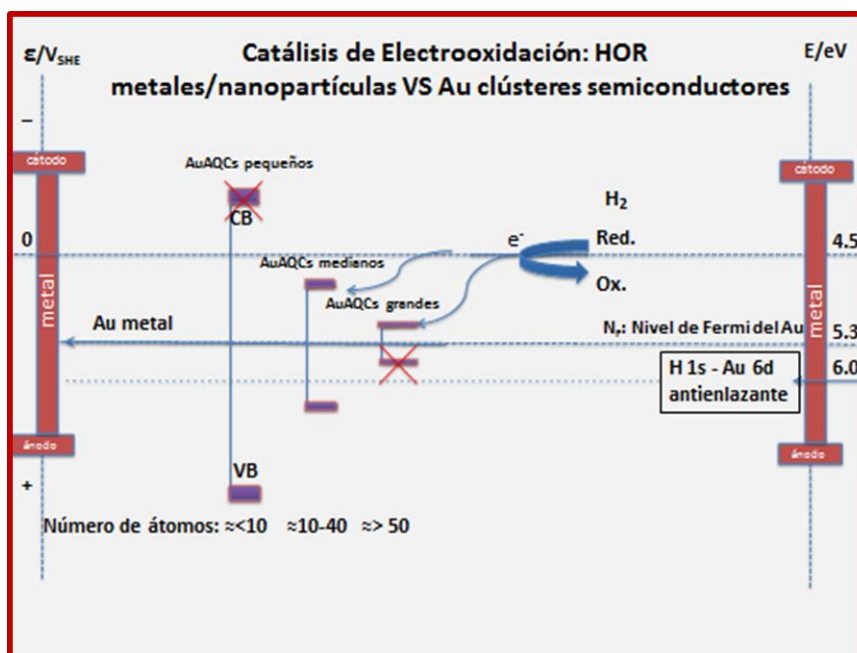


Figura 41- Representación esquemática del comportamiento electrocatalítico de clústeres de pequeño, medio y gran tamaño, así como de nanopartículas y metal masivo

En esta figura se muestra la posición del *bandgap* para diferentes tamaños de clústeres de Au en dos escalas, a la derecha la absoluta en eV, y a la izquierda la relativa tomando como referencia al electrodo estándar de hidrógeno (E_{SHE}). Para mayor simplicidad, la densidad de estados (DOS) para las bandas de valencia (VB) y conducción (CB) se representan esquemáticamente como pequeñas cajas que indican la indertidumbre respecto a estos valores. También se representan el nivel de Fermi del Au (5,3 eV), situado en el medio del *bandgap* de los AuAQC, así como el potencial redox de la HOR ($E_{red/ox}$) (4,5 eV).

HOR sobre AuAQCs

Para que la HOR tenga lugar, el catalizador debe ser capaz de aceptar en su CB el electrón desprendido en la oxidación y, por lo tanto, esta CB tendría que estar situada por debajo del $E_{\text{red/ox}}$ de la HOR. Puede verse en la figura que para clústeres de pequeño tamaño (valores altos del *bandgap*) esto no sucede. La CB en este tipo de clústeres estaría por encima del $E_{\text{red/ox}}$ de la HOR y, por tanto, el aceptar un electrón de la oxidación no es un proceso favorable. Sin embargo, cuando crece el tamaño del clúster, se reduce el *bandgap* y, por tanto, llegará un momento en que la CB esté por debajo del $E_{\text{red/ox}}$, siendo factible la HOR. La pregunta surge por sí sola ¿de qué tamaño crítico estamos hablando?

Teniendo en cuenta las condiciones experimentales, el potencial redox de la HOR sería $E_{\text{red/ox}} = 0,03$ V. Analizando la Figura 41, el *bandgap* máximo (BG_{max}) que podría tener un clúster para ser activo frente a la HOR sería:

$$BG_{\text{max}} = 2 \times [E_{\text{red/ox}}(\text{HOR}) + \Delta] = 2 \times (0,03 + 0,8) \approx 1,7 \text{ eV}$$

Siendo $\Delta = E_{\text{F}} - E_{\text{SHE}} = 5,3 - 4,7 = 0,8$ eV, donde $E_{\text{F}} = 5,3$ eV representa el nivel de Fermi del Au y $E_{\text{SHE}} = 4,7$ eV el potencial estándar de hidrógeno en escala absoluta.

Por tanto, el BG_{max} para que un clúster sea activo frente a la HOR debería ser de 1,7 eV, mucho menor que el *bandgap* de los clústeres presentes en la disolución de estudio. De esta manera se justifica que los clústeres inicialmente no sean activos frente a la HOR.

Teniendo en cuenta que el *bandgap* decrece con el número de átomos²¹, y utilizando una vez más el modelo de Jellium, puede calcularse el número de átomos que debería tener un clúster para que su *bandgap* sea igual al BG_{max} :

$$N < \approx [5,3/(1,7+0,4)]^3 = 16 \text{ átomos}$$

El resultado de aplicar el modelo de Jellium da como resultado que el tamaño mínimo de clúster con actividad para la HOR es de 16 átomos. Sin embargo, tal como se comentó anteriormente, este modelo es muy simple y no tiene en cuenta la influencia de ligandos y otras interacciones en el *bandgap*.

Para una estimación más rigurosa, pueden utilizarse los resultados publicados recientemente por Hakinen y colaboradores²¹: Mediante cálculos de la teoría del

funcional densidad, estos autores mostraron que los valores de *bandgap* del clúster de Au₁₁ pueden variar en el intervalo de 1,5 eV a 2,1 eV, presentando el Au₁₃ con ligandos similares un *bandgap* de 1,8 eV. Por tanto, se puede establecer un intervalo de $N \approx 10-15$ átomos como tamaño máximo para que un clúster sea electroactivo frente a la HOR.

En la Figura 41 se ha representado también de forma esquemática el otro factor comentado anteriormente que hay que tener en cuenta para explicar las propiedades electrocatalíticas del Au y que se refiere a la dificultad del proceso de disociación del hidrógeno sobre el oro –tanto en forma masiva como en forma de nanopartículas-, delimitando de esta forma, no solo un tamaño mínimo, sino también un tamaño máximo que estaría definido por la “nobleza” del Au.

En efecto, Hammer y Norskov⁵¹ mostraron, mediante cálculos autoconsistentes del funcional densidad, que el H₂ no se puede disociar sobre oro metálico (ya sea masivo o como nanopartícula metálica). Esto sucede porque, al contrario de lo que pasa con otros metales “menos nobles” como Pt y Ni, el N_F del Au está situado por encima de la resonancia antienlazante H 1s-Au 6d, por lo que la aceptación de un electrón implicaría llenar los estados antienlazantes y crearía repulsión entre el H y el Au.

La posición de la resonancia antienlazante estimada por Hammer y Norskov ($\approx 6,0$ eV) está representada también en la Figura 41. Puede observarse que clústeres de gran tamaño, y, por lo tanto, *bandgaps* pequeños ($>\approx 50$ átomos; BG $<\approx 1-1,5$ eV), tendrán su VB por encima de la resonancia antienlazante. La existencia de una VB por encima de la resonancia antienlazante, al igual que para el Au masivo y nanopartículas (E_F Au), hace que los electrones puedan llenar estos estados antienlazantes, lo que implicaría la repulsión entre el Au y el H y no permitiría la necesaria unión del Au al H para su posterior oxidación catalítica, haciendo de esta forma que resulten inactivos frente a la HOR. Por lo tanto, solamente los clústeres de tamaño inferior a ≈ 50 átomos son capaces de enlazar H al estar su VB por debajo de la resonancia antienlazante. Apoyando este hecho conviene recordar que existen numerosas publicaciones teóricas que demuestran que, contrariamente a las nanopartículas y al oro masivo, los

clústeres de muy pequeño tamaño poseen una gran capacidad para disociar la molécula de hidrógeno^{74,85}.

Se pueden establecer entonces (véase Figura 41) unos límites de tamaño para que los clústeres de Au sean activos frente a la HOR. El tamaño que tendrán que tener los clústeres estará en el intervalo: 10-15 átomos \approx Au_N \lesssim 50 átomos.

Teniendo en cuenta todo esto, los AuAQCs presentes en la disolución inicial tendrían que crecer, al menos, hasta un tamaño de 10-15 átomos para ser activos frente a la HOR. Esto parece que se consigue en el proceso de activación, ciclando entre -10 mV y 790 mV, en HClO₄ saturado con H₂. Para que ocurra este crecimiento es necesaria la presencia de iones metálicos, que es el caso de las muestras de clústeres utilizadas, como se comentó anteriormente.

La presencia conjunta de iones y clústeres en la superficie del electrodo, y el efecto de los ciclos de potencial, hacen crecer los AuAQCs iniciales y permiten obtener clústeres de un tamaño superior catalíticamente activos, como puede observarse en los resultados obtenidos. La concentración de estos clústeres de mayor tamaño está limitada por la concentración superficial de clústeres y por la cantidad de iones metálicos presentes en la disolución de partida. Por tanto, es de esperar que cuando todos los iones han reaccionado, la concentración de clústeres de mayor tamaño permanezca constante y la activación alcanzará su valor límite. Este hecho explica la estabilidad de la densidad de corriente que se alcanza en los procesos de ciclado.

Por su parte, tal como se ha comentado, Hutchings y colaboradores encontraron que los clústeres 2D de pequeño tamaño (10 átomos), tiene una actividad catalítica extraordinaria⁷¹. Tal como se ha mencionado estructuras 3D, como las obtenidas a partir de Au NPs de 4 nm, tras activación por ultrasonidos y electroactivación a -600 mV, presentan una actividad de 1,280 mA/cm²⁷³ que es claramente inferior a la presentada por los AuAQCs en ausencia de activación catódica a -600 mV, lo que podría significar que los clústeres producidos por la activación anódica presentan estructuras 2D más activas. Si los clústeres siguiesen creciendo por encima del límite 2D, podrían alcanzar tamaños mayores de los 50 átomos, y se inactivarían. Este fenómeno se traduciría en una disminución de la densidad de corriente, después de haberse activado los

clústeres, lo que no se observa en nuestro caso. Por tanto, se puede suponer que la activación de los clústeres los hace crecer hasta un tamaño máximo del orden de 10 -12 átomos, manteniendo una estructura 2D y, por lo tanto, con una actividad catalítica máxima. La razón por la que el crecimiento se detiene en la transición 2D a 3D por el momento no se conoce, pero podría estar asociada a un requerimiento energético más alto para este proceso, que haría que el intervalo de potenciales empleado no sea suficiente como para que los clusters crezcan más allá de ese límite, contrariamente a lo que sucede en el caso de la activación de la sal de oro vista anteriormente, en la que al utilizarse potenciales más altos no existe dicho límite y los clústeres pueden crecer formando estructuras 3D con un número de átomos mayor de 10-12. Conviene indicar aquí que el cambio de una estructura 2D a otra 3D en clústeres de Au ha sido también invocada como origen de la pérdida de actividad electrocatalítica en la reducción de oxígeno, lo que soporta la hipótesis propuesta⁸⁶.

3.5. De la sal a la metaestabilidad

La desactivación que ocurre con el ciclado para el H_{AuCl₄}/GC activado lleva directamente a pensar en la formación de algún tipo de estructura 3D metastable. De hecho, está publicado que tratamientos electroquímicos agresivos⁸⁷⁻⁸⁹, entre otros^{90,91}, producen estructuras metaestables, utilizándose a menudo este procedimiento para activar catalizadores. De esta forma, el H_{AuCl₄} podría, en primer lugar, formar un film de oro en estado reducido sobre el GC. Cuando se lleva el potencial hasta 1,7 V se crean defectos en la superficie formándose, por tanto, mezclas de clústeres de varios tamaños, 2D y 3D, que podrían asociarse a la aparición de dos picos en la HOR. La obtención en este caso de densidades de corriente intermedias entre los AuAQCs y las nanopartículas de 4nm activadas catódicamente sería indicativo de que los dos tipos de estructuras (2D y 3D) están presentes tras la activación. La desactivación que se observa con el tiempo, cuando se deja de realizar la activación anódica a 1,7 V y transcurrido cierto tiempo (unos 30 ciclos), podría entonces deberse a que la superficie se relaja, y los defectos desaparecen, desapareciendo también la actividad electrocatalítica^{87,91,92}.

3.6. Conclusiones

En este capítulo se ha mostrado la extraordinaria actividad catalítica que presentan AuAQCs sintetizados por vía húmeda, estables en disolución y en ausencia de soporte.

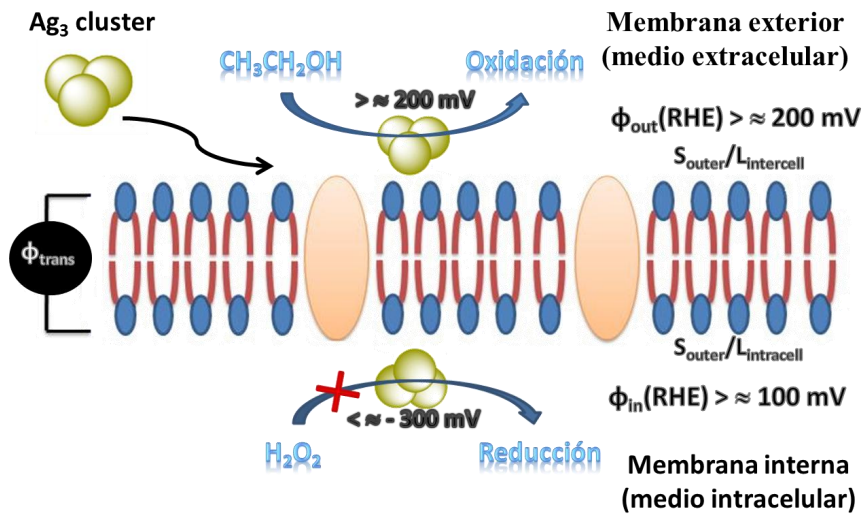
Se ha mostrado también que estos AuAQCs (de muy pequeño tamaño: aprox. 2-5 átomos) presentan actividad electrocatalítica frente a la HOR sólo después de haber sido activados anódicamente a un potencial de 790 mV. Esta activación se debe a la presencia de iones de Au que permiten crecer a los AuAQCs hasta alcanzar un tamaño crítico electroquímicamente activo.

Se ha desarrollado un modelo que permite explicar de forma conveniente la existencia de un intervalo de tamaños óptimos (aprox. 10 a 50 átomos) para que los AQCs sean electroactivos. Este tamaño crítico coincide con clústeres lo suficientemente pequeños como para tener una geometría 2D, y lo suficientemente grandes como para que su CB esté por debajo del potencial redox de la HOR.

Se ha obtenido mediante este procedimiento de activación la actividad electrocatalítica del Au más alta que se conoce hasta la fecha frente a la HOR.

Por lo tanto, se puede concluir que este estudio ha permitido establecer unos límites de tamaño aplicables a nanoestructuras de Au, para que su actividad catalítica frente a la HOR sea óptima, lo que resulta de importancia fundamental en el diseño de nuevos electrocatalizadores basados en este metal.

BIOELECTROCATALISIS: UNA CONEXION ENTRE CELULAS ELECTROQUIMICAS Y BIOLÓGICAS



1. Introducción

La electroquímica de clústeres subnanométricos es un campo nuevo, activo y prometedor que abarca un sinnúmero de posibilidades, muchas de las cuales permanecen aún inexploradas.

Como ya se ha comentado en esta tesis, las propiedades de los clústeres pueden diferir marcadamente de las de las nanopartículas y esto se ha demostrado fehacientemente en el capítulo anterior en el que se ha observado la gran actividad electrocatalítica que tienen los clústeres de Au de un pequeño número de átomos en la HOR.

El comportamiento catalítico y, más concretamente, el electrocatalítico de la plata no está muy estudiado. Sin embargo, los catalizadores comúnmente utilizados, como Pt, Pd, Rh o Au, tienen un coste muy elevado para ser utilizados a escala industrial. Se hace necesario, por tanto, la investigación de otros catalizadores alternativos. De esta manera, teniendo en cuenta las sorprendentes propiedades que presentan los clústeres, el estudio de la electrocatalisis sobre AgAQCs tiene un valor práctico significativo.

Por otro lado, el tamaño de dichos clústeres los hace candidatos ideales para su utilización como bioelectrocatalizadores, campo inexplorado hasta el momento. Así, la combinación de una alta actividad electrocatalítica para la oxidación de alcoholes junto con un tamaño que resulte adecuado a la fisiología celular, podría resultar de extrema importancia en el tratamiento de enfermedades asociadas a la ingesta excesiva de alcohol. Dicha terapia se basaría en la oxidación in vivo del alcohol en el propio medio celular. Como ejemplo, los clústeres de plata podrían prevenir, o al menos mitigar, algunos de los daños celulares asociados a casos graves como el síndrome de alcoholismo fetal (FAS), patología común en hijos de madres que consumen alcohol durante el embarazo⁹³. Es importante mencionar que el desarrollo del sistema nervioso es particularmente sensible al alcohol, por lo que el FAS puede producir trastornos muy graves⁹³.

En este sentido se ha publicado que el etanol induce, entre otros, apoptosis⁹⁴ y desorganización del citoesqueleto de actina^{95, 96}. Dichos resultados han sido

obtenidos en cultivos primarios de astrocitos de ratas recién nacidas que se suponen representan unos modelos celulares adecuados de FAS⁹³.

Además, que sepamos, hasta los presentes estudios nunca se había abordado la posibilidad de la aplicación de partículas metálicas como electrocatalizadores en medios biológicos.

En este capítulo se analiza la actividad electrocatalítica de clústeres de plata depositados sobre electrodos de carbono vítreo para la oxidación de etanol y otros alcoholes en celdas electroquímicas. Los experimentos se realizaron en medio ácido, básico y fisiológico, a potenciales muy bajos (de aproximadamente 200 mV vs RHE) y con concentraciones de alcohol similares a las usadas en los estudios de la toxicidad de alcohol en los medios celulares antes mencionados.

Finalmente, se analiza el efecto citoprotector de los clústeres *in vivo* frente al etanol, con el objetivo de evaluar la prevención de la acción de esta sustancia sobre la desorganización del citoesqueleto de actina y la apoptosis producida por la exposición de las células a dicho tóxico.

2. Estudio de los clústeres de plata: Caracterización

La muestra de clústeres de plata fue sintetizada por la empresa NANOGAP utilizando una variante del método electroquímico propuesto inicialmente por Reetz⁴⁷, y modificado posteriormente en nuestro grupo de investigación^{26, 33, 42, 48} (Materiales y métodos, 1.8).

En primer lugar, el trabajo se centró en la caracterización de los clústeres de plata, con el objetivo de comprobar su estabilidad y el tamaño de los mismos. A tal efecto, tal como se ha visto en la página 54, los clústeres de plata se caracterizaron utilizando espectroscopia de absorción atómica, microscopia de fuerzas atómicas (AFM), espectroscopía UV-Vis, espectroscopía de fluorescencia, espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) y voltametría cíclica.

Las medidas de espectroscopía de absorción atómica dieron como resultado una concentración de átomos de plata en la muestra de 25 mg/l.

Al objeto de observar la existencia de clústeres de pequeño tamaño en la disolución se llevaron a cabo, en primer lugar, medidas de AFM. Como se ha mencionado anteriormente (Introducción, sección 2.4.1), diferentes estudios teóricos han permitido deducir que los clústeres menores de 10 átomos^{23, 24 22} poseen una geometría plana, por lo que se puede tratar de determinar el tamaño máximo de los clústeres empleados mediante AFM.

En la Figura 42 pueden verse dos de las imágenes tomadas en AFM para los clústeres de plata utilizados.

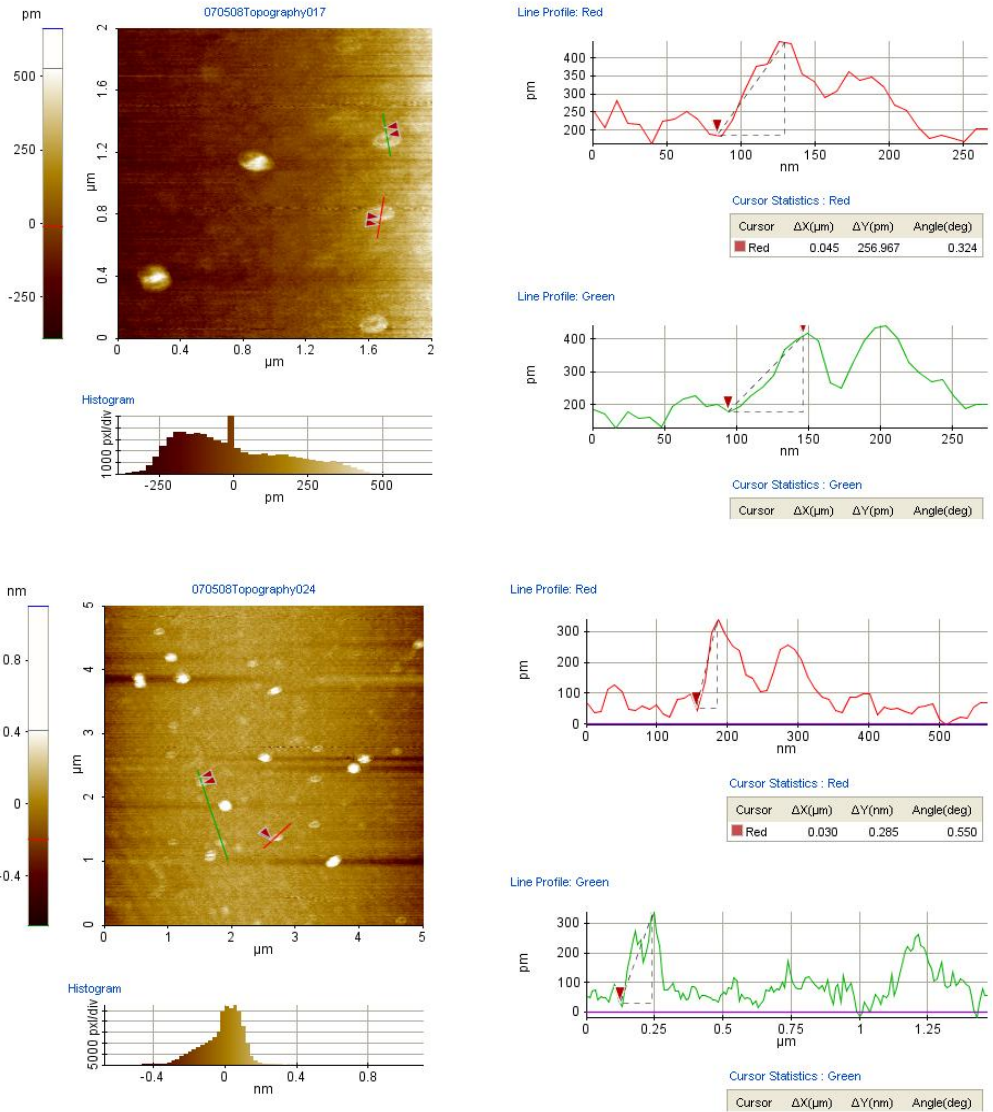


Figura 42-Imágenes de AFM de la disolución acuosa de clústeres de plata depositados en mica (rugosidad media ~150 pm). Debajo de cada una de las imágenes puede verse el histograma de tamaños correspondiente. A la derecha de cada imagen puede verse el perfil de los fragmentos seleccionados

Se observa en estas imágenes la existencia de partículas depositadas con una altura aproximada de 0,3 nm, lo que corresponde a un átomo de plata. Se puede

concluir así que las partículas depositadas corresponden a clústeres planos de plata y, por lo tanto, menores de 10 átomos.

Por otra parte en el histograma obtenido no se observan perfiles de partículas con una altura superior a 0,4 nanómetros, corroborando de esta forma la ausencia de nanopartículas en las muestras, que deberían poseer una altura mínima de 1 nm.

Debido a la pobre resolución lateral de la técnica utilizada no es posible determinar el tamaño exacto de los clústeres. En la actualidad se han iniciado colaboraciones con el Prof. D.Fujita al objeto de poder obtener esta información utilizando la técnica de microscopia de efecto túnel (STM) en condiciones de baja temperatura (4K), lo que será objeto de futuras investigaciones en el desarrollo y la continuación del presente trabajo.

La espectroscopía UV-Visible es una de las técnicas de caracterización más utilizadas para nanoestructuras de plata. Es sabido que las nanopartículas de plata esféricas presentan una banda plasmónica (Figura 6) que normalmente se encuentra entre 400 y 435 nm^{97, 98}, la cual se ve desplazada a longitudes de onda mayores a medida que la partícula va incrementando su tamaño, cambia de forma⁹⁹⁻¹⁰¹, o varían las propiedades redox de los agentes utilizados como estabilizantes. Al igual que ocurría con las partículas de Au mencionadas en el capítulo anterior, para partículas de tamaños inferiores a ~1,5 nm, la banda plasmónica desaparece, dando lugar a medida que se reduce el tamaño, primero a bandas de absorción continuas decrecientes con pequeños hombros, similares a las de los semiconductores, para clústeres grandes, y finalmente a bandas de absorción bien definidas, que recuerdan a las bandas de absorción moleculares, para clústeres de pequeño tamaño^{33, 76}.

En el espectro UV-Visible obtenido (Figura 43), pueden observarse únicamente tres bandas bien diferenciadas a 192 nm, 209 nm y 227 nm, características, por tanto, de clústeres de pequeño tamaño. Al igual que se hizo anteriormente para los AuAQCs, se puede estimar el tamaño de estos clústeres de plata aplicando el modelo de Jellium y considerando el valor del *bandgap* como el valor de la longitud de onda correspondiente al inicio de las bandas de absorción (~350 nm = 3,54 eV), dando como resultado un tamaño de unos 3 átomos ($n = (5,4/3,54)^3$,

donde 5,4 V es el nivel de Fermi de la plata masiva). En este caso, debido a la ausencia de Cl^- y otros ligandos, no se requirió de la utilización de una corrección al modelo como en el caso de los clústeres de Au.

Estos resultados son consistentes con los datos obtenidos por AFM.

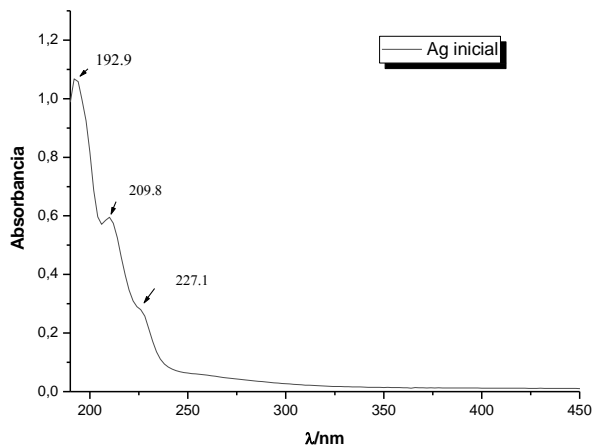


Figura 43- Espectro de absorción UV-Visible de la muestra de AgAQC

La Figura 44 representa el espectro de emisión de los AgAQC para una longitud de onda de excitación de 230 nm. Pueden observarse 2 bandas de emisión, una de ellas centrada en ≈ 300 nm y la otra en torno a 350 nm.

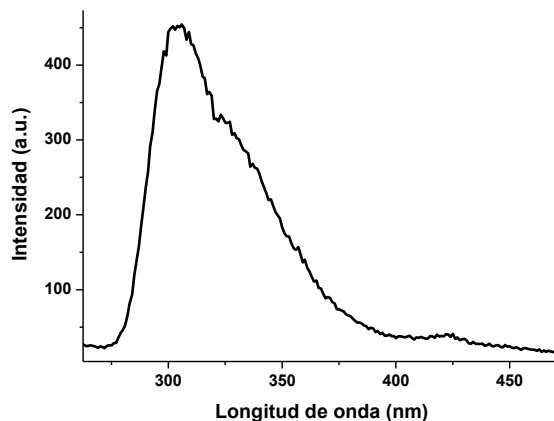


Figura 44- Espectros de emisión de los clústeres de plata a una longitud de onda de excitación de 230 nm

Suponiendo que un clúster tiene solo una absorción y emisión específica^{20, 22} y utilizando de nuevo el modelo de Jellium para las emisiones obtenidas, 300 nm (4,16 eV) y 350 nm (3,56 eV), puede deducirse de nuevo la existencia de dos clústeres: Ag₂ y Ag₃, asociados a las dos emisiones observadas.

Es de destacar que la presencia de fluorescencia sólo se observa en clústeres y no en nanopartículas debido a su baja densidad de estados^{37, 102}, que hace que sus propiedades ópticas sean semejantes a las exhibidas por moléculas y *quantum dots*, extendiéndose de esta forma la potencial aplicación de los mismos.

En el capítulo siguiente (sección 3.2.2) se expondrá un análisis más exhaustivo de las propiedades fluorescentes de estos clústeres.

Los resultados obtenidos por MALDI, tanto en modo positivo como en negativo, muestran que las especies predominantes en disolución son A₂ y Ag₃. Sin embargo, también es clara la presencia de clústeres de mayor tamaño, aunque en concentración mucho menor. Esto también se hará evidente a partir de los resultados del proceso de purificación de los mismos descritos en el capítulo siguiente (Sección 3.2.3). Se obtiene de esta forma una buena concordancia con los resultados obtenidos por las otras técnicas de caracterización mencionadas, al tiempo que se confirma la existencia de una alta concentración del catión metálico Ag⁺ en las muestras, subproducto del método de síntesis utilizado⁴⁸.

Los análisis de voltametría cíclica permiten confirmar la existencia del catión metálico Ag⁺ en la disolución, al observarse de forma clara la presencia del par redox de la plata en el voltamograma de la disolución de clústeres de plata (Figura 45), realizado en H₂SO₄ 0,1 M y depositando 20 µl de esta disolución sobre carbono vítreo siguiendo el procedimiento descrito en la en la página 49 (~99% superficie del GC cubierta, 0,5µg Ag)

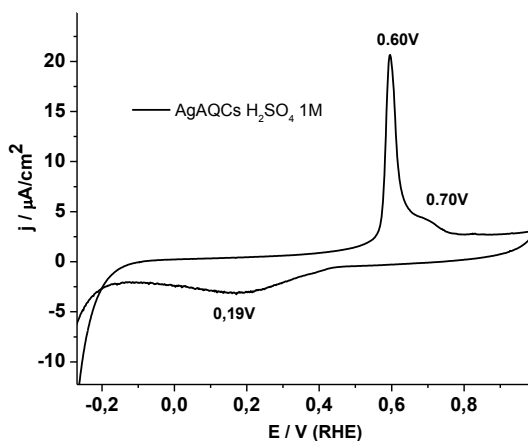


Figura 45- Voltamograma cíclico de la muestra de clústeres de plata (AgAQC's) en H₂SO₄ 1M. Velocidad de barrido: 20 mV/s

Debido a la presencia del catión metálico en las disoluciones de clústeres, para observar el comportamiento electroquímico de los clústeres deberían eliminarse los iones de las muestras. Aunque este aspecto será abordado con más detalle en el siguiente capítulo (sección 3.2.2), en su momento la empresa NANOGAP ofreció también el producto purificado sin iones, por lo que se recurrió a ese nuevo producto para estos estudios.

Con el objeto de comprobar primero la eliminación del catión metálico en las muestras purificadas se depositaron 240 μl (~15% de la superficie del GC cubierta, 0,072 μg Ag) de disolución de estos clústeres sobre GC, y se comparó su respuesta con la misma cantidad y concentración de AgNO₃.

Como puede verse en la Figura 46, incluso para las concentraciones tan bajas de iones utilizadas se observan los picos redox de la plata en las voltametrías de la sal, no siendo así para el caso de los clústeres, demostrándose, por tanto, la efectiva eliminación del catión metálico en las muestras purificadas.

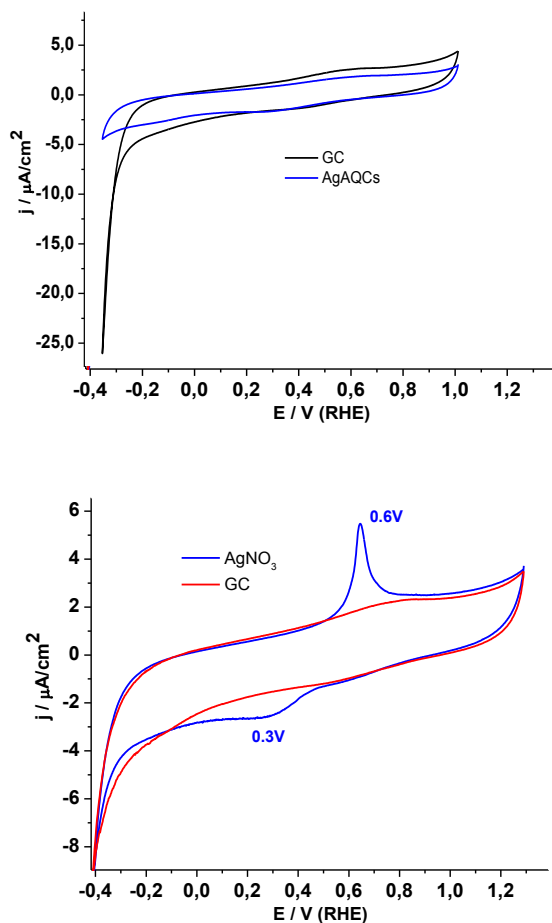


Figura 46- Voltamogramas cíclicos de la muestra de (arriba) clústeres de plata (AgAQC)s sin iones y (abajo) de AgNO₃ comparados con carbono vítreo en H₂SO₄ 1M. Velocidad de barrido: 20 mV/s

Al ampliarse el intervalo de potenciales de estudio se pudo observar que, en comparación con el carbono vítreo, en presencia de clústeres se produce un desplazamiento catódico de aproximadamente 300 mV para el desprendimiento de H₂, lo que indica la gran ventana de estabilidad electroquímica que presentan los clústeres de plata. Estos resultados están en concordancia con resultados publicados previamente para otros clústeres de plata de pequeño tamaño³⁹.

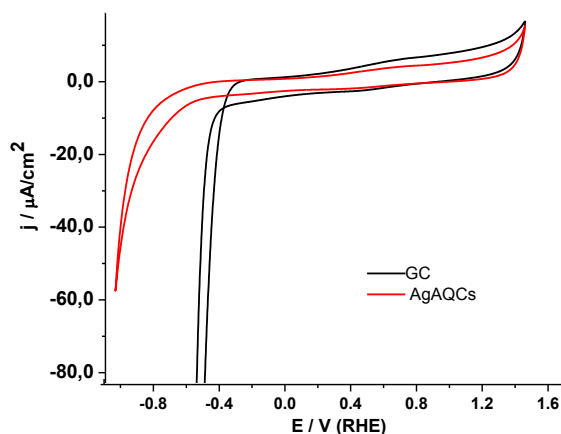


Figura 47- Voltamograma cíclico de la muestra de clústeres de plata (AgAQC)s sin iones comparado con carbono vítreo en H₂SO₄ 1M. Velocidad de barrido: 20 mVs

Precisamente, esta gran estabilidad electroquímica que presentan los clústeres, hace que sean también muy estables en disolución acuosa (hasta varios meses). La gran estabilidad está asociada con el gran valor del *bandgap*, o *diferencia HOMO-LUMO* ($> \sim 3,5$ eV) que presentan, lo que les confiere gran resistencia a la oxidación o a la reducción. Por su parte, esta estabilidad se encuentra también reforzada por su estructura electrónica de capa cerrada ($1S^2$) predicha para “orbitales superatómicos” deslocalizados²¹.

3. Bioelectrocatalisis

3.1. Electrocatalisis de la oxidación de etanol en diferentes medios

Una vez estudiadas las propiedades de los clústeres utilizados se examinaron sus propiedades electrocatalíticas en celdas electroquímicas convencionales, utilizando el método explicado en la página 49. Para ello se midió, en primer lugar, la electrooxidación de etanol en medio ácido y básico. Se siguieron para ello los experimentos detallados en la en la página 55.

Para este estudio se escogió el intervalo de potenciales desde -200 mV a 300mV que, aunque es muy restringido para los estudios electrocatalíticos convencionales, su elección viene motivada por dos razones. En primer lugar, para evitar la interacción del catión plata presente en las muestras de estudio y,

en segundo lugar, porque éste es el intervalo de potenciales de mayor interés para el estudio de la aplicación electrocatalítica de los clústeres en células biológicas.

La cantidad de clústeres depositados en el electrodo se calculó para que se pudiera completar aproximadamente una monocapa completa. Las voltametrías de barrido lineal se llevaron a cabo primeramente en el electrolito (H_2SO_4 1M, NaOH 1M) y luego se añadieron diferentes concentraciones de etanol (1, 2 y 5M).

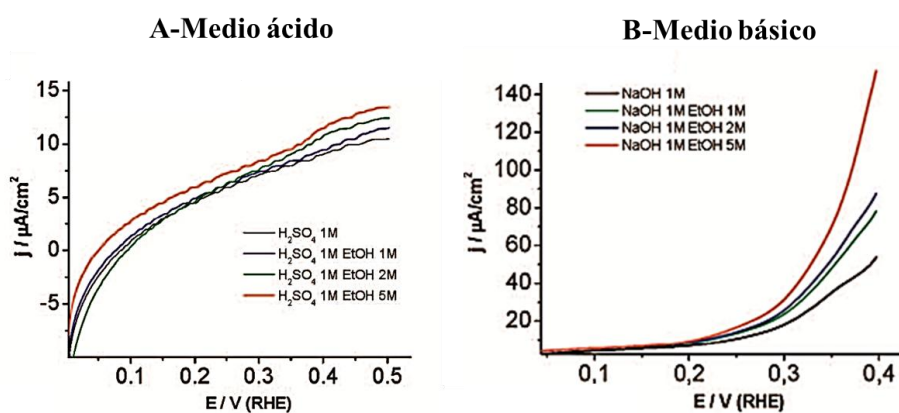


Figura 48-Electrocatalisis de la oxidación de etanol sobre clústeres de plata (AgAQC)s. Voltametrías de barrido lineal para diferentes concentraciones de etanol en medio ácido (A, H_2SO_4 1M) y básico (B, NaOH 1M) Velocidad de barrido: 50 mV/s

Como puede observarse en la Figura 48, la oxidación de etanol en ambos medios, ácido y básico, tiene lugar a potenciales muy bajos (cerca de 0V respecto a RHE).

En medio básico se obtienen corrientes anódicas considerablemente más altas que en medio ácido, lo que es consistente con la observación de que, en medio básico, la adsorción de aniones que actúan como “espectadores” sobre la plata es mucho menor, lo que facilita la oxidación de etanol¹⁰³.

La relación no lineal entre la corriente y la concentración de etanol en estos potenciales tan bajos (< 300 mV) en ambos medios, indica que la

electrooxidación de etanol sobre los clústeres de plata no está controlada por la difusión, sino por el potencial aplicado, corroborándose este aspecto por la dependencia voltamétrica con la velocidad de barrido, como puede verse en las Figura 49 y Figura 50, para medio ácido y básico respectivamente. Sin embargo, a potenciales superiores a los 300 mV, el control se vuelve difusivo.

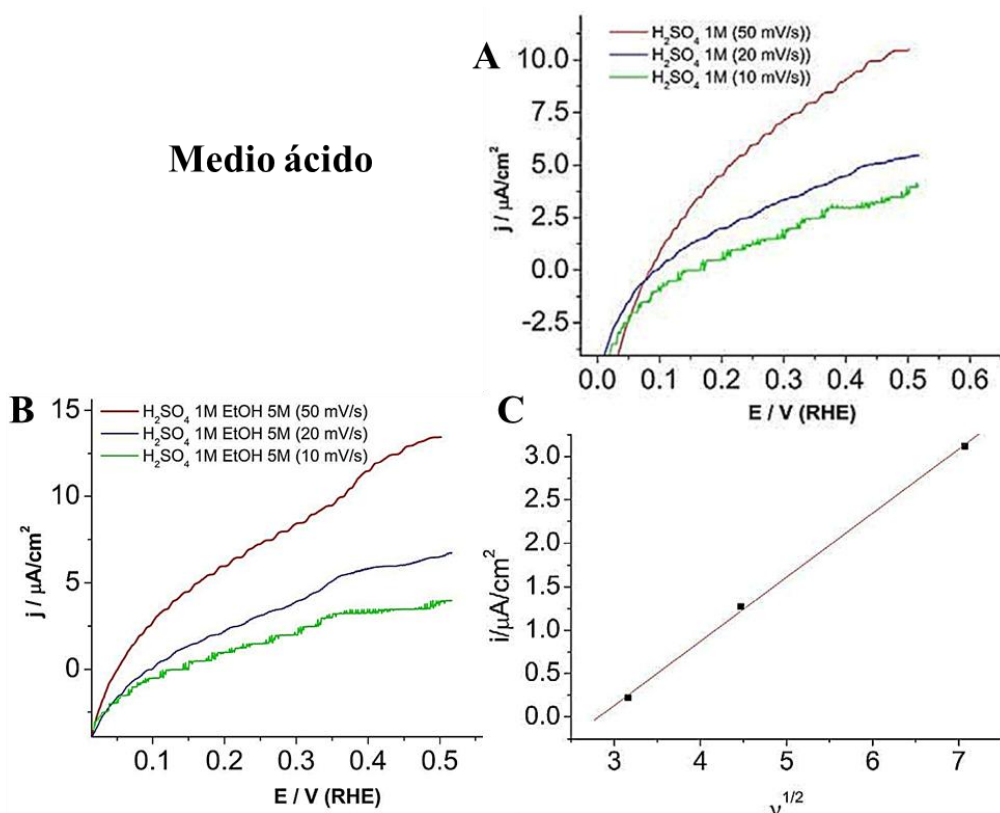


Figura 49-(A) Blanco. Voltametrías de barrido lineal en una disolución blanco para diferentes velocidades de barrido. (B) Voltametrías de barrido lineal para la electrooxidación de etanol en medio ácido a diferentes velocidades de barrido. (C) Dependencia de la velocidad de barrido 0,5 V mostrando un control difusivo

Se obtuvieron resultados similares cuando se protegió a las clústeres depositados sobre el electrodo con una monocapa de Nafion[®], lo que indica que los clústeres son perfectamente estables sobre el electrodo en el potencial de

estudio. Por ello las medidas se realizaron sin Nafion[®], para evitar posibles interferencias.

Medio básico

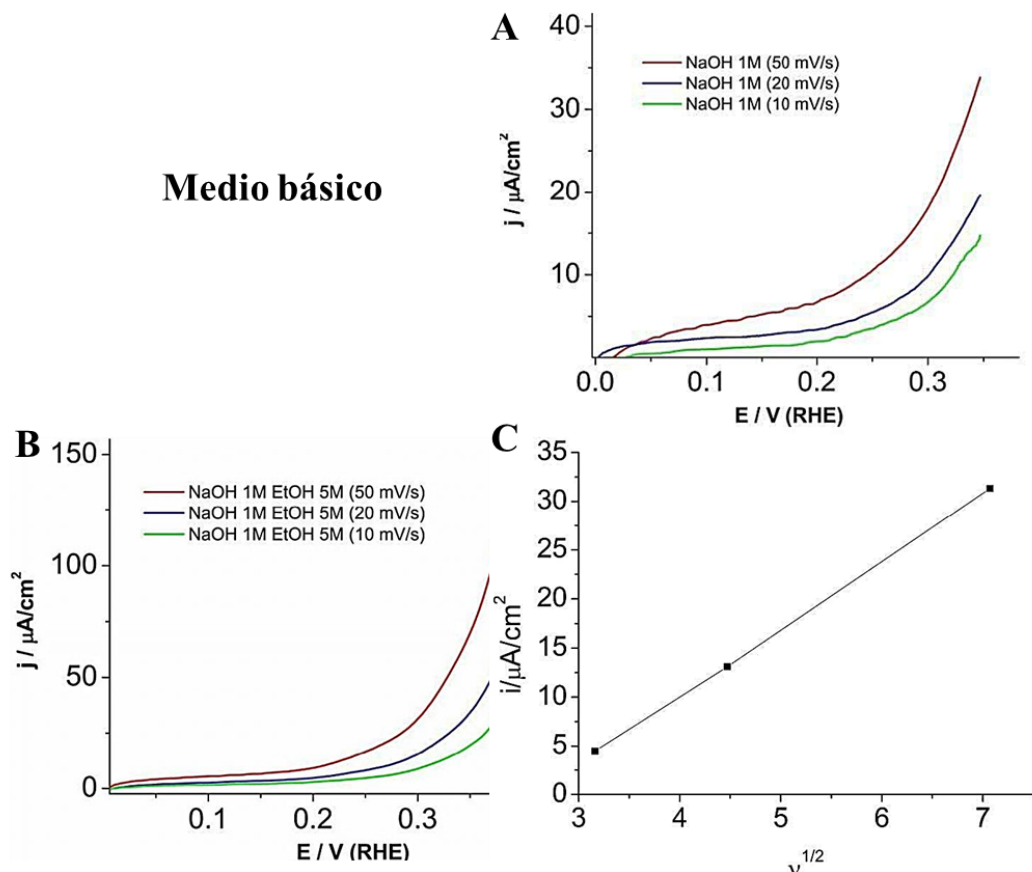


Figura 50-(A) Blanco. Voltametrías de barrido lineal en una disolución blanco para diferentes velocidades de barrido. (B) Voltametrías de barrido lineal para la electrooxidación de etanol en medio básico a diferentes velocidades de barrido. (C) Dependencia de la velocidad de barrido 0,4 V mostrando un control difusivo.

Teniendo en cuenta el esquema de la Figura 41 del capítulo anterior y las conclusiones allí obtenidas de que los clústeres muy pequeños, al poseer un gran *bandgap*, la posición de su banda de conducción se encuentra muy desplazada catódicamente, lo que hace imposible que acepte electrones de

sustancias con potenciales redox $\varepsilon > 0$, como los alcoholes, por lo que no podrían electrocatalizar la oxidación de esas sustancias, tal como se representa en la Figura 51, surge entonces la siguiente pregunta: ¿por qué se observa que los clústeres de Ag utilizados electrocatalizan la oxidación del etanol?

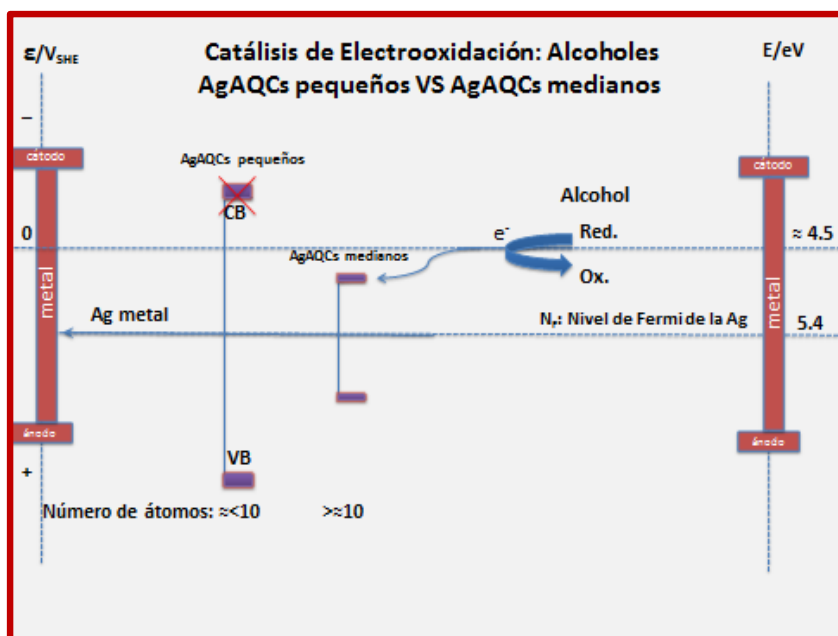


Figura 51- Representación esquemática del comportamiento electrocatalítico de clústeres de plata de pequeño y medio tamaño frente a la electrooxidación de alcoholes

La respuesta se encuentra en el hecho de que, aunque la mayor proporción de clústeres en las muestras corresponde a los clústeres Ag_2 y Ag_3 que tienen menos de 10-12 átomos y, por lo tanto, serían inactivos, sin embargo, los estudios que se expondrán en el capítulo siguiente sobre la purificación de clústeres de plata mediante diálisis con ADN (Capítulo 5, sección 3.2.3), muestran la presencia de una baja cantidad de clústeres de mayor tamaño. El espectro de emisión fluorescente tras la diálisis (Figura 94), además de mostrar la banda a 300 nm correspondiente a los clústeres mencionados, presenta además una cola que decrece lentamente hasta ≈ 550 nm. La fluorescencia en ese intervalo de

longitudes de onda revela la presencia de clústeres de plata de mayor tamaño (15-30 átomos) –véase al respecto la fluorescencia de clústeres de plata de tamaño medio (Figura 62)-. La presencia de esta baja concentración de clústeres de mayor tamaño coincide asimismo con lo encontrado por espectroscopía MALDI mencionados anteriormente.

Por lo tanto, la actividad electrocatalítica encontrada en estos sistemas no se debe a la presencia de los clústeres mayoritarios de pequeño tamaño (Ag_2 y Ag_3), sino que es debida a los clústeres de tamaño medio presentes también en disolución en una menor concentración.

Una vez comprobada y estudiada la electrocatalisis en medio ácido y básico, el siguiente paso tenía por objetivo su aplicación en medios biológicos, por lo que en primer lugar se procedió a comprobar si los clústeres son capaces de electrooxidar el etanol en medio fisiológico para después, en caso afirmativo, determinar el intervalo de potenciales en los que ocurre la catálisis y si es apreciable para concentraciones de alcohol utilizadas en los experimentos realizados en medios biológicos¹⁰⁴.

Para este estudio se utilizó una disolución tampón de fosfato salino (PBS) 1 M (pH=7,4). Los resultados obtenidos fueron muy interesantes, pues no solamente se apreciaba actividad electrocatalítica para las concentraciones utilizadas (20, 100 y 500 mM EtOH), sino que además, dicha electrocatalisis se producía, al igual que en los medios anteriores, a potenciales muy bajos, aprox. 0,2 V respecto a RHE (Figura 52).

Puede observarse, al igual que para los dos medios anteriores, la relación no lineal entre la intensidad de corriente y la concentración de etanol en estos potenciales tan bajos (< 300 mV). Se puede deducir, por tanto, que la electrooxidación de etanol sobre los clústeres de plata en medio fisiológico tampoco está controlada por la difusión, sino por el potencial aplicado. Este es un hecho relevante, ya que se ha observado un comportamiento similar, en las mismas condiciones de potencial, para la oxidación de la glucosa producida por enzimas depositados sobre electrodos de carbono¹⁰⁵.

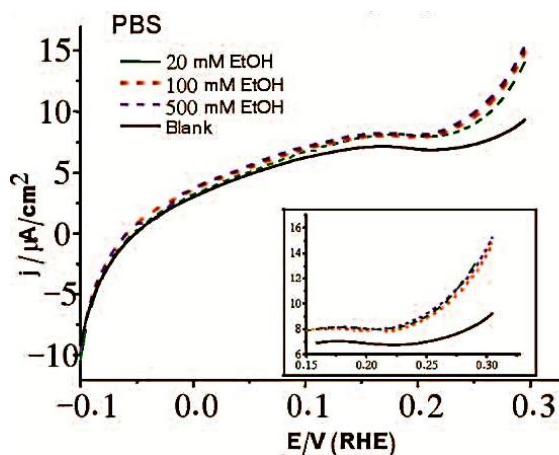


Figura 52-Electrocatalisis de la oxidación de etanol sobre clústeres de plata (AgAQC). Voltametrías de barrido lineal para diferentes concentraciones de etanol en medio fisiológico (PBS 1 M) con ampliación de la zona de interés electrocatalítico. Velocidad de barrido: 50 mV/s

Por otra parte, las densidades de corriente observadas ($\approx \mu\text{A}/\text{cm}^2$) para la electrooxidación de etanol son del mismo orden que para reacciones de electrooxidación llevadas a cabo sobre electrodos modificados con enzimas¹⁰⁶.

Por el momento, tanto los productos de reacción como el mecanismo exacto de la electrooxidación del etanol sobre los clústeres de plata en estos potenciales tan bajos son desconocidos, pero la actividad catalítica puede ser relacionada con la interacción de especies oxigenadas con dichos clústeres¹⁰⁷.

Se puede comparar la actividad electrocatalítica observada para los clústeres de plata con las observadas para otros catalizadores, biológicos y no biológicos, bajo las mismas condiciones. A partir de los resultados obtenidos, la actividad electrocatalítica estimada para los clústeres de plata en medio ácido y 0,5 V vs RHE es de $0,5 \text{ mA}/\text{cm}^2\text{mg Ag}$. Hay que resaltar que estos cálculos están realizados en función de la plata total depositada en el electrodo y no se tiene en cuenta el porcentaje de clústeres activos, que representa –tal como se mencionó anteriormente- únicamente un porcentaje muy pequeño del total, por lo que la actividad deducida para los clústeres debería ser mucho mayor. Aun así, esta

actividad es unas 100 veces mayor que la del platino masivo, y tan solo la mitad que para el Pt₈₀Ru₂₀¹⁰⁸.

La comparación con otras enzimas, como la alcohol deshidrogenasa (ADH) y su coenzima la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺/NADH), es más difícil debido a la gran variación de los valores publicados. Por ejemplo, la actividad de los clústeres de plata a pH fisiológico y 0,2 V es comparable con la publicada por el grupo de Miteer¹⁰⁹, pero 3 órdenes de magnitud menor que la publicada por Gouveia-Caridade *et al.*¹¹⁰

3.2. Introduciéndonos en el medio biológico: Los clústeres de plata previenen las alteraciones inducidas por el alcohol en cultivos de células de mamíferos

Una vez demostrada la electrocatalisis *in vitro* de la oxidación de etanol sobre clústeres de plata a potenciales muy bajos y en medio fisiológico, se comprobó si los clústeres podían prevenir, o mitigar, algunas de las conocidas alteraciones observadas en células expuestas a etanol. Este estudio fue realizado por el grupo del prof. G.Egea del Hospital Clínico de la Universidad de Barcelona, a quién expresamos nuestro agradecimiento por el permiso dado para la inclusión de esos estudios en la presente tesis.

Estudios previos realizados por el grupo del prof. Egea, mostraron que los cultivos primarios de astrocitos de rata, tras una exposición a etanol a largo plazo (tratamiento crónico), sufren una desorganización del citoesqueleto de actina, observado por un decrecimiento en las fibras de tensión de actina y la formación de anillos de actina periféricos^{95, 96}.

Sin embargo, para la realización del presente trabajo, se tuvo que establecer un nuevo modelo celular para evaluar primero la toxicidad, y después las alteraciones celulares, inducidas por exposiciones a etanol a corto plazo (tratamiento agudo).

Se evaluaron por tanto tres parámetros en una serie de líneas de células clonadas, que son representativos de la toxicidad aguda del etanol: 1) la aparición de morfología celular redondeada, consecuencia de una

reorganización anormal del citoesqueleto de actina, 2) alteraciones en la relación entre la actina filamentosa (actina F) y la actina globular (actina G), y 3) la inducción de la apoptosis.

Se decidió utilizar células renales de rata común (NRK) por su elevada sensibilidad frente a la exposición a etanol⁴⁹, así como por su tolerancia a los clústeres de plata en concentraciones de hasta 1 µg/ml (~0,3 mM). Una vez seleccionadas las células, se estudió el potencial efecto citoprotector de los clústeres de plata, para lo que se introdujo 200 mM de etanol en dos medios de cultivo, con y sin clústeres de plata, de NRK.

Tras la exposición a etanol puede observarse que, mientras en los cultivos sin clústeres el número de células que presentan una morfología redondeada y la desorganización de esqueleto de actina es muy alto, en los cultivos con clústeres el número de células redondeadas decrece mucho y la mayoría presenta una organización de actina normal (Figura 53). Por otro lado, y como cabría esperar, en los cultivos sin clústeres la relación F-actina/G-actina se reduce considerablemente tras la exposición a etanol, mientras que en los cultivos con clústeres esta relación permanece inalterada.

El etanol induce también estrés oxidativo y apoptosis en las células¹¹¹⁻¹¹³, por lo que se decidió estudiar si los clústeres de plata podrían también prevenir dichos fenómenos. Teniendo en cuenta que la caspasa-3 es un mediador clave y un marcador bien establecido de la apoptosis de células de mamíferos^{112, 114}, se estudió dicho proceso mediante la inmunofluorescencia e inmunotransferencia basada en la formación y localización nuclear de fragmentos proteolíticos de caspasa-3.

A los 30 min de la exposición a etanol aparecen en los núcleos celulares fragmentos de caspasa-3. Sin embargo, en concordancia con lo obtenido anteriormente, la presencia de los clústeres previene la formación y nucleación de dichos fragmentos, como puede observarse en la Figura 53.

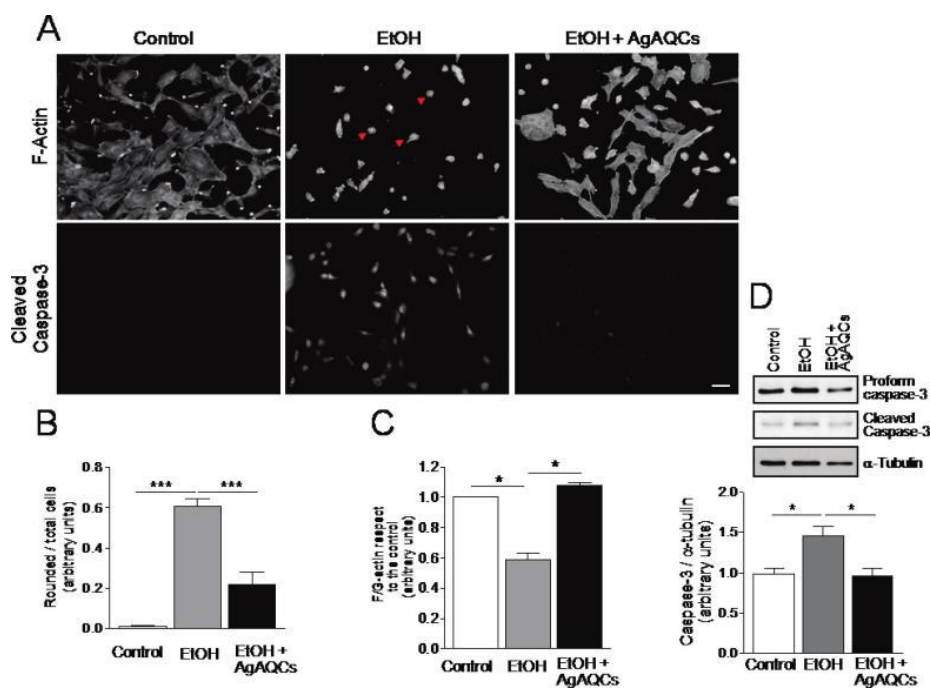


Figura 53- (A) Las células expuestas a etanol (200 mM) fueron incubadas en la ausencia y presencia de clústeres (1 μ g/ml) durante 30 min. La morfología celular y la organización del citoesqueleto de actina (F-actina) fueron evaluadas por microscopia de epifluorescencia usando FITC-phalloidin. La activación de la caspasa fue evaluada usando inmunofluorescencia por la presencia de fragmentos proteolíticos de caspasa-3. Barra de escalado, 20 μ m. (B) Análisis cuantitativo de los resultados del panel A de la relación células redondeadas/células totales (C) Relación entre actina globular y filamentosa para células sin exponer y expuestas a etanol con y sin clústeres. (D) Análisis de inmunoblot para las células sin exponer y expuestas a etanol con y sin clústeres. La activación de la caspasa-3 fue evaluada usando anticósmicos contra los fragmentos de caspasa-3. La α -tubulina fue usada como control

Por tanto, puede decirse que los clústeres de plata previenen las alteraciones celulares producidas por la exposición de las mismas a etanol. Sorprendentemente, se observó que dicha protección se obtiene solamente cuando ambos, etanol y clústeres, son añadidos simultáneamente a las células y no cuando uno se añade antes que el otro. Estos resultados indican que la citoprotección de los clústeres frente al etanol se produce por combinación de éstos con las células.

3.3. Los clústeres oxidan el etanol solamente en presencia de células

Teniendo en cuenta las propiedades electrocatalíticas de los clústeres de plata frente a la oxidación de etanol, se examinó si en la citoprotección de las células NRK mediada por los clústeres tiene lugar una reducción efectiva de la concentración de etanol presente en el medio de cultivo.

Para ello se determinó la concentración final de etanol en dos medios de cultivo celulares, con y sin clústeres, expuestos previamente a 200 mM del mismo. Como se muestra en la Figura 54, la concentración de etanol disminuye considerablemente en el medio de cultivo cuando los clústeres están presentes.

Un punto interesante es que esta disminución solamente se produce cuando en el medio de cultivo hay células, apoyando lo comentado anteriormente, de que la citoprotección de los clústeres frente al etanol se produce por una combinación de estos con las células.

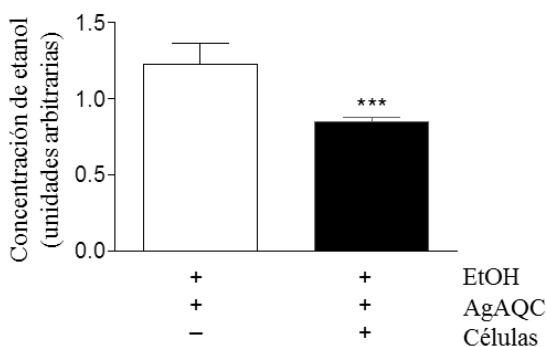


Figura 54- Determinación de la concentración de etanol (200 mM inicial) en el medio de cultivo con AgAQC (1 µg/ml) después de 30 min en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de células NRK

3.4. Los clústeres son también citoprotectores en astrocitos de rata

La citoprotección observada para los clústeres de plata frente a la toxicidad del etanol en las células inevitablemente lleva a pensar en su aplicación en la etiopatogenia de abuso del alcohol.

El etanol es una sustancia toxica que afecta al desarrollo del sistema nervioso, alterando tanto las neuronas como las células gliales^{93, 113}. Por tanto, se examinó si los clústeres de plata eran capaces de proteger a los astrocitos de ratas recién nacidas frente a una exposición aguda a etanol. Para ello, se examinaron, como en el caso de las células NRK, los cambios que se producen tanto en la morfología celular como en la organización del esqueleto de actina^{95, 96}. En este caso, para producir alteraciones significativas en los astrocitos de rata, se tuvieron que utilizar concentraciones de etanol mayores que para el caso de las células NRK (500 mM en vez de los 200 mM).

Con el objetivo de comprobar si los clústeres producían alteraciones en las células, de la misma manera que para el caso de las células NKR, los cultivos primarios de astrocitos se incubaron en presencia de dos concentraciones diferentes de clústeres (0,5 y 1 µg/ml) durante 30 min. En ninguno de los casos las células mostraron alteración alguna, por lo que se pasó a los estudios con etanol.

Como cabría esperar, el etanol provocó alteraciones importantes tanto en la morfología celular como en la organización del esqueleto de actina, sin embargo, ambas alteraciones se ven significativamente disminuidas cuando los astrocitos se cultivan en presencia de clústeres de plata (Figura 55).

Por lo tanto, puede concluirse que, al igual que con las células NRK, los clústeres de plata son también citoprotectores para los astrocitos expuestos a etanol.

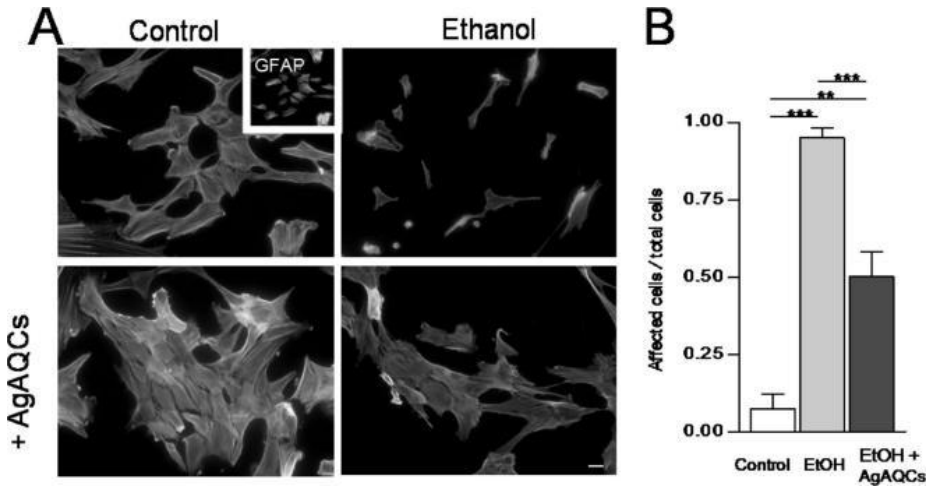


Figura 55-(A) Células de astrocitos de rata no expuestas (control) y células expuestas a etanol (500 mM) fueron incubadas en la ausencia y presencia de clústeres (1 μ g/ml) durante 30 min. La morfología celular y la organización del citoesqueleto de actina (F-actina) fueron evaluadas por microscopía de epifluorescencia usando FITC-phalloidin. Barra de escalado, 20 μ m. (B) Análisis cuantitativo de los resultados del panel A de la relación células redondeadas/células totales

3.5. Probando otros agentes tóxicos: Los clústeres de plata previenen alteraciones inducidas por otros alcoholes, pero no aquellas inducidas por los peróxidos

Una vez realizados los estudios con el etanol, el siguiente paso fue comprobar si dicho efecto citoprotector tenía lugar para otros alcoholes como metanol y butanol. Para ello, se comprobó en primer lugar la actividad electrocatalítica de los clústeres *in vitro* frente a la oxidación de metanol y butanol, de la misma manera que para el etanol, en medio fisiológico. Puede observarse que la electrooxidación tanto del metanol como del butanol tienen lugar en medio ácido, básico y fisiológico a potenciales tan bajos como en el caso del etanol (< ~200 mV) (Figura 56), por lo que se pasó a realizarse el estudio “in vivo”.

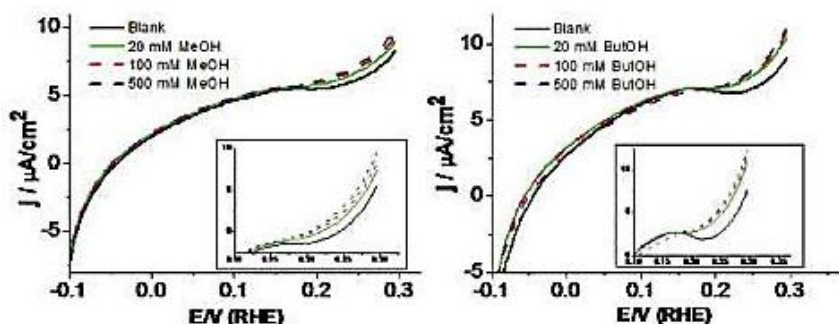


Figura 56-Electrocatalisis de la oxidación de metanol (izquierda) y butanol (derecha) sobre clústeres de plata (AgAQC). Voltametrías de barrido lineal para diferentes concentraciones de ambos alcoholes a diferentes concentraciones en medio fisiológico (PBS 1 M) con ampliación en la zona de interés electrocatalítico. Velocidad de barrido: 50 mV/s

Para ello se expusieron células NRK a metanol (50 mM) y butanol (25 mM) durante 30 min y se analizó, como en los casos anteriores, tanto la morfología celular como la organización del esqueleto de actina.

Como puede verse en la Figura 57, ambos alcoholes inducen tanto cambios morfológicos como desorganización del esqueleto de actina, de forma similar a los observados para el caso del etanol y de acuerdo con otros resultados obtenidos previamente para otras líneas celulares¹¹⁵.

Puede observarse en los resultados de la exposición a ambos alcoholes, al igual que para el etanol, que el número de células con alteraciones morfológicas o desorganización de su esqueleto de actina es muchísimo menor cuando los clústeres de plata están en el medio de cultivo, por lo que queda demostrado que el efecto citoprotector de los clústeres de plata no está restringido al etanol, sino que puede extenderse a otros alcoholes primarios.

A la vista de los resultados obtenidos, se examinó si los clústeres de plata tenían un efecto citoprotector para otro tipo de sustancias tóxicas diferentes de los alcoholes. Con este objetivo se escogió peróxido de hidrógeno que, al igual que los alcoholes, produce estrés oxidativo¹¹⁶.

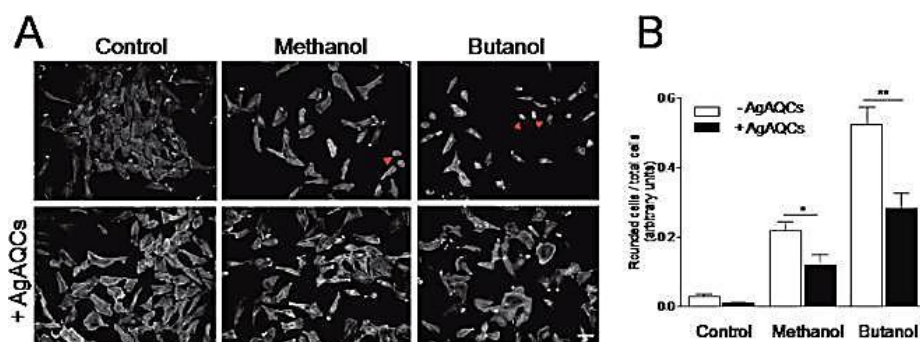


Figura 57-(A) Células NRK no expuestas (control) y células expuestas a metanol (50 mM) y butanol (25 mM) fueron incubadas en la ausencia y presencia de clústeres (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 min. La morfología celular y la organización del citoesqueleto de actina (F-actina) fueron evaluadas por microscopía de epifluorescencia usando FITC-phalloidin. Barra de escalado, 20 μm . (B) Análisis cuantitativo de los resultados del panel A de la relación células redondeadas/células totales

En primer lugar se realizaron los estudios de electrocatalisis en células electroquímicas. Para ello se estudió la electroreducción de H_2O_2 , tanto en medio ácido como fisiológico, observándose que ésta tiene lugar a potenciales mucho más negativos (Figura 58). Asimismo se observa que, mientras que en medio ácido solamente aparece un pico de reducción, en PBS aparecen dos.

Con el objetivo de identificar cual es el pico que pertenece a la reducción de peróxido de hidrogeno, se realizaron medidas en atmosfera de O_2 , obteniéndose claramente que el pico a -0,35V es debido al O_2 y el de -0,9V es debido al peróxido.

Se observó asimismo que en medio ácido la electroreducción tiene lugar a -0,6 V, mientras que en medio fisiológico esta reducción es aún más difícil, ocurriendo a -0,9 V y obteniéndose densidades de corriente mucho menores que para medio ácido.

Se pasó entonces al estudio "in vivo". Se observó que las células NRK expuestas a peróxido de hidrogeno (250 μM durante 30 min) sufren cambios severos tanto en la morfología celular como en la organización de esqueleto de actina, ninguno de los cuales pudo ser evitado por la acción de los clústeres, como puede verse en la Figura 59.

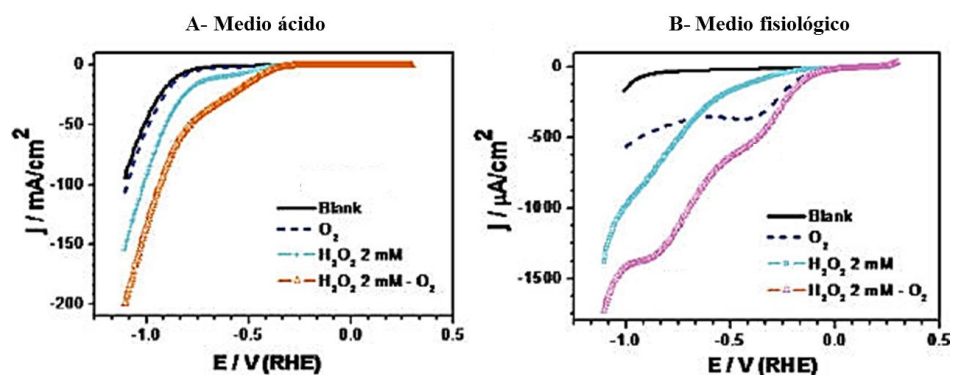


Figura 58-Electrocatalisis de la reducción de peróxido de hidrogeno sobre clústeres de plata (AgAQC). Barridos de reducción de la voltametría cíclica para medio ácido (H_2SO_4 1 M) y fisiológico (PBS 1 M) en atmosfera de N_2 sin H_2O_2 (línea negra) y con peróxido (línea turquesa) y en atmosfera de O_2 sin H_2O_2 (línea punteada) y con H_2O_2 (líneas naranja, ácido, y morada, PBS). Velocidad de barrido: 50 mVs

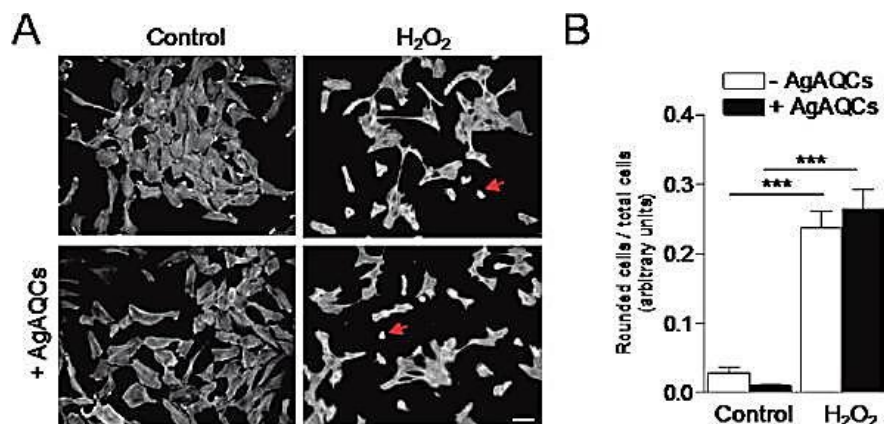


Figura 59-(A) Células NRK no expuestas (control) y células expuestas a H_2O_2 (250 μM) fueron incubadas en la ausencia y presencia de clústeres (1 $\mu g/ml$) durante 30 min. La morfología celular y la organización del citoesqueleto de actina (F-actina) fueron evaluadas por microscopia de epifluorescencia usando FITC-phalloidin. Las flechas rojas indican típica morfología redondeada producida por el H_2O_2 . Barra de escalado, 20 μm . (B) Análisis cuantitativo de los resultados del panel A de la relación células redondeadas/células totales

3.6. Tratando de entender la bioelectrocatalisis: Mecanismo

Los resultados expuestos muestran que los clústeres de plata previenen los efectos nocivos producidos por los alcoholes en contacto con las células, produciendo una disminución de la concentración de los mismos en el medio de cultivo. Se ha observado además que esta disminución de concentración tiene lugar solamente cuando clústeres, etanol y células están juntos en el medio de cultivo. Por su parte, se ha visto que la actividad electrocatalítica de los clústeres en la oxidación de los alcoholes en medios fisiológicos se produce ya a potenciales muy bajos semejantes a los existentes en las membranas de las células biológicas. Como en las células biológicas solamente es posible la existencia de potenciales eléctricos en las membranas celulares se puede entonces concluir que las membranas tienen que ejercer el papel de los electrodos en las células electroquímicas y que, en ese caso, NECESARIAMENTE los clústeres tendrán que depositarse mayoritariamente en dicha membrana. Además, la membrana celular deberá aportar el voltaje necesario ($> \approx 0,2V$ RHE) para que se produzca la electrooxidación del alcohol por los clústeres.

El hecho de que los potenciales y densidades de corriente obtenidos para la electrooxidación de etanol en medio fisiológico y en una célula electroquímica convencional sean del mismo orden de magnitud que los medidos en la membrana plasmática de células excitables y no excitables, parece apoyar dicha hipótesis¹¹⁷. Por otra parte, se observa que ambos parámetros (potenciales de membrana y densidades de corriente) son del mismo orden de magnitud que los publicados para ciertos procesos electroquímicos que tienen lugar en orgánulos celulares como las mitocondrias¹¹⁸.

Como se ha comentado anteriormente, los clústeres de plata son estructuras planas²³, que tienden a ir a la interfase de membranas modelo, como por ejemplo la película de surfactante en una microemulsión^{39, 119}. Por tanto, es razonable pensar que la asociación entre los clústeres y la membrana plasmática se ve favorecida pudiendo de esa forma desarrollarse las condiciones necesarias para que se produzca el proceso de electrooxidación de los alcoholes.

Se trató, por ello, de lograr obtener una localización de los clústeres en el entorno celular, pero no fue posible debido a que su reducido tamaño está por

debajo del límite de detección para las técnicas de microscopia electrónica convencionales usadas en muestras biológicas. Además, aunque los clústeres de plata emiten fluorescencia¹¹⁹, tal como se ha visto anteriormente, las bajas longitudes de onda de excitación y las bajas concentraciones utilizadas en los estudios realizados imposibilitan su detección en los medios de cultivo por esta técnica.

Como se puede observar (Figura 52), el potencial mínimo donde se produce la electrooxidación de etanol en medio fisiológico (energía libre mínima) es de +200 mV. Por tanto, por comparación de la misma reacción en las células electroquímicas convencionales y las NRK se puede estimar el potencial mínimo necesario que tiene que tener el lado de la membrana (exterior/interior) donde se produzca la reacción. Se sabe que el lado exterior de las membranas celulares está a potenciales más positivos que el lado interior, por lo que la electrooxidación tendrá lugar preferentemente en la membrana exterior. Se puede entonces concluir que, al menos para células NRK y de astocitos, el potencial (respecto RHE) de la hemimembrana plasmática externa tiene que ser $\varphi_{ex} \geq +200$ mV. Que nosotros sepamos, esta es la primera vez que se ha obtenido el potencial de una hemimembrana celular referido al potencial estándar del hidrógeno.

Este valor es mayor que el potencial redox efectivo de entornos extracelulares oxidantes (~ 0 V)¹²⁰. Sin embargo, se tiene que tener en cuenta que el concepto de potencial redox efectivo no está bien definido, y representa tan solo un valor medio, que varía considerablemente y depende en gran manera del tipo de célula, condiciones de estrés oxidativo, etc.¹²¹ Por otro lado, los potenciales dipolo y de superficie hacen variar el potencial eléctrico de membrana, tanto en los compartimentos externos como internos¹²².

A partir del valor del potencial de la hemimembrana externa estimado anteriormente y teniendo en cuenta los valores usuales del potencial transmembrana (φ_{trans}) medidos en células mamíferas no excitables (de -30 hasta -90 mV)¹¹⁷, se puede estimar el valor del potencial de la hemimembrana interna, $\varphi_{int} = \varphi_{ex} - \varphi_{trans} \geq 110 - 170$ mV. Según esta estimación, el potencial negativo necesario para que tenga lugar al electroreducción de peróxido de

hidrogeno en medio fisiológico (-0,3V), está muy lejos del potencial menos positivo que puede ser aportado por la membrana celular (+0,1V-+0,2V). Por tanto, es de esperar que los clústeres no puedan catalizar la electroreducción del H₂O₂ en células biológicas ya que la membrana celular no es capaz de proveer del potencial reductor suficiente para que se produzca dicha electroreducción, no pudiendo de esa forma evitarse los efectos tóxicos generados por el peróxido.

En la Figura 60 puede verse un esquema del mecanismo propuesto en donde se representan a los clústeres asociados a la membrana celular, aportando ésta el potencial necesario para oxidar a los alcoholes, como el etanol, pero no para reducir peróxidos.

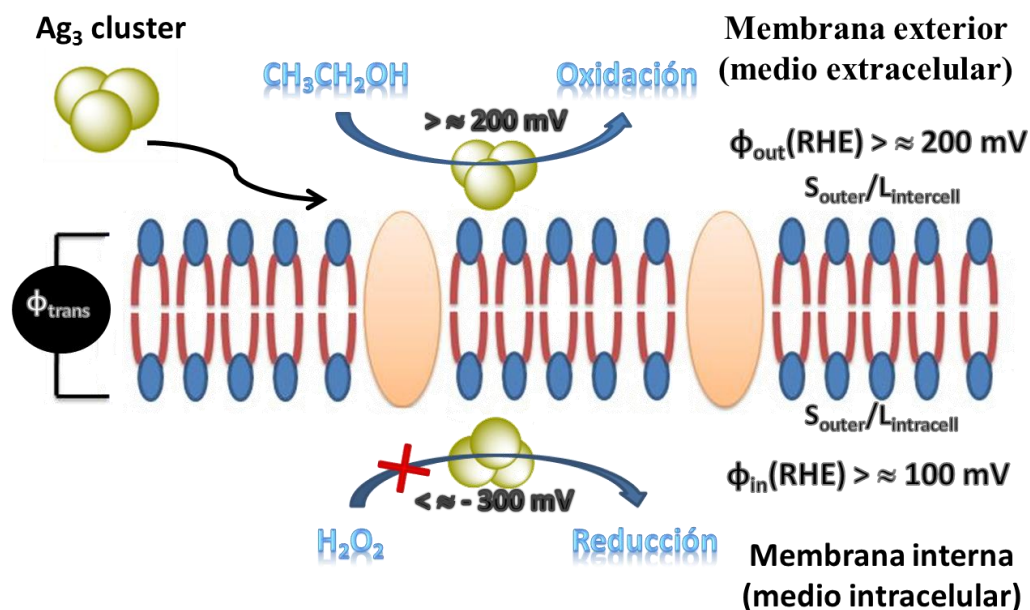


Figura 60- Mecanismo propuesto para el proceso de bioelectrocatalisis

Por último, mediante este modelo se puede explicar también el hecho observado de que no se produzca la protección cuando las células se incuban con los clústeres antes de añadir el alcohol. Tal como se ha podido comprobar en estudios realizados dentro del grupo de investigación en el que se enmarca el presente trabajo, los clústeres difunden a través de la membrana celular y

penetran en el interior de la célula. Por este motivo, al cabo de un tiempo de incubación (estimado en aprox. 30 minutos), los clústeres desaparecen de la hemimembrana celular exterior perdiéndose de esta forma su actividad electrocatalítica.

4. Conclusiones

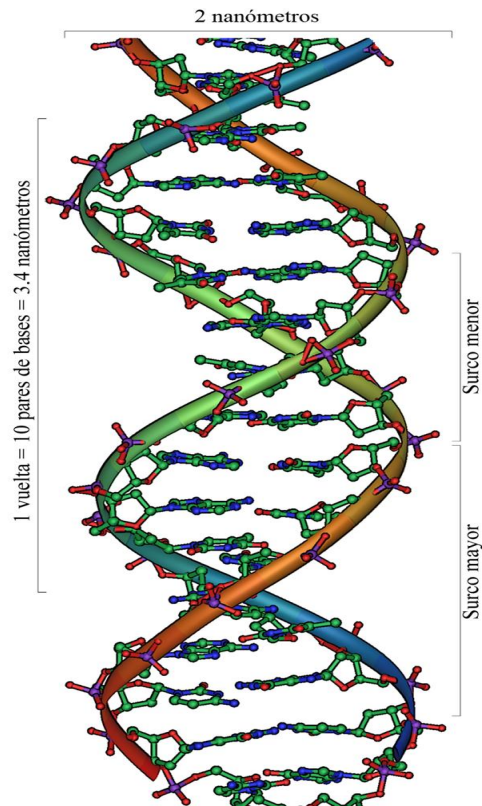
Se ha observado que los clústeres de plata electrocatalizan la oxidación de alcoholes en medios ácido, básico y neutro.

Se ha observado que los clústeres de plata son citoprotectores de los alcoholes en células mamíferas, previniendo sus efectos nocivos.

Los hechos de que 1) los clústeres de plata electrocatalicen la reacción de alcoholes a potenciales muy bajos en medio fisiológico; 2) solamente tengan efecto citoprotector cuando las células están presentes; y 3) la concentración de alcohol disminuya del medio de cultivo, permiten postular la hipótesis de que son las células, a través de su potencial de membrana las que aportan el potencial eléctrico necesario para dicho proceso. Esto sugiere que las células pueden actuar como fuentes de energía en reacciones bioelectrocatalíticas.

Por último, la citoprotección observada en los modelos celulares de astrocitos de rata recién nacida expuestos a etanol, abre nuevas posibilidades para su potencial aplicación en la prevención de los daños irreversibles que causa el etanol en el sistema nervioso central, de enorme interés en enfermedades como el síndrome FAS.

PURIFICACION: LA BUSQUEDA DEL CLUSTER PURO



Cortesía de Michael Ströck

1. Introducción

En los capítulos anteriores se mostraron las propiedades catalíticas de los clústeres y, por lo tanto, las enormes potencialidades que ofrecen en áreas de gran impacto tecnológico como son la electrocatálisis o la bioelectrocatalisis. También se observó que las inusuales propiedades y actividad de estos clústeres dependen fuertemente de su tamaño, estructura y grado de purificación, ya que el aumento de solamente un átomo en el tamaño de un clúster cambia apreciablemente su *bandgap* y, por lo tanto, sus propiedades. Esto demuestra la importancia que tiene el hecho de poder tener procesos de purificación y separación que permitan la obtención de muestras puras y monodispersas como paso previo para el escalado de la producción y la aplicación generalizada de los clústeres. Con esta motivación, en esta parte del trabajo se exponen los estudios realizados utilizando tres metodologías diferentes con el objetivo final de conseguir la extracción selectiva de clústeres y comparar la eficiencia y selectividad de dichos métodos. De forma paralela estos estudios han servido, al mismo tiempo, para analizar la interacción de los clústeres con diferentes disolventes y biomoléculas (como el ADN y la agarosa), permitiendo asimismo predecir el posible desarrollo de nuevas aplicaciones de los clústeres.

2. Separación por electroforesis

Los experimentos descritos en los capítulos anteriores demostraron que la presencia de iones metálicos en las muestras de clústeres, además de tener una gran influencia en procesos de importancia tecnológica como la electrocatálisis, pueden interactuar también con los clústeres, modificando las propiedades intrínsecas de los mismos y dificultando en gran medida su correcta caracterización.

El primer objetivo de purificación ha sido, por lo tanto, separar los clústeres de los iones metálicos, subproducto común del método de síntesis utilizado⁴⁸. Para ello, en una primera tentativa, se escogió la electroforesis como proceso de separación. Basándonos en las diferencias de carga y masa entre iones y clústeres, la electroforesis podría considerarse, a priori, como un método

prometedor de separación y purificación. Los experimentos de electroforesis fueron realizados en colaboración con el grupo del Profesor Fernando Domínguez, de la facultad de Medicina en la Universidad de Santiago de Compostela.

La electroforesis es una técnica de separación basada en la movilidad de los analitos sometidos a un campo eléctrico. La más utilizada es la electroforesis en gel de agarosa, en presencia de una disolución de TAE como electrolito. Esta fue la escogida para realizar los primeros experimentos.

Por otro lado, para el estudio de la purificación se seleccionó la disolución de clústeres de plata previamente utilizada en los experimentos de bioelectrocatalisis (Capítulo 4), debido principalmente a tres razones:

Primero, es una muestra que, según las técnicas de caracterización empleadas (Capítulo 4, sección 2), tiene pocas especies presentes en disolución: únicamente una distribución no muy polidispersa de clústeres y el ión metálico.

Segundo, la fluorescencia de esta muestra es más alta que la presentada por los clústeres de Au, lo que aumenta la sensibilidad del ensayo al utilizarse la misma como elemento de detección.

Por último, se dispone de muestras de clústeres de plata de tamaño medio que presentan una fluorescencia muy elevada, AgFAQCs, las cuales puede utilizarse, a título comparativo, para ver la generalización del método de purificación desarrollado (ver sección 2.2 más adelante).

2.1. Comprobación de la viabilidad del método

Todos los experimentos aquí descritos fueron realizados utilizando el protocolo detallado en la página 58.

El dispositivo de electroforesis consiste en un gel de agarosa dispuesto en horizontal, con una serie de pocillos o incisiones en su parte central, inmerso en la disolución de electrolito. Usualmente la muestra se mezcla con glicerol (7:3), para aumentar su densidad; a continuación se deposita en los pocillos y, por último, se aplica un voltaje para la separación de las especies cargadas.

Purificación

La primera etapa consistió en mezclar la disolución de AgAQCs con glicerol (7:3), realizándose los espectros UV-Vis de la muestra antes y después de haber estado 5 min depositada en uno de los pocillos de un gel de 1,5% de agarosa sumergido en TAE. Ambos espectros coinciden, lo que muestra que los clústeres se dispersan bien en la mezcla glicerol-agua y que, además, permanecen dentro de los pocillos existentes en la superficie de la agarosa, pudiendo utilizarse la mezcla como disolución de partida para los estudios electroforéticos.

Una vez comprobado que los AgAQCs no difunden en el gel, se procedió a comprobar si los clústeres y/o los iones eran detectables a las longitudes de onda de excitación y emisión fluorescente utilizadas para la caracterización de ácidos nucleicos. Las medidas de fluorescencia post-electroforesis se realizaron en un equipo GelDoc[®], dispositivo preparado para ver la fluorescencia en el gel y que, normalmente, se utiliza para la detección de biomoléculas sometidas a procedimientos de electroforesis.

Se realizaron tres tipos de experimentos de electroforesis variando las disoluciones de electrolito: TAE, NaCl y NaClO₄, a pH 8. En ninguno de los casos, tras 20 o 40 min de ensayo, se consiguió ver señal alguna bajo las condiciones empleadas. Este hecho se debe a que la longitud de onda de detección del GelDoc[®] se encuentra en el visible (380nm-780nm) mientras que los AgAQCs emiten principalmente en el intervalo 300nm-350 nm, por lo que no se pueden detectar mediante este procedimiento.

2.2. En busca de luz: Experimentos con clústeres fluorescentes

Debido a los problemas de caracterización presentados por la muestra de clústeres de menor tamaño, se decidió estudiar el comportamiento electroforético de los clústeres de plata de tamaño medio anteriormente mencionados, (AgFAQCs, Ag Fluorescent Atomic Quantum Clusters), cuya emisión fluorescente a 500 nm debería ser detectada por el GelDoc[®]

En primer lugar, se realizó la caracterización de la muestra utilizando espectroscopia UV-Vis, fluorescencia y AFM.

En el espectro UV-Visible obtenido (Figura 61), puede observarse un aumento continuo de la absorbancia desde aproximadamente 600 nm hasta alrededor de

Purificación

los 300 nm. También se observan tres bandas bien diferenciadas a 310 nm, 350 nm y 460 nm. Aplicando el modelo de Jellium, al igual que para los AgAQCs, desde el inicio de las bandas de absorción ($\sim 600 \text{ nm} = 2,08 \text{ eV}$), se obtiene un tamaño de clúster de unos 15 átomos ($n=(5,4/2,08)^3$, donde 5,4 V es el nivel de Fermi de la plata masiva).

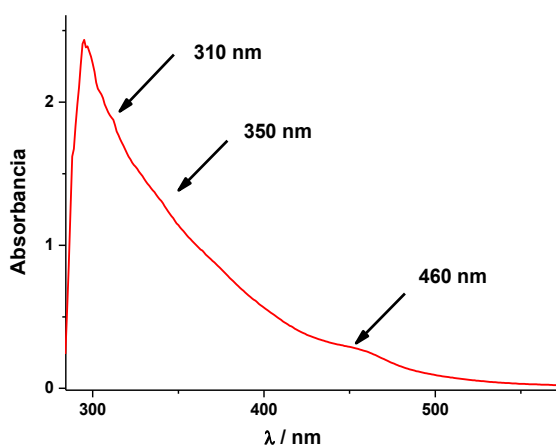


Figura 61- Espectro de absorción UV-Visible de AgFAQCs

La Figura 62 presenta el espectro de emisión de los AgFAQCs a una longitud de onda de excitación de 450 nm y el espectro de excitación a una emisión de 508 nm.

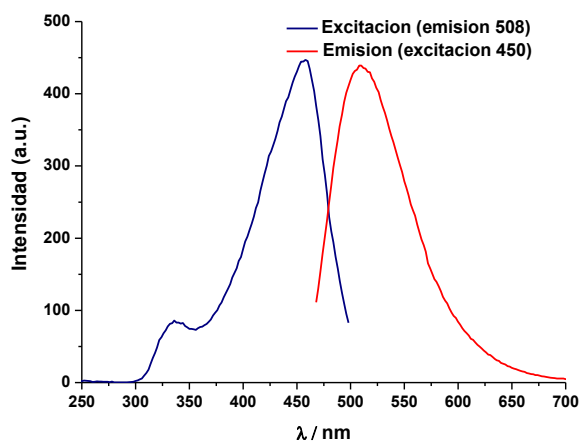


Figura 62- Espectros de emisión y excitación de AgFAQCs

Purificación

El espectro muestra una clara diferencia con los AgAQCs, que emitían a 300 nm o 350 nm. La diferencia en emisión se debe principalmente a la diferencia de tamaño. Los AgFAQCs tienen un número mayor de átomos, lo que corresponde a un *bandgap* menor y, por lo tanto, a una menor energía de emisión (mayor longitud de onda). La caracterización llevada a cabo mediante medidas de AFM fue realizada de la misma forma que para los AuAQCs y AgAQCs (Figura 63). Estas imágenes denotan la presencia de clústeres con diferentes tamaños, desde 0,3 nm (15 átomos) hasta 1,2 (55 átomos) nm, indicando que los AgFAQCs poseen fundamentalmente estructuras 3D (Figura 11). De nuevo puede verse la diferencia con los AgAQCs, de un número de átomos tan pequeño (2 o 3), que exhiben una estructura 2D.

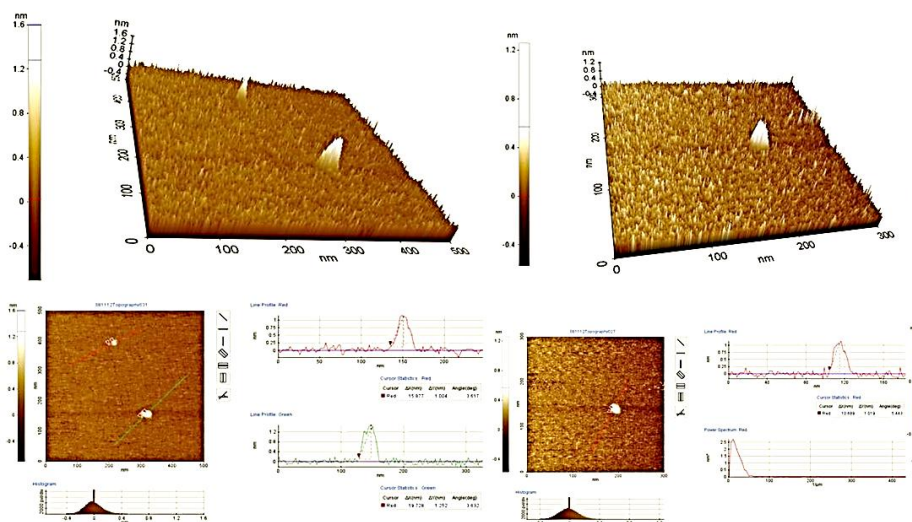


Figura 63-Imágenes de AFM de AgFAQCs depositados en mica (rugosidad media ~150 pm). (arriba) Imágenes 3D. (abajo) Imágenes 2D. Bajo cada una de las imágenes puede verse el histograma correspondiente en nanómetros. A la derecha de cada imagen puede verse el perfil de los fragmentos seleccionados, en picómetros

Una vez caracterizados los AgFAQCs, se estudió su respuesta electroforética empleando el método GelDoc[®] para su caracterización. Para ello se depositó una gota (10 μ l) sobre un portaobjetos de vidrio, y se observó su emisión fluorescente. Como puede verse en la Figura 64, a diferencia de los clústeres

Purificación

anteriormente utilizados, estos mostraron una señal muy intensa, similar a la de un marcador comúnmente utilizado para el ADN, como es el bromuro de etidio.

Una vez comprobada la señal de los AgFAQCs, se procedió a su estudio en geles de agarosa 1,5% con los tres tipos de disoluciones electrolito antes mencionados: TAE, NaCl y NaClO₄. En la Figura 65 se muestran los resultados cuando se examinan dichos geles en el GelDoc[®], tras 20 min y 40 min de ensayo a 60V.

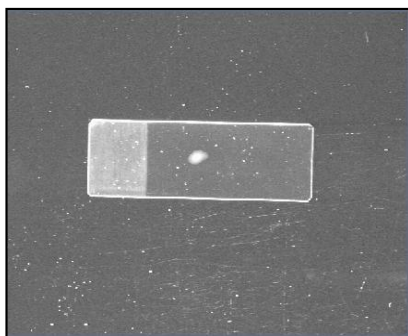


Figura 64- Imagen de la fluorescencia mostrada por los AgAQFCs depositados en un portaobjetos de vidrio

En este caso puede observarse la fluorescencia debida a los clústeres y la manera en que estos avanzan en el gel con el tiempo. Del análisis de las imágenes en la Figura 65 se pueden obtener las siguientes conclusiones.

En primer lugar, la diferencia más importante observada en los tres medios radica en el sentido de la migración. Según los métodos de síntesis utilizados (para AgAQCs y AgFAQCs, *bottom up*, a partir de sal metálica) se puede suponer que la carga de los clústeres, en el caso de que estuvieran cargados, sería positiva.

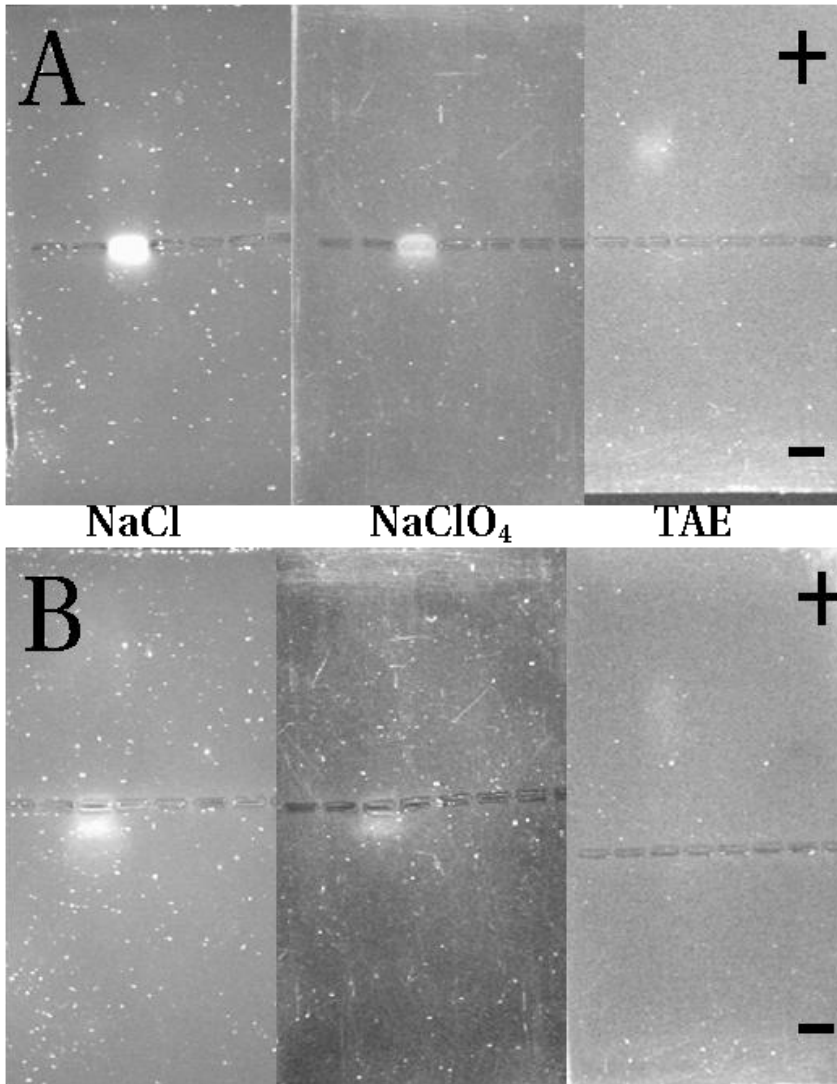


Figura 65- Electroforesis de AgFAQCs en geles 3 geles diferentes de agarosa a 1,5% en disoluciones electrolíticas de NaCl, NaClO₄ y TAE a 60 V y (A) 20 min y (B) 40 min. Se muestra en la parte derecha la posición de los electrodos negativo y positivo

Las migraciones en el NaCl y NaClO₄ así lo indican, observándose que los clústeres avanzan hacia el polo negativo. Sin embargo, con el TAE, los clústeres avanzan hacia el polo opuesto, lo que indica la presencia de una carga efectiva negativa. Esto puede explicarse por la posible formación de un complejo entre el

EDTA y los clústeres. Es bien conocido el poder complejante del EDTA con iones Ag^+ y otros cationes por lo que no es de extrañar que dicho poder complejante se extienda también a los clústeres de Ag^{123} .

La otra diferencia importante observada es la velocidad de migración. En el TAE los clústeres migran aproximadamente a doble velocidad que en los otros dos sistemas. Este hecho puede explicarse de nuevo por la complejación con el EDTA. El EDTA tiene carga -3 a pH 8 (pH del gel)¹²⁴. La relación EDTA/clústeres es muy grande, por lo que puede suponerse que cada EDTA compleja como máximo, a un clúster. De esta forma y suponiendo una carga +1 para los clústeres, la carga del complejo resultante sería de -2, por lo que su velocidad de migración debería ser más rápida y en dirección opuesta a los clústeres sin complejar.

2.3. Efecto de los AgFAQCs sobre la agarosa: el fin de una relación y sus inesperadas consecuencias.

En los experimentos anteriores se pudo observar que, al finalizar el ensayo, los pocillos donde se habían depositado los AgFAQCs estaban dañados, especialmente en la parte inicial del recorrido de los clústeres en el gel de agarosa. Este hecho, aunque de carácter negativo para los propósitos de la purificación, lejos de carecer de importancia puede tener una gran relevancia, ya que -a la vista de los estudios realizados en los capítulos anteriores- hace pensar en una posible electrooxidación de la materia orgánica sobre estos clústeres de tamaño medio. La agarosa es un azúcar y, como tal, su potencial redox es similar al que presentan los alcoholes orgánicos, como el etanol. Por lo tanto, al igual que en el caso expuesto en el capítulo anterior para la electrooxidación de alcoholes (Capítulo 4, sección 3.1), el tamaño mínimo que tiene que tener un clúster para presentar actividad electrocatalítica en la oxidación de azúcares es de 10-12 átomos. De esta forma, tal como se indicó en el capítulo anterior, los clústeres de 2 o 3 átomos no presentan actividad electrocatalítica, lo que puede corroborarse con los presentes experimentos, ya que en los estudios realizados de electroforesis con los AgAQCs de pequeño tamaño (mayoritariamente formados por 2 o 3 átomos) no se observa la degradación de la agarosa, contrariamente a los AgFAQCs, de mayor tamaño.

Purificación

Para comprobar este efecto de la degradación de la agarosa por los clústeres de tamaño medio, FAQAQCs se modificó ligeramente el procedimiento empleado, tal como se describe a continuación.

Hasta ahora, como se ha podido observar en la sección anterior, los geles de electroforesis habían sido cargados utilizando una disolución de AgFAQAQCs mezclada con glicerol (7:3) con la finalidad de aumentar su densidad. Esta dilución en glicerol podría estar actuando como protección contra la degradación del gel, apantallando el efecto real que los AgFAQAQCs tienen sobre la agarosa.

Por este motivo, se llevaron a cabo pruebas de estabilidad de la muestra de AgFAQAQCs, en los pocillos de la agarosa sin utilizar glicerol. La disolución de AgFAQAQCs es más densa que el agua y, por lo tanto, los clústeres permanecen en el fondo del pocillo.

Una vez comprobada la posibilidad de utilizar los clústeres sin necesidad de añadir glicerol, se realizaron experimentos de electroforesis en dos tipos de disolución electrolítica, NaCl y TAE, en las mismas concentraciones utilizadas en el apartado anterior.

Los resultados mostraron que, en comparación a lo anteriormente observado, la acción de degradación de los AgFAQAQCs sobre el gel de agarosa resulta ahora mucho más acentuada debido al aumento de concentración de los clústeres. Puede observarse en la Figura 66 el resultado obtenido después de 10 min de proceso electroforético sobre el gel en NaCl. Resulta claro que el gel se encuentra totalmente degradado y que los clústeres prácticamente no han avanzado, quedando retenidos cerca del pocillo en el que fueron colocados.

Cuando se observan los resultados del gel en TAE, puede verse que, en este caso, los clústeres sí que avanzan en el gel. Se puede observar asimismo que el pocillo está mucho más dañado que en los experimentos previos con glicerol, pero mucho menos que en el caso del gel en NaCl. Las imágenes del gel en TAE reveladas en el GelDoc® a dos tiempos diferentes, 20 min y 40 min pueden observarse en la Figura 66.

Un examen más detenido mostró que los clústeres dejan, además, una clara marca en el gel, resultado de la degradación continua de la agarosa al paso de los clústeres.

El hecho de que se haya degradado más la agarosa en NaCl que en TAE se puede asimismo explicar por la electrocatálisis de los clústeres. Como se observó en la sección anterior, los AgFAQCs se mueven más lentamente en un gel sumergido en NaCl que en uno sumergido en TAE. Es lógico pues pensar que, cuanto más lento migren los AgFAQCs en la agarosa, menos se difundirán y más tiempo estarán en un punto determinado sometidos a un potencial. Por lo tanto, el efecto electrocatalítico será mayor y se degradará más la agarosa, haciendo incluso imposible su migración en el gel, como se observa que pasa en NaCl.

Conviene indicar que existen estudios publicados de la interacción electroquímica de la agarosa con electrodos de Ag en medio ácido¹²⁵. En dichos estudios se demuestra cómo la presencia de la agarosa modifica la morfología de los cristales de plata obtenidos durante la aplicación del potencial. Esto indica que existe una adsorción de la agarosa sobre la plata, paso necesario para que tenga lugar la electrooxidación. Más allá de este interesante resultado, no tenemos conocimiento de ningún estudio que muestre la degradación de la agarosa sobre un electrodo de plata.

Por tanto, lo observado en esta sección apoya la teoría propuesta en los capítulos anteriores (Capítulo 3, sección 3.4 y Capítulo 4, sección 3.1) de que la electrocatálisis se ve favorecida en sistemas subnanométricos. A su vez, se observa que los clústeres de pequeños tamaños (2,3 átomos) son inactivos mientras que la actividad electrocatalítica comienza a ser importante con los clústeres de tamaño medio (clústeres a partir de 10-12 átomos) que son los responsables de la degradación de la agarosa.

Debemos destacar que este comportamiento puede tener una gran relevancia tecnológica, ya que abre una nueva vía a la posible aplicación de estos clústeres en procesos de electrooxidación de materia orgánica. Estos procesos son muy importantes en generación de energías alternativas, por ejemplo en pilas de biocombustible^{126, 127} o en procesos de limpieza de materia orgánica a escala industrial, tratamiento de aguas, etc¹²⁸.

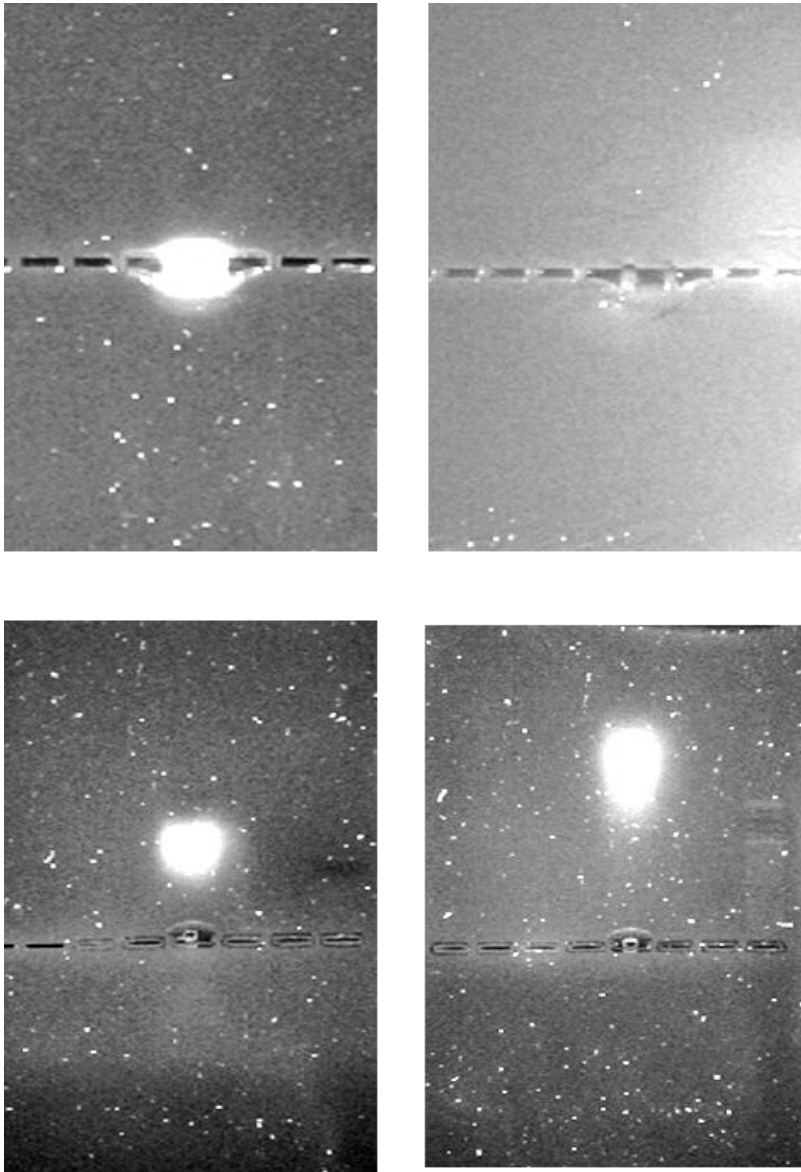


Figura 66- Geles de agarosa tras electroforesis de AgFAQCs sin glicerol en: (arriba) NaCl 1 mM. A los 10 min Izquierda: Emisión fluorescente en GelDoc® y Derecha: Imagen con luz blanca. (abajo) TAE 1mM. Izquierda: 20 min y Derecha: 40 min

2.4. Conclusiones y trabajo futuro

La electroforesis, pudiendo parecer, por sus características, la técnica óptima de purificación para el tipo de sistema planteado, no resultó eficiente para la

Purificación

separación de mezclas de clústeres e iones. Los principales problemas están relacionados, en el caso de los AgAQCs, con la dificultad de detección de las especies y, en el caso de los AgFAQCs, con la degradación de la agarosa en contacto con dichos clústeres.

Aun así, se han obtenido resultados que podrían resultar relevantes, como la demostración de la naturaleza catiónica de los AgFAQCs y su potencial aplicación para la electrooxidación de materia orgánica.

Se observó que el proceso de electrooxidación de agarosa solamente tenía lugar con los clústeres de tamaño medio y no con los más pequeños. Esto corrobora la validez de la teoría presentada en los dos capítulos anteriores para las reacciones de electrooxidación sobre clústeres subnanométricos (Capítulo 3, sección 3.4 y Capítulo 4, sección 3.1).

Debido a la importancia de una posible actividad frente a la electrooxidación de materia orgánica, se pretende continuar el estudio de la electrooxidación tanto de agarosa, como de otro tipo de moléculas orgánicas (surfactantes, azúcares...) de una forma más exhaustiva. En este sentido, se pretenden buscar las condiciones y tipo de clúster más adecuado para cada tipo de oxidación.

3. Separación mediante complejación selectiva

Como se concluyó en el apartado anterior, la electroforesis no es un método eficiente para la separación de iones y clústeres. Por esta razón, e intentando buscar alternativas, se pensó en encontrar un agente complejante capaz de interactuar selectivamente con uno de los componentes de la solución: iones o clústeres. La idea subyacente en este método es que el agente sea capaz de formar, selectivamente, complejos reversibles que permitan la recuperación de los clústeres o, alternativamente, de los iones sin reducir.

Sin embargo, encontrar un ligando adecuado no resulta trivial. Como se vio en la sección 2.2, la opción de utilizar un quelante polidentado general, como el EDTA, quedó descartada una vez comprobada su interacción inespecífica con clústeres e iones. Por lo tanto, a la hora de seleccionar un agente complejante es necesario determinar su posible interacción tanto con los iones como con los clústeres buscando la selectividad por cada uno de ellos.

3.1. Objetivo, los iones: Extracción en disolventes orgánicos

La primera opción analizada tuvo como objetivo la eliminación de los iones plata con un secuestrante específico. La Rodanina (4-(dimetilaminobencilidene) es un agente complejante que se utiliza para la determinación selectiva de iones plata con alta sensibilidad¹²⁹. Su alta especificidad hacia los iones lo convierte en un candidato atractivo para ser estudiado como posible vía de eliminación de estos iones en mezclas con clústeres. Más específicamente, se ha demostrado que no interacciona con otras formas de plata reducida como son las nanopartículas¹³⁰.

Sin embargo, el problema fundamental en el uso de la Rodanina es que no es soluble en medio acuoso, por lo que se planteó una extracción de los iones en fase acuosa a fase orgánica mediante su complejación con este agente, a partir de una disolución de Rodanina preparada en un disolvente orgánico adecuado.

El acetonitrilo es un disolvente adecuado de la Rodanina, por lo que se propuso como medio de solubilidad común en el estudio de la interacción de la Rodanina con los iones Ag.

Purificación

3.1.1. Interacción de la Rodanina con iones

Con el objetivo de estudiar la interacción entre la Rodanina y los iones, se realizaron experimentos en un disolvente común para ambas especies: el acetonitrilo.

Se realizaron dos disoluciones stock de Rodanina y AgNO_3 (122,45 mg/l y 50 mg/l respectivamente). Se mezclaron diferentes cantidades de las mismas para obtener, en un volumen final de 5 ml, diferentes relaciones de Rodanina e iones:

$$\text{Rh:Ag}^+ = 1:0/1:0,25/1:0,5/1:0,75/1:1/1:1,15/1:2/1:3/1:4$$

Inmediatamente después de preparadas, las muestras mostraron un color rojo intenso, de intensidad creciente con la concentración de Rodanina. (Figura 67). Tras 48 h de almacenamiento en reposo, solamente la disolución de Rodanina pura mantuvo la misma tonalidad. El resto de las muestras se decoloró significativamente cambiando su tonalidad del rojo al amarillo hasta la relación 1:1. Por encima de esta relación las disoluciones perdieron casi por completo el color para tornarse incoloras a relaciones más altas que 1:4. En todas las muestras pudo apreciarse la presencia de un precipitado rojo que explica el cambio de intensidad de color observado (Figura 68)



Figura 67- Disoluciones con diferentes relaciones de Rodanina e iones. Izquierda-derecha: 1:0,25/1:0,5/1:0,75/1:1/1:1,5/1:2/1:3/1:4



Figura 68- Detalle de la formación del precipitado rojo, así como del cambio de color en la disolución de diferentes disoluciones de $Rh:Ag^+$ tras 48 h. Izquierda-derecha: 1:0,25/1:0,5/1:0,75/1:1/1:1,5/1:2/1:3/1:4

Puede concluirse de este experimento, que el complejo formado por la Rodanina y los iones es insoluble en acetonitrilo, ya que la formación de precipitado es más acentuada cuanto mayor es la cantidad relativa de iones respecto a la de Rodanina.

Con el objetivo de cuantificar el proceso, se realizaron nuevas disoluciones con una relación Rodanina:iones entre 1:1 y 1:6. Se realizaron espectros UV-Vis tanto de las muestras recién preparadas como de los sobrenadantes obtenidos después del reposo y eliminación del precipitado por centrifugación. Los resultados se muestran en la Figura 69.

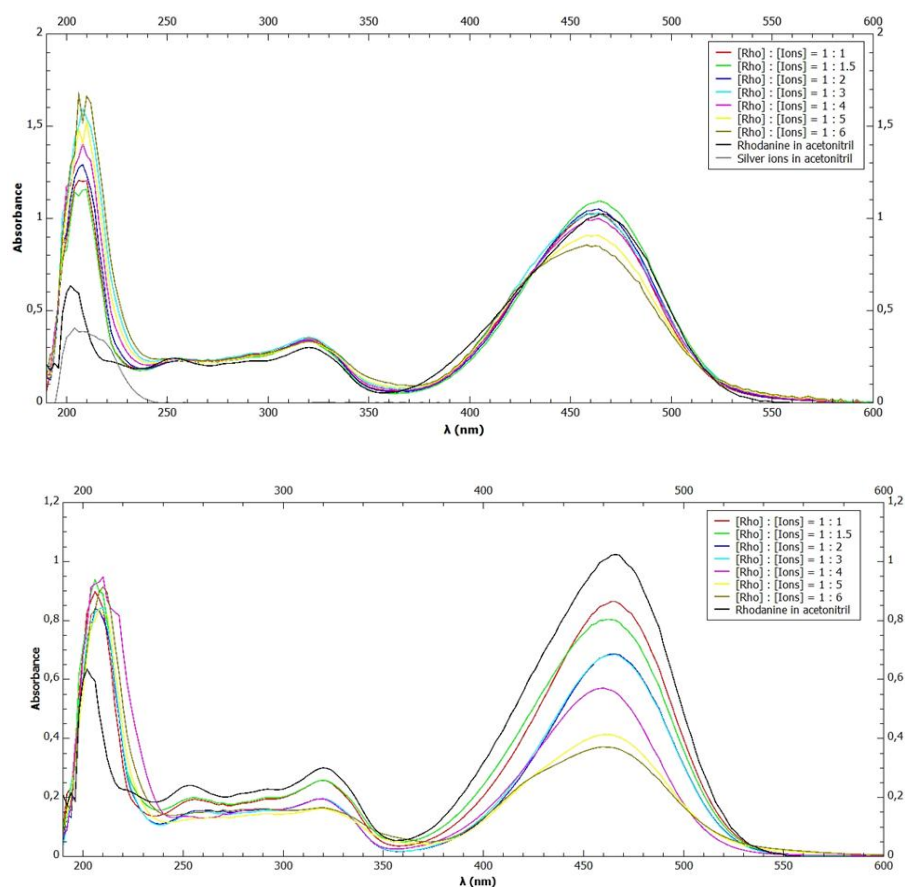


Figura 69- Espectros de UV-Vis de las disoluciones Rodanina e iones con diferentes relaciones (arriba) antes de la centrifugación y (abajo) después de la centrifugación

Puede observarse que la precipitación de la Rodanina (disminución de intensidad de bandas de absorción), es proporcional a la cantidad de iones. Esta dependencia es equivalente a la observada por Azimiet *al.* quienes analizaron la complejación de iones Ag^+ por Rodanina previamente depositada sobre sílica¹³¹.

3.1.2. Interacción de la Rodanina con clústeres

Una vez comprobada la interacción entre la Rodanina y los iones, el siguiente paso consistió en el estudio de su posible interacción con los clústeres. En este caso se decidió utilizar la electroforesis para detectar su posible interacción.

Purificación

Para ello se utilizó un gel de agarosa en TAE 1 mM, depositando en 3 pocillos, Rodanina, Rodanina con AgFAQCs y Rodanina con iones. Los resultados pueden verse en la Figura 70.

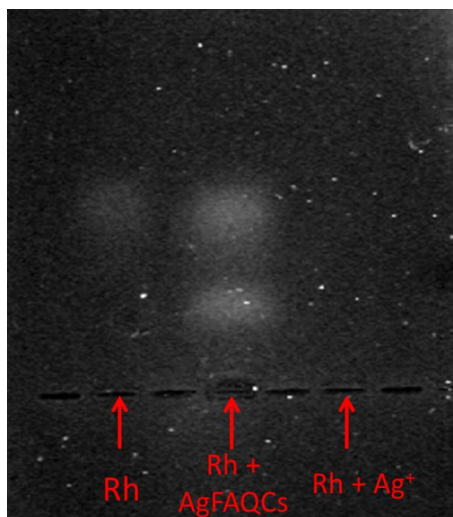


Figura 70- Imagen de electroforesis en TAE de Rodanina, Rodanina con AgFAQCs y Rodanina con iones

Puede observarse que la Rodanina es claramente detectable por el GelDoc[®] lo que permite apreciar 2 fenómenos importantes. Primero, que la Rodanina mezclada con los iones en una relación 1:1 no migra en el gel, debido probablemente a la presencia del complejo precipitado. Segundo, que los AgFAQCs y la Rodanina presentes en la mezcla migran por separado. La velocidad de ambos es claramente diferente como se aprecia del mayor avance de la Rodanina cuya migración es la más rápida, debido a su mayor relación carga/masa.

La Rodanina no interacciona con los clústeres. Esto confirma que la extracción utilizando Rodanina es un método potencialmente aplicable a la separación de clústeres e iones.

Sin embargo, llegados a este punto, surge una duda sobre el método. La falta de interacción de la rodanina con los clústeres ¿se debía a una extrema selectividad

de este complejante? ¿o podía deberse a una interacción fuerte e inespecífica de los clústeres con los disolventes orgánicos?

De esta manera, la estrategia planteada presentaba un problema: desconocíamos cuál era el comportamiento de los clústeres en presencia de disolventes orgánicos y, lo que resulta de mayor importancia, si su naturaleza podía verse afectada por dicho disolvente. Por este motivo se planteó el estudio de la interacción entre clústeres y disolventes orgánicos puros en procedimientos de extracción.

3.1.3. Extracciones con disolventes orgánicos

En primer lugar, se decidió estudiar la interacción de los AgAQCs y AuAQCs con diferentes disolventes orgánicos puros. Se estudió así, el comportamiento de las muestras de clústeres de Au y Ag utilizadas en los capítulos 3 y 4 con dos disolventes de polaridad diferente: ciclohexano y diclorometano ($\epsilon=0$ y 8.93 respectivamente)¹³². Es de esperar que, debido a la naturaleza cargada de los clústeres metálicos de Au y Ag, esta variable tenga influencia sobre la eficiencia de la extracción

Como se vio en la Introducción los clústeres se asemejan más en su comportamiento y propiedades a moléculas que a nanopartículas o iones. De esta manera es de esperar que, a diferencia de los iones, cuando los clústeres no están cargados o cuando formen aductos de carga total igual a cero, tengan una solubilidad apreciable en disolventes orgánicos

3.1.3.1. Clústeres de Ag

3.1.3.1.1. Extracción con ciclohexano:

La extracción con ciclohexano se llevó a cabo según el procedimiento general explicado en la página 60. Los resultados se muestran a continuación:

♦ Fase acuosa:

La Figura 71 muestra el espectro de absorción UV-Visible de la fase acuosa (FA ciclohexano) después de la extracción comparado con el de la muestra inicial

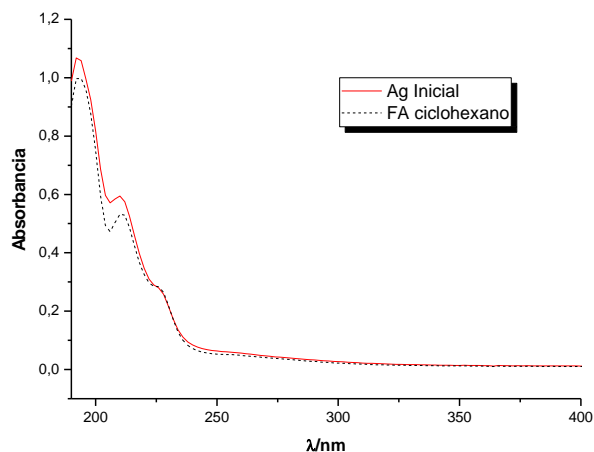


Figura 71- Espectros de la fase acuosa resultante de la extracción de clústeres de plata con ciclohexano: absorción de (negro) la fase acuosa y de (rojo) la muestra inicial

Comparando el espectro de absorción de la muestra sin tratamiento (Ag inicial) con el de la fase acuosa posterior a la extracción (FA ciclohexano) se observa que hubo una disminución en la concentración de clústeres, especialmente de aquellos que absorben a 210 nm. Estos son los que preferencialmente pasaron a la fase orgánica.

♦ Fase orgánica:

La Figura 72 muestra el espectro de absorción UV-Visible de la fase orgánica (FO ciclohexano) después de la extracción comparado con el de la muestra inicial. Se pueden observar dos aspectos relevantes. El primero es que son los clústeres de mayor tamaño (los de menor energía de excitación) los que pasan a la fase orgánica. El segundo, muy importante, es el aumento general en la intensidad

de las bandas de absorción, lo que indica un aumento de la concentración de clústeres de mayor tamaño en la fase orgánica respecto de la fase acuosa.

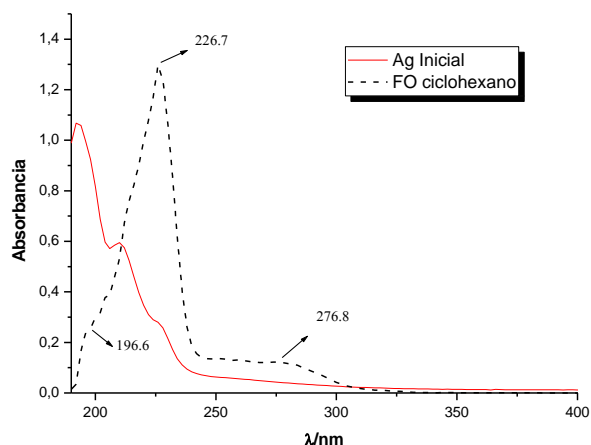


Figura 72- Espectro de absorción de (negro) la fase orgánica resultante de la extracción de clústeres de plata con ciclohexano y de (rojo) la muestra inicial, en disolución acuosa

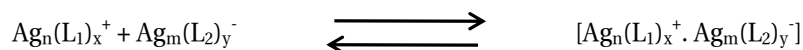
Con el fin de comprender este fenómeno es necesario analizar la naturaleza de los clústeres en disolución, a partir de lo cual podría formularse una hipótesis teniendo en cuenta dos cuestiones principales.

En primer lugar, se sabe que una vez detenida la síntesis electroquímica, además del catión metálico, queda en disolución una mezcla de varios tamaños de clústeres pequeños, neutros y con carga positiva⁴⁸. Al observar los espectros de masas de muestras de clústeres (Ag y Au) puede verse también que existen clústeres (o clústeres y ligandos) con carga negativa. Por tanto, en disolución podría haber clústeres positivos, negativos y neutros.

Por otro lado, está estudiado que existen clústeres con cierto número de átomos, llamados números mágicos, con una estabilidad excepcional correspondientes a estructuras electrónicas cerradas²¹.

Purificación

Por tanto, con la presencia de clústeres positivos y negativos, pueden existir equilibrios de la forma:



Donde $n+m$ es un número mágico. L_1 y L_2 representan ligandos asociados a los clústeres. El producto se indica en forma de agregado debido a que el proceso es reversible. De formarse un clúster propiamente dicho de tamaño $n+m$, en vez de un agregado, el proceso sería irreversible, debido a la gran estabilidad de este clúster. Sin embargo, se ha demostrado que si se lleva a sequedad la fase orgánica y se redispersan los clústeres en agua nuevamente, se vuelve a obtener la misma intensidad de bandas de absorción y aproximadamente la misma concentración de plata que en la muestra inicial, lo que contradice la formación de clústeres estables de tamaño $n+m$, apoyando por el contrario la idea de asociaciones de clusters en medios poco polares¹³³.

Así, en fase acuosa, debido a la alta polaridad, este equilibrio estaría desplazado casi totalmente hacia la izquierda, mientras que el ciclohexano extrae el producto neutro, desplazando dicho equilibrio hacia la derecha.

Así, el número de especies de mayor tamaño aumenta en el disolvente orgánico comparado con el que había presente en la disolución acuosa original.

Se dará una explicación más detallada sobre este fenómeno en el apartado siguiente, relativo a la extracción con diclorometano.

3.1.3.1.2. Estudio del secado de la fase orgánica (efecto del sulfato sódico anhidro)

Se realizaron dos extracciones con ciclohexano, una de ellas secando con sulfato sódico anhidro la fase orgánica y la otra sin secar, según el procedimiento detallado anteriormente en la página 60. El objetivo de este ensayo fue comprobar si el sulfato sódico anhidro arrastraba clústeres en el proceso de secado, ya que interesaría su uso para eliminar restos de agua del disolvente orgánico.

Purificación

En la Figura 73 se muestran los espectros de absorción de las fases orgánicas. Puede observarse que la fase orgánica que se secó con sulfato sódico anhidro tiene mucha menos cantidad de clústeres en disolución que la que no se secó.

Resulta evidente, por tanto, que la utilización de sulfato sódico anhidro para remover posibles restos de agua de la fase orgánica es perjudicial por la cantidad de clústeres perdidos en el proceso.

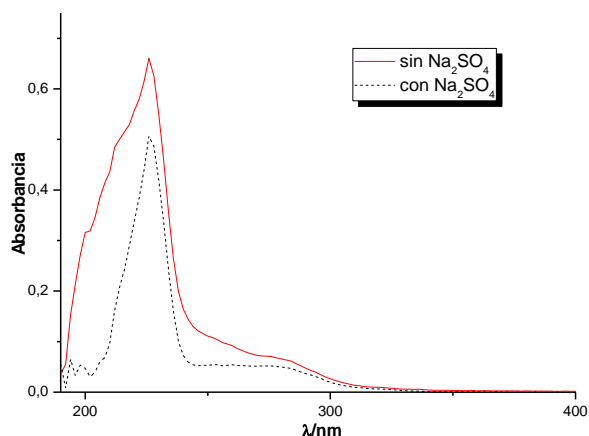


Figura 73- Espectros de absorción de las fases orgánicas resultante de dos extracciones con ciclohexano, una tras secarse con Na_2SO_4 anhidro (negro) y la otra sin secarse (rojo)

3.1.3.1.3. Estudio del efecto de la extracción utilizando ultrasonidos

Esta prueba se realizó con la finalidad de evaluar si presenta alguna ventaja la extracción mediante agitación con ultrasonidos con respecto a la agitación mecánica, buscando una posible mejora en la cantidad de clústeres extraídos.

Se pueden observar en la Figura 74 los espectros de absorción de ambas fases, orgánica y acuosa, con y sin ultrasonidos. Es claro que la agitación con ultrasonidos promueve la extracción de más clústeres a la fase orgánica.

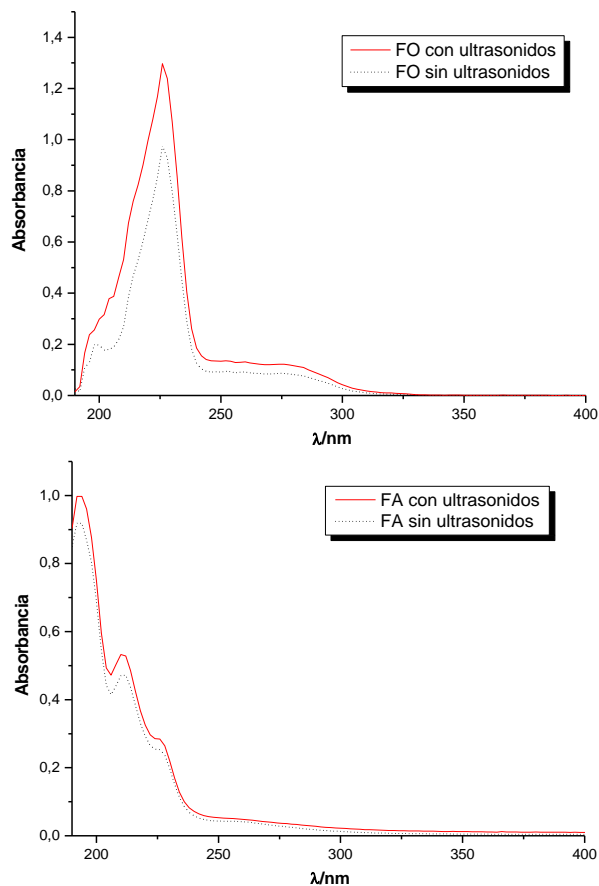


Figura 74- Espectros de absorción de las fases acuosas (arriba) y orgánicas (abajo) resultantes de dos extracciones con ciclohexano, agitando con ultrasonidos (rojo) y la otra sin ultrasonidos (negro)

3.1.3.1.4. Extracción con diclorometano

En esta sección se analiza el efecto de la polaridad sobre la selectividad y eficiencia de la extracción de clústeres. El diclorometano es un disolvente de mayor polaridad que el ciclohexano por lo que resulta útil en este análisis.

La extracción con diclorometano fue llevada a cabo según el procedimiento general explicado en la página 60. Los resultados se muestran a continuación:

- ♦ Fase acuosa:

Purificación

La Figura 75 muestra el espectro de absorción UV-Vis de la fase acuosa (FA diclorometano) después de la extracción comparado con el de la muestra inicial

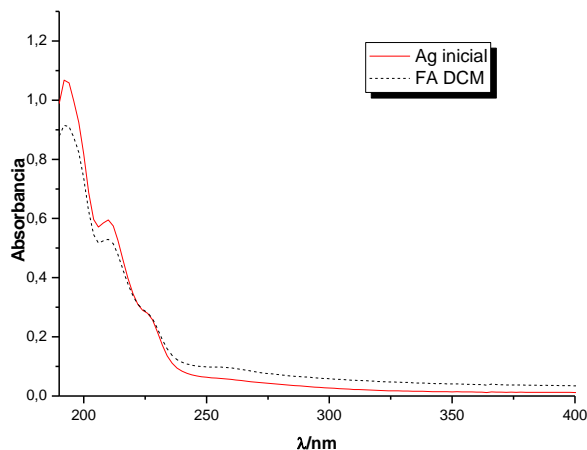


Figura 75- Espectro de absorción de (negro) la fase acuosa resultante de la extracción de clústeres de plata con diclorometano y de (rojo) la muestra inicial, en disolución acuosa

En el espectro de absorción de la fase acuosa se observa una ligera disminución en la absorbancia a longitudes de onda menores de 230 nm, y un aumento a longitudes de onda mayores. Este hecho induce a pensar en un aumento de la cantidad de los clústeres de mayor tamaño en la fase acuosa, de manera similar a lo observado para el ciclohexano.

♦ Fase orgánica:

La Figura 76 muestra el espectro de absorción UV-Vis de la fase orgánica (FO diclorometano) después de la extracción comparado con el de la muestra inicial.

Purificación

El espectro de absorción de la fase orgánica muestra un gran aumento en la concentración de los clústeres de mayor tamaño y una concentración prácticamente nula de los más pequeños.

En el espectro de fluorescencia solamente aparece una banda de emisión a 344 nm, con un máximo de excitación a 240 nm. Teniendo en cuenta lo explicado en la sección anterior de que cada clúster tiene solo una absorción y emisión específica, este hecho apunta a un incremento en la concentración de un determinado tipo de clústeres fluorescentes con absorción a 240 nm.

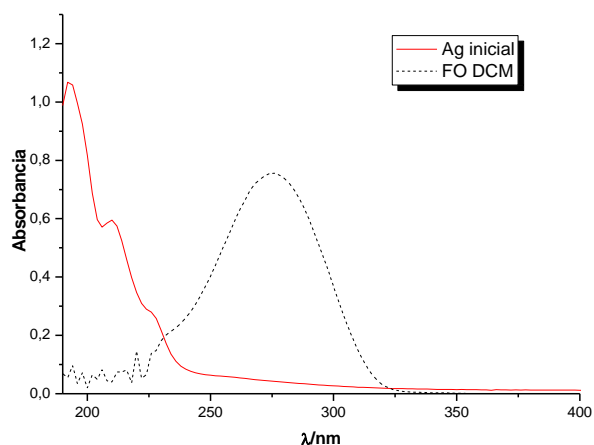


Figura 76- Espectro de absorción de (negro) la fase orgánica resultante de la extracción de clústeres de plata con diclorometano y de (rojo) la muestra inicial, en disolución acuosa

Al contrario de lo que sucede en el caso del ciclohexano, tras la redispersión en agua de los clústeres extraídos con el diclorometano, no se vuelven a recuperar los clústeres de partida. Por otro lado, los espectros de UV-Vis de la FA tras la extracción, muestran ya un aumento de las bandas a mayores longitudes de onda, tanto en los AgAQCs como en los AuAQCs (sección siguiente) indicando que se han formado clústeres de mayor tamaño, incluso en el agua.

Purificación

Por tanto, existen dos procesos bien diferenciados con ambos disolventes orgánicos. Los resultados obtenidos con diclorometano, como se ha observado, sugieren que se están creando clústeres estables nuevos de mayor tamaño.

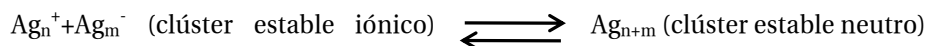
Esta idea, a priori, puede parecer poco probable, teniendo en cuenta la gran estabilidad mostrada por los clústeres de pequeño tamaño^{16, 35, 134}. Es necesario tener en cuenta que, al contrario que el ciclohexano, el diclorometano es un disolvente polar. Por su parte, la polarizabilidad de un clúster aumenta linealmente con su tamaño²⁴, posiblemente debido a que los electrones están más ligados a los núcleos de los clústeres pequeños con índices de coordinación menores. Por tanto, el diclorometano va a tener más afinidad por los clústeres de mayor tamaño que el ciclohexano, debido a su carácter polar. Teniendo en cuenta, además, que los clústeres presentan una especial tendencia a adsorberse en la interfase³⁹ y que el agua ejerce una fuerte solvatación sobre los clústeres de menor tamaño, puede entonces suponerse que, en el caso del ciclohexano, los clústeres podrían formar agregados como los anteriormente explicados, pero estarían fuertemente solvatados por moléculas de agua, es decir, los clústeres no saldrían de la interfase. Esta hipótesis explica lo observado en la utilización del sulfato sódico anhidro, que eliminaría dichos agregados solvatados de la disolución. Por otro lado, dado el carácter polar del diclorometano y su mayor afinidad por los clústeres más grandes, los equilibrios propuestos serían entonces irreversiblemente desplazados hacia la formación de clústeres de mayor tamaño neutros y, por tanto, de mayor estabilidad que los agregados.

A modo de resumen, existiría una competencia entre dos procesos. Por un lado la solvatación del agua y la capacidad de los clústeres para permanecer en la interfase. Por el otro, la creación de nuevos clústeres neutros estables con estructuras electrónicas cerradas por la combinación de diferentes clústeres iónicos y catión metálico presentes en disolución.

Ante la duda de por qué no se forman dichos clústeres en agua desde un principio, se puede dar una posible respuesta al considerar la estabilidad de los clústeres iónicos, diferente de la de los neutros y al cambiar, los números mágicos por los correspondientes a clústeres cargados¹³⁵.

Purificación

Por tanto en agua, como se ha explicado anteriormente, estos clústeres serían muy estables. Sin embargo, en presencia de un disolvente polar aprótico, los clústeres de mayor tamaño serían extraídos por la fase orgánica, provocando el desplazamiento del equilibrio hacia la formación de clústeres neutros y, por tanto, con nuevos números mágicos estables, distintos de los correspondientes a los clústeres iónicos.



Esto se puede observar en los espectros de la fase acuosa, en la que se evidencia la presencia de clústeres de mayor tamaño formados tras la extracción, tanto en el caso de la plata (Figura 75) como en el del oro (Figura 77), que comentaremos en la siguiente sección, pues para estos últimos el efecto se muestra mucho más claramente. Elucidar y comprobar la teoría propuesta queda pendiente para futuros trabajos.

3.1.3.2. Clústeres de Au

3.1.3.2.1. Extracción con ciclohexano

La extracción con ciclohexano fue llevada a cabo según el procedimiento general explicado en la página 60. Los resultados se muestran a continuación:

♦ Fase acuosa:

La Figura 77 muestra el espectro de absorción UV-Vis de la fase acuosa (FA ciclohexano) después de la extracción comparado con el de la muestra inicial

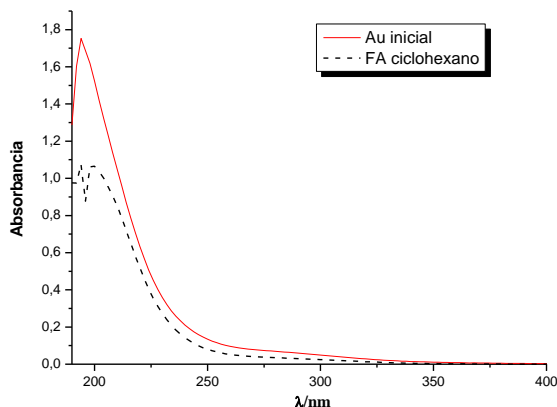


Figura 77- Espectro de absorción de (negro) la fase acuosa resultante de la extracción de clústeres de oro con ciclohexano y de (rojo) la muestra inicial, en disolución acuosa

En un análisis del espectro de UV-Vis se observa que, posteriormente a la extracción con el disolvente orgánico, disminuye la absorbancia de la solución a lo largo de todo el espectro, indicando que algunas de las especies presentes fueron extraídas por el ciclohexano.

♦ Fase orgánica:

La Figura 78 muestra el espectro de absorción UV-Vis de la fase orgánica (FO ciclohexano) después de la extracción comparado con el de la muestra inicial

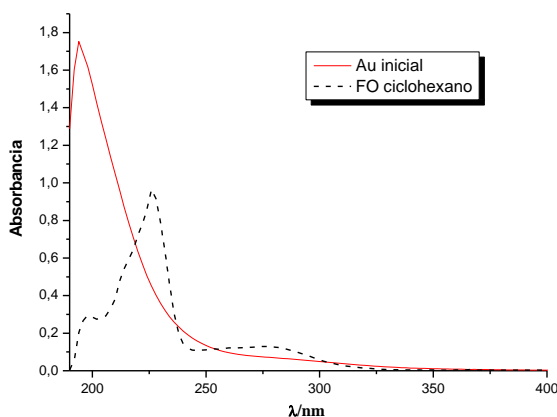


Figura 78- Espectro de absorción de (negro) la fase orgánica resultante de la extracción de clústeres de oro con ciclohexano y de (rojo) la muestra inicial, en disolución acuosa

Analizando los espectros, se observan los mismos detalles destacados en el caso de los clústeres de plata, sección 3.1.3.1.1. El primero es que son los clústeres de mayor tamaño (los de mayor longitud de onda de absorción) los que pasan a la fase orgánica. También se observa un aumento en la intensidad de las bandas de absorción de estos clústeres, lo que indica un aumento en su concentración.

La explicación de este hecho es la dada en la sección anterior, ya que la situación es análoga al caso de los clústeres de plata.

3.1.3.2.2. Extracción con diclorometano

La extracción con diclorometano fue llevada a cabo según el procedimiento general explicado en la página 60. Los resultados se muestran a continuación:

- ♦ Fase acuosa:

La Figura 79 muestra el espectro de absorción UV-Vis de la fase acuosa (FA diclorometano) después de la extracción comparado con el de la muestra inicial.

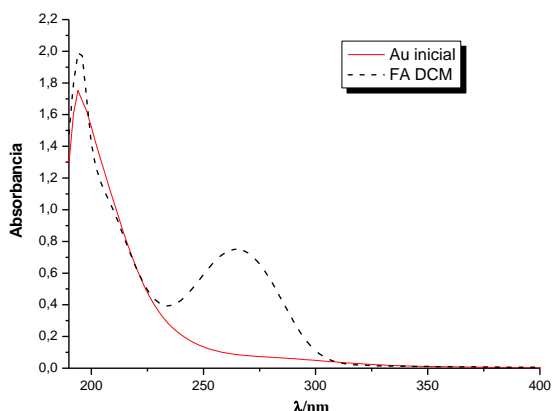


Figura 79- Espectro de absorción de (negro) la fase acuosa resultante de la extracción de clústeres de oro con diclorometano y de (rojo) la muestra inicial, en disolución acuosa

Se observa en el espectro de absorción de la fase acuosa un aumento de la cantidad de los clústeres de mayor tamaño respecto a la muestra inicial, lo que

representa un resultado similar, aunque más acentuado, al obtenido con los clústeres de plata,

Fase orgánica:

La Figura 80 muestra el espectro de absorción UV-Vis de la fase orgánica (FO diclorometano) después de la extracción comparado con el de la muestra inicial

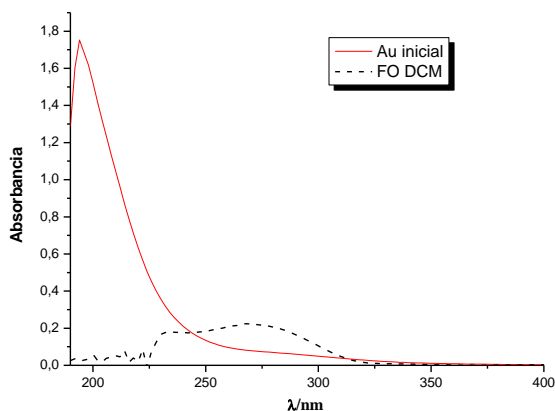


Figura 80- Espectro de absorción de (negro) la fase orgánica resultante de la extracción de clústeres de oro con diclorometano y de (rojo) la muestra inicial, en disolución acuosa

El espectro de absorción de la fase orgánica muestra un gran aumento de los clústeres de mayor tamaño, mientras que prácticamente es inexistente la contribución de los más pequeños.

Se observa de nuevo con los clústeres de oro resultados semejantes a los de plata. Esto confirma que hay importantes similitudes, en lo referente al comportamiento químico frente a la extracción con disolventes orgánicos para clústeres de ambos metales.

3.1.4. Conclusiones

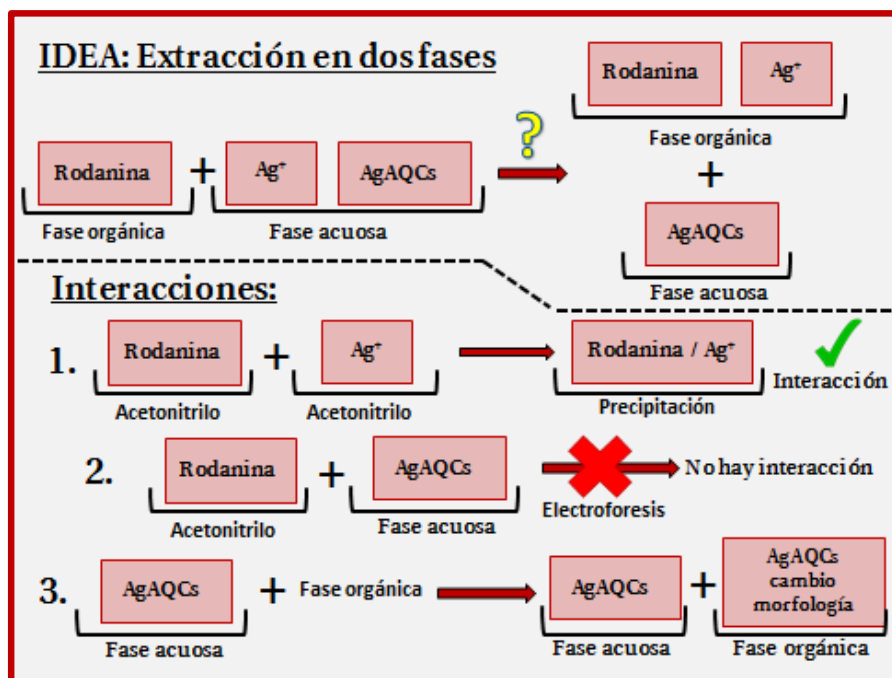


Figura 81- Esquema de los procesos de interacción entre Rodanina, clústeres, iones y disolventes orgánicos

De esquema representado en la Figura 81 se pueden sacar las siguientes conclusiones:

La Rodanina ha demostrado ser un complejante selectivo de los iones, sin embargo al no ser soluble en el disolvente de los AgAQC se hace necesario utilizar una extracción en dos fases.

Las extracciones en dos fases no resultan adecuadas para la extracción de los iones con Rodanina, debido a que la morfología y tamaño de los clústeres puede cambiar de modo irreversible, en contacto con un disolvente orgánico.

En general, las extracciones permiten la separación de los clústeres en función del tamaño. Los clústeres de menor tamaño quedan en la fase acuosa, mientras que los más grandes son extraídos por la fase orgánica.

Purificación

Por otro lado, se observa que el ciclohexano permite recuperar estos clústeres simplemente evaporando hasta sequedad y redispersando el residuo en fase acuosa.

Con el diclorometano, por otro lado, es posible estabilizar clústeres grandes, lo que podría aprovecharse para la obtención de muestras de clústeres de mayor tamaño con un “número mágico” de átomos.

3.2. Objetivo, clústeres: Una diálisis con ADN

En el apartado anterior se analizó el uso de un complejante selectivo de los iones Ag^+ , la Rodanina, como método de purificación aplicado a disoluciones de clústeres. La insolubilidad de este compuesto en agua motivó el planteamiento de una posible extracción en dos fases. Sin embargo, después de un análisis exhaustivo de la interacción de los clústeres con disolventes orgánicos comunes, se desestimó la idea debido a la fuerte influencia que estos solventes tienen sobre la estructura y estabilidad de los clústeres.

Mientras se llevaban a cabo los intentos de purificación descritos anteriormente en este capítulo, en estudios realizados dentro del grupo de investigación en el que se enmarca la presente tesis doctoral, en colaboración el grupo del prof. J.M. Leal de la Universidad de Burgos y con el prof. F.Domínguez de la USC, se encontró que existía una fuerte interacción entre el ADN y los AgAQCs. Además se comprobó que la interacción con los clústeres es del tipo de intercalación dentro de la doble hélice del ADN. El conocimiento de la existencia de esta interacción llevó a plantear (idea original del Prof. F. Domínguez) que, en principio, los clústeres metálicos se podrían retener selectivamente dentro de la doble hélice, por lo que se podría aprovechar este hecho para separar los clústeres de los iones, “atrapando” los clústeres en la doble hélice del ADN, utilizando a continuación una membrana de diálisis para “lavar” los iones.

Los resultados de esta serie de experimentos se detallan a continuación.

3.2.1. Visualización de la interacción: Electroforesis ADN-AgAQCs

En primer lugar, con el objetivo de visualizar la interacción entre el ADN y los AgAQCs, se decidió realizar una electroforesis en gel de agarosa del ADN libre y del ADN tratado con AgAQCs.

Es de esperar que la intercalación de los AgAQCs produzca una disminución de la movilidad del ADN en el gel de agarosa durante la electroforesis, como consecuencia del incremento másico y de la reducción de su carga parcial negativa debida a la presencia de los clústeres catiónicos.

Purificación

La Figura 82 muestra los resultados de la electroforesis tras el tratamiento del gel con bromuro de etidio. Puede observarse una gran diferencia en la distancia de migración de ambas muestras de ADN. El ADN libre migró, como cabría de esperar, considerablemente más rápido que el ADN tratado con los AgAQCs.

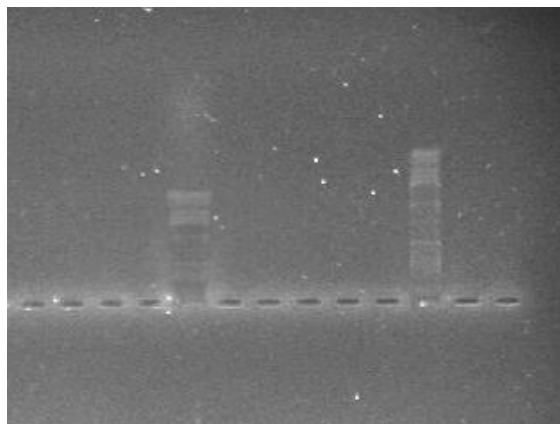


Figura 82- Electroforesis de (izquierda) ADN tratado con AgAQC y (derecha) ADN libre

De esta forma se pone de manifiesto claramente la interacción entre el ADN y los AgAQC, y se demuestra, por tanto, la piedra angular de los experimentos de separación basados en ADN.

3.2.2. Caracterización y estabilidad de las especies participantes en la diálisis

Previo a los ensayos de separación se realizó un estudio espectroscópico de la absorción UV-Vis y de las propiedades fluorescentes de las especies utilizadas en el proceso de separación. Además de la caracterización se han realizado seguimientos de las muestras a diferentes tiempos y en diferentes condiciones, con el objetivo de determinar su estabilidad. Se midieron así por tanto: $\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$ (17 mg/l), AgAQC sin iones (0,1 mg/l) y ADN (varias concentraciones). Los espectros de AgAQC (17 mg/l) se incluirán para su comparación.

3.2.2.1. Caracterización de AgAQC (en presencia y ausencia de iones Ag^+)

La Figura 83 muestra los espectros de absorción UV-Vis y de emisión fluorescente a una longitud de onda de excitación de 230 nm de los AgAQC.

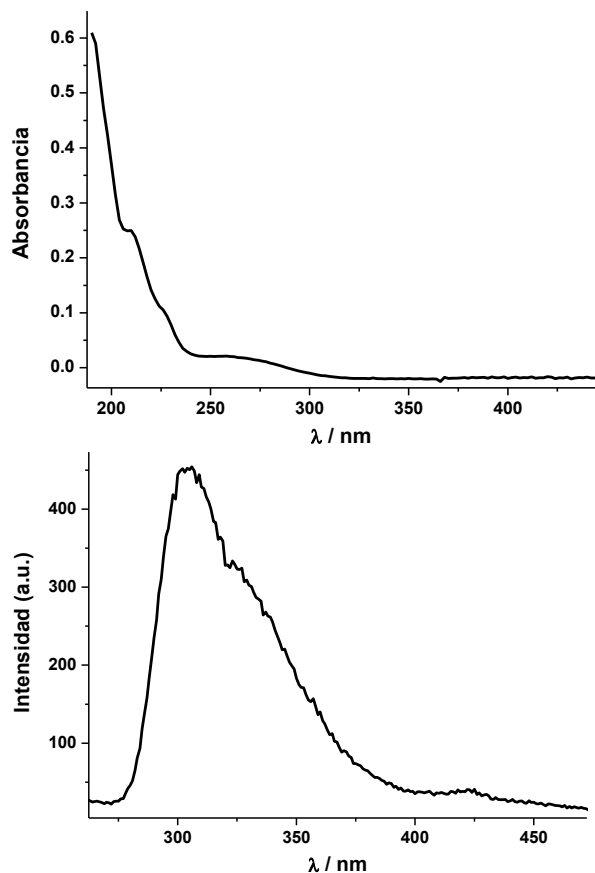


Figura 83- Espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión ($\text{ext}=230 \text{ nm}$) de AgAQC's

Debido a que los experimentos de diálisis requieren de una dilución importante de las muestras y con el objetivo de detectar cualquier posible cambio en los espectros, se decidió medir también los espectros de una disolución diluida de los clústeres: 0,2 mg/l (cantidad total de Ag).

La Figura 84 muestra los espectros de absorción UV-Vis y emisión fluorescente de la muestra de clústeres diluida.

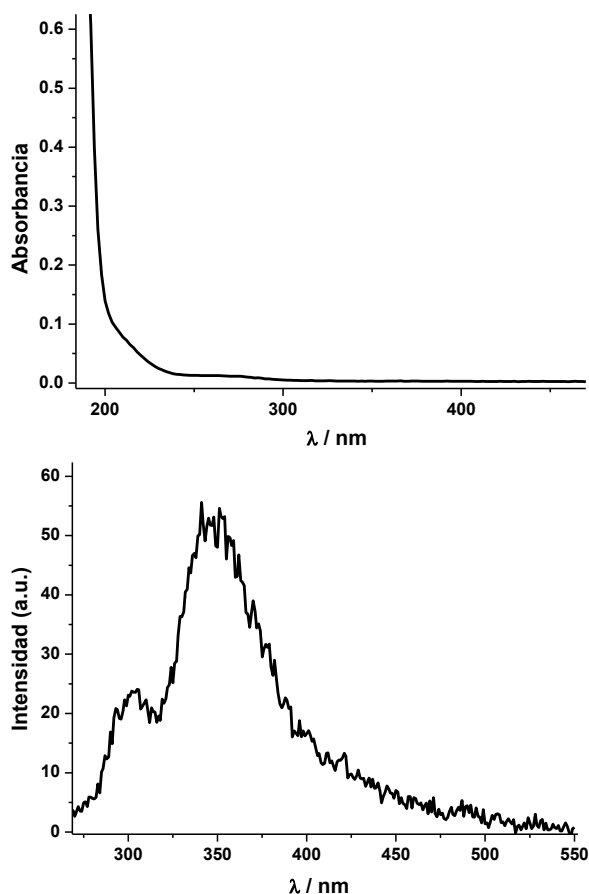


Figura 84- Espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión ($\text{ext}=230 \text{ nm}$) de AgAQC's diluidos

Como era de esperar, el espectro UV-Vis muestra una disminución general de la intensidad de las bandas respecto a la muestra concentrada. El espectro de emisión muestra, sin embargo, un resultado menos intuitivo. Al igual que en la muestra concentrada, se observan las dos bandas de 300 nm y 350 nm, pero en este caso, la de 350 nm es más intensa.

La fluorescencia de una sustancia a menudo es *quencheada* cuando su concentración supera un límite determinado¹³⁶, lo que resulta en una disminución de la intensidad de fluorescencia. Teniendo en cuenta este hecho, se puede considerar que la concentración de *quencheo* del clúster responsable de la banda a 350 nm es baja. Por tanto, a concentraciones altas su intensidad se

Purificación

verá disminuida, lo que hará que aparezca como un hombro de baja intensidad superpuesto con la banda de 300 nm, en lugar de como una banda intensa. Por el contrario, la banda de 300 nm se mantiene igual debido a que no sufre *quencheo* para las concentraciones utilizadas en los experimentos.

Este cambio en la intensidad relativa de las bandas puede resultar importante en la caracterización de muestras de clústeres, especialmente en lo que respecta a los cambios de concentración que ocurren durante las diálisis.

Se dispone, también, de una disolución de AgAQCs suministrada por la empresa NANO GAP de la que han sido extraídos los iones.

La Figura 85 muestra el espectro de emisión fluorescente de los AgAQC sin iones. Se pueden observar las mismas bandas obtenidas anteriormente para AgAQC.

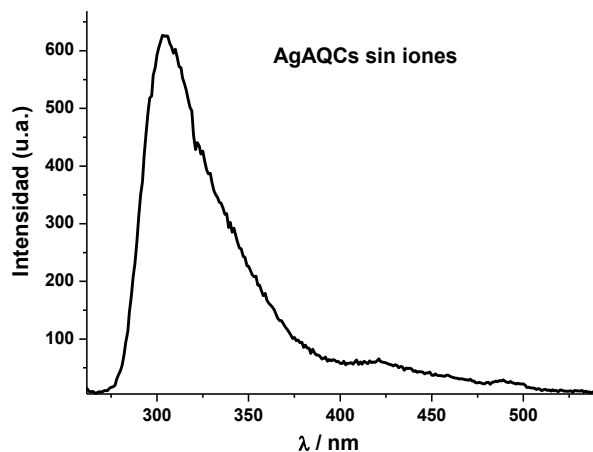


Figura 85- Espectro de emisión (exc=230 nm) de AgAQC sin iones

3.2.2.2. Caracterización de una disolución de AgNO₃

El objetivo principal de utilizar diálisis es separar el catión Ag⁺ de los AgAQC. Para ello es necesario conocer muy bien el comportamiento de ambas especies, tanto en lo que respecta a su absorción UV-vis como a su emisión fluorescente. Por este motivo se decidió realizar una caracterización similar a la llevada a cabo con los clústeres para una solución de una sal de plata. La Figura 86 muestra los espectros de UV-Vis y emisión fluorescente (exc 230 nm), respectivamente, de

Purificación

$\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$. En el espectro de absorción UV-Vis sólo se observa una banda característica por debajo de los 250 nm, correspondiente a la sal de plata. Por otro lado, el espectro de emisión muestra un resultado más interesante. En él aparecen 2 bandas, a 300 nm y a 350 nm, que recuerdan a las observadas para los clústeres. En efecto, tal como han observado Xia y colaboradores¹³⁷, las sales de nitrato de plata, tanto en disolución como en sólido, siempre contienen un bajo porcentaje de clústeres de pequeño tamaño. Según estos autores, los clústeres que se forman no son estables, y desaparecen con el tiempo. Por ello, se decidió estudiar la evolución de los AgAQCs y $\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$ en diferentes situaciones: expuestos a la luz, guardados en la oscuridad a 4°C y bajo una atmosfera de oxígeno a temperatura ambiente.

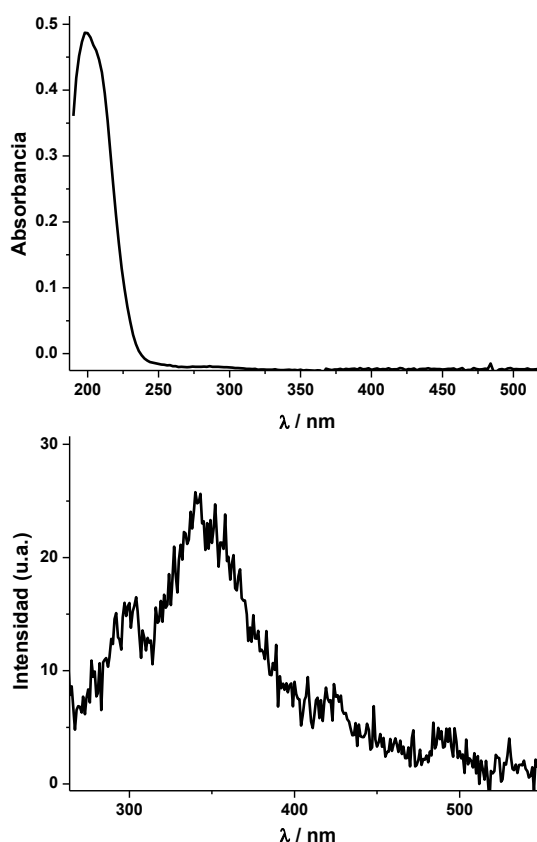


Figura 86- Espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión (ext=230 nm) de AgAQCsdiluidos procedentes de $\text{AgNO}_{3(\text{aq})}$

3.2.2.3. Exposición a la luz natural

La Figura 87 muestra la evolución de los espectros de absorción en el UV-Vis y de emisión fluorescente de una disolución de AgNO_3 expuesta a la luz natural en función del tiempo.

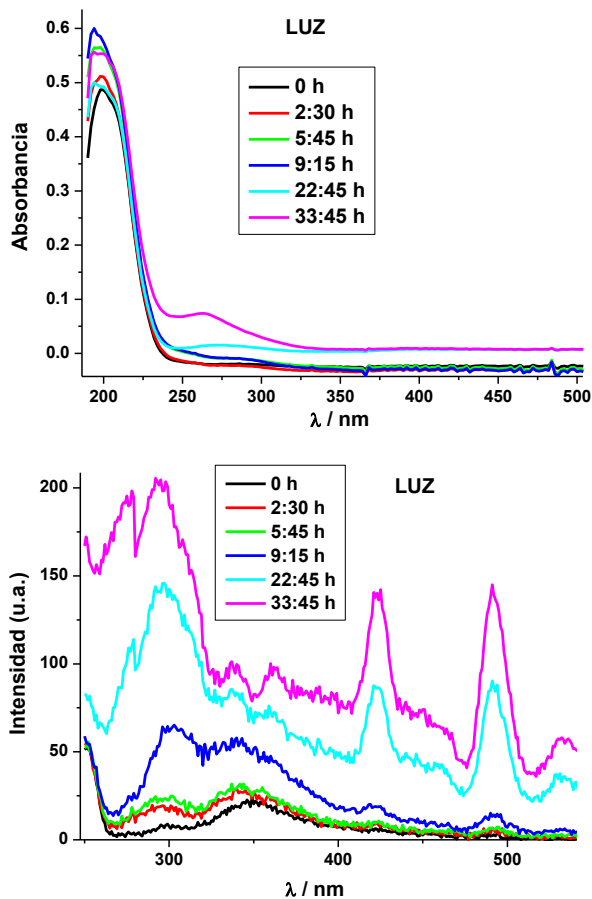


Figura 87- Variación de los espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión ($\text{exc}=230$ nm) de una disolución de AgNO_3 a la luz, en función del tiempo

Puede observarse un aumento de la intensidad de las bandas relativas a los clústeres hasta las 5 h, momento a partir del cual empiezan a aparecer otras dos bandas, a 420 nm y 490 nm, que se hacen mucho más importantes a tiempos más largos.

Purificación

Observando los espectros de absorción en el UV-Vis, se puede comprobar que la aparición de estas bandas observadas en fluorescencia coincide con el aumento de la absorción a partir de 420 nm. Se pueden asociar estas bandas, por tanto, a las resonancias del plasmón de nanopartículas de Ag^{97, 98}.

Por otra parte, el espectro de emisión fluorescente muestra que al aumentar la concentración de los clústeres, las intensidades relativas de las bandas a 300 nm y 350 nm cambian, corroborando lo anteriormente propuesto de la influencia de la concentración en el *quencheo* de la emisión del clúster de 3 átomos, localizada a 350 nm.

La variación observada en la concentración de clústeres y la aparición de nanopartículas metálicas puede ser explicada por la reducción fotoquímica de los iones plata.

El siguiente paso consistió en comprobar si la disolución de AgAQCs con iones se comportaba de la misma manera.

La Figura 88 muestra la variación con el tiempo de los espectros de absorción UV-Vis y de emisión fluorescente para una muestra de AgAQCs en presencia de iones y a la luz.

Al igual que para el AgNO₃ se observa una evolución en el tiempo cuando la muestra de AgAQCs se expone a la luz.

En este caso, sin embargo, no aumenta el número de clústeres, como pasaba con el AgNO₃, sino que desde el primer momento aparecen nanopartículas, lo que hace disminuir el número de clústeres presentes en disolución a tiempos elevados.

La presencia de un mayor número de clústeres estables, por tanto, favorece la formación de nanopartículas cuando existen iones en disolución.

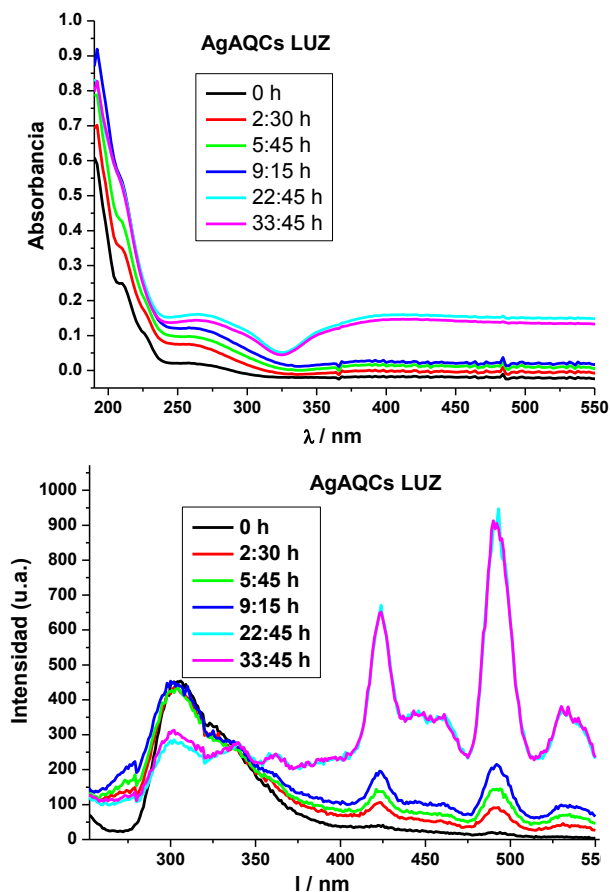


Figura 88- Variación de los espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión ($\text{exc}=230 \text{ nm}$) de una disolución de AgAQC's con iones a la luz, en función del tiempo

A fin de descartar una inestabilidad intrínseca de los clústeres se realizó un seguimiento similar para la disolución de AgAQC's sin iones. Los resultados indican que la muestra se mantiene inalterada, demostrándose, por tanto, la estabilidad de los clústeres en ausencia de iones metálicos.

Este hecho pone de manifiesto la gran influencia que tienen los iones sobre la estabilidad de los AgAQC's.

3.2.2.4. Evolución a 4°C

Hasta el momento se ha observado que una disolución de AgNO_3 y una de AgAQCs con iones muestran un comportamiento similar de estabilidad frente a la luz.

Por otro lado, el seguimiento de una muestra de AgAQC con iones almacenada a 4°C, ha demostrado su inalterabilidad durante períodos de al menos medio año, lo que prueba que los clústeres presentes en la disolución son muy estables, por lo que en ausencia de un reductor como la luz, es posible evitar la reducción de los iones y la formación de nanopartículas de plata.

Con el objetivo de determinar si los clústeres formados en disoluciones de AgNO_3 presentan un comportamiento similar a los AgAQC se estudió la evolución de una disolución de nitrato de plata guardada a 4°C en un vial opaco.

La Figura 89 muestra la variación con el tiempo del espectro de emisión fluorescente de la disolución de AgNO_3 almacenada en estas condiciones. El espectro de absorción en el UV-Vis es equivalente al observado al exponer la muestras a la luz natural, lo que pone de manifiesto la inestabilidad de los clústeres formados por la sal en disolución, en contraposición con la estabilidad de los clústeres presentes en los AgAQC.

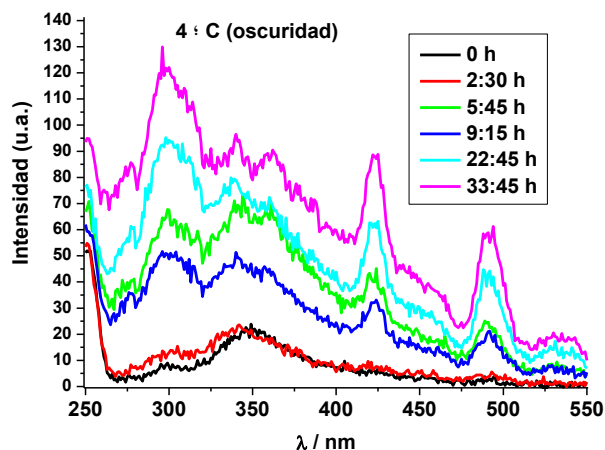


Figura 89- Variación de los espectros de emisión ($\text{exc}=230 \text{ nm}$) de una disolución de AgNO_3 almacenada a 4°C en vial opaco, en función del tiempo

3.2.2.2. Evolución bajo atmosfera de O_2

Xia y colaboradores, en el artículo previamente comentado¹³⁷, atribuyeron la inestabilidad de los clústeres formados en nitrato de plata a la presencia de oxígeno en disolución. Esta afirmación se basa en la evolución temporal pero no hace ninguna consideración sobre las condiciones ambientales (luz, temperatura, etc.)

Por tanto se decidió estudiar la evolución de ambas, una muestra de $AgNO_{3(aq)}$ y una muestra de AgAQCs en presencia de iones, saturadas de oxígeno manteniendo una atmósfera del mismo gas.

La Figura 90 muestra la evolución en el tiempo del espectro de emisión fluorescente para una muestra de $AgNO_{3(aq)}$. Puede observarse que, sorprendentemente, las bandas de los clústeres aumentan sin registrarse evidencia alguna de la formación de nanopartículas.

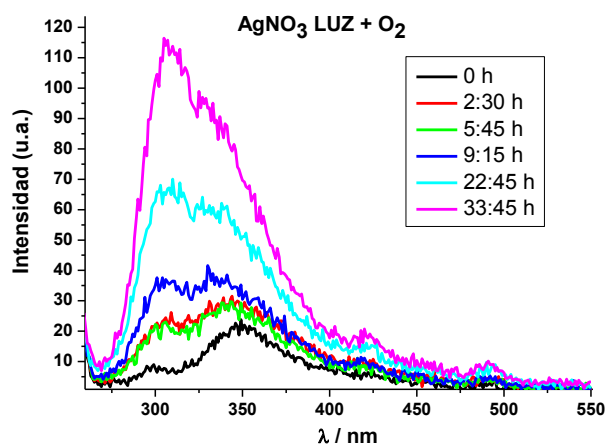


Figura 90- Variación de los espectros de emisión (exc=230 nm) de una disolución de $AgNO_3$ bajo una corriente de O_2 en función del tiempo

Este es, sin duda, un resultado de importancia que muestra que los iones plata pueden convertirse de manera sencilla (al menos parcialmente) en clústeres metálicos estables.

Se realizaron entonces experimentos similares sobre el efecto del O_2 en una muestra de AgAQC's con iones. La Figura 91 muestra el espectro de emisión fluorescente de la muestra de AgAQC's inicial y tras 20 h en atmósfera de O_2 .

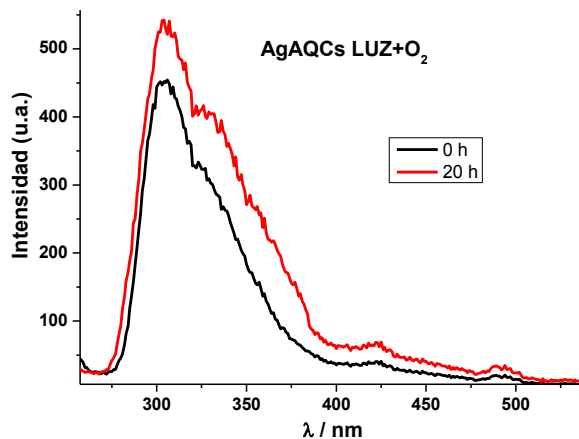


Figura 91- Espectro de emisión (ext=230 nm) de AgAQC's bajo una corriente de O_2 (negro) inicial y (rojo) tras 20 h

Se observa un aumento de la cantidad de clústeres y la ausencia casi total de nanopartículas, de manera similar a lo observado para la sal de plata.

Por último, y para determinar si la presencia de O_2 tiene algún efecto sobre los clústeres, se realizó un experimento similar pero utilizando clústeres sin iones. No se observó variación alguna tras 20 h de almacenamiento en atmósfera de O_2 .

Los resultados obtenidos se pueden explicar considerando un posible efecto de estabilización de los clústeres de pequeño tamaño por adsorción de oxígeno. Este efecto de estabilización favorecería, durante la reducción, la formación de clústeres frente a la de nanopartículas.

Este efecto es muy interesante, desde dos puntos de vista:

-Optimización de la síntesis por aumento de la conversión de Ag^+ en clústeres⁴⁸

-Importancia del efecto de adsorción de O_2 sobre clústeres de Ag^+ en procesos catalíticos^{138, 139}

3.2.2.3. Caracterización de las disoluciones de ADN

El ADN utilizado en los experimentos de diálisis ha sido ADN genómico de *Bacillus licheniformis*. El ADN se caracterizó de la misma manera que las especies de plata, por espectroscopía UV-Vis y emisión fluorescente.

La Figura 92 muestra los espectros obtenidos para una solución de ADN de concentración 17 mg/l.

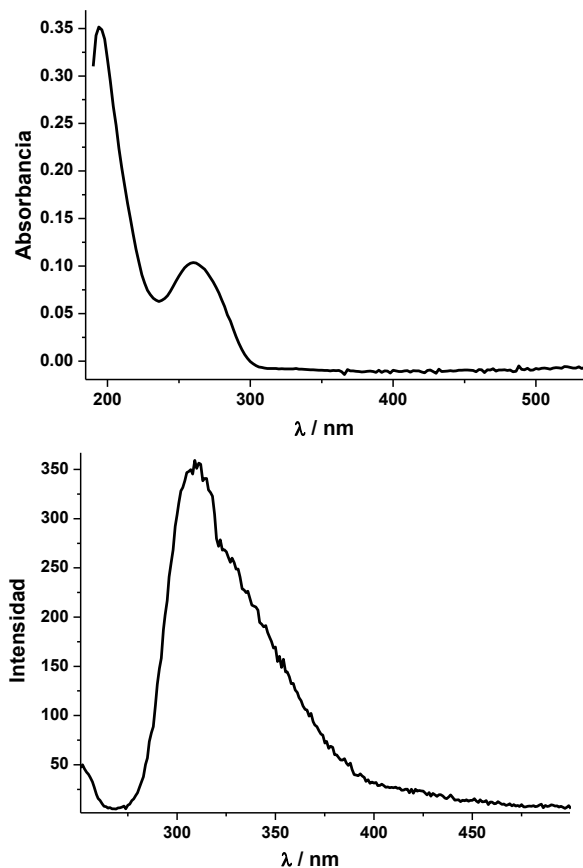


Figura 92- Espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión (exc=230 nm) de ADN

El espectro de absorción UV-Vis muestra la banda característica del ADN a 260 nm. El espectro de emisión fluorescente presenta una banda a 300 nm, que se asemeja a la observada para los AgAQC's y que dificulta su diferenciación por esta técnica. Sin embargo, pudo comprobarse que la forma del espectro de

absorción UV-vis no varía con la concentración de ADN en el intervalo comprendido entre 100 mg/l y 0,05 mg/l, y que la banda característica a 260 nm se mantiene. Esto es importante, pues permite la correcta diferenciación de los clústeres y ADN utilizando espectroscopía de absorción UV-Vis.

3.2.3. La diálisis

Una vez realizada la caracterización de todas las especies participantes en el proceso de separación, se procedieron a realizar los ensayos de diálisis.

Se realizaron diálisis de ADN/AgAQCs y también de ADN/AgNO₃ como blanco.

Todas las diálisis se llevaron a cabo siguiendo la misma metodología. El cartucho con la muestra problema se sumergió en 4 disoluciones diferentes por un período de 24 h cada una. La Figura 93 muestra un ejemplo del montaje utilizado.

Las dos primeras diálisis se llevaron a cabo en H₂O MiliQ. El hecho de que se puedan realizar las diálisis con H₂O únicamente es importante debido a que se evita añadir una sal al producto final. La tercera diálisis se realizó en NaCl 1M, para aumentar la fuerza iónica del sistema y liberar posibles iones adsorbidos en la superficie del ADN. La cuarta diálisis se hizo en NaCl 0,1 M con el objetivo de reducir la cantidad de sal dentro de la membrana y, a la vez, extraer posibles iones que podrían estar presentes aún en baja concentración. Para la última parte de los experimentos, de recuperación de los clústeres del ADN es necesario tener en cuenta que el ADN en contacto con una concentración de sal elevada tiene una temperatura de desnaturalización mayor¹⁴⁰.

Una vez realizados los experimentos de diálisis (4 en total), se extrajo la mezcla del interior de la membrana y se calentó a 95°C durante 6h, con el objetivo de desnaturalizar el ADN, separar la doble hebra y de esta forma liberar los clústeres intercalados. Tras ese tiempo, la muestra se llevó a 0°C para impedir la renaturalización de la doble hélice, y evitar que los clústeres vuelvan a quedar atrapados. Una vez a 0°C, la muestra se introdujo nuevamente en el cartucho de diálisis, y se sumergió en H₂O durante otras 24 h.



Figura 93- Fotografía que muestra un cartucho de diálisis de 3,5 kDa sumergido en H₂O MilliQ con agitación. La muestra se encuentra en el compartimento central

Todas las especies de interés tienen emisión fluorescente a una excitación de 230 nm. Debido a que la fluorescencia es un método de caracterización de mayor sensibilidad que el de absorción UV-Vis, se utilizó éste para el seguimiento del proceso. Sin embargo, en los casos en los que se obtuvo señal significativa, se realizaron medidas de absorción UV-Vis, para poder diferenciar todas las especies presentes.

3.2.2.2. Diálisis de ADN/AgAAQCs

La muestra de diálisis de ADN/AgAAQCs se preparó mezclando dos disoluciones, una de AgAAQCs y otra de ADN, en relación 1:1 en peso. Para ello se dejó en agitación suave durante 12 h.

Purificación

Una vez mezclados los AgAQCs y el ADN se introdujo la disolución en los cartuchos de diálisis. Se realizó el experimento por duplicado utilizando dos tamaños de poro, uno de 3,5 kDa y otro de 7 kDa. Los resultados óptimos se obtuvieron con la membrana de 3,5 kDa, que serán los únicos comentados en este trabajo.

Una vez cargado con la disolución de ADN/AgAQCs el cartucho se sumergió en H₂O MiliQ con agitación suave durante 24 h.

Tras las primeras 24 h en H₂O, se midieron espectros de absorbancia UV-Vis y de emisión fluorescente de la fase acuosa externa, (ver Figura 94).

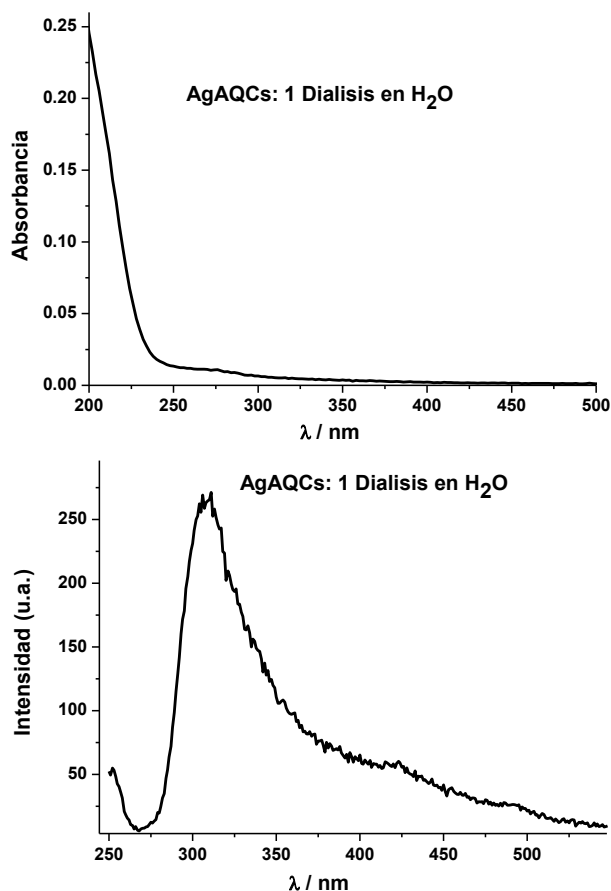


Figura 94- Espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión ($\text{exc}=230 \text{ nm}$) de la fase acuosa externa de la 1ª diálisis de ADN/AgAQC en H₂O tras 24 h

Purificación

El espectro de fluorescencia muestra una banda a 300 nm que, a priori, podría corresponder tanto a los clústeres como al ADN.

Sin embargo, el espectro de UV-Vis no muestra la banda a 260 nm típica del ADN (Figura 92) sino el perfil observado para los AgAQCs (Figura 84). La presencia de AgAQCs en esta primera diálisis será comentada al final de esta sección.

El espectro de fluorescencia de la segunda diálisis en H₂O, tras otras 24 h, puede observarse en la Figura 95.

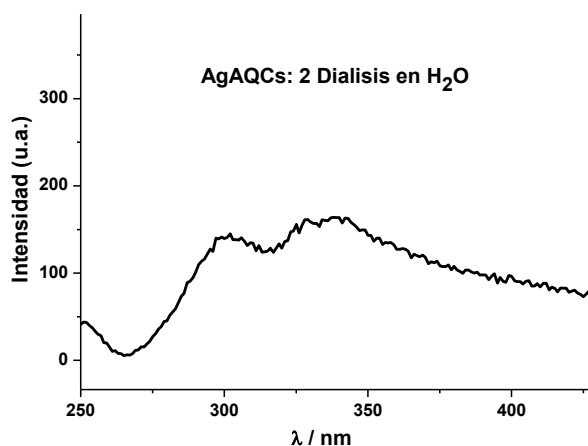


Figura 95- Espectro de emisión (exc=230 nm) de la fase acuosa externa de la segunda diálisis de ADN/AgAQC en H₂O tras 24 h

El espectro revela la presencia de iones Ag⁺ contenidos en la muestra de AgAQC, como se comprobará en la sección siguiente para la diálisis de ADN/AgNO₃.

Los espectros de emisión fluorescente de las dos últimas diálisis en NaCl están representados en la Figura 96. Se observa que no hay una extracción significativa ni de clústeres ni de iones en ninguna de las dos por lo que puede suponerse que se alcanzó el máximo de eficiencia del proceso en las dos primeras diálisis con H₂O.

Purificación

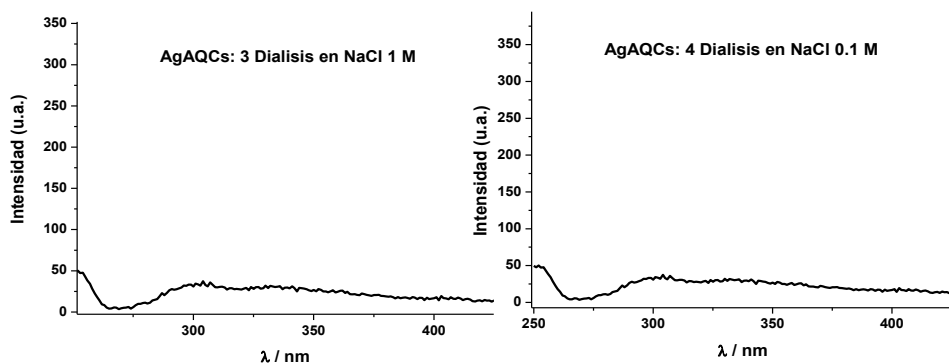


Figura 96- Espectros de emisión fluorescente (exc 230 nm) de la tercera y cuarta diálisis de ADN/AgAQCs

Una vez finalizado el proceso de extracción, se continuó con la desnaturalización y liberación de los clústeres “atrapados” en la doble hebra del ADN. Tras el calentamiento/enfriamiento explicado anteriormente, se realizó una nueva diálisis de la disolución resultante.

Los espectros de absorción UV-Vis y de emisión fluorescente de la extracción final están representados en la Figura 97.

El espectro de emisión fluorescente muestra una banda a 350 nm. En este caso, a diferencia de lo observado en la primera diálisis, la banda no se corresponde con la del ADN, cuyo máximo está a 300 nm. Por otro lado, el espectro de UV-Vis muestra el perfil típico de los clústeres, con una absorción continua desde 350 nm.

Por tanto todo parece indicar que el proceso de diálisis planteado ha cumplido su función. Los clústeres quedaron “atrapados” dentro de la doble hebra del ADN y, tras varios procesos de diálisis para eliminar los iones, se consiguieron liberar por desnaturalización y apertura de las hebras.

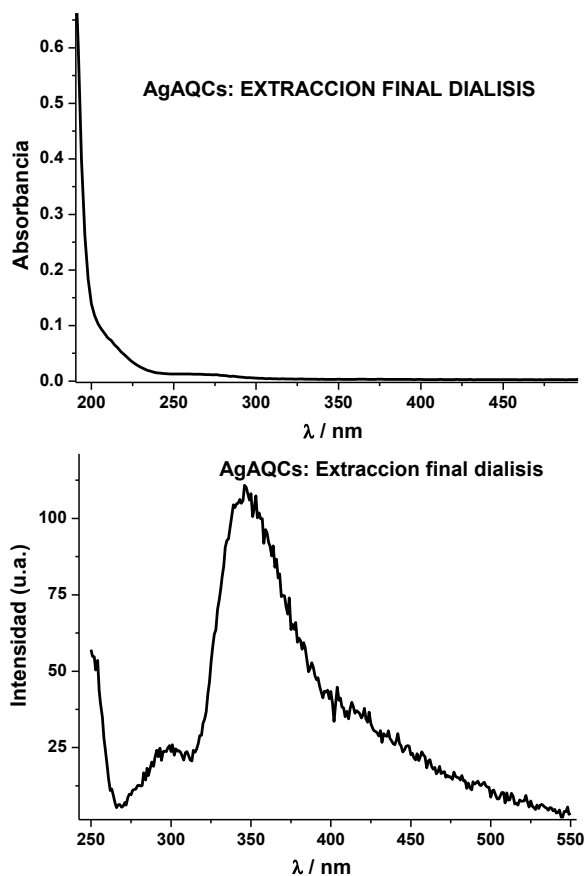


Figura 97- Espectros de (arriba) UV-Vis y (abajo) emisión (exc=230 nm) de los resultados de la extracción final de la diálisis de ADN/AgAQCs en H₂O tras 24 h

Aun así, quedan ciertas cuestiones pendientes por resolver:

1. ¿Se separaron todos los iones de los clústeres?
2. ¿Qué se separó en la primera y segunda diálisis?
3. ¿Los clústeres obtenidos en la extracción final estaban realmente purificados?

Con el objetivo de comprobar si los clústeres extraídos en la parte final de la diálisis estaban impurificados con iones o no, se dejaron a la luz durante una semana. Según lo observado en la sección 3.2.2.3, en presencia de iones y expuestos a la luz, los clústeres sufren una evolución hacia la formación de

Purificación

partículas de mayor tamaño Por otro lado, en muestras purificadas no se espera evolución alguna.

Los clústeres obtenidos como producto final del proceso de diálisis no mostraron variación alguna cuando fueron expuestos a la luz durante una semana, demostrando así su pureza y la validez del método de purificación empleado.

Con el objetivo de determinar si los iones habían sido extraídos del sistema e intentar, así, dar respuesta a las dos primeras preguntas, se realizó primero la diálisis de ADN/AgNO₃,

Los espectros de emisión fluorescente obtenidos de las dos primeras diálisis en H₂O están representados en las Figura 98 Figura 99.

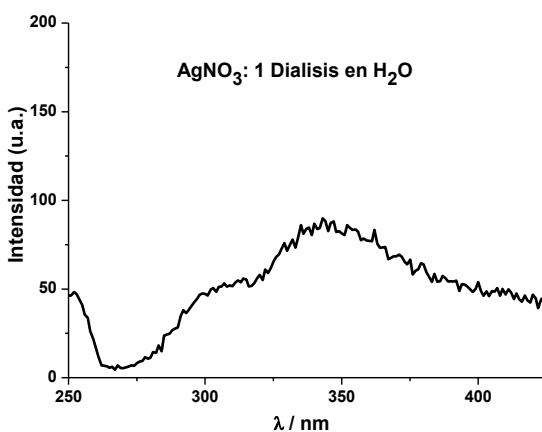


Figura 98- Espectro de emisión fluorescente (exc 230 nm) de la primera diálisis de ADN/AgNO₃

Pueden verse dos bandas de emisión, a 300 nm y a 350 nm, de intensidad y forma muy similar a la obtenida para la segunda diálisis de ADN/AgAQCs. Por tanto, tal como fue comentado anteriormente, puede concluirse que en esta diálisis se produce la extracción de los iones.

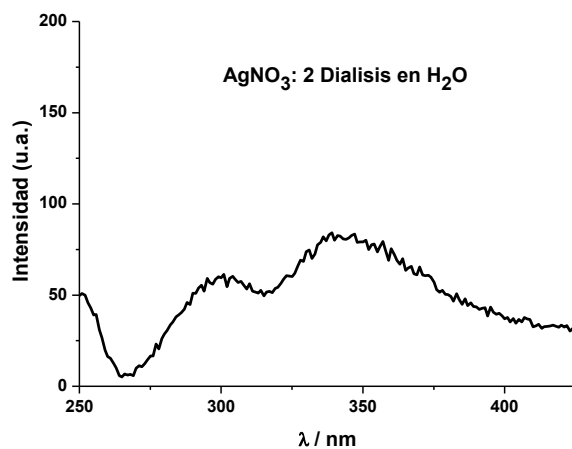


Figura 99- Espectro de emisión fluorescente (exc 230 nm) de la segunda diálisis de ADN/AgNO₃

La tercera y cuarta diálisis, al igual que en el caso de ADN/AgAQCs no arrojaron ningún resultado significativo.

El espectro de emisión fluorescente de la extracción final tras la desnaturalización del ADN se muestra en la Figura 100.

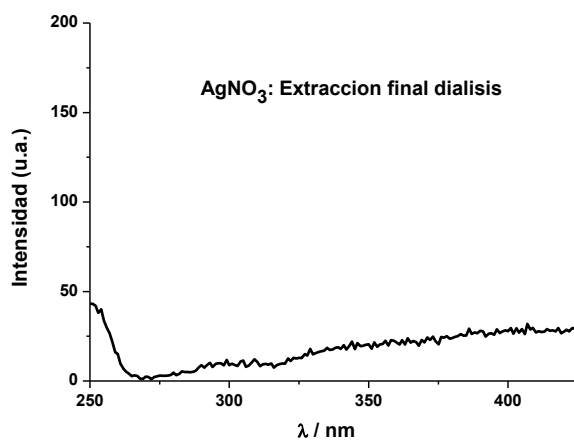


Figura 100- Espectro de emisión fluorescente (exc 230 nm) de la extracción final de la diálisis de ADN/AgNO₃

Purificación

En este caso, y a diferencia de lo observado en el caso del ADN/AgAQC_s, no puede apreciarse ninguna señal significativa, lo que indica que, como era de esperar, los iones no se intercalan dentro de la doble hebra del ADN.

En resumen, este último ensayo con los iones permitió establecer que el producto de extracción de la segunda diálisis son los iones Ag⁺ y que éstos se extraen en agua, sin necesidad de cloruro sódico. Por otro lado, la ausencia de señal después de la tercera y cuarta diálisis y luego de la desnaturalización, corrobora que se requieren sólo dos procesos de diálisis para completar la purificación y que no quedan iones atrapados entre las hebras de ADN.

Para confirmar la pureza de los clústeres obtenidos en la primera diálisis de ADN/AgAQC_s, la muestra obtenida se expuso a la luz de la misma forma que para los obtenidos en la extracción final. El espectro de emisión fluorescente no sufrió ningún cambio significativo tras una semana de exposición lo que demuestra la elevada pureza de dichos clústeres.

Finalmente, la pregunta que queda pendiente de toda la discusión realizada es: ¿por qué se extraen clústeres en la primera y en la última diálisis?

Existen cálculos teóricos, realizados por el profesor Giampaolo Barone, del Dipartimento di Chimica "S. Cannizzaro", de la Università di Palermo, en colaboración con nuestro grupo de investigación, que indican que el clúster de Ag₂ no se intercala entre las hebras de ADN, sino que se asocia en su superficie. Como se ha demostrado en esta tesis, la muestra de AgAQC_s utilizada contiene predominantemente Ag₂ y Ag₃, por lo que es de esperar la unión del primero sobre el ADN y la intercalación del segundo entre las hebras.

El Ag₂ unido exteriormente a la doble hebra, debido a que su densidad de carga es menor que la de los iones, se debería extraer antes que estos últimos y, por tanto, debería salir en la primera diálisis.

El Ag₃ queda, sin embargo, intercalado en medio de la doble hebra, y de este modo es extraído únicamente tras la desnaturalización y separación de las hebras del ADN.

Purificación

Estos hechos pueden verse reflejados en los espectros de emisión fluorescente obtenidos para ambos casos.

En la primera diálisis (Figura 94) aparece una banda a 300 nm, que según el modelo de Jellium, debería corresponder a un clúster de 2 átomos.

Por otro lado, en la extracción final (Figura 97) aparecen dos bandas, a 300 nm y 350 nm. La banda de 350 nm es mucho más intensa que la de 300 nm lo que, por comparación con el espectro de emisión fluorescente de la Figura 84 para clústeres diluidos, indica que la concentración relativa de Ag_3 es más alta que en la muestra inicial, lo que permite corroborar las explicaciones propuestas. Por tanto, el método de la diálisis con ADN no solo permite separar clústeres e iones, si no que resulta una herramienta valiosa en la separación de clústeres de un pequeño número de átomos.

3.2.3. Conclusiones y trabajo futuro

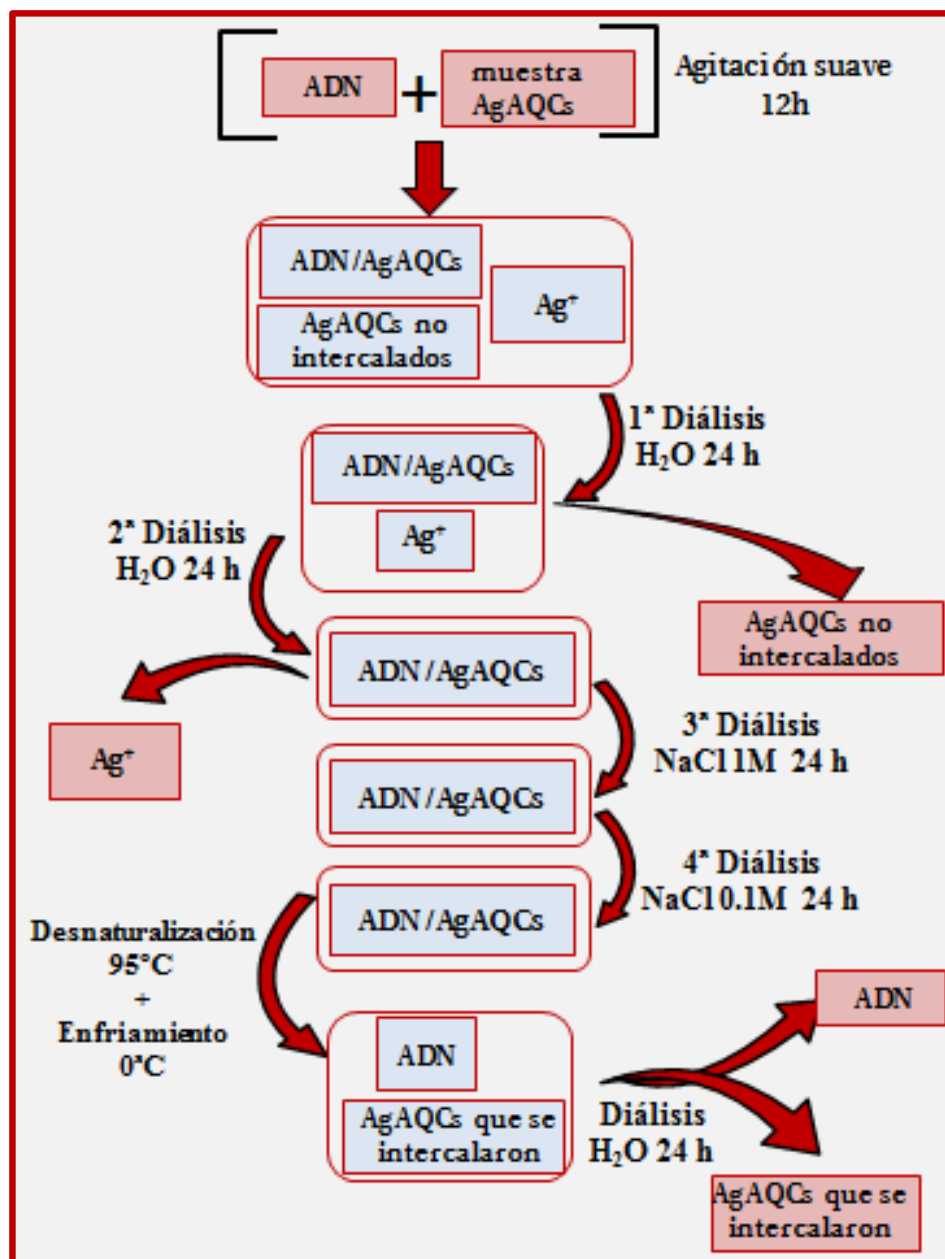


Figura 101- Esquema del proceso de diálisis

Purificación

Los iones hacen crecer los AgAQCs obteniéndose nanopartículas cuando estos se exponen a la luz. Sin embargo, las muestras de AgAQC con iones almacenadas a 4°C permanecen estables.

Si se aplica atmosfera de O₂ a la muestra de AgAQC expuesta a la luz, se previene la formación de nanopartículas y únicamente se forman una mayor cantidad de clústeres por reducción de los iones, lo que se ha interpretado como una mayor estabilización de los clústeres de pequeño tamaño por adsorción de oxígeno.

Los AgAQC sin iones son estables en disolución acuosa, incluso expuestos a la luz.

La diálisis con ADN permite no solo separar clústeres de iones, si no también separar clústeres de diferentes tamaños entre sí.

En un trabajo futuro:

Se pretende estudiar la posibilidad de aprovechar los iones reduciéndolos para formar nuevos clústeres bajo una atmosfera de O₂, seguida por un proceso de diálisis para separar posibles nanopartículas formadas en el proceso.

Se pretende optimizar el proceso de diálisis en dos aspectos. Por un lado se pretende minimizar la cantidad de ADN a utilizar y, por otro lado, minimizar el tiempo de extracción de diálisis, por ejemplo, mediante la adición de carbón activo en las fases de extracción de iones.

Se pretende aplicar la separación con ADN y diálisis a clústeres de otros metales, empezando por los AuAQC y extendiéndose a Cu, Pt, Pd...

4. Conclusiones generales

Se descartaron la electroforesis y la complejación selectiva de los iones con Rodanina como métodos de separación de clústeres e iones debido a que la morfología y tamaño de los clústeres puede cambiar de modo irreversible, en contacto con un disolvente orgánico.

Se observó una gran actividad de electrooxidación de la agarosa con clústeres de plata de tamaño intermedio lo que abre una importante ventana para su aplicación en la degradación electrocatalítica de materia orgánica.

Se comprobó que los iones desestabilizan a los clústeres, reduciéndose y haciéndolos crecer formando nanopartículas. Sin embargo, una atmosfera de O_2 previene este crecimiento y los iones se reducen haciendo crecer únicamente el número de clústeres.

Debido a las interacciones existentes entre los AgAQCs y el ADN, es posible la separación tanto de clústeres e iones, como de clústeres de diferentes tamaños, utilizando un proceso de diálisis mediado por ADN.

Conclusiones

De forma general, los resultados presentados en esta tesis ponen de manifiesto la gran influencia que tienen el tamaño y la estructura electrónica de los clústeres cuánticos subnanométricos sobre sus propiedades, así como la gran importancia que tienen el control de los procesos de síntesis y la purificación de los clústeres en sus potenciales aplicaciones.

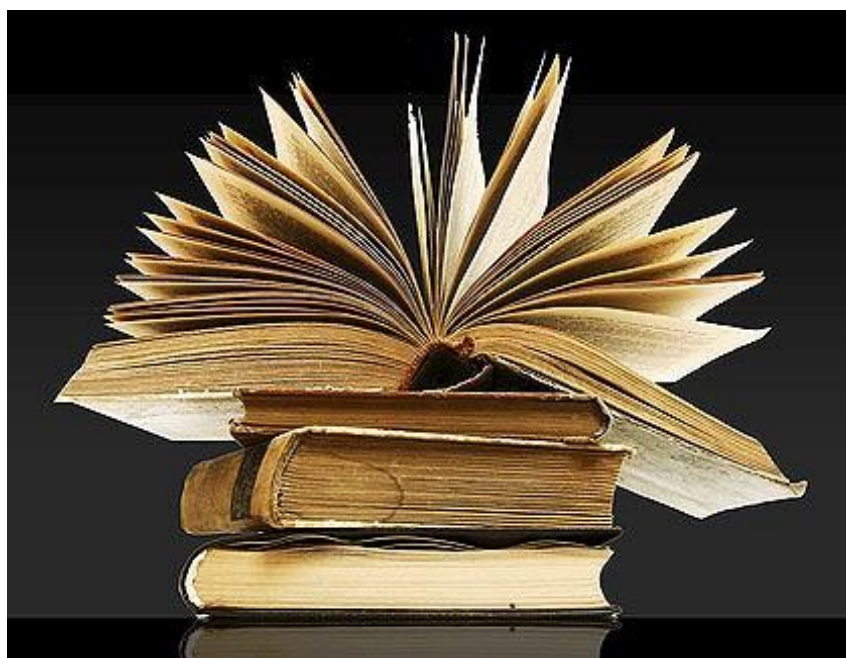
Las principales conclusiones del trabajo se resumen a continuación:

- 1- Se elaboró un modelo que establece límites de tamaño (máximo y mínimo) para la actividad electrocatalítica de las nanopartículas y clústeres de Au frente a la HOR. Dicho modelo podría generalizarse a otros metales y a otro tipo de reacciones, lo que resulta de importancia fundamental en el diseño de nuevos electrocatalizadores, especialmente en el intervalo de tamaños subnanométricos.
- 2- Se observó que clústeres de Au presentan la mayor actividad electrocatalítica frente a la HOR conocida hasta la fecha. Se determinó que esta gran actividad es exhibida únicamente por los clústeres 2D de mayor tamaño (entre 10 y 12 átomos).
- 3- Se observó, por primera vez, que las células biológicas pueden actuar como fuentes de energía en reacciones bioelectrocatalíticas con clústeres metálicos de Ag.
- 4- Se observó que el potencial ABSOLUTO de la membrana exterior de las células biológicas es suficiente para provocar la electrooxidación de alcoholes catalizada por clústeres de Ag.
- 5- Se midió por primera vez, de forma indirecta, el potencial ABSOLUTO en una membrana biológica, resultando ser $\approx 200\text{mV}$ en células mamíferas.
- 6- Se observó que los clústeres de Ag actúan como bioelectrocatalizadores previniendo los efectos nocivos de los alcoholes sobre las células vivas. La citoprotección por los clústeres de Ag, observada en modelos celulares de astrocitos de rata recién nacida expuestos a etanol, abre nuevos caminos hacia su posible uso en la prevención de los daños que causa esta sustancia en el sistema nervioso central en el síndrome de alcoholismo fetal (FAS), patología común en hijos de madres que consumen alcohol durante el embarazo.

Conclusiones

- 7- Se observó que los clústeres de Ag de tamaño superior a $\approx 10-15$ átomos son capaces de degradar agarosa como consecuencia de su actividad electrocatalítica, lo que confirma de nuevo el modelo establecido para la actividad electrocatalítica de los clústeres. La posibilidad de utilizar clústeres metálicos para degradar la materia orgánica abre así un nuevo camino en procesos de gran relevancia tecnológica medioambiental, como es el de los procesos de eliminación de contaminantes ambientales orgánicos por electrooxidación.
- 8- Se comprobó que el oxígeno se adsorbe en los clústeres de plata, estabilizándolos y que dicha interacción es útil para la optimización de los procesos de síntesis y purificación. Este hecho confirma la enormes potencialidades que presenta la utilización de los clústeres como catalizadores en reacciones de oxidación por oxígeno (química verde)
- 9- Se desarrolló un método de purificación eficiente de clústeres basado en la mayor interacción del ADN con los clústeres que con los respectivos iones.
- 10- Se observó que los clústeres se unen de forma diferente al ADN dependiendo de su tamaño, lo que abre un nuevo camino para su separación selectiva.

REFERENCIAS



Referencias

Referencias

1. Feynman, R. P. "There's plenty of room at the bottom". *Engineering and science* **1960**, February, 22.
2. Daniel, M.; Astruc, D. "Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology.". *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2004**, *104*, 293.
3. Gonella, F.; Mazzoldi, P. "Metal Nanocluster Composite Glasses", *Handbook of Nanostructured Materials and Nanotechnology*, ed. Nalwa, H. S. , Academic Press, San Diego, CA, **2000**, *4*, 81.
4. Freestone, I.; Meeks, N.; Sax, M.; Higgitt, C. "The Lycurgus cup - A Roman nanotechnology.". *Gold Bull. (London, U. K.)* **2007**, *40*, 270.
5. Smith, A. "Nanotechnologies - a new branch of chemistry?". *Chem. N. Z.* **2011**, *75*, 21.
6. Binning, G.; Rohrer, H.; Gerber, C.; Weibel, E. "Surface studies by scanning tunneling microscopy.". *Phys. Rev. Lett.* **1982**, *49*, 57.
7. Binnig, G.; Gerber, C.; Stoll, E.; Albrecht, T. R.; Quate, C. F. "Atomic resolution with atomic force microscope.". *Surf. Sci.* **1987**, *189-190*, 1.
8. Faraday, M. "Experimental Relations of Gold (and other metals) to Light". *Philos. Trans.* **1857**, *147*, 145.
9. Eustis, S.; El-Sayed, M. A. "Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes.". *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 209.
10. Giraldo Gallo, J.; Gonzalez, E.; Gómez Baquero, F. "Nanociencia: Nociones preliminares sobre el universo nanoscópico". Bogotá, Unibiblos, Universidad Nacional de Colombia, 2007, 132.
11. Asimov, I. *Fantastic Voyage*; Bantam Dell, A Division of Random House, Inc.: New York, NY, 1966;
12. Cabral, H.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. "Supramolecular nanodevices: From design validation to theranostic Nanomedicine.". *Acc. Chem. Res.* **2011** ACS ASAP.
13. Roduner, E. *Nanoscopic Materials: Size-Dependent Phenomena*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2006; p 285.

Referencias

14. Roduner, E. "Size matters: why nanomaterials are different." *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 583.
15. Bose, S.; Raychaudhuri, P.; Banerjee, R.; Ayyub, P. "Upper critical field in nanostructured Nb. Competing effects of the reduction in density of states and the mean free path." *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* **2006**, 74, 224502/1.
16. Li, J.; Li, X.; Zhai, H.; Wang, L. "Au₂₀: A Tetrahedral Cluster." *Science (Washington, DC, U. S.)* **2003**, 299, 864.
17. Edwards, P. P.; Johnston, R. L.; Rao, C. N. R. "On the Size-Induced Metal-Insulator Transition in Clusters and Small Particles." *Met. Clusters Chem.*, **1999**, 3, 1454.
18. Calvo Fuentes, J.; Rivas Rey, J.; Lopez-Quintela, M. A. "Synthesis of subnanometric metal nanoparticles", *Encyclopedia of nanotechnology*, ed. Bhushan, B., Springer Verlag, **2011**,
19. Chou, M. Y.; Cleland, A.; Cohen, M. L. "Total energies, abundances, and electronic shell structure of lithium, sodium, and potassium clusters." *Solid State Commun.* **1984**, 52, 645.
20. de Heer, W. A. "The physics of simple metal clusters: experimental aspects and simple models." *Rev. Mod. Phys.* **1993**, 65, 611.
21. Walter, M.; Akola, J.; Lopez-Acevedo, O.; Jadzinsky, P. D.; Calero, G.; Ackerson, C. J.; Whetten, R. L.; Gronbeck, H.; Hakkinen, H. "A unified view of ligand-protected gold clusters as superatom complexes." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, 9157.
22. Zheng, J.; Zhang, C.; Dickson, R. M. "Highly fluorescent, water-soluble, size-tunable gold quantum dots" *Phys Rev Lett* **2004**, 93, 077402.
23. Lee, H. M.; Ge, M.; Sahu, B. R.; Tarakeshwar, P.; Kim, K. S. "Geometrical and Electronic Structures of Gold, Silver, and Gold-Silver Binary Clusters: Origins of Ductility of Gold and Gold-Silver Alloy Formation." *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 9994.
24. Li, X.; Wang, H.; Yang, X.; Zhu, Z.; Tang, Y. "Size dependence of the structures and energetic and electronic properties of gold clusters" *J Chem Phys* **2007**, 126, 084505.
25. Zheng, J.; Nicovich, P. R.; Dickson, R. M. "Highly fluorescent noble-metal quantum dots." *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, 58, 409.
26. Vilar-Vidal, N.; Blanco, M. C.; Lopez-Quintela, M. A.; Rivas, J.; Serra, C. "Electrochemical Synthesis of Very Stable Photoluminescent Copper Clusters." *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 15924.

Referencias

27. Vilar-Vidal, N. "Tesis doctoral en proceso de escritura". Dissertation/Thesis. Facultad de Química. Universidad de Santiago de Compostela.
28. Lin, C. J.; Yang, T.; Lee, C.; Huang, S. H.; Sperling, R. A.; Zanella, M.; Li, J. K.; Shen, J.; Wang, H.; Yeh, H.; Parak, W. J.; Chang, W. H. "Synthesis, Characterization, and Bioconjugation of Fluorescent Gold Nanoclusters toward Biological Labeling Applications.". *ACS Nano* **2009**, *3*, 395.
29. Heiz, U.; Landman, U. *Nanocatalysis (Nanoscience and Technology)*; Springer: Berlin, 2007;
30. Vajda, S.; Pellin, M. J.; Greeley, J. P.; Marshall, C. L.; Curtiss, L. A.; Ballentine, G. A.; Elam, J. W.; Catillon-Mucherie, S.; Redfern, P. C.; Mehmood, F.; Zapol, P. "Subnanometre platinum clusters as highly active and selective catalysts for the oxidative dehydrogenation of propane.". *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 213.
31. Lee, S.; Molina, L. M.; Lopez, M.; Alonso, J. A.; Hammer, B.; Lee, B.; Seifert, S.; Winans, R. E.; Elam, J. W.; Pellin, M. J.; Vajda, S. "Selective propene epoxidation on immobilized Au₆₋₁₀ clusters: the effect of hydrogen and water on activity and selectivity.". *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 1467.
32. Harding, C.; Habibpour, V.; Kunz, S.; Farnbacher, A. N.; Heiz, U.; Yoon, B.; Landman, U. "Control and Manipulation of Gold Nanocatalysis: Effects of Metal Oxide Support Thickness and Composition.". *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 538.
33. Rodriguez-Vazquez, M. J.; Blanco, M. C.; Lourido, R.; Vazquez-Vazquez, C.; Pastor, E.; Planes, G. A.; Rivas, J.; Lopez-Quintela, M. A. "Synthesis of Atomic Gold Clusters with Strong Electrocatalytic Activities.". *Langmuir* **2008**, *24*, 12690.
34. Muhammed, M. A. H.; Ramesh, S.; Sinha, S. S.; Pal, S. K.; Pradeep, T. "Two distinct fluorescent quantum clusters of gold starting from metallic nanoparticles by pH-dependent ligand etching.". *Nano Res.* **2008**, *1*, 333.
35. Duan, H.; Nie, S. "Etching Colloidal Gold Nanocrystals with Hyperbranched and Multivalent Polymers: A New Route to Fluorescent and Water-Soluble Atomic Clusters.". *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2412.
36. Schaeffer, N.; Tan, B.; Dickinson, C.; Rosseinsky, M. J.; Laromaine, A.; McComb, D. W.; Stevens, M. M.; Wang, Y.; Petit, L.; Barentin, C.; Spiller, D. G.; Cooper, A. I.; Levy, R. "Fluorescent or not? Size-dependent fluorescence switching for polymer-stabilized gold clusters in the 1.1-1.7 nm size range.". *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2008** 3986.
37. Negishi, Y.; Nobusada, K.; Tsukuda, T. "Glutathione-Protected Gold Clusters Revisited: Bridging the Gap between Gold(I)-Thiolate Complexes and Thiolate-Protected Gold Nanocrystals.". *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5261.
38. Royon, A.; Bourhis, K.; Bellec, M.; Papon, G.; Bousquet, B.; Deshayes, Y.; Cardinal, T.; Canioni, L. "Silver Clusters Embedded in Glass as a Perennial High

Referencias

Capacity Optical Recording Medium." *Adv. Mater. (Weinheim, Ger.)* **2010**, *22*, 5282.

39. Ledo-Suarez,A.; Rivas,J.; Rodriguez-Abreu,C.; Rodriguez,M. J.; Pastor,E.; Hernandez-Creus,A.; Oseroff,S. B.; Lopez-Quintela,M. A. "Facile synthesis of stable subnanosized silver clusters in microemulsions." *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 8823.

40. Lopez-Quintela,M. A. "Synthesis of nanomaterials in microemulsions: formation mechanisms and growth control." *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, *8*, 137.

41. Vazquez-Vazquez,C.; Banobre-Lopez,M.; Mitra,A.; Lopez-Quintela,M. A.; Rivas,J. "Synthesis of Small Atomic Copper Clusters in Microemulsions." *Langmuir* **2009**, *25*, 8208.

42. Santiago Gonzalez,B.; Rodriguez,M. J.; Blanco,C.; Rivas,J.; Lopez-Quintela,M. A.; Martinho,J. M. G. "One Step Synthesis of the Smallest Photoluminescent and Paramagnetic PVP-Protected Gold Atomic Clusters." *Nano Lett.* **2010**, *10*, 4217.

43. Skooj,D. A.; Holler,F. J.; Nieman,T. A. *Principles of Instrumental Analysis*; Thomson Brooks/Cole: Belmont, C, 2001;

44. Qiu,S.; Dong,J.; Chen,G. "Preparation of Cu Nanoparticles from Water-in-Oil Microemulsions." *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *216*, 230.

45. Templeton,A. C.; Wuelfing,W. P.; Murray,R. W. "Monolayer-Protected Cluster Molecules." *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 27.

46. Bard,A. J.; Faulkner,L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Inc.: 1980; p 718.

47. Reetz,M. T.; Helbig,W. "Size-Selective Synthesis of Nanostructured Transition Metal Clusters." *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7401.

48. Rodriguez-Sanchez,L.; Blanco,M. C.; Lopez-Quintela,M. A. "Electrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles." *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 9683.

49. Selva,J.; Martinez,S. E.; Buceta,D.; Rodriguez-Vazquez,M. J.; Blanco,M. C.; Lopez-Quintela,M. A.; Egea,G. "Silver Sub-nanoclusters Electrocatalyze Ethanol Oxidation and Provide Protection against Ethanol Toxicity in Cultured Mammalian Cells." *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6947.

50. Ageitos, J. M. "Purificación, caracterización y expresión heteróloga de la proteasa menor extracelular (Epr) de *Bacillus licheniformis*. Tesis Doctoral". Dissertation/Thesis. **2011**. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.

51. Hammer,B.; Norskov,J. K. "Why gold is the noblest of all the metals." *Nature (London)* **1995**, *376*, 238.

Referencias

52. Thomas, J. M.; Thomas, J. W.; Editors. "Principles and Practice of Heterogeneous Catalysis.". **1996** 553.
53. Guzman, J.; Carrettin, S.; Corma, A. "Spectroscopic Evidence for the Supply of Reactive Oxygen during CO Oxidation Catalyzed by Gold Supported on Nanocrystalline CeO₂". *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3286.
54. Hughes, M. D.; Xu, Y.; Jenkins, P.; McMorn, P.; Landon, P.; Enache, D. I.; Carley, A. F.; Attard, G. A.; Hutchings, G. J.; King, F.; Stitt, E. H.; Johnston, P.; Griffin, K.; Kiely, C. J. "Tunable gold catalysts for selective hydrocarbon oxidation under mild conditions.". *Nature (London, U. K.)* **2005**, *437*, 1132.
55. Enache, D. I.; Edwards, J. K.; Landon, P.; Solsona-Espriu, B.; Carley, A. F.; Herzing, A. A.; Watanabe, M.; Kiely, C. J.; Knight, D. W.; Hutchings, G. J. "Solvent-Free Oxidation of Primary Alcohols to Aldehydes Using Au-Pd/TiO₂ Catalysts.". *Science (Washington, DC, U. S.)* **2006**, *311*, 362.
56. Valden, M.; Lai, X.; Goodman, D. W. "Onset of catalytic activity of gold clusters on titania with the appearance of nonmetallic properties.". *Science (Washington, D. C.)* **1998**, *281*, 1647.
57. Ishida, T.; Kinoshita, N.; Okatsu, H.; Akita, T.; Takei, T.; Haruta, H. "Influence of the support and the size of gold clusters on catalytic activity for glucose oxidation.". *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 9265.
58. Gonzalez-Arellano, C.; Abad, A.; Corma, A.; Garcia, H.; Iglesias, M.; Sanchez, F. "Catalysis by gold(I) and gold(III): a parallelism between homo- and heterogeneous catalysts for copper-free Sonogashira cross-coupling reactions.". *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 1536.
59. Corma, A.; Serna, P. "Chemoselective Hydrogenation of Nitro Compounds with Supported Gold Catalysts.". *Science (Washington, DC, U. S.)* **2006**, *313*, 332.
60. Ojeda, M.; Iglesia, E. "Formic Acid Dehydrogenation on Au-Based Catalysts at Near-Ambient Temperatures.". *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4800.
61. McEwan, L.; Julius, M.; Roberts, S.; Fletcher, J. C. Q. "A review of the use of gold catalysts in selective hydrogenation reactions.". *Gold Bull. (London, U. K.)* **2010**, *43*, 298.
62. Haruta, M.; Yamada, N.; Kobayashi, T.; Iijima, S. "Gold catalysts prepared by coprecipitation for low-temperature oxidation of hydrogen and of carbon monoxide.". *J. Catal.* **1989**, *115*, 301.
63. Hutchings, G. J. "Vapor phase hydrochlorination of acetylene: correlation of catalytic activity of supported metal chloride catalysts.". *J. Catal.* **1985**, *96*, 292.
64. Okumura, M.; Kitagawa, Y.; Haruta, M.; Yamaguchi, K. "The interaction of neutral and charged Au clusters with O₂, CO and H₂". *Appl. Catal., A* **2005**, *291*, 37.

Referencias

65. Barrio,L.; Liu,P.; Rodriguez,J. A.; Campos-Martin,J. M.; Fierro,J. L. G. "A density functional theory study of the dissociation of H₂ on gold clusters: Importance of fluxionality and ensemble effects." *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 164715/1.
66. Molina,L. M.; Hammer,B. "Some recent theoretical advances in the understanding of the catalytic activity of Au." *Appl. Catal., A* **2005**, *291*, 21.
67. Hutchings,G. J. "Nanocrystalline gold catalysts: a reflection on catalyst discovery and the nature of active sites." *Gold Bull. (London, U. K.)* **2009**, *42*, 260.
68. Baker,T. A.; Liu,X.; Friend,C. M. "The mystery of gold's chemical activity: local bonding, morphology and reactivity of atomic oxygen." *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 34.
69. Haruta,M. "When gold is not noble: Catalysis by nanoparticles." *Chem. Rec.* **2003**, *3*, 75.
70. Fujitani,T.; Nakamura,I.; Akita,T.; Okumura,M.; Haruta,M. "Hydrogen Dissociation by Gold Clusters." *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 9515.
71. Herzing,A. A.; Kiely,C. J.; Carley,A. F.; Landon,P.; Hutchings,G. J. "Identification of Active Gold Nanoclusters on Iron Oxide Supports for CO Oxidation." *Science (Washington, DC, U. S.)* **2008**, *321*, 1331.
72. Zhang,J. Z.; Hongsirikarn,K.; Goodwin,J. G.,Jr. "The effect of low concentrations of CO on H₂ adsorption and activation on Pt/C in the presence of H₂O vapor." *J. Power Sources* **2011**, *196*, 6186.
73. Lee,Y.; Kim,G.; Joe,M.; Jang,J.; Kim,J.; Lee,K.; Kwon,Y. "Enhancement of electrocatalytic activity of gold nanoparticles by sonochemical treatment." *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2010**, *46*, 5656.
74. Zanchet,A.; Dorta-Urra,A.; Aguado,A.; Roncero,O. "Understanding Structure, Size, and Charge Effects for the H₂ Dissociation Mechanism on Planar Gold Clusters." *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 47.
75. Liz-Marzan,L. M. "Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles." *Langmuir* **2006**, *22*, 32.
76. Menard,L. D.; Gao,S.; Xu,H.; Twisten,R. D.; Harper,A. S.; Song,Y.; Wang,G.; Douglas,A. D.; Yang,J. C.; Frenkel,A. I.; Nuzzo,R. G.; Murray,R. W. "Sub-Nanometer Au Monolayer-Protected Clusters Exhibiting Molecule-like Electronic Behavior: Quantitative High-Angle Annular Dark-Field Scanning Transmission Electron Microscopy and Electrochemical Characterization of Clusters with Precise Atomic Stoichiometry." *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 12874.

Referencias

77. Cordova O.,R.; Martins,M. E.; Arvia,A. J. "The activation of polycrystalline gold to the hydrogen electrode reaction promoted with repetitive potentiodynamic perturbations." *J. Electrochem. Soc.* **1980**, *127*, 2628.
78. Angerstein-Kozłowska,H.; Conway,B. E.; Hamelin,A. "Electrocatalytic mediation of oxidation of molecular hydrogen at gold by chemisorbed states of anions." *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1990**, *277*, 233.
79. Jenkins,G. M.; Kawamura,K. "Structure of glassy carbon." *Nature (London)* **1971**, *231*, 175.
80. Pandolfo,A. G.; Hollenkamp,A. F. "Carbon properties and their role in supercapacitors." *J. Power Sources* **2006**, *157*, 11.
81. Braun,A.; Bartsch,M.; Schnyder,B.; Kotz,R.; Haas,O.; Haubold,H. -.; Goerigk,G. "X-ray scattering and adsorption studies of thermally oxidized glassy carbon." *J. Non-Cryst. Solids* **1999**, *260*, 1.
82. Deegan,R. D.; Bakajin,O.; Dupont,T. F.; Huber,G.; Nagel,S. R.; Witten,T. A. "Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops". *Nature* **1997**, *389*, 827.
83. Kita,H.; Nakajima,H. "Metal electrodes bonded on solid polymer electrolyte membranes (SPE) - III. Carbon monoxide oxidation at gold-SPE electrodes." *Electrochim. Acta* **1986**, *31*, 193.
84. Inoue,H.; Wang,J. X.; Sasaki,K.; Adzic,R. R. "Electrocatalysis of H₂ oxidation on Ru(0001) and Ru(10-10) single crystal surfaces." *J. Electroanal. Chem.* **2003**, *554-555*, 77.
85. Zanchet,A.; Roncero,O.; Omar,S.; Paniagua,M.; Aguado,A. "Potential energy surface and reactive collisions for the Au + H₂ system." *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 034301/1.
86. Jeyabharathi,C.; Kumar,S. S.; Kiruthika,G. V. M.; Phani,K. L. N. "Aqueous CTAB-Assisted Electrodeposition of Gold Atomic Clusters and Their Oxygen Reduction Electrocatalytic Activity in Acid Solutions." *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 2925.
87. Burke,L. D.; O'Mullane,A. P. "Generation of active surface states of gold and the role of such states in electrocatalysis." *J. Solid State Electrochem.* **2000**, *4*, 285.
88. Burke,L. D.; O'Connell,A. M.; O'Mullane,A. P. "The role of defects, or active states, in surface electrochemistry with particular reference to gold in neutral solution." *J. Appl. Electrochem.* **2003**, *33*, 1125.
89. Burke,L. D.; Horgan,M. A.; Hurley,L. M.; Nagle,L. C.; O'Mullane,A. P. "Superactivation of metal electrode surfaces and its relevance to COads oxidation at fuel cell anodes." *J. Appl. Electrochem.* **2001**, *31*, 729.

Referencias

90. Burke, L. D.; Hurley, L. M.; Lodge, V. E.; Mooney, M. B. "The effect of severe thermal pretreatment on the redox behavior of gold in aqueous acid solution." *J. Solid State Electrochem.* **2001**, *5*, 250.
91. Das, J.; Patra, S.; Yang, H. "Enhancement of the electrocatalytic activity of gold nanoparticles via NaBH₄ treatment." *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2008** 4451.
92. Jo, K.; Kang, H. J.; Yang, H. "Enhancement of the electrocatalytic activity of gold nanoparticles via anodic treatment and the decrease of the enhanced activity with aging." *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32*, 728.
93. Martinez, S. E.; Egea, G. "Novel molecular targets for the prevention of fetal alcohol syndrome." *Recent Pat. CNS Drug Discovery* **2007**, *2*, 23.
94. Minambres, R.; Guasch, R. M.; Perez-Arago, A.; Guerri, C. "The RhoA/ROCK-I/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes." *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 271.
95. Tomas, M.; Marin, P.; Megias, L.; Egea, G.; Renau-Piqueras, J. "Ethanol perturbs the secretory pathways in astrocytes." *Neurobiol. Dis.* **2005**, *20*, 773.
96. Martinez, S. E.; Lazaro-Dieguez, F.; Selva, J.; Calvo, F.; Piqueras, J.; Crespo, P.; Claro, E.; Egea, G. "Lysophosphatidic acid rescues RhoA activation and phosphoinositides levels in astrocytes exposed to ethanol." *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 1044.
97. Chen, S.; Kimura, K. "Water soluble silver nanoparticles functionalized with thiolate." *Chem. Lett.* **1999** 1169.
98. He, S.; Yao, J.; Jiang, P.; Shi, D.; Zhang, H.; Xie, S.; Pang, S.; Gao, H. "Formation of silver nanoparticles and self-assembled two-dimensional ordered superlattice." *Langmuir* **2001**, *17*, 1571.
99. Brause, R.; Moeltgen, H.; Kleinermanns, K. "Characterization of laser-ablated and chemically reduced silver colloids in aqueous solution by UV/VIS spectroscopy and STM/SEM microscopy." *Appl. Phys. B: Lasers Opt.* **2002**, *75*, 711.
100. Mock, J. J.; Barbic, M.; Smith, D. R.; Schultz, D. A.; Schultz, S. "Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles." *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, 6755.
101. Sosa, I. O.; Noguez, C.; Barrera, R. G. "Optical Properties of Metal Nanoparticles with Arbitrary Shapes." *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 6269.
102. Treguer, M.; Rocco, F.; Lelong, G.; Le Nestour, A.; Cardinal, T.; Maali, A.; Lounis, B. "Fluorescent silver oligomeric clusters and colloidal particles." *Solid State Sci.* **2005**, *7*, 812.

Referencias

103. Spendelow, J. S.; Wieckowski, A. "Electrocatalysis of oxygen reduction and small alcohol oxidation in alkaline media." *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 2654.
104. Eckardt, M. J.; File, S. E.; Gessa, G. L.; Grant, K. A.; Guerri, C.; Hoffman, P. L.; Kalant, H.; Koob, G. F.; Li, T. K.; Tabakoff, B. "Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system." *Alcohol Clin Exp Res* **1998**, *22*, 998.
105. Kamitaka, Y.; Tsujimura, S.; Setoyama, N.; Kajino, T.; Kano, K. "Fructose/dioxygen biofuel cell based on direct electron transfer-type bioelectrocatalysis." *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 1793.
106. Cracknell, J. A.; Vincent, K. A.; Armstrong, F. A. "Enzymes as Working or Inspirational Electrocatalysts for Fuel Cells and Electrolysis." *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **2008**, *108*, 2439.
107. Hagen, J.; Socaciu, L. D.; Le Roux, J.; Popolan, D.; Bernhardt, T. M.; Woeste, L.; Mitric, R.; Noack, H.; Bonacic-Koutecky, V. "Cooperative Effects in the Activation of Molecular Oxygen by Anionic Silver Clusters." *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3442.
108. Chatterjee, M.; Chatterjee, A.; Ghosh, S.; Basumallick, I. "Electro-oxidation of ethanol and ethylene glycol on carbon-supported nano-Pt and -PtRu catalyst in acid solution." *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 7299.
109. Topcagic, S.; Minter, S. D. "Development of a membraneless ethanol/oxygen biofuel cell." *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 2168.
110. Gouveia-Caridade, C.; Pauliukaite, R.; Brett, C. M. A. "Development of electrochemical oxidase biosensors based on carbon nanotube-modified carbon film electrodes for glucose and ethanol." *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 6732.
111. Zhou, Z.; Sun, X.; Kang, Y. J. "Ethanol-induced apoptosis in mouse liver: Fas- and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway." *Am J Pathol* **2001**, *159*, 329.
112. Ieraci, A.; Herrera, D. G. "Nicotinamide protects against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing mouse brain." *PLoS Med.* **2006**, *3*, 547.
113. Harper, C. "The neurotoxicity of alcohol." *Hum. Exp. Toxicol.* **2007**, *26*, 251.
114. Kohler, C.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. "Evaluation of caspase activity in apoptotic cells." *J. Immunol. Methods* **2002**, *265*, 97.
115. Komati, H.; Naro, F.; Mebarek, S.; De Arcangelis, V.; Adamo, S.; Lagarde, M.; Prigent, A.; Nemoz, G. "Phospholipase D is involved in myogenic differentiation through remodeling of actin cytoskeleton." *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 1232.

Referencias

116. Han,D.; Hanawa,N.; Saberi,B.; Kaplowitz,N. "Hydrogen peroxide and redox modulation sensitize primary mouse hepatocytes to TNF-induced apoptosis." *Free Radical Biol. Med.* **2006**, *41*, 627.
117. Kandel,E. R.; Schwartz,J. H.; Jessell,T. M. *Principles of Neural Science, 4th ed.* McGraw-Hill: New York, 2000; p 126-127.
118. Bockris,J. O.; Reddy,A. K. N. *Modern Electrochemistry 2B*; Kluwer Academic: New York, 2000; p 1967.
119. Ledo,A.; Martinez,F.; Lopez-Quintela,M. A.; Rivas,J. "Synthesis of Ag clusters in microemulsions: A time-resolved UV-vis and fluorescence spectroscopy study." *Phys. B (Amsterdam, Neth.)* **2007**, *398*, 273.
120. Moriarty-Craige,S. E.; Jones,D. P. "Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism." *Annu. Rev. Nutr.* **2004**, *24*, 481.
121. Martinovich,G. G.; Cherenkevich,S. N.; Sauer,H. "Intracellular redox state: towards quantitative description." *Eur. Biophys. J.* **2005**, *34*, 937.
122. Clarke,R. J. "The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection" *Adv Colloid Interface Sci* **2001**, *89-90*, 263.
123. Kennedy,A. J.; Hull,M. S.; Bednar,A. J.; Goss,J. D.; Gunter,J. C.; Bouldin,J. L.; Vikesland,P. J.; Steevens,J. A. "Fractionating Nanosilver: Importance for Determining Toxicity to Aquatic Test Organisms" *Environmental Science & Technology* **2010**, *44*, 9571.
124. Day,J. R. A.; Underwood,A. L. *Quantitative Analysis*; Prentice Hall: 1989; p 5th Ed.
125. Pasquale,M. A.; Marchiano,S. L.; Bolzan,A. E.; Arvia,A. J. "Influence of agarose on the electrochemical behaviour of the silver and platinum aqueous acid electrolyte interface." *J. Appl. Electrochem.* **2003**, *33*, 431.
126. Basu,D.; Basu,S. "Synthesis, characterization and application of platinum based bi-metallic catalysts for direct glucose alkaline fuel cell." *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 6106.
127. Davis,F.; Higson,S. P. J. "Biofuel cells-Recent advances and applications." *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1224.
128. Panizza,M. "Importance of Electrode Material in the Electrochemical Treatment of Wastewater Containing Organic Pollutants" *Electrochemistry for the Environment* **2010** 25.
129. Arena,M. P.; Porter,M. D.; Fritz,J. S.; Mudgett,P.; Rutz,J.; Schultz,J. "32nd International Conference on Environmental Systems" *San Antonio, TX 2002*, SAE Technical Paper #2002-01-2535,

Referencias

130. Hill, A. A.; Lipert, R. J.; Porter, M. D. "Determination of colloidal and dissolved silver in water samples using colorimetric solid-phase extraction." *Talanta* **2010**, *80*, 1606.
131. Azimi, G.; Zolgharnein, J.; Sangi, M. R.; Ebrahimi, S. "Solid phase selective and extractive preconcentration of silver ion from aqueous samples on modified silica gel with 5-(4-dimethylaminobenzylidene)-rhodanine; prepared by sol-gel method." *Anal. Sci.* **2009**, *25*, 711.
132. Anonymous *CRC Handbook of Chemistry and Physics. 90th Edition*; CRC Press: 2010;
133. Rodríguez Cobo, E. "TESIS DOCTORAL En Preparacion. Dirigida Por El Profesor Manuel Arturo López Quintela".
134. Shichibu, Y.; Negishi, Y.; Tsunoyama, H.; Kanehara, M.; Teranishi, T.; Tsukuda, T. "Extremely high stability of glutathionate-protected Au₂₅ clusters against core etching." *Small* **2007**, *3*, 835.
135. Huda, M. N.; Ray, A. K. "Electronic structures and magic numbers of small silver clusters: A many-body perturbation-theoretic study." *Phys. Rev. A: At., Mol., Opt. Phys.* **2003**, *67*, 013201/1.
136. Chaudhuri, K. D. "Concentration quenching of fluorescence in solutions." *Z. Phys.* **1959**, *154*, 34.
137. Xiong, Y.; Washio, I.; Chen, J.; Sadilek, M.; Xia, Y. "Trimeric clusters of silver in aqueous AgNO₃ solutions and their role as nuclei in forming triangular nanoplates of silver." *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 4917.
138. Liang, Y. Q.; Cui, Z. D.; Zhu, S. L.; Liu, Y.; Yang, X. J. "Silver nanoparticles supported on TiO₂ nanotubes as active catalysts for ethanol oxidation." *J. Catal.* **2011**, *278*, 276.
139. Caballero, A.; Despagnet-Ayoub, E.; Mar Diaz-Requejo, M.; Diaz-Rodriguez, A.; Gonzalez-Nunez, M. E.; Mello, R.; Munoz, B. K.; Ojo, W.; Asensio, G.; Etienne, M.; Perez, P. J. "Silver-Catalyzed C-C Bond Formation Between Methane and Ethyl Diazoacetate in Supercritical CO₂." *Science (Washington, DC, U. S.)* **2011**, *332*, 835.
140. Darzynkiewicz, Z.; Traganos, F.; Sharpless, T.; Melamed, M. R. "Effect of 0.25 N sodium chloride treatment on DNA denaturation in situ in thymus lymphocytes." *Exp. Cell Res.* **1976**, *100*, 393.