

Tesis Doctoral

Uso de matrices nanoporosas como molde para la síntesis de nanopartículas/clusters metálicos. Aplicaciones a sensores y catálisis

Peinetti, Ana Sol

2016-12-21

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Peinetti, Ana Sol. (2016-12-21). Uso de matrices nanoporosas como molde para la síntesis de nanopartículas/clusters metálicos. Aplicaciones a sensores y catálisis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Peinetti, Ana Sol. "Uso de matrices nanoporosas como molde para la síntesis de nanopartículas/clusters metálicos. Aplicaciones a sensores y catálisis". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-12-21.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

Uso de matrices nanoporosas como molde para la síntesis de nanopartículas/clusters metálicos. Aplicaciones a sensores y catálisis

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Inorgánica, Química Analítica y Química Física.

Ana Sol Peinetti

Directores de Tesis:

Dr. Fernando Battaglini
Dra. Graciela Alicia González

Consejero de Estudios:

Dr. Matías Jobaggy

Lugar de trabajo:

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física -INQUIMAE

Fecha de defensa:

Buenos Aires, 2016

Uso de matrices nanoporosas como molde para la síntesis de nanopartículas/clusters metálicos. Aplicaciones a sensores y catálisis

El control del tamaño y el entorno de nanopartículas cumplen un rol fundamental en sus propiedades. Se han utilizado diversas técnicas para su síntesis y en su mayoría es necesaria la adición de especies estabilizantes para controlar el tamaño y evitar su aglomeración. La presencia de estas moléculas puede resultar un inconveniente para su posterior modificación y afectar su funcionalidad. En este trabajo se presenta un método de síntesis basado en pulsos de corriente para la generación de nanopartículas (NPs) de oro, platino y níquel, dentro de una matriz nanoporosa de alúmina. El método permite la generación de NPs de diferentes metales con superficies activas, presentando una excelente respuesta a los procesos de transferencia de carga, ejemplificados con la respuesta electroquímica de diferentes especies, en particular, ferrocianuro. Se ha obtenido un control del tamaño de las nanopartículas y de las características del sistema a través del uso de nanoporos de distintos tamaños, distinta corriente de electrodeposición y de diferentes precursores del metal; permitiendo la obtención de nanopartículas pequeñas (2-10nm de diámetro) y clusters atómicos metálicos. Se ha logrado optimizar las condiciones para preparar materiales con la funcionalidad deseada.

Estas nanopartículas confinadas en una matriz porosa actúan como un arreglo de nanoelectrodos. Para lograr una descripción completa de la respuesta electroquímica de estos sistemas, se ha desarrollado un modelo bidimensional para simular su comportamiento, el cual permite entender las diferentes respuestas obtenidas por voltametría cíclica dependiendo de las características geométricas del sistema y la velocidad de barrido. Este modelo puede extenderse a distintos arreglos de micro y nanoelectrodos, como se demuestra en el trabajo.

Los clusters metálicos formados por menos de 100 átomos presentan interesantes propiedades, diferentes a las nanopartículas, que los hacen muy buenos candidatos para aplicaciones en catálisis. Se analiza la capacidad catalítica de los clusters de Ni y Au obtenidos, evaluándola a partir de la reacción de reducción de 4-nitrofenol y azul de metileno. Se obtuvieron valores de constantes de velocidad de pseudo-primer orden mayores a las reportadas para NPs sintetizadas en fase homogénea.

Por otro lado, las nanopartículas de oro electrogeneradas en los nanoporos de alúmina con un tamaño controlado de 2nm fueron modificadas con aptámeros para la detección libre de marcadores, de moléculas pequeñas de relevancia biológica por espectroscopía de impedancia. Los resultados muestran que el uso de una superficie conductora confinada dentro de un entorno aislante puede ser muy sensible a cambios conformacionales de aptámeros, introduciendo un nuevo enfoque para la detección de moléculas pequeñas ejemplificada en este trabajo por la detección directa y selectiva de adenosina monofosfato en la escala nanomolar. Este trabajo demuestra las ventajas de controlar la arquitectura en la escala nanométrica para obtener una sensibilidad adecuada.

Palabras claves: nanopartículas metálicas – clusters atómicos – matriz porosa – arreglo de nanoelectrodos – catálisis – aptámeros – sensores

Nanoporous matrices as a template for the synthesis of metallic nanoparticles/clusters. Applications to sensors and catalysis.

Nanoparticles properties are determined by their size and environment. Different techniques have been used for their synthesis, most of them introduce a capping agent to avoid the agglomeration of nanoparticles and to control size. However, the presence of these molecules can be inconvenient for further modification and can affect their functionality. The synthesis of metal nanoparticles (Au, Ni, Pt) by pulsed galvanostatic electrodeposition on nanoporous alumina is presented here. The method allows the production of different metal nanoparticles with active uncapped surfaces. They present efficient electron transfer processes, exemplified here by the electrochemical response of different species, in particular ferrocyanide. The NPs size and the system features can be controlled through the nanoporous diameter, the electrodeposition current and different metal precursors; obtaining small nanoparticles (from 2 to 10 nm diameter) and atomic metal clusters. Optimal conditions can be achieved to obtain materials with the desired functionality.

These nanoparticles, confined in a porous matrix, work as a nanoelectrode array. For a complete description of the electrochemical response of these systems, a two-dimensional model was developed to simulate their behavior. This model allows understanding the different responses obtained by cyclic voltammetry depending on the geometric properties of the system and the scan rate. The obtained results can be extended to different micro and nanoarrays, as it is demonstrated in this work.

Metallic cluster, consisting of less than 100 atoms, present interesting properties that differ from those of nanoparticles and make them good candidates for catalytic applications. The catalytic capabilities of Ni and Au clusters are analyzed through the reduction reaction of 4-nitrophenol and methylene blue. The obtained values of pseudo first rate constants are higher than those reported for NPs synthesized in homogeneous phase.

As model system, gold nanoparticles electrogenerated in the alumina cavities with a controlled size (2 nm) are easily modified with a thiol-containing aptamer for the label-free detection of small molecules by electrochemical impedance spectroscopy. Our results show that the use of a confined electrical conducting surface inside an insulating environment can be very sensitive to the aptamer conformational changes, introducing a new approach to the detection of small molecules exemplified here by the direct and selective detection of adenosine monophosphate at nanomolar concentrations. This work demonstrates the advantages of this novel nanometer scale architecture for signal enhancing.

Keywords: metallic nanoparticles – atomic cluster – porous matrix – nanoelectrodes array – catalysis – aptamer – sensors

A mis Padres

Los resultados que se presentan en este trabajo de tesis han sido parcialmente publicados en:

Publicaciones

Numerical simulation of the diffusion processes in nanoelectrode arrays using an Axial Neighbor Symmetry Approximation

A. S. Peinetti, R. S. Gilardoni, M. Mizrahi, F. G. Requejo, G. A. González, F. Battaglini
Analytical Chemistry, 88, 5752, 2016 - DOI: 10.1021/acs.analchem.6b00039

Confined gold nanoparticles enhance the detection of small molecules in label-free impedance aptasensors

A. S. Peinetti, H. Ceretti, M. Mizrahi, G. A. González, S. A. Ramírez, F. Requejo, J. M. Montserrat, F. Battaglini
Nanoscale, 7, 7763, 2015 - DOI: 10.1039/C5NR01429H

Synthesis of atomic metal clusters on nanoporous alumina

A.S. Peinetti, S. Herrera, G.A. González, F. Battaglini
Chemical Communications, 49, 11317, 2013 – DOI: 10.1039/c3cc47170e

Publicaciones en preparación

Confined Gold Nanoparticles as Transduction Element in DNA-Based Sensors

A. S. Peinetti, H. Ceretti, M. Mizrahi, G. A. González, S. A. Ramírez, F. G. Requejo, J. M. Montserrat, F. Battaglini

Controlled synthesis of capping-free Ni nanoclusters. Its further growth and catalytic behavior

A. S. Peinetti, M. Mizrahi, M. Cuevas, G. A. González, F. Requejo, D. Buceta, M.A. Lopez-Quintela, F. Battaglini

Índice General

Capítulo 1: Introducción	1
1.1. Motivación	3
1.2. Antecedentes/Estado del arte.....	4
1.2.1. Nanomateriales: nanopartículas vs clusters atómicos	4
1.2.2. Sistemas porosos.....	10
1.2.2.1. Anodizado de aluminio.....	10
1.2.2.2. Generación de nanoestructuras en alúmina porosa	13
1.2.3. Arreglos de nanoelectrodos.....	15
1.2.4. Biosensores.....	19
1.3. Estructura de este trabajo de tesis	22
Referencias	24
Capítulo 2: Métodos	29
2.1. Introducción	31
2.2 Métodos de caracterización	31
2.2.1. Técnicas electroquímicas.....	31
2.2.1.1. Conceptos generales.....	31
2.2.1.2. Transporte de masa	32
2.2.1.3. Medidas electroquímicas.....	34
2.2.1.4. Voltametría cíclica (CV)	34
2.2.1.5. Voltametría de onda cuadrada (SWV)	39
2.2.1.6. Espectroscopía electroquímica de impedancia (EIS)	42
2.2.1.7. Instrumentación.....	46
2.2.2. Técnicas de adsorción de rayos X (XAS).....	47
2.2.2.1. Conceptos básicos	48
2.2.2.2. XANES (<i>X-ray absorption near edge structure</i>).....	50
2.2.2.3. EXAFS (<i>extended X-ray absorption fine structure</i>).....	50
2.2.2.4. Instrumentación.....	52
2.2.3. Microbalanza de Cristal de Cuarzo con Disipación (QCM-D).....	52
2.2.3.1. Instrumentación.....	54
2.2.4. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	54
2.2.4.1. Instrumentación.....	56

2.2.5. Microscopía electrónica.....	56
2.2.4.1. Instrumentación.....	57
2.2.6. Focus Ion Beam (FIB).....	57
2.2.6.1. Instrumentación.....	58
2.2.7. Espectroscopía UV-vis.....	58
2.3. Modelo numérico.....	58
2.3.1. Método de elementos finitos	59
Referencias	62

Capítulo 3: Síntesis y caracterización de nanopartículas y clusters metálicos (Al/Al₂O₃/Me)..... 65

3.1. Introducción	67
3.2. Experimental	69
3.2.1. Materiales.....	69
3.2.2. Anodizado de aluminio.....	69
3.2.3. Electrodeposición de metales	70
3.2.4. Suspensión de partículas metálicas.....	70
3.2.5. Medidas electroquímicas - Voltametría cíclica (CV).....	70
3.2.6. Micrografía.....	71
3.2.6.1. SEM.....	71
3.2.6.2. Microscopía Dual-Beam o FIB (Focus Ion Beam).....	71
3.2.6.3. HR-TEM.....	71
3.2.7. Técnicas de absorción de rayos X.....	71
3.2.8. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).....	72
3.2.9. Espectroscopía UV-vis y fluorescencia.....	72
3.3. Resultados y discusión	72
3.3.1. Anodizado de aluminio - Al/Al ₂ O ₃	72
3.3.2. Electrodeposición de metales - Al/Al ₂ O ₃ /Me	75
3.3.2.1. Al/Al ₂ O ₃ /Ni	76
3.3.2.1.1. Síntesis y Caracterización	76
3.3.2.1.2. Efecto de los parámetros de síntesis.....	82
3.3.2.1.2.1. Efecto del tamaño de poro	82
3.3.2.1.2.2. Efecto de la corriente de deposición.....	83
3.3.2.2. Al/Al ₂ O ₃ /Au	87
3.3.2.2.1. Síntesis y Caracterización	87
3.3.2.2.2. Efecto de los parámetros de síntesis.....	91

3.3.2.2.2.1. Efecto del tamaño del poro.....	91
3.3.2.2.2.2. Efecto de la corriente de deposición.....	92
3.3.2.2.2.3. Efecto del precursor de Au	93
3.3.2.3. Al/Al ₂ O ₃ /Pt.....	95
3.3.3. Comportamiento Au vs Ni: Nucleación y crecimiento	97
3.4. Sumario.....	100
Referencias	101
Capítulo 4: Arreglo de micro y nanoelectrodos - Modelo numérico.....	105
4. 1. Introducción	107
4.2. Modelo matemático	109
4.2.1 Descripción del sistema de ecuaciones.....	109
4.2.2. Arreglo geométrico.....	111
4.2.2.1. Descripción del modelo DDA.....	111
4.2.2.1. Descripción del modelo ANSA.....	113
4.2.3. Descripción de arreglos de nano y microelectrodos	115
4.2.3.1. Arreglos A y B.....	116
4.2.3.2. Arreglo C.....	116
4.2.3.3. Arreglos D y E.....	117
4.2.4. Parámetros de la simulación	117
4.3. Resultados y discusión	118
4.3.1. Validación del modelo.....	119
4.3.1.1. Arreglos A y B: Caso 2.....	119
4.3.1.2. Arreglo C: Caso 3.....	122
4.3.1.3. Arreglos D y E: Caso 4 con transiciones al caso 2 y 3	123
4.3.2. Efecto del radio del electrodo	126
4.3.3. Efecto de la velocidad de barrido	127
4.3.4. Efecto de la profundidad del poro.....	128
4.3.5. Estudio de los sistemas de nanopartículas/clusters metálicos dentro de alúmina porosa	129
4.4. Sumario.....	132
Referencias	134
Capítulo 5: Desarrollo de un aptasensor impedimétrico libre de marcadores para la detección de moléculas pequeñas	137
5.1. Introducción.....	139

5. 2. Experimental.....	143
5.2.1. Secuencias de oligonucleótidos.....	143
5.2.1. Síntesis de alúmina nanoporosa y AuNPs.....	143
5.2.3. Modificación de la superficie de las AuNPs.....	144
5.2.4. Técnicas de rayos-X.....	144
5.2.5. Medidas electroquímicas.....	145
5.3. Resultados y discusión.....	145
5.3.1. Caracterización del sistema Al/Al ₂ O ₃ /Au.....	145
5.3.2. Adsorción del aptámero en la superficie de AuNPs. Diferentes métodos de inmovilización.....	147
5.3.3. Comparación con Au macizo.....	156
5.3.4. Desarrollo de un aptasensor para la detección de moléculas pequeñas. Estudio de parámetros analíticos.....	157
5.3.5. Desarrollo como genosensor.....	161
5.4. Sumario.....	162
Referencias.....	164
Capítulo 6: Aplicaciones de los sistemas Al/Al₂O₃/Me en catálisis.....	169
6.1. Introducción.....	171
6.2. Experimental.....	173
6.2.1. Reducción química de azul de metileno.....	173
6.2.2. Reducción química de 4-nitrofenol.....	174
6.2.3. Reducción electroquímica.....	174
6.3. Resultados y discusión.....	175
6.3.1. Reducción química.....	175
6.3.1.1. Catálisis de reducción de azul de metileno.....	175
6.3.1.2. Catálisis de reducción de 4-nitrofenol.....	181
6.3.2. Reducción electroquímica.....	184
6.4. Sumario.....	186
Referencias.....	187
Capítulo 7: Discusión y conclusiones generales.....	191
7.1. Discusión y conclusiones.....	193
Referencias.....	200
Agradecimientos.....	203

Capítulo 1: Introducción

1.1. Motivación

El objetivo de este trabajo de tesis es la generación de nanopartículas metálicas en sistemas confinados por medios electroquímicos. Una de las ventajas de las nanopartículas sintetizadas de esta manera es que se encuentran libres de ligandos, facilitando de este modo su uso como arreglo de nanoelectrodos, sensores y elementos catalíticos.

En este sentido, el confinamiento de nanopartículas en una matriz porosa presenta grandes ventajas, como se discutirá a lo largo de todo este trabajo de tesis. En particular, se pensó en alúmina nanoporosa como una matriz adecuada, principalmente, por la simplicidad en su fabricación y el control en los parámetros geométricos que puede alcanzarse variando las condiciones experimentales. Mientras que la elección de la síntesis de nanopartículas metálicas a partir de la electrodeposición pulsada permite la generación de nanopartículas autosoportadas, con superficies activas (sin necesidad de agentes estabilizantes que la recubran) y con un control preciso de su crecimiento respecto a la síntesis vía reductores químicos en solución.

Se espera así que sus superficies puedan modificarse fácilmente a partir de diferentes estrategias, como el autoensamblado de tioles,¹ la modificación a partir de polielectrolitos² (por ejemplo, ensamblados capa por capa) o modificaciones formando enlaces covalentes.³ Por otro lado, se espera que los sistemas porosos generen selectividad por tamaño y por carga. Si pensamos en biomoléculas, como por ejemplo proteínas que pueden llegar a tener radios de 4-6nm, la síntesis de poros del orden de los 10nm de diámetro puede introducir este tipo de selectividad. Por otro lado, el confinamiento de biomoléculas en estas estructuras puede permitir obtener una gran sensibilidad a sus posibles cambios conformacionales, como se discutirá posteriormente. Finalmente, se buscará preservar las propiedades particulares que caracterizan a las partículas en la nanoescala.

1.2. Antecedentes/Estado del arte

1.2.1. Nanomateriales: nanopartículas vs clusters atómicos

La química de los nanomateriales trata un rango de materiales que se encuentran en un borde difuso entre átomos individuales y moléculas, definidos por la mecánica cuántica, y estructuras macroscópicas cuyas propiedades son el resultado del comportamiento colectivo de un gran número de átomos. Estos materiales en la nanoscala resultan particularmente interesantes porque presentan propiedades electrónicas, ópticas, magnéticas y químicas diferentes a los casos límites señalados y, más aún, éstas dependen fuertemente del número de átomos que las componen. Recién en la década del 80 su estudio adquiere gran relevancia, ya que se desarrollan métodos instrumentales con resolución adecuada que permitieron manipularlos y caracterizarlos.^{4,5} Lo que además ha permitido avanzar en la síntesis de estos nanomateriales de una manera reproducible y con un gran control.

El tamaño es, entonces, un nuevo parámetro que permite cambiar las propiedades de la materia y, por lo tanto, expande el potencial de la química en una nueva dimensión.⁶ Existen, principalmente, dos razones que hacen que los nanomateriales presenten propiedades diferentes a los materiales macizos. Por un lado, los efectos de superficie y, por el otro, los efectos de confinamiento cuántico.

Los efectos de superficie están relacionados con el hecho de que los átomos en la superficie tienen un número de coordinación menor que los átomos en el seno del material. Esto hace que sean más reactivos. Las propiedades relacionadas con este efecto, cambian suavemente de acuerdo a la fracción de átomos de la superficie. Para una esfera, esta fracción de átomos escala con la inversa del radio, r , y por lo tanto, con $N^{-1/3}$ siendo N igual al número total de átomos. Lo mismo ocurre con otras formas como cubos o cilindros. En la Figura 1. 1 se muestra la evolución de la fracción de átomos en la superficie, denominada por algunos autores como dispersión, con $N^{1/3}$ para un cluster cúbico.⁶ Luego, todas las propiedades que dependan de esta fracción de átomos mostrarán un comportamiento lineal al graficarlas respecto a $N^{-1/3}$ o r^{-1} , *e.g.* punto de fusión. Llamaremos **nanopartículas** a aquellas partículas de metal masivo que presenten dimensiones nanométricas y cuyas propiedades estén determinadas por su relación superficie-volumen.

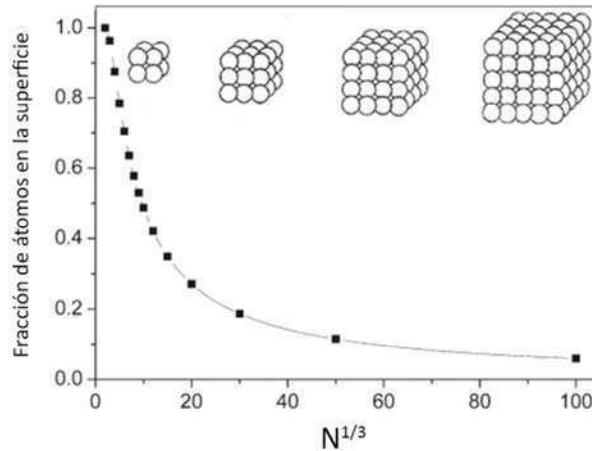


Figura 1. 1. Evolución de la fracción de átomos en la superficie con $N^{1/3}$ para un cluster cúbico. Adaptado de Ref 4

Por otro lado, cuando las partículas son muy pequeñas, los efectos de confinamiento cuántico se hacen importantes y son los que dominan el comportamiento. Estas partículas reciben el nombre de **clusters atómicos metálicos** y se definen como un conjunto de átomos (típicamente menos de 100-200 átomos) que presentan una composición bien definida y una o algunas estructuras estables.^{7,8}

En la Figura 1. 2, se muestra un esquema de la densidad de estados en función del tamaño. Cada uno de los N átomos que forman la partícula contribuye con sus estados atómicos a una banda cuya densidad de estados aumenta a medida que el número de átomos es mayor; siendo un continuo en el caso del material macizo y reduciéndose drásticamente a estados localizados para un número limitado de átomos. Así una de las características de los clusters atómicos, que los diferencian de las nanopartículas, es que presentan orbitales moleculares localizados en lugar de bandas y el band gap puede hacerse muy grande recordando a la diferencia HOMO-LUMO en una molécula.⁶

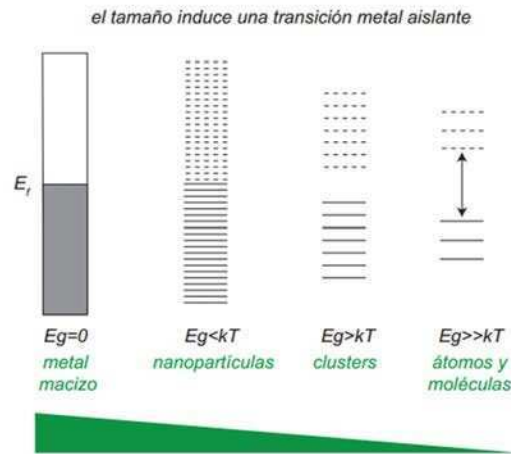


Figura 1. 2. Evolución de la densidad de estados y el band gap a medida que aumenta el número de átomos del sistema. Adaptado de la Ref 6.

Tanto las propiedades ópticas y eléctricas como la química de las partículas cambian al disminuir el tamaño de nanopartícula a cluster y se hacen fuertemente dependientes del número de átomos que forman la partícula. La aparición de un band gap en el caso de los clusters genera un cambio en las propiedades eléctricas, dejando de tener un comportamiento metálico y acercándose a un semiconductor. En cuanto a las propiedades ópticas, las nanopartículas presentan un plasmón superficial localizado que puede describirse a partir de la teoría de Mie utilizando las ecuaciones de Maxwells para describir la interacción de la luz con las partículas metálicas. El plasmón superficial está asociado con la oscilación colectiva de los electrones de conducción del núcleo del metal. Se ha mostrado que la posición de este plasmón es dependiente de la forma y el tamaño de las nanopartículas.⁹ Por otro lado, en el caso de los clusters éstos no presentan una banda plasmónica, sino que los efectos de confinamiento cuánticos predicen estados localizados. Dependiendo si son clusters grandes (de 10-20 átomos a 100-200 átomos) o pequeños (de 2 a 10-20 átomos), estos muestran dos comportamientos diferentes: un decrecimiento continuo de la banda de absorción con algunas picos poco marcados, de manera similar a los semiconductores, en el caso de los clusters grandes; o bandas de absorción bien definidas que recuerda el comportamiento de moléculas y que se comportan como aislantes, en el caso de los clusters pequeños.

Es importante remarcar que la división en nanopartículas, clusters grandes y clusters pequeños, está dada por el cambio en sus propiedades. Así, si bien es difícil establecer un límite estricto en cuanto a su tamaño, se puede establecer como criterio que

las nanopartículas metálicas que presentan un plasmón superficial, tienen un tamaño mayor a 2nm de diámetro. Por otro lado, los clusters grandes suelen tener diámetros entre 1-2nm y se caracterizan por una pérdida del plasmón superficial si bien presentan conducción eléctrica. Finalmente, los clusters pequeños, con un comportamiento tipo molécula, son aquellos que presentan tamaños inferiores a 1nm.⁸

Si bien la estructura electrónica de los clusters atómicos es difícil de obtener por cálculos precisos cuando estos exceden algunos pocos átomos, se ha hecho un esfuerzo por entender y predecir sus propiedades, y la estabilidad particular que presentan clusters formados por cierto número de átomos. Una de las teorías que surgen en este contexto, es la teoría del superátomo,^{10,11} la cual considera a los clusters como átomos gigantes que siguen las mismas reglas que los átomos en general. Esta teoría se desarrolló para clusters metálicos en fase gaseosa y luego se extendió para clusters en suspensión, y está soportada en evidencia experimental y teórica que muestra que los clusters metálicos presentan un comportamiento respecto a su potencial de ionización y afinidad electrónica igual a la de los elementos (Figura 1. 3, A).¹² Esta teoría considera válido el modelo de Jellium, según el cual, las cargas positivas se distribuyen en una esfera. Es decir, el clúster real es sustituido por una estructura que consiste en una esfera de Jellium uniforme y cargada positivamente rodeada de electrones de valencia. Estos electrones se mueven en un campo de potencial medio ocupando niveles de acuerdo al principio de Aufbau ($1S^2 | 1P^6 | 1D^{10} | 2S^2 1F^{14} | 2P^6 1G^{18} | \dots$) (Figura 1. 3, B), donde las líneas corresponden a clusters con un número de átomos que presentan configuraciones de capas cerradas con una diferencia HOMO-LUMO muy grande, lo cual estabiliza la estructura superatómica (Figura 1. 3, C). Siguiendo esta regla, se obtienen capas cerradas para ciertos números de átomos (2, 8, 18, 20, 34, 40, 58, 94, 138...), y usualmente, se refiere a ellos como números mágicos. Además de esta estabilidad por capa electrónica cerrada, hay una estabilidad adicional que corresponde a capas geométricas cerradas.¹² Dependiendo de la forma, *e.g.* cúbica, tetraédrica, octaédrica o icosaédrica, se requieren cierto número de átomos para formar una capa geométrica cerrada. El número de átomos necesarios para formar una estructura icosaédrica cerrada está determinado por la serie de Mackay¹³ y corresponden a 1, 13, 55, 147, 309, 561, ... átomos.

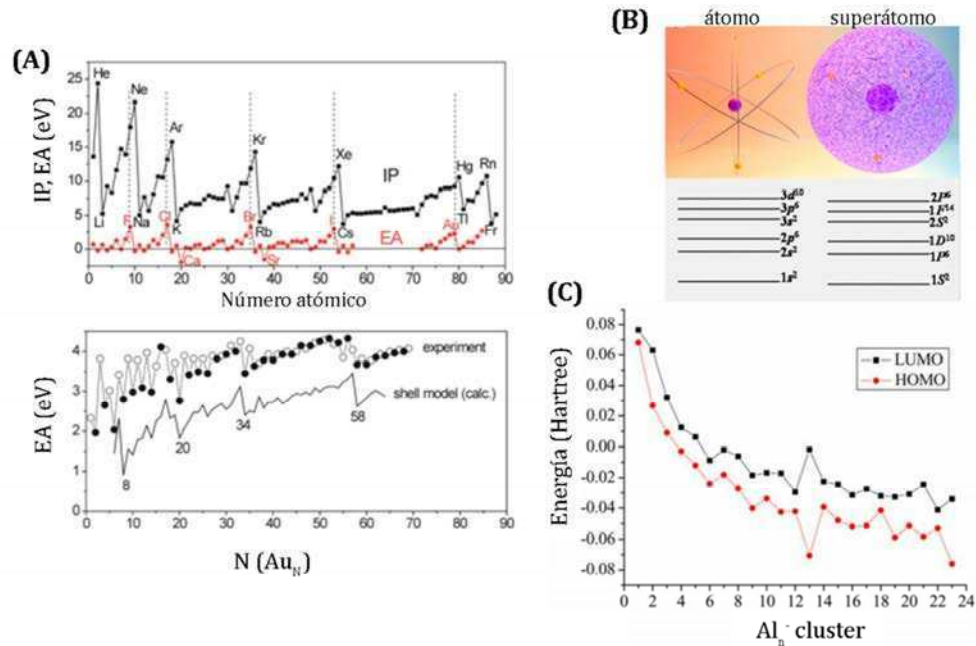


Figura 1.3. A) Potencial de ionización y afinidad electrónica de los elementos (arriba) en comparación con los valores de afinidad electrónica medidos (círculos) y calculados con el modelo de capas (línea) en función del tamaño para Au₁₋₇₀ (abajo). B) Esquema de los orbitales de un átomo y sus análogos en un superátomo. C) Gráfico teórico de la energía asociada con el HOMO y LUMO de clusters de Al_n en función del tamaño. Adaptados de las Ref 6 y 12.

La síntesis de estos clusters metálicos es uno de los retos de la nanotecnología hoy en día.⁸ En general, los métodos utilizados se llevan a cabo en fase acuosa controlando diferentes variables experimentales como la relación metal-ligando, la estructura química de los agentes protectores, el tipo de agente reductor, condiciones de agitación, temperatura de la reacción, tiempo y pH, entre otras. El método más representativo de los denominados *bottom-up* es el de Brust-Schiffrin (método de dos fases, Figura 1. 4), en el que los precursores metálicos se disuelven en una solución acuosa y se transfieren a una fase orgánica utilizando un agente de transferencia (como bromuro de tetraoctilamonio, TOAB). Luego, se agregan agentes protectores (tioles) y el agente reductor (típicamente NaBH₄) a la fase orgánica, obteniéndose nanoclusters. De esta manera, se han obtenido con éxito clusters protegidos con tioles de Au y otros metales como Ag, Cu y Pt.

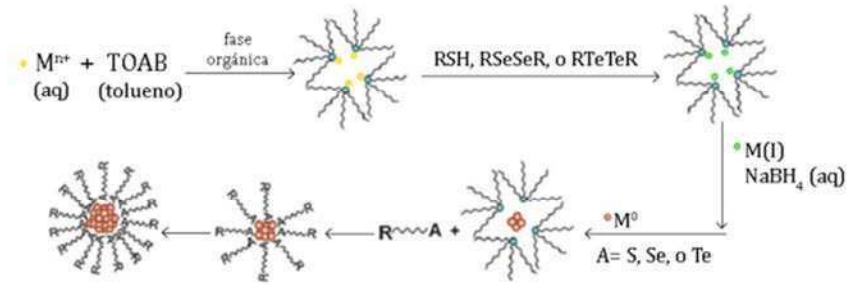


Figura 1. 4. Esquema general de la síntesis de Brust-Schiffrin de dos fases

Una alternativa es el uso de matrices que funcionan como molde permitiendo el control en la forma y tamaño; la mayoría de estos métodos se llevan a cabo en soluciones que utilizan especies de alto peso molecular como polímeros,^{14,15} polielectrolitos,¹⁶ proteínas,¹⁷ dendrímeros¹⁷⁻¹⁹ y DNA²⁰, los cuales limitan el crecimiento y protege a los clusters de la agregación. En la Figura 1. 5 se muestran algunos ejemplos de estos métodos reportados en bibliografía.

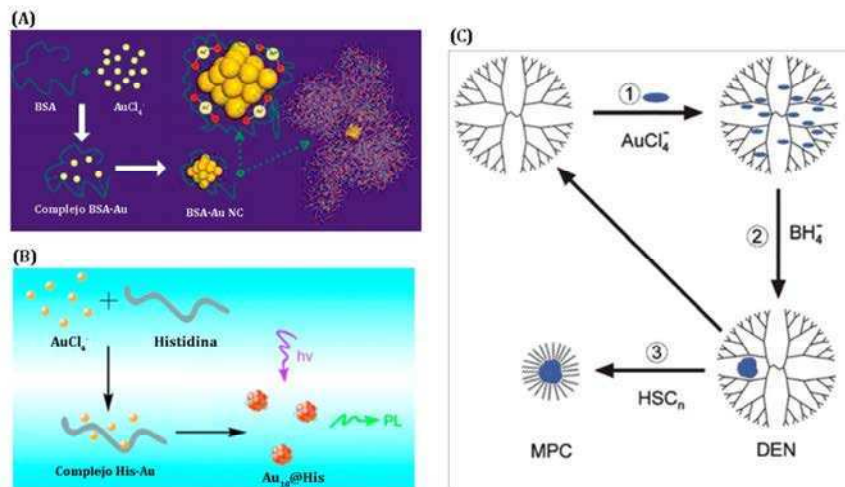


Figura 1. 5. Esquema que representa la síntesis de nanoclusters de Au en fase homogénea, en una solución de la proteína BSA (A-Ref 17), a partir del uso de histidina como molde (B-Ref14) y encapsulados en dendrímeros (C-Ref18)

También se pueden usar métodos electroquímicos para lograr la síntesis de clusters atómicos. El método reportado por Vilar-Vidal *et al*²¹ se basa en el uso de un ánodo de sacrificio como fuente del metal, donde se lleva a cabo una electrólisis en un

solvente orgánico bajo atmósfera de argón, obteniéndose clusters de Cu pequeños.^{21,22} Los métodos electroquímicos presentan ciertas ventajas respecto a los métodos donde se utiliza un reductor químico: son simples, de bajo costo de los reactivos, se utilizan temperaturas moderadas (se llevan a cabo a temperatura ambiente) y el tamaño puede regularse fácilmente ajustando el voltaje, el electrolito, etc.

1.2.2. Sistemas porosos

1.2.2.1. Anodizado de aluminio

En 1857, Buff encuentra que el aluminio puede oxidarse electroquímicamente en una solución acuosa para formar una barrera de óxido mayor a la barrera de óxido nativa que se forma en contacto con el aire.²³ Este proceso recibe el nombre de anodizado debido a que el aluminio forma el ánodo de la celda electrolítica. A principios de 1920, este fenómeno comienza a ser explotado para aplicaciones industriales, por ejemplo como protector para evitar la corrosión de metales. En la década de los 90s, este proceso adquiere relevancia en el ambiente científico, específicamente, en el campo de la nanotecnología, a partir de los trabajos de Masuda y colaboradores quienes reportaron en 1995 el auto-ordenamiento en poros de óxido de aluminio anodizado (AAO, por sus siglas en inglés) y desarrollaron el proceso de anodizado en dos pasos.^{24,25}

En general, las películas de óxido de aluminio anodizado se pueden formar con dos morfologías diferentes: films de óxidos no porosos o porosos; dependiendo principalmente de la naturaleza del electrolito utilizado en el anodizado.²⁶ Si el electrolito es casi neutro (pH 5-7), se forma una capa fina y compacta (no porosa) del óxido. Por el contrario, si se utiliza un electrolito ácido, *e.g.* ácido sulfúrico, oxálico, fosfórico, donde el óxido de aluminio es levemente soluble, el film de AAO que se obtiene es poroso(Figura 1. 6).²⁷

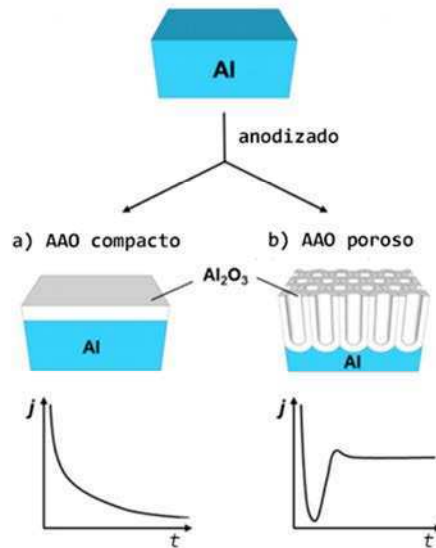


Figura 1. 6. Diferentes tipos de anodizados; utilizando electrolitos a pH 5-7 se obtiene AAO compacto (a) mientras que con electrolitos ácidos se obtiene AAO poroso (b). Abajo se muestran las curvas de densidad de corriente (j) en función del tiempo (t) para cada tipo de anodizado. Adaptado de Ref 26.

En la Figura 1. 7 se muestra cómo varía la corriente durante el tiempo en el que se aplica el potencial constante utilizando un electrolito ácido. Se pueden identificar distintas etapas durante el proceso de anodizado. En la primera etapa (I), la corriente cae abruptamente por la oxidación de la superficie de aluminio, formándose una capa de óxido compacta. En la etapa II, el óxido formado comienza a disolverse en la interfase óxido/electrolito debido al medio ácido. En la etapa III, se alcanza un equilibrio entre estos dos procesos, mientras que en la etapa IV el óxido crece de forma ordenada, generándose los poros regulares.^{26,28}

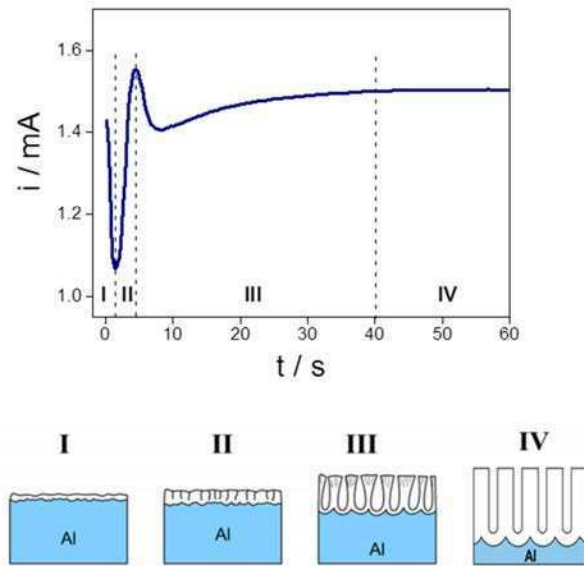


Figura 1. 7. Arriba: Corriente en función del tiempo cuando se realiza el anodizado en H_2SO_4 15%, aplicando 15V. Abajo: Representación de como es el crecimiento de los poros. Adaptado de Ref 26.

La capa de AAO poroso que crece en el aluminio está compuesta por una barrera de óxido fina en contacto con el aluminio; y sobre ella, una capa de óxido poroso, relativamente gruesa, formado por poros paralelos cilíndricos. Cada poro cilíndrico y su región de óxido que lo rodea constituyen una celda hexagonal alineada normal a la superficie del metal. En condiciones específicas, las celdas de óxido se auto-organizan en un arreglo hexagonal compacto, formando una estructura tipo panal.²⁹⁻³¹ En la Figura 1. 8 se muestra un esquema de la estructura de alúmina porosa. Es posible obtener diámetros y densidades de poro en un amplio rango eligiendo las condiciones apropiadas de anodizados; siendo posibles variar los diámetros de poros entre 5-400nm y la densidad de poro entre 10^8-10^{10} poros cm^{-2} .

Típicamente se utilizan tres electrolitos ácidos: H_2SO_4 , $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ y H_3PO_4 . Para cada uno de ellos es posible determinar un rango de potenciales que permite obtener el arreglo de poros. Otros ácidos, como el ácido crómico, bórico, cítrico, pueden emplearse como electrolitos pero el arreglo que se obtiene es menos ordenado.³² Para obtener poros más pequeños entre 6 y 20nm de diámetro se utiliza ácido sulfúrico, siendo 10-25V el rango de potenciales necesario.³³ El ácido oxálico permite generar poros de 25-100nm de diámetro³⁴ usando potenciales entre 30-60V. Partiendo de ácido fosfórico los potenciales usados son mayores (alrededor de 200V), así como también el tamaño de poro (200-500nm) obtenido.³⁵ Por lo tanto, se utilizará durante este trabajo, como electrolito, ácido sulfúrico;

de manera de obtener poros pequeños, en el orden de algunos nanómetros, que generen un ambiente confinado.

Una ventaja importante del anodizado de aluminio es que la estructura geométrica de la alúmina puede controlarse fácilmente a partir del control de las condiciones de anodizado. Los parámetros geométricos que definen el óxido se muestran en la Figura 1. 8 e incluyen el diámetro de poro, D_p , la distancia interporo, d , la densidad de poros, ρ , la profundidad, h , y los espesores de la barrera de óxido, t_b y t_w , que se generan en contacto con el aluminio y en las paredes del poro, respectivamente.

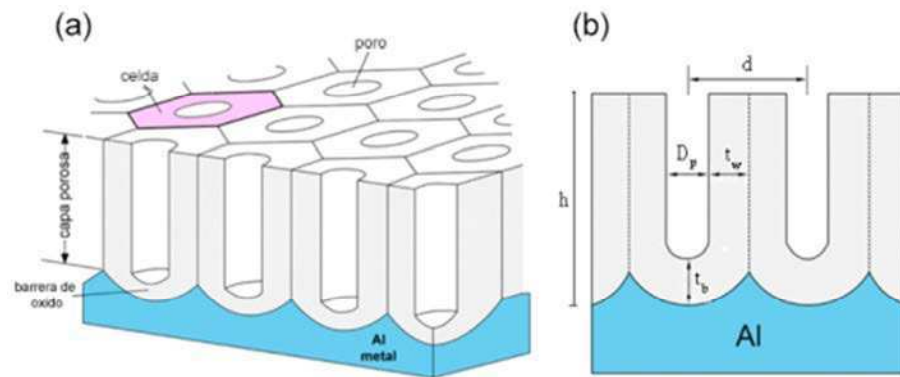


Figura 1. 8. A) Esquema del arreglo de poros cilíndricos que se forman al realiza el anodizado de aluminio. B) Parámetros geométricos que definen el sistema.

1.2.2.2. Generación de nanoestructuras en alúmina porosa

La posibilidad de tener estructuras porosas con características bien definidas ha sido extensamente explotada para sintetizar un gran rango de nanoestructuras metálicas en la forma de nanopartículas, nanocables y nanotubos, y también para desarrollar nanodispositivos funcionales.^{28,36} La síntesis utilizando moldes provee un método robusto para tener un control preciso sobre el tamaño, forma y dirección de crecimiento. Se han reportado numerosos trabajos donde se sintetizan nanoestructuras metálicas dentro de alúmina, principalmente, utilizando dos estrategias. Para la generación de estructuras que llenen todo el poro, como nanocables y nanobarras, se utilizan técnicas de electrodeposición, donde se lleva a cabo la reducción electroquímica a partir de una solución que contiene la sal del precursor metálico. En estos casos, primero se realiza la deposición por evaporación o *sputtering* de una capa delgada metálica de plata, que luego actúa como electrodo de trabajo y contacto eléctrico para la posterior deposición del metal buscado. Este proceso involucra un paso anterior, donde es necesario separar la alúmina porosa del aluminio donde está soportada luego de su generación, y disolver la barrera de

óxido que cierra el poro. Finalmente, aplicando un potencial al film metálico en presencia de un electrolito que contiene la sal del metal a ser depositado, se lleva a cabo la reducción de los iones en la superficie del electrodo de trabajo y el control del crecimiento *bottom-up* de las nanobarras en el poro.^{37,38} En la Figura 1. 9 se muestra un esquema general del proceso, donde se deposita Ag para generar el contacto eléctrico y luego se realizan sucesivas electrodeposiciones de Au y Ni. Finalmente, es posible tener una suspensión de las nanobarras a partir de pasos de disolución química del metal de sacrificio y del molde de alúmina.

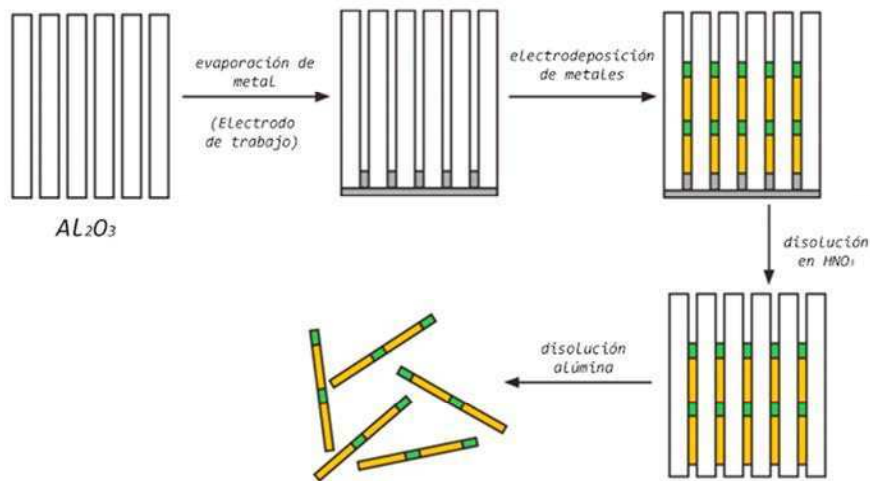


Figura 1. 9. Esquema de síntesis de nanoestructuras en alúmina por electrodeposición partiendo de la evaporación de una capa de plata que actúa como electrodo de trabajo y la posterior electrodeposición de Au y Ni formando multisegmentos. Adaptado de Ref 38.

Por otro lado, a partir de la técnica de *electroless*, introducida por Martin y colaboradores,³⁹ es posible obtener nanoestructuras huecas donde solo las paredes de los poros están cubiertas por el material, *e.g.* nanotubos. Brevemente, iones de Sn^{2+} se adsorben en las paredes del poro. Luego, se pone en contacto la alúmina con una solución que contiene Ag^+ y el Sn^{2+} es oxidado a Sn^{4+} , mientras que la plata se reduce formándose nanopartículas de Ag. Finalmente, una solución que contiene el precursor del metal que se desea depositar junto con un agente reductor, se pone en contacto con el sistema permitiendo la deposición del metal sobre las nanopartículas de plata que se encuentran en los poros.³⁹ La clave para poder formar nanotubos es hacer que la deposición comience en las paredes del poro y para ello es necesario modificarlas, en este caso generando nanopartículas de Ag.

Niensch *et al.*⁴⁰ introdujo un método de deposición de metales dentro de poros de alúmina ordenados por electrodeposición pulsada que le permitió depositar Ni y Ag, formando barras dentro de poros de 50nm de diámetro (Figura 1. 10). El método consiste en: I) creación de una estructura nanoporosa de óxido, II) el ataque químico de la barrera de óxido, III) otro paso que busca afinar y formar poros en la barrera de óxido mediante dos pasos sucesivos de anodizado a corriente limitada, y IV) electrodeposición pulsada de metales en el poro a corrientes de deposición grandes (70mA cm^{-2}). Los pasos II y III son muy importantes para disminuir la capa de óxido y la aislación eléctrica que ésta genera. En particular, el paso III) permite la formación de poros dendríticos en la barrera.

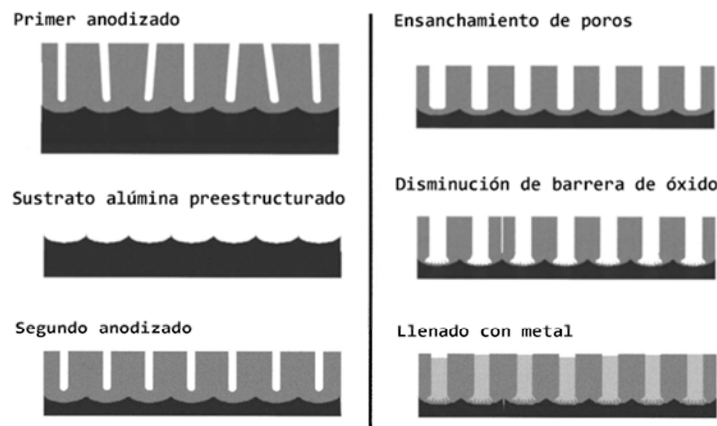


Figura 1. 10. Esquema de formación de nanobarras de metales dentro de alúmina por electrodeposición. Ref 40.

En este trabajo de tesis se decidió adaptar el procedimiento de Niensch *et al.* controlando la densidad de corriente aplicada, lo que permite un control cinético del crecimiento de las estructuras, ya sean clusters, nanopartículas o nanobarras, dentro de la matriz porosa de alúmina.

1.2.3. Arreglos de nanoelectrodos

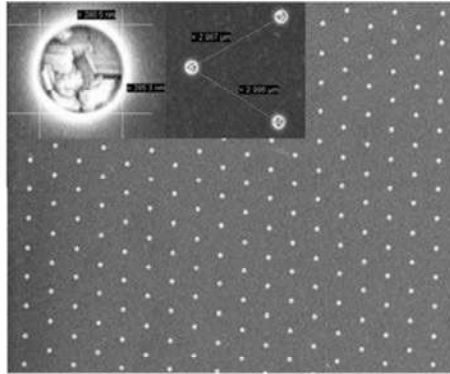
Los arreglos de nano y microelectrodos han adquirido gran relevancia tanto en investigación fundamental como tecnológica debido a su habilidad para mejorar la relación señal-ruido en aplicaciones analíticas como para facilitar estudios cinéticos.⁴¹⁻⁴⁶ Recientemente, la reducción del tamaño de los electrodos a dimensiones nanométricas no solo ha mejorado estas características sino que también han presentado interesantes efectos electrocatalíticos⁴⁷ y en la sensibilidad⁴⁸ y selectividad.⁴⁹ Las técnicas más comunes

para construir estos arreglos involucran métodos *top-down* como la fotolitografía y la litografía por haz de electrones.^{44,47,50-53} Esta última permite obtener los electrodos más pequeños, alcanzando diámetros de 50nm.⁵⁴ La litografía se basa en la aplicación de una capa aislante sobre un sustrato conductor en la cual se hace incidir luz UV o un haz de electrones creando un patrón que luego se revela generando poros. Debajo de estos poros, el sustrato conductor funciona como micro o nanoelectrodos (Figura 1. 11, A).

La metodología *bottom-up*^{51,55-60} comenzó a utilizarse en la generación de arreglos de nanoelectrodos a partir de los trabajos de Menom y Martin.⁵⁵ Fontaine *et al.* construyeron por una ruta sol-gel arreglos de nanoelectrodos por nanoporos de 16nm de diámetro sostenidos en sustratos de platino y protegidos por una matriz inorgánica compuesta de zirconia cristalina (Figura 1. 11, B).⁵⁹ Otro ejemplo reciente utiliza la deposición de una capa aislante de alúmina en un film conductor de carbono enmascarado con esferas de poliestireno de diámetro micrométrico. Luego, estas esferas son removidas por sonicación dejando de esta manera carbón expuesto como arreglos de micro y nanoelectrodos (Figura 1. 11, C).⁶⁰ Siguiendo esta aproximación, otra estrategia puede utilizarse invirtiendo la secuencia de construcción, generando primero la estructura porosa y luego creciendo el material conductor.^{40,61} Esta idea es la que se siguió en este trabajo de tesis al generar nanopartículas de oro por reducción electroquímica dentro de la matriz de alúmina nanoporosa. De esta manera la interfase donde ocurre la transferencia electrónica queda limitada por la superficie de oro. Como se mostrará, este sistema presenta varias ventajas: los poros son fáciles de construir, con un buen control en la altura y el diámetro. Más aún, electrodos de diferentes metales pueden crearse por este método con diámetros de menos de 3nm.⁶²

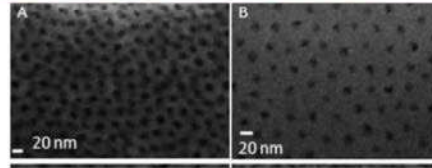
Métodos *top-down*

A) Fotolitografía – Arreglo de microelectrodos



Métodos *bottom-up*

B) Sol-Gel en sustratos conductores – Arreglo de nanoelectrodos



C) Esferas de poliestireno- Arreglo de microelectrodos

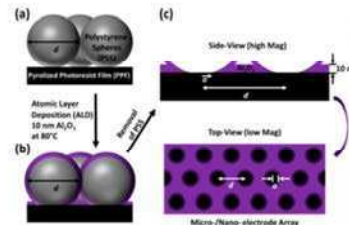


Figura 1. 11. Construcciones de arreglos de nano y microelectrodos por métodos *top-down* como litografía obteniendo electrodos de 140nm de radio, separados por 3 μ m de distancia (izquierda, A, adaptado de Ref 54), y por métodos *bottom-up* (derecha). En el caso B, se utiliza una ruta sol-gel para obtener electrodos y en el caso C, se emplean esferas de poliestireno que luego se remueven generando los micro o nanoelectrodos (Adaptados de Ref 59 y 60)

En la Figura 1. 11, se muestran imágenes SEM de los arreglos de electrodos obtenidos por técnicas *top-down* y *bottom-up*. La elección del método para construir estos arreglos depende de las características deseadas. Los métodos *top-down* permiten obtener un número finito de electrodos con geometrías muy precisas pero con tamaños de electrodos del orden de cientos de nanómetros y utilizando tecnología que requiere un gran costo. Por otro lado, los métodos *bottom-up* generan arreglos extendidos con tamaños de electrodos que pueden llegar a unos pocos nanómetros pero con menor control sobre los parámetros geométricos.

Para entender y predecir la respuesta electroquímica de estos arreglos se necesita un marco teórico, siendo la voltametría cíclica una técnica experimental ampliamente estudiada que permite entender los procesos cinéticos y de difusión que dominan el proceso. Sin embargo, no puede aplicarse una simple descripción analítica para entender qué está ocurriendo en el caso de arreglos de micro y nanoelectrodos, y es por ello, que varios grupos han presentado interesantes descripciones computacionales del problema.^{43,44,63,64} La respuesta de un arreglo de nanoelectrodos en un experimento de voltametría está relacionada con tres factores principalmente: la velocidad de barrido, el radio del electrodo y la distancia entre electrodos, que produce diferentes patrones difusionales que se ven reflejados en la forma del voltagrama, como se ilustra en la Figura 1. 12. La validez de los diferentes modelos depende de la combinación de estas variables

según fue racionalizado en el trabajo de Guo y Linder sin una solución cuantitativa (Figura 1. 12).⁴⁵ Se puede ver en esta figura un diagrama de zonas de las voltametrías cíclicas para distintos comportamientos, mostrando los límites para los distintos regímenes de difusión a partir de la definición de una velocidad relativa, V , que depende de la velocidad de barrido, del coeficiente de difusión y del radio del electrodo. Cuando la distancia entre electrodos es grande y el cubrimiento chico, a bajas velocidades, los electrodos se comportarán como microelectrodos aislados (III). Al aumentar la velocidad, el sistema pasa por un caso donde hay una mezcla en el modo de difusión entre radial y lineal (II), hasta que la velocidad es tan grande que el sistema se comporta como difusión lineal en el área de cada electrodo. Los casos donde la distancia entre electrodos es muy chica y el cubrimiento alto (empaquetamientos densos de electrodos) no deja lugar a voltametrías sigmoideas, a todas las velocidades se obtiene difusión lineal incluyendo el área de todo el arreglo (V) o comportamientos intermedios (IV) porque el solapamiento se da en tiempos muy cortos.

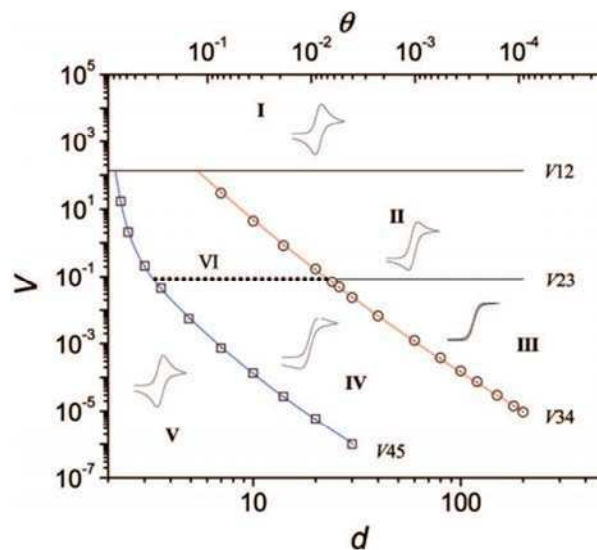


Figura 1. 12. Diagrama de zonas del comportamiento por voltametría cíclica de arreglos de microelectrodos coplanares; siendo d la distancia interelectrodos (medido en unidades de radio a), V es la velocidad de barrido adimensional ($V = n \cdot F \cdot v \cdot a^2 / 4 \cdot R \cdot T \cdot D$), y θ es la fracción de área electroquímica activa en el arreglo. Gráfico obtenido de la Ref 45.

Compton y colaboradores^{43,44} han desarrollado un modelo de simulación en 2 dimensiones, identificando los factores claves cuando se realiza una voltametría cíclica en estos arreglos. Este método en 2D se basa en la aproximación de dominio difusional (DDA) la cual considera una distribución regular de N electrodos donde los electrodos tienen un

área circular de radio r y están separados a una distancia d , y divide el área cubierta en N celdas unidades individuales cada una centrada en un electrodo. Este modelo considera a su vez un flujo neto igual a cero a través de las paredes del dominio de difusión, una condición que es válida si no se solapan los perfiles de difusión. Por ello, es necesario definir una distancia crítica promedio entre el centro del electrodo y el límite de la celda unidad, donde el error debido al solapamiento de las capas de difusión es aún despreciable. Así la división del sistema simplifica el proceso de simulación a sólo una celda unidad y reduce el problema de 3D a un problema de 2D. Sin embargo, es necesario encontrar condiciones geométricas y de velocidades de barrido donde es válido.

Amatore y colaboradores⁴² demostraron que la aplicación de un mapeo cuasi-conformacional transforma el área simulada desde una geometría compleja real a una unidad cuadrada, removiendo singularidades de las esquinas del inicio del dominio computacional en el espacio real. Esta estrategia permite mejorar la eficiencia del cálculo numérico y la precisión al simular arreglo de microelectrodos empotrados (*recessed microelectrodes*), y permite evaluar la dependencia de estos procesos con los parámetros geométricos principales. Sin embargo, este modelo también considera pozos con paredes de celda unidad perpendiculares a los bordes y que no hay flujo a través de ellos, manteniendo la limitación en el caso donde los perfiles de difusión se solapan. A su vez, este modelo es válido para microelectrodos. En estos casos, una condición propuesta para obtener comportamiento independiente de los electrodos, y por lo tanto, evitar el solapamiento es $d/r \geq 12$, donde d representa la distancia interelectrodos y r el radio de los microelectrodos; esta condición no es válida cuando el tamaño de los electrodos decrece a la escala nanométrica, donde cambia el peso relativo de las componentes radial y normal de la difusión.

Un modelo numérico completo debe ser capaz de resolver satisfactoriamente todas las situaciones descritas sin una preselección de las condiciones que lleven a uno u otro caso. Por lo tanto, una descripción completa del comportamiento electroquímico de arreglo de electrodos es aún un desafío, principalmente cuando los electrodos adquieren dimensiones en la nanoescala.

1.2.4. Biosensores

Los sensores son dispositivos que responden a estímulos físicos o químicos y producen señales detectables. Estos son una extensión crítica de la percepción humana del mundo en muchos aspectos de la sociedad.⁶⁵ Una composición química o biológica adecuada está íntimamente relacionada con nuestra calidad de vida, y pequeños cambios

en estos parámetros pueden no ser detectados instantáneamente, evidenciando su efecto en el largo plazo y/o por análisis específicos. Por ejemplo, la presencia de ciertas moléculas o iones y sus concentraciones en sangre reflejan el estado de salud de las personas, mientras que la presencia de ciertas especies, aun en concentraciones bajas, en el ambiente puede afectar nuestra salud. Por lo tanto, el desarrollo de sensores con una alta sensibilidad y selectividad, que reconozcan analitos relevantes, ha sido el foco de muchas áreas de investigación, incluyendo monitoreo ambiental, control de calidad industrial y diagnóstico médico.⁶⁵

Todo sensor está formado básicamente por dos unidades funcionales: un elemento de reconocimiento y un transductor de la señal (Figura 1. 13). En cuanto al elemento de reconocimiento, es importante que presenten gran afinidad, lo que impacta en un bajo límite de detección, alta selectividad, disminuyendo el efecto de posibles interferencias, una respuesta rápida, un amplio rango dinámico y estabilidad. Por otro lado, el transductor será el encargado de convertir el evento de reconocimiento molecular en una señal física detectable, típicamente, fluorescencia, color, corriente, etc.⁶⁶

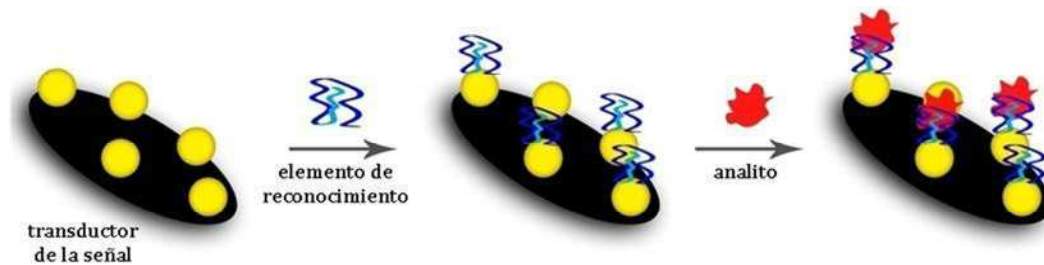


Figura 1. 13. Esquema que representa los distintos elementos de biosensores electroquímicos. En el paso 1 se esquematiza la inmovilización del elemento de reconocimiento en la superficie que actúa como transductor de la señal. El segundo paso corresponde a al evento de reconocimiento.

El diseño de una interfase selectiva es un desafío en la construcción de sensores químicos. Esta interfase debe construirse de manera que posea un amplio rango dinámico y un límite de detección adecuado para la aplicación que se trate: monitoreo ambiental, determinaciones clínicas, efluentes y aguas de procesos industriales, etc. En este sentido, el elemento de reconocimiento juega un papel fundamental, siendo los anticuerpos uno de los elementos ampliamente utilizados en ensayos médicos por su alta afinidad y selectividad. Cabe mencionar, que un gran número de analitos pueden ser reconocidos debido a que actúan como antígenos en el sistema inmune mamario y por lo tanto, se han desarrollado un gran número de inmunoensayos del tipo sandwich o competitivos. En los ensayos de tipo sándwich, el analito es reconocido por un anticuerpo y se une a un

segundo anticuerpo marcado con un elemento que permite la transducción de la señal. Estos ensayos requieren que el analito sea lo suficientemente grande como para tener dos sitios de unión. En los ensayos competitivos, el analito compite con su análogo marcado por el sitio de unión al anticuerpo. En ambos tipos de ensayos, se requiere de un marcador que genere la señal.⁶⁷

Una estrategia alternativa al uso de anticuerpos ha sido el desarrollo de aptámeros por técnicas de selección *in vitro*.^{68,69} Los aptámeros se definen como oligonucleótidos simple cadena compuestos por DNA o RNA que se pliegan en conformaciones tridimensionales únicas, presentando propiedades de reconocimiento molecular. Por ser pequeños y multifuncionales los aptámeros muestran un inmenso potencial como alternativa de los anticuerpos.⁷⁰⁻⁷³ La ventaja más relevante de éstos es que pueden desarrollarse contra un rango ilimitado de blancos, desde simplemente átomos o moléculas pequeñas hasta bacterias o células completas, con constantes de afinidad del orden pM-nM. Otras ventajas que presenta el uso de aptámeros para el desarrollo de sensores, involucran: que no es necesario el uso de animales para su síntesis; la posibilidad de introducir modificaciones en posiciones definidas durante su síntesis química; y su estabilidad térmicamente, pueden desnaturalizarse y renaturalizarse dependiendo de las condiciones sin que pierdan su capacidad de reconocimiento.

Los biosensores electroquímicos combinan la sensibilidad que proporcionan los métodos electroquímicos de detección con la gran especificidad que introducen los elementos de reconocimientos biológicos. Dentro de los métodos electroquímicos de detección, la espectroscopía electroquímica de impedancia se presenta como una gran alternativa como método para medir la interacción molecular interfacial, constituyendo sensores libres de marcadores y que no destruyen la muestra, con la ventaja de no requerir que el analito tenga actividad redox. En esta técnica se mide la resistencia y capacidad de la interfase al perturbar el sistema con una señal sinusoidal alterna de baja amplitud. La velocidad de transferencia electrónica de una sonda se mide como una resistencia (R_{te}) en una superficie modificada con un elemento de reconocimiento, por ejemplo un anticuerpo. Cuando el complejo anticuerpo-antígeno se forma, cambia la velocidad de transferencia electrónica dependiendo de la concentración de antígeno,⁷⁴ sin la necesidad de un segundo anticuerpo ni un marcador. El cambio se debe, principalmente, al tamaño del analito y el número de cargas que este aporta o neutraliza en la superficie. Este hecho modifica la estructura de la interfase, y por ende, la facilidad con la que la sonda puede llevar a cabo el proceso de transferencia electrónica. Para explotar este

fenómeno de manera más eficiente por lo general se utiliza como sonda una especie iónica con un número elevado de cargas, siendo el ferrocianuro una de las más utilizadas.⁷⁵⁻⁷⁸

1.3. Estructura de este trabajo de tesis

En el siguiente capítulo se presenta una descripción de los métodos de síntesis y caracterización empleados junto con un breve marco teórico. El tercer capítulo de esta tesis está relacionado con la obtención y caracterización de los sistemas de nanopartículas/clusters metálicos dentro de la matriz porosa. Se discute cómo influyen las diferentes variables estudiadas sobre las características del sistema, lo que permitirá elegir las condiciones óptimas para preparar los materiales con las funcionalidades deseadas. A su vez, se muestran los desafíos que genera la caracterización de sistemas confinados en una estructura mesoporosa y en la escala subnanométrica. Por último, se realiza una discusión respecto a los comportamientos observados para los diferentes metales en el contexto de la teoría de nucleación y crecimiento.

Luego, el cuarto capítulo aborda el comportamiento electroquímico de arreglo de electrodos. Dado que el confinamiento de partículas metálicas produce un arreglo de nanoelectrodos, es relevante entender en el contexto de esta tesis su comportamiento, debido a que será la forma de transducción de la señal. Resulta necesario el desarrollo de un modelo numérico para lograr una completa descripción del sistema teniendo en cuenta el radio del electrodo, la distancia entre electrodos y la profundidad de los poro, y de este modo hacerlo extensible a otros sistemas de arreglos de micro y nanoelectrodos. El modelo se validó frente a arreglos de micro y nanoelectrodos reportados en bibliografía y los desarrollados en el tercer capítulo de esta tesis.

El quinto capítulo describe el desarrollo llevado a cabo para obtener un aptasensor impedimétrico libre de marcadores para moléculas pequeñas de relevancia biológica, utilizando como sistema modelo el aptámero que reconoce AMP. Para su obtención, fue necesario el estudio de la adsorción de aptámeros con diferentes grupos terminales azufrados en nanopartículas de oro. La inmovilización de aptámeros en un ambiente confinado permite la detección de cambios conformacionales con gran sensibilidad mediante la técnica de espectroscopía de impedancia, obteniendo una respuesta a AMP del orden nanomolar y demostrando la importancia de poder controlar la arquitectura a escala nanométrica.

Finalmente, en el último capítulo de resultados, se estudia la aplicación en catálisis de los sistemas obtenidos. Los clústeres metálicos, formados por menos de 100 átomos, presentan interesantes propiedades, diferentes a las nanopartículas, que los hacen muy buenos candidatos para esta aplicación. Se presenta un estudio de sus propiedades empleando reacciones conocidas como prueba de concepto; en particular, la catálisis de reducción de 4-nitrofenol y azul de metileno.

Trabajar con nanomateriales comprende su síntesis, caracterización, estudio de sus propiedades y aplicación en distintos campos. Por lo tanto, involucra distintas áreas del conocimiento y la contribución multidisciplinaria de la física, química y biología. Así, este trabajo de tesis, no se hubiera podido llevar a cabo sin la interacción y colaboración con distintos grupos:

- **Dr. Martin Mizrahi y Dr. Felix Requejo** (INIFTA - UNLP - Argentina): caracterización de los nanomateriales sintetizados por técnicas de absorción de rayos X (LNLS-Campinas).
- **Dra. Helena Ceretti, Dra. Silvana Ramirez y Dr. Javier Monserrat** (UNGS-Argentina): Manipulación y modificación de aptámeros
- **Dr. David Buceta y Dr. Arturo Lopez-Quintela** (USC- España): caracterización de clusters atómicos metálicos.

Dichos grupos aportaron su experiencia en las distintas áreas y me permitieron aprender varias de las técnicas presentadas en esta tesis.

También quiero hacer una especial mención al estudiante de la Licenciatura en Química, **Rodrigo Gillardoni**, por su colaboración en la extensión de la validación del modelo numérico a otros ejemplos de la literatura.

Referencias

- (1) Li, Z.; Jin, R.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. Multiple Thiol-Anchor Capped DNA-gold Nanoparticle Conjugates. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (7), 1558–1562.
- (2) Bruening, M. L.; Dotzauer, D. M.; Jain, P.; Ouyang, L.; Baker, G. L. Creation of Functional Membranes Using Polyelectrolyte Multilayers and Polymer Brushes. *Langmuir* **2008**, *24* (15), 7663–7673.
- (3) Jani, A. M. M.; Kempson, I. M.; Losic, D.; Voelcker, N. H. Dressing in Layers: Layering Surface Functionalities in Nanoporous Aluminum Oxide Membranes. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, *49* (43), 7933–7937.
- (4) Binnig, G.; Rohrer, H.; Gerber, C.; Weibel, E. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **1982**, *49* (1), 57–61.
- (5) Binnig, G.; Gerber, C.; Stoll, E.; Albrecht, T. R.; Quate, C. F. Atomic Resolution with Atomic Force Microscope. *Surf. Sci.* **1987**, *189*, 1–6.
- (6) Roduner, E. Size Matters: Why Nanomaterials Are Different. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (7), 583–592.
- (7) Yau, S. H.; Varnavski, O.; Goodson, T. An Ultrafast Look at Au Nanoclusters. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46* (7), 1506–1516.
- (8) Lu, Y.; Chen, W. Sub-Nanometre Sized Metal Clusters: From Synthetic Challenges to the Unique Property Discoveries. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (9), 3594–3623.
- (9) Varnavski, O. P.; Goodson, T.; Mohamed, M. B.; El-Sayed, M. A. Femtosecond Excitation Dynamics in Gold Nanospheres and Nanorods. *Phys. Rev. B* **2005**, *72* (23), 235405.
- (10) Knight, W. D.; Clemenger, K.; de Heer, W. A.; Saunders, W. A.; Chou, M. Y.; Cohen, M. L. Electronic Shell Structure and Abundances of Sodium Clusters. *Phys. Rev. Lett.* **1984**, *52* (24), 2141–2143.
- (11) de Heer, W. A. The Physics of Simple Metal Clusters: Experimental Aspects and Simple Models. *Rev. Mod. Phys.* **1993**, *65* (3), 611–676.
- (12) Joshi, C. P.; Bootharaju, M. S.; Bakr, O. M. Tuning Properties in Silver Clusters. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6* (15), 3023–3035.
- (13) Mackay, A. A Dense Non-Crystallographic Packing of Equal Spheres. *Acta Crystallogr.* **1962**, *15* (9), 916–918.
- (14) Yang, X.; Shi, M.; Zhou, R.; Chen, X.; Chen, H. Blending of HAuCl₄ and Histidine in Aqueous Solution: A Simple Approach to the Au₁₀ Cluster. *Nanoscale* **2011**, *3* (6), 2596–2601.
- (15) Zhang, J.; Xu, S.; Kumacheva, E. Photogeneration of Fluorescent Silver Nanoclusters in Polymer Microgels. *Adv. Mater.* **2005**, *17* (19), 2336–2340.
- (16) Shang, L.; Dong, S. Facile Preparation of Water-Soluble Fluorescent Silver Nanoclusters Using a Polyelectrolyte Template. *Chem. Commun.* **2008**, No. 9, 1088–1090.
- (17) Xie, J.; Zheng, Y.; Ying, J. Y. Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (3), 888–889.
- (18) Zheng, J.; Dickson, R. M. Individual Water-Soluble Dendrimer-Encapsulated Silver Nanodot Fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (47), 13982–13983.
- (19) Myers, V. S.; Weir, M. G.; Carino, E. V.; Yancey, D. F.; Pande, S.; Crooks, R. M. Dendrimer-Encapsulated Nanoparticles: New Synthetic and Characterization Methods and Catalytic Applications. *Chem. Sci.* **2011**, *2* (9), 1632–1646.

- (20) Richards, C. I.; Choi, S.; Hsiang, J.-C.; Antoku, Y.; Vosch, T.; Bongiorno, A.; Tzeng, Y.-L.; Dickson, R. M. Oligonucleotide-Stabilized Ag Nanocluster Fluorophores. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (15), 5038–5039.
- (21) Vilar-Vidal, N.; Blanco, M. C.; López-Quintela, M. A.; Rivas, J.; Serra, C. Electrochemical Synthesis of Very Stable Photoluminescent Copper Clusters. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (38), 15924–15930.
- (22) Reetz, M. T.; Helbig, W. Size-Selective Synthesis of Nanostructured Transition Metal Clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (16), 7401–7402.
- (23) Wohler, F.; Buff, H. No Title. *Liebigs Ann. Chem.* **1857**, *3*, 265–284.
- (24) Masuda, H.; Fukuda, K. Ordered Metal Nanohole Arrays Made by a Two-Step Replication of Honeycomb Structures of Anodic Alumina. *Science (80-.)*. **1995**, *268* (5216), 1466 LP-1468.
- (25) Masuda, H.; Satoh, M. Fabrication of Gold Nanodot Array Using Anodic Porous Alumina as an Evaporation Mask. *Jpn. J. Appl. Phys.* **1996**, *35* (1B), L126.
- (26) Lee, W.; Park, S.-J. Porous Anodic Aluminum Oxide: Anodization and Templated Synthesis of Functional Nanostructures. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (15), 7487–7556.
- (27) Keller, F.; Hunter, M. S.; Robinson, D. L. Structural Features of Oxide Coatings on Aluminum. *J. Electrochem. Soc.* **1953**, *100* (9), 411–419.
- (28) Md Jani, A. M.; Losic, D.; Voelcker, N. H. Nanoporous Anodic Aluminium Oxide: Advances in Surface Engineering and Emerging Applications. *Prog. Mater. Sci.* **2013**, *58* (5), 636–704.
- (29) Keller, F.; Hunter, M. S.; Robinson, D. L. Structural Features of Oxide Coatings on Aluminum. *J. Electrochem. Soc.* **1953**, *100* (9), 411–419.
- (30) Masuda, H.; Fukuda, K. Ordered Metal Nanohole Arrays Made by a Two-Step Replication of Honeycomb Structures of Anodic Alumina. *Science (80-.)*. **1995**, *268* (5216), 1466 LP-1468.
- (31) Satoh, H. M. and M. Fabrication of Gold Nanodot Array Using Anodic Porous Alumina as an Evaporation Mask. *Jpn. J. Appl. Phys.* **1996**, *35* (1B), L126.
- (32) Md Jani, A. M.; Losic, D.; Voelcker, N. H. Nanoporous Anodic Aluminium Oxide: Advances in Surface Engineering and Emerging Applications. *Prog. Mater. Sci.* **2013**, *58* (5), 636–704.
- (33) Sulka, G. D.; Parkoła, K. G. Temperature Influence on Well-Ordered Nanopore Structures Grown by Anodization of Aluminium in Sulphuric Acid. *Electrochim. Acta* **2007**, *52* (5), 1880–1888.
- (34) Sulka, G. D.; Stępniewski, W. J. Structural Features of Self-Organized Nanopore Arrays Formed by Anodization of Aluminum in Oxalic Acid at Relatively High Temperatures. *Electrochim. Acta* **2009**, *54* (14), 3683–3691.
- (35) Osaka, H. M. and K. Y. and A. Self-Ordering of Cell Configuration of Anodic Porous Alumina with Large-Size Pores in Phosphoric Acid Solution. *Jpn. J. Appl. Phys.* **1998**, *37* (11A), L1340.
- (36) Soler-Illia, G. J. A. A.; Azzaroni, O. Multifunctional Hybrids by Combining Ordered Mesoporous Materials and Macromolecular Building Blocks. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (2), 1107–1150.
- (37) Martin, C. R. Nanomaterials: A Membrane-Based Synthetic Approach. *Science (80-.)*. **1994**, *266* (5193), 1961 LP-1966.
- (38) Hurst, S. J.; Payne, E. K.; Qin, L.; Mirkin, C. A. Multisegmented One-Dimensional Nanorods Prepared by Hard-Template Synthetic Methods. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45* (17), 2672–2692.

- (39) C. Hulteen, J.; Martin, C. R. A General Template-Based Method for the Preparation of Nanomaterials. *J. Mater. Chem.* **1997**, *7* (7), 1075–1087.
- (40) Nielsch, K.; Müller, F.; Li, A.-P.; Gösele, U. Uniform Nickel Deposition into Ordered Alumina Pores by Pulsed Electrodeposition. *Adv. Mater.* **2000**, *12* (8), 582–586.
- (41) Zhu, F.; Yan, J.; Pang, S.; Zhou, Y.; Mao, B.; Oleinick, A.; Svir, I.; Amatore, C. Strategy for Increasing the Electrode Density of Microelectrode Arrays by Utilizing Bipolar Behavior of a Metallic Film. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (6), 3138–3145.
- (42) Amatore, C.; Oleinick, A. I.; Svir, I. Numerical Simulation of Diffusion Processes at Recessed Disk Microelectrode Arrays Using the Quasi-Conformal Mapping Approach. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (11), 4397–4405.
- (43) Davies, T. J.; Compton, R. G. The Cyclic and Linear Sweep Voltammetry of Regular and Random Arrays of Microdisc Electrodes: Theory. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *585* (1), 63–82.
- (44) Davies, T. J.; Ward-Jones, S.; Banks, C. E.; del Campo, J.; Mas, R.; Muñoz, F. X.; Compton, R. G. The Cyclic and Linear Sweep Voltammetry of Regular Arrays of Microdisc Electrodes: Fitting of Experimental Data. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *585* (1), 51–62.
- (45) Guo, J.; Lindner, E. Cyclic Voltammograms at Coplanar and Shallow Recessed Microdisk Electrode Arrays: Guidelines for Design and Experiment. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (1), 130–138.
- (46) Ongaro, M.; Ugo, P. Bioelectroanalysis with Nanoelectrode Ensembles and Arrays. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405* (11), 3715–3729.
- (47) Fernández, J. L.; Wijesinghe, M.; Zoski, C. G. Theory and Experiments for Voltammetric and SECM Investigations and Application to ORR Electrocatalysis at Nanoelectrode Ensembles of Ultramicroelectrode Dimensions. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (2), 1066–1074.
- (48) Zhang, B.; Zhang, Y.; White, H. S. The Nanopore Electrode. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (21), 6229–6238.
- (49) Calvo, A.; Yameen, B.; Williams, F. J.; Soler-Illia, G. J. A. A.; Azzaroni, O. Mesoporous Films and Polymer Brushes Helping Each Other To Modulate Ionic Transport in Nanoconfined Environments. An Interesting Example of Synergism in Functional Hybrid Assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (31), 10866–10868.
- (50) Godino, N.; Borrísé, X.; Muñoz, F. X.; del Campo, F. J.; Compton, R. G. Mass Transport to Nanoelectrode Arrays and Limitations of the Diffusion Domain Approach: Theory and Experiment. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (25), 11119–11125.
- (51) Lanyon, Y. H.; De Marzi, G.; Watson, Y. E.; Quinn, A. J.; Gleeson, J. P.; Redmond, G.; Arrigan, D. W. M. Fabrication of Nanopore Array Electrodes by Focused Ion Beam Milling. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (8), 3048–3055.
- (52) Sandison, M. E.; Cooper, J. M. Nanofabrication of Electrode Arrays by Electron-Beam and Nanoimprint Lithographies. *Lab Chip* **2006**, *6* (8), 1020–1025.
- (53) Ugo, L. M. M. and M. T. and M. D. L. and A. C. and P. Polycarbonate-Based Ordered Arrays of Electrochemical Nanoelectrodes Obtained by E-Beam Lithography. *Nanotechnology* **2011**, *22* (18), 185305.
- (54) Ziaie, B.; Baldi, A.; Atashbar, M. Z. Introduction to Micro-/Nanofabrication BT - Springer Handbook of Nanotechnology; Bhushan, B., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2010; pp 231–269.
- (55) Menon, V. P.; Martin, C. R. Fabrication and Evaluation of Nanoelectrode Ensembles. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (13), 1920–1928.

- (56) Baker, W. S.; Crooks, R. M. Independent Geometrical and Electrochemical Characterization of Arrays of Nanometer-Scale Electrodes. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (49), 10041–10046.
- (57) De Leo, M.; Pereira, F. C.; Moretto, L. M.; Scopece, P.; Polizzi, S.; Ugo, P. Towards a Better Understanding of Gold Electroless Deposition in Track-Etched Templates. *Chem. Mater.* **2007**, *19* (24), 5955–5964.
- (58) Perera, D. M. N. T.; Ito, T. Cyclic Voltammetry on Recessed Nanodisk-Array Electrodes Prepared from Track-Etched Polycarbonate Membranes with 10-Nm Diameter Pores. *Analyst* **2010**, *135* (1), 172–176.
- (59) Fontaine, O.; Laberty-Robert, C.; Sanchez, C. Sol-Gel Route to Zirconia-Pt-Nanoelectrode Arrays 8 Nm in Radius: Their Geometrical Impact in Mass Transport. *Langmuir* **2012**, *28* (7), 3650–3657.
- (60) Duay, J.; Goran, J. M.; Stevenson, K. J. Facile Fabrication of Carbon Ultramicro- to Nanoelectrode Arrays with Tunable Voltammetric Response. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (23), 11528–11532.
- (61) Tian, M.; Xu, S.; Wang, J.; Kumar, N.; Wertz, E.; Li, Q.; Campbell, P. M.; Chan, M. H. W.; Mallouk, T. E. Penetrating the Oxide Barrier in Situ and Separating Freestanding Porous Anodic Alumina Films in One Step. *Nano Lett.* **2005**, *5* (4), 697–703.
- (62) Peinetti, A. S.; Herrera, S.; González, G. a; Battaglini, F. Synthesis of Atomic Metal Clusters on Nanoporous Alumina. *Chem. Commun. (Camb)*. **2013**, *49* (96), 11317–11319.
- (63) Amatore, C.; Savéant, J. M.; Tessier, D. Charge Transfer at Partially Blocked Surfaces. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1983**, *147* (1), 39–51.
- (64) Lee, H. J.; Beriet, C.; Ferrigno, R.; Girault, H. H. Cyclic Voltammetry at a Regular Microdisc Electrode Array. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *502* (1–2), 138–145.
- (65) Liu, J.; Cao, Z.; Lu, Y. Functional Nucleic Acid Sensors. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (5), 1948–1998.
- (66) Janata, J. *Principles of Chemical Sensors*; Edition, S., Ed.; Springer: Heidelberg, Alemania, 2009.
- (67) *The Immunoassay Handbook. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*, 4th. editi.; Wild, D., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013.
- (68) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature* **1990**, *346* (6287), 818–822.
- (69) Tuerk, C.; Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science (80-.)*. **1990**, *249* (4968), 505 LP-510.
- (70) Banerjee, J.; Nilsen-Hamilton, M. Aptamers: Multifunctional Molecules for Biomedical Research. *J. Mol. Med.* **2013**, *91* (12), 1333–1342.
- (71) Sun, H.; Zu, Y. A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. *Molecules* . 2015.
- (72) Meng, H.-M.; Liu, H.; Kuai, H.; Peng, R.; Mo, L.; Zhang, X.-B. Aptamer-Integrated DNA Nanostructures for Biosensing, Bioimaging and Cancer Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (9), 2583–2602.
- (73) Hianik, T.; Wang, J. Electrochemical Aptasensors – Recent Achievements and Perspectives. *Electroanalysis* **2009**, *21* (11), 1223–1235.
- (74) Katz, E.; Willner, I. Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-

Sensors, and Enzyme Biosensors. *Electroanalysis* **2003**, *15* (11), 913–947.

- (75) Willner, I.; Zayats, M. Electronic Aptamer-Based Sensors. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46* (34), 6408–6418.
- (76) Ziegler, S.; Pries, V.; Hedberg, C.; Waldmann, H. Target Identification for Small Bioactive Molecules: Finding the Needle in the Haystack. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52* (10), 2744–2792.
- (77) Mu, B.; Zhang, J.; McNicholas, T. P.; Reuel, N. F.; Kruss, S.; Strano, M. S. Recent Advances in Molecular Recognition Based on Nanoengineered Platforms. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (4), 979–988.
- (78) Rodriguez, M. C.; Kawde, A.-N.; Wang, J. Aptamer Biosensor for Label-Free Impedance Spectroscopy Detection of Proteins Based on Recognition-Induced Switching of the Surface Charge. *Chem. Commun.* **2005**, No. 34, 4267–4269.

Capítulo 2: Métodos

2.1. Introducción

En este Capítulo se hace una breve descripción de las principales técnicas empleadas en el transcurso de este trabajo de tesis para la caracterización de los materiales sintetizados, remarcando los parámetros estructurales y la información que es posible obtener a partir de ellas; así como también de las técnicas que se utilizaron como método de detección en el desarrollo de biosensores. Por último se describen las características del método numérico empleado para simular el comportamiento de los arreglos de nanoelectrodos.

Una descripción más detallada de los materiales empleados y de las condiciones en las que se llevan a cabo las medidas se realizan en la Sección Experimental de cada Capítulo.

2.2 Métodos de caracterización

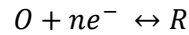
2.2.1. Técnicas electroquímicas

2.2.1.1. Conceptos generales

Las medidas electroquímicas involucran el estudio de la interfase electrodo/electrolito y los eventos que ocurren cuando se aplica un potencial y/o circula corriente a través de ésta.

Una reacción de electrodo es una reacción interfacial que necesariamente involucra un paso de transferencia de carga desde o hacia una superficie conductora. La reacción de electrodo comprende a todos los procesos (reacción química, reorganización estructural, adsorción, transporte) que acompañan el paso de transferencia de carga. Se trata de un proceso anódico si las especies son oxidadas perdiendo electrones, o bien es un proceso catódico si las especies son reducidas en la interfase, ganando electrones. Las especies electroactivas pueden ser especies en solución, el solvente, una película sobre la superficie del electrodo o el material del electrodo en sí mismo.

Una reacción de electrodo de la forma general:



(donde O y R son las especies oxidadas y reducidas respectivamente, y n es el número de electrones, e⁻) involucra una secuencia de pasos que puede incluir el transporte de reactivos hacia/desde la superficie del electrodo, la transferencia de electrones y la remoción del producto de la superficie del electrodo; por lo que la velocidad del proceso estará determinada por la velocidad del paso más lento de la secuencia.

Los procesos electroquímicos generalmente no son sencillos. En todos los casos, van a estar involucrados procesos heterogéneos de transferencia de electrones y de transporte de masa de la especie electroactiva hacia /desde el electrodo. A estos procesos a su vez, pueden sumarse reacciones químicas homogéneas que pueden estar acopladas, procesos superficiales tales como adsorción, etc. El estudio del transporte de masa es por lo tanto un tema relevante que se discute en la siguiente sección.

2.2.1.2. Transporte de masa ¹

En una solución, el transporte de masa ocurre por difusión, migración y/o convección. La difusión y migración se generan por un gradiente en el potencial electroquímico. La primera está asociada a la presencia de un gradiente de potencial químico (diferencia de concentraciones) mientras que la segunda a la existencia de un campo eléctrico o diferencia de potencial. La convección está relacionada con fuerzas no compensadas en la solución (transporte hidrodinámico).

Se puede escribir el flujo de una especie i a una distancia x de la superficie, $J_i(x)$, como se presenta en la Ecuación (2.1), *Ecuación de Nernst-Planck*; dependiendo de su coeficiente de difusión, D_i , del gradiente de concentración a esta distancia x, $\frac{\partial C_i(x)}{\partial x}$, de la velocidad con la que el elemento de volumen se mueve en la dirección x, $v(x)$, del gradiente del campo eléctrico en la dirección x, $\frac{\partial \phi(x)}{\partial x}$, y de la carga, z_i , y de la concentración, C_i , de la especie.

$$J_i(x) = -D_i \frac{\partial C_i(x)}{\partial x} - \frac{z_i F}{RT} D_i C_i \frac{\partial \phi(x)}{\partial x} + C_i v(x) \quad (2.1)$$

Al agregar un exceso de iones no electroactivos, *electrolito soporte*, la contribución de la migración al transporte de masa se hace despreciable. A su vez la presencia de un electrolito soporte, disminuye la resistencia de la solución y cae la resistencia no compensada

entre el electrodo de trabajo y de referencia. En todos los casos comprendidos en esta tesis, se trabajará con electrolito soporte. A su vez, no se realizará agitación en el transcurso de las medidas electroquímicas por lo que, no existirá una contribución de convección.

Es posible restringir, entonces, el transporte de masa a la difusión. Este tipo de transporte está determinado por las leyes de Fick, las cuales definen el flujo de una sustancia y su concentración en función del tiempo y la distancia. La formulación general de la segunda ley de Fick se presenta en la Ecuación (2.2), donde C_0 es la concentración de la especie O, D_0 es su coeficiente de difusión y ∇^2 es el operador Laplaciano que adquiere distintas formas para diferentes geometrías.

$$\frac{\partial C_0}{\partial t} = D_0 \nabla^2 C_0 \quad (2.2)$$

Para electrodos planos, la ecuación de difusión lineal es adecuada (Ecuación (2.3)) mientras que para electrodos esféricos, se llega a la difusión esférica cuya forma se presenta en la Ecuación (2.4). Las diferencias entre ambas formas de difusión deriva de que la difusión esférica ocurre con un incremento del área a medida que aumenta el radio, r.

$$\frac{\partial C_0(x,t)}{\partial t} = D_0 \left(\frac{\partial^2 C_0(x,t)}{\partial x^2} \right) \quad (2.3)$$

$$\frac{\partial C_0(x,t)}{\partial t} = D_0 \left[\frac{\partial^2 C_0(x,t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_0(x,t)}{\partial r} \right] \quad (2.4)$$

En la resolución del transporte de masa en un problema electroquímico, se escribe una ecuación de difusión para cada una de las especies involucradas en el proceso. La solución de esas ecuaciones, es decir, encontrar una expresión de la concentración de cada una de ellas en función del tiempo y la posición, requiere definir las condiciones iniciales (el perfil de concentración a $t=0$) y dos condiciones de contorno (una función que pueda aplicarse a un cierto valor de x) para cada especie. Algunas de las condiciones de contorno que se utilizaran a lo largo de este trabajo son: por un lado, que a una distancia lo suficientemente lejos del electrodo la concentración es constante y corresponde a la del seno de la solución (concentración inicial). Por otro lado, se tiene en cuenta lo que ocurre en la superficie, relacionando el flujo en $x=0$ con una función del potencial o la corriente de acuerdo a cual sea la variable que se está controlando. Otra condición de contorno muy usada es la de conservación de masa.

2.2.1.3. Medidas electroquímicas^{2,3}

El potencióstato es el instrumento encargado de controlar el potencial aplicado entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. En la actualidad estos dispositivos permiten aplicar distintas funciones de potencial al electrodo de trabajo, generando distintos tipos de respuesta de corriente. Existe una amplia variedad de técnicas electroquímicas desarrolladas para determinar los parámetros tanto cinéticos como termodinámicos de las reacciones de electrodo. La técnica a utilizar dependerá del sistema químico y de la información que se quiera obtener.

Estas técnicas requieren del uso de un potencióstato para fijar el potencial y medir la corriente, y de una celda electroquímica, típicamente de tres electrodos. El electrodo de trabajo (WE) es aquel donde ocurren los procesos electroquímicos de interés. En este tipo de celdas la corriente circula desde el electrodo de trabajo por un circuito externo y luego hacia el electrodo auxiliar o contraelectrodo (CE); el circuito se cierra por el transporte de iones en la solución. El contraelectrodo debe tener un área mucho mayor que la del electrodo de trabajo para no limitar el flujo de carga eléctrica. El tercer electrodo es el electrodo de referencia (RE) por el cual no circula corriente debido a su alta impedancia y que solamente controla el potencial del electrodo de trabajo.

En este trabajo de tesis se utilizaron principalmente tres técnicas electroquímicas para caracterizar los sistemas: voltametría cíclica (CV), voltametría de onda cuadrada (SWV) y espectroscopía electroquímica de impedancia (EIS). Se describirá el fundamento de cada una de estas técnicas en las secciones siguientes.

2.2.1.4. Voltametría cíclica (CV)⁴

En la voltametría cíclica se aplica sobre el sistema una variación lineal del potencial, a partir de un potencial inicial E_1 . En cada momento, el potencial aplicado, E , responde a la ecuación:

$$E = E_1 + v \cdot t \quad (2.5)$$

donde v es la velocidad de variación del potencial con el tiempo, $\frac{dE}{dt}$. En la Figura 2. 1 se muestra la forma en la que puede variarse el potencial aplicado al electrodo de trabajo, en función del tiempo. El potencial se varía linealmente con el tiempo (a una dada velocidad de

barrido, v) desde un valor E_1 a un valor E_2 , luego se puede regresar al mismo valor inicial E_1 u a otro valor y así sucesivamente. La velocidad de barrido usada generalmente se encuentra entre los pocos mV s^{-1} hasta 100V s^{-1} . Se grafica entonces la respuesta de corriente del sistema en función del potencial aplicado (el eje de potencial es también un eje de tiempo), obteniéndose la curva intensidad vs potencial o curva voltamétrica. La forma exacta de esta curva depende del tipo de proceso que tiene lugar en el electrodo de trabajo. Los límites de potencial definen las reacciones electrónicas que se permite que se produzcan, y la velocidad de barrido de potencial define la escala de tiempo en la que se examina el proceso electroquímico.

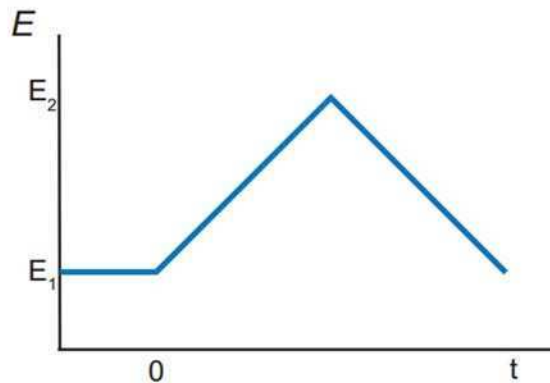


Figura 2. 1. Perfil de potencial en función del tiempo para voltametría cíclica

Esta técnica suele utilizarse como técnica inicial en cualquier estudio electroquímico pues da una primera información acerca del proceso de electrodo en estudio, ya que dependiendo de la forma de la curva voltamétrica se podrá analizar la reversibilidad del mismo, la velocidad de transferencia electrónica de la reacción, la existencia de reacciones acopladas, la relevancia del transporte de masa, etc.

Respecto al análisis de las curvas i vs. E , la corriente depende del control cinético y difusional. En la Figura 2. 2 se observa el voltamograma cíclico obtenido para una reacción reversible de transferencia de 1 electrón, donde la especie electroquímica se encuentra en la solución. Si el barrido empieza desde un potencial menor al E^0 de la cupla, la corriente dependerá sólo de procesos no faradaicos. Al barrer hacia valores de potenciales más positivos, a través del intervalo donde se produce la reacción de oxidación ($R \rightarrow O$),

inicialmente y como consecuencia del cambio en el potencial aplicado, la oxidación de R en la superficie se ve favorecida y por lo tanto, la densidad de corriente anódica aumenta. Esta densidad de corriente continúa aumentando hasta que la concentración superficial llega a ser cero y por lo tanto la reacción pasa a estar controlada por difusión. Cuando la difusión es lineal (perpendicular a la superficie), como la concentración superficial se mantiene en cero, y con el tiempo el flujo hacia la superficie disminuye, la densidad de corriente disminuye, y por consiguiente la respuesta presenta un pico. Para el barrido de vuelta, la reacción de transferencia electrónica en el electrodo es $O \rightarrow R$, por lo tanto la corriente cambiará su signo. La corriente catódica pasará de nuevo a través de un pico, en un proceso similar al descrito anteriormente.

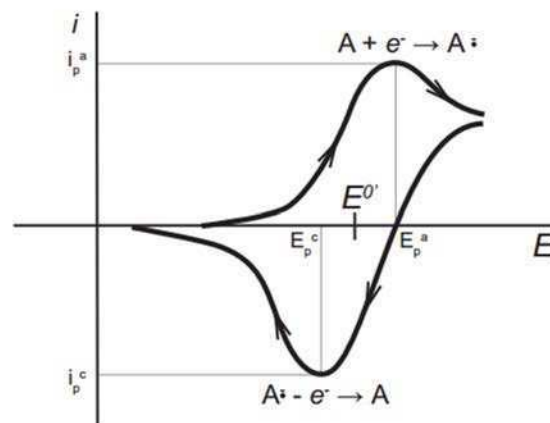


Figura 2. 2. Voltametría cíclica para un proceso reversible. E_p^c y E_p^a corresponden a los potenciales de pico catódico y anódico respectivamente. i_p^c e i_p^a son las corrientes de pico catódico y anódico.

La respuesta de la voltametría cíclica para una reacción de transferencia electrónica de una especie en solución puede modelarse teniendo en cuenta la velocidad de reacción de la especie electroactiva en la superficie del electrodo, su difusión y las posibles reacciones acopladas en el seno de la solución.

Para el caso de una especie que reacciona muy rápido con la superficie de un electrodo (caso reversible, donde la concentración de las especies O y R se ajustan rápido a las predichas por la ecuación de Nernst) y que presenta una difusión semi-infinita lineal puede aplicarse la solución obtenida para la voltametría lineal de barrido, donde la corriente de pico está determinada por la ecuación de Randles-Sevcik, escrita a 298K:

$$i_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} \nu^{1/2} C \quad (2.6)$$

donde la corriente de pico, i_p tiene la unidad Ampere (A), el área del electrodo, A (cm^2), la concentración de la especie electroactiva en el seno de la solución, C , (mol cm^{-3}), el coeficiente de difusión, D ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) y la velocidad de barrido de potencial, ν (V s^{-1}). En este caso el potencial de pico, E_p , no depende de la velocidad de barrido, y se puede definir, como:

$$E_p = E_{1/2} - 1.109 \frac{RT}{nF} \quad (2.7)$$

siendo $E_{1/2}$ el potencial a media onda, R la constante de los gases, T la temperatura, n el número de electrones intercambiados y F la constante de Faraday. La diferencia entre los potenciales de pico anódico y catódico (ΔE_p) suele utilizarse como un diagnóstico para testear si la reacción es reversible, esperándose un valor de 60mV si el número de electrones intercambiados es uno.

Los sistemas *quasi-reversibles* son aquellos donde la reacción muestra una cinética de transferencia de electrones más lenta y la reacción inversa debe ser considerada. En estos casos, donde la cinética de la reacción se ve involucrada, las formas de las voltametrías se ven afectadas por un desplazamiento de los picos hacia potenciales más extremos (positivos en el caso de la oxidación y negativos para la reducción) haciéndose mayor la separación entre picos. En estos casos, la expresión que describe la corriente de pico es la siguiente:

$$i_p = i_p(\text{rev}) * K(\Lambda, \alpha) \quad (2.8)$$

donde la $i_p(\text{rev})$ es la calculada por la Ecuación (2.6) y $K(\Lambda, \alpha)$ es una función que depende de α , el coeficiente de transferencia (igual a 0.5), y de Λ definido como

$$\Lambda = \frac{k^o}{(D f \nu)^{1/2}} \quad (2.9)$$

Los valores que adopta la función K en distintas condiciones se puede encontrar en la página 238 de la Ref 4.

Si el transporte de masa es del tipo difusión esférica, la corriente está dada por la siguiente expresión:

$$i = i(\text{plano}) + \frac{nFAD_0 C_0^* \theta(\sigma t)}{r_0} \quad (2.8)$$

donde r_0 es el radio del electrodo y $\theta(\sigma t)$ es una función tabulada. Para valores grandes de v y para electrodos de tamaño macroscópico el término $i(\text{plano})$ es mucho mayor que el término de corrección esférico y el electrodo puede considerarse plano. Sin embargo, para electrodos donde r_0 sea muy chico el segundo término se hace importante y predomina a bajas velocidades. En la Figura 2. 3 se muestra el cambio en la voltametría cíclica para un electrodo de $10\mu\text{m}$ de radio al cambiar la velocidad de barrido entre 0.01V s^{-1} hasta 1V s^{-1} obtenido de la Ref 4.

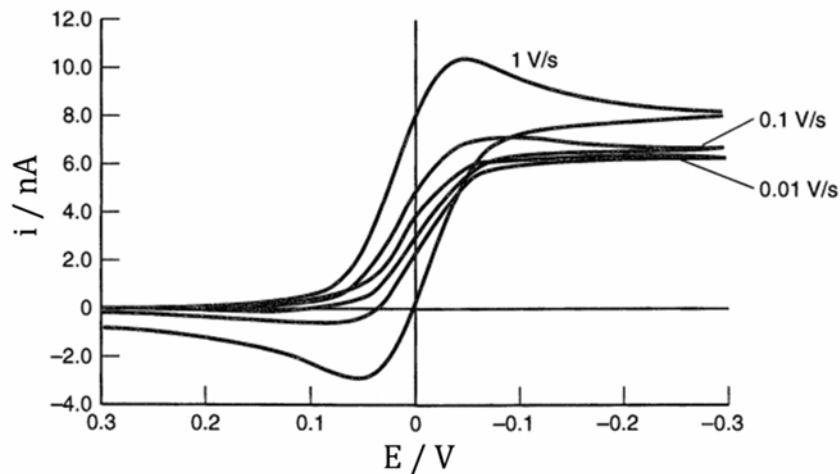


Figura 2. 3. Efecto de la velocidad de barrido en el voltagrama cíclico para un microelectrodo de $10\mu\text{m}$ de radio. Adaptada de Ref 4.

De esta manera, para micro y nanoelectrodos la voltametría alcanza un estado estacionario independiente de la velocidad de barrido pero dependiente del tamaño del electrodo y de la profundidad de éste (en el caso de electrodos empotrados). En la Figura 2. 4, se muestran las expresiones para la corriente límite o de estado estacionario a la que se llega para diferentes formas de micro o nanoelectrodos.⁵

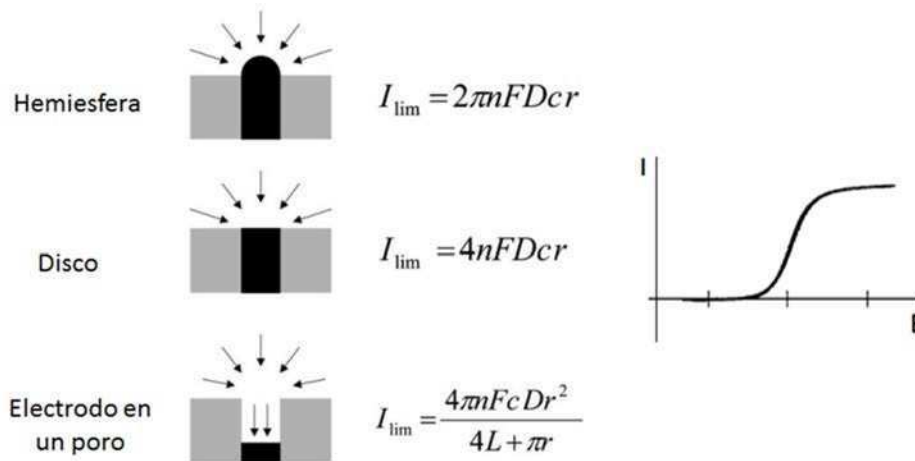


Figura 2. 4. Expresiones de la corriente límite para voltametrías cíclicas llevadas a cabo en micro-nanoelectrodos de diferentes formas. Adaptado de Ref 5.

En el caso de nanoelectrodos, cuyas dimensiones alcanzan valores similares al espesor de la doble capa (típicamente menores a 10nm), un tratamiento convencional que involucra un transporte exclusivamente controlado por difusión no es completo. Un tratamiento más preciso para el transporte de masa en este tipo de nanoelectrodos requiere consideraciones explícitas de la doble capa y sus efectos.⁶⁻⁸

2.2.1.5. Voltametría de onda cuadrada (SWV)⁹

La voltametría de onda cuadrada (*square wave voltammetry*, SWV) combina los mejores atributos de los métodos voltamétricos de pulso, una buena línea de base, la sensibilidad de la voltametría diferencial de pulso y la capacidad diagnóstica de la voltametría normal de pulso. También permite medir en un amplio rango de escala temporal como en el caso de las técnicas polarográficas de pulso.

Este tipo de voltametría puede ser interpretada como un caso particular de la voltametría diferencial de pulso donde el barrido de potencial no se realiza de forma lineal como en la voltametría cíclica, sino que se aplica un perfil caracterizado por pulsos de potencial de baja amplitud (Figura 2. 5). En esta técnica se toman dos medidas de corriente por cada pulso de potencial aplicado, la primera de ellas a tiempo τ' , inmediatamente antes del pulso, y la segundo a tiempo τ , justo antes de la finalización del pulso. En esta última medición, la corriente capacitiva, correspondiente a la carga de la doble capa, ya habrá caído a

zero, haciendo que la corriente medida sea netamente faradaica. De esta forma, la técnica gana sensibilidad respecto de las técnicas no pulsadas. El registro del experimento corresponde a un gráfico de la diferencia de corriente, $\delta i = i(\tau) - i(\tau')$ en función del potencial base, E .

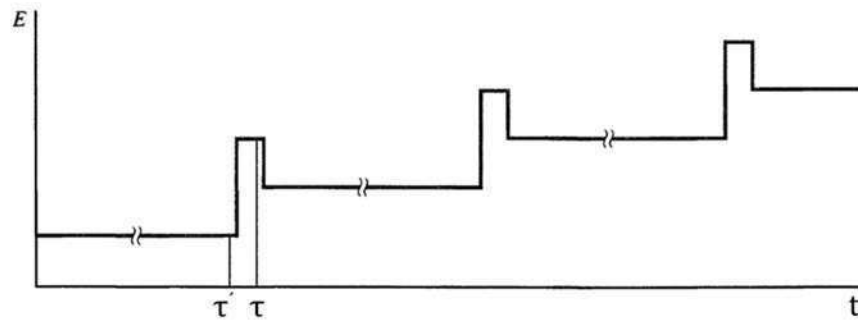


Figura 2. 5. Programa de potencial en un experimento de voltametría diferencial de pulso.

En particular, en la SWV, el período de preelectrólisis, τ' y el pulso son de igual duración, y éste tiene la dirección opuesta al barrido aplicado. La interpretación de los resultados se facilita considerando la forma de la onda como un barrido en estado estacionario, al cual se sobre impone un doble pulso simétrico, uno en la dirección directa y otro en la inversa, tal como se muestra en la Figura 2. 6.

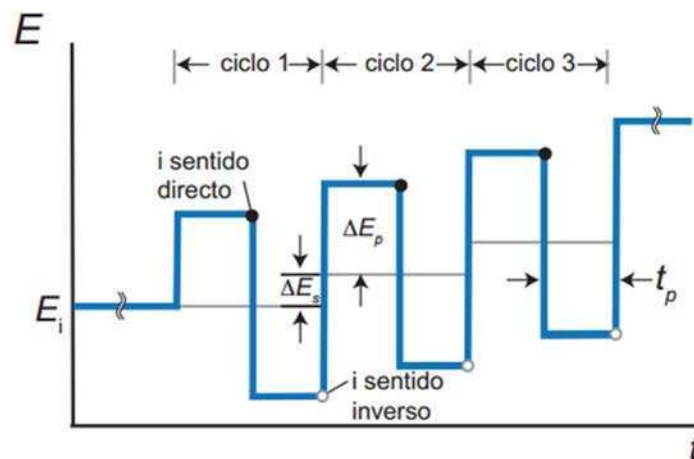


Figura 2. 6. Esquema de la forma del pulso y medición en SWV

La onda cuadrada se caracteriza por una altura de pulso ΔE_p y un ancho de pulso t_p , el cual puede ser expresado en términos de la frecuencia de onda cuadrada $f = \frac{1}{2} t_p$. El estado estacionario tiene un valor de ΔE_s al comienzo de cada ciclo, siendo la velocidad de barrido:

$$v = \frac{\Delta E_s}{2} t_s = f \Delta E_s \quad (2.9)$$

La corriente i se mide 2 veces por ciclo, al final de cada pulso. La corriente directa i_f se mide al comienzo del primer pulso de cada ciclo en la dirección del barrido. La corriente inversa i_r se mide al final del segundo pulso en la dirección opuesta. La diferencia entre ambas corrientes es

$$\Delta i = i_f - i_r \quad (2.10)$$

Dado que la capa difusional no se renueva al inicio de cada ciclo, la condición inicial de la misma es el resultado de su evolución en los pulsos previos. Dicha capa es función, no sólo de la forma de la onda aplicada, sino de la cinética y los procesos químicos asociados al electrodo. Sea nuevamente una reacción de electrodo con una cinética reversible: $O + ne \rightarrow R$ donde la solución contiene sólo la especie O. El potencial inicial E_i se selecciona a un valor más positivo que E° de modo que el perfil de concentraciones sea uniforme al inicio del barrido. El experimento es suficientemente rápido para considerar un comportamiento de difusión lineal seminfinita de modo que vale la segunda ley de Fick para ambas especies O y R. La forma de la onda de potencial aplicado se relaciona con la concentración a través de la ecuación de Nernst. Se considera dicha onda como una serie de ciclos sucesivos desde $m=1$ en adelante. El voltograma alcanza un máximo en

$$E_{1/2} = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_R}{D_O} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.11)$$

y tiene una corriente pico adimensional, $\Delta \Psi_p$, que depende de n , ΔE_p y ΔE_s como se muestra en la Figura 2. 7.

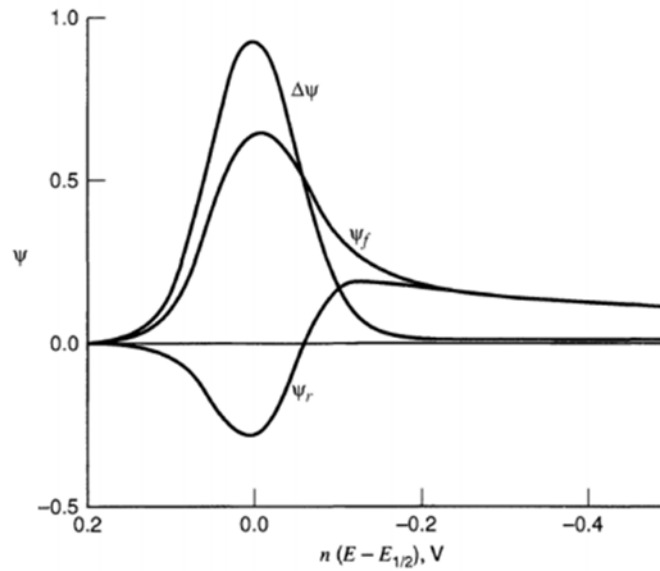


Figura 2. 7. SWV para una cupla O/R reversible, inicialmente $R = 0$, ψ_f corriente directa, ψ_r corriente inversa, $\Delta\psi$ diferencia. Ref 9.

La expresión para Δi_p es:

$$\Delta i_p = \frac{nFAD_0^{1/2}C_0^*}{\pi^{1/2}t_p^{1/2}} \Delta\psi_p \quad (2.12)$$

Como hemos mencionado, la voltametría cíclica, posee una gran capacidad diagnóstica especialmente cuando se analizan las corrientes directa e inversa. La ventaja de la técnica de SWV con respecto a CV, es la supresión de la corriente de base, por lo tanto, es posible medir a concentraciones menores que las requeridas para una voltametría cíclica. En un sentido amplio SWV es mejor que CV para evaluar concentraciones.

2.2.1.6. Espectroscopía electroquímica de impedancia (EIS)^{10,11}

Las técnicas descritas previamente aplican barridos de potencial, de diferentes formas, que llevan al electrodo a condiciones fuera del equilibrio, donde se observa su respuesta. Otra estrategia posible es perturbar el sistema con una señal alterna de magnitudes pequeñas y observar la forma en la que el sistema sigue esas perturbaciones, en el equilibrio o

en un estado estacionario. Este es el caso de EIS, donde la perturbación se realiza sobre el potencial aplicado siendo ésta de forma sinusoidal:

$$V_t = V_o \sin(2\pi ft) \quad (2.13)$$

donde V_t es el voltaje aplicado a un determinado tiempo t , V_o es la amplitud máxima del voltaje y f es la frecuencia en Hz. La respuesta en corriente obtenida también es sinusoidal a la misma frecuencia pero desplazada en fase:

$$I_t = I_o \sin(2\pi ft + \Phi) \quad (2.14)$$

donde I_t es la corriente a un determinado tiempo t , I_o es la amplitud de la corriente y Φ es el desplazamiento de fase de la corriente frente al voltaje aplicado.

La impedancia se define de manera análoga a la resistencia en el caso de un circuito de corriente continua como:

$$Z = \frac{V_t}{I_t} \quad (2.15)$$

A partir de esta definición, se observa que la impedancia tiene una magnitud $Z_o = V_o / I_o$ y un desplazamiento de fase Φ , que representa un balance entre la componente capacitiva y resistiva. En notación compleja la impedancia adquiere la forma:

$$Z = Z_o (\cos \Phi + j \sin \Phi) = Z_r + jZ_i \quad (2.16)$$

donde $j = \sqrt{-1}$ y Z_r es la parte real y Z_i la parte imaginaria de la impedancia.

La variación de la impedancia con la frecuencia se representa comúnmente de dos formas, mediante los llamados diagramas de Nyquist o de Bode, utilizando su carácter vectorial. En el diagrama de Bode se representa el ángulo de fase y el logaritmo de la magnitud de la impedancia frente al logaritmo de frecuencia. En los diagramas de Nyquist se representa la parte imaginaria de la impedancia frente a la real para diferentes valores de frecuencia.

El tratamiento de los datos obtenidos suele realizarse mediante la obtención de un circuito equivalente que reproduzca el espectro de impedancia alcanzado durante el experimento. Estos circuitos están formados por elementos eléctricos como resistencias, capacitores, etc, que representan el comportamiento de los procesos reales que ocurren en el

electrodo. Un circuito equivalente utilizado frecuentemente es el circuito de Randles que se representa en la Figura 2. 8 junto con el gráfico de Nysquit obtenido en este caso. Se introducen elementos en paralelo que implican que la corriente total que pasa a través de la superficie es la suma de diferentes contribuciones de los procesos faradaicos y de la carga de la doble capa. La doble capa suele representarse como un capacitor puro, C_d . Una corrección que se hace en este trabajo de tesis es introducir un elemento de fase constante (CPE), teniendo en cuenta las desviaciones del comportamiento ideal de capacitor debidas a inhomogeneidades del sistema en estudio. Este elemento presenta la forma:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{(j\omega)^\alpha Y_0} \quad (2.17)$$

donde Y_0 es la capacidad y α es un coeficiente que vale 1 si el capacitor es ideal. Si bien, se puede relacionar este coeficiente con parámetros físicos (rugosidad de la superficie, distribución no homogénea de cargas, etc.) puede también pensarse como una corrección ya que en algunos casos no posee una explicación física intuitiva.

Por otro lado, al proceso faradaico se lo considera como una impedancia faradaica, Z_f , que en el circuito de Randles, comprende dos elementos en serie. Uno consiste en una resistencia pura, R_{te} , relacionada con la transferencia electrónica, y el otro es una impedancia de Warburg, Z_w , relacionada con el proceso de transporte de masa. Por último, la corriente pasa por la solución, introduciendo la resistencia de esta solución como otra resistencia en el circuito, R_Ω . Estos representan los elementos de los procesos más simples que pueden ocurrir en un proceso de electrodo. Luego, pueden introducirse nuevos elementos cuando otros procesos están involucrados.

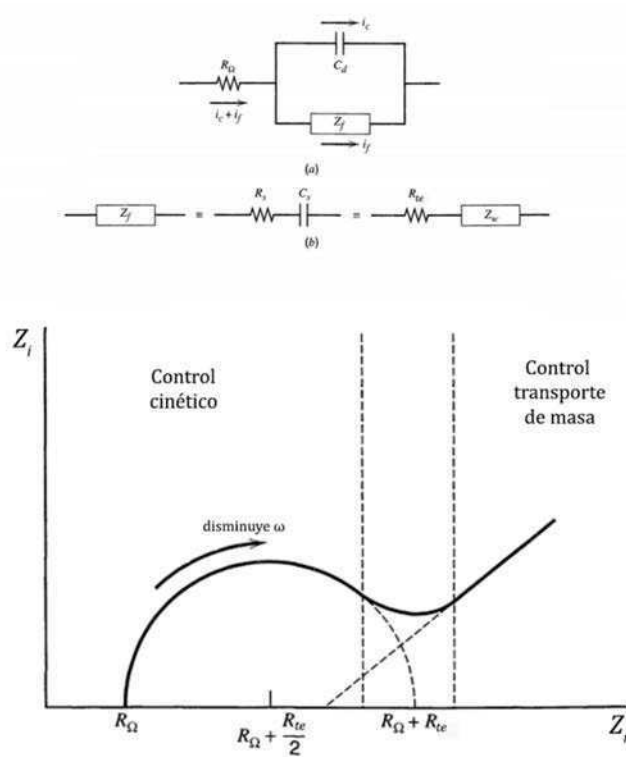


Figura 2. 8. Arriba: Representación del circuito equivalente para una celda electroquímica (circuito de Randles). Abajo: Gráfico de Nysquit obtenido para un sistema cuyo circuito equivalente es el circuito de Randles. Adaptado de Ref 10.

Para un sistema electroquímico descrito por este circuito, se pueden obtener las expresiones para la parte real e imaginaria de la impedancia de la siguiente manera:

$$Z_r = R_\Omega + \frac{R_{te} + \sigma\omega^{-1/2}}{(C_d\sigma\omega^{1/2} + 1)^2 + \omega^2 C_d^2 (R_{te} + \sigma\omega^{-1/2})^2} \quad (2.18)$$

$$Z_i = \frac{\omega C_d (R_{te} + \sigma\omega^{-1/2})^2 + \sigma\omega^{-1/2} (C_d\sigma\omega^{1/2} + 1)}{(C_d\sigma\omega^{1/2} + 1)^2 + \omega^2 C_d^2 (R_{te} + \sigma\omega^{-1/2})^2} \quad (2.19)$$

Resulta interesante estudiar que sucede en los casos límites de frecuencia. Cuando la frecuencias son muy chicas ($\omega \rightarrow 0$), al graficar Z_i vs Z_r el gráfico se vuelve lineal, ya que el sistema está controlado por la impedancia de Warburg, es decir, por el transporte de masa. Si el transporte de masa no es lineal, la forma de la curva cambia de acuerdo al tipo de

transporte que domine el proceso. En el caso de los sistemas que se desarrollaran en este trabajo de tesis, la difusión está gobernada muchas veces por una difusión radial.

A frecuencias altas, la impedancia de Warburg se vuelve despreciable, y el circuito puede representarse como se muestra en la Figura 2. 9. El gráfico de Nysquit adquiere forma de semicírculo.

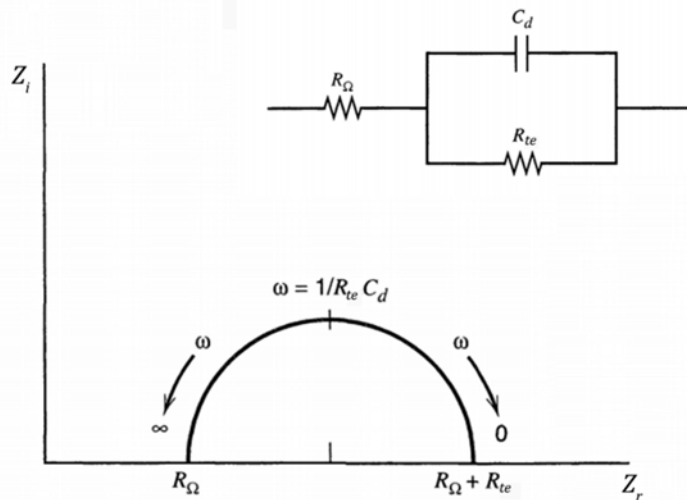


Figura 2. 9. Circuito equivalente y gráfico de Nysquit para un sistema donde la impedancia de Warburg es despreciable. Adaptado de Ref 10.

Dependiendo de las características del sistema químico, se encuentran diferentes comportamientos. Si el sistema presenta una cinética lenta, presentará una R_{te} grande, y existirá un rango de frecuencias muy pequeño donde el transporte de masa sea importante. Por el contrario, sistemas con cinética rápida tendrá un dominio del transporte de masa para un rango de frecuencias muy grande.

2.2.1.7. Instrumentación

Las técnicas electroquímicas se llevaron a cabo utilizando distinta instrumentación de acuerdo a los requerimientos de cada procedimiento, que se detallarán en cada Capítulo. Se utilizaron dos equipos comerciales, un potenciostato μ AUTOLAB type III, y potenciostato Gamry G300, ambos presentan los programas de adquisición y análisis. En el caso de los

ajustes de los gráficos de Nysquit de EIS se realizaron con el programa AnalystChem. En todos los casos se utilizó un electrodo de Ag/AgCl (sat) como referencia.

2.2.2. Técnicas de adsorción de rayos X (XAS)¹²

Las medidas de adsorción de rayos X fueron llevadas a cabo utilizando como fuente de radiación un sincrotron de tercera generación debido a su intensidad y a la tecnología de luz ajustable. Debido a que las fuentes de radiación sincrotron permiten la generación de luz monocromática, polarizada y de gran intensidad en un rango muy amplio de energías (desde unos pocos eV hasta varios keV), concentrado en una región muy pequeña del espacio, se presentan como una gran herramienta para el estudio de nanosistemas y en particular, para los desarrollados en el transcurso de este trabajo.

Los laboratorios de luz sincrotron constan de un anillo donde se mantienen las partículas cargadas en órbita a velocidades relativistas; las cuales son introducidas por el sistema de inyección, responsable de producir, acelerar e insertar electrones y positrones dentro del anillo en condiciones de ultra-alto vacío. Este anillo está constituido por cavidades de radiofrecuencia, que aumenta la energía de las partículas para compensar la pérdida de energía por la emisión de radiación; dipolos magnéticos, que permiten desviar las partículas y hacer que estas adquieran una trayectoria circular; y onduladores y *wigglers*, que consisten en un arreglo de imanes de polaridad alternada a través del cual el haz circula generando radiación X y optimizando las especificaciones del haz (energía, resolución espacial, estado de polarización) que se requiere para el experimento que se va a llevar a cabo.

Los fotones producidos en el anillo, son procesados por un conjunto de elementos ópticos que transforman la radiación de manera que tenga las características deseadas, en el rango de energías requerido, para una determinada aplicación. Estos elementos reflejan, enfocan y filtran la radiación, e involucran espejos, monocromadores, sistemas de vacío, etc.

En la Figura 2. 10, se muestra una foto del Laboratorio Nacional de Luz Síncrotron donde se llevaron a cabo las medidas realizadas en este trabajo de tesis.

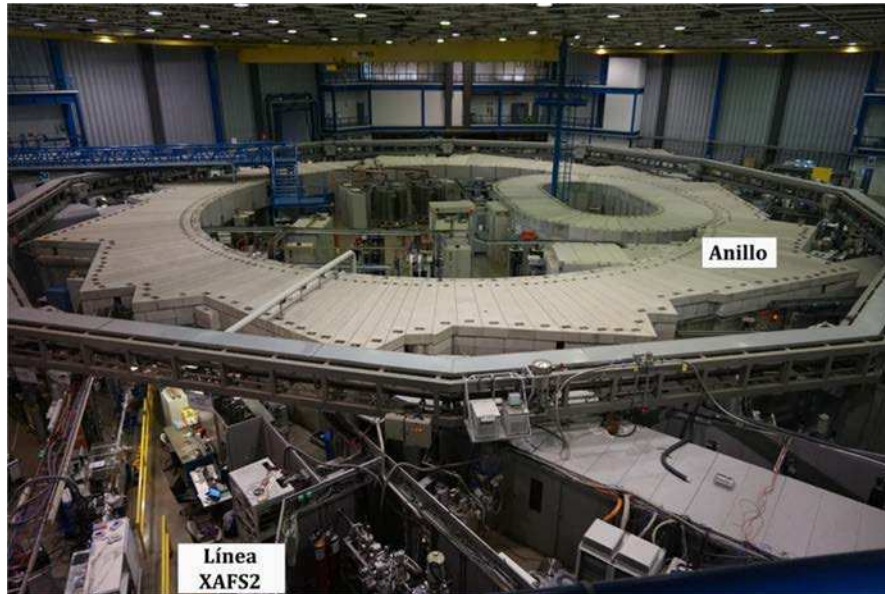


Figura 2. 10. Fotografía del Laboratorio Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) en Campinas- Brasil

2.2.2.1. Conceptos básicos

En las técnicas de absorción de rayos X, se mide la absorción de rayos X en función de la energía. Cuando el haz de fotones atraviesa la muestra decrece la intensidad incidente, I , en una cantidad relacionada con las características de absorción del material. La variación de la intensidad cuando el haz atraviesa una distancia dx , estará dada por:

$$dI = -\mu(E) I dx \quad (2.20)$$

siendo μ el coeficiente de absorción, el cual es función de la energía (E) de los fotones.

Al integrar la Ecuación (2.18) a lo largo de todo el espesor, se obtiene la ley de Lambert:

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad (2.21)$$

siendo I_0 la intensidad incidente e I la intensidad transmitida.

Cuando se grafica el coeficiente de absorción en función de la energía para una dada muestra, tres características principales pueden observarse en los espectros: a) un decrecimiento de la absorción al aumentar la energía del haz incidente; b) un abrupto crecimiento de la absorción a una energía particular; y c) una oscilación estructurada después del salto abrupto que modula la absorción.

La primer característica está en concordancia con los cálculos simples de la teoría semi-clásica, la cual predice una dependencia de $\mu(E) \sim E^{-3}$. Luego, la posición en energía del

salto observado en el coeficiente de absorción es específica de cada tipo de átomo que está absorbiendo el fotón, y, suele llamarse, borde de absorción. La energía de la radiación absorbida en los bordes corresponde a la energía de unión de los electrones de las capas más internas del átomo (K, L, M). La región cerca de este borde de absorción, llamada XANES (*X-ray absorption near edge structure*).

La tercer característica se denomina *X-ray absorption fine structure* (XAFS) y cuando se interpreta correctamente provee información estructural y electrónica del átomo absorbente. Las oscilaciones observadas de aproximadamente 30eV luego del borde de absorción corresponden a la región denominada EXAFS (*extended X-ray absorption fine structure*). Esta contiene información de la estructura atómica alrededor del átomo absorbente y combinada con modelos teóricos brinda información cuantitativa del tipo de átomos, número de coordinación, distancias interatómicas de las capas de átomos que rodean al átomo absorbente y del desorden estructural.

El espectro de absorción $\chi(E)$ (Figura 2. 11) se define como:

$$\chi(E) = \frac{\mu(E) - \mu_0(E)}{\Delta\mu_0} \quad (2.22)$$

donde $\mu_0(E)$ es la absorción atómica y $\Delta\mu_0$ es un factor de normalización.

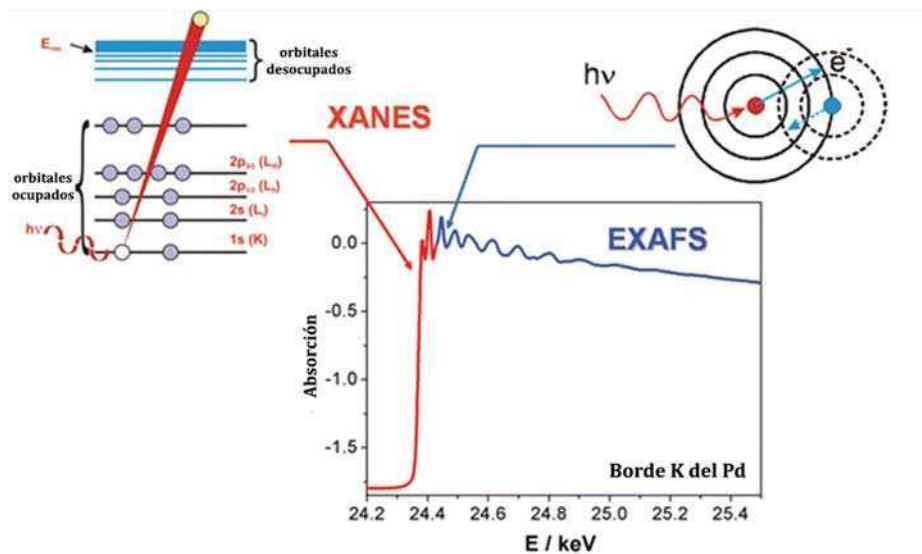


Figura 2. 11. Esquema del principio de la espectroscopía XANES y EXAFS. Adaptado de la Ref 13.

2.2.2.2. XANES (*X-ray absorption near edge structure*)

La región del espectro de absorción alrededor del borde de absorción, es la región XANES. Esta región provee información electrónica del átomo absorbente e información estructural de su entorno. La simetría y geometría del sitio del átomo absorbente, el estado de oxidación y la densidad de estados desocupados pueden estudiarse con esta técnica.

Esta región está asociada a procesos de excitación de electrones del núcleo del átomo (Figura 2. 11). Como la excitación involucra múltiples electrones y múltiples procesos de dispersión, la interpretación de los resultados es compleja y una teoría tan detallada como en EXAFS no está desarrollada. Por esta razón, tradicionalmente es una técnica del tipo huella-dactilar, donde los espectros de las muestras en estudio se comparan con los espectros de compuestos de referencia para correlacionar e interpretar los resultados. Sin embargo, en los últimos años, con el incremento del poder de cálculo de las computadoras algunas aproximaciones teóricas pueden hacerse y obtenerse así algunos parámetros cuantitativos.

2.2.2.3. EXAFS (*extended X-ray absorption fine structure*)

La región EXAFS puede interpretarse como un fenómeno de interferencia cuántica. El fotoelectrón que se producen de la excitación con rayos X, puede considerarse como una onda cuántica que viaja desde el átomo absorbente. A medida que se aleja de éste, encuentra obstáculos (átomos vecinos) y es reflejada hacia su origen. Las amplitudes de estas dos ondas pueden generar una interferencia constructiva o destructiva dependiendo de sus fases. Cómo cambian las fases con la longitud de onda del fotoelectrón depende de la distancia entre el átomo absorbente y los átomos que dispersan; mientras que la variación de la amplitud de la dispersión en función de la energía del fotoelectrón depende del tipo y de la cantidad de átomos vecinos. Así la oscilación EXAFS tiene información de la estructura local alrededor del átomo absorbente. Se han desarrollado teorías detalladas que permiten tener información cuantitativa de estos parámetros.

La teoría más simple está basada en la aproximación de dispersión única. Esta aproximación supone que el electrón es dispersado sólo una vez antes de volver al átomo absorbente (Figura 2. 12).

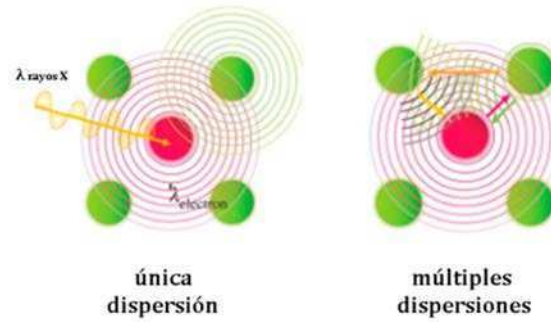


Figura 2. 12. Esquema de un sistema donde se considera una única dispersión (izquierda) y múltiples dispersiones (derecha). En rojo se muestra el átomo absorbente y en verde los átomos vecinos. Adaptado de Ref 13

Con este modelo, se llega a la siguiente expresión para las oscilaciones de EXAFS en el espacio de número de ondas del fotoelectrón generado, $\chi(k)$:

$$\chi(k) = \sum_i N_i f_i(k) \frac{\sin[2kr_i + \delta_i(k)]}{kr_i^2} e^{-2k^2\sigma_i^2} \quad (2.23)$$

donde $f_i(k)$ está relacionada con la amplitud de la dispersión del átomo i ; $2kr_i$ es el corrimiento de fases introducido al viajar la onda y el término $\delta_i(k)$ se suma como una corrección al corrimiento de la fase. El término σ_i^2 corresponde al factor de Debye-Waller, el cual tiene en cuenta vibraciones térmicas y desorden estructural.

Esta fórmula nos brinda una manera conveniente de parametrización para ajustar los datos experimentales a una estructura atómica local alrededor de un átomo central. Cada término corresponde a una capa de N_i átomos (se considera que cada capa está formada por el mismo tipo de átomos) localizados a una distancia R_i del átomo absorbente. El análisis del espectro de EXAFS requiere conocer los parámetros de la amplitud de dispersión $f_i(k)$ y el corrimiento de fase $\delta_i(k)$. Estos pueden extraerse de la transformada de Fourier del espectro EXAFS de componentes de referencia. Varios programas se han desarrollado para obtener estos parámetros, en particular, en este trabajo de tesis se utilizará el FEFF.

El número de coordinación de los primeros vecinos en nanopartículas es una función no lineal del diámetro de la partícula si estas son más chicas que 3-4nm. Esta propiedad es utilizada en el análisis de EXAFS para determinar el tamaño de las nanopartículas conociendo la forma de las mismas.^{13,14}

2.2.2.4. Instrumentación

Se midieron los espectros de absorción de rayos X en el borde L_3 del Au, K del Ni y L del Pt, a temperatura ambiente en modo fluorescencia en la línea XAFS2 del Laboratorio Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brazil (Figura 2. 13). Se utilizó una cámara de ionización para detectar el flujo incidente y un vector de estado sólido de germanio 15 como sensor de la señal de fluorescencia para la muestra. Los datos fueron procesados usando el algoritmo ATHENA.¹⁵ Se utilizó una lámina metálica de oro como referencia.

Las oscilaciones $\chi(k)$ EXAFS se extrajeron de los datos experimentales utilizando un procedimiento estándar con el programa ATHENA.¹⁵ Se realizó la transformada de Fourier de los datos de $\chi(k)$ pesados por k^2 , para mejorar las oscilaciones a altos k . La transformada de Fourier fue calculada usando la función de filtro de Hanning. El modelado de EXAFS fue llevado a cabo usando el programa ARTEMIS que es parte del paquete IFFEFIT.

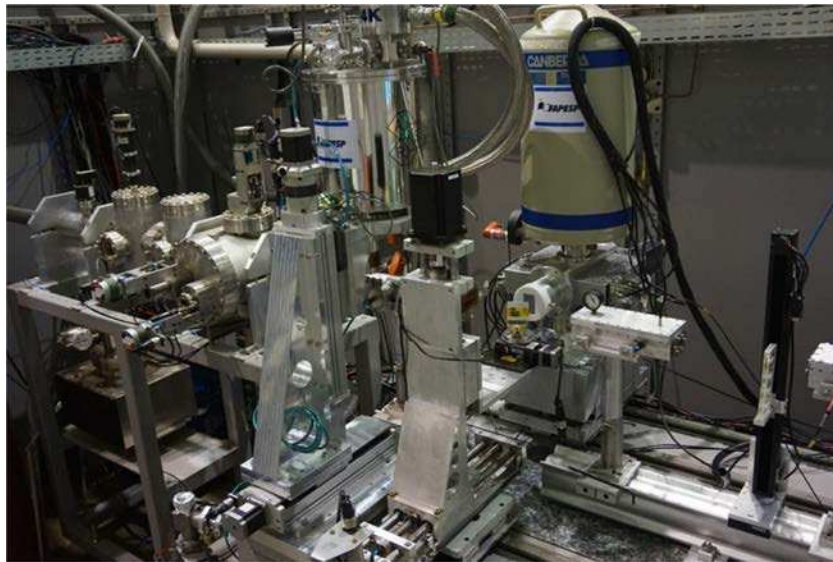


Figura 2. 13. Fotografía de la línea XAFS2 del Laboratorio Nacional de Luz Síncrotron.

2.2.3. Microbalanza de Cristal de Cuarzo con Disipación (QCM-D)

La microbalanza de Cristal de Cuarzo permite detectar la masa adsorbida sobre una superficie. Este método está basado en el efecto piezoeléctrico que presentan algunos materiales y que involucra la deformación de los mismos al aplicarles una diferencia de potencial.¹⁶ En QCM se emplea un cristal delgado de cuarzo con un electrodo metálico en cada

una de sus caras. Las propiedades piezoeléctricas del cuarzo son la base de su empleo como sensor gravimétrico, ya que la aplicación de una tensión eléctrica oscilante sobre un cristal de este material produce una deformación periódica en su estructura cristalina. Como cualquier otro oscilador, los cristales de cuarzo presentan una frecuencia de oscilación característica, es decir una frecuencia de resonancia. Al depositar cualquier material sobre la superficie de un cristal de cuarzo, esta frecuencia de resonancia varía, y la magnitud de esta variación es la señal que se utiliza para detectar cambios de masa. En el caso de una película acoplada rígidamente, existe una relación lineal entre su masa y la frecuencia de resonancia del cristal.¹⁷

$$\Delta F = -\frac{2 f_0^2 \Delta m}{\sqrt{\mu_q \rho_q} A} \quad (2.24)$$

donde ΔF es el cambio de frecuencia medido, f_0 la frecuencia resonante fundamental del cristal de cuarzo, Δm la masa de la película, A el área activa piezoeléctrica, ρ_q la densidad de cuarzo (2.648 g cm^{-3}) y μ_q el módulo de corte del cuarzo de corte AT ($2.947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-2}$). Esta ecuación (2.24), conocida como ecuación de Sauerbrey, relaciona los cambios en la frecuencia resonante ΔF con los cambios de masa adsorbida Δm , por unidad de área A , y vale si $\Delta F \ll f_0$ y si la capa está acoplada rígidamente al cristal, es decir si la onda acústica se propaga a igual velocidad en ambos medios.¹⁶ En caso de no cumplirse la última condición, es necesario considerar el espesor y las propiedades viscoelásticas de la película. Para tener en cuenta estos aspectos, modelos más sofisticados son necesarios, existiendo dos aproximaciones al problema: una aproximación consiste en seguir el decaimiento rápido de la oscilación del cristal de cuarzo luego de una breve excitación a una frecuencia cercana a la de resonancia, este decaimiento se analiza a través de un modelo viscoelástico;¹⁸ mientras que la otra analiza una serie de frecuencias cercanas a la de resonancia utilizando como modelo un circuito equivalente.¹⁶ En este trabajo, el equipamiento utilizado emplea el modo de excitación y viene provisto de un software para el análisis de la señal generada.

Por lo tanto, esta técnica permite el estudio de adsorción de especies sobre una superficie. En particular, si las especies que se adsorben presentan un alto peso molecular (como oligonucleótidos), los cambios en la superficie son apreciables y es posible cuantificar el número de moléculas que se adsorben y determinar el cubrimiento de la superficie.

2.2.3.1. Instrumentación

Los experimentos fueron realizados con un equipo Q-Sense Instrument (QCM-D, QSense E1, Suecia), provisto de un módulo para operar en flujo (Q-Sense Flow Module, QFM 401), Figura 2. 14. El volumen mínimo de muestra que requiere la celda de medición es de 300 μL . La celda de medición se ubica sobre una mesada antivibratoria. Para trabajar en flujo se empleó una bomba peristáltica ISMATEC, ISM 596D Glattbrugg, Switzerland. La adquisición y análisis de datos se realizó empleando el software con que es provisto el instrumento. Se usaron sensores comerciales que consisten en un cristal de cuarzo (5MHz, AT-cut) de geometría circular (14 mm de diámetro) con recubrimiento de Au de 0,3 mm pulido hasta lograr una rugosidad inferior a 3 nm (QSX 301). Inmediatamente antes de usar el sensor se limpia con O_3 y luz UV durante 15 min. Se midió la respuesta del sensor en el 3er sobretono debido a la mayor sensibilidad del equipo. La limpieza del sensor para su reutilización se hizo sumergiendo el mismo en una solución de $\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_3$ 25%: H_2O_2 100 v (5:1:1) a 75°C, 20 minutos, luego se enjuagó con H_2O MilliQ, y se secó con N_2 (g).



Figura 2. 14. Imagen del equipo Q-Sense Instrument (QCM-D, QSense E1)

2.2.4. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)¹⁹

La microscopía de fuerza atómica es de la familia de microscopías donde una sonda (punta) barre la superficie de una muestra, obteniéndose un mapa de las interacciones que

ocurren entre esta punta y la muestra; denominadas microscopías de sondas de barrido. Estas técnicas se caracterizan por permitir desplazamientos de hasta 150 μm en el plano, y 10-15 μm en altura. La resolución en altura está dada por la resolución de las cerámicas piezoeléctricas (de hasta 0.01 \AA); y además, permiten trabajar en medios muy variables: en aire, en atmósfera controlada, en vacío y ultra-alto vacío, altas/bajas temperaturas y líquidos.

El microscopio de fuerza atómica (AFM) consiste en un alero o *cantiléver* con una fina punta o *tip* al final, que se usa para recorrer la superficie de la muestra. El *cantiléver* es usualmente de algún derivado de silicio y la punta se encuentra formando una curvatura de radio del orden de nanómetros (Figura 2. 15). La técnica se basa en la medición de las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra. Cuando la punta 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, en AFM pueden medirse con precisión fuerzas mecánicas de contacto, fuerzas de Van der Waals, fuerzas capilares, fuerzas electrostáticas, de enlace, magnéticas o de solvatación, entre otras. También es posible medir 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 (Figura 2. 15). Otros métodos de detección posibles son la interferometría óptica o el de *cantilevers* piezoselectivos, aunque este es menos sensible.

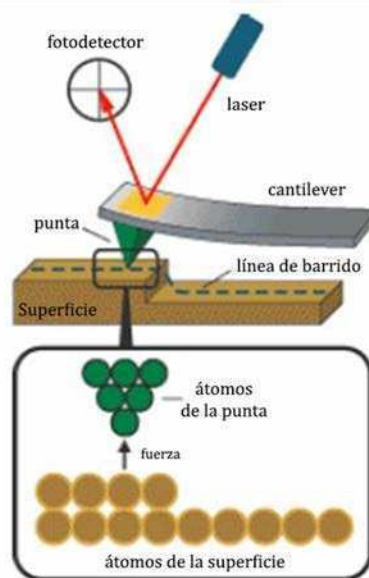


Figura 2. 15. Esquema del funcionamiento del microscopio de fuerza atómica.

El microscopio de fuerza atómica tiene diferentes modos de operación, los más usuales son el de contacto y no contacto. En el modo contacto, la punta mantiene un contacto físico suave con la muestra; mientras que en el modo no-contacto, se excita el cantilever cerca de su frecuencia de resonancia de modo que vibre cerca de la superficie de la muestra, a una distancia comprendida entre 10 y 100 Å, evitando deteriorar la superficie en la que se mide.

Por su resolución teórica del orden de 0.1 angstrom (siendo función de las características de la punta) así como por su versatilidad y su capacidad de no modificar la muestra, ésta fue una de las técnicas utilizadas en este trabajo para caracterizar los clusters metálicos.

2.2.4.1. Instrumentación

Las medidas de AFM en modo no-contacto se realizaron en un equipo XE-100 instrument (Park Systems Corporation) presente en el laboratorio NANOMAG, Universidad de Santiago de Compostela. Como soporte se emplea mica. En ella, se depositan 20µl de la suspensión acuosa de partículas. Se deja esta solución en contacto con la mica durante 2min y se lava con abundante agua para remover las sales que puedan adsorberse. Finalmente, se seca con N₂ y se mide.

2.2.5. Microscopía electrónica

Existen básicamente dos tipos de microscopios electrónicos: el Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) y el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). En ambas técnicas se incide sobre la muestra con un haz de electrones, pero mientras que en el TEM se observan los electrones que atraviesan la muestra, en el SEM se detectan los electrones reflejados o emitidos por la muestra. Estos últimos se clasifican en electrones retrodispersados y electrones secundarios. Los electrones secundarios se generan por la interacción del haz primario con la muestra y poseen energías mucho menores que éste (< 50 eV).²⁰ A diferencia del TEM, donde todos los electrones atraviesan la muestra en paralelo, en el SEM se recorre la muestra con un haz de electrones y se detecta la respuesta de la muestra en cada punto con detectores específicos. La intensidad medida en cada punto se emplea para construir una imagen de la muestra.

Los microscopios SEM cuentan con una fuente o cañón que emite los electrones, un cátodo que los acelera, un sistema de lentes electromagnéticas que enfoca el haz de electrones sobre la muestra y uno o más detectores que recogen los electrones reflejados o emitidos por la misma. Todos estos componentes y la muestra deben ubicarse en un sistema de alto vacío (1065 a 1067 Pa). Existen dos tipos de cañones de electrones, los termoiónicos y los de emisión de campo, que emplean respectivamente un filamento de tungsteno calentado a 2700 K aplicando campos eléctricos muy elevados ($> 109 \text{ V/m}$) para producir la emisión de los electrones que forman el haz. Los cañones de emisión de campo producen corrientes mayores, más estables y haces más monocromáticos que los termoiónicos y por lo tanto presentan mejor resolución, llegando en la actualidad a 0.5 nm .²⁰

Para evitar que la muestra se cargue electrostáticamente al irradiarla con el haz de electrones, esta debe ser conductora o debe ser recubierta con una fina capa metálica (debe metalizarse). En la actualidad los equipos cuentan con la posibilidad de examinar muestras no conductoras sacrificando en parte la resolución.

2.2.4.1. Instrumentación

Las imágenes SEM fueron adquiridas con un microscopio Zeiss DSM 982 GEMINI (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) perteneciente al Centro de Microscopías Avanzadas (CMA) de la FCEN-UBA. Este microscopio emplea un cañón de emisión de campo (FEG) y un detector de electrones secundarios (SE). Las muestras empleadas se colocaron sobre cinta bifaz de carbono para su observación. Se empleó un voltaje de aceleración de 5 kV.

2.2.6. Focus Ion Beam (FIB)

En el caso de los microscopios Focus Ion Beam las partículas aceleradas y enfocadas por el campo eléctrico son iones. El funcionamiento de éste es idéntico al del SEM sólo que al incidir con un haz de iones en la muestra, se puede modificar la superficie por el proceso de *sputtering*, removiendo parte de ésta. Controlando la energía y la intensidad del haz, este proceso puede controlarse a escala nanométrica. A su vez, es posible depositar materiales con una precisión similar, por deposición de vapor químico asistido por haz de iones (*ion beam assisted chemical vapor deposition*). Para ello, se inyecta una pequeña cantidad de un gas precursor específico en las cercanías del haz de iones, donde el haz los descompone, generando la deposición del producto en la superficie mientras que los productos volátiles se

extraen por el sistema de vacío. Estas características permiten manipular la muestra a escala nanométrica, siendo posible obtener lamelas muy finas (de nanómetros de espesor) que luego pueden analizarse por HR-TEM. En particular, los sistemas que poseen un haz de electrones y uno de iones, es decir, que pueden utilizarse como SEM y FIB, se denominan *Dual Beam*.

2.2.6.1. Instrumentación

Se obtuvieron lamelas de 50nm de espesor del sistema Al/Al₂O₃/Ni que se depositan en una grilla de TEM, a través del uso de un microscopio Dual-Beam del Centro de Apoyo Científico-Tecnológico á Investigación (CACTI) de la Universidad de Vigo, España.

Las lamelas se analizan utilizando un microscopio electrónico de transmisión-emisión de campo ultra de alta resolución (JEOL JEM-2010 FEG (200kv)) presente en el Centro de Apoyo Científico-Tecnológico á Investigación (CACTI) de la Universidad de Vigo, España.

2.2.7. Espectroscopía UV-vis

Se realizaron medidas de espectros de absorción en la región ultravioleta – visible (UV-Vis). Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Ocean Optics DT-Mini-2y utilizando una cubeta de cuarzo Hellma de 1cm de longitud de paso, a temperatura ambiente.

Esta técnica permitió seguir la cinética de la reacción de reducción tanto de azul de metileno como de 4-nitrofenol. En ambos casos, se siguió cómo varían los picos a 665nm y 400nm, respectivamente, en el tiempo. En el Capítulo 6 se detallan las condiciones experimentales utilizadas en ambos casos.

2.3. Modelo numérico

Los métodos numéricos son la herramienta indispensable para abordar problemas donde las ecuaciones que los describen resultan en un sistema de ecuaciones en derivadas parciales acopladas, o bien la geometría del problema implica la definición de un número alto de condiciones iniciales y condiciones de contorno, que impide la resolución analítica del problema. Los métodos numéricos resuelven el sistema de ecuaciones en puntos discretos llamados nodos y aproximan los valores de las variables entre estos puntos. Así, el primer paso en cualquier procedimiento numérico es la discretización; donde se divide el medio de

interés en un número de pequeñas subregiones y nodos. Para este tipo de problemas se emplean dos clases de métodos numéricos: método de las diferencias finitas y método de los elementos finitos.

En el caso del método de las diferencias finitas, la ecuación diferencial se escribe para cada nodo y sus derivadas son reemplazadas por diferencias sucesivas de las funciones aplicadas en los nodos, con ello se logra un conjunto de ecuaciones lineales simultáneas.²¹ Aunque este método es de fácil interpretación e implementación en problemas simples, se presentan dificultades al aplicarlo a geometrías complejas. En contraste, el método de los elementos finitos usa una formulación integral para crear un sistema de ecuaciones algebraicas. En éste se asume una función continua aproximada para representar la solución para cada elemento. La solución completa se genera conectando o armando las soluciones individuales, permitiendo la continuidad de los límites inter-elementales.

El método de elementos finitos se describe más en detalle en la siguiente sección y es el método que se utilizará en este trabajo para realizar las simulaciones.

2.3.1. Método de elementos finitos²²⁻²⁴

El método de los elementos finitos (MEF) es un método general para solución de sistemas de ecuaciones diferenciales en derivadas parciales asociadas a un problema físico sobre geometrías complicadas. El MEF puede ser usado en la simulación de sistemas físicos y biológicos complejos.

El método se basa en dividir el cuerpo, estructura o dominio (medio continuo), sobre el que están definidas ciertas ecuaciones integrales que caracterizan el comportamiento físico del problema, en una serie de subdominios no intersectantes entre sí, denominados “elementos finitos”. El conjunto de elementos finitos forma una partición del dominio también denominada discretización. Dentro de cada elemento se distinguen una serie de puntos representativos llamados “nodos”. Dos nodos son adyacentes si pertenecen al mismo elemento finito; además, un nodo sobre la frontera de un elemento finito puede pertenecer a varios elementos. El conjunto de nodos considerando sus relaciones de adyacencia se denomina “malla”. Los cálculos se realizan sobre una malla creada a partir del dominio con programas especiales llamados generadores de mallas, en una etapa previa a los cálculos, que se denomina pre-proceso. De acuerdo con estas relaciones de adyacencia o

conectividad se relaciona el valor de un conjunto de variables incógnitas definidas en cada nodo y denominadas grados de libertad. El conjunto de relaciones entre el valor de una determinada variable entre los nodos se puede escribir en forma de sistema de ecuaciones lineales (o linealizadas). La matriz de dicho sistema de ecuaciones se llama matriz de rigidez del sistema. El número de ecuaciones de dicho sistema es proporcional al número de nodos.

El método de los elementos finitos es muy usado debido a su generalidad y a la facilidad de introducir dominios de cálculo complejos (en dos o tres dimensiones). Una importante propiedad del método es la convergencia; si se consideran particiones de elementos finitos sucesivamente más finas, la solución numérica calculada converge rápidamente hacia la solución exacta del sistema de ecuaciones. Desde el punto de vista de la programación algorítmica modular las tareas necesarias para llevar a cabo un cálculo mediante un programa MEF se dividen en:

- Preproceso: que consiste en la definición de geometría, generación de la malla, las condiciones de contorno y asignación de propiedades a los materiales y otras condiciones. En ocasiones existen operaciones cosméticas de regularización de la malla y acondicionamiento para garantizar una mejor aproximación o una mejor convergencia del cálculo.
- Cálculo: el resultado del preproceso, en un problema simple no dependiente del tiempo, permite generar un conjunto de n ecuaciones y n incógnitas, que puede ser resuelto con cualquier algoritmo para la resolución de sistemas de ecuaciones lineales. Cuando el problema a tratar es un problema no lineal o un problema dependiente del tiempo a veces el cálculo consiste en una sucesión finita de sistemas de n ecuaciones y n incógnitas que deben resolverse una a continuación de otro, y cuya entrada depende del resultado del paso anterior (iteración).
- Post-proceso: el cálculo proporciona valores de cierto conjunto de funciones en los nodos de la malla que define la discretización, en el post-proceso se calculan magnitudes derivadas de los valores obtenidos para los nodos, y en ocasiones se aplican operaciones de suavizado, interpolación e incluso determinación de errores de aproximación.

Se utilizó un software comercial para el método de elementos finitos (COMSOL Multiphysics 3.4) para simular los experimentos de voltametría cíclica y los perfiles de concentración. El software fue ejecutado en una PC Intel Corel Duo, 4 GB de RAM, con sistema operativo Windows 7-

La descripción del sistema de ecuaciones, condiciones iniciales y de contorno, que se emplean para obtener los voltagramas cíclicos y los perfiles de concentración simulados de diferentes arreglos de nano o microelectrodos; junto con el arreglo geométrico empleado se desarrolla en detalle en el Capítulo 4. En todos los casos las dimensiones de la malla y número de nodos fueron optimizadas para el problema en estudio.

Referencias

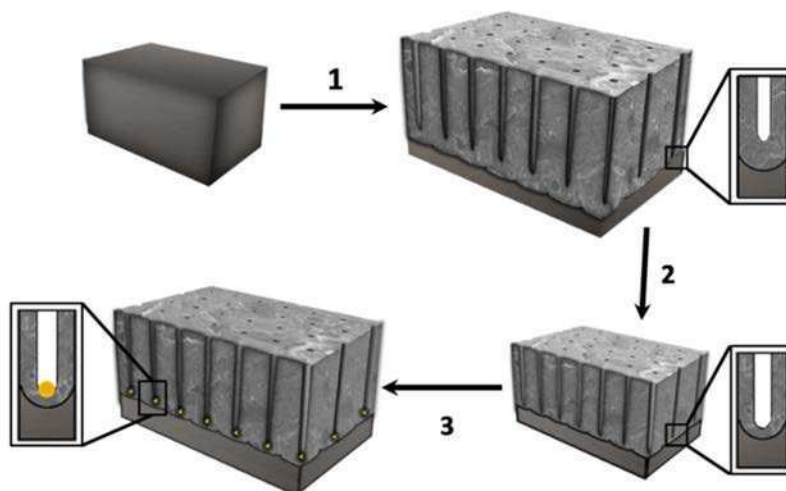
- (1) Bard, A.; Faulkner, L. Chapter 4: Mass Transfer by Migration and Diffusion. In *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; WILEY-VCH Verlag: New York, 2001.
- (2) Bard, A.; Faulkner, L. Chapter 2: Potentials and Thermodynamics of Cells. In *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; WILEY-VCH Verlag: New York, 2001.
- (3) Bard, A.; Faulkner, L. Chapter 15: Electrochemical Instrumentation. In *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; WILEY-VCH Verlag: New York, 2001.
- (4) Bard, A.; Faulkner, L. Chapter 6: Potential Sweep Methods. In *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; WILEY-VCH Verlag: New York, 2001.
- (5) Arrigan, D. W. M. Nanoelectrodes, Nanoelectrode Arrays and Their Applications. *Analyst* **2004**, *129* (12), 1157–1165.
- (6) Sun, Y.; Liu, Y.; Liang, Z.; Xiong, L.; Wang, A.; Chen, S. On the Applicability of Conventional Voltammetric Theory to Nanoscale Electrochemical Interfaces. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (22), 9878–9883.
- (7) Liu, Y.; He, R.; Zhang, Q.; Chen, S. Theory of Electrochemistry for Nanometer-Sized Disk Electrodes. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (24), 10812–10822.
- (8) Dickinson, E. J. F.; Compton, R. G. Diffuse Double Layer at Nanoelectrodes. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (41), 17585–17589.
- (9) Bard, A.; Faulkner, L. Chapter 7: Polarography And Pulse Voltammetry. In *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; WILEY-VCH Verlag: New York, 2001.
- (10) *Impedance Spectroscopy, Theory, Experiment, and Applications, Second Edition*, 2nd Edition.; Barsoukov, E., Macdonald, J. R., Eds.; Wiley: New York, 2005.
- (11) Bard, A.; Faulkner, L. Chapter 10: Techniques Based On Concepts Of Impedance. In *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; WILEY-VCH Verlag: New York, 2001.
- (12) Ramallo-López, J. M.; Requejo, F. G. X-Ray Absorption Fine Structure Studies of Fundamental Properties of Nanostructures. In *Recent Advances in Nanoscience*; Kerala, 2007; pp 162–201.
- (13) Ramallo-López, J. M.; Requejo, F. G.; Craievich, A. F.; Wei, J.; Avalos-Borja, M.; Iglesia, E. Complementary Methods for Cluster Size Distribution Measurements: Supported Platinum Nanoclusters in Methane Reforming Catalysts. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2005**, *228* (1–2), 299–307.
- (14) Chakroune, N.; Viau, G.; Ammar, S.; Poul, L.; Veautier, D.; Chehimi, M. M.; Mangeney, C.; Villain, F.; Fiévet, F. Acetate- and Thiol-Capped Monodisperse Ruthenium Nanoparticles: XPS, XAS, and HRTEM Studies. *Langmuir* **2005**, *21* (15), 6788–6796.
- (15) Ravel, B.; Newville, M. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: Data Analysis for X-Ray Absorption Spectroscopy Using IFEFFIT. *J. Synchrotron Radiat.* **2005**, *12* (4), 537–541.
- (16) Buttry, D. A.; Ward, M. D. Measurement of Interfacial Processes at Electrode Surfaces with the Electrochemical Quartz Crystal Microbalance. *Chem. Rev.* **1992**, *92* (6), 1355–1379.
- (17) Sauerbrey, G. Verwendung von Schwingquarzen Zur Wägung Dünner Schichten Und Zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Phys.* **1959**, *155* (2), 206–222.
- (18) Rodahl, M.; Höök, F.; Krozer, A.; Brzezinski, P.; Kasemo, B. Quartz Crystal Microbalance Setup for

Frequency and Q-factor Measurements in Gaseous and Liquid Environments. *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, *66* (7).

- (19) Meyer, E. Atomic Force Microscopy. *Prog. Surf. Sci.* **1992**, *41* (1), 3–49.
- (20) Goodhew, P. J.; Humphreys, J.; Beanland, R. *Electron Microscopy and Analysis*; Taylor & Francis: London, 2001.
- (21) Mazumder, S. Chapter 2 - The Finite Difference Method BT - Numerical Methods for Partial Differential Equations; Academic Press, 2016; pp 51–101.
- (22) Zhang, B.; Zhang, Y.; White, H. S. The Nanopore Electrode. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (21), 6229–6238.
- (23) Newman, J.; Thomas-Alyea, K. *Electrochemical Systems 3rd Ed.*; Wiley & Sons, 2004.
- (24) Zienkiewicz, O. C.; Taylor, R. L.; Zhu, J. Z. Chapter 1 - The Standard Discrete System and Origins of the Finite Element Method BT - The Finite Element Method: Its Basis and Fundamentals (Seventh Edition); Butterworth-Heinemann: Oxford, 2013; pp 1–20.

**Capítulo 3: Síntesis y
caracterización de nanopartículas
y clusters metálicos
(Al/Al₂O₃/Me)**

La utilización de matrices nanoporosas como molde para la síntesis de partículas permite obtener nanopartículas pequeñas/clusters metálicos confinados y libres de agentes estabilizantes a partir de la electrodeposición pulsada.



3.1. Introducción

En este capítulo se presenta un método para la síntesis de nanopartículas y clusters de metales de transición confinadas en nanoporos. La síntesis se basa en la reducción de iones de dichos elementos a través de un proceso catódico a corriente constante. El método se estudió en detalle para la obtención de nanopartículas/clusters de níquel y oro, debido a que presentan notables diferencias en su formación. En menor medida fue estudiado el platino, con características similares al oro.

De éstos elementos, existe una gran diferencia en la información disponible y en el estado del conocimiento para los casos de Au y Pt respecto a Ni, y más aún cuando se refiere a clusters que solo contienen átomos de Ni. En particular, se ha reportado la obtención de NiNPs cubiertas con moléculas orgánicas usando técnicas de microemulsión,¹ descomposición por laser² o la reducción de iones metálicos en presencia de varios ligandos incluyendo alquilaminas,³ alcanotioles,^{4,5} polímeros⁶ y surfactante.⁷ Estos ligandos orgánicos pasivan la superficie de las nanopartículas en crecimiento, permitiendo el control del diámetro de éstas y proveyéndole estabilidad. Utilizando estos métodos se alcanzan NPs con diámetros mayores a 5nm. Por otro lado, Crooks y colaboradores⁸ sintetizaron eficientemente NiNPs por reducción

de iones Ni dentro de dendrímeros y obtuvieron NPs con tamaños menores a 4nm; mientras que Alonso *et al.*⁹ obtuvieron NiNP menores a 2nm de diámetro usando litio como reductor en un solvente orgánico. Más recientemente, Vijayakrishna *et al.*¹⁰ sintetizó NiNPs estabilizadas en líquidos poliónicos mostrando diámetros entre 7 y 40nm; mientras que Calderon *et al.*¹¹ lograron obtener partículas de Ni de alrededor de 1nm de diámetro en coexistencia con alquiltiolatos a partir de la modificación del método de síntesis de Brust-Schiffrin. Por lo tanto, se puede afirmar que en la mayoría de los casos, la aproximación sintética para preparar materiales con dimensiones bien definidas por debajo de los 3nm es limitada.

Por otra parte, si bien la síntesis de nanopartículas y clusters de Au ha sido ampliamente estudiada, y su obtención sobre distintos tipos de soportes es posible,¹²⁻¹⁵ su aplicación como arreglos de nanoelectrodos ha sido principalmente estudiada a partir de su crecimiento como nanobarras en membranas de policarbonato, lo que implica un engorroso proceso de deposición vía electroless.¹⁶⁻¹⁹

En este contexto, la electrodeposición galvánica pulsada dentro de alúmina porosa en condiciones suaves donde pueda existir un control cinético es una muy buena estrategia para obtener clusters estables, libre de ligandos (*capping agents*), lo que facilitaría su posterior modificación y mantendría sus propiedades catalíticas y electroquímicas. Más aún, es posible cambiando la corriente de deposición y el tiempo del proceso de electrodeposición, obtener nanopartículas y nanobarras, logrando preparar estructuras bien definidas con dimensiones controladas y composiciones que de otra manera es muy difícil de obtener.

En este capítulo se describe en primer término la síntesis y caracterización de la matriz de alúmina porosa que se utilizará para el crecimiento de los distintos tipos de nanoestructuras. Posteriormente se presentan resultados correspondientes a la generación de dichas estructuras a partir de una corriente pulsada para distintos tipos de precursores: Ni, Au y Pt.

3.2. Experimental

3.2.1. Materiales

Todas las soluciones se realizaron utilizando agua Milli-Q (sistema Millipore). Todos los reactivos utilizados son de calidad analítica y se usaron sin pasos de purificación salvo que se indique lo contrario.

Se utilizó durante todo el trabajo de tesis aluminio de una aleación 1145, con una pureza del 99.5%, siendo el Fe y Si las principales impurezas y conteniendo trazas de Cu, Zn, Ti y Mn. Los ácidos usados en el electropulido y anodizado del aluminio, ácido perclórico 72% y ácido sulfúrico 98%, fueron obtenidos de Biopack; mientras que el etanol es calidad farmacopea.

Las electrodeposiciones de oro que se realizaron a partir del complejo con cianuro se llevaron a cabo a partir de un baño comercial de 15g L^{-1} $\text{KAu}(\text{CN})_2$ provisto por la empresa Vilmet (Argentina). Los demás reactivos empleados para las electrodeposiciones, ácido tetracloroaurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), sulfato de níquel ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cloruro de níquel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y ácido hexacloroplatínico (H_2PtCl_6) fueron adquiridas en Sigma-Aldrich.

3.2.2. Anodizado de aluminio

Se utilizaron electrodos de trabajo de 4mm^2 de aluminio 1145 (99.5%). Se realizó un pretratamiento del aluminio en el que se desgrasó la superficie en un baño de ultrasonido con acetona y luego se llevó a cabo un electropulido en una solución 5:1 etanol: HClO_4 (v:v) a 18V por 1min.

La superficie limpia se expuso inmediatamente a la solución del electrolito ácido a temperatura ambiente. Como electrolito ácido se utilizó H_2SO_4 15% p/p. Se realizó el anodizado aplicando un dado potencial (se estudiaron valores entre 10 y 25V) durante 1min, utilizando como contraelectrodo plomo, enfrentado al electrodo de trabajo. Una vez realizado el anodizado, se dejó en contacto con este electrolito durante 5min y se lavó con agua Milli-Q.

3.2.3. Electrodeposición de metales

La electrodeposición de los metales se llevó a cabo usando diferentes soluciones de sales del metal a depositar. Para el caso de oro, las soluciones usadas fueron: $\text{KAu}(\text{CN})_2$ 50mM a pH 6 y HAuCl_4 10mM a pH 4. En lo que respecta al Ni, se utilizó una sal mixta formada por 100g/L $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 45g/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 45g/L H_3BO_3 a pH 4.5. Para la deposición de platino se utilizó una solución de H_2PtCl_6 50mM a pH 5. El pH se ajustó usando soluciones de NaOH y HCl según el caso.

El aluminio anodizado y una placa de oro o Pt macizo se utilizaron como electrodo de trabajo y como contraelectrodo, respectivamente; mientras que como electrodo de referencia se usó un electrodo de Ag/AgCl. La electrodeposición de metales se realizó en 3 pasos: (i) Se aplicó una corriente catódica, típicamente -3mA cm^{-2} , durante 8ms, (ii) Se aplicó la misma corriente que en el caso anterior pero con signo contrario (corriente catódica) durante 2ms, (iii) no se aplicó corriente durante 500ms. Estos ciclos se repitieron una determinada cantidad veces, en general se realizaron 3000 ciclos.

3.2.4. Suspensión de partículas metálicas

Para obtener una dispersión acuosa de las partículas metálicas, se disolvió el óxido de aluminio poroso, en el que se encuentran soportadas, en NaOH 0.1M dejando en contacto el soporte con la solución básica durante 30min. La alúmina se disuelve quedando una solución con un alto contenido de aluminato de sodio.

Para las medidas de fluorescencia, se realizó una extracción desde la solución acuosa a una fase orgánica, usando cloroformo, con el objetivo de eliminar la interferencia de las sales.

3.2.5. Medidas electroquímicas - Voltametría cíclica (CV)

Las medidas electroquímicas se llevan a cabo utilizando un potenciostato Gamry G300 que posee un programa de adquisición de datos. Los electrodos Al/ Al_2O_3 /Au o Pt generados fueron caracterizados luego de su síntesis por la técnica de voltametría cíclica, utilizando éstos como electrodo de trabajo. Se utilizaron una malla de Pt como contraelectrodo, y un electrodo de Ag/AgCl como referencia. Se llevaron a cabo voltametrías en una solución que

contiene ferrocianuro de potasio 50mM a una velocidad de 50mV s^{-1} entre -0.1V y 0.4V , ya que por encima de este potencial se observa la oxidación del aluminio.

3.2.6. Micrografía

3.2.6.1. SEM

Las micrografías fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) Zeiss DSM 982 Gemini en el Centro Avanzado de Microscopías (CMA, Universidad de Buenos Aires). Las imágenes de perfil de Al_2O_3 porosa, se obtienen a partir de escamas que se depositan sobre una cinta conductora de carbono, a partir del raspado del material con un elemento cortante.

3.2.6.2. Microscopía Dual-Beam o FIB (Focus Ion Beam)

Se usó un microscopio Dual-Beam del Centro de Apoyo Científico-Tecnológico á Investigación (CACTI) de la Universidad de Vigo, España, para la obtención de lamelas de 50nm de espesor del sistema $\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Ni}$ depositadas en una grilla de TEM.

3.2.6.3. HR-TEM

Las lamelas de 50nm de espesor del sistema $\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Ni}$ obtenidas se analizaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión-emisión de campo ultra de alta resolución (JEOL JEM-2010 FEG (200kv)) presente en el Centro de Apoyo Científico-Tecnológico á Investigación (CACTI) de la Universidad de Vigo, España.

3.2.7. Técnicas de absorción de rayos X

Se midió el espectro de absorción de rayos X en el borde L3 del Au, K del Ni y L3 del Pt, a temperatura ambiente en modo fluorescencia en la línea XAFS2 del Laboratorio Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brazil). Se utilizó una cámara de ionización para detectar el flujo incidente y un vector de estado sólido de germanio 15 como sensor de la señal de fluorescencia para la muestra. Se utilizaron una lámina metálica de oro, níquel y platino como referencias según corresponda. Los datos fueron procesados usando el algoritmo ATHENA y el modelado de EXAFS se realizó usando el programa ARTEMIS que es parte del paquete IFFEFIT, según se detalla en la Sección 2.2.2.4.

3.2.8. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

Se utilizó un equipo XE-100 instrument (Park Systems Corporation) en modo no contacto para analizar las muestras soportadas sobre MICA. En ella, se depositaron 20 μ l de la suspensión acuosa de partículas producto de disolver la alúmina con NaOH 0.1M. Se dejó esta solución en contacto con la MICA durante 2min y se lavó con abundante agua para remover las sales que puedan adsorberse. Finalmente, se secó con N₂ y se realizó la medida. Los blancos se realizaron sólo con la Al₂O₃, sin depositar partículas.

3.2.9. Espectroscopía UV-vis y fluorescencia

Ambas espectroscopías se llevaron a cabo en una cubeta de cuarzo Hellma de 1cm de longitud de paso óptico; en la que se midieron las dispersiones acuosas de las partículas o en la fase orgánica, dependiendo del caso. Las medidas de UV-vis se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Ocean Optics DT-Mini-2 y las medidas de fluorescencias en un fluorímetro Cary Eclipse Varian.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Anodizado de aluminio - Al/Al₂O₃

El proceso de anodizado de aluminio consiste en aplicar un potencial constante durante un determinado tiempo en presencia de un electrolito ácido. Si se ajustan las condiciones en la que se realiza este proceso la alúmina se auto-organiza en un arreglo hexagonal de poros cilíndricos como se detalla en la Sección 1.3.1.

En este trabajo se utilizó ácido sulfúrico, de manera de poder obtener poros entre 6 y 20 nm, permitiendo así generar un ambiente confinado y en el mismo orden de magnitud que moléculas de interés biológico. Una vez definido el electrolito a utilizar, las características finales del arreglo de poros quedan determinadas principalmente por el potencial aplicado. En la Tabla 3. 1 se resumen los parámetros geométricos de la alúmina porosa sintetizada a diferentes potenciales. Los parámetros como diámetro de poro, distancia entre poros y espesor de la barrera de óxido, se determinaron a partir del análisis de imágenes SEM de distintas muestras (Figura 3. 1). Al realizar el anodizado en H₂SO₄ 15% aplicando potenciales entre 10 y 25V durante 1min a temperatura ambiente, es posible obtener arreglos

hexagonales de nanoporos con diámetros de poro entre 6 y 20nm. El análisis de las distintas estructuras generadas muestra que, para un mismo electrolito, el potencial aplicado define no sólo el diámetro de poro sino también la distancia entre poros y el espesor de la barrera de óxido que se forma en el fondo de estos, mientras que la profundidad siempre es $1\mu\text{m}$ (Tabla 3. 1 y Figura 3. 1). Por último, el crecimiento de la barrera de óxido está en concordancia con lo reportado en bibliografía (aproximadamente $1.2\text{nm}/\text{V}$).²⁰

Potencial aplicado / V	Diámetro de poro / nm	Distancia interporo / nm	Espesor barrera de óxido / nm
10	6.3 ± 0.7	19 ± 3	11 ± 3
15	11 ± 1	35 ± 4	15 ± 2
25	18 ± 2	55 ± 4	24 ± 2

Tabla 3. 1. Valores de diámetro de poro, distancia interporo y espesor de la barrera de óxido para los distintos potenciales aplicados, utilizando como electrolito H_2SO_4 15%. Determinaciones realizadas por microscopias de barrido electrónico.

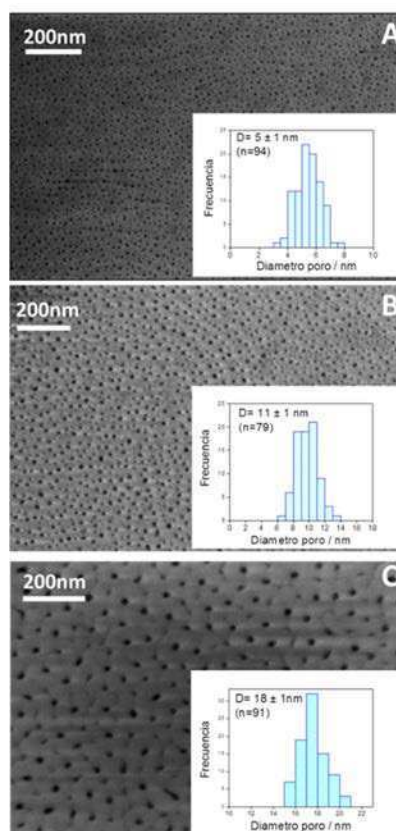


Figura 3. 1 Imágenes SEM de la superficie de alúmina porosa generada por anodizado de aluminio usando H_2SO_4 15% como electrolito y aplicando 10V (A), 15V (B) y 25V (C), durante 1min a temperatura ambiente.

El tiempo durante el cual se hace el anodizado determina la profundidad de los poros, al aumentar el tiempo aumenta la profundidad. En todos los casos que se mostró en la Tabla 3. 1 el tiempo utilizado fue 1min, siendo la profundidad de todos ellos $1.0 \pm 0.1\mu\text{m}$ (Figura 3. 2). Otros parámetros como la temperatura y la concentración del ácido sulfúrico no tienen un efecto tan marcado en el auto-ordenamiento de los poros. El aumento de temperatura induce una mayor velocidad de crecimiento y, por lo tanto, una estructura porosa menos ordenada, por esto suele trabajarse a temperaturas bajas ($0-4^{\circ}\text{C}$). Sin embargo, como el tamaño de poro no depende fuertemente de este parámetro de síntesis, como se ha estudiado en trabajos anteriores,²¹⁻²³ y, en nuestro caso, el orden de los poros alcanzados a temperatura ambiente es suficiente para las aplicaciones buscadas, se priorizó obtener un método más simple y rápido.

Los pretratamientos que se realizan sobre la superficie del aluminio antes de llevar a cabo el anodizado también influyen en la morfología y estructura del óxido poroso que se forma finalmente. En este trabajo se realizó el electropulido del aluminio a 18V en Etanol:HClO₄ 5:1. Se han reportado diferentes métodos de pulido dentro de los que se incluyen el electropulido, el pulido mecánico y los ataques químicos. Tanto en la bibliografía como en los resultados del presente trabajo se observa que las estructuras más ordenadas con canales cilíndricos y paralelos se alcanzan partiendo de una superficie electropulida. Más aún, se observa que en estos casos los poros obtenidos son más pequeños, una de las características buscadas.^{24,25}

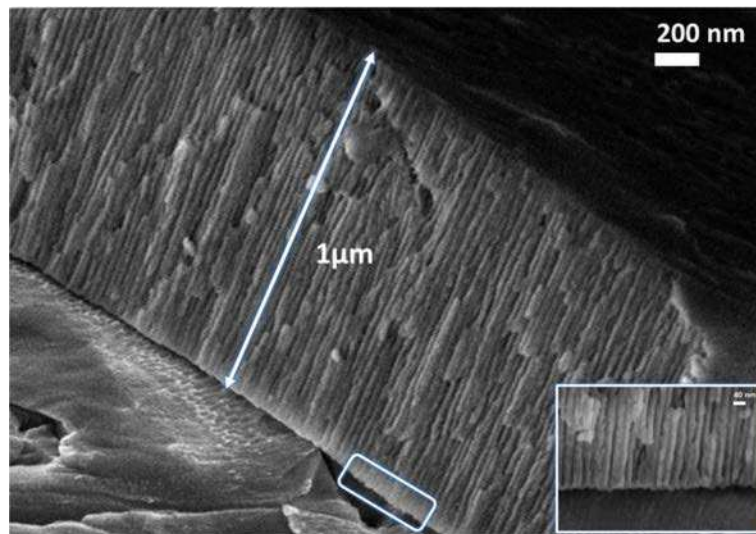


Figura 3. 2. Imagen SEM del perfil de alúmina porosa obtenida por anodizado de aluminio usando H₂SO₄ 15% como electrolito y aplicando 15V durante 1min a temperatura ambiente. En el recuadro se muestra una imagen ampliada del fondo de los poros.

En conclusión, el anodizado de aluminio representa un método muy simple con el cual es posible obtener un arreglo de poros ordenados con diámetros del orden de algunos nanómetros de forma reproducible. Esta matriz de alúmina, que presenta un arreglo hexagonal de poros, se utilizó como molde para la posterior síntesis de partículas metálicas.

3.3.2. Electrodeposición de metales - Al/Al₂O₃/Me

La síntesis de nanomateriales en fase heterogénea permite obtener partículas autosoportadas y con superficies activas, sin necesidad de agregar agentes estabilizantes que se adsorben en su superficie. A su vez, este método de síntesis permite lograr un gran control del tamaño.

El método elegido para realizar la deposición de partículas metálicas es la electrodeposición galvanostática pulsada. Se utiliza el soporte de aluminio anodizado en una de sus caras (Al/Al₂O₃) como electrodo de trabajo. Si bien una barrera de óxido, típicamente de 10nm de espesor, queda entre el aluminio y el electrolito, ésta no genera una resistencia significativa al paso de corriente. Este electrodo se introduce en un electrolito que contiene el precursor del metal que se busca depositar. Para evitar el ataque del medio a la alúmina, el pH de esta solución debe ser mayor a 3, pH por debajo del cual la alúmina se disuelve. A su vez, se busca que la concentración de la sal sea alta para poder suministrar la mayor cantidad de iones en la superficie y así evitar que la reducción de protones se vuelva la reacción predominante.

El ciclo de pulsos consta de 3 pasos. El primer paso consiste en aplicar una corriente catódica durante 8ms. Durante este tiempo se genera la deposición del metal en el fondo de los poros, donde el potencial es tal que permite la reducción de los iones. En el siguiente paso, se aplica una corriente de igual magnitud pero de signo contrario, durante un período muy corto (2ms). Este paso cambia la polaridad de la interfase. Finalmente, para permitir la recuperación de la concentración de iones en el fondo de los poros por difusión desde la solución, no se aplica corriente durante 500ms. Este ciclo se repite varias veces, típicamente 3000 en nuestras medidas. En la Figura 3. 3 se muestran las curvas de densidad de corriente vs tiempo y cómo varía el potencial en el tiempo en dos ciclos consecutivos.

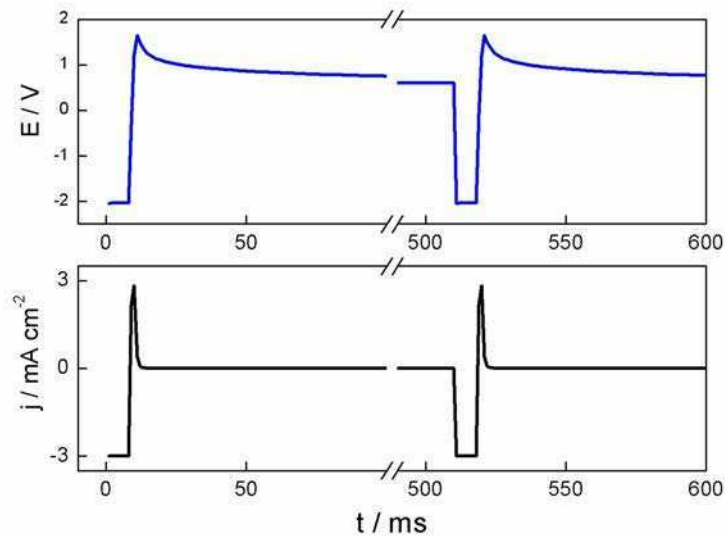


Figura 3. 3. Variación del potencial y la densidad de corriente en el tiempo a lo largo de dos ciclos de electrodeposición pulsada.

La densidad de corriente es uno de los principales parámetros de la electrodeposición que se modificaron para lograr el control de las nanoestructuras metálicas formadas. En muchos de los casos, se emplearon corrientes bajas en relación a las utilizadas en los trabajos de Gösele y colaboradores,^{20,26} debido a que se buscó un control cinético que permitiera obtener clusters metálicos.

3.3.2.1. Al/Al₂O₃/Ni

3.3.2.1.1. Síntesis y Caracterización

Se utilizó como matriz para generar la síntesis de clusters de Ni, el arreglo de poros hexagonales de alúmina de 11nm de diámetro, 35nm de distancia interporo y 1 μ m de profundidad. Se realiza la electrodeposición a partir de una solución de Ni(II) 0.75M a pH 4.5. Se aplicaron 3000 ciclos donde cada ciclo está formado por los siguientes 3 pasos: i) -3mA cm⁻² por 8ms, (ii) 3mA cm⁻² por 2ms, (iii) no se aplica corriente por 500ms. Luego de aplicar los 3000 ciclos no se observan cambios en el aspecto de la alúmina en contraposición con otros métodos, donde la deposición de níquel dentro de alúmina se utiliza para darle color.²⁰

Para la determinación de la morfología del sistema, se utilizó como primera técnica de caracterización la microscopía electrónica de barrido (SEM). Al hacer un corte transversal de la alúmina, no se observó ninguna evidencia de la presencia de Ni.

La caracterización *in situ* de las partículas de Ni que se forman se logró a partir de técnicas de absorción de rayos X llevadas a cabo en el Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS, Campinas, Brasil). El tamaño de las partículas generadas se determinó por EXAFS (*Extended X-ray absorption fine structure spectroscopy*). Esta técnica provee información del número, tipo y distancia entre vecinos de un átomo de Ni central sin alterar la geometría de la muestra. En la Figura 3. 4 se muestran las oscilaciones EXAFS en el borde K de Ni de la muestra de Al/Al₂O₃/Ni y de una referencia de Ni macizo. En ambos casos, las oscilaciones son similares, confirmando que el estado de oxidación en las partículas de Ni es cero. A su vez, las oscilaciones se ven atenuadas en la muestra de los clusters de Ni indicando que el número de átomos involucrados es muy pequeño.

En la Figura 3. 4, y en la Tabla 3. 2, se puede observar la correspondiente transformada de Fourier sin corrección de fases de los datos de EXAFS y su ajuste a las fórmulas teóricas de *scattering*, que permite estimar diferentes parámetros estructurales de las partículas de Ni como el número de coordinación (N), la distancia de enlace (R) y el desorden cuadrático medio (σ^2). Para la muestra Al/Al₂O₃/Ni se obtuvo sólo una capa de coordinación de Ni alrededor del átomo de Ni adsorbente. Un importante decrecimiento del número de coordinación medio ($N_{Ni-Ni} = 5.9 \pm 0.7$) respecto al Ni macizo ($N_{Ni-Ni} = 12$) indica que la mayoría de los átomos están localizados en la superficie y se encuentran coordinadamente insaturados. Esta disminución en el número de coordinación puede explicarse en términos del decrecimiento del tamaño de partícula. Las geometrías obtenidas por cálculos de DFT para clusters de Ni pequeños²⁷ permiten suponer que tienen una geometría esférica. Bajo esta aproximación, el tamaño de partícula medio puede estimarse a partir de una simple correlación con el número de coordinación medio.²⁸ El diámetro promedio obtenido de este modo es de 0.7 ± 0.1 nm, indicando que el níquel forma clusters pequeños de pocos átomos. El tamaño obtenido coincide con el tamaño estimado teóricamente para una estructura icosaédrica de 13 átomos.²⁹

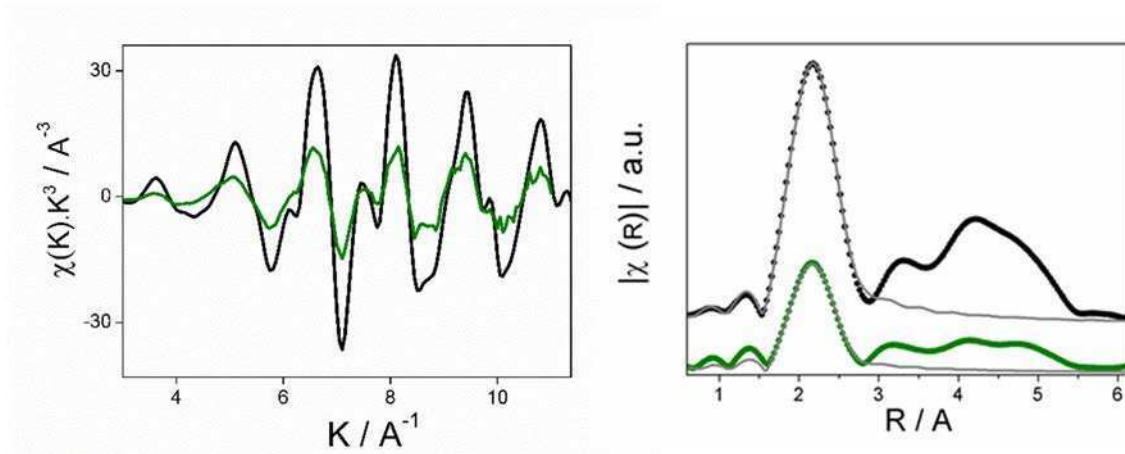


Figura 3. 4. Oscilaciones EXAFS (izquierda), transformada de Fourier de las oscilaciones EXAFS (derecha) y sus ajustes (línea gris), de la muestra Al/Al₂O₃/Ni (verde) y una referencia de Ni macizo (negro).

Muestra	N _{Ni-Ni}	R _{Ni-Ni} / Å	D _{NPs} / nm
Ni metálico	12*	2.484 (4)	-
Al/Al ₂ O ₃ /Ni	5.9 (7)	2.49 (1)	0.7 (1)

Tabla 3. 2. Parámetros estructurales (número de coordinación promedio (N), distancia interatómica (R) y factor de Debye-Waller (DWF), obtenidos para los ajustes de la señal EXAFS en el borde K del Ni. *Parámetro fijo.

Por otro lado, la región XANES (*X-ray absorption near edge structure*) del espectro de absorción brinda información de la densidad de estados desocupados del átomo absorbente estudiado. Por ello, las características del espectro en esta región están muy ligadas al estado electrónico del átomo sonda. Ya que no hay descripción teórica completa que explique el comportamiento de la región XANES, el estudio de esta región suele hacerse por comparación del espectro incógnita con el de una muestra de referencia conocida. Así, estos espectros puede considerarse como una huella dactilar y sus diferentes características dan información sobre el estado de oxidación y la estructura local de los átomos de Ni. La Figura 3. 5 muestra el espectro XANES en el borde K del Ni de una muestra de Al/Al₂O₃/Ni y de una referencia de Ni. Los resultados indican que el níquel electrogenerado en los nanoporos de alúmina se encuentra en forma de Ni con estado de oxidación cero y es resistente a la oxidación. Estos clusters de tamaño comparable a la longitud de onda de Fermi son conocidos por mostrar un comportamiento de tipo molécula, donde un gap HOMO-LUMO aparece en el nivel de Fermi de los clusters, como se describe en la Sección 1.2.1. Este band gap le confiere una alta

estabilidad frente a la oxidación.³⁰ Es importante remarcar que los clusters se mantuvieron en contacto con el aire durante un mes antes de realizar las medidas.

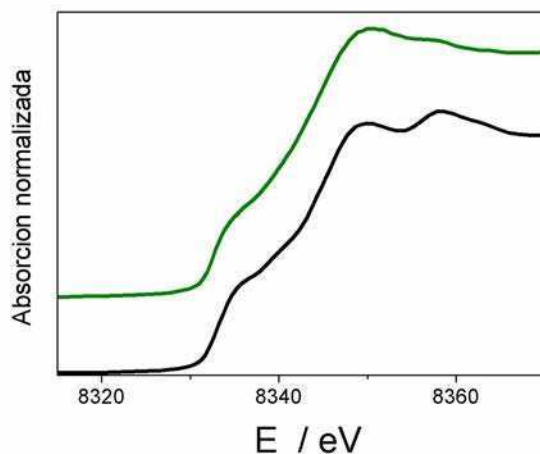


Figura 3. 5. Espectro XANES normalizado en el borde K del Ni de Al/Al₂O₃/Ni(verde) y de una referencia de Ni macizo(negro).

Para continuar con la caracterización, se disolvió la alúmina en una solución de NaOH 0.1M. Esto permite obtener una suspensión acuosa de los clusters de Ni. Sin embargo, estas dispersiones presentan dos problemas importantes. Por un lado, la concentración de partículas es muy baja, se pueden llegar a concentraciones en el orden de nanomolar. Una concentración mayor genera que las partículas se aglomeren y precipiten, debido a que no se agregó ningún estabilizante. Por otro lado, la concentración de sal de aluminato de sodio es muy alta, lo cual interfiere en las medidas de fluorescencia. En este caso, fue posible llevar a cabo una extracción de los clusters en cloroformo. En la Figura 3.6 se muestra el espectro de emisión ($\lambda_{exc}=230nm$) luego de la extracción. Se puede ver una banda a 360nm cuando los clusters de Ni están presentes y no en los blancos usados como referencia. Esta banda puede relacionarse también con la aparición del band gap HOMO-LUMO de los clusters, el cual es altamente dependiente del tamaño del mismo (el band gap aumenta a medida que el tamaño del cluster disminuye).

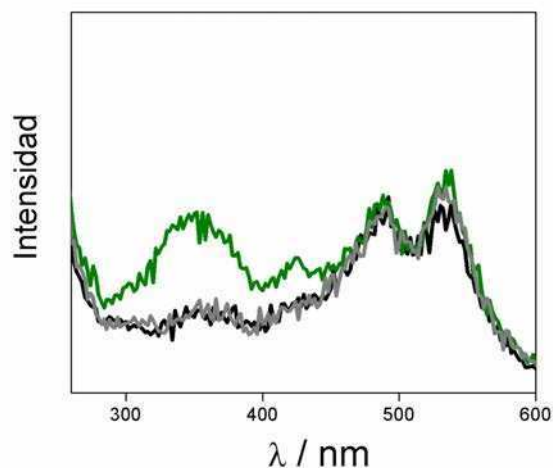


Figura 3.6. Espectro de emisión ($\lambda_{\text{exc}}=230\text{nm}$) de clusters de Ni (línea verde) extraídos en cloroformo. Como blancos, se muestran una solución de cloroformo (línea negra) y una extracción en cloroformo de una solución que sólo contenía alúmina (línea gris).

La suspensión acuosa también fue analizada por microscopía de fuerza atómica (AFM), depositando una gota de ésta sobre un sustrato de mica. Esta técnica tiene resolución atómica a lo largo del eje vertical, por lo que cambios en la altura pueden asociarse directamente con el diámetro del cluster. A su vez esta técnica no genera cambios en el material durante el análisis, por lo tanto es muy usada en el estudio de partículas muy pequeñas. En la Figura 3. 7 se muestra la topografía por AFM y los perfiles de las secciones verticales de diferentes clusters, donde pueden distinguirse clusters con alturas de $0.7 \pm 0.1\text{nm}$ ($n = 100$), no existiendo diferencias con lo obtenido por el ajuste de la señal EXAFS.

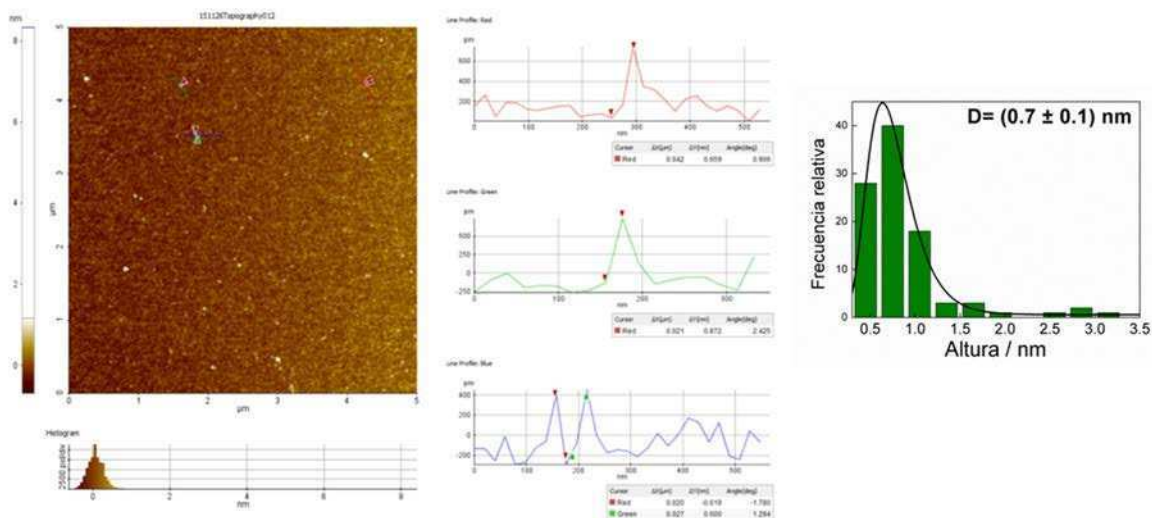


Figura 3. 7. Izquierda: Imágenes topográficas en modo NC-AFM de clusters de Ni depositados en sustratos de mica. Perfiles del análisis de las líneas marcadas en el imagen de AFM (medio) y el correspondiente histograma de la distribución de alturas (derecha).

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se utiliza tradicionalmente para obtener información del tamaño y forma de nanopartículas. No obstante, el estudio de clusters por esta técnica es muy limitado debido a que el efecto térmico del haz de electrones genera la fusión y la aglomeración de los clusters, resultando en partículas más grandes.^{31,32} Por otro lado, la espectrometría de masa es una técnica eficiente para el análisis del tamaño (número de átomos) y la composición de éstos. Más aún, recientemente se ha utilizado para determinar el estado de carga de los mismos y el mecanismo de crecimiento.³³ A partir de la suspensión de las partículas, se buscó caracterizar por MALDI-TOF y Electrospray (ESI) las nanoestructuras. Sin embargo, por la baja concentración de los clusters y el alto contenido de sales de la misma, no fue posible.

La exposición prolongada de clusters a un haz de electrones de alta energía produce la agregación de los mismos o que estos se fundan generando partículas de mayor tamaño.^{11,31} Por ello, aunque no se espera poder calcular el tamaño de los mismos en imágenes obtenidas por HR-TEM, es posible determinar la localización de éstos en la estructura porosa. En la Figura 3. 8 se muestran imágenes de HR-TEM de una lamela fina que se obtiene por la técnica de FIB (*Focus Ion Beam*). Se pueden ver en el fondo de los poros, nanopartículas metálicas pequeñas que se forman por la fusión de los clusters de Ni. Más aún, en la imagen con mayor aumento es posible diferenciar distintos planos en una partícula grande, indicando también la

formación de agregados de clusters. Otro hecho interesante que revelan las imágenes es que se pueden encontrar varios clusters por poro.

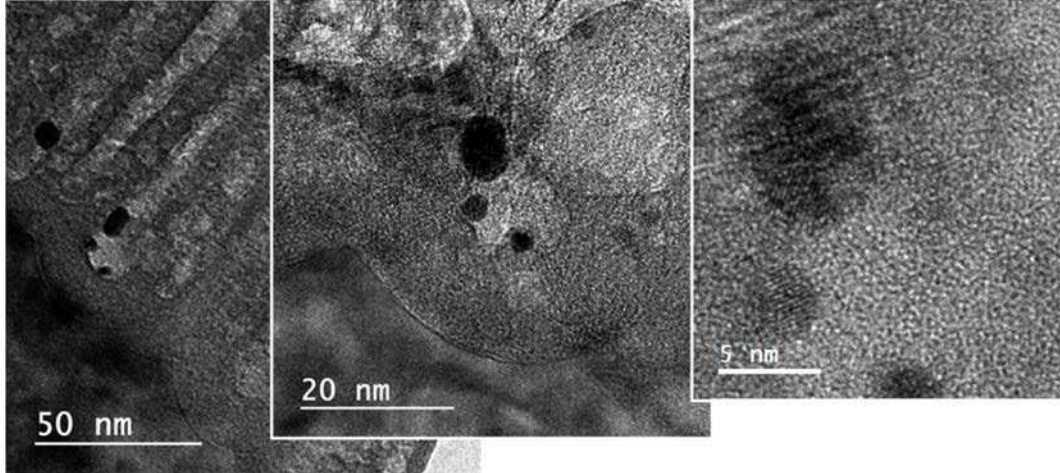


Figura 3. 8. Imagen HR-TEM del fondo de los poros de 11nm de diámetro con distintos aumentos al depositar Ni a -3mA cm^{-2} aplicando 3000pulsos.

3.3.2.1.2. Efecto de los parámetros de síntesis

3.3.2.1.2.1. Efecto del tamaño de poro

En la Tabla 3. 3 se muestran los valores de diámetro de clusters sintetizados en matrices de Al/Al₂O₃ con diferentes tamaños de poro (entre 6-20nm de diámetro). Estos clusters fueron sintetizados en las mismas condiciones de electrodeposición de Ni del caso descrito en la sección anterior y sus diámetros determinados por AFM. Contrario a lo esperado, se observa que el tamaño de los clusters que se obtienen no depende fuertemente del tamaño de poro. En la Figura 3. 9 se pueden ver los histogramas que presentan la distribución de tamaños de partículas de Ni obtenidos por AFM para cada uno de los tamaños de poro ensayados. En todos los casos, la mayoría de clusters que se forman son de tamaño entre 0.5 y 0.8nm de diámetro, mientras que en el caso de los poros de mayor tamaño ($D_{\text{poro}} = 18 \text{ nm}$) se encuentran también algunas nanopartículas más grandes. Esto podría indicar que parte de estos clusters pueden crecer para formar aglomerados de mayores dimensiones.

	$D_{\text{poro}}/\text{nm}$	$D_{\text{NPs}}/\text{nm (AFM)}$
Al/Al₂O₃/Ni	6.3 ± 0.7	0.5 ± 0.2
	11 ± 1	0.7 ± 0.1
	18 ± 2	1.2 ± 0.5

Tabla 3. 3. Valores de diámetro de clusters de Ni obtenidos por AFM para los sistemas Al/Al₂O₃/Ni sintetizados a partir de una solución de Ni²⁺ 0.75M usando una corriente de deposición de -3mA cm⁻² y 3000 ciclos, en matrices que presentan poros de distinto diámetro.

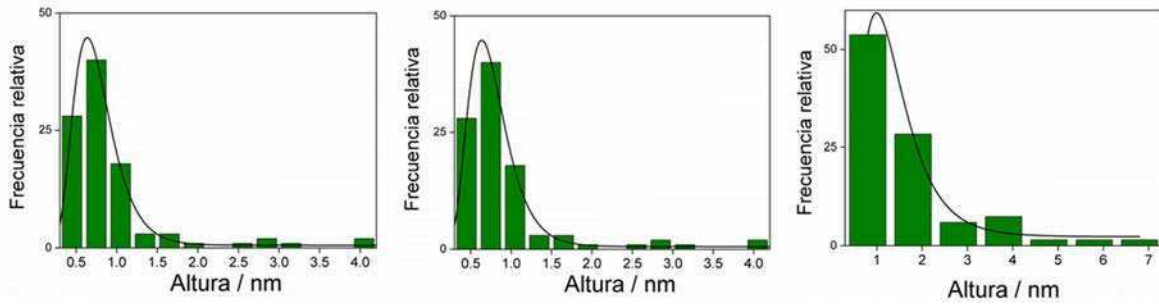


Figura 3. 9. Histogramas que presentan la distribución de alturas obtenidos por AFM para los sistemas Al/Al₂O₃/Ni sintetizados a partir de una solución de Ni²⁺ 0.75M usando como corriente de deposición-3mA cm⁻² y 3000 ciclos, en matrices que presentan poros de distinto tamaño.

3.3.2.1.2.2. Efecto de la corriente de deposición

Se estudió el efecto de la densidad de corriente en el proceso de electrodeposición de Ni. Para ello, en matrices porosas con poros de 11nm de diámetro, se realizó la deposición utilizando diferentes densidades de corriente y aplicando en todos los casos el mismo número de ciclos (3000 ciclos). Los histogramas de la distribución de alturas obtenidos a partir de imágenes de AFM y asociados al diámetro de las partículas de Ni generadas, se muestran en la Figura 3. 10, mientras que la Tabla 3. 4 resume los valores de diámetro promedios.

	$i_{\text{deposición}} / \text{mA cm}^{-2}$	$D_{\text{NPs}} / \text{nm (AFM)}$
Al/Al ₂ O ₃ /Ni	3	0.7 ± 0.1
	5	0.8 ± 0.1
	10	<1nm y 5 ± 2

Tabla 3. 4. Valores de diámetro de clusters de Ni obtenidos por AFM para los sistemas Al/Al₂O₃/Ni sintetizados a partir de una solución de Ni²⁺ 0.75M, aplicando 3000 ciclos y variando la corriente de deposición, en matrices que presentan poros de 11nm de diámetro.

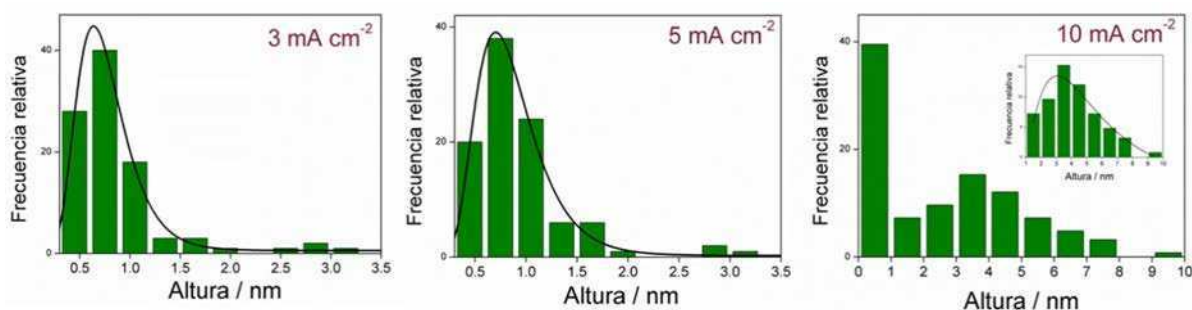


Figura 3. 10. Histograma de la distribución de alturas (n=100) obtenido a partir de imágenes AFM para tres muestras de Ni que se generan a diferentes corrientes de deposición (3, 5 y 10mA cm⁻²).

Es interesante notar que al incrementar la corriente aplicada de -3 a -5mA cm⁻² no se genera un cambio apreciable en el tamaño de los clusters, por lo que es probable que nuevos núcleos puedan formarse. Luego, al aumentar la corriente de deposición a -10 mA cm⁻², los clusters de Ni pueden crecer formando nanopartículas de 5 ± 2 nm de diámetro, debido a que los núcleos comienzan a colapsar en el fondo del poro confinado. El análisis de las imágenes de AFM de las partículas de Ni formadas en esta condición muestra que aún hay presente una gran cantidad de clusters de menos de 1nm en conjunto con las nanopartículas (Figura 3. 10). La presencia simultánea de las dos formas de agregados atómicos sugiere que al aumentar la corriente el número de clusters en el mismo poro crece facilitando la formación de partículas más grandes a partir del agregado de clusters más pequeños³⁴ y es posible que estos clusters catalicen el crecimiento de nanopartículas. Se ha reportado que los clusters pequeños (de 3 a 6 átomos) pueden adsorberse en las caras de las partículas y catalizar la reducción y el crecimiento guiado, por ejemplo de nanobarras de Au.^{35,36} Este podría ser el mecanismo de crecimiento también en el caso del Ni, donde ambos tipos de partículas están presentes simultáneamente.

El espectro XANES de las nanopartículas depositadas a corrientes altas muestra una contribución de NiO que no fue observada en el caso de los clusters (Figura 3. 11), indicando que estas nanopartículas se encuentran oxidadas, como es esperado para nanopartículas de Ni sin agentes protectores o que comienzan a tomar un carácter metálico. Se observa que los espectros de la forma oxidada y reducida de Ni son muy diferentes; en particular dos características sirven para identificar cuando una muestra de Ni está oxidada. En la Figura 3. 11 se observa que en la región cercana a los 8330 eV (zona 1) existe un “hombro” característico del Ni metálico el cual no aparece en los óxidos de este elemento. Por otra parte, en los espectros de absorción, en general, se observa un aumento de la “línea blanca” (zona 2) del espectro cuando aumenta el estado de oxidación del elemento absorbente. En este caso, hay un incremento en la absorción cuando el Ni está oxidado respecto a la muestra metálica. Estas dos marcas características se utilizan para determinar si una muestra de Ni se encuentra en estado metálico, oxidado o está en un estado intermedio. A partir de una combinación lineal de los espectros de referencia puede obtenerse una estimación cuantitativa de la fracción oxidada en la muestra preparada con una corriente de deposición de -10mA cm^{-2} , obteniéndose una composición 70% óxido – 30% Ni elemental.

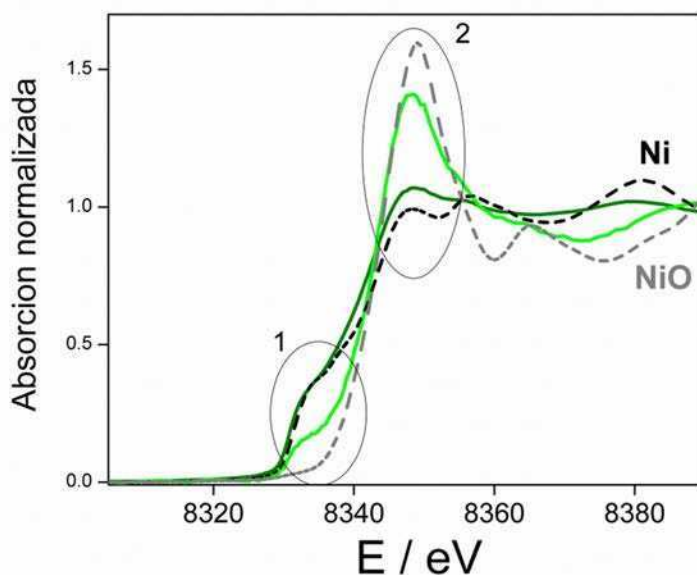


Figura 3. 11. Espectro XANES en el borde K del Ni de una muestra de Al/Al₂O₃/Ni generada a -3mA cm^{-2} (verde oscuro) y a -10mA cm^{-2} (verde claro) junto con dos referencias, Ni elemental (negro) y óxido de níquel (gris). Se marcan dos zonas que permiten distinguir si el Ni está oxidado.

Finalmente, a densidades de corriente mayores a -25mA cm^{-2} , se llenan los poros y se obtienen barras de Ni, cuya longitud puede regularse por el número de pulsos y la corriente aplicada similar a lo descrito por Gösele.^{20,26} En este caso, la formación de nanobarras está guiada por la estructura de los poros y su diámetro corresponde al diámetro del poro. En la Figura 3. 12 se muestran imágenes SEM, utilizando un detector (QBSD) que permite distinguir los elementos por peso atómico, resaltando la presencia de Ni en el óxido de aluminio. En esta figura se pueden ver los resultados cuando se utilizan corrientes de -25 mA cm^{-2} y -50 mA cm^{-2} , aplicando en ambos casos 3000 pulsos. Cuanto mayor es la corriente, mayor es la altura de las barras obtenidas, siendo $28 \pm 4\text{nm}$ y $50 \pm 7\text{nm}$ las alturas respectivas en estos dos últimos casos. Por otro lado, la longitud de la nanobarra que se obtiene también aumenta con el número de pulsos que se aplica. En la Tabla 3.5 se resumen los valores de las alturas obtenidas al utilizar una misma corriente y aumentar la cantidad de pulsos que se aplican, siendo el diámetro siempre igual al diámetro del poro. Por lo tanto, como es esperado, la longitud de la nanobarra es proporcional a la cantidad de carga que se hace circular.

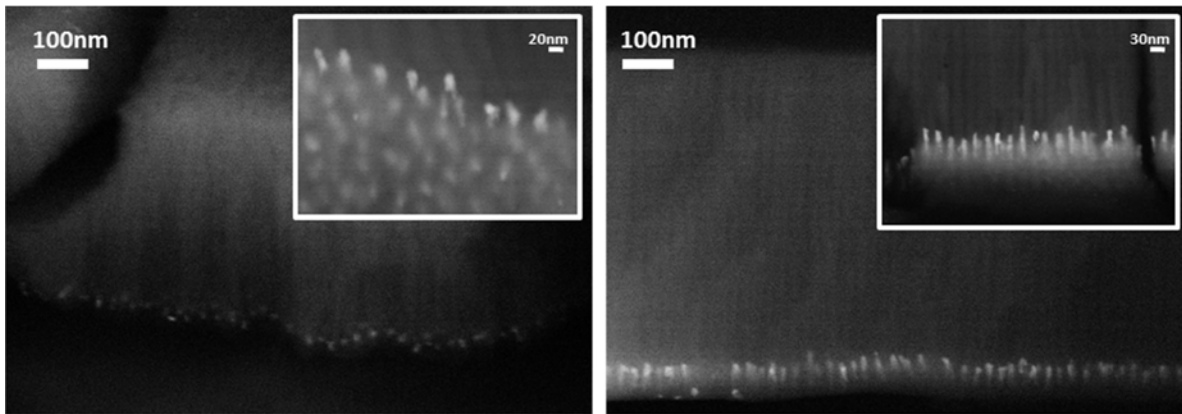


Figura 3. 12. Imágenes SEM del crecimiento de nanobarras de Ni. Se realiza la electrodeposición a -25mAcm^{-2} (izquierda) y a -50mAcm^{-2} (derecha) aplicando en cada caso 3000pulsos.

$i / \text{mA cm}^{-2}$	Nº Ciclos	Altura rod / nm
25	2000	23 ± 4
	3000	28 ± 3
	4000	31 ± 3
	8000	47 ± 5
50	3000	50 ± 7
	6000	65 ± 6

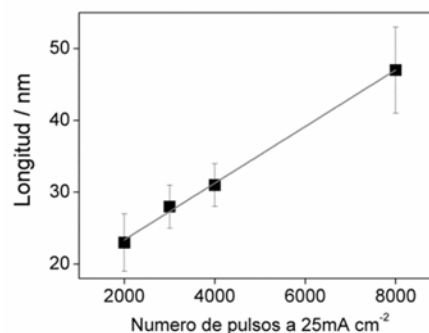


Tabla 3.5. Alturas de las nanobarras de Ni obtenidas a partir del análisis de imágenes SEM al realizar la electrodeposición a 25 y 50 mA cm⁻² y variar el número de ciclos. A la derecha se presenta como varía la longitud de estos en función del número de ciclos aplicados a 25mA cm⁻², junto con el ajuste lineal.

Por lo tanto, cambiando la densidad de corriente aplicada es posible obtener control del tamaño, desde clusters conteniendo menos de 15 átomos (a corriente bajas) hasta nanobarras que presentan el diámetro del poro (corrientes altas).

3.3.2.2. Al/Al₂O₃/Au

3.3.2.2.1. Síntesis y Caracterización

Se utilizó como precursor de oro una sal de KAu(CN)₂ 50mM a pH 6. Se aplicaron 3000 ciclos donde cada ciclo está formado por los siguientes 3 pasos: i) -3mA cm⁻² por 8ms, (ii) 3mA cm⁻² por 2ms, (iii) no se aplica corriente por 500ms. Estas condiciones son análogas a las presentadas en el caso del Ni, en la Sección 3.3.2.1.1.

Al sistema obtenido de esta manera se lo caracterizó a través de medidas electroquímicas utilizando como especie electroactiva ferrocianuro 50mM. Se muestra en la Figura 3. 13 la respuesta amperométrica de la voltametría cíclica a 50mV s⁻¹ utilizando como electrodo de trabajo un sustrato de aluminio (Al), aluminio anodizado en una de sus caras (Al/Al₂O₃) y, por último, alúmina luego de realizar la electrodeposición de oro (Al/Al₂O₃/Au). En presencia de oro se observa una señal al potencial esperado para el ferrocianuro, que presenta un comportamiento que se acerca al de nanoelectrodos, mientras que en el caso de sólo tener Al/Al₂O₃ no se observa una corriente apreciable debido a que la barrera de óxido actúa como una capa aislante. Recientemente, Fontaine et al.³⁷ han resumido los parámetros geométricos que necesitan ser controlados para dirigir el comportamiento de arreglos de nanoelectrodos, donde se incluyen la distancia interelectrodo, el radio de los nanoelectrodos y

la profundidad de los mismos. Dependiendo de la relación entre estos factores y la escala de tiempo del experimento (determinada por la velocidad de barrido), las curvas de voltametría cíclica adquieren diferentes formas. En el caso de la voltametría cíclica que se obtiene para el arreglo de nanoelectrodos de oro (Figura 3. 13), ésta presenta un comportamiento intermedio entre el esperado para una difusión típica de plano infinito y el comportamiento de estado estacionario que presentan los nanoelectrodos individuales con una fuerte contribución de difusión radial. En la esquina superior izquierda de la Figura 3. 13 se muestra un esquema del perfil de difusión donde se representa la superposición de las capas difusionales de los nanoelectrodos. Este tema se discute en detalle en el Capítulo 4.

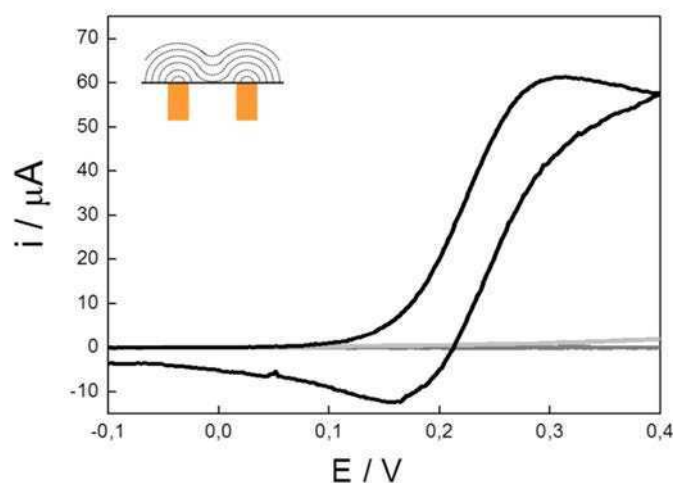


Figura 3. 13. Voltametría cíclica de ferrocianuro de potasio 50mM a 50mV s^{-1} en Al (gris claro), Al/Al₂O₃ (gris oscuro) y Al/Al₂O₃/Au (negro)

La caracterización electroquímica permite determinar la presencia de oro en la estructura, el cual está conectado eléctricamente con el aluminio y actúa como un arreglo de nanoelectrodos. Al igual que en el caso del Ni depositado a esta corriente, al hacer un corte transversal de la alúmina y analizar por SEM, no se ve ninguna evidencia de la presencia de oro. Por lo que podemos decir que las nanopartículas que se están formando deben ser muy pequeñas, menores a 4-5nm.

A partir de la disolución en NaOH 0.1M de la alúmina se obtuvo la suspensión de partículas de Au. Si bien, al igual que con el Ni, su concentración es baja mientras que el contenido de sal (aluminato de sodio) es muy alto, fue posible determinar el espectro de

absorción por espectroscopía UV-vis, que se muestra en la Figura 3. 14. Se puede ver que a diferencia del blanco (línea negra) que consistió en una solución acuosa de NaOH 0.1M donde se disolvió la misma cantidad de alúmina, en el caso de la suspensión de partículas de oro el espectro presenta dos hombros a 300 y 350nm. Por otro lado, no se observa la banda alrededor de 520nm correspondiente al plasmón superficial de la nanopartículas de oro esféricas,^{36,38} indicando que las partículas que se están formando tienen menos de 2 nm de diámetro. Además, como se desarrolla en la Sección 1.2.1., al aparecer bandas de absorción bien definidas, se puede afirmar que se trata de clusters grandes.

La separación de los clusters de oro de la sal de la solución se intentó por diferentes métodos que incluyeron centrifugación, filtrado y extracciones con solventes orgánicos pero estos métodos no resultaron eficientes. De esta manera, no fue posible llevar a cabo medidas por fluorescencia en este caso.

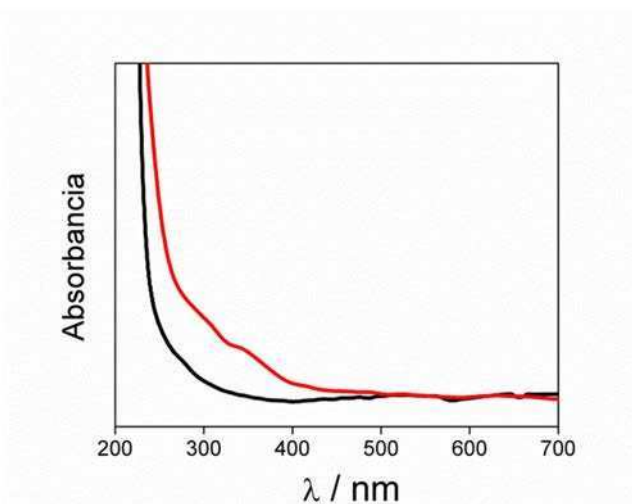


Figura 3. 14. Espectro de absorción UV-vis de una suspensión acuosa de partículas de oro (línea roja). En línea negra se muestra el espectro de absorción correspondiente a un blanco de alúmina en la cual no se ha depositado oro.

La caracterización *in situ* de las nanopartículas de oro dentro de la alúmina porosa fue posible, como en el caso del Ni, por técnicas de absorción de rayos X. En la Figura 3. 15 (A), se muestra el espectro XANES del borde L3 del Au para la muestra de Al/Al₂O₃/Au y para una referencia de oro macizo. A partir de la comparación de ambos espectros, podemos concluir que el Au en las nanopartículas se encuentra como oro metálico.

A su vez, el tamaño de las AuNPs generadas se determinó por EXAFS en el borde L3 del Au. Los resultados del sistema Al/Al₂O₃/Au se muestran en la Figura 3. 15 (B). Para esta muestra sólo se observa a 2.83Å una capa de coordinación de Au alrededor del átomo de Au absorbente. El ajuste no lineal por cuadrados mínimos de los datos experimentales con la señal teórica de EXAFS permitió obtener el número de coordinación (N) para la esfera de coordinación de Au-Au (Tabla 3. 6) y, asumiendo una geometría esférica, se estimó un tamaño de AuNPs de 2.2±0.5 nm de diámetro.²⁸ Por otro lado, la contracción de la distancia (R_{Au-Au}) para el caso de la muestra estudiada respecto al Au metálico resulta consistente con lo ya reportado en la literatura por efectos de superficie.³⁹ Los valores obtenidos para el factor de Debye-Waller (DWF_{Au-Au}) son similares a los encontrados en el Au metálico, mostrando que el desorden térmico es similar en todos los casos.

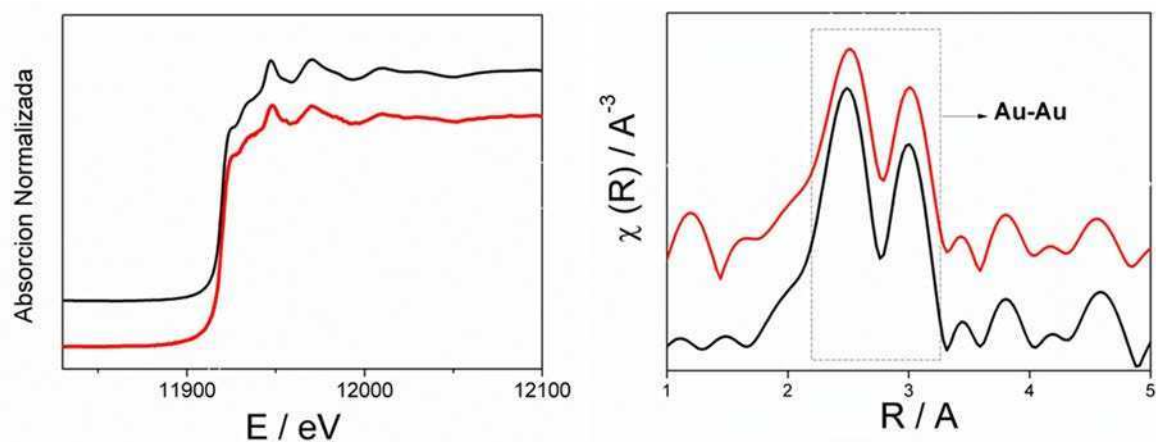


Figura 3. 15. Espectro XANES normalizado (izquierda) y transformada de Fourier de las oscilaciones EXAFS (sin corrección de fase) (derecha) en el borde L3 Au para la muestra Al/Al₂O₃/AuNP (línea roja) y para una referencia de oro macizo (línea negra)

Muestra	L ₃ -Au			Diámetro (nm)
	N _{Au-Au}	R _{Au-Au} (Å)	σ ² _{Au-Au} (Å ²)	
Au metálico	12	2.880(2)	0.0082(3)	-
Al/Al ₂ O ₃ /Au	9.7(6)	2.863(4)	0.0082(6)	2.2(5)

Tabla 3. 6. Valores de número de coordinación y distancia promedio Au-Au junto con el valor del factor de Debye-Waller para la muestra de referencia de oro macizo y para Al/Al₂O₃/AuNP. A su vez, se muestra el valor de diámetro medio calculado para las nanopartículas de Au

3.3.2.2. Efecto de los parámetros de síntesis

3.3.2.2.1. Efecto del tamaño del poro

Se partió de alúmina nanoporosa con poros de 6, 11 y 18 nm de diámetro generados según se describe en la Sección 3.3.1 y se llevó a cabo la síntesis de partículas de oro, a partir de una sal de $\text{KAu}(\text{CN})_2$ 50mM a pH 6, utilizando las condiciones de electrodeposición que se detallaron en la sección anterior. En la Tabla 3. 7 se muestran los valores de diámetro de nanopartículas obtenidos a partir de medidas del sistema *in situ* por EXAFS para los diferentes tamaños de poro. A diferencia de lo observado en el caso de Ni, existe una relación directa entre el tamaño de las NPs con el diámetro de poro. Como es de esperar, el poro actúa limitando el crecimiento de las NPs en la cavidad, de manera que, cuanto más chico sea el poro, más chicas serán las partículas que se obtienen; llegándose a obtener clusters de Au de 1.3nm de diámetro hasta nanopartículas de 8 nm de diámetro.

Por otro lado, la intensidad de fluorescencia en las medidas de absorción de rayos X es proporcional a la cantidad de átomos de Au en la muestra. Esto permite estimar las cantidades relativas de oro entre las distintas muestras si se expone el mismo área de $\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Au}$, si bien no es posible realizar una cuantificación absoluta de oro en cada muestra. Suponiendo que la intensidad es proporcional a la cantidad de átomos de Au totales, se puede llegar a una relación entre la intensidad en cada caso y el radio y la cantidad de NPs. Esto permite, además, estimar una relación de cantidad de NPs entre una muestra y otra. En particular, en el caso de poros grandes (18nm de diámetro) el número de NPs es 3 órdenes de magnitud menor. Esto puede estar asociado al espesor de la barrera de óxido (ver Tabla 3. 1) que llega a un valor máximo de 24nm en este caso.

Muestra	i	$D_{\text{poro}}/\text{nm}$	$N_{\text{Au-Au}}$	$R_{\text{Au-Au}} (\text{Å})$	$\sigma^2_{\text{Au-Au}} (\text{Å}^2)$	$D_{\text{NPs}} / \text{nm}$	Cantidad de NPs relativa n_i / n_B
Au metálico bulk		-	12	2.880(2)	0.0082(3)	-	-
Al/Al₂O₃/Au	A	6.3(7)	8.3(6)	2.861(5)	0.0084(7)	1.3(7)	4
	B	11(1)	9.7(6)	2.863(4)	0.0082(6)	2.2(5)	1
	C	18(2)	11.6(1.6)	2.87(1)	0.010(2)	8 (2)	$3 \cdot 10^{-3}$

Tabla 3. 7. Valores de número de coordinación (N) y distancia promedio (R) Au-Au junto con el valor del factor de Debye-Waller (σ^2) para la muestra de referencia de oro macizo y para $\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{AuNP}$ sintetizadas en poros de diferente tamaño (D_{poro}), obtenidos del ajuste de los espectros EXAFS. A su vez, se muestra el valor de diámetro medio (D_{NPs}) calculado para las nanopartículas de Au y la cantidad de NPs relativa al caso B.

En conclusión, para el caso de Au el tamaño del poro resulta ser el parámetro determinante en el diámetro de las nanopartículas que se obtienen.

3.3.2.2.2. Efecto de la corriente de deposición

La Tabla 3. 8 resume los resultados obtenidos de número de coordinación promedio a partir del ajuste de las oscilaciones EXAFS en el borde L3 del Au para sistemas Al/Al₂O₃/Au donde se utilizaron diferentes corrientes de electrodeposición (entre 3 y 25 mA cm⁻²) para la síntesis de AuNPs. En todos los casos se utiliza una matriz de alúmina con poros de 11nm de diámetro y se utiliza como precursor KAu(CN)₂ 50mM a pH 6, aplicando 3000 ciclos.

Muestra	I _{deposición} / mA cm ⁻²	N _{Au-Au}	R _{Au-Au} (Å)	σ ² _{Au-Au} (Å ²)	D _{NPs} / nm
Au metálico bulk	-	12	2.880(2)	0.0082(3)	-
Al/Al ₂ O ₃ /AuNPs	3	9.7 (6)	2.863(4)	0.0082(6)	2.2 (4)
	5	9.7 (6)	2.860(4)	0.0082 (6)	2.2 (5)
	10	9.3 (6)	2.865(6)	0.0080 (9)	1.8 (5)
	25	8.8 (6)	2.869(5)	0.0080 (7)	1.5 (4)

Tabla 3. 8. Valores de diámetro de nanopartículas obtenidas a diferentes corrientes de deposición. Se muestran los valores de número de coordinación promedio (N_{Au-Au}) obtenidos a partir del ajuste de las oscilaciones EXAFS, que permiten estimar el tamaño.

Se puede observar que el tamaño de las nanopartículas tiende a disminuir cuando aumenta la corriente de deposición. Si bien esta tendencia es contraria a la observada para los clusters de Ni, este es el resultado esperado para nanopartículas, tal como fue reportado por Reetz para otros metales.^{40,41} A medida que aumenta la densidad de corriente, aumenta el sobrepotencial aplicado; es decir aumenta el potencial respecto al potencial de equilibrio. Se ha reportado en literatura,^{42,43} que el radio crítico del núcleo de átomos que se forma depende del sobrepotencial según la Ecuación 1, donde M es el peso atómico del ion metálico a reducir, γ la tensión superficial, ρ la densidad del material y η el sobrepotencial.

$$r_c = \frac{-2.M.\gamma}{n.F.\eta .\rho} \quad (3.1)$$

Según ésta el radio crítico, r_c , es inversamente proporcional al sobrepotencial y, por lo tanto, a la densidad de corriente; lo que está en concordancia con lo observado.

Es interesante remarcar que no se observa el crecimiento de las nanopartículas de oro ni la formación de barras a ninguna corriente de las utilizadas, como sucede en la deposición de Ni llevada a cabo en condiciones análogas y como fue reportado para otros metales como Ni y Ag por Gösele y colaboradores^{20,26} con un método muy similar. La diferencia respecto a las condiciones de síntesis de Au y Ni podría estar relacionada con la concentración de precursor, ya que la de oro es 15 veces menor que la de níquel, debido a la solubilidad de la sal $\text{KAu}(\text{CN})_2$. Para poner a prueba esta posibilidad se realizó la electrodeposición de Ni a 25mA cm^{-2} , a partir de una concentración igual a la del oro (50mM). En ese caso, se obtienen nanobarras como en el caso de utilizar una solución de Ni(II) 0.75M , sólo que de menor altura (ver Figura 3. 16); por lo que el efecto de la concentración no permite explicar lo observado en el caso de Au.

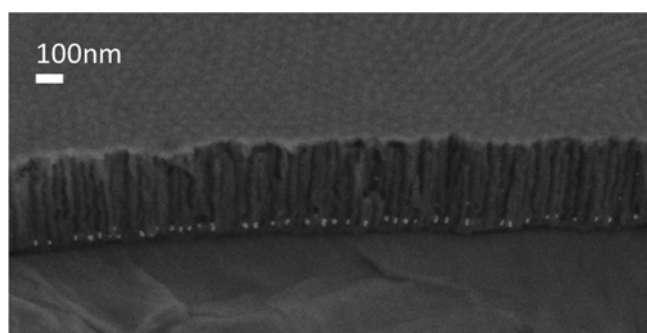


Figura 3. 16. Imágenes SEM del crecimiento de nanobarras de Ni. Se realiza la electrodeposición a partir de Ni(II) 50mM , a -25mAcm^{-2} aplicando 3000ciclos.

3.3.2.2.2.3. Efecto del precursor de Au

El complejo de Au(I), $\text{Au}(\text{CN})_2^-$, es un complejo muy estable con un potencial de reducción bajo ($E^0 = -0.6\text{V vs ENH}$), lo que permite un reducción más controlada y lo convierte en un buen candidato para electrodeposición. Por otro lado, la mayoría de las síntesis de nanopartículas de Au se realizan a partir de un complejo de Au(III), AuCl_4^- , que tiene un potencial de reducción mucho mayor ($E^0 = 0.99\text{V vs ENH}$), y, por lo tanto, es mucho más fácil de reducir.

En la Tabla 3. 9 se presentan las características de las AuNPs obtenidas a partir de la reducción de diferentes precursores en alúmina nanoporosa de 11nm de diámetro de poro. El diámetro de las NPs obtenidas es bastante similar para ambos precursores, por lo que, el limitante en el crecimiento de las mismas sigue siendo el diámetro del poro. Sin embargo, la

cantidad de NPs en el caso del AuCl_4^- es mayor. Esto se ve reflejado también en las voltametrías cíclicas realizadas con ferrocianuro a 50mV s^{-1} (Figura 3. 17), donde la corriente de pico es mayor en el caso de utilizar complejo cloroáurico como precursor.

Es importante observar que las condiciones de electrodeposición utilizadas en el caso de utilizar AuCl_4^- son más suaves; se aplica 3 veces menos pulsos y la concentración del precursor es 5 veces menor. Por otro lado, si se utilizan las condiciones de síntesis del precursor de cianuro con el complejo cloro áurico se observa que el oro se deposita por fuera de los poros debido a que este complejo se puede reducir con diferentes impurezas de manera no electroquímica debido a su alto potencial de reducción.

i	$D_{\text{poro}}/\text{nm}$	Precursor	$I_{\text{deposición}}/\text{mA cm}^{-2}$	Nº ciclos	D_{NPs}/nm	Cantidad de NPs relativa n_i/n_A
A	11	$\text{Au}(\text{CN})_2^-$ 50mM	3	3000	2.2 ± 0.4	1
B	11	AuCl_4^- 10mM	3	1000	2.6 ± 0.6	3

Tabla 3. 9. Descripción de los parámetro de deposición usados en cada caso, junto a los valores de diámetro de NPobtenidos por el ajuste de la señal EXAFS y la cantidad de NPs relativa al caso A.

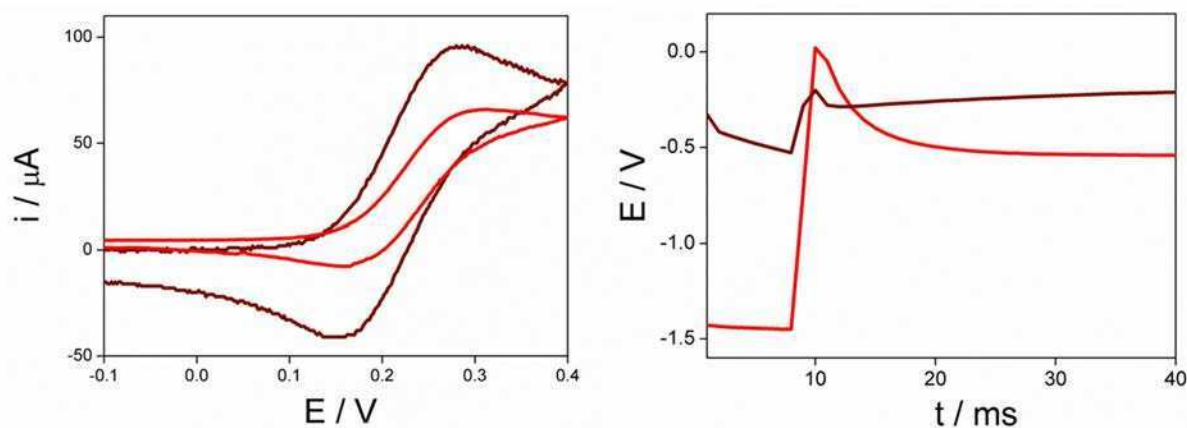


Figura 3. 17. Izquierda) Voltametría cíclica de una solución de ferrocianuro de potasio 50mM a 50mV/s para el caso de usar AuCl_4^- 10mM (bordo), y para $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ (rojo) como precursor. Derecha) Potencial vs tiempo durante el primer ciclo de deposición, para los distintos precursores.

3.3.2.3. Al/Al₂O₃/Pt

El método de síntesis desarrollado durante este trabajo, no sólo permite tener clusters de Au y Ni, sino que es un método general de síntesis de partículas muy pequeñas de metales en general. En particular, por sus interesantes aplicaciones en catálisis, otros de los clusters metálicos obtenidos durante esta tesis, es el caso de clusters de platino.

Utilizando una matriz porosa de 11nm de diámetro de poro, se realiza la electrodeposición de platino a partir de una solución de H₂PtCl₆ 50mM a pH 5. La secuencia de pulsos utilizada es análoga a los casos anteriores. Cada ciclo está formado por los siguientes 3 pasos: (i) -3mA cm⁻² por 8ms, (ii) 3mA cm⁻² por 2ms, (iii) no se aplica corriente por 500ms. Se aplican 1000 ciclos.

La caracterización se realiza utilizando las mismas técnicas que en los casos anteriores. A partir del análisis de las distintas regiones del espectro de absorción de rayos X, es posible asegurar que el Pt se encuentra en forma no oxidada (XANES) y es posible obtener un valor de diámetro promedio de 1.1 ± 0.3 nm a partir del valor de distancia promedio Pt-Pt, N_{Pt-Pt} , que resulta del ajuste de las oscilaciones EXAFS (Tabla 3. 10). En la Figura 3. 18 se presentan estas dos regiones del espectro para la muestra de Al/Al₂O₃/Pt y para una referencia de Pt macizo. Un valor similar de diámetro de cluster de Pt se obtiene por AFM. De forma análoga al Ni, una suspensión de clusters de Pt se pone en contacto con el soporte de mica. Se mide la altura de las partículas depositadas y se la relaciona directamente con el diámetro de cluster. En la Figura 3. 19 se muestran las imágenes topográficas, los perfiles del análisis de las líneas marcadas en estas imágenes y el correspondiente histograma de la distribución de alturas; resultando un diámetro de 1.0 ± 0.4 nm.

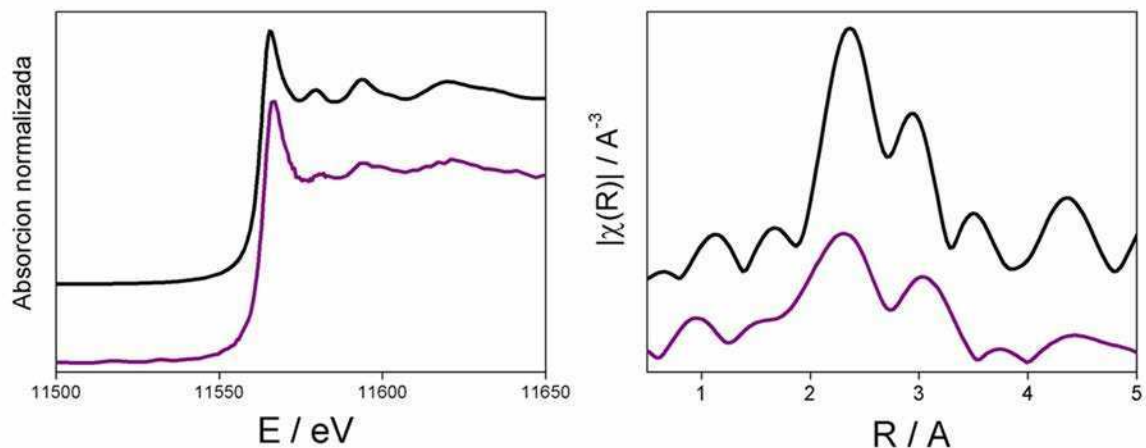


Figura 3. 18. Espectro XANES normalizado (izquierda) y transformada de Fourier de las oscilaciones EXAFS (sin corrección de fase) (derecha) en el borde L3 Pt para la muestra Al/Al₂O₃/Pt (línea violeta) y para una referencia de platino macizo (línea negra)

Muestra	N _{Pt-Pt}	R _{Pt-Pt} / Å	D _{NPs} / nm
Pt macizo	12	2.772	-
NPs Pt	7.5 (1.2)	2.75(1)	1.1 ± 0.3

Tabla 3. 10. Valores de número de coordinación (N_{Pt-Pt}), distancia entre átomos de Pt (R_{Pt-Pt}) y diámetro promedio obtenidos a partir de las medidas de EXAFS para el caso de un cluster de Pt sintetizado en alúmina porosa y para una referencia de Pt macizo.

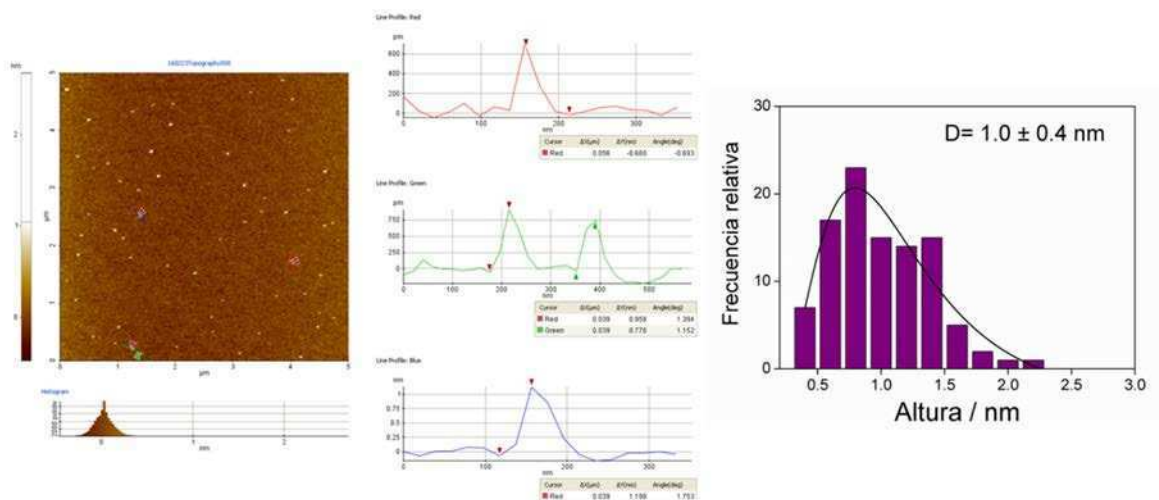


Figura 3. 19. Izquierda: Imágenes topográficas en modo NC-AFM de clusters de Pt depositados en sustratos de mica. Perfiles del análisis de las líneas marcadas en el imagen de AFM (medio) y el correspondiente histograma de la distribución de alturas (derecha).

Por último, se mide la voltametría cíclica usando como sonda ferrocianuro de potasio 50mM en buffer HEPES 50mM a pH 7. Al igual que en el caso del Au, estos clusters de Pt presentan un buen contacto eléctrico y medidas electroquímicas pueden llevarse a cabo. El comportamiento de la voltametría a 50mV s^{-1} , que se muestra en la Figura 3. 20, corresponde también a un comportamiento intermedio entre plano infinito y suma de nanoelectrodos individuales, lo que implica una superposición de los perfiles difusionales.

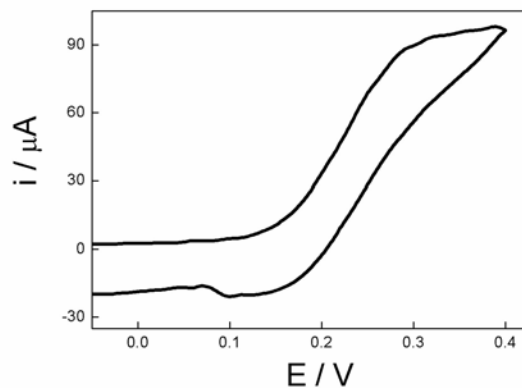


Figura 3. 20. Voltametría cíclica de ferrocianuro 50mM a 50mV s^{-1} de clusters de Pt dentro de la alúmina nanoporosa

3.3.3. Comportamiento Au vs Ni: Nucleación y crecimiento

En una síntesis típica de nanopartículas metálicas la reducción ocurre de manera rápida, ya que se utilizan reductores fuertes para favorecer la formación de muchos núcleos de cristalización que, en presencia de los estabilizantes adecuados, pueden dar lugar a suspensiones estables. En estos casos, la fuerza impulsora de la reacción (diferencia en los potenciales electroquímicos del catión metálico y del reductor) es incluso mayor que la necesaria para llevar el sistema de un máximo de energía a un mínimo local de baja energía (nanopartículas).⁴²

Sin embargo, es posible encontrar condiciones que permitan generar clusters estables intermedios.⁴⁴ La estabilidad especial de clusters con determinados números de átomos (llamados números mágicos) se ha explicado a partir de sus particulares estructuras geométricas y estructuras electrónicas de capa cerrada, como se desarrolló en la Sección 1.2.1.⁴⁵ Por lo tanto, con un control adecuado de la cinética de la reacción, es posible detenerla en un punto intermedio y obtener clusters estables de pequeño tamaño, como ocurre en el

caso del Ni cuando se utilizan corrientes por debajo de los 5 mA cm^{-2} en la síntesis. El mismo comportamiento se ha reportado en la síntesis de clusters de Ag de 10 átomos en microemulsiones usando agentes reductores suaves⁴⁶ o a partir de otros métodos electroquímicos utilizados por el grupo de Lopez-Quintela.^{34,47}

Para la electrodeposición de Ni se requirió un sobrepotencial alto de 4-5V al aplicar 3 mA cm^{-2} vs. 1.5-2V necesarios al aplicar la misma corriente para la deposición de oro a partir de $\text{KAu}(\text{CN})_2$. En el caso del Ni, como se muestra previamente, el tamaño de la partícula resulta independiente del tamaño del poro y de la densidad de corriente empleada cuando se aplican corrientes menores a 5 mA cm^{-2} . Mientras que a densidades de corriente mayores se forman nanopartículas más grandes o barras. Por lo tanto, se logra, para este metal, un control de diferentes nanoestructuras. Según lo reportado previamente,³⁶ la formación de nanobarras podría estar catalizada por clusters. Entonces, los clusters presentes podrían aglomerarse dando nanopartículas, y autocatalizar su crecimiento. Para poner a prueba esta hipótesis se estudió la deposición en los primeros pulsos (5, 50 y 100 pulsos) utilizando corrientes de 25 mA cm^{-2} que dan lugar a la formación de nanobarras. En la Figura 3. 21 se muestran los espectros XANES en el borde K del Ni de las partículas que se forman en estas condiciones. Al comenzar la síntesis, luego de aplicar 5 pulsos, se observan mayoritariamente partículas oxidadas, lo que sugiere que las partículas formadas no son clusters sino que se trata de partículas más grandes. Más aún, si suponemos que se obtiene todo como óxido, se puede estimar un tamaño de $5 \pm 2 \text{ nm}$. Por lo tanto, podemos concluir que a corrientes altas se forman núcleos más grandes que se comportan como nanopartículas. A su vez, debido a que existe una contribución de Ni reducido, no puede descartarse en estas condiciones, que estén presentes clusters desde un comienzo. Este resultado junto con las medidas de AFM que se muestran en la Sección 3.3.2.1.2.2; indican que siempre se generan clusters; esto puede deberse a la cinética lenta de reducción del Ni. Por lo tanto, se puede concluir que el crecimiento de las nanopartículas a nanobarras es posible en la medida que existan estos clusters pequeños que catalicen el crecimiento, al igual que lo reportado en fase homogénea.^{36,48,49}

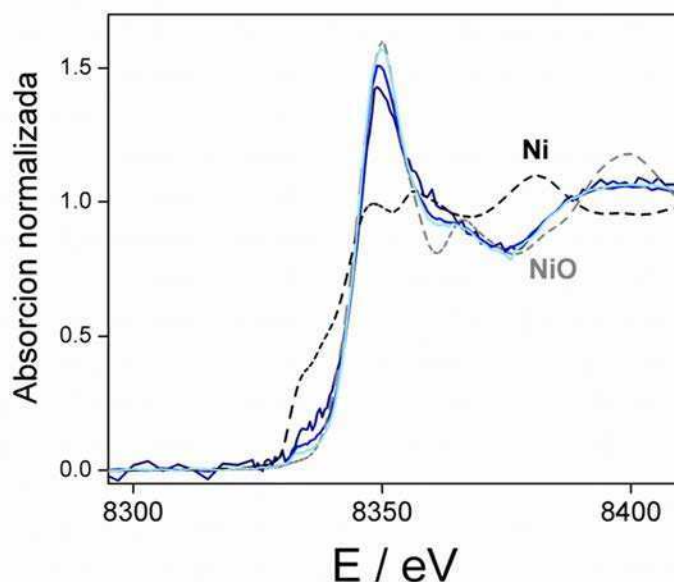


Figura 3. 21. Espectro XANES en el borde K del Ni de una muestra de Al/Al₂O₃/Ni generada a -25mA cm⁻² aplicando 5 pulsos (azul oscuro), 50 pulsos (azul) y 100 pulsos (celeste) junto con dos referencias, Ni metálico (línea punteada negro) y óxido de Ni (línea punteada gris).

Por otro lado, el oro presenta un comportamiento muy distinto. Se observa que el tamaño de la partícula está limitado por el tamaño de poro, es decir, el crecimiento de los núcleos de oro está condicionado por el molde de alúmina en el rango de condiciones ensayadas. A su vez, de acuerdo a lo esperado por la teoría de nucleación y crecimiento,^{42,50} se observa que a medida que aumenta la corriente de deposición (condiciones más alejadas del equilibrio) los núcleos formados son cada vez más chicos. Esto es compatible con el bajo sobrepotencial necesario para generarlos, que no permitiría la obtención de clusters de tamaños intermedios formándose directamente una nanopartícula. En este sentido, se podría esperar que de continuar el crecimiento puedan crecer nanobarras. Sin embargo, esto no se observa, lo que sugiere que las barras solo podrían formarse en presencia de clusters.

El caso del Pt es más similar al caso del Au; si bien, es necesario un estudio más detallado de su comportamiento, en ambos casos al aumentar la corriente de deposición a 25mA cm⁻² no se observa el crecimiento a nanobarras.

3.4. Sumario

Se ha desarrollado un método de síntesis de clusters/nanopartículas a partir del uso de una matriz nanoporosa de alúmina. Este método es sumamente sencillo y consiste en la síntesis de la matriz nanoporosa a partir del anodizado de aluminio junto con una etapa posterior, en la cual se deja el sistema Al/Al₂O₃ en contacto con el electrolito ácido, disminuyendo el espesor de la barrera de óxido que se encuentra en contacto con el aluminio. Finalmente, por electrodeposición pulsada se obtienen las partículas metálicas. Las condiciones de síntesis de los nanomateriales fueron elegidas de acuerdo a las características estructurales necesarias para las funciones buscadas. En particular, los poros de tamaño pequeño (5-20nm de diámetro) generan el entorno confinado que permite la obtención de cluster metálicos, que presentan actividad catalítica (Capítulo 6) y que pueden ser utilizados en el diseño de sensores (Capítulo 5).

Se demostró que este es un método general, permitiendo la síntesis de partículas muy pequeñas de diferentes metales. En este caso, no sólo se mostró la posibilidad de obtener cluster grandes/nanopartículas de Au y Pt, sino también clusters pequeños de Ni en estado elemental, que son difíciles de obtener ya que, como metal, tiende a oxidarse y, como clusters, crecen, debido a su atracción magnética.¹⁴

Se estudió el efecto de distintos parámetros de síntesis, *e.g. corriente de deposición, diámetro de poro*, en las características finales de las partículas obtenidas; obteniéndose diferentes comportamientos para los diferentes metales.

Otra característica a resaltar del sistema obtenido es su gran estabilidad en el tiempo respecto a la agregación y la oxidación de las partículas. La morfología de los clusters no presenta cambios respecto al tamaño, determinados por EXAFS, incluso después de meses. En este sentido, es importante remarcar que las partículas sintetizadas no presentan ningún agente estabilizante y son conservadas en presencia de aire.

Referencias

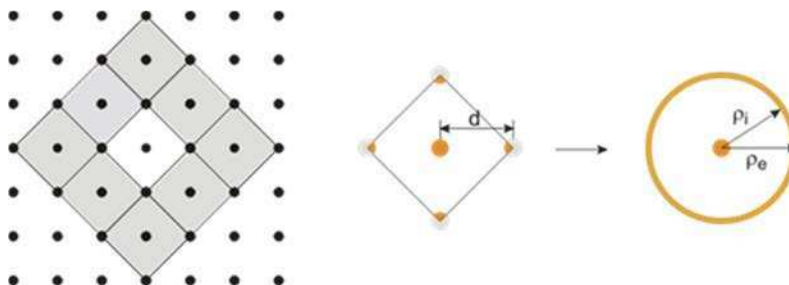
- (1) Eriksson, S.; Nylén, U.; Rojas, S.; Boutonnet, M. Preparation of Catalysts from Microemulsions and Their Applications in Heterogeneous Catalysis. *Appl. Catal. A Gen.* **2004**, *265* (2), 207–219.
- (2) El-Gendy, A. A.; Ibrahim, E. M. M.; Khavrus, V. O.; Krupskaya, Y.; Hampel, S.; Leonhardt, A.; Büchner, B.; Klingeler, R. The Synthesis of Carbon Coated Fe, Co and Ni Nanoparticles and an Examination of Their Magnetic Properties. *Carbon N. Y.* **2009**, *47* (12), 2821–2828.
- (3) Mourdikoudis, S.; Simeonidis, K.; Vilalta-Clemente, A.; Tuna, F.; Tsiaoussis, I.; Angelakeris, M.; Dendrinou-Samara, C.; Kalogirou, O. Controlling the Crystal Structure of Ni Nanoparticles by the Use of Alkylamines. *J. Magn. Magn. Mater.* **2009**, *321* (18), 2723–2728.
- (4) Chen, L.; Chen, J.; Zhou, H.; Zhang, D.; Wan, H. Synthesis of Dodecanethiol Monolayer-Stabilized Nickel Nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. A* **2007**, *452–453*, 262–266.
- (5) Lei, S.-B.; Wang, C.; Yin, S.-X.; Wan, L.-J.; Bai, C.-L. Assembling Nanometer Nickel Particles into Ordered Arrays. *ChemPhysChem* **2003**, *4* (10), 1114–1117.
- (6) Peng, L.; Jianguo, G.; Qingjie, Z.; Wenyu, Z. Preparation and Characterization of Monodisperse Nickel Nanoparticles by Polyol Process. *J. Wuhan Univ. Technol. Sci. Ed.* **2005**, *20* (4), 35–37.
- (7) Bradley, J. S.; Tesche, B.; Busser, W.; Maase, M.; Reetz, M. T. Surface Spectroscopic Study of the Stabilization Mechanism for Shape-Selectively Synthesized Nanostructured Transition Metal Colloids. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (19), 4631–4636.
- (8) Knecht, M. R.; Garcia-Martinez, J. C.; Crooks, R. M. Synthesis, Characterization, and Magnetic Properties of Dendrimer-Encapsulated Nickel Nanoparticles Containing <150 Atoms. *Chem. Mater.* **2006**, *18* (21), 5039–5044.
- (9) Alonso, F.; Riente, P.; Sirvent, J. A.; Yus, M. Nickel Nanoparticles in Hydrogen-Transfer Reductions: Characterisation and Nature of the Catalyst. *Appl. Catal. A Gen.* **2010**, *378* (1), 42–51.
- (10) Vijayakrishna, K.; Charan, K. T. P.; Manojkumar, K.; Venkatesh, S.; Pothanagandhi, N.; Sivaramakrishna, A.; Mayuri, P.; Kumar, A. S.; Sreedhar, B. Ni Nanoparticles Stabilized by Poly(Ionic Liquids) as Chemoselective and Magnetically Recoverable Catalysts for Transfer Hydrogenation Reactions of Carbonyl Compounds. *ChemCatChem* **2016**, *8* (6), 1139–1145.
- (11) Calderón, M. F.; Zelaya, E.; Benitez, G. A.; Schilardi, P. L.; Creus, A. H.; Orive, A. G.; Salvarezza, R. C.; Ibañez, F. J. New Findings for the Composition and Structure of Ni Nanoparticles Protected with Organomercaptan Molecules. *Langmuir* **2013**, *29* (15), 4670–4678.
- (12) Yang, X.; Shi, M.; Zhou, R.; Chen, X.; Chen, H. Blending of H₂AuCl₄ and Histidine in Aqueous Solution: A Simple Approach to the Au₁₀ Cluster. *Nanoscale* **2011**, *3* (6), 2596–2601.
- (13) Xie, J.; Zheng, Y.; Ying, J. Y. Protein-Directed Synthesis of Highly Fluorescent Gold Nanoclusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (3), 888–889.
- (14) Myers, V. S.; Weir, M. G.; Carino, E. V.; Yancey, D. F.; Pande, S.; Crooks, R. M. Dendrimer-Encapsulated Nanoparticles: New Synthetic and Characterization Methods and Catalytic Applications. *Chem. Sci.* **2011**, *2* (9), 1632–1646.
- (15) Violi, I. L.; Zelcer, A.; Bruno, M. M.; Luca, V.; Soler-Illia, G. J. A. A. Gold Nanoparticles Supported in Zirconia–Ceria Mesoporous Thin Films: A Highly Active Reusable Heterogeneous Nanocatalyst. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (2), 1114–1121.

- (16) Martin, C. R. Nanomaterials: A Membrane-Based Synthetic Approach. *Science* (80-.). **1994**, 266 (5193), 1961 LP-1966.
- (17) Fernández, J. L.; Wijesinghe, M.; Zoski, C. G. Theory and Experiments for Voltammetric and SECM Investigations and Application to ORR Electrocatalysis at Nanoelectrode Ensembles of Ultramicroelectrode Dimensions. *Anal. Chem.* **2015**, 87 (2), 1066–1074.
- (18) Ugo, P.; Moretto, L. M. Scanning Electrochemical Microscopy. In *Handbook of Electrochemistry*; Zoski, C. G., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2007; p 678–709.
- (19) Sides, C. R.; Martin, C. R. Deposition into Templates. In *Electrochemistry at the Nanoscale*; Schmuki, P., Virtanen, S., Eds.; Springer: New York, 2009; p 279–320.
- (20) Nielsch, K.; Müller, F.; Li, A.-P.; Gösele, U. Uniform Nickel Deposition into Ordered Alumina Pores by Pulsed Electrodeposition. *Adv. Mater.* **2000**, 12 (8), 582–586.
- (21) Hwang, S.-K.; Jeong, S.-H.; Hwang, H.-Y.; Lee, O.-J.; Lee, K.-H. Fabrication of Highly Ordered Pore Array in Anodic Aluminum Oxide. *Korean J. Chem. Eng.* **2002**, 19 (3), 467–473.
- (22) Li, A. P.; Müller, F.; Gösele, U. Polycrystalline and Monocrystalline Pore Arrays with Large Interpore Distance in Anodic Alumina. *Electrochem. Solid-State Lett.* **2000**, 3 (3), 131–134.
- (23) CHOWDHURY, P.; RAGHUVARAN, K.; KRISHNAN, M.; BARSHILIA, H. C.; RAJAM, K. S. Effect of Process Parameters on Growth Rate and Diameter of Nano-Porous Alumina Templates. *Bull. Mater. Sci.* **2011**, 34 (3), 423–427.
- (24) Vázquez, A. L.; Carrera, R.; Arce, E.; Castillo, N.; Castillo, S.; Morán-Pineda, M. Preparation of Mesoporous Alumina Films by Anodization: Effect of Pretreatments on the Aluminum Surface and MTBE Catalytic Oxidation. *J. Alloys Compd.* **2009**, 483 (1–2), 418–421.
- (25) Bocchetta, P.; Sunseri, C.; Chiavarotti, G.; Di Quarto, F. Microporous Alumina Membranes Electrochemically Grown. *Electrochim. Acta* **2003**, 48 (20–22), 3175–3183.
- (26) Sauer, G.; Brehm, G.; Schneider, S.; Nielsch, K.; Wehrspohn, R. B.; Choi, J.; Hofmeister, H.; Gösele, U. Highly Ordered Monocrystalline Silver Nanowire Arrays. *J. Appl. Phys.* **2002**, 91 (5).
- (27) Rodríguez-Kessler, P. L.; Rodríguez-Domínguez, A. R. Stability of Ni Clusters and the Adsorption of CH₄: First-Principles Calculations. *J. Phys. Chem. C* **2015**, 119 (22), 12378–12384.
- (28) Ramallo-López, J. M.; Requejo, F. G.; Craievich, A. F.; Wei, J.; Avalos-Borja, M.; Iglesia, E. Complementary Methods for Cluster Size Distribution Measurements: Supported Platinum Nanoclusters in Methane Reforming Catalysts. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2005**, 228 (1–2), 299–307.
- (29) Rodríguez-Kessler, P. L.; Rodríguez-Domínguez, A. R. Stability of Ni Clusters and the Adsorption of CH₄: First-Principles Calculations. *J. Phys. Chem. C* **2015**, 119 (22), 12378–12384.
- (30) Vilar-Vidal, N.; Rivas, J.; López-Quintela, M. A. Size Dependent Catalytic Activity of Reusable Subnanometer copper(0) Clusters. *ACS Catal.* **2012**, 2 (8), 1693–1697.
- (31) Lu, Y.; Chen, W. Sub-Nanometre Sized Metal Clusters: From Synthetic Challenges to the Unique Property Discoveries. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41 (9), 3594–3623.
- (32) Kim, B. H.; Hackett, M. J.; Park, J.; Hyeon, T. Synthesis, Characterization, and Application of Ultrasmall Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2014**, 26 (1), 59–71.
- (33) Lu, Y.; Chen, W. Application of Mass Spectrometry in the Synthesis and Characterization of Metal Nanoclusters. *Anal. Chem.* **2015**, 87 (21), 10659–10667.

- (34) Vázquez-Vázquez, C.; Bañobre-López, M.; Mitra, A.; López-Quintela, M. A.; Rivas, J. Synthesis of Small Atomic Copper Clusters in Microemulsions. *Langmuir* **2009**, *25* (14), 8208–8216.
- (35) Attia, Y. A.; Buceta, D.; Blanco-Varela, C.; Mohamed, M. B.; Barone, G.; López-Quintela, M. A. Structure-Directing and High-Efficiency Photocatalytic Hydrogen Production by Ag Clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (4), 1182–1185.
- (36) Attia, Y. A.; Vazquez-Vazquez, C.; Blanco, M. C.; Buceta, D.; Lopez-Quintela, M. A. Gold Nanorod Synthesis Catalysed by Au Clusters. *Faraday Discuss.* **2016**.
- (37) Fontaine, O.; Laberty-Robert, C.; Sanchez, C. Sol-Gel Route to Zirconia-Pt-Nanoelectrode Arrays 8 Nm in Radius: Their Geometrical Impact in Mass Transport. *Langmuir* **2012**, *28* (7), 3650–3657.
- (38) Liz-Marzán, L. M. Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles. *Langmuir* **2006**, *22* (1), 32–41.
- (39) Miller, J. T.; Kropf, A. J.; Zha, Y.; Regalbuto, J. R.; Delannoy, L.; Louis, C.; Bus, E.; van Bokhoven, J. A. The Effect of Gold Particle Size on AuAu Bond Length and Reactivity toward Oxygen in Supported Catalysts. *J. Catal.* **2006**, *240* (2), 222–234.
- (40) Rodríguez-Sánchez, L.; Blanco, M. C.; López-Quintela, M. A. Electrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104* (41), 9683–9688.
- (41) Reetz, M. T.; Helbig, W. Size-Selective Synthesis of Nanostructured Transition Metal Clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (16), 7401–7402.
- (42) Group, S. E. *Instrumental Methods in Electrochemistry*; Ellis Horwood Ltd: Chichester, 1990.
- (43) Reetz, M. T.; Helbig, W. Size-Selective Synthesis of Nanostructured Transition Metal Clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (16), 7401–7402.
- (44) Piñeiro, Y.; Buceta, D.; Calvo, J.; Huseyinova, S.; Cuerva, M.; Pérez, Á.; Domínguez, B.; López-Quintela, M. A. Large Stability and High Catalytic Activities of Sub-Nm Metal (0) Clusters: Implications into the Nucleation and Growth Theory. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *449*, 279–285.
- (45) Negishi, Y.; Chaki, N. K.; Shichibu, Y.; Whetten, R. L.; Tsukuda, T. Origin of Magic Stability of Thiolated Gold Clusters: A Case Study on Au₂₅(SC₆H₁₃)₁₈. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (37), 11322–11323.
- (46) Ledo-Suárez, A.; Rivas, J.; Rodríguez-Abreu, C. F.; Rodríguez, M. J.; Pastor, E.; Hernández-Creus, A.; Oseroff, S. B.; López-Quintela, M. A. Facile Synthesis of Stable Subnanosized Silver Clusters in Microemulsions. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46* (46), 8823–8827.
- (47) Santiago González, B.; Rodríguez, M. J.; Blanco, C.; Rivas, J.; López-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* (10), 4217–4221.
- (48) Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M.; Mulvaney, P. Gold Nanorods: Synthesis, Characterization and Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249* (17–18), 1870–1901.
- (49) Sharma, V.; Park, K.; Srinivasarao, M. Colloidal Dispersion of Gold Nanorods: Historical Background, Optical Properties, Seed-Mediated Synthesis, Shape Separation and Self-Assembly. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **2009**, *65* (1–3), 1–38.
- (50) Paunovic, M.; Schlesinger, M. *Fundamentals of Electrochemical Deposition*, 2nd Editio.; John Wiley & Sons, Inc: New Jersey, 2006.

Capítulo 4: Arreglo de micro y nanoelectrodos - Modelo numérico

El comportamiento electroquímico de arreglos de nanoelectrodos regulares se logra describir a partir del desarrollo de un modelo numérico (ANSA) que tiene en cuenta el efecto en la respuesta en función de la distancia de los electrodos vecinos; empleando como variables los parámetros geométricos y el tiempo del experimento en el análisis de la respuesta obtenida.



4. 1. Introducción

Los sistemas de nanopartículas pequeñas/clusters metálicos conductores confinados en los nanoporos de alúmina presentan una transferencia de carga eficiente como se muestra utilizando sondas electroactivas como ferrocianuro, en la Sección 3.3.2.2 para el caso del Au y en la Sección 3.3.2.3 para el Pt. Estos sistemas actúan como un arreglo de nanoelectrodos, cuyo comportamiento en cuanto a los procesos cinéticos y de difusión pueden ser estudiados a través de la técnica de voltametría cíclica.

La respuesta de un arreglo de nanoelectrodos en un experimento de voltametría está relacionada principalmente con tres factores: la velocidad de barrido (tiempo de la medida), el radio del electrodo y la distancia entre electrodos. A partir de la relación entre estos valores, se obtienen diferentes patrones difusionales. En la Figura 4. 1, se esquematizan los distintos casos. Los casos 1 y 4 pueden describirse como difusión plana y, por lo tanto, el tratamiento del problema se reduce a un caso de 1 dimensión, cuya solución numérica permite una descripción completa de la respuesta.¹ El caso 2 puede tratarse como microelectrodos individuales, conociéndose también para este caso, una solución.² El más complicado de resolver es el caso 3, donde al ocurrir el solapamiento de las capas difusionales adyacentes no es posible considerar los electrodos como independientes, mientras que, por otro lado, los campos difusionales no están lo suficientemente solapados como para considerarlos como un caso de difusión lineal (caso 4). Es por eso, que de los cuatro casos es el más desafiante de tratar. Esta situación se observa muchas veces en arreglos de

nanoelectrodos^{3,4} dado que al reducir la superficie del electrodo, la participación de la difusión radial aumenta,¹ alcanzando un peso considerable en la nanoescala.

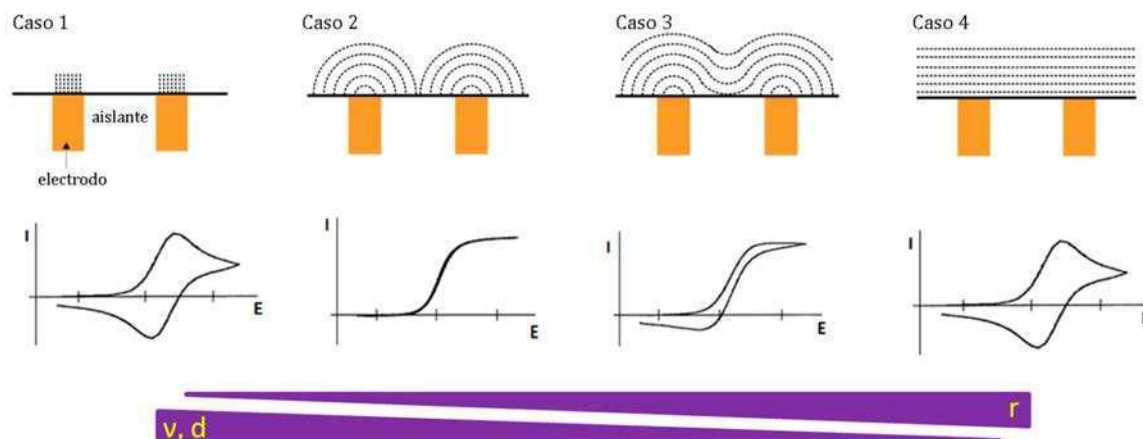


Figura 4. 1. Esquema de los posibles perfiles de difusión en arreglos de micro y nanoelectrodos y sus correspondientes voltametrías cíclicas. Las barras abajo indican la tendencia en el comportamiento en función del radio del electrodo (r), la distancia interelectrodo (d) y la velocidad de barrido (v). A medida que el parámetro aumenta, el espesor de la barra aumenta.

En literatura, no existe un modelo numérico capaz de resolver satisfactoriamente todas las situaciones descritas sin una preselección de las condiciones que llevan a uno u otro caso. Uno de los métodos existentes y más utilizados es el modelo numérico en dos dimensiones (2D) desarrollado por Compton y colaboradores^{5,6} (ver Sección 1.2.3), pero que no permite el estudio de sistemas cuyos perfiles difusionales estén solapados.

En este capítulo se describe el nuevo modelo desarrollado en este trabajo y su validación, en el que se tiene en cuenta la posibilidad de solapamiento de los perfiles difusionales entre cada electrodo con su vecino más cercano (caso 3), siendo capaz, a su vez, de resolver los otros casos. El modelo se basa en dividir un arreglo regular de electrodos en celdas (Figura 4. 2). En cada una de estas celdas, hay un electrodo central rodeado de electrodos vecinos; estos electrodos vecinos son transformados en un anillo manteniendo la misma área activa que la suma del área de los vecinos más próximos. Usando esta aproximación de simetría axial con los vecinos (ANSA) el problema adquiere simetría cilíndrica. Este modelo considera que la reacción electroquímica en estudio ocurre tanto en el electrodo central como en los vecinos, pudiendo aplicarse a cualquiera de los patrones de

difusión antes descritos. Este concepto preserva la simplicidad y bajo costo computacional de reducir el problema a un electrodo con un área equivalente vecina y un tratamiento computacional en 2D.

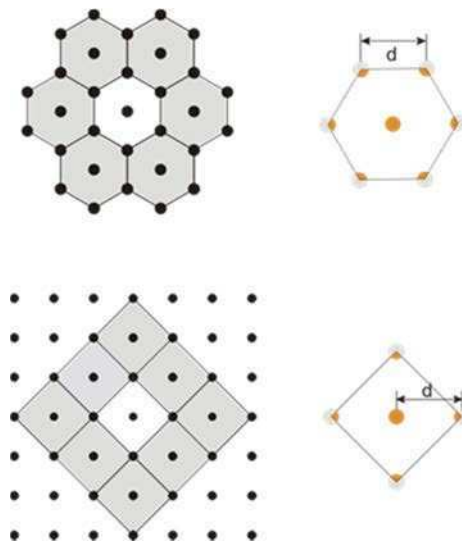


Figura 4. 2. División de un arreglo regular de electrodos en celdas segun el modelo ANSA y definición de la celda unidad.

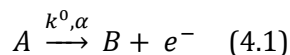
Como ventaja adicional, el modelo que se presenta en esta tesis puede aplicarse tanto a electrodos coplanares como electrodos empotrados (*recessed electrodes*). Este se valida con soluciones numéricas en los casos que están disponibles y mediante medidas experimentales para arreglos cuadrados y hexagonales de electrodos de radios entre 1.3nm y 10 μ m, cubriendo la transición entre los diferentes casos que se muestran en la Figura 4. 1.

4.2. Modelo matemático

4.2.1 Descripción del sistema de ecuaciones

El modelo geométrico antes descrito, junto con el sistema de ecuaciones, las condiciones iniciales y de contorno que se describen a continuación, se resuelve empleando un software de elementos finitos, COMSOL Multiphysics 3.4 para PC.

Se plantea la simulación devoltametrías cíclicas considerando una cuplaredox que intercambia un solo electrón en un arreglo regular (cúbico o hexagonal) de micro y nanoelectrodos.



siendo k^0 la constante de transferencia electrónica y α el coeficiente de simetría (que se considera 0,5 en este trabajo). Emulando las condiciones experimentales, inicialmente sólo está presente la especie A y a medida que el potencial se acerca al potencial de equilibrio, se produce la especie B, formándose una zona de difusión, que depende de los parámetros mencionados previamente: velocidad de barrido, distancia interelectrodo, radio de cada electrodo y el coeficiente de difusión de la sonda electroactiva. Luego, las condiciones iniciales relevantes son la concentración de la especie A y el potencial eléctrico aplicado que será dependiente de la velocidad de barrido.

El transporte de masa se describe mediante la ecuación de Nernst-Planck. Esta ecuación tiene en cuenta la existencia tanto de procesos de difusión (movilidad de una especie por la existencia de un gradiente de potencial químico), migración (movilidad de una especie por la presencia de un campo eléctrico) y convección (transporte hidrodinámico), como se muestra en la Ecuación 4.2. Se puede ver que el flujo de una especie i a una distancia x de la superficie, $J_i(x)$, depende de un primer término difusional relacionado con el coeficiente de difusión, D_i y el gradiente de concentración a esta distancia x , $\frac{\partial C_i(x)}{\partial x}$; de un segundo término migratorio determinado por el gradiente de potencial, $\frac{\partial \varphi(x)}{\partial x}$, y la carga z_i ; y, finalmente, de un tercer término de convección dado por la velocidad con la que el elemento de volumen se mueve en la dirección x , $v(x)$, y por la concentración, C_i , de la especie.

$$J_i(x) = -D_i \frac{\partial C_i(x)}{\partial x} - \frac{z_i F}{RT} D_i C_i \frac{\partial \varphi(x)}{\partial x} + C_i v(x) \quad (4.2)$$

En los experimentos que se propone simular, se trabaja en condiciones de altas concentraciones de electrolito soporte, y sin agitación externa, por lo que si bien el modelo propuesto es de aplicación más general, en los ejemplos que se presentan, el problema queda reducido al caso difusional.

El campo eléctrico, E , se describe a partir de la ecuación de Poisson (4.3), siendo V el potencial eléctrico, ϵ_0 la permitividad en el vacío, ρ la densidad de carga eléctrica.

$$-\nabla(\varepsilon_0 \nabla V) = \rho \quad (4.3)$$

Por último, para modelar la interfase electrodo-solución se emplea la Ecuación de Butler-Volmer (4.4), que permite relacionar el flujo de una especie y la corriente resultante con el potencial eléctrico aplicado.

$$j_{reac} = \frac{i}{FA} = k_0 \left[C_{ox} * e^{\left(\frac{-F}{RT}\alpha(E-E_{eq})\right)} - C_{red} * e^{\left(\frac{F}{RT}(1-\alpha)(E-E_{eq})\right)} \right] \quad (4.4)$$

El sistema de ecuaciones diferenciales en derivadas parciales propuesto, permite modelar la respuesta del electrodo en las condiciones experimentales de voltametrías cíclicas y obtener la evolución temporal de los perfiles de concentración.

4.2.2. Arreglo geométrico

Como se ha mencionado, existen reportes en literatura de modelos numéricos en dos dimensiones para resolver el problema de arreglos de electrodos, para casos donde no exista solapamiento de perfiles de difusión. A continuación, se describe brevemente uno de los modelos reportados más exitoso (DDA), para poder evaluar las diferencias con el modelo presentado en esta tesis (ANSA).

4.2.2.1. Descripción del modelo DDA

Compton y colaboradores^{5,6} han desarrollado un modelo de simulación en 2D, empleando un sistema de ecuaciones similar al previamente descrito. Este método en 2D se basa en la aproximación de dominio difusional (DDA por su nombre en inglés, *diffusion domain approximation*).^{5,6} El modelo DDA considera una distribución regular de N electrodos, tanto en una red cuadrada como en una hexagonal donde los electrodos tienen un área circular de radio r y están separados una distancia d. El área cubierta puede dividirse en N celdas unidades individuales cada una centrada en un electrodo. En la Figura 4. 3 se muestra un esquema que resume los parámetros geométricos y la celda unidad. Notar que la longitud de la celda unidad es igual a la distancia entre electrodos. La división del sistema simplifica el proceso de simulación a sólo una celda unidad, siempre y cuando las capas difusionales no se solapen (caso 2 en la Figura 4. 1). Este caso puede, a su vez, dividirse en dos. Uno en el cual los

electrodos se comportan como si estuvieran alejados infinitamente uno de otros, existiendo soluciones numéricas. Y otro caso en el cual la difusión se encuentra acotada en un cilindro alrededor del electrodo, siendo este el principal aporte de este modelo, pero no aplicable a todas las velocidades de barrido. Luego, es posible obtener la respuesta del arreglo de electrodos multiplicando el comportamiento de una celda por los N elementos del arreglo. De esta manera, se construye una celda unidad con simetría cilíndrica, lo que reduce el problema de tres dimensiones a un problema de dos dimensiones.

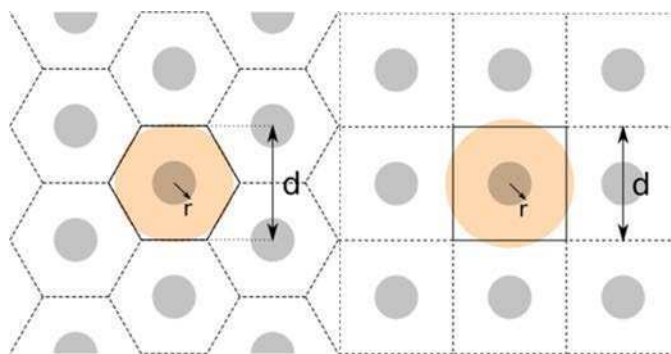


Figura 4. 3. Definición de la celda unidad según el modelo DDA. Izquierda: arreglo hexagonal. Derecha: arreglo cuadrado. El círculo establece la transformación de la celda unidad como se define en la Ref 5.

En la Figura 4. 4 pueden verse resumidas las condiciones de contorno de este modelo, el cual considera un flujo neto igual a cero a través de las paredes del dominio de difusión, una condición que es válida dependiendo de la velocidad de barrido y el tamaño del electrodo. Para mantener la condición de no solapamiento de los perfiles difusionales, se define una distancia crítica entre el centro del electrodo y el límite de la celda unidad, donde el error debido al solapamiento de las capas de difusión es aún despreciable. Esta distancia resulta prácticamente la mitad de la distancia entre los electrodos y solo puede aplicarse por encima de cierta velocidad de barrido. Esta velocidad de barrido es elegida tal que produce un decrecimiento del 2,5% de la corriente de pico (o límite) comparada con el caso donde los microelectrodos en el arreglo están infinitamente separados. Este hecho limita la aplicación del modelo, no siendo válido a menores velocidades de barrido a medida que el radio del electrodo decrece.

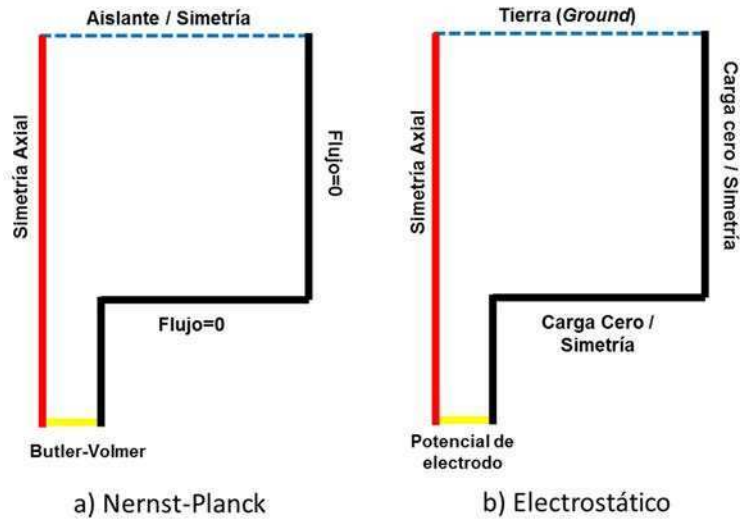


Figura 4. 4. Espacio de simulación en 2D para un electrodo en el fondo de un poro. Modelo para arreglos de nano/microelectrodos usando la simulación DDA y las condiciones de contorno correspondientes para a) la ecuación de Nernst-Planck, y b) la ecuación de Poisson.

4.2.2.1. Descripción del modelo ANSA

La aproximación de simetría axial con los vecinos (ANSA) que se desarrolló es aplicable, al igual que DDA, a arreglos de electrodos coplanares empotrados, con un radio r , separados a una distancia d .

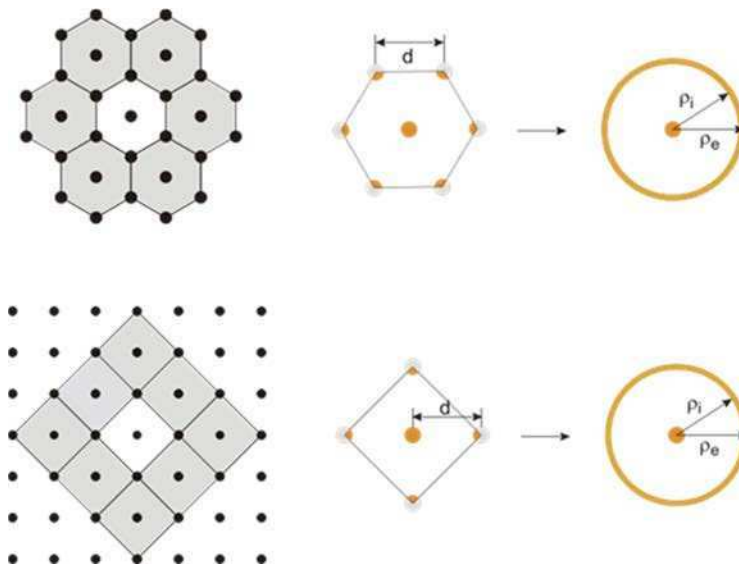


Figura 4. 5. Izquierda: Definición de la celda unidad con el modelo ANSA. Derecha: Transformación de la celda unidad en un sistema con simetría axial considerando los vecinos más próximos. Arriba: arreglo hexagonal. Abajo: arreglo cuadrado

En este modelo se definió una celda que incluye al electrodo central y sus primeros vecinos (Figura 4. 5, izquierda). Luego, se evalúan los electrodos vecinos considerando como cada uno de ellos se comparte entre las celdas vecinas (sombra gris en la Figura 4. 5, izquierda). Así, el área efectiva, A_{ef} , para los primeros vecinos puede calcularse de una manera general como:

$$A_{ef} = \frac{\theta}{2} nr^2 \quad (4.5)$$

donde, θ es el ángulo de barrido de la superficie de un electrodo vecino asignado en la celda en estudio (celda blanca en la Figura 4. 5, izquierda), n es el número de electrodos vecinos cercanos y r el radio del electrodo. Para el arreglo hexagonal θ es $2\pi/3$ radianes (120°) y para el arreglo cuadrado es $\pi/2$ radianes (90°).

La posición del anillo se establece considerando que su radio interno (ρ_i) es igual a:

$$\rho_i = d - r \quad (4.6)$$

y su área está definida por:

$$A_{ef} = \pi (\rho_e^2 - \rho_i^2) \quad (4.7)$$

Considerando la ecuación (4.5) y (4.7), el radio externo (ρ_e) está definido como:

$$\rho_e = \sqrt{\rho_i^2 + \frac{A_{ef}}{\pi}} = \sqrt{\rho_i^2 + \frac{\theta}{2\pi} nr^2} \quad (4.8)$$

Luego, para un arreglo cuadrado:

$$\rho_e = \sqrt{\rho_i^2 + r^2} \quad (4.9)$$

Y para un arreglo hexagonal:

$$\rho_e = \sqrt{\rho_i^2 + 2r^2} \quad (4.10)$$

Usando ANSA el sistema adquiere simetría cilíndrica y el problema puede reducirse a 2D, disminuyendo de esta manera el costo computacional. En la Figura 4. 6 se muestra el problema 2D a resolver; donde se ilustra el espacio de simulación incluyendo las condiciones de contorno. El eje con simetría axial está localizado en el centro de la celda que contiene al electrodo central y a sus primeros vecinos, representados con un anillo en el plano de revolución. La altura de la celda se define de manera que el volumen considerado sea suficiente para no limitar la corriente por agotamiento de la especie electroactiva. Para

determinar este valor, se tiene en cuenta la altura del poro más una capa de solución de altura $z=6(Dt_{\max})^{1/2}$, donde D es el coeficiente de difusión de la especie y t_{\max} es el tiempo involucrado en el experimento para la velocidad de barrido más lenta. De esta manera, se garantiza que la concentración de la sonda electroactiva a la distancia perpendicular más lejana al electrodo sea igual a la concentración del seno de la solución; en cada experimento numérico se verificó su cumplimiento. Es importante remarcar que la corriente se calcula para el electrodo central y este valor se multiplica por el número de electrodos del arreglo para obtener la corriente total.

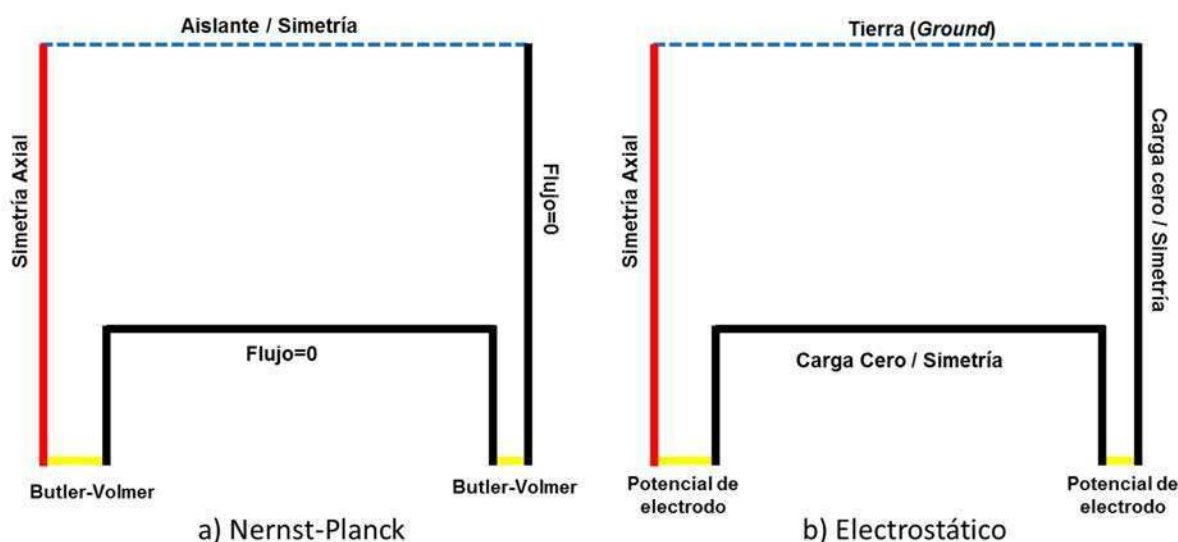


Figura 4. 6. Espacio de simulación en 2D para un electrodo en el fondo de un poro. Modelo para arreglos de nano/microelectrodos usando la simulación ANSA y las condiciones de contorno correspondientes para a) la ecuación de Nernst-Planck y b) la ecuación de Poisson.

4.2.3. Descripción de arreglos de nano y microelectrodos

En la Tabla 4. 1 se presentan las características geométricas de los arreglos de electrodos que se utilizaron para validar el modelo ANSA. Los datos experimentales corresponden a resultados reportados y a los obtenidos del sistema que se presenta en la Sección 3.3.2.2.3. El trabajo de Davies et al⁶ (arreglos A y B) resultó de gran utilidad debido a que permitió contrastar el modelo con un gran número de resultados experimentales, reportando también información completa sobre los parámetros de las voltametrías cíclicas y permitiendo comparar tanto el modelo DDA como ANSA con valores experimentales.

Arreglo	Material	Radio del electrodo / μm	Distancia interelectrodo / μm	Profundidad / μm	Electrodos en el arreglo	Referencia
A	Pt	10.0 ± 0.2	100 ± 1	1	210	6
B	Au	5.0 ± 0.2	100 ± 1	1	72	6
C	Au	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	$(35 \pm 4) \times 10^{-3}$	1	2.6×10^9	Sección 3.3.2.2.2.3.
D	C	$(9.7 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	1.54	0.010	2.41×10^7	3
E	Au	$(3.4 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	0.110	0.010	8.5×10^9	4

Tabla 4. 1. Características de los arreglos testeados

4.2.3.1. Arreglos A y B

Los arreglos A y B, obtenidos por Davies *et al*,⁶ son arreglos de microelectrodos (10 y 5 μm de radio de electrodo, respectivamente) desarrollados con técnicas de fotolitografía, con un número finito de electrodos. Los microelectrodos construidos por estas técnicas presentan geometrías muy bien definidas, encontrándose separados a $100\mu\text{m}$.

Estos electrodos se construyen depositando una capa de Pt u Au, dependiendo el caso, sobre una oblea de Si oxidada. Luego, se deposita la resina (*photoresist*) y se la irradia luz ultravioleta utilizando la máscara correspondiente. Los detalles experimentales pueden encontrarse en la Ref 6.

4.2.3.2. Arreglo C

Se utilizaron electrodos de trabajo de 4mm^2 a partir del aluminio 1145 (99.5%). Se realizó el electropulido del aluminio e inmediatamente el anodizado en una solución del electrolito ácido (H_2SO_4 15%) a temperatura ambiente, aplicando 15V durante 1min. Finalmente, se dejó en contacto con el electrolito ácido durante 5min y se lava con agua Milli-Q. La electrodeposición de oro se llevó a cabo usando una solución 10 mM HAuCl_4 a pH 4.0. El aluminio anodizado y una placa de oro macizo se utilizaron como electrodo de trabajo y como contraelectrodo, respectivamente. La electrodeposición de oro se realizó en 3 pasos: (i) -3mA cm^{-2} durante 8ms, (ii) 3mA cm^{-2} durante 2ms, (iii) no se aplica corriente durante 500ms. Se aplican en total 3000 ciclos.

Se realiza la caracterización de la alúmina por SEM y de las partículas generadas de oro por EXAFS, de la misma forma que se detalla en la Sección 3.2.5 y 3.2.6, respectivamente.

4.2.3.3. Arreglos D y E

Estos dos arreglos de nanoelectrodos son generados por técnicas *bottom up*. Ambos se pueden considerar como arreglos infinitos de electrodos, es decir puede despreciarse el efecto de borde en la frontera del arreglo (*vide infra*). En el caso del arreglo D, éste se genera por pirólisis de esferas de poliestireno soportadas en carbono, que fueron recubiertas por Al_2O_3 . Al pirolizar las esferas ordenadas en un empaquetamiento hexagonal, se forma un arreglo de nanoelectrodos de carbono de 97nm de radio. Por otro lado, el arreglo E de nanoelectrodos de oro se genera por técnicas de sol-gel, generando una membrana de zirconia sobre un sustrato de oro depositado en silicio. Más detalles de la síntesis de estos arreglos pueden encontrarse en las Ref 3 y 4, respectivamente.

4.2.4. Parámetros de la simulación

En la Tabla 4. 2 se resumen los parámetros usados para cada uno de los arreglos de electrodos que se utilizaron para validar el modelo, como se detalla en la sección de Resultados.

			Arreglo				
			A	B	C	D	E
Temperatura	T	K	294	294	298	298	298
Constante de los gases	R	$\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$	8.3144621				
Constante de Faraday	F	C mol^{-1}	9.64853399×10^4				
Permitividad relativa	ϵ_r		78.3				
Constante de velocidad (Butler-Volmer)	k_0	cm s^{-1}	0.05	0.01	0.6	0.2	0.004
Coefficiente de transferencia (Butler-Volmer)	α		0.5				

Potencial de equilibrio	E_{eq}	V	-0.193	0.174	0.210	0.185	0.170
Velocidad de barrido	ν		Variable				
Coeficiente de difusión de la especie reducida	D_{red}	$cm^2 s^{-1}$	8×10^{-6}	5.8×10^{-6}	7.6×10^{-6}	5×10^{-6}	3.2×10^{-6}
Concentración inicial de la especie reducida	$C_{red}0$	mM	0	1	50	1	2
Carga de la especie reducida	z_{red}		2	-4	-4	0	-4
Coeficiente de difusión de la especie oxidada	D_{ox}	$cm^2 s^{-1}$	8×10^{-6}	5.8×10^{-6}	6.5×10^{-6}	5×10^{-6}	3.2×10^{-6}
Concentración inicial de la especie oxidada	$C_{ox}0$	mM	1	0	0	0	0
Carga de la especie oxidada	z_{ox}		3	-3	-3	1	-3
Altura de la celda	h	mm	1.6	1.6	0.5	33	0.5
Potencial del electrodo	E		$ E_{max} - E_{min} - \nu * t - (E_{max} - E_{min})/\nu $				
Butler-Volmer	j_{reac}		$k_0 \left[C_{ox} * e^{\left(-\frac{F}{RT}\alpha(E-E_{eq})\right)} - C_{red} * e^{\left(\frac{F}{RT}(1-\alpha)(E-E_{eq})\right)} \right]$				

Tabla 4. 2. Parámetros utilizados en la simulación de los diferentes arreglos de electrodos estudiados.

4.3. Resultados y discusión

Los arreglos de electrodos fueron elegidos para validar el modelo ANSA, de manera de incluir ejemplos que representaran distintos casos de difusión planteados en la Figura 4. 1. Los arreglos A y B, fueron construidos de manera de que se comporten como microelectrodos individuales (Caso 2) y por lo tanto, son casos donde el modelo DDA puede aplicarse, permitiendo validar nuestro modelo respecto al DDA. El arreglo C es un ejemplo de los sistemas construidos a partir del método de síntesis que se desarrolla en el Capítulo 3. Este está formado por nanoelectrodos que se encuentran cerca, y por lo tanto, a las velocidades de barrido estudiadas siempre hay solapamiento de los perfiles difusionales (Caso 3). Por último,

los arreglos D y E, son arreglos de nanoelectrodos con un comportamiento de difusión infinita (Caso 4) pero con transiciones al caso 2 y 3, dependiendo de la velocidad de barrido. El Caso 1 corresponde a velocidades relativas de barrido muy altas que no fueron alcanzadas en ningún caso.⁷

4.3.1. Validación del modelo

4.3.1.1. Arreglos A y B: Caso 2

El arreglo A se utilizó para estudiar la respuesta por voltametría cíclica de una solución 1 mM $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ en 0.1M KCl, variando la velocidad de barrido entre 0.01 y 2 V s^{-1} . A partir de las voltametrías que se presentan en el trabajo y las corrientes de pico que se reportan, es posible hacer una comparación entre los dos modelos (DDA y ANSA) y los resultados experimentales. Se muestra en la Figura 4. 7 (izquierda) un ejemplo de las voltametrías simuladas comparadas con los resultados experimentales; mientras que en la Figura 4. 7 (derecha) se presentan los errores relativos porcentuales obtenidos en la simulación de la corriente máxima respecto a los resultados experimentales a diferentes velocidades de barrido.

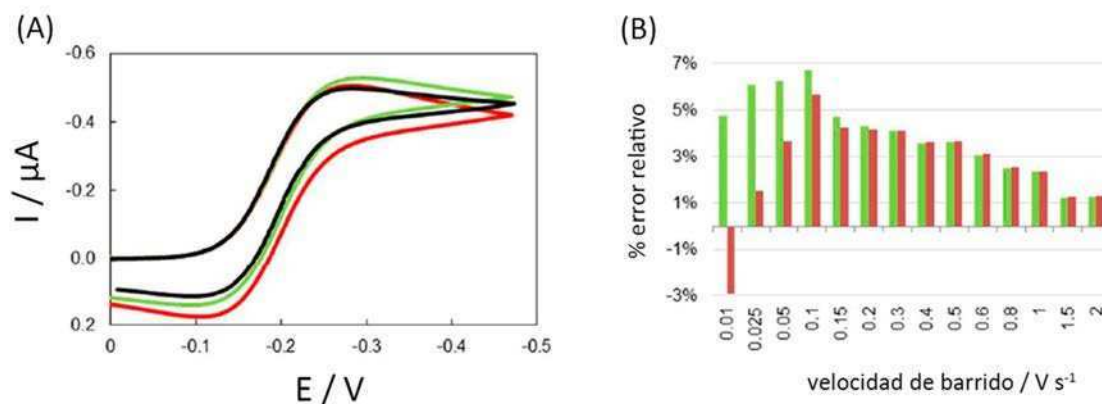


Figura 4. 7. (A) Voltametría cíclica de una solución de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 1mM + 0.1M KCl a 25 mV s^{-1} para el Arreglo A: datos experimentales (línea negra); datos simulados con el modelo DDA (línea verde); datos simulados con el modelo ANSA (línea roja). (B) Error porcentual relativo para la predicción de la corriente máxima a diferentes velocidades de barrido: modelo DDA en verde, modelo ANSA en rojo. Los datos experimentales fueron tomados de la Ref 6.

El otro ejemplo presentado por Davies et al. es un arreglo de menor número de electrodos (Arreglo B) que se expone a una solución 1 mM de ferrocianuro con 0.1 M de KCl. Se

llevan a cabo voltametrías cíclicas en el rango de 0.01 y 0.15V s⁻¹. En este caso, como el radio del electrodo es más chico y la distancia entre electrodos es la misma, el consumo de la sonda decrece y el solapamiento de las capas difusionales es despreciable aún a la velocidad de barrido más chica; con errores menores al 3% para ambos modelos (Figura 4. 8).

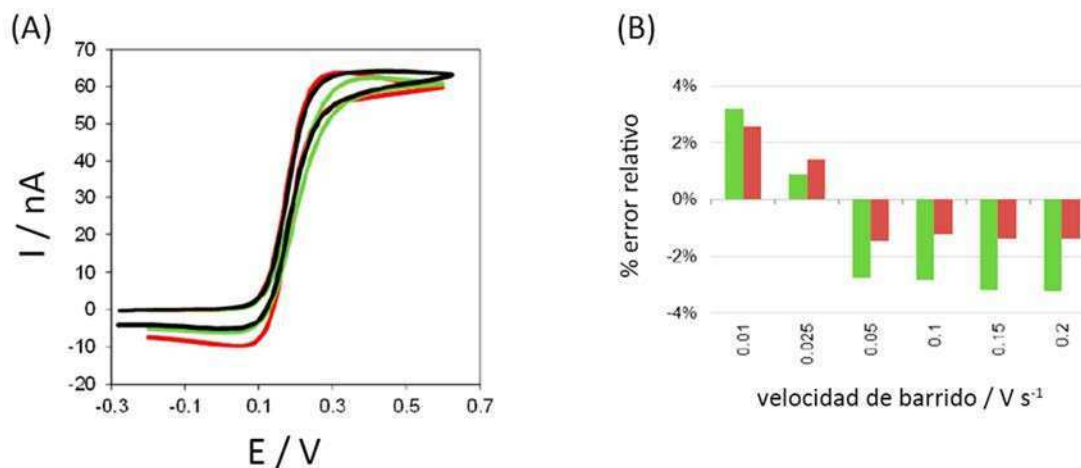


Figura 4. 8 (A) Voltametría cíclica de una solución de 1 mM ferrocianuro de potasio + 0.1M KCl a 50mV s⁻¹ para el Arreglo B: datos experimentales (línea negra); datos simulados con el modelo DDA (línea verde); datos simulados con el modelo ANSA (línea roja). (B) Error porcentual relativo para la predicción de la corriente máxima a diferentes velocidades de barrido: modelo DDA en verde, modelo ANSA en rojo. Los datos experimentales fueron tomados de la Ref 6.

Es importante destacar que tanto las condiciones de voltametría cíclica como la distribución geométrica de ambos arreglos fueron seleccionadas de manera tal que los perfiles de difusión no se solapan, es decir, de manera de estar en el caso 2 de la Figura 4. 1, por ello, el modelo DDA ajusta muy bien los datos en general. Esto nos permite validar nuestro modelo, el cual presenta también un muy buen ajuste a los datos experimentales en estos casos. A velocidades mayores a 0.2V s⁻¹ no existen diferencias entre los resultados de ambos modelos dado que el arreglo funciona como la suma de electrodos independientes.

Para el caso del arreglo A (Figura 4. 7), si bien el error relativo en todos los casos es muy pequeño, se observa que ambos modelos tienden a calcular una corriente mayor a la experimental debido a que no tienen en cuenta (DDA) o subestiman (ANSA) el efecto del consumo de los electrodos vecinos. Sin embargo, el modelo ANSA presenta errores relativos menores a velocidades de barrido por debajo de 0.2V s⁻¹, debido a que tiene en cuenta el solapamiento de las capas difusionales entre los primeros vecinos, mientras que el modelo DDA no considera el efecto producido por ninguno de los vecinos, el cual se hace más evidente

a velocidades de barrido bajas. Para el caso del arreglo B (Figura 4. 8), formado por muy pocos electrodos, ambos modelos subestiman la respuesta de la corriente. En este caso, es necesario hacer un análisis más amplio.

En ambos modelos, la corriente de un electrodo se multiplica por el número de electrodos en el arreglo, como si éste fuera un arreglo infinito de poros. En el modelo ANSA, se considera que los electrodos vecinos están distribuidos simétricamente alrededor del electrodo que se estudia. Si el arreglo es finito, es decir, está formado por pocos electrodos, esto no es cierto para los electrodos que se encuentran en las fronteras del arreglo. La corriente experimental generada para los electrodos individuales ubicados en la frontera es mayor que la corriente producida por un electrodo dentro del arreglo, debido a que el flujo de la sonda electroactiva, al no tener parte de los vecinos que consuman material, es mayor para éstos electrodos. Lo mismo ocurre con el modelo de DDA, debido a que éste tiene en cuenta un área limitada alrededor de cada electrodo. Por lo tanto, ambos modelos subestiman la corriente experimental cuando el número de electrodos es reducido, siendo despreciable este efecto en arreglos extendidos.

En el arreglo A, que presenta una geometría de 14x15 electrodos formando un cuadrado, de los 210 electrodos hay 156 internos y 54 en la frontera, que representan el 26% del total de electrodos. A partir de los datos experimentales, podemos considerar que, en este caso, a bajas velocidades de barrido la sobreestimación que proviene de despreciar los vecinos es más importante, y los valores de corrientes predichos son mayores que los experimentales en todos los casos para DDA, mientras que para ANSA la competencia de los vecinos comienza a ser sobrestimada a muy bajas velocidades. Por el otro lado, para el arreglo B, un arreglo de 8x9 electrodos, 30 electrodos se encuentran en la frontera, representando el 42% del total de electrodos. En este caso, los errores se compensan; a bajas velocidades de barrido, el error introducido por despreciar el efecto de solapamiento de las capas difusionales es más importante, mientras que a altas velocidades, los electrodos internos se comportan como lo predice el modelo pero los electrodos de frontera incorporan más material que el predicho. En este caso, la relación $d/r = 20$ es lo suficientemente grande como para que el solapamiento de los perfiles difusionales sean mínimos y, por lo tanto, ambos casos presentan resultados muy parecidos. Finalmente, ambos modelos pueden aplicarse cuando los arreglos pueden considerarse como infinitos, es decir, cuando la difusión radial en

la frontera del arreglo puede considerarse despreciable.⁸ Esto ocurre en el caso de todos los arreglos que se presentan.

4.3.1.2. Arreglo C: Caso 3

Un aspecto a tener en cuenta en este tipo de arreglos es el tamaño de los electrodos individuales. Cuando se obtienen electrodos de diámetros pequeños, la componente radial de cada electrodo se hace más relevante. En particular, esto se hace evidente, con el arreglo de nanoelectrodos que hemos generado formando nanopartículas pequeñas de oro en alúmina porosa. Como se ha desarrollado previamente (Sección 1.2.2), el anodizado de aluminio genera un arreglo hexagonal de poros. Algunos grupos han crecido nanobarras de metales dentro de la alúmina porosa,⁹ mientras que en esta tesis se ha tomado un enfoque diferente y hemos sintetizado nanopartículas de radios de menos de 2nm. Para realizar la simulación se estudió el sistema donde se utiliza como precursor para la síntesis $[\text{AuCl}_4]^-$ obteniéndose NPs de $1.3 \pm 0.3\text{nm}$ de radio. El tamaño de estas AuNPs se determinó in situ por EXAFS en el borde L3 del Au.

En la Figura 4. 9 (izquierda) se muestra los resultados de voltametría cíclica de ferrocianuro 50mM a 100mV s^{-1} comparada con los valores predichos usando ANSA y DDA; mientras que la Figura 4. 9 (derecha) muestra diferencia porcentual relativa entre la corriente máxima predicha por los modelos y los resultados experimentales. En este caso, se observa una diferencia mayor entre los modelos, siendo ANSA el más adecuado. A su vez, vale la pena notar que los errores relativos son mayores que los obtenidos en los casos anteriores para ambos modelos. Esto puede atribuirse a varias razones. Por un lado, razones experimentales: la incertidumbre en las características geométricas del arreglo es mayor en los métodos *bottom-up* comparados con la fabricación mediante fotolitografía (ver Tabla 4. 1). Por otro lado, a las limitaciones propias del modelo. Si bien un modelo basado en un control difusional, como los que se presentan en este Capítulo, representan una buena aproximación para el estudio de sistemas empotrados es necesario aclarar que, este tratamiento convencional (electroneutralidad y transporte exclusivamente controlado por difusión), puede volverse inadecuado en electrodos con radios menores a 5nm debido al mayor efecto de la doble capa en el transporte de carga interfacial y los procesos de transferencia electrónica. Un

tratamiento más preciso para el transporte de masa en este tipo de nanoelectrodos requiere consideraciones explícitas de la doble capa y sus efectos.¹⁰⁻¹³

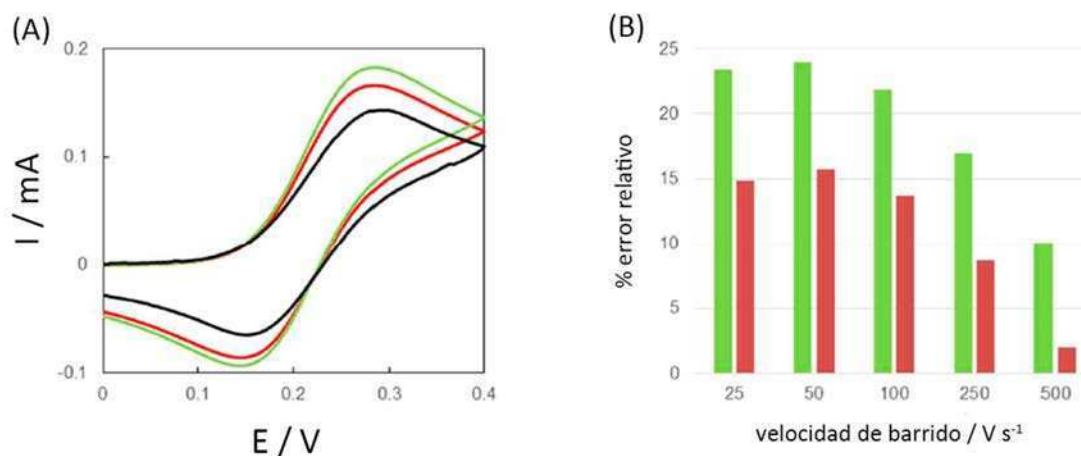


Figura 4. 9. (A) Voltametría cíclica de una solución 50 mM ferrocianuro en buffer HEPES 50mM pH 7.0 a 100 mV s^{-1} para el Arreglo C: datos experimentales (línea negra); datos simulados con el modelo DDA (línea verde); datos simulados con el modelo ANSA (línea roja). (B) Error porcentual relativo para la predicción de la corriente máxima a diferentes velocidades de barrido: modelo DDA en verde, modelo ANSA en rojo.

4.3.1.3. Arreglos D y E: Caso 4 con transiciones al caso 2 y 3

El modelo desarrollado fue utilizado para predecir el comportamiento de otros dos arreglos, D y E, con electrodos que presentan radios de 97 y 34nm, respectivamente. Estos son arreglos de nanoelectrodos pero que no presentan las limitaciones del ejemplo previo donde el tamaño de los electrodos (1.3nm de radio) es del orden del espesor de la doble capa. Las principales características de estos arreglos se presentan en la Tabla 4. 1.

El arreglo D corresponde a un arreglo hexagonal de nanoelectrodos producidos en alúmina, donde el área electroactiva es carbón obtenido por un proceso pirolítico.³ La característica interesante de este caso es el hecho de que presenta un radio en la escala submicrométrica y la relación entre la distancia interelectrodos y el radio del electrodo es 16. A partir de medidas de impedancia, los autores concluyen que el comportamiento de este arreglo puede aproximarse al caso de nanoelectrodos independientes sólo si la velocidad de barrido es mayor a 6 V s^{-1} . Mientras que a velocidades de barrido muy bajas (1 mV s^{-1}), los autores reportan un comportamiento cercano al Caso 4.

Para seguir la transición entre un régimen difusional prácticamente lineal (caso 4, velocidades de barrido bajas) a un régimen de electrodos paralelos independientes, se

confrontó la capacidad predictiva del modelo con los datos experimentales reportados, cubriendo velocidades de barrido entre 0.01 y 1 V s⁻¹. Cuando el arreglo está en las condiciones del caso 4, la corriente pico puede calcularse considerando el arreglo como un electrodo donde parte de la superficie está bloqueada; lo que causa un aparente decrecimiento de la constante de velocidad de transferencia heterogénea que es proporcional a la fracción de área electroquímicamente activa.¹⁴⁻¹⁶ Por lo tanto, una opción es comparar los valores experimentales con aquellos que se pueden predecir para un electrodo plano infinito (caso 4 en Figura 4. 1) con una fracción de área activa (0.0144) y actuando como un sistema *quasi-reversible*.¹

En el otro extremo, si el comportamiento es de electrodos independientes infinitamente alejados (caso 2) es válida la siguiente expresión:

$$i_{ind} = \frac{4nFDC^0r}{\left(\frac{4h}{\pi r}\right)+1} \quad (4.11)$$

donde C⁰ es la concentración de la sonda en el bulk, r es el radio del electrodo, h es la profundidad del poro y el resto de los símbolos tienen el significado usual.¹⁷ Si se tiene en cuenta el número de nanoelectrodos y considerándolos independientes, la corriente esperada para este arreglo es de 398.8μA. En la Tabla 4. 3 se presentan los valores de corriente de pico predichos para diferentes velocidades de barrido considerando el arreglo como un electrodo con un comportamiento *quasi-reversible* (columna 2), predichos por ANSA (columna 3) y los valores experimentales (columna 4). En este caso, la simulación fue llevada a cabo calculando 4 ciclos para alcanzar una respuesta similar a la observada en los resultados experimentales. En la Figura 4. 10 se muestra el ajuste para una voltametría cíclica a 100mV s⁻¹. Dado que el modelo DDA no considera solapamiento de perfiles difusionales, no resulta aplicable para describir estos arreglos y por lo tanto no se incluye en la comparación de resultados.

Velocidad de barrido/ mV s ⁻¹	Quasi-reversible	ANSA	Experimental (Ref 3)
10	28	22	23
50	61	43	46
100	84	57	62
500	178	95	94
1000	247	113	100

Tabla 4. 3. Comparación de la corriente de pico predicha vs valores experimentales (Ref 3) del arreglo D (corrientes en μA).

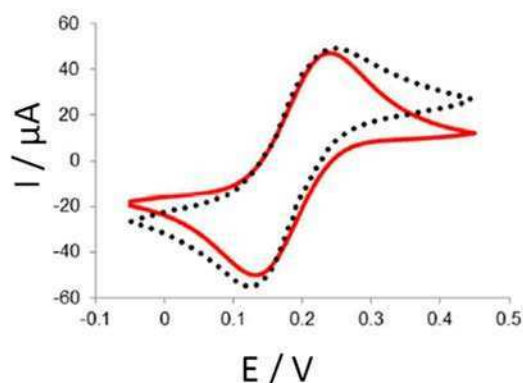


Figura 4. 10. Voltametría cíclica de una solución 1mM de ferrocenometanol a 100 mV s^{-1} para el arreglo D: la línea negra punteada corresponde a los datos experimentales, mientras que la línea roja, representa los datos simulados con el modelo ANSA. Los datos experimentales se tomaron de la Ref 3.

Se observa en la Tabla 4. 3 que a 10 mV s^{-1} la diferencia entre las dos corrientes calculadas y el valor experimental es pequeña; sin embargo, al aumentar la velocidad de barrido ninguno de los dos modelos analíticos (Caso 2, que según la ecuación 4.11 reportaría una corriente igual a $399 \mu\text{A}$, ni caso 4, tabulado en la columna de comportamiento *quasi-reversible*) pueden explicar el resultado experimental obtenido. Mientras que con el modelo ANSA es posible hacer una predicción de la corriente de pico con un error menor al 10% hasta 500 mV s^{-1} . A velocidades de barrido más altas, los valores experimentales se ven afectados por una resistencia no compensada, que ya se observa a 0.1 V s^{-1} (Figura 4. 10) al comparar la pendiente al inicio del barrido para el voltograma experimental con el simulado. Este comportamiento es más marcado cuando aumenta la velocidad de barrido y es un efecto no considerado en el modelo numérico.

Finalmente, los datos experimentales obtenidos por otro arreglo de nanoelectrodos construidos utilizando un método *bottom up* fue simulado utilizando el modelo ANSA (Arreglo E). En este caso, los datos pertenecen a un trabajo publicado por Lantiat *et al.*⁴ Este arreglo está formado por electrodos de 34nm de radio ubicados a una distancia entre electrodos de 110nm. El comportamiento electroquímico observado a las velocidades de barrido utilizadas en el trabajo representa una transición entre el caso 3 y 4. En la Tabla 4. 4 se muestran las pequeñas diferencias obtenidas entre los resultados experimentales y los predichos con ANSA teniendo en cuenta la superposición de las capas difusionales. Como se explicó para el caso anterior, el arreglo se comporta como un electrodo donde parte de su superficie está

bloqueada. Es por ello, que se compara los valores experimentales con los predichos considerando el caso de un electrodo plano infinito (caso 4, Figura 4. 1) con una fracción de área activa de 0.33 y actuando como un sistema *quasi-reversible*. La diferencia con los valores experimentales muestra un rango estrecho (23 a 35%) comparado con el ejemplo anterior, donde a altas velocidades de barrido la diferencia llega a ser del 75%. Luego, considerando las incertezas experimentales, puede considerarse que el arreglo tiene un comportamiento cercano al caso 4. En la misma tabla, se muestran los valores predichos para la corriente de pico por ANSA, mostrando errores menores al 12% en todos los casos.

Velocidad de barrido / mV s^{-1}	Quasi-reversible	ANSA	Experimental (Ref 4)
10	0.096	0.070	0.070
50	0.203	0.148	0.152
200	0.388	0.281	0.322
500	0.594	0.431	0.482

Tabla 4. 4. Comparación de la corriente de pico predicha con los valores experimentales (Ref 4) para el arreglo E (corrientes en mA).

4.3.2. Efecto del radio del electrodo

Como se estableció previamente, el radio del electrodo juega un rol fundamental en la formación de los campos de difusión. La eficiencia de cada electrodo para sumar corriente en el arreglo está dada por cuan cerca se encuentra el valor experimental a la corriente producida por un nano o microelectrodo aislado. Estos valores pueden determinarse prediciendo la corriente de un electrodo empotrado individual usando la ecuación 4.11 (i_{ind}), y la corriente predicha por el modelo ANSA para un electrodo individual en el arreglo ($i_{\text{s,ANSA}}$). La relación entre $i_{\text{s,ANSA}}/i_{\text{ind}}$ para diferentes tamaños de electrodos y distancia interelectrodos nos dan una idea del efecto en la eficiencia de la corriente.

En la Figura 4.11 se compara la relación de corriente obtenido para un electrodo de 5nm y otro de 5 μm de radio en un arreglo de electrodos empotrados (1 μm de profundidad) a diferentes distancias interelectrodo considerando que se realiza una voltametría cíclica en solución similar a la utilizada para el arreglo C a 50 mV s^{-1} . La distancia interelectrodo está definida en una escala relativa donde la unidad es el radio del electrodo en cada caso. Un punto importante de abordar es el efecto de la difusión radial en cada electrodo; para el electrodo de 5 μm , en la escala de tiempo del experimento que se muestra en la Figura 4.11, la

corriente se produce principalmente por el flujo perpendicular de la sonda a cada electrodo individual y el solapamiento de los campos difusionales puede despreciarse. Por otro lado, para el electrodo de 5nm, el flujo radial representa una contribución importante y el solapamiento de los campos difusionales se nota inmediatamente. Como se puede ver, a una separación de 20 veces el radio r , aún no actúan como electrodos individuales en la escala nanométrica, mientras que en la escala micrométrica la diferencia es despreciable y los electrodos son independientes. Este efecto es más importante cuando la distancia entre electrodos decrece, y la misma tendencia se observa cuando la profundidad del poro decrece. Esta situación se observa comúnmente en muchos arreglos de nanoelectrodos construidos por procedimientos *bottom-up*^{3,4,18} donde el uso de la condición $d/r \geq 12$ para considerar como independientes los electrodos no se puede aplicar.

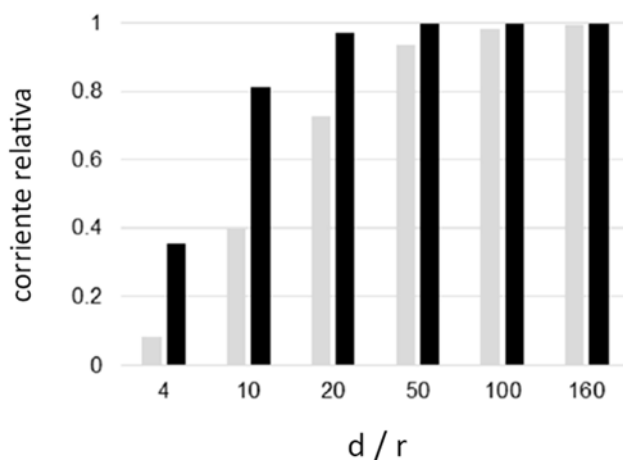


Figura 4.11. Corriente máxima de un electrodo en un arreglo relativa a un electrodo individual para diferentes distancias interelectrodo. Las corrientes se obtuvieron simulando voltametrías cíclicas a 50 mV s^{-1} . En gris se muestran los resultados para el radio de electrodo de 5 nm y, en negro, los resultados para electrodos de $5 \mu\text{m}$ de radio. Profundidad de poro: $1 \mu\text{m}$.

4.3.3. Efecto de la velocidad de barrido

El modelo propuesto permite cambiar, no solo, el radio del electrodo, sino también la velocidad de barrido, la distancia interelectrodo y la profundidad de los electrodos, permitiendo analizar el efecto de modificar los parámetros al diseñar arreglos de electrodos, logrando, de esta manera, diseñar arreglos con comportamientos predecibles.

Utilizando la misma definición de corriente relativa ($i_{s,ANSA}/i_{ind}$) que en la sección anterior, se analiza el efecto de la velocidad de barrido a distintas distancias interelectrodos relativas al radio, para electrodos de radio 50nm. En la Figura 4. 12 se muestran los resultados a tres velocidades de barrido diferentes: 10, 100 y 1000mV s⁻¹. Velocidades de barrido menores implican un mayor tiempo de experimento y por lo tanto, zonas de difusión mayores que involucran un mayor efecto de solapamiento de los perfiles difusionales y una corriente relativa menor. Más aún, esta disminución se observa a todas las velocidades de barrido para un arreglo con este radio de nanoelectrodo, incluso a $d/r = 50$, donde, a velocidades bajas la corriente decrece a menos del 50%. Esto muestra que para nanoelectrodos el peso de la difusión radial es muy grande y aún a velocidades de barrido muy altas, como puede ser 1V s⁻¹, se necesitan distancia interelectrodos grandes para lograr que cada uno de ellos se comporte como aislado; de lo contrario, el arreglo se encontrará en el caso intermedio 3. Por lo tanto, para lograr pasar de un caso a otro variando la velocidad de barrido se requiere que los electrodos estén muy separados como en el caso de d/r cercanos a 100, donde a velocidades rápidas de 1V s⁻¹ el sistema se encuentra en el caso 2 y al bajar la velocidad de barrido este pasará al caso 3.

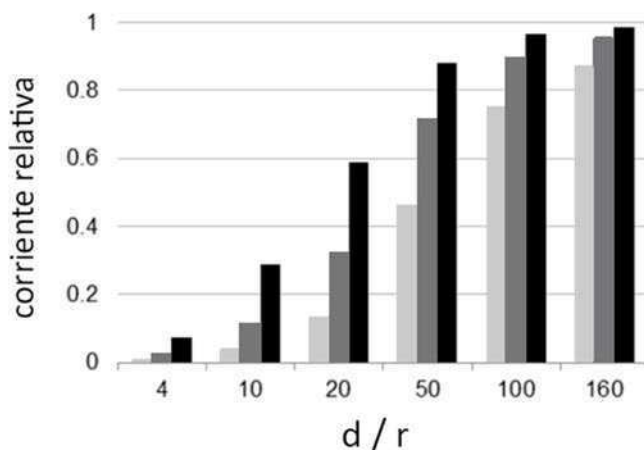


Figura 4. 12. Efecto de la velocidad de barrido a diferentes distancias interelectrodo para un arreglo formado por electrodos de 50nm de radio. Velocidades de barrido (mV s⁻¹): 10 (gris claro), 100 (gris oscuro) y 1000 (negro). La escala de corriente es relativa a la máxima corriente observada para un electrodo aislado de 50nm de radio. Profundidad de poro: 150nm.

4.3.4. Efecto de la profundidad del poro

Otro parámetro geométrico que tiene un efecto relevante sobre el comportamiento de los arreglos es la profundidad del poro en estos electrodos empotrados, aún para

profundidades no muy grandes (del orden de algunos cientos de nanómetros), como se puede observar en la Figura 4. 13. En esta figura se muestra nuevamente la corriente relativa ($i_{s,ANSA}/i_{ind}$) para un arreglo de nanoelectrodos con radios de 5nm de radio y a dos distancias interelectrodos diferentes. En ambos casos la velocidad de barrido es de 50mV s^{-1} . Se muestra para cada distancia interelectrodo el efecto a tres profundidades de poro diferentes: 0, 0.2 y $1\mu\text{m}$. Se puede ver que para arreglos coplanares (profundidad= $0\mu\text{m}$), el solapamiento de los campos difusionales tiene un efecto importante incluso a una distancia interelectrodo $d/r = 100$. Luego, cuanto más profundo es el poro, los perfiles de difusión quedan contenidos dentro de él y menor es el solapamiento de los perfiles de diferentes electrodos; actuando casi como electrodos individuales cuando la distancia interelectrodo $d/r = 100$ y el poro tiene, al menos, $1\mu\text{m}$ de profundidad.

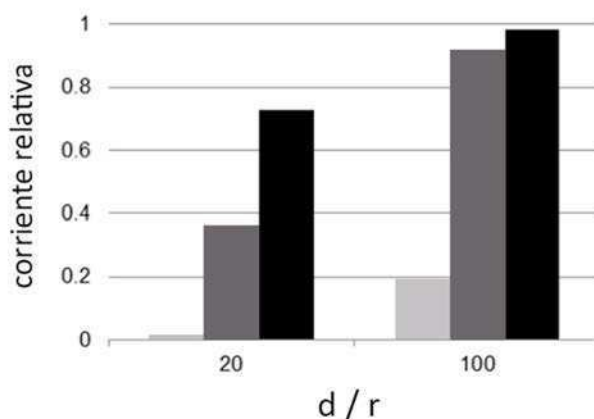


Figura 4. 13. Efecto de la profundidad del poro a diferentes distancias interelectrodo para un arreglo de electrodos de 5nm de diámetro. Profundidades de poro (μm): 0 (gris claro), 0.2 (gris oscuro) y 1.0 (negro). La escala de corriente es relativa a la máxima corriente observada para un electrodo de radio 5nm aislado. Velocidad de barrido= 50mV s^{-1} .

4.3.5. Estudio de los sistemas de nanopartículas/clusters metálicos dentro de alúmina porosa

Los sistemas de nanopartículas/clusters metálicos de Au y Pt pueden estudiarse a partir de las técnicas de voltametría cíclica utilizando como sonda electroactiva ferrocianuro como se describió en el Capítulo 3 para diferentes casos. El método de síntesis desarrollado permite tener partículas confinadas que presentan grandes ventajas en cuanto a sus aplicaciones, pero que son difíciles de caracterizar en cuanto a la cantidad de partículas obtenidas por poro y su ubicación en las matrices porosas. Por imágenes SEM es posible descartar la presencia de NPs en la superficie superior del óxido poroso. A su vez, en el trabajo

reportado por Houser *et al.*,¹⁹ se muestra cómo cae el potencial a lo largo del poro, siendo el fondo de éstos el único lugar donde el potencial debido al espesor de la barrera de óxido permite la reducción de los iones. Por lo tanto, se espera que las partículas se formen allí. Mediante imágenes de HR-TEM que se obtuvieron para una lamela de Al/Al₂O₃/Ni, podemos asegurar que éstos se ubican en el fondo de la matriz porosa y, en este caso, existen más de una partícula por poro. Sin embargo, para el caso del Au y Pt no fue posible realizar estas medidas hasta el momento, por no disponibilidad del equipo. Aun así, en estos casos, los valores de corriente de pico y la forma de la voltametría pueden ser de utilidad para pensar este problema.

En la Sección 4.3.1.2 se presentan los resultados obtenidos para el arreglo C, generado a partir de la electrodeposición de oro utilizando como precursor AuCl₄⁻. Se muestra la posibilidad de simular el comportamiento electroquímico de estos sistemas con el modelo ANSA, relacionándolo con las propiedades geométricas del arreglo de poros y el tamaño de la partícula. En este caso, se consideró una partícula de 2.6nm de diámetro por poro y los resultados obtenidos a partir de la simulación se corresponden con los obtenidos experimentalmente. Se realiza un análisis similar, para el caso de las partículas de oro generadas a partir del precursor de Au(CN)₂⁻ aplicando el mismo esquema de ciclos de electrodeposición que en el caso del precursor anterior. En la Sección 3.3.2.2.3 se discute el efecto del precursor y se muestran las voltametrías cíclicas de ambos sistemas a 50mV s⁻¹. A partir de los resultados de EXAFS se observa que el tamaño obtenido en ambos casos es muy similar; sin embargo, la señal de fluorescencia, asociada con la cantidad de partículas, en el caso de utilizar como precursor AuCl₄⁻ era 3 veces las obtenidas con Au(CN)₂⁻.

Se muestran en la Figura 4. 14, la voltametría cíclica simulada para un sistema que presenta un arreglo hexagonal de poros de 11nm de diámetro, 35nm de separación interporo y 1µm de profundidad, con un radio activo de poro de 1.1nm, llevada a cabo a 50mV s⁻¹, junto con la voltametría obtenida experimentalmente a la misma velocidad de barrido, para la electrodeposición a partir de Au(CN)₂⁻, el cual presenta las características geométricas detalladas. Por otro lado, también se muestra la CV simulada suponiendo que uno de cada tres poros está ocupado. Para ello, se simula el comportamiento de un poro rodeado por un anillo que está al doble de distancia. Al hacer esto, estamos suponiendo que hay una distribución regular de poros ocupados y desocupados. Se puede ver que el caso que mejor ajusta a los resultados experimentales corresponde a aquel donde se supone esta relación de poros

ocupados-desocupados; y por lo tanto, estaría indicando que en uno de cada tres poros existe una nanopartícula de oro; lo que se corresponde con la relación de fluorescencias obtenidas por XAS.

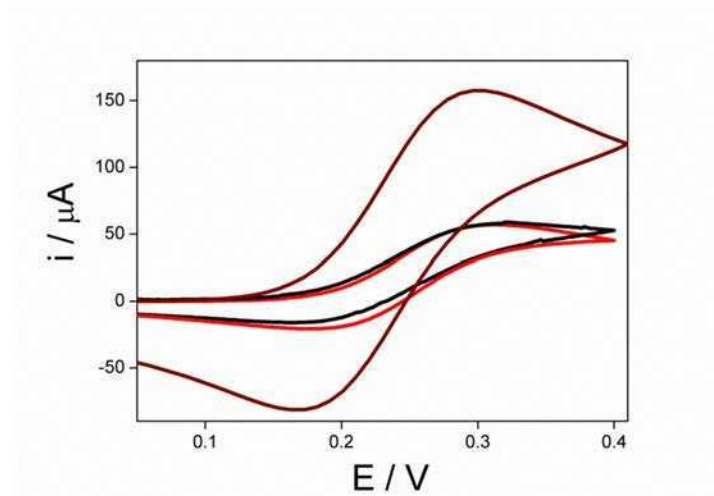


Figura 4. 14. Voltametría cíclica a 50mV s^{-1} para un electrodo $\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Au}$ con poros de 11nm de diámetro y partículas de 2.2nm de diámetro generadas utilizando como precursor $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ (negro) junto con el voltagrama simulado utilizando el modelo ANSA suponiendo que 1 de cada 3 poros están ocupados (rojo) y todos los poros ocupados (bordo).

Es posible, hacer el mismo análisis para el caso de los clusters de Pt. En este caso, se determina en la Sección 3.3.2.3 que el tamaño de éstos es de 1.1nm de diámetro. Se muestra en la Figura 4. 15, los resultados de la voltametría simulada a partir de un radio activo de poro de 0.5nm a 50mV s^{-1} . Se puede ver que ésta ajusta bien el comportamiento obtenido experimentalmente. Por lo que, podemos suponer, que en el caso del Pt todos los poros están ocupados.

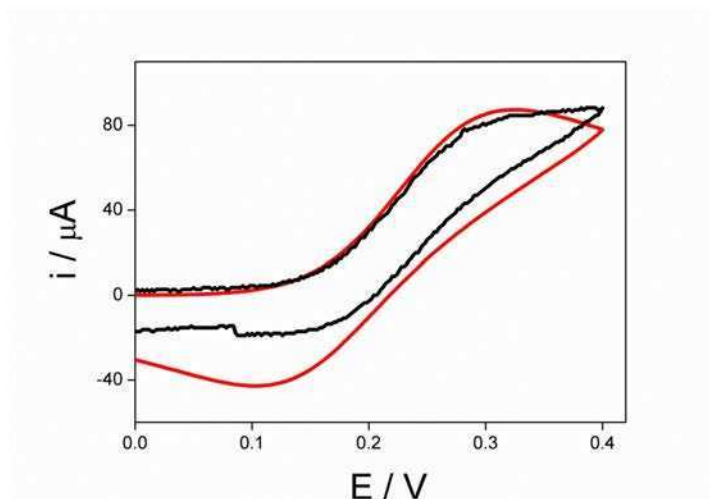


Figura 4. 15. Voltametría cíclica a 50mV s^{-1} para un electrodo $\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Pt}$ con poros de 11nm de diámetro y partículas de 1nm de diámetro (negro) junto con el voltagrama simulado utilizando el modelo ANSA (rojo) suponiendo todos los poros ocupados.

Este análisis resulta relevante para poder estimar el número de partículas presentes en un arreglo y determinar así la capacidad catalítica de las partículas a partir del estudio de la cinética de reacciones y poder comparar con valores obtenidos en nuestro caso con valores reportados en bibliografía, como se presenta en el Capítulo 6.

4.4. Sumario

En este Capítulo se presentan simulaciones numéricas de experimentos de voltametrías cíclicas de arreglos de nano y microelectrodos. Para lo cual se desarrolló un modelo basado en elementos finitos que resuelve un sistema de ecuaciones en derivadas parciales para una geometría simplificada, donde los electrodos vecinos más cercanos son tenidos en cuenta en los procesos de difusión y transferencia electrónica, llevados a cabo por la especie electroactiva.

La geometría empleada consiste en dividir el arreglo en celdas formadas por un electrodo central rodeado por los electrodos vecinos más cercanos que forman un anillo a su alrededor. Como quedó demostrado por los ejemplos que se presentaron a lo largo del Capítulo, tomando sólo los vecinos más próximos, el modelo es capaz de describir muy bien los resultados experimentales de cinco arreglos que se presentan como ejemplos de los

diferentes patrones de difusión posibles (Figura 4. 1). Permittedo de este modo la validación del modelo propuesto y su extensión a otros análisis.

El modelo aquí presentado representa una mejora en el tratamiento del transporte de masa por difusión en arreglos de micro y nanoelectrodos empotrados donde se verifica un control difusional.¹⁰⁻¹³ Éste puede describir y predecir cuantitativamente la corriente resultante de cualquiera de los casos presentados, independientemente de la escala de tiempo del experimento y, por lo tanto, representa una herramienta muy interesante para el diseño de estos arreglos.

Este modelo permite trabajar con electrodos de tamaño nanométricos (arreglos C, D y E) donde el solapamiento de los campos difusionales puede ser importante, incluso a distancias interelectrodo mayores a 12 veces el radio del electrodo, una distancia que en general se propone como regla sencilla para observar un comportamiento de electrodos independientes.²⁰ A su vez, vale la pena mencionar, que el modelo trabaja con las dimensiones reales sin necesidad de usar números adimensionales, permitiendo una evaluación directa de los resultados.

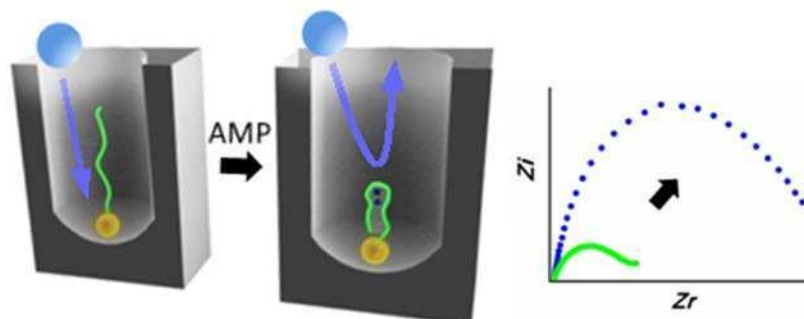
Referencias

- (1) Bard, A.; Faulkner, L. Chapter 4: Mass Transfer by Migration and Diffusion. In *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; WILEY-VCH Verlag: New York, 2001.
- (2) Arrigan, D. W. M. Nanoelectrodes, Nanoelectrode Arrays and Their Applications. *Analyst* **2004**, *129* (12), 1157–1165.
- (3) Duay, J.; Goran, J. M.; Stevenson, K. J. Facile Fabrication of Carbon Ultramicro- to Nanoelectrode Arrays with Tunable Voltammetric Response. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (23), 11528–11532.
- (4) Lantiat, D.; Vivier, V.; Laberty-Robert, C.; Grosso, D.; Sanchez, C. Gold Nanoelectrode Arrays and Their Evaluation by Impedance Spectroscopy and Cyclic Voltammetry. *ChemPhysChem* **2010**, *11* (9), 1971–1977.
- (5) Davies, T. J.; Compton, R. G. The Cyclic and Linear Sweep Voltammetry of Regular and Random Arrays of Microdisc Electrodes: Theory. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *585* (1), 63–82.
- (6) Davies, T. J.; Ward-Jones, S.; Banks, C. E.; del Campo, J.; Mas, R.; Muñoz, F. X.; Compton, R. G. The Cyclic and Linear Sweep Voltammetry of Regular Arrays of Microdisc Electrodes: Fitting of Experimental Data. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *585* (1), 51–62.
- (7) Guo, J.; Lindner, E. Cyclic Voltammograms at Coplanar and Shallow Recessed Microdisk Electrode Arrays: Guidelines for Design and Experiment. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (1), 130–138.
- (8) Amatore, C.; Oleinick, A. I.; Svir, I. Numerical Simulation of Diffusion Processes at Recessed Disk Microelectrode Arrays Using the Quasi-Conformal Mapping Approach. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (11), 4397–4405.
- (9) Lee, W.; Park, S.-J. Porous Anodic Aluminum Oxide: Anodization and Templated Synthesis of Functional Nanostructures. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (15), 7487–7556.
- (10) Sun, Y.; Liu, Y.; Liang, Z.; Xiong, L.; Wang, A.; Chen, S. On the Applicability of Conventional Voltammetric Theory to Nanoscale Electrochemical Interfaces. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (22), 9878–9883.
- (11) Smith, C. P.; White, H. S. Theory of the Voltammetric Response of Electrodes of Submicron Dimensions. Violation of Electroneutrality in the Presence of Excess Supporting Electrolyte. *Anal. Chem.* **1993**, *65* (23), 3343–3353.
- (12) Liu, Y.; He, R.; Zhang, Q.; Chen, S. Theory of Electrochemistry for Nanometer-Sized Disk Electrodes. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (24), 10812–10822.

- (13) Dickinson, E. J. F.; Compton, R. G. Diffuse Double Layer at Nanoelectrodes. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (41), 17585–17589.
- (14) Fontaine, O.; Laberty-Robert, C.; Sanchez, C. Sol–Gel Route to Zirconia–Pt-Nanoelectrode Arrays 8 Nm in Radius: Their Geometrical Impact in Mass Transport. *Langmuir* **2012**, *28* (7), 3650–3657.
- (15) Menon, V. P.; Martin, C. R. Fabrication and Evaluation of Nanoelectrode Ensembles. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (13), 1920–1928.
- (16) Amatore, C.; Savéant, J. M.; Tessier, D. Charge Transfer at Partially Blocked Surfaces. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1983**, *147* (1), 39–51.
- (17) Bond, A. M.; Luscombe, D.; Oldham, K. B.; Zoski, C. G. A Comparison of the Chronoamperometric Response at Inlaid and Recessed Disc Microelectrodes. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1988**, *249* (1), 1–14.
- (18) Peinetti, A. S.; Herrera, S.; González, G. a; Battaglini, F. Synthesis of Atomic Metal Clusters on Nanoporous Alumina. *Chem. Commun. (Camb)*. **2013**, *49* (96), 11317–11319.
- (19) Houser, J. E.; Hebert, K. R. Modeling the Potential Distribution in Porous Anodic Alumina Films during Steady-State Growth. *J. Electrochem. Soc.* **2006**, *153* (12), B566–B573.
- (20) Lee, H. J.; Beriet, C.; Ferrigno, R.; Girault, H. H. Cyclic Voltammetry at a Regular Microdisc Electrode Array. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *502* (1–2), 138–145.

Capítulo 5: Desarrollo de un aptasensor impedimétrico libre de marcadores para la detección de moléculas pequeñas

Pequeños cambios, grandes señales. La modificación de nanopartículas de oro confinadas en alúmina porosa modificadas con aptámeros permite la generación de un sistema muy sensible a los cambios conformacionales producidos por el reconocimiento de moléculas pequeñas.



5.1. Introducción

La nanotecnología ha extendido la aplicación de moléculas ya conocidas, como oligonucleótidos de DNA o RNA, desarrollando diversos usos desde imágenes guiadas en terapia de cáncer¹ hasta nanoestructuras para biosensado.² En este último campo, las moléculas pequeñas son un interesante objetivo debido a su importante rol en muchos campos como la señalización en células, drogas en medicina, pesticidas, entre muchos otros.^{3,4} La relevancia de estos campos justifican el esfuerzo para lograr su determinación directa, una discusión vigente en la comunidad científica dedicada al desarrollo de sensores.⁵⁻⁷

El uso de aptámeros en la construcción de sensores no involucró un simple reemplazo de los anticuerpos, sino que permitió el desarrollo de estrategias de detección completamente nuevas, fundamentalmente haciendo uso de dos características que presentan los mismos. Una de ellas involucra el cambio conformacional de estos oligonucleótidos al unirse a la molécula objeto de reconocimiento (analito); la otra se basa en la posibilidad de diseñar cadenas complementarias que se hibridicen con ellos, lo que permitió el desarrollo de varios ensayos basados en desplazamientos competitivos. En la Figura 5. 1, se representan algunas de las estrategias reportadas en bibliografía. El primer caso (A), comprende un ensayo análogo al ensayo de tipo “sándwich” que se lleva a cabo con anticuerpos.⁵ Este tipo de ensayos requiere que el analito presente un tamaño lo suficientemente grande como para tener dos sitios de unión a ligandos. El caso (B), es un ejemplo de ensayo donde el analito induce un cambio conformacional, acercando el mediador redox (ferroceno) a la superficie y

generando la señal eléctrica.⁵ En el caso (C), la unión del analito genera el desplazamiento de la hebra complementaria que se encontraba marcada con un *quencher* de fluorescencia. Al desplazarse la hebra complementaria, se genera una señal fluorescente detectable.⁸ Finalmente, el caso (D), representa un ejemplo donde la unión del analito con el aptámero genera un bloqueo de la superficie de oro y un cambio en la densidad de cargas; lo cual dificulta la llegada de una sonda redox a la superficie y, por lo tanto, produce un cambio en la impedancia.⁹ Esta señal es detectable si el analito que se utiliza presenta un gran tamaño, como es el caso de biomoléculas, *e.g.* proteínas; de manera que el bloqueo de la superficie sea importante. Por lo tanto, todas estas estrategias, se han desarrollado para moléculas de gran tamaño, que generan cambios apreciables; o involucran la utilización de una hebra complementaria que presenta un gran tamaño; o incluyen el uso de marcadores. Mientras que la detección directa de moléculas pequeñas (moléculas de menos de 1kDa) sigue siendo un desafío.

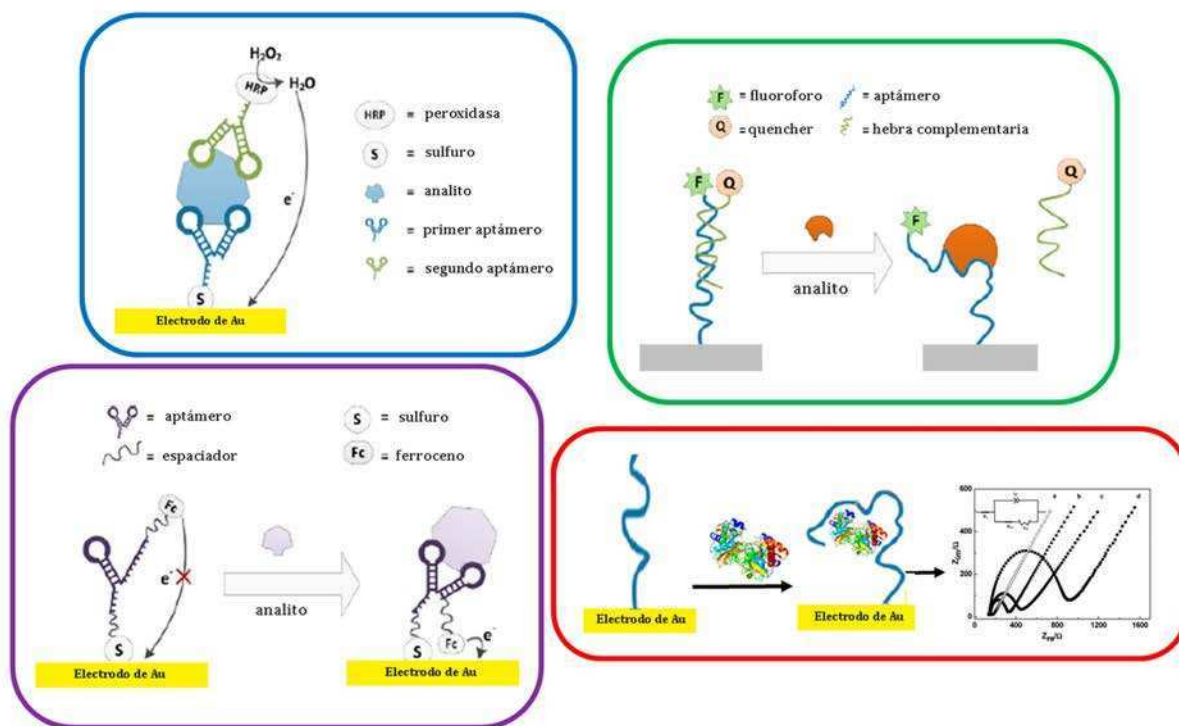


Figura 5. 1. Esquemas de distintas estrategias de sensado utilizando aptámeros como elemento de reconocimiento. Adaptado de Ref 5, 8 y 9.

Varios ingeniosos trabajos han combinado los aptámeros con espectroscopía electroquímica de impedancia (EIS) para la detección de proteínas con un ensayo libre de

marcadores.^{10,11} Sin embargo, como fue señalado por Willner y Zayats,⁵ el uso de EIS como un medio para identificar complejos de afinidad entre aptámeros y moléculas pequeñas es un tema complicado. La formación del complejo aptámero-molécula pequeña en el electrodo produce un cambio pequeño, generalmente indetectable, en la velocidad de transferencia electrónica en la interfase. Así, para superar esa limitación, se utilizan secuencias de aptámero más largas que la región de reconocimiento o una hebra complementaria, para introducir un cambio estructural detectable, como se mostró en la Figura 5. 1.⁵ Otra alternativa, para observar estos cambios muy pequeños podría involucrar la reducción de la superficie del electrodo a un tamaño cercano al del aptámero. En ese caso, cambios mínimos en las cercanías de la superficie del electrodo tendrán un efecto importante en el proceso de transferencia electrónica interfacial.

Como ha sido descrito en el Capítulo 3, en este trabajo de tesis se ha logrado la construcción de nanoelectrodos de oro dentro de una matriz de alúmina porosa. Estos arreglos presentan estructuras bien definidas y permiten procesos de transferencia electrónica en forma eficiente.

La adenosina monofosfato (AMP, MW: 347.2 Da) está directamente ligada al metabolismo energético celular, contribuyendo en el camino principal de generación de adenosina,¹² que está a su vez involucrado en diferentes procesos neuronales en el cerebro, como el sueño, la excitación y la locomoción.¹³ Por su relevancia clínica y su tamaño, AMP constituye el sistema modelo de molécula pequeña. Su aptámero fue uno de los primeros en ser sintetizados^{14,15} y el cambio conformacional y sus sitios de reconocimiento se han estudiado ampliamente. Este aptámero que reconoce AMP consiste en una secuencia de 27 nucleótidos que presenta dos posibles estructuras: una azarosa (*random coil*) y otra tipo hebilla (*stem-loop*). La estructura azarosa se puede representar como un cable flexible de 1nm de diámetro y 10nm de largo. Cuando el aptámero reconoce al AMP, dos moléculas se intercalan en sitios adyacentes dentro de una ranura rectangular, cambiando la conformación a una estructura tipo hebilla, que presenta 2nm de diámetro y la mitad de largo.^{15,16} Si pensamos en un electrodo macizo, por ejemplo de 1 mm de diámetro, estos son ligeros cambios conformacionales que no van a impedir la llegada de la sonda redox a la superficie.

Por otro lado, los materiales mesoporosos han sido estudiados extensamente para obtener un control activo en el transporte molecular en geometrías altamente confinadas.¹⁷⁻¹⁹ La generación de nanoelectrodos dentro de estructuras bien ordenadas con un tamaño similar a estas especies biológicas introducen nuevas oportunidades en el desarrollo de dispositivos

de sensado; dado que estas superficies pequeñas y confinadas pueden ser muy sensibles a cambios en la carga y en la conformación.

Es por esto que se decidió explorar el potencial del sistema de AuNPs de 2nm de diámetro confinadas en alúmina para construir un sensor libre de marcadores basado en aptámeros capaz de detectar moléculas pequeñas, tomando como sistema modelo el AMP. Como el complejo AMP-aptámero presenta un tamaño similar a las AuNPs, los cambios conformacionales esperados pueden generar un impacto importante en la señal. En la Figura 5. 2 se muestra un esquema del concepto de este capítulo. El aptámero se adsorbe en la nanopartícula y luego el sistema modificado se expone a diferentes concentraciones de AMP, generando un cambio conformacional que afecta el cubrimiento de la AuNP, impidiendo el acceso de la sonda redox a la superficie. Esta hipótesis se confirma con las medidas de EIS, obteniéndose una respuesta a AMP en la escala nanomolar.

En sensores basados en DNA, la hebra inmovilizada en la superficie de oro debe mantener su habilidad de reconocimiento y esto es posible controlando la orientación de la hebra en la superficie y su distribución espacial. De esta manera, la interface DNA-nanopartícula de oro es un punto clave en el diseño de nanoplataformas híbridas funcionales. Es por ello que se estudiaron diferentes formas de inmovilización del aptámero en esta superficie, analizando el efecto del confinamiento y comparando el comportamiento con lo que ocurre en una superficie de oro macizo.

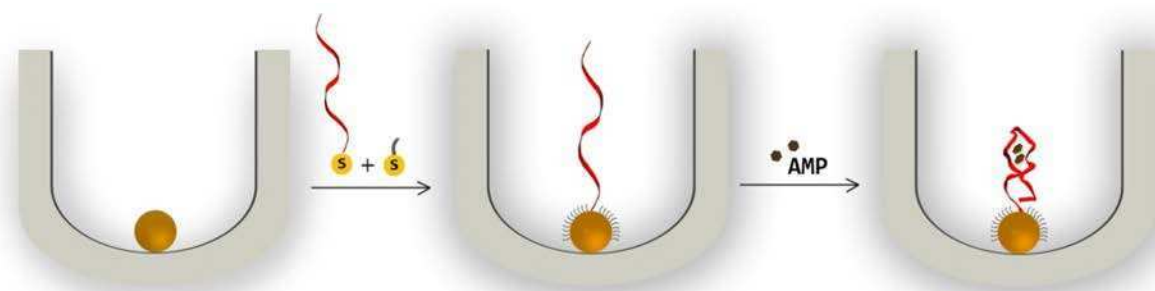


Figura 5. 2. Representación de un poro de alúmina. *Paso 1:* Coadsorción del aptámero y hexanotiol. *Paso 2:* Reconocimiento de AMP.

5. 2. Experimental

5.2.1. Secuencias de oligonucleótidos

Todos los reactivos son de grado analítico. Se utilizó un equipo Millipore Simplicity para obtener agua MilliQ ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

Las secuencias de oligonucleótidos fueron desaladas y purificadas por HPLC (Sigma-Genosys). La secuencia del aptámero de AMP es la secuencia original de Szostack¹⁴ más cinco timinas adicionales que se usan como conector a la superficie. La secuencia aleatoria (*scrumble*) fue diseñada con el mismo número de bases que el aptámero pero en posiciones aleatorias.

Secuencia del aptámero disulfuro:

5'-[C6H13-S-S-C6H12]TTTTTACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT-3'

Secuencia del aptámero fosforotioato (5PS-DNA, Ts: timidinfosforotioato):

5'-TsTsTs TsTsTTTTTACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT-3'

Secuencia aleatoria:

5'-[C6H13-S-S-C6H12]ACGAAGGGCGGGGGTAGGGTATTTACG-3'.

Hebra complementaria:

5'-ACCTTCCTCCGCAATACTCCCCAGGT-3'

Los electrodos de oro macizo se prepararon por *screen printed* como se ha reportado en trabajos del grupo.²⁰

5.2.1. Síntesis de alúmina nanoporosa y AuNPs

Para esta parte de la tesis se utilizaron electrodos de trabajo de 4mm^2 a partir del aluminio 1145 (99.5%). Como se reporta en la Sección 3.2.2 se realizó un pretratamiento al aluminio y se llevó a cabo el anodizado en H_2SO_4 15%, a temperatura ambiente, aplicando 15V por 1 minuto, utilizando un contraelectrodo de plomo enfrentado al electrodo de trabajo. Una vez realizado el anodizado, se deja en contacto con el electrolito ácido durante 5min y se lava con agua Milli-Q.

La electrodeposición de oro se llevó a cabo usando la solución comercial que contiene 15g L^{-1} $\text{K}[\text{Au}(\text{CN})_2]$. El aluminio anodizado y una placa de oro macizo se utilizaron como electrodo de trabajo y como contraelectrodo, respectivamente. La electrodeposición de oro se realizó en 3 pasos: (i) -3mA cm^{-2} por 8ms, (ii) 3mA cm^{-2} por 2ms, (iii) no se aplica corriente por 500ms. Se aplicaron en total 3000 ciclos.

5.2.3. Modificación de la superficie de las AuNPs

El sistema $\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Au}$ se modificó por inmovilización de aptámeros. Se utilizaron 3 estrategias de quimisorción Au-S. En todos los casos se puso en contacto el $\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Au}$ con $10\mu\text{l}$ de cada una de las siguientes soluciones que contiene $1\mu\text{M}$ de aptámero, durante 30min a temperatura ambiente:

- a) Una solución equimolar del aptámero modificado con un grupo tiol y hexanotiol (Caso **RS+SDNA**).
- b) Una solución que contiene el aptámero disulfuro con el hexanotiol unido a uno de los sulfuros (Caso **RS-SDNA**).
- c) Una solución que contiene el aptámero con 5 fosfortioatimidinas (Caso **5PS-DNA**).

Luego se lavó con buffer.

La mezcla equimolar se preparó reduciendo en fase homogénea el puente disulfuro. Para ello, se agregó como reductor 1.5 mM de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) por dos horas a temperatura ambiente en oscuridad.

5.2.4. Técnicas de rayos-X

El uso de EXAFS permitió calcular el tamaño de la nanopartícula así como también el cubrimiento de sulfuro de las mismas para los distintos casos estudiados de inmovilización. Se midió el espectro EXAFS en el borde L3 del Au a temperatura ambiente en modo fluorescencia en la línea XAFS2 del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Campinas, Brazil), como se detalla en la Sección 3.2.6.

5.2.5. Medidas electroquímicas

Las medidas de espectroscopía electroquímica de impedancia se llevaron a cabo en un potenciostato Gamry G300 con el módulo EIS300 que contiene su software de adquisición de datos. Los electrodos de oro se modificaron con el aptámero de acuerdo a lo que se especifica en la Sección 5.2.3. Luego se lavó con buffer y se introdujo en una solución que contiene $K_4[Fe(CN)_6]$ 50mM en buffer HEPES 50mM pH 7.4. Las medidas de EIS se realizaron al potencial formal de la sonda redox, 0.20 V vs. Ag/AgCl, usando un rango de frecuencias desde 10kHz a 1Hz y una amplitud de voltaje de 10mV.

Se lavó nuevamente el electrodo con buffer y se expuso a una solución de AMP de una dada concentración en buffer Tris pH 7.4, por 15min a temperatura ambiente. Para cada concentración de AMP se realizó la determinación por triplicado y en cada caso se utilizó un nuevo electrodo. Una nueva medida de EIS se llevó a cabo, lavando el electrodo con buffer e introduciéndolo en la solución de ferrocianuro.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Caracterización del sistema Al/Al₂O₃/Au

La Figura 5. 3 muestra imágenes SEM de la estructura de alúmina nanoporosa que se utilizó en esta parte de la tesis. A la izquierda puede observarse la vista superior de la capa de óxido a partir de la cual puede calcularse el diámetro y distancia entre poros. Del análisis estadístico, se obtiene un diámetro de poro de 11 ± 1 nm y una distancia interporo de 35 ± 4 nm. Por otro lado, una vista del corte lateral (derecha) permite calcular la profundidad (1 μ m) y observar la regularidad de los poros. La posterior electrodeposición de Au a partir de la sal $K[Au(CN)_2]$, en las condiciones descritas, permite la formación de AuNPs en el fondo de estos poros.²¹ El tamaño de las AuNPs generadas se determinó *in situ* por la técnica de EXAFS en el borde L3 del Au y, asumiendo una geometría esférica para las NPs, se estimó un tamaño de 2.2 ± 0.5 nm de diámetro. La descripción detallada de la caracterización del sistema poroso y las nanopartículas de oro realizada en la Sección 3.3.2.2.1 corresponde también al sistema utilizado en esta sección.

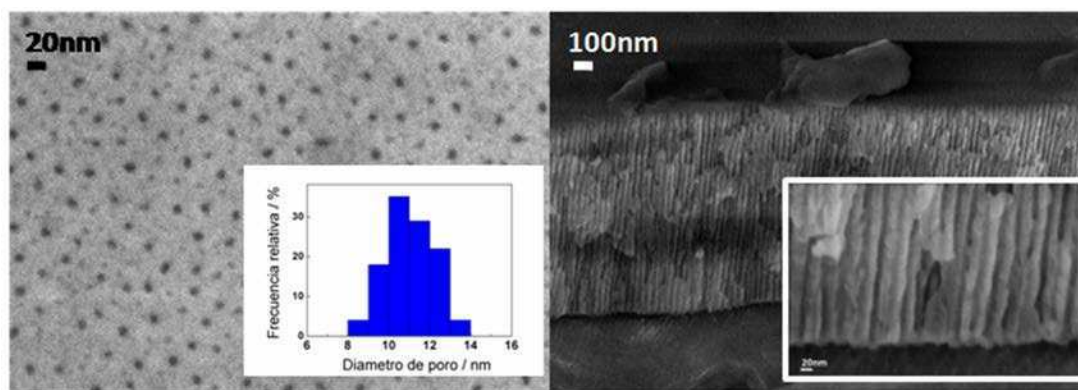


Figura 5.3. Imágenes SEM de la vista de arriba (izquierda) y de un corte transversal (derecha) de la alúmina nanoporosa crecida en Al utilizando H_2SO_4 15% como electrolito. El recuadro de la izquierda muestra la distribución de tamaños de poro ($n=106$). El recuadro de la derecha es una imagen más detallada del fondo de los poros de la capa mesoporosa.

En la Figura 5.4, se presenta el gráfico de Nysquit obtenido por espectroscopía de impedancia para el sistema $\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Au}$ en ferrocianuro 50mM en buffer HEPES 50mM a pH 7.4 barriendo un rango de frecuencias entre 1Hz y 10kHz. A altas frecuencias se observa una curva que caracteriza el proceso de transferencia electrónica. Si se ajusta con un semicírculo, el diámetro del semicírculo (punto donde interseca el ajuste con el eje de la impedancia real, Z_r) corresponde a la resistencia a la transferencia electrónica, R_{te} . Analizando distintos electrodos se llega a $R_{te} = 2.3 \pm 0.4\text{k}\Omega$ ($n=7$) para el sistema $\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Au}$. A frecuencias más bajas el control está dado por la difusión de la especie hacia el electrodo. Si la difusión fuese lineal, se esperaría que a bajas frecuencias se observara (en el gráfico de Nysquit) una tendencia lineal determinada por la impedancia de Warburg. Si cada nanoelectrodo actuara de manera independiente, se esperaría otro semicírculo a bajas frecuencias. El comportamiento que se observa es intermedio, un semicírculo con una contribución de Warburg; lo que demuestra una vez más que existe solapamiento de los perfiles de difusión de los nanoelectrodos.²²

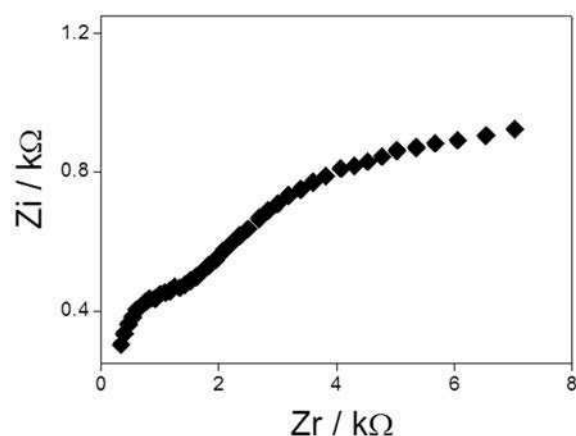


Figura 5. 4. Gráfico de Nysquit obtenido barriendo frecuencias entre 1Hz y 10kHz, usando como sonda redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 50 mM en buffer HEPES 50 mM pH 7.4 y como electrodo Al/ Al_2O_3 /Au.

5.3.2. Adsorción del aptámero en la superficie de AuNPs. Diferentes métodos de inmovilización.

En sensores basados en secuencias de oligonucleótidos como elemento de reconocimiento, la inmovilización de éstos en la superficie debe retener sus propiedades y su habilidad de reconocimiento, lo que implica controlar la distribución espacial y la orientación de la hebra. En particular, la unión directa de DNA a nanopartículas ha tenido un gran impacto en el crecimiento de la nanobiotecnología.²³ Se han reportado diferentes métodos de inmovilización,²⁴ que involucran desde la fisisorción por interacciones electrostáticas utilizando polielectrolitos hasta la adsorción por uniones covalentes, como la formación de conjugados avidina-biotina^{11,25} o de monocapas autoensambladas de tioles en superficies de oro.^{16,26,27} A su vez, la coadsorción de tioles de cadenas cortas, como mercapto-hexanol (MCH)²⁶ u oligoetilenglicol,^{26,28} formando una capa autoensamblada mixta se ha utilizado en varios trabajos en lugar de la adsorción directa del aptámero. Esta estrategia evita la adsorción inespecífica de la hebra de DNA y, por lo tanto, su pérdida de funcionalidad debido a la incorrecta orientación de la misma en la superficie; así como también, de otras biomoléculas que puedan encontrarse presentes en la matriz en la que se realiza la determinación y que eventualmente bloqueen la superficie.

Una de las formas ensayadas de modificación de AuNPs involucra la coadsorción del aptámero modificado con un tiol en el extremo 5', junto con hexanotiol. Para ello se realizó la

reducción en fase homogénea del disulfuro presente en la secuencia original, utilizando como reductor fosfina.



Se obtiene así una solución equimolar en aptámero y hexanotiol, donde se incuban los electrodos de Al/Al₂O₃/AuNP por 30min. A los electrodos modificados de esta manera los llamaremos **RS+SDNA**.

Otra posible forma de modificación con grupos tioles, ensayada en este trabajo, involucra la modificación directa de los electrodos Al/Al₂O₃/Au con una solución de aptámero que contiene el puente disulfuro, de manera que éste se reduzca en la superficie de oro, adsorbiéndose una molécula de aptámero y una de tiol corto. A esta forma de modificación la denominaremos **RS-SDNA**.

Si bien la forma más utilizada para modificar AuNPs con aptámeros, debido a la estabilidad de la unión, es a través de la interacción Au-tiol, recientemente se ha explorado la utilización de aptámeros no tiolados como una alternativa,²³ en la cual es posible controlar mejor la densidad y la cinética de hibridación de estos en la superficie, y los costos de producción son mucho menores. Una posibilidad es que la adsorción se produzca a través de las bases de DNA (incluso se puede agregar un conjunto de la misma base, por ejemplo poli-A). Por otro lado, es posible utilizar hebras modificadas con fosforotioato, donde uno de los oxígenos del fosfato es sustituido por un azufre (Ver Figura 5. 5). En nuestro caso, se estudió la adsorción del aptámero modificado con 5 grupos fosforotioatos timinas (Ts) en un extremo:



Si bien la interacción de estos grupos (Ts) con la superficie es más débil que en el caso del tiol, la inclusión de 5 grupos puede generar una capa estable que cambia la distribución espacial de la hebra en la superficie. Este caso se denominará **5PSDNA**.

En la Figura 5. 6, se muestra un esquema de las tres formas de modificación.

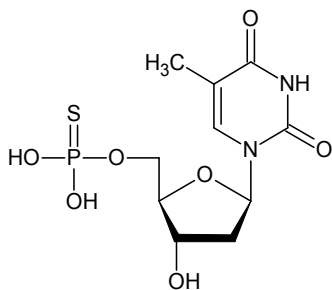


Figura 5. 5. Estructura de un grupo fosforotioato timina (Ts)

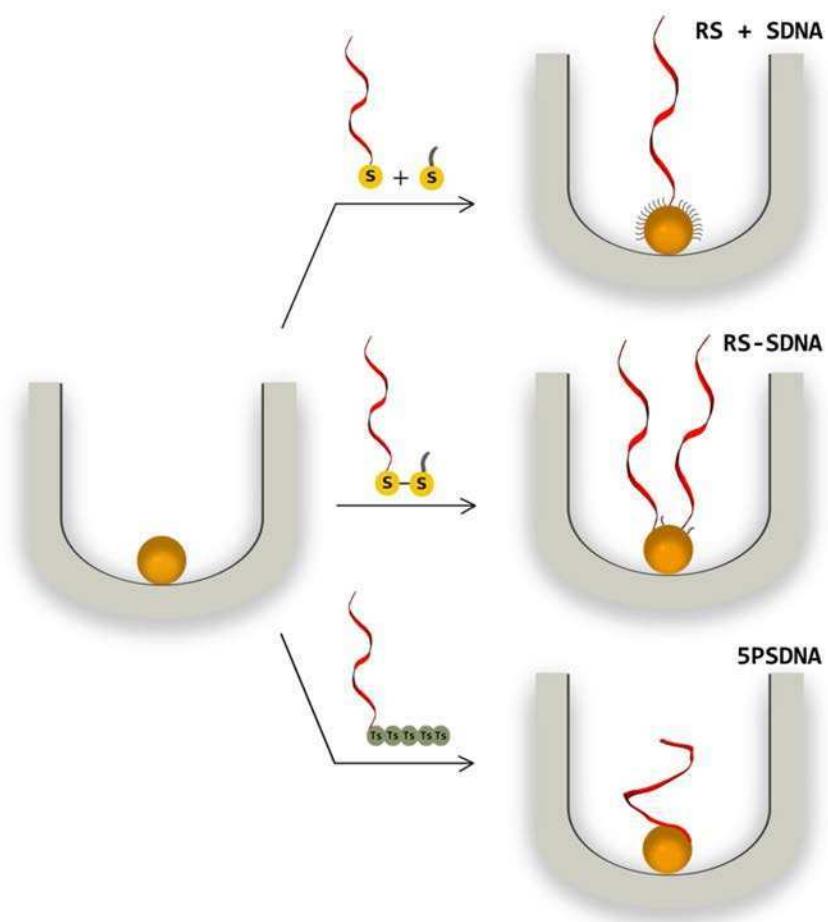


Figura 5. 6. Esquema de las distintas modificaciones de AuNPs con aptámeros llevadas a cabo en este trabajo: coadsorción (RS+SDNA); aptámero disulfuro (RS-SDNA); aptámero con 5 fosforotioatotimidina (5PSDNA)

En principio, es posible estudiar cómo es el proceso de adsorción del aptámero en los distintos casos en una superficie de oro macizo a través de la técnica de balanza de cuarzo con disipación (QCM-D). Para ello, se modificaron obleas de Au con aptámeros en forma análoga a la que se realizan las modificaciones de las AuNPs (incubando un mismo tiempo y con la misma concentración de aptámero). En la Figura 5. 7 se muestran los valores de frecuencia en función del tiempo para los 3 casos. En todos ellos se puede observar la adsorción del aptámero como un cambio de frecuencia ΔF_{apt} . Se ve como la frecuencia disminuye en el tiempo al adsorberse el aptámero debido a un aumento de la masa.

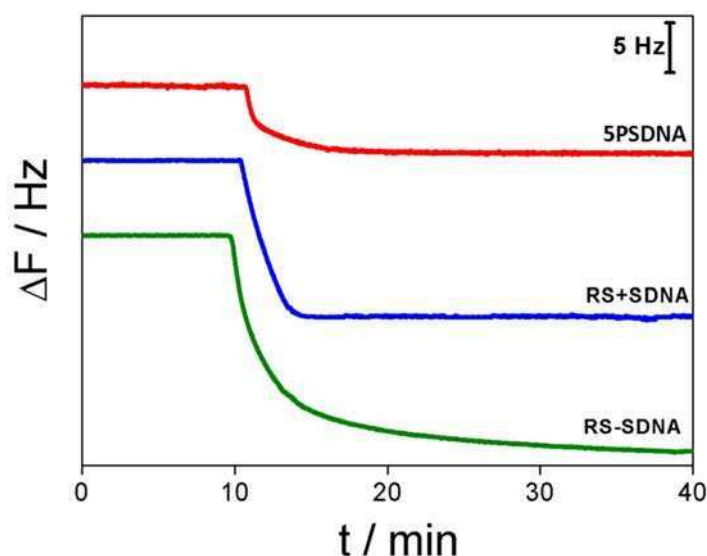


Figura 5. 7. Medidas de QCM-D en los distintos casos: A) coadsorción, RS-SDNA (verde), B) aptámero disulfuro, RS+SDNA (azul) y C) aptámero modificado con 5 fosfortioatimidina, 5PSDNA (rojo)

El método RS-SDNA es el que produce mayor cambio de frecuencia y, por lo tanto, la mayor adsorción de aptámero; seguido por el método RS+SDNA y, finalmente, el método 5PSDNA (Figura 5. 7). Es importante considerar que el máximo cubrimiento de alquil-tioles esperado en una superficie de Au plana es de $7.7 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ y la relación S:Au es 1:3.²⁹ Es posible calcular el cubrimiento de tioles a partir del cambio de frecuencia la masa adsorbida considerando el modelo de Sauerbrey (válido para un depósito rígido, delgado y homogéneamente distribuido sobre la superficie). Según este modelo el cambio en la frecuencia correlaciona linealmente con la masa adsorbida mediante la siguiente expresión: $\Delta m = (C / n) \Delta F$, siendo C la constante específica de masa, la cual vale $17,7 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$ cuando se mide a la frecuencia fundamental (5 MHz), y n los sobretonos ($n=1, 3, 5, \dots$). A partir de los valores de masa se puede calcular el cubrimiento para cada tipo de modificación.

Un análisis más detallado muestra que la modificación RS-SDNA alcanza un cubrimiento de 3.9×10^{-11} mol cm^{-2} , representando un 5% del máximo cubrimiento. Este número está en concordancia con trabajos donde se adsorben DNA modificados con tioles²⁹⁻³¹ y puede explicarse por el impedimento estérico y el efecto de carga que genera una molécula con un peso molecular aproximado de 10.000 Da y con cargas negativas como lo es una hebra de DNA. En este caso, es posible asumir que por cada molécula de DNA se adsorberá una molécula de hexanotiol. Se considera que, por su bajo peso molecular, la contribución de estos tioles cortos al cambio de frecuencia es despreciable. En el caso del método RS+SDNA, el cubrimiento es aún menor y sólo es posible hacer una estimación de la máxima cantidad de DNA que puede adsorberse debido a que al tener el alquiltiol y el DNA como moléculas separadas pueden adsorberse en diferentes proporciones. Sin embargo, como la masa del alquil-tiol (Mr: 134Da) es 100 veces más chica que el DNA (Mr: 10334Da), el error introducido al considerar que todo el cambio proviene de la adsorción del DNA es despreciable, y es posible estimar un cubrimiento de 2.6×10^{-11} mol cm^{-2} . Este representa un 3.3% del máximo cubrimiento posible. Finalmente, para el caso 5PSDNA, se puede calcular un cubrimiento de 1.3×10^{-11} mol cm^{-2} , el cual representa un 1.7% del cubrimiento máximo esperado. En este caso la orientación de la hebra tiene que ser considerada, debido a que ya se ha establecido que los aptámeros que presentan grupos fosforotioatos se inmovilizan de forma casi paralela a la superficie de oro.³²

La técnica de QCM-D es muy útil para seguir el cubrimiento obtenido por los diferentes métodos de inmovilización cuando éstos se realizan sobre una superficie de oro plana; sin embargo, en nuestro caso, el objetivo es inmovilizar las hebras de DNA en nanopartículas de aproximadamente 2nm de diámetro dentro de poros de alúmina. Es esperado que la relación entre átomos de alquiltioles y átomos de Au en un nanopartícula sea mayor que en una superficie de Au (111).³³ Incluso, Mirkin y colaboradores han encontrado que la densidad del cubrimiento de las hebras de DNA dependen del tamaño de las NPs, decreciendo a medida que aumenta el diámetro de éstas.²⁴ En éste contexto, técnicas como la adsorción de rayos X (EXAFS), son las indicadas para establecer el tamaño de las NPs y las características de su modificación. Esta técnica da información sobre el entorno de los átomos de Au y por lo tanto, nos permitirá determinar si parte de estos átomos está modificado con S.

Los resultados de las medidas de EXAFS para la muestra RS+SDNA (Figura 5. 8) muestra dos esferas de coordinación alrededor de los átomos de Au. Una a 2.34 Å que

corresponde a los átomos de azufre (Au-S) y otra a 2.83 Å correspondiente a la primera esfera de coordinación de oro (Au-Au); indicando que se logró modificar las AuNPs con tioles. A su vez, se determina el diámetro medio de la nanopartícula por el mismo procedimiento que para el sistema Al/Al₂O₃/Au sin modificar, dando un resultado similar, de 2.3±0.7 nm de diámetro para el núcleo de Au. Si consideramos la proporción S:Au que se obtiene experimentalmente para AuNPs con tamaño similar al de nuestro caso y recubiertas con hexanotiol, la relación S:Au esperada sería de 0.65.³⁴ Luego, a partir del número de coordinación obtenido para el ajuste de Au-S (Tabla 5. 1) y teniendo en cuenta esta proporción S:Au, el cubrimiento de sulfuro en las AuNPs es del 60%. Este representa un cubrimiento de sulfuro alto, mayor al obtenido para una superficie de un cristal de Au (111); lo que sugiere que la mayor parte de la superficie expuesta a la solución se ha modificado con tioles cortos. Si bien no es posible en esta modificación y por esta técnica, obtener el cubrimiento únicamente de aptámeros, con este caso es posible estimar la superficie de AuNPs expuesta.

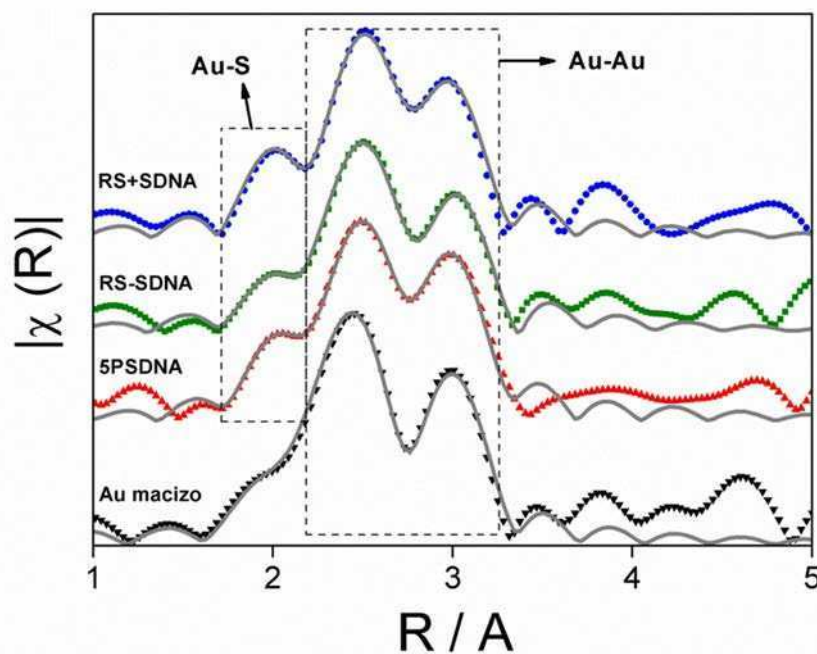


Figura 5. 8. Transformada de Fourier de las oscilaciones EXAFS (sin corrección de fase) para Al/Al₂O₃/AuNP modificadas con RS+SDNA (azul), RS-SDNA (verde) y 5PSDNA (rojo); y para el oro macizo (negro). En línea gris se muestran los ajustes de cada muestra.

Muestra	L ₃ -Au						S:Au	D _{AuNP} (nm)
	N _{Au-Au}	R _{Au-Au} (Å)	σ^2_{Au-Au} (Å ²)	N _{Au-S}	R _{Au-S} (Å)	σ^2_{Au-S} (Å ²)		
Au metálico	12	2.880(2)	0.0082(3)	-	-	-	-	-
AuNP/RS+SDNA	9.8(8)	2.836(5)	0.0075(6)	0.22(8)	2.340(5)	0.003(1)	0.60	2.3(7)
AuNP/RS-SDNA	9.7(9)	2.847(6)	0.0075(6)	0.13(7)	2.330(5)	0.003(1)	0.35	2.3(7)
AuNP/5PSDNA	9.6(8)	2.840(4)	0.0076(6)	0.15(8)	2.337(6)	0.003(1)	0.41	2.2(7)

Tabla 5. 1. Valores ajustados a través de la señal EXAFS para el número de coordinación medio (N), distancia interatómica media (R) y factor de Debye-Waller (σ^2), para la primera capa de coordinación de átomos de Au, junto con el diámetro estimado para las AuNPs y la relación S:Au para cada muestra. El número de coordinación para el oro metálico se fija en 12

Al analizar los resultados obtenidos por el método RS-SDNA, el cubrimiento de sulfuros alcanzado es del 35%; en este caso como se adsorbe una hebra de DNA por cada hexanotiol, la repulsión entre las cadenas cargadas juega un rol importante, disminuyendo el cubrimiento. Finalmente, la modificación con fosforotioato produce un cubrimiento levemente por encima del observado para el método RS-SDNA (41% vs 35%). Sin embargo, debe considerarse que con el método RS-SDNA se introducen dos átomos de S por aptámero, mientras que en el caso del método 5PSDNA, por cada aptámero se incorporan 5 S. A partir de estas diferencias en la forma de unión, se concluye que el cubrimiento final de aptámeros para el caso el fosforotioato es alrededor del 8% y para RS-SDNA es 17%.

El análisis de los resultados de rayos X permite estimar el grado de cubrimiento de las AuNPs, sin embargo, la cantidad de grupos tioles introducidos en la nanopartícula no correlaciona directamente con la sensibilidad del sistema como sensor. En la Figura 5. 9 se muestra el comportamiento electroquímico de estas AuNPs confinadas y su impacto en los cambios conformacionales del DNA cuando la cadena de oligonucleótidos es utilizada como aptámero que reconoce moléculas pequeñas como el AMP. En esta figura se puede ver los espectros de impedancia para una solución de ferrocianuro 50mM en los arreglo de electrodos formados por las AuNP, cada uno modificado por uno de los métodos descriptos anteriormente.

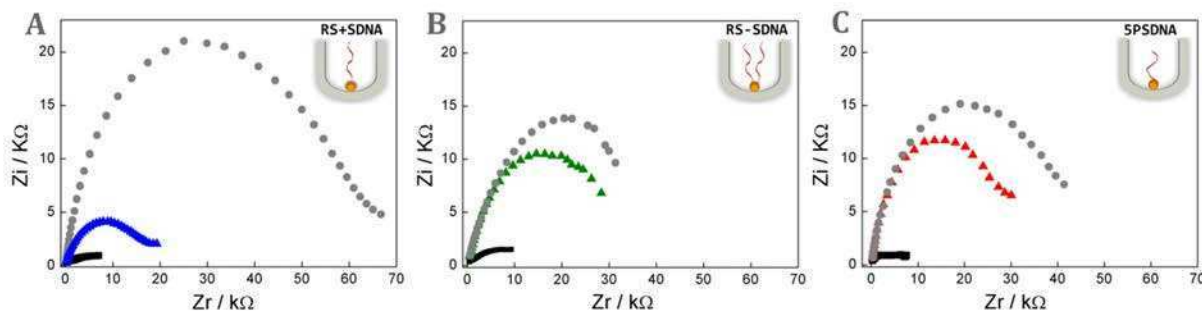


Figura 5. 9. Gráficos de Nysquits obtenidos por EIS. Sonda: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ en buffer HEPES pH 7.4. En negro, se muestra el caso de $\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{AuNP}$. Luego, se muestra el caso de $\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3/\text{AuNP}/\text{SR}$ donde SR corresponde al método RS-SDNA (azul), RS-SDNA (verde) y 5PSDNA (rojo). Finalmente, se incubó con AMP 500nM (círculos grises).

Las medidas electroquímicas muestran que las 3 superficies fueron modificadas y que la velocidad de transferencia electrónica para la oxidación de ferrocianuro decreció más dramáticamente para los métodos RS-SDNA y 5PSDNA. En estas medidas la carga y el cubrimiento de las AuNPs juega un rol importante. Como el tamaño de los poros es de 11nm y el diámetro de la nanopartícula es 2nm, el ingreso y adsorción de las cadenas de DNA se produce en un entorno muy diferente a cuando ésta se genera desde el seno de la solución a una superficie plana de oro. En el caso de RS+SDNA, los tioles cortos y las hebras de DNA modificadas con el grupo tiol compiten por la superficie de oro; debido a las restricciones impuestas por el tamaño del poro, el tiol corto puede acceder más fácilmente a esta superficie, haciendo que este método sea limitado en el número de hebras de DNA que pueden inmovilizarse por nanopartícula. En los otros dos casos, la especie reactiva es sólo la molécula de DNA y, por lo tanto, el acceso de átomos de S al oro está más restringido, alcanzando un menor cubrimiento como se observa por EXAFS. Sin embargo, las pocas hebras inmovilizadas en este ambiente confinado introducen un importante impedimento que se observa claramente en las medidas de EIS.

Una medida que soporta esta hipótesis es la exposición de los tres arreglos a 500nM de AMP. El espectro de impedancia de las AuNP modificadas por el método RS+SDNA muestra que la superficie de oro fue modificada por el aptámero y que éste es capaz de sufrir un cambio conformacional cuando se expone a la molécula blanco; mientras que en los otros dos casos los cambios son pequeños luego del reconocimiento de AMP. Estos resultados permiten plantear diferentes hipótesis que explican este comportamiento. El método RS-SDNA permite la adsorción de más hebras en la nanopartícula, impidiendo el cambio conformacional

requerido en el proceso de reconocimiento. Por otro lado, el comportamiento observado en las AuNPs modificadas por el método 5PSDNA puede explicarse por los resultados experimentales presentados por Jiang *et al.*³⁵ Estos autores analizan el tipo de modificación en AuNPs por espectroscopías Raman (SERS) y de rayos X (SAXS), concluyendo que los átomos de S introducidos en el esqueleto de fosfato dominan la interacción entre el DNA y nanopartículas, y que la hebra mayoritariamente se encuentra de forma casi paralela a la superficie de la nanopartícula debido a los múltiples sitios de anclaje. De esta manera la superficie está bloqueada con una cadena de oligonucleótidos con una gran carga negativa generando una resistencia a la transferencia electrónica grande, sin sensibilidad al cambio conformacional producido cuando el AMP es reconocido.

En esta última configuración, las AuNPs se tratan posteriormente con mercaptohexanol (MCH), una técnica común para eliminar la adsorción inespecífica de DNA en la superficie de oro.²⁶ La Figura 5. 10 muestra un decrecimiento en la resistencia a la transferencia electrónica luego de la incubación con el alquiltiol corto. Sin embargo la exposición a AMP produce cambios mínimos, indicando que el tiol remueve el DNA fosforotioato, un resultado observado previamente en AuNP.²³

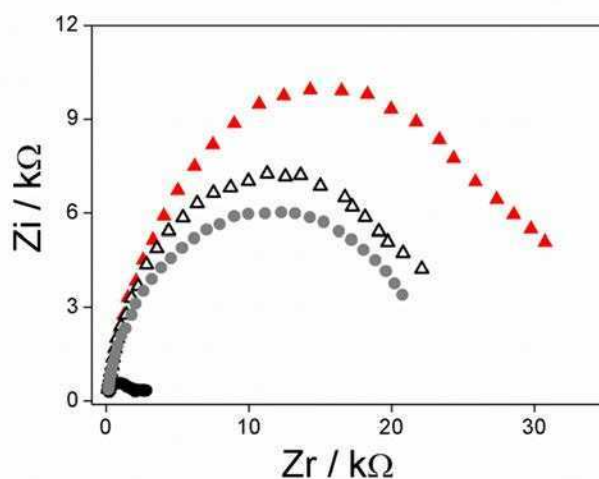


Figura 5. 10. Gráficos de Nyquist de las medidas de impedancia en 50mM ferrocianuro en 50mM HEPES pH 7.4: Al/Al₂O₃/AuNPs (negro); Al/Al₂O₃/AuNPs/5PSDNA (triángulos rojos); Al/Al₂O₃/AuNPs/5PSDNA/MCH (triángulos blancos); Al/Al₂O₃/AuNPs/5PSDNA/MCH/AMP 500 nM (círculos grises)

En base a los resultados anteriores, podemos afirmar que la mejor forma de modificar la superficie de nanopartículas confinadas con aptámeros, de manera que estos conserven sus

propiedades de reconocimiento frente al analito y manteniendo una sensibilidad adecuada, es el caso de la coadsorción de la hebra de DNA junto con tioles de cadena corta, contrariamente a lo que se ha reportado en bibliografía para superficies macroscópicas donde el mayor cubrimiento conlleva a una mayor sensibilidad.²⁶ Por todo lo expuesto anteriormente, se utilizará esta técnica de modificación.

Estos resultados remarcan que las propiedades de reconocimiento de biomoléculas inmovilizadas en nanopartículas de oro muy pequeñas no sólo dependen de la afinidad intrínseca que presentan, sino que también el entorno es un factor importante y, por lo tanto, lo es el control en la nanoarquitectura.

5.3.3. Comparación con Au macizo

Con el objetivo de mostrar la relevancia de trabajar con AuNPs confinadas, se lleva a cabo la modificación elegida (RS+SDNA) en un electrodo de oro macizo. Los cambios en esta superficie macroscópica pueden seguirse por QCM-D y medidas de impedancia. Como se indicó previamente, a partir de los cambios de frecuencia en experimentos de balanza de cristal de cuarzo fue posible estimar la concentración superficial máxima posible del aptámero (2.4×10^{-11} mol cm^{-2}). Este cubrimiento es del orden de los valores previamente reportados^{29,30,36}, indicando que el aptámero reacciona con menos del 4% del total de átomos de oro presentes en esta superficie plana. Por otro lado, la medida de disipación (Figura 5. 11) muestra un pequeño incremento debido a la presencia de la hebra libre en la superficie.³⁷ Como el AMP es una molécula pequeña, al unirse al electrodo modificado no produce cambios importantes en la frecuencia, pero se observa una disminución de la disipación (Figura 5. 11). Este cambio puede entenderse en términos de la contracción del aptámero que genera el AMP al formarse el complejo, el cual presenta una estructura más compacta.

En el caso de las medidas de EIS para el electrodo de oro macizo, donde la inmovilización del aptámero se llevó a cabo a partir de la coadsorción, éstas muestran pequeños cambios cuando se reconoce AMP 500nM (Figura 5. 11). Las diferencias que se observan en la resistencia a la transferencia de carga pueden explicarse en base a la interacción entre el espacio libre y la repulsión de cargas, considerando que el aptámero cambia desde una conformación azarosa (*random coil*) a una tipo hebilla (*stem-loop*) al reconocer al AMP. Este cambio conformacional pliega el aptámero haciéndolo más rígido.

Esto implica que se pierde parte de la habilidad de éste para repeler la sonda de ferrocianuro ya que sus cargas perturbaban un área menor del electrodo. Por lo tanto, la sonda puede acercarse a la superficie del electrodo que está libre de aptámero y la resistencia a la transferencia de carga decrece.

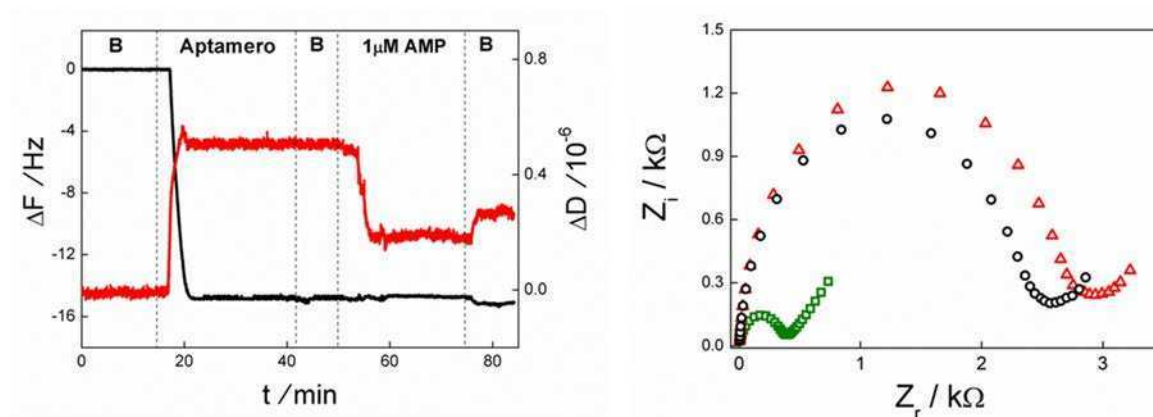


Figura 5. 11. Izquierda: Resultados de QCM-D para una oblea de oro modificada por el método de coadsorción seguido por la modificación con AMP 1 μ M. B representa los lavados con buffer. ΔF representa los cambios en frecuencia (línea negra) y ΔD los cambios en la disipación (línea roja). Derecha: Respuesta de la impedancia en ferrocianuro 50mM en buffer pH 7.4, para Au (cuadrados verdes), Au/SR (triángulos rojos) y Au/SR/AMP (círculos negros).

5.3.4. Desarrollo de un aptasensor para la detección de moléculas pequeñas. Estudio de parámetros analíticos

En la Sección 5.3.2, se muestra que la forma más conveniente de modificar la superficie, pensando en su aplicación en la detección de moléculas pequeñas, es la coadsorción del aptámero que presenta un sulfuro terminal junto con hexanotiol.

Para analizar la selectividad del sistema Al/Al₂O₃/AuNP/RS+SDNA a AMP se llevaron a cabo varios experimentos control. Estudios anteriores mostraron que el reconocimiento del aptámero de DNA que se utiliza en este trabajo presenta prácticamente la misma constante de afinidad para adenosina, AMP y ATP.^{15,38} Esto se debe a que el reconocimiento por parte del aptámero involucra interacciones únicamente con partes de la adenosina pero no con los grupos fosfatos (Figura 5. 12, izquierda). Por lo tanto, se eligió guanosina (un nucleósido con una estructura muy similar al analito) para realizar los estudios de selectividad (Figura 5. 12, derecha).

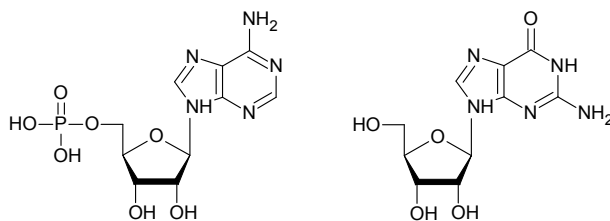


Figura 5. 12. Estructura molecular de AMP (izquierda) y Guanosina (derecha)

En la Tabla 5. 2 se resumen los resultados obtenidos para el sistema Al/Al₂O₃/Au modificado con el aptámero que se une a AMP y utilizando como analito guanosina. El cambio despreciable que se observa en la resistencia a la transferencia electrónica muestra la selectividad del sistema.

Otro ensayo de selectividad involucró la modificación de Al/Al₂O₃/Au con una secuencia aleatoria de oligonucleotidos (*scrumble*). Al incubar con AMP y medir los cambios en ΔR_{te} , tampoco se observaron variaciones (Tabla 5. 2), confirmando que los diferencias en la señal están asociados al evento de reconocimiento y al cambio conformacional.

Secuencia	Analito	[Analito] / nM	ΔR_{te} / k Ω
Aptámero	AMP	500	39 \pm 2
Aptámero	G	1000	4 \pm 1
Aleatoria	AMP	500	2 \pm 1

Tabla 5. 2. Estudio de la selectividad. Experimentos control.

Finalmente, se determinó la sensibilidad a la concentración de AMP. Se llevaron a cabo medidas de EIS a diferentes concentraciones de AMP en el rango de 10 a 500nM (Figura 5. 14). Se puede ver un incremento de la impedancia a medida que aumenta la concentración de AMP. Cada concentración de AMP se determinó por triplicado de manera independiente. Se utiliza un circuito equivalente para ajustar los datos de impedancia y determinar así los valores de los parámetros eléctricos en cada medida, en particular, la resistencia de

transferencia electrónica. El circuito equivalente que se plantea está formado por los siguientes elementos (ver Figura 5. 13): la resistencia del electrolito (R_s) en serie con dos ramas en paralelo; una correspondiente a la resistencia de transferencia electrónica (R_{te}) y la otra a un elemento de fase constante (CPE), que representa el comportamiento no ideal de la doble capa como capacitor. Así la diferencia entre la resistencia a la transferencia electrónica antes y después de incubar con AMP (ΔR_{te}) se utiliza como parámetro para determinar el analito. Se utiliza el programa EchemAnalyst™ Software para realizar los ajustes. Se utiliza un rango de frecuencias entre 50Hz-10kHz, donde no se observa una contribución marcada del transporte de masa.

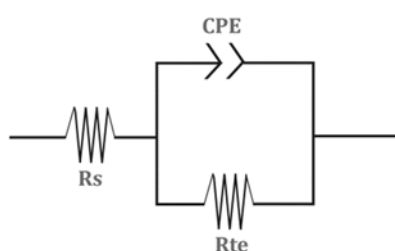


Figura 5. 13. Circuito equivalente utilizado para realizar los ajustes de los gráficos de Nysquit

La diferencia entre la resistencia de transferencia de carga antes y después de incubar con AMP se utiliza como señal (Figura 5. 14). Considerando la constante de disociación del aptámero, $6\mu\text{M}$,¹⁵ la habilidad para detectar este analito en la escala nanomolar, se puede considerar como una sensibilidad notable.

A partir de este ajuste de los gráficos de Nysquit se puede advertir que el cambio con la concentración de AMP está dado en la resistencia a la transferencia electrónica. Los demás parámetros no varían significativamente, encontrándose valores de Y_0 y α alrededor de 3×10^{-7} y 0.8, respectivamente.

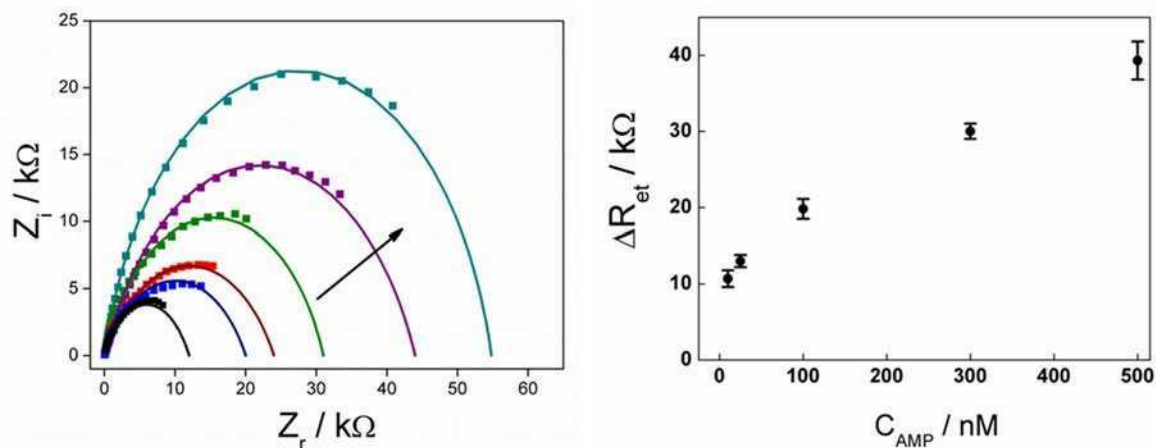


Figura 5. 14. *Izquierda:* Gráfico de Nyquist para diferentes concentraciones de AMP. La flecha indica concentraciones crecientes (0, 10, 25, 100, 300 and 500 nM). *Derecha:* Efecto de la concentración de AMP en la Rte para un electrodo de Al/Al₂O₃/AuNP/SR. Cada valor de ΔR_{et} corresponde a medidas tomadas con 3 sensores independientes para cada concentración. $\Delta R_{et} = R_{et}(Al/Al_2O_3/AuNP/RS+SDNA-AMP) - R_{et}(Al/Al_2O_3/AuNP/RS+SDNA)$. Las barras de error indican la desviación estándar para tres electrodos independientes.

Otro tema a discutir en los ensayos basados en oligoDNA que se llevan a cabo en sistemas confinados, es la necesidad de utilizar una sonda cargada como lo es el ferrocianuro. En las secciones previas se discutió de qué manera los cambios conformacionales del aptámero luego del evento de reconocimiento modifican la resistencia a la transferencia electrónica en las medidas de impedancia. Sin embargo, no fue discutido si estos cambios se deben al volumen ocupado por la nueva conformación del aptámero o si la nueva conformación produce una dispersión de cargas negativas mayor sobre la nanopartícula. Para analizar estas posibilidades, se llevó a cabo la modificación de la superficie con RS+SDNA y posteriormente se incubó con AMP 500nM, midiendo en ambos casos el espectro de impedancia, utilizando una sonda neutra como lo es el ferrocenometanol. En la Figura 5. 15 se puede observar la variación en la resistencia a la transferencia electrónica luego de la modificación de la superficie con la hebra. Sin embargo, los cambios que se producen por el evento de reconocimiento son relativamente menores que en el caso de utilizar ferrocianuro. Al hacer el ajuste de los espectros de impedancia, la diferencia relativa en la resistencia a la transferencia electrónica debida al cambio de configuración del aptámero cuando reconoce 500 nM de AMP es 28%. Por otro lado, la misma medida produce una variación del 260% cuando se usa como sonda ferrocianuro (Figura 5. 9 A). Por lo tanto, la nueva distribución de cargas es el factor principal que determina la sensibilidad del ensayo.

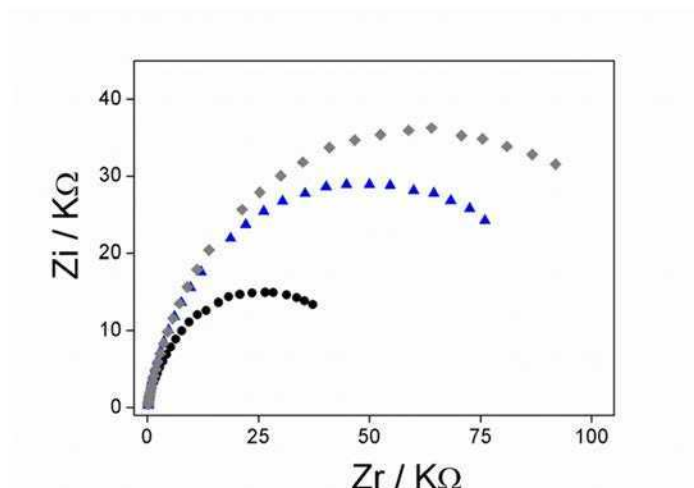


Figura 5. 15. EIS de 0.5 mM de ferrocenometanol en 50mM HEPES pH 7 en Al/Al₂O₃/AuNPs (negro); Al/Al₂O₃/AuNPs/RS+SDNA (azul); Al/Al₂O₃/AuNPs/RS+SDNA/AMP 500nM (gris).

5.3.5. Desarrollo como genosensor

Como se viene demostrando en este capítulo, la inmovilización de DNA en las AuNP confinadas presenta algunas restricciones; sin embargo es posible encontrar las condiciones para detectar cambios conformacionales producidos por moléculas pequeñas. Resulta interesante determinar si esta construcción también puede utilizarse como genosensor, es decir, para detectar y cuantificar secuencias de DNA/RNA, cuyo determinación presenta gran relevancia por sus funciones como biomarcadores de distintas enfermedades.³⁹⁻⁴² La estrategia general, utilizando oligonucleótidos como elemento de reconocimiento, involucra la hibridación específica entre éste y la secuencia blanco.

Una forma de hacer un ensayo sencillo que sirva de prueba de este concepto, es estudiar el reconocimiento de la hebra complementaria al aptámero que reconoce AMP, lo que permite comparar la sensibilidad que es posible alcanzar con la misma hebra en una situación donde su hebra complementaria (cadena de 27 nucleótidos) debe difundir dentro de los poros y unirse a ésta.

La Figura 5. 16 muestra los resultados obtenidos de la diferencia en la resistencia a la transferencia electrónica antes y luego de incubar los electrodos de Al/Al₂O₃/AuNP/RS+SDNA con diferentes concentraciones de la hebra complementaria de DNA (ΔR_{te}). Se puede observar una buena sensibilidad a los cambios incluso a concentraciones de 100pM. Estos resultados son comparable con los obtenidos en trabajos recientes dedicados a la detección de

microRNA, un potencial biomarcador para varias enfermedades que está formado por un número de bases similar a la hebra complementaria utilizada en este caso. Por lo que, este sistema podría extenderse a ese tipo de aplicaciones. A su vez, esta concentración es 100 veces más pequeña que la obtenida para el reconocimiento de AMP, algo esperable por tratarse de un analito más voluminoso, con una gran densidad de cargas y afinidad mayor.

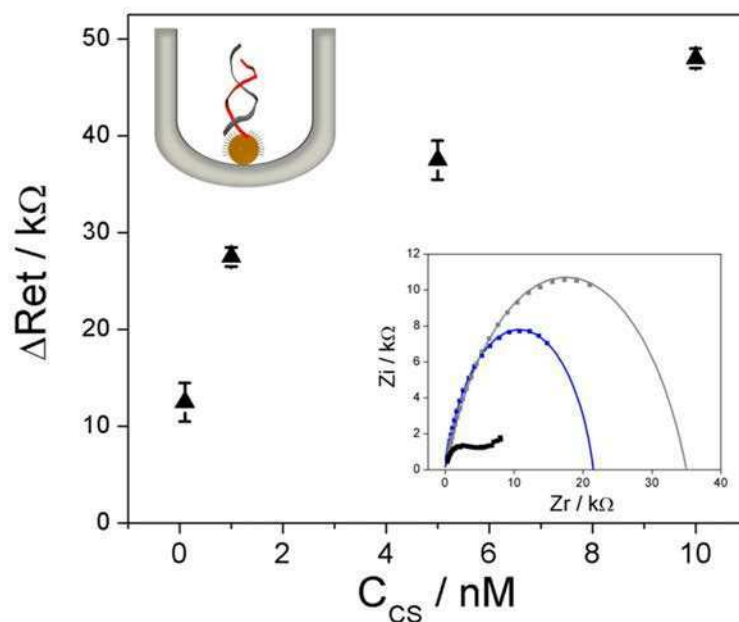


Figura 5. 16. Dependencia de la ΔRet con la concentración de hebra complementaria (HC). Dentro se muestra el gráfico de Nysquist para 50mM de ferrocianuro en 50mM de HEPES pH 7 en: Al/Al₂O₃/AuNPs (negro), Al/Al₂O₃/AuNPs/RS+SDNA (azul), Al/Al₂O₃/AuNPs/RS+SDNA/CS 0.1nM (gris).

5.4. Sumario

Los materiales mesoporosos han sido estudiados extensamente para obtener un control activo en el transporte molecular en geometrías altamente confinadas.^{17,19,43,44} La generación de nanoelectrodos dentro de estructuras bien ordenadas con un tamaño similar a las especies biológicas (proteínas, DNA, lipopolisacáridos) introducen nuevas oportunidades en el desarrollo de dispositivos de sensado, dado que estas superficies pequeñas confinadas pueden ser muy sensibles a cambios en la carga y en la conformación. La modificación de nanopartículas de oro con moléculas de DNA que contienen en uno de sus extremos un grupo tiol es una práctica común hoy en día y presentan características diferentes a la

inmovilización en oro macizo. Mirkin y colaboradores han establecido que la densidad de DNA adsorbidos aumenta cuando el diámetro de las nanopartículas decrece.²⁴ Este resultado está relacionado con la curvatura de las nanopartículas que ayuda a reducir las repulsiones entre las cargas de las cadenas de DNA. La mayoría de los resultados presentados en literatura corresponden a nanopartículas con diámetros mayores a 10nm y en solución. Al momento de escribir este trabajo no encontramos reportes sobre el cubrimiento de AuNPs con diámetros de 2nm con hebras de DNA.

En este capítulo se estudiaron diferentes estrategias para la inmovilización del aptámero que une AMP y su efecto en el reconocimiento molecular, involucrando distintas modificaciones químicas en los extremos de la hebra, *e.g.* sulfuros, fosforotioatos, que permiten la adsorción de estos en la superficie. Estos grupos permitieron analizar el efecto de la densidad y la orientación de las hebras inmovilizadas en la sensibilidad del proceso de reconocimiento. Se concluyó que, a diferencia de lo buscado en superficies planas²⁶ o nanopartículas en solución,²³ una baja densidad de aptámeros es deseada ya que permite que ocurra el cambio conformacional debido al evento de reconocimiento. A su vez, una orientación perpendicular de la hebra a la superficie facilita los procesos de transferencia electrónica.

Se logró una gran sensibilidad, en la escala nanomolar, para la detección y cuantificación de moléculas pequeñas debido a la generación de AuNPs confinadas en poros con dimensiones del orden de los cambio producido por el reconocimiento, lo que produce un cambio importante en el proceso de transferencia electrónica. Esta sensibilidad proviene también del uso de una sonda con una carga muy negativa. En el caso de usar una sonda neutra, como lo es el ferrocenometanol, también es posible notar cambios, aunque estos no son tan importantes, lo que indica que el uso de una interface en la escala molecular puede ser sensible a los cambios estructurales, pero la repulsión debida a la distribución de las cargas negativas es el efecto más fuerte en la respuesta electroquímica observada.

Por último, fue posible no sólo detectar moléculas pequeñas, sino que se utilizó el sistema obtenido para el reconocimiento de la hebra complementaria como una prueba de concepto para estimar la sensibilidad del sistema como genosensor. Este nanosistema permitió trabajar con volúmenes de muestra de 10µl y cuantificar concentraciones de hasta 0.1nM.

Referencias

- (1) Shi, H.; Ye, X.; He, X.; Wang, K.; Cui, W.; He, D.; Li, D.; Jia, X. Au@Ag/Au Nanoparticles Assembled with Activatable Aptamer Probes as Smart “nano-Doctors” for Image-Guided Cancer Thermotherapy. *Nanoscale* **2014**, 6 (15), 8754–8761.
- (2) Busseron, E.; Ruff, Y.; Moulin, E.; Giuseppone, N. Supramolecular Self-Assemblies as Functional Nanomaterials. *Nanoscale* **2013**, 5 (16), 7098–7140.
- (3) Ziegler, S.; Pries, V.; Hedberg, C.; Waldmann, H. Target Identification for Small Bioactive Molecules: Finding the Needle in the Haystack. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, 52 (10), 2744–2792.
- (4) Mu, B.; Zhang, J.; McNicholas, T. P.; Reuel, N. F.; Kruss, S.; Strano, M. S. Recent Advances in Molecular Recognition Based on Nanoengineered Platforms. *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47 (4), 979–988.
- (5) Willner, I.; Zayats, M. Electronic Aptamer-Based Sensors. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, 46 (34), 6408–6418.
- (6) Ma, C.; Lin, C.; Wang, Y.; Chen, X. DNA-Based ATP Sensing. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, 77, 226–241.
- (7) Li, F.; Zhang, H.; Wang, Z.; Newbigging, A. M.; Reid, M. S.; Li, X.-F.; Le, X. C. Aptamers Facilitating Amplified Detection of Biomolecules. *Anal. Chem.* **2015**, 87 (1), 274–292.
- (8) Tuleuova, N.; Jones, C. N.; Yan, J.; Ramanculov, E.; Yokobayashi, Y.; Revzin, A. Development of an Aptamer Beacon for Detection of Interferon-Gamma. *Anal. Chem.* **2010**, 82 (5), 1851–1857.
- (9) Radi, A.-E.; Acero Sánchez, J. L.; Baldrich, E.; O’Sullivan, C. K. Reusable Impedimetric Aptasensor. *Anal. Chem.* **2005**, 77 (19), 6320–6323.
- (10) Radi, A.-E.; Acero Sánchez, J. L.; Baldrich, E.; O’Sullivan, C. K. Reusable Impedimetric Aptasensor. *Anal. Chem.* **2005**, 77 (19), 6320–6323.
- (11) Rodriguez, M. C.; Kawde, A.-N.; Wang, J. Aptamer Biosensor for Label-Free Impedance Spectroscopy Detection of Proteins Based on Recognition-Induced Switching of the Surface Charge. *Chem. Commun.* **2005**, No. 34, 4267–4269.
- (12) Porkka-Heiskanen, T.; Alanko, L.; Kalinchuk, A.; Stenberg, D. Adenosine and Sleep. *Sleep Med. Rev.* **2002**, 6 (4), 321–332.
- (13) Dunwiddie, T. V.; Masino, S. A. THE ROLE AND REGULATION OF ADENOSINE IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Annu. Rev. Neurosci.* **2001**, 24 (1), 31–55.
- (14) Huizenga, D. E.; Szostak, J. W. A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP. *Biochemistry*

- 1995**, *34* (2), 656–665.
- (15) Lin, C. H.; Patei, D. J. Structural Basis of DNA Folding and Recognition in an AMP-DNA Aptamer Complex: Distinct Architectures but Common Recognition Motifs for DNA and RNA Aptamers Complexed to AMP. *Chem. Biol.* **1997**, *4* (11), 817–832.
- (16) Li, Z.; Zhang, L.; Mo, H.; Peng, Y.; Zhang, H.; Xu, Z.; Zheng, C.; Lu, Z. Size-Fitting Effect for Hybridization of DNA/mercaptohexanol Mixed Monolayers on Gold. *Analyst* **2014**, *139* (12), 3137–3145.
- (17) Calvo, A.; Yameen, B.; Williams, F. J.; Soler-Illia, G. J. A. A.; Azzaroni, O. Mesoporous Films and Polymer Brushes Helping Each Other To Modulate Ionic Transport in Nanoconfined Environments. An Interesting Example of Synergism in Functional Hybrid Assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (31), 10866–10868.
- (18) Stair, J. L.; Harris, J. J.; Bruening, M. L. Enhancement of the Ion-Transport Selectivity of Layered Polyelectrolyte Membranes through Cross-Linking and Hybridization. *Chem. Mater.* **2001**, *13* (8), 2641–2648.
- (19) Pérez-Mitta, G.; Marmisollé, W. A.; Trautmann, C.; Toimil-Molares, M. E.; Azzaroni, O. Nanofluidic Diodes with Dynamic Rectification Properties Stemming from Reversible Electrochemical Conversions in Conducting Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (49), 15382–15385.
- (20) Priano, G.; González, G.; Günther, M.; Battaglini, F. Disposable Gold Electrode Array for Simultaneous Electrochemical Studies. *Electroanalysis* **2008**, *20* (1), 91–97.
- (21) Houser, J. E.; Hebert, K. R. Modeling the Potential Distribution in Porous Anodic Alumina Films during Steady-State Growth. *J. Electrochem. Soc.* **2006**, *153* (12), B566–B573.
- (22) Lantiat, D.; Vivier, V.; Laberty-Robert, C.; Grosso, D.; Sanchez, C. Gold Nanoelectrode Arrays and Their Evaluation by Impedance Spectroscopy and Cyclic Voltammetry. *ChemPhysChem* **2010**, *11* (9), 1971–1977.
- (23) Zhou, W.; Wang, F.; Ding, J.; Liu, J. Tandem Phosphorothioate Modifications for DNA Adsorption Strength and Polarity Control on Gold Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (17), 14795–14800.
- (24) Hurst, S. J.; Lytton-Jean, A. K. R.; Mirkin, C. A. Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (24), 8313–8318.
- (25) Papadakis, G.; Tsortos, A.; Kordas, A.; Tiniakou, I.; Morou, E.; Vontas, J.; Kardassis, D.; Gizeli, E. Acoustic Detection of DNA Conformation in Genetic Assays Combined with PCR. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2033.
- (26) Zhang, X.; Yadavalli, V. K. Surface Immobilization of DNA Aptamers for Biosensing and Protein

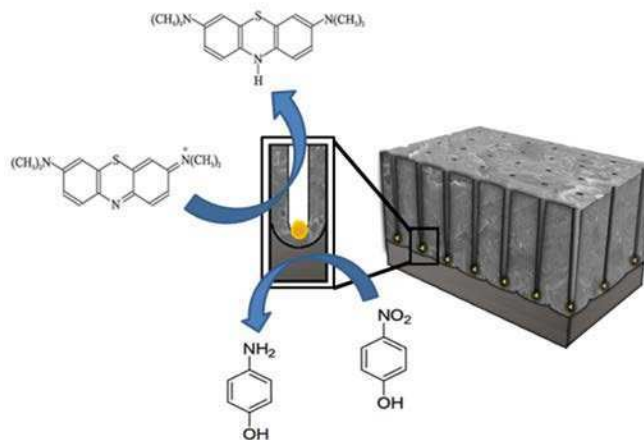
- Interaction Analysis. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26* (7), 3142–3147.
- (27) Ceretti, H.; Ponce, B.; Ramírez, S. A.; Montserrat, J. M. Adenosine Reagentless Electrochemical Aptasensor Using a Phosphorothioate Immobilization Strategy. *Electroanalysis* **2010**, *22* (2), 147–150.
- (28) Boozer, C.; Chen, S.; Jiang, S. Controlling DNA Orientation on Mixed ssDNA/OEG SAMs. *Langmuir* **2006**, *22* (10), 4694–4698.
- (29) Strong, L.; Whitesides, G. M. Structures of Self-Assembled Monolayer Films of Organosulfur Compounds Adsorbed on Gold Single Crystals: Electron Diffraction Studies. *Langmuir* **1988**, *4* (3), 546–558.
- (30) Ohshiro, T.; Maeda, M. Single-Molecule Imaging of DNA Duplexes Immobilized on Surfaces with a Scanning Tunneling Microscope. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (15), 2581–2583.
- (31) Petrovykh, D. Y.; Kimura-Suda, H.; Whitman, L. J.; Tarlov, M. J. Quantitative Analysis and Characterization of DNA Immobilized on Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (17), 5219–5226.
- (32) Campos, R.; Kotlyar, A.; Ferapontova, E. E. DNA-Mediated Electron Transfer in DNA Duplexes Tethered to Gold Electrodes via Phosphorothioated dA Tags. *Langmuir* **2014**, *30* (40), 11853–11857.
- (33) Ramallo-López, J. M.; Giovanetti, L. J.; Requejo, F. G.; Isaacs, S. R.; Shon, Y. S.; Salmeron, M. Molecular Conformation Changes in Alkylthiol Ligands as a Function of Size in Gold Nanoparticles: X-Ray Absorption Studies. *Phys. Rev. B* **2006**, *74* (7), 73410.
- (34) Ramallo-López, J. M.; Giovanetti, L. J.; Requejo, F. G.; Isaacs, S. R.; Shon, Y. S.; Salmeron, M. Molecular Conformation Changes in Alkylthiol Ligands as a Function of Size in Gold Nanoparticles: X-Ray Absorption Studies. *Phys. Rev. B* **2006**, *74* (7), 73410.
- (35) Jiang, L.; Zhang, H.; Zhuang, J.; Yang, B.; Yang, W.; Li, T.; Sun, C. Sterically Mediated Two-Dimensional Architectures in Aggregates of Au Nanoparticles Directed by Phosphorothioate Oligonucleotide-DNA. *Adv. Mater.* **2005**, *17* (17), 2066–2070.
- (36) Petrovykh, D. Y.; Kimura-Suda, H.; Whitman, L. J.; Tarlov, M. J. Quantitative Analysis and Characterization of DNA Immobilized on Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (17), 5219–5226.
- (37) Papadakis, G.; Tsortos, A.; Bender, F.; Ferapontova, E. E.; Gizeli, E. Direct Detection of DNA Conformation in Hybridization Processes. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (4), 1854–1861.
- (38) Huizenga, D. E.; Szostak, J. W. A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP. *Biochemistry* **1995**, *34* (2), 656–665.
- (39) Gormally, E.; Caboux, E.; Vineis, P.; Hainaut, P. Circulating Free DNA in Plasma or Serum as

Biomarker of Carcinogenesis: Practical Aspects and Biological Significance. *Mutat. Res.* **2007**, 635 (2-3), 105-117.

- (40) Schwarzenbach, H.; Pantel, K. Circulating DNA as Biomarker in Breast Cancer. *Breast Cancer Res.* **2015**, 17 (1), 136.
- (41) Song, Y.; Huang, Y.-Y.; Liu, X.; Zhang, X.; Ferrari, M.; Qin, L. Point-of-Care Technologies for Molecular Diagnostics Using a Drop of Blood. *Trends Biotechnol.* **2016**, 32 (3), 132-139.
- (42) Wu, L.; Qu, X. Cancer Biomarker Detection: Recent Achievements and Challenges. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44 (10), 2963-2997.
- (43) Taniguchi, M. Selective Multidetector Using Nanopores. *Anal. Chem.* **2015**, 87 (1), 188-199.
- (44) Choi, Y.; Baker, L. A.; Hillebrenner, H.; Martin, C. R. Biosensing with Conically Shaped Nanopores and Nanotubes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8 (43), 4976-4988.

Capítulo 6: Aplicaciones de los sistemas Al/Al₂O₃/Me en catálisis

Los clusters metálicos soportados en alúmina porosa presentan muy buenas propiedades catalíticas, como se muestra para dos reacciones de referencia: la reducción de azul de metileno y 4-nitrofenol.



6.1. Introducción

Las nanopartículas y clusters metálicos son catalizadores muy eficientes, particularmente, en el caso de reacciones redox.¹⁻³ Un catalizador redox facilita la transferencia de electrones desde un donador a un aceptor; por lo que, su potencial de reducción debe encontrarse entre los valores de potenciales de reducción del donador y el aceptor.⁴ En el caso de partículas metálicas, los cambios de tamaño generan corrimientos en el nivel de Fermi afectando sus propiedades redox, más aún cuando estas adquieren dimensiones de clusters pequeños. Por otro lado, el decrecimiento del tamaño de las partículas genera un aumento en la fracción de sitios en el metal con baja coordinación, *e.g.* vértices, bordes, que promueven la adsorción de los reactivos facilitando la reacción. Estos efectos se observan principalmente, en partículas con diámetros menores a 5nm.⁵ Por lo tanto, el tamaño es un parámetro determinante en las propiedades catalíticas de las nanopartículas.⁶

Una de las ventajas de la electrodeposición de nanopartículas/clusters metálicos en una matriz porosa, sobre la síntesis homogénea de catalizadores, es que no se necesitan ligandos orgánicos para estabilizar las partículas. Estos agentes estabilizantes usados en la síntesis homogénea, usualmente bloquean los sitios de la superficie y reducen la actividad catalítica.⁴ A su vez, es posible que los agentes que estabilizan las nanopartículas y evitan que estas se aglomeren, se pierdan en el proceso, perdiendo su actividad catalítica.⁷⁻⁹ En este

sentido los catalizadores en fase heterogénea, como nuestras partículas, presentan grandes ventajas, siendo muy sencilla su separación sin que sea necesario diseñar el proceso (precipitación, cromatografía, etc). Además, las partículas en una matriz porosa generan la posibilidad de reutilizar el catalizador, lo que es sumamente relevante respecto a una potencial aplicación.

Por lo tanto, las características del sistema formado a partir de la electrodeposición de partículas metálicas pequeñas soportadas en alúmina, sugieren que éstas podrían tener aplicaciones como catalizadores para reacciones redox. En este sentido, es interesante evaluar el efecto que tiene sobre la actividad catalítica el metal que compone la partícula, así como su morfología. Los clusters de metales nobles, en particular el Au y Pt, están bien caracterizados y muestran mucho potencial.¹⁰⁻¹² El Ni, por otro lado, constituye una alternativa económica junto con el Cu y el Fe y adquiere relevancia debido a sus aplicaciones en almacenamiento de energía.¹³ Por otra parte, Cu, Ni y sus aleaciones han sido utilizados exitosamente como catalizadores en procesos redox, como por ejemplo en la oxidación de alcoholes.¹⁴⁻²¹ Sin embargo, no se han reportado hasta el momento estudios de catálisis de clusters de Ni en ausencia de agentes estabilizantes, por lo que caracterizar las propiedades catalíticas en los sistemas de Ni es de particular interés.

Para la comparación de las actividades catalíticas de distintos materiales es de suma importancia contar con reacciones modelo cuya medidas cinéticas sean robustas, reproducibles y fáciles de monitorear. En este capítulo, se evalúa la capacidad catalítica de los diferentes clusters metálicos que se presentaron en el Capítulo 3, utilizando dos reacciones de referencia (la reducción de 4-nitrofenol⁶ y de azul de metileno²²) como prueba de concepto. El grado de conversión de ambas reacciones puede monitorearse a partir de medidas UV-Vis y los parámetros cinéticos son de fácil obtención ya que pueden llevarse a cabo en condiciones de pseudo-primer orden.

El 4-nitrofenol (4-NP) es uno de los contaminantes más comunes de los efluentes industriales y, junto con sus derivados, se obtiene como subproducto de la fabricación de pesticidas, herbicidas, colorantes, explosivos.^{23,24} Su determinación por métodos rápidos y sencillos es altamente conveniente, ya que la toxicidad de estos productos es alta, afectando el sistema nervioso, hígado, riñón y la sangre en animales y humanos. La reacción de reducción de 4-nitrofenol a 4-aminofenol ($E^0 = -0.76V$) en condiciones ambiente es termodinámicamente favorable utilizando un reductor fuerte, como lo es NaBH₄ en agua ($E^0 = -1.33V$). Sin embargo,

involucra un proceso de transferencia de 6 electrones en presencia de este reductor y no procede en ausencia de catalizador. La reacción produce únicamente 4-aminofenol, sin generar otros sub-productos.⁶

Por otro lado, la reducción de azul de metileno también es una reacción de referencia, donde el azul de metileno (MB), de color azul, se reduce a azul de leucometileno (solución transparente); de manera que es posible seguir su cinética a partir de medidas de espectrofotometría UV-Vis. A su vez, el azul de metileno tiene una buena respuesta electroquímica, lo que lo convierte en una sonda conveniente para estudios básicos y aplicados en electrocatálisis.²⁵ Además, esta sonda tiene una alta afinidad por el ADN, siendo utilizada en genosensores²⁶ y aptasensores²⁷ basados en técnicas electroquímicas.

6.2. Experimental

6.2.1. Reducción química de azul de metileno

La cinética de reducción de azul de metileno (MB) se estudió a través de la técnica de espectroscopía UV-Vis, utilizando una cubeta de cuarzo. La solución de azul de metileno e hidrato de hidracina se mezclaron con HCl para ajustar el pH a 8.5. Inmediatamente, 24mm² del sistema Al/Al₂O₃/Me se pusieron en contacto con 0.7ml de la solución que contenía 0.06M de hidracina y 3.3x10⁻⁵M de MB. La cubeta se colocó, inmediatamente, en el equipo y se midieron los espectros de absorción, a temperatura ambiente. Luego, para los estudios catalíticos se tienen en cuenta los cambios en la absorbancia a 665nm respecto del tiempo. Los controles se realizaron utilizando un soporte de Al/Al₂O₃ donde no se realizó la electrodeposición de partículas.

En este caso, se observa un tiempo de inducción que depende de la velocidad con que sucede la reacción con hidracina. Esto sugiere que el O₂ disuelto en la solución fue eliminado por el propio azul de metileno reducido; este fenómeno ya fue previamente reportado.²⁸ Por limitaciones en el arreglo experimental el oxígeno disuelto no puede ser removido y el análisis cinético informado en este capítulo se realiza descontando ese período (t_0).

6.2.2. Reducción química de 4-nitrofenol

Se estudió la cinética de reducción de 4-nitrofenol (4-NP) por espectroscopía UV-Vis. Se pone en contacto con la solución que contiene 50 μ M de 4-nitrofenol y 20mM de NaBH₄, una superficie total de 8mm² de Al/Al₂O₃/Me. Para determinar la constante de pseudo orden, k' , se midieron los cambios en la absorbancia del pico correspondiente a 4-nitrofenol ($\lambda = 400\text{nm}$) en intervalos de dos minutos. Como medida control se realizó el mismo experimento pero usando sólo el soporte Al/Al₂O₃, sin la deposición de los metales.

Para el cálculo de la constante aparente se tuvo en cuenta la concentración de NaBH₄, el volumen de reacción y la masa de catalizador. Esta última se calculó a partir de la superficie expuesta en el volumen de reacción, el número de poros de alúmina por centímetro cuadrado y el número de clusters por poro, que se estiman a partir de resultados obtenidos en los Capítulos 3 y 4.

6.2.3. Reducción electroquímica

Las reducciones electroquímicas se realizaron utilizando los electrodos Al/Al₂O₃/Au generados como electrodo de trabajo. Como contra electrodo se usó una lámina de oro macizo y como referencia, un electrodo de Ag/AgCl. Se llevó a cabo la voltametría cíclica en una solución que contiene azul de metileno 3.3 μ M a pH 7.4 con KNO₃ 100mM, a 50mV/s entre -0.3V y 0V.

Por otro lado, se llevaron a cabo medidas de voltametría de onda cuadrada en las siguientes condiciones: amplitud igual a 20mV, frecuencia de 25Hz y salto de 5mV. Se utilizaron los mismos electrodos de Al/Al₂O₃/Au y se llevó a cabo las medidas de reducción de 4-nitrofenol a partir de una solución de 4-nitrofenol 50 μ M en buffer MES 50mM pH 5.5.

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Reducción química

6.3.1.1. Catálisis de reducción de azul de metileno

Se estudió la capacidad catalítica de los sistemas Al/Al₂O₃/Me a través de la reducción del colorante azul de metileno usando como reductor hidracina. En particular, se caracterizó la dependencia con el metal (Au, Ni y Pt) y con el tamaño del poro.

Se eligieron aquellas condiciones de síntesis que permiten obtener los clusters más pequeños, que son los que potencialmente podrían presentar las mejores propiedades catalíticas. Estos se generan por electrodeposición utilizando una corriente catódica de 3mA cm⁻² en todos los casos, y aplicando la misma secuencia de pulsos para los distintos metales, según se describió en las Secciones 3.3.2.1, 3.3.2.2 y 3.3.2.3.

La cinética de reducción de azul de metileno se puede monitorear por espectroscopía UV-Vis, siguiendo el cambio a la longitud de onda del máximo de absorbancia del MB ($\lambda_{\text{max}}=665\text{nm}$) (Figura 6. 1). Si la concentración del reductor es mucho mayor que la de azul de metileno, la reacción puede considerarse como de pseudo-primer orden respecto a él.

Para obtener la constante de pseudo-primer orden, k' , se realizó un ajuste lineal del $\ln(A/A_0)$ en función del tiempo y se obtuvo la constante a partir de la pendiente. En la Figura 6. 2 se presentan los gráficos de la cinética de pseudo-primer orden y en la Tabla 6. 1 se resumen los valores de k' obtenidos para el soporte de alúmina y para los distintos metales depositados. En primer lugar, se observa que la reacción ocurre en forma lenta en ausencia de clusters (Figura 6. 2, negro), catalizada por la luz, con una constante de pseudo orden igual a la reportada en bibliografía para las mismas concentraciones de hidracina y MB.²² Los cambios en el tiempo en presencia de los clusters son significativamente mayores respecto al blanco, mostrando que los clusters electrodepositados son catalizadores eficientes.

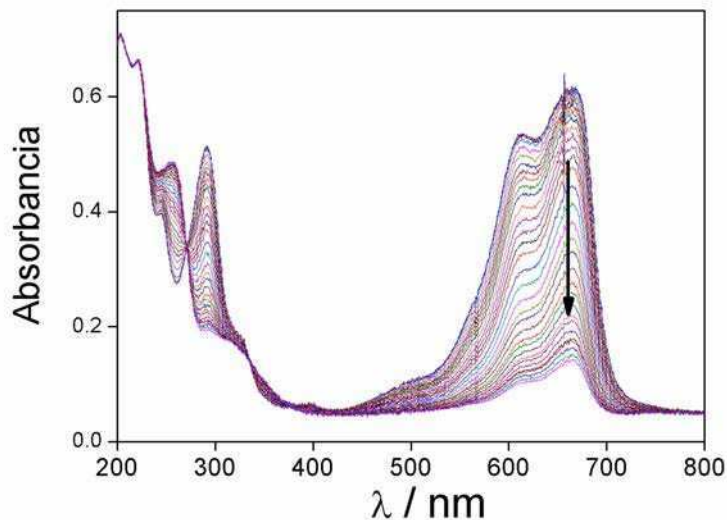


Figura 6. 1. Espectros de absorción obtenidos durante la reducción de azul de metileno con hidracina en presencia de Al/Al₂O₃/Au a distintos tiempos. Se observa como decrece el pico a 665nm correspondiente al azul de metileno a medida que avanza la reacción.

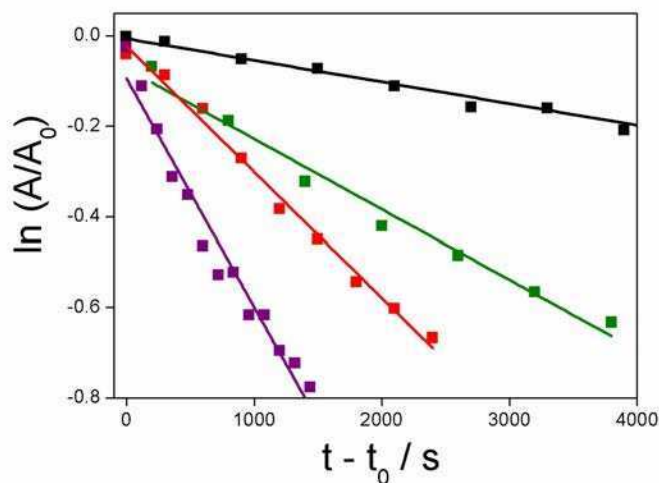


Figura 6. 2. Gráfico de la cinética de pseudo primer orden para la reducción de MB a 665nm, para el caso de utilizar Al₂O₃ (negro) y clusters de Ni (verde), Au (rojo) y Pt (azul) en Al₂O₃.

En la Tabla 6. 1 se presentan los valores de k' promedio de 3 medidas independientes en cada caso. Por otro lado, todas las partículas metálicas presentan muy buena actividad catalítica frente a la reducción de MB, siendo el platino el que tiene una mayor constante. Sin embargo, para realizar una comparación de la capacidad catalítica es necesario tener en cuenta la dependencia de la constante con la concentración.

El valor de k' depende de la concentración de hidracina, que es la misma en todos los casos estudiados, y de la concentración de clusters. Se puede estimar una concentración de clusters del orden de nM, teniendo en cuenta el volumen de solución utilizada y el área expuesta de catalizador. Además para calcular su concentración es necesario establecer el número de clusters presentes por poro, que no pudo determinarse de manera directa en los sistemas desarrollados en este trabajo. Sin embargo, a partir de las caracterizaciones realizadas, se estimó que en el caso del oro se genera como máximo una partícula por poro. Para llegar a esta conclusión se tuvieron en cuenta las medidas electroquímicas de voltametría cíclica presentadas en el Capítulo 3 y 4, y los resultados obtenidos a partir de la simulación de estas voltametrías. Como se concluye en la Sección 4.3.5, en las condiciones utilizadas en este caso, 1 de cada 3 poros están ocupados por las partículas de oro generadas a partir de KAu(CN)₂. Por otro lado, la presencia de más de una partícula de oro por poro queda descartada por el comportamiento detallado en el Capítulo 3: si existiera más de una partícula se esperaría que estas se agreguen y crezcan. Es esperable que en el caso de los clusters de Pt se forme una partícula por poro, ya que este sistema tiene propiedades similares al caso del Au. Para el Ni es diferente; las imágenes de HRTEM de un corte de perfil en el fondo de los poros que se muestra en la Sección 3.3.2.1.1, permite asegurar que hay presentes varios clusters por poro.

Para no subestimar la concentración de clusters, que permitiría obtener valores de constantes de velocidad mayores a las reales, se sobreestima la concentración de partículas; suponiendo que hay presente una partícula por poro para Au y Pt, mientras que para el Ni se considerará que se forman 10 clusters por poro, si bien por las características geométricas se espera que este número sea menor. A partir de estos valores, puede estimarse la concentración de clusters y obtener la constante de velocidad, k , que resulta independiente de la concentración del catalizador y del reductor.

	D _{poro} / nm	ρ / poros cm ⁻²	D _{NPs} / nm	k' / 10 ⁴ s ⁻¹	k / M ⁻² s ⁻¹
Al₂O₃	11 ± 1	6.5 x 10 ¹⁰	-	0.75 ± 0.04	-
Pt	11 ± 1	6.5 x 10 ¹⁰	1.1 ± 0.3	4.7 ± 0.3	8 x 10 ⁹
Au	6.3 ± 0.7	1.5 x 10 ¹¹	1.3 ± 0.7	7.5 ± 0.2	6 x 10 ⁸
	11 ± 1	6.5 x 10 ¹⁰	2.2 ± 0.5	2.4 ± 0.1	4 x 10 ⁸
Ni	6.3 ± 0.7	1.5 x 10 ¹¹	0.7 ± 0.1	3.6 ± 0.2	3 x 10 ⁷
	11 ± 1	6.5 x 10 ¹⁰	0.7 ± 0.1	1.6 ± 0.2	3 x 10 ⁷

Tabla 6. 1. Se muestran los valores de constantes cinéticas de pseudo orden (k') para los diferentes clusters estudiados junto con las características geométricas del sistema poroso. A su vez se calcula la constante aparente (k) suponiendo una partícula por poro para el caso del Pt y Au, y 5 partículas por poro para el Ni.

Para un mismo tamaño de poro, a partir de la comparación de las constantes de velocidad, k, se observa que el mejor catalizador es el Pt, luego el Au y por último, el Ni. En este sentido, es importante remarcar que éste es uno de los primeros trabajos donde se obtiene catálisis de reducción de MB con partículas de Ni y no se han encontrados reportes previos de catálisis de MB en presencia de reductores suaves como la hidracina. Recientemente, Veerakumar *et al.*²⁹ presentaron la síntesis de nanopartículas de níquel de 6 nm de diámetro sobre carbono poroso a través de un método que involucra el uso de surfactantes, resinas y tratamientos térmicos a 120 y 900 °C. Dichos autores utilizan una suspensión de este material como catalizador de la reducción de azul de metileno en un exceso de borohidruro de sodio. Si bien la comparación de resultados no es directa ya que se usa otro reductor, la constante de pseudo primer orden en presencia de 2 mg de catalizador es de 9.5x10⁻³ s⁻¹. Este catalizador contiene 2 µg de Ni, mientras que en nuestro caso una constante de pseudo primer orden de 1.6x10⁻⁴ s⁻¹ es obtenida en presencia de 2x10⁻⁴ µg. Esto sugiere que el sistema presentado aquí es aproximadamente 100 veces más rápido por unidad de masa de catalizador y muy sencillo de preparar.

Por otro lado, es interesante, por tratarse de metales que catalizan el mismo tipo de reacción con mecanismos similares,²¹ la comparación del comportamiento de los clusters de Ni con clusters de Cu para los cuales hay valores reportados en la literatura. El valor obtenido

de constante de velocidad aparente resulta ser de $2.5 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-2}$ para clusters de Ni de 0.7nm de diámetro. Esta constante de velocidad es algunos órdenes de magnitud mayor que la reportada para clusters de Cu₁₃ obtenidos en las mismas condiciones de reacción.²² Es importante remarcar que el Cu₁₃ fue sintetizado en fase homogénea utilizando como agente protector tetrabutilamonio, mientras que los clusters de Ni₁₃ sintetizados en alúmina son clusters “desnudos” y por lo tanto, más reactivos.

Se realizó el mismo estudio cinético para los clusters de Au y Ni sintetizados en poros de menor tamaño (6nm de diámetro). En la Tabla 6. 1 se resumen las constantes de pseudo-orden obtenidas para la reacción en cada caso; junto con la densidad de poros para las dos estructuras porosas utilizadas y los valores de tamaño de partícula obtenido en cada caso (determinados en el Capítulo 3). Se informa un valor de constante k' para la alúmina que proviene del promedio de las constantes obtenidas para las estructuras de 11nm y 6.3nm de diámetro de poro, ya que en ambos casos los valores de k' no difieren significativamente. Se puede ver que en el caso del Ni, donde el tamaño del cluster no cambia con el tamaño de poro, la constante k , normalizada por la concentración de clusters, es la misma en ambos casos. Por otro lado, en el caso del Au, donde el tamaño de la partícula cambia con el diámetro de poro, el valor obtenido para partículas más pequeñas es un 50% mayor.

Una de las principales propiedades deseadas en los catalizadores cuando se piensa en una aplicación real de éstos, involucran su reutilización y la separación de ellos del medio de reacción en forma rápida y sencilla. En este sentido, es interesante notar que si el soporte con los clusters se remueve de la solución, se observa un cambio inmediato en la pendiente y la constante de velocidad de pseudo-orden se iguala a la obtenida con el blanco. En la Figura 6. 3 se muestran dos ejemplos, uno que involucra los clusters de Ni de 0.7nm (A) y otro de Au de 1.3nm (B). De este modo, se demuestra la estabilidad de los clusters dentro del soporte de alúmina que permiten remover el catalizador sin necesidad de pasos de purificación.

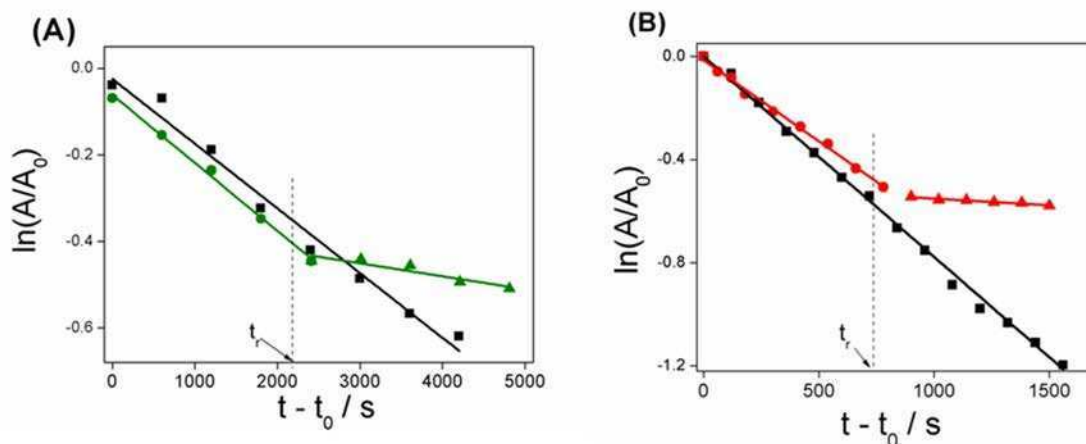


Figura 6. 3. Gráfico de la cinética de pseudo primer orden para la reducción de MB a 665nm utilizando los sistemas Al/Al₂O₃ /Ni (A) y Al/Al₂O₃ /Au (B). En negro se muestra el caso donde *no* se remueve el catalizador y en color el caso donde, al tiempo indicado (t_r), se remueve el catalizador.

Por otro lado, se estudia las propiedades de reciclado del sistema catalítico a partir del soporte de Al₂O₃ conteniendo clusters de Au de 1.3nm. Para ello se utiliza el mismo catalizador en sucesivos ciclos de reducción de azul de metileno de 30min. En la Tabla 6. 2 se muestran los valores de constante de pseudo primer orden k' obtenidas. Se puede observar que las propiedades catalíticas del sistema parecerían mantenerse luego de algunos ciclos; si bien existe una disminución en los primeros ciclos, posiblemente debido a efectos de pasivación de la superficie por la adsorción de reactivos, según estos resultados preliminares. Un estudio más detallado es necesario para confirmar estos resultados.

Nº de ciclo	$k' / 10^4 s^{-1}$
1	7.7 ± 0.1
2	7.5 ± 0.2
3	6.9 ± 0.1
4	6.8 ± 0.1

Tabla 6. 2. Valores de constantes de velocidad de pseudo primer orden para la reducción de azul de metileno utilizando el mismo catalizador de Al/Al₂O₃/Au en 4 ciclos sucesivos.

6.3.1.2. Catálisis de reducción de 4-nitrofenol

En forma comparativa, se estudió la capacidad catalítica de los sistemas Al/Al₂O₃/Me a través de la reducción del 4-nitrofenol con NaBH₄. Esto permite analizar si la alta capacidad catalítica obtenida para la reducción de MB a partir de los diferentes clusters se puede generalizar para otras reacciones.

En este caso, los clusters fueron generados por electrodeposición dentro de poros de 11nm de diámetro, utilizando una corriente catódica de 3mA cm⁻² y aplicando la misma secuencia de pulsos para los distintos metales, al igual que en la Sección 6.3.1.1.

Se sabe que la reacción de reducción de 4-nitrofenol procede utilizando NaBH₄ como reductor, en medio acuoso, a temperatura ambiente, y es catalizada por nanopartículas libres o inmovilizadas.⁶ Se conoce que en presencia de un exceso de NaBH₄ la reacción es de pseudo-primer orden en la concentración de 4-nitrofenol, pudiéndose obtener una k' de pseudo-orden. Entonces, se realizó la reacción de reducción en exceso de NaBH₄, exponiendo los clusters de Ni, Au y Pt contenidos en la matriz de alúmina a una solución que lo contiene junto al 4-nitrofenol.

En la Figura 6. 4, se muestran, los espectros de absorción a distintos tiempos (entre 0 y 30min) al utilizar como catalizador Al/Al₂O₃/Au. Se obtuvieron resultados comparables en los sistemas de Al/Al₂O₃/Pt y Al/Al₂O₃/Ni. Se observa que el pico a 400nm, correspondiente al 4-nitrofenol, decae en el tiempo, mientras que el pico correspondiente al 4-aminofenol ($\lambda=297\text{nm}$) aumenta.

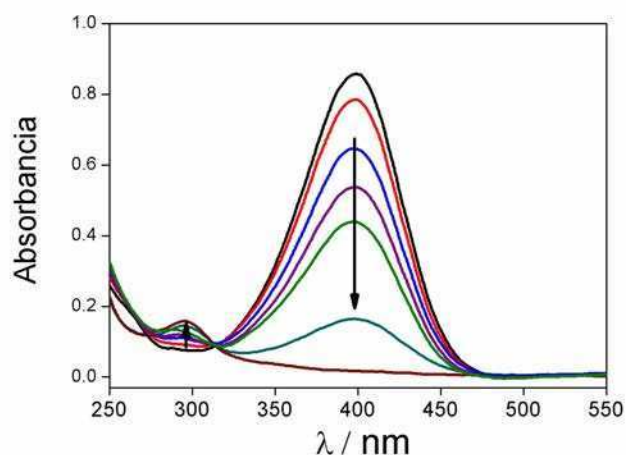


Figura 6. 4. Espectros de absorción obtenidos durante la reducción de 4-nitrofenol con NaBH₄ en presencia de Al/Al₂O₃/Au a distintos tiempos. Los picos de absorción a 405nm y 297nm corresponden a 4-nitrofenol y 4-aminofenol, respectivamente. Las flechas indican la dirección del cambio en el tiempo.

Para obtener la constante de pseudo-primer orden, k' , se realizó un ajuste lineal del $\ln(A/A_0)$ en función del tiempo y se obtuvo la constante a partir de la pendiente, al igual que en la Sección anterior. En la Figura 6. 5 se presentan los gráficos de la cinética de pseudo-primer orden y en la Tabla 6. 3 se resumen los valores de k' obtenidos para el soporte de alúmina y para los distintos metales depositados. En primer lugar, se observa que la reacción no es catalizada por el soporte de alúmina.

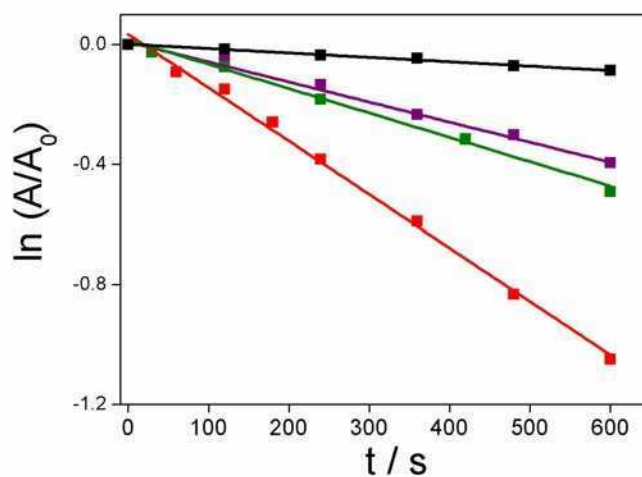


Figura 6. 5. Gráfico de la cinética de pseudo primer orden para la reducción de 4-nitrofenol a 400nm, para el caso de utilizar Al₂O₃ (negro) y clusters de Ni (verde), Au (rojo) y Pt (violeta) en Al₂O₃ con poros de 11nm.

Metal	D _{NPs} / nm	k' / 10 ⁴ s ⁻¹
Au	2.2 ± 0.5	16.8 ± 0.6
Pt	1.1 ± 0.3	6.2 ± 0.2
Ni	0.7 ± 0.1	7.1 ± 0.4

Tabla 6. 3. Valores de diámetro de partícula de los diferentes metales obtenidos a partir del análisis de los espectros EXAFS, descrito en el Capítulo 3.

A partir del cálculo de la concentración de clusters tal como se realizó para el MB, se obtiene la frecuencia de regeneración (*turnover frequency*, TOF), la cual se define según la ecuación 6.1, siendo C_{4-NP} la concentración de 4-nitrofenol (50 μM), C_{Me} la concentración del metal que corresponda en cada caso y t el tiempo que se tarda en llegar a convertir un dado porcentaje de reactivo. Este valor refleja la actividad catalítica de las partículas, de forma independiente de las concentraciones.

$$TOF = \frac{C_{4-NP} \cdot \text{conversión}}{C_{Me} \cdot t} \quad (6.1)$$

En la Tabla 6. 4 se presentan algunos valores de TOF obtenidos para la reducción de 4-nitrofenol con partículas de oro generadas en diferentes soportes. Se puede ver que los valores de TOF disminuyen al aumentar el tamaño de las nanopartículas. Los resultados obtenidos en este trabajo son del orden de los reportados por Xu *et al.* para clusters de Au de tamaño similar.¹²

Metal	Soporte del catalizador	D _{partícula} / nm	TOF (h ⁻¹)	Ref
Au	Grafeno	26	42	10
Au	Nanocristales de celulosa	30 ± 3	109	11
Au	péptidos	1.8 ± 0.2	720	12
Au	Al ₂ O ₃	2.2 ± 0.5	1280	Este trabajo
Pt	Al ₂ O ₃	1.1 ± 0.3	456	
Ni	Al ₂ O ₃	0.7 ± 0.1	54	

Tabla 6. 4. Valores de constante de pseudo orden (k') y TOF para la catálisis de 4-nitrofenol con partículas de oro en distintos soportes, reportados en bibliografía y en este trabajo.

También se muestran en la Tabla 6. 4, los valores de TOF para la reducción de nitrofenol con las partículas de Ni y Pt generadas en la matriz de alúmina. El Pt presenta valores comparables a los obtenidos para los mejores sistemas catalíticos de partículas de oro.

Por otro lado, el TOF alcanzado por los clusters pequeños de Ni son comparables con los alcanzados por algunos de los sistemas reportados para nanopartículas de metales nobles como el oro. Por lo tanto, los clusters de Ni presentan una performance remarcable, también para esta reacción.

6.3.2. Reducción electroquímica

Se llevó a cabo la reducción electroquímica tanto del azul de metileno como del 4-nitrofenol utilizando como electrodo de trabajo los sistemas Al/Al₂O₃/Au. En este caso, en lugar de un reductor químico (hidracina o NaBH₄), se aplica un potencial reductor realizando voltametrías cíclica o de onda cuadrada. Se prepararon soluciones de MB y 4-NP en las mismas concentraciones que en el caso de la reducción química (3.3 μM y 50 μM, respectivamente).

En la Figura 6. 6 se muestra la voltametría cíclica de 3.3 μM MB a pH 7.4 + 100mM de KNO₃ a 50mV s⁻¹ y la voltametría de onda cuadrada (SWV) para la reducción de 50 μM 4-NP a pH 5.5. En el caso del 4-NP, fue necesario utilizar la técnica de SWV para aumentar la sensibilidad y poder detectarla. En ambos casos se realiza una medida control, donde se utiliza como electrodo de trabajo solo alúmina, sin obtenerse una señal de reducción en ningún caso. Se demuestra entonces, que la transferencia electrónica necesaria para la reducción de ambas especies sólo es posible en presencia de las partículas de oro electrodepositadas. Incluso, estas medidas muestran la posibilidad de realizar una transferencia electrónica rápida.

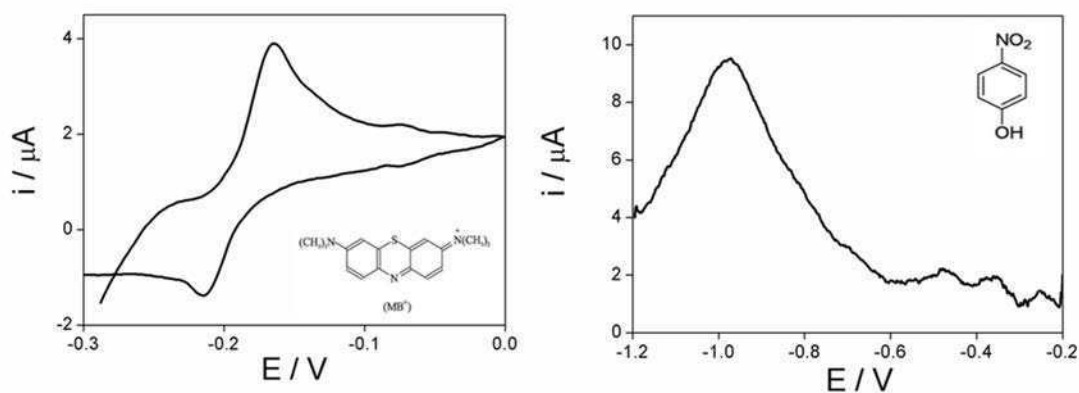


Figura 6. 6. Izquierda: Voltametría cíclica de 3.3×10^{-5} M MB a pH 7.4 + 100mM de KNO₃ a 50mV s⁻¹. Derecha: Voltametría de onda cuadrada para la reducción de 50 μM 4-NP a pH 5.5. En ambos casos se utiliza como electrodo de trabajo Al/Al₂O₃/Au.

El cambio de pH afecta la carga superficial de la alúmina. A pH ácidos la alúmina se encuentra cargada positivamente (Al-OH₂⁺), mientras que a pH mayores a 8, la carga de ésta es negativa (Al-O⁻). El punto de carga cero (PZC), valor de pH al cual la carga superficial de la alúmina es cero, es cercano a 8.^{30,31} Se muestra, en la Figura 6. 7, las voltametrías de onda cuadrada llevadas a cabo en una solución 50μM de 4-nitrofenol a distintos pH. El 4-nitrofenol, al contener un grupo fenol, presenta carga negativa a pH básicos. De esta forma, a pH 9, existen fuerzas repulsivas debidas a las cargas negativas de la alúmina y por lo tanto, no alcanza la superficie de oro y no es posible su reducción. Mientras que a pH ácidos, 5.5, se observa el pico correspondiente a esta reacción. De esta manera se muestra que modulando la carga superficial del sistema poroso es posible alcanzar selectividad.

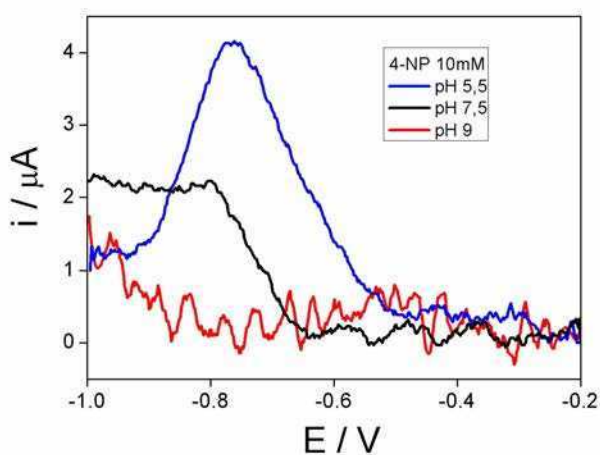


Figura 6. 7. Voltametrías de onda cuadrada de reducción de 4-NPa pH 5.5 (azul), 7.5 (negra) y 9 (roja). En todos los casos se utiliza como electrodo de trabajo Al/Al₂O₃/Au

Estas medidas representan medidas preliminares que muestran la posibilidad de realizar la electroreducción de sondas redox sobre los clusters sintetizados dentro de alúmina, con una muy buena transferencia electrónica y con la posibilidad de regular el transporte a través de los poros, generando selectividad, regulando el pH del medio. Estos resultados, muestran la potencialidad del sistema desarrollado para estudios en electrocatálisis.

6.4. Sumario

Se evaluaron las propiedades catalíticas de los clusters metálicos soportados en alúmina sintetizados en este trabajo de tesis. Para ello, se utilizaron como sistemas de referencia dos reacciones redox cuya cinética pudiera seguirse de forma sencilla y robusta. Se pudo concluir que todos los clusters metálicos (Au, Ni y Pt) exhibieron muy buena actividad catalítica incluso con concentraciones de los mismos en el orden de nM.

En particular, las partículas de oro son las que mejor catalizan la reducción de nitrofenol, incluso obteniendo valores de frecuencias de regeneración (TOF) mayores a los reportados en otros trabajos. Por otro lado, los clusters de Pt son los que permiten obtener mayores constantes de velocidad para la reducción de azul de metileno. Si bien, los clusters de Ni presentan valores de constantes menores que para el caso de los clusters de Au y Pt obtenidos en este trabajo, su actividad catalítica es comparable a las reportadas para la reducción de nitrofenol para nanopartículas de Au como se mostró en la Tabla 6. 4. Por lo que, estos clusters de Ni presentan un gran potencial para ser utilizados como catalizadores económicos en reacciones redox y un estudio de su actividad se planea realizar a futuro, en reacciones de interés.

Los últimos resultados de electroreducción de azul de metileno y 4-nitrofenol, muestran el potencial del sistema para ser utilizado en aplicaciones de electrocatálisis.

Referencias

- (1) Della Pina, C.; Falletta, E.; Prati, L.; Rossi, M. Selective Oxidation Using Gold. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (9), 2077–2095.
- (2) Haruta, M.; Daté, M. Advances in the Catalysis of Au Nanoparticles. *Appl. Catal. A Gen.* **2001**, *222* (1–2), 427–437.
- (3) Gong, J.; Mullins, C. B. Surface Science Investigations of Oxidative Chemistry on Gold. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (8), 1063–1073.
- (4) Jana, N. R.; Wang, Z. L.; Pal, T. Redox Catalytic Properties of Palladium Nanoparticles: Surfactant and Electron Donor–Acceptor Effects. *Langmuir* **2000**, *16* (6), 2457–2463.
- (5) Lee, J.; Park, J. C.; Song, H. A Nanoreactor Framework of a Au@SiO₂ Yolk/Shell Structure for Catalytic Reduction of P-Nitrophenol. *Adv. Mater.* **2008**, *20* (8), 1523–1528.
- (6) Aditya, T.; Pal, A.; Pal, T. Nitroarene Reduction: A Trusted Model Reaction to Test Nanoparticle Catalysts. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (46), 9410–9431.
- (7) Violi, I. L.; Zelcer, A.; Bruno, M. M.; Luca, V.; Soler-Illia, G. J. A. A. Gold Nanoparticles Supported in Zirconia–Ceria Mesoporous Thin Films: A Highly Active Reusable Heterogeneous Nanocatalyst. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (2), 1114–1121.
- (8) Prati, L.; Villa, A. Gold Colloids: From Quasi-Homogeneous to Heterogeneous Catalytic Systems. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47* (3), 855–863.
- (9) Mahmoud, M. A.; Snyder, B.; El-Sayed, M. A. Polystyrene Microspheres: Inactive Supporting Material for Recycling and Recovering Colloidal Nanocatalysts in Solution. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1* (1), 28–31.
- (10) Ye, W.; Yu, J.; Zhou, Y.; Gao, D.; Wang, D.; Wang, C.; Xue, D. Green Synthesis of Pt–Au Dendrimer-like Nanoparticles Supported on Polydopamine-Functionalized Graphene and Their High Performance toward 4-Nitrophenol Reduction. *Appl. Catal. B Environ.* **2016**, *181*, 371–378.
- (11) Wu, X.; Lu, C.; Zhou, Z.; Yuan, G.; Xiong, R.; Zhang, X. Green Synthesis and Formation Mechanism of Cellulose Nanocrystal-Supported Gold Nanoparticles with Enhanced Catalytic Performance. *Environ. Sci. Nano* **2014**, *1* (1), 71–79.
- (12) Xu, W.; Hong, Y.; Hu, Y.; Hao, J.; Song, A. Ultrafine Au and Ag Nanoparticles Synthesized from Self-Assembled Peptide Fibers and Their Excellent Catalytic Activity. *ChemPhysChem* **2016**, *17* (14), 2157–2163.
- (13) Chirik, P. J.; Wieghardt, K. Radical Ligands Confer Nobility on Base-Metal Catalysts. *Science* (80-.). **2010**, *327* (5967), 794 LP-795.

- (14) Azizi, S. N.; Ghasemi, S.; Chiani, E. Nickel/mesoporous Silica (SBA-15) Modified Electrode: An Effective Porous Material for Electrooxidation of Methanol. *Electrochim. Acta* **2013**, *88*, 463–472.
- (15) Hasanzadeh, M.; Karim-Nezhad, G.; Mahjani, M. G.; Jafarian, M.; Shadjou, N.; Khalilzadeh, B.; Saghatforoush, L. A. A Study of the Electrocatalytic Oxidation of Cyclohexanol on Copper Electrode. *Catal. Commun.* **2008**, *10* (3), 295–299.
- (16) Danaee, I.; Jafarian, M.; Forouzandeh, F.; Gobal, F.; Mahjani, M. G. Electrochemical Impedance Studies of Methanol Oxidation on GC/Ni and GC/NiCu Electrode. *Int. J. Hydrogen Energy* **2009**, *34* (2), 859–869.
- (17) Golikand, A. N.; Asgari, M.; Maragheh, M. G.; Shahrokhian, S. Methanol Electrooxidation on a Nickel Electrode Modified by Nickel-dimethylglyoxime Complex Formed by Electrochemical Synthesis. *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *588* (1), 155–160.
- (18) Jafarian, M.; Babaei, M.; Gobal, F.; Mahjani, M. G. Electro-Oxidation of Alcohols on Nickel Dispersed in Poly-O-Aminophenol Modified Graphite Electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2011**, *652* (1–2), 8–12.
- (19) Huang, T.-K.; Lin, K.-W.; Tung, S.-P.; Cheng, T.-M.; Chang, I.-C.; Hsieh, Y.-Z.; Lee, C.-Y.; Chiu, H.-T. Glucose Sensing by Electrochemically Grown Copper Nanobelt Electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, *636* (1–2), 123–127.
- (20) Batchelor-McAuley, C.; Du, Y.; Wildgoose, G. G.; Compton, R. G. The Use of copper(II) Oxide Nanorod Bundles for the Non-Enzymatic Voltammetric Sensing of Carbohydrates and Hydrogen Peroxide. *Sensors Actuators B Chem.* **2008**, *135* (1), 230–235.
- (21) Carugno, S.; Chassaing, E.; Rosso, M.; González, G. A. Enhanced Electrochemical Oxidation of Methanol on Copper Electrodes Modified by Electrocorrosion and Electrodeposition. *Mater. Chem. Phys.* **2014**, *143* (3), 1012–1017.
- (22) Vilar-Vidal, N.; Rivas, J.; López-Quintela, M. A. Size Dependent Catalytic Activity of Reusable Subnanometer copper(0) Clusters. *ACS Catal.* **2012**, *2* (8), 1693–1697.
- (23) Panigrahi, S.; Basu, S.; Praharaj, S.; Pande, S.; Jana, S.; Pal, A.; Ghosh, S. K.; Pal, T. Synthesis and Size-Selective Catalysis by Supported Gold Nanoparticles: Study on Heterogeneous and Homogeneous Catalytic Process. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (12), 4596–4605.
- (24) Narayanan, K. B.; Sakthivel, N. Synthesis and Characterization of Nano-Gold Composite Using *Cylindrocladium floridanum* and Its Heterogeneous Catalysis in the Degradation of 4-Nitrophenol. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *189* (1–2), 519–525.
- (25) Yan, Y.; Zhang, M.; Gong, K.; Su, L.; Guo, Z.; Mao, L. Adsorption of Methylene Blue Dye onto

- Carbon Nanotubes: A Route to an Electrochemically Functional Nanostructure and Its Layer-by-Layer Assembled Nanocomposite. *Chem. Mater.* **2005**, *17* (13), 3457–3463.
- (26) Kara, P.; Kerman, K.; Ozkan, D.; Meric, B.; Erdem, A.; Ozkan, Z.; Ozsoz, M. Electrochemical Genosensor for the Detection of Interaction between Methylene Blue and DNA. *Electrochem. commun.* **2002**, *4* (9), 705–709.
- (27) Bang, G. S.; Cho, S.; Kim, B.-G. A Novel Electrochemical Detection Method for Aptamer Biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21* (6), 863–870.
- (28) Resch, P.; Field, R. J.; Schneider, F. W.; Burger, M. Reduction of Methylene Blue by Sulfide Ion in the Presence and Absence of Oxygen: Simulation of the Methylene Blue-O₂-HS- CSTR Oscillations. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93* (25), 8181–8186.
- (29) Veerakumar, P.; Chen, S.-M.; Madhu, R.; Veeramani, V.; Hung, C.-T.; Liu, S.-B. Nickel Nanoparticle-Decorated Porous Carbons for Highly Active Catalytic Reduction of Organic Dyes and Sensitive Detection of Hg(II) Ions. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (44), 24810–24821.
- (30) Schmuhl, R.; Keizer, K.; van den Berg, A.; ten Elshof, J. E.; Blank, D. H. A. Controlling the Transport of Cations through Permselective Mesoporous Alumina Layers by Manipulation of Electric Field and Ionic Strength. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *273* (1), 331–338.
- (31) Bluhm, E. A.; Bauer, E.; Chamberlin, R. M.; Abney, K. D.; Young, J. S.; Jarvinen, G. D. Surface Effects on Cation Transport across Porous Alumina Membranes. *Langmuir* **1999**, *15* (25), 8668–8672.

Capítulo 7: Discusión y conclusiones generales

7.1. Discusión y conclusiones

Este trabajo se centró, en el diseño y obtención de un método de síntesis de clusters/nanopartículas metálicas a partir del uso de una matriz nanoporosa de alúmina, a su vez se demostró que este método permite obtener las características estructurales necesarias para aplicaciones en biosensores y catálisis.

Se desarrolló un método sumamente sencillo que consiste en la síntesis de la matriz nanoporosa a partir del anodizado de aluminio junto con una etapa posterior, en la cual se deja el sistema Al/Al₂O₃ en contacto con el electrolito ácido, disminuyendo el espesor de la barrera de óxido que se encuentra en contacto con el aluminio. Finalmente, por electrodeposición pulsada se obtienen las partículas metálicas de pequeño tamaño, libres de agentes estabilizantes y en un entorno confinado.

Este es un método general que permite la síntesis de partículas de diferentes metales. Se mostró la posibilidad de obtener cluster grandes/nanopartículas de Au y Pt, así como también de clusters pequeños de Ni en estado elemental. Una ventaja importante de esta estrategia es que permite la síntesis de clusters de metales menos nobles que son difíciles de obtener debido a su tendencia a oxidarse y a agregarse a partir de interacciones magnéticas, si estos presentan este tipo de propiedades.^{1,2}

Las partículas generadas a partir de esta estrategia de síntesis presentan tamaños muy pequeños (siendo nanopartículas o clusters) y superficies activas, sin agentes protectores, con una excelente respuesta a los procesos de transferencia de carga, como fue ejemplificado con la respuesta electroquímica obtenida para diferentes especies, en particular, ferrocianuro. A su vez, este método permitió tener partículas confinadas en un entorno de escala nanométrica y con un control sobre el tamaño y la estructura obtenida que depende de las condiciones de síntesis empleadas. Estas características cumplen un rol fundamental en sus propiedades y funciones.

La caracterización de las nanoestructuras generadas dentro de la matriz de alúmina porosa presentó algunos inconvenientes que pudieron resolverse satisfactoriamente. El hecho de tener las partículas confinadas en el fondo de los poros a 1 μm de profundidad y teniendo una concentración relativamente pequeña de éstas, requiere de técnicas que presenten una gran sensibilidad para la caracterización *in situ*. Mientras que el pequeño tamaño de las partículas y la gran concentración de sal (aluminato de sodio) que queda luego de la

disolución del óxido de aluminio, impide aplicar de manera sencilla técnicas como TEM o HR-TEM, utilizadas comúnmente para el estudio de nanopartículas más grandes. Así, su caracterización resultó ser un desafío que requirió de la utilización de un conjunto de técnicas, que involucraron espectroscopías de absorción, microscopías y técnicas electroquímicas, que presentaron la sensibilidad y resolución necesaria, así como también del diseño de preparación de muestra para que pudieran ser llevadas a cabo.

Se mostró que el comportamiento de clusters atómicos pequeños (caso del Ni), caracterizados por un diámetro menor a 1 nm y señal fluorescente, y clusters grandes/NPs muy chicas (caso del Au), caracterizados por un diámetro menor a 3 nm y la pérdida de señal del plasmón superficial, es muy diferente. En base a los resultados presentados en esta tesis se propone que, dependiendo del sobrepotencial necesario para la electrodeposición de las especies en solución, es posible, o no, encontrar condiciones de síntesis donde se llegue a un control cinético que permita estabilizar mínimos locales de energía. En el caso del Ni, donde es necesario sobrepotenciales altos para su reducción y generación de partículas, se forman clusters, mientras que el Au, que requiere sobrepotenciales menores, genera directamente nanopartículas en las condiciones ensayadas.

Los resultados reportados en bibliografía para clusters metálicos y obtenidos en este trabajo, sugieren una revisión de la teoría de nucleación y crecimiento clásica. En base a ésta, los núcleos formados en un primer momento son estables solamente a partir de un tamaño determinado, llamado radio crítico. Agrupaciones de átomos que tengan un tamaño menor al radio crítico, se disolverán espontáneamente. Por encima de ese tamaño, continúan creciendo para reducir su energía superficial por diversos mecanismos, como la autocatálisis, Ostwald, etc. hasta que el crecimiento se detiene por la acción de ligandos protectores o la estructura del molde que se utiliza para la síntesis.³ Esta teoría se basa en considerar que se puede tratar a los núcleos que se forman como si se comportaran como una fase con propiedades macroscópicas. Por otro lado, se ha mostrado previamente⁴⁻⁷ y en este trabajo, que partículas con tamaños menores a 1 nm pueden ser muy estables, incluso sin ningún agente estabilizante. Éstas muestran un efecto muy marcado de confinamiento cuántico haciendo que sus propiedades físicas varíen en forma discreta. Así, no podrán ser explicados en el marco de la termodinámica clásica, como ocurre con la teoría de nucleación y crecimiento, y consideraciones respecto a configuraciones electrónicas y geométricas

particularmente estables, son necesarias. Así, estos clusters no se redisuelven una vez formados, contrariamente a una de las mayores suposiciones de esta teoría.^{3,8}

Se propone que en el caso del Au se forma una partícula por poro, mientras que varios clusters por poro se obtienen para el Ni. Estos clusters pueden aglomerarse, formando nanopartículas; luego, al continuar el proceso de electrodeposición, nuevos clusters se generan permitiendo obtener nanobarras de Ni con un muy buen control en la altura a partir de la corriente y del número de ciclos aplicados. En este sentido, este método permite tener un control en la relación altura/diámetro (relación de aspecto) y lograr la síntesis de barras monodispersas.

Las partículas confinadas en una matriz porosa actúan como un arreglo de nanoelectrodos como se mostró en el Capítulo 3 y 4. Para lograr una descripción completa de la respuesta electroquímica de estos sistemas, se desarrolló un modelo numérico para simular su comportamiento, el cual permite analizar los diferentes resultados obtenidos por voltametría cíclica dependiendo de las características geométricas del sistema y la velocidad de barrido.

Se utilizó un modelo basado en elementos finitos para resolver el sistema de ecuaciones en derivadas parciales que describe a la celda electroquímica, en una geometría simplificada que reduce un arreglo tridimensional a un problema 2D, donde los electrodos vecinos más cercanos son tenidos en cuenta en los procesos de difusión y transferencia electrónica, llevados a cabo por la especie electroactiva.

El modelo desarrollado representa una mejora en el tratamiento del transporte de masa por difusión en arreglos de micro y nanoelectrodos donde se verifica un control difusional.⁹⁻¹² Éste puede describir y predecir cuantitativamente la corriente resultante en los diferentes casos de difusión posibles, independientemente de la escala de tiempo del experimento. Así, se logró analizar las respuestas obtenidas para nuestro arreglo de electrodos, el cual presentaba condiciones que no eran abordadas por los modelos existentes en literatura. A su vez, el modelo desarrollado tiene un importante valor predictivo y puede usarse en la fabricación de arreglos experimentales, de modo de realizar el diseño de los mismos en función de las condiciones experimentales en que serán empleados.

En particular, su aplicación es muy adecuada cuando los electrodos alcanzan las dimensiones nanométricas en sistemas construidos por aproximaciones *bottom-up*, donde la

relación entre la distancia interelectrodo y el radio del electrodo es más difícil de controlar. Este modelo permite trabajar con electrodos de tamaño nanométricos (arreglos C, D y E) donde el solapamiento de los campos difusionales puede ser importante, incluso a distancias interelectrodo mayores a 12 veces el radio del electrodo, una distancia que en general se propone como regla sencilla para observar un comportamiento de electrodos independientes.¹³ A su vez, vale la pena mencionar que el modelo trabaja con las dimensiones reales sin necesidad de usar números adimensionales, permitiendo una evaluación directa de los resultados.

Por otro lado, en el Capítulo 5, las nanopartículas de oro electrogeneradas en los nanoporos de alúmina con un tamaño controlado de 2nm se modificaron con aptámeros para la detección, libre de marcadores, de moléculas pequeñas con relevancia biológica por espectroscopía de impedancia.

Los resultados mostraron que el uso de una superficie conductora confinada dentro de un entorno aislante puede ser muy sensible a cambios conformacionales de aptámeros, introduciendo un nuevo enfoque para la detección de moléculas pequeñas ejemplificada en este trabajo por la detección directa y selectiva de adenosina monofosfato en la escala nanomolar. Estas superficies confinadas son muy sensibles a cambios en la carga y la conformación, demostrando las ventajas de controlar la arquitectura en la escala nanométrica para obtener una sensibilidad adecuada.

Se presentaron diferentes estrategias para la inmovilización del aptámero que una AMP y su efecto en el reconocimiento molecular. Los resultados muestran que tanto la densidad como la orientación de las hebras inmovilizadas juegan un rol clave en la sensibilidad del proceso de reconocimiento. Una densidad alta de los elementos de reconocimiento y una orientación paralela a la superficie de éstos, exponiendo sus cargas negativas sobre toda la superficie, introduce una resistencia a la transferencia electrónica de fondo muy alta, como se mostró en el caso de la inmovilización del disulfuro (RS-SDNA) y del fosforotioato, respectivamente. Esto genera que el evento de reconocimiento sea indetectable, debido a que los aptámeros no pueden cambiar de conformación cuando la densidad de hebras es muy alta, o debido a que los cambios que se producen son pequeños. De esta manera, el método de co-inmovilización, RS+SDNA, es el método más efectivo para modificar las AuNPs de 2nm de diámetro confinadas en la matriz porosa; contrariamente a los métodos elegidos para modificar superficies de oro planas¹⁴ o nanopartículas dispersas en solución.¹⁵

Estos resultados demuestran la relevancia de tener control de las nanoestructuras para obtener dispositivos funcionales.

Otro punto importante es el desafío que presenta generar sensores libres de marcadores para la detección directa de moléculas pequeñas.¹⁶ Uno de los principales motivos está asociado a la pequeña fracción de superficie de oro macizo que se ve afectada por el cambio de conformación que genera el evento de reconocimiento de estas moléculas pequeñas; perdiendo gran sensibilidad. La metodología que se utilizó en este trabajo, consistente en generar AuNPs confinadas en los poros de alúmina, supera este problema debido a que las dimensiones del cambio producido por el reconocimiento están en la misma escala que el entorno, generando una perturbación importante en el proceso de transferencia electrónica. Esto permite la detección y cuantificación de moléculas pequeñas, representadas aquí por el AMP, con gran sensibilidad y en la escala nanomolar.

Es interesante mostrar que gran parte de la sensibilidad provino también del uso de una sonda con una carga negativa alta (ferrocianuro). En el caso de usar una sonda neutra, como lo es el ferrocenometanol, también es posible notar cambios, aunque estos no son tan importantes, lo que indica que el uso de una interface en la escala molecular puede ser sensible a los cambios estructurales, pero la repulsión debida a la distribución de las cargas negativas es el efecto más fuerte en la respuesta electroquímica observada.

Estos ensayos también demostraron una alta selectividad frente a analitos con estructuras muy similares debido al uso de aptámeros que reconocen con alta selectividad a su objetivo (*target*). Por lo tanto, se reafirma que estos son herramientas muy útiles como elementos de reconocimiento en la construcción de sensores.

Por último, fue posible no sólo detectar moléculas pequeñas, sino que se utilizó el sistema obtenido para el reconocimiento de la hebra complementaria como una prueba de concepto para estimar la sensibilidad del sistema como genosensor. Esta hebra de 27 oligonucleótidos presenta un tamaño cercano a los micro-RNA, sistemas que en los últimos años han tomado un impulso importante como biomarcadores de varias enfermedades.¹⁷ Este nanosistema formado por AuNPs en nanoporos, que puede considerarse como un dispositivo preliminar, permitió trabajar con volúmenes de muestra de 10µl y cuantificar concentraciones del orden de 0.1nM.

El uso de estas plataformas generadas a partir de nanoingeniería puede extenderse a otros analitos de interés ya que no requiere ninguna característica especial del aptámero. Además, seleccionando el tamaño del poro es posible evitar la adsorción en el electrodo de especies presentes en la matriz donde se encuentre el analito, como otras proteínas. En cuanto a la estabilidad del sistema en el tiempo es necesario un estudio detallado a futuro. Las partículas son estables en el tiempo (se realizaron medidas de caracterización estructural del sistema con 3 meses de diferencia sin observar diferencias). Sin embargo, se observa una pérdida de conducción a lo largo del tiempo al almacenar el sistema en condiciones ambiente (sin control de temperatura y humedad). En este sentido, nuevas estrategias de almacenamiento se están analizando.

Por último, en el Capítulo 6, se evaluaron las propiedades catalíticas de los clusters metálicos sintetizados. Para ello se utilizaron como sistemas de referencia dos reacciones redox cuya cinética pudiera seguirse de forma sencilla y robusta. Se pudo concluir que todos los clusters metálicos (Au, Ni y Pt) exhibieron muy buena actividad catalítica incluso con concentraciones de los mismos en el orden de nM, para las reacciones de óxido-reducción ensayadas.

Podemos concluir, además, que este método permite obtener partículas que son estables dentro de los poros y que estos presentan las ventajas de los catalizadores en fase heterogénea en cuanto a su reutilización. Sin embargo, existen dos limitaciones para su aplicación de forma directa. Por un lado, si bien la actividad catalítica de los clusters es realmente muy buena, la concentración de éstos dentro de la matriz porosa es baja, por lo que, se buscará optimizar la carga del catalizador dentro del soporte. Por otro lado, la alúmina se disuelve a pH menores de 3 y mayores a 9, lo que no representa ningún problema para la mayoría de las aplicaciones biomédicas, pero debido a que muchas reacciones de interés presentan mejores performance en condiciones más extremas a estos límites, puede ser interesante estudiar a futuro la posibilidad de realizar modificaciones superficiales de la alúmina que permitan obtener sistemas estables a estos pH.

En particular, resulta muy atractiva la capacidad catalítica obtenida con los clusters pequeños de Ni, siendo uno de los primeros trabajos que muestran que éstos pueden tener performance comparables a los reportados para nanopartículas de oro. Estudios más detallados de las propiedades catalíticas del sistema de Ni se llevarán a cabo a futuro, buscando extender el método a otros metales que presentan características similares, como

Cu, y a reacciones redox de interés. En este sentido, se espera que utilizando este método puedan obtenerse también clusters de Cu. Medidas preliminares indican que es posible generar clusters pequeños de Cu que no se encuentran oxidados. Se buscará a futuro obtener una caracterización detallada de estas estructuras y el estudio de su aplicación en catálisis.

A su vez, queda pendiente como trabajo a futuro, el estudio de las propiedades magnéticas de los clusters de Ni y su dependencia con el tamaño y tipo de estructura generada.

Referencias

- (1) Knecht, M. R.; Garcia-Martinez, J. C.; Crooks, R. M. Synthesis, Characterization, and Magnetic Properties of Dendrimer-Encapsulated Nickel Nanoparticles Containing <150 Atoms. *Chem. Mater.* **2006**, *18* (21), 5039–5044.
- (2) Calderón, M. F.; Zelaya, E.; Benitez, G. A.; Schilardi, P. L.; Creus, A. H.; Orive, A. G.; Salvarezza, R. C.; Ibañez, F. J. New Findings for the Composition and Structure of Ni Nanoparticles Protected with Organomeraptan Molecules. *Langmuir* **2013**, *29* (15), 4670–4678.
- (3) Finney, E. E.; Finke, R. G. Nanocluster Nucleation and Growth Kinetic and Mechanistic Studies: A Review Emphasizing Transition-Metal Nanoclusters. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *317* (2), 351–374.
- (4) Heaven, M. W.; Dass, A.; White, P. S.; Holt, K. M.; Murray, R. W. Crystal Structure of the Gold Nanoparticle $[N(C_8H_{17})_4][Au_{25}(SCH_2CH_2Ph)_{18}]$. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (12), 3754–3755.
- (5) Huseyinova, S.; Blanco, J.; Requejo, F. G.; Ramallo-López, J. M.; Blanco, M. C.; Buceta, D.; López-Quintela, M. A. Synthesis of Highly Stable Surfactant-Free Cu_5 Clusters in Water. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120* (29), 15902–15908.
- (6) Attia, Y. A.; Buceta, D.; Blanco-Varela, C.; Mohamed, M. B.; Barone, G.; López-Quintela, M. A. Structure-Directing and High-Efficiency Photocatalytic Hydrogen Production by Ag Clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (4), 1182–1185.
- (7) Lu, Y.; Chen, W. Sub-Nanometre Sized Metal Clusters: From Synthetic Challenges to the Unique Property Discoveries. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (9), 3594–3623.
- (8) Piñeiro, Y.; Buceta, D.; Calvo, J.; Huseyinova, S.; Cuerva, M.; Pérez, Á.; Domínguez, B.; López-Quintela, M. A. Large Stability and High Catalytic Activities of Sub-Nm Metal (0) Clusters: Implications into the Nucleation and Growth Theory. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *449*, 279–285.
- (9) Sun, Y.; Liu, Y.; Liang, Z.; Xiong, L.; Wang, A.; Chen, S. On the Applicability of Conventional Voltammetric Theory to Nanoscale Electrochemical Interfaces. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (22), 9878–9883.
- (10) Liu, Y.; He, R.; Zhang, Q.; Chen, S. Theory of Electrochemistry for Nanometer-Sized Disk Electrodes. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (24), 10812–10822.
- (11) Smith, C. P.; White, H. S. Theory of the Voltammetric Response of Electrodes of Submicron Dimensions. Violation of Electroneutrality in the Presence of Excess Supporting Electrolyte.

Anal. Chem. **1993**, *65* (23), 3343–3353.

- (12) Dickinson, E. J. F.; Compton, R. G. Diffuse Double Layer at Nanoelectrodes. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (41), 17585–17589.
- (13) Lee, H. J.; Beriet, C.; Ferrigno, R.; Girault, H. H. Cyclic Voltammetry at a Regular Microdisc Electrode Array. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *502* (1–2), 138–145.
- (14) Zhang, X.; Yadavalli, V. K. Surface Immobilization of DNA Aptamers for Biosensing and Protein Interaction Analysis. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26* (7), 3142–3147.
- (15) Zhou, W.; Wang, F.; Ding, J.; Liu, J. Tandem Phosphorothioate Modifications for DNA Adsorption Strength and Polarity Control on Gold Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (17), 14795–14800.
- (16) Willner, I.; Zayats, M. Electronic Aptamer-Based Sensors. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46* (34), 6408–6418.
- (17) Zen, K.; Zhang, C.-Y. Circulating MicroRNAs: A Novel Class of Biomarkers to Diagnose and Monitor Human Cancers. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32* (2), 326–348.

Agradecimientos

A la Universidad de Buenos Aires, por mi formación.

A las instituciones que financiaron este trabajo de tesis: CONICET, UBA, MinCyT, BEC.AR, LNLS

A mis directores de tesis, Fernando y Graciela, quienes me acompañaron desde que comencé mi recorrido por la Química; por ser mis mentores, por enseñarme, guiarme y estar SIEMPRE presentes con el aporte de sus conocimientos y experiencia; poniéndose el guardapolvo y sentándose a mi lado para hacer alguna medida, hasta charlas de café que incluyeron incontables consejos sobre la vida científica.

A los personas que aportaron a esta tesis su conocimiento y experiencia en distintas áreas. Gracias por las discusiones, las medidas y el interés por que aprenda y salgan las cosas adelante:

- A Martin Mizrahi y Felix Requejo*
- A Helena Ceretti, Silvana Ramirez y Javier Monserrat*
- A David Buceta, Miguel Cuevas y Arturo Lopez-Quintela*

A Rodrigo Gillardoni por su colaboración en la extensión de la validación del modelo numérico.

Al DQIAQF – INQUIMAE por brindarme el lugar de trabajo y a la gente que forma parte de él por darme una mano en el día a día. En especial a:

- A Santi Herrera y Claudia Marchi por su contribución en las medidas de AFM y SEM.*
- A Adriana, Alberto y Pedro por su buena onda de todos los días*
- A Alejandra y Claudia por la ayuda con los papeles y trámites*

A Lore, por su amistad, por su compañía en todo momento y sus consejos, por los mates y los almuerzos al sol.

A Dofi, por transmitirme su entusiasmo, por toda su ayuda y por estar.

A la gente del labo (de todos los tiempos): Graciela P., Diego, Jorge, Lore, Sofi, Ley, Néstor, Nico, Nati, Nacho, Ignacio, por su colaboración en todo momento y por hacer disfrutables los días.

A mis amigos de la facu: Ley, Lean, Silvio, Marce, Diego, Yami y Santi, por acompañarme compartiendo charlas y buenos momentos. Gracias Santi y Yami por su ayuda sobre el final que hizo posible que llegara con la entrega.

A los chicos de NANOMAG: Iria, Blanca, Darío, Zule, Shahana, Ángel, Pau, Miguel y David, que hicieron de mi estadía en España uno de mis mejores recuerdos.

A mi mama, por ser mi sostén y un ejemplo de que con esfuerzo y ganas se llega.

A mi hermano, por ayudarme con el diseño gráfico y sostenerme con su buena onda.

A Kevin, por su apoyo incondicional.

Y a todos los que directa e indirectamente me acompañaron en el proceso de construcción de esta tesis.