

Curso 2012/13
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/30
I.S.B.N.: 978-84-15939-00-9

ALEJANDRO GONZÁLEZ ORIVE

**Electrogenación de películas ultradelgadas
de melanina: nanoestructura, electrocatálisis,
conductividad, magnetismo y fotorrespuesta**

Directores

**ALBERTO HERNÁNDEZ CREUS
PILAR CARRO REGLERO**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

Agradecimientos

Por fin se terminó... He de admitir que durante un tiempo creí no ver la luz al final del túnel, lo que no está exento de cierta ironía... Pero aquí está. Han sido unos cuantos años de intenso y, sin embargo, apasionante trabajo pero también de duro aprendizaje que hoy, al fin, han dado su fruto. Ahora se inicia una nueva etapa, veamos dónde nos lleva...

Quisiera empezar por agradecer el entusiasmo, la dedicación y el tiempo con el que mis directores, Alberto Hernández Creus y Pilar Carro, han afrontado las distintas fases de mi formación. Siempre fui consciente de su apoyo y disponibilidad. Espero haberles correspondido en la misma medida. Gracias a su mediación, se me concedió la oportunidad única de formarme junto a investigadores de más que reconocido prestigio como Luis Vázquez y Roberto C. Salvarezza. Esta tesis, en la medida en que su implicación en la misma fue significativa desde el primer momento, también les pertenece.

No quisiera olvidarme de todos aquellos que he tenido la oportunidad de conocer y tratar durante estos años en el Departamento de Química Física. Con mención especial para los becarios. De aquellos que me antecedieron como Gabriel Planes, Francisco Armijo, el *italiano* Gonzalo García, Belén Meneses y Pilar Díaz. Y, cómo no, de mi antigua compañera de laboratorio, Yurima Gimeno, que recibió el penoso encargo de enseñarme cómo trabajar en un laboratorio e hizo gala de una paciencia infinita para iniciarme en el manejo de los microscopios. De los que empezaron conmigo, Olmedo Guillén y Mari Carmen Goya. Y de los que vinieron después: Jacob Quintana, el *Magíster* Juan Carlos Calderón, Thais Aranha de Barros y Jonathan Flórez. De los que vinieron del otro lado del océano: Mauricio Lucero, Andrea Riquelme, América Marín, Fabiola Isaacs, Luis Miguel Rivera y Natalia Runga. Y de tantos otros. A todos ellos, por los buenos momentos vividos, gracias...

A los miembros del INIFTA, La Plata, por toda la ayuda prestada durante mi estancia en Argentina, especialmente a Patricia Schilardi, Doris Grumelli y Carolina Díaz. También a María Elena Vela, Carolina Vericat, Bárbara Blum, Fede Castez, Mariano Fonticelli y Francisco Ibáñez y a los chicos: Coni, Matías, Agustín, Emi, Eva, Julio, Antonieta, etc. Todos ellos hicieron que mi estancia allí fuese de lo más llevadera.

Igualmente a los miembros del grupo de investigación de María Jesús Aguirre de la USACH de Santiago de Chile por su calurosa acogida durante mi estadía en su laboratorio.

Vayan mi agradecimiento y reconocimiento más sentidos a mis familiares y amigos. Por todo el tiempo que sin duda les he robado, por el apoyo que siempre me han mostrado y por la paciencia que han sabido tener conmigo. No lo volveré a hacer...

Muy especialmente me gustaría destacar a Diana, por su perenne buen humor, afecto, colaboración y comprensión todo este tiempo. Ella ha sido el verdadero pilar en el que apoyarme en los malos momentos. Además, ha colaborado activamente en la edición de la presente tesis. Sin ella, nada de esto hubiera sido posible... ¡Gracias!

También me gustaría agradecer a CajaCanarias y al Ministerio de Educación y Ciencia por la financiación concedida en forma de beca doctoral y de la beca FPU, respectivamente, para la realización de esta tesis doctoral y las estancias de investigación en Santiago de Chile y La Plata.

Por último, quisiera añadir que, en el pasado, recibí el testigo y la responsabilidad de continuar la senda de la investigación con melanina, su melanina, de manos de la Dra. Pilar Díaz. Ella confiaba en que fuera acreedor de tal distinción. Ahora, pasado el tiempo, soy yo el que está en disposición de cederlo a Miriam Rodríguez. Estoy convencido de que la melanina queda en buenas manos...

Alejandro González Orive

Junio 2013

*A mis padres y
a mis abuelos*

A Diana

ÍNDICE

ÍNDICE

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	3
I.1. Estructura macromolecular	8
I.2. Propiedades optoelectrónicas	13
I.3. Propiedades eléctricas	17
I.4. Comportamiento rédox, radicales libres y paramagnetismo	20
I.5. Fotoprotección y propiedades antioxidantes	22
I.6. Contenido en iones metálicos	24
I.7. Preparación de películas de melanina	27
I.8. Bibliografía	28

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	37
II.1. Reactivos y disoluciones	37
II.2. Técnicas Experimentales	38
II.2.1. Microscopías de Barrido de Sonda	38
II.2.1.1. Microscopía de Efecto Túnel	39
II.2.1.1.1. Fundamentos teóricos del STM: Teoría de la microscopía de efecto túnel	39
II.2.1.1.2. Equipamiento	42
II.2.1.1.3. Modos de operación en STM	44
II.2.1.2. Microscopía de Fuerzas Atómicas	46
II.2.1.2.1. Equipamiento	48
II.2.1.2.2. Modos de operación en AFM	50
II.2.1.3. Espectroscopias SPM	54
II.2.1.4. Microscopía de Fuerzas Magnéticas (MFM)	58
II.2.2. Microscopía electrónica	62
II.2.2.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM) con microanálisis de rayos X (EDX)	62
II.2.2.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	64
II.2.3. Métodos electroquímicos	65
II.2.3.1. Modos de Operación	65
II.2.3.1.1. Voltametría Cíclica	65
II.2.3.2. Equipamiento	67
II.2.3.2.1. Potenciostato	67
II.2.3.2.2. Celdas y electrodos	68
II.2.3.3. Preparación electroquímica de películas de melanina	70

II.2.3.4. Preparación electroquímica de puntas de Pt-Ir para STM	71
II.2.4. Medidas espectroscópicas	73
II.2.4.1. Espectroscopía Auger (AES)	73
II.2.4.2. Espectroscopía de fotoelectrones generados por rayos X	76
II.2.4.3. Espectroscopía de absorción de Rayos-X (XAS): XANES y EXAFS	80
II.2.4.4. Dispersión de Rayos X a Ángulos Bajos (SAXS)	83
II.2.4.5. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	84
II.3. Sustratos	84
II.3.1. Au	84
II.3.2. Grafito Pirolíticamente Altamente Orientado (HOPG)	87
II.3.3. Nanopartículas de Au (AuNPs)	88
II.3.4. AuNPs sobre HOPG	90
II.4. Teoría del Funcional de la Densidad (DFT)	92
II.5. Bibliografía	94

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

99

III.1. Bibliografía

101

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

105

IV.1. SÍNTESIS ELECTROQUÍMICA DE PELÍCULAS DE MELANINA SOBRE Au

105

IV.1.1. Antecedentes

105

IV.1.2. Preparación y caracterización fisicoquímica de películas de melanina sobre Au(111)

108

IV.1.2.1. Caracterización por STM y AFM de películas de melanina sobre Au(111)

113

IV.1.2.2. Caracterización por AES y XPS de películas de melanina sobre Au(111)

125

IV.1.2.3. Caracterización por XANES de películas de melanina sobre Au(111)

129

IV.1.2.4. Caracterización por MFM de películas de melanina sobre Au(111)

133

IV.1.2.5. Caracterización electroquímica de películas de melanina sobre Au(111)

142

IV.1.2.6. Propiedades electrocatalíticas de películas de melanina sobre Au(111)

156

IV.1.2.7. Tratamiento de películas de melanina sobre Au(111) con EDTANa ₂	170
IV.1.3. Conclusiones	184
IV.1.4. Bibliografía	186
IV.2. ADSORCIÓN Y CONDUCTANCIA MOLECULAR DE PELÍCULAS DE MELANINA SOBRE Au	193
IV.2.1. Antecedentes	193
IV.2.2. Caracterización de la adsorción y conductancia de moléculas de melanina sobre Au(111)	197
IV.2.2.1 Caracterización por STM de películas de melanina sobre Au(111)	198
IV.2.2.2 Estudio teórico de la adsorción de melanina sobre Au(111)	203
IV.2.2.3 Caracterización electrónica de películas de melanina sobre Au(111)	207
IV.2.2.4 Caracterización de la fotorrespuesta de películas de eumelanina sobre Au(111), tras irradiación con luz blanca, vía STM	210
IV.2.3. Conclusiones	218
IV.2.4. Bibliografía	218
IV.3. PREPARACIÓN ELECTROQUÍMICA DE PELÍCULAS DE MELANINA-HIERRO SOBRE HOPG	223
IV.3.1. Antecedentes	223
IV.3.2. Preparación y caracterización fisicoquímica de películas de melanina sobre HOPG	225
IV.3.2.1. Caracterización de sitios de Fe en la melanina	249
IV.3.2.2. Propiedades magnéticas de las películas de melanina sobre HOPG	253
IV.3.2.3. Propiedades electrocatalíticas de las películas de melanina sobre HOPG	266
IV.3.3. Conclusiones	283
IV.3.4. Bibliografía	284
IV.4. MODIFICACIÓN ELECTROQUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE Au CON EL SISTEMA HIERRO-MELANINA	291
IV.4.1. Antecedentes	291
IV.4.2. Preparación y liberación por medios electroquímicos de AuNPs modificadas con melanina	293

IV.4.2.1. Modificación de AuNPs con el sistema melanina-hierro	303
IV.4.2.2. Actividad electrocatalítica de las AuNPs modificadas con melanina	313
IV.4.2.3. Modificación de TAuNPs con el sistema melanina-hierro y posterior liberación al medio electrolítico	318
IV.4.3. Conclusiones	329
IV.4.4. Bibliografía	330

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

V.1. Conclusiones	337
V.1.1 Au(111)	337
V.1.2 HOPG	342
V.1.3. AuNPs adsorbidas HOPG	345
V.2. Perspectivas Futuras	347
V.3. Bibliografía	350

CAPÍTULO VI

PUBLICACIONES

APÉNDICE

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

CAPÍTULO I

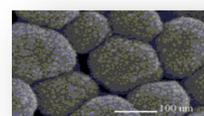
Introducción

I. INTRODUCCIÓN

Entre la amplia variedad de los biopolímeros presentes en la naturaleza, son pocos los que, tal y como sucede en el caso de las melaninas, pueden ofrecer implicaciones interdisciplinarias tan profundas y fascinantes que engloben a distintas ramas de la ciencia como son la física, la química, la biología y la medicina. Las razones que permiten justificar esta afirmación descansan sobre el papel fundamental que estos pigmentos desarrollan en el sistema pigmentario humano y también, cómo no, sobre la importancia socio-económica y relevancia clínica de estos biopolímeros en cuanto a su implicación en desordenes pigmentarios entre los que destaca el melanoma, el más agresivo entre los cánceres de piel.¹

En general, bajo el nombre de melaninas se designa a una de las clases más extensa de pigmentos naturales dentro del reino animal.² Las melaninas constituyen pues una importante clase de biopolímeros presentes de forma ubicua en los organismos vivos. Estos polímeros exhiben propiedades físicas y químicas muy interesantes que están estrechamente relacionadas con su actividad biológica. Así, en los animales, unas células pigmentarias denominadas melanocitos sintetizan las melaninas y las almacenan en orgánulos denominados melanosomas. Están representadas en la piel, pelo, ojos, oído interno y sistema nervioso central de los animales, en las plumas de los pájaros e, incluso, en algunos hongos. En el pelo y las plumas,³ las melaninas cumplen una función fundamental de pigmentación y de fotoprotección evitando el deterioro de los mismos y contribuyendo a una labor ornamental. En la piel, concretamente en la epidermis,⁴ también pigmentan y protegen de la radiación UV, evitando así mutaciones en el ADN celular que conduzcan a fenómenos neoplásicos y carcinogénicos.

En los seres humanos, la melanina presente en el cerebro medio forma parte de la llamada *Substantia nigra* donde combinada con moléculas de origen peptídico e iones metálicos forma la neuromelanina, cuya función, sin estar completamente definida, parece asociada a la actividad dopaminérgica.⁵ La función de la melanina en los ojos es la de evitar que la luz incida con alta

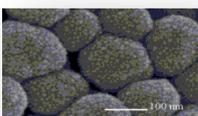


intensidad en los tejidos fotosensibles con el fin de aumentar el contraste en las imágenes que se forman tras la señal luminosa en la retina.⁶ En el oído interno desempeña un papel todavía poco conocido pero aparentemente relacionado con la atenuación de las ondas sonoras.⁷

Una de las funciones más conocidas de las melaninas es, indudablemente, la de la fotoprotección frente a la radiación UV, lo que se conoce como tampón frente al estrés fotoquímico, toda vez que la formación de melanina es rápidamente inducida por la exposición a radiación UV de los melanocitos. Como se ha dicho, en la piel de los animales, la melanina pigmenta y, a la vez, protege de la radiación UV, evitando así mutaciones en el ADN celular, por medio de reacciones fotoquímicas inducidas por radiación UV, que pudieran ocasionar conformaciones anómalas que impidan la correcta expresión del ADN.⁸ La melanina es capaz de absorber fotones y disipar la energía absorbida como calor, sonido y, probablemente, otras formas de relajación no radiante.⁹

Además, las melaninas desarrollan algunas otras funciones importantes como por ejemplo, la de amortiguar la actividad de especies oxidantes tales como peróxidos y superóxidos, así como de diversos iones metálicos o de radicales libres.⁴ La melanina es capaz de atrapar grandes cantidades de cationes metálicos tales como Ca, Mg, Cu, Al, Zn y Fe.¹⁰ De hecho, estudios recientes demuestran que, en la neuromelanina (NM) presente en la *Substantia Nigra* del cerebro medio humano, el hierro aparece comúnmente asociado a este pigmento.¹¹ Así, en el cerebro de pacientes con Parkinson, la muerte neuronal está acompañada por elevados niveles de hierro y una pérdida de NM.¹²

En cuanto a los antecedentes históricos concernientes a la investigación en melaninas hay que decir que la pigmentación ha atraído la curiosidad y la atención del ser humano desde el principio de los tiempos. De hecho el estudio de la pigmentación comenzó hace no menos de cuatrocientos años con el primer estudio experimental descrito por Santorio Santorius (1561-1636) que atribuyó la tonalidad de las pieles de color a la presencia de bilis. A principio del siglo dieciocho los estudios que pretendían encontrar bilis en la piel habían



fallado repetidamente y, paralelamente, Alexis Littre (1658-1726) publicó la presencia de un pigmento insoluble de color negro adherido a la membrana reticular. Si bien ya se había descubierto la melanina, fueron necesarios avances posteriores tanto en técnicas analíticas como de síntesis en el campo de la química para poder avanzar en el conocimiento del origen, la síntesis y las propiedades químicas de las melaninas.

Posteriormente, Otto von Fürth y Hugo Schneider propusieron que las melaninas (nombre derivado de la palabra griega *melas*, negro) eran el resultado de la interacción entre una oxidasa intercelular con grupos aromáticos en ciertas proteínas.¹³ En este sentido, Bruno Bloch, inspirado por esta hipótesis, descubrió que determinadas células llevan a cabo reacciones catalíticas mediante las cuales oxidan dopa a melanina. Como consecuencia, denominó a la enzima responsable como dopa-oxidasa. En 1895, Emile Bourquelot y George Bertrand encontraron tirosinas en hongos y descubrieron que la tirosinasa convertía a la tirosina en un pigmento negro similar a la melanina de mamíferos.¹⁴

Aún más importante, en 1927 Henry Stanley Raper pudo aislar dopa como producto primario de la reacción de la enzima tirosinasa con la tirosina y, por medio de cuidadosos estudios químicos, pudo establecer los primeros pasos químicos para la oxidación enzimática de tirosina a melanina.¹⁵ De hecho, fue capaz de aislar derivados del 5,6-dihidroxiindol (DHI) y del 5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA), Figura I.1a-b, respectivamente. Estas dos especies indólicas son consideradas en la actualidad inequívocamente como las unidades fundamentales constituyentes del pigmento oscuro denominado eumelanina.

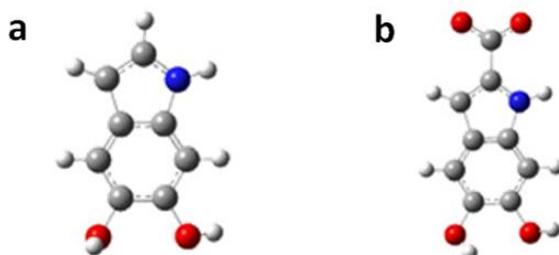
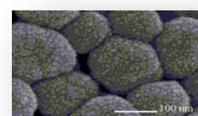


Figura I.1. DHI (a). DHICA (b). Átomos de N en azul, de C en gris, O en rojo e H, blanco.

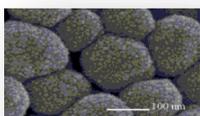


En 1948 Howard Mason extendió el esquema molecular de Raper e introdujo un modelo polimérico para describir a las melaninas que implicaba la autocondensación de quinonas indólicas.¹⁶ Durante la década de los sesenta los estudios realizados sobre varios pigmentos naturales dieron lugar a una clasificación de las melaninas en dos clases bien diferenciadas: eumelaninas (*eu*, prefijo griego para bueno) y feomelaninas (*phaeo*, prefijo griego para oscuro). En 1966 Prota puso de manifiesto una importante diferencia química entre ambas clases al demostrar que las feomelaninas son consecuencia de la reacción específica de cisteína con las quinonas producidas en la oxidación de tirosina. Tal reacción no tiene lugar en la síntesis de eumelanina.¹⁷

En los años posteriores se llevaron a cabo importantes avances en diferentes aproximaciones cuantitativas basadas en la degradación oxidativa y en la hidrólisis reductiva de estos pigmentos naturales que arrojaron luz sobre aspectos específicos relacionados con la estructura molecular de las melaninas.¹⁸ Más adelante retomaremos estas cuestiones en mayor profundidad.

De acuerdo a lo expuesto, se puede concluir que el grado y la naturaleza de la pigmentación presente en la piel, pelo y ojos en los seres humanos están condicionados en cierta medida por la habilidad de determinadas células especializadas de sintetizar el pigmento de color negro denominado eumelanina y el de color amarillo rojizo que recibe el nombre de feomelanina. Como se ha indicado anteriormente se trata de polímeros heterogéneos compuestos principalmente por dihidroxiindoles provenientes de la polimerización oxidativa de la tirosina o dopa.⁴ La eumelanina es la modalidad de melanina más ampliamente extendida y está compuesta por especies moleculares derivadas del acoplamiento de dos monómeros: DHI y DHICA, ver fig. I.1a-b.

Por su parte, en segundo lugar, dentro de las melaninas con actividad biológica, se debe considerar a la feomelanina, consistente en pigmentos amarillo-rojizos que difieren significativamente en su estructura química de la eumelanina, es decir, presentan cisteínas en el esqueleto del polímero, los DHI



parecen no existir y, en su lugar, la molécula presenta cisdopas, moléculas formadas por la reacción de cisteína con dopa, que se incorporan a la estructura en forma de 1,4-benzotiazina.

En cualquier caso tanto la eumelanina como la feomelanina son obtenidas a partir del mismo precursor, la dopaquinona, que se forma en la oxidación de tirosina. En la Figura I.2 se representan las diferentes rutas sintéticas que, con el concurso de enzimas específicas, dan lugar a los diferentes pigmentos a partir de dopaquinona.

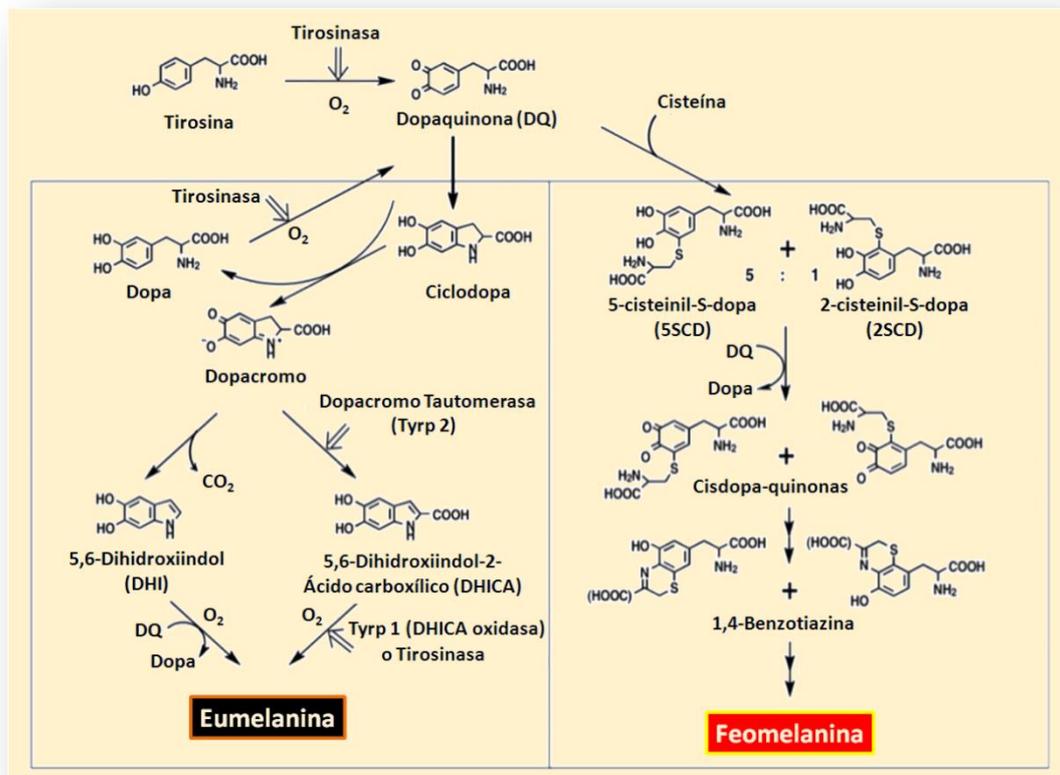
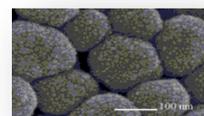


Figura I.2. Rutas biosintéticas que dan lugar a la producción de eumelanina y feomelanina. Téngase en cuenta que las enzimas Tirosinasa, Typr 1 y Typr 2 están implicadas en la síntesis de eumelanina mientras que únicamente la tirosinasa, además de la cisteína, es necesaria para la producción de feomelanina.

La fig. I.2 ilustra el actual modelo de rutas biosintéticas que producen eumelanina y feomelanina, comúnmente denominado esquema de Raper-Mason. Sin embargo, aún hoy existen determinadas cuestiones que



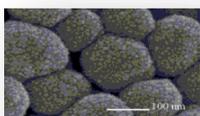
permanecen sin poder ser definidas completamente en lo que se refiere a las relaciones existentes entre aquellas moléculas formadas inicialmente y la estructura final presente en los oligómeros, asociaciones de éstos o polímeros que finalmente constituyen el pigmento en cuestión.

Por su parte, la NM se diferencia ligeramente de los dos tipos anteriores y se ha propuesto que se trata de un complejo polímero formado por unidades de dihidroxiindol y de benzotiazina junto a, posiblemente, otra serie de grupos funcionales aún por determinar.¹⁹ También se debe comentar la existencia de un cuarto tipo de compuesto, con características físicas similares a los anteriores pero sin actividad biológica conocida, como sería la alomelanina, pigmento éste que se obtiene a partir de la polimerización de polifenoles.²

A tenor de lo expuesto y dada la extrema complejidad de las diversas melaninas presentes en la naturaleza así como las dificultades que entraña su aislamiento a partir de medios naturales, en la presente memoria se abordará el estudio de las propiedades físico-químicas de un tipo concreto de eumelanina, por otra parte la modalidad más ampliamente investigada, la melanina sintética.²⁰ Dicho pigmento se obtiene a partir de la oxidación enzimática (tirosinasa, peroxidasa) o química ($K_3[Fe(CN)_6]$) de dopa, DHI o DHICA. Experiencias llevadas a cabo por medio de SEM demostraron que las melaninas sintéticas así preparadas se estructuran como un sólido amorfo, incluso a escala micrométrica.²¹

I.1. Estructura macromolecular

A pesar de las continuadas experiencias llevadas a cabo en las últimas décadas en los campos de la química orgánica y la biofísica, la estructura macromolecular de las eumelaninas no ha sido completamente establecida sin género de dudas. Es decir, si bien es comúnmente aceptado que, en un primer nivel, las eumelaninas son macromoléculas de DHI y DHICA, también lo es que no existe consenso acerca de un único modelo que justifique la estructura secundaria de estos pigmentos. Esto es, por otra parte, lógico si se tiene en cuenta la miríada de posibles configuraciones de enlace que las especies indólicas funcionalizadas pueden adoptar,²² representadas en la Figura I.3:



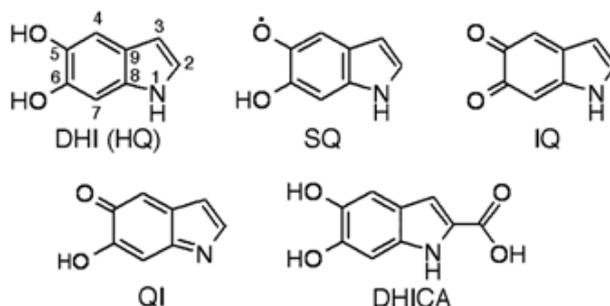
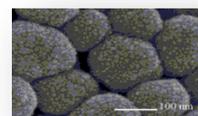


Figura 1.3. Monómeros básicos de las eumelaninas, DHI y DHICA y sus distintas formas rédox: Hidroquinona (HQ), Semiquinona (SQ), Indol Quinona (IQ) y Quinona Imina (QI). En HQ se han numerado las distintas posibilidades de enlace.

En este sentido se ha propuesto que la polimerización tiene lugar fundamentalmente por medio de las posiciones 2 y 4 en el DHI, ver fig. 1.3.²³ Este hecho daría lugar a la formación de macromoléculas lineales unidas por medio de enlaces simples. En el caso del DHICA existen estudios experimentales que demuestran que los acoplamientos a través de las posiciones 3, 4 y 7 son también posibles, si bien el 4-4' se muestra como el acoplamiento dominante.²⁴

Obviamente la elucidación de los acoplamientos predominantes, si es que existen, entre los monómeros de DHI y DHICA constituye la primera etapa a la hora de construir un modelo consistente que defina la estructura secundaria de las eumelaninas. Sin embargo, lo que es cierto es que incluso un número reducido de monómeros como los que son objeto del presente estudio (DHI, DHICA y sus correspondientes formas oxidadas, fig. 1.3) produce un número significativo de dímeros (16 en el caso del DHI) y, consecuentemente, un número apreciablemente alto de oligómeros de alto orden. Por tanto, el desorden químico observado en las eumelaninas es la consecuencia directa de la formación de macromoléculas a partir de sus monómeros indólicos.²⁵

Se han propuesto dos modelos diferentes con la intención de poder explicar la estructura secundaria de la melanina. De acuerdo al primero de ellos, la melanina estaría formada por un entramado de filamentos poliméricos entrecruzados que seguirían el modelo de Raper- Mason.⁴ Por el contrario, en



el segundo modelo, se considera que la melanina está compuesta por oligómeros de pequeño tamaño que se agregan a su vez formando nanoagregados de cuatro o cinco oligómeros.²⁶ Determinar la estructura química de la eumelanina y los detalles de su ensamblado en tres dimensiones resulta, por tanto, fundamental a la hora de poder establecer correspondencias entre su estructura y actividad bioquímica.

Durante mucho tiempo se impuso el modelo heteropolimérico para describir la estructura secundaria de las eumelaninas que postula la formación de las formas extendidas de estos biopolímeros mediante la formación de enlaces aleatorios entre los diferentes monómeros. Tal modelo viene a ser una ampliación del famoso esquema de Raper-Mason para la biosíntesis de melanina consistente en la oxidación enzimática de tirosina que desencadena la formación de DHI y DHICA, fig. 1.2.²² De hecho, se consideraba que este modelo representaba la única vía para poder explicar las propiedades eléctricas y ópticas de las melaninas, principalmente su absorbancia de banda ancha en el UV y en el visible, su conductividad eléctrica y fotoconductividad. En la Figura 1.4 se representan varios ejemplos del modelo extendido de Raper-Mason:

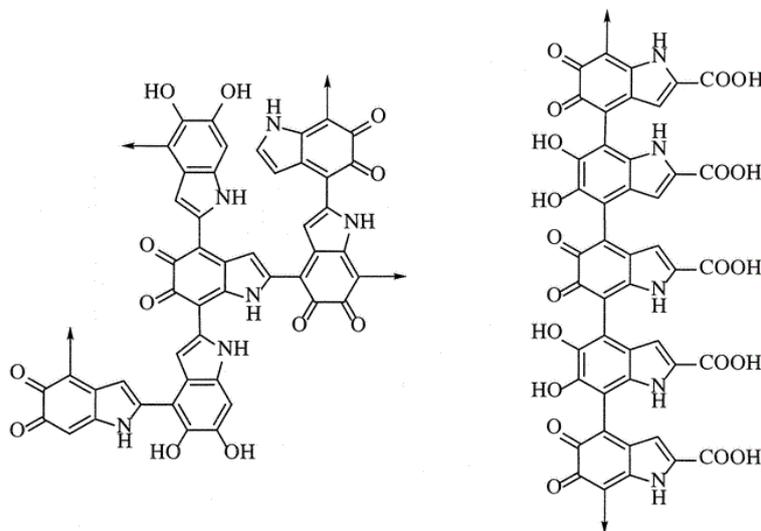
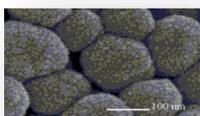
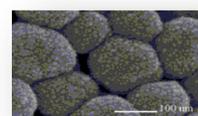


Figura 1.4. Ejemplos de polímeros extendidos de DHI (izquierda) y de DHICA (derecha).



Además, la estabilidad química y la insolubilidad de las melaninas podían explicarse eficazmente por medio de este modelo heteropolimérico. De hecho varios estudios de referencia publicados en la década de los noventa se basaron en el principio de que las eumelaninas pasaban por ser polímeros extendidos de DHI.²⁷

Sin embargo, en 1994 se propuso un modelo alternativo al anterior que comenzó a tomar fuerza a partir de ese momento.²⁸ Basándose en estudios realizados por STM con la intención de verificar estudios anteriores de rayos-X,²⁹ Zajac y colaboradores sugirieron que las eumelaninas lejos de estar formadas por heteropolímeros extendidos, parecían más bien estar compuestas de “protomoléculas” oligoméricas de dimensiones comprendidas entre 1,5-2,0 nm, constituidas, a su vez, por no más de 5 ó 6 unidades indólicas y que se apilan entre sí en un modelo análogo al observado entre las hojas de grafeno en el grafito.³⁰ Los agregados así formados interaccionarían entre sí dando lugar a toda una serie de aglomerados de gran tamaño con dimensiones y geometría variables en función del entorno en que se hallen. En particular para la eumelanina de *Sepia Officinalis* se ha propuesto un modelo secuencial de etapas de ensamblado que permiten justificar los tres niveles de organización estructural descritos en la bibliografía.³¹ En la Figura I.5 se muestra un esquema que ilustra lo anterior:



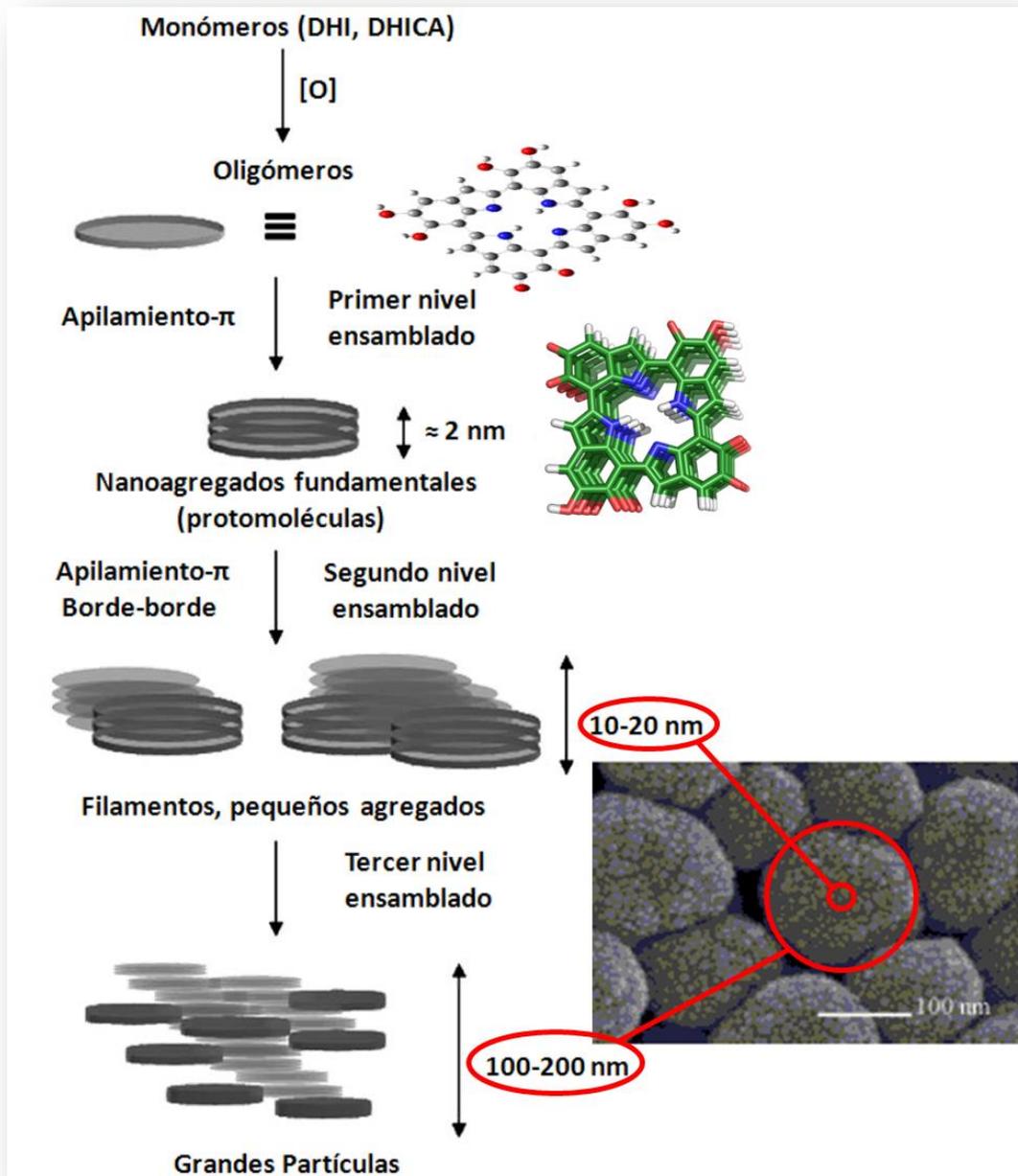
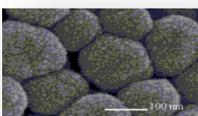


Figura I.5. Esquema que muestra la estructura de agregados propuesta para la eumelanina de *Sepia officinalis*.

Si bien se han realizado numerosos estudios apoyados en diversas técnicas instrumentales que parecen apoyar uno u otro modelo,³² aún no se han encontrado pruebas concluyentes que permitan decantarse definitivamente por uno, especialmente en lo que concierne a cuestiones relacionadas con la conectividad entre los monómeros indólicos básicos.³³



I.2. Propiedades optoelectrónicas

Como es bien conocido, dos de las funciones más importantes entre las que desarrollan las eumelaninas son sin duda la pigmentación y la fotoprotección. Por tanto, las propiedades ópticas de las melaninas desempeñan un papel relevante en lo concerniente a las propiedades fundamentales de las eumelaninas. Pese a ello, aún hoy no se conoce completamente cómo interacciona la radiación UV y visible con estas macromoléculas de melanina para dar lugar a fenómenos tan característicos como su absorbancia monotónica de banda ancha. De hecho, la explicación de los aspectos más importantes relacionados con efectos como los descritos requerirían un modelo estructural detallado (y correcto) a escala molecular.

La inmensa mayoría de los trabajos existentes sobre las propiedades y el comportamiento de la melanina se dirigen específicamente a estudios espectrofotométricos en el visible y el UV, debido precisamente a las importantísimas propiedades fotoprotectoras que desarrolla este biopolímero. Así, un aspecto determinante para identificar al biopolímero con el que se está trabajando, es la comparación del espectro UV-Visible de las disoluciones de trabajo con el espectro característico y reiteradamente publicado para la eumelanina que se muestra en la Figura I.6.

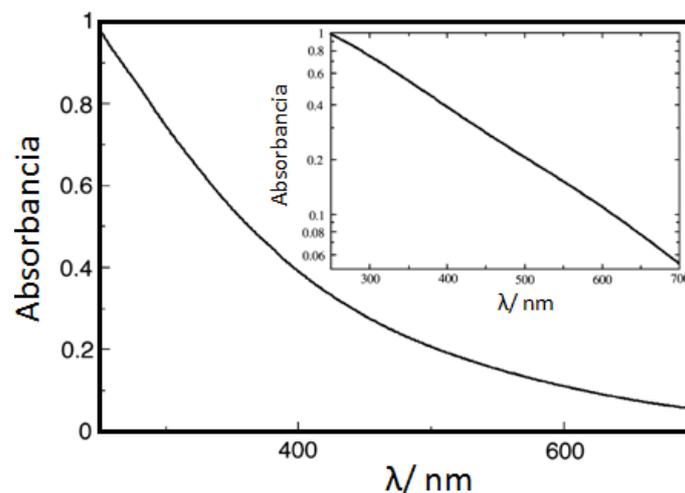
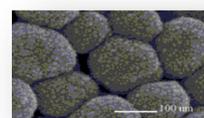


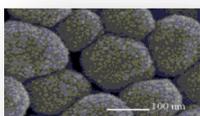
Figura I.6. Espectro UV-Visible de eumelanina sintética $0,003 \text{ g L}^{-1}$ en NaOH $0,1\text{M}$. El espectro se ajusta bien a una exponencial (gráfico inserto) y no se detectan picos cromóforos en el mismo.



La fig. I.6 corresponde al espectro característico de las disoluciones de eumelanina en medio básico. Es un espectro continuo, exponencial, decreciente y que ocupa todo el rango de longitudes de onda desde 250 a 700 nm. Tales características no son las observadas habitualmente en el caso de cromóforos orgánicos que normalmente exhiben picos en el espectro correspondientes a transiciones entre estados electrónicos y vibracionales distintos. Por tanto, parece corresponder más a un material inorgánico que a uno orgánico. Esta circunstancia está detrás del hecho de que muchos investigadores consideren un modelo de semiconducción en bandas para las eumelaninas.

Muchos autores consideran que el característico perfil de absorción exhibido por las melaninas es esencialmente dispersivo. De hecho, sería de esperar que, en su forma natural agregada y en disoluciones donde el pigmento se halla escasamente solubilizado, la dispersión desempeñe un rol significativo, combinándose con la absorción molecular debido a transiciones electrónicas en las moléculas de melanina, para dar lugar a la “extinción” conjunta de la radiación incidente. Sin embargo, tal y como se muestra en la fig. I.6, incluso en disoluciones alcalinas donde el pigmento se muestra altamente solubilizado, el perfil de absorción descrito persiste. En cualquier caso, es claro que si bien los procesos dispersivos incrementan la función foto-protectora característica de las melaninas, el espectro de absorción subyacente se debe fundamentalmente a efectos electrónicos producidos a nivel molecular.

Por tanto, este típico espectro exponencial registrado para las disoluciones básicas de melanina está producido precisamente por las características de las partículas que forman la disolución y contiene un hecho diferencial importante: la caída de la absorbancia con la longitud de onda no se corresponde ni con una dispersión tipo Rayleigh (propia de medios dispersivos formados por partículas muy pequeñas respecto de la longitud de onda) ni con una dispersión Mie (característica de medios formados por partículas grandes). Justamente la caída de absorbancia en las disoluciones de melanina es típica de los medios que contienen partículas cuyos tamaños se dispersan en un amplio rango.³⁰ En este tipo de sistemas la absorbancia decae siguiendo una



ley del tipo $A \propto \lambda^{-0.005}$. Esta potencia, 1/200, es característica de todos los tipos de melanina³⁴ y se ha argumentado que se debe a la superposición de bandas de absorción no homogéneas pertenecientes a diferentes tipos de oligómeros que se encuentran en la solución. De hecho, se ha calculado que basta con once de estas especies oligoméricas para dar lugar al perfil exponencial descrito entre las regiones del UV, el visible y el infrarrojo cercano.²⁵ Además dicha superposición de bandas ofrece una serie de *gaps*, los cuales parece ser que confieren a la melanina sus propiedades semiconductoras. En la Figura I.7 se ha representado precisamente la curva teórica correspondiente a esta dependencia entre la absorbancia y la longitud de onda y, tal y como puede apreciarse, el ajuste con los datos experimentales es excelente.

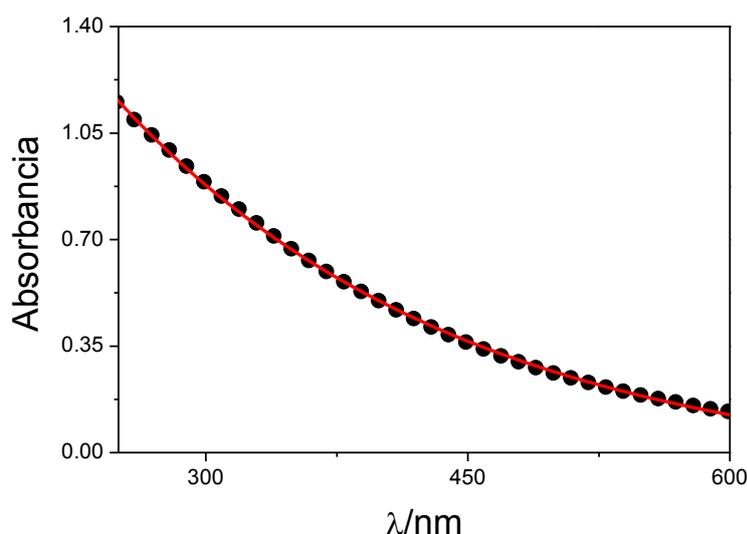
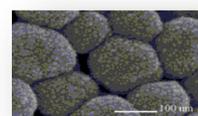


Figura I.7. Espectro UV-Visible experimental de melanina $0,003 \text{ gL}^{-1}$ en NaOH $0,1\text{M}$ (puntos en color negro) junto con el ajuste de $\lambda^{-1/200}$ (color rojo).

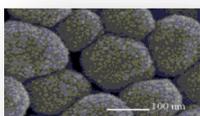
El espectro visible de moléculas orgánicas de gran tamaño es generalmente difícil de interpretar debido a que la mayor parte de los tránsitos producen bandas anchas y difusas. El espectro de absorción de la eumelanina, como se ha visto en la fig. I.6, se caracteriza por una caída monótonica de la absorbancia desde el UV hasta el IR cercano similar al que presentaría un semiconductor eléctrico amorfo.³⁴ Este hecho apoyaría el modelo estructural de la melanina como un polímero heterogéneo y desordenado donde esa banda



ancha de absorción es consecuencia de la superposición de numerosas bandas de absorción de oligómeros de pequeño tamaño. Sin embargo, medidas recientes de difracción de rayos X de ángulo alto (WAXS)²⁹ y de ángulo bajo (SAXS)³⁵, STM³⁶ y más recientemente por AFM³⁷ han revelado la presencia de estructuras empaquetadas. Estos resultados sugieren un modelo para la estructura de la eumelanina basado en un apilamiento en forma de capas de protomelanina que a su vez están formadas por monómeros unidos covalentemente de IQ, HQ, SQ y QI.

Si bien no es inusual la afirmación de que las melaninas no fluorescen, tal extremo no es exactamente cierto. De hecho, diversos estudios han demostrado que las eumelaninas naturales y la sintética emiten radiación cuando son apropiadamente estimuladas por radiación UV y visible. Aunque esta radiación emitida representa sólo una pequeña fracción de la energía total absorbida. En la actualidad se conoce que en torno al 99 % de la radiación absorbida por las eumelaninas se disipa, de forma no radiante, como calor en los 50 ps que siguen a la absorción. Por lo tanto, las melaninas son extremadamente buenas disipando radiación UV y visible. No obstante, el mecanismo molecular por el cual las melaninas disipan la radiación absorbida constituye, aún hoy, un misterio. En cualquier caso, se debe destacar el hecho de que el espectro de emisión no guarde similitud alguna con el de absorción. De hecho, se ha demostrado que tal espectro en las eumelaninas depende de la energía de la radiación de excitación, en contraste a lo que ocurre para la mayoría de los cromóforos donde dicha emisión es constante para energías de excitación superiores al *gap* de excitación de la molécula.³⁸ Esta particular mezcla de propiedades ópticas combinada con diferentes aproximaciones teóricas³⁹ es, de acuerdo a diferentes autores, indicativo de la gran variabilidad molecular, en términos de un alto grado de desorden químico y estructural, de las eumelaninas.³⁴

En general, se podría concluir que la eumelanina no es un cromóforo simple individual al uso, sino que más bien parece estar constituida por distintas especies químicamente diferentes. De hecho, existe un variado número de estudios teóricos que apoyan este punto de vista y que además permiten

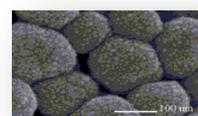


justificar los espectros de absorción, emisión y excitación en términos de la existencia de una heterogénea y compleja mezcla de múltiples especies oligoméricas.²⁵

I.3. Propiedades eléctricas

Ya en la década de los sesenta Longuet-Higgins y Pullman propusieron en sendos estudios teóricos que la estructura indólica y la consiguiente deslocalización electrónica podría conferir propiedades semiconductoras a estos biopolímeros.⁴⁰ Posteriormente, en 1972, McGinness demostró que las eumelaninas, en virtud de la observación de fotoconductividad en presencia de luz visible y de sus aplicaciones como interruptor molecular, podían comportarse como semiconductores eléctricos amorfos⁴¹ y, tras investigaciones posteriores, se concluyó que efectivamente las melaninas condensadas en estado sólido actuaban como semiconductores, propiedad ésta que hasta entonces sólo se había atribuido a polímeros inorgánicos.⁴² Si bien varios estudios han demostrado que las propiedades eléctricas de las eumelaninas sólidas dependen del estado de hidratación del material,⁴³ este hecho no es óbice para considerar el comportamiento semiconductor de las melaninas ya que en el caso de materiales higroscópicos como este biopolímero cabría esperar energías de activación dependientes del estado de hidratación.

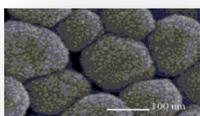
No obstante, si bien se ha podido demostrar que las capacidades que exhiben las eumelaninas para el transporte de carga guardan una estrecha relación con el nivel de hidratación del sistema, aún no ha sido posible caracterizar plenamente dicha dependencia. En este sentido, diversos autores han tratado de establecer predicciones teóricas que arrojasen luz sobre el efecto que ejercen las moléculas de agua presentes en la melanina sobre la conductividad de ésta en términos de los mecanismos específicos de transporte de carga que pudieran tener lugar.⁴⁴ En tales estudios se sugiere que las melaninas vienen a ser conductores “mixtos” en los que las especies transportadoras de carga dominantes pasan de ser los electrones a los protones a medida que el estado de hidratación del sistema aumenta. De hecho, los análisis realizados por termogravimetría confirman la presencia en las eumelaninas de dos fracciones de agua diferente: un agua fuertemente



enlazada íntimamente asociada con la macromolécula y otra débilmente enlazada presente en su estructura porosa. La segunda desaparece simplemente con secar la muestra a temperaturas en torno a los 60°C. Por el contrario, para eliminar la primera se requieren cientos de grados.⁴³

Por tanto, en las melaninas existe un balance a la hora de definir el transporte de carga entre por un lado la deslocalización electrónica que juega un papel relevante a nivel local ya que las unidades monoméricas y los oligómeros de pequeño tamaño están altamente conjugados y por otro los protones presentes intercalados en la compleja estructura del biopolímero procedentes del agua de hidratación.

Es bien conocido que el desorden estructural juega un papel crucial en las propiedades de transporte de carga de los semiconductores inorgánicos no cristalinos. Extrapolando esto a los semiconductores orgánicos y teniendo en cuenta que la melanina constituye un claro ejemplo de ellos, es obvio el desorden característico de este polímero debido a su heterogeneidad estructural. Si se intenta elucidar una estructura combinando los monómeros que se conocen, existen muchas macromoléculas posibles en función de la proporción de los distintos monómeros (DHI y DHICA), de cómo estuvieran ordenados los mismos, de las posiciones en las que se encontraran las cadenas laterales y de las distintas combinaciones de tautómeros que pudiera haber. Existen variados estudios cuánticos sobre las estructuras posibles pero todavía queda un largo camino por recorrer hasta poder disponer de un modelo consensuado de la estructura más probable, lo que sí parece comúnmente aceptado es que esas propiedades semiconductoras desde el punto de vista teórico se ven optimizadas con un número de oligómeros relativamente reducido.²⁵ Es preciso, por tanto, con la finalidad de poder aprovechar este tipo de comportamiento de la eumelanina, el conocer y caracterizar sus unidades estructurales básicas, toda vez que tal hallazgo supondría un notable avance en ingeniería molecular a la hora de llevar a cabo el diseño de biosensores o células fotovoltaicas biomiméticas.⁴⁵



En esta línea de razonamiento se debe comentar que se han descrito en la bibliografía varios estudios en los que pastillas de eumelanina sólida dan lugar a la generación de foto-corriente bajo iluminación con un haz de luz blanca.⁴⁶ Así, en la Figura I.8 se ha representado la foto-corriente obtenida a partir de una película de eumelanina sintética electropolimerizada a partir de dopa.⁴⁷

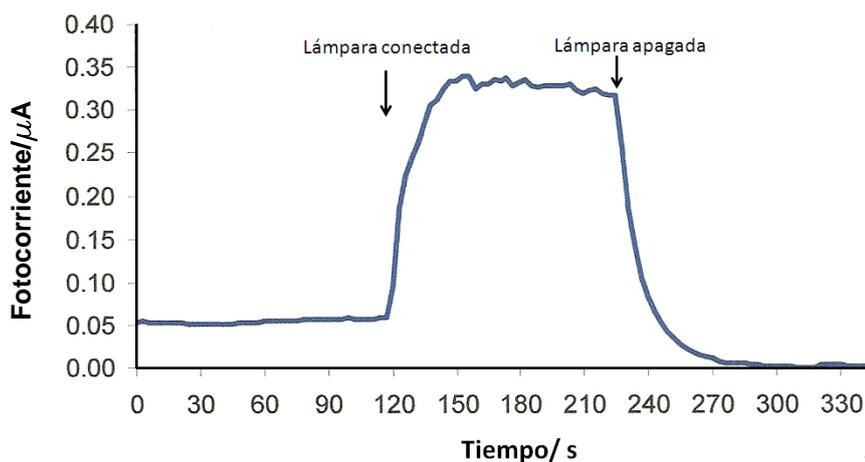
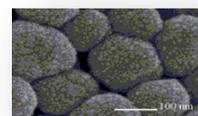


Figura I.8. Respuesta de foto-corriente obtenida a partir de una película delgada de eumelanina sintética fabricada por electropolimerización de dopa. La foto-corriente medida es el resultado de iluminar la muestra con una lámpara de Hg de 150 W mientras se aplicaba un campo eléctrico de 65 V cm^{-1} .

El efecto descrito en la fig. I.8 es marcadamente estable y reproducible. La iluminación de la muestra trae consigo el calentamiento de la misma y la consiguiente pérdida del agua enlazada. Este hecho se pone de manifiesto en términos de la resistencia instantánea que adquiere la película una vez se ha apagado la lámpara, siendo por supuesto superior a la exhibida antes de la iluminación, recuperándose el valor original de equilibrio tras algunos minutos.

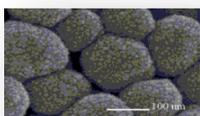
En resumen, como se ha dicho, la producción de foto-corriente tras irradiación con luz blanca es indicativa de un comportamiento tipo semiconductor. Así, la radiación UV y visible estimularían un número significativo de transportadores de carga en el modelo híbrido propuesto para las melaninas, esto es pequeñas regiones semiconductoras que contienen electrones deslocalizados acopladas junto a un medio, esencialmente iónico,



de material amorfo hidratado, siendo esta última la dominante. La facilidad de las melaninas para absorber radiación solar y generar transportadores de carga fotoexcitados, además de lo sencillo de su síntesis, su alta estabilidad química y fotoquímica, biocompatibilidad y biodisponibilidad, hacen de estos biopolímeros candidatos ideales para ser integrados en dispositivos adecuados para ser empleados como materiales fotovoltaicos.

I.4. Comportamiento rédox, radicales libres y paramagnetismo

Sin duda una de las más interesantes características de las eumelaninas es su habilidad para dar lugar a reacciones de transferencia electrónica. Los fundamentos químicos para entender la reactividad de la melanina residen en sus subunidades catecoles (dihidroxiindoles) que pueden sufrir dos procesos consecutivos de oxidación, perdiendo electrones, transformándose en la correspondiente forma quinona.⁴⁸ Aunque la naturaleza del par quinona/hidroquinona de las subunidades de eumelanina constituyen una más que razonable base para explicar la actividad rédox exhibida por el biopolímero, la estabilidad química de dichos grupos quinona no ha sido aun suficientemente explicada. Los grupos quinona presentes en las melaninas son *o*-quinonas procedentes de las subunidades indólicas DHI y DHICA, fig. I.1.⁴⁹ Sin embargo, las *o*-quinonas libres, a diferencia de las *p*-quinonas, son altamente inestables. Se ha especulado que su estabilización en la melanina es una consecuencia de la unión covalente entre distintas subunidades indólicas para formar pequeños oligómeros y de la consiguiente agregación de éstos en el biopolímero. A pesar de su relevancia, hay que decir que no existen demasiados datos cuantitativos relacionados con las propiedades rédox de las eumelaninas.^{48,50} Sin embargo, investigaciones recientes demostraron que el potencial rédox de la reacción de electroreducción monoelectrónica para el modelo de eumelanina propuesto resultó estar comprendido entre -450 y -550 mV vs. ENH.⁵⁰ También se ha realizado un estudio electroquímico a partir de una eumelanina sintética preparada enzimáticamente en la que se observaron dos picos de oxidación a potenciales de +460 y +525 mV vs. ECS. Asimismo, el voltamograma exhibió sendos picos de reducción a +20 y -355 mV vs. ECS.^{48b} En otros casos, se extendió el estudio a las propiedades rédox de grupos funcionales presentes en

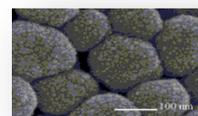


las eumelaninas por medio de medidas potenciométricas.^{10b}

En general, dada su escasa solubilidad en la mayoría de los disolventes y debido a que las melaninas se presentan casi siempre bajo la forma de suspensión de partículas coloidales, no es fácil de estudiar su comportamiento rédox con las técnicas clásicas para medios líquidos homogéneos. Numerosos estudios previos parecen concluir que la actividad electroquímica de tales suspensiones coloidales es prácticamente inexistente. Sin embargo, cuando se logra tener el monómero libre en solución es posible detectar una actividad electroquímica significativa junto a la posibilidad de controlar su polimerización bajo condiciones experimentales reproducibles.⁵¹

Dada su actividad rédox, en los últimos tiempos se ha intentado caracterizar el comportamiento electroquímico de las eumelaninas sin demasiado éxito. Así, se han intentado obtener películas de melanina mediante la oxidación de dopa y tras la posterior evaporación del polímero obtenido sobre sustratos de silicio.⁵² Desafortunadamente, el proceso de evaporación da lugar a películas discontinuas y no homogéneas con estructuras y propiedades fisicoquímicas lamentablemente poco reproducibles. También se ha recurrido a las técnicas electroquímicas con objeto de llevar a cabo la preparación de películas tipo melanina por electrooxidación de DHI sobre carbón vítreo,^{48c,53} sin embargo estas películas de DHI polimerizado no consiguen reproducir fielmente algunas de las propiedades fundamentales y características de las melaninas.

Por otro lado, hay que decir que una de las propiedades más inusuales que exhiben las eumelaninas como macromoléculas es su persistente señal de resonancia de espín electrón (*ESR*) o resonancia paramagnética electrónica (*EPR*), lo que constituye una clara indicación de la existencia de centros de radicales libres presentes en el material así como de su carácter paramagnético o, incluso, superparamagnético.⁵⁴ Estas especies radicales alojadas en la melanina son consideradas como excepcionalmente estables e incluso, tras ser tratadas durante varios días en disoluciones de ácido sulfúrico o de ácido clorhídrico, no experimentan cambios significativos en sus propiedades paramagnéticas.^{54a} Parece generalmente aceptado que la



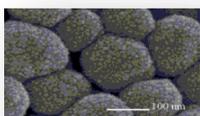
concentración de especies radicalarias en el biopolímero dependen del equilibrio de la denominada reacción de comproporción, esto es la reacción que se establece entre la forma completamente reducida, la completamente oxidada y la semi-reducida (semi-oxidada) de las subunidades monoméricas de las melaninas. Dicho equilibrio puede escribirse esquemáticamente de la siguiente forma:



Donde QH_2 y Q representan las formas *o*-hidroquinona y *o*-quinona de las subunidades de eumelanina, respectivamente. Q^\cdot es su correspondiente forma radical. El equilibrio (1) está claramente desplazado hacia las especies totalmente oxidada y reducida con lo que la concentración de radicales en la melanina es apreciablemente baja. En este sentido, se ha calculado que bajo condiciones experimentales normales una de estas especies radicales está en equilibrio con 1000 subunidades de melanina completamente oxidada y reducida.⁵⁵ Ahora bien, también se ha probado que la incorporación a las eumelaninas de iones metálicos paramagnéticos alteran el comportamiento magnético del biopolímero, sin que esto guarde relación alguna con reacciones en las que las especies radicales de la melanina tomen parte.⁵⁶ Hay que decir, en este sentido, que en la actualidad existe una cierta controversia en tanto en cuanto se han publicado varios estudios en los que el carácter superparamagnético registrado por diversas técnicas en muestras de melaninas sintéticas se ha atribuido a la presencia de hierro en las mismas.^{54b} Sin embargo, otros autores han detectado el mismo carácter superparamagnético en melaninas sintéticas que carecían de dicho metal.^{54c}

I.5. Fotoprotección y propiedades antioxidantes

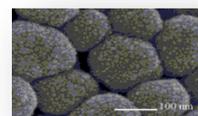
Como se ha explicado previamente, aún no se comprende completamente el mecanismo molecular y celular mediante el cual las melaninas ejercen su función de fotoprotección. Obviamente, la habilidad de estos pigmentos para absorber radiación UV y visible y el hecho de que su eficiencia se incremente inversamente a la longitud de onda de la radiación incidente, ya los hacen intrínsecamente fotoprotectores puesto que la energía absorbida de los fotones



es rápidamente utilizada en procesos no fotoquímicos. De hecho, como también se ha indicado, existen estudios recientes que confirman que a la absorción de fotones UV y visible le sigue la desexcitación de la melanina en procesos no radiantes altamente eficientes, fundamentalmente por relajación térmica.^{9,45,57} Como consecuencia, el riesgo potencial de que las melaninas puedan dar lugar a reacciones fotoquímicas dañinas se reduce significativamente.

Se ha propuesto que la capacidad de las melaninas para extinguir estados excitados de moléculas fotosensibles y de amortiguar la actividad de radicales libres constituye un factor determinante en la acción protectora que ejercen las melaninas frente al estrés oxidativo inducido, en los tejidos pigmentados, por procesos químicos o fotoquímicos. Mediante el uso de la técnica de radiólisis de pulso como método directo para la generación de radicales libres y la monitorización de sus tiempos de vida, en presencia o en ausencia de eumelanina sintética, se pudo demostrar que dichos pigmentos exhiben una apreciable reactividad frente a radicales tanto oxidantes como reductores.⁵⁸ Así, interacciona de manera bastante eficiente con el anión superóxido, pobre oxidante y sólo levemente reductor. Asimismo, las melaninas reaccionan a velocidades relativamente altas con radicales peroxilos, hidroxilos y otras especies radicales implicadas en la peroxidación de lípidos.⁵⁹ La interacción de las eumelaninas con radicales oxidantes y reductores se explica en términos de la naturaleza tipo quinona e hidroquinona de sus subunidades constituyentes que pueden actuar, según el caso, como donantes y aceptores de electrones, respectivamente.

No obstante, también se debe hacer notar que se ha descrito la posible implicación de melaninas en reacciones fototóxicas responsables de la aparición de ciertos melanomas relacionados con la exposición a radiación UV. Dicho argumento se basa en las similitudes existentes entre los mecanismos de fotogeneración de especies radicales en las melaninas y los responsables de la inducción de ciertos melanomas.⁶⁰ Desde luego es cierto que la fotoexcitación aeróbica de la melanina conduciría a la formación del anión superóxido y de peróxido de hidrógeno, el cual, en presencia de iones

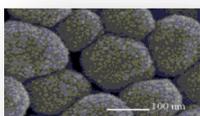


metálicos activos electroquímicamente, puede dar lugar a la aparición de un oxidante tan poderoso como el radical hidroxilo. Sin embargo, la eficiencia de la generación de radicales en las melaninas así como la del anión superóxido es bastante reducida, aún incluso en el rango del UV. El hecho en cuestión radica en que si un flujo relativamente bajo de estas especies radicales que aparecen en las melaninas bajo condiciones típicas de exposición a radiación UV y visible tendría o no un impacto bioquímico significativo. En general, se ha propuesto que las células melanóticas con una baja eficiencia antioxidante y una alta susceptibilidad a sufrir daños por oxidación, experimentan un elevado riesgo de estrés oxidativo cuando son expuestas a la luz que fotoactiva las células de melanina.

I.6. Contenido en iones metálicos

Las melaninas exhiben una gran afinidad por los iones metálicos con lo que los tejidos pigmentados contienen una cantidad significativa de tales iones.⁶¹ Dado que los organismos vivos ejercen un estricto control sobre las proporciones de metales, la implicación de las melaninas en los mecanismos de regulación del contenido en iones metálicos es de gran importancia y ha atraído la atención de la comunidad científica en los últimos tiempos.⁶² En concreto, se ha tratado fundamentalmente de caracterizar la capacidad de enlace y la afinidad de varios de estos metales hacia la melanina y también de describir la naturaleza química de los sitios de enlace melanina-ión metálico así como los efectos que el contenido en un metal coordinado concreto tiene sobre las propiedades bioquímicas del pigmento, por ejemplo, la capacidad para actuar como un antioxidante efectivo.

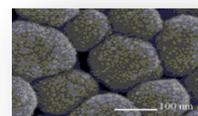
En esta línea de razonamiento es importante destacar dos cuestiones que impregnan la bibliografía sobre eumelaninas: la habilidad de las melaninas para actuar como depósito de iones metálicos, permitiendo su almacenamiento, liberación e intercambio, y su capacidad para enlazarse fuertemente y secuestrar a iones metálicos muy reactivos, atenuando así su posible implicación en aquellos mecanismos que inducen estrés oxidativo.⁶² Así, una de las primeras funciones atribuidas a las melaninas en este sentido está relacionada con la de servir de reserva de Ca(II) y Zn(II), de forma que puedan



ser liberados bajo ciertas condiciones.⁶³ Por su parte, iones metálicos más pesados como, por ejemplo, Fe(III) y Cu(II), se enlazan firmemente a las melaninas.⁶⁴ Es bien conocido que Fe(II) y Cu(I) pueden ocasionar daños en sistemas biológicos mediante la catálisis de la reacción de Fenton. De esta forma los melanosomas atrapan estos iones metálicos, protegiéndoles de una ulterior reducción por parte de determinados componentes celulares de manera que consiguen inhibir la consiguiente inducción de estrés oxidativo catalizado por los iones metálicos señalados.⁶⁵

La distribución de átomos metálicos en los melanosomas suele ser, en la mayoría de los casos, un reflejo del entorno biológico en el que éstos se desarrollan. Así, la melanina extraída de la *Sepia Officinalis*, habitualmente empleada como modelo clásico de eumelanina, contiene principalmente Ca, Mg, Na, y K, que son generalmente los elementos metálicos más abundantes tanto en estos organismos como en el agua de mar.⁶⁶ En este sentido, especial atención merece el contenido en metales, Fe especialmente, presentes en la NM debido a la potencial conexión entre el estrés oxidativo producido por el hierro alojado en la NM y la degeneración selectiva de neuronas pigmentadas en la *Substantia Nigra* en el cerebro de pacientes con Parkinson. De hecho se ha propuesto que la NM constituye la principal reserva de hierro en la *Substantia Nigra*.¹¹ Sin embargo, el hierro, a pesar de tratarse del metal más abundante en la NM, está presente en concentraciones mucho menores en el resto de melanosomas que se han analizado. Esta circunstancia probablemente se debe a las diferencias existentes entre los procesos de melanogénesis que se dan en la NM y en otras melaninas, siendo el Fe(III) un elemento activo en la biosíntesis de NM.⁶⁷ Es más, con la excepción de la NM, los melanosomas de origen humano contienen Ca como su metal más abundante lo que podría estar relacionado con un posible papel de la melanina en la regulación de la homeostasis del calcio.⁶⁸

En cuanto a los sitios de enlace en las melaninas hay que decir que teniendo en cuenta las subunidades monoméricas DHI y DHICA que las forman, estos biopolímeros deberían contener grupos funcionales como carboxilos, amina, hidroxilos (fenólicos), quinona y semiquinona, todos los cuales o incluso

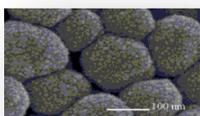


combinaciones de ellos podrían servir como potenciales agentes quelantes de cationes metálicos como los descritos. La presencia de tales grupos funcionales se ha podido confirmar por diversas técnicas, especialmente XPS e IR.⁶⁹ En general, los metales alcalinos se enlazan a grupos carboxílicos en condiciones neutras o débilmente ácidas, compartiendo sitios de enlace con iones de metales alcalinotérreos como Ca(II), Mg(II), así como el Zn(II). Sin embargo, Fe(III) y Cu(II) no se coordinan a los grupos carboxilato y pueden ser almacenados en los melanosomas sin afectar al contenido de los otros iones metálicos nombrados.⁷⁰

En el caso concreto del hierro se ha demostrado que el ión Fe(III) se encuentra en las eumelaninas formando un complejo con grupos *o*-fenólicos, tipo catecol, presentes en los monómeros de DHI y DHICA.⁷¹ De acuerdo a lo expuesto, una cuestión de gran relevancia es el estado de oxidación del metal coordinado en la melanina. El poder concretar las cantidades de Fe(II) así como la afinidades relativas de enlace de las eumelaninas por cada uno de los dos estados de oxidación del hierro es de vital importancia en la medida en que, como ya se ha explicado anteriormente, el ión Fe(II) toma parte en una serie de reacciones rédox que dan como resultado la producción de radicales libres que inducen estrés oxidativo.⁷²

Por su parte para el Cu se ha concluido que los grupos funcionales responsables de enlazarse a Cu(II) dependen del pH. Así, para pH 2-7 el Cu(II) se enlaza a grupos carboxilato o amina, mientras que para pH 7-11 el Cu(II) es coordinado por grupos hidroxilo fenólicos.⁶⁹

En cuanto a los efectos que la acumulación de metales pueda tener sobre las características morfológicas de los melanosomas, hay que decir que se han realizado algunas experiencias en este sentido en los últimos tiempos. Si bien no es posible examinar el impacto de los iones metálicos en las melaninas, sí que resulta factible examinar como la adición de iones metálicos afecta a las características morfológicas de los gránulos de este pigmento. Así, la forma y talla de gránulos de melanina de *Sepia Officinalis* dopadas con distintas proporciones de iones metálicos no mostraron dependencia alguna con la

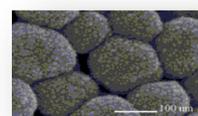


cantidad ni con el tipo de ión metálico empleado. Esto reveló una escasa incidencia de estos metales a la hora de mantener o alterar la estructura de los gránulos de melanina. Sin embargo, sí que se observó que el tamaño de los gránulos decrecía gradualmente tras tratamiento de los mismos en EDTA que permitía extraer cationes metálicos di y multivalentes. Dado que la mayor parte de los iones presentes en las melaninas son de Mg(II) y Ca(II), se sugirió que la salida de estos dos iones divalentes en el tratamiento con EDTA incrementa la solubilidad de las melaninas.³¹

En este sentido también se ha de considerar que una de las funciones biológicas más destacadas en las melaninas es la de actuar como antioxidante en virtud de su capacidad de amortiguar la actividad de radicales libres. En este contexto, la acumulación en las melaninas de iones metálicos como Fe(III) y Cu(II) es de gran interés y ha sido objeto de diferentes estudios.^{70,72} En general se ha podido concluir que la función antioxidante de las melaninas parte de su habilidad para secuestrar iones metálicos reactivos pero es importante hacer notar que existe un límite para la capacidad de estos biopolímeros para desarrollar esta función. Una vez superado este límite, la melanina, saturada de estos iones metálicos altamente reactivos, se convierte en prooxidante.⁷¹

I.7. Preparación de películas de melanina

Parece claro que para llevar a cabo una caracterización completa de las propiedades fisicoquímicas de las melaninas y además con la intención de preparar materiales y dispositivos basados en eumelaninas que puedan aprovechar sus características propiedades optoelectrónicas, el primer paso, en este sentido, implicaría el desarrollo de técnicas que permitan la síntesis de películas ultradelgadas de estos pigmentos. En el pasado se han podido realizar determinadas medidas, sobre todo de tipo eléctrico, a partir de aglomerados de melanina en polvo prensada. Este método de trabajo pasa por ser poco adecuado para la preparación de materiales complejos debido a su alta variedad morfológica. En los últimos tiempos, distintos grupos han sido capaces de preparar películas delgadas de este biopolímero a partir de melanina sintética⁷³ y a partir de la evaporación de derivados de melanina solubles en disolventes orgánicos con moderado éxito.⁷⁴ Más aún, se han

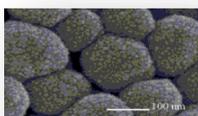


descrito dispositivos basados en películas de eumelanina sintética que exhiben propiedades optoelectrónicas exaltadas.⁷⁵ Sin embargo, los métodos de evaporación dan lugar con frecuencia a depósitos discontinuos y escasamente homogéneos que exhiben estructuras y propiedades raramente reproducibles. También se han preparado electrodepositos a partir de unidades de DHI sobre carbón vítreo,^{10b,48c,53b} si bien tales películas no reproducen fielmente algunas propiedades importantes de las melaninas como serían su estructura y comportamiento rédox.

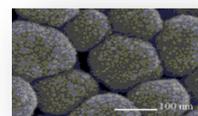
En cualquier caso, la clave para llevar a cabo el desarrollo de películas de eumelanina, homogéneas y reproducibles en cuanto a morfología y propiedades fisicoquímicas, con vistas al diseño de materiales bioorgánicos, requiere inevitablemente una mayor comprensión y conocimiento acerca de la estructura secundaria y del estado de agregación de las subunidades de DHI y DHICA y de sus oligómeros en estos biopolímeros. De hecho, son múltiples las aplicaciones que, como materiales biomiméticos, ofrecen los sistemas que, al igual que las melaninas, están basados en estructuras tipo catecol.⁷⁶ Entre éstas destacan su uso como biosensores, en bioceldas de combustible, electroremediación de metales pesados, síntesis y funcionalización de nanopartículas, en paneles solares, etc.⁷⁶ Es por tanto en este marco en el que se justifica y desarrolla la presente tesis doctoral.

I.8. Bibliografía

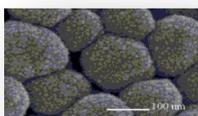
- 1) (a) G. Prota, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, **1995**, 64, 94. (b) S. Ito, *Pigment Cell Res.*, **2003**, 16, 230. (c) M.G. Peter, H. Foerster, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1989**, 101, 757.
- 2) J.J. Nordlund, *The Pigmentary System*, ed., Oxford University Press, **1988**.
- 3) A.C. Santos Nogueira, I. Joekes, *Photochem. Photobiol. B Biol.*, **2004**, 74, 109.
- 4) G. Prota. *Melanins and Melanogenesis*. New York Academic Press, **1992**.
- 5) K.L. Double, L. Zecca, P. Costi, M. Mauer, C. Griesinger, S. Ito, D. Ben-



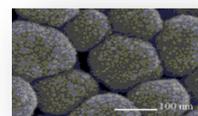
- Shachar, G. Bringmar, R.G. Fariello, P. Riederer, M. Gerlach. *J. Neurochem.*, **2000**, 75, 2583.
- 6) M.L. Wolbarsht, A.W. Walsh, G. George, *Appl. Opt.*, **1981**, 20, 2184.
- 7) B.J.R. Nicolaus, *Medical Hypotheses*, **2005**, 65, 791.
- 8) N. Kollias, R.M. Sayre, L. Zeise, R. Chedekel, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **1991**, 9, 135.
- 9) (a) P.H. Proctor, *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants*, CRC Press: Boca Ratón, **1989**, 1, 209. (b) R. Kono, T. Yamaoka, N. Yoshikazi, *J. Appl. Phys.*, **1979**, 50, 1236.
- 10) (a) Y. Liu, V. Kempf, A. Samokhvalov, J.D. Simon, *Pigment Cell Res.*, **2003**, 16, 608. (b) B. Szpoganicz, S. Gidanian, P. Kong, P. Farmer, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 89, 45.
- 11) L. Zecca, M. Gallorini, V. Schunemann, A.X. Trautwein, M. Gerlach, P. Riederer, P. Vezzoni, D. Tampellini, *J. Neurochem.*, **2001**, 76, 1766.
- 12) K.A. Kellinger, *The role of iron in neurodegeneration – prospects for pharmacotherapy of Parkinson’s disease. Drugs Aging*, **1999**, 14, 115.
- 13) O.v. Fürth, O. Schneider, H. Schneider, *Beitr. Chem. Physiol. Pathol.*, **1902**, 1, 229.
- 14) E. Bourquelot, G. Bertrand, *Rend. Soc. Biol.*, **1895**, 47, 582.
- 15) H.S. Raper, *Biochem. J.*, **1927**, 21, 89.
- 16) H.S. Mason, *J. Biol. Chem.*, **1948**, 172, 83.
- 17) G. Prota, M. Piatelli, R.A. Nicolaus, *Rend. Sci. Fis. Mat.*, **1966**, 33, 146.
- 18) (a) G. Prota, M. d’Ischia, A. Napolitano, *The Chemistry of Melanins and Related Metabolites*. En *The Pigmentary System*, Oxford University Press: New York, **1998**, 307. (b) S. Ito, K. Wakamatsu, *Chemistry of Melanins*. En *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*, Blackwell: Malden, MA, **2006**, 282.
- 19) (a) G. Odh, R. Carstam, J. Paulson, A. Wittbjør, E. Rosengren, H. Rorsman, *J. Neurochem.*, **1994**, 62, 2030. (b) K. Wakamatsu, K. Fujikawa, F.A. Zucca, L. Zecca, S. Ito, *J. Neurochem.*, **2003**, 86, 1015.
- 20) (a) P. Meredith, T. Sarna, *Pigment Cell Res.*, **2006**, 19, 572. (b) M. d’Ischia, A. Napolitano, A. Pezzella, P. Meredith, T. Sarna, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 3914. (c) J.D. Simon, D.N. Peles, *Acc. Chem. Res.*,



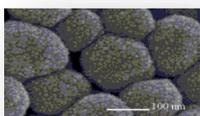
- 2010**, 43, 1452.
- 21) J.B. Nofsinger, S.E. Forest, L.M. Eibest, K.A. Gold, J.D. Simon, *Pigment Cell Res.*, **2000**, 13, 179.
- 22) K. Wakamatsu, S. Ito, *Pigment Cell Res.*, **2002**, 15, 174.
- 23) G. Prota, *Pigment Cell Res.*, **2000**, 13, 283.
- 24) A. Pezzella, D. Vogna, G. Prota, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 3681.
- 25) P. Meredith, B.J. Powell, J. Riesz, S.P. Nighswander-Rempel, M.R. Pederson, E.G. Moore, *Soft Matter*, **2006**, 2, 37.
- 26) (a) C.M.R. Clancy, J.B. Nofsinger, R.K. Hanks, J.D. Simon, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, 104, 7871. (b) C.M.R. Clancy, J.D. Simon, *Biochemistry*, **2001**, 40, 13353.
- 27) (a) D.S. Galvao, M.J. Caldas, *J. Chem. Phys.*, **1988**, 88, 4088. (b) D.S. Galvao, M.J. Caldas, *J. Chem. Phys.*, **1990**, 92, 2630. (c) D.S. Galvao, M.J. Caldas, *J. Chem. Phys.*, **1990**, 93, 2848.
- 28) G.W. Zajac, J.M. Gallas, J. Cheng, M. Eisner, S.C. Moss, A.E. Alvarado-Swaissgood, *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, 1199, 271.
- 29) (a) J. Cheng, S.C. Moss, M. Eisner, P. Zcshack, *Pigment Cell Res.*, **1994**, 7, 255. (b) J. Cheng, S.C. Moss, M. Eisner, *Pigment Cell Res.*, **1994**, 7, 263.
- 30) K.C. Littrell, J.M. Gallas, G.W. Zajac, P. Thiyagarajan, *Photochem. Photobiol.*, **2003**, 77, 115.
- 31) (a) Y. Liu, J.D. Simon, *Pigment Cell Res.*, **2003**, 16, 606. (b) Y. Liu, J.D. Simon, *Pigment Cell Res.*, **2005**, 18, 42.
- 32) (a) G.S. Lorite, V.R. Coluci, M.I.N. da Silva, S.N. Deziderio, C.F.O. Graeff, D.S. Galvao, M.A. Cota, *J. Appl. Phys.*, **2006**, 99, 113511. (b) V. Capozzi, G. Perna, P. Carmone, A. Gallone, M. Lastella, E. Mezzenga, G. Quartucci, M. Ambrico, V. Augelli, P.F. Biagi, T. Ligonzo, A. Minafra, L. Schiavulli, M. Pallara, R. Cicero, *Thin Solid Films*, **2006**, 511-512, 362. (c) A. Pezzella, A. Napolitano, M. d'Ischia, G. Prota, R. Seraglia, P. Traldi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1997**, 11, 368. (d) S. Ghiani, S. Baroni, D. Burgio, G. Digilio, M. Fukuhara, P. Martino, K. Monda, C. Nervi, A. Kiyomine, S. Aime, *Magn. Reson. Chem.*, **2008**, 46, 471. (e) S. Meng, E. Kaxiras, *Biophys. J.*, **2007**, 94, 2095.



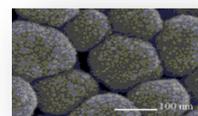
- 33) M. d'Ischia, A. Napolitano, A. Pezzella, P. Meredith, T. Sarna, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 3914.
- 34) M. L. Tran , B. J. Powell, P. Meredith *Biophys. J.*, **2006**, *90*, 743.
- 35) J.M. Gallas, K.C. Littrell, S. Seifert, G.W. Zajac, P. Thiyagarajan, *Biophys. J.*, **1999**, *77*, 1135.
- 36) J.M. Gallas, G.W. Zajac, T. Sarna, P. Stotter, *Pigment Cell Res.*, **2000**, *13*, 99.
- 37) B.J. Powell, *Chem. Phys. Lett.*, **2005**, *402*, 111.
- 38) (a) S.P. Nighswander-Rempel, J. Riesz, J. Gilmore, P. Meredith, *J. Chem. Phys.*, **2005**, *123*, 194901. (b) S.P. Nighswander-Rempel, J. Riesz, J. Gilmore, P. Meredith, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, *109*, 20629.
- 39) K.B. Stark, J.M. Gallas, G.W. Zajac, J.T. Golab, S. Gidanian, T. McIntire, P.J. Farmer, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, *109*, 1970.
- 40) (a) H.C. Longuet-Higgins, *Arch. Biochim. Biophys. Acta*, **1960**, *186*, 231. (b) A. Pullman, B. Pullman, *Biochim. Biophys. Acta*, **1961**, *54*, 384.
- 41) (a) J. McGinness, *Science*, **1972**, *177*, 896. (b) J. McGinness, P. Corry, P. Proctor, *Science*, **1974**, *183*, 853.
- 42) R. Crippa, V. Cristofolletti, N. Romeo, *Biochim, Biophys. Acta*, **1978**, *538*,164.
- 43) M.M. Jastrzebska, J. Isotalo, J. Paloheimo, H. Stubb, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **1995**, 577.
- 44) (a) M.M. Jastrzebska, A. Kocot, J.K. Vij, J. Zalewska-Rejda, T. Witecki, *J. Mol. Struct.*, **2002**, *606*, 205. (b) P.J. Goncalves, O. Bafa Filho, C.F.O. Graeff, *J. Appl. Phys.*, **2006**, *99*, 104701.
- 45) P. Meredith, J. Riesz, *Photochem. Photobiol.*, **2004**, *79*, 211.
- 46) M.M. Jastrzebska, A. Kocot, L. Tajber, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **2002**, *66*, 201.
- 47) (a) S. Subianto, G. Will, P. Meredith, *International Congress on Synthetic Metals, Wollongong*, **2004**. (b) A.B. Mostert, B.J. Powell, F.L. Pratt, G.R. Hanson, T. Sarna, I.R. Gentle, P. Meredith, *PNAS*, **2012**, 1119948109.
- 48) (a) V. Horak, G. Weeks, *Bioorganic Chemistry*, **1993**, *21*, 24. (b) C.L. Serpentine, C. Gauchet, D. Montauzon, M. Comat, J. Ginestar, N.



- Paillous, *Electrochim. Acta*, **2000**, *45*, 1663. (c) S. Gidanian, P.J. Farmer, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, *89*, 54.
- 49) A. Pezzella, O. Crescenzi, A. Natangelo, L. Panzella, A. Napolitano, S. Navaratnam, R. Edge, E.J. Land, V. Barone, M d'Ischia, *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 1595.
- 50) M. Rozanowska, T. Sarna, E.J. Land, T.G. Truscott, *Free Radical Biol. Med.*, **1999**, *26*, 518.
- 51) P. Díaz, Y. Gimeno, P. Carro, S. González, P.L. Schilardi, G. Benítez, R.C. Salvarezza, A.H. Creus, *Langmuir*, **2005**, *21*, 5924.
- 52) M.I.N da Silva, S.N. Dezidério, J.C. Gonzalez, C.F.O. Graeff, M.A. Cotta, *J. Appl. Phys.*, **2004**, *96*, 5803.
- 53) (a) P.J. Farmer, S. Gidanian, B. Shahandeh, A.J. Di Bilio, N. Tohidian, F.L.Jr. Meyskens, *Pigm. Cell Res.*, **2003**, *16*, 273. (b) J. Di, S. Bi, *Anal. Sci.*, **2004**, *20*, 629.
- 54) (a) R.C. Sealy, J.S. Hyde, C.C. Felix, L.A. Menon, G. Prota, *Science*, **1982**, *217*, 545. (b) F. Bolzoni, S. Giraudoc, L. Lopiano, B. Bergamasco, M. Fasano, P.R. Crippa, *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**, *210*, 1856. (c) M.E. Cano, R. Castañeda-Priego, A. Gil-Villegas, M.A. Sosa, P. Schio, A.J.A. de Oliveira, F. Chen, O. Baffa, C.F.O. Graeff, *Photochem. Photobiol.*, **2008**, *84*, 627.
- 55) W. Froncisz, T. Sarna, J.S. Hyde, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1980**, *202*, 289.
- 56) T. Sarna, J.S. Hyde, H.M. Swartz, *Science*, **1976**, *192*, 1131.
- 57) (a) J. Riesz, J. Gilmore, P. Meredith, *Biophys. J.*, **2006**, *90*, 1. (b) T. Ye, J.D. Simon, *J. Phys. Chem. B*, **2003**, *107*, 11240. (c) J. Riesz, T. Sarna, P. Meredith, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*, 13985.
- 58) M. Rozanowska, T. Sarna, E.J. Land, T.G. Truscott, *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**, *26*, 518.
- 59) R. Dunford, E.J. Land, M. Rozanowska, T. Sarna, T.G. Truscott, *Free Radic. Biol. Med.*, **1995**, *19*, 735.
- 60) S.R. Wood, M. Berwick, M.R. Ley, R.B. Walter, R.B. Setlow, G.S. Timmins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, *103*, 4111.
- 61) Y. Liu, L. Hong, K. Wakamatsu, S. Ito, B. Adhyaru, C.Y. Cheng, C.R.



- Bowers, J.D. Simon, *Photochem. Photobiol.*, **2005**, *81*, 135.
- 62) J. Borovansky, *Sb. Lek.*, **1994**, *95*, 309.
- 63) B.J. Panessa, J.A. Zadunaisky, *Exp. Eye Res.*, **1981**, *32*, 593.
- 64) M.B.H. Youdim, P. Riederer, *J. Neural Transm.: Gen. Sect.*, **1993**, 57.
- 65) L. Zecca, T. Shima, A. Stroppolo, C. Goj, G.A. Battiston, R. Gerbasi, T. Sarna, H.M. Swartz, *Neuroscience*, **1996**, *73*, 407.
- 66) C. Sarzanini, E. Mentasti, O. Abollino, M. Fasano, S. Aime, *Mar. Chem.*, **1992**, *39*, 243.
- 67) D. Sulzer, J. Bogulavsky, K.E. Larsen, G. Behr, E. Karatekin, M.H. Kleinman, N. Turro, D. Krantz, R.H. Edwards, L.A. Greene, L. Zecca, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, *97*, 11869.
- 68) M.J. Hoogduijn, N.P. Smit, A. van der Laarse, A.F. van der Niewpoort, J.M. Wood, A.J. Thody, *Pigm. Cell Res.*, **2003**, *16*, 127.
- 69) L. Hong, J.D. Simon, *Photochem. Photobiol.*, **2006**, *82*, 1265.
- 70) L. Hong, Y. Liu, J.D. Simon, *Photochem. Photobiol.*, **2004**, *80*, 477.
- 71) L. Hong, J.D. Simon, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, *28*, 7938.
- 72) B. Pilas, T. Sarna, B. Kalyanaraman, H.M. Swartz, *Free Radical Biol. Mol.*, **1988**, *4*, 285.
- 73) P. Meredith, S. Subianto, G. Will, *PCT Int. Appl.*, **2005**, 22.
- 74) K.J. Lawrie, P. Meredith, R.P. McGeary, *Photochem. Photobiol.*, **2008**, *84*, 632.
- 75) J.P. Bothma, J. de Boor, U. Divakar, P.E. Schenn, P. Meredith, *Adv. Matter.*, **2008**, *20*, 3539.
- 76) J. Sedo, J. Saiz-Poseu, F. Busque, D. Ruiz-Molina, *Adv. Matter*, **2013**, *25*, 653.



CAPÍTULO II

Materiales y Métodos Experimentales

II. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

II.1. Reactivos y disoluciones

- Disolución de hidróxido sódico, NaOH, 0,1 M preparada a partir de hidróxido sódico, MERCK^(R) de 99% de pureza.
- Disolución de ácido perclórico, HClO₄, 0,1 M preparada a partir de ácido perclórico (70-72% de riqueza y densidad 1,67 g cm⁻³), MERCK^(R) p.a.
- Tampón fosfato, elaborado a partir de NaH₂PO₄·2H₂O y Na₂HPO₄·12H₂O, PANREAC^(R), para conseguir pH = 7,4, medido con pH-metro.
- Disolución 1,0 M y 1 mM de la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTANa₂), PANREAC^(R) del 99% de pureza.
- Las disoluciones de peróxido de hidrógeno, H₂O₂, PANREAC^(R), en NaOH, 0,1 M, se prepararon siempre justo antes de comenzar las medidas ciclovolta métricas. Esto debe hacerse así ya que el H₂O₂ en soluciones fuertemente alcalinas se descompone en pocas horas desprendiendo oxígeno.
- Tampón TRIS-HCl, elaborado a partir de tris (hidroximetil) aminometano (Sigma^(R)) y ácido clorhídrico, HCl, MERCK^(R) al 37%, para conseguir pH=7,4, medido con pH-metro.
- Disoluciones 1 mM de sulfato sódico, Na₂SO₄, PANREAC^(R) al 99% de pureza, y 1 mM de sulfato cúprico, CuSO₄, PANREAC^(R) al 99% de pureza, a pH = 9,0.
- Nonanotiol (NT), Sigma^(R) y dodecanotiol (DT), Sigma^(R).
- Etanol absoluto, MERCK^(R) p.a.
- Hexano, MERCK^(R) p.a.
- Tolueno, MERCK^(R) p.a.
- Hidrógeno tetracloroaurato (III) trihidratado HAuCl₄·3H₂O, Sigma^(R) al 99,99% de pureza.
- Borohidruro sódico, NaBH₄, Sigma^(R) al 96% de pureza.
- Bromuro de tetraoctilamonio, [CH₃(CH₂)₇]₄N⁺Br⁻; ToABr, Sigma^(R) al 98% de pureza.
- Disoluciones de 0,03 y 0,3 g/ L de melanina sintética, Sigma^(R) M8631.



II.2. Técnicas Experimentales

II.2.1. Microscopías de Barrido de Sonda

El concepto de microscopías de barrido de sonda, *SPM*, hace referencia a un grupo de técnicas que exhiben una característica común: la capacidad de controlar la posición tridimensional de una sonda (punta) con respecto a la superficie de una muestra mediante un sistema de movimiento perfectamente controlado, generalmente por medio de piezoeléctricos. Una vez establecida la señal, ésta es amplificada de forma lineal o logarítmica. Mientras el piezoeléctrico produce un barrido controlado de alta resolución en el plano X-Y, paralelo a la superficie de la muestra, un sistema de realimentación opera en el eje Z, controlando así la variación de altura a lo largo de cada barrido.

El primero de estos equipos fue el Microscopio de Efecto Túnel (*STM*) inventado por G. Binnig y H. Rohrer y colaboradores a principios de los años 80¹ que está basado en la medida de la corriente túnel que se establece entre una punta metálica y una muestra conductora cuando se encuentran suficientemente cerca.

En poco tiempo aparecieron otras técnicas basadas en el mismo principio de actuación, siendo las más extendidas:

- Microscopía de Fuerzas Atómicas (*AFM*): se basa en la medida de fuerzas de diferente naturaleza a nivel atómico tales como, van der Waals, electrostáticas, magnéticas, capilares, de fricción, etc.
- Microscopía de Barrido de Capacitancia (*SCAM*): su fundamento radica en la medida de la capacidad, la cual es inversamente proporcional a la distancia entre la punta y la muestra.
- Microscopía de Barrido Térmico (*SNTM*): permite la obtención de un mapa superficial de aislantes y conductores basándose en la medida de la interacción térmica entre la punta y la muestra.
- Microscopio de Barrido Electroquímico (*SECM*): mide la corriente faradáica que fluye entre un pequeño electrodo y una muestra conductora o semiconductor, estando ambos inmersos en una disolución de un electrolito.



II.2.1.1. Microscopía de Efecto Túnel

II.2.1.1.1. Fundamentos teóricos del STM: Teoría de la microscopía de efecto túnel

De forma muy resumida, en STM una punta metálica muy aguda se dispone muy cerca de una superficie conductora aplicándose entre ellas un voltaje V_t . Cuando la separación entre la punta y la muestra es lo suficientemente pequeña, fluye una corriente I_t de naturaleza cuántica entre ambas. La distancia típica entre punta y muestra es, bajo estas condiciones, del orden de varios diámetros atómicos y el transporte de electrones ocurre mediante efecto túnel.

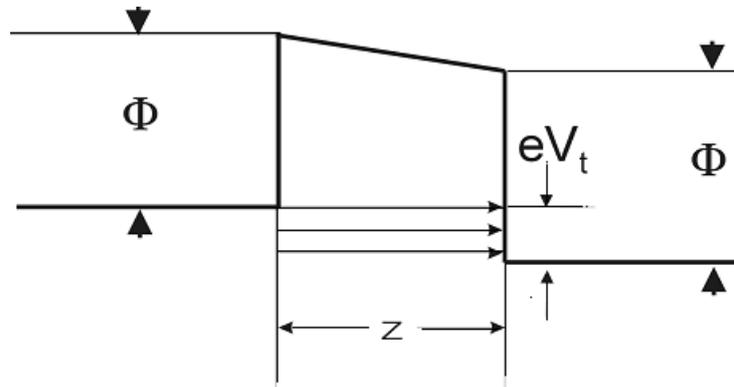


Figura II.1. Diagrama de energía de un gap de corriente túnel idealizado. No se ha tenido en cuenta el efecto de la carga.

Cuando el módulo del potencial aplicado $|V_t|$ es pequeño comparado con la magnitud de la función trabajo Φ , la barrera túnel es prácticamente rectangular con un ancho z y un altura dada por la función trabajo Φ , tal y como se muestra en la Figura II.1. De acuerdo con la mecánica cuántica, la corriente túnel viene dada por:

$$I_t = I_0 e^{-2\kappa z} \quad (1)$$

siendo I_0 función del voltaje aplicado y de la densidad de estados tanto en la punta como en la muestra y

$$\kappa = \sqrt{2m\phi} / \hbar \quad (2)$$



donde m es la masa del electrón, \hbar la constante de Planck y Φ es la función trabajo de los metales que está, en promedio, en torno a los 4-5 eV. Esto significa que $\kappa \approx 1 \text{ \AA}^{-1}$ y por ello un aumento en z de sólo 1 \AA , implica una disminución en más de un orden de magnitud de la corriente túnel. Esta fuerte dependencia entre corriente túnel y distancia es mayoritariamente soportada por el átomo más próximo a los átomos de la muestra y de ahí que, incluso con puntas no demasiado agudas, sea posible con relativa facilidad obtener resolución atómica en muestras planas.

Un amplificador operacional corriente-voltaje, de bajo ruido y corriente, transforma la corriente túnel en voltaje mediante una resistencia de retroalimentación de unos 100 M Ω , tal y como se muestra en la Figura II.2.

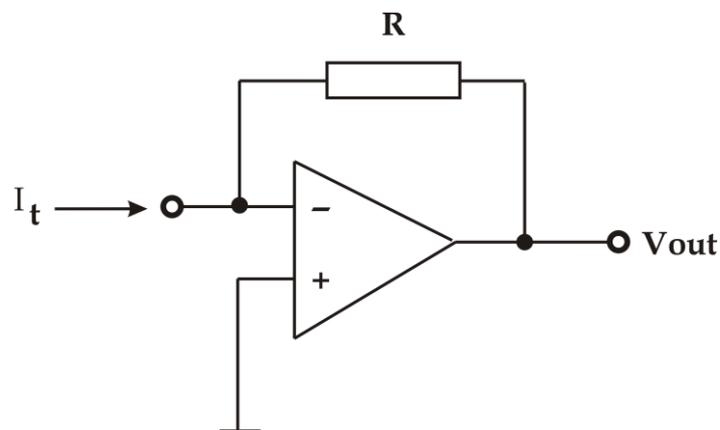


Figura II.2. Convertidor de corriente en voltaje para un STM. Consiste en un amplificador operacional con alta velocidad, bajo ruido y un input bajo de corriente, lo cual lo asemeja a una resistencia de retroalimentación. Típica impedancia de $R \approx 10^8$.

Finalmente, para terminar este apartado habría que hablar de la resolución del STM. La definición de resolución espacial en STM no es trivial, ya que sería necesario conocer lo que el instrumento mediría idealmente y esto no es obvio, ya que el STM no es una técnica solamente microscópica, sino también espectroscópica en el sentido de que las imágenes obtenidas dependen críticamente del potencial seleccionado, así como de la naturaleza de la punta y de la superficie. De acuerdo a Tersoff y Hamann,² la corrugación viene definida por:



$$\Delta = z_+ - z_- \quad (3)$$

donde z_+ y z_- representan los valores extremos del desplazamiento de la punta en un barrido de corriente constante.

La corrugación Δ disminuye exponencialmente con la distancia z desde la superficie:

$$\Delta \approx \frac{2}{\kappa} \exp(-2\sqrt{\kappa^2 + \frac{\pi^2}{a^2}} - \kappa)z \quad (4)$$

κ es la constante de decaimiento y a es la periodicidad de la superficie. Como se observa en esta expresión, la amplitud de corrugación depende críticamente de a . Para periodicidades grandes, $a \gg \pi/\kappa$, la amplitud de corrugación es grande y prácticamente independiente de la distancia punta-muestra.

En definitiva, en un STM, una señal de corriente se sigue con gran precisión a través de la superficie de una muestra modificando su relación con la distancia mínima que mantiene una punta metálica respecto de una muestra conductora. En otras palabras, la calidad de una imagen STM depende directamente del ruido (la imprecisión en la señal) de la medida de la corriente, δI , con respecto al ruido en la medida de la distancia, δz .



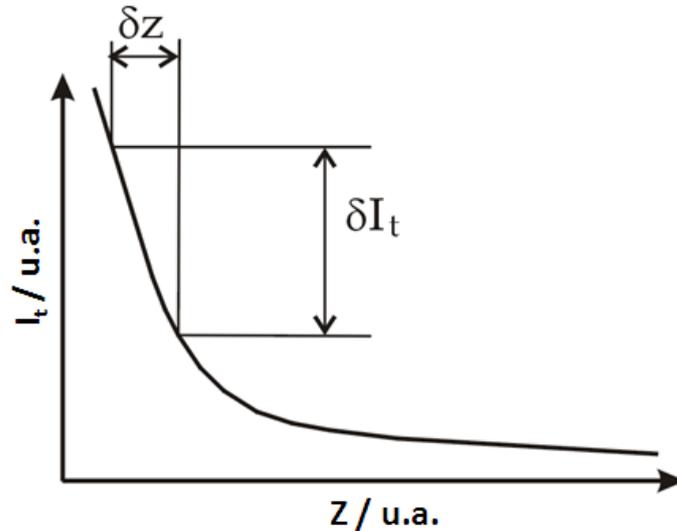


Figura II.3. Corriente túnel en función de la distancia, relación entre la imprecisión en la corriente δI y la imprecisión vertical δz . (unidades arbitrarias).

En la Figura II.3 se observa cualitativamente cómo la corriente túnel sigue una caída monotónica con la distancia³ y, para el tramo más lineal en distancias muy pequeñas, la imprecisión en z se expresa como:

$$\delta z = \frac{\delta I}{|\partial I / \partial z|} \quad (5)$$

En general, el ruido de la I es mucho menor que la pendiente del tramo lineal lo que explica la impresionante resolución de un STM. Obviamente, un equipo de estas características ha de venir equipado con un sistema de aislamiento de vibraciones mecánicas y acústicas especialmente eficaz. Sólo mediante un cuidadoso diseño de los componentes del microscopio y en conjunción con las mencionadas medidas de aislamiento mecánico y acústico que puedan adoptarse, es posible conseguir buenas imágenes.

II.2.1.1.2. Equipamiento

Los equipos SPM usados en la presente tesis doctoral, han sido el *NanoScope II E* y *NanoScope V*, comercializados por *Digital Instruments* (Santa Bárbara, California) en su versión de STM y AFM. En la Figura II.4 se muestran imágenes del dispositivo *NanoScope II E*, fig. II.4a, y, en detalle, la unidad de STM donde se produce la interacción punta-muestra:



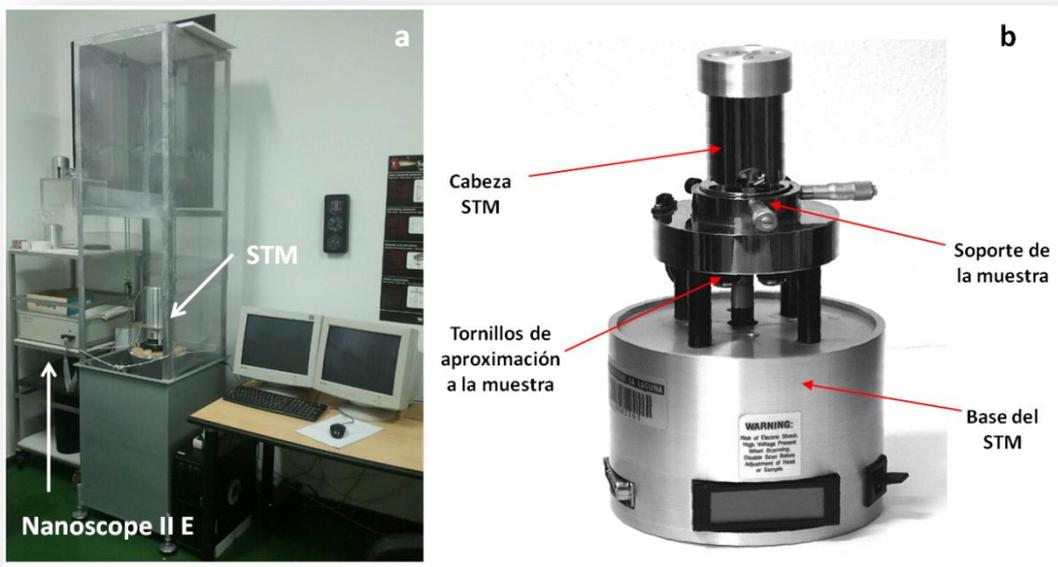


Figura II.4. Imágenes de la NanoScope II E (a) y de la unidad STM (b).

En la fig. II.4b pueden apreciarse las distintas partes de la unidad de STM donde destaca poderosamente la cabeza de barrido. A su vez, en la Fig. II.5, se destacan los diferentes constituyentes que definen dicho dispositivo:

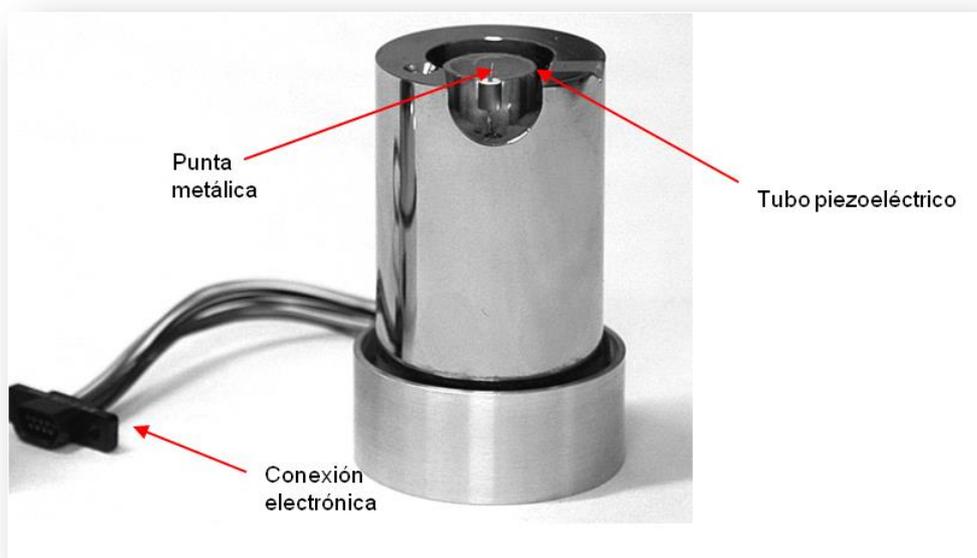


Figura II.5. Cabeza de barrido del STM.

Las puntas metálicas, como la que se muestra en la fig. II.5, tienen un diámetro de 0,25 mm y se fijan al sistema doblándolas ligeramente antes de introducirlas en el receptáculo de acero inoxidable.



Cuando se trabaja al aire o en condiciones de vacío, se usan materiales inertes, como por ejemplo metales nobles como Pt y Au que, en ocasiones, se alean con otros para aumentar su dureza. Las puntas empleadas en este estudio son de una de las aleaciones más usadas, Pt-Ir.

Así, la instrumentación habitual para todos los tipos de microscopios de campo cercano consta de dos componentes comunes: por un lado, la sonda, esto es, la punta que es el elemento que va a permitir interaccionar con la superficie a estudiar y, por otro, el sistema de retroalimentación que permitirá posicionar con gran precisión dicha sonda sobre la muestra, tanto lateral como verticalmente.⁴ Movimientos tan finos como los que limitan las resoluciones laterales y verticales, no son posibles mediante los dispositivos mecánicos habituales. Para ello, se usan unas cerámicas piezoeléctricas a modo de motores para obtener el apropiado movimiento en los tres ejes del espacio y el acercamiento de la punta.^{4,5} Materiales como éstos pueden convertir diferencias de potencial eléctrico desde 1 mV hasta 100 V en movimientos mecánicos que van desde distancias menores a 1 Å hasta varias decenas de micras.

El tubo piezoeléctrico como el que se exhibe en la fig. II.5 tiene un diámetro interno de 1,3 cm y se encuentra recubierto de una capa de poliuretano que minimiza las pérdidas de corriente que se puede producir bien por la humedad bien por contaminación.

II.2.1.1.3. Modos de operación en STM

En STM existen dos modos de operación: el modo de *corriente constante* y el modo de *altura constante*. Usando tanto uno como otro, se obtiene el mapa topográfico de la superficie. No obstante, la forma de obtener la información es diferente en cada uno de ellos:

1. El modo de *corriente constante*: es el más empleado. Un circuito de retroalimentación ajusta continuamente la altura z de la punta durante el barrido de la muestra, de forma que, en todo momento, la corriente túnel permanece siempre constante. Así, el movimiento de la punta va reproduciendo la topografía de la muestra recorriendo picos y valles en función de la corriente



túnel preestablecida. La altura z es ajustada aplicando un potencial U_z al piezoeléctrico responsable del movimiento en dicha dirección, mientras la punta barre la superficie de la muestra en las direcciones x e y , mediante la aplicación de potenciales U_x y U_y a los piezoeléctricos responsables de los movimientos en x e y , respectivamente. Por tanto, la señal $U_z(U_x, U_y)$ queda convenientemente registrada, obteniéndose así la topografía de la muestra $z(x, y)$. En la Figura II.6 se muestra cómo opera dicho modo:

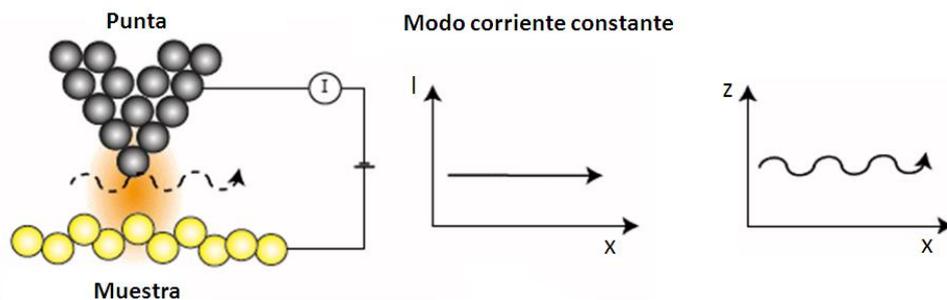


Figura II.6. Esquema del modo de corriente constante del STM.

2. El modo de altura constante: permite obtener velocidades de barrido superiores a las del modo de corriente constante. La punta barre la superficie de la muestra pero, en este caso, sin ajustar la altura, con el circuito de retroalimentación desconectado, registrándose así la corriente túnel a una altura constante en función de la posición $I_{tun}(x, y)$. La dependencia exponencial de la corriente túnel con la separación punta-muestra permite obtener la topografía de la superficie de la muestra con una alta sensibilidad, incluso a escala atómica. El modo de altura constante está limitado a muestras suficientemente lisas, ya que en el caso de que las muestras sean rugosas, se corre el riesgo de romper la punta contra la superficie de la muestra. Otro inconveniente que presenta el modo de altura constante, es que las imágenes obtenidas tienen unidades de corriente en el eje Z, lo que impide obtener la corrugación de la muestra, ya que se necesitaría conocer la altura local de la barrera. En la Figura II.7 se muestra como opera el modo de altura constante:



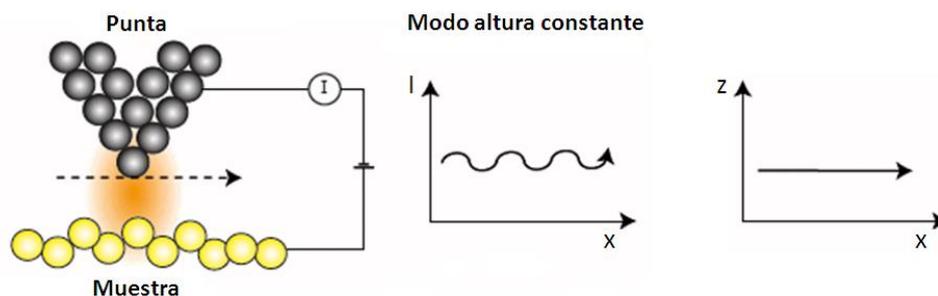


Figura II.7. Esquema del modo de altura constante del STM.

Generalmente, para barridos grandes, se emplea el modo de corriente constante, mientras que el de altura constante, se emplea para barridos pequeños y en superficies suficientemente lisas.

Para registrar las imágenes de la superficie del electrodo de trabajo se operó fundamentalmente en el modo de corriente constante al aire, *ex situ*, dado que tanto las películas de melanina como los propios sustratos son estables en la atmósfera. Se emplearon puntas de Pt-Ir, bien comerciales bien preparadas por *etching* electroquímico. Se recurrió a valores de corriente túnel entre 0,15-1,0 nA y entre 0,1-1,0 V de potencial *bias*. Las velocidades de barrido fueron generalmente del orden de los 0,5-3 Hz. En estas condiciones, se registraron imágenes de la superficie de las distintas muestras desde $5 \times 5 \text{ nm}^2$ hasta $10 \times 10 \text{ }\mu\text{m}^2$.

II.2.1.2. Microscopía de Fuerzas Atómicas

Con independencia de todas las ventajas que exhibe y de su espectacular resolución, el STM presenta la desventaja de que sólo permite el estudio de materiales conductores o semiconductores, dado que en materiales no conductores resulta prácticamente imposible mantener una corriente túnel. En este contexto y con la idea de sobrellevar las limitaciones descritas para el STM, nace la microscopía de fuerzas atómicas, AFM,⁶ que se basa en la monitorización de las fuerzas de interacción presentes entre átomos y moléculas. Tales fuerzas que pueden ser tanto de corto como de largo alcance, atractivas o repulsivas, están presentes en todos los materiales, de ahí el extenso rango de aplicación del AFM. Así, mediante la apropiada selección de la interacción entre punta y muestra a registrar, resulta posible obtener mapas



superficiales de un número significativo de propiedades físico-químicas como adhesión, fricción, módulo de Young, campos magnéticos y eléctricos, conductividad, etc. Este hecho junto a la posibilidad de poder trabajar en distintas y variadas condiciones (al aire, en líquidos, en ultra alto vacío, cámaras de temperatura, etc.) hacen del AFM una herramienta extraordinariamente versátil y multidisciplinar.⁷

Por tanto, la corriente túnel que circula entre punta y muestra en un STM queda sustituida en un AFM por un sensor a algún tipo de fuerza o interacción que pueda establecerse entre punta y muestra. Así, cuando la punta y la muestra están suficientemente cerca, comienzan a tener efecto las fuerzas de interacción entre ambas y se produce una flexión de la palanca (cantiléver) que sigue la ley de Hooke:

$$F = - K.x \quad (6)$$

F es la fuerza, x la flexión de la palanca y k es la constante de elasticidad de la palanca. Esta flexión de la palanca puede medirse con una alta sensibilidad colocando un sistema STM que usa la propia palanca como muestra o, más habitualmente, con otros métodos de detección como pueden ser los ópticos. De esta forma se obtiene un mapa topográfico de la superficie de la muestra manteniendo, por ejemplo, la fuerza de interacción constante mientras la muestra se mueve bajo la punta.

El AFM puede operar en "modo contacto", usando fuerzas comprendidas en el rango $10^{-8} - 10^{-10}$ N o en "modo no contacto", utilizando, en este caso, las fuerzas de van der Waals.

El componente crítico del AFM es la elasticidad de la palanca. Para alcanzar una sensibilidad alta se necesita tener una curvatura razonable para una fuerza dada, es por ello que la elasticidad de la palanca debería ser la mayor posible. Por otro lado, es necesaria una frecuencia de resonancia alta, para minimizar el efecto de las vibraciones mecánicas. La frecuencia de resonancia del sistema elástico viene dada por:



$$w_0 = \left(\frac{k}{m} \right)^{1/2} \quad (7)$$

En la que k es la constante de elasticidad de la palanca y m la masa eficaz.

Por tanto, se necesitan altas constantes de elasticidad y masas pequeñas, lo que conduce a pequeños tamaños de palanca y a las técnicas de micro-fabricación para las puntas AFM.

Actualmente las técnicas AFM permiten el uso de una gran cantidad de fuerzas: van der Waals, electrostáticas, repulsiones ión-ión, magnéticas, de fricción, etc. Así surgen las diferentes modalidades disponibles comercialmente en la actualidad.

II.2.1.2.1. Equipamiento

Los equipos SPM usados en la presente tesis doctoral, han sido el *NanoScope IIIa* y el *NanoScope V*, comercializados por *Digital Instruments* (Santa Bárbara, California) en su versión de STM y AFM. En la Figura II.8 se han destacado imágenes del dispositivo *NanoScope V*, fig. II.8a, y, en mayor detalle, la unidad de AFM donde la interacción punta-muestra tiene lugar:

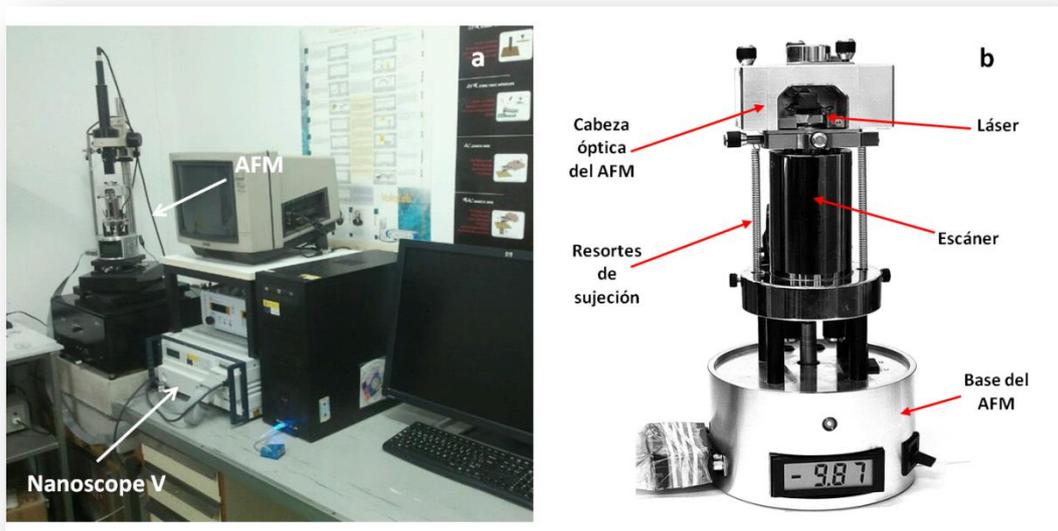


Figura II.8. Imágenes de la NanoScope V (a) y de la unidad de AFM (b).



A diferencia de lo que ocurre en el caso del STM, el piezoeléctrico no se encuentra en la cabeza sino que, en este caso, se halla ubicado bajo la muestra, de forma que la cabeza no se desplaza durante el análisis de la superficie objeto de estudio. La cabeza del AFM contiene, por un lado, el sistema de detección óptica que permite detectar los cambios inducidos sobre el cantiléver como consecuencia de la interacción con la muestra y, por otro, la punta convenientemente fijada en un soporte adecuado a tal fin. Esencialmente, se hace incidir sobre el cantiléver, en la parte opuesta a la punta, un haz láser, cuyo reflejo llega hasta un detector fotoeléctrico segmentado. Los cambios en el voltaje producidos en éste permiten conocer en todo momento la magnitud de la deflexión del cantiléver. Así, cuando se mide una muestra, la corrugación de ésta causa variaciones en la curvatura de la palanca, lo cual se refleja en una diferencia de reflexión en el láser que se detecta en el fotodiodo, tal y como se indica en la Figura II.9:

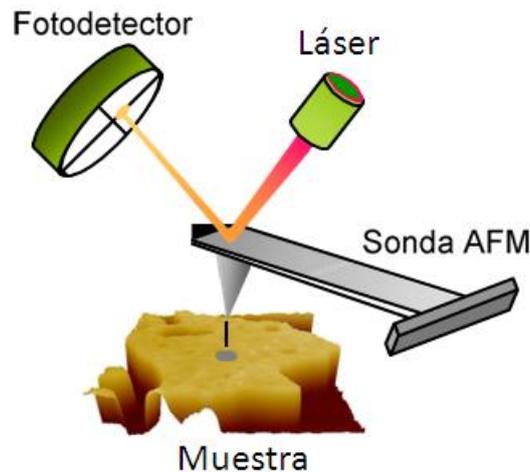


Figura II.9. Esquema del sensor óptico

La cabeza óptica permite ajustar la posición del láser y orientarlo hacia el fotodiodo por medio de un espejo. Dispone, además, de un juego de tornillos que permite mover la punta con respecto a la muestra en el plano XY.

El uso creciente de este tipo de técnicas junto a la imperiosa necesidad de obtener puntas de propiedades altamente reproducibles ha impulsado el desarrollo de la micro-fabricación en serie de las mismas. Así, en la actualidad, existe una extensísima variedad de tipos diferentes de puntas, materiales y diseños. En general, se usan puntas cónicas o piramidales integradas en



cantilévers de nitruro de silicio (Si_3N_4) o en óxido de silicio (SiO_2) de radios inferiores a 300 Å. También puede variar la forma de la palanca en la que se integra la punta, siendo quizás las más usadas las triangulares aunque también las hay rectangulares. Existen de hecho, en la actualidad, disponibles comercialmente, puntas de hasta 10 Å de radio. En la Figura II.10 se muestran imágenes de microscopía electrónica (SEM) de puntas de AFM:

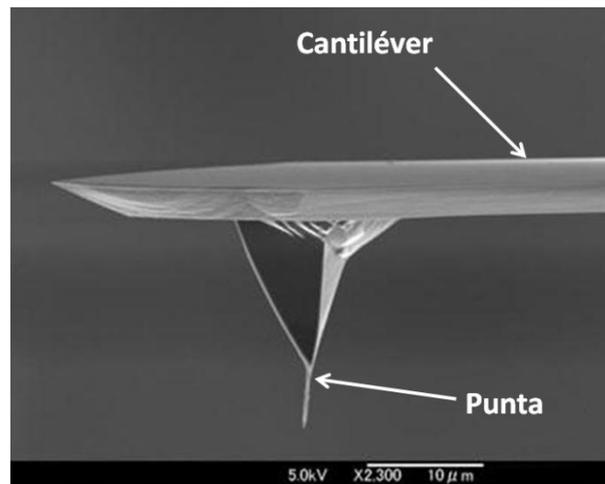


Figura II.10. Imagen de SEM de una de las puntas empleadas en la adquisición de imágenes de AFM.

Para las medidas de AFM llevadas a cabo en el presente trabajo de investigación se han empleado puntas modelo RTESP de Digital Instruments®, con 20-80 N/m de constante de fuerza y de 300 a 400 KHz de frecuencia resonante y FESP, con 1-5 N/m y de 60 a 100 KHz.

II.2.1.2.2. Modos de operación en AFM

La calidad de una imagen AFM, la veracidad de la información en ella contenida, los artefactos más habituales y la versatilidad enorme de estos equipos así como todas las formas bajo las que pueden usarse, dependen directamente de un aspecto fundamental que condiciona la calidad y el comportamiento de un equipo dado en cada momento: la curva de fuerzas.

Con objeto de entender, al menos intuitivamente, a qué se debe y cómo es una curva de fuerzas, así como qué información puede obtenerse de sus variaciones, se empleará un ejemplo sencillo admitiendo una energía potencial



de tipo Lennard-Jones como válida para expresar la interacción punta-muestra. El potencial Lennard-Jones puede expresarse como:

$$V(z) = + 4\varepsilon \left[\left(\frac{\sigma}{z} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{z} \right)^6 \right] \quad (8)$$

La energía potencial se compone de dos términos de signos opuesto: uno que representa a las interacciones atractivas entre dos partículas, proporcional a z^{-6} , y otro repulsivo proporcional a z^{-12} . En la Figura II.11 se muestra la dependencia del potencial con la distancia:

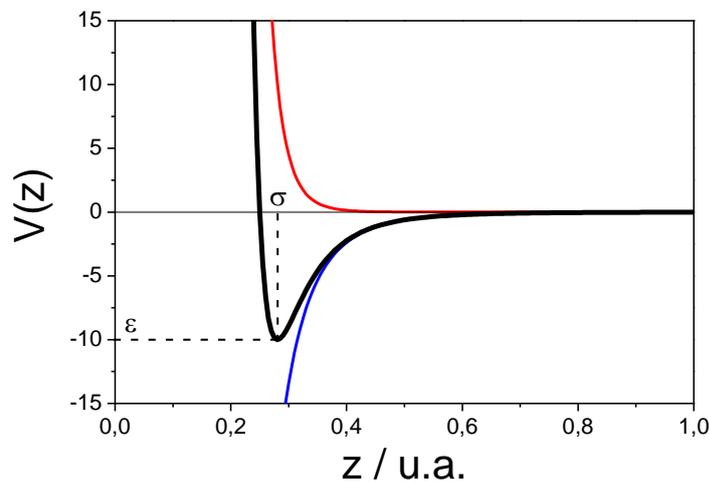


Figura II.11 Curva de energía potencial en función de la distancia (en color negro). Término atractivo de la energía potencial (en azul), término repulsivo (rojo).

En color negro se exhibe la dependencia de la energía potencial desarrollada (V), en este caso, entre punta y muestra, con la distancia (z). En azul se muestra la componente atractiva de esta energía, representada en la ecuación (8) por un término negativo. Se observa cómo a medida que z decrece, esta componente va disminuyendo su valor hasta una distancia en la que la componente atractiva tiende asintóticamente a $-\infty$. Al mismo tiempo, al acortar la distancia entre las dos partículas, comienza a intervenir el término repulsivo de la energía potencial, en rojo, y, una vez superada una distancia mínima determinada, la energía de repulsión se hace enorme y tiende asintóticamente a $+\infty$. De esta manera, la curva de energía potencial muestra



un mínimo de valor $-\varepsilon$, a una distancia determinada, σ , entre dos partículas. Así, a valores de z superiores a ese mínimo predomina la atracción. Por el contrario, a z de menor magnitud predominan las interacciones repulsivas entre partículas.

Si se tiene en cuenta que la fuerza de interacción entre dos partículas se define como la variación del potencial con la distancia, cambiada de signo:

$$F = - \frac{\partial V}{\partial z} \quad (9)$$

A partir de la ecuación (9) se obtendría la curva de fuerzas, representada en la Figura II.12, que describe cómo varían las fuerzas de interacción entre punta y muestra con la distancia entre ellas, z .

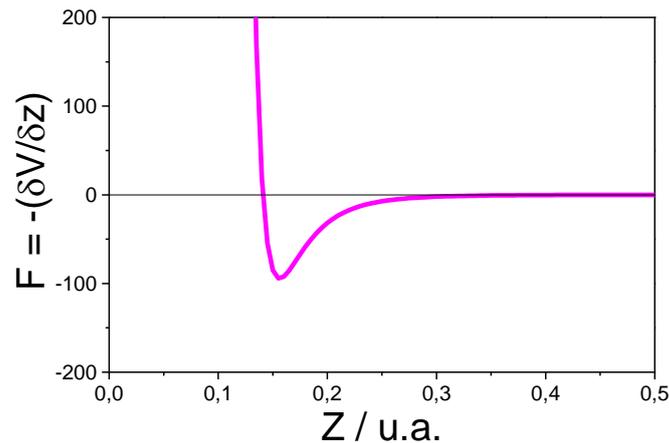


Figura II.12. Curva de fuerzas punta muestra

Atendiendo al tipo de fuerzas detectadas por el AFM y a la distancia punta-muestra, pueden distinguirse dos modos principales de trabajo denominados *modo estático* y *modo dinámico*:⁸

1. Modo estático: AFM de contacto. En este modo de operación, más comúnmente conocido como modo de contacto, el extremo de la punta se encuentra permanentemente en contacto físico con la superficie de la muestra. Las fuerzas de interacción existentes entre ambas dan lugar a una deflexión vertical en el cantiléver, cuya magnitud, determinada por la ley de elasticidad



de Hooke (6), depende tanto de la magnitud de la fuerza experimentada por la punta como de la constante de fuerza del cantiléver.⁹ Al desplazarse la punta sobre la superficie de la muestra, los perfiles topográficos de la misma producen variaciones de esta deflexión. Generalmente, en AFM de contacto se mantiene constante la fuerza de interacción punta-muestra durante la obtención de la imagen, por lo que se hace uso de la deflexión del cantiléver como señal de retroalimentación. De este modo, los ajustes de la posición vertical del escáner durante el barrido para mantener constante el valor de la deflexión darán lugar a la imagen topográfica de la superficie. En el caso de emplear puntas conductoras, esta técnica permitiría, además, analizar las propiedades eléctricas de la muestra.

Sin embargo, el contacto prolongado entre punta y muestra convierte a esta variante del AFM en un método notablemente invasivo, haciendo que muestras delicadas, especialmente las de origen biológico, puedan resultar fácilmente dañadas y/o arrastradas por la punta.

2. Modo dinámico: Con la intención de atenuar los efectos invasivos descritos anteriormente para la modalidad de AFM de contacto, se desarrollaron los modos dinámicos en los que no se permite un contacto continuo entre punta y muestra.¹⁰ Esto se llevó a cabo mediante el acoplamiento del cantiléver a un oscilador piezoeléctrico que es excitado eléctricamente a una frecuencia ligeramente menor que su frecuencia de resonancia libre (esto es, la exhibida por el cantiléver en ausencia de interacción con la muestra) que, normalmente, se encuentra comprendida entre 10-500 KHz.

La amplitud, fase o frecuencia de oscilación del cantiléver son pues parámetros sensibles a la interacción entre la punta oscilante y la muestra, pudiendo utilizar el circuito de retroalimentación a cualquiera de ellos como variable en función de la cual estudiar la topografía durante el barrido de la superficie de la muestra.¹¹ Normalmente se emplean la frecuencia de oscilación en el modo de modulación de frecuencia (*FM-AFM*) o la amplitud en el de modulación de la amplitud (*AM-AFM*).



La técnica AM-AFM, también denominada de contacto intermitente, resonante o, más comúnmente, *tapping*, ha sido el modo habitualmente empleado en la obtención de las imágenes que se muestran en la presente tesis doctoral. En este modo el cantiléver se hace vibrar a una frecuencia próxima a su frecuencia natural de resonancia, entre 60-400 KHz. En esta aplicación, la punta está en contacto intermitente con la superficie a la vez que la barre. Es entonces, tal y como se ha dicho, la variación de la amplitud de oscilación de la punta, debida a la amortiguación que experimenta como consecuencia de la interacción con la superficie, la variable de la que se hace uso como señal de control. Durante el movimiento oscilatorio que describe el cantiléver, en su interacción con la superficie de la muestra, la punta atravesará regiones en las que rigen fuerzas atractivas de largo alcance y otras en las que, por el contrario, permanece sometida a fuerzas repulsivas de corto alcance. Hay que decir que la magnitud de las amplitudes de oscilación que experimenta la punta en tales condiciones hace que, a diferencia de lo que ocurre en AFM contacto, la punta se adhiera difícilmente a la superficie de la muestra. Esto permite, por tanto, que sea posible minimizar la influencia de las fuerzas laterales y de fricción, favoreciendo así una mejor resolución lateral, e incluso de las verticales de forma que la muestra se ve apreciablemente menos afectada por la interacción con la punta. Como resultado de lo expuesto, es habitual el uso del *tapping* para caracterizar muestras “blandas” como podrían ser los sistemas biológicos y polímeros, sin que tengan lugar, por supuesto, daños severos en los mismos durante la medida.¹²

II.2.1.3. Espectroscopias SPM

Tal y como se ha venido diciendo, estas técnicas SPM tienen su origen en la monitorización de una señal de distintas características asociada a las fuerzas de interacción que se producen entre la punta o sonda y la muestra de interés. En esta línea de razonamiento, resulta posible recabar información precisa acerca de alguna de estas magnitudes en función del voltaje o de la distancia existente entre punta y muestra, en puntos concretos de la superficie. De ahí surge el concepto de espectroscopias SPM, entre las que se destacan principalmente:



1. Espectroscopía de Efecto Túnel (STS). En esta modalidad se estudia la variación de corriente túnel con el potencial aplicado para una posición y una distancia punta-muestra prefijadas, las cuales no se ven alteradas durante la medida. En estas condiciones resulta posible obtener información acerca de la estructura electrónica del sustrato, esto es de la densidad local de estados electrónicos, del *gap* de semiconducción, etc., a partir de las curvas I-V y, especialmente, de las curvas dI/dV -V, o sea, conductancia frente a voltaje, resultantes.

En particular y de interés creciente resultaría la obtención de medidas STM de adsorbatos moleculares que puede ser justificada en términos de lo expuesto en la Figura II.13 en la que los orbitales frontera (*HOMO* y *LUMO*) del adsorbato pueden dar lugar a un aumento en la corriente túnel si éstos están energéticamente próximos a los estados electrónicos del sustrato implicados en la unión túnel. Esto se debe a que, en estas condiciones, se establecen nuevas vías adicionales para la circulación de los electrones túnel en comparación a las que habría en ausencia del adsorbato.

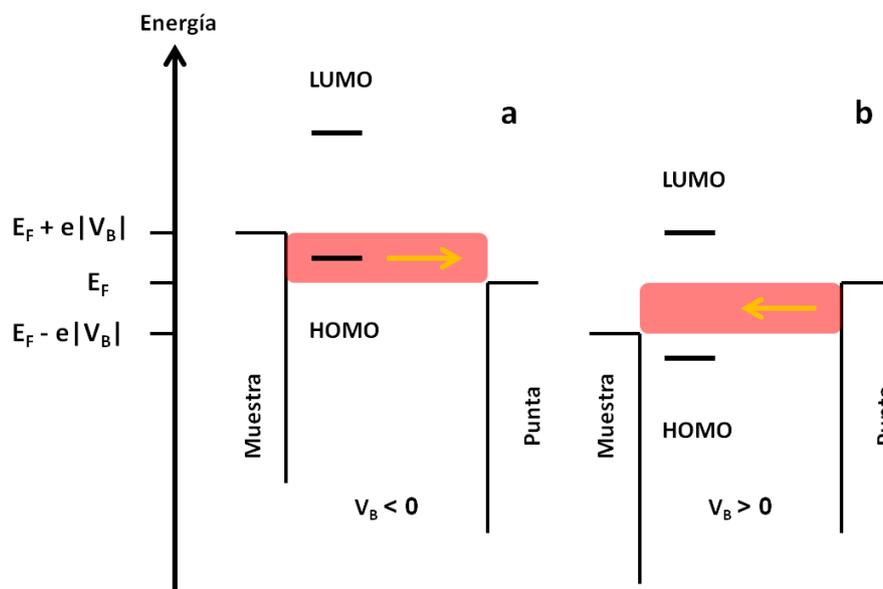


Figura II.13. Esquema que ilustra la transferencia electrónica en STM. En el caso en que el voltaje de la muestra respecto a la punta sea negativo, $V_B < 0$, los electrones fluirían desde los estados ocupados de la muestra hacia los estados desocupados de la punta (a). Por el contrario, si se invirtiera la polaridad del voltaje, esto es, $V_B > 0$, el flujo de electrones tendría lugar desde los estados ocupados de la punta hacia los estados desocupados de la muestra (b). El HOMO del adsorbato está más próximo al nivel de Fermi del sustrato (E_F) que el LUMO.



Así, la corriente túnel que se registra en sistemas en los que existen moléculas entre punta y sustrato depende de la densidad local de estados electrónicos de la punta, de la muestra y del adsorbato molecular en cuestión, sus energías relativas y, por supuesto, su posición espacial, así como del potencial aplicado. Las medidas de curvas I-V características para una distancia relativa punta-muestra determinada suministran acceso directo a las propiedades electrónicas de la molécula. De hecho, la simetría (o asimetría) de dichas curvas se justifica en función del alineamiento de los niveles energéticos entre los orbitales HOMO y LUMO del adsorbato y los niveles de Fermi de la punta y el sustrato. Como ejemplo de lo anterior, en la fig. II.13 se ha representado una situación en la que el HOMO de la molécula adsorbida está más próximo al nivel de Fermi del sustrato que el LUMO. A voltajes aplicados a la muestra suficientemente negativos, fig. II.13a, tiene lugar una contribución electrónica procedente de los estados llenos del HOMO de la molécula que da lugar a un consiguiente aumento en la corriente túnel. Por el contrario, al mismo potencial aplicado a la muestra pero de signo contrario, no se detectaría contribución alguna procedente del LUMO.¹⁴ Como consecuencia, se obtendría una curva I-V asimétrica con corrientes mayores a potenciales bias aplicados a la muestra, análoga a la que se muestra en la Figura II.14:

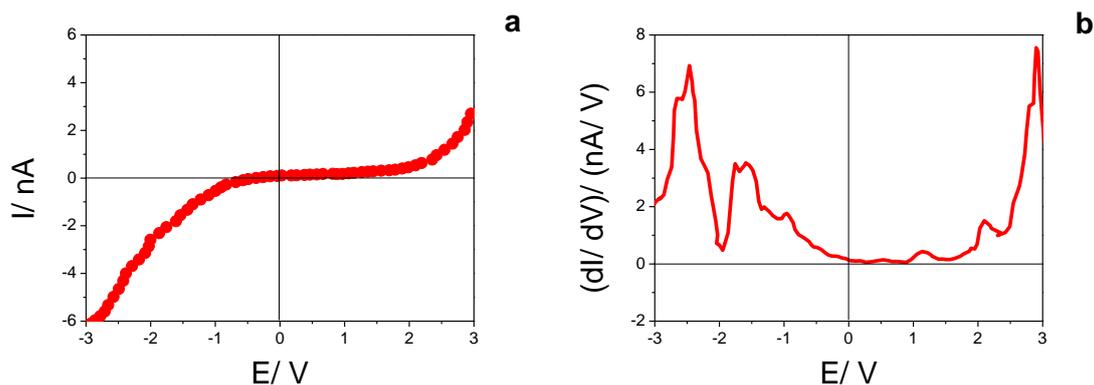


Figura II.14. (a) Ejemplo de curva I-V resultante de la situación descrita en la fig. 13. (b) Curva de conductancia diferencial, dI/dV , obtenida a partir de los datos exhibidos en (a).

Por su parte, la curva de conductancia diferencial, fig. II.14 b, vendría a ser un reflejo de la densidad local de estados electrónicos (LDOS).¹⁵



2. Espectroscopía de Fuerzas (FS). La FS consiste en adquirir una curva de fuerzas en función del desplazamiento del piezoeléctrico (Δz) que aproxima la punta a la muestra y permite su análisis en un punto determinado.¹³ Las principales ventajas que presenta esta técnica son:

2.1. Inmediatamente antes y después de la adquisición de la curva, se puede obtener una imagen de alta resolución pudiendo observar la huella residual producida.

2.2. La fuerza aplicada puede ser del orden de los nN (10^{-9} N) o pN (10^{-12} N). Por consiguiente, se pueden determinar de forma precisa el módulo de Young (E) y otras propiedades características del material, tales como deformación, energía de disipación, fuerzas de adhesión y demás, a una fuerza dada, toda vez que se pueden obtener curvas totalmente elásticas sin producir deformaciones permanentes en el material. Así, en la Figura II.15 se han representado diferentes magnitudes de interés, concernientes a las propiedades nanomecánicas de los materiales, que pueden ser extraídas a partir de los perfiles característicos de estas curvas:



Figura II.15. Esquema que describe la interacción entre la sonda AFM y la superficie de la muestra para una fuerza dada o un desplazamiento del piezoeléctrico determinado.

De hecho, en este diagrama se muestra la información cuantitativa que se podría deducir sobre el sistema objeto de estudio a partir de la obtención de la curva de fuerzas de la muestra.



II.2.1.4. Microscopía de Fuerzas Magnéticas (MFM)

La utilización del modo resonante en AFM para la obtención de imágenes nanoscópicas ofrece diversas posibilidades a la hora de obtener información sensible a partir de una muestra. La inmensa mayoría de casos se concentra en la obtención de la topografía a través del control sobre la amplitud de la señal sinusoidal impuesta a la sonda, generándose así información 3D de la superficie de la muestra. Al mismo tiempo, el modo resonante en AFM permite extraer igualmente información de gran valor a través del cambio registrado, no en la amplitud de la señal sino en la fase de la misma, tal y como se muestra de la Figura II.16:

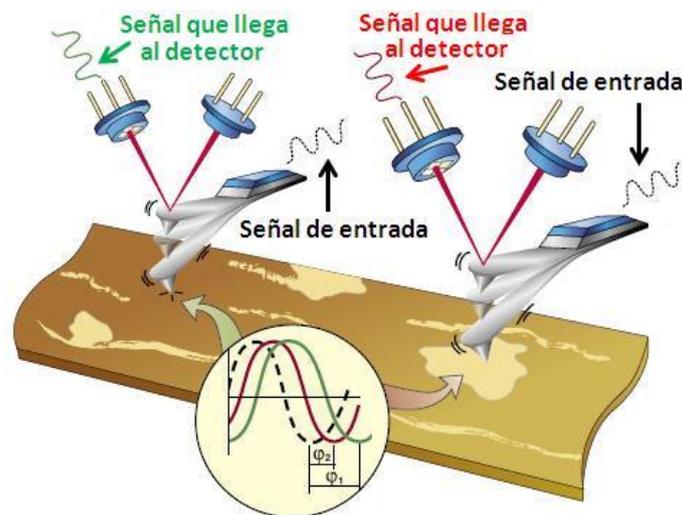


Figura II.16. Cambio de fase que se produce en la oscilación del cantiléver, operando en AFM en modo resonante como consecuencia de la interacción con regiones de la muestra de distinta naturaleza.

Es decir, si se produce un cambio en la fase de la señal a lo largo de un barrido en el eje X, éste puede ser monitorizado y registrado en cada línea de barrido. De esta manera aparece lo que se conoce como imagen de contraste de fase. Así, si en una muestra coinciden zonas de distinta naturaleza (diferencias en dureza, composición química, resistencia a la deformación, adhesión, etc.) la imagen topográfica no nos indicará demasiado acerca de esas diferencias. Sin embargo, la imagen en contraste de fase puede resultar altamente sensible.



Un ejemplo en donde el contraste de fase resulta de enorme aplicación es aquel en el que la muestra posea dominios magnéticos alojados en su superficie. Si se registra una imagen topográfica de una superficie en la que existen dominios magnéticos con una punta convencional, no se detectará información relevante alguna. En cambio, si se usa una punta recubierta de un material ferromagnético (generalmente una aleación de Co-Cr), entonces cuando la punta barra una zona no magnetizada responderá exclusivamente a su topografía, pero cuando pase por un área con dominios magnéticos responderá, además de a su topografía, al contraste de fase provocado por la interacción de naturaleza magnética de largo alcance entre punta y muestra.¹⁶

Resulta obvio que si bien la imagen topográfica no se verá afectada por esta interacción magnética, de largo alcance, la imagen de contraste de fase, en estas condiciones, queda totalmente interferida de la topografía de la muestra.

Para solucionar este problema existen diversas técnicas, pero una de las mejores, incorporadas en el propio software del AFM es lo que se conoce como AFM en modo entrecruzado-elevado (modo *interleave-lift*). Esta modalidad de operación consiste en lo siguiente: cada línea de barrido en el eje X de la muestra es realizado en realidad dos veces. La primera bajo condiciones de modo resonante de manera que la punta está bajo la influencia de las fuerzas atractivas de van der Waals o bajo la interacción de fuerzas de repulsión, lo que, como ya se ha explicado ampliamente, permite reflejar fielmente la topografía de la muestra. Entonces la punta es elevada a una altura considerable, de entre 10 a 200 nm, por encima de la muestra y vuelve a realizar el mismo barrido, en la misma línea, pero ahora registrando únicamente el contraste de fase que se observa. Nótese que la altura añadida se suma por igual a la altura de cada uno de los puntos del barrido topográfico hecho previamente. Si la altura sumada es insuficiente, la imagen de contraste de fase estará siempre contaminada de la topografía, pero en general por encima de los 10 a 30 nm de altura, este efecto desaparece por completo. En la Figura II.17 se muestra un esquema de todo ello:



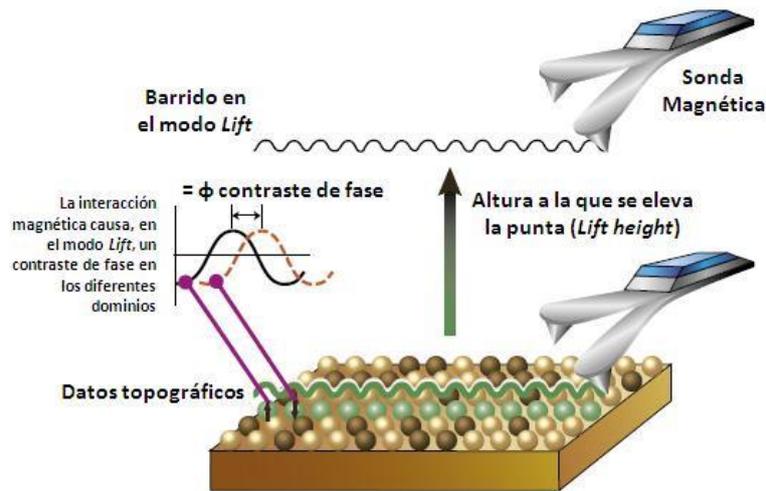


Figura II.17. Esquema del modo de operación en MFM. En primer lugar se mide cerca de la muestra obteniendo el resultado de la interacción con fuerzas de corto alcance. Entonces se aleja la punta de la muestra y se repite el barrido inicial de manera que sólo actúan sobre la punta fuerzas de largo alcance como las magnéticas.

A alturas de mayor magnitud no hay esencialmente interacción posible que dependa de la topografía, pero en cambio una interacción magnética punta-muestra sí que se extiende durante una distancia considerable y es capaz de alterar la fase de oscilación de la punta. El AFM en modo resonante equipado con puntas con recubrimiento ferromagnético y con la posibilidad del modo *lift* se convierte de hecho en una nueva microscopía llamada Microscopía de Fuerzas Magnéticas, MFM. Existe en el mercado un sistema exclusivamente dedicado a medidas MFM que añade a todo lo anterior la posibilidad de generar campos magnéticos altamente controlados en dirección e intensidad para magnetizar la muestra a conveniencia.

En la Figura II.18 se muestra, a modo de ejemplo ilustrativo, el resultado de las medidas llevadas a cabo por MFM sobre un dispositivo comercial de grabación magnética (que contiene nanopartículas de óxido de hierro inmersas en un polímero diamagnético). Así, en las fig. II.18a y II.18b se exhiben la imagen topográfica y su correspondiente imagen de contraste de fase, respectivamente. Por su parte, en la fig. 18c se ha representado la imagen de contraste de fase obtenida en el modo *Lift*, esto es la imagen resultante de elevar la punta magnética, tras cada línea de barrido que dan lugar a las imágenes (a) y (b), 50 nm sobre la muestra y hacerla reproducir, en este



segundo paso sobre la superficie de la muestra, la topografía registrada en el primer barrido. De esta forma, es posible asegurar que la distancia relativa punta-muestra sea la misma en cada punto de la medida de índole magnético.

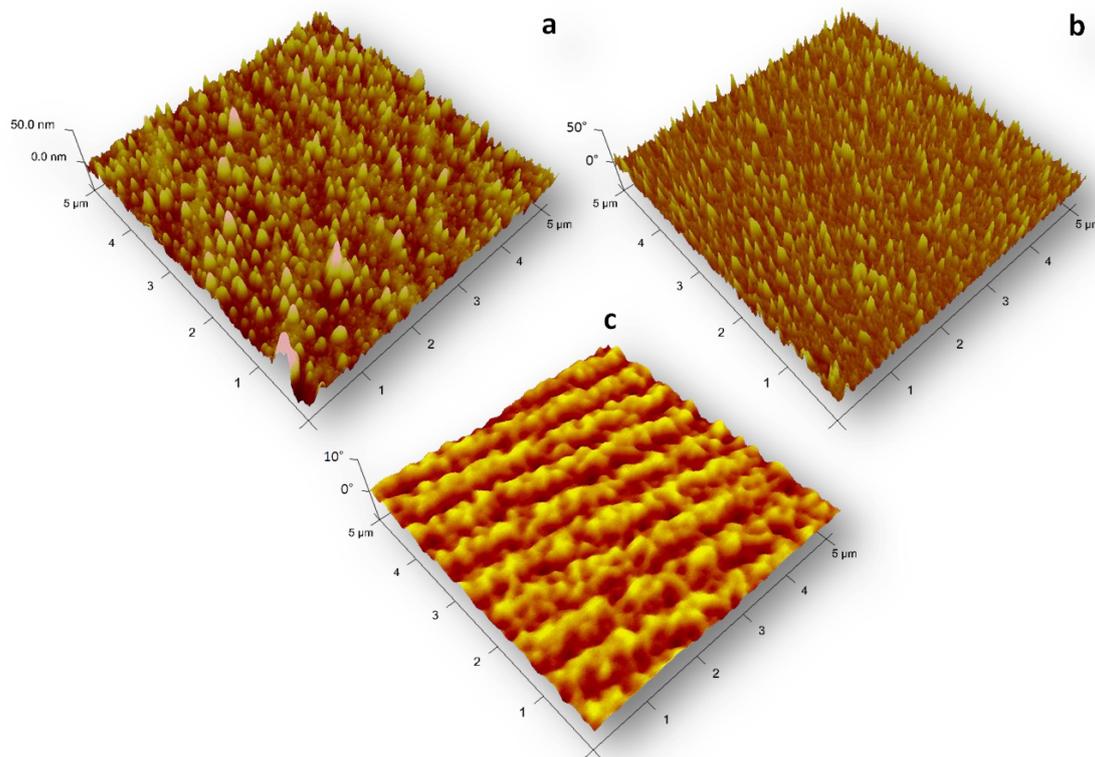


Figura II.18. Imágenes AFM tapping de $5,0 \times 5,0 \mu\text{m}^2$ de una cinta comercial de grabación magnética: topografía (a) y contraste de fase (b). Imagen MFM obtenida simultáneamente a (a) y (b), en el modo Lift, a una altura de 50 nm.

En cualquier caso, a la vista de la fig. II.18c es posible concluir, para este dispositivo magnético de almacenamiento de datos, la presencia de dominios magnéticos paralelos y longitudinales, a modo de bandas, con signos de contraste de fase alternados, en el plano de la muestra.

En general la información que podría extraerse de este sistema en virtud de las imágenes mostradas sería la siguiente:

1. Las estructuras presentes en las imágenes fig. II.18a y fig. II.18b son debidas a la interacción entre la punta y muestra, fundamentalmente fuerzas de van der



Waals, de corto alcance, ya que su influencia casi desaparece o, al menos se atenúa significativamente, cuando la punta se eleva 50 nm sobre la superficie de la muestra, fig. II.18c. Constituyen, por tanto, la verdadera topografía de la muestra.

2. La distribución de bandas presente en la imagen MFM, fig. II.18c, se origina como consecuencia de la interacción entre el momento magnético de la punta y el campo de dispersión de los dominios magnéticos previamente grabados en el dispositivo. Admitiendo que la orientación del momento magnético de la punta se halla en la dirección perpendicular a la muestra, las áreas brillantes y las oscuras representan campos magnéticos residuales que entran y salen de la superficie de la muestra, respectivamente.

A modo de resumen, se puede concluir que, en MFM, la muestra es barrida por una punta ferromagnética que es mantenida a una cierta distancia constante por encima de su superficie. Así, la interacción de índole magnetostático que surge entre el campo de dispersión debido a la estructura de dominios magnéticos presente en el plano de la muestra y el momento magnético de la punta puede ser registrada con una escasa contribución de la topografía de la muestra.¹⁷

II.2.2. Microscopía electrónica

II.2.2.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM) con microanálisis de rayos X (EDX)

Un Microscopio electrónico de barrido permite obtener imágenes topográficas de elevada resolución, a partir de los electrones secundarios generados tras la interacción de un haz de electrones acelerados, provenientes de un cátodo, con la muestra objeto de estudio.¹⁸ La interacción de los electrones incidentes con la superficie de la muestra produce una serie de radiaciones secundarias: electrones secundarios, electrones retrodispersados, electrones transmitidos, radiación X, electrones Auger, catodoluminiscencia y energía absorbida (por la muestra). La utilización de unas u otras nos permite obtener información relevante de diferente índole sobre la muestra.



De todas las formas de radiación resultantes de la interacción entre el haz incidente y la muestra hay dos realmente fundamentales en el microscopio de barrido: los electrones secundarios y los electrones retrodispersados. Los primeros son electrones de baja energía (decenas de eV) que resultan de la emisión por parte de los átomos constituyentes de la muestra (los más cercanos a la superficie) debido a la colisión con el haz incidente. Los electrones retrodispersados sin embargo, son electrones del haz incidente que han interactuado con los átomos de la muestra y han sido reflejados. La intensidad de ambas emisiones varía en función del ángulo que forma el haz incidente con la superficie del material, es decir, depende del perfil topográfico de la muestra. Estos electrones son muy sensibles a la topografía de la muestra debido al pequeño volumen de generación del que proceden. Esta distancia varía aproximadamente entre 1 y 5 nm en metales, siendo un orden de magnitud superior en el caso de materiales aislantes. Por lo tanto, se utilizan para generar imágenes, tras ser recogidos mediante un detector sincronizado con el barrido del haz del microscopio. El control del barrido, colimación y enfoque del haz se lleva a cabo mediante un sistema de lentes magnéticas dispuestas en el interior del microscopio, que trabaja en condiciones de alto vacío ($\sim 10^{-6}$ Torr).

Por otro lado, como se ha dicho, al excitar la muestra con el haz de electrones también se producen rayos X. La energía de la radiación emitida es característica del átomo que la emite por lo que, analizando adecuadamente la energía de los fotones emitidos por la muestra, es posible conocer la composición química de la misma. Por tanto, se puede bien analizar la composición promedio de todo el área barrida por el haz de electrones o bien, sincronizando el barrido con la detección de rayos X, realizar un mapa de composición diferencial.

Los rayos X característicos se excitan en la región del material en la que la energía de los electrones incidentes es mayor que la energía de ionización de la capa electrónica involucrada en la emisión. Por tanto, la resolución espacial de la técnica de EDX, típicamente del orden de unidades de μm , es bastante peor que el diámetro del haz.



Las imágenes y los análisis de la composición química de las muestras que se exhiben en la presente memoria se han registrado por medio de un SEM JEOL 6300.

II.2.2.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La técnica de microscopía electrónica de transmisión permite obtener imágenes de alta resolución a partir del análisis de los electrones de alta energía que atraviesan la muestra.¹⁹ Los microscopios electrónicos más sencillos constan de dos lentes formadoras de la imagen de forma muy parecida a los microscopios ópticos convencionales. La iluminación proviene de un cañón de electrones emitidos por un filamento de W o LaB₆. Los electrones son acelerados al aplicar un potencial negativo (100 kV - 1000 kV) y focalizados mediante dos lentes condensadoras sobre una muestra delgada, transparente a los electrones.

Después de pasar a través de la muestra, los electrones son recogidos y focalizados por la lente objetivo dentro de una imagen intermedia ampliada. La imagen es ampliada aún más gracias a las lentes proyectoras, las cuales controlan la ampliación de la imagen en la pantalla fluorescente. La imagen final se proyecta sobre una pantalla fluorescente o una película fotográfica.

Existen diferentes modos de formación de la imagen en un microscopio de transmisión: si la imagen se forma a partir del haz transmitido, que no ha sufrido dispersión, entonces la imagen del objeto es oscura sobre un fondo brillante. Si, por el contrario, se utilizan los electrones dispersados en este caso la imagen aparece brillante sobre un fondo oscuro. Por ello estas dos técnicas se denominan formación de imagen en campo claro y en campo oscuro, respectivamente. La primera es la más utilizada.

Esta técnica proporciona información relacionada con los posibles defectos presentes en los materiales, tales como dislocaciones, faltas de apilamiento, fronteras policristalinas o multifase e, incluso, cambios en la composición química, todo ello con una resolución altamente exaltada que dependerá del tipo de defecto y del material analizado.



Una modificación de esta técnica consiste en la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (*HRTEM*). En este caso, la imagen se genera mediante la interferencia de más de un haz difractado, de manera que aparece un contraste de fase con el que poder analizar la muestra con una resolución estructural por debajo de 0,2 nm.

En la caracterización de las dimensiones de las nanopartículas de Au estudiadas en esta tesis, se ha trabajado con un HRTEM Philips CM200.

II.2.3. Métodos electroquímicos

Las técnicas electroquímicas consisten fundamentalmente en aplicar una señal eléctrica al sistema objeto de interés lo que permite obtener información del mismo analizando la respuesta eléctrica que genera dicha señal. Mediante un potencióstato y, por medio de las diversas técnicas disponibles, se pueden aplicar los métodos electroquímicos más interesantes para cada sistema en particular, con lo que resulta posible realizar los estudios necesarios para la completa caracterización del mismo.

II.2.3.1. Modos de Operación

II.2.3.1.1. Voltametría Cíclica

La voltametría cíclica es una técnica electroquímica consistente en emplear una señal de potencial que varía con el tiempo de acuerdo a una función lineal. Permite estudiar las propiedades rédox de diversas sustancias químicas y la estructura de las interfases generadas.²⁰

Dado que no es posible experimentalmente disponer de una interfase aislada, se han de estudiar las propiedades de una colección de interfases denominada *celda electroquímica*. Estos sistemas están definidos por al menos dos electrodos y una solución electrolítica. El método de los tres electrodos es el más ampliamente utilizado. En tal método se usan un electrodo de referencia, *RE*, un electrodo de trabajo, *WE*, y un contraelectrodo, *CE*, inmersos en una solución. Se ha de contar, además, con un electrolito en la solución objeto de estudio para garantizar una suficiente conductividad. La combinación del disolvente, el electrolito y el material del electrodo de trabajo



específico condicionan el rango del potencial. Como el electrodo de referencia exhibe un potencial fijo y no circula corriente a través de este durante las medidas, cualquier cambio en el potencial aplicado a la celda modifica la polarización del electrodo de trabajo.

En la voltametría cíclica, el potencial aplicado se varía con el tiempo, a una velocidad ($\Delta E / \Delta t$) determinada. Para las medidas que se llevaron a cabo en la presente memoria, se utilizaron variaciones lineales como las que se muestran en la Figura II.19a, de modo que la curva de barrido es triangular: se comienza a un potencial dado, se alcanza un potencial final y luego se retorna al mismo potencial inicial. Durante el barrido de potencial, el *potenciostato* mide la corriente resultante debida al potencial aplicado.

Por tanto, como se ha dicho, en una experiencia de voltametría cíclica, Figura II.19, el generador de señales hace variar, a través del potenciostato, el potencial del electrodo de trabajo desde un valor inicial (E_0) hasta otro final, tras lo cual el barrido se invierte volviendo al potencial inicial. Esto da lugar a la curva de excitación $E = f(t)$, de perfil triangular $E = E_0 \pm vt$, donde v es la velocidad de barrido ($\Delta E / \Delta t$), fig. II.19a. La señal que se registra es, por tanto, la corriente que pasa a través del electrodo de trabajo como respuesta a esta perturbación, en función del potencial aplicado.

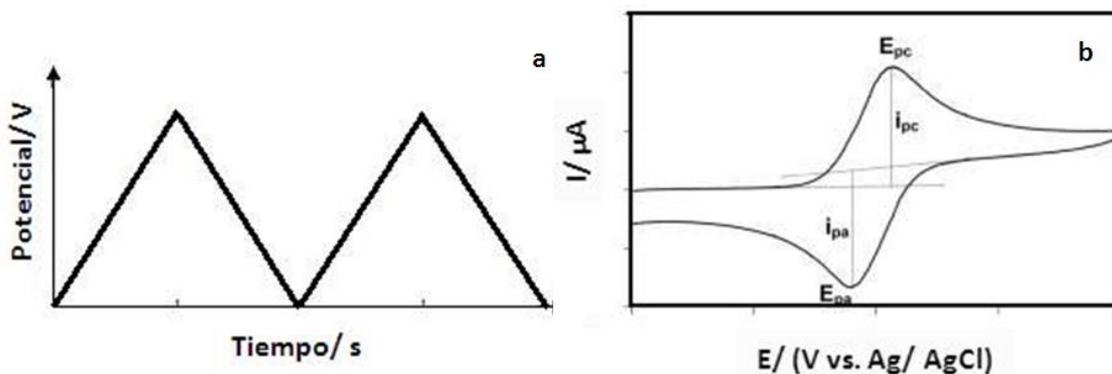


Figura II.19. Variación del potencial frente al tiempo en voltametría cíclica (a). Ejemplo del voltamperograma cíclico resultante de aplicar una rutina de potencial como la descrita a un sistema electroquímico de interés (b).



Si se representara gráficamente la corriente frente al potencial, se obtendría un voltamograma cíclico, fig. II.19b, que es función de un gran número de parámetros fisicoquímicos y, además, es dependiente del tiempo. Así, la fig. 19b ilustra la respuesta electroquímica esperada para un par rédox reversible durante un ciclo de barrido. Como resultado, se obtiene información acerca del potencial rédox, las velocidades de la reacción electroquímica de los compuestos y la concentración de especies electroactivas.

La voltametría cíclica es, en definitiva, una técnica muy empleada para la adquisición de diversos parámetros característicos de aquellos procesos que tienen lugar en la superficie de los electrodos: número de electrones transferidos en una reacción de oxidación o reducción, recubrimientos superficiales, constantes de velocidad, constantes de formación, coeficientes de difusión, etc. También resulta de utilidad para obtener datos estructurales tanto de la superficie como, en ocasiones, de los adsorbatos que se encuentran sobre ella.^{20b}

II.2.3.2. Equipamiento

II.2.3.2.1. Potenciostato

Las medidas electroquímicas voltamperométricas se llevaron a cabo con el siguiente equipo electroquímico:

1. Potenciostato-galvanostato AUTOLAB^(R) modelo PGSTAT 30: Posee un voltímetro-amperímetro y un interruptor que permite la conexión a la celda exterior o a una celda falsa. Permite un rango de sensibilidades desde 1 μA hasta 1 A. Este sistema automatizado Potenciostato/ Galvanostato permite la realización de las técnicas voltamétricas, cronoamperométricas, cronoculombimétricas y polarográficas en todas sus variantes.



Figura II.20. Potenciostato-galvanostato AUTOLAB^(R) modelo PGSTAT 30.



2. El programa GEPS (*General Purpose Electrochemical System*):

Proporciona un control completo sobre las medidas electroquímicas del sistema. Se trata de un programa compatible con el sistema operativo Windows que consta de dos partes diferenciadas:

2.1. La interfaz con el usuario que permite la obtención de gráficos y el análisis de los datos obtenidos.

2.1.2 La comunicación con el dispositivo AUTOLAB de manera que controla la ejecución de las rutinas de trabajo.

Ambas partes del programa están conectadas via memoria compartida, las tareas de medida se ejecutan con mayor prioridad que las de análisis de datos.

II.2.3.2.2. Celdas y electrodos

Se han empleado dos tipos de celda: una celda electroquímica convencional de la casa comercial *Metrohm* EA 876, provista de una doble pared para su termostatación, con tapa de plástico de cierre hermético, la cual posee orificios normalizados en los que se disponen los electrodos (trabajo, contraelectrodo y referencia), el tubo de entrada y salida del gas inerte, y una segunda celda electroquímica, específicamente diseñada para evitar que los bordes de los monocristales de HOPG, *EPG*, entren en contacto con la interfase electroquímica. Ambas se muestran en la Figura II.21:

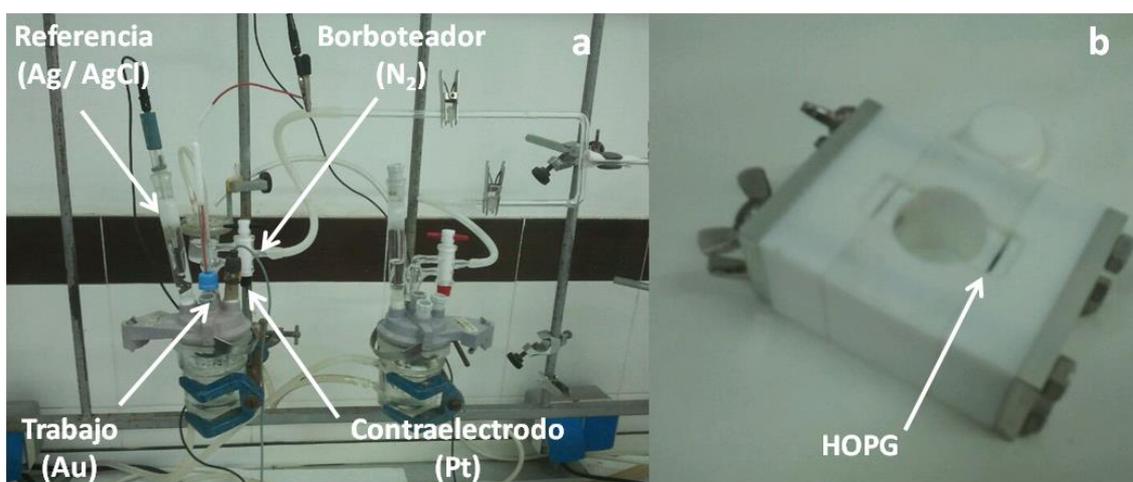


Figura II.21 Celda electroquímica de tres electrodos convencional (a). Celda de teflón diseñada específicamente para obtener la respuesta electroquímica del plano basal del HOPG (b).



El generador de N_2 se comunica con la celda electroquímica a través de un sistema de purificación adicional del gas inerte constituido por una trampa de mercurio (evita accidentes por retroceso o sobrepresión), un compartimento lleno de varillas de cobre que se calienta mediante un hornillo hasta una temperatura de $400\text{ }^\circ\text{C}$ para eliminar trazas de oxígeno y un borboteador de H_2SO_4 concentrado que elimina restos de materia orgánica y agua.

En todas las experiencias la temperatura de la celda se mantiene a $25^\circ\text{C} \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$, mediante un termostato-criostato de la casa comercial *Heto* Modelo *CB11e*.

Los electrodos usados han sido:

1. Electrodo de trabajo: En la presente tesis doctoral se ha hecho uso de tres electrodos que a continuación se detallan:

1.1. Placas de Au(111): se trata de placas de vidrio recubiertas con una capa de Cr (de 2,5 nm de espesor) y sobre ésta otra de Au (de 250 nm de espesor), de forma que, tras un protocolo de calentamiento a la llama (*flame annealing*), se forman terrazas de Au(111) en la superficie. El área geométrica de cada placa es de $11 \times 11\text{ mm}^2$ y han sido adquiridas de la casa comercial *Arrandee*TM. Nótese que estas placas, antes de su calentamiento, son de Au policristalino y fueron empleadas como tal en algunas experiencias.

1.2. Monocristales de HOPG.

1.3. Nanopartículas de Au adsorbidas sobre HOPG.

2. Electrodo de referencia: electrodo de Ag/ AgCl (3M de KCl) de la casa comercial *Metrohm*, ($E_{\text{Ag}/\text{AgCl vs NHE}} = +0,210\text{ V}$ a 25°C), aislado de la disolución por una camisa o lugging, tubo de vidrio que permite el contacto eléctrico a través de un vidrio poroso, para evitar la posible contaminación de la disolución con los iones Cl^- . Todos los potenciales que aparecen en esta memoria están referidos a la escala del Ag/AgCl.

3. Contraelectrodo: se usó un anillo de disco de Pt policristalino aislado de la disolución con el mismo sistema que el electrodo de referencia.



II.2.3.3. Preparación electroquímica de películas de melanina

La melanina usada para la preparación de estos electrodos modificados es una eumelanina sintética adquirida comercialmente de Sigma-Aldrich (M8631). La preparación de estas películas se ha realizado a partir de una disolución de melanina $0,3 \text{ g L}^{-1}$ en NaOH $0,1 \text{ M}$ haciendo uso de un método, desarrollado por este grupo de investigación, para el autoensamblado electroquímico de películas de eumelanina sintética.²¹

Para ello se ha empleado un clásico diseño experimental consistente en una celda electroquímica, Figura II.22, con los siguientes tres electrodos:

- Como electrodo de trabajo se empleó alguno de los tres descritos en el apartado anterior.
- El electrodo de referencia utilizado es un electrodo Ag/ AgCl.
- Por último, como contraelectrodo se emplea un electrodo de disco de platino.

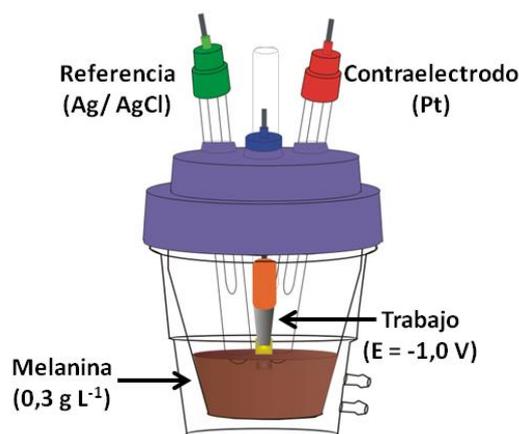


Figura II.22. Representación esquemática de la celda electroquímica empleada para la fabricación de películas autoensambladas electroquímicamente de eumelanina sintética sobre Au(111).

Para el crecimiento de las películas, el electrodo de trabajo es sometido a polarización catódica de $-1,0 \text{ V}$ (frente a Ag/ AgCl), para distintos tiempos de adsorción t_a , en la disolución de trabajo ($0,3 \text{ g L}^{-1}$ de eumelanina sintética en



NaOH 0,1 M). Hay que aclarar que el electrodo de trabajo se introduce en la disolución una vez que ya está aplicado el potencial.

Una vez se ha extraído el electrodo modificado de la celda, éste es aclarado primero con NaOH 0,1 M para retirar los restos de eumelanina no adsorbida y después con agua mili-Q para desplazar posibles restos de NaOH que hayan quedado retenidos en la película.

Tras este procedimiento de lavado, el electrodo se deja secar durante al menos 10 horas en atmósfera de N₂ antes de llevar a cabo su caracterización.

II.2.3.4. Preparación electroquímica de puntas de Pt-Ir para STM

En aquellas ocasiones en las que se requerían imágenes STM dotadas de una altísima resolución, se han empleado puntas elaboradas por *etching* electroquímico en el Laboratorio de Nanoscopías y Superficies de acuerdo al protocolo²² que se indica a continuación:

1. Se colocan aproximadamente 40 ml de una disolución de CaCl₂ al 33,3% a partir de la saturada en un vaso de precipitado de 100 ml.
2. En torno a 1 cm de un alambre de Pt-Ir se inserta en un capilar de vidrio. El capilar ha de quedar sujeto al alambre por rozamiento.
3. El conjunto capilar-alambre se introduce en el vaso *quiver* dejando cierto margen en éste como para que la punta, una vez cortada, caiga en el interior del *quiver*.
4. Debe ajustarse la profundidad de la inmersión del conjunto capilar-alambre de forma que aproximadamente 1 mm del alambre descubierto esté en contacto con la disolución.
5. Se añade ahora un volumen de agua mili-Q que represente, aproximadamente, el 10% de la disolución de afilado de CaCl₂. De esta forma se obtienen dos fases. El cloruro de Pt, de color negro, formado durante el proceso de afilado a altas temperaturas, se acumula en la fase superior acuosa dejando así la disolución de afilado libre de este compuesto.



6. Se aplica entonces una diferencia de potencial de entre 20 a 30 V de alterna.

7. Una vez que cae la punta, se elimina con una pipeta Pasteur la fase acuosa con el cloruro de Pt y se va retirando la disolución de afilado (que es reutilizable) hasta poder extraer el capilar que contiene la punta en su interior.

8. Con ayuda de otro capilar de vidrio más estrecho se extrae la punta.

En la Figura II.23 se detalla con imágenes el proceso completo:

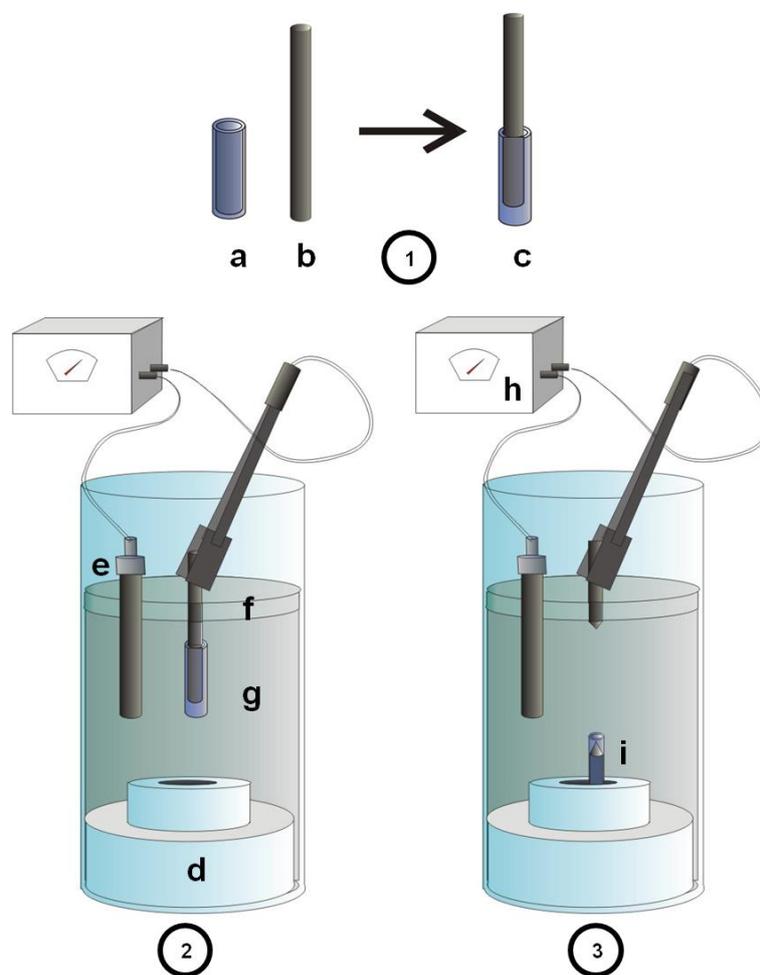


Figura II.23. Esquema de elaboración de puntas de Pt-Ir. **(a)** Capilar de vidrio para insertar el alambre de Pt-Ir. **(b)** Alambre de Pt-Ir. **(c)** Alambre insertado en el capilar. **(d)** Vaso quiver. **(e)** Cátodo de grafito. **(f)** Fase más diluida **(g)** Disolución de CaCl_2 al 33,3%. **(h)** Fuente de corriente alterna. **(i)** Punta formada protegida por el capilar.

Se debe hacer notar que los mejores resultados fueron obtenidos aplicando 27 V de corriente alterna hasta desprendimiento de la punta por gravedad. De



hecho, la aplicación de 27 V de alterna durante 5 minutos y posterior disminución hasta 11 V hasta ruptura mostró peores resultados, si bien arrojó morfologías de la punta mucho más reproducibles. En la Figura II.24 se muestra un ejemplo representativo de puntas de Pt-Ir fabricadas por este método.

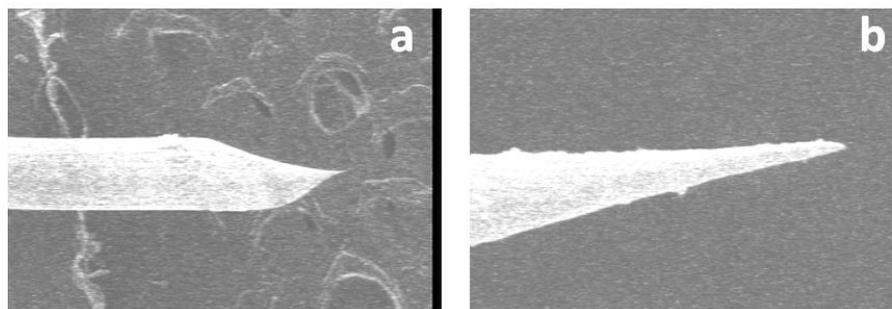


Figura II.24. Detalle de una punta de Pt-Ir obtenida por etching electroquímico en disolución de CaCl_2 vista por SEM: (a) 150 aumentos y (b) 7500 aumentos.

II.2.4. Medidas espectroscópicas

II.2.4.1. Espectroscopía Auger (AES)

Al ionizarse un átomo en un nivel electrónico interno, los electrones que se encuentran en niveles más altos de energía tienden a llenar el hueco dejado a menor energía y al hacerlo se emite un fotón de rayos X. Al considerar la cantidad de átomos que eran ionizados arrancándoles un electrón de la capa K y compararla con la fracción de estos átomos que emitían fotones, se encontraba que la relación era muy inferior a uno. Si el único mecanismo para que el átomo vuelva al estado base era la caída de un electrón de un nivel superior al nivel ionizado con la emisión de un fotón, entonces todos los átomos ionizados de esta forma deberían emitir fotones. La existencia de otro mecanismo fue comprobada en 1925 por el físico francés Pierre-Victor Auger. Se trata del ahora denominado efecto Auger.

Por tanto, la espectroscopía Auger se basa en un proceso en 2 etapas en el que la primera de ellas implica la formación de un ion A^{+} , excitado electrónicamente por exposición del analito a un haz de rayos X o a un electrón



acelerado a alta velocidad (electrón sonda), donde tiene lugar una reacción del siguiente tipo:



donde A puede ser un átomo, una molécula o un ion, y A^{+*} es un ion electrónicamente excitado con una carga positiva más que A. Cuando la relajación de la especie A^{+*} tiene lugar de la siguiente forma:



se produce entonces la emisión Auger, que consiste en que la energía cedida en la relajación produce la expulsión de un segundo electrón e^-_A , que es lo que se conoce como "electrón Auger". La energía de este segundo electrón es independiente de la energía del fotón que produjo la formación de la especie A^{+*} . Las emisiones tipo Auger se describen en función del tipo de transiciones orbitales implicadas en la producción el electrón, Figura II.25.

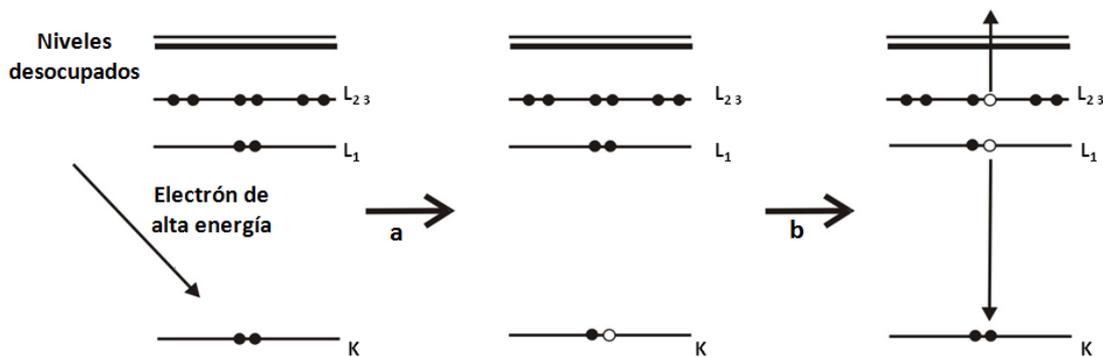


Figura II.25. Ilustración del proceso Auger: (a) Átomo ionizado en un electrón de la capa K; (b) Decaimiento del átomo al estado base al ocupar un electrón de energía mayor, el hueco de la capa K, emitiendo al mismo tiempo un electrón Auger KL_2L_3 .

El efecto Auger es el dominante: el 95% de las ionizaciones conduce al estado de un átomo doblemente ionizado y un electrón Auger.

El electrón Auger se mueve por el sólido y pronto pierde su energía al impactar con los demás electrones que sí se mantienen ligados a sus átomos. Si el electrón ha sido producido cerca de la superficie puede escapar con una



pérdida de energía pequeña o nula y ser detectado por un espectrómetro que mida su energía.

Muchos de los electrones sonda son reflejados hacia atrás y también colectados por los espectrómetros. Las gráficas de Auger muestran los picos de los electrones Auger sobre un fondo dado por los electrones sonda reflejados. Si todos los electrones Auger salieran del material sin pérdida de energía, los picos serían sumamente estrechos, pero debido a los impactos entre electrones, los picos engrosan. Las energías utilizadas para el haz de electrones sonda casi siempre se encuentran entre 5 y 10 keV. El espectrómetro registra el número de electrones Auger que salen en cada energía.

Si se tuviera una muestra con elementos desconocidos en la superficie, éstos podrían ser identificados a partir de sus picos Auger. En muchos casos estos picos pueden casi desaparecer y confundirse con los picos del fondo o ruido. Es conocido que la señal Auger (el número de electrones Auger) cae fuertemente después de pasar la energía bien definida del pico, por ello, se opta por representar la derivada del número de electrones Auger respecto a la energía, este tipo de espectro recibe el nombre de espectro diferencial. Por convención, se ha escogido el valor de energía donde aparece el mínimo en el espectro diferencial como la posición del pico Auger. La Figura II.26 muestra el espectro Auger, arriba, y el espectro diferencial del hierro, abajo. Puede apreciarse cómo el espectro diferencial exhibe detalles que son difíciles de percibir en el espectro directo:



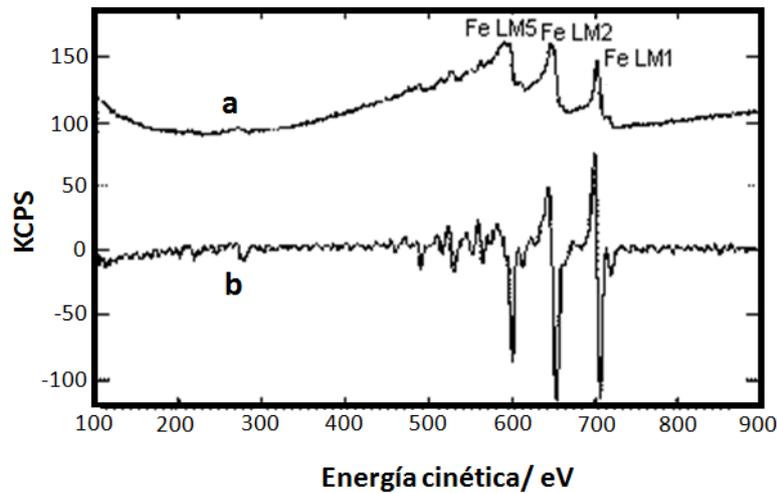


Figura II.26. Espectro Auger del Fe. (a) Espectro directo. (b) Espectro diferencial.

II.2.4.2. Espectroscopía de fotoelectrones generados por rayos X

La espectroscopía de fotoelectrones generados por rayos X (*X-ray photoelectron spectroscopy, XPS*), denominada inicialmente espectroscopía electrónica para análisis químico (*electron spectroscopy for chemical analysis, ESCA*), se basa en el efecto fotoeléctrico, descubierto en 1887 por H. R. Hertz y cuyas bases teóricas fueron ampliadas por A. Einstein en 1905. Ya en la década de los sesenta se implementó su empleo con fines analíticos, por medio de los trabajos pioneros del grupo de K. M. Siegbahn, quien fue galardonado con el Premio Nobel de Física en 1981 por este motivo.

La habilidad de detectar diferencias en los estados químicos junto con su alta sensibilidad superficial han hecho de esta técnica espectroscópica la más universalmente utilizada para el análisis de superficies. De hecho, permite detectar casi todos los elementos, a excepción del hidrógeno y el helio. Las muestras objeto de estudio pueden ser sólidas, líquidas o gaseosas. La profundidad en el análisis de los materiales sólidos se extiende desde las 2 últimas capas atómicas hasta aproximadamente 10 capas. Es aplicable a materiales de diferente naturaleza, esto es, orgánicos, biológicos y poliméricos, así como también a metales, semiconductores y cerámicos.



Un aspecto fundamental que debe ser tenido en cuenta es que, además de la obtención de la composición química elemental, permite adquirir información del estado químico de cada elemento, el estado de oxidación del átomo, los enlaces químicos, la homogeneidad superficial y el estado de adsorbatos, todo ello, a partir de la energía de enlace del electrón fotoemitido.

La técnica de fotoemisión se obtiene cuando un material absorbe un fotón de rayos X lo que provoca que los electrones más internos adquieran suficiente energía como para salir de él. Midiendo la energía cinética del electrón arrancado y conociendo la energía de la radiación incidente se puede medir la energía de ligadura (*binding energy*, energía de enlace) que depende del átomo que se estudia.²³ Por ello el espectro de XPS nos permite saber qué átomos están presentes en él.

Para arrancar electrones de niveles interiores es necesario utilizar una radiación de alta energía (entre 50 y 1200 eV) lo que se corresponde con la zona de los rayos X.

Cuando una muestra es irradiada con fotones dotados con una energía superior a la de enlace de los electrones, estos salen de la muestra con una energía cinética igual al exceso de energía del fotón respecto a la energía de enlace. La energía que suministra el fotón se puede dividir en: energía necesaria para arrancar un electrón desde su estado fundamental, energía de enlace, y la energía cinética que adquiere el electrón.

La energía de ligadura o enlace (*binding energy*, E_b) de los estados ocupados de los electrones emitidos medida respecto del nivel de Fermi del material se pueden calcular mediante la siguiente expresión:

$$E_b = h\nu - E_k - \Phi \quad (12)$$

donde E_k , es el valor de la energía cinética con la que los fotoelectrones emitidos llegan a un detector, $h\nu$ es la energía de la radiación X incidente y Φ un factor corrector del entorno electrostático del electrón, correspondiente a la función de trabajo de la muestra y del espectrómetro.



Por tanto, conocidas las energías de enlace, al tratarse de una magnitud característica de cada elemento, es posible caracterizar la composición elemental de la muestra objeto de interés.

A la hora de obtener un espectro XPS de una muestra problema se han de tener en cuenta las siguientes consideraciones generales: en primer lugar se realiza un barrido amplio, alrededor de unos 1000 eV, y luego barridos más reducidos, en torno a los elementos de interés, de unos 20 eV. Ahora bien, cuando se incrementa la energía, también aumenta el ruido de fondo. Este ruido tiene su origen en fotoelectrones que han perdido parte de su energía por colisiones inelásticas en el sólido pero que todavía poseen energía suficiente para escapar y, también, en algunos elementos de menor intensidad que son difíciles de detectar y, por tanto, de separar de la señal del ruido.

Con la intención de disminuir este efecto, se lleva a cabo una acumulación sucesiva de espectros, incrementando de esta manera la relación señal/ruido en el espectro, allanándose el camino para la determinación de los picos de menor intensidad. La energía de enlace de los picos asociados a la emisión de fotoelectrones queda muy bien resuelta permitiendo así incluso identificar el estado de oxidación de cationes y aniones. Es más, átomos del mismo elemento que aunque presentes en la misma muestra no son equivalentes, bien porque exhiben distintos estados de oxidación o diferente esfera de coordinación, etc., dan lugar a una variación significativa, alrededor de 1-3 eV, en la energía de enlace.

A modo de ejemplo de lo que se ha comentado hasta el momento, en la Figura II.27 se ha representado el espectro XPS registrado en una muestra de origen biológico que contiene nanopartículas de óxidos de hierro:



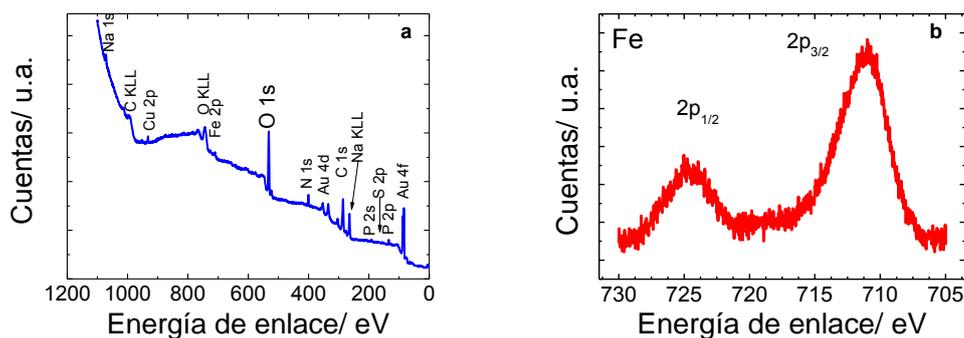


Figura II.27. Espectro XPS de la superficie de un electrodeósito de melanina-hierro sobre Au. Se nombran los principales picos que aparecen en el espectro: Fe, C, N, O y Au (a). Detalle de la señal de Fe 2p (b).

En el eje horizontal se representan valores de energía de enlace y en el eje vertical la intensidad o número de cuentas medidas, ver fig. II.27 a-b.

Se debe añadir además que esta técnica permite realizar, conjuntamente a la habitual identificación elemental, un análisis cuantitativo de la muestra y definir perfiles de concentración de determinados compuestos en superficies de interés. Así, los análisis cuantitativos se realizarían mediante el cómputo de las áreas encerradas bajo cada pico correspondiente a los diferentes elementos. Por su parte, los perfiles de profundidad se elaborarían en combinación con el bombardeo con iones argón.²³

Las medidas de XPS realizadas para la elaboración de esta memoria se llevaron a cabo en el Instituto Nacional de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas, INIFTA, en La Plata, Argentina. Para ello se hizo uso de una fuente de Mg $K\alpha$ (XR50, Specs GmbH) y un analizador hemisférico (PHOIBOS 100, Specs GmbH). La presión en el interior de la cámara de UHV fue inferior a 1×10^{-9} mbar. El ángulo entre la fuente de rayos X y el eje del analizador se estableció en $54^\circ 44'$. Los valores de sección eficaz de fotoionización están tabulados para esta geometría. Previamente a las medidas, se realizó una calibración de la escala de energía de dos puntos, utilizando Au evaporado (E_b de Au $4f_{7/2} = 84,00$ eV) y Cu (E_b de Cu $2p_{3/2} = 932,67$ eV).



II.2.4.3. Espectroscopía de absorción de Rayos-X (XAS): XANES y EXAFS

La espectroscopía de absorción de rayos X (*X-ray absorption spectroscopy*, XAS) consiste fundamentalmente en la irradiación de una muestra de interés con una fuente de rayos X de energía variable y el ulterior registro de la intensidad absorbida por la muestra en función de la energía de los fotones incidentes. Esto se lleva a cabo en las regiones donde los elementos estudiados exhiben un borde de absorción que viene definido por una transición electrónica desde un nivel interno hasta un nivel desocupado (por encima del nivel de Fermi) o por encima del nivel de vacío, generándose así un fotoelectrón. En XAS se estudia la absorción de radiación cuya energía abarca la zona de rayos X blandos, desde aproximadamente 250 eV, y duros.²⁴

La espectroscopía de absorción de rayos X abarca dos técnicas básicas: XANES y EXAFS, que implican principios físicos y tratamientos matemáticos distintos, además de proporcionar diferentes datos experimentales.

El EXAFS se refiere a la estructura fina en la absorción por encima de un borde dado de absorción y hoy en día se explica en términos de una teoría de dispersión múltiple, *scattering*.

El XANES, por su parte, hace referencia a la estructura fina cercana al borde de absorción y su teoría no es aún totalmente general y requiere, por tanto, de diferentes consideraciones físicas y de análisis diferenciados y específicos para cada tipo de átomo absorbente y región de energía incidente. Pese a todo, en la actualidad, es objeto de numerosas investigaciones así como la base de aplicaciones concretas para el estudio y caracterización de materiales y procesos, si bien aunque todavía no es posible un entendimiento más complejo y detallado del fenómeno en todos los casos.

Un espectro de absorción de rayos X suministra información respecto de las transiciones electrónicas en los niveles internos de un átomo, siendo el proceso básico la excitación de los electrones localizados en niveles $1s$ o $2p$ a través de la absorción de rayos X.



En la Figura II.28 se muestra un espectro de absorción de rayos X. Cuando se representan el coeficiente de absorción en función de la energía, los datos experimentales exhiben tres características generales: (a) un decrecimiento general de la absorción de rayos X al aumentar la energía incidente E , lo que estaría de acuerdo con cálculos semi-clásicos simples que predicen un comportamiento del tipo $\mu(E) \sim \rho Z/AE^3$ (donde ρ es la densidad de la muestra, Z y A el número y la masa atómica, respectivamente y μ el coeficiente de absorción de rayos X), (b) la presencia de un aumento abrupto de la absorción a determinada energía denominada borde de absorción, y (c) por encima del borde, una estructura oscilatoria que modula la absorción. La primera característica ilustra el fenómeno de absorción de rayos X, descrito por la “regla de oro” de Fermi. La posición en energía del borde es única para un átomo absorbente dado y determina la energía de excitación de los electrones de capas internas, dando lugar a la selectividad atómica de la técnica. La tercera cuestión es precisamente la que suscita el interés en la estructura fina de la absorción de rayos X, XAFS. Cuando se interpreta correctamente, contiene información estructural detallada como son, por ejemplo, las distancias interatómicas y los números de coordinación de los átomos implicados.

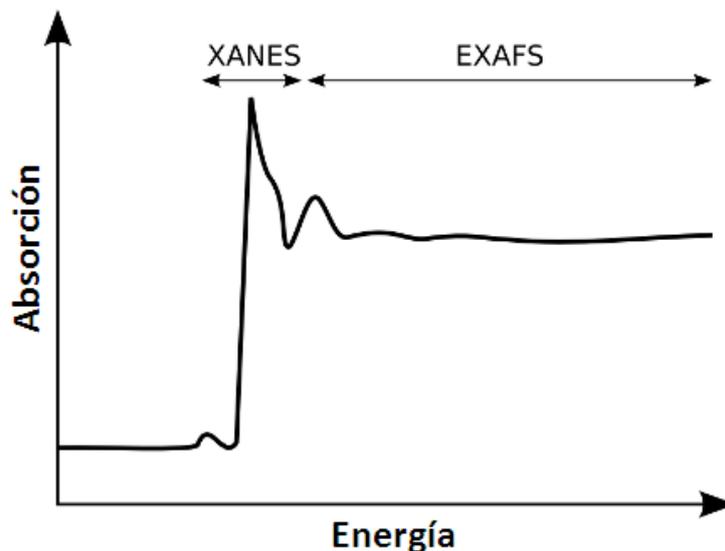


Figura II.28. Representación esquemática de un espectro de absorción de rayos X.

Normalmente se analiza el espectro como el exhibido en la fig. II.28, dividiéndolo en sus dos regiones características:



1. Región EXAFS: Se llama así a la absorción en energía que ocurre en la región entre 50 hasta unos 1000 eV por encima del borde de absorción y que presenta oscilaciones más suaves en la absorción (estructura fina). Esta estructura fina suministra información precisa sobre la estructura atómica local alrededor del átomo absorbente: número de átomos vecinos en la capa, longitud de enlace atómico, naturaleza de los átomos vecinos, desorden, etc.

2. Región XANES: comprendida en torno a unos 50 eV por encima del borde de absorción. Se trata de una técnica muy relacionada con el EXAFS pero en la que sólo se analiza la zona de absorción justo después del borde y permite, principalmente, el estudio de los estados de oxidación de los diferentes elementos si bien no posee tanta utilidad para abarcar estudios estructurales. Es, de hecho, muy utilizada para la caracterización de los estados de oxidación de los metales de transición.

El espectro XANES otorga como contrapartida al EXAFS información física y química del entorno local de un dado elemento en forma inmediata, por ejemplo de la simetría local alrededor del átomo absorbente a través de la comparación directa con espectros de referencia. En este sentido, el espectro XANES se considera como una impresión digital de la estructura tridimensional local.

Las medidas de XAS en el borde K del Fe (7112 eV) de diferentes muestras de melanina y distintos patrones fueron realizadas en la línea XAFS-1 del Laboratorio Nacional de Luz Síncrotron de Campinas, Sao Paulo, Brasil, LNLS, en aire, a temperatura ambiente, en modo transmisión, utilizando el método *TEY* (*total electron yield*) que consiste en medir la corriente de reposición de carga a la muestra (debido a los huecos generados por la radiación incidente) y a una lámina delgada de Au colocada antes de la muestra, en el eje del haz incidente. Se utilizaron 3 cámaras de ionización como detectores: una antes de la muestra, para medir la radiación incidente (I_0), otra después de la muestra y antes de la lámina de Au de referencia, para medir la intensidad luego de la muestra (I_1), y la tercera luego de esta lámina para medir la intensidad I_2 . El espectro de absorción de la muestra y del metal de referencia se expresó como $\log(I_0/I_1)$ y $\log(I_1/I_2)$, respectivamente. El espectro de la lámina de Au se utilizó para calibrar la escala de energía.



II.2.4.4. Dispersión de Rayos X a Ángulos Bajos (SAXS)

Cuando la radiación interacciona con la materia experimental, entre otros fenómenos, una dispersión elástica por parte de aquellos objetos cuyo tamaño es similar a la longitud de onda de la radiación.²⁵ El espectro de dispersión obtenido estará determinado por la forma, estructura y tamaño del objeto dispersante. Por este motivo, la dispersión de rayos X y de neutrones con longitudes de onda del orden de 0,1 nm se utilizan ampliamente para la caracterización estructural de la materia.

La teoría de dispersión de rayos X a ángulos bajos ha sido ampliamente desarrollada para un sistema ideal de dos fases,²⁶ donde cada fase presenta una amplitud de dispersión por unidad de volumen constante y diferente para la radiación incidente. De este modo, se han deducido ecuaciones con las que es posible determinar parámetros relacionados con las características (por ejemplo tamaños y distribución) de las partículas responsables de la dispersión.

La aplicación de esta técnica al estudio de nanopartículas (NPs) permite estudiar su forma y su tamaño. En el caso de partículas en las que su composición no es homogénea sino que presenta diferencias en la densidad electrónica de las diferentes partes que la componen, es posible modelar su estructura mediante el ajuste de las curvas de dispersión generadas por las curvas experimentales.²⁷

Las medidas de SAXS fueron realizadas en la línea SAXS-2 del LNLS. Esta línea está equipada con un monocromador de Si(111) que permite la obtención de un haz enfocado horizontal y verticalmente, con una longitud de onda $\lambda = 0,17556$ nm. Se utilizó una cámara CCD (*charge-coupled device*) como detector de los rayos X dispersados. Las muestras de nanopartículas se midieron a temperatura ambiente en una celda para líquidos con ventanas de mica.



II.2.4.5. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja ha sido una técnica tradicionalmente aplicada a la caracterización de moléculas, especialmente en el campo de las ciencias experimentales. Por medio de esta técnica es posible llevar a cabo la identificación de grupos funcionales de materiales orgánicos así como la determinación estructural de diversas muestras sólidas y líquidas. El estudio pormenorizado de los diferentes picos y bandas que aparecen en el espectro de absorción, para los diferentes números de onda, permite caracterizar la composición de la muestra de interés. Dado que estos picos y bandas son característicos de determinados grupos funcionales, su identificación facilita la elucidación de la estructura en función de las frecuencias de los modos normales de vibración de las moléculas. En la actualidad la mayoría de los equipos de espectrofotometría infrarroja se basan en el empleo del interferómetro de Michelson que realiza la transformada de Fourier (FTIR).

Las medidas FTIR realizadas en esta tesis se llevaron a cabo con un espectrómetro Bruker IFS66 dotado de un detector Global y un módulo de reflectancia total atenuada (ATR) con cristal de diamante. Para cada espectro se recolectaron 128 interferogramas con una resolución de 8 cm^{-1} . Los espectros obtenidos para películas de melanina electrodepositadas sobre HOPG se muestran en términos de R/R_0 , donde R y R_0 son la reflectancia correspondiente a la muestra y a la superficie libre del plano basal del HOPG sin melanina, respectivamente.

II.3. Sustratos

II.3.1. Au

Los sustratos de Au empleados en la presente Tesis se obtuvieron a partir de placas de Au evaporado sobre vidrio boro silicato, *Robax*, adquiridas a la casa comercial Arrandee™, Alemania. Puesto que la adherencia del oro al vidrio no es lo suficientemente buena, se ha de depositar una capa intermedia de Cr, de entre 1 y 4 nm de espesor, para facilitar una mejor adhesión del Au al soporte.





Figura II.29. Imagen de placa de Au Arrandee™ de 11 x 11 mm².

Previamente a su uso, las placas se lavaron inicialmente por inmersión durante 5 minutos en solución “piraña” que es frecuentemente utilizada con la finalidad de retirar residuos orgánicos de los sustratos. Esta solución contiene una relación 3:1 en volumen entre ácido sulfúrico concentrado (98 % p/p) y solución de peróxido de hidrógeno concentrada. Como es extremadamente corrosiva y reacciona violentamente con la materia orgánica, debe utilizarse con extrema precaución. Luego del lavado, las películas se enjuagaron con agua Milli-Q y se secaron en atmósfera de N₂.

Las placas de Au evaporado son, en origen, policristalinas, esto es Au(pc). Por tanto, en los casos en los que se hace necesario contar con sustratos de Au con la orientación preferencial Au(111) y terrazas de tamaño adecuado, se las debe someter a un tratamiento térmico, conocido comúnmente como *flame annealing*. Este tratamiento se puede llevar a cabo calentando los sustratos con una llama de butano. Las películas de Au limpias, soportadas sobre vidrio, se expusieron a la llama y fueron calentadas sobre un sustrato de mármol hasta alcanzar color “rojo sombra”, que corresponde a aproximadamente 650°C, que se mantuvo durante algunos minutos. Inicialmente la superficie está compuesta por pequeños gránulos de Au y, tras someterla a este proceso de calentamiento, se consigue que estos granos se unan entre sí dando lugar a otros mayores que desarrollan, a su vez, terrazas triangulares de Au(111) de entre 500-1000 nm de base, separadas por escalones de altura monoatómica.



En la Figura II.30 se han representado imágenes obtenidas por STM que ilustran el proceso de conversión de Au(pc), fig. II.30a y c, en Au(111), fig. II.30 b y d, por *flame annealing*.

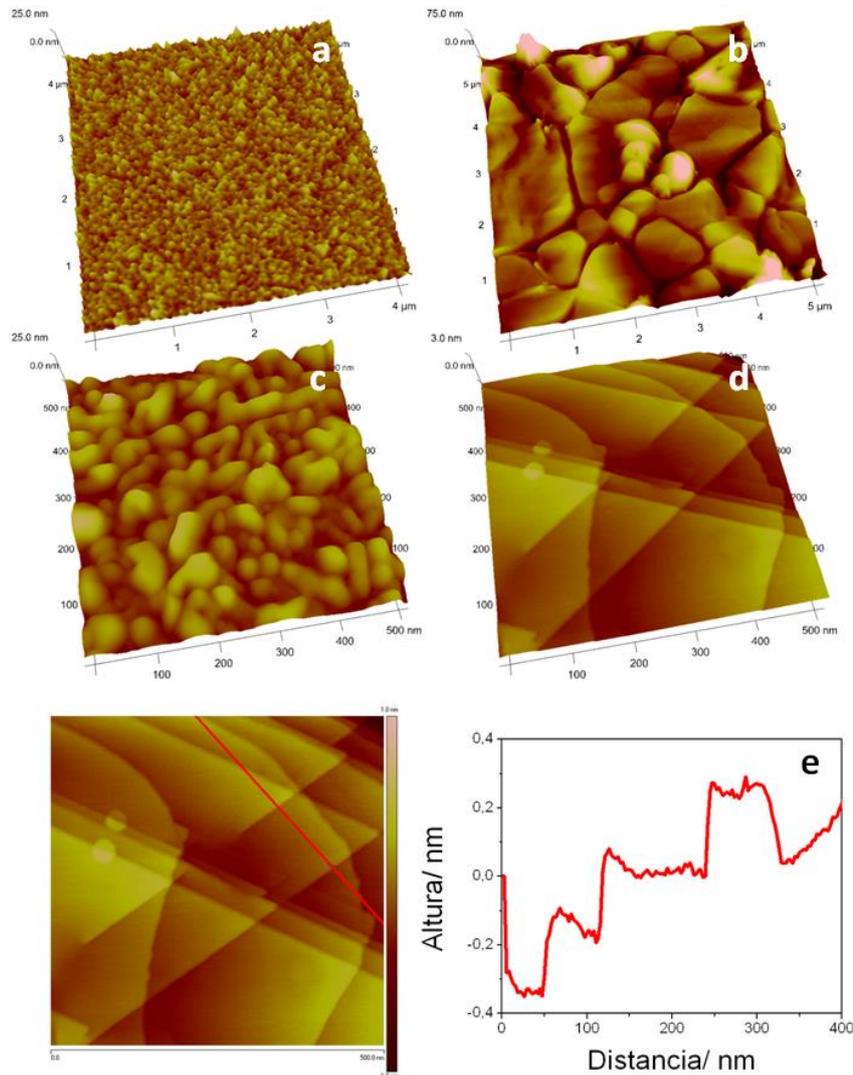


Figura II.30. Imágenes STM 3D antes, (a) y (c), y después, (b) y (d), del calentamiento a la llama de los sustratos de Au Arrandee™. Imagen de $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ de superficie de Au(pc) formada por gránulos de 20-50 nm (a). Imagen de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ de superficie de Au(111) formada por granos de 1-3 μm (b). Imagen de $500 \times 500 \text{ nm}^2$ de superficie de Au(pc) mostrando detalle de los gránulos vistos en (a), (c). Imagen de $500 \times 500 \text{ nm}^2$ de superficie de Au(111) donde se exhiben sus características terrazas triangulares (d). Sección transversal a lo largo de la línea de color rojo que muestra terrazas de altura monoatómica (e).



Con objeto de calibrar la calidad de las medidas llevadas a cabo por SPM, en la dimensión normal a la superficie, se hace uso de la altura de los escalones monoatómicos del Au(111), fig. II.30e, 0,236 nm.

II.3.2. Grafito Pirolíticamente Altamente Orientado (HOPG)

Los sustratos de HOPG empleados en esta memoria fueron adquiridos de NT-MDT (Moscú, Rusia) y de Digital Instruments/ Veeco Metrology Group (Santa Barbara, E.E.U.U). En todos los casos, previamente a su uso, los monocristales de HOPG fueron exfoliados con el objeto de poder garantizar una estructura superficial altamente reproducible cada vez.

En la Figura II.31 se muestran imágenes representativas de los sustratos de HOPG que muestran su característica estructura de escalones que unen terrazas atómicamente planas:

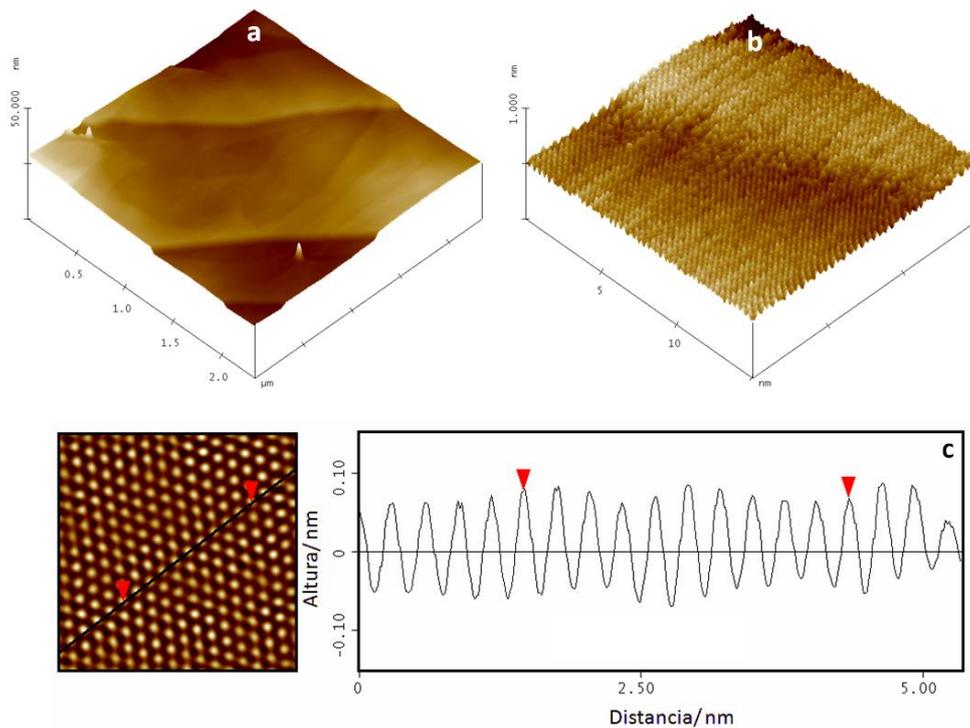


Figura II.31. Imágenes STM 3D de la superficie de un monocristal de HOPG: (a) $2,3 \times 2,3 \mu\text{m}^2$, terrazas y escalones y (b) $15 \times 15 \text{nm}^2$ resolución atómica de dos capas de átomos de grafito. (c) Sección transversal que muestra la distancia entre átomos de carbono.



La resolución de átomos de carbono en la superficie del HOPG, fig. II.31c, es usada tradicionalmente como patrón interno de calibración de los piezoeléctricos en STM, puesto que se conocen perfectamente sus distancias interatómicas, en concreto 0,246 nm.²⁸

II.3.3. Nanopartículas de Au (AuNPs)

Las AuNPs se han sintetizado de acuerdo al método de dos fases de Brust-Schiffrin,²⁹ el cual, por otro lado, es uno de los más habitualmente empleados en la síntesis de AuNPs recubiertas de alcanotioles. Básicamente, se añaden 0,31 g de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a 25 mL de agua milli-Q en el matraz de reacción. Se añaden 100 mL de tolueno donde se encuentra disuelto 1,09 g de una sal de amonio cuaternaria, bromuro de tetraoctilamonio (ToABr). El catión de esta sal actúa como agente de transferencia de fase, produciendo el transporte de los iones AuCl_4^- desde la fase acuosa a la fase orgánica. Posteriormente, se descarta la fase acuosa y la fase orgánica se lava con abundante agua Milli-Q para eliminar el HBr que pueda permanecer, procedente de la fase acuosa. Se añade entonces la cantidad necesaria de alcanotiol de forma que se garantice una relación RSH: Au de 2:1, tras lo cual se debe agitar la mezcla de reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añaden 10 mL de agua milli-Q en los que previamente se han disuelto 0,30 g de NaBH_4 , es decir, en notable exceso respecto al metal, NaBH_4 : Au de 10:1, produce la reducción final a Au(0), creándose así núcleos de Au metálico en el interior de las micelas inversas del alcanotiol.

Después del paso de la reducción con el borohidruro y, una vez preparadas las AuNPs, es necesario su lavado para eliminar los restos de reactivos utilizados en la síntesis, especialmente de moléculas del alcanotiol libre. A tal fin, se reduce el volumen de tolueno en un rotavapor. Hecho esto, el sólido de color oscuro formado por las partículas es dispersado en etanol durante treinta minutos y se sónica durante un minuto. El etanol permite, por su polaridad, la disolución de las moléculas de tiol pero a la vez no forma suspensiones estables de las AuNPs. Al centrifugar esta mezcla, las AuNPs precipitan y se desecha el sobrenadante. Este proceso debe repetirse al menos 3 veces más para eliminar la máxima cantidad posible de tiol libre. Por último, las AuNPs se



dejan secar bajo corriente de nitrógeno obteniéndose un polvo de color marrón oscuro.

La morfología de las AuNPs sintetizadas así como su distribución de tamaños, se han medido por HRTEM, tal y como se muestra en la Figura II.32:

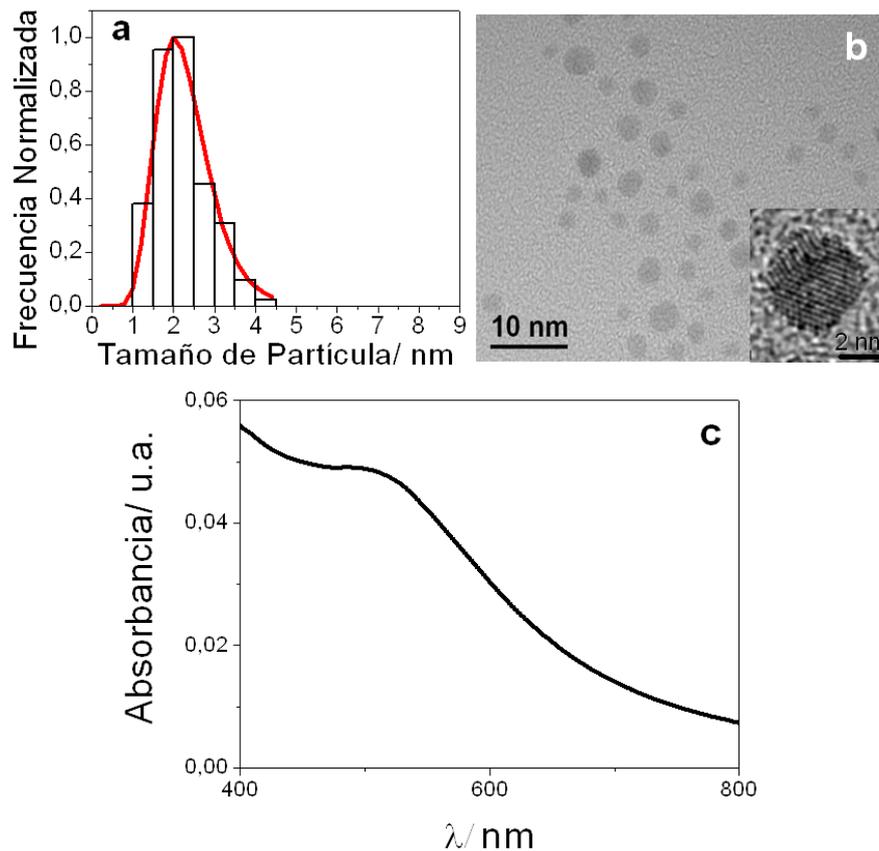


Figura II.32. HRTEM (a) Función de distribución de tamaños (b) imagen TEM de alta resolución de AuNPs protegidas con nonanotiolato (NT), utilizando una relación RSH:Au de 2:1, de diámetro promedio $\langle D \rangle = 3,0 \pm 0,9$ nm. (c) Espectro UV-Visible.

Adviértase, en cualquier caso, que el comportamiento del pico de absorción de plasmón en el espectro de las AuNPs registrado en hexano, fig. II.32c, está en concordancia con lo que se ha observado para AuNPs de reducidas dimensiones.³⁰



II.3.4. AuNPs sobre HOPG

Los sustratos de HOPG modificados con AuNPs se han preparado por inmersión de los sustratos sin modificar, recién exfoliados, durante 24 horas, en una disolución 2 mg/ mL de las AuNPs recubiertas de alcanotiol, nonanotiol (NT) o dodecanotiol (DT), T AuNPs, en hexano.³¹ Transcurridas las 24 horas de incubación, las muestras fueron repetidas veces lavadas en hexano y dejadas secar en atmósfera de nitrógeno. La cantidad de T AuNPs adsorbidas depende del tiempo de inmersión y de la concentración y se ensamblan sobre el plano basal del HOPG formando capas conectadas eléctricamente con el sustrato. La morfología de las mismas se exhibe en la Figura II.33:



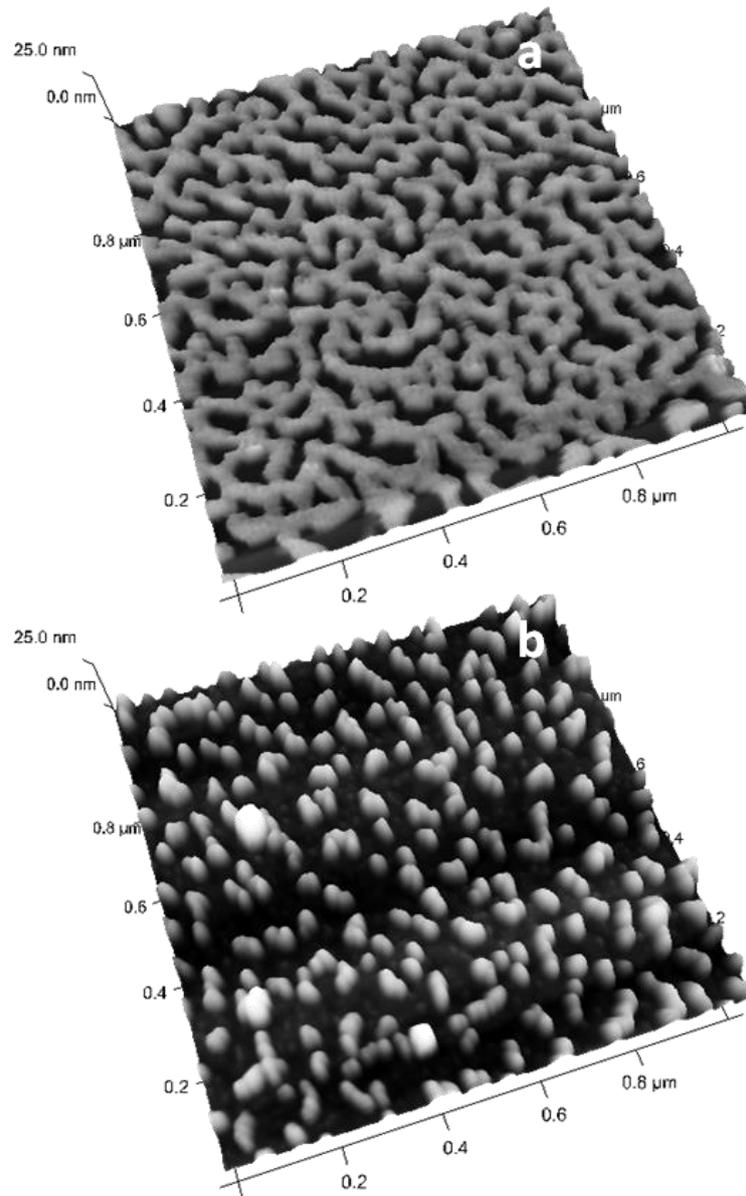


Figura II.33. Imágenes 3D AFM en modo resonante de $1,0 \times 1,0 \mu\text{m}^2$ mostrando islas de AuNPs sobre HOPG: (a) antes y (b) después de la electrodesorción de DT.

La electrodesorción reductiva del recubrimiento de tiol de las AuNPs permite liberar alrededor del 90% de las NPs presentes en la superficie de grafito a la solución acuosa. Las restantes AuNPs, ya libres del recubrimiento de alcanotiol, fig. II.33b, forman islas de NPs muy estables que además son electroquímicamente activas.³¹



II.4. Teoría del Funcional de la Densidad (DFT)

La teoría del funcional de densidad, DFT, es una aproximación al cálculo de la estructura electrónica de átomos y moléculas que ha adquirido gran relevancia en el estudio de la fisicoquímica de superficies. A menudo, los resultados experimentales obtenidos por SPM, en particular por STM, no son sencillos de interpretar. En este sentido, las simulaciones teóricas permiten establecer un nexo de unión entre las imágenes obtenidas por STM y la topografía superficial y la estructura electrónica de la muestra.

Todos los cálculos de la presente tesis fueron realizados en el marco de la teoría del funcional de la densidad (DFT) con condiciones periódicas, empleando pseudopotenciales PAW (proyector conservante de la norma) que permite describir el efecto de los núcleos y electrones internos sobre los electrones de valencia y un conjunto base de ondas planas para los electrones de valencia. El funcional utilizado para el cálculo de la energía de intercambio y correlación fue el de Perdew-Wang 91 (PW91) dentro de la aproximación del gradiente generalizado (GGA). El criterio de corte de energía para las ondas planas fue de 450 eV. Para la integración del espacio recíproco se utilizó una rejilla (5x5x1) de puntos k generados mediante el algoritmo de Monkhorst-Pack. La minimización de energía (relajación de la densidad electrónica) para una configuración nuclear dada fue realizada utilizando un esquema de iteración de Davidson. Para minimizar efectos de polarización causados por la asimetría de las celdas se aplicó la corrección de dipolo. El código computacional empleado en todos los cálculos ha sido el de VASP(*Vienna Ab initio Simulation Package*) v.5.2.11.³²

El estudio de la superficie de un sólido se realiza mediante el modelo de *slab* en el que a lo largo de la dirección z se crea una región de vacío lo suficientemente grande como para evitar interacciones entre un slab y su réplica en esa dirección del vacío. En este estudio se ha empleado un slab de cuatro capas de metal y un vacío de ~12 Å, Figura II.34:



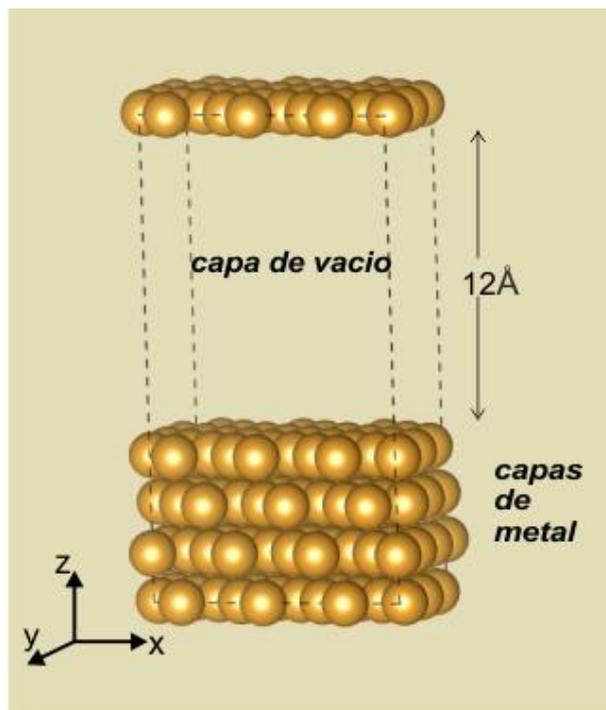


Figura II.34. Modelo de slab utilizado para representar la superficie metálica y el vacío. La súpercelada es repetida en las 3 direcciones del espacio.

Las posiciones atómicas de las dos capas metálicas inferiores se han mantenido fijas en el valor optimizado del parámetro de red calculado para el Au masivo que fue 4,18 Å. Mientras, las 2 capas de metal restantes así como todas las posiciones atómicas del adsorbato se han dejado relajar sin restricciones. El adsorbato se colocó únicamente en uno de los lados del bloque.

La celda unidad empleada en los cálculos fue una superred ($5 \times 3\sqrt{3}$) del Au(111). Los cálculos de los tetrámeros aislados se han llevado a cabo en una súpercelada con longitudes laterales de ($20 \text{ Å} \times 20 \text{ Å} \times 10 \text{ Å}$).

Es bien conocido que las fuerzas de largo alcance de van der Waals juegan un papel relevante en las interacciones entre moléculas orgánicas y superficies metálicas. Por lo tanto, en los sistemas estudiados en esta memoria han de tenerse en cuenta. Con objeto incorporar tales interacciones se ha utilizado la corrección empírica al DFT propuesto por Grimme, D2-DFT.³³ También se han realizado cálculos sin la corrección de vdW para evaluar la influencia de estas interacciones.



La energía de adsorción, E_{ads} , de los tetrámeros se define por la siguiente expresión:

$$E_{\text{ads}} = [E^{\text{Tetrámero/Au}} - E^{\text{Au}} - E^{\text{Tetrámero}}] \quad (13)$$

Donde $E^{\text{Tetrámero/Au}}$, E^{Au} y $E^{\text{Tetrámero}}$ representan la energía total del sistema, la energía de la superficie y la energía de los tetrámeros, respectivamente. Números negativos implicarían un proceso exotérmico de adsorción con respecto a la superficie libre y al tetrámero aislado originado durante el proceso de adsorción.

II.5. Bibliografía

- 1) W. Kauzmann, *Quantum Chemistry*, Academic Press, New York, **1959**, 183.
- 2) J. Tersoff, D.R. Hamann, *Phys. Rev. Lett.*, **1983**, 50, 1998.
- 3) F.J. Giessibl., *Rev. Mod. Phys.*, **2003**, 75, 3.
- 4) R. Wiesendanger, *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy: Methods and Applications*, Cambridge University Press, **1994**.
- 5) C. Bai, *Scanning tunneling microscopy and its applications*, Springer-Verlag: Heidelberg, **1992**.
- 6) G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.*, **1986**, 56, 930.
- 7) P.A. Midgley, C. Durkan, *Mater. Today*, **2008**, 11, 8.
- 8) Y. Martin, C.C. Williams, H.K. Wickramasinghe, *J. Appl. Phys.*, **1987**, 61, 4723.
- 9) B. Cappella, G. Dietler, *Surf. Sci. Rep.*, **1999**, 34, 1.
- 10) T.R. Albrecht, P. Grütter, D. Horne, D. Rugar, *J. Appl. Phys.*, **1991**, 69, 668.
- 11) R. García, R. Pérez. *Surf. Sci. Reports*, **2002**, 47, 197.
- 12) (a) F. Dubourg, J.P. Aimé, S. Marsaudon, G. Couturier, R. Boisgard, *J. Phys. Cond. Matter*, **2003**, 15, 6167. (b) L. Nony, R. Boisgard, J.P. Aimé, *Biomacromolecules*, **2001**, 2, 827.
- 13) B.V. Derjaguin, V.M. Muller, Y.P. Toporov, *Journal of Colloid and Interface Science*, **1975**, 53, 314.



- 14) W. Mizutani, M. Shigeno, K. Kajimura, M. Ono, *Ultramicroscopy*, **1992**, 236, 42.
- 15) M. Toerker, T. Fritz, H. Proehl, R. Gutierrez, F. Großmann, R. Schmidt, *Phys. Rev. B*, **2002**, 65, 245422.
- 16) L. Belliard, A. Thiaville, S. Lemerle, A. Lagrange, J. Ferré, J. Miltat, J. Appl. Phys., **1997**, 81, 3849.
- 17) S. Singamaneni, V.N. Bliznyuk, C. Binek, E.Y. Tsymbal, *J. Mater. Chem.*, **2011**, 21, 16819.
- 18) (a) M. Knoll, *Z. Physik*, **1935**, 11, 467. (b) J.I. Golstein, *Scanning Electron Microscopy. Plenum Press*, **1992**.
- 19) E. Ruska, *Z. Physik*, **1934**, 78, 318.
- 20) (a) A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, **1980**, 1-13. (b) G.G. Will, *J. Electrochem. Soc.*, **1965**, 112, 451.
- 21) P. Diaz, Y. Gimeno, P. Carro, S. Gonzalez, P.L. Schilardi, G. Benitez, R.C. Salvarezza, A.H. Creus, *Langmuir*, **2005**, 21, 5924.
- 22) (a) A.G. Güell, I. Diez-Perez, P. Gorostiza, F. Sanz, *Analytical Chemistry*, **2004**, 76, 5218. (b) A.J. Nam, A. Teren, T.A. Lusby, A.J. Melmed, *J. Vac. Sci. Technol. B*, **1995**, 13, 4.
- 23) S. Gunther, B. Kaulich, L. Gregoratti, M. Kiskinova, *Progress in Surface Science*, **2002**, 70, 187–260.
- 24) (a) J. Yano, V.K. Yachandra, *Photosynth Res*, **2009**, 102, 241. (b) S.J.A. Figueroa, Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, **2009**.
- 25) O. Glatter, O. Kratky, *Small Angle X-ray Scattering. Academic Press*, **1982**.
- 26) A. Guinier, G. Fournet, *Small Angle Scattering of X-Ray. New York, John Wiley & Sons Inc.*, **1955**.
- 27) G. Corthey, Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, **2012**.
- 28) Z. Osvath, G. Vertesy, L. Tapasztó, F. Weber, Z.E. Horvath, J. Gyulai, L.P. Biro, *Materials Science and Engineering C*, **2006**, 26, 1194.
- 29) M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R. Whyman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 801.
- 30) P. Zhang, T.K. Sham, *Phys. Rev. Lett.*, **2003**, 90, 245502.



- 31) D. Grumelli, C. Vericat, G. Benitez, M.E. Vela, R.C. Salvarezza, L.J. Giovanetti, J.M. Ramallo-Lopez, F.G. Requejo, A.F. Craievich, Y.S. Shon, *J. Phys. Chem. C*, **2007**, *111*, 7179.
- 32) G. Kresse, D. Joubert, *Phys. Rev. B*, **1999**, *59*, 1758.
- 33) S. Grimme, *J. Comput. Chem.*, **2006**, *27*, 1787.



CAPÍTULO III

Objetivos

III. OBJETIVOS

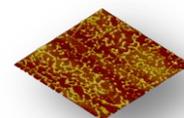
Los objetivos de la presente tesis se centran en la preparación por vía electroquímica de materiales electródicos de gran estabilidad, conductividad y, presumiblemente, con alta actividad electrocatalítica a partir de la inmovilización de moléculas bioactivas de eumelanina sintética. Se pretende, por tanto, desarrollar los siguientes estudios:

- La electroformación de bio-películas ultradelgadas y nanoestructuradas de melanina sobre diversos sustratos conductores y semiconductores.
- La determinación y caracterización de la morfología, composición química y propiedades fisicoquímicas de tales películas así como de sus propiedades eléctricas y magnéticas.
- La evaluación de su actividad electroquímica y electrocatalítica frente a reacciones rédox de interés bioquímico.
- Generación de fotocorriente en películas de melanina sobre Au(111).

Dichas experiencias se han llevado a cabo mediante la combinación de un vasto conjunto de técnicas que incluyen la microscopía de efecto túnel (STM), microscopía de fuerzas atómicas (AFM), microscopía de fuerzas magnéticas (MFM), las técnicas electroquímicas convencionales y las espectroscopías Auger (AES), difracción de rayos X (XRD), de dispersión de energía de rayos X (EDX), fotoelectrónica de rayos X (XPS) y de absorción de rayos X (XANES y EXAFS).

Los objetivos que se persiguen son el desarrollo de nuevos métodos para la inmovilización de material biológico y su aplicación para desarrollar dispositivos bio-sensibles, así como la preparación por vía electroquímica de superficies poliméricas nanoestructuradas de características definidas para su empleo en electrocatálisis.

En el laboratorio de Nanoscopías y Electroquímica del departamento de Química Física de la Universidad de La Laguna se vienen desarrollando, desde hace varios años, diversas líneas de investigación en donde se combinan

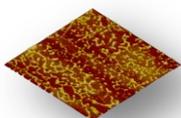


Objetivos

técnicas nanoscópicas (AFM y STM) con las distintas técnicas electroquímicas. Estas últimas han demostrado ser una alternativa sencilla y asequible capaz de fabricar, a bajo coste y a temperatura ambiente, materiales nanoestructurados con formas, tamaños y composiciones altamente controladas.^{1,2} Al mismo tiempo la investigación en interfases líquido/ sólido mediante técnicas nanoscópicas puede llevarse a cabo bajo condiciones de control electroquímico. A través del potencial eléctrico se puede conseguir un control excelente de la interfase electrodo/ disolución^{3,4} lo cual ofrece la enorme ventaja de poder estudiar *in situ* los fenómenos propios de esta interfase electrodo/disolución. Todas estas áreas en donde coinciden técnicas nanoscópicas y técnicas electroquímicas son de un especial interés para nosotros y pueden ser considerados estudios dentro de lo que se ha dado en denominar en los últimos años como Nanociencia.⁵⁻⁷

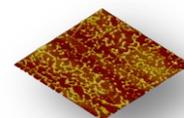
Los materiales nanoestructurados desarrollan determinadas características y propiedades en un grado muy superior a los mismos materiales preparados por vía convencional. Si a ello añadimos que dicho materiales sean de naturaleza bioactiva o biosensible, el interés sobre la investigación en dichos sistemas es de máxima actualidad. El uso de las microscopías AFM y STM en biomateriales y en sus posibles aplicaciones tecnológicas, está sometido desde hace varios años a un fuerte desarrollo que va mucho más allá de lo que es una mera descripción y/ o medida de la topografía de la superficie, para convertirse en una herramienta fundamental en el estudio de la estructura, las propiedades, la dinámica y la manipulación de superficies e interfases biosensibles.^{8,9}

La presente tesis pretende ampliar los estudios ya realizados a nuevos campos y aplicaciones que nos parecen de gran interés tanto científico como tecnológico y que podemos resumir en la siguiente línea básica: **el estudio sobre la preparación, caracterización, evolución y aplicaciones de películas de melanina soportadas sobre diversos sustratos conductores.**



III.1. Bibliografía

- 1) M.P. Zach, R.M. Penner, *Adv. Mat.*, **2000**, *12*, 878.
- 2) J.A. Switzer, C.-H. Hung, L.-Y. Huang, E.R. Switzer, D.R. Kammler, T.D. Golden, E.W. Bohannon, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 3530.
- 3) "*Electrochemical Nanotechnology*", Eds. W.J. Lorenz and W. Plieth, Wiley-VCH, **1998**.
- 4) "*Electrochemistry at Nanostructured Materials*", *Langmuir* **15**, Volumen monográfico, **1999**.
- 5) "*Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy. Methods and Applications*", R. Wiesendanger, Cambridge University Press, **1994**.
- 6) "*Nanostructure Science and Technology: R&D Status and Trends in Nanoparticles, Nanostructured Materials and Nanodevices*", Eds. R.W. Siegel, E. Hu and M.C. Roco, 1999, WTEC Loyola College, Maryland, USA. <http://itri.loyola.edu/nano/final>.
- 7) Red Española de Nanotecnología. Informe sobre la situación de la Nanociencia y la Nanotecnología en España y propuesta de acción estratégica dentro del plan nacional de I+D+I (2004-2007). <http://www.nanospain.net/nanospain.htm>
- 8) K.D. Jandt, *Surface Science*, **2001**, *491*, 303.
- 9) C.M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 4128.



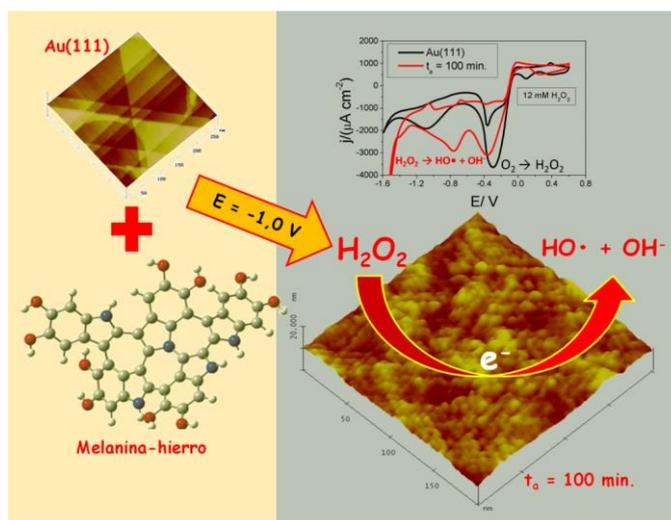
CAPÍTULO IV

Resultados y Discusión

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. SÍNTESIS ELECTROQUÍMICA DE PELÍCULAS DE MELANINA SOBRE Au

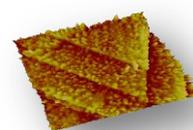
En este primer capítulo se procederá a la descripción del método electroquímico desarrollado para el crecimiento potenciostático de depósitos nanoestructurados de melanina sobre monocristales de Au(111). Se mostrará que es posible preparar electroquímicamente películas continuas y ultradelgadas de melanina sobre Au a partir de soluciones alcalinas del biopolímero. Con la finalidad



de obtener un profundo conocimiento tanto de la estructura, composición química, propiedades fisicoquímicas y de los procesos de autoensamblado de los electrodepositos fabricados, así como de su actividad electrocatalítica, se hará uso de las microscopías de efecto túnel y de fuerzas atómicas, de técnicas espectroscópicas como Auger, XPS y XANES y de las metodologías electroquímicas convencionales.

IV.1.1. Antecedentes

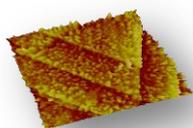
Como ya se ha dicho, las melaninas constituyen una importante clase de biopolímeros que están presentes en diferentes estructuras dentro del mundo animal y vegetal.¹ Estos polímeros poseen propiedades fisicoquímicas muy interesantes que guardan una estrecha relación con su actividad biológica. Así, desarrollan funciones muy variadas que van desde la fotoprotección², el comportamiento como semiconductor,³ la complejación de iones metálicos⁴ y la amortiguación de la actividad de radicales libres.¹ Además, en los últimos tiempos, se ha descrito la actividad electroquímica de diferentes tipos de melaninas adsorbidas sobre distintas superficies electródicas.⁵ Por todo ello,



las melaninas resultan muy atractivas desde el punto de vista de la ciencia de materiales.

La modalidad de melanina más ampliamente extendida es la eumelanina que está compuesta por especies moleculares derivadas del acoplamiento de dos monómeros: 5,6-dihidroxiindol (DHI) y 5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA) que proporcionan diversos grupos funcionales como potenciales agentes quelantes para cationes metálicos como son los grupos hidroxilo, carbonilo, catecol, quinona y semiquinona.^{6,7,8} A pesar de los esfuerzos realizados hasta el momento, la estructura química secundaria de las eumelaninas y los detalles de su ensamblado en tres dimensiones permanecen aún bajo debate. Por contra, sí que existen evidencias significativas de que la melanina está formada por pequeñas partículas de talla nanométrica, de entre 10 y 20 nm, que se agregan dando lugar a la formación de gránulos de mayor tamaño, en torno a 150 nm de diámetro, aproximadamente.⁹ El modelo más comúnmente aceptado, en lo concerniente al modo en el que se estructuran estos biopolímeros, defiende que la eumelanina polimeriza dando lugar a pequeños oligómeros (formados por pocos monómeros de DHI y DHICA) que se ensamblan entre sí por medio de un apilamiento gobernado por interacciones tipo π - π de los anillos aromáticos.⁹

La melanina es capaz de atrapar cantidades significativas de cationes metálicos tales como Ca, Mg, Cu, Al, Zn y Fe.⁴ De hecho, estudios recientes demuestran que, en la neuromelanina presente en la *Substantia Nigra* del cerebro humano, el hierro aparece comúnmente asociado a este pigmento.¹⁰ Desafortunadamente no se conoce demasiado acerca de los posibles estados de agregación del Fe presente en las melaninas.¹¹ Pese a ello, se ha podido establecer que, en el caso de pacientes con Parkinson, la muerte neuronal está acompañada por un elevado nivel de hierro y una pérdida de neuromelanina.¹² Se ha propuesto que la saturación de ión hierro en la neuromelanina desemboca en la existencia de este catión metálico no enlazado en las neuronas de la *Substantia Nigra*, que sería capaz de catalizar reacciones no enzimáticas que generan especies oxigenadas radicalarias que podrían inducir la muerte celular. De hecho, la peroxidación lipídica en la *Substantia Nigra* se

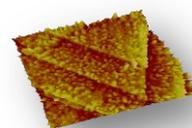


relaciona comúnmente con la enfermedad de Parkinson.¹³ Existen en la bibliografía varios ejemplos de sistemas ión metálico-melanina que presentan actividad peroxidasa de forma que promueven la formación de estas especies oxigenadas altamente reactivas.¹⁴ Por todo lo mencionado, parece claro que sería importante evaluar dicha actividad peroxidasa para el sistema hierro-melanina.

Es bien conocido que el peróxido de hidrógeno es producido en ambientes celulares bajo una gran variedad de circunstancias. Así, los linfocitos activados liberan peróxido de hidrógeno como parte de un mecanismo oxidativo con fines antibióticos.¹⁵ Se ha descubierto que la velocidad de eliminación del peróxido de hidrógeno mitocondrial está ampliamente relacionada con la esperanza de vida o edad fisiológica de los organismos.¹⁶ En este contexto, resulta de especial interés poder desarrollar métodos que permitan detectar y cuantificar la cantidad de peróxido de hidrógeno presente en organismos vivos.

El estudio de las propiedades electrocatalíticas de moléculas orgánicas que contienen al ión Fe(III) ha generado un considerable interés en los últimos años. En particular, las ftalocianinas y porfirinas de Fe(III) juegan un papel crucial en determinadas funciones biológicas tales como la transferencia de carga, el transporte de oxígeno y la catálisis de procesos de incorporación de oxígeno a otras moléculas. En estos materiales las propiedades catalíticas están altamente relacionadas con la presencia de iones hierro enlazados al material orgánico.¹⁷ De hecho, porfirinas de Fe electropolimerizadas sobre oro han sido caracterizadas a nivel molecular y se han estudiado ampliamente sus propiedades electroquímicas y electrocatalíticas en relación a la electrorreducción de oxígeno y de peróxido de hidrógeno.¹⁸ En contraste, las melaninas, que contienen al ión Fe(III), y que podrían ser materiales potencialmente importantes en electrocatálisis y bioelectrocatálisis, no han sido tan profundamente estudiadas.

Resulta, por tanto, de especial interés, alcanzar una mayor comprensión acerca de los estados de agregación de las especies de hierro en las melaninas. Hasta la fecha, el sitio de enlace del Fe(III) en las melaninas ha sido



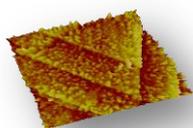
examinado por diferentes técnicas^{8,11,19} y , en general, se puede concluir que el Fe(III) está predominantemente ligado a la melanina por medio de grupos hidroxilos fenólicos formando complejos de alto spin de tetra a hexacoordinados con simetría rómbica u octaédrica distorsionada.

Las melaninas podrían ser también importantes desde el punto de vista de la electroquímica. De hecho, ya se han descrito dispositivos basados en melaninas para el almacenamiento de energía eléctrica.²⁰ También se ha propuesto el uso de biopolímeros como la melanina en aplicaciones optoelectrónicas y de fotovoltaica.²¹ Por lo tanto, se puede considerar a las melaninas como un material más que interesante, con una amplia ventana de posibles aplicaciones tecnológicas en el desarrollo de dispositivos electrónicos, fotoactivos, de almacenamiento de energía y biosensores.

En este sentido, nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente un novedoso método encaminado al autoensamblado electroquímico de películas de melanina sobre Au(111) a partir de soluciones acuosas de eumelanina sintética.²² A diferencia de otros métodos electroquímicos que implican la oxidación de monómeros,⁵ estos depósitos se obtienen mediante polarización catódica en soluciones alcalinas de melanina. En este caso, la melanina se autoensambla bajo control potencioestático dando lugar a estructuras análogas a las que se han descrito en la bibliografía para las melaninas naturales. Por lo tanto, estas películas pueden ser utilizadas como sistemas biomiméticos con objeto de ser sometidos a estudios de diferente naturaleza. En concreto, aquellos relacionados con sus propiedades electroquímicas ofrecen un impacto potencial en áreas de la ciencia que se extienden desde la biología a la nanotecnología.

IV.1.2. Preparación y caracterización fisicoquímica de películas de melanina sobre Au(111)

La manipulación e inmovilización de depósitos de melanina sobre sustratos conductores es interesante desde la perspectiva de sus potenciales aplicaciones tecnológicas y para el conocimiento de sus propiedades rédox, cuestión ésta de máxima relevancia para investigar algunas de las importantes



propiedades que expresan las melaninas en los seres vivos. Además, también permitiría alcanzar una mayor comprensión acerca del proceso de auto-organización de las melaninas naturales. Sin embargo, la preparación de películas de melanina no pasa por ser una tarea fácil ya que a la baja solubilidad que ofrece dicho pigmento en soluciones acuosas hay que unirle su alta estabilidad química y su heterogeneidad estructural.

Por tanto, hasta la fecha, se habían preparado depósitos de melanina sobre diferentes sustratos como mica, grafito pirolítico altamente orientado (*HOPG*), Au y Si, por spin-coating²³ o por evaporación a partir de disoluciones de este biopolímeros en diferentes solventes.²⁴ De hecho, los primeros intentos, llevados a cabo por parte de este grupo de investigación, de manipular de forma controlada la melanina fueron realizados por evaporación de soluciones de eumelanina sintética a partir de distintos disolventes (agua, metanol, etanol, hexano, tolueno, etc.) sobre diferentes sustratos (oro, *HOPG* y mica). En la Figura IV.1.1 se muestra un ejemplo de evaporación de melanina sobre mica.

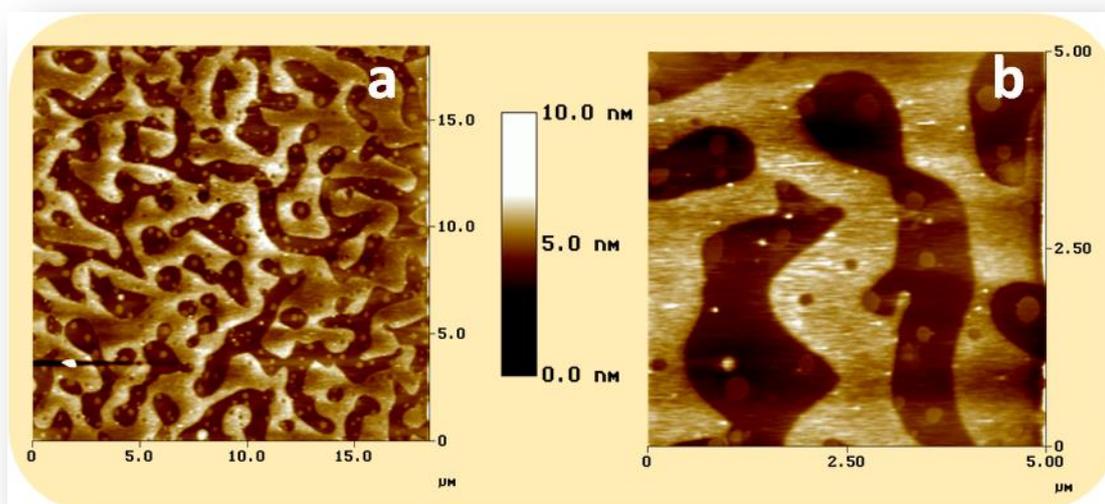
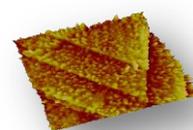


Figura IV.1.1. Imágenes de AFM obtenidas tras la evaporación sobre mica de 0,025 mL de disolución metanólica de melanina 0,0066 g L⁻¹: (a) 20 μm X 20 μm y (b) 5 μm X 5 μm.

Sin embargo, por medio de esta metodología no fue posible controlar ni el tamaño de partícula ni la morfología de los depósitos. Además y todavía más significativo, la respuesta voltamétrica de estos depósitos de melanina,



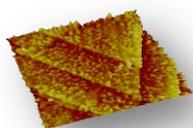
obtenidos por evaporación, resultó inexistente en todos los casos comentados.

Ya más recientemente se han descrito métodos más sofisticados consistentes en la oxidación de 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina y posterior evaporación sobre sustratos de silicio.²⁵ Sin embargo, los procesos de evaporación como los referidos dan lugar habitualmente a películas poco homogéneas y discontinuas, con estructuras y propiedades fisicoquímicas poco reproducibles.

Para evitar los inconvenientes descritos en los casos anteriores, en los últimos tiempos, se ha recurrido a la electroquímica para preparar películas análogas a la melanina, por ejemplo, por electrooxidación de DHI sobre carbón vítreo.^{5b,14d,26} No obstante, la relación entre tales películas preparadas a partir de DHI y las melaninas no está suficientemente bien definida, especialmente en lo que se refiere a la estructura de las películas y a su comportamiento redox. En esta misma línea de actuación, Meredith y colaboradores han llevado a cabo la síntesis de películas de derivados de melanina sobre ITO a partir de un método galvanostático por electrooxidación de L-dopa.^{5d}

Dada la extrema complejidad de las diversas melaninas presentes en la naturaleza así como las dificultades que ofrece su aislamiento a partir de medios naturales, nos hemos centrado en la preparación de películas de eumelanina sintética sobre distintos sustratos, por medio de varios métodos (evaporación y electroquímico potencioestático), con objeto de poder caracterizar estas películas por voltametría cíclica, microscopía de efecto túnel y microscopía de fuerzas atómicas y magnéticas y, también, por espectroscopías Auger, XPS y XANES. Este biopolímero sintético se obtiene por oxidación de tirosina, dopa, DHI o DHICA, bien enzimática (tirosinasa, peroxidasa), bien química ($K_3[Fe(CN)_6]$).^{9c}

La eumelanina sintética se disuelve fácilmente en disoluciones acuosas de NaOH 0,1 M. En principio se podría considerar que los resultados obtenidos a pH 13 son difícilmente extrapolables a la hora de estudiar el comportamiento de la melanina en los seres vivos (la melanina ejerce su actividad, por tanto, a pH fisiológico). Sin embargo, también es cierto que, en los microambientes



celulares en los que la melanina desarrolla su acción tampón frente a agentes oxidantes, se alcanzan altas concentraciones de radicales e iones OH^- , lo cual hace que el pH local, en determinadas zonas de intensa actividad celular, sea mucho más alto de lo que cabría esperar a priori. Teniendo en cuenta esta circunstancia, parecía razonable comprobar si el hecho de usar como disolución electrolítica de trabajo una solución alcalina de eumelanina sintética, alteraba de alguna manera el ciclo voltamograma estabilizado del Au(111) registrado en NaOH 0,1 M. Ambas respuestas electroquímicas se muestran en la Figura IV.1.2:

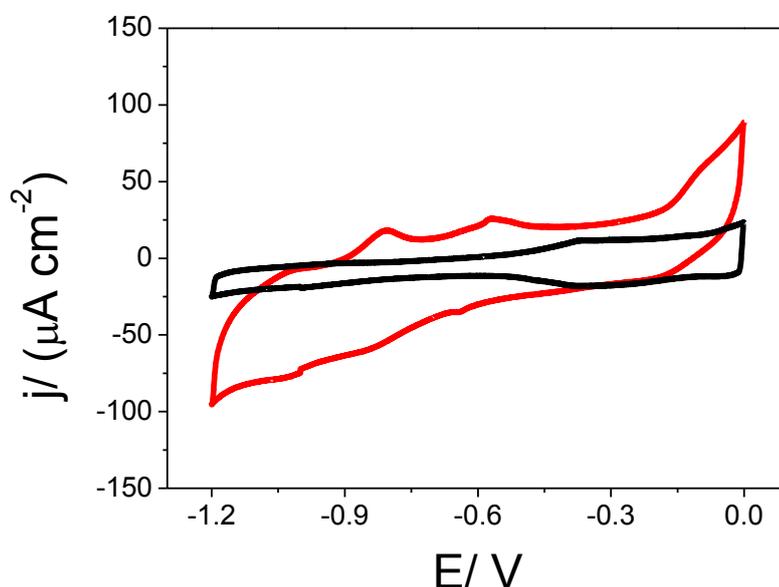
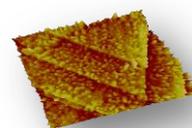


Figura IV.1.2. Ciclo voltamogramas de Au(111) registrados a $0,2 \text{ V s}^{-1}$ en NaOH 0,1 M (en color negro) y en $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de melanina sintética en NaOH 0,1 M (línea roja).

Tal y como se muestra en dicho gráfico, la eumelanina presente en solución exhibe un comportamiento electroquímico característico que modifica significativamente el mostrado por el Au(111).

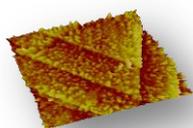
Dado que a potenciales más catódicos que el potencial de carga cero del electrodo de Au(111), esto es $-0,4 \text{ V}$,²⁷ especies aromáticas que poseen átomos de nitrógeno, como las que incorporarían los oligómeros de melanina, quedan adsorbidas como consecuencia de la interacción de los electrones π de estos anillos aromáticos, en una disposición que obliga a la coplanaridad del anillo sobre el sustrato.²⁸ Parecería razonable, entonces, proponer un método



electroquímico potenciostático para la preparación de películas de melanina sobre sustratos conductores. En este sentido, resulta de especial importancia seleccionar el potencial más adecuado para la electrodeposición de eumelanina sobre el electrodo a partir de soluciones alcalinas del biopolímero. Así, se realizaron distintas experiencias a diferentes potenciales de adsorción comprendidos entre 0,0 y -1,3 V de las que se pudo concluir que cuanto más catódico es el potencial aplicado, mayor es la modificación obtenida en el voltamograma correspondiente.

En resumen, se pudo comprobar que la eumelanina sintética se adsorbía sobre el electrodo de Au mediante el proceso electroquímico descrito y que, además, esta adsorción se veía notablemente favorecida por la aplicación de potenciales cada vez más negativos. Si bien, en la práctica, se decidió trabajar preferentemente a potencial de adsorción de -1,0 V para evitar entrar en la zona de evolución de hidrógeno (HER).

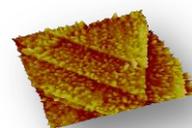
Por tanto, para la preparación de las películas, un electrodo de Au previamente sometido a calentamiento a la llama (*flame annealing*) con objeto de obtener terrazas micrométricas de altura monoatómica en el plano (111), es ubicado como electrodo de trabajo en una celda electroquímica convencional de tres electrodos usando como solución electrolítica 0,3 g/ L de melanina sintética en NaOH 0,1 M. El contraelectrodo es un anillo de Pt y como referencia se emplea un electrodo de Ag/ AgCl. En estas condiciones, se aplica al electrodo de Au(111) un voltaje de -1,0 V durante diferentes tiempos de adsorción, t_a . Es importante aclarar que, una vez se ha extraído el electrodo modificado de la celda, éste es aclarado primero con NaOH 0,1 M para retirar los restos de eumelanina no adsorbida y después con agua mili-Q para desplazar posibles restos de NaOH que hayan quedado retenidos en la película. Tras este procedimiento de lavado, el electrodo se deja secar durante al menos 10 horas en atmósfera de N_2 antes de llevar a cabo su caracterización por STM.

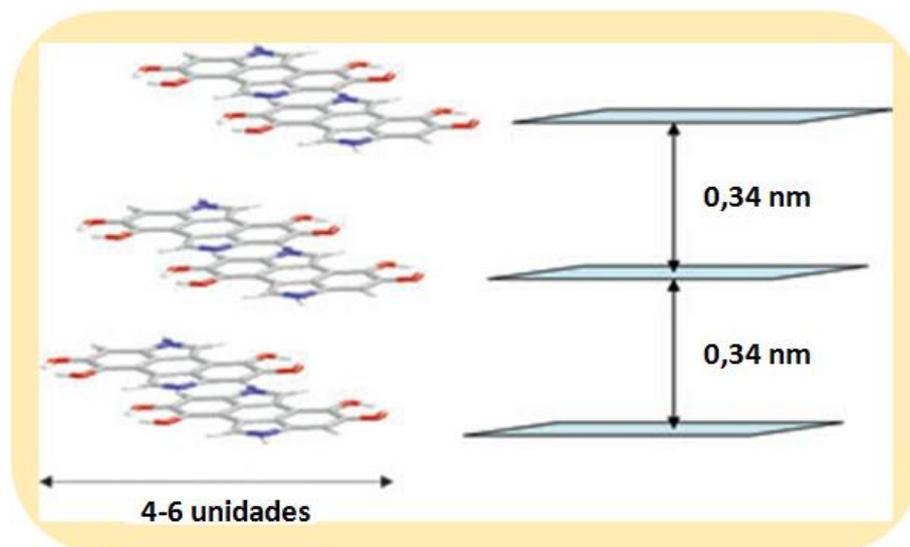


IV.1.2.1. Caracterización por STM y AFM de películas de melanina sobre Au(111)

Hasta la fecha, la estructura macromolecular fundamental de las melaninas, si es que es posible aplicar este concepto a un material tan heterogéneo como el que nos ocupa, no ha podido ser inequívocamente establecida.⁹ Pese a ello, a mediados de los años noventa se propuso un modelo de organización estructural basado en una arquitectura supramolecular de las partículas de melanina.²⁹ Los estudios realizados en los últimos tiempos por microscopía de barrido de electrones (SEM) y por microscopía de barrido de sonda, SPM (STM y AFM), sobre diferentes muestras de eumelanina, han permitido confirmar la existencia de al menos tres niveles básicos de organización estructural: gránulos de aproximadamente 100-200 nm que están, a su vez, constituidos por partículas de talla nanométrica (de entre 10 y 20 nm) y, por último, la mínima unidad estructural registrada, de entre 1-2 nm, constituida a partir de monómeros indólicos.^{5d,9}

Este último tamaño de partícula, que se ha podido detectar por STM,^{22,30} resulta, en cualquier caso, compatible con la presencia de entre cuatro a seis moléculas monoméricas enlazadas y dispuestas en el plano xy formando tetrámeros o hexámeros de estructura plana que, a su vez, se apilarían entre sí a lo largo del eje z por medio de interacciones π - π , con una distancia entre capas análoga a la que se ha podido detectar en el grafito, esto es, 3,4 Å, tal y como se muestra en el Esquema IV.1.1 Es decir, podría tratarse de lo que se ha dado en denominar “protomelanina” como oligómero básico constituyente de las eumelaninas.³⁰

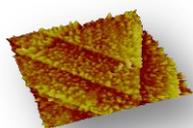




Esquema IV.1.1. Representación esquemática del modelo de apilamiento de oligómeros mostrando planos de índoles oligoméricos, apilados en la dirección del eje, separados por una distancia análoga a la observada entre las hojas de grafito, 3,4 Å.

A tenor de lo expuesto, queda más que justificado el empleo de las SPM con objeto de poder dilucidar las características estructurales y morfológicas de las películas de eumelanina crecidas electroquímicamente sobre Au.

A tal fin, un electrodo de Au(111) se sumergió durante 10 minutos a potencial de circuito abierto (OCP) en una solución 0,3 g/ L de eumelanina sintética en NaOH 0,1 M. Durante la inmersión los valores de OCP permanecieron en torno a -0,15 V. Hecho esto, el sustrato de Au(111) se extrajo cuidadosamente de la celda electroquímica, se lavó primero con NaOH 0,1 M y después se enjuagó con abundante agua Milli-Q. Por último, se dejó secar en corriente de N₂. Las imágenes obtenidas por STM, representadas en la Figura IV.1.3, de la superficie mostraron la presencia de pequeñas partículas aisladas con tamaños comprendidos entre 1,5-4 nm, ver fig. IV.1.3a, aleatoriamente distribuidas sobre las terrazas monoatómicas del Au(111). La altura promedio de las mismas está en torno a los 0,33 nm, valor similar al correspondiente a la separación entre capas del grafito.²²



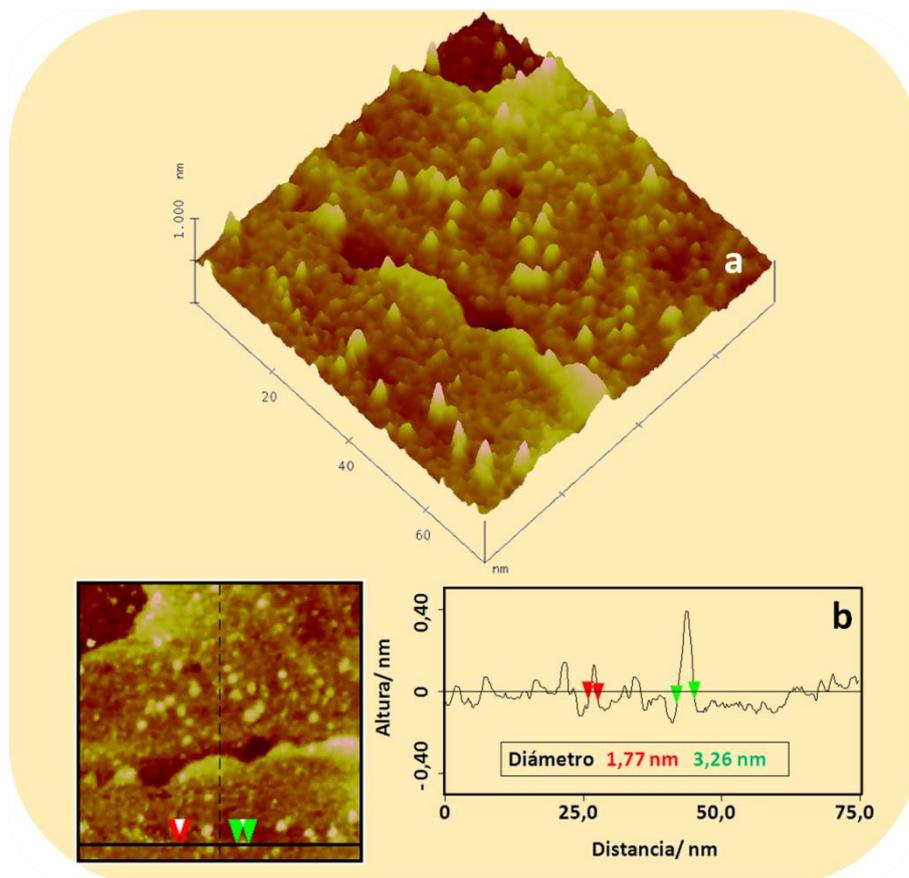
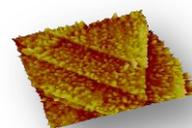


Figura IV.1.3. (a) Imagen STM 3D de $70 \times 70 \text{ nm}^2$ de la superficie del Au(111) tras inmersión durante 10 minutos en solución $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de melanina sintética en NaOH $0,1 \text{ M}$ a OCP. (b) Sección transversal característica mostrando partículas individuales de melanina con tamaños comprendidos entre $1,5\text{-}4 \text{ nm}$ sobre la superficie del Au. Las imágenes STM se obtuvieron con un potencial bias de $1,0 \text{ V}$ y para una corriente túnel de $0,35 \text{ nA}$.

Las dimensiones exhibidas por las partículas de menor tamaño, fig. IV.1.3b, son coincidentes con las descritas en la bibliografía para la molécula de protomelanina, propuesta como unidad mínima estructural de las melaninas, esto es $1,7 \times 1,2 \text{ nm}^2$.³⁰ Dado que estas partículas se han podido observar igualmente en experiencias realizadas por STM in situ en soluciones electrolíticas de HClO_4 ,²² se puede concluir que tales partículas no se forman como consecuencia del proceso de secado.

Sin embargo, es evidente que en condiciones de OCP no resulta posible obtener una película continua y uniforme de melanina sobre la superficie del Au(111) y, de hecho, sólo se adsorben sobre ésta partículas de reducidas dimensiones. Por tanto, se decidió inducir el crecimiento de la película



mediante la aplicación de potencial al electrodo.^{22,28} Así, cuando el sustrato de Au(111) es sometido a polarización catódica de -1,0 V durante 10 minutos en una solución alcalina de eumelanina sintética, tiene lugar, efectivamente, el crecimiento de una película continua sobre la superficie. En la Figura IV.1.4 se muestran las imágenes STM, correspondientes al mencionado electrodepósito, que revelan la presencia del depósito de melanina que cubre el sustrato, fig. IV.1.4a.

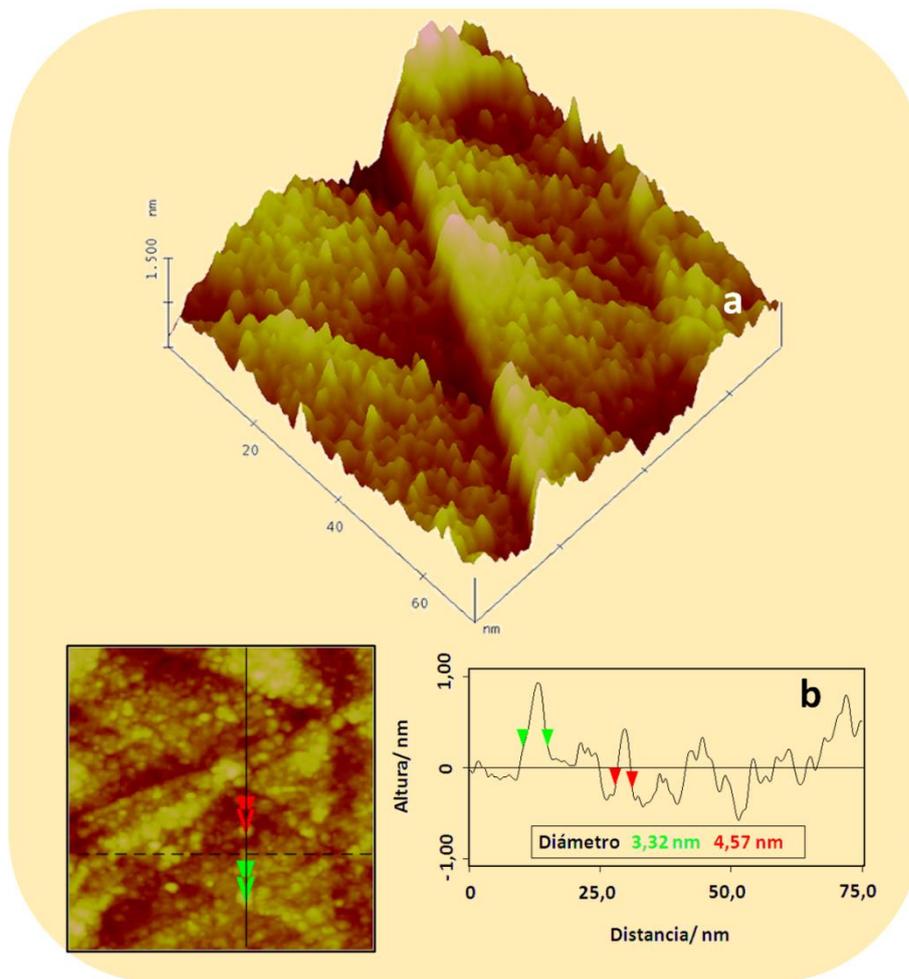
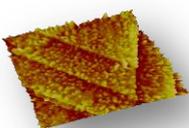


Figura IV.1.4. (a) Imagen STM 3D de $70 \times 70 \text{ nm}^2$ de la superficie del Au(111) tras inmersión durante 10 minutos en solución $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de melanina sintética en NaOH $0,1 \text{ M}$ a $-1,0 \text{ V}$. (b) Sección transversal característica mostrando partículas individuales de melanina con tamaños comprendidos entre 2-5 nm sobre la superficie del Au. Las imágenes STM se obtuvieron con un potencial bias de $1,0 \text{ V}$ y para una corriente túnel de $0,35 \text{ nA}$.

En este caso, las terrazas triangulares monoatómicas del Au(111) aparecen cubiertas por una película ultradelgada de melanina formada por partículas de



talla nanométrica cuyas dimensiones varían entre los 2-5 nm, fig. IV.1.4b.

El aumento en el tiempo de adsorción en un orden de magnitud trajo como consecuencia la formación de películas más continuas y compactas, constituidas a su vez por agregados de mayor tamaño que los descritos hasta ahora. Las imágenes STM que se muestran a continuación en la Figura IV.1.5 se han obtenido, tras polarización catódica de -1.0 V, para películas de eumelanina sintética de $t_a = 100$ minutos. Estas películas, fig. IV.1.5a, exhiben regiones bien diferenciadas. Por un lado, se aprecian zonas compactas y homogéneas en las que las partículas de melanina se presentan en un alto grado de ordenamiento, fig. IV.1.5b. Por otro, existen áreas del sustrato con agregados de partículas de mayor tamaño que las anteriores, distribuidas aleatoriamente, que configuran una película tridimensional sobre las capas ordenadas subyacentes, fig. IV.1.5c.

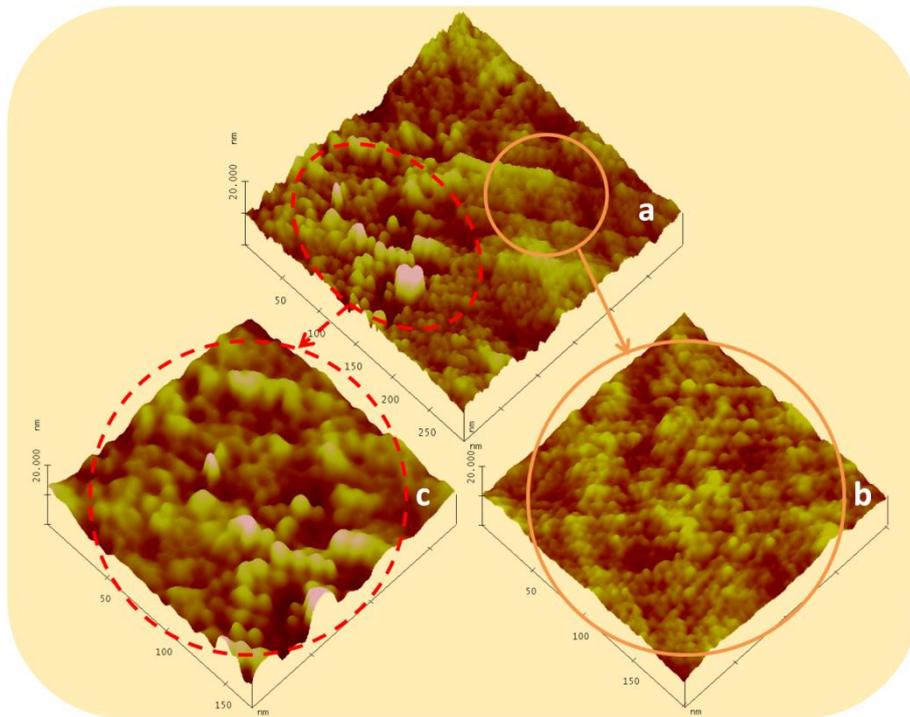
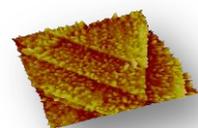
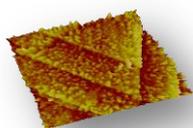


Figura IV.1.5. Imágenes 3D obtenidas por STM en una película de melanina de $t_a = 100$ minutos sobre Au(111): (a) $300 \times 300 \text{ nm}^2$, (b) $175 \times 175 \text{ nm}^2$, región desordenada y (c) $200 \times 200 \text{ nm}^2$, región ordenada.

En la Figura IV.1.6 se muestran en detalle una imagen tridimensional, fig. IV.1.6a, y una sección transversal representativa, fig. IV.1.6b, obtenidas en las regiones ordenadas de una película de melanina de $t_a = 100$ minutos. Se



pueden observar en ella nanopartículas cuyas dimensiones oscilan entre los 5 y 8 nm en anchura y entre los 0,33 a 1 nm en altura. El tamaño promedio de tales partículas depositadas en la superficie del sustrato se ve reflejado en la presencia de un pico máximo próximo a 5 nm en el análisis 2D de frecuencias, PSD, fig. IV.1.6c. Teniendo en cuenta las dimensiones propuestas para la protomelanina,³⁰ las partículas de entre 5-8 nm, mostradas en la imagen STM, implicarían entre 12 y 30 unidades de la protomolécula básica. Por otro lado, los valores de las alturas de una cantidad apreciable de nanopartículas, es decir, 1 nm \approx 3 capas, flechas rojas en fig. IV.1.6b, se muestran razonablemente compatibles con lo que cabría esperar para apilamientos de anillos aromáticos dispuestos paralelamente sobre la superficie del Au(111), de acuerdo a lo que se ha descrito previamente en la bibliografía.³⁰



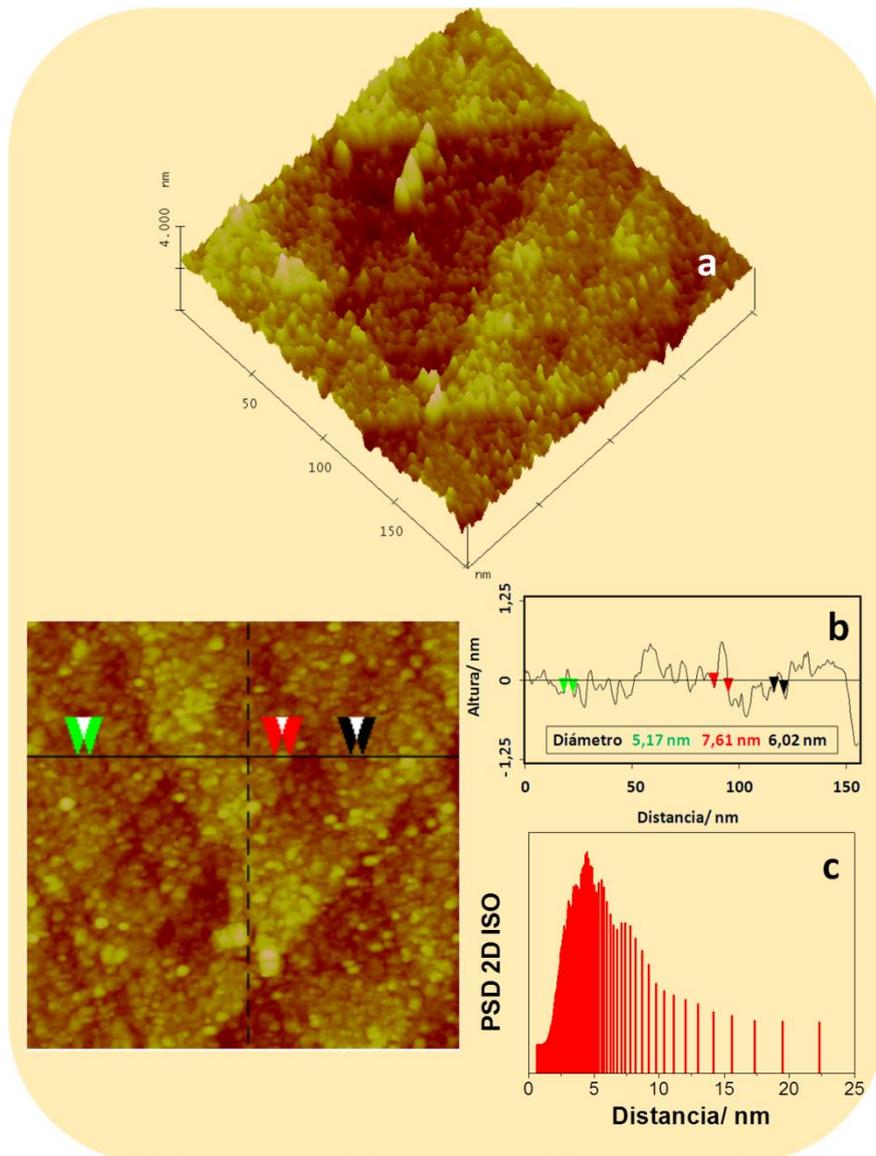
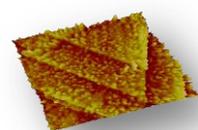
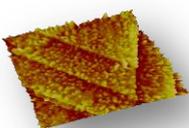


Figura IV.1.6. (a) Imagen 3D obtenida por STM a partir de una película de melanina de $t_a = 100$ minutos sobre Au(111). (b) Sección transversal característica mostrando partículas individuales de melanina con tamaños comprendidos entre 4-8 nm sobre la superficie del Au. (c) Análisis 2D de frecuencias, PSD, de la imagen. Las imágenes STM se obtuvieron con un potencial bias de 1,0 V y para una corriente túnel de 0,35 nA.

Esto último adquiere una relevancia más que notable si se tiene en cuenta que algunas de las propiedades más significativas de las melaninas pueden quedar convenientemente justificadas en la base de que ésta se estructura a partir de un apilamiento de oligómeros dando lugar a placas conectadas entre sí por medio de interacciones π - π entre anillos aromáticos de placas consecutivas.^{30b,31}



Las imágenes STM de alta resolución que se muestran en la Figura IV.1.7, obtenidas en las regiones ordenadas de una película de $t_a = 100$ minutos, mostraron que las unidades de menor tamaño presentes en la película, de entre cinco y ocho nanómetros de ancho por entre 0,3 y 1 nm de altura, forman, por un proceso de autoensamblado electroquímico, agrupaciones ordenadas que reproducen aproximadamente la topografía del Au(111), fig. IV.1.7a. Esto último también puede apreciarse en términos de la distribución hexagonal compacta que adquieren dichas nanopartículas de melanina sobre el sustrato, fig. IV.1.7b.



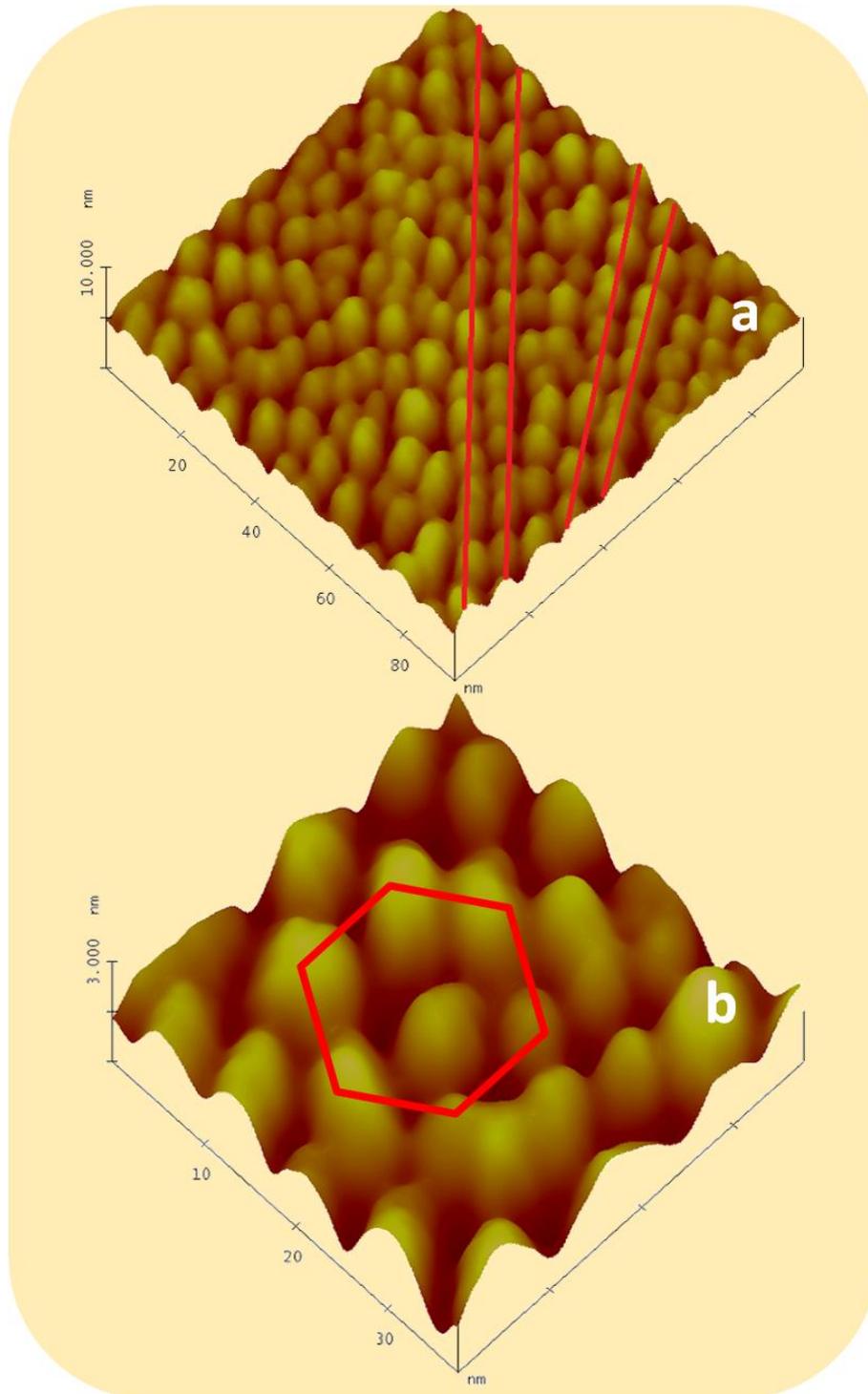
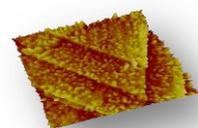


Figura IV.1.7. Imágenes 3D obtenidas por STM en la región ordenada de una película de melanina de $t_a = 100$ minutos sobre Au(111): (a) $90 \times 90 \text{ nm}^2$ y (b) $35 \times 35 \text{ nm}^2$.

En estas zonas confluyen, por tanto, dos órdenes de corto alcance, es decir, por un lado se aprecia la tendencia de las nanopartículas de eumelanina a formar filas paralelas de mayor o menor longitud y, por otro, un cierto orden tipo



hexagonal compacto más o menos distorsionado.

Por último, en la Figura IV.1.8 se puede apreciar, en aquellas áreas de las películas con escaso orden, fig. IV.1.8a, la presencia de nanopartículas de melanina que exhiben un mayor tamaño que las mostradas en la fig. IV.1.6. De hecho, las dimensiones de tales partículas se extienden desde los 7 hasta los 15 nm, fig. IV.1.8b.

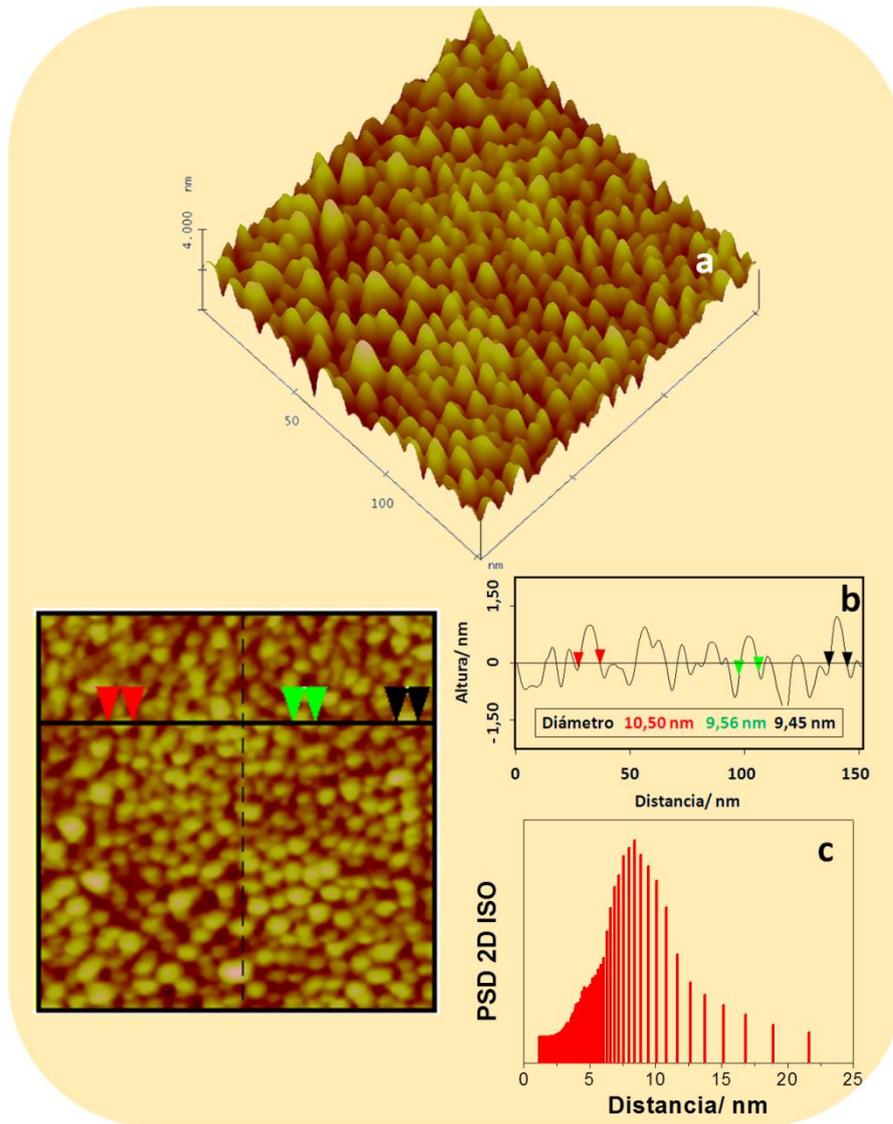
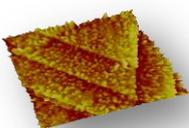


Figura IV.1.8. (a) Imagen 3D obtenida por STM a partir de una película de melanina de $t_a = 100$ minutos sobre Au(111). (b) Sección transversal característica mostrando partículas individuales de melanina con tamaños comprendidos entre 7-15 nm sobre la superficie del Au. (c) Análisis 2D de frecuencias, PSD, de la imagen (c). Las imágenes STM se obtuvieron con un potencial bias de 1,0 V y para una corriente túnel de 0,35 nA.



En relación a esto, la PSD, fig. IV.1.8c, muestra un máximo bien definido que sitúa el tamaño promedio de las partículas presentes en estas zonas en torno a los 9-10 nm. Además, el análisis exhaustivo realizado sobre imágenes de campos reducidos, registradas en dichas regiones, permite extraer conclusiones interesantes acerca de la morfología de los gránulos de melanina presentes en las mismas. Así, en la Figura IV.1.9 se pone de manifiesto la estructura fina de tales gránulos que parecieran estar formados por nanopartículas de alrededor de 2 nm, esto es, por partículas de protomelanina.²²

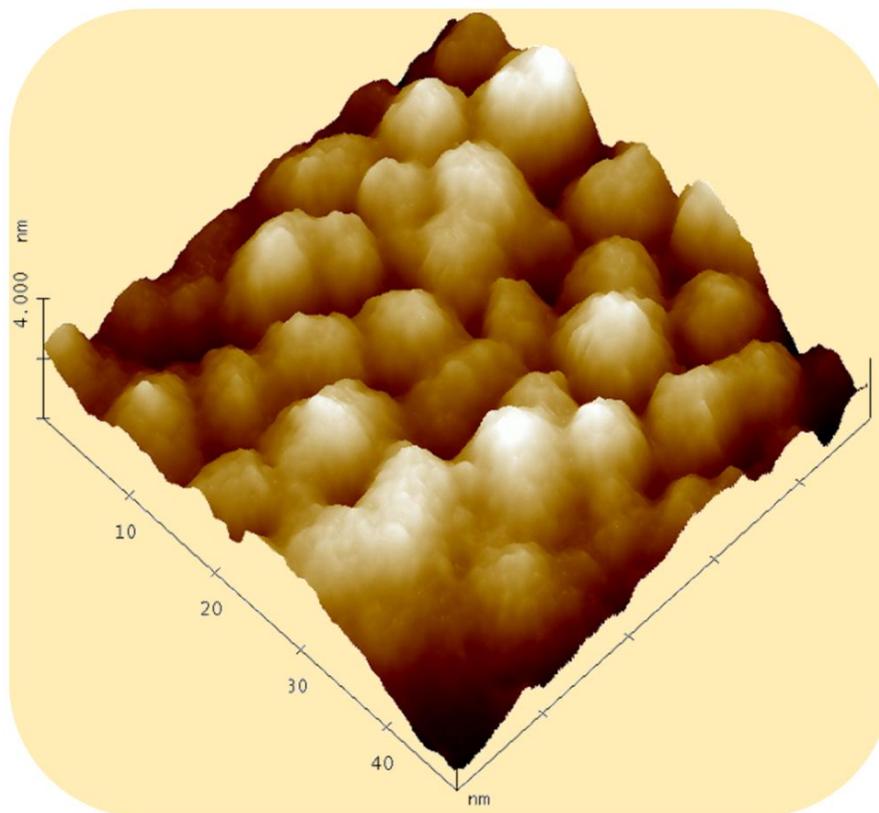
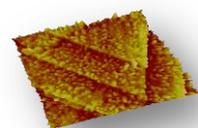


Figura IV.1.9. Imagen 3D de $35 \times 35 \text{ nm}^2$ obtenida por STM en una de las regiones desordenadas de una película de melanina de $t_a = 100$ minutos sobre $\text{Au}(111)$.

Aún resulta posible obtener películas más compactas que las mostradas hasta ahora incrementando el t_a hasta los 300 minutos. En la Figura IV.1.10 se han representado imágenes obtenidas por STM a partir de estas películas. Adviértase la presencia de zonas donde se acumulan gránulos de gran tamaño, de entre 30-50 nm de ancho, fig. IV.1.10a. En este caso, la estructura de los objetos de mayores dimensiones, fig. IV.1.10b, constituidos por nanopartículas



de entre 4-8 nm, se pudo confirmar tras el lavado ácido de la película, fig. IV.1.10c. De hecho, algunos de los gránulos y nanopartículas que cubrían la superficie del Au en la fig. IV.1.10b desaparecen tras la inmersión en la solución ácida, dejando así parte de las terrazas triangulares del Au(111) perfectamente visibles. Igualmente estas imágenes reflejan el espesor de escala nanométrica de estas películas.

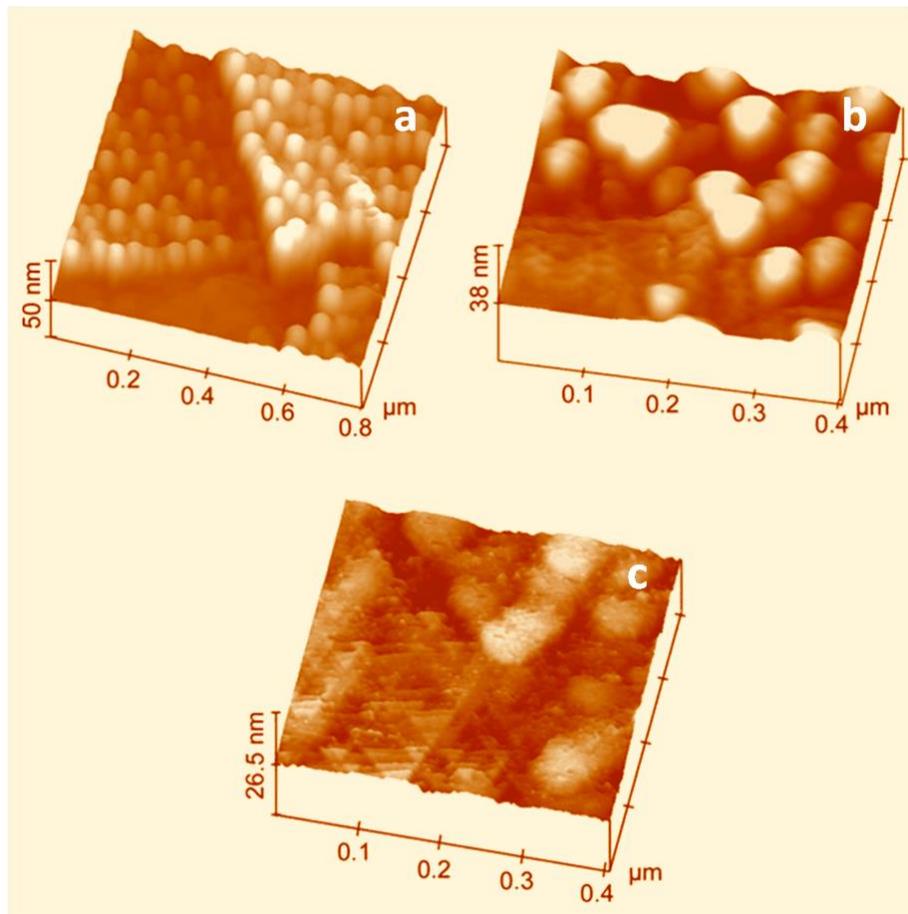
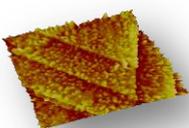


Figura IV.10. Imágenes 3D obtenidas por STM en una película de melanina de $t_a = 300$ minutos sobre Au(111): (a) $800 \times 800 \text{ nm}^2$, (b) $400 \times 400 \text{ nm}^2$ y (c) $400 \times 400 \text{ nm}^2$ tras lavado ácido en H_2SO_4 0,1 M durante 5 minutos.

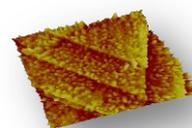
Por todo lo comentado, las características morfológicas de las películas no pueden atribuirse exclusivamente al proceso de electrodeposición dado que éstas exhiben una estructura análoga a la que se ha descrito para las melaninas naturales.²²



IV.1.2.2. Caracterización por AES y XPS de películas de melanina sobre Au(111)

Tomando en consideración la gran heterogeneidad que ofrecen las diferentes melaninas y conocida su capacidad de atrapar cantidades significativas de iones metálicos, se planteó la necesidad de dilucidar la composición química de estas películas de melanina sintética electrodepositadas sobre Au. A tal fin se recurrió a la espectroscopía Auger (AES). Esta técnica constituye una poderosa herramienta para poder conocer la composición elemental superficial de diversos materiales.

En este sentido, se han representado en la Figura IV.1.11 los resultados de las medidas registradas por AES sobre diferentes depósitos de melanina. Así, en la fig. IV.1.11a se muestra el espectro Auger característico obtenido para una película de melanina de $t_a = 100$ minutos. Dicho gráfico muestra las señales características de una película orgánica (C, N y O), con una relación N/ C entre 0,15 y 0,18, similar a la que se ha descrito para diferentes clases de melaninas.³¹ Además de las señales comentadas, también aparecen tres picos entre 600 y 750 eV que corresponden a especies de Fe. En la fig. IV.1.11b se puede ver el espectro obtenido después de sumergir la muestra anterior durante 1 minuto en disolución 0,1 M de H_2SO_4 . Por su parte, en la fig. IV.1.11c se recoge el espectro AES obtenido a partir de una película de melanina de mayor espesor, esto es $t_a = 16$ horas. Por último, el espectro de la fig. IV.1.11d corresponde a una película formada por evaporación desde una disolución metanólica de melanina. Los resultados mostrados en el gráfico indican, por tanto, la presencia inequívoca de especies de Fe en las películas de eumelanina electrodepositadas sobre Au. Ya los análisis realizados por absorción atómica de disoluciones 0,3 g L⁻¹ de melanina en NaOH 0,1 M mostraron que éstas contenían hasta 0,28 ppm de hierro.



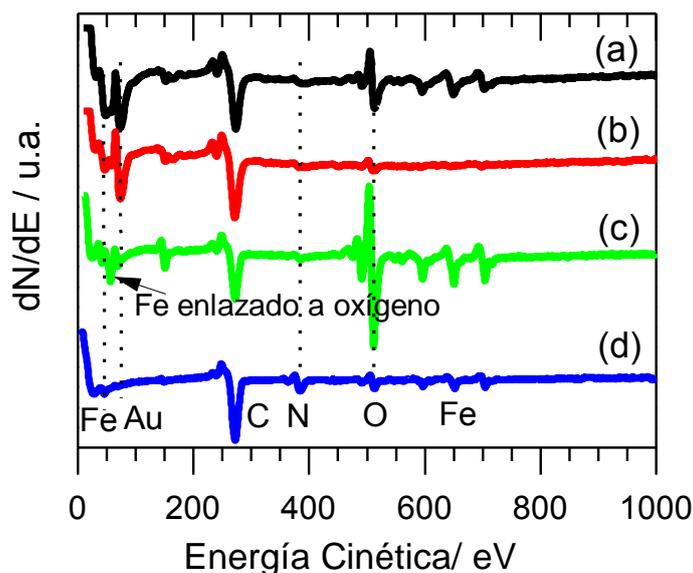
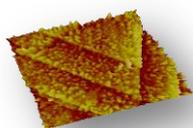


Figura IV.1.11. Espectro AES de películas de melanina crecidas electroquímicamente a $E = -1.0$ V a partir de soluciones $c = 0.3$ g L^{-1} en NaOH 0,1 M: (a) $t_a = 100$ minutos, en color negro. (b) $t_a = 100$ minutos tras lavado ácido en H_2SO_4 0,1 M durante 1 minuto, rojo. (c) $t_a = 16$ horas, verde. (d) Espectro AES de una película de melanina evaporada (a partir de una disolución metanólica) sobre Au, en azul. Están indicadas las señales de Au, C, N, O y Fe.

El gráfico de la evolución de las señales N/Au y Fe/Au con el tiempo de adsorción, que se muestra en la Figura IV.1.12, refleja fielmente el aumento en el espesor de la película de melanina. De hecho, se puede observar que, para tiempos de adsorción elevados, la señal del Au va desapareciendo, indicando así que el sustrato va quedando completamente cubierto por la película orgánica del biopolímero.



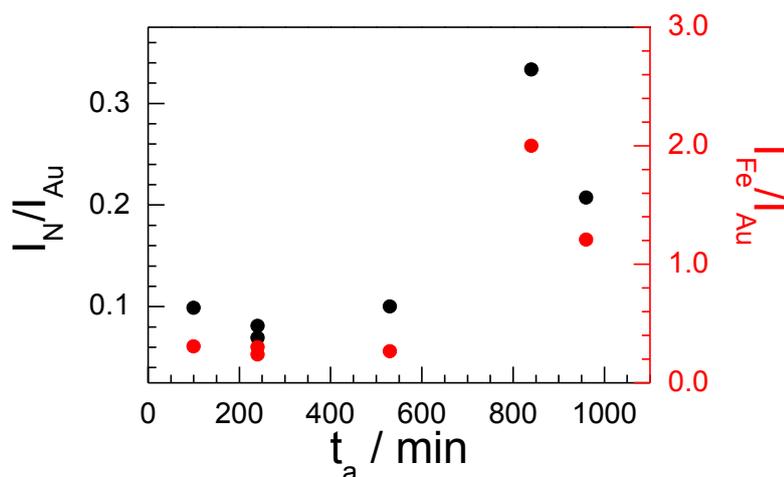
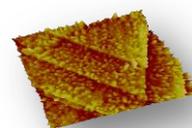


Figura IV.1.12. Evolución de las señales Auger con el tiempo de electroadsorción, t_a , a $E = -1.0$ V, a partir de una disolución de melanina $0,3 \text{ g L}^{-1}$ en NaOH $0,1 \text{ M}$. Relación N/Au vs. t_a , en color negro. Relación Fe/Au vs. t_a , rojo.

Para películas suficientemente gruesas, fig. IV.1.11c, donde la señal del Au no interfiere, los espectros Auger exhiben una señal característica a baja energía, Fe MVV a 55 eV, típica del Fe unido a oxígeno.³² La relación Fe/N que se extrae de los espectros AES para las películas de melanina formadas sobre Au es próxima a 3, valor éste que excede ampliamente el observado en la bibliografía para el Fe enlazado al material orgánico en las melaninas naturales.^{11b} Se conoce que la máxima relación Fe/N que cabría esperar para melaninas sólidas es próxima a 0,25. Incluso, la relación Fe/N para la película de eumelanina evaporada, fig. IV.1.11d, es de aproximadamente 0,75, es decir, es siempre inferior a la unidad. Estos resultados indican claramente que, mientras tiene lugar la formación de las películas de melanina, se produce un notable enriquecimiento en Fe procedente de la disolución. Resulta razonable asumir que, durante el proceso de autoensamblado electroquímico de las películas, determinadas especies de óxido de hierro podrían quedar electroadsorbidas y almacenadas en la propia película de melanina. De hecho, es bien conocido que es posible sintetizar partículas de óxidos de hierro por coprecipitación de Fe(II) y Fe(III) en soluciones de NaOH.³³ Esto podría explicar la menor presencia de especies de Fe-O en la película de melanina obtenida por



evaporación.

También se han obtenido evidencias de la presencia de especies de óxido de Fe a través del análisis de los resultados registrados tras tratamiento ácido de películas de melanina soportadas sobre Au. De hecho, después de sumergir la película durante un minuto en H_2SO_4 0,1 M, las señales de Fe prácticamente desaparecen, la de O se reduce bastante y las de C y N prácticamente permanecen inalteradas. Esto se traduce en que las especies de óxidos de Fe se han disuelto selectivamente en medio ácido. Esto constituye una clara indicación de que ha tenido lugar el depósito de especies de óxidos de Fe durante la formación de la película.

Adicionalmente a todo lo anterior, también se han llevado a cabo medidas de XPS de estos electrodepuestos de melanina sobre Au(111). En la Figura IV.1.13 se han representado los resultados obtenidos para las señales de Fe 2p y N 1s, fig. IV.1.13a y IV.1.13b, respectivamente.

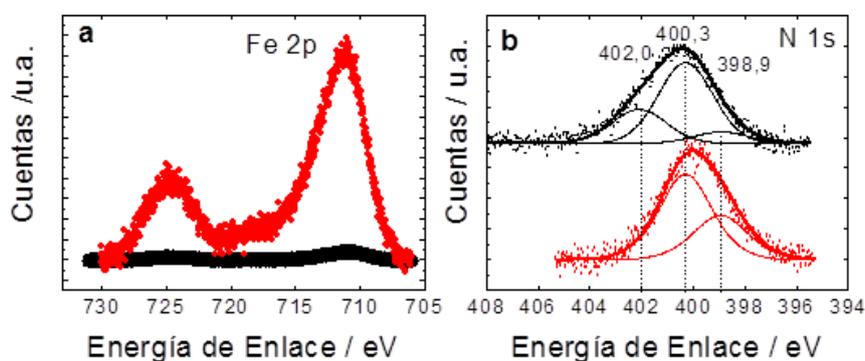
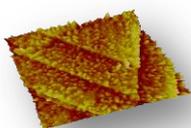


Figura IV.1.13. Espectros XPS: (a) señal Fe 2p para películas de melanina sobre Au(111) electrodepositada de $t_a = 100$ minutos, en color rojo, y evaporada en color negro; (b) señal de N 1s para melanina en polvo evaporada sobre Au(111), en color negro y para películas de melanina de $t_a = 100$ minutos sobre Au(111), en color rojo.

Los datos mostrados en la fig. 13a, donde el electrodeósito exhibe las señales típicas del Fe 2p, confirman el enriquecimiento en especies de hierro durante el crecimiento electroquímico de las películas de melanina. Más interesante aún son los resultados correspondientes a la señal de N 1s: mientras que en la película evaporada se detectan las tres componentes características presentes en las melaninas naturales,³¹ fig. IV.1.13b, en la



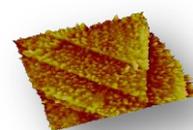
película electrodepositada sólo están presentes las contribuciones de las señales a 400 y 399 eV. Esto es indicativo, por tanto, de una cierta selectividad frente a las especies de N durante el proceso de formación de las películas. Más adelante se retomará esta discusión con más detalle.

En cualquier caso, a partir de los datos de AES y XPS y por medio de las señales de N, C, O y Fe, presentes en los electrodepósitos, se puede concluir que el electrodo de Au(111) ha sido modificado exitosamente con el sistema hierro-melanina por medios electroquímicos.

IV.1.2.3 Caracterización por XANES de películas de melanina sobre Au(111)

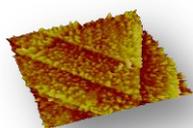
En este estudio se ha recurrido a la espectroscopia de absorción de rayos-X, en concreto a la estructura de absorción de rayos-X próxima al umbral (XANES), con objeto de poder dilucidar la naturaleza de las diferentes especies localizadas tanto en la eumelanina sólida como en las películas de eumelanina autoensambladas electroquímicamente sobre Au(111) y obtener información acerca de la presencia de especies específicas de Fe y sobre sus estados de oxidación. De hecho, la espectroscopia XANES puede ser usada como una técnica cualitativa de huella digital si se emplean muestras patrón adecuadas para la comparación de espectros. También permite la identificación de especies o de sitios atómicos desconocidos, incluso para sistemas diluidos. Esto es posible debido a la naturaleza del XANES que es sensible a la configuración electrónica del átomo absorbente y al arreglo espacial de los átomos que lo rodean.³⁴ La estructura próxima al umbral en un espectro de absorción de rayos-X está vagamente definida como el rango existente entre la energía del umbral y el punto en el cual comienza la estructura fina que aparece por encima del umbral de absorción de rayos-X (mejor conocido en su acrónimo en inglés, EXAFS) y se extiende entre 50 y 100 eV por encima de dicho umbral de absorción de rayos-X.

En este sentido, cabría comentar que se ha publicado recientemente la utilización de los espectros XANES de absorción del umbral K del Fe para determinar el estado de oxidación del Fe en centros de Fe altamente diluidos.³⁵



Por tanto, con objeto de poder llevar a cabo una caracterización más completa de las películas de eumelanina crecidas sobre Au(111), se recurrió a la espectroscopia XANES que permite, principalmente, obtener información acerca de los estados de oxidación de los elementos que forman parte de la película. En nuestro caso se pretende determinar la naturaleza de especies presentes en la melanina sólida así como en películas de eumelanina crecidas sobre Au(111) para concluir la presencia de especies específicas de hierro y sus estados de oxidación.

En la Figura IV.1.14 se muestran los espectros XANES de muestras de melanina, eumelanina sólida y películas de eumelanina sobre Au(111) ($E = -1,0$ V, $t_a = 24$ horas, $c = 0,3$ g L⁻¹) y de diferentes compuestos de óxidos de hierro tomados como referencia: FeO (Fe⁺²), Fe₃O₄ (Fe⁺² y Fe⁺³) y Fe₂O₃ (Fe⁺³). En lo sucesivo, nos referiremos al estado de oxidación del Fe como estado de oxidación “promedio” toda vez que las experiencias XANES representan un valor promediado en función de la abundancia atómica de cada tipo de Fe en cada muestra.



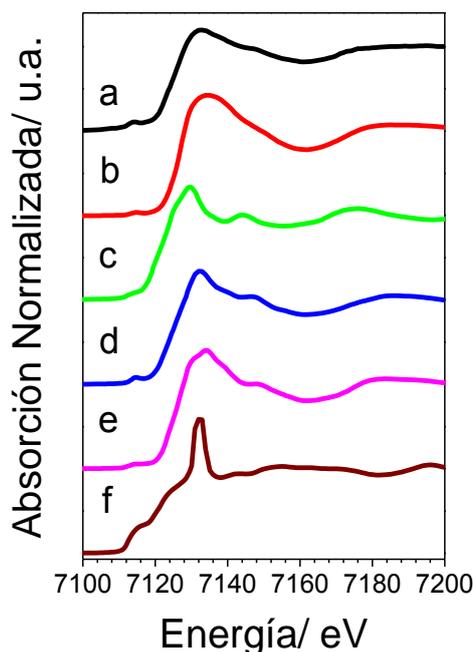
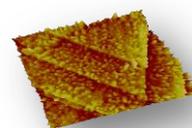


Figura IV.1.14. Espectro XANES de a) película de eumelanina soportada sobre Au(111), $E = -1,0$ V, $t_a = 24$ horas, $c = 0,3$ g L^{-1} ; b) melanina sólida; c) FeO; d) Fe_3O_4 ; e) Fe_2O_3 y f) Fe metálico (película). El análisis cualitativo permite una asignación directa de estados de hierro en las muestras de melanina por comparación con óxidos de hierro de referencia.

Se puede observar que el estado promedio del hierro difiere en la melanina depositada sobre oro frente al de la melanina sólida. Además existen correspondencias entre las muestras de melanina y los compuestos de referencia. En efecto, los datos extraídos del espectro XANES de la melanina pura exhiben un aspecto general y pre-picos característicos similares a los que se dan en el Fe_2O_3 , ver los espectros b y e respectivamente. Este tipo de similitudes también pueden observarse entre los espectros correspondientes a las películas de melaninas soportadas sobre Au y el Fe_3O_4 , espectros a y d, respectivamente.

En general hay que decir que la correspondencia entre muestras y compuestos de referencia no puede ser completa a causa de la diferente naturaleza de los materiales, es decir, mientras que en las muestras de melanina el Fe está muy diluido, en los compuestos de referencia encontramos Fe altamente concentrado en sistemas cristalinos. Además, a diferencia de lo



que sucede en los óxidos de Fe, en la estructura propuesta para la eumelanina sintética, consiste en un átomo de hierro coordinado a dos pares de átomos de oxígeno que son parte de dos estructuras tipo *o*-quinona en la melanina.^{11b,36}

Puede observarse la misma tendencia en los aumentos de energía del umbral K del Fe respecto al Fe metálico, Figura IV.1.15. Las concentraciones relativas de especies de hierro en películas de eumelanina sobre Au(111) pueden ser estimadas, considerando los espectros XANES, mediante la medida del aumento de energía en el borde de absorción, como una superposición lineal de sólo dos sitios de absorción del hierro: Fe⁺² en Fe₃O₄ y Fe⁺³ en la melanina. En general, se puede concluir que el hierro en la melanina sólida es más similar al Fe₂O₃ que a cualquier otro óxido mientras que el hierro en la película de melanina soportada sobre oro es muy próximo al hierro en la magnetita.

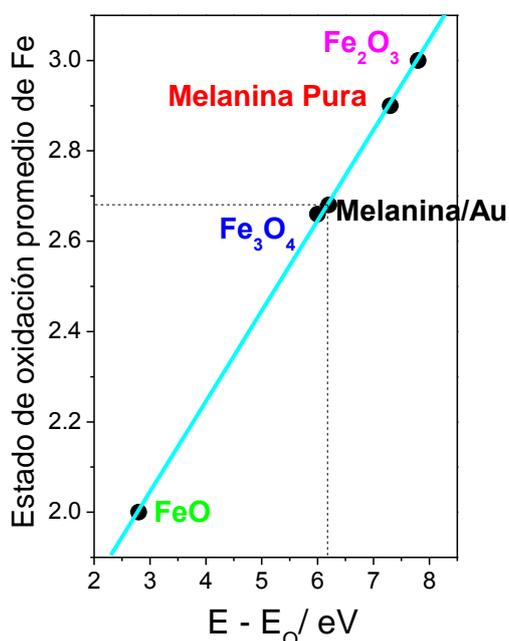
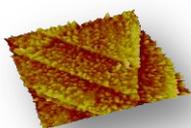


Figura IV.1.15. Aumentos de energía del umbral K del Fe respecto al Fe metálico (E_0). Los óxidos de Fe se toman como referencia para calibración del estado de oxidación promedio.

En la tabla IV.1.1 se muestran los valores de energía, la relación Fe⁺²/Fe⁺³ y las concentraciones relativas estimadas para las especies de Fe. Las principales especies de hierro presentes en las películas de eumelanina



depositadas sobre Au son compuestos tipo magnetita (aproximadamente en un 80 %) siendo el resto de especies de Fe existentes en la melanina un componente minoritario (en torno al 20 %).

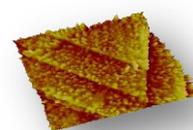
Muestra	Posición del umbral de energía/ eV	Relación Fe^{+2}/Fe^{+3}	Concentración relativa $Fe_3O_4/$ %
FeO	7120,6	1	-
Fe_3O_4	7125,0	0,5	100
Fe_2O_3	7127,3	0	-
Melanina polvo	7127,0	0	0
Melanina/ Au(111)	7125,4	0,37	80

Tabla IV.1.1. Valores de energía del umbral para los compuestos de referencia y muestras de melanina. Relación Fe^{+2}/Fe^{+3} y concentración relativa de especies tipo magnetita.

IV.1.2.4 Caracterización por MFM de películas de melanina sobre Au(111)

La microscopía de fuerzas magnéticas (*MFM*) es una técnica de gran utilidad para el análisis del comportamiento magnético de los materiales a escala nanométrica.³⁷ Por su carácter local, el MFM es complementario a otras técnicas de caracterización magnética macroscópica como son el magnetómetro de muestra vibrante (*VSM*) o el *SQUID* (*superconducting quantum interference devices*). En el caso de materiales nanométricos, solamente algunas técnicas pueden ofrecer información sobre el comportamiento individual de cada nanoelemento y el MFM es, sin duda, una de ellas, en la medida en que exhibe una alta resolución y, además, ofrece información relevante acerca del proceso general de magnetización.³⁸

En esencia, el MFM es un modo de operación derivado de la microscopía de fuerzas atómicas (*AFM*) que se caracteriza por emplear una punta con un recubrimiento ferromagnético de CoCr que se hace pasar en dos ocasiones sobre cada línea de la medida de la muestra. En el primer paso, la punta registra la topografía de la superficie. En el segundo, denominado modo “lift”, la punta es elevada una determinada altura constante sobre cada punto de la muestra. De esta forma resulta posible aislar las interacciones de largo alcance como pueden ser las de origen magnético de otras, de tipo mecánico, de más corto alcance. Así, las interacciones de tipo magnetostático (y también electrostático, si las hubiere) quedan específicamente registradas.

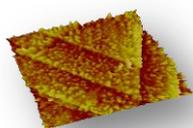


En los últimos tiempos se han descrito varios casos de moléculas con propiedades de carácter magnético caracterizadas por MFM.³⁹ Especialmente interesante es el caso de la referencia [40] donde se depositan discos de escala nanométrica (35 nm de diámetro por 0,6 nm de alto) de una molécula puramente orgánica, polirradicalaria de alto spin, sobre HOPG. Dado que tales moléculas son paramagnéticas y las medidas se realizaron en ausencia de campos magnéticos externos, el mecanismo que se ha propuesto para explicar la detección de la respuesta magnética de las mismas considera una interacción atractiva entre la punta, con recubrimiento ferromagnético, y las moléculas radicales, las cuales son directamente magnetizadas por la propia sonda cuando se aproxima a la muestra.

En relación a lo anteriormente expuesto hay que comentar que el paramagnetismo observado en los gránulos de melanina se atribuye a que contienen una mezcla de diversas especies radicalarias que tienen su origen en los derivados de orto-semiquinonas y orto-quinonas que constituyen las melaninas.^{9b} Tomando en consideración este hecho junto con las dimensiones de las partículas presentes en las películas de melanina, del orden de las descritas en los ejemplos precedentes,⁴⁰ se puede concluir que nuestros electrodepósitos sobre Au se presentan como un sustrato ideal para su caracterización por MFM.

En esta misma línea de razonamiento se debe comentar que en una modalidad de eumelanina, la neuromelanina (NM), presente en la *Substantia Nigra* (SN) del cerebro medio humano, el hierro aparece comúnmente asociado a este pigmento. De hecho, en el cerebro de pacientes con Parkinson, la muerte neuronal está acompañada por un elevado nivel de hierro y una pérdida de neuromelanina.

Podemos encontrar en la bibliografía diferentes estudios en los que se afirma que la NM, desde el punto de vista magnético, presenta características similares a otras proteínas humanas como la ferritina y la hemosiderina.⁴¹ En el espectro Mössbauer exhibe un acoplamiento del magnetismo de los iones de hierro que indica una considerable proximidad entre ellos. En dichas moléculas



de origen proteico y también en la NM,⁴² el metal es almacenado como matrices de oxo-hidróxido de hierro conteniendo miles de átomos de hierro. Esta extensa red se estabiliza por medio de grupos dadores de electrones pertenecientes a la cobertura proteica.^{42a}

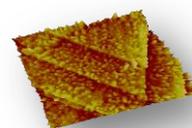
La evidencia patológica de la despigmentación selectiva de las neuronas más pigmentadas de la SN sugiere una desprotección de las células pigmentadas en la enfermedad de Parkinson. Las investigaciones en resonancia electrónica paramagnética (*EPR*) confirman que, efectivamente, existe un acoplamiento magnético de átomos de hierro.

Experiencias análogas llevadas a cabo sobre diferentes modelos de melanina sintética-hierro revelaron la presencia de gránulos de reducido tamaño de naturaleza superparamagnética.⁴³

Las propiedades magnéticas de la NM también han sido puestas de manifiesto por medio de medidas realizadas por SQUID que permitieron concluir la presencia de distintos dominios de hierro, de dimensiones variables, presentes en la NM.⁴³

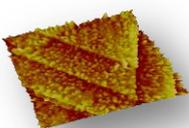
Considerando además que las espectroscopías AUGER, XPS y XANES, como se ha visto, mostraron la existencia de especies de óxidos de hierro tipo magnetita presentes en las películas de eumelanina sintética soportadas sobre oro, resulta más que razonable recurrir a la microscopía de fuerzas magnéticas con objeto de llevar a cabo una caracterización más compleja de las propiedades magnéticas de estas películas y de detectar gránulos significativamente ricos en hierro presentes en las mismas. En este sentido, se debe mencionar que, en los últimos tiempos, se ha descrito por MFM la estructura magnética de composites de nanopartículas de óxidos de hierro y polímeros⁴⁴ y, además, se ha podido registrar la señal MFM correspondiente a nanopartículas individuales de óxido de hierro.⁴⁵

Así, la imagen de la izquierda, en la Figura IV.1.16, es una imagen topográfica obtenida por MFM a partir de un electrodeposición de melanina sobre Au(111) de $t_a = 180$ minutos, fig. IV.1.16a. Mientras, la ubicada a su derecha es su correspondiente imagen de contraste de fase, registrada a 25 nm de



separación entre punta y muestra, fig. IV.1.16b, que sólo muestra, en principio, los dominios magnéticos. El análisis detallado de ambas imágenes, fig. IV.1.16a y b, permite extraer como principal conclusión la presencia en estas películas de partículas con diferentes características magnéticas. Es decir, las secciones transversales de algunas de estas partículas, fig. IV.1.16 c, d y e, exhiben, en contraste de fase, diferencias apreciables en sus perfiles. Así, el contraste de fase magnético correspondiente a la partícula c se ajusta a la siguiente descripción: ligeramente positivo en los extremos y negativo en el centro, fig. IV.1.16c. Por su parte, la partícula analizada en la fig. IV.1.16d muestra un contraste de fase, inducido magnéticamente, básicamente positivo. Por último, en la fig. IV.1.16e se muestra la sección transversal de dos partículas adyacentes, siendo cada una de ellas representante de una de las dos situaciones anteriormente descritas.

Llegados a este punto se hace necesario incidir sobre el hecho de que conjuntamente a la composición iónica, la simetría cristalina y la geometría del clúster, las dimensiones de las nanopartículas de magnetita (*MNPs*) condicionan notablemente sus propiedades magnéticas.⁴⁶ De hecho, se admite con carácter general que *MNPs* de diámetros comprendidos entre 30 y 80 nm son ferromagnéticas y se comportan como monodominios magnéticos individuales. Por su parte, de *MNPs* de dimensiones inferiores a los 30-35 nm se espera un comportamiento más bien superparamagnético, toda vez que no poseen volumen suficiente como para albergar un momento magnético suficientemente estable como para no verse afectado por la energía térmica a temperatura ambiente.^{39,46} Así, de forma similar a átomos y moléculas paramagnéticas, una matriz de *MNPs* en estado superparamagnético sólo exhibirían un momento magnético neto exclusivamente en presencia de un campo magnético aplicado.⁴⁷



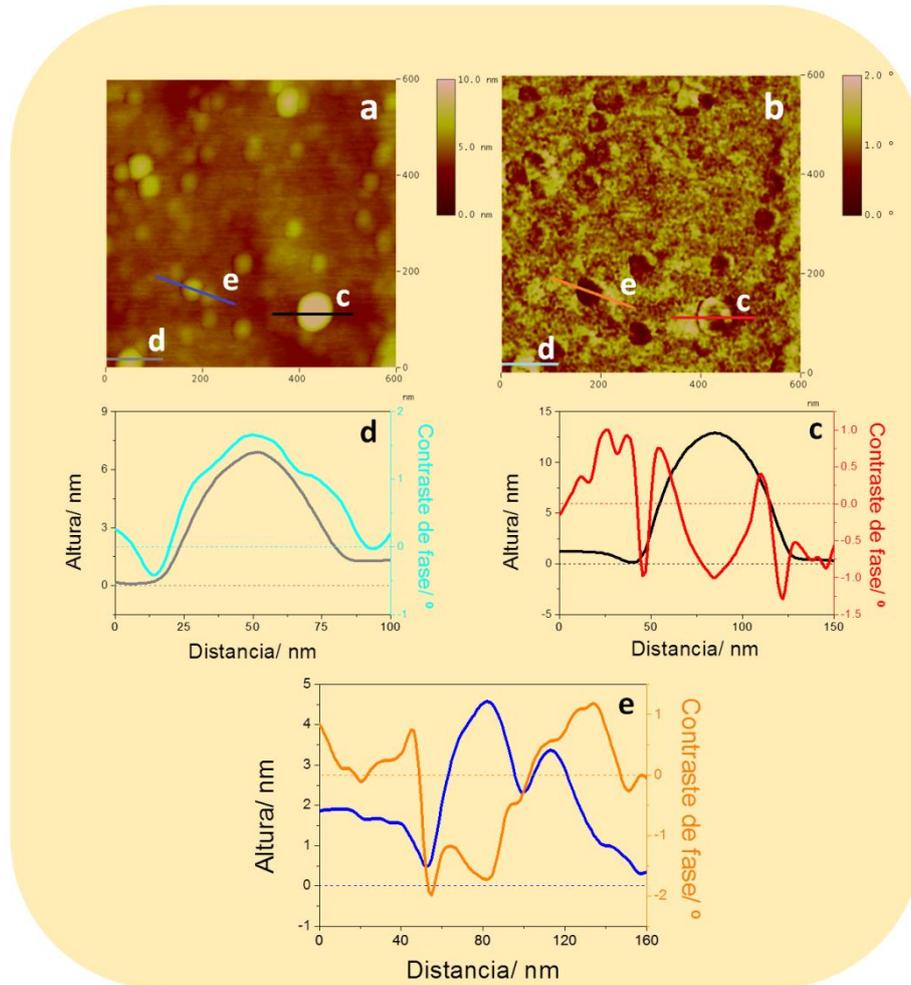
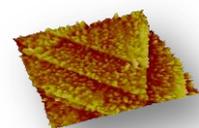


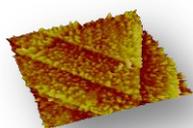
Figura IV.1.16. Imágenes MFM de $600 \times 600 \text{ nm}^2$: (a) imagen topográfica y (b) imagen de contraste de fase (modo lift) de la película de melanina ($E = -1,0 \text{ V}$, $c = 0,3 \text{ g L}^{-1}$, $t_a = 180$ minutos) sobre Au(111). Son visibles gránulos de magnetización diferente a través de los diferentes signos e intensidades relativas en el contraste de fase. La altura en el modo "lift" es de 25 nm .

A tenor de lo expuesto, cabe comentar que se acepta mayoritariamente que, en el caso de nanopartículas de magnetita de dimensiones del orden de las analizadas, éstas exhiben un contraste de fase magnético análogo al mostrado en la fig. IV.1.16c. Es decir, positivo en los bordes y negativo en el centro de la partícula, como consecuencia de una interacción esencialmente atractiva entre punta y muestra.^{46,48} Por el contrario, el perfil observado en partículas como las de la fig. IV.1.16d es atribuido a partículas no magnéticas o de magnetización débil. De hecho, se ha propuesto que, en el caso de las partículas no magnéticas, este contraste de fase positivo se debe a una interacción de origen electrostático repulsiva entre la superficie y la punta, igualmente cargadas.⁴⁸



Por tanto, parece evidente que existen campos magnéticos bien definidos que se concentran en algunos gránulos mientras que son bastante débiles en otros, con independencia del tamaño topográfico de los mismos. Resulta razonable, por tanto, asumir que los gránulos, presentes en el electrodeósito, que muestran contrastes de fase esencialmente negativos están mayoritariamente formados por nanopartículas de óxidos de hierro tipo Fe_3O_4 , ya detectadas por espectroscopia XANES.

Tomando en consideración que, en general, es difícil aislar la respuesta magnética debida a nanopartículas con dimensiones por debajo de 15-20 nm del límite de ruido térmico en las medidas de MFM,⁴⁶⁻⁴⁹ unido a las dificultades que para esta técnica ofrecen las diferencias de altura que se dan entre los límites de grano en los sustratos de Au(111), se decidió estudiar la respuesta de las películas de melanina de tiempos de adsorción cortos, de menor tamaño de partícula, directamente sobre Au ArrandeeTM, es decir, sin el habitual tratamiento térmico. Así, en la Figura IV.1.17 se han representado imágenes MFM correspondientes a campos significativamente mayores que los que se mostraron en la figura anterior. La fig. IV.1.17a, topográfica, muestra la superficie granular del Au homogéneamente cubierta por la película de melanina. Por su parte, la fig. IV.1.17b corresponde al contraste de fase detectado durante la medida. Por último, la imagen de la fig. IV.1.17c exhibe el contraste de fase inducido magnéticamente registrado cuando la punta se eleva hasta 15 nm sobre la superficie de la muestra con objeto de sustraer la contribución de las interacciones punta-muestra de más corto alcance.^{39,47}



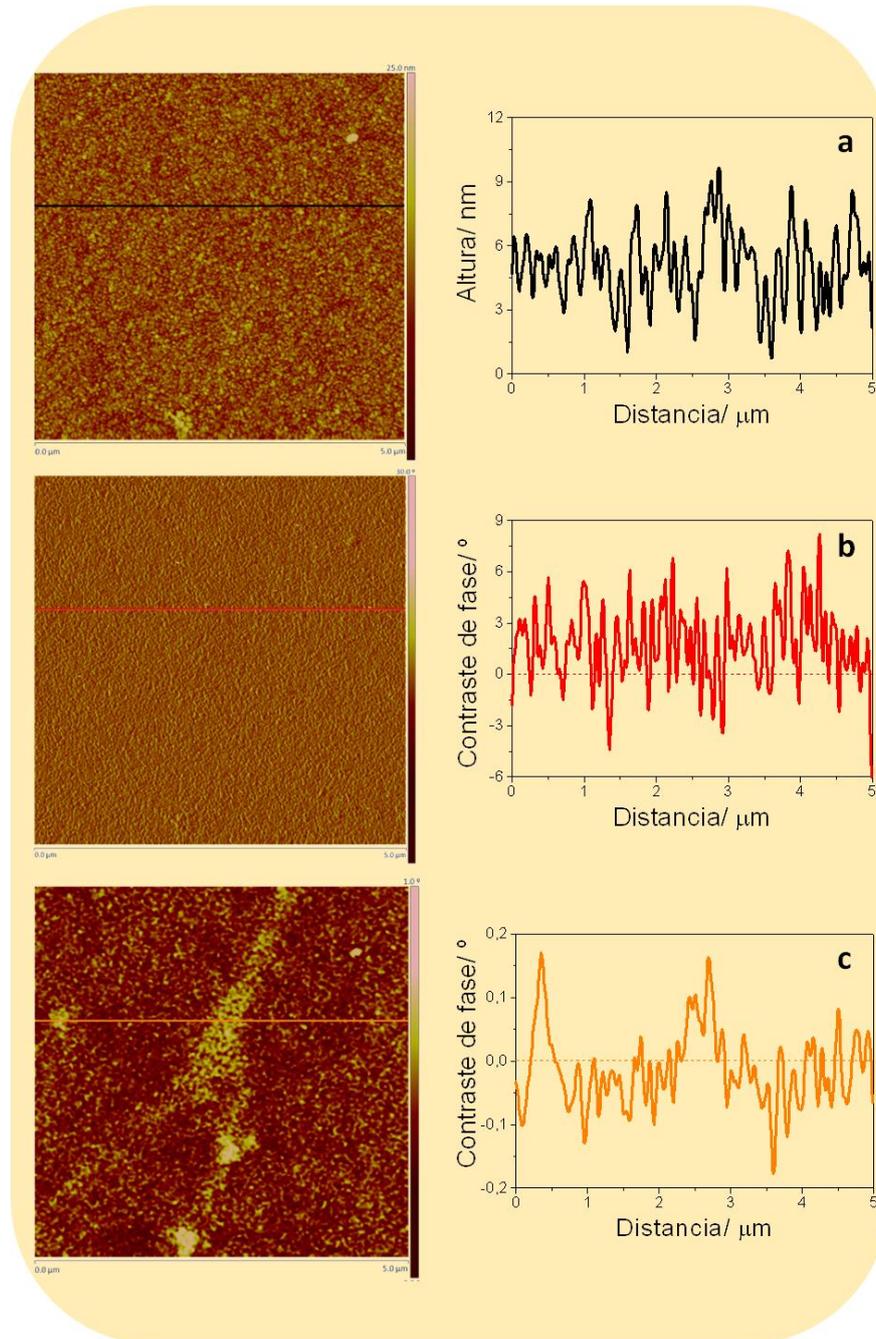
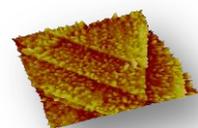


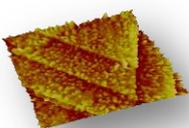
Figura. IV.1.17. Secciones transversales de imágenes MFM de $5,0 \times 5,0 \mu\text{m}^2$: (a) imagen topográfica, (b) imagen de contraste de fase y (c) imagen de contraste de fase (modo "lift") de la película de melanina ($E = -1,0 \text{ V}$, $c = 0,3 \text{ g L}^{-1}$, $t_a = 60 \text{ minutos}$) sobre Au. La altura en el modo lift es de 15 nm . Se advierten regiones con diferente magnetización.

Como estrategia de control de la calidad de la medida se ha introducido en el análisis la imagen de contraste de fase, fig. IV.1.17b, que reproduce, más o menos fielmente, la topografía de la muestra, fig. IV.1.17a, a diferencia de lo que ocurre en el modo *lift* donde puede apreciarse una estructura de áreas de



magnetización paralela, de varios cientos de nanómetros, de signos opuestos que se alternan entre sí, fig. IV.1.17c. Esto último unido al hecho de que la imagen MFM ocupara exactamente la misma posición en el barrido de ida y en el de vuelta confirma que el contraste de fase magnético registrado no se debe a repentinos cambios en la topografía o a otros artefactos. Además, se debe añadir que también se han llevado a cabo medidas análogas a las descritas pero utilizando sondas de las mismas características que las de MFM, es decir, similar frecuencia de resonancia y constante de fuerza, pero carentes del recubrimiento ferromagnético.^{46,48} El resultado en el modo *lift*, en este caso, no difiere significativamente de lo que se ha mostrado en la imagen fig. IV.1.17b.

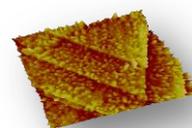
La comparación de las imágenes y sus secciones transversales pone de manifiesto la presencia de determinadas zonas con magnetización paralela similares a los dominios que se han podido observar en el caso de películas continuas de materiales ferromagnéticos.⁴⁷ En este caso, las regiones con contraste de fase magnético, bien positivo bien negativo, que se alternan entre sí, mostradas en la fig. IV.1.17c, corresponden a interacciones muestra-punta repulsivas o atractivas, respectivamente.⁵⁰ De hecho, estas zonas con contrastes de fase brillantes u oscuros son características de dominios con magnetización en direcciones opuestas, fuera del plano de la muestra. Si bien es cierto que, en general, las nanopartículas en forma de disco, de dimensiones inferiores a los 30 nm, suelen definir monodominios individuales en la dirección del plano⁴⁷ y que una alta densidad de las mismas, en películas fundamentalmente 2D, hace que en éstas se dé, por medio de interacciones dipolo-dipolo, una cierta magnetización característica en la dirección del plano de la muestra,⁴⁹ también lo es que se ha descrito en repetidas ocasiones que el momento magnético de las mismas revierte continuamente de la posición en el plano a fuera del plano.⁵⁰ En cualquiera de los casos, también hay que tener en cuenta que aunque diferentes modelos defienden la magnetización de la punta en la dirección de su propio eje, parece bastante claro que el campo magnético de la misma pasa por ser poco homogéneo y no exactamente perpendicular a la superficie de la muestra.⁴⁸ Además, admite diferentes distribuciones en función de las diferentes geometrías propuestas para la sonda.^{45,46} Por otro



lado, tampoco se debe descartar que la propia punta pueda ser, de hecho, en ausencia de campos magnéticos aplicados a la muestra, responsable de la magnetización de la muestra en un proceso de escritura-lectura AFM/ MFM, producidos en el primer y segundo paso de la punta, con recubrimiento ferromagnético de CoCr, sobre cada línea de la superficie de la muestra, respectivamente.^{48,49} En cualquier caso, el hecho de que las magnitudes de los dominios superen, en órdenes de magnitud, las dimensiones de las partículas presentes en las películas indica necesariamente la existencia de interacciones de acoplamiento magnético entre las mismas.^{49,50}

Parece claro que en función de los tiempos de adsorción de las películas que, como se ha mostrado, condicionan el tamaño de nanopartícula presente en las mismas y, por tanto, su carácter bien superparamagnético bien ferromagnético, las respuestas obtenidas por MFM a partir de los electrodepósitos exhiben diferencias significativas. Es decir, en películas de tiempos de adsorción cortos, fig. IV.1.17, donde el tamaño de partícula difícilmente supera los 15 nm, el ensamblado 2D de los electrodepósitos condiciona una cierta anisotropía gobernada por interacciones dipolo-dipolo que hace que los momentos magnéticos de las MNPs definan dominios alternados de magnetización paralela.^{49,50} Sin embargo, en películas más gruesas con un mayor tamaño de MNPs, de diámetros muy superiores a los 10-20 nm que constituyen el límite comúnmente aceptado para la técnica, entonces sí que es posible detectar la señal MFM correspondiente a MNPs aisladas, fig. IV.1.16.^{46,48}

La estructura de estas películas de eumelanina podría ser utilizada para conocer las cantidades relativas de especies de hierro que fueron estimadas a partir de los resultados espectroscópicos. Ya se ha comentado que la mayor contribución de especies que contienen hierro en las películas de eumelanina depositadas sobre Au procede de compuestos tipo magnetita (aproximadamente un 80 %) mientras que las especies de hierro tal y como se hallan en la melanina pura, presentes en la película, constituían un componente minoritario (20%) en las mismas. Teniendo en cuenta que las imágenes de STM mostraron que la estructura fina de la película estaba formada por



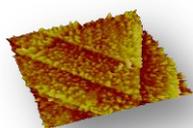
nanopartículas de entre 4 y 8 nm de anchura que, en principio, contendrían entre 16 y 30 unidades de protomelanina²² y que cada una de estas unidades estaría enlazada a un átomo de Fe,¹¹ el máximo número de átomos de Fe por nanopartícula de eumelanina está comprendido entre 16 y 30. Por otro lado, una nanopartícula de Fe₃O₄ de 8 nm contiene aproximadamente mil átomos de Fe. Por tanto, una hipotética película de melanina formada por un 50 % de nanopartículas de melanina y por un 50 % de nanopartículas de Fe₃O₄ no debería tener más de un 3 % de especies de hierro tal y como se hallan en la melanina pura. El 20 % estimado por la espectroscopia XANES, para películas de 100 minutos, implicaría que la relación entre nanopartículas de melanina frente a nanopartículas de especies de óxidos de hierro tipo Fe₃O₄ es de, aproximadamente, siete.

A partir de los resultados obtenidos por espectroscopía AUGER y XANES y de las imágenes de STM y MFM, se puede concluir que, en las películas de eumelanina, existen dos componentes: nanopartículas de melanina que contienen iones Fe⁺³ enlazados a grupos hidroxilos fenólicos en una configuración octaédrica similar a la encontrada para el Fe₂O₃ y nanopartículas ricas en Fe₃O₄.

Por tanto, parece razonable asumir que, durante el proceso de autoensamblado electroquímico de la melanina sobre el sustrato de oro, nanopartículas de óxidos de hierro tipo magnetita podrían quedar electroadsorbidas y almacenadas en la propia película de melanina. De hecho, es bien conocido que es posible sintetizar partículas de óxidos de hierro por coprecipitación de Fe(II) y Fe(III) en soluciones de NaOH.³³

IV.1.2.5. Caracterización electroquímica de películas de melanina sobre Au(111)

En general, las propiedades electroquímicas de las melaninas son poco conocidas debido a la alta insolubilidad que exhiben tales pigmentos. En el pasado se ha usado melanina incorporada en pasta de carbono con objeto de caracterizar su respuesta electroquímica.^{5,51} En estos casos se puede apreciar una pareja rédox próxima a 0 V a pH 7,0.



Para llevar a cabo el estudio electroquímico de estas películas, se ha dispuesto una celda electroquímica convencional de tres electrodos donde la película de eumelanina electrodepositada sobre Au hace las veces de electrodo de trabajo. Se usaron, además, un electrodo de Ag/ AgCl como electrodo de referencia y un electrodo de disco de platino como contraelectrodo. Por otro lado, los electrolitos de fondo en los que han sido registrados la mayor parte de los ciclovoltamogramas que se van a mostrar a continuación son disoluciones acuosas de tampón fosfato, PBS, a pH 7,4 y de NaOH 0,1 M, pH 12,6. La velocidad de barrido, empleada en todos los casos, fue de $0,2 \text{ V s}^{-1}$.

En la Figura IV.1.18 se muestran los ciclovoltamogramas estabilizados de un electrodo de Au(111) y de Au arrandee™ sin tratamiento térmico, Au(pc), y de las películas de eumelanina de $t_a = 100$ minutos electrodepositadas sobre los mismos, registrados en NaOH 0,1 M. Así, en los voltamogramas de Au(pc) y de Au(111), es posible observar en el barrido anódico los picos voltamétricos relacionados con la formación de la monocapa de óxido de oro y, en el catódico, su correspondiente pico de reducción a +0,1 V. Dichos electrodos de Au exhiben una amplia región de doble capa (carente de proceso faradaico alguno) que precede a la reacción de evolución de hidrógeno, *HER*. Por su parte, los voltamogramas mostrados por las correspondientes películas, en rojo, ponen de manifiesto que, a diferencia de las películas obtenidas por evaporación, tales electrodepositos son, sin duda, electroquímicamente activos.²²

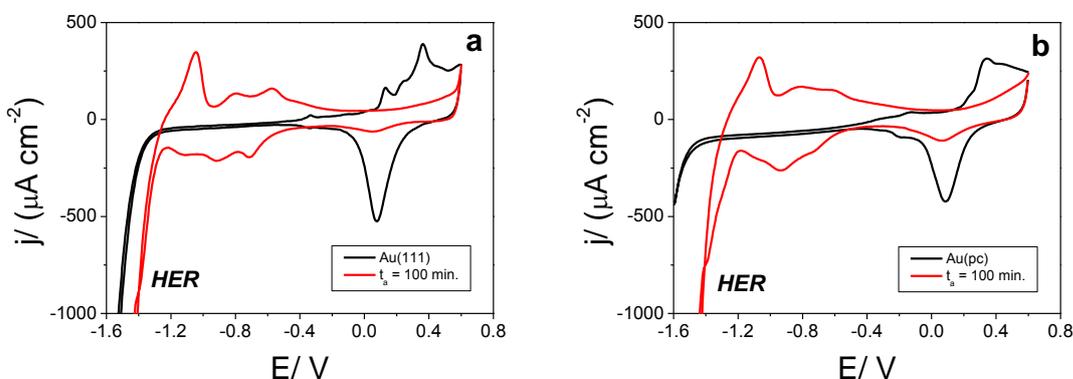
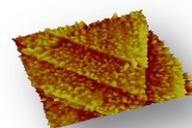


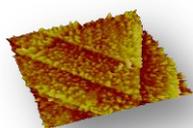
Figura IV.1.18. Ciclovoltamogramas estabilizados registrados en NaOH 0,1 M a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$ de un electrodo de Au, en color negro, y de una película de eumelanina de $t_a = 100$ minutos crecida sobre éste, en rojo: (a) Au(111) y (b) Au(pc).



Precisamente, en esta fig. IV.1.18, se aprecia la existencia de picos voltamétricos sobre la región de doble capa del Au(111) que corresponden, indudablemente, a la respuesta electroquímica de la película de eumelanina. Por otro lado, también es posible observar cómo el crecimiento de la película de melanina inhibe la formación de la monocapa de óxido de oro y su posterior reducción.

La respuesta electroquímica de ambas películas, fig. IV.1.18a-b, demuestra que no existen diferencias significativas en cuanto a la composición de los correspondientes electrodepósitos de melanina en función de que el sustrato escogido sea Au(pc) ó Au(111).

En la Figuras IV.1.19 a y b se han representado los voltamogramas estabilizados, obtenidos en disolución de NaOH 0,1 M, para una película de $t_a = 100$ minutos y otra de $t_a = 24$ horas, respectivamente. Estos voltamogramas ponen en evidencia la existencia de, al menos, cuatro procesos rédox con picos anódicos a -0,40 V (A'I), -0,63 V (AI), -0,85 V (AII) y -1,15 V (AIII), y picos catódicos a -0,43 V (C'I), -0,60 V (C'II), -0,73 V (CI), -0,93 V (CII), -1,2 V (CIII) y -1,35 V (CIV), localizados en la región de doble capa del Au(111), precediendo a HER.



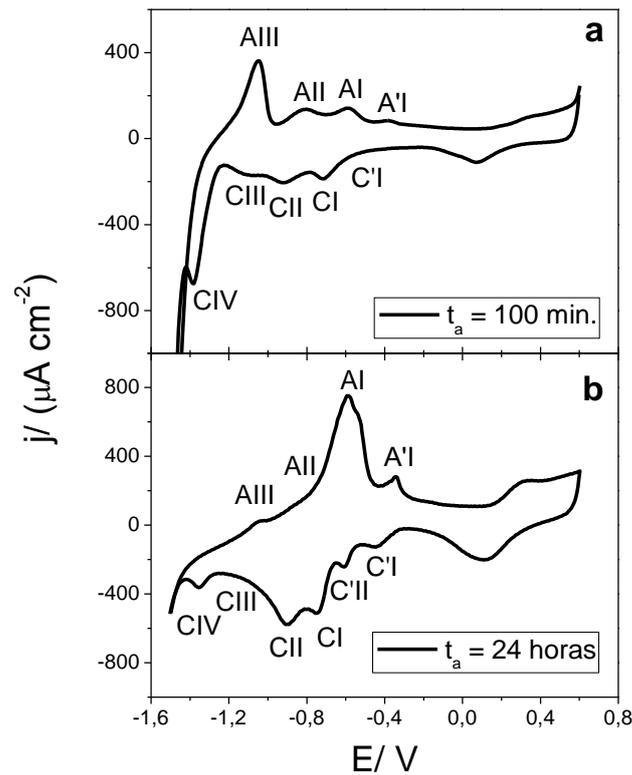
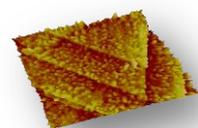


Figura IV.1.19. Ciclovoltamogramas estabilizados registrados en NaOH 0,1 M a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$ de películas de eumelanina de (a) $t_a = 100$ minutos y (b) $t_a = 24$ horas.

Estos picos voltamétricos también pueden observarse cuando el voltamograma es registrado en PBS a pH 7,4, para películas de mayor espesor de eumelanina, a excepción de los picos AIII/CIII-CIV, ver Figura IV.1.20. Se ha tratado de extender, por tanto, la caracterización electroquímica de las películas a medios neutros porque es importante para el estudio de sus aplicaciones biológicas.



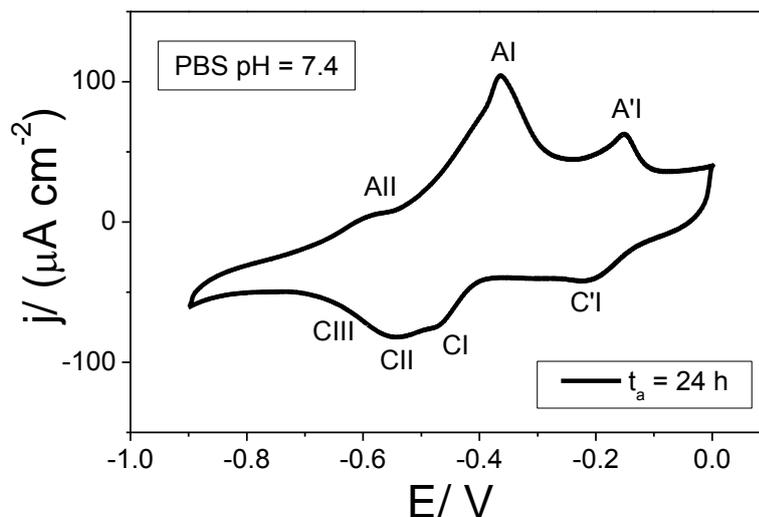
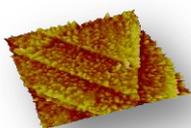


Figura IV.1.20. Ciclo voltamograma estabilizado registrado en PBS a pH 7,4 a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$ de una película de eumelanina de $t_a = 24$ horas sobre Au(111).

Tomando en consideración el voltaje al que aparece el pico voltamétrico más relevante, AI, cuando el pH varía de 12,6 hasta 7,0, fig. IV.1.19-20, éste se desplaza en sentido positivo alrededor de 0,20 V con lo que es compatible con una dependencia de 0,03 V por unidad de pH.

La presencia de diferentes pares rédox indica que el comportamiento electroquímico de las películas de melanina es mucho más complejo que el de las que se han podido obtener mediante la simple oxidación de monómeros.⁵ Como ya se ha indicado anteriormente, los diversos intentos por obtener una respuesta electroquímica a partir de depósitos de melanina preparados por evaporación de distintos disolventes no produjo ningún resultado en la región comprendida entre 0,0 y -1,4 V. Parece razonable considerar que la melanina electrodepositada que, como se vio en las imágenes STM, fig. IV.1.6-7, formaba una película continua sobre el sustrato, está fuertemente enlazada al Au mediante la quimisorción de oligómeros dando lugar así a una buena conductividad eléctrica.²⁸ Por el contrario, en el caso de los depósitos preparados por evaporación, éstos son forzados a crecer en condiciones OCP en las que no se llegan a formar películas continuas y homogéneas como las anteriores, fig. IV.1.3. De esta forma, el contacto con la superficie del Au no es tan bueno como en el caso anterior, de manera que no es posible obtener



respuesta electroquímica alguna.

Con la intención de poder inferir las correlaciones existentes entre los diferentes procesos rédox correspondientes al sistema hierro-melanina, se registraron diferentes voltamogramas de una película de melanina de $t_a = 60$ minutos con diferentes límites catódicos, Figura IV.1.21.

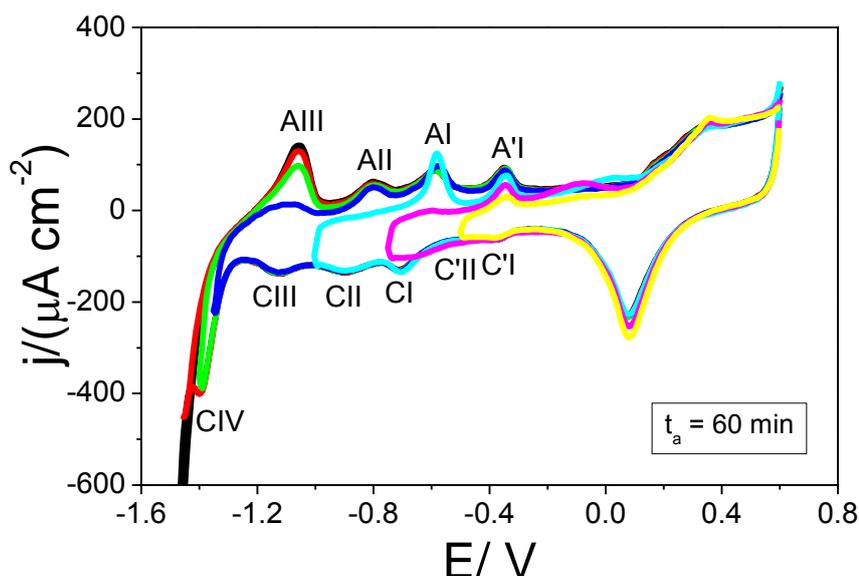
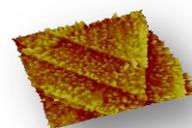


Figura IV.1.21. Ciclovoltamogramas estabilizados registrados en NaOH 0,1 M a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$ de películas de eumelanina de $t_a = 60$ minutos.

A la vista de la fig. IV.1.21 se puede concluir que las relaciones entre los picos voltamétricos del sistema melanina-hierro quedarían de la siguiente forma: AIII/ CIV, AII/ CIII, AI/ CII y A'I/ C'I.

La ausencia de la pareja de picos voltamétricos AIII/ CIV y, en menor medida, AIII/CIII en PBS a pH 7,4, fig. IV.1.19b-20, sugiere que estos picos están relacionados con el comportamiento rédox de las nanopartículas de óxido de hierro presentes en la película, ya detectadas por espectroscopia AUGER y XANES y por MFM. De hecho, se ha demostrado que nanopartículas de Fe_2O_3 , soportadas sobre electrodos de ITO, en PBS a pH 8, son disueltas en el primer ciclo a -0.66 V (frente a ECS) liberándose Fe^{+2} a la disolución.⁵²



En esta misma línea de razonamiento, se han realizado una serie de experiencias consistentes en la inmersión, para diferentes tiempos, de una película de eumelanina de tiempo de adsorción de sesenta minutos en medio ácido (HClO_4 0,01 M). Recuérdese que los espectros AUGER obtenidos antes y después precisamente del lavado ácido de una película de melanina mostraban que mientras las señales de Fe y de O prácticamente desaparecían, las de C y N prácticamente permanecían inalteradas, ver fig. IV.1.11, lo que se interpretó como que las especies de óxidos de Fe se habían disuelto selectivamente. De hecho, es bien conocido que las partículas de magnetita se disuelven rápidamente en medios ácidos.⁵³

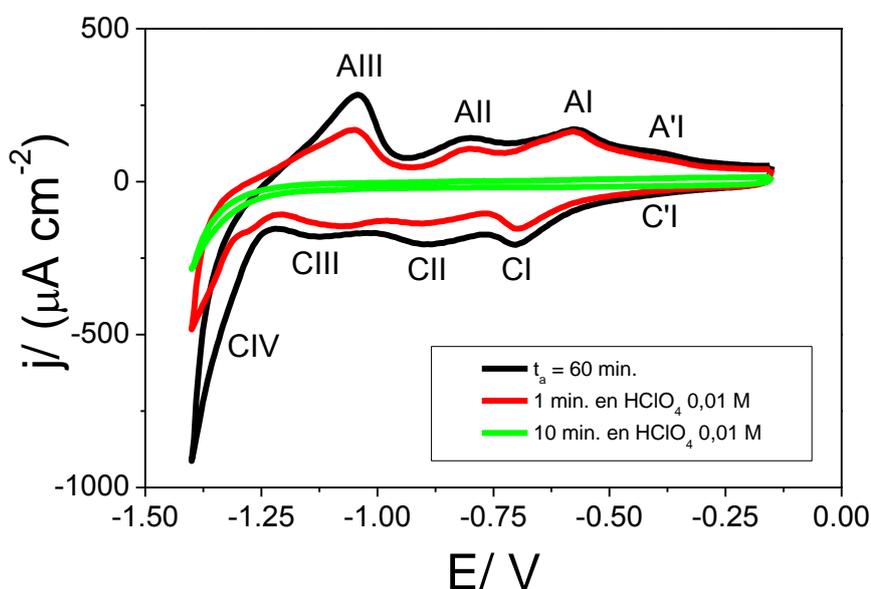
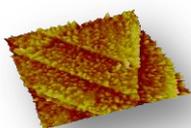


Figura IV.1.22. Voltamogramas estabilizados para una película de melanina de $t_a = 60$ min registrados en NaOH 0,1 M a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$ tras inmersión durante distintos tiempos, t_i , en una disolución de HClO_4 0,01 M: $t_i = 0$, voltagrama de color negro; $t_i = 1$ minuto, en color rojo y $t_i = 10$ minutos, color verde.

Así, se puede apreciar en la Figura IV.1.22 que para tiempos de inmersión inferiores al minuto, los picos voltamétricos AIII/ CIV y, en menor extensión AII/ CIII, exhiben una marcada disminución en área voltamétrica mientras que el resto de picos voltamétricos, esto es los picos AI/ CII y CI, A'I/ C'I, sólo se ven ligeramente afectados. Por otro lado, también se debe hacer notar que, para tiempos largos de inmersión en la disolución ácida, la película es fuertemente



atacada por el medio de forma que, tras diez minutos en HClO_4 0,01 M, el voltamograma registrado exhibió valores de carga y perfil similares a los medidos para el Au libre.

Con objeto de intentar conocer en mayor profundidad aquellos procesos rédox involucrados en los picos voltamétricos exhibidos por el sistema hierro-melanina debido a la presencia de tales especies de hierro oxidadas, se recurrió a la comparación de la respuesta electroquímica de estos electrodepuestos con la de un electrodo de Fe/ C (Fe-0,75 w/o C). Hay que decir que la hidrólisis de los productos de corrosión del Fe, en medios alcalinos, da lugar fundamentalmente a $\text{Fe}(\text{OH})_2$, si bien también se obtienen Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y $\gamma\text{-FeOOH}$, junto a otros oxohidróxidos.⁵⁴ La presencia de una notable variedad de estas especies se ha puesto de manifiesto por voltametría cíclica.⁵⁵ En la Figura IV.1.23 se han representado conjuntamente los voltamogramas correspondientes a ambos electrodos para facilitar su comparación:

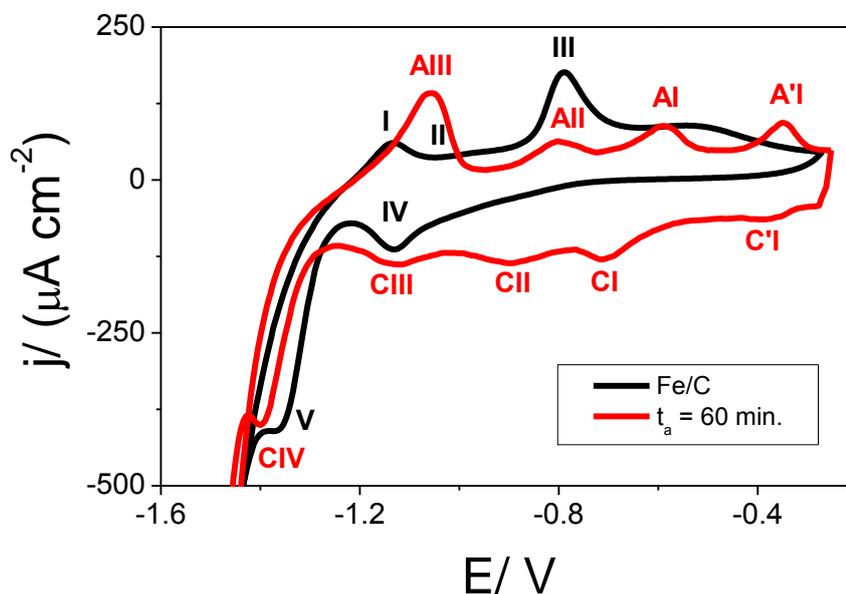
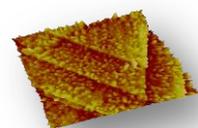


Figura IV.1.23. Voltamogramas estabilizados registrados en NaOH 0,1 M a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$ para un electrodo de Fe/ C, voltamograma en color negro, y de una película de melanina de $t_a = 60$ minutos sobre Au(111), color rojo.

A tenor de los voltamogramas mostrados parece clara la existencia en el Fe/ C de al menos dos procesos rédox identificados de acuerdo a la siguiente



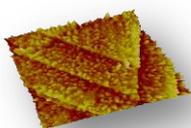
notación: I (-1,10 V), II (-0,97 V) y III (-0,80 V) como picos anódicos y IV (-1,05 V) y V (-1,35 V), catódicos. Tal y como se ha descrito en la referencia [54] y de acuerdo a lo mostrado por otros autores,⁵⁶ las especies formadas en los picos voltamétricos I y II son reducidas en el pico V. Por su parte, aquellas formadas en el pico III son posteriormente reducidas en el IV.

Por tanto, a partir de la comparación entre los procesos rédox exhibidos por el electrodo de Fe/ C y los correspondientes a la respuesta electroquímica de la película de melanina sobre Au(111), fig. IV.1.23, y por asociación con los primeros, éstos pueden describirse de la siguiente forma:

- I-II \approx AIII: $\text{Fe} \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_2$, $\text{Fe} \rightarrow \text{Fe}_3\text{O}_4$, $\text{Fe}(\text{OH})_2 \rightarrow \text{Fe}_3\text{O}_4$, $\text{Fe}_3\text{O}_4 \rightarrow \text{FeOOH}$
- III \approx AII: $\text{Fe}(\text{OH})_2 \rightarrow \delta\text{-FeOOH}$, $\text{Fe}(\text{OH})_2 \rightarrow \text{Fe}_3\text{O}_4$
- IV \approx CIII: $\delta\text{-FeOOH} \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_2$
- V \approx CIV: $\text{Fe}_3\text{O}_4 \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_2$

Este hecho junto con los datos obtenidos a partir de la espectroscopía Auger tras lavado ácido, confirman que es posible asignar los picos voltamétricos AIII/CIV y, en parte, AII/ CIII al comportamiento rédox de las nanopartículas de óxidos de hierro presentes en la película.

En esta misma línea de razonamiento y con la intención de poder identificar los pares rédox correspondientes al sistema hierro-melanina se ha llevado a cabo la electropolimerización de una porfirina de Fe(III), TAPP-Fe^{III}, y de la misma porfirina desmetalada, TAPP, sobre Au(111).⁵⁷ Dicho complejo organometálico contiene un ión Fe(III) enlazado al material orgánico en una configuración análoga a la que se ha encontrado para el Fe(III) presente en la eumelanina sintética. La respuesta voltamétrica de la película de porfirina de Fe(III), tal y como se muestra en la Figura IV.1.24, exhibe picos anódicos en el rango de potenciales comprendido entre -0,60 y -0,80 V y picos anódicos entre -0,65 y -0,90 V que no están presentes en el voltamograma de la porfirina desmetalada, fig. IV.1.24a. Estos picos voltamétricos pueden ser, por tanto, asignados al par rédox Fe⁺³/ Fe⁺² en la película polimérica de porfirina.



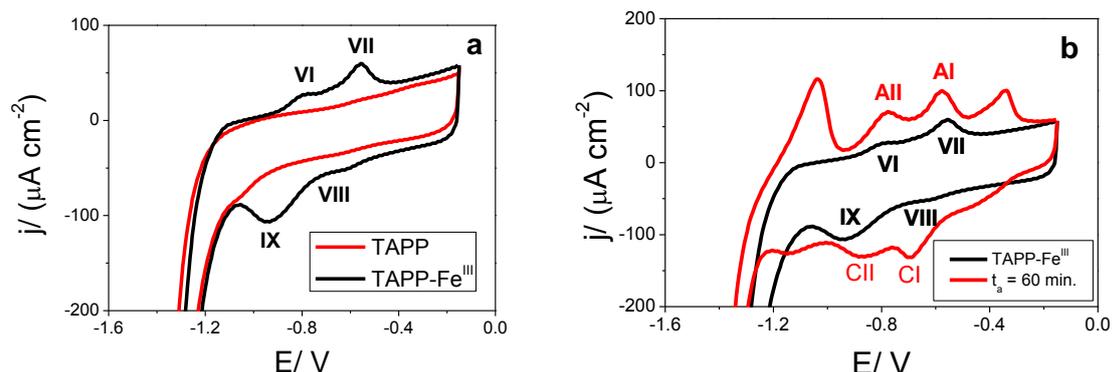
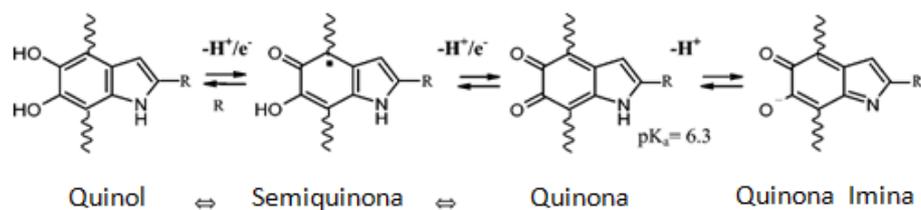


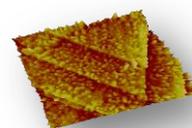
Figura IV.1.24. (a) Voltamogramas estabilizados de TAPP, en rojo, y de TAPP-Fe^{III}, en negro, electropolimerizadas 100 ciclos sobre Au(111), registrados en NaOH 0,1 M a 0,2 Vs⁻¹. (b) Ciclovoltamogramas estabilizados registrados en NaOH 0,1 M a 0,2 Vs⁻¹ de TAPP-Fe^{III}, en negro, y de película de eumelanina de $t_a = 60$ minutos, en rojo, sobre Au(111).

Aunque una asignación directa de los picos voltamétricos en el sistema hierro-melanina es difícil, los resultados mostrados en la fig. IV.1.24b sugieren que los picos AI/ CI y AII/ CII en la melanina podrían implicar el par rédox Fe⁺³/Fe⁺² del hierro coordinado a monómeros de DHI y DHICA o a oligómeros de éstos.

Por último, los picos voltamétricos A'I/ C'II y C'I deben asignarse a los procesos rédox debido a especies quinona/ semiquinona/ hidroquinona (quinol)⁵ presentes en los electrodepositos:



Esta afirmación se soporta sobre la base de los resultados obtenidos en el caso de otras moléculas tipo quinonas descritos en la bibliografía. Así, en el caso de quinonas enlazadas covalentemente a un electrodo de Au, éstas exhiben una clara respuesta voltamétrica a pH 12,6 en el rango de potenciales de A'I/ C'I, fig. IV.1.19.⁵⁸ También se han descrito derivados de antraquinonas que, a pH 7,4, muestran un par rédox reversible en torno a -0,2 V, compatible por tanto con A'I/ C'I, ver fig. IV.1.18.⁵⁹ Es más, la voltametría cíclica de otras especies de o-quinonas (al igual que DHI y DHICA) como son las 9,10-



fenantrenoquinonas,⁶⁰ unidas covalentemente a un electrodo de carbón vítreo mediante la reducción de sus correspondientes sales diazonio, muestran una serie de picos voltamétricos, visiblemente dependientes del pH de la solución y correspondientes al par rédox quinona/ hidroquinona, en la región de potenciales en torno a -0,2 V a pH 7 donde aparecen A'I/ C'I, ver fig. IV.1.20, y entre -0,45/ -0,75 V a pH 14, de manera que, asumiendo un desplazamiento de 0,03 V/ pH, serían compatibles, por tanto, con A'I/ C'I y AI/ CI a pH 12,6, ver fig. IV.1.19.

En esta línea de razonamiento, se llevó a cabo la síntesis de un electrodepósito sobre Au(111) siguiendo el mismo procedimiento empleado para las películas de melanina pero, en este caso, partiendo del resultado de la polimerización oxidativa de hidroquinona en NaOH 0,1 M.⁶¹ De esta forma, la superficie del sustrato quedaría modificada con grupos quinona/ semiquinona/ hidroquinona, Q/ HQ, electroquímicamente activos, y, además, libre de la presencia de las especies de hierro que acompañan a la melanina. La respuesta voltamétrica de dicho depósito y de una película de melanina de carga equivalente se han dispuesto en la Figura IV.1.25:

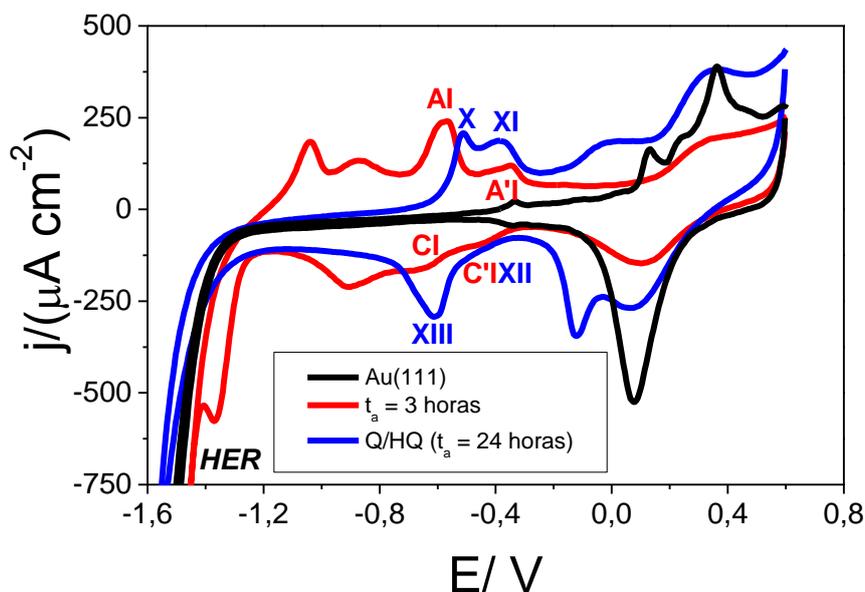
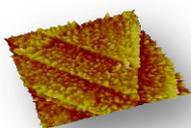
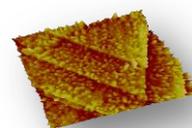


Figura IV.25. Voltamogramas estabilizados para Au(111), en color negro, y películas de melanina, en rojo, y de quinona/ hidroquinona, azul, sobre Au(111), registrados en NaOH 0,1 M a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$.



Como se esperaba, no se observa respuesta voltamétrica en la región de potenciales más catódicos en los que, como se ha visto, sí que aparecen los picos voltamétricos correspondientes a especies de hierro, fig. IV.1.23 y 24. Por el contrario, entre -0,35/ -0,65 V, aparecen en la película de Q/ HQ dos picos anódicos, X y XI, y dos catódicos, XII y XIII, fig. IV.1.25. Estos procesos rédox, achacables a especies quinona/ semiquinona/ hidroquinona,⁵ tal y como se desprende de la comparación con la respuesta electroquímica de la película de melanina, coinciden tanto con las parejas de picos voltamétricos A'I/ C'I y también AI/ CI característicos de ésta, como con resultados previamente descritos en la bibliografía.^{60,61}

Resulta de especial interés llevar a cabo un estudio sobre la evolución de la respuesta electroquímica que exhiben las películas de melanina a medida que aumenta el tiempo de adsorción. Así, en la Figura IV.1.26, se puede observar que a medida que aumenta dicho tiempo de adsorción, va disminuyendo la densidad de corriente asociada a la formación de la monocapa de óxido de oro y de su posterior reducción. De hecho, si se miden las áreas voltamétricas correspondientes al pico de reducción del óxido de oro, se encuentra que la carga registrada para una película de eumelanina de 100 minutos representa aproximadamente una quinta parte de la que proporcionaría el oro libre. Por tanto, tras el crecimiento de la película, tan sólo un 20 % del oro permanece accesible a la interfase.



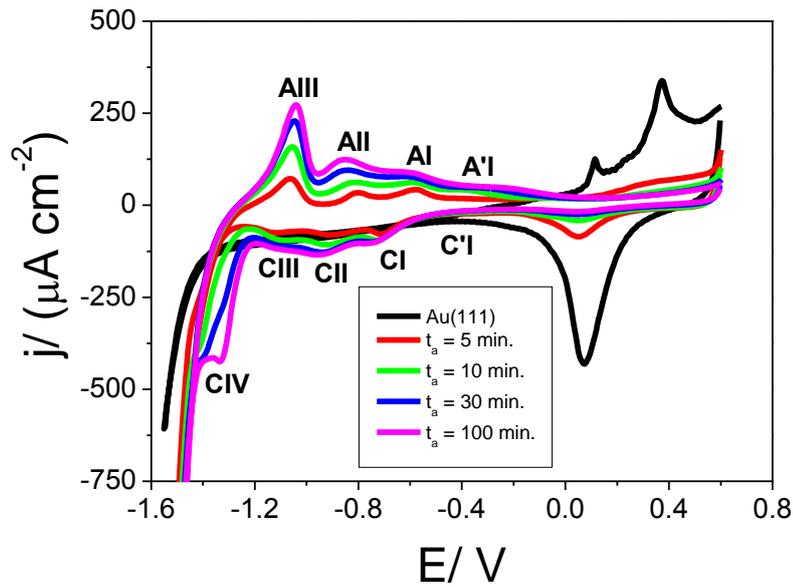


Figura IV.26. Ciclovoltamogramas estabilizados registrados en NaOH 0,1 M a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$: Au(111), en negro; película de eumelanina de $t_a = 5$ minutos soportada sobre Au(111), en rojo; $t_a = 10$ minutos, verde; $t_a = 30$ minutos, azul, y $t_a = 100$ minutos, magenta.

A continuación, en la Figura IV.1.27, se han representado las respuestas voltamétricas de películas gruesas de eumelanina formadas sobre Au(111) para diferentes tiempos de adsorción, en este caso: 100 minutos, 5 y 24 horas.

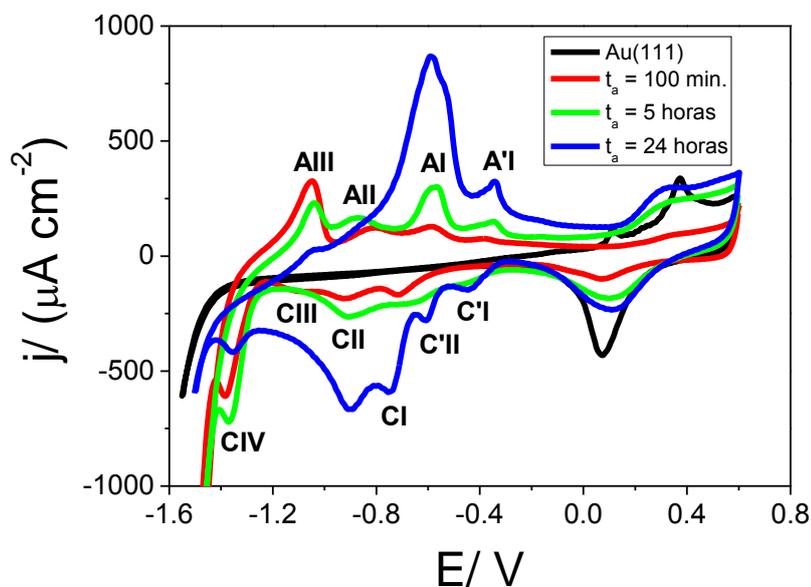
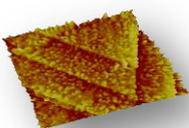


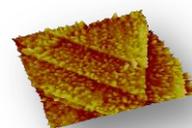
Figura IV.27. Voltamogramas estabilizados registrados en NaOH 0,1 M a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$: Au(111), en negro; película de eumelanina de $t_a = 100$ minutos soportada sobre Au(111), en rojo; $t_a = 5$ horas, verde; y $t_a = 24$ horas, azul.



A partir de los resultados mostrados en las fig. IV.1.26 y IV.1.27 es posible concluir que durante las primeras etapas de formación de las películas, sobre el Au(111), se han ido depositando especies de óxido de hierro cuya respuesta voltamétrica se ha asociado a los picos voltamétricos AIII/ CIV y AII/CIII, fig. IV.1.23. Sin embargo, en la medida en que va aumentando el tiempo de adsorción y, por tanto, el sustrato de oro va quedando cubierto, se observa que las parejas de picos AIII/ CIV y AII/CIII permanecen prácticamente inalteradas mientras que los procesos rédox AI/ CII y CI, relacionados, en principio, con el par rédox $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ coordinado al material orgánico, fig. IV.1.24b, y también A'I/ C'II y C'I, asociados a los grupos quinona/ hidroquinona presentes en el biopolímero, fig. IV.1.25, se ven incrementados significativamente.

Por tanto, en películas de tiempos de adsorción altos y, por tanto, de gran espesor, la superficie externa de las mismas estará compuesta principalmente por capas de agregados moleculares de oligómeros de eumelanina en ausencia, en principio, de especies de óxidos de hierro.

La comparación de las respuestas voltamétricas de las películas de melanina en función del tiempo de adsorción muestra un aspecto interesante en lo concerniente a la formación de la monocapa de AuO. Así, mientras que para películas delgadas, fig. IV.1.26, el incremento en el tiempo de adsorción trae como consecuencia una disminución en el área voltamétrica de AuO en la medida en que el sustrato se va cubriendo progresivamente con el biopolímero, no ocurre lo mismo en el caso de las películas gruesas, fig. IV.1.27. De hecho, en este último caso se suman corrientes de oxidación y reducción presumiblemente correspondientes al conjunto de especies presentes en el composite orgánico-inorgánico. En relación a esto, hay que decir que otras moléculas biorgánicas que contienen hierro exhiben respuestas voltamétricas análogas en ese ámbito de potencial. Así, tanto en el caso de la mioglobina, proteína consistente en una subunidad de cadena polipeptídica unida a un grupo hemo (porfirina de hierro), y la hemoglobina, formada por cuatro subunidades de enzimas polipeptídicas con un grupo hemo en cada subunidad, así como para distintas porfirinas y el citocromo C, se ha descrito una pareja de picos voltamétricos cuyo potencial de pico anódico, E_{pa} , a pH 13 aparece entre



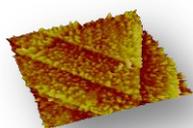
0,13 y 0,41 V, con lo que se solaparía con AuO.⁶² Estos picos son asignados al par rédox Fe(III)/ Fe(IV) coordinado a la estructura orgánica.

No obstante, no es menos cierto que no existen diferencias demasiado significativas en cuanto a las densidades de corriente registradas en la región de potencial correspondientes a la monocapa de AuO entre la película de 24 horas (para la que las imágenes de STM y AFM mostraron al electrodo de oro completamente cubierto de melanina) y la película de 5 horas. Es decir, la formación de la película inhibe en cierta medida la formación de la monocapa de óxido de Au pero lo hace más o menos en la misma extensión con independencia de la cantidad de material adsorbido a partir de un determinado grado de recubrimiento. Este hecho podría indicar la existencia en estas películas de una serie de canales que la hacen permeable a la solución, tal y como se ha comprobado que sucede en la melanina natural,^{9a} y que permitieran en cierta forma el acceso del sustrato a la interfase.

Por último, cabe destacar que tal y como se ha mostrado hasta ahora, a diferencia de los intentos descritos en la bibliografía basados en la electropolimerización de DHI o en pastas de carbón que contienen melanina, etc. y de los resultados obtenidos para los distintos depósitos formados por evaporación, hemos sido capaces de fabricar por un método electroquímico potencioestático películas de eumelanina sintética que exhiben una respuesta electroquímica extraordinariamente estable y reproducible.

IV.1.2.6. Propiedades electrocatalíticas de películas de melanina sobre Au(111)

Es bien conocida la capacidad de las melaninas de actuar como amortiguador de la actividad de determinados productos oxidantes procedentes del metabolismo aerobio¹ tales como el peróxido de hidrógeno. Dicho compuesto se genera en los peroxisomas tras la oxidación de ácidos grasos y péptidos y, habitualmente, se descompone en productos inertes para las células por medio de la acción de enzimas oxidativas denominadas catalasas. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo intenso, las catalasas se saturan y este tipo de compuestos podrían inducir la muerte celular. De hecho, es bastante probable

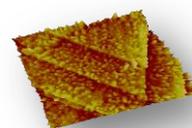


que la melanina actúe descomponiendo el peróxido de hidrógeno, hecho éste que explicaría la presencia de este pigmento en ambientes de gran actividad celular.⁹

Sin embargo, también se han descrito en el caso de sistemas tipo melanina-metal una cierta actividad peroxidasa que da lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno.¹⁴ Incluso se han detectado cambios estructurales significativos en las nanopartículas de melanina durante procesos de blanqueado con peróxido.²⁹ Además, hay que decir que la peroxidación lipídica en la *Substantia nigra* en el cerebro medio humano se ha vinculado estrechamente con la enfermedad de Parkinson.¹² Recuérdese que en la neuromelanina el hierro aparece comúnmente asociado a este pigmento.⁶³

Por otro lado, hay que decir que las propiedades electrocatalíticas de distintas moléculas orgánicas que contienen hierro han sido ampliamente descritas en los últimos años. En concreto, la investigación de las actividades electroquímicas y electrocatalíticas de por ejemplo mioglobina, hemoglobina, citocromo C y porfirinas y ftalocianinas de Fe frente a oxígeno y peróxido de hidrógeno han constituido el objeto de numerosos estudios.^{18,62} Por el contrario, el estudio del sistema melanina-hierro, con potenciales aplicaciones en los campos de la electrocatálisis y la bioelectrocatalisis, no ha sido suficientemente abordado.

Por todo lo dicho, el estudio de la actividad peroxidasa del sistema melanina-hierro, activo electroquímicamente cuando se deposita potencioestáticamente como película sobre Au(111), podría proporcionar información significativa acerca del papel que desempeña la melanina en aquellos procesos involucrados en la descomposición del peróxido de hidrógeno, no sólo con fines bioquímicos o biomédicos sino también desde el punto de vista de sus potenciales aplicaciones en el campo de las celdas de biocombustible. Si bien es verdad que el O₂ pasa por ser el reactivo más empleado en las reacciones catódicas en las bioceldas debido fundamentalmente a su gran disponibilidad,⁶⁴ también lo es que también se emplean otros oxidantes secundarios. Entre estos últimos, el H₂O₂, debe ser considerado uno de los más prometedores en

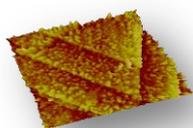


base a su alta solubilidad en soluciones acuosas y las facilidades que ofrece su almacenamiento. De hecho, existen estudios recientes realizados con nanocomposites de óxidos y oxohidróxidos de hierro que muestran resultados muy interesantes en este sentido.⁶⁵

Así, cuando se registran ciclovoltamogramas, representados en la Figura IV.1.28, para un electrodo de Au(111) en una disolución electrolítica 4 mM de H₂O₂ en NaOH 0,1 M, aparecen dos picos de corriente bien definidos. El primero de ellos a -0,2 V, pico CA, corresponde a la electroreducción de oxígeno a agua oxigenada, y el segundo a -1,2 V, pico CB, se relaciona con la electroreducción de peróxido de hidrógeno a iones hidroxilos. De hecho, es bien conocido que los electrodos de oro reducen oxígeno en medios alcalinos en dos pasos⁶⁶ bien definidos:



Sin embargo, curvas análogas registradas para películas de melanina de tiempo de adsorción de 120 minutos, muestran que, mientras el pico CA se desplaza ligeramente en dirección catódica, el pico CB se desplaza hasta 0,5 V en sentido positivo tal y como se puede ver en la fig. IV.1.28.



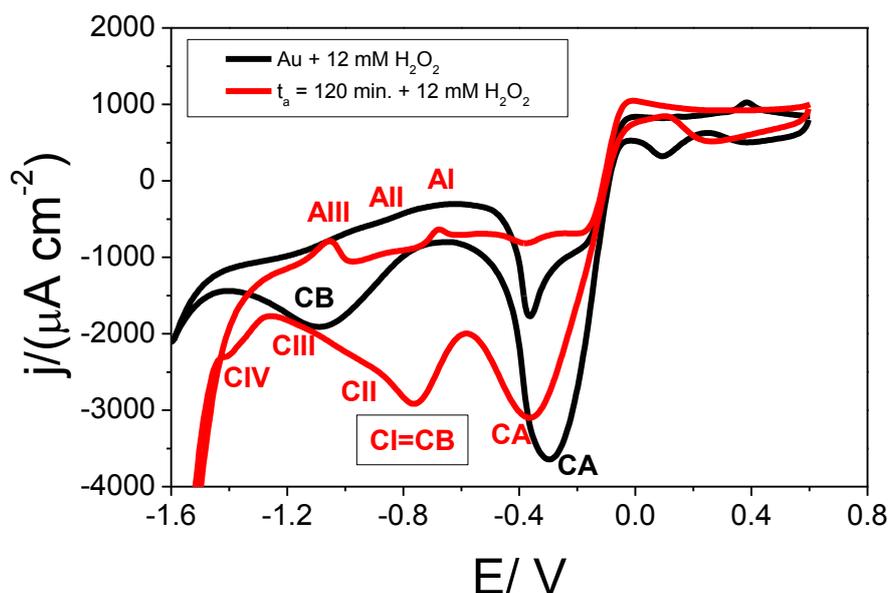
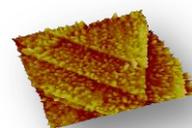


Figura IV.28. Voltamogramas estabilizados registrados en 12 mM de H_2O_2 en NaOH 0,1 M a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$: Au(111), en negro; película de eumelanina de $t_a = 120$ minutos soportada sobre Au(111), en rojo.

En general, se admite que la electroreducción del HO_2^- (2) constituye la segunda etapa de la reducción general del oxígeno con independencia del pH del medio. Es decir, la reducción del oxígeno llega hasta agua tras pasar primero por la reducción del oxígeno a peróxido de hidrógeno (1). En este sentido, la afirmación de que el pico voltamétrico CA corresponde a la electroreducción de oxígeno a peróxido de hidrógeno quedó convenientemente justificada tras la experiencia que se muestra a continuación en la Figura IV.1.29, consistente en burbujear N_2 en la celda electroquímica para distintos tiempos:



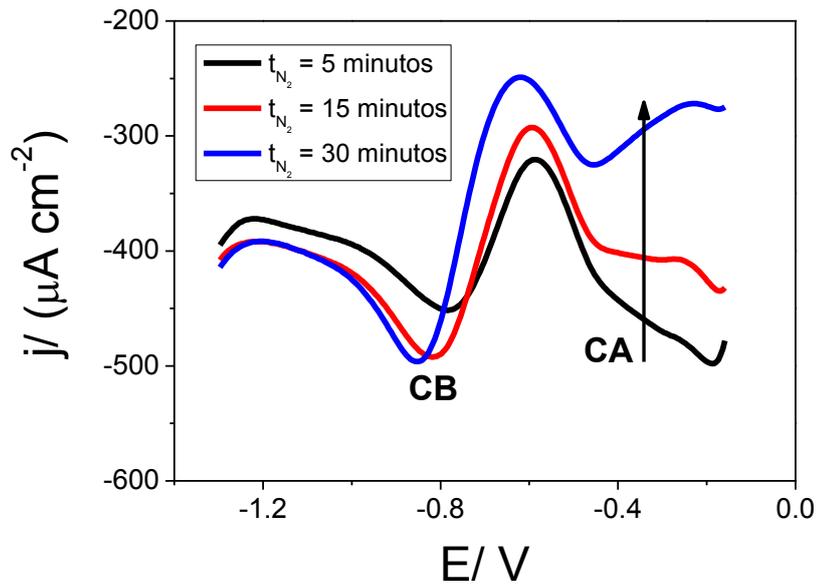
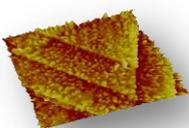


Figura IV.1.29. Ciclovoltamogramas de película de eumelanina de $t_a = 30$ minutos registrados en H_2O_2 4 mM en NaOH 0,1 M a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$, registradas para distintos tiempos de burbujeo de nitrógeno en la celda electroquímica: 5 minutos en color negro, 15 minutos en rojo y 30 minutos en azul. La flecha negra indica la disminución de la corriente en el pico CA a medida que aumenta el tiempo de burbujeo con nitrógeno.

En el gráfico puede observarse cómo, a medida que aumenta el tiempo de burbujeo, el pico CA decrece marcadamente mientras que el pico CB permanece prácticamente inalterado. Es bien conocido que el peróxido de hidrógeno en disoluciones de NaOH a pH 13 comienza a descomponerse generándose oxígeno en el medio. Por tanto, la eliminación de dicho oxígeno, tras burbujeo de N_2 en la celda electroquímica para diferentes tiempos, trae consigo una notable disminución del pico CA mientras que el pico CB no experimenta alteraciones significativas.

Por otro lado, se ha podido demostrar que el pico CB corresponde a la electroreducción de peróxido de hidrógeno (2) a partir de la dependencia lineal de la densidad de corriente estacionaria registrada a -0.75 V frente a la concentración de peróxido de hidrógeno, Figura IV.1.30. De este modo, podemos decir que las películas de melanina podrían actuar, en estas condiciones, como biosensores de peróxido de hidrógeno.



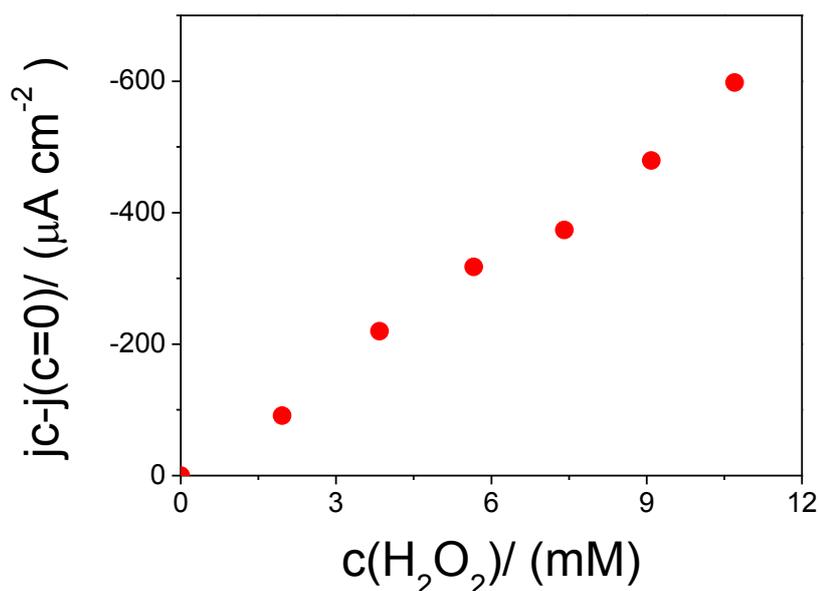
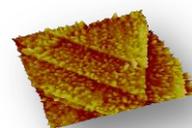


Figura IV.1.30. Densidad de corriente estacionaria $j_c - j_{c=0}$ frente a concentración de H_2O_2 , (c), medida para una película de eumelanina sobre $\text{Au}(111)$ ($t_a = 30 \text{ min}$). j_c es la densidad de corriente estacionaria medida a $-0,75 \text{ V}$, pico CB, y $j_{c=0}$ es la densidad de corriente estacionaria medida a $-0,75 \text{ V}$ en disolución de $\text{NaOH } 0,1 \text{ M}$ en ausencia de H_2O_2 .

Nótese que la densidad de corriente que se ha representado en la fig. IV.1.30 corresponde a la reducción electrocatalizada de peróxido de hidrógeno sin que exista contribución alguna de la densidad de corriente debida a los pares rédox de la melanina toda vez que se ha sustraído el valor medido en disolución de $\text{NaOH } 0,1 \text{ M}$ en ausencia de peróxido de hidrógeno.

La asignación del pico CB a la electroreducción de peróxido de hidrógeno también puede ser estimada en términos del aumento de la densidad de corriente del pico CB para valores crecientes de concentración de peróxido de hidrógeno para una película de $t_a = 100 \text{ minutos}$, ver Figura IV.1.31.



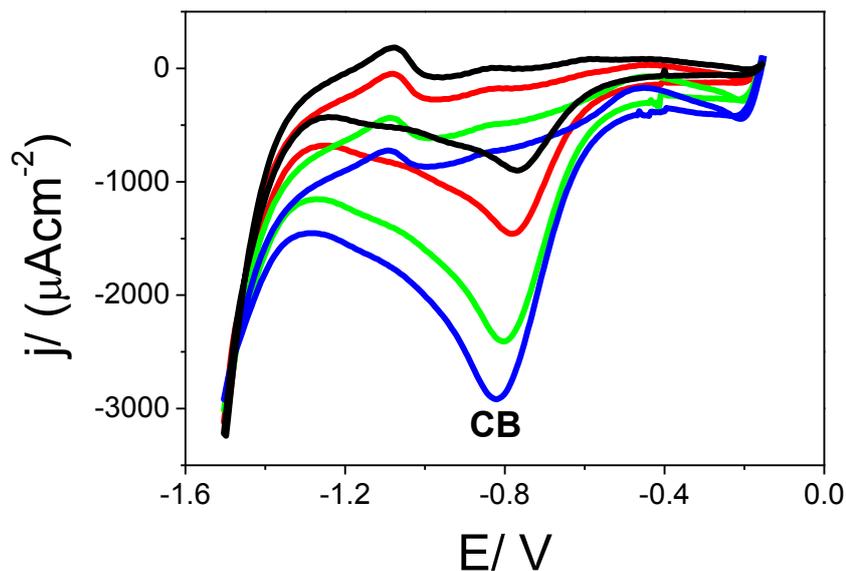
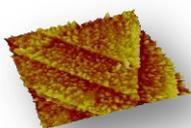


Figura IV.1.31. Ciclovoltagramas de una película de melanina sobre Au(111) de $t_a = 100$ minutos registrados en NaOH 0,1 M a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$, a distintas concentraciones de H_2O_2 : 1.16×10^{-3} M, voltagrama en negro; 2.25×10^{-3} M, en rojo; 4.23×10^{-3} M, verde; 6×10^{-3} M, azul.

En la Figura IV.1.32 se muestran los voltamogramas registrados para un electrodo de Au(111), para una película de melanina de $t_a = 30$ minutos crecida sobre Au(111) y para una película del mismo tiempo de adsorción tras lavado ácido durante un minuto, obtenidas para idéntica concentración de H_2O_2 , 4 mM, en NaOH 0,1 M.



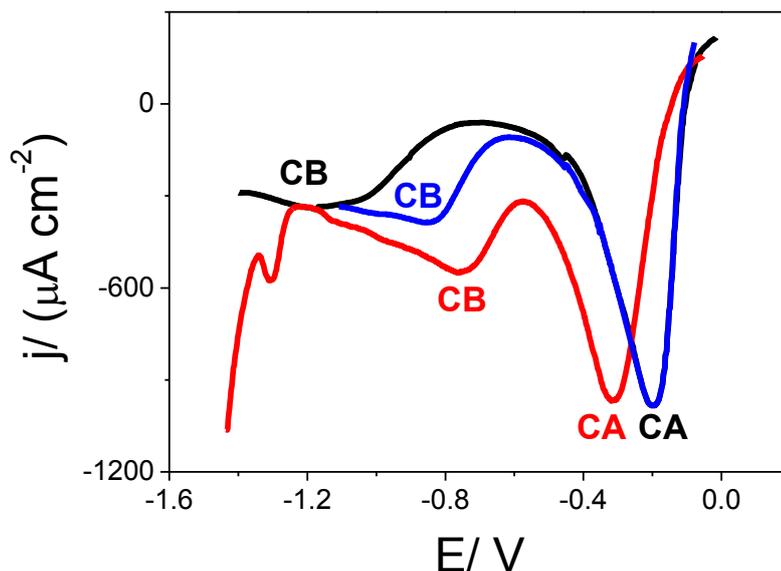
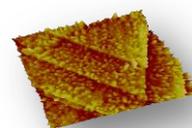


Figura IV.1.32. Ciclovoltamogramas registrados a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$ desde $0,0 \text{ V}$ hasta $-1,3 \text{ V}$ en una solución 4 mM de H_2O_2 en $\text{NaOH } 0,1 \text{ M}$ para: $\text{Au}(111)$, en color negro, $\text{Au}(111)$ cubierto de melanina $t_a = 30$ minutos, en rojo, y $\text{Au}(111)$ cubierto de melanina de $t_a = 30$ minutos, después de lavado ácido en $\text{H}_2\text{SO}_4 0,1 \text{ M}$ durante un minuto.

A la vista de la figura se puede concluir que el potencial del pico CB se desplaza desde los $-1,2 \text{ V}$ medidos para el $\text{Au}(111)$ hasta los $-0,75 \text{ V}$ registrados cuando la melanina cubre la superficie del Au. Este hecho indica claramente que la película de melanina es capaz de catalizar eficientemente la electroreducción de peróxido de hidrógeno. Cabe comentar en este sentido que dicho efecto catalítico se da en el rango de potenciales en los que la película de melanina es electroquímicamente activa a través de la pareja de picos voltamétricos AI/CI, fig. IV.1.28, IV.1.31 y IV.1.32.

Resulta necesario añadir que, después del lavado ácido que permite disolver especies de óxido de hierro,⁵³ el efecto catalítico que ejerce la película de eumelanina es aún evidente con el pico CB a $-0,85 \text{ V}$, voltamograma en azul en fig. IV.1.30, indicando que aquellas nanopartículas ricas en compuestos de óxidos de hierro tipo magnetita,⁶⁷ no son esenciales para la catálisis de la electroreducción del peróxido de hidrógeno.

En lo que sigue se ha tratado de extender el presente estudio sobre la actividad electroquímica de las películas de melanina en presencia de peróxido



de hidrógeno a medios neutros toda vez que es importante de cara a establecer y definir sus potenciales implicaciones bioquímicas.

Así, hay que decir que se han podido obtener, en medios neutros, resultados similares para la electroreducción del peróxido de hidrógeno, tal y como se muestra a continuación. Las experiencias comentadas, que se muestran en la Figura IV.1.33, ponen de manifiesto un marcado incremento en la densidad de corriente catódica proporcional a la concentración de agua oxigenada y la diferencia de comportamiento entre el Au(111) y la película de eumelanina.

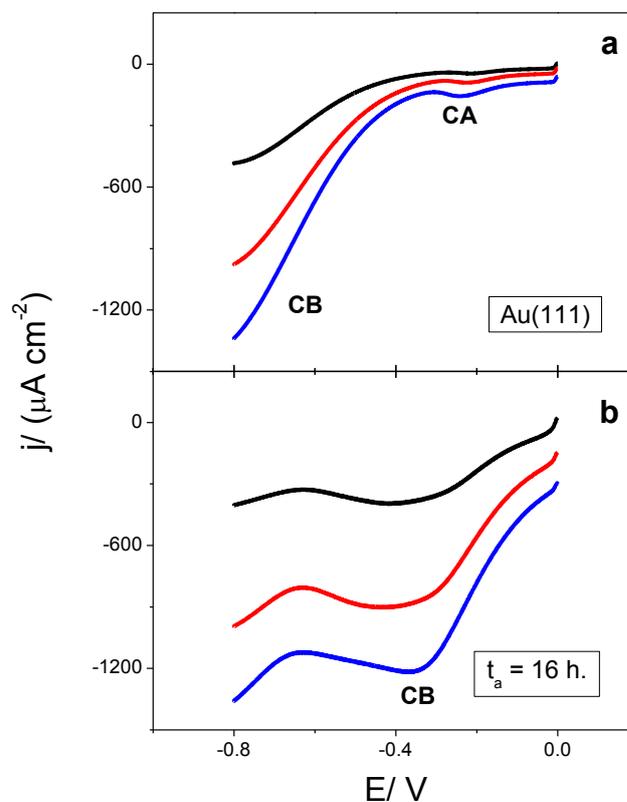
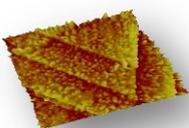


Figura IV.1.33. Ciclovoltamogramas registrados a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$ desde $0,0 \text{ V}$ hasta $-0,8 \text{ V}$ en PBS pH 7,4 para un electrodo de Au(111), (a), y para una película de melanina de $t_a = 16$ horas, (b), en distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno: $2,44 \text{ mM}$ en negro, $4,59 \text{ mM}$ en rojo y $6,5 \text{ mM}$ en azul.

En el caso del Au(111) es posible apreciar la existencia de un pequeño pico voltamétrico a $-0,2 \text{ V}$, CA, que se ha asignado a la electroreducción de oxígeno y una onda a $-0,8 \text{ V}$, CB, relacionada con la electroreducción de



peróxido de hidrógeno de forma análoga a lo reflejado en la bibliografía,^{66,68} fig. IV.1.31a. Por su parte, en las películas de melanina, el efecto electrocatalítico aparece en el rango de potenciales comprendido entre 0,0 V y aproximadamente -0,5 V, fig. IV.1.33b, donde el electrodo de Au(111) muestra una escasa actividad.

No obstante, parece claro que, en general, resulta más difícil, en medio neutro, identificar la contribución de cada una de las dos etapas correspondientes a la electroreducción global del oxígeno, es decir, identificar los picos voltamétricos CA y CB. En este sentido, se realizó una experiencia similar a la ya comentada en la fig. IV.1.29, consistente en burbujear N_2 durante 5 minutos en la celda electroquímica. El resultado se muestra en la Figura IV.1.34:

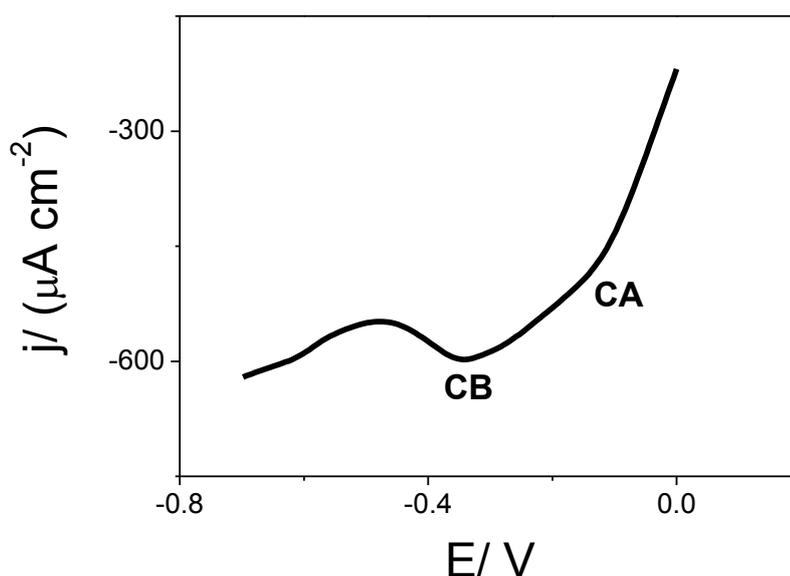
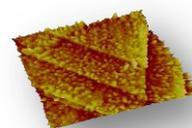


Figura IV.1.34. Ciclovoltamograma registrado a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$ en PBS pH 7,4 para una película de melanina de $t_a = 16$ horas sobre Au(111), en presencia de $4,59 \text{ mM}$ de H_2O_2 , después de burbujear N_2 durante 5 minutos.

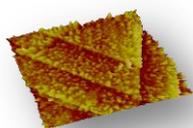
Tal y como se muestra en el gráfico, la contribución de las densidades de corriente de ambos procesos pueden ser apreciadas mucho más claramente. De hecho, mientras que el pico CA aparece como un ligero “hombro”, el pico CB se muestra bien resuelto en el voltamograma exhibido.

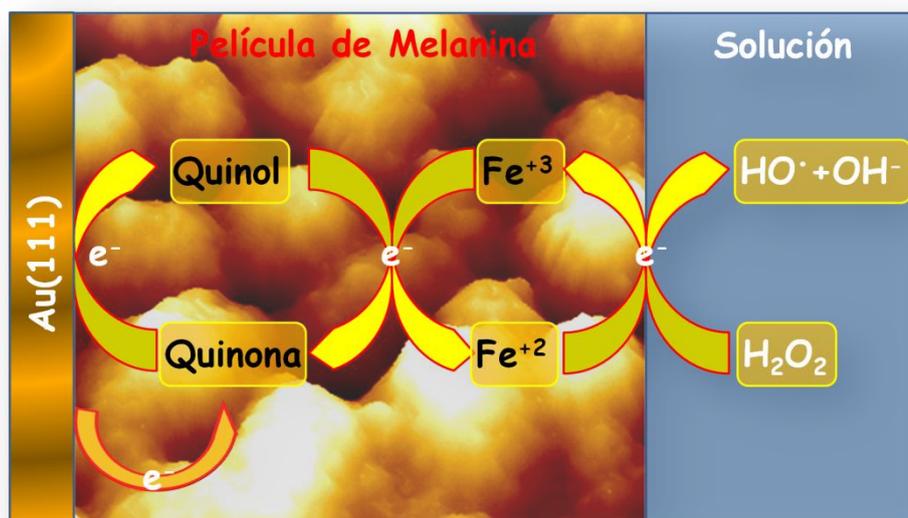


En cualquier caso, a la vista de los resultados mostrados, fig. IV.1.33a-b, se puede concluir que la electroreducción de peróxido de hidrógeno, pico CB, sobre el electrodeposición de melanina tiene lugar a un potencial aproximadamente 0,4 V más positivo que para el Au sin modificar. Por tanto, la película de eumelanina es capaz de catalizar la electroreducción del peróxido de hidrógeno también en medios neutros.

Se debe hacer notar que el hecho de que el efecto electrocatalítico sea también observado en PBS pH 7,4 donde fundamentalmente las especies de óxido de hierro, más lábiles, son disueltas en el barrido catódico,⁵² fig. IV.1.20, confirma la observación hecha previamente en relación a que las nanopartículas ricas en magnetita no son esenciales para la electrocatálisis. Este hecho junto a la catálisis observada tras lavado ácido, fig. IV.1.32, constituyen una clara evidencia de que la actividad electrocatalítica de las películas de eumelanina descansa sobremanera en la actividad electroquímica de las nanopartículas de melanina que contienen iones Fe(III) enlazados a grupos hidroxilos fenólicos en una configuración octaédrica similar a la encontrada para el Fe₂O₃.

Se ha propuesto un posible mecanismo que trata de explicar la actividad electrocatalítica de las películas de eumelanina cuando el electrodo es polarizado a -0,75 V (CB). Este mecanismo, que se muestra en el Esquema IV.1.2, implica la oxidación del Fe⁺² a Fe⁺³ (iones hierro enlazado a la melanina, se entiende) a causa de la reducción del peróxido de hidrógeno a iones OH⁻ y radicales OH· tal y como sucede en la reacción de Fenton. Este Fe⁺³ se reduce entonces a Fe⁺² por oxidación de grupos quinoles (que en este rango de potenciales están completamente reducidos) a quinonas. Por último, los grupos quinona pueden reducirse de nuevo a quinol sobre la superficie electródica cerrándose así el ciclo.



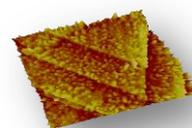


Esquema IV.1.2. Representación esquemática que muestra un posible mecanismo de reacción para la actividad electrocatalítica de las películas de hierro-melanina en la región de potencial del pico CB (-0,75 V).

Tal mecanismo se justifica en el hecho de que los melanosomas de eumelanina y feomelanina son capaces de reducir al sistema Fe(III)-citocromo.⁶⁹

Ya se ha mostrado anteriormente que los electrodeósitos de melanina aumentan considerablemente la actividad electrocatalítica respecto a HER en relación al sustrato primigenio de Au(111), ver fig. IV.1.18. No obstante, si bien es cierto que podría atribuirse a un aumento del área electroquímica, también lo es que el análisis del área superficial suministrado por el software del microscopio muestra un incremento en la misma, tras la modificación con el sistema hierro-melanina, que no justifica en ningún caso el aumento en la densidad de corriente registrado en el rango de potenciales correspondiente a HER.

La actividad electrocatalítica descrita es notable no sólo en las experiencias realizadas en NaOH 0,1 M, pH 12,6, sino que se extiende en un amplio rango hasta pH fisiológico, esto es pH 7,4, tal y como se muestra en la Figura IV.1.35:



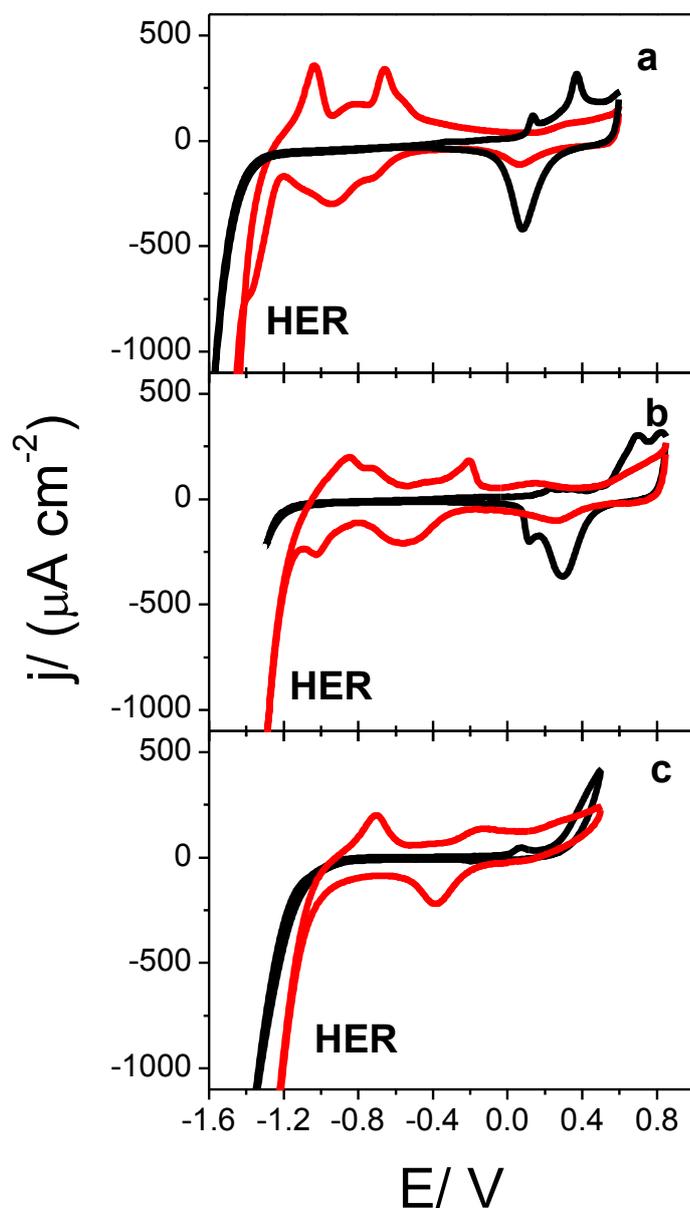
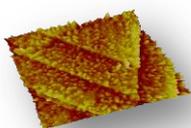


Figura IV.1.35. Ciclovoltamogramas registrados a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$ para Au(111), en color negro y película de melanina de $t_a = 3$ horas, rojo, en diferentes medios electrolíticos: NaOH 0,1 M, pH 12,6 (a), tampón $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$, pH 9,4 (b) y tampón TRIS/ HCl a pH 7,4 (c).

Estas propiedades catalíticas exaltadas frente a HER que exhiben las películas de melanina deben ser atribuidas a las especies de hierro presentes en las mismas. Esta afirmación se justifica en el hecho de que las películas de Q/ HQ, ver fig. IV.1.25, de hecho bloquean la superficie del sustrato frente a HER. Es más, los electrodepósitos de melanina de tiempos de adsorción largos que, como ya se ha indicado anteriormente, acumulan en su superficie externa capas de agregados moleculares de oligómeros de eumelanina con menor



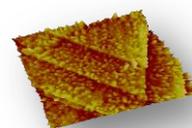
presencia, en principio, de especies de óxidos de hierro, también muestran un peor comportamiento electrocatalítico que las películas de menor espesor, fig. IV.1.26 y IV.1.27.

En este sentido hay que decir que se ha sugerido, en el caso de electrodos de Fe/ óxidos de Fe,⁷⁰ la presencia de especies intermedias adsorbidas FeOH_{ad} formadas en el primer paso de la disolución anódica del hierro en soluciones alcalinas y ácidas:



Este equilibrio (3) precede a la formación de $(\text{FeO})_{\text{ad}}$ y FeOH^+ en medios alcalinos y ácidos, respectivamente. El significado puramente físico de las especies $(\text{FeOH})_{\text{ad}}$ y $(\text{FeO})_{\text{ad}}$ es un tanto ambiguo, es decir, podrían ser especies quimisorbidas de Fe(I) y Fe(II) asociadas con OH^- u O^{2-} , respectivamente, o $(\text{OH})_{\text{ad}}$ o $(\text{O})_{\text{ad}}$. En cualquier caso, la aceleración de HER por parte de especies $(\text{FeOH})_{\text{ad}}$ es más que probable toda vez que óxidos de otros metales de transición como RuO_2 , IrO_2 y RhO_x exhiben una buena actividad electrocatalítica frente a HER. El mecanismo propuesto en los casos anteriores implica la formación de un intermedio $\text{S}(\text{OH})\text{H}$ (siendo $\text{S} = \text{Ru}, \text{Ir}, \text{Rh}$).⁷¹ Por analogía, es razonable proponer la existencia de un intermedio $(\text{FeOH})_{\text{ad}}\text{H}_{\text{ad}}$ en los electrodepuestos de melanina.^{70a}

Por otro lado, también es conocido que las porfirinas de Fe catalizan HER por medio del complejo Fe(0)-porfirina formado a potenciales catódicos por la reducción de Fe(II)-porfirina.⁷² En esta misma línea de razonamiento, el complejo Fe(0)-melanina podría desempeñar el mismo papel en las películas de melanina. Por tanto, parece claro que las diferentes especies de hierro presentes en el composite orgánico-inorgánico son responsables de la actividad electrocatalítica exaltada de estas películas frente a HER. Con objeto de confirmar lo apuntado hasta el momento, se registró la respuesta electroquímica de una película de melanina tras sumergirla repetidas veces en una disolución ácida:



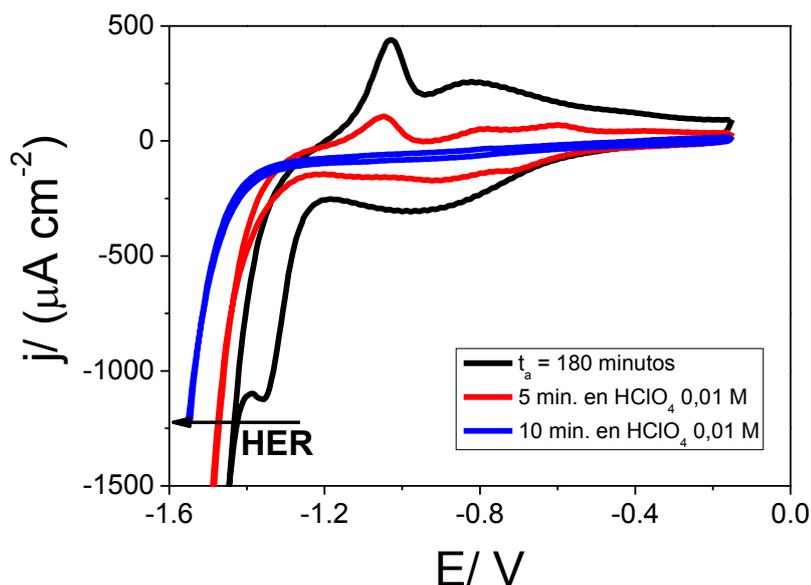
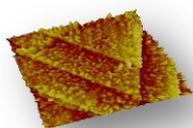


Figura IV.1.36. Voltamogramas estabilizados para una película de melanina de $t_a = 180$ min registrados en NaOH 0,1 M a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$ tras inmersión durante distintos tiempos, t_i , en una disolución de HClO_4 0,01 M: $t_i = 0$, voltamograma de color negro; $t_i = 5$ minuto, en color rojo y $t_i = 10$ minutos, azul.

En la Figura IV.1.36 se observa que en la medida en que aumenta el tiempo de inmersión en la solución de HClO_4 y, por tanto, las especies de hierro presentes en la película se van disolviendo, por un lado se recupera la respuesta electroquímica inicial del Au y, por otro, HER se desplaza hacia potenciales cada vez más negativos. Por tanto, se puede concluir que el complejo melanina-hierro es esencial para la electrocatálisis descrita.

IV.1.2.7. Tratamiento de películas de melanina sobre Au(111) con EDTANa_2

Con objeto de obtener aun más evidencias acerca del papel que desempeña el hierro en la respuesta voltamétrica de las películas de melanina obtenidas tras polarización catódica a -1.0 V , estos electrodepositos fueron sumergidos, para distintos tiempos, en disoluciones acuosas de la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, EDTANa_2 . Cabría esperar que el EDTANa_2 no sólo eliminase las nanopartículas tipo Fe_3O_4 presentes en las películas sino también los iones Fe^{+3} coordinados octaédricamente al material orgánico. De hecho, se ha publicado que el EDTANa_2 es capaz de extraer el Fe de los gránulos de



melanina-hierro presentes en disolución sin que se produzcan cambios apreciables en la morfología de dichos gránulos.^{9a}

Así, en la Figura IV.1.37 se muestra la respuesta voltamétrica de una película de eumelanina de $t_a = 100$ minutos tras permanecer diferentes intervalos de tiempo en contacto con una disolución 20 mM de EDTANa₂ en NaOH 0,1 M.

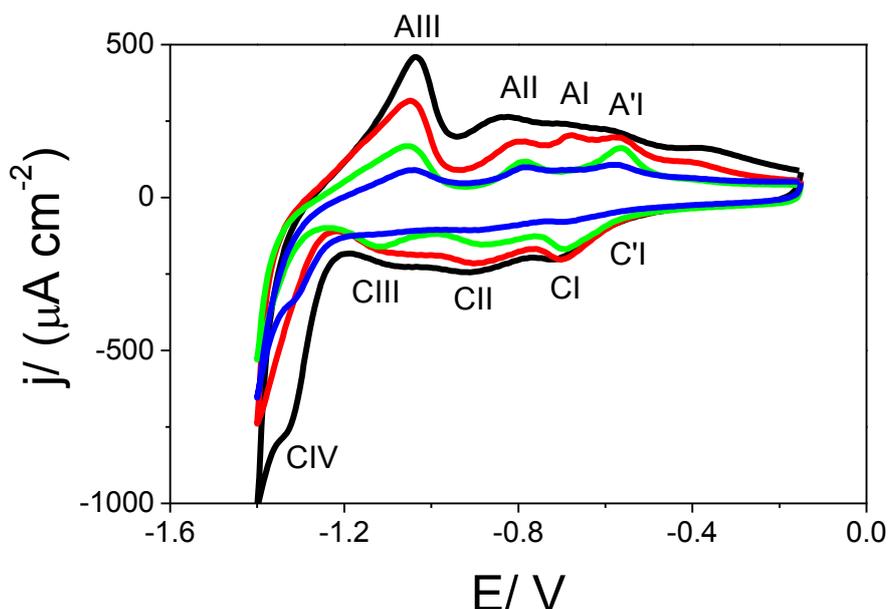
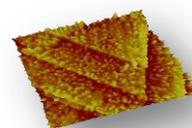


Figura IV.1.37. Ciclovoltamogramas estabilizados para una película de melanina de $t_a = 100$ minutos registrados en NaOH 0,1 M a 0.2 Vs^{-1} tras inmersión durante distintos tiempos, t_i , en disolución 20 mM de EDTANa₂: $t_i = 0$ minutos, voltamograma de color negro; $t_i = 1$ minuto, rojo; $t_i = 10$ minutos, verde; $t_i = 20$ minutos, azul.

A la vista del gráfico es posible concluir que todos los picos voltamétricos van disminuyendo en área a medida que aumenta el tiempo de exposición a la disolución de EDTANa₂, sobre todo la pareja AIII/CIV y, en menor medida AII/ CIII. Es evidente que estos picos voltamétricos, como ya se ha comentado, están relacionados con la respuesta electroquímica de las partículas ricas en especies de óxidos de hierro tipo magnetita resultan más fuertemente afectados mientras que los otros picos muestran alteraciones significativamente inferiores. Por tanto, es posible concluir que las nanopartículas de óxidos de hierro son más rápidamente extraídas de la película mientras que el hierro coordinado en las nanopartículas de melanina-hierro va abandonando la misma



más lentamente.

En este sentido, hay que decir que la actividad electrocatalítica de las películas de eumelanina que han permanecido en contacto con la disolución de EDTANa_2 para tiempos de inmersión inferiores a diez minutos no exhibió alteraciones significativas, como se puede ver en la Figura IV.1.38. Si bien es cierto que, a lo largo de dicho periodo de tiempo, las nanopartículas de óxidos de hierro son preferentemente extraídas de la película en comparación con el hierro coordinado en las nanopartículas de melanina-hierro cuyos picos voltamétricos asociados se ven afectados en menor medida. Esta afirmación se sustenta en los resultados mostrados de AES, fig. IV.1.11-12.

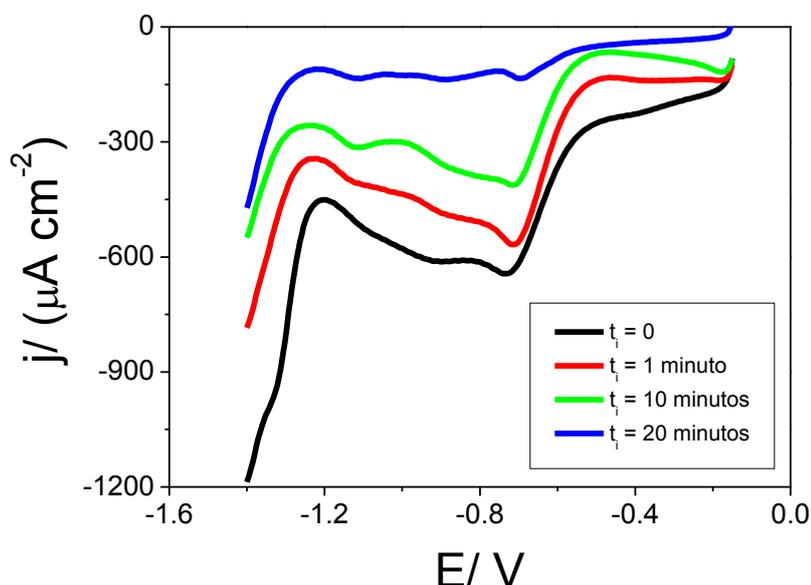
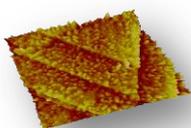


Figura IV.1.38. Ciclovoltamogramas estabilizados de una película de melanina de $t_a = 100$ minutos registrados en H_2O_2 2 mM en NaOH 0,1 M a $0,2 \text{ V s}^{-1}$ tras inmersión durante distintos tiempos t_i en disolución 20 mM de EDTANa_2 : $t_i = 0$, voltamograma de color negro; $t_i = 1$ minuto, rojo; $t_i = 10$ minutos, verde; $t_i = 20$ minutos, azul.

Sin embargo, se puede observar que para tiempos de inmersión grandes, para los que incluso el hierro que estaba presente en las nanopartículas de melanina-hierro ha sido extraído de las mismas en gran medida, voltamograma azul de la fig. IV.1.37, la actividad electrocatalítica de las películas se ha visto drásticamente reducida, voltamograma azul en la fig. IV.1.38.

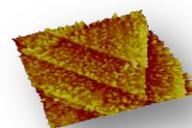


Estas experiencias permiten, por tanto, confirmar lo que ya se había podido apuntar en el apartado anterior, es decir, que la actividad electrocatalítica de las películas de eumelanina crecidas sobre Au(111) con respecto a la electroreducción del peróxido de hidrógeno, está fundamentalmente relacionada con el Fe(III) octaédrico coordinado a las unidades de DHI y/o DHICA en las nanopartículas de melanina mientras que las nanopartículas ricas en óxidos de hierro tipo magnetita no son esenciales para la electrocatálisis.

Sin embargo no se debe obviar la posibilidad de que durante el tratamiento con EDTANa₂ se hayan perdido algunos gránulos de melanina. De hecho, se han publicado estudios recientes en los que se demuestra que los iones metálicos desempeñan un papel significativo en el ensamblado de los componentes orgánicos no metálicos a la hora de formar estructuras tridimensionales distribuidas a lo largo del esqueleto proteico dentro de los gránulos.^{9a}

Desde este punto de vista, se decidió afrontar un estudio sistemático por STM y AFM en modo resonante con el objeto de poder correlacionar la salida de las distintas especies de hierro con las imágenes topográficas obtenidas para electrodepositos de melanina sometidos a inmersión para diferentes tiempos en disolución 20 mM de EDTANa₂ en NaOH 0,1 M.

Así, en la Figura IV.1.39 se muestran las imágenes STM obtenidas para una película de $t_a = 100$ minutos tras 10 y 20 minutos de inmersión:



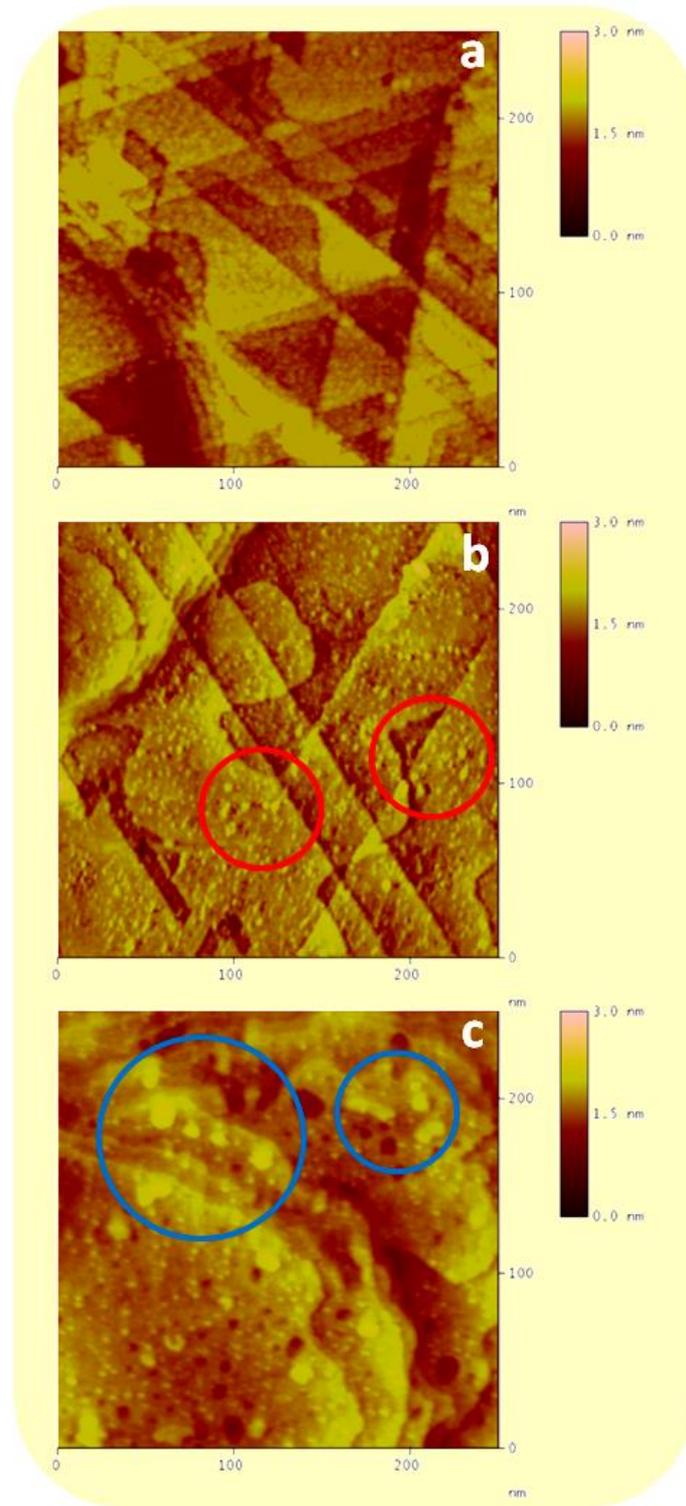
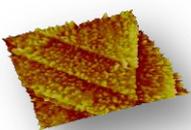


Figura IV.1.39. Imágenes STM de alta resolución de $250 \times 250 \text{ nm}^2$ de: (a) película de melanina de $t_a = 100$ minutos sobre Au(111), (b) película de melanina sobre Au(111) tras 10 minutos en 20 mM de EDTANa₂ en NaOH 0,1 M y (c) película de melanina sobre Au(111) tras 20 minutos en 20 mM de EDTANa₂ en NaOH 0,1 M.

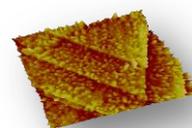


A la vista de las imágenes STM es posible concluir que la densidad de partículas que contrastan al STM disminuye significativamente a medida que aumenta el tiempo de inmersión en EDTANa₂. De hecho, mientras que en la película de eumelanina de sesenta minutos el sustrato de oro se encuentra totalmente cubierto de nanopartículas de melanina que reproducen aproximadamente la topografía del Au(111), en las imágenes correspondientes a películas sumergidas diez y veinte minutos en solución de EDTANa₂, puede advertirse fácilmente la superficie del sustrato.

Se debe destacar que las dimensiones de las nanopartículas de menor tamaño que pueden observarse en cada una de las imágenes no parecen haberse visto apreciablemente afectadas por el tratamiento en EDTANa₂. Sin embargo, sí es cierto que empiezan a distinguirse agregados de las mismas, cuyo número y dimensiones aumenta significativamente con el tiempo de inmersión, ver zonas marcadas en rojo y en azul en fig. IV.1.39b y c, respectivamente. Por otro lado, se puede apreciar como la superficie del sustrato de Au(111) va experimentando un mayor deterioro a medida que permanece más tiempo en la disolución de EDTANa₂.

Las imágenes STM que se han mostrado hasta ahora confirman lo esperado a la vista de la respuesta electroquímica de las películas tras permanecer diferentes tiempos sumergidas en disolución de EDTANa₂, fig. IV.1.37. Es decir, a medida que aumenta el tiempo de inmersión, disminuye la densidad de partículas que contrastan al STM adsorbidas sobre el sustrato de Au(111).

Sin embargo, cuando se llevó a cabo el mismo estudio pero, en esta ocasión, por medio de AFM en modo resonante, se obtuvieron las imágenes que se muestran a continuación en la Figura IV.1.40:



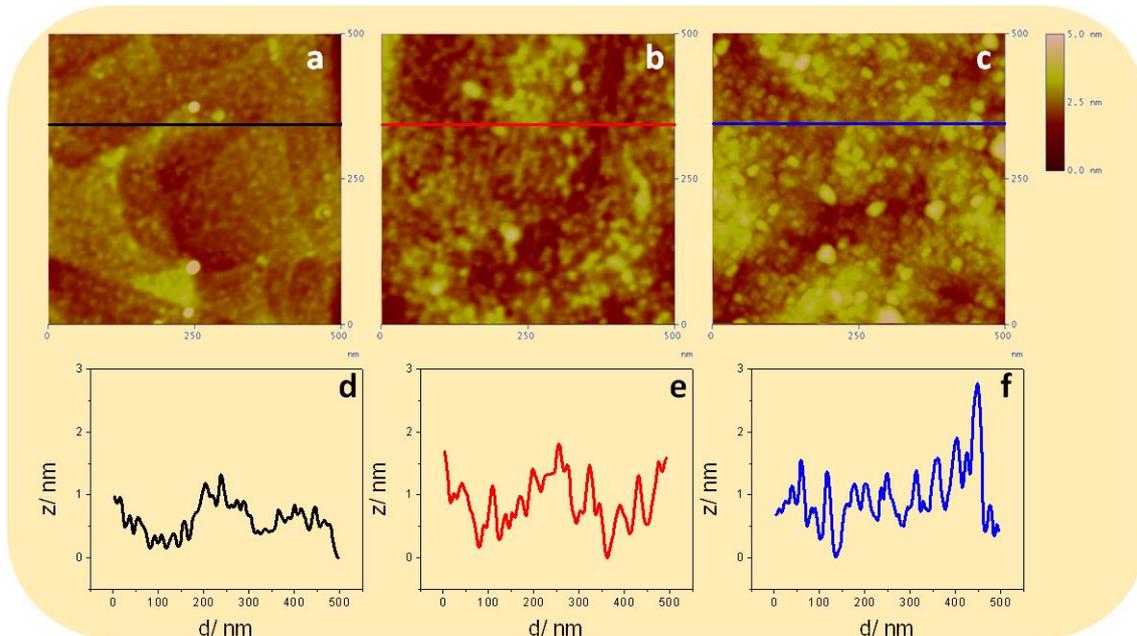
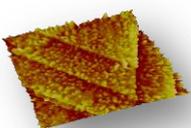


Figura IV.1.40. Imágenes AFM de alta resolución de $500 \times 500 \text{ nm}^2$ de: (a) película de melanina de $t_a = 100$ minutos sobre Au(111), (b) película de melanina sobre Au(111) tras 10 minutos en 20 mM de EDTANa₂ en NaOH 0,1 M y (c) película de melanina sobre Au(111) tras 20 minutos en 20 mM de EDTANa₂ en NaOH 0,1 M. Secciones transversales representativas de: película de $t_a = 100$ minutos en color negro (d), película de sesenta minutos tras 10 minutos en 20 mM de EDTANa₂ en NaOH 0.1 M en color rojo (e) y película de sesenta minutos tras 20 minutos en 20 mM de EDTANa₂ en NaOH 0.1 M en color azul (f).

Las imágenes muestran que el sustrato de Au(111) está, en los tres casos, completamente cubierto por nanopartículas de melanina, no siendo visible en caso alguno la superficie del mismo. Además, el análisis de las secciones transversales permite advertir un sensible incremento en las dimensiones de los gránulos a medida que aumenta el tiempo de inmersión en EDTANa₂. Por tanto, queda claro que el hierro desempeña un papel importante pero no decisivo en el mantenimiento de la estructura granular del depósito, toda vez que los gránulos cambian de tamaño pero sin alterar la morfología granular del electrodepósito.

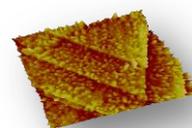
La diferencia en los resultados de las medidas realizadas por STM y AFM, lejos de ser una incongruencia, nos aporta información muy valiosa acerca de las propiedades de los materiales presentes en el composite orgánico-inorgánico. Es importante recordar, llegados a este punto, que el AFM es capaz de producir imágenes con alta resolución no sólo de muestras conductoras y



semiconductoras como sucede con el STM, sino también de superficies aislantes.

Así, por medio de las imágenes AFM de la película tras inmersión, fig. IV.1.48b-c, se puede apreciar una capa de material orgánico visiblemente nanoestructurado que desde luego no contrasta, al menos no en toda su extensión, al STM y que permanece sin alteraciones demasiado significativas, aún tras inmersión en EDTANa₂. De manera que, por AFM, se observa que el sustrato está totalmente cubierto en todos los casos propuestos. Sin embargo, los resultados de las medidas realizadas por STM mostraron, a medida que aumentaba el tiempo de exposición al EDTANa₂, una notable disminución en el número de partículas que contrastan, siendo visible la superficie del sustrato tras largos tiempos de inmersión. También es importante destacar el hecho de que las dimensiones de las partículas que contrastan al STM, entre 5 y 8 nm de ancho, son ligeramente menores que las que se han podido medir con el AFM, entre 10 y 20 nm de ancho. Esta circunstancia debe ser atribuida a la convolución que causa la sonda debido a la menor agudeza de la punta de AFM en relación a la de STM.⁴⁵

Por tanto, parece razonable considerar que la situación inicial, correspondiente a una película de 100 minutos, medida por STM, fig. IV.1.39a, en la que el sustrato de oro aparece totalmente cubierto y las partículas de melanina siguen aproximadamente la topografía del Au(111), corresponde a la presencia en la película de nanopartículas ricas en compuestos de óxidos de hierro tipo magnetita y de nanopartículas de melanina que contienen Fe(II)/Fe(III) enlazado tetraédricamente/ octaédricamente al material orgánico, como ya se ha demostrado previamente. Sin embargo, en la medida en que dicha película es sumergida en la disolución de EDTANa₂, y, por tanto, las nanopartículas de óxidos de hierro son rápidamente extraídas de la película mientras que el hierro coordinado en las nanopartículas de melanina va abandonando la misma más lentamente, fig. IV.1.37, va disminuyendo el número de partículas que contrastan al STM. Es decir, la eliminación del hierro, tanto del que se encuentra en forma de óxidos como del enlazado al material orgánico, afecta drásticamente al contenido en material conductor o

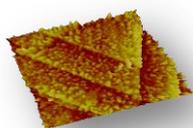


semiconductor de la película.

En este sentido, el hecho de que el hierro pueda ser extraído de la película sin que ésta sufra alteraciones significativas en cuanto a su morfología granular se refiere, más allá de un ligero aumento en las dimensiones de las partículas, coincide con lo ya apuntado en la bibliografía para la eumelanina natural.^{9a} Es decir, resulta razonable suponer la existencia en la estructura granular de los electrodepósitos de melanina-hierro de una serie de canales que permitiría el flujo de iones hierro a través de la película sin que su estructura se vea notablemente afectada.

Tomando en consideración la compleja composición del biopolímero de partida parece razonable que existan diferentes tipos de fuerzas intermoleculares que puedan desempeñar un papel relevante en el proceso de ensamblado de los electrodepósitos durante el crecimiento de las películas. Así, las interacciones π - π deberían ser la fuerza dominante entre los oligómeros de DHI y DHICA. Por el contrario, las interacciones Fe-oligómero y los enlaces de hidrógeno que se pudieran establecer entre los distintos complejos Fe-oligómero podrían determinar la orientación de los mismos en el apilamiento π . De hecho, parece claro que las especies Fe(III)-melanina favorecen el apilamiento de agregados de melanina en todas direcciones probablemente porque la coordinación del Fe(III) implica a múltiples ligandos orientados en las tres dimensiones, tal y como se ha propuesto a partir de los datos de rayos X.^{11b}

Por lo tanto, en lo que sigue se ha tratado de investigar la incidencia del hierro en la formación y el crecimiento de las películas de eumelanina sobre Au(111). A tal fin, se ha llevado a cabo la siguiente experiencia: en este caso, las películas se hacen crecer a partir una solución que contiene 0,3 g L⁻¹ de eumelanina y 20 mM de EDTANa₂ en NaOH 0,1 M. Esto tendría por objeto, considerando la estructura de ligando hexadentado del EDTA, complejar completamente el ión Fe(III) de coordinación octaédrica presente en la eumelanina sintética y, por consiguiente, evaluar qué efecto ejerce dicho ión sobre la formación y la morfología de la película bajo polarización catódica de



Resultados y Discusión

-1,0 V sobre Au(111).

Con la intención de obtener evidencias acerca de la existencia o no de película de eumelanina sobre el Au(111) en la citada experiencia, se llevaron a cabo medidas de STM y AFM de la película crecida en las condiciones experimentales anteriormente mencionadas, es decir, 100 minutos a -1,0 V en disolución $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de eumelanina y 20 mM de EDTANa₂ en NaOH 0,1 M, cuyos resultados se muestran en la figura IV.1.41.

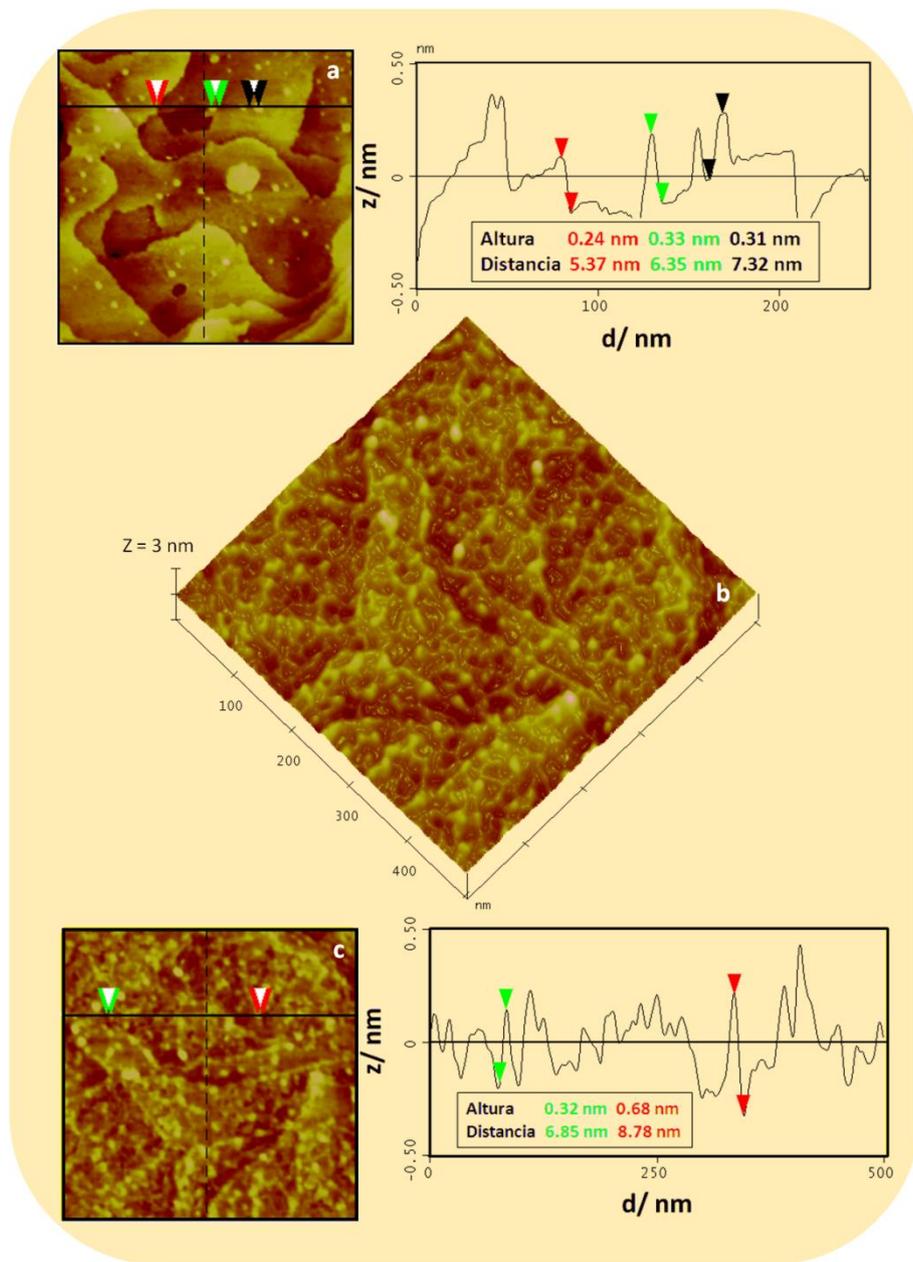
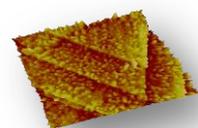


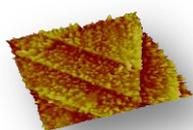
Figura IV.1.41. (a) Sección transversal de una imagen STM de $250 \times 250 \text{ nm}^2$ de una película de $t_a = 100$ minutos crecida en disolución $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de melanina sintética en 20 mM de EDTANa₂ en NaOH 0,1 M. (b) Imagen AFM 3D de $500 \times 500 \text{ nm}^2$ de la misma película. (c) Sección transversal mostrando las dimensiones de las fibras (c).



Cuando se comparan los resultados obtenidos al preparar la película de eumelanina en presencia de EDTANa_2 20 mM, fig. IV.1.41a, con un electrodepósito del mismo tiempo de adsorción preparada de la manera convencional, fig. IV.1.39a, se observa cómo el número de partículas que contrastan al STM es ahora mucho más reducido, siendo perfectamente visible la superficie del sustrato de Au(111). En general, se podría concluir que la formación en la disolución de trabajo de un complejo tan estable como es el Fe(III)-EDTA dificultaría enormemente la electroadsorción de la eumelanina sobre el sustrato de Au(111), con lo que el hierro jugaría, por tanto, un papel fundamental en dicha adsorción.

Existe otro hecho especialmente interesante en relación al tamaño de las partículas adsorbidas sobre al sustrato: ya se ha comentado que, en las primeras etapas de formación de las películas convencionales, las unidades más pequeñas presentes en la misma, de entre 5 y 8 nanómetros de ancho por entre 0,3 y 1 nanómetro de altura, forman, por un proceso de autoensamblado electroquímico, agrupaciones ordenadas que reproducen aproximadamente la topografía del Au (111), fig. IV.1.39a. Sin embargo, cuando la película es preparada en presencia de EDTANa_2 , el tamaño de partícula que contrasta al STM es sensiblemente superior, con nanopartículas cuyas dimensiones oscilan entre 12 y 18 nanómetros de ancho por entre 0,3 y 1,2 nanómetros de alto, fig. IV.1.41a. En este sentido, ya se ha comentado que existen evidencias significativas, obtenidas por SEM y AFM, de que la eumelanina natural está formada por pequeñas partículas de talla nanométrica, entre 10 y 20 nm, que se agregan, en una fase posterior, dando lugar a la formación de gránulos, en torno a 150 nm aproximadamente.⁹

De la misma forma que sucedía en las experiencias anteriores tras inmersión en disolución de EDTANa_2 , fig. IV.1.40, puede observarse por AFM en la fig. IV.1.41b la presencia de una gran cantidad de material biorgánico no conductor que, por tanto, no contrasta al STM. Sin embargo, en este caso y a diferencia de los anteriores, en imágenes de campos grandes sí resulta posible apreciar la superficie del sustrato de Au(111), lo cual confirma la importancia del papel que desempeña el hierro en el ensamblado de las películas de eumelanina.



Aún más relevante resulta el hecho de que, en este caso, los agregados de oligómeros de eumelanina se estructuran configurando un arreglo bidimensional de estructuras fibrilares interconectadas.

Esta morfología fibrilar de los electrodepositos crecidos en EDTANa₂ se hace aún más patente en el caso de películas de mayor espesor. Así, en la Figura IV.1.42 se muestra la imagen AFM 3D registrada para una película de $t_a = 24$ horas.

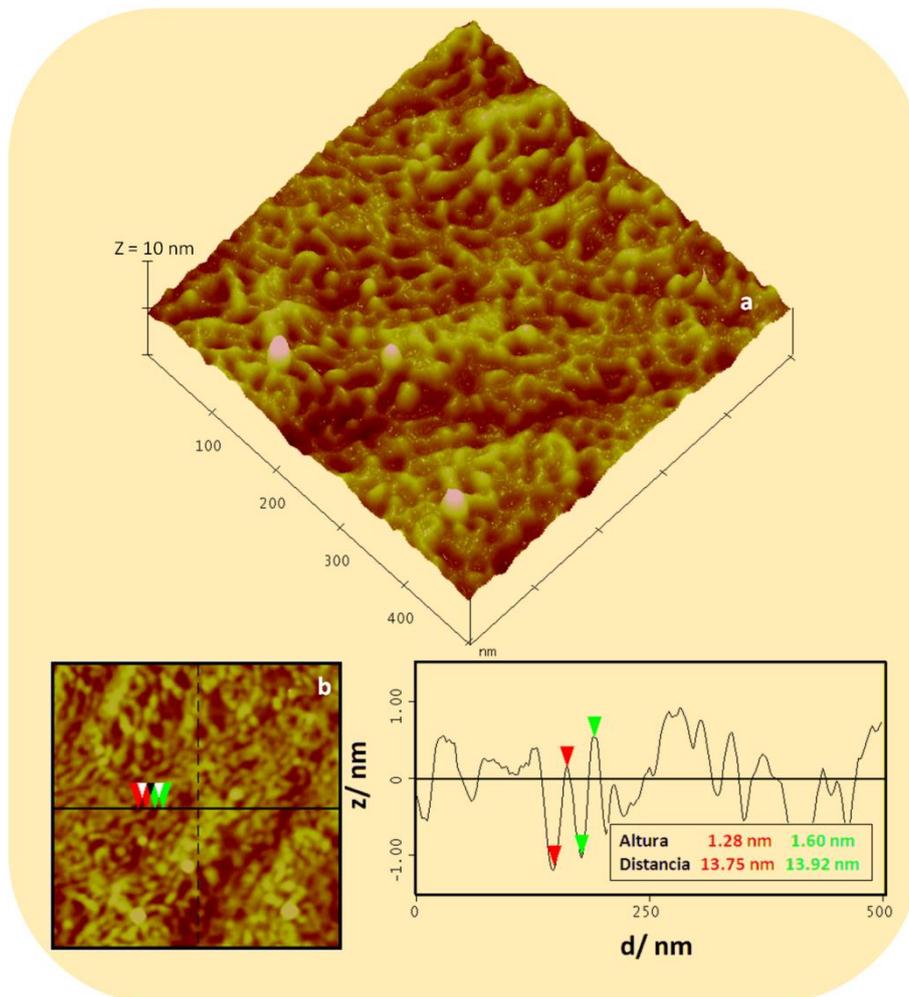
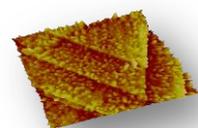


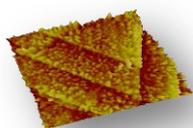
Figura IV.1.42. (a) Imagen AFM 3D de $500 \times 500 \text{ nm}^2$ de una película de $t_a = 24$ horas crecida en disolución $0,3 \text{ gL}^{-1}$ de melanina sintética en 20 mM de EDTANa₂ en NaOH $0,1 \text{ M}$. (b) Sección transversal mostrando las dimensiones de las fibras.

Tal y como se desprende de la comparación de las películas de diferente espesor, se puede concluir que el aumento en el tiempo de adsorción trae como consecuencia un aumento en las dimensiones de las estructuras



fibrilares que configuran el electrodeposito, fig. IV.1.41c- IV.1.42b, resultando aún accesible, incluso en las películas más gruesas, la superficie del sustrato. Por lo tanto, la no incorporación del hierro junto a los oligómeros de melanina durante el crecimiento de la película condiciona significativamente la morfología de la misma pues parecen estar favorecidas las interacciones π - π entre oligómeros que darían lugar a apilamientos longitudinales monodimensionales que a su vez podrían empaquetarse junto a otros análogos a éstos mediante puentes de hidrógeno definiendo así estructuras alargadas pseudofibrilares como las que exhiben las películas analizadas en las fig. IV.1.41-42. De hecho, se ha descrito en la bibliografía el ensamblado de derivados fenilénicos básicamente planos, como lo son el DHI, DHICA y sus oligómeros de menor tamaño, que, una vez adsorbidos y en función de la naturaleza del sustrato, pueden dar lugar a arquitecturas supramoleculares fibrilares similares a las mostradas.⁷³

En cualquier caso, en lo que respecta a la respuesta electroquímica de estas películas, ver Figura IV.1.43, hay que decir que, pese a la existencia de esta capa de material orgánico escasamente conductor, con bajo o prácticamente nulo contenido en hierro, adsorbida sobre el sustrato de Au(111) en las condiciones ya comentadas, y más allá de un ligero ensanchamiento observado en la región de doble capa del sustrato así como de una poco significativa disminución del área electroquímica implicada en la formación y reducción de la monocapa de AuO, no resulta posible identificar densidad de corriente alguna debida a la contribución de procesos faradaicos correspondientes a especies de hierro o al sistema quinona/ semiquinona/ hidroquinona.



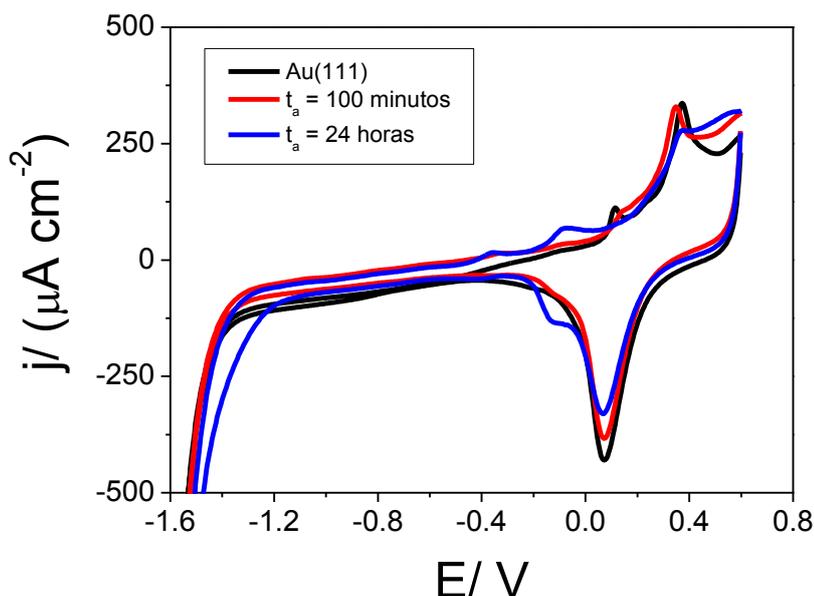
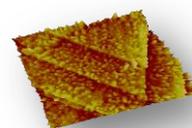


Figura IV.1.43. Ciclovoltamogramas registrados a $0,2 \text{ Vs}^{-1}$ en NaOH $0,1 \text{ M}$ de: Au(111), en color negro, y de películas de melanina crecidas en 20 mM de EDTANa₂ en NaOH $0,1 \text{ M}$, $t_a = 100$ minutos, en rojo y $t_a = 24$ horas, azul.

Por tanto, se puede concluir que las películas de melanina electrodepositadas en presencia de EDTANa₂ resultan ser electroquímicamente inactivas o, en su defecto, la cantidad total de material electrodepositado sobre la superficie del sustrato es aún insuficiente como para producir una respuesta electroquímica apreciable.

No obstante, llegados a este punto hay que tener en cuenta que en determinados estudios en los que se defiende y se trata de justificar el modelo de apilamiento π de oligómeros, también se demostró la existencia de algunas de las especies oligoméricas propuestas en el modelo heteropolimérico primigenio de Raper-Mason basado en la presencia de formas poliméricas extendidas mediante enlaces aleatorios entre unidades de DHI y DHICA.⁷⁴ De esto se deduce que ambos modelos de apilamiento pueden no ser excluyentes y, en consecuencia, podrían coexistir simultáneamente en la melanina, al menos hasta cierto punto. En el caso de los electrodepósitos de melanina-hierro, parece claro que la presencia del Fe(III), de acuerdo a los datos descritos en la bibliografía y a nuestros propios resultados experimentales, favorece el primer modelo dando lugar a la formación de películas de

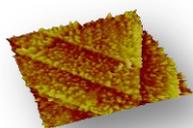


morfología granular en las que las dimensiones de las nanopartículas coinciden con los datos descritos en la bibliografía y con la estructura secundaria de partículas de entre 10 y 20 nm, propuesta en el modelo de apilamiento π de oligómeros.⁹ Sin embargo, la formación en la disolución de partida de un complejo tan estable como es el hierro-melanina-EDTA hace que la adsorción de tales especies sobre el sustrato no sea posible en estas condiciones, de forma que serían los oligómeros extendidos, correspondientes al segundo modelo, el de Raper-Mason, los que hipotéticamente se incorporarían a la superficie del sustrato, configurando el arreglo bidimensional de estructuras fibrilares alargadas interconectadas características del mismo y que se muestran en las fig. IV.1.41 y IV.1.42.

Por su parte, en lo que respecta a la respuesta electroquímica inactiva exhibida por los electrodepositos de melanina crecidos en presencia de EDTANa₂, hay que decir que si bien la naturaleza tipo quinona/ semiquinona/ hidroquinona de las subunidades de melanina constituye una base razonable para explicar las presumibles propiedades redox de estas películas, especialmente en ausencia de especies Fe-melanina, también es cierto que la estabilidad química de estos grupos quinona no se conoce completamente.^{9c} De hecho, tales grupos son fundamentalmente ortoquinonas, o-quinonas, presentes en los monómeros DHI y DHICA. Sin embargo, a diferencia de las p-quinonas, las o-quinonas son altamente inestables.⁷⁵ En principio, se ha propuesto que su estabilización en las melaninas proviene, en primer lugar, de la existencia de enlaces covalentes entre las subunidades de melanina y, en segundo lugar, de su posterior apilamiento mediante interacciones π - π en agregados moleculares.^{9c} La carencia de estas últimas, en el caso de los oligómeros extendidos de Raper-Mason, dificultarían sobremanera su estabilización dando lugar a películas electroquímicamente inactivas como las mostradas en la fig. IV.1.43.

IV.1.3. Conclusiones

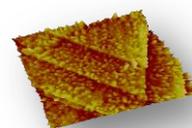
Hemos preparado mediante un método electroquímico potenciostático películas ultradelgadas y nanoestructuradas sobre sustratos de Au a partir de soluciones



alcalinas de eumelanina sintética. En las primeras etapas de formación de las películas se obtienen agrupaciones ordenadas de nanopartículas de dimensiones comprendidas entre 5 y 8 nm que exhiben una fuerte influencia del sustrato. En etapas más avanzadas se obtienen películas tridimensionales de morfología granular cuyo tamaño de partícula es similar al que se ha descrito en películas de eumelanina preparadas por evaporación. Estos electrodepósitos son activos electroquímicamente en el rango de potenciales comprendido entre -1,2 V y -0,35 V donde exhiben pares rédox bien definidos, dependiendo el grado de desarrollo de los mismos del espesor de la película.

Los resultados de las medidas de XANES, AES, XPS, MFM y voltametría cíclica confirman la presencia de dos tipos de hierro en las películas: por un lado nanopartículas de óxidos de hierro tipo magnetita, por otro hierro enlazado en las nanopartículas de melanina. Por tanto, el sistema puede ser considerado como un composite orgánico-inorgánico, nanoestructurado, con propiedades magnéticas y electrocatalíticas exaltadas. De hecho, el sistema melanina-hierro cataliza eficientemente la reducción del peróxido de hidrógeno en el rango de potenciales donde la película es electroquímicamente activa. Esta actividad electrocatalítica se relaciona en mayor medida con los iones hierro coordinados a las unidades catecol en configuraciones tetraédricas u octaédricas. Sin embargo, las propiedades magnéticas de los electrodepósitos se atribuyen fundamentalmente a las nanopartículas de óxidos de hierro atrapadas en la matriz orgánica durante el crecimiento de las películas.

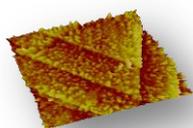
Los resultados de estos estudios, recientemente publicados,⁷⁶ son importantes en la medida en que ofrecen la posibilidad de sintetizar, fácilmente y a bajo coste, un sistema biomimético que permitiría estudiar la influencia que ejerce la estructura de la melanina, esto es espesor de la película y tamaño de partícula, sobre la incorporación y almacenamiento de Fe y su relación con la actividad peroxidasa y el estrés oxidativo en los melanosomas debido al sistema hierro-melanina. Por su parte, la interacción existente entre los gránulos de melanina y las nanopartículas de óxidos de hierro hacen de este biopolímero un candidato idóneo para el recubrimiento de nanopartículas de hierro con polímeros biocompatibles para su uso en aplicaciones bioquímicas y



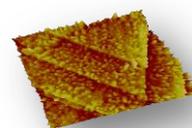
médicas.⁷⁷

IV.1.4. Bibliografía

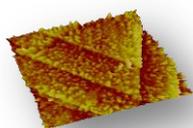
- 1) (a) G. Prota, *Melanins and Melanogenesis*; Academic Press: San Diego, **1992**. (b) J.D. Simon, *Acc. Chem. Res.*, **2000**, *33*, 307.
- 2) N. Kollias, R. M. Sayre, L. Zeise, R. Chedekel, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **1991**, *9*, 135.
- 3) R. Crippa, V. Cristofolleti, N. Romeo, *Biochem. Biophys. Acta.*, **1978**, *538*, 164.
- 4) (a) Y. Liu, V. Kempf, A. Samokhvalov, J. D. Simon, *Pigment Cell Res.*, **2003**, *16*, 608. (b) B. Szpoganicz, S. Gidanian, P. Kong, P. Farmer, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, *89*, 45.
- 5) (a) M. D. Rubianes, G. A. Rivas, *Anal. Lett.*, **2003**, *36*, 329. (b) S. Gidanian, P. J. Farmer, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, *89*, 54. (c) K.B. Stark, J. M. Gallas, G. W. Zajac, J. T. Golab, S. Gidanian, T. McIntire, P. J. Farmer, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, *109*, 1970. (d) S. Subianto, G. Will, P. Meredith, *Polymer*, **2005**, *46*, 11505.
- 6) S. Ito, *Biochem. Biophys. Acta*, **1986**, *883*, 155.
- 7) S. Ito, *Pigm. Cell Res.*, **2003**, *16*, 230.
- 8) A. Samokhvalov, Y. Liu, J.D. Simon, *Photochemistry and Photobiology*, **2004**, *80*, 84.
- 9) (a) Y. Liu, J. D. Simon, *Pigm. Cell Res.*, **2005**, *18*, 42. (b) P. Meredith, T. Sarna, *Pigment Cell Res.*, **2006**, *19*, 572. (c) M. d'Ischia, A. Napolitano, A. Pezzela, P. Meredith, T. Sarna, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 3914.
- 10) L. Zecca, M. Gallorini, V. Schunemann, A.X. Trautwein, M. Gerlach, P. Riederer, P. Vezzoni, D. Tampellini, *J. Neurochem.*, **2001**, *76*, 1766.
- 11) (a) S. Aime, B. Bergamasco, D. Biglino, G. Digilio, M. Fasano, E. Giamello, L. Lopiano, *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, *1361*, 49. (b) A. J. Kropf, B. A. Bunker, M. Eisner, S. C. Moss, L. Zecca, A. Stroppolo, P. R. Crippa, *Biophys. J.*, **1998**, *75*, 3135. (c) F. Bolzoni, S. Giraudo, L. Lopiano, B. Bergamasco, M. Fasano, P. R. Crippa, *Biochim. Biophys. Acta*, **2002**, *1586*, 210. (d) L. Zecca, D. Tampellini, M. Gerlach, P. Riederer, R. G. Fariello, D. Sulzer, *J. Clin. Pathol.*, **2001**, *54*, 414.



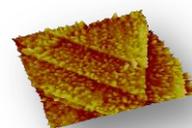
- 12) (a) B. Pilas, T. Sarna, B. Kalyanaraman, H. M. Swartz, *Free Radical Biol. Med.*, **1988**, *4*, 285. (b) T. Shima, T. Sarna, H. M. Swartz, A. Stroppolo, R. Gerbasi, L. Zecca, *Free Radical Biol. Med.*, **1997**, *23*, 110.
- 13) Y. Liu, L. Hong, V. R. Kempf, K. Wakamatsu, S. Ito and J. D. Simon, *Pigm. Cell Res.*, **2004**, *17*, 262.
- 14) (a) W. Korytowski, T. Sarna, *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 12 410. (b) M. Gerlach, K. L. Double, D. Ben-Shachar, L. Zecca, M. B. Youdim, P. Riederer, *Neurotoxic. Res.*, **2003**, *5*, 35. (c) S. Husain, S. M. Hadi, *Mutat. Res.*, **1998**, *397*, 161. (d) P. J. Farmer, S. Gidanian, B. Shahandeh, A. J. Di Bilio, N. Tohidian, F. L. Meyskens, Jr., *Pigment Cell Res.*, **2003**, *16*, 273.
- 15) (a) A. Deisseroth, A. L. Dounce, *Physiol. Rev.*, **1970**, *50*, 319. (b) E. Cadenas, *Biofactors*, **1997**, *6*, 399.
- 16) R. S. Sohal. *Mech. Ageing. Dev.*, **1991**, *60*, 198.
- 17) A.B. Anderson, R.A. Sidik, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, 5031.
- 18) S. Yoshimoto, A. Tada, K. Itaya, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, *108*, 5171.
- 19) (a) Bilinska, U. Kolczynska, T. Wilczok, *Studia Biophysica*, **1987**, *122*, 157. (b) M. Carbucicchio, P. R. Crippa, *Physiol. Chem. Phys.*, **1982**, *14*, 111.
- 20) McGinness, J. E. Electrical Energy Storage. U.S. Patent 4,366,216, **1982**.
- 21) (a) G.G. Wallace, P.C. Dastoor, D.L. Officer, O.T. Chee, *Chem. Innovation*, **2000**, *30*, 14. (b) R.H. Friend, R.W. Gymer, A.B. Holmes, J.H. Burroughes, R.N. Marks, C. Taliani, D.D.C. Bradley, D.A. Dos Santos, J.L. Bredas, M. Logdlund, W.R. Salanek, *Nature* **1999**, *397*, 121. (c) M.A. Rosei, L. Mosca, F. Galluzzi, *Synth. Met.*, **1996**, *76*, 331.
- 22) P. Díaz, Y. Gimeno, P. Carro, S. González, P.L. Schilardi, G. Benítez, R. C. Salvarezza, A. Hernández Creus, *Langmuir*, **2005**, *21*, 5924.
- 23) (a) J.P. Bothma, J. de Boor, U. Divakar, P.E. Schwenn, P. Meredith, *Adv. Mater.*, **2008**, *20*, 3539. (b) M. Ambrico, P.F. Ambrico, A. Cardone, T. Ligonzo, S.R. Cicco, R. di Mundo, V. Augelli, G.M. Farinola, *Adv. Mater.*, **2011**, *23*, 3332.
- 24) (a) C.M. Clancy, J.B. Nofsinger, R. Kyle, J.D. Simon, *J. Phys. Chem. B*,



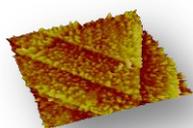
- 2000**, 104, 7871. (b) Y. H'chev, J.D. Simon, *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107, 7162.
- 25) M.I.N. da Silva, S.N. Dezidério, J.C. Gonzalez, C.F.O. Graeff, M.A. Cotta, *J. Appl. Phys.*, **2004**, 96, 5803.
- 26) J. Di, S. Bi, *Anal. Sci.*, **2004**, 20, 629.
- 27) T. Kakiuchi, H. Usui, D. Hobara, M. Yamamoto, *Langmuir*, **2002**, 18, 5231.
- 28) G. Andreasen, M.E. Vela, R.C. Salvarezza, A.J. Arvia, *J. Electroanal. Chem.*, **1999**, 467, 230.
- 29) K.C. Littrell, J.M. Gallas, G.W. Zajac, P. Thiyagarajan, *Photochem. Photobiol.*, **2003**, 77, 115.
- 30) (a) G.W. Zajac, J.M. Gallas, J. Cheng, M. Eisner, S.C. Moss, A.E. Alvarado-Swaisgood, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1994**, 1199, 271. (b) J.M. Gallas, G.W. Zajac, T. Sarna, P.L. Stotter, *Pigm. Cell Res.*, **2000**, 13, 99.
- 31) M.B. Clark, J.A. Gardella Jr., J.M. Schultz, D.G. Patil, L. Salvati Jr., *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 949.
- 32) R. Weissmann, K. Muller, *Surf. Sci. Reports*, **1981**, 1, 251.
- 33) Y. S. Kang, S. Risburd, J. F. Rabolt, P. Stroeve. *Chem. Mater.*, **1996**, 8, 2209.
- 34) P. J. Durham, *X-ray Absortion: Principies, Applications, Techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES*, Ed: D.C. Koninsberger, R. Prins, Wiley Interscience, New York, **1988**.
- 35) J. M. Ramallo-López, E. J. Lede, F. G. Requejo, J. A. Rodríguez, J-Y. Kim, R. Rosas-Salas, J. M. Domínguez, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, 20005.
- 36) A. L. Roe, D. J. Schneider, R. J. Mayer, J. W. Pyrz, J. Wydom, L. Que, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 1676.
- 37) (a) Y. Martin, C.C. Williams, H.K. Wickramasinghe, *J. Appl. Phys.*, **1987**, 61, 4723. (b) J.J. Sáenz, N. García, P. Grütter, E. Meyer, H. Heinzelmann, R. Wiesendanger, L. Rosenthaler, H.R. Hidber, H.J. Güntherodt, *J. Appl. Phys.*, **1987**, 62, 4293.
- 38) A. Asenjo, D. García, J.M. García, C. Prados, M. Vázquez, *Phys. Rev. B.*, **2000**, 62, 6538.



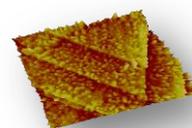
- 39) N. Domingo, E. Bellido, D. Ruiz-Molina, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 258.
- 40) M. Miyasaka, Y. Saito, H. Nishide, *Adv. Funct. Mater.*, **2003**, *13*, 113.
- 41) (a) M. Gerlach, A.X. Trautwein, L. Zecca, M.B. Youdim, P. Riederer. *J. Neurochem.*, **1995**, *65*, 923. (b) J. Galazca-Friedman, E.R. Bauminger, A. Friedman, M. Barcikowska, D. Heckel, I. Nowik. *Mov. Disord.*, **1996**, *11*, 8.
- 42) (a) P.M. Harrison, P. Arosio. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1996**, *1275*, 161. (b) S. Aime, B. Bergamasco, D. Biglino, G. Biglino, M. Fasano, E. Giamello, L. Lopiano. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1997**, *1361*, 49.
- 43) F. Bolzoni, S. Giraud, L. Lopiano, B. Bergamasco, M. Fasano, P.R. Crippa, *Biochem. Biophys. Acta.*, **2002**, *1586*, 210.
- 44) S. Sun, S. Anders, H.F. Hamann, J.U. Thiele, J.E.E. Baglin, T. Thomson, E.E. Fullerton, C.B. Murray, B.D. Terris, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 2884.
- 45) M. Rasa, B.W.M Kuipers, A. Philipse, *J. Colloid Interface Sci.*, **2002**, *250*, 303.
- 46) S. Schreiber, M. Savla, D.V. Pelekhov, D.F. Iscru, C. Selcu, P.C. Hammel, G. Agarwal, *Small*, **2008**, *4*, 270.
- 47) S. Singamaneni, V.N. Bliznyuk, C. Binek, E.Y. Tsybal, *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, 16819.
- 48) C.S. Neves, P. Quaresma, P.V. Baptista, P.A. Carvalho, J.P. Araujo, E. Pereira, P. Eaton, *Nanotechnology*, **2010**, *21*, 305706.
- 49) V.F. Puentes, P. Gorostiza, D.M. Aruguete, N.G. Bastus, A.P. Alivisatos, *Nat. Mater.*, **2004**, *3*, 263.
- 50) (a) F. Dumas-Bouchiat, H.S. Nagaraja, F. Rossignol, C. Champeaux, A. Catherinot, *Applied Surface Science*, **2005**, *247*, 76. (b) M. Hehn, K. Chefiri-Khodjaoui, K. Ounadjela, J.P. Bucher, J. Arabski, *J. Magn. Magn. Mater.*, **1997**, *165*, 520. (c) M. Hehn, S. Padovani, K. Ounadjela, J.P. Bucher, *Phys. Rev.*, **1996**, *54*, 3428.
- 51) C.L. Serpentine, C. Gauchet, D. Montauzon, M. Comtat, J. Ginestar, N. Paillous, *Electrochim. Acta*, **2000**, *45*, 1663.
- 52) K. J. Mc Kenzie, F. Marken, *Pure Appl. Chem.*, **2001**, *73*, 1885.



- 53) G. Senanayake, G. K. Das, *Hydrometallurgy*, **2004**, 72, 59.
- 54) A. Hugot-Le Goff, J. Flis, N. Boucherit, S. Joiret, J. Wilinski, *J. Electrochem. Soc.*, **1990**, 9, 2684.
- 55) (a) J. Dunnwald, A. Otto, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **1984**, 319, 738. (b) I. Diez-Perez, F. Sanz, P. Gorostiza, *Electrochem. Commun.*, **2006**, 8, 1595. (c) I. Diez-Perez, C. Vericat, F. Sanz, P. Gorostiza, *Electrochem. Commun.*, **2006**, 8, 627.
- 56) (a) R.S.S. Guzman, J.R. Vilche, A.J. Arvia, *Electrochim. Acta*, **1979**, 24, 395. (b) D.D. Macdonald, B. Roberts, *Electrochim. Acta*, **1978**, 23, 781.
- 57) M. Lucero, G. Ramirez, A. Riquelme, I. Azocar, M. Isaacs, F. Armijo, J.E. Förster, E. Trollund, M.J. Aguirre, D. Lexa, *J. Mol. Catal. A*, **2004**, 221, 71.
- 58) S.A. Trammell, D.A. Lowy, D.S. Seferos, M. Moore, G.C. Bazan, N. Lebedev, *J. Electroanal. Chem.*, **2007**, 606, 33.
- 59) A. Salimi, H. Eshghi, H. Sharghi, S.M. Golabi, M. Shamsipur, *Electroanalysis*, **1999**, 11, 114.
- 60) G. Jürmann, D.J. Schiffrin, K. Tammeveski, *Electrochim. Acta*, **2007**, 53, 390.
- 61) F. Cataldo, *Polym. Int.*, **1998**, 46, 263.
- 62) (a) S.-M. Chen, C.-C. Tseng, *Electrochim. Acta*, **2004**, 49, 1903. (b) S.-M. Chen, C.-C. Tseng, *Electrochim. Acta*, **2005**, 575, 147.
- 63) L. Hong, J.D. Simon, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 7938.
- 64) J. Zhang, M. Oyama, *Electrochim. Acta*, **2004**, 50, 85.
- 65) (a) K.J. McKenzie, F. Marken, M. Hyde, R.G. Compton, *New J. Chem.*, **2002**, 26, 625. (b) M.V.A. Martins, C. Bonfim, W.C. da Silva, F.N. Crespilho, *Electrochem. Commun.*, **2010**, 10, 1509.
- 66) (a) Md. Rezwan Miah, T. Ohsaka, *Electrochim. Acta*, **2007**, 52, 6378. (b) A. Kongkanand, S. Kuwabata, *Electrochem. Commun.*, **2003**, 5, 133.
- 67) E.R. Vago, E.J. Calvo, *J. Electroanal. Chem.*, **1992**, 339, 41.
- 68) M.S. El-Deab, T. Okajima, T. Ohsaka, *J. Electrochem. Soc.*, **2003**, 150, A851.
- 69) A. Samokhvalov, L. Hong, Y. Liu, J. Garguilo, R.J. Nemanich, G.S. Edwards, J.D. Simon, *Photochem. Photobiol.*, **2005**, 81, 145.



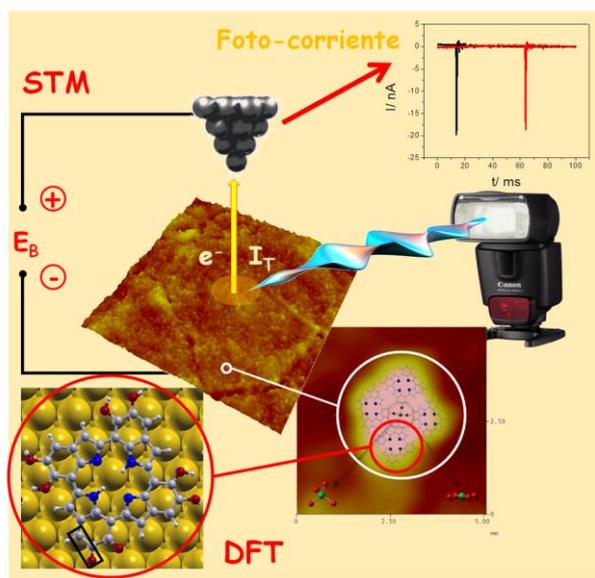
- 70) (a) I. Flis-Kabulska, J. Flis, T. Zackroczymski, *Electrochim. Acta*, **2007**, 7158. (b) I. Flis-Kabulska, J. Flis, T. Zackroczymski, *Electrochim. Acta*, **2008**, 3094.
- 71) S. Trasatti, *Modern Chlor-Alkali Technology*, Ed: T.C. Wellington, SCI-Elsevier, **1992**, 281.
- 72) I. Bhugun, D. Lexa, J.M. Saveant, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 3982.
- 73) (a) M. Palma, J. Levin, O. Debever, Y. Geerts, M. Lehmann, P. Samorí, *Soft Matter*, **2008**, 4, 303. (b) B. Schmaltz, T. Weil, Klaus Müllen, *Adv. Mater.*, **2009**, 21, 1067. (c) D. García Velázquez, A. González Orive, A. Hernández Creus, R. Luque, A. Gutiérrez Ravelo, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9, 6524.
- 74) A. Pezzella, A. Napolitano, M. d'Ischia, G. Prota, R. Seraglia, P. Traldi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1997**, 11, 368.
- 75) A. Pezzella, O. Crescenzi, A. Natangelo, L. Panzella, A. Napolitano, S. Navaratnam, R. Edge, E.J. Land, V. Barone, M. d'Ischia, *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 1595.
- 76) A. González Orive, P. Dip, Y. Gimeno, P. Díaz, P. Carro, A. Hernández Creus, G. Benítez, P.L. Schilardi, L. Andrini, F. Requejo, R.C. Salvarezza, *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 473.
- 77) S. Yu, G.M. Chow, *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 2781.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.2. ADSORCIÓN Y CONDUCTANCIA MOLECULAR DE PELÍCULAS DE MELANINA SOBRE Au

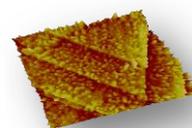
Una vez preparados y caracterizados por diferentes técnicas los electrodepósitos de melanina sobre Au(111), el objetivo de este segundo capítulo se centra en el estudio de la adsorción y de las propiedades electrónicas de los oligómeros de melanina incorporados sobre este sustrato. Se demostrará que la mínima unidad estructural de la melanina, detectada bajo diferentes condiciones de adsorción, es consistente con un modelo de protomoléculas de melanina basado en tetrámeros



macrocíclicos formados por cuatro unidades monoméricas. Se llevará a cabo una aproximación tanto teórica como experimental a los efectos de la polimerización en las propiedades electrónicas de estos depósitos de melanina. Además, se probará que el espesor de estas películas continuas y ultradelgadas del biopolímero determina las características conductoras exhibidas por las mismas. Por último, se procederá a la descripción del método experimental desarrollado y de los resultados de fotocorriente inducidos tras la iluminación de películas de melanina con un haz de luz blanca.

IV.2.1. Antecedentes

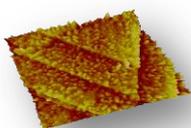
A pesar de la notable importancia de las melaninas desde un punto de vista médico y biológico que ha motivado décadas de investigación por parte de la comunidad científica, tanto la estructura como la composición y modos de agregación en fase condensada de esta clase de pigmentos están aún bastante lejos de ser satisfactoriamente esclarecidos.¹ En fase condensada la eumelanina es descrita como un sistema intrínsecamente desordenado aunque



con un orden estructural parcial debido al ensamblado de unidades de oligómeros (protomoléculas) en una dirección perpendicular al plano molecular.² En una primera aproximación se acepta que las eumelaninas están constituidas por macromoléculas de 5,6-dihidroxiindol (DHI) y 5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA) y sus distintas formas oxidadas.³ Sin embargo, aún no ha sido posible establecer de forma unívoca la forma en la que los monómeros individuales se unen para formar las protomoléculas de melanina (protomelanina). De hecho, la elucidación de este mecanismo pasa por ser el punto de partida para la construcción de nuevos modelos que permitan establecer relaciones consistentes entre la estructura, propiedades y funciones desarrolladas por las melaninas. Por tanto, de acuerdo a lo expuesto, la estructura química de las protomelaninas tiene importantes consecuencias en sus propiedades optoelectrónicas.

Las melaninas ofrecen propiedades fisicoquímicas muy interesantes entre las que destacan su fotoactividad, su respuesta electroquímica y su comportamiento como semiconductor eléctrico amorfo.^{4,5} La combinación de las propiedades ópticas y electrónicas en las melaninas ha atraído la atención de la comunidad científica en aras de su potencial aplicación como sustratos para el diseño de células solares orgánicas y otros dispositivos electrónicos novedosos.⁶ En particular, la eumelanina sintética utilizada en nuestras experiencias es química y fotoquímicamente muy estable.⁶

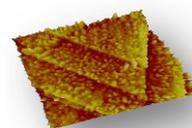
Recientemente se ha demostrado mediante cálculos *ab initio* que las distancias entre el orbital molecular ocupado de mayor energía (*HOMO*) y el orbital molecular desocupado de menor energía (*LUMO*), gap, de distintos derivados rédox de DHI son apreciablemente diferentes.⁷ También se ha demostrado que varias formas rédox de DHI y DHICA (hidroquinona, HQ, quinona-imina, QI, e indol-quinona, IQ) son estables termodinámicamente.⁸ Por tanto, se puede concluir que se puede formar una amplia variedad de oligómeros, químicamente distintos, cada uno con una diferente distancia HOMO-LUMO. Una vez más, establecer estas unidades estructurales básicas permitiría definir modelos consistentes para el transporte de carga en materiales biorgánicos tan complejos como las melaninas. Así, si bien se ha



descrito comúnmente a las melaninas como semiconductores amorfos,⁹ no se ha podido establecer si la conductividad observada es de naturaleza electrónica.⁶ De hecho, las melaninas son bien conocidas por sus gran capacidad de absorción óptica que se extiende desde el ultravioleta (*UV*) al infrarrojo cercano (*NIR*). Estas propiedades se han interpretado precisamente como una evidencia de su carácter como semiconductor orgánico amorfo.¹⁰ Además en su función como fotoprotector, las melaninas absorben radiación visible y *UV* y disipan esta energía tan potencialmente dañina en forma de fundamentalmente calor.¹¹ Es precisamente la combinación de estas propiedades ópticas y electrónicas lo que ha atraído la atención de la comunidad científica sobre estas macromoléculas biológicas. La preparación de la melanina sintética, comúnmente aceptada como representativa de las eumelaninas naturales,¹² implica la oxidación de la dihidroxifenilalanina (*DOPA*). El polvo negro resultante es insoluble en la mayor parte de los disolventes con lo que no resulta fácil de tratar por los métodos convencionales de procesado de polímeros. Por tanto, a la vista de lo expuesto, la preparación de películas de melanina con una estructura definida sobre un sustrato conductor es determinante para poder abordar con garantías el estudio de la conductancia eléctrica de este tipo de polímeros.

En los últimos tiempos varios son los grupos de investigación que han sido capaces de producir películas de eumelanina sintética¹³ y también de derivados de melanina solubles en disolventes orgánicos.¹⁴ Incluso se han descrito determinados dispositivos que incorporan eumelanina sintética y que exhiben propiedades optoelectrónicas exaltadas.¹⁵

En este sentido, nosotros hemos demostrado recientemente que es posible preparar por medios electroquímicos películas ultradelgadas y nanoestructuradas de melanina sobre *Au(111)*.¹⁶ Tales películas son interesantes como modelo biomimético para estudiar la etapa inicial de adsorción de las primeras moléculas sobre superficies bien ordenadas, su conductancia y sus propiedades fotoeléctricas.

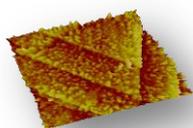


La habilidad para determinar *in-situ* propiedades optoelectrónicas de determinados materiales semiconductores ha llegado a ser especialmente importante a medida que las dimensiones de los dispositivos de estos materiales ha ido disminuyendo y el desarrollo de microsistemas, cada vez más complejos, se ha visto incrementado con el tiempo. Existe, por tanto, un especial interés en desarrollar métodos que permitan, por ejemplo, obtener espectros UV/ visible o IR/ Raman de determinadas moléculas y de sus agregados y, simultáneamente, llevar a cabo una caracterización de las mismas por microscopías de barrido de sonda.

En este sentido, la microscopía de efecto túnel, STM, podría ser usada para registrar, en imágenes de alta resolución, la fotorrespuesta local producida tras irradiación. En los últimos tiempos se han realizado importantes estudios sobre el efecto de la irradiación del conjunto punta muestra¹⁷ así como intentos de observar centros de reacción en las superficies de materiales semiconductores.¹⁸ Así, ha sido posible investigar el efecto que tiene sobre la corriente túnel la excitación de determinados adsorbatos moleculares con radiación UV/ visible.¹⁹

En esta línea de razonamiento se ha hecho uso recientemente del STM para registrar fotorepuestas localizadas sobre superficies metálicas, tras irradiar Au(111) y clústeres de Ag sobre Au(111) con luz de 830 nm.²⁰ Por tanto, de acuerdo a lo comentado, tanto el STM como la espectroscopía de efecto túnel (STS) pasan por ser herramientas muy poderosas no sólo para la obtención de imágenes sino también para la medida local de las propiedades electrónicas de estas películas de melanina sintética bajo irradiación con luz blanca.

Paralelamente a las experiencias descritas, se debe añadir que se han llevado a cabo toda una serie de estudios teóricos que han permitido caracterizar profundamente y que además han proporcionado información detallada sobre los monómeros de DHI, DHICA, sobre sus quinonas y sus oligómeros más probables.^{8,21} En este sentido se ha de destacar que recientemente se ha propuesto, apoyándose en estudios basados en la Teoría

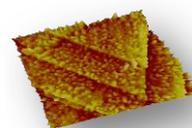


del Funcional de la Densidad (*DFT*), un modelo estructural de oligómero consistente en tetrámeros constituidos por cuatro monómeros dispuestos de tal forma que alojan en su interior un anillo tipo porfirina.²² Se estima que tales tetrámeros macrocíclicos constituyen las protomoléculas de melanina que por asociación definen el biopolímero. Tal afirmación se justifica en el hecho de que reproducen exactamente muchas propiedades importantes de las melaninas como serían los datos de rayos-X, su habilidad para capturar y liberar iones metálicos en ambientes celulares, las características fundamentales de sus espectros y sus dimensiones coinciden, además, con las detectadas para la protomelanina.^{22a,23} Desde este punto de vista parece razonable llevar a cabo un estudio por *DFT* que permitiera obtener información acerca de la estructura, la energía de adsorción y de la estructura electrónica de las protomoléculas de melanina adsorbidas sobre Au(111).

IV.2.2. Caracterización de la adsorción y conductancia de moléculas de melanina sobre Au(111)

En el presente capítulo se describe un estudio que combina resultados tanto experimentales como teóricos registrados a partir de películas de melanina sintética preparadas bien por inmersión o bien depositadas electroquímicamente sobre Au(111).¹⁶ Tales resultados han sido obtenidos principalmente por medio de medidas de STM y STS.

Con objeto de obtener información relevante sobre la estructura, energía de adsorción y la estructura electrónica de las moléculas de protomelanina adsorbidas sobre el Au(111) se recurrió a cálculos basados en la teoría del funcional de la densidad, *DFT*. Los modelos químicos utilizados en el presente estudio son dos tetrámeros macrocíclicos propuestos comúnmente en la bibliografía como algunos de los oligómeros constituyentes fundamentales de las melaninas.²² En la Figura IV.2.1 se muestran los monómeros fundamentales de DHI, fig. IV.2.1a, y DHICA, fig. IV.2.1b, que exhiben además distintos estados de oxidación: indol-quinona, semiquinona e hidroquinona. Uno de los tetrámeros, IHHH, fig. IV.2.1c, está constituido por una unidad indol-quinona, I, y por tres unidades hidroquinona, H. El otro, IMIM, fig. IV.2.1d, está formado



por dos unidades indol-quinona, I, y por dos semiquinona, M.

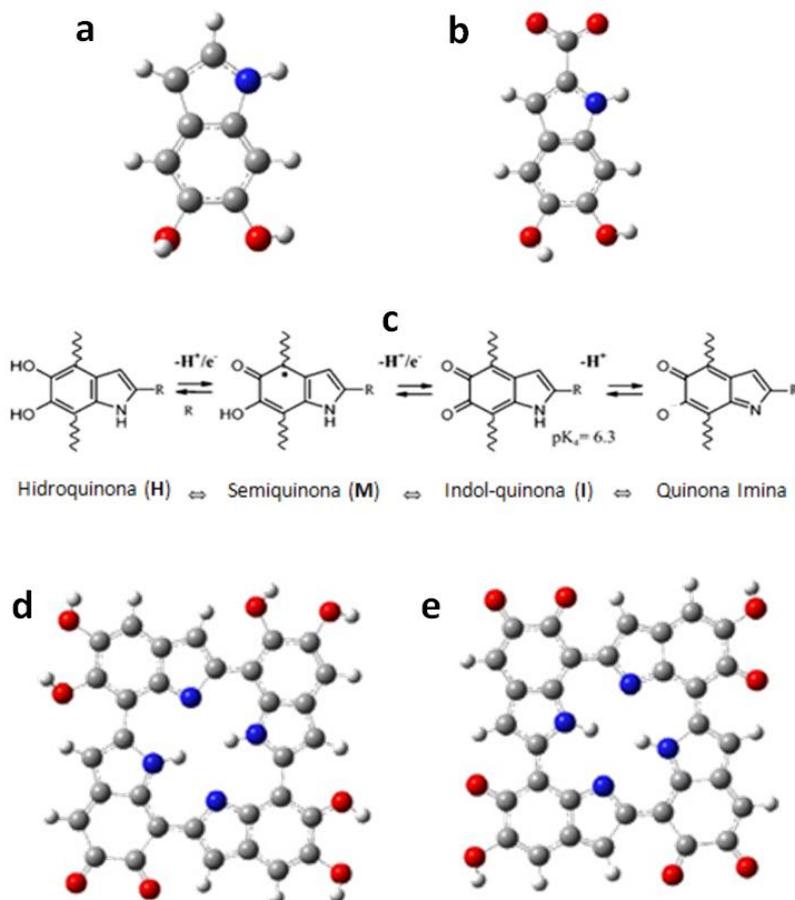
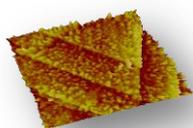


Figura IV.2.1. DHI (a). DHICA (b). Esquema que muestra los diferentes estados de oxidación de DHI y DHICA (c). Tetrámero IHHH (d) y tetrámero IMIM (e). N (azul), C (gris), O (rojo) y H (blanco).

IV.2.2.1 Caracterización por STM de películas de melanina sobre Au(111)

En primer lugar se decidió estudiar las etapas iniciales de adsorción con objeto de detectar las unidades de melanina de menor tamaño presentes en la superficie de Au(111). A tal fin se adsorbió melanina a partir de una disolución alcalina de eumelanina sintética durante $t_a = 10$ minutos a potencial de circuito abierto, OCP. En la Figura IV.2.2 se han representado las imágenes STM de la superficie del Au(111) tras la inmersión en la solución de melanina que mostraron la presencia en la misma de pequeñas partículas de entre 1,6-3,2 nm de ancho y de aproximadamente 0,3 nm de altura, valor éste similar a la separación entre capas encontrada en el grafito, fig. IV.2.2a.



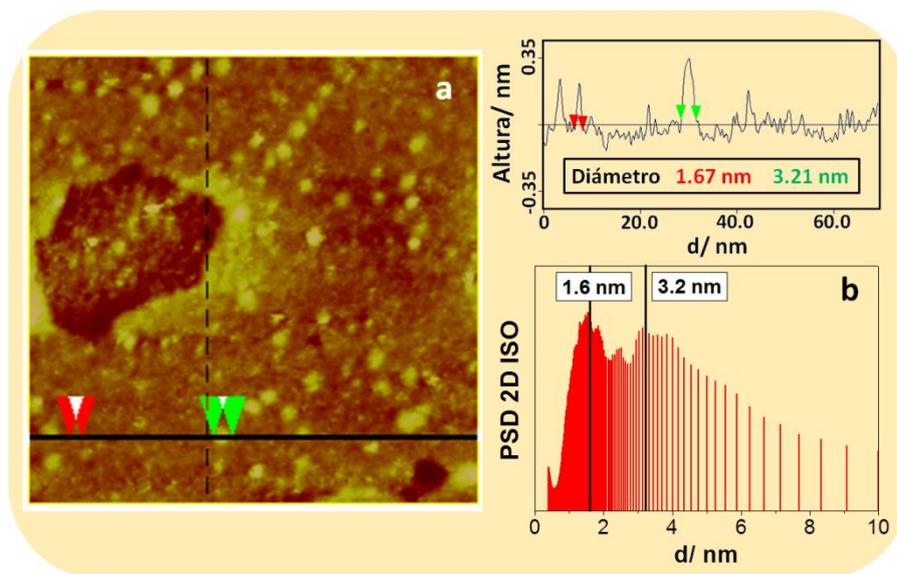
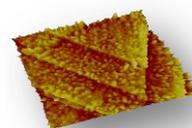


Figura IV.2.2. Imagen STM de $70 \times 70 \text{ nm}^2$ de depósito de melanina de $t_a = 10$ minutos a OCP sobre Au(111), (a). La línea negra indica el lugar donde se ha tomado la sección transversal, panel superior derecha. (b) Análisis 2D de frecuencias, PSD, tomada en la imagen (a).

La presencia de los elementos estructurales descritos presentes en la superficie del Au(111) se pone en evidencia en el análisis 2D de frecuencias (PSD) de las imágenes obtenidas, fig. IV.2.2b, que muestra picos destacados en el rango comprendido entre 1,6 y 3,2 nm. Estos resultados son consistentes con la existencia de una protomolécula de melanina y de pequeños oligómeros organizados en una estructura tipo grafito.

Las unidades de menor tamaño, de 1,6 nm, exhiben unas dimensiones próximas a las que exhiben los tetrámeros descritos en la fig. IV.2.1d-e (de 1,5 nm). Por su parte, las partículas de 3,2 nm podrían corresponder a pequeños oligómeros constituidos a su vez por cuatro de los tetrámeros anteriores, tal y como se muestra en la Figura IV.2.3 superimpreso sobre una de estas partículas.



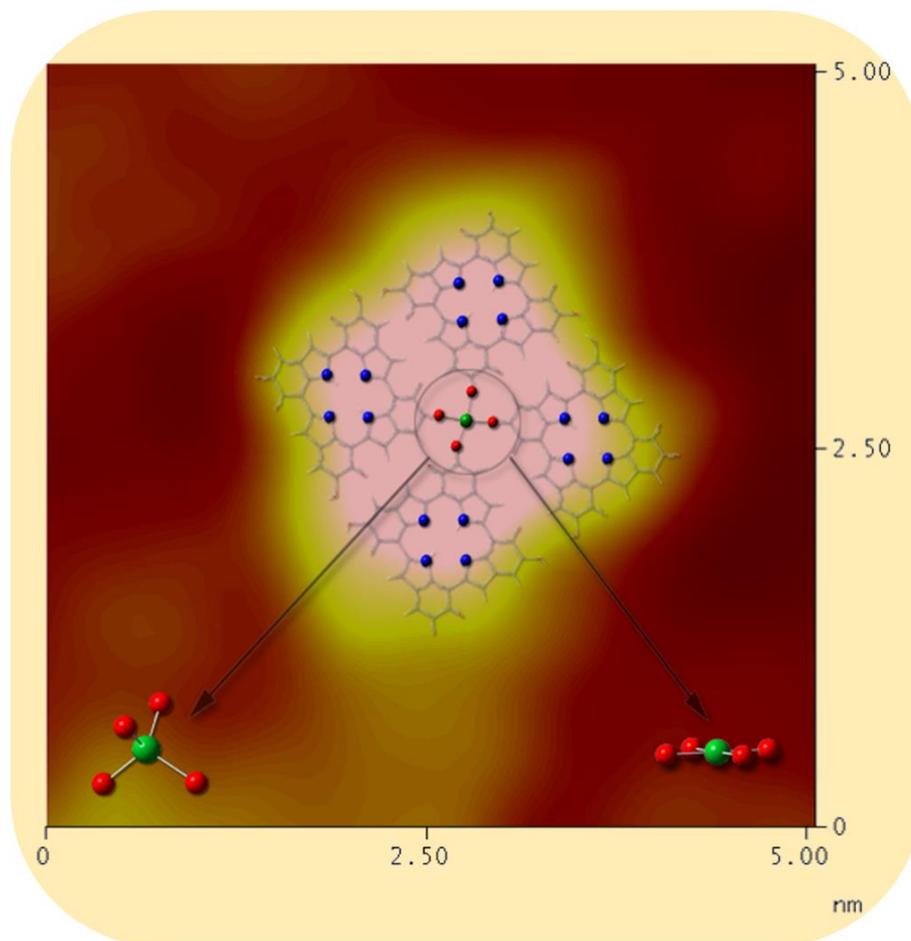
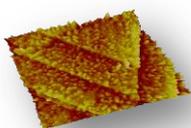


Figura IV.2.3. Imagen STM de $5 \times 5 \text{ nm}^2$ de una partícula de 3,2 nm de diámetro obtenida en un depósito de melanina de $t_a = 10$ minutos a OCP sobre Au(111). Sobre la partícula se ha representado un esquema de cuatro tetrámeros formando un oligómero. En la figura también se han indicado los posibles estados de coordinación del Fe: Fe tetraédrico, esquina inferior izquierda, y Fe octaédrico, esquina inferior derecha. Los átomos de N se han representado en color azul, los de O en color rojo, Fe en verde, C en gris e H en blanco. Las imágenes STM se obtuvieron con un potencial bias de 1,0 V y para corriente túnel de 0,35 nA.

No obstante, hay que tener en cuenta que las películas preparadas en condiciones de OCP son, en general, discontinuas dejando amplias áreas del sustrato sin cubrir tal y como se puede apreciar en la fig. IV.2.2a. Con objeto de incrementar la calidad de la película, se ha adsorbido melanina a partir de soluciones alcalinas que la contienen por polarización catódica a -1,0 V del sustrato de Au(111) durante $t_a = 10$ minutos.¹⁶ La imagen STM representada en la Figura IV.2.4 muestra que, en este caso, la superficie del Au(111) aparece homogéneamente cubierta por los oligómeros de 3,2 nm mostrados anteriormente. La sección transversal, fig. IV.2.4a, y la PSD de la imagen, fig.



IV.2.4b, ponen de manifiesto este hecho.

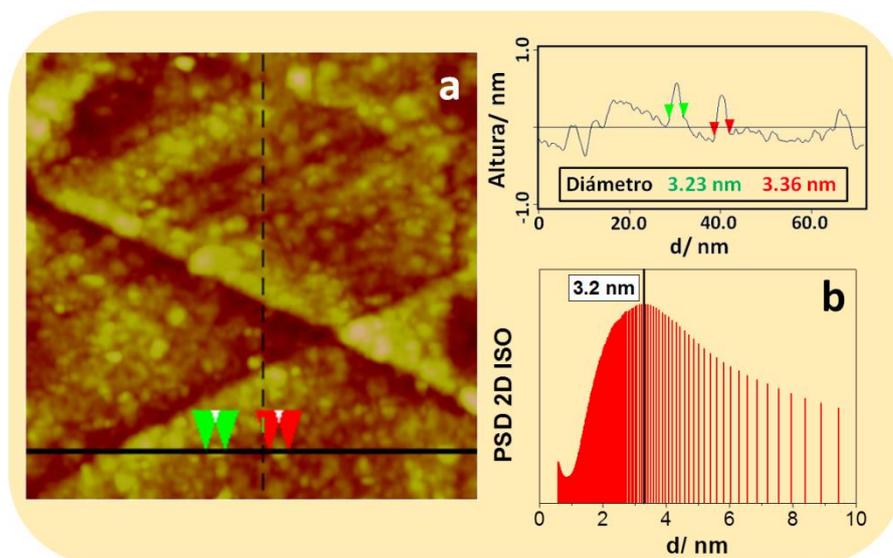
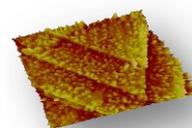


Figura IV.2.4. Imagen STM de $70 \times 70 \text{ nm}^2$ de la superficie del Au(111) tras inmersión durante 10 minutos en solución $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de melanina sintética en NaOH $0,1 \text{ M}$ a $-1,0 \text{ V}$ (a). La línea negra indica el lugar donde se ha tomado la sección transversal, panel superior derecha. (b) Análisis 2D de frecuencias, PSD, tomada en la imagen (a). Las imágenes STM se obtuvieron con un potencial bias de $1,0 \text{ V}$ y para corriente túnel de $0,35 \text{ nA}$.

El aumento en el tiempo de adsorción, tal y como se mostró en el capítulo anterior, da como resultado la formación de películas más compactas formadas por agregados de mayor tamaño. Así, en la Figura IV.2.5 se muestra la imagen STM de un electrodeposito de melanina de $t_a = 45$ minutos. Tanto la propia imagen, fig. IV.2.5a, como el análisis realizado por PSD, fig. IV.2.5b, muestran la presencia en la superficie del sustrato de gránulos de melanina cuyas dimensiones varían entre 3 y 8 nm, con un tamaño promedio de partícula de 5,8 nm. Sin embargo la influencia de la superficie del sustrato de Au(111) es aún perceptible a través de las características formas triangulares que ofrecen las terrazas y que todavía están presentes en las imágenes. Este hecho implicaría que las películas de melanina involucrarían a sólo unas cuantas monocapas. De hecho, asumiendo que la altura de los agregados, de entre 0,6 y 1 nm, fig. IV.2.5c, constituye una medida representativa del espesor de la película y, de acuerdo a lo expuesto anteriormente, considerando la distancia de 0,33 nm como la separación entre capas de oligómeros de melanina, se puede estimar la existencia de entre 2 y hasta 3 monocapas de oligómeros de



melanina.

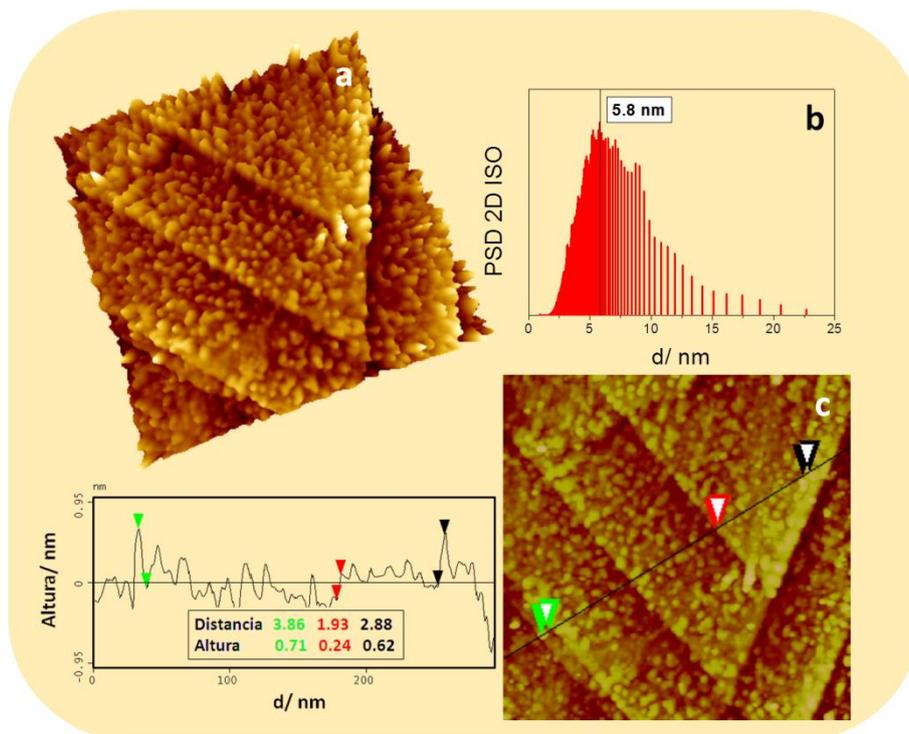
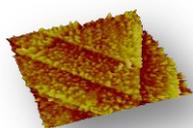


Figura IV.2.5. (a) Imagen STM 3D de $250 \times 250 \text{ nm}^2$ de la superficie del Au(111) tras inmersión durante $t_a = 45$ minutos en solución $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de melanina sintética en NaOH $0,1 \text{ M}$ a $-1,0 \text{ V}$. (b) Análisis 2D de frecuencias, PSD, tomada en la imagen (a). (c) Sección transversal característica que muestra partículas de melanina sobre la superficie del Au(111) con dimensiones comprendidas entre 3 y 8 nm. La línea de color negro indica el lugar donde se ha tomado la sección transversal, panel inferior izquierda. Las flechas en color rojo indican un escalón monoatómico de Au. Las imágenes STM se obtuvieron con un potencial bias de $1,0 \text{ V}$ y para corriente túnel de $0,35 \text{ nA}$.

La estructura de los oligómeros de melanina que se ha mostrado en la fig. IV.2.3 pone de manifiesto la incorporación de cationes metálicos en los tetrámeros, Fe en el caso descrito, propiedad ésta de gran relevancia en las melaninas naturales. De hecho, cada tetrámero, fig. IV.2.1d-e, exhibe sus átomos de oxígeno en la periferia de la molécula mientras que deja sus átomos de N orientados hacia el centro definiendo así un anillo tipo porfirina. Por tanto existen dos posibles sitios para la coordinación de cationes metálicos: el primero creado por los cuatro átomos de oxígeno de cuatro tetrámeros adyacentes, como se ha descrito en la fig. IV.2.3, y el segundo correspondería



a los cuatro átomos de N ubicados en el centro de cada anillo porfirínico.

En este sentido hay que decir que los espectros XPS, obtenidos para películas de melanina de $t_a = 120$ minutos, de hecho indican que el O representa el ambiente preferido para los iones Fe. Tales espectros se muestran en la Figura IV.2.6:

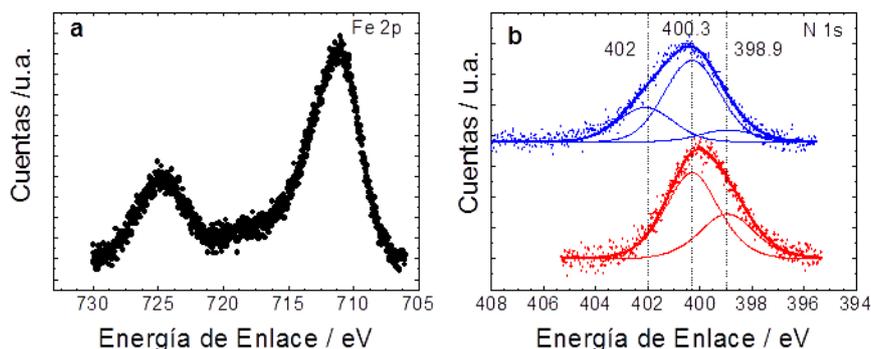
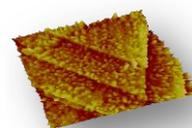


Figura IV.2.6. Espectros XPS: (a) señal Fe 2p para películas de melanina de 120 minutos sobre Au(111) en color negro, (b) señal de N 1s para melanina en polvo evaporada sobre Au(111) en color azul y para película de melanina sobre Au(111) en color rojo.

Es más, los espectros de N 1s exhiben dos componentes a 399 eV y 400,3 eV. Tales valores no son consistentes con una hipotética coordinación catión metálico-N que mostraría una energía de enlace de 398,4 eV.²⁴ Por tanto, en películas de melanina de una monocapa de espesor el catión metálico debería interactuar con la superficie del Au mientras que para películas formadas por multicapas, el catión estaría ubicado entre capas de oligómeros en los gránulos de melanina.

IV.2.2.2 Estudio teórico de la adsorción de melanina sobre Au(111)

Con objeto de estudiar la adsorción de las protomoléculas de melanina sobre el Au(111) se recurrió a cálculos de DFT basados en modelos periódicos con ondas planas. Se hizo uso de la aproximación del gradiente generalizado (GC) con el pseudopotencial PW91. Las funciones de onda de un electrón fueron expandidas hasta un *cutoff* de 450 eV. Para tener en cuenta las interacciones van der Waals de largo alcance entre las protomoléculas y la superficie del Au(111) se utilizó el método de Grimme a través del código DFT-D2, todo ello



implementado en el programa de cálculo *ab-initio*, VASP 5.2. La superficie metálica fue modelizada con un *slab* de 4 capas de Au más una capa de vacío de 12 Å. Durante los cálculos de adsorción se permitió relajar sin ninguna restricción todas las coordenadas de las protomoléculas, así como las 2 primeras capas de metal. La energía de adsorción del tetrámero se define como:

$$E_{ads} = E^{tetrámero/Au} - E^{Au} - E^{tetrámero}$$

donde $E^{tetrámero/Au}$, E^{Au} y $E^{tetrámero}$ representan la energía total del sistema, la de la superficie limpia y la del tetrámero aislado. Los números negativos de E_{ads} indican que el proceso de adsorción es exotérmico.

Así, en la Figura IV.2.7 se han representado las geometrías optimizadas de los tetrámeros IHHH Y IMIM:

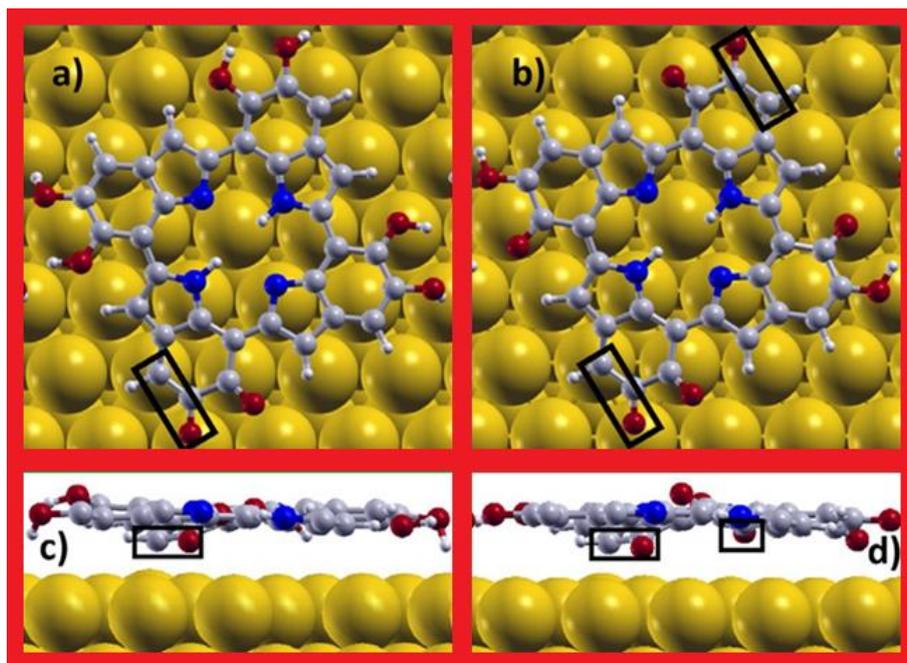
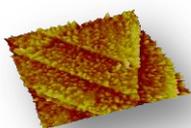


Figura IV.2.7. Vista cenital de las geometrías optimizadas de los tetrámeros IHHH (a) y IMIM (b) adsorbidos sobre la superficie del Au(111). Vista lateral de los tetrámeros adsorbidos (c y d). N (azul), C (gris), O (rojo), H (blanco) y Au (dorado).

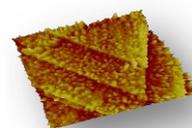
Los adsorbatos se han dispuesto de forma que el plano de la molécula quede paralelo a la superficie metálica, fig. IV.2.4a-b. La elección de esta configuración se justifica de acuerdo a los datos experimentales recabados por



STM donde la altura medida para los oligómeros de melanina estaba en torno a los 0,33 nm, indicando así que se ubican paralelamente a la superficie del Au(111). Esto, desde luego, parece razonable si se tiene en cuenta que los oligómeros aparecen sobre el electrodo a un potencial de -1,0 V, más negativo por tanto que el potencial de carga cero (ZCP) del Au(111).¹⁶ De hecho se ha demostrado que la adsorción de moléculas aromáticas que contienen átomos de N tales como la piridina tiene lugar de forma paralela a la superficie metálica cuando el Au(111) está cargado negativamente mientras que se levantan a potenciales más positivos que el ZCP del sustrato.²⁵ También se ha descrito que las moléculas de piridina y de pirazina, a potenciales negativos, involucran a sus orbitales π en su interacción con la superficie del Au. Sin embargo, a potenciales aplicados positivos, es el par de e^- no enlazante del N el responsable de la interacción con la superficie metálica.²⁶

Las geometrías optimizadas de los tetrámeros IHHH/ IMIM mostradas en las fig. IV.2.7c-d están ligeramente alabeadas con respecto a los oligómeros inicialmente planos, fig. IV.2.1d-e. La altura promedio de los átomos presentes en los tetrámeros es de 0,3 nm lo que estaría completamente de acuerdo con los resultados experimentales obtenidos a partir de las imágenes STM. Se debe advertir que son los oxígenos carboxílicos en C5 y los átomos de carbono C4 de fragmentos de indol-quinona (I) los más próximos a los átomos de Au presentes en la superficie metálica en relación al resto de átomos en ambos tetrámeros. Tales posiciones, a una altura de 0,24 nm, se han destacado con un rectángulo en negro, fig. IV.2.7a-d. Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos en el caso de cálculos de DFT realizados para triptofano sobre nanopartículas de Au donde el enlace se asignó tanto a los grupos carboxílicos como indólicos.²⁷ Ahora bien, también es cierto que, una vez adsorbidos, los tetrámeros pierden cierto grado de conjugación π ya que la estructura intramolecular de los tetrámeros experimenta sutiles cambios entre los que destaca el incremento en la distancia de enlace C=O en el C5 tras la adsorción.

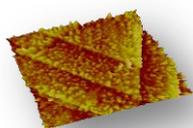
Las energías de adsorción (E_{ad}) calculadas para los tetrámeros, sin tener en cuenta las interacciones de van der Waals (vdW), fueron -1,25 eV para IMIM y -



0,71 eV para IHHH. La magnitud de estos valores indica un proceso de quimisorción relativamente débil. En cualquier caso, queda claro que la simple fisisorción queda descartada toda vez que la distancia más corta registrada entre el átomo de carbono más bajo y la superficie del Au, de 0,24 nm, es más pequeña que la suma del radio de vdW del Au, 0,166 nm, y del C, 0,17 nm. Sin embargo, cuando se incluyen las interacciones de vdW en los cálculos, las energías de adsorción aumentan hasta los -6,4 eV para IMIM y -5,7 eV para IHHH, es decir, aproximadamente -1,5 eV para cada unidad monomérica. Estos resultados indican que las fuerzas de vdW son cruciales para ligar fuertemente los tetrámeros a la superficie del Au(111). En este sentido hay que decir que se han descrito fenómenos similares a los mencionados en el caso de la adsorción de otras especies moleculares aromáticas sobre superficies metálicas cuando se tienen en cuenta las fuerzas de dispersión a la hora de afrontar los cálculos.²⁸

Además se ha llevado a cabo un análisis de carga por el método Bader con el objeto de evaluar la redistribución de la carga tras la desorción de los oligómeros sobre la superficie del Au(111). Las mayores diferencias se han detectado para los átomos más próximos a la superficie metálica, destacados en la fig. IV.2.7a-d, que adquieren de la superficie del Au -0,12 e y -0,21 e para el IHHH y el IMIM, respectivamente. Por su parte el átomo de oxígeno presente en el enlace C=O de los fragmentos de indol-quinona, I, pierde carga, haciéndose +0,33 e más positivo en ambos tetrámeros.

Por último, se debe tener en cuenta que la función trabajo del Au(111) se modifica en sólo 0,1 eV tras la adsorción de los tetrámeros. Este hecho podría interpretarse si se toma en consideración que la reducción del dipolo intrínseco de la superficie metálica es casi perfectamente compensada por el dipolo superficial que surge de la transferencia de carga entre el Au y el LUMO molecular.



IV.2.2.3 Caracterización electrónica de películas de melanina sobre Au(111)

Las propiedades electrónicas de las películas de melanina se han estudiado experimentalmente por STS. En la Figura IV.2.8 se han representado las curvas I/V registradas para el sustrato de Au(111) y para películas de melanina de diferentes tiempos de adsorción. Antes de registrar cada curva I/V , la distancia punta muestra se varió cambiando el potencial bias entre 1 y 3 V manteniendo la corriente túnel a un valor constante de 0,35 nA. Hay que tener en cuenta que si la corriente túnel se mantiene constante, cuanto mayor sea el potencial bias aplicado mayor será la distancia relativa punta-muestra.

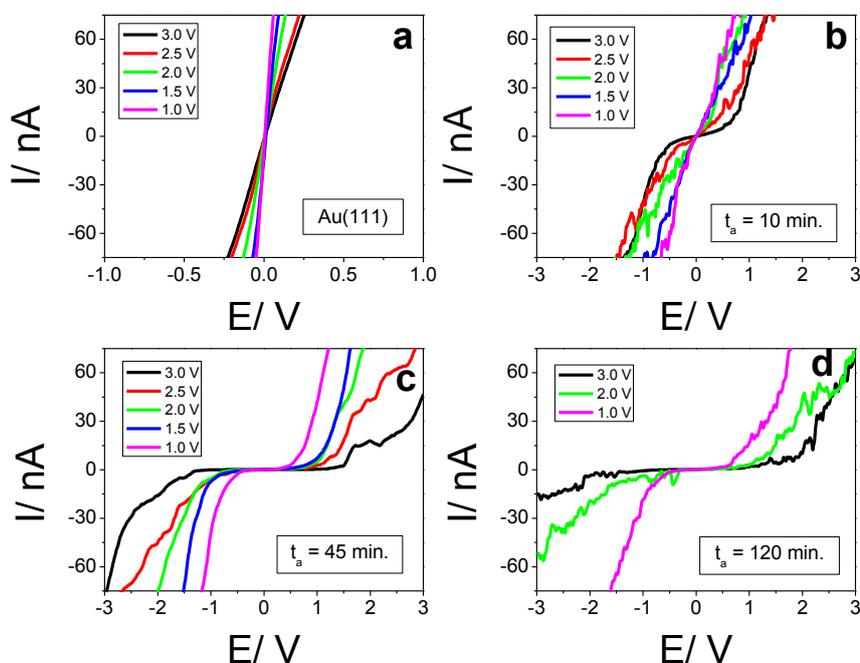
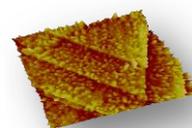


Figura IV.2.8. Curvas I/V registradas a diferentes potenciales bias sobre: (a) Au(111) y películas de melanina sobre Au(111) de (b) $t_a = 10$ minutos, (c) $t_a = 45$ minutos y (d) $t_a = 120$ minutos.

Si se comparan los datos promediados de STS obtenidos para Au(111) y para la película de melanina de $t_a = 10$ minutos (de espesor correspondiente a una monocapa, fig. IV.2.4), fig. IV.2.8a-b, es evidente que el comportamiento exhibido por el electrodeposición se aproxima a las características que muestran los conductores metálicos.²⁹ En contraste a lo anterior, las curvas I/V registradas para películas gruesas de melanina de $t_a = 45$ minutos, fig. IV.2.8c,



y $t_a = 120$ minutos, fig. IV.2.8d, exhiben una respuesta típica de materiales semiconductores.³⁰ De hecho, se aprecia en ambos casos una región de corriente no lineal que aumenta ligeramente con el tiempo de deposición. Esto se puede apreciar mucho más claramente usando la derivada de los espectros STS, dI/dV , que constituye una medida de la densidad local de estados (LDOS) de una superficie.³¹

Los espectros dI/dV promediados obtenidos para películas de melanina de mayor espesor, de $t_a = 45$ y 120 minutos, registradas para una separación punta muestra dada por la aplicación de un potencial bias de 1,0 V y una corriente túnel de 0,35 nA, se han representado en la Figura IV.2.9:

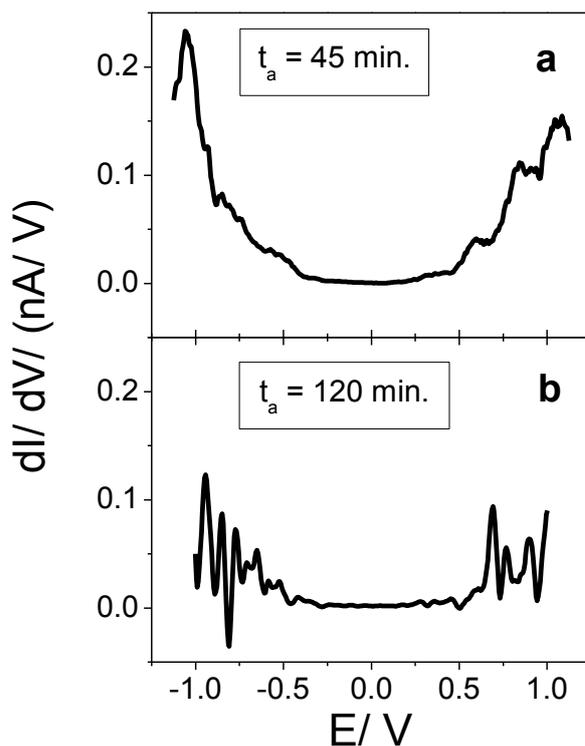
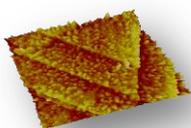


Figura IV.2.9. Curvas dI/dV registradas para películas de melanina sobre Au(111) de (a) $t_a = 45$ minutos y (b) $t_a = 120$ minutos.

A partir de estas curvas se puede concluir que en las películas de $t_a = 45$ minutos el HOMO y el LUMO aparecen a -0,5 y +0,6 eV, respectivamente, mientras que lo hacen a -0,6 y +0,7 eV para $t_a = 120$ minutos. La magnitud de



las diferencias HOMO-LUMO es consistente con los valores descritos en la bibliografía para películas semiconductoras de melanina.^{4,32}

En lo que respecta al comportamiento exhibido por la película de melanina de una monocapa de espesor, es decir $t_a = 10$ minutos, fig. IV.2.8b, hay que decir que, como se ha insistido anteriormente, exhibe una buena conductancia electrónica. Con objeto de justificar tal comportamiento, se han dispuesto en la Figura IV.2.10, para su comparación, los resultados de dI/dV junto a la densidad de estados proyectada (PDOS) de los tetrámeros IHHH y IMIM adsorbidos sobre Au(111) a partir de los cálculos DFT.

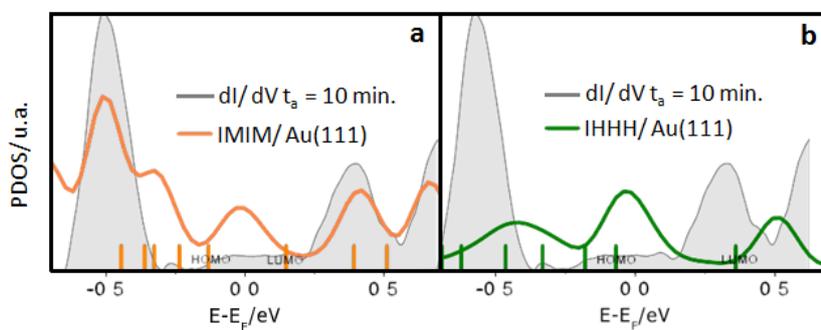
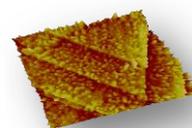


Figura IV.2.10. Densidad de estados proyectada, PDOS, sobre (a) IMIM sobre Au(111) en color naranja y (b) IHHH sobre Au(111) en verde. Se toma como cero de energía la energía de Fermi del sistema adsorbido. La curva en gris es el espectro dI/dV de una película de melanina de $t_a = 10$ minutos. Las barras verticales indican los estados para los tetrámeros aislados en el vacío. También se han indicado las posiciones del HOMO y LUMO de los tetrámeros aislados en el vacío.

En las fig. IV.2.7a-b se puede apreciar que los niveles moleculares de energía de ambos tetrámeros se hibridan con las funciones de onda deslocalizadas del metal que muestran un ensanchamiento significativo que originaría, a su vez, una transferencia de carga entre el tetrámero y el sustrato, tal y como reveló el análisis de Bader.

Si bien es cierto que las aproximaciones de gradiente generalizado (GGA) no proporcionan predicciones exactas acerca de los valores propios del HOMO y el LUMO, también lo es que aportan una estimación bastante buena de las diferencias HOMO-LUMO.³³ No obstante, en las películas delgadas adsorbidas

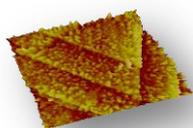


sobre Au(111), fig. IV.2.10a-b, aparecen estados localizados entre el HOMO y el LUMO. Nuestros cálculos DFT también indican la presencia de estados electrónicos en el nivel del Fermi debido a la fuerte hibridación de orbitales moleculares y los estados electrónicos del sustrato en la interfase Au/tetrámero. El estado presente entre HOMO y LUMO podría corresponder a la ocupación del LUMO del tetrámero. Parece que este orbital se desplaza hacia menores energías próximas al nivel de Fermi. También se debe hacer notar que el LUMO está parcialmente ocupado en el estado adsorbido reflejando así la transferencia de carga desde el sustrato de Au. Para ambos tetrámeros, los orbitales HOMO y LUMO pierden su identidad, el gap entre éstos prácticamente desaparece y, consecuentemente, la película exhibe una conducción prácticamente metálica.

Llegados a este punto se deben retomar aquellos aspectos relacionados con el mecanismo de adsorción de los tetrámeros IMIM y IHHH sobre la superficie del Au(111). Tal y como ocurre en la mayoría de grandes moléculas orgánicas π -conjugadas que poseen distintos grupos funcionales, las interacciones de enlace entre éstas deben ser entendidas por medio de dos fenómenos cooperativos: (a) transferencia de carga entre la superficie del Au y el LUMO que se desplaza al nivel de Fermi en el proceso de adsorción y (b) enlace Au-O local entre el O carboxílico y la superficie del Au(111). Esto significaría que toda la estructura π del tetrámero debe estar implicada en el proceso de adsorción a través de sus orbitales frontera (HOMO y LUMO), hecho este que se ve reflejado en los cambios experimentados en ciertos enlaces intramoleculares.

IV.2.2.4 Caracterización de la fotorrespuesta de películas de eumelanina sobre Au(111), tras irradiación con luz blanca, vía STM

La combinación de una fuente de radiación electromagnética con las capacidades de obtención de imágenes y de caracterización electrónica de la microscopía de efecto túnel, proporcionan un método adecuado para la determinación de propiedades óptico-electrónicas de las películas de eumelanina. En esta línea de razonamiento, hay que decir que el STM podría ser usado para registrar, en imágenes de alta resolución, la fotorrespuesta local

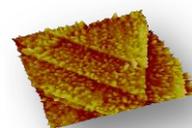


producida tras irradiación de la muestra. Como se ha indicado con anterioridad, recientemente se han abordado estudios de gran relevancia acerca del efecto de la irradiación del conjunto punta-muestra en STM.¹⁷ De hecho, se ha podido investigar el efecto que tiene sobre la corriente túnel la excitación de determinados adsorbatos moleculares con radiación UV/ Visible.¹⁹

En el caso que nos ocupa se llevó a cabo un estudio de medidas de fotoconductividad sobre películas de melanina de $t_a = 100$ minutos y de un electrodo de Au(111) que hizo las veces de blanco. Resulta necesario aclarar en este punto que, una vez se han extraído los electrodos de la disolución de trabajo, deben dejarse secar, bajo condiciones de humedad controlada, durante aproximadamente 24 horas. Esta circunstancia se justifica por el hecho de que se ha demostrado que la conductividad de las eumelaninas es altamente dependiente de la humedad relativa atmosférica.³⁴

Todas las experiencias fueron llevadas a cabo por medio de un microscopio STM, bajo condiciones ambientales y haciendo uso de puntas comerciales de Pt-Ir. Las imágenes fueron obtenidas en los dos modos de trabajo que permite el microscopio, es decir, en modo altura (corriente constante) y en modo corriente (altura constante) con objeto de poder registrar las respuestas de desplazamiento del piezoeléctrico y de corriente túnel, respectivamente, bajo irradiación del conjunto punta-muestra. Cabría añadir que las medidas se realizaron de forma que, en todos los casos, la posición de la punta del STM quedó fijada en x e y, es decir, sólo fue posible, en algún caso, su desplazamiento en z.

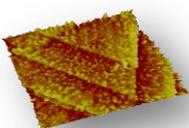
Como fuente de radiación electromagnética se empleó un dispositivo común de flash de fotografía disponible comercialmente, cuya posición relativa y ángulo de incidencia frente a la ubicación de la muestra en el microscopio quedaron perfectamente fijados, de forma que fueran los mismos (40 cm y 15° respectivamente) en todos los ensayos. En estas condiciones, en la superficie de la muestra, se registra una densidad de potencia de 3 mW cm⁻². El tiempo de emisión es de, aproximadamente, 1 ms por cada disparo de flash.



Se fijaron las condiciones de operación del microscopio de forma que fuera posible garantizar que la distancia relativa punta muestra fuese la misma en aquellas experiencias realizadas para el mismo potencial *bias* en valor absoluto pero con distinta polaridad. Bajo estas circunstancias, la dependencia de la magnitud del efecto observado en función de la polaridad del *bias*, indicaría una manifiesta contribución de electrones fotoexcitados frente al efecto, en este caso, menos importante, de la expansión térmica de los materiales implicados.

Por esta razón, en lo sucesivo, se procedió de la siguiente manera: la punta se aproximó sobre la superficie de la muestra, sin iluminación, hasta obtener corriente túnel bajo diferentes condiciones. En particular, nuestras experiencias se llevaron a cabo combinando una batería de hasta 4 potenciales *bias*, ± 200 mV y ± 500 mV, combinados con dos corrientes túnel, 0,3 nA y 0,6 nA. Se fijaron las condiciones túnel correspondientes a cada caso (pero siempre para potencial *bias* positivo), se estableció la conexión túnel en modo altura, sin desconectar se cambió a modo corriente, se registraron las imágenes y, de nuevo sin desconectar, se invirtió la polaridad (a potencial *bias* negativo) y se tomaron las medidas de fotocorriente pertinentes.

Las corrientes foto-inducidas obtenidas tras irradiación del conjunto punta muestra se procesan realizando secciones transversales a la imagen que proporciona el microscopio, Figura IV.2.11:



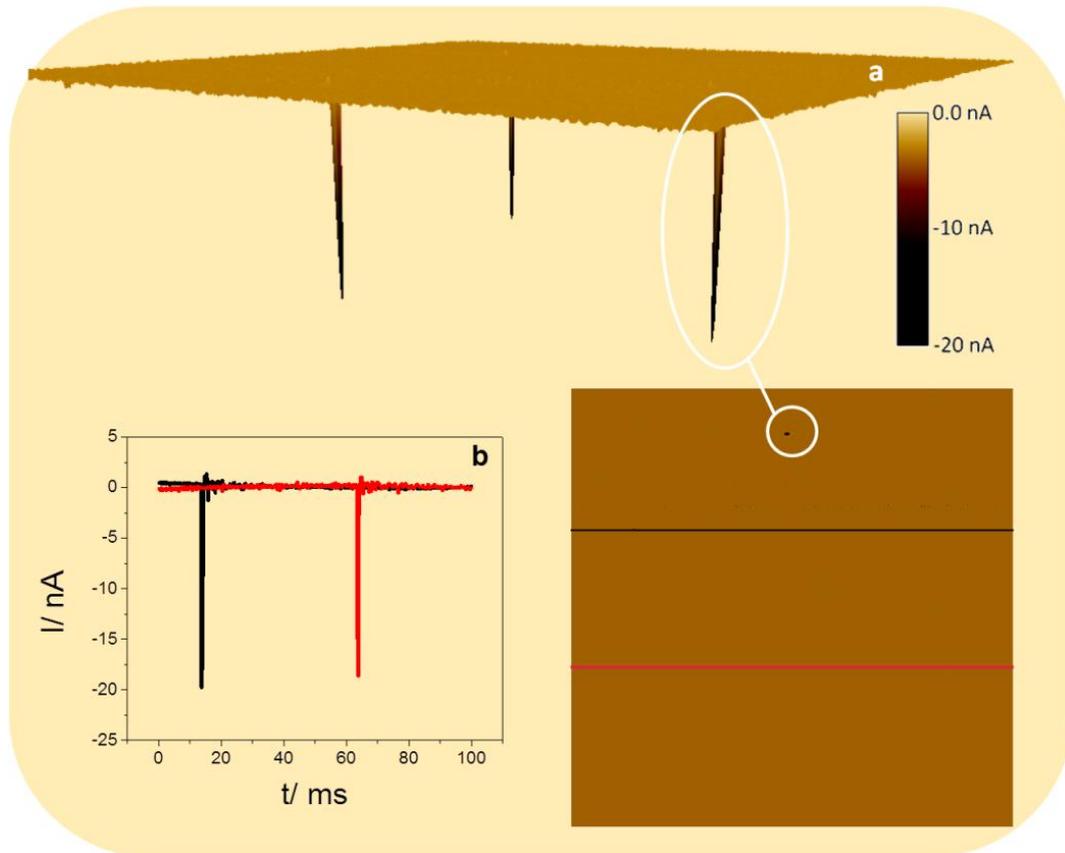
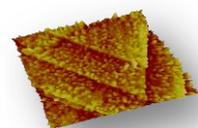


Figura IV.2.11. (a) Imagen STM 3D en la que se recogen varias corrientes foto-inducidas tras irradiación del conjunto punta-muestra con un haz de luz blanca. (b) Secciones transversales que muestran el cambio en la corriente túnel tras la irradiación. Las líneas negra y roja marcan el lugar en la imagen de la derecha donde se tomó la correspondiente sección transversal. Condiciones túnel: $I_T = 0,3 \text{ nA}$ y $E_B = -200 \text{ mV}$.

Los resultados obtenidos en el caso de potenciales *bias* comprendidos en el *gap*, es decir $+200$ y -200 mV , donde no se registran corriente túneles significativas, se muestran en la Figura IV.2.12 tanto para la película de melanina, fig. IV.2.12a-b, como para el Au(111), fig. IV.2.12c-d.



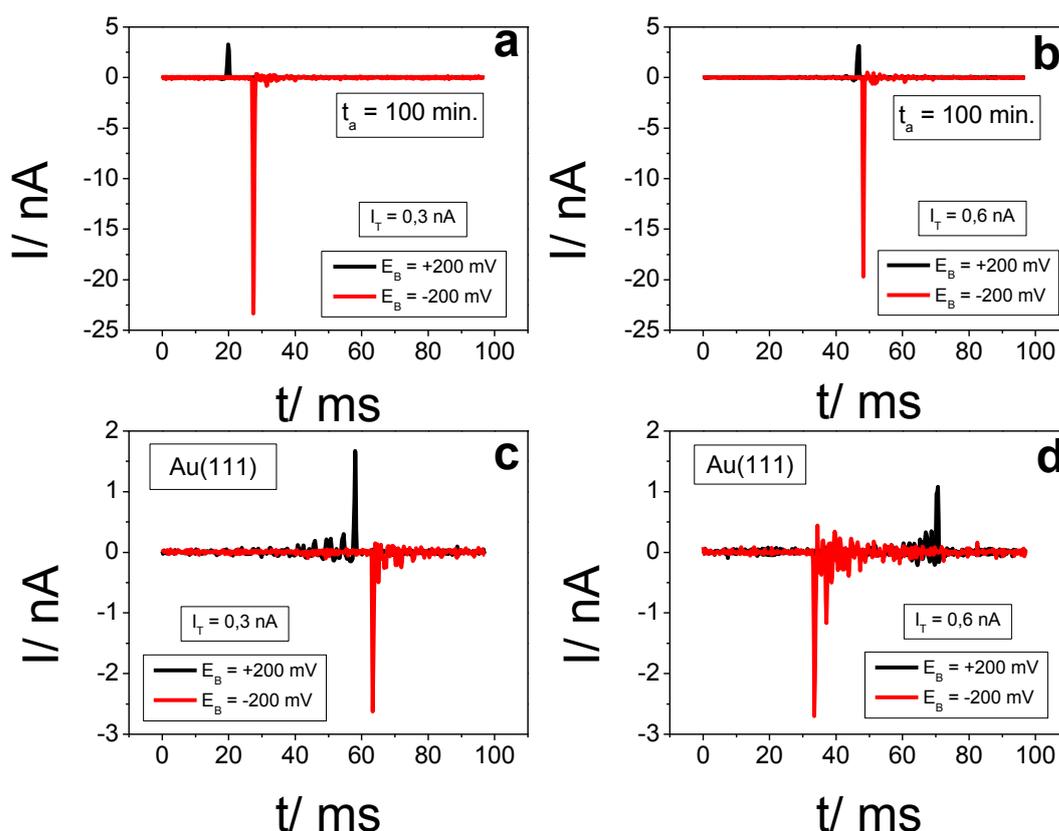
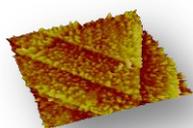


Figura IV.2.12. Cambios en la corriente túnel registrados en el modo corriente (altura constante) tras irradiación del conjunto punta-muestra con un haz de luz blanca bajo diferentes condiciones túnel pero manteniendo constante la distancia punta-muestra. Película de melanina sobre Au(111) de $t_a = 100$ minutos (a y b), para corrientes túnel: (a) $I_T = 0,3$ nA y (b) $I_T = 0,6$ nA. Au(111) (c y d), para corrientes túnel: (c) $I_T = 0,3$ nA y (d) $I_T = 0,6$ nA. Potenciales bias: $E_B = +200$ mV en color negro y $E_B = -200$ mV en color rojo.

Los gráficos muestran típicas respuestas de corriente túnel obtenidas tras el pulso de luz blanca en función del signo del potencial aplicado. Los valores representados en la fig. IV.2.12 son el resultado de promediar los datos obtenidos en diferentes zonas de cada muestra y, al menos, varios cientos de pulsos de luz blanca.

En las fig. IV.2.12a-b se observa para la película de melanina que cuando los potenciales bias se colocan a valores positivos, esto es la muestra permanece positiva, se registra un ligero incremento, entre 1-3 nA (gráficos en color negro), en la corriente túnel, con independencia de la distancia punta-muestra. Téngase en cuenta que, tal y como se indicó anteriormente, la



distancia punta-muestra de trabajo se fija por medio de las condiciones túnel que se establecen inicialmente. Sin embargo, cuando el potencial *bias* aplicado es negativo, muestra negativa, entonces se detecta un drástico incremento, de entre 15-25 nA, en la corriente túnel, una vez ha tenido lugar la irradiación, fig. 12a-b, en color rojo.

Estos aumentos de la corriente túnel observados para *bias* negativos resultaron ser mucho mayores que los obtenidos bajo condiciones experimentales idénticas para el sustrato de Au(111) sin modificar, fig. IV.2.8c-d.

Los resultados obtenidos en el caso de potenciales *bias*, también como en los casos anteriores comprendidos en el *gap*, de ± 500 mV se muestran en la Figura IV.2.13:

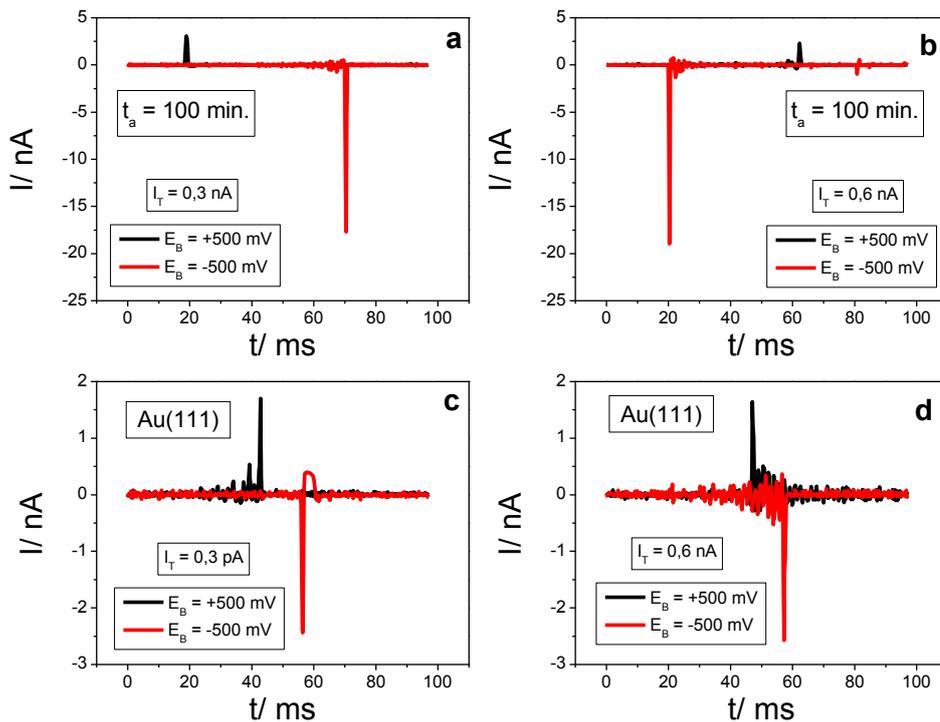
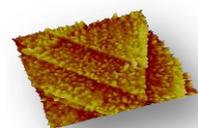


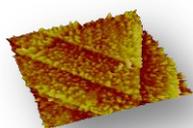
Figura IV.2.13. Cambios en la corriente túnel registrados en el modo corriente (altura constante) tras irradiación del conjunto punta-muestra con un haz de luz blanca bajo diferentes condiciones túnel pero manteniendo constante la distancia punta-muestra. Película de melanina sobre Au(111) de $t_a = 100$ minutos (a y b), para corrientes túnel: (a) $I_T = 0,3$ nA y (b) $I_T = 0,6$ nA. Au(111) (c y d), para corrientes túnel: (c) $I_T = 0,3$ nA y (d) $I_T = 0,6$ nA. Potenciales *bias*: $E_B = +500$ mV en color negro y $E_B = -500$ mV en color rojo.



La comparación de las figuras, para las distintas condiciones túnel estudiadas en el momento de establecer la conexión túnel, muestran claramente que la electrodeposición de películas de melanina, fig. IV.2.12a-b y fig. IV.2.13a-b, altera notablemente la respuesta exhibida por el sustrato de Au(111), fig. IV.2.12c-d y fig. IV.2.13c-d.

El análisis de los resultados y su comparación con los mostrados en la fig. IV.2.12a-d nos permite concluir que, para las películas de melanina de $t_a = 100$ minutos, la magnitud de la respuesta de corriente túnel foto-inducida tras pulso del flash, es significativamente dependiente de la polaridad del potencial *bias* aplicado, si bien resulta independiente del valor absoluto del *bias*. Es decir, para *bias* negativos (los electrones atraviesan la barrera túnel desde la muestra hacia la punta), los valores de corriente foto-inducida son notablemente superiores a los que se han registrado para *bias* positivos del mismo valor absoluto (en este caso, los electrones cruzan desde la punta hacia la muestra).

Es bien conocido que, en medidas de STM en las que se iluminan materiales fotoactivos, en general, se observa un incremento de las corrientes túnel debido a dos efectos bien diferenciados. El primero de ellos hace referencia a la expansión térmica tanto de la punta como de la muestra que produce, como consecuencia, una disminución de la distancia relativa punta-muestra y, por tanto, un incremento de la corriente túnel.³⁵ A pesar de los repetidos esfuerzos que se han realizado con objeto de estudiar el efecto de la fotoirradiación sobre la distancia punta-muestra en STM, la realidad es que los mecanismos detallados implicados en el proceso no son del todo conocidos. De hecho, la gran sensibilidad que ofrece el STM para la detección de corrientes inducidas por irradiación, se ve oscurecida por la aparición de corrientes debidas a la expansión térmica de la muestra. Pese a ello, algunos autores han empleado la expansión térmica de punta y muestra para calcular funciones trabajo.³⁶ Es más, se ha demostrado que las corrientes inducidas tras irradiación debidas a expansión térmica pueden ser reconocibles, toda vez que son proporcionales a la corriente túnel promediada.³⁷ Esta identificación permite, por tanto, discriminar si otros tipos de corrientes inducidas por la irradiación están

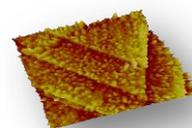


presentes en el efecto estudiado.

El segundo efecto involucrado en el aumento de corriente túnel en medidas de STM en las que se iluminan materiales fotoactivos implicaría la contribución de electrones foto-inducidos debido a la irradiación con el haz de luz blanca. Es decir, el aumento de la corriente túnel ocasionado por la fotoexcitación de los electrones hasta la banda de conducción de los agregados moleculares.²⁰ Queda claro, sin embargo, que el marcadamente asimétrico aumento de la corriente túnel en función del signo del potencial *bias* aplicado (recuérdese que el valor absoluto del potencial y la distancia punta-muestra es la misma en ambas experiencias), fig. IV.2.12-13, nos permite descartar la expansión térmica como la principal contribución al incremento de corriente túnel detectado en nuestras experiencias. Por tanto, considerando que todas las medidas se han realizado en la región de potencial correspondiente al *gap* que mostraron las experiencias STS, fig. IV.2.8, estos incrementos de la corriente túnel pueden asociarse a un efecto fotovoltaico ya descrito previamente en el caso de películas de melanina de gran espesor sobre dióxido de titanio.³⁸ Sin embargo, se debe tener en cuenta que, hasta ahora, esta respuesta asimétrica de fotocorriente observada en nuestras experiencias no había sido descrita en el caso de películas de melanina.

Nuestros resultados indican que manteniendo constante la distancia punta-muestra y el potencial *bias* negativo, un importante flujo de electrones foto-inducidos pasan de la muestra a la punta mientras que dicho fenómeno estaría impedido en el caso de *bias* positivos. Se puede concluir, por tanto, que bajo irradiación con un haz de luz blanca, los electrones se desplazan desde el HOMO de la película de melanina al LUMO desde donde son recolectados por la punta, cargada positivamente.

Por último, se debe tomar en consideración el hecho de que la producción de fotocorriente bajo iluminación con luz blanca es claramente indicativa de un comportamiento típico de semiconductor. Esto estaría claramente de acuerdo con la respuesta exhibida por las películas de melanina en las experiencias de curvas I/V , fig. IV.2.8.



IV.2.3. Conclusiones

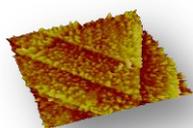
Hemos estudiado por medio de STM, STS, XPS y cálculos de DFT las propiedades electrónicas y la adsorción de películas ultradelgadas de melanina sobre Au(111). Las medidas de STM mostraron que las unidades de melanina de menor tamaño, detectadas en las primeras etapas de adsorción, exhiben tamaños similares a las de los tetrámeros IMIM e IHHH y a pequeños oligómeros formados a partir de los anteriores. Los cálculos de DFT mostraron que la estructura π de los tetrámeros está involucrada en el proceso de quimisorción por medio de sus orbitales frontera (HOMO y LUMO). Este hecho se refleja en los cambios producidos en ciertos enlaces intramoleculares.

Las películas de melanina muestran una buena conductancia molecular debido a la presencia de estados localizados en el nivel de Fermi. En el caso de películas más gruesas se observa un comportamiento típico de semiconductor con una separación HOMO-LUMO de aproximadamente 1 eV.

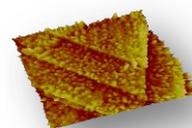
Estas películas exhiben corrientes túnel fotoinducidas tras irradiación con un haz de luz blanca. La magnitud de la fotorrespuesta registrada en estas condiciones depende del signo del potencial *bias* aplicado. Los resultados descritos en el presente capítulo han sido recientemente publicados en medios de difusión internacional.³⁹

IV.2.4. Bibliografía

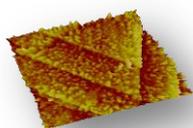
- 1) (a) H.Z. Hill, G.J. Hill, *Pigment Cell Res.*, **1987**, *1*, 163. (b) F.A. Zucca, G. Giaveri, M. Gallorini, A. Albertini, M. Toscani, G. Pezzoli, R. Lucius, H. Wilms, D. Sultzer, S. Ito, K. Wakamtsu, L. Zecca, , *Pigment Cell Res.*, **2004**, *17*, 610.
- 2) C.M.R. Clancy, J.D. Simon, *Biochemistry*, **2001**, *40*, 13353.
- 3) S. Ito, *Biochim. Biophys. Acta*, **1986**, *883*, 155.
- 4) J. McGuinness, P. Corry, P. Proctor, *Science*, **1974**, *183*, 853.
- 5) P. Meredith, T. Sarna, *Pigment Cell Res.*, **2006**, *19*, 572.
- 6) M. Ambrico, A. Cardone, T. Ligonzo, V. Augelli, P.F. Ambrico, S. Cicco, G.M. Farinola, M. Filannino, G. Perna, V. Capozzi, *Org. Electron.*, **2010**, *11*, 1809.



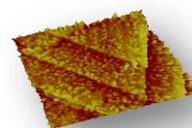
- 7) L. Sangaletti, S. Pagliara, P. Vilmercati, C. Castellarin-Cudia, P. Borghetti, P. Galinetto, R. Gebauer, A. Goldoni, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, *111*, 5372.
- 8) (a) K.B. Stark, J.M. Gallas, G.W. Zajac, M. Eisner, J.T. Golab, *J. Phys. Chem. B*, **2003**, *107*, 3061. (b) B.J. Powell, T. Baruah, N. Bernstein, K. Brake, R.H. McKenzie, P. Meredith, M.R. Pederson, *J. Chem. Phys.*, **2004**, *120*, 8608.
- 9) (a) C.M.R. Clancy, J.B. Nofsinger, R.K. Hanks, J.D. Simon, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, *104*, 7871. (b) M.M. Jastrzebska, H. Isotalo, J. Paloheimo, H. Stubb, B. Pilawa, *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.*, **1996**, *7*, 781.
- 10) J. McGinnes, P. Corry, P. Proctor, *Science*, **1974**, *183*, 853.
- 11) P. Meredith, J. Riesz, *Photochem. Photobiol.*, **2004**, *79*, 211.
- 12) P. Borghetti, A. Goldoni, C. Castellarin-Cudia, L. Casalis, F. Herberg, L. Floreano, A. Cossaro, A. Verdini, R. Gebauer, P. Ghosh, L. Sangaletti, *Langmuir*, **2010**, *26*, 19007.
- 13) P. Meredith, S. Subianto, G. Will, *PCT Int. Appl.*, **2005**, 22.
- 14) K.J. Lawrie, P. Meredith, R.P. McGeary, *Photochem. Photobiol.*, **2008**, *84*, 632.
- 15) J.P. Bothma, J. deBoor, U. Divakar, P.E. Schenn, P. Meredith, *Adv. Mater.*, **2008**, *20*, 3539.
- 16) (a) P. Díaz, Y. Gimeno, P. Carro, S. González, P.L. Schilardi, G. Benítez, R. C. Salvarezza, A. Hernández Creus, *Langmuir*, **2005**, *21*, 5924. (b) A. González Orive, P. Dip, Y. Gimeno, P. Díaz, P. Carro, A. Hernández Creus, G. Benítez, P.L. Schilardi, L. Andrini, F. Requejo, R.C. Salvarezza, *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 473.
- 17) P.I. Geshev, F. Demming, J. Jersch, K. Dickmann, *Appl. Phys. B*, **2000**, *70*, 91.
- 18) R. Hiesgen, D. Meissner, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **1997**, 358, 54.
- 19) H. Möltgen, Karl Kleinermanns, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2003**, *5*, 2643.
- 20) K. Murakoshi, T. Kitamura, Y. Nakato, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2001**, *3*, 4572.



- 21) A.L. Sobolewski, W. Domcke, *ChemPhysChem*, **2007**, *8*, 756.
- 22) (a) E. Kaxiras, A. Tsolakidis, G. Zonios, S. Meng, *Phys. Rev. Lett.*, **2006**, *97*, 218102. (b) S. Meng, E. Kaxiras, *Biophys. J.*, **2007**, *94*, 2095.
- 23) P. Ghosh, S. Pagliara, P. Vilmercati, C. Castellarin-Cudia, L. Floreano, A. Cossaro, A. Verdini, R. Gerbauer, A. Goldoni, *Phys. Rev. B*, **2009**, *80*, 174203.
- 24) S.A. Suarez, M.H. Fonticelli, A.A. Rubert, E. de la Llave, D. Scherlis, R.C. Salvarezza, M.A. Marti, F. Doctorovich, *Inorg. Chem.*, **2010**, *49*, 6955.
- 25) M. Hoon-Khosla, W.R. Fawcett, A. Chen, J. Lipkowski, B. Pettinger, *Electrochim. Acta*, **1999**, *45*, 611.
- 26) A. Iannelli, J. Merza, J. Lipkowski, *J. Electroanal. Chem.*, **1994**, *376*, 49.
- 27) P. Jhosi, V. Shewale, R. Pandey, *J. Phys. Chem. C*, **2011**, *115*, 22818.
- 28) (a) W.K. Chen, M.J. Cao, S.H. Liu, C.H. Lu, Y. Xu, J.Q. Li, *Chem. Phys. Lett.*, **2006**, *417*, 414. (b) K. Toyoda, Y. Nakano, I. Hamada, K. Kyuho, S. Yanagisawa, Y. Morikawa, *Surf. Sci*, **2003**, *603*, 2912. (c) E. Abad, Y.I. Martínez, F. Flores, J.J. Ortega, *Phys. Chem.*, **2011**, *134*, 044701. (d) J. Wellendorff, A. Kelkkanen, J.J. Mortensen, B.I. Lundquist, T. Bligaard, *Top. Catal.*, **2010**, *53*, 378.
- 29) H. Yu, L.J. Webb, J.R. Heath, N.S. Lewis, *Appl. Phys. Lett.*, **2006**, *88*, 252111.
- 30) K. Xue, H.P. Ho, J.B. Xu, *J. Phys. D*, **2007**, *40*, 2886.
- 31) J. Tersoff, D.R. Hamann, *Phys. Rev. B*, **1985**, *31*, 805.
- 32) M. Abbas, M. Ali, S.K. Shah, F. D'amico, P. Postorino, S. Mangialardo, M. Cestelli Guidi, A. Cricenti, R. Gunnella, *J. Phys. Chem. B*, **2011**, *115*, 11199.
- 33) G. Zhang, C.B. Musgrave, *J. Phys. Chem. A*, **2007**, *111*, 1554.
- 34) M. Jastrzebska, A. Kocot, L. Tajber, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 2002, *66*, 201.
- 35) A.V. Bragas, S.M. Landi, J.A. Coy, O.E. Martínez, *J. Appl. Phys.*, **1997**, *82*, 4153.
- 36) N.M. Amer, A. Skumanich, D. Ripple, *Appl. Phys. Lett.*, **1986**, *49*, 137.
- 37) S.M. Landi, A.V. Bragas, J.A. Coy, O.E. Martínez, *Ultramicroscopy*,



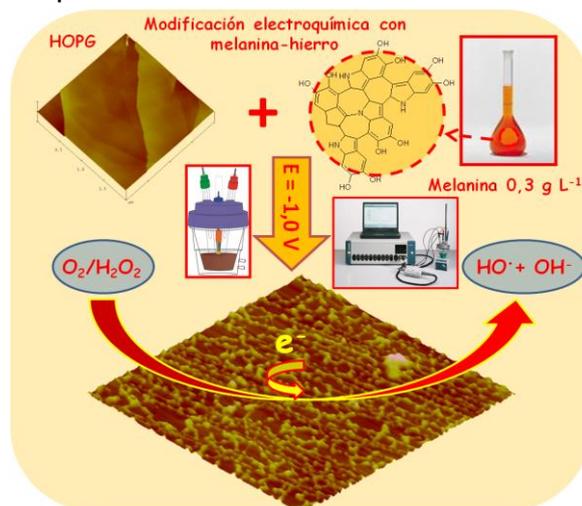
- 1999**, 77, 207.
- 38) P. Meredith, B.J. Powell, J. Riesz, R. Vogel, D. Blake, I. Kartini, G. Will, S. Subianto, **2006**, Broadband photon-harvesting biomolecules for photovoltaics, en: A.F. Collings, C. Critchley (Eds.), *Artificial Photosynthesis: From Basic Biology to Industrial Application*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- 39) A. González Orive, A. Hernández Creus, P. Carro, R.C. Salvarezza, *Org. Electron.*, **2012**, 10, 1844.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

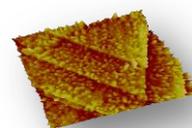
IV.3. PREPARACIÓN ELECTROQUÍMICA DE PELÍCULAS DE MELANINA-HIERRO SOBRE HOPG

En el presente capítulo se abordará la adaptación del método empleado previamente para el crecimiento potencioestático de melanina sobre monocristales de Au(111) a la síntesis de películas de este biopolímero sobre otro sustrato conductor como es el grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG). Con la intención de alcanzar un profundo conocimiento tanto de la morfología, composición química y de las características de los depósitos así como de su actividad electrocatalítica, se hará uso de las microscopías de barrido electrónico y de fuerzas atómicas, de técnicas espectroscópicas como XPS y XANES y de las metodologías electroquímicas convencionales.



IV.3.1. Antecedentes

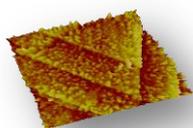
Dentro de la familia de los electrodos sólidos, el grafito es probablemente uno de los más utilizados en estudios electroanalíticos toda vez que se trata de un electrodo que exhibe características muy útiles que lo hacen muy apreciado para diversos fines electroquímicos.¹ Entre sus propiedades destacan la posibilidad de poder trabajar en una amplia ventana de potenciales, su baja resistividad así como la ausencia de corrientes residuales y, además, ofrecen una estructura superficial altamente reproducible y muy sencilla de limpiar. Muestra también una amplia estabilidad térmica y gran diversidad morfológica, presentándose en una gran variedad de formas útiles en diferentes aplicaciones electroquímicas como pueden ser las nano y microfibras de carbono, el carbón vítreo, las pastas y composites de carbono, HOPG, nanotubos carbono (CNT), etc.^{1a} Es más, en los últimos tiempos, han emergido



con fuerza los electrodos de grafito pirolítico de borde, *EPG*, que han mostrado características altamente exaltadas frente a otros electrodos gráfiticos.² Las superficies de grafito son, además, igualmente útiles tanto para el electroanálisis de compuestos lipofílicos como hidrofílicos.^{1c,3} Este hecho ha permitido la utilización de estos electrodos como biosensores en diversos estudios.^{1a}

No obstante, es cierto que la escasa reactividad química de las superficies tipo grafeno como las del plano basal del HOPG y los CNTs constituyen un obstáculo para su uso como plataforma para sustentar nanopartículas metálicas, moléculas y biomoléculas para su utilización en sensores, sistemas catalíticos y electrocatalíticos, etc. Por tanto, la funcionalización de tales superficies es fundamental de cara a resolver problemas como los apuntados,⁴ en la medida en que estos grupos funcionales enlazados a la superficie aumentarían su reactividad superficial, selectividad, humectabilidad y su dispersión en fases líquidas y gaseosas. Así, existen numerosos ejemplos en la bibliografía que recogen diversos métodos para la funcionalización y modificación de las superficies carbonosas y de CNTs entre los que destacan la oxidación química,⁵ térmica⁶ y de plasma⁷, el haz de iones,⁸ las interacciones hidrofóbicas⁹ y la quimisorción de moléculas y biomoléculas.¹⁰ Ahora bien, hay que tener en cuenta que, en la mayoría de los casos, estos tratamientos dan lugar a una degradación parcial de las propiedades electrónicas y mecánicas inherentes a estos sustratos además de un nada deseable incremento en la rugosidad superficial de los mismos.

En esta línea de razonamiento, la preparación de películas de melanina por medios electroquímicos ofrecería la posibilidad de funcionalizar superficies de grafito y de CNTs con un polímero biocompatible que contendría diferentes grupos funcionales y evitaría, además, la degradación del sustrato de partida. En este sentido, cabe comentar que en los últimos tiempos se han publicado diferentes estudios donde se han hecho crecer, por electropolimerización oxidativa de L-dopa, depósitos poliméricos análogos a las melaninas naturales en sustratos carbonosos.¹¹ Películas como éstas se han empleado con éxito, a modo de membranas selectivas que impiden la interferencia de diferentes

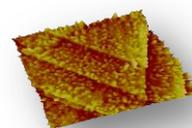


compuestos, en las determinaciones electroanalíticas de dopamina y glucosa.^{12,13} Es más, también se han sintetizado monocapas, fisisorbidas o quimisorbidas, de dopamina propiamente y de distintas especies de quinonas, como las presentes en las melaninas y responsables de su comportamiento rédox, que exhiben actividad electrocatalítica frente a diferentes reacciones.¹⁴ Incluso se han descrito experiencias en las que se emplean electrodos de eumelanina en pasta de carbono¹⁵ para poner de manifiesto la interacción entre este biopolímero y radiación gamma ionizante que da como resultado la producción de corriente eléctrica, resultando ésta proporcional a la cantidad de melanina irradiada.¹⁶

Por otro lado, es cierto que las reducciones electroquímicas de oxígeno y de peróxido de hidrógeno sobre electrodos de base carbonosa han sido extensivamente estudiadas dada su amplia utilización como soporte de catalizadores metálicos en celdas de combustible. De hecho es bien conocido que diferentes tipos de estos sistemas son electroquímicamente activos para la reducción de oxígeno.¹⁷ No ocurre así en el caso del plano basal del HOPG donde esta reacción está fuertemente inhibida.¹⁸ Por tanto, la modificación de superficies de HOPG con el sistema melanina-hierro ofrecería la oportunidad de estudiar la actividad electrocatalítica de la película frente a las reacciones de reducción de oxígeno y peróxido de hidrógeno sin interferencia del sustrato.

IV.3.2. Preparación y caracterización fisicoquímica de películas de melanina sobre HOPG

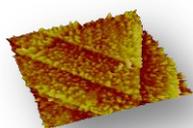
Como se ha comentado, en este capítulo se abordará la modificación de superficies de HOPG, altamente inertes, con películas ultradelgadas y nanoestructuradas de melanina por medios electroquímicos. Esta escasa reactividad físico-química del plano basal del HOPG es una consecuencia de su baja densidad de estados electrónicos y de la ausencia tanto de grupos funcionales como de sitios de adsorción.¹⁹ A diferencia de otros métodos donde se sintetizan, por polimerización oxidativa de L-dopa¹¹⁻¹³ o DHI,²⁰ depósitos de estructura más o menos similar a las melaninas naturales, en nuestro caso las películas se obtienen directamente a partir de soluciones alcalinas de



eumelanina. Si bien, como se mostró en capítulos precedentes, este método se mostró adecuado para la modificación de superficies de Au,^{21,22} su aplicación a una superficie tan hidrofóbica e inerte como la del HOPG requiere especial atención. Así, el proceso de crecimiento de las películas fue monitorizado por técnicas electroquímicas, AFM, EDX, XPS, XANES y FTIR.

Con objeto de sintetizar las películas, los sustratos de HOPG fueron sometidos a polarización catódica de $-1,0$ V en soluciones $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de eumelanina sintética en NaOH $0,1$ M diferentes tiempos de adsorción en una celda electroquímica de tres electrodos. Dicha celda fue diseñada de tal forma que sólo permite la exposición del plano basal del HOPG a la solución electrolítica. Así, únicamente éste se ve modificado con el sistema melanina-hierro ya que se observó que cuando los bordes del electrodo de HOPG, es decir EPG, de mayor actividad que el plano basal, están en contacto con la disolución, se depositaban cantidades muy superiores de melanina. Como es sabido, la disolución alcalina de eumelanina sintética contiene hasta $0,3$ ppm de Fe tal y como se ha podido determinar por absorción atómica. En cuanto a la elección del potencial de polarización de $-1,0$ V, hay que decir que fue seleccionado en virtud a los buenos resultados obtenidos en Au(111) donde la deposición del sistema melanina-hierro acontecía con la calidad y a la velocidad demandada. De hecho, en experiencias realizadas sobre HOPG con polarización catódica de $-0,5$ V, la cantidad de melanina depositada fue prácticamente insignificante. Por último, una vez se hubieron sintetizado convenientemente los depósitos de melanina sobre el plano basal de HOPG, de acuerdo al protocolo recién descrito, éstos fueron escrupulosamente lavados primero en NaOH $0,1$ M y, acto seguido, en abundante H_2O milli-Q y, por último, se dejaron secar en atmósfera de N_2 antes de su posterior caracterización por las diversas técnicas utilizadas en esta sección.

En la Figura IV.3.1 se recogen las imágenes obtenidas por AFM en modo resonante de películas de melanina sobre HOPG de diferentes tiempos de adsorción, t_a . Tal y como se aprecia en las imágenes, éstas muestran la presencia de un electrodepósito granular que gradualmente, en la medida en



que aumenta el tiempo de adsorción, va cubriendo la superficie del HOPG.

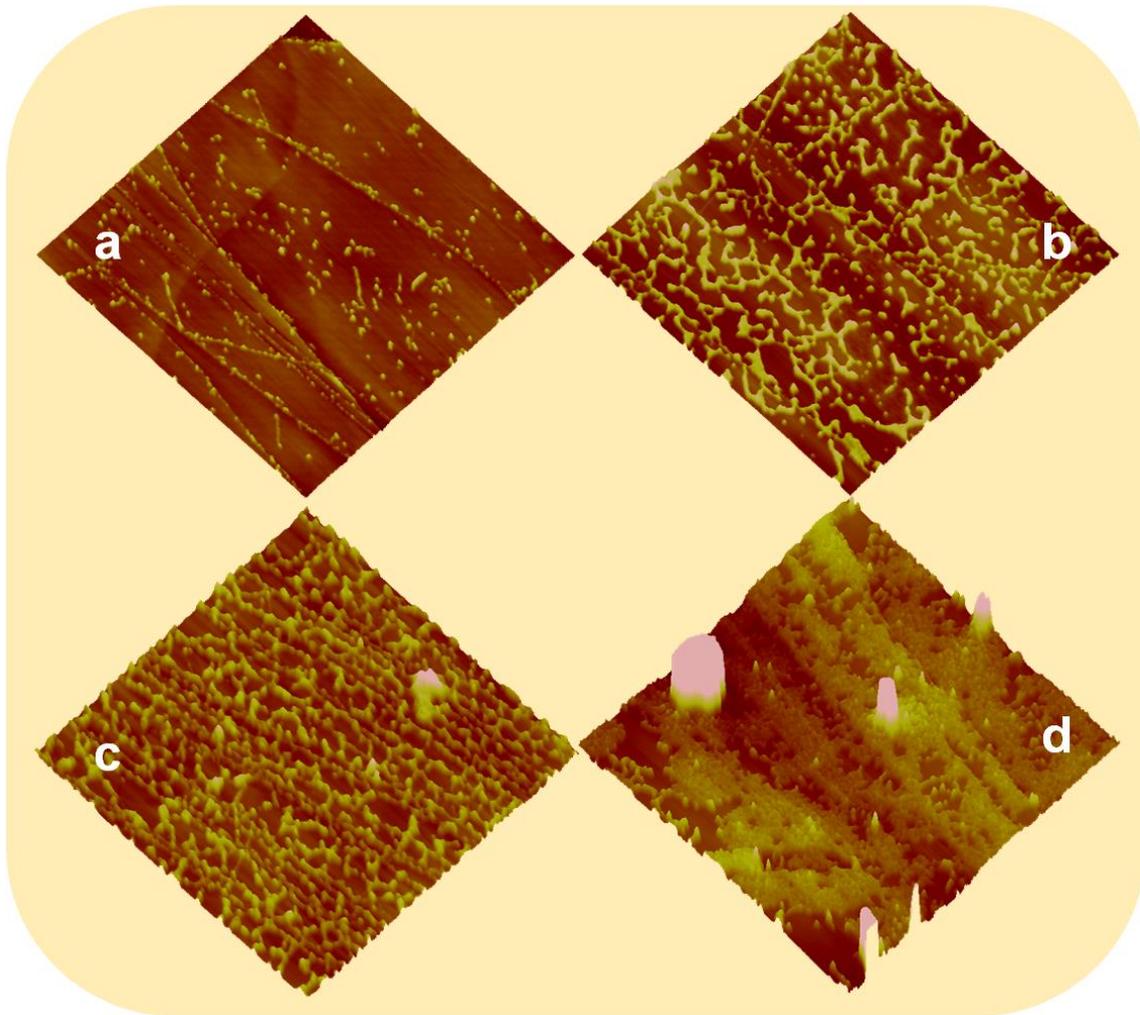
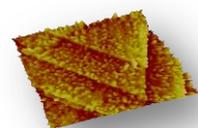


Figura IV.3.1. Imágenes 3D de $2,0 \times 2,0 \mu\text{m}^2$ obtenidas por AFM resonante a partir de películas de melanina sobre HOPG de diferentes tiempos de adsorción: $t_a = 2 \text{ h}$ (a), $t_a = 4 \text{ h}$ (b), $t_a = 14 \text{ h}$ (c) y $t_a = 24 \text{ h}$ (d). La escala en z en todas las imágenes es 25 nm.

El proceso de deposición se inicia en los escalones del plano basal con la adsorción de pequeñas partículas cuyas dimensiones varían entre los 8-18 nm (ver tabla IV.3.1) y entre 0,35-1 nm en altura, fig. IV.3.1a. Para t_a superiores a las 2 horas, las partículas antes referidas comienzan a agregarse formando grandes islas ramificadas que finalmente colapsan, ver fig. IV.3.1b-c. Después de 24 horas de polarización catódica, la película prácticamente cubre la totalidad de la superficie, alcanzándose así alturas comprendidas entre los 3-10 nm, ver fig. IV.3.1d, llegando a advertirse incluso gránulos de talla submicrométrica.



Tiempo de deposición/ h	Tamaño de partícula/ nm
2	8-13
4	9-18
14	10-25
24	15-35

Tabla IV.3.1. Evolución del tamaño de partícula en las películas de melanina en función del t_a .

No obstante, debe tenerse en cuenta que incluso en los agregados de mayor tamaño siempre es posible distinguir pequeñas partículas, ver Figura IV.3.2, constituyentes de los mismos, cuyas dimensiones se ven incrementadas con el tiempo de deposición, tabla IV.3.1.

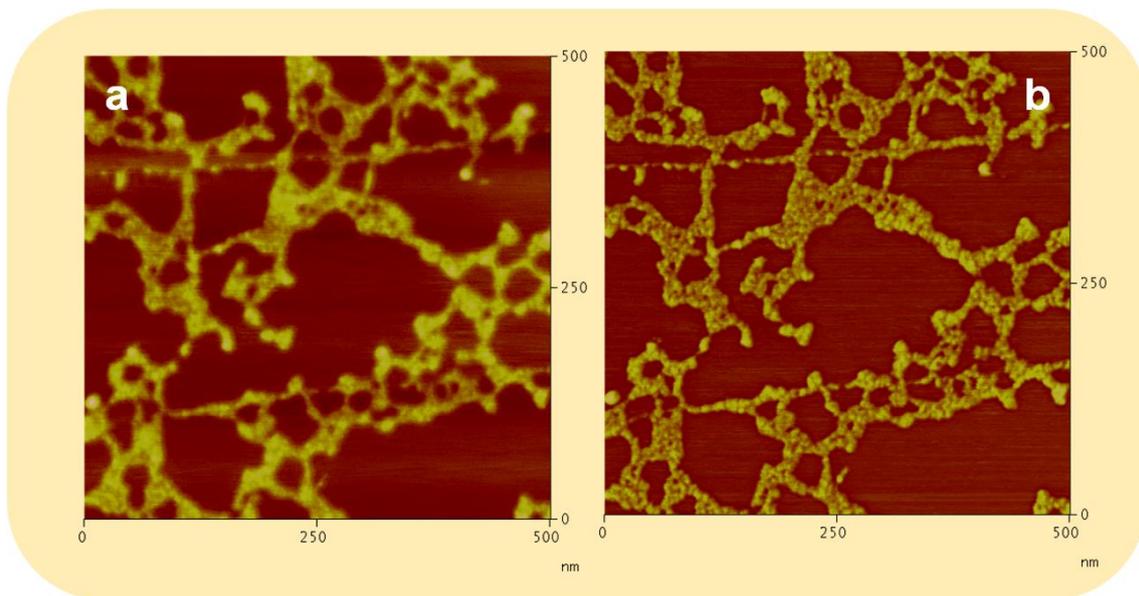
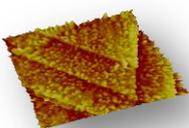


Figura IV.3.2. Imagen AFM en modo resonante de $500 \times 500 \text{ nm}^2$ de película de melanina de 14 horas sobre HOPG: (a) imagen topográfica y (b) imagen de contraste de fase que permite apreciar en mayor detalle la composición granular de los depósitos.

Se debe añadir además que, dentro del rango de dimensiones exhibido por las partículas, mostrado en la tabla IV.3.1, las películas de melanina sintetizadas de acuerdo al método electroquímico propuesto son notablemente reproducibles.

Con objeto de poder caracterizar la composición química de estas películas se recurrió a medidas de XPS. Así en la Figura IV.3.3 se muestran los espectros obtenidos para películas de melanina sobre HOPG a distintos tiempos de deposición.



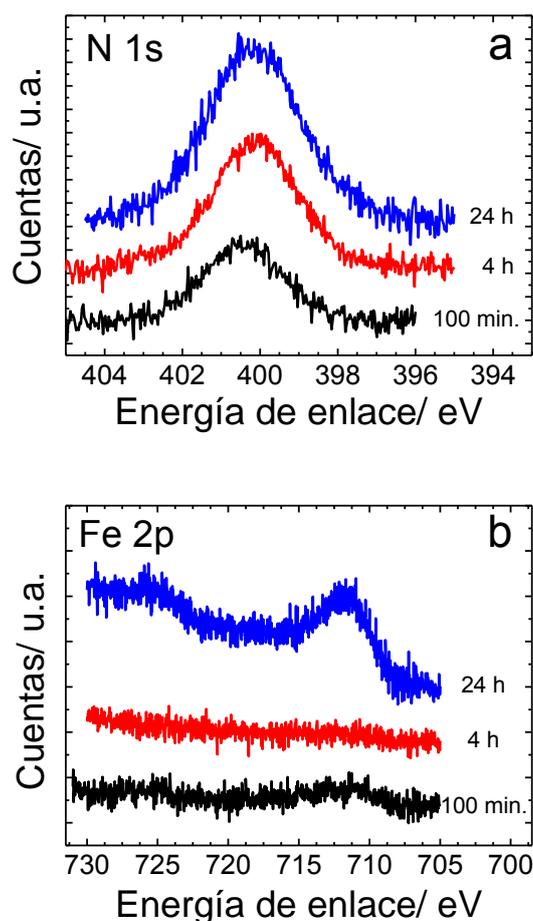
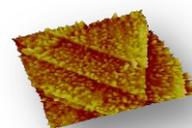


Figura IV.3.3. Espectros XPS obtenidos para películas de melanina sobre HOPG de diferentes tiempos de adsorción: $t_a = 100$ minutos (negro), $t_a = 4$ horas (rojo) y $t_a = 24$ horas. Señales de N 1s (a) y de Fe 2p (b).

Tal y como se aprecia en la fig. IV.3.3a, se ha podido detectar una pequeña señal de N 1s, característica de las melanina, presente en la película de 100 minutos. En la medida en que va aumentando el tiempo de adsorción, tiene lugar un sostenido incremento en la señal de N 1s, lo que indica que el sustrato se va cubriendo progresivamente con el biopolímero. No obstante, también es ciertamente notorio que para la película de 24 horas la señal de N 1s exhibe sólo un ligero aumento en intensidad con respecto a los datos obtenidos para la película de 4 horas. Por el contrario, en comparación con la poco significativa señal de Fe 2p registrada para las películas de 100 minutos y de 4 horas, el depósito de 24 horas mostró una fuerte señal de Fe 2p indicando la incorporación al mismo de cantidades significativas de especies de hierro



oxidado, fig. IV.3.3b. Estos resultados hacen suponer que, tras una inicial modificación de la superficie del HOPG con el biopolímero, grandes cantidades de especies de hierro quedan atrapadas en la película de melanina. De hecho, para las películas de melanina de 24 horas, la relación Fe/ N varía entre 0,25 y 0,45, mientras que para los electrodepositos de t_a comprendidos entre 1 y 4 horas esta relación es próxima a 0. Cabe comentar, llegados a este punto, que este resultado no es del todo sorprendente si se tiene en cuenta la capacidad de las melaninas de atrapar grandes cantidades de cationes metálicos.²³

Por otro lado, la señal XPS de N 1s registrada para una película de melanina de 24 horas se comparó con la obtenida para una muestra de melanina evaporada sobre HOPG, Figura IV.3.4. A tal fin se dejó evaporar una solución etanólica de eumelanina sintética sobre el sustrato formando un depósito grueso. En este caso sólo se pudo detectar la señal de N 1s lo que está de acuerdo con el bajo contenido en hierro presente en la melanina sintética.

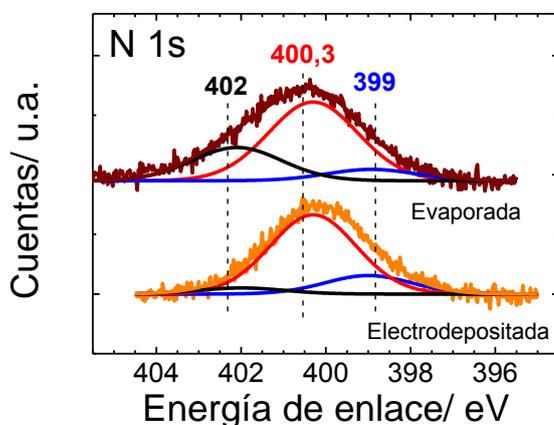
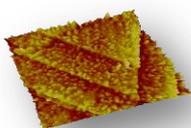


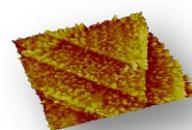
Figura IV.3.4. Señal XPS de N 1s medida en películas de melanina: evaporada (marrón) y electrodepositada (naranja). Los colores negro, rojo y azul corresponden a los ajustes propuestos de la señal a 402, 400,3 y 399 eV, respectivamente.

Obsérvese que sólo se necesitaron dos componentes, las señaladas en colores rojo y azul en la fig. IV.3.4, para el adecuado ajuste del pico correspondiente a la señal de N 1s en el caso de la película de melanina electrodepositada de 24 horas, fig. IV.3.4 en naranja. Por tanto, estas dos



componentes se mantuvieron también en el caso del depósito evaporado, fig. IV.3.4 en marrón. Sin embargo, en esta ocasión, se necesitó una componente adicional, en color negro, para el correcto ajuste de la señal. Cabe añadir que las tres componentes, ubicadas a 399, 400,3 y 402 eV, están ubicuamente presentes en las melaninas naturales.²⁴ De hecho, la componente que más contribuye a la señal de N 1s, a 400,3 eV, aparece también en el monómero, DHICA,²⁵ y en diferentes tipos de melanina.²⁴ Esta componente también se ha asignado a los nitrógenos indólicos.²⁶ En cualquier caso, en las películas electrodepositadas de melanina sólo están presentes, como se ha dicho, las contribuciones a 399 y a 400,3 eV.

Por último en lo que a medidas XPS se refiere, en la Figura IV.3.5 se han comparado las intensidades de las señales de N 1s y de Fe 2p de películas electrodepositadas de melanina del mismo tiempo de adsorción, $t_a = 4$ horas, crecidas sobre diferentes sustratos: HOPG y Au(111).



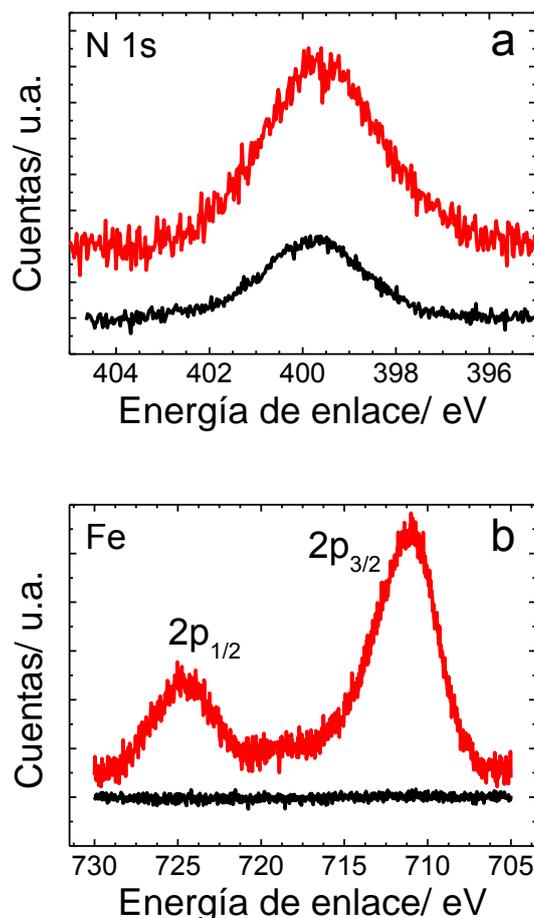
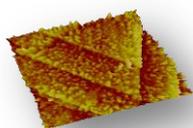


Figura IV.3.5. Espectros XPS obtenidos para películas de melanina de $t_a = 4$ horas sobre HOPG, en color negro, y sobre Au(111), en color rojo. Señales de N 1s (a) y de Fe 2p (b).

Es evidente que para el mismo tiempo de adsorción se han depositado mayores cantidades de melanina y, particularmente, de especies de óxidos de hierro sobre la superficie de Au que sobre la de HOPG. Este resultado estaría en concordancia con las características y la morfología de las películas obtenidas en los distintos sustratos, es decir, alargados depósitos ramificados sobre el plano basal del HOPG frente a las densas y gruesas películas crecidas sobre Au(111) para el mismo tiempo de adsorción.^{21,22} No obstante, con independencia del sustrato elegido, los electrodepositos de melanina sólo exhiben las componentes a 399 y a 400,3 eV de la señal de N 1s.

Estas películas de melanina sobre HOPG fueron igualmente caracterizadas por FTIR. Así los espectros IR obtenidos para películas de $t_a = 4$ y $t_a = 14$ horas, representados en la Figura IV.3.6, exhiben las señales típicas atribuidas



tradicionalmente a las melaninas,²⁷ fundamentalmente las bandas de tensión características de las quinonas, C=O a 1720 cm^{-1} , y una banda ancha en torno a 1630 cm^{-1} debida a la tensión de unidades C=C aromáticas de residuos indólicos presentes en el biopolímero. Por su parte, la señal sobre 1376 cm^{-1} implica la contribución de las bandas de tensión de C=N aromáticos y de flexión de grupos N-H,²⁸ mientras que las señales que van desde 1000 a 1240 cm^{-1} se deben asignar a la vibración de tensión de C-O en derivados fenólicos.^{28b}

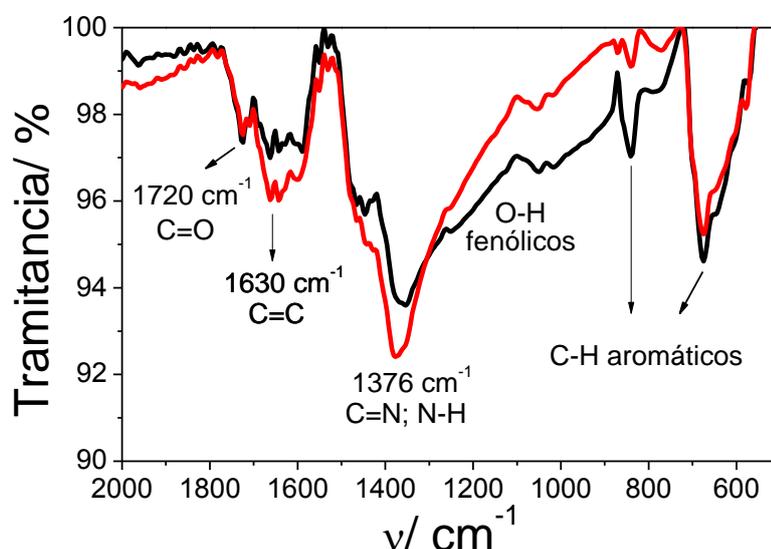


Figura IV.3.6. Espectros FTIR de películas de melanina sobre HOPG de diferentes tiempos de adsorción: $t_a = 4$ horas (color negro) y $t_a = 14$ horas (color rojo).

La intensidad de las señales atribuidas a la melanina aumenta con el tiempo de adsorción dado que mayores cantidades de melanina van quedando absorbidas en la superficie del sustrato. Por otro lado, las señales que aparecen a bajas frecuencias pueden ser asignadas a bandas de flexión de C-H aromáticos y, adicionalmente, a frecuencias menores a 600 cm^{-1} , también estarían presentes contribuciones debidas a vibraciones Fe-O en especies de óxido de hierro.²⁹

La presencia de partículas ricas en óxidos de hierro en las películas electrodepositadas de melanina sobre HOPG, ya apuntada por medidas espectroscópicas de XPS y FTIR, se verificó por medio de SEM y EDAX. En la

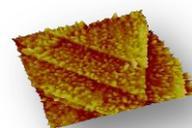
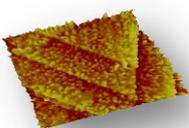


Figura IV.3.7 se han representado las imágenes SEM obtenidas a partir de un depósito de $t_a = 24$ horas. En éstas, el plano basal del HOPG aparece totalmente cubierto de partículas de talla nanométrica lo que estaría de acuerdo con los resultados mostrados por AFM, fig. IV.3.1d.



Figura IV.3.7. Imagen SEM de la superficie del HOPG tras la electrodeposición de melanina-hierro durante $t_a = 24$ horas. Los círculos en rojo destacan la posición de gránulos brillantes analizados por EDX.

Las imágenes muestran igualmente la presencia de gránulos brillantes, señalados en rojo en fig. IV.3.7, distribuidos aleatoriamente sobre la superficie del plano basal, de dimensiones comprendidas entre 50-100 nm, pero que pueden llegar a alcanzar, en algunos casos, incluso hasta tallas micrométricas. Por su parte, los análisis realizados por microsonda EDX se han representado en la Figura IV.3.8, distinguiéndose dos zonas características: área entre gránulos brillantes, fig. IV.3.8a, y los propios gránulos, fig. IV.3.8b. Estos últimos exhibieron fuertes señales de Fe y O indicando, por tanto, que estas zonas brillantes corresponden a partículas notablemente enriquecidas en especies de óxidos de hierro.



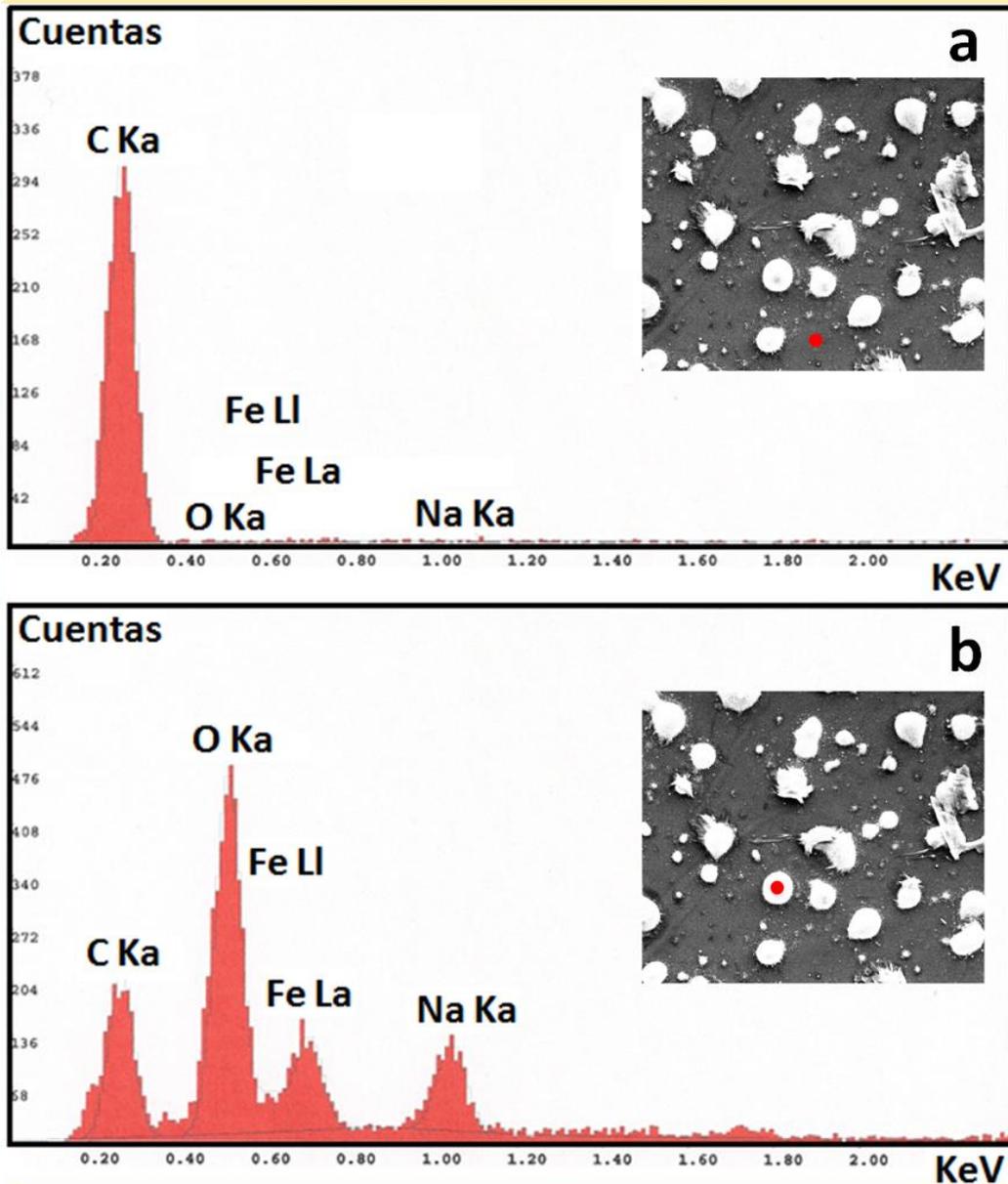
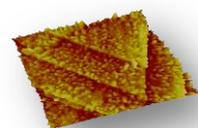


Figura IV.3.8. Espectros EDX obtenidos en distintas áreas de una película de melanina de $t_a = 24$ horas sobre HOPG: (a) zona entre gránulos y (b) gránulo brillante. En ambos casos el punto rojo señala la zona analizada.

Teniendo en cuenta los resultados mostrados hasta el momento se pudo abordar la caracterización de la respuesta electroquímica de los depósitos de melanina. Así, en la Figura IV.3.9 se han dispuesto los ciclovoltamogramas registrados en NaOH 0,1 M de películas de melanina de diferentes tiempos de adsorción comparados con los del HOPG sin modificar. Los depósitos de



melanina representados en fig. IV.3.9a-c exhiben una pareja rédox reversible a -0.35 V (A'I/ C'I), acompañada de un ancho pico anódico (AI) y sus contrapartidas catódicas (CI y CII) presentes en el rango de potenciales comprendidos entre $-0,7/ -1,0$ V. El aumento en el tiempo de adsorción da como resultado un ligero incremento en la pareja rédox A'I/ C'I mientras que tiene lugar un significativo aumento del área voltamétrica implicada en el pico AI, ver fig. IV.3.9b-c, acompañado de los picos catódicos a $-0,75$ V (CI), $-1,0$ V (CII) y, además, CIII a $-1,2$ V.

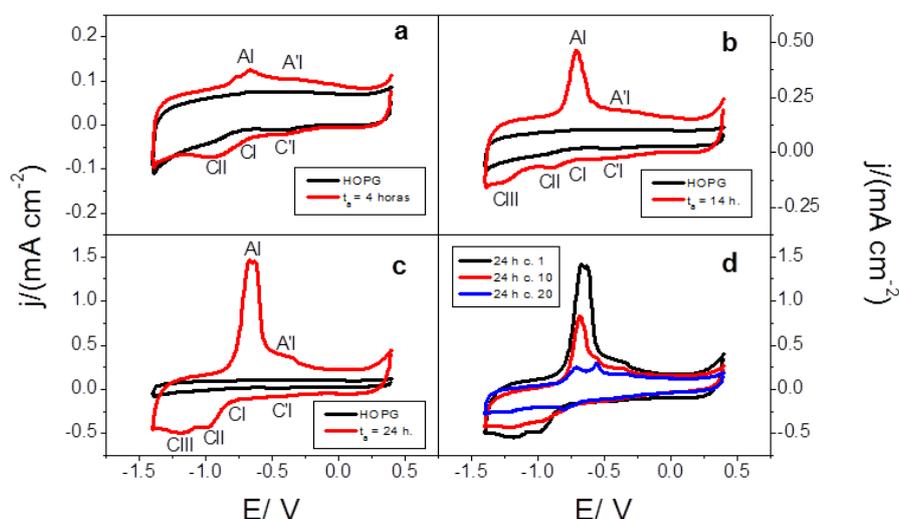
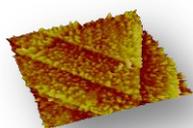


Figura IV.3.9. Ciclovoltamogramas registrados en NaOH $0,1$ M a $0,2$ V s^{-1} de HOPG (en color negro) y del mismo sustrato tras la electrodeposición de melanina (en color rojo) para diferentes tiempos de adsorción: (a) $t_a = 4$ horas, (b) $t_a = 14$ horas y (c) $t_a = 24$ horas. El panel (d) muestra varios ciclos sucesivos registrados para una película de melanina de 24 horas en NaOH $0,1$ M y a $0,2$ V s^{-1} : ciclo 1 (color negro), ciclo 10 (color rojo) y ciclo 20 (color azul).

De forma análoga se ha podido detectar la respuesta electroquímica de películas de melanina-hierro de diferentes tiempos de adsorción en solución TRIS a pH 7,4, ver Figura IV.3.10. Los resultados obtenidos se han representado en la figura IV.3.10a para su comparación con los registrados en NaOH $0,1$ M, fig. IV.3.10b. Como se ha dicho, los electrodeósitos de melanina-hierro referidos son, por tanto, electroquímicamente activos en un amplio rango de potenciales y pHs. Con objeto de poder discernir entre las posibles contribuciones debidas a la heterogénea composición de estas películas de melanina sobre HOPG, se procedió a la síntesis de películas de



quinona/ hidroquinona, libres tanto del hierro coordinado en la melanina como del que se encuentra en forma de óxido, sobre HOPG. Estos depósitos se prepararon de acuerdo al mismo procedimiento electroquímico empleado para la síntesis de las películas de melanina pero partiendo, en este caso, del resultado de la polimerización oxidativa de hidroquinona en NaOH 0,1 M.³⁰ Su respuesta electroquímica, obtenida en las mismas condiciones experimentales que las de las películas de melanina, se muestra en las figuras IV.3.10c-d.

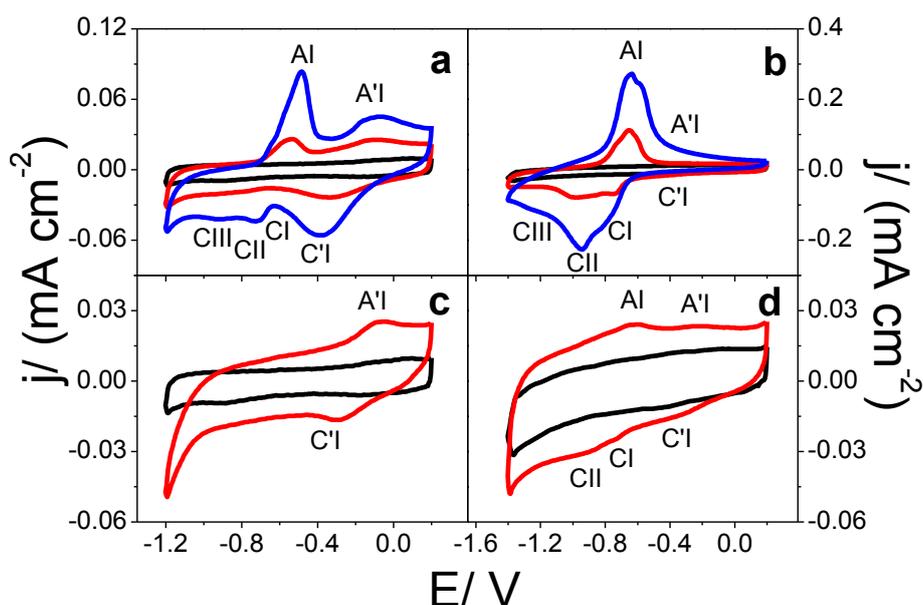
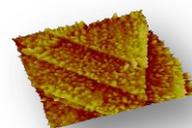


Figura IV.3.10. Voltamogramas estabilizados para películas de melanina sobre HOPG de diferentes tiempos de adsorción: HOPG, $t_a = 0$ (color negro), $t_a = 4$ horas (color rojo) y $t_a = 8$ horas (color azul). (a) Tampón TRIS a pH 7,4 y (b) NaOH 0,1 M. Ciclovoltamogramas de HOPG (color negro) y película de quinona/ hidroquinona sobre HOPG (color rojo). (c) Tampón TRIS a pH 7,4 y (d) NaOH 0,1 M. Velocidad de barrido: $0,2 \text{ V s}^{-1}$.

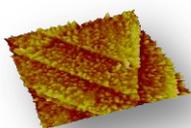
Por tanto, tal y como se desprende de la comparación de los picos voltamétricos exhibidos por unas y otras a distintos pHs en los gráficos mostrados, se puede concluir que la pareja de picos voltamétricos A'1/ C'1 presente en los depósitos de melanina debe ser asignada al par redox quinona/ hidroquinona. De hecho, no es sólo responsable de la pareja reversible A'1/ C'1 sino que también, especialmente en medio alcalino, contribuye en el rango de potenciales de los picos A1/ C1 y CII, fig. IV.3.10d. En cualquier caso, existen evidencias en la bibliografía que permiten confirmar tal aseveración. Así, ciertos derivados de antraquinona muestran un potencial de $-0,2 \text{ V}$ (vs. Ag/ AgCl) a pH



7,0 y un desplazamiento de esta señal voltamétrica en 0,03 V/ unidad de pH en dirección catódica para valores de pH superiores a 7.³¹ Por lo tanto, cabría esperar un valor próximo a -0,4 V a pH 12,6. En esta misma línea de razonamiento, los datos voltamétricos medidos para el sistema quinona/hidroquinona inmovilizado covalentemente sobre una monocapa autoensamblada (SAM) de tioles sobre Au a pH 12,6 muestran una pareja rédox reversible a -0,3/ -0,4 V.³² Sin embargo, también hay que tener en cuenta que la oxidación/ reducción de tintes de antraquinona originan, en soluciones alcalinas, además un pico anódico y dos picos catódicos en el rango de potenciales donde aparecen AI/ CI y CII.³³

Como ya se ha comentado, en la medida en que el tiempo de adsorción aumenta, se produce un progresivo incremento en la pareja rédox A'I/ C'I mientras que, paralelamente, tiene lugar un marcado aumento del pico voltamétrico AI, acompañado de los picos catódicos CI, CII y CIII, fig. IV.3.9a-c y fig. IV.3.10a-b. Sin embargo, cuando el crecimiento de la película de melanina, en este caso de 24 horas, Figura IV.3.11, se lleva a cabo a partir de soluciones de melanina que contienen EDTANa₂, fig. IV.3.11a, con objeto de quelar las especies de hierro presentes en la misma, entonces el pico AI decrece significativamente, registrándose un perfil voltamétrico análogo al mostrado en la fig. IV.3.9a.

Por tanto, el marcado incremento de los picos AI/CI-CIII con el tiempo de adsorción se debe en mayor medida a la acumulación/ concentración de especies de hierro, es decir, tanto del que se encuentra coordinado en la estructura orgánica de la melanina como del que se halla en forma de óxidos de hierro, que son electroquímicamente activas, más que al propio crecimiento de la película de melanina. De hecho, los resultados de las medidas realizadas por XPS en películas de distintos tiempos de adsorción, mostrados en las fig. IV.3.3a-b, sustentan este argumento. Así, mientras que la señal de N 1s se ve incrementada sólo ligeramente con el tiempo de adsorción, la señal de Fe 2p experimenta un drástico aumento en intensidad al pasar de $t_a = 4$ horas a $t_a = 24$ horas. En este sentido, la aportación de especies de óxidos de hierro a la voltametría cíclica de los electrodeósitos de melanina-hierro se pudo



demostrar igualmente por comparación con los voltamogramas registrados para multicapas de $\text{Fe}(\text{OH})_2$ sobre HOPG obtenidos por inmersiones repetitivas del este sustrato en una solución 2 mM FeSO_4 y su precipitación en solución alcalina,³⁴ fig. IV.3.11b. Estas multicapas muestran anchos picos voltamétricos asociados a los pares rédox Fe/Fe^{+2} y $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ en la zona de potenciales entre -0,6 y -1,2 V, coincidentes con los picos voltamétricos AI/ CI- CIII.

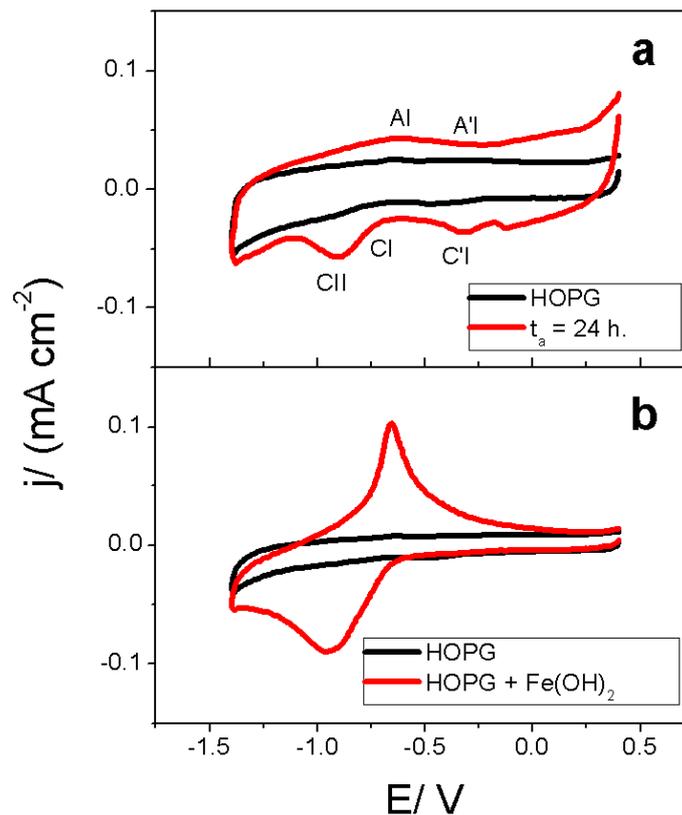
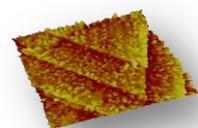


Figura IV.3.11. Ciclos voltamétricos en NaOH 0,1 M: (a) película de melanina crecida sobre HOPG durante 24 horas a -1,0 V en $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de melanina + 20 mM de EDTANa_2 en NaOH 0,1 M y (b) Multicapas de $\text{Fe}(\text{OH})_2$ sobre HOPG tras inmersión en 2 mM de FeSO_4 .³⁴ Velocidad de barrido: $0,2 \text{ V s}^{-1}$.

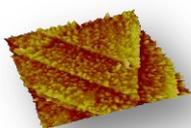
En resumen, nuestros resultados demuestran que los electrodepositos de melanina sintetizados son electroquímicamente activos en un amplio rango de potenciales y pHs. La pareja rédox reversible, A'I/ C'I, que aparece a -0,15/ -0,30 V, fig. IV.3.10a y c, corresponde al par rédox quinona/ hidroquinona presente en el biopolímero. Por su parte, el resto de los picos voltamétricos localizados entre -0,5/ -1,0 V, esto es AI/ CI-CIII, pueden ser asignados a las



diferentes contribuciones de especies férricas, es decir, óxidos de hierro por un lado y, por otro, especies de Fe(II)/ Fe(III) coordinadas en protomoléculas de melanina,³⁵ para las que se ha propuesto que alrededor de cuatro unidades indólicas se coordinan con un único átomo de hierro.³⁶ Como era de esperar en medios fuertemente alcalinos, el par rédox A¹/ C¹ se desplaza en dirección catódica definiendo dos ondas voltamétricas a -0,3/ -0,4 V y a -0,5/ -0,9 V que se solapan en cierta medida con los picos voltamétricos correspondientes al comportamiento rédox de diversas especies de hierro, esto es, A¹/ C¹-C^{III}, fig. IV.3.9a-c, IV.3.10b y IV.3.11b.

La intensidad de los picos voltamétricos y la carga implicada en los mismos aumenta marcadamente con el tiempo de deposición, indicando así un progresivo incremento en el cubrimiento superficial del sustrato de HOPG. Este hecho está de acuerdo con los datos obtenidos por XPS y por FTIR. Se debe tener en cuenta que la densidad de carga implicada en el pico voltamétrico A¹ para una película de 8 horas sobre HOPG es equivalente a la que se obtendría en un electrodeposición de 2 horas sobre Au(111). Por tanto, la velocidad de electrodeposición de melanina es mucho menor en una superficie tan hidrófoba como resulta ser el plano basal del HOPG.

Por último, nótese que el ciclado electroquímico continuado en el rango de potenciales comprendido entre -0,4 y -1,4 V trae como consecuencia la progresiva desorción del electrodeposición de melanina-hierro del sustrato de HOPG, fig. IV.3.12, siendo este hecho especialmente relevante en el caso de las especies implicadas en los picos voltamétricos A¹/ C¹-C^{III}, ver fig. IV.3.9d. De hecho el valor de la densidad de carga correspondiente al pico A¹ pasó de prácticamente 1,5 hasta 0,1 mC cm⁻² en tan sólo 20 ciclos a 0,2 V s⁻¹. Las imágenes tomadas por AFM antes (fig. IV.3.12a) y después (fig. IV.3.12b) del ciclado electroquímico en una película de 24 horas indican que la electrodesorción ocurre mayoritariamente en las zonas de terraza, quedando aún islas ramificadas adsorbidas en los escalones y defectos del HOPG basal.



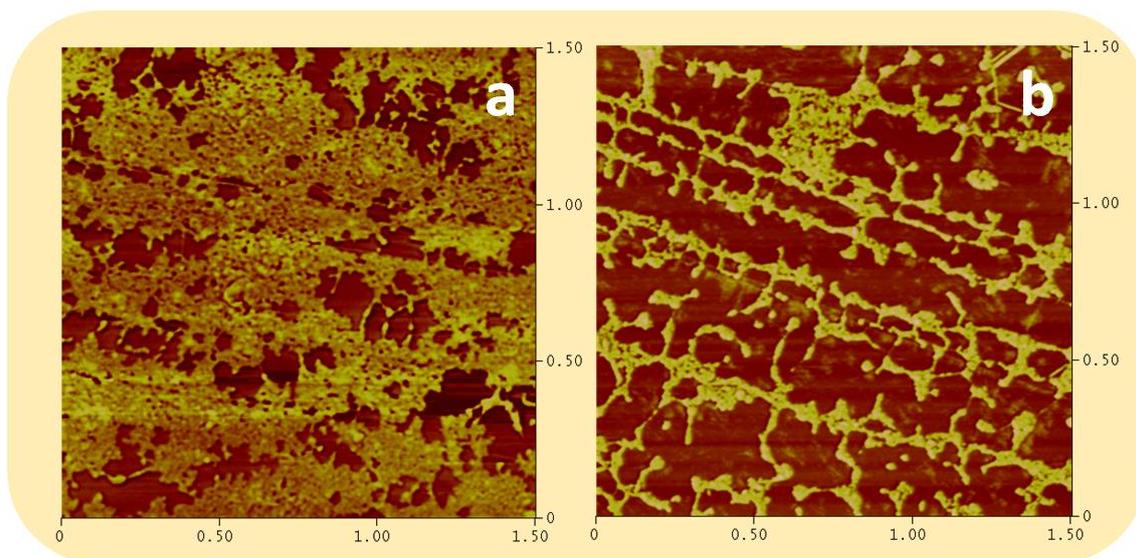
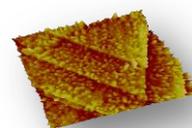


Figura IV.3.12. Imágenes AFM de contraste de fase de $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$ de películas de melanina de $t_a = 24$ horas: antes (a) y después (b) de 20 ciclos entre 0,4 y -1,4 V a $0,2 \text{ V s}^{-1}$ en NaOH 0,1 M.

Así, en la fig. IV.3.12b, se aprecia que los gránulos de melanina están todavía presentes en los escalones del HOPG, indicando, por tanto, que los allí ubicados son más difíciles de desorber y que los gránulos que aún permanecen en las zonas de terraza están, de hecho, conectados al biopolímero que se encuentra sobre los escalones.

Por tanto, tomando en consideración los resultados mostrados hasta el momento, se puede concluir que el ciclado electroquímico da lugar a la pérdida de cantidades significativas de especies de óxidos de hierro presentes en las películas. En esta misma línea de razonamiento se ha monitorizado la evolución del contenido en hierro de películas de melanina sumergidas en soluciones acuosas 1 mM de Na_2SO_4 a pH 9,0 por medio de la disminución en la densidad de carga implicada en el pico voltamétrico AI, toda vez que éste constituye una buena medida de la cantidad de hierro presente en los electrodepósitos. A tal fin, se sumergió una película de melanina de 24 horas en una solución 1 mM de Na_2SO_4 a pH 9,0 durante crecientes periodos de tiempo (t_i). Una vez concluido el tiempo de cada inmersión, el sustrato de HOPG se coloca en una celda electroquímica con NaOH 0,1 M y se registran los correspondientes voltamogramas. Una vez hecho esto, la muestra es de nuevo sumergida en la disolución 1 mM de Na_2SO_4 otro tiempo de inmersión



diferente y así sucesivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura IV.3.13:

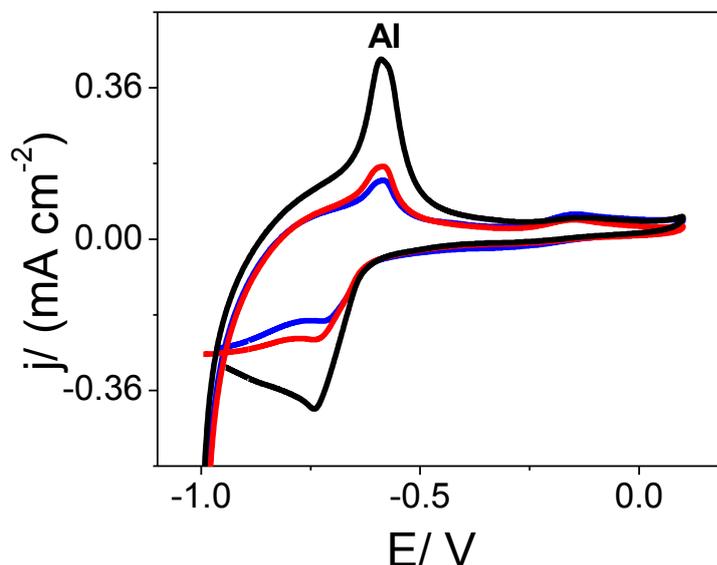
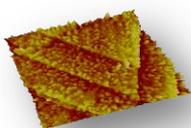


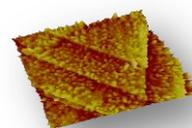
Figura IV.3.13. Ciclovoltamogramas registrados en NaOH 0,1 M a $0,025 \text{ V s}^{-1}$ para una película de melanina de 24 horas después de ser sumergida en solución 1 mM de Na_2SO_4 a pH 9,0 durante diferentes tiempos de inmersión (t_i): $t_i = 0$ en color negro, $t_i = 10$ minutos en color rojo y $t_i = 90$ minutos en color azul.

Tal y como se aprecia en la fig. IV.3.13, tiene lugar un rápido descenso en la densidad de carga asociada al pico anódico Al en los primeros 10 minutos de inmersión. Sin embargo, para t_i mayores a los 10 minutos iniciales se alcanza un valor de densidad de carga que prácticamente permanece inalterado aún cuando se incrementa el tiempo de inmersión. En cualquier caso, debe tenerse en cuenta que la carga implicada en el pico Al es, en todos los casos descritos en la figura IV.3.13, siempre mayor que la que se ha podido detectar para las películas de melanina crecidas tanto en presencia de EDTANa_2 , fig. IV.3.11a, como en el caso de las primeras etapas de formación de estos electrodepositos, $t_a = 4$ horas, fig. IV.3.9a. Esto significa que algunas especies de hierro están más fuertemente enlazadas a la película de melanina y, de hecho, permanecen retenidas en la superficie incluso después de varios ciclos electroquímicos consecutivos. Los datos de XPS para estas muestras exhiben una relación Fe/ N entre 0,1 y 0,2. Por tanto, se puede concluir la existencia, en estos electrodepositos de melanina, de dos entornos diferentes de hierro, es



decir, por un lado tendríamos especies de hierro débilmente enlazadas en las películas correspondientes a nanopartículas de óxidos de hierro y , por otro, mucho más fuertemente ligadas, especies Fe(II)/ Fe(III) coordinadas en la melanina.

Conocida la capacidad de las melaninas de atrapar cantidades significativas de iones metálicos en su estructura,^{23,37} se decidió evaluar la habilidad de estas películas de melanina sobre HOPG para actuar como biosensores químicos. En este sentido se desarrolló la siguiente experiencia: una película de melanina de $t_a = 24$ horas sobre HOPG que sólo contiene las especies de hierro fuertemente enlazadas al biopolímero y que, por tanto, previamente se ha sumergido durante al menos 90 minutos en 1 mM de Na_2SO_4 a pH 9,0, fig. IV.3.13 en color azul, es puesta en contacto con una disolución 1 mM de CuSO_4 a pH 9,0 durante diferentes tiempos de inmersión (t_i). Hecho esto, la muestra se lava cuidadosamente con abundante agua milli-Q y se habilita como electrodo de trabajo en una celda electroquímica con NaOH 0,1 M como electrolito de forma que se pueda registrar su respuesta electroquímica tras permanecer cantidades variables de tiempo en contacto con iones Cu(II). Los resultados de las medidas comentadas se han representado en la Figura IV.3.14a-c. Obviamente, también se realizaron experiencias equivalentes sobre HOPG sin modificar que hicieron las veces de blanco, fig. IV.3.14d.



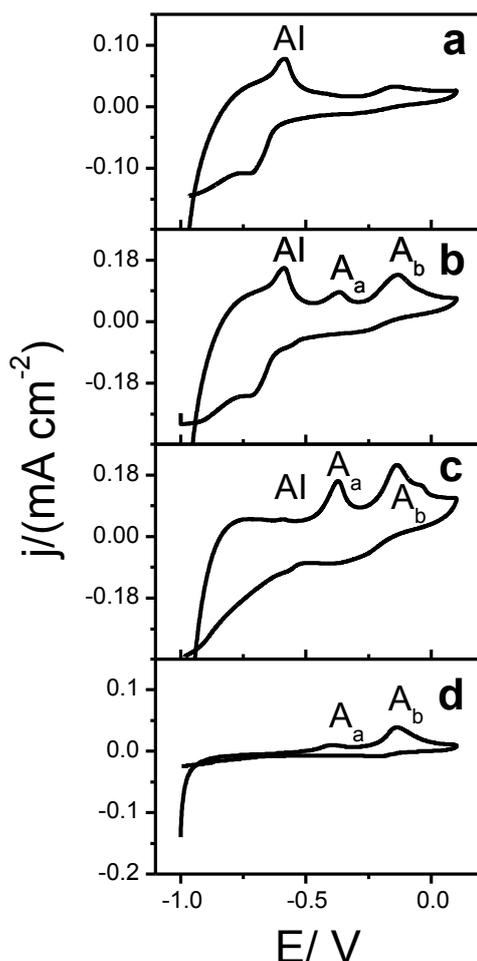
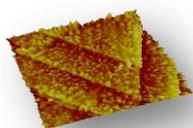


Figura IV.3.14. Voltamogramas registrados en NaOH 0,1 M a $0,025 \text{ V s}^{-1}$ para una película de melanina de $t_a = 24$ horas sobre HOPG después de ser sumergida durante diferentes tiempos de inmersión en solución 1 mM CuSO_4 a pH 9,0 y lavar cuidadosamente con agua milli-Q: $t_i = 0$ (a), $t_i = 30$ minutos (b) y $t_i = 150$ minutos (c). La muestra se mantuvo 1 minuto a -1,0 V en NaOH 0,1 M antes de comenzar el barrido anódico. Voltametría cíclica de HOPG en NaOH 0,1 M a $0,025 \text{ V s}^{-1}$ tras 150 minutos de inmersión en 1 mM CuSO_4 a pH 9,0 (d).

Mientras que el blanco de HOPG sin modificar exhibe pequeñas corrientes anódicas asociadas a la formación de los correspondientes óxidos de Cu: Cu_2O (A_a) y CuO (A_b),³⁸ fig. IV.3.14c, la película de melanina muestra un marcado descenso en la carga implicada en el pico anódico Al acompañado de un progresivo incremento en los picos A_a y A_b en la medida en que avanza el tiempo de inmersión, fig. IV.3.14a-c. En cualquier caso, es claro que las densidades de cargas correspondientes a los picos A_a y A_b en el caso de la



película de melanina son notablemente superiores a las implicadas en los mismos en el caso de la superficie del HOPG sin modificar.

Por otro lado, tal y como se aprecia en la Figura IV.3.15, la velocidad de incorporación de especies iónicas de Cu a las películas de melanina varía fuertemente con la concentración de CuSO_4 presente en la disolución. En tal figura se han mostrado los valores de densidad de corriente anódica registrados en el pico voltamétrico A_b asociado a CuO , j_{A_b} , obtenidas a partir de los voltamogramas registrados en NaOH 0,1 M después de la incubación tanto en 0,1 como en 1 mM de CuSO_4 , a pH 9,0.

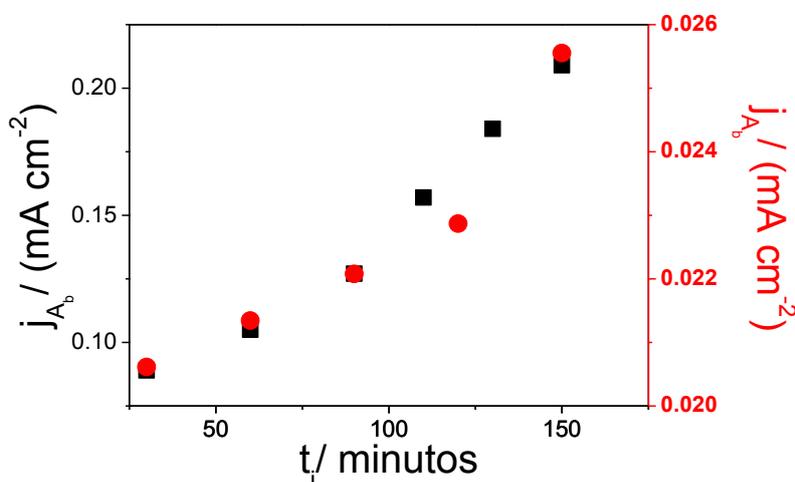
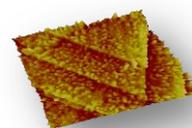


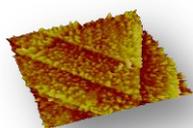
Figura IV.3.15. Densidades de corriente del pico A_b , j_{A_b} , en películas de melanina de 24 horas sobre HOPG frente al tiempo de incubación en 0,1 mM (círculos rojos) y 1 mM (cuadrados en color negro) de CuSO_4 a pH 9,0.

Tales acontecimientos se justifican de la siguiente manera: el plano basal del HOPG posee en su superficie, en escalones y defectos, grupos funcionales que contienen fundamentalmente oxígeno e hidrógeno³⁹ y que son capaces de inmovilizar pequeñas cantidades de especies iónicas de Cu. Estas especies son, a su vez, reducidas a Cu metálico cuando la muestra se mantiene durante un minuto a -1,0 V en NaOH 0,1 M (potencial de inicio del ciclado electroquímico mostrado en la fig. IV.3.14), después de permanecer diferentes tiempos de inmersión en 0,1 o en 1 mM de CuSO_4 , pH 9,0. Este Cu metálico es ahora reoxidado durante el barrido anódico obteniéndose así los correspondientes óxidos de Cu: Cu_2O (A_a) y CuO (A_b). Por otro lado, la



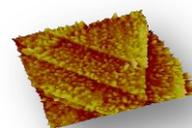
electrodeposición de melanina sobre la superficie del HOPG introduce cantidades notablemente mayores de estos grupos funcionales (quinonas, hidroquinonas, carbonilos, ácido carboxílicos, etc.) que los que pudiera haber sobre el plano basal, de forma que las densidades de carga implicadas en los picos asociados a los óxidos de Cu en los electrodeósitos aumenta drásticamente si se compara con las registradas para el HOPG sin modificar.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto hasta el momento, el mecanismo que se propone para la formación potencioestática a $-1,0$ V de estas películas de melanina sobre HOPG se explica a continuación. El primer paso implica la adsorción de las moléculas de protomelanina y de pequeños oligómeros de melanina presentes en la solución de NaOH 0,1 M, en forma de quinol (modo reducido), sobre el plano basal del HOPG en una configuración plana que permitiera maximizar las interacciones electrónicas con los orbitales π del HOPG. Esta adsorción es más fácil en los defectos de la superficie del sustrato debido a la posibilidad de establecer puentes de hidrógeno entre los grupos R-OH del biopolímero y los grupos funcionales (derivados de la oxidación del carbono) presentes, como se ha dicho, en escalones, bordes y defectos y que hacen del plano basal del HOPG una superficie más activa.³⁹ Después del proceso de nucleación, el electrodeósito de melanina crece lentamente con el tiempo de adsorción sobre las terrazas del HOPG, ver fig. IV.3.1. La diferencia en la velocidad de deposición observada en la síntesis de estas películas de melanina cuando se hacen crecer sobre el plano basal del HOPG, superficie altamente hidrofóbica e inerte, o sobre Au(111),^{21,22} se justifica por la muy superior cantidad de sitios activos de nucleación presentes en la superficie metálica en comparación con la del HOPG. Por su parte, la morfología de islas ramificadas detectada en los electrodeósitos se asemeja poderosamente a patrones de agregación difusionales ramificados.⁴⁰ De hecho, es perfectamente factible que bien monómeros, protomoléculas o pequeños oligómeros de melanina se vayan incorporando a las islas bajo control difusional, de forma que tienen más opciones de ser capturados por las protuberancias de las islas, dando lugar así a patrones ramificados.



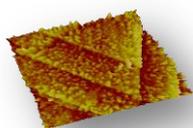
Una vez se ha formado el electrodeposición de melanina sobre el HOPG, el anteriormente hidrófobo y bastante inerte plano basal pasa a ser, tras la modificación, una superficie repleta de grupos R-OH y demás grupos funcionales oxigenados capaces de atrapar especies de hierro. De hecho, en las primeras cuatro horas de adsorción sólo resulta posible detectar trazas de hierro, fig. IV.3.3b. Sin embargo, en la medida en que aumenta el tiempo de adsorción, la cantidad de hierro presente en las películas aumenta considerablemente. A la vista de los espectros XPS, fig. IV.3.3, y de los ciclovoltagramas, fig. IV.3.9 y IV.3.10, el hecho de que el N y el Fe ofrezcan cinéticas de incorporación a las películas significativamente diferentes indica que la mayoría del Fe presente en las mismas no se debe a especies de hierro coordinadas en la melanina ya que, en ese caso, ambos elementos exhibirían dependencias entre la concentración superficial y el tiempo de adsorción similares. Lo que, como se ha visto, no es así. Por lo tanto, parece razonable asumir que la mayoría del hierro que queda retenido en las películas tiene su origen en la incorporación de nanopartículas de óxido de hierro producidas, a su vez, por la coprecipitación de especies de Fe(II)/ Fe(III), presentes en el polvo de eumelanina sintética. De hecho, es bien sabido que la coprecipitación de Fe(II)/ Fe(III) en NaOH da como resultado la formación de partículas de óxidos de hierro de talla nanométrica.⁴¹ Estas nanopartículas de óxidos de hierro son, por tanto, los gránulos brillantes mostrados en las imágenes de AFM, fig. IV.3.1d, SEM, fig. IV.3.7, y analizadas por EDX, fig. IV.3.8b, que, además, corresponden al hierro débilmente enlazado detectado en las experiencias mostradas en las fig. IV.3.13 y IV.3.14.

Las nanopartículas de óxidos de hierro tienen un punto isoeléctrico de 7,5, por lo que, a pH 12,6 al que se sintetizan las películas, aparecen cargadas negativamente.⁴² Por lo tanto, parece razonable asumir que estas nanopartículas están formadas por un núcleo de hierro metálico, de óxidos de Fe(II) o de Fe₃O₄ que exponen sus grupos Fe-O⁻ hacia la solución acuosa alcalina. Estos grupos son capaces, por su parte, de formar enlaces de hidrógeno con los grupos quinol presentes en el depósito de melanina. En este sentido, se ha descrito en la bibliografía que, de hecho, es posible recubrir



nanopartículas de óxidos de hierro con dextrano mediante el establecimiento de enlaces de hidrógeno entre grupos hidroxilo⁴³ y, además, el pK_a de los índoles se ha establecido en 16,97.⁴⁴ Incluso se han podido detectar, en este caso mediante el estudio de curvas de fuerzas por AFM, enlaces bastante estables entre citocromos C de origen bacteriano y óxidos de hierro presentes en una punta AFM, que facilitan la transferencia electrónica a iones hierro durante la respiración anaeróbica.⁴⁵ Por otro lado, como se ha dicho, las melaninas naturales son capaces de atrapar cantidades apreciables de iones metálicos, hierro entre ellos, de forma que los tejidos que poseen melanina proporcionan un intenso contraste en las imágenes obtenidas por resonancia magnética.⁴⁶ Así, el confinamiento de partículas de óxidos de hierro en células o tejidos marcados, produciría como consecuencia una significativa amplificación de la señal. Las películas de melanina son, por tanto, capaces de concentrar estas nanopartículas de óxidos de hierro sobre la superficie del HOPG, lo que explicaría el drástico aumento en el recubrimiento superficial del sustrato por parte del electrodeposición observado en las imágenes AFM, fig. IV.3.1c y d. Como se ha comentado, el ciclado electroquímico de las películas de $t_a = 24$ horas desencadena la desorción de, fundamentalmente, estas nanopartículas de óxidos de hierro, toda vez que el depósito final obtenido tras el ciclado se asemeja, tanto en morfología, fig. IV.3.12b, como en comportamiento electroquímico, fig. IV.3.9d, a las películas de melanina de $t_a = 4$ horas, fig. IV.3.1a y IV.3.9a, respectivamente, donde el biopolímero domina frente a la presencia de especies de hierro. Por otro lado, la más reducida fracción de especies de hierro, más fuertemente enlazada al biopolímero, puede ser asignada a iones hierro coordinados a la estructura orgánica de la melanina.^{22,36}

Por otro lado, estas películas son capaces de atrapar iones Cu en su estructura cuando son puestas en contacto con soluciones que los contengan, fig. IV.3.14. Cabe decir que se ha descrito que, en las melaninas, los iones Cu^{+2} y Fe^{+3} comparten sitios de enlace, esto es, se coordinan a especies tipo catecol (cat).⁴⁷ En este sentido, se debe destacar que la constante de afinidad para el sistema melanina-Cu es mayor que la del melanina-Fe⁴⁸ y, de hecho, a



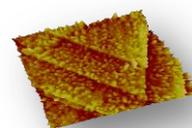
pH 9,0, tiene lugar la formación²³ del complejo $[\text{Cu}(\text{cat})_2]^{-2}$. En los últimos tiempos es frecuente en el tratamiento de melanomas el uso de fármacos que contienen Cu.^{20,49} En esta línea de razonamiento, el sistema melanina-hierro podría ser considerado como un modelo válido para estudiar y caracterizar las interacciones existentes entre melanina-hierro y fármacos que contuvieran Cu.

IV.3.2.1. Caracterización de sitios de Fe en la melanina

Con la intención de definir la naturaleza del hierro presente en la eumelanina se ha llevado a cabo su caracterización por medio de medidas de estructura de absorción de rayos X (XAFS) sobre muestras de la eumelanina sintética empleada en todas nuestras experiencias y, para su comparación, de distintas muestras de variados óxidos de hierro. Tales acciones tienen como objetivo último el establecer las concentraciones relativas de Fe(II)/Fe(III) y, además, definir el entorno local de éstos en la eumelanina, esto es, simetría, coordinación, distancias atómicas y densidad de iones hierro.

En capítulos precedentes ya se recurrió a medidas de la estructura de absorción de rayos X próxima al umbral, XANES, con la intención de obtener información precisa acerca del estado de oxidación de los iones hierro y su simetría. En la Figura IV.3.16a se han representado los espectros XANES de la eumelanina sintética y de tres compuestos de óxidos de hierro empleados como referencia. Los resultados de tales espectros son consistentes, en el caso de la melanina, con la presencia de iones hierro en una alta simetría, es decir, en este caso iones Fe octaédricamente coordinados.⁵⁰

Como una primera aproximación para definir un estado de oxidación promedio para las especies de hierro presentes en la melanina se estableció una relación lineal con los aumentos de energía del umbral K del Fe respecto al Fe⁰ metálico utilizando para ello los mismos óxidos de hierro que se tomaron como referencia en los espectros anteriores, fig. IV.3.16b.⁵¹ Llegados a este punto, se debe añadir que la relación Fe(II)/ Fe(III) en la melanina se estableció a partir del desplazamiento del umbral K del Fe en el espectro de adsorción, asumiendo la presencia en la muestra de únicamente dos estados de oxidación para el hierro, es decir, +3 y +2.²²



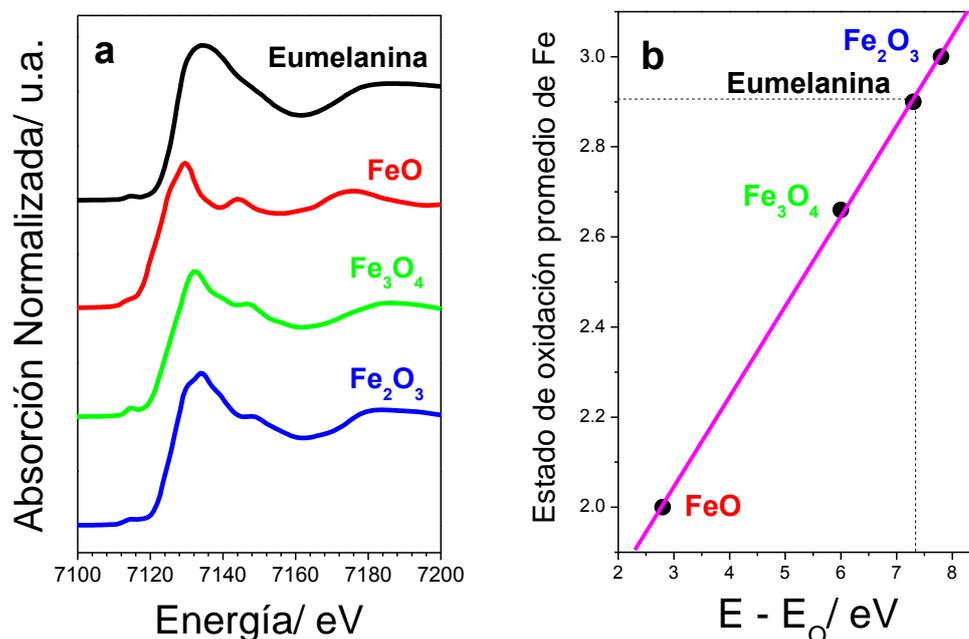
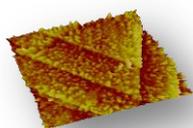


Figura IV.3.16. (a) Espectros XANES de la muestra de eumelanina sólida (color negro) y de los óxidos de hierro usados como referencia: FeO (color rojo), Fe₃O₄ (color verde) y Fe₂O₃ (color azul). (b) Aumentos de energía del umbral K del Fe de las distintas muestras (E) respecto al Fe⁰ metálico (E_0). Los óxidos de Fe se toman como referencia para la calibración del estado de oxidación promedio.

Por tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos conforme a los procedimientos descritos, se puede concluir que el desplazamiento de energía del umbral K del Fe en el espectro XANES de absorción en la muestra de melanina, de 7,3 eV, ver fig. IV.3.16b, implicaría necesariamente una relación Fe(II)/ Fe(III), en la melanina, de 1/ 9.

Por su parte, las experiencias realizadas por estructura fina de absorción de rayos X (EXAFS) nos permitieron establecer la estructura del entorno más inmediato de los iones Fe presentes en la muestra de eumelanina sintética. El análisis de los datos de EXAFS se realizó de acuerdo al método de filtrado de Fourier.⁵² Como ya se ha dicho, el análisis de la región XANES próxima al umbral permite asumir para el Fe en la melanina un entorno octaédrico distorsionado equivalente al que exhibe el Fe en el Fe₂O₃, ver fig. IV.3.16 a. Por tanto, la primera esfera de coordinación del Fe se puede representar por un



único átomo de Fe en un arreglo estructural distorsionado pero similar al del Fe en el Fe_2O_3 , con una longitud de enlace bien definida.

Así, en la Figura IV.3.17 se han representado las transformadas de Fourier de los datos experimentales de las oscilaciones de estructura fina, EXAFS, por encima del umbral obtenidos para la melanina y de la correspondiente a la función ajustada considerando una primera esfera de coordinación con seis átomos de oxígeno y una segunda de átomos de Fe.

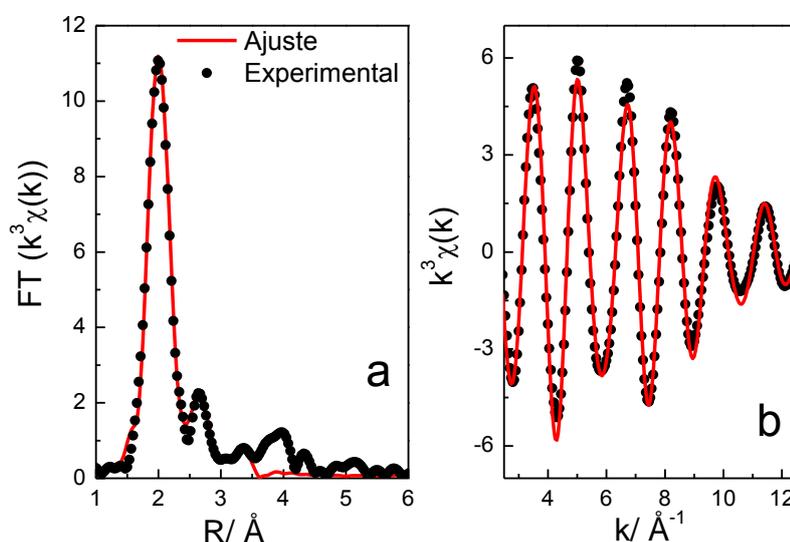
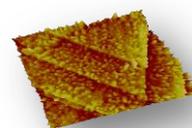


Figura IV.3.17. (a) Transformada de Fourier de los datos experimentales de EXAFS obtenidos para la melanina (círculos) y la correspondiente a la función ajustada (línea roja) considerando una primera esfera de coordinación con seis átomos de oxígeno y una segunda de átomos de Fe. (b) Transformada de Fourier de los datos experimentales obtenidos para la melanina (círculos) filtrados en la región de 1-4 \AA^{-1} y la correspondiente a los datos ajustados (línea roja).

En este sentido, en la Tabla IV.3.2 se han dispuesto los parámetros EXAFS para la primera esfera de coordinación para cada tipo de átomo vecino (Fe y O):



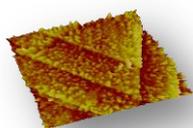
Esfera de coordinación	Número de coordinación promedio	Distancia radial/ Å	Factor Debye-Waller/ Å ²
O ₁	4.2 ₁	2.00 ₅	0.008 ₁
O ₂	1.6 ₃	2.18 ₅	0.008 ₁
Fe ₁	0.6 ₅	2.81 ₅	0.004 ₃
Fe ₂	0.5 ₅	2.95 ₅	0.004 ₃
Fe ₃	0.3 ₅	3.24 ₅	0.004 ₃

Tabla IV.3.2. Parámetros EXAFS para la primera esfera de coordinación para cada tipo de átomo vecino (Fe y O).

De acuerdo a estos resultados, la estructura más probable para el Fe en la melanina consiste en un único átomo de Fe coordinado a tres pares de átomos de oxígeno como vecinos más próximos. De hecho, en estudios previos se han asignado dos pares de estos oxígenos a dos estructuras tipo quinonas.³⁶ El par restante de átomos de oxígeno se atribuye a la hidratación de la muestra, fuera del plano definido por las estructuras tipo quinona. En nuestro caso, la longitud del enlace Fe-O de 2,18 Å, registrado para los oxígenos de hidratación, resulta ser aproximadamente 0,2 Å mayor que la de los cuatro átomos de oxígeno correspondientes a las estructuras tipo quinona enlazados al Fe, ver Tabla IV.3.2.

Por último, otro punto destacable de las medidas realizadas por EXAFS corresponde a la coordinación del átomo de Fe con otros iones Fe próximos. Así, conforme a los valores del número de coordinación promedio, incluso aunque éstos no se correspondan con los exhibidos por el Fe en las estructuras cristalinas de óxidos de hierro, los centros Fe aparecen enlazados con otros átomos de Fe, formando, por tanto, clústeres de melanina con más de un ión de hierro.

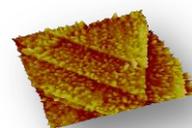
En resumen, los resultados de XPS, FTIR, XANES y EXAFS mostrados hasta ahora demuestran que el electrodepósito granular contiene fundamentalmente grupos quinona/ semiquinona/ hidroquinona y complejos oxo-hidróxidos de melanina-hierro de simetría octaédrica. Además, las medidas realizadas por AFM, SEM y EDX confirman igualmente la presencia en estas películas de especies de óxidos de hierro. El electrodepósito obtenido es, en cualquier caso, activo electroquímicamente en un amplio rango de potenciales y de pHs.



IV.3.2.2. Propiedades magnéticas de las películas de melanina sobre HOPG

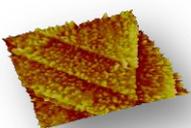
Como ya se ha descrito en capítulos precedentes, los electrodepósitos de eumelanina muestran propiedades magnéticas que resultan de gran interés desde el punto de vista de la dependencia existente entre éstas y, por un lado, la complejidad estructural y, por otro, la variabilidad en cuanto a la composición química exhibida por estas películas en función del tiempo de adsorción y del sustrato elegido para la síntesis electroquímica. En este sentido cabe destacar que existen en la bibliografía distintos estudios en los que se describe someramente el comportamiento magnético de melaninas procedentes de diferentes fuentes.^{53,54} Así, se ha postulado que las melaninas naturales, en virtud de su persistente señal de resonancia de espín-electrón (*ESR*), contienen una mezcla de toda una suerte de especies radicalarias que tienen su origen en los derivados de orto-semiquinonas y orto-quinonas que constituyen las melaninas y que dan como resultado gránulos paramagnéticos.⁵³

Especial atención merecen las experiencias descritas en la ref. [54] donde el momento magnético registrado para una eumelanina sintética preparada por oxidación enzimática (tirosinasa) de dopamina en presencia de especies oxohidróxidos de hierro y, por tanto, equivalente a la empleada en nuestros experimentos, no se puede explicar recurriendo únicamente a los iones hierro quelados en la matriz orgánica como iones paramagnéticos individuales. Los autores defienden, en cambio, un modelo basado en la presencia de pequeños gránulos superparamagnéticos donde todos los espines se alinean paralelamente: acoplamiento ferromagnético de clústeres de Fe^{+3} . Estos gránulos superparamagnéticos habrían de convivir con una fuerte contribución paramagnética debido a aquellos iones hierro libres del acoplamiento ferromagnético. Estas estructuras magnéticas bien definidas permiten explicar el fuerte momento magnético que exhibe esta eumelanina sintética en comparación a la neuromelanina de origen humano objeto del estudio. Estos resultados adquieren una gran relevancia si se tiene en cuenta que, cuando se aísla este pigmento a partir de pacientes afectados por la enfermedad de



Parkinson, la magnetización total registrada para la muestra es significativamente menor que la que se ha podido detectar en las neuromelaninas de control. Este hecho se relaciona con una progresiva migración de iones Fe^{+3} desde sus sitios de almacenamiento en la neuromelanina al citosol.

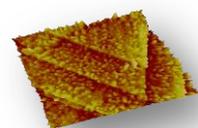
En este contexto cabe comentar que la microscopía de fuerzas magnéticas (MFM) ha sido ampliamente utilizada en los últimos tiempos en el estudio y caracterización de la nano y microestructura magnética y, adicionalmente, en la estimación del momento magnético de una amplia variedad de materiales. Entre éstos destacarían los dispositivos magnéticos de almacenamiento de información, nanopartículas de Co y de Fe, códigos de barras de Cu-Ni, bacterias magnetotácticas, imanes moleculares, etc.⁵⁵ Como ya se ha descrito previamente, las medidas de MFM se llevan a cabo mediante el uso de una punta con recubrimiento ferromagnético de CoCr que, por cada línea de la imagen, se hace pasar en dos ocasiones por encima de la muestra con objeto de aislar las interacciones de largo alcance como son las de origen magnético de aquellas de corto alcance, van der Waals fundamentalmente. Así, durante el primer barrido de la punta, se registra la topografía de la muestra. En el segundo, denominado modo *lift*, la punta es elevada sobre la muestra una altura determinada, comprendida normalmente entre 20 y 50 nm, reproduciendo la topografía registrada en el primer barrido, de forma que la distancia relativa punta-muestra permanezca constante en todo momento. En estas condiciones, las interacciones de tipo magnético (y/o electrostático si las hubiese) son medidas de forma específica, minimizándose de esta manera la contaminación inducida por la topografía de la muestra, debida, como se ha explicado, a las interacciones de corto alcance. La resolución de la técnica depende, por tanto, de varios factores entre los que sobresalen el tamaño y la forma de la punta, la distancia punta-muestra, el ruido ambiental (eléctrico, mecánico y acústico) y, cómo no, la sensibilidad de la instrumentación. Es, por tanto, muy importante garantizar que la altura de trabajo en el modo *lift* sea lo suficientemente grande como para eliminar la contribución de las interacciones de van der Waals. Sin embargo, no se debe ignorar el hecho de que cuanto



mayor sea la distancia relativa punta-muestra, la intensidad del campo magnetostático, debido a los dipolos magnéticos de la muestra, experimentada por la punta es menor, dando como resultado una pobre señal y, como consecuencia, una limitada resolución.

Teniendo en cuenta que se han podido observar por MFM la estructura magnética de composites de polímeros y nanopartículas de óxidos de hierro,⁵⁶ así como el contraste de fase de origen magnético debido a nanopartículas individuales de óxidos de hierro,⁵⁷ unido al hecho fehaciente de los prometedores resultados alcanzados previamente en películas de melanina sobre Au(111),²² resulta razonable considerar a los electrodepositos de melanina sobre HOPG, dadas su composición química y su morfología característica, como candidatos ideales para que sus propiedades magnéticas puedan ser evaluadas por MFM.

En la Figura IV.3.18 se han dispuesto las imágenes topográficas (izquierda) y de contraste de fase magnético (derecha) de una película de melanina de 24 horas, donde, como puede apreciarse, el biopolímero prácticamente cubre la totalidad de la superficie del plano basal del HOPG. Téngase en cuenta que la resolución lateral de las imágenes de AFM que se mostrarán a continuación, sobre los 12 nm en algún caso, es razonablemente superior a la curvatura de la punta, en torno a los 50 nm según especificaciones del fabricante, lo que resulta factible debido a la gran periodicidad y regularidad exhibida por la disposición de los gránulos que conforman el electrodeposito. Por su parte, en lo que corresponde a la imagen de MFM, fig. IV.3.18b, se observa claramente la aparición de dominios magnéticos, más o menos globulares, de talla submicrométrica y que exhiben signos de contraste de fase alternados, es decir, positivos (interacción punta-muestra de tipo repulsiva) y negativos (interacción atractiva). Este hecho tiene su importancia dado que la comparación con la imagen de contraste de fase que se obtiene cuando no se activa el modo *lift*, de signo mayoritariamente positivo en los casos que se procede a exponer, es indicativa de la presencia en la muestra de estructuras con magnetización paralela, no achacables en ningún caso a la topografía de la



muestra.

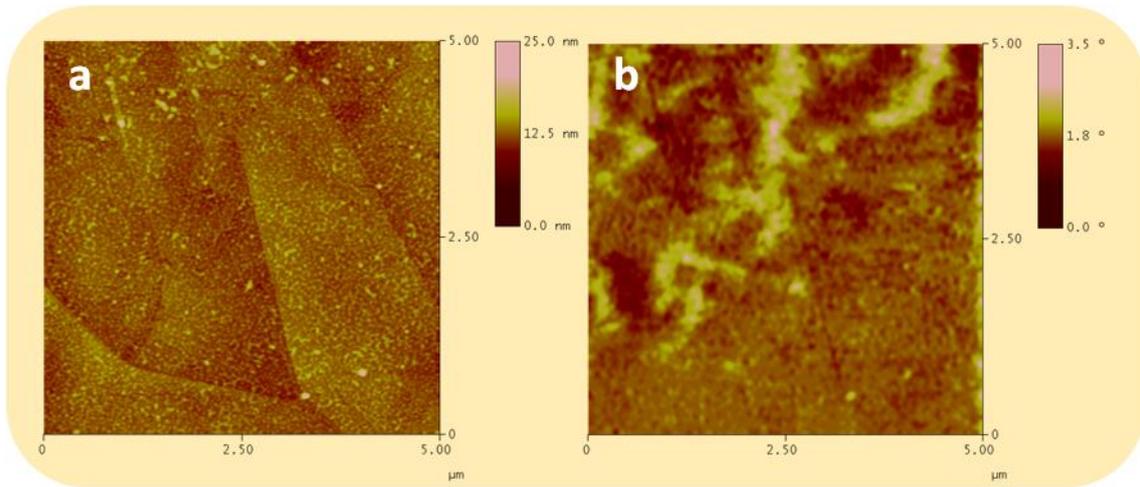
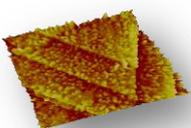


Figura IV.3.18. Imágenes MFM de $5,0 \times 5,0 \mu\text{m}^2$ de película de melanina de $t_a = 24$ horas sobre HOPG: (a) topográfica y (b) contraste de fase. La altura en el modo lift es de 25 nm. Se advierten regiones con diferente magnetización.

Las regiones con contraste de fase del mismo signo responden de forma similar a la interacción con la punta, definiendo así los correspondientes dominios de magnetización paralela. Este tipo de comportamiento magnético como el descrito para el sistema melanina-hierro también ha sido observado en películas delgadas de aleaciones granulares, débilmente ferromagnéticas, de CoFeAgCu^{58} y, más recientemente, en el caso del ensamblado bidimensional de nanopartículas superparamagnéticas (SPMNs) de Co, de 9-12 nm de diámetro, sobre Si.⁵⁹ Si bien es cierto que existen lógicas diferencias entre los ejemplos expuestos y los electrodepositos de melanina-hierro, también lo es que tanto el reducido espesor como la composición de las películas (con una apreciable contribución de nanopartículas de óxidos de hierro, fundamentalmente de Fe_3O_4 , y de una variada colección de tamaños) hacen de los electrodepositos de melanina-hierro sobre HOPG sustratos susceptibles de mostrar similares comportamientos.

Cuando se aborda el estudio por MFM de películas con un menor grado de recubrimiento de la superficie del HOPG que las anteriores, de $t_a = 18$ horas en este caso, Figura IV.3.19, los resultados obtenidos son similares a los precedentes, aunque con matices significativos que a continuación se detallan. Especial relevancia adquieren aquellas muestras en las que la superficie del



sustrato presenta un gran número de escalones y/o defectos. En las presentes muestras se distingue con facilidad la existencia de una estructura magnética de áreas correlacionadas, con contrastes de fase de signo opuesto, fig. IV.3.19b, en un sistema con una morfología bastante más discontinua que en el ejemplo anterior, fig. IV.3.19a.

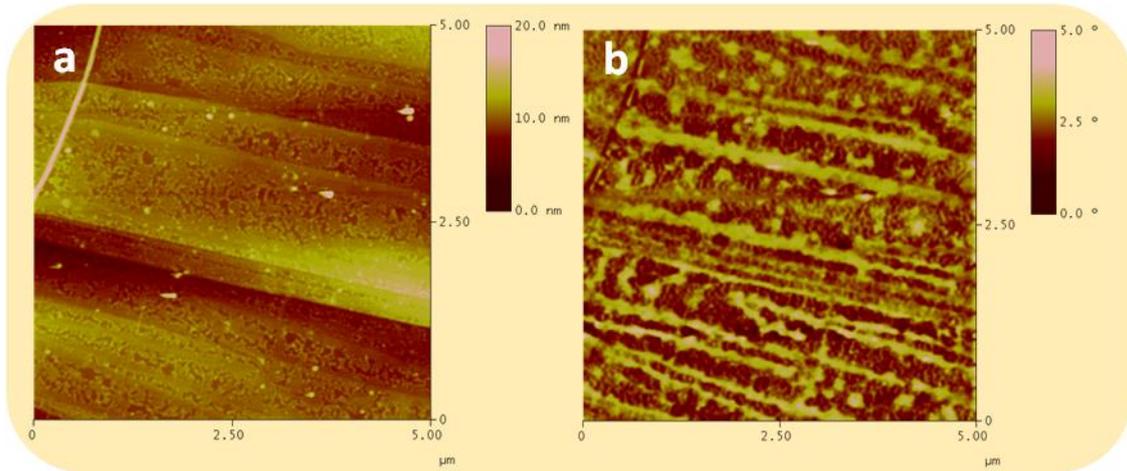
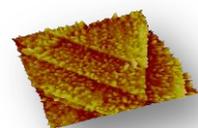


Figura IV.3.19. Imágenes MFM de $5,0 \times 5,0 \mu\text{m}^2$ de película de melanina de $t_a = 18$ horas sobre HOPG: (a) topográfica y (b) contraste de fase. La altura en el modo lift es de 25 nm.

El hecho de que las áreas más brillantes y las áreas más oscuras de la imagen de contraste de fase magnético coincidan con las zonas correspondientes o más próximas a los escalones presentes en la superficie del HOPG en la imagen topográfica, guarda, muy probablemente, una relación directa con el modelo propuesto de crecimiento del electrodepósito de melanina sobre el plano basal. Nótese que la imagen de contraste de fase está formada por una serie de dominios alternados más o menos rectilíneos en oposición a los dominios más bien globulares mostrados en las imágenes anteriores. Así, las diferentes cinéticas de incorporación de nanopartículas más o menos ricas en óxidos de hierro exhibidas durante la síntesis electroquímica del sistema melanina-hierro y mostradas por AFM, fig. IV.3.1, en función de si tiene lugar sobre los escalones y defectos de la superficie, significativamente más reactivos y sitios preferentes de nucleación, o de si se trata de la zona de terrazas entre escalones del plano basal, prácticamente inerte, condicionarían un enriquecimiento diferencial de tales nanopartículas, presumiblemente superparamagnéticas, en regiones bien definidas. De esta forma se originarían



dominios de magnetización paralela, de signos opuestos, vinculados a estas zonas, en contraste con otras regiones del sustrato modificado bastante más homogéneas. De hecho, en zonas amplias de terrazas entre escalones, como las que se muestran en la figura 20, se detectan diferentes áreas brillantes (contraste de fase positivo) y áreas oscuras (contraste de fase negativo) más bien amorfas y distribuidas aleatoriamente, más en la línea de lo que ocurría en el caso comentado anteriormente, fig. IV.3.18b.

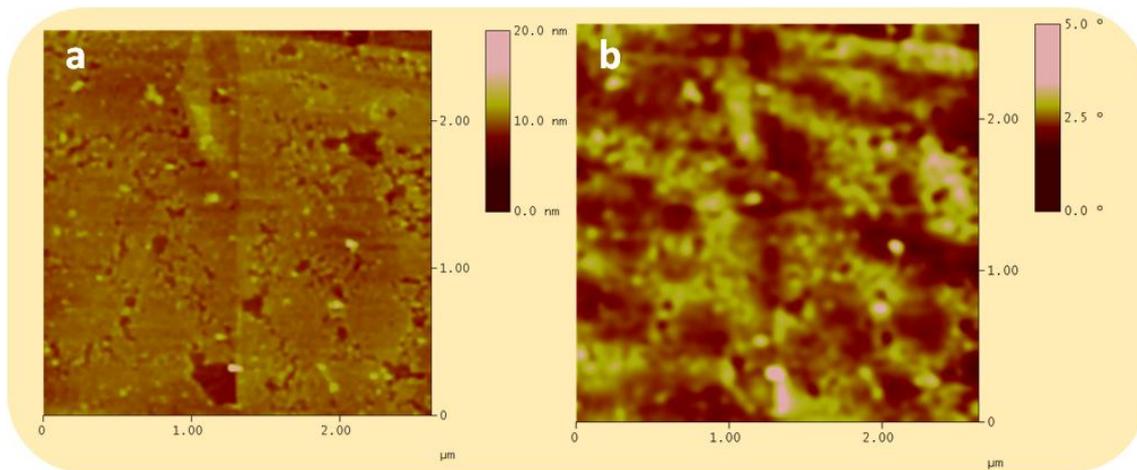
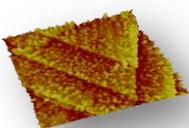


Figura IV.3.20. Imágenes MFM de $2,7 \times 2,7 \mu\text{m}^2$ de película de melanina de $t_a = 18$ horas sobre HOPG: (a) topográfica y (b) contraste de fase. La altura en el modo *lift* es de 25 nm.

En algunas de las imágenes MFM mostradas hasta el momento la topografía de la muestra resulta aún perceptible. Tal circunstancia, habitual en cualquier caso, es una consecuencia directa de, por un lado, el hecho de que, en el caso de las nanopartículas magnéticas, el dipolo magnético está centrado en las mismas, con lo que decae rápidamente en ausencia de las nanopartículas^{59,60} y, por otro, de los intentos por maximizar la señal MFM disminuyendo la altura aplicada en el modo *lift*. En este sentido, si bien se han realizado estudios teóricos que demuestran que a alturas por encima de los 20 nm el contraste de fase es causado mayoritariamente por las interacciones de largo alcance, magnéticas en el caso que nos ocupa, también es cierto que las contribuciones de otras interacciones posibles entre punta-muestra como, especialmente, las de van der Waals y las de origen electrostático, no deben ser descartadas completamente.⁶¹



El análisis exhaustivo de los datos recabados por MFM en estas películas de melanina sobre HOPG arroja un nuevo aspecto interesante a tener en cuenta: la amplitud de la señal MFM registrada es menor en las regiones con mayor recubrimiento de la superficie del sustrato, fig. IV.3.18, que en aquellas de menor densidad superficial, fig. IV.3.19 y IV.3.20. Este fenómeno, es decir, la variación de la amplitud de la señal magnética MFM con el grado de recubrimiento del sustrato, puede apreciarse claramente en la imagen magnética representada en la Figura IV.3.21, donde coexisten regiones con diferente densidad superficial de partículas:

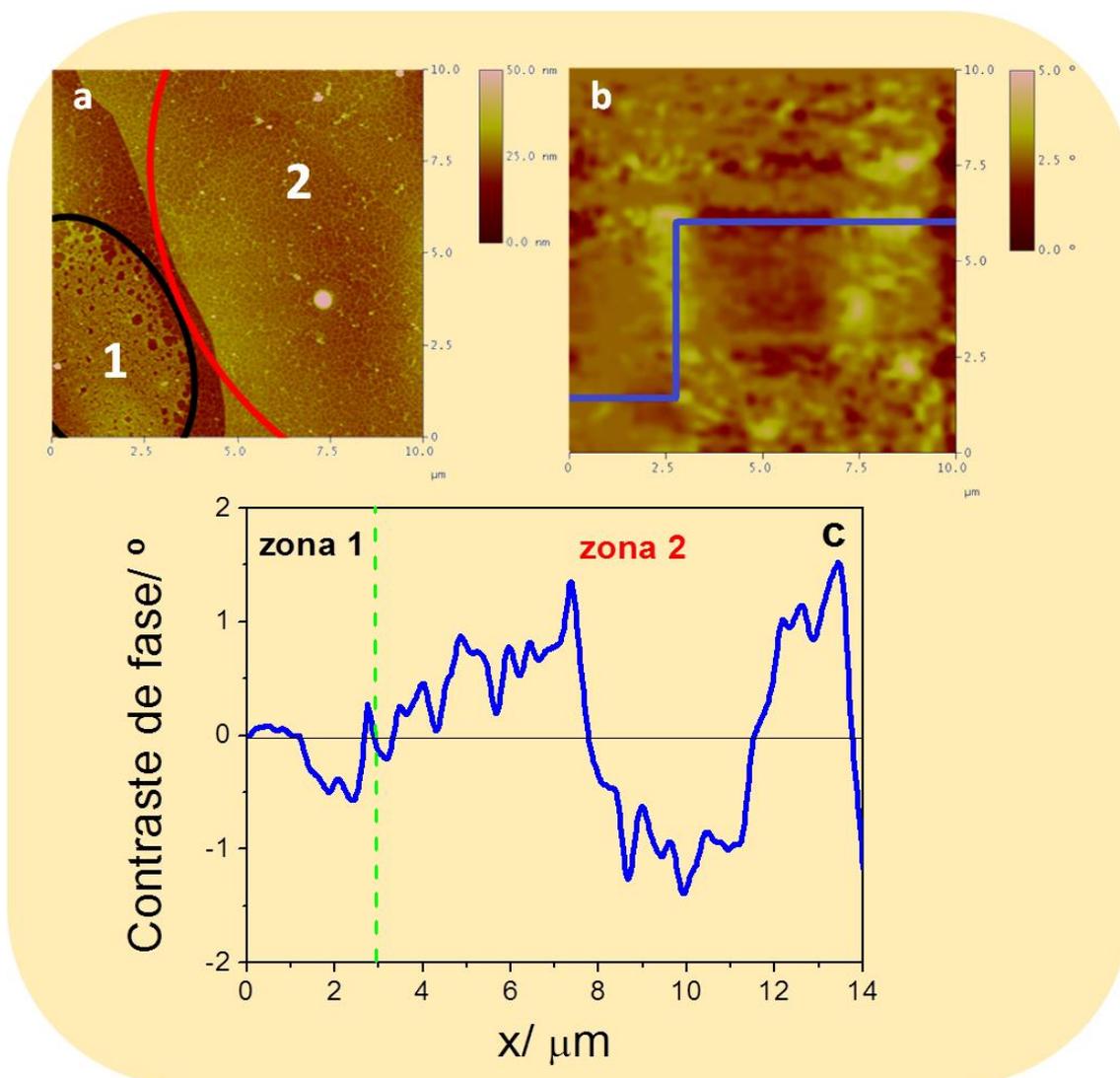
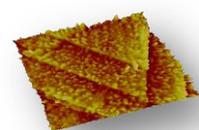
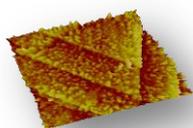


Figura IV.3.21. Imágenes MFM de $10,0 \times 10,0 \mu\text{m}^2$ de película de melanina de $t_a = 18$ horas sobre HOPG: (a) topográfica y (b) contraste de fase. La altura en el modo lift es de 25 nm. Las líneas negra y roja en (a) delimitan las zonas 1, de mayor densidad superficial, y la zona 2, de menor recubrimiento, respectivamente. (c) Sección transversal de la imagen de MFM correspondiente a la línea azul en (b).



Así, en la fig. IV.3.21a se han delimitado claramente dos regiones con diferente densidad de nanopartículas que exhiben, en promedio, diferentes contrastes de fase magnéticos, fig. IV.3.21b. Analizando cada una de estas zonas por separado resulta posible distinguir estructuras magnéticas análogas a las descritas anteriormente en las figuras IV.3.18 y IV.3.20. La sección transversal realizada en la imagen de MFM permite poner de manifiesto las diferencias en cuanto a la magnitud del contraste de fase magnético exhibido por cada una de las dos regiones diferenciadas, fig. IV.3.21c. De hecho, estos valores se hacen hasta tres veces mayor en el caso de las regiones de menor densidad de nanopartículas, en comparación a los que se han podido registrar para las zonas de mayor recubrimiento del sustrato. En la referencia [59], en el ensamblado bidimensional de SPMNPs de Co sobre sustratos monocristalinos de Si, se hace mención a un fenómeno similar al descrito en esta memoria. Los autores justifican tal comportamiento en la base de una preferente magnetización en el propio plano de la capa 2D que definen las NPs de Co, con lo que, en la medida en que aumenta la densidad de nanopartículas en dicha capa, la señal MFM por partícula disminuye. Esto último es consecuencia del hecho de que en las áreas de mayor densidad de NPs, donde el sustrato está prácticamente cubierto, el momento magnético de las partículas es forzado a permanecer en el plano debido a las interacciones dipolares que se establecen con las NPs vecinas, esto es, en perpendicular a la dirección efectiva de la medida MFM.

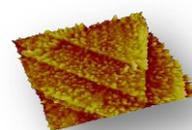
Llegados a este punto se hace necesario comentar que todas las muestras objeto del presente estudio fueron igualmente exploradas, exactamente en las mismas condiciones experimentales empleadas en las experiencias MFM, pero haciendo uso, en este caso, de puntas de idénticas características físicas pero carentes del recubrimiento ferromagnético de CoCr, con el objetivo de garantizar que se están detectando señales de origen magnético.^{59,61} De hecho, los resultados registrados con estas puntas no magnéticas no mostraron, en ningún caso, rastros de la presencia de las áreas brillantes y oscuras alternadas que sí aparecían en las medidas llevadas a cabo con puntas de CoCr.



En resumen, los electrodeósitos de melanina sobre HOPG, en virtud de los resultados obtenidos mediante el análisis de su nano y microestructura magnética por medio de MFM, exhiben un comportamiento magnético caracterizado por la presencia de dominios de magnetización paralela, similar a aquellos registrados en los casos de películas delgadas ferromagnéticas. Tomando en consideración los resultados presentados, tanto las características morfológicas como la magnitud de la señal de MFM asociada a tales dominios pueden ser convenientemente manipuladas controlando el tiempo de adsorción, es decir, la densidad superficial de NPs, y las características de la superficie del sustrato de HOPG, en términos del número de escalones y defectos.

Por último, recientemente se han publicado distintos estudios relacionados con la medida y caracterización por MFM de las señales asociadas a nanopartículas aisladas de carácter superparamagnético o a imanes moleculares individuales, de diversos orígenes, en los que se discuten tanto la idoneidad como las ventajas y limitaciones de la técnica respecto a esta cuestión en concreto.^{57,59,61,62} En este sentido, lo primero que se ha de comentar es que la mayoría de estos ejemplos los protagonizan partículas de dimensiones inferiores a los 100 nm. Esto hace que tales partículas sean, por naturaleza, paramagnéticas o superparamagnéticas. Como es sabido, en la Naturaleza, el material magnético más común es la magnetita, Fe_3O_4 , que corresponde a dos estados de oxidación del hierro: Fe(II) y Fe(III). La composición iónica, la simetría cristalina y la geometría presentes en la partícula magnética determinan sus propiedades magnéticas y, además, proporcionan una información de gran valor sobre los medios biológicos que nuclean o precipitan cristales de hierro de un estado de oxidación específico.⁶³

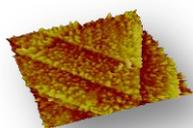
Las dimensiones de la partícula constituyen un factor decisivo en cuanto a que afectan críticamente a sus propiedades magnéticas. De hecho, las nanopartículas que son suficientemente pequeñas presentan una estructura de un único dominio magnético frente a partículas de mayor tamaño que constan de varios dominios con diferentes orientaciones de magnetización. Así, las NPs de magnetita con tamaños inferiores a 80 nm son partículas que exhiben un



sólo dominio magnético. Además, aquellas NPs de magnetita con dimensiones inferiores a 25-35 nm, a 300 K, deben ser consideradas superparamagnéticas dado que no poseen suficiente volumen como para mantener un momento magnético estable, pues la energía térmica a temperatura ambiente es suficiente como para invertir su sentido.

Por su parte, partículas de magnetita mayores a 25-35 nm exhiben comportamiento ferromagnético.^{61,62c} De forma similar a los átomos y moléculas paramagnéticas, un conjunto de partículas superparamagnéticas muestran un momento magnético neto sólo en presencia de un campo magnético externo. Por las razones expuestas, la posibilidad de utilizar esta técnica para la obtención de imágenes que permitan la localización espacial de dominios magnéticos en la nanoescala presentes en determinados tejidos a niveles sub-celulares constituye un ilusionante reto extensible a las películas delgadas de melanina sintética preparadas sobre HOPG. La presencia en los electrodepósitos sobre HOPG de NPs con dimensiones comprendidas entre 8-35 nm, fig. IV.3.1, con una creciente contribución de óxidos de hierro, fundamentalmente de Fe_3O_4 de acuerdo a los datos obtenidos por XANES,²² previsiblemente superparamagnéticas de acuerdo a lo expuesto, en la medida en que aumenta el tiempo de adsorción, hacen de las películas de melanina-hierro sustratos ideales para evaluar las señales MFM asociadas a estas NPs.

No obstante, téngase en cuenta que, dados los resultados mostrados tanto por AFM como por voltametría cíclica y XPS, las nanopartículas significativamente ricas en óxidos de hierro no empiezan a depositarse sobre las películas hasta que no se alcanza un cierto grado de recubrimiento de la superficie del HOPG. Este hecho junto con las limitaciones de sensibilidad de la técnica que no permite detectar el débil campo magnético debido a SPMNPs que actúen como monodominios magnéticos cuyas dimensiones sean inferiores a 10 nm,⁶¹ hace que no sea posible detectar la señal de MFM originada por las mismas en películas de tiempos de adsorción inferiores a las 8 horas. No obstante, en electrodepósitos de más entidad, tal y como se aprecia en la Figura IV.3.22 donde se han representado imágenes MFM características de una película de $t_a = 14$ horas, pueden detectarse algunas



partículas aisladas de tamaños comprendidos entre 15 y 30 nm, depositadas sobre una primera capa o bicapa de agregados del biopolímero (ver fig. IV.3.22a y c, línea negra). Tales partículas exhiben un contraste de fase magnético característico y análogo a los que se han detectado en la bibliografía, vinculados a monodominios magnéticos de SPMNPs de Co o, como en nuestro caso, de óxidos de hierro tipo magnetita.^{59,61}

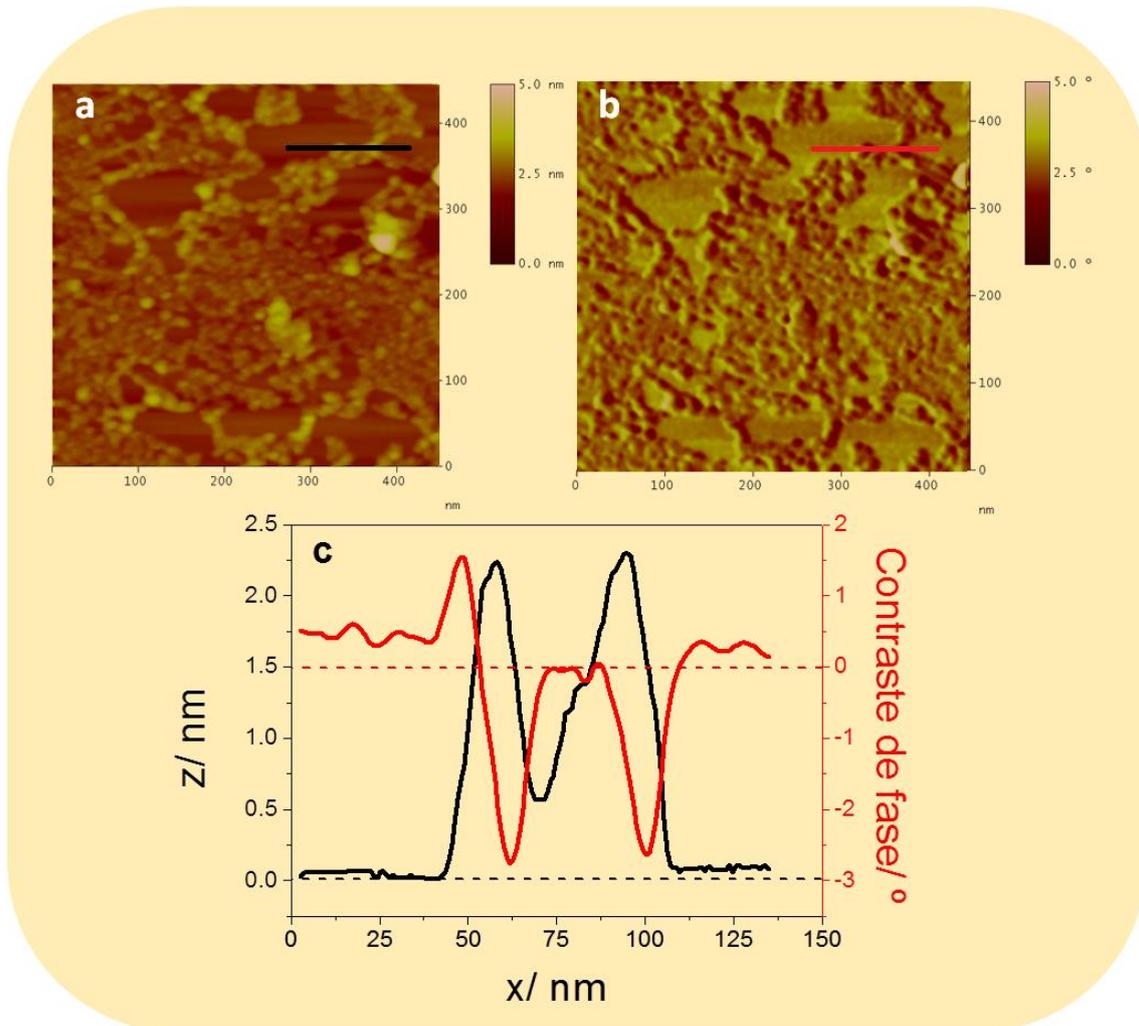
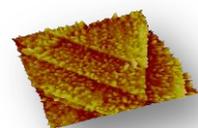


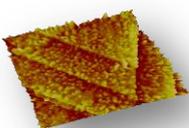
Figura IV.3.22. Imágenes MFM de $450 \times 450 \text{ nm}^2$ de película de melanina de $t_a = 14$ horas sobre HOPG: (a) topográfica y (b) contraste de fase. La altura en el modo lift es de 25 nm. (c) Secciones transversales de la imagen topográfica correspondiente a la línea negra en (a), en negro, y de la imagen MFM (b) en rojo.

La sección transversal de estas partículas (fig. IV.3.22b y c) muestra que su contraste de fase magnético se amolda a la siguiente descripción: contraste de fase de sentido marcadamente negativo en el centro de la partícula y ligeramente positivo en los extremos de la misma.^{62a} Ahora bien, el perfil de al



menos una de las partículas, la ubicada más a la izquierda en las figuras IV.3.22a-c, también se ajustaría al clásico modelo que exhiben partículas ferromagnéticas, es decir, tipo dipolo, aunque esto se suele dar, más frecuentemente, en los casos de magnetización externa en la dirección del plano de la muestra, al menos en el caso de NPs.^{61,62a} Además, en la misma imagen, también pueden apreciarse NPs con contraste de fase magnético esencialmente positivo, especialmente en la zona central de la misma. Es decir, que de acuerdo a lo expuesto por diferentes autores,^{61,62a,c} corresponderían a NPs no magnéticas. En tal caso, una posible explicación al origen de este contraste de fase positivo, consecuencia de una interacción punta-muestra repulsiva, residiría en una interacción de tipo electrostático entre punta y NPs, idénticamente cargadas.

No obstante, algunas de las partículas presentes en películas más gruesas y acompañando a la distribución de áreas brillantes y oscuras alternadas característica de estas muestras, fig. IV.3.19, también desarrollan contrastes de fase magnéticos similares a los descritos líneas atrás. Así, en la Figura IV.3.23 se han representado imágenes MFM de una película de melanina de 24 horas y sus correspondientes secciones transversales.



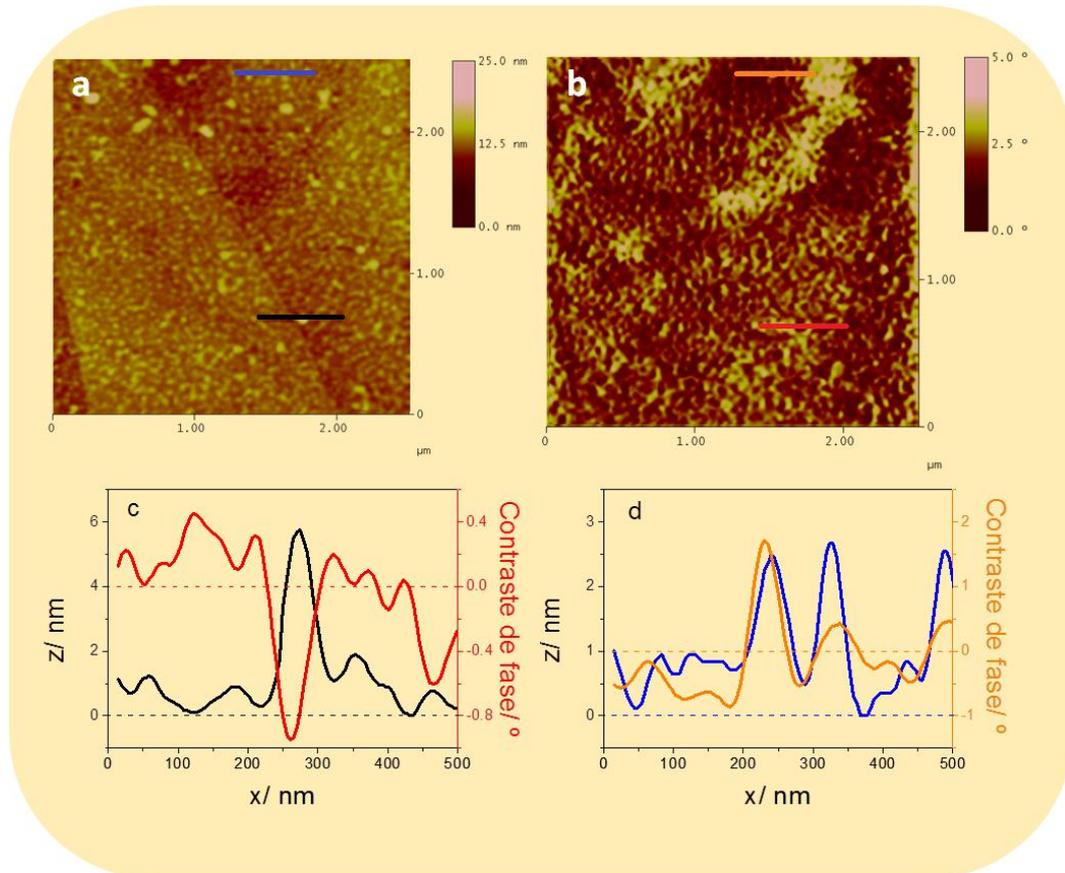
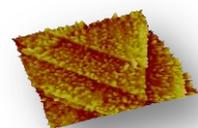


Figura IV.3.23. Imágenes MFM de $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$ de película de melanina de $t_a = 24$ horas sobre HOPG: (a) topográfica y (b) contraste de fase. La altura en el modo “lift” es de 25 nm. (c) y (d) Secciones transversales de la imagen topográfica correspondiente a la líneas negras y azul en (a), en negro y azul, y de la imagen MFM (b) en rojo y naranja, respectivamente.

Sin embargo, se debe llamar la atención sobre el hecho de que este efecto se observa en partículas relativamente aisladas entre sí que comienzan a desarrollarse sobre una ya preexistente capa homogénea del electrodeposición de melanina-hierro, es decir, correspondiente a una segunda fase de crecimiento 3D de la película. Así la partícula ubicada en la parte inferior de la imagen, fig. IV.3.23c, más que un efecto unidireccional, exhibe dos zonas de contraste de fase magnético de signo opuesto: ligeramente positivo en los bordes y negativo en el centro. Por el contrario, la sección transversal de las partículas en la parte superior de la imagen muestra un contraste de fase esencialmente positivo. Estas últimas carecerían, por tanto, de las propiedades de índole magnética exhibidas por las anteriores.^{62a}



IV.3.2.3. Propiedades electrocatalíticas de las películas de melanina sobre HOPG

La reducción electroquímica de oxígeno desempeña un papel más que significativo en el diseño y desarrollo de celdas de combustible, de sensores de gases y en la síntesis electroquímica de peróxido de hidrógeno.⁶⁴ La reacción de reducción de oxígeno tiene lugar de acuerdo a un proceso directo de cuatro electrones o a través de dos electrones.⁶⁵ La obtención de agua por medio de la reducción directa de cuatro electrones se emplea en el caso las celdas de combustible y de los sensores de gases, mientras que el peróxido de hidrógeno se obtiene a través de la reducción electroquímica de oxígeno de dos electrones. La reacción de reducción de oxígeno (*ORR*) ha sido ampliamente estudiada sobre varios sustratos electródicos tales como platino, mercurio, plata, oro y materiales basados en el carbono.⁶⁶ De hecho, se ha establecido que esta reacción está notablemente influenciada por la naturaleza del material electródico y por el medio electrolítico. Así, el efecto que ejercen tanto las características físico-químicas del sustrato y distintas fases electrolíticas en la *ORR*, a través de su influencia en los potenciales y corrientes de reducción, se han estudiado y descrito ampliamente en la bibliografía.⁶⁶ No obstante, el mecanismo detallado de la reducción de oxígeno no está del todo claro. Como ya se ha explicado anteriormente se cree que, en general, la reducción de oxígeno ocurre de acuerdo a la vía directa de cuatro electrones o a la de dos electrones, que se representan, para los medios neutros y alcalinos donde se desarrollan nuestros estudios, de la siguiente manera:

1. Vía directa de cuatro electrones:



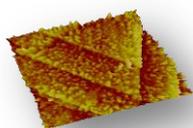
2. Vía peróxido de hidrógeno:



A la reacción (2) le sigue la posterior reducción de dos electrones:



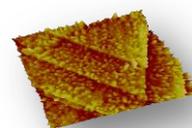
O la descomposición mediante la reacción de dismutación:



Con carácter general se debe comentar que los electrodos de base carbón, de gran área superficial, son de gran interés desde el punto de vista de la ORR toda vez que se usan comúnmente como soportes para catalizadores de Pt y derivados de éstos en celdas de combustible. No obstante, la ORR en sustratos carbonosos tiene lugar normalmente por medio de la vía de dos electrones, produciendo, por tanto, peróxido de hidrógeno que suele ser un producto poco deseable en las celdas de combustible, dado que reduce su eficiencia. En este sentido, hay que tener en cuenta que la ORR en sustratos de origen carbonoso es mucho más lenta que, por ejemplo, en superficies metálicas activas como son las de oro o platino. Este hecho permite justificar la necesidad de la modificación de tales sustratos con materiales electrocatalíticos que permitan reducir los grandes sobrepotenciales requeridos para la ORR.⁶⁷ A tal fin se han desarrollado una gran variedad de catalizadores para la modificación de electrodos carbonosos entre los que se incluyen macrociclos complejos de Co,⁶⁸ dióxido de manganeso,⁶⁹ aleaciones Cu-Ni,⁷⁰ porfirinas y ftalocianinas de metales de transición,⁷¹ nanopartículas de oro,⁷² nanocomposites de Fe,⁷³ nanotubos de carbono⁷⁴ o distintos tipos de quinonas.⁷⁵

Tomando en consideración lo anteriormente expuesto, parece claro que la modificación electroquímica de la altamente inerte superficie del plano basal del HOPG con el electrodeposición de melanina-hierro debería, en buena lid, implementar significativamente las prestaciones del sustrato frente a la ORR. Tal aseveración se justificaría en la presencia, en las películas descritas, de determinados componentes de probada actividad electrocatalítica como serían por un lado grupos funcionales oxigenados como las quinonas, constituyentes fundamentales y presentes de forma ubicua en el biopolímero, y, por otro, de diversas especies de hierro, esto es, tanto del que se encuentra coordinado en la matriz orgánica como del que se halla en forma de óxidos.

En este sentido se han representado en la Figura IV.3.24 las respuestas voltamétricas del sustrato de HOPG y de los correspondientes electrodeposiciones de melanina-hierro de diferentes tiempos de adsorción obtenidas a pH 7,4 en



presencia de diferentes concentraciones de oxígeno.

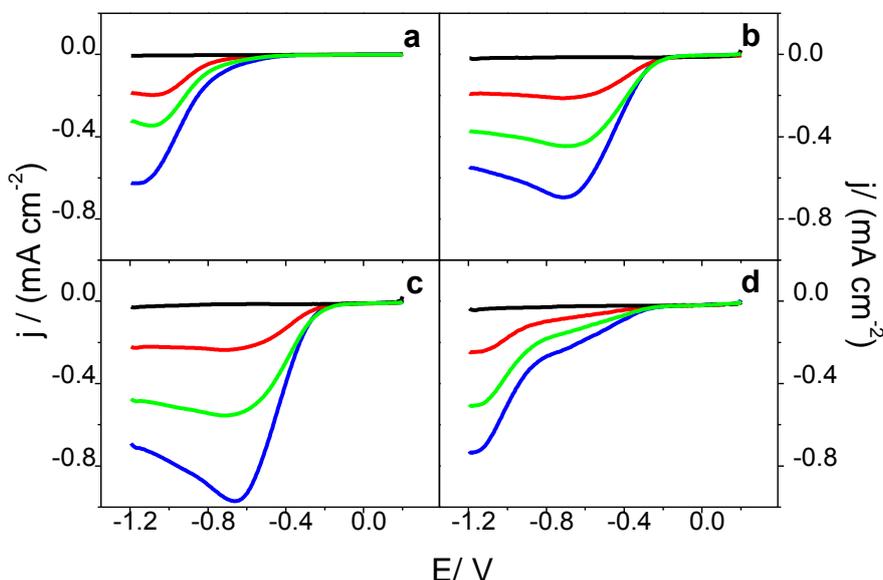
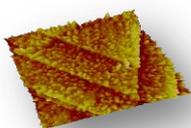


Figura IV.3.24. Voltamogramas registrados a $0,2 \text{ V/s}^{-1}$ en buffer TRIS a pH 7,4 en presencia de diferentes concentraciones de O_2 : 0 M (negro), $5,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ (rojo), $1,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ (verde) y $2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ (azul). (a) HOPG, (b) electrodepósito de melanina-hierro de $t_a = 4$ horas sobre HOPG, (c) electrodepósito de melanina-hierro de $t_a = 8$ horas sobre HOPG, (d) película de QH/ Q sobre HOPG.

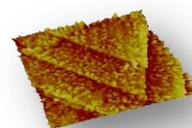
Se observa que la ORR sobre el plano basal del HOPG muestra una única onda de reducción a potenciales bastante negativos $E < -1,1 \text{ V}$, si bien la densidad de corriente asociada a dicha onda aumenta claramente con la concentración de la especie electroactiva, fig. IV.3.24a. Por tanto, debe ser asignada a una primera etapa de transferencia electrónica de la ORR, reacción (2), que da lugar a peróxido de hidrógeno.^{64,75a} Sin embargo, es bien conocido que la superficie del plano basal del HOPG está fuertemente inhibida frente a la reacción de reducción de O_2 , como se demuestra con los sobrepotenciales tan negativos que requiere.^{64,74c,76} No ocurre lo mismo con los bordes del HOPG, EPG, que son, desde luego, mucho más reactivos en lo concerniente a la transferencia electrónica y a la adsorción de especies.⁷⁷ De hecho, incluso las densidades de corriente registradas para la reducción de oxígeno en el plano basal son significativamente menores que las que se han podido detectar en otros grafitos pirolíticos y en el propio carbón vítreo.⁶⁵ La escasa reactividad del



plano basal se debe fundamentalmente a la baja densidad de estados electrónicos y a la ausencia en su superficie de grupos funcionales y de sitios de adsorción preferentes.⁷⁸ En este sentido se hace necesario comentar que el plano basal del HOPG es bastante inusual en el sentido en que todas las valencias están satisfechas, precisamente, en el plano superficial.⁷⁹ Además, mientras que en la superficie de otros grafitos pirolíticos es posible detectar determinados grupos funcionales considerablemente activos frente a ORR, no ocurre lo mismo en el caso del HOPG. Téngase en cuenta que durante la reducción electroquímica de O₂ se requiere una notable interacción entre el oxígeno molecular y estos grupos funcionales presentes en la superficie de los citados sustratos.⁶⁴

En oposición a lo observado previamente para el HOPG, la película de melanina-hierro de $t_a = 4$ horas muestra una onda muy bien definida a $-0,65$ V, fig. IV.3.24b, que depende igualmente de la concentración de O₂. Por tanto, tal y como se puede observar en la figura 24, la ORR se adelanta hasta $0,45$ V en sentido positivo cuando el sustrato de partida es modificado electroquímicamente con el sistema melanina-hierro. Este desplazamiento del potencial se reproduce de igual forma en electrodepósitos de mayor espesor, como por ejemplo para $t_a = 8$ horas, fig. IV.3.24c. No obstante, las densidades de corriente vinculadas a la electrorreducción de oxígeno son visiblemente mayores en la medida en que se aumenta el tiempo de adsorción, fig. IV.3.24b-c. Este resultado se interpreta de la siguiente manera: el incremento en el recubrimiento superficial del plano basal del HOPG y del espesor del electrodepósito traen como consecuencia un significativo aumento en el número de sitios activos presentes en el electrodo.

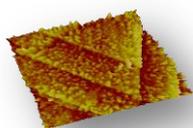
Los resultados obtenidos para los electrodepósitos de melanina-hierro se compararon con los que se han podido obtener para un sustrato de HOPG modificado electroquímicamente con una película del sistema hidroquinona/quinona, QH/ Q,⁸⁰ que cuenta con un espesor análogo al de la película de melanina-hierro de $t_a = 8$ horas, fig. IV.3.24d. En este caso se aprecian claramente dos ondas diferenciadas en los ciclovoltamogramas registrados en concentraciones crecientes de O₂. La primera de ellas, poco definida, aparece



desde los -0,6/ -0,7 V y, por comparación con los resultados exhibidos por el plano basal del HOPG sin modificar, debe ser asignada a la actividad catalítica de la pareja rédox QH/ Q frente a la ORR. De hecho, es bien conocido que las quinonas presentes como grupos funcionales superficiales en diferentes sustratos carbonosos, tras la adecuada modificación de los mismos, resultan catalizadores más que eficientes para la ORR⁷⁵, dada la alta reactividad química exhibida por los intermedios semiquinona generados en la reducción electroquímica de especies tipo quinona frente al O₂. Lógicamente, la segunda onda, a E < -1,1 V, se debe asignar, por comparación con los resultados mostrados en la fig. IV.3.24a, a la actividad debida a dominios del HOPG que permanecen sin cubrir.

A partir de esta figura se pueden extraer una serie de conclusiones interesantes: la primera residiría en el hecho de que el sistema melanina-hierro exhibe una capacidad catalítica exaltada frente a ORR en un rango de potenciales donde la superficie del plano basal del HOPG es notablemente inactiva, fig. IV.3.24a-c. Tal capacidad catalítica se debe fundamentalmente a la presencia del sistema quinol/ quinona en el electrodeposición del biopolímero puesto que ésta se da en la región de potencial donde el par rédox QH/ Q es activa. Por otro lado, la modificación de la superficie del HOPG es bastante más sencilla en el caso del sistema melanina-hierro que para el QH/ Q ya que da lugar a un mayor número de sitios activos que conducen a ondas de electroreducción bien definidas y grandes corrientes.

En la Figura IV.3.25 se muestran los ciclovoltamogramas registrados para muestras equivalentes en NaOH 0,1 M. El primer factor a destacar sería la pequeña preonda, en torno a -0,5 V, que exhibe el HOPG y que corresponde a la actividad catalítica de una reducida cantidad de grupos funcionales activos presentes en defectos del plano basal.^{75a,81} De hecho, es bien sabido que la existencia de estos grupos funcionales en la superficie del grafito incrementan significativamente su rendimiento frente a ORR en la medida en que proporcionan sitios de adsorción adecuados para el oxígeno y otros intermedios de reacción. De forma análoga a lo que se ha descrito para el HOPG y para otros sistemas relacionados, esta preonda se puede observar



sólo a valores de pH superiores a 10.^{64,74c,75c} Además, con un cierto paralelismo al comportamiento exhibido a pH 7,4, también se observan densidades de corrientes asociadas a ORR a sobrepotenciales bastante negativos, en torno a $E < -1,2$ V, fig. IV.3.25a.

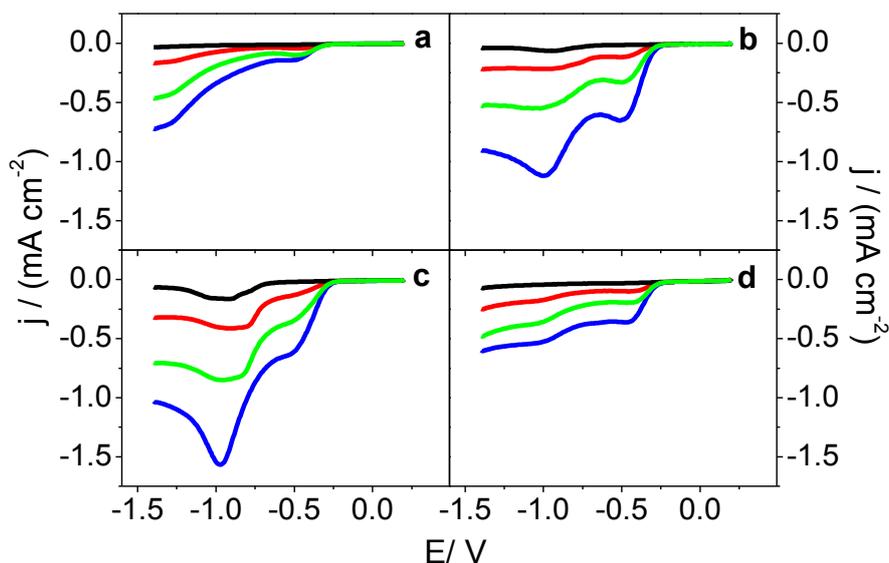
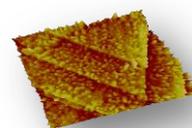


Figura IV.3.25. Voltamogramas registrados a $0,2 \text{ V s}^{-1}$ en NaOH $0,1 \text{ M}$ en presencia de diferentes concentraciones de O_2 : 0 M (negro), $5,5 \times 10^{-5} \text{ M}$ (rojo), $1,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ (verde) y $2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ (azul). (a) HOPG, (b) electrodepósito de melanina-hierro de $t_a = 4$ horas sobre HOPG, (c) electrodepósito de melanina-hierro de $t_a = 8$ horas sobre HOPG, (d) película de QH/ Q sobre HOPG.

En el caso de los electrodepósitos de melanina-hierro sobre HOPG se aprecian claramente dos picos voltamétricos bien definidos a $-0,5$ y $-0,9$ V, fig. IV.3.25a-b. En principio, la primera onda, a $-0,45$ V, debe ser asignada a la electroreducción de O_2 a HO_2^- , reacción catalizada por el sistema quinol/quinona presente en el biopolímero como se desprende de la comparación con los ciclovoltamogramas registrados en presencia de concentraciones crecientes de oxígeno para los depósitos de QH/ Q sobre HOPG (de densidad de carga similar a la de la película de melanina-hierro de $t_a = 8$ horas) que muestra esta misma primera onda de reducción en la misma región de potencial que las películas de melanina-hierro, si bien los valores de densidad de corriente



asociados son marcadamente mayores en estas últimas.

Por su parte la segunda onda que aparece a $-0,9$ V puede ser asociada a la consiguiente electroreducción de peróxido de hidrógeno. En este sentido, en la Figura IV.3.26 se han representado los ciclovoltamogramas registrados para una película de melanina de $t_a = 8$ horas en presencia de concentraciones crecientes de HO_2^- , fig. IV.3.26a. Tal y como se aprecia en la figura, la electroreducción del peróxido muestra un pico voltamétrico bien definido a $-0,9$ V cuyos valores de densidad de corriente dependen de la concentración de HO_2^- .

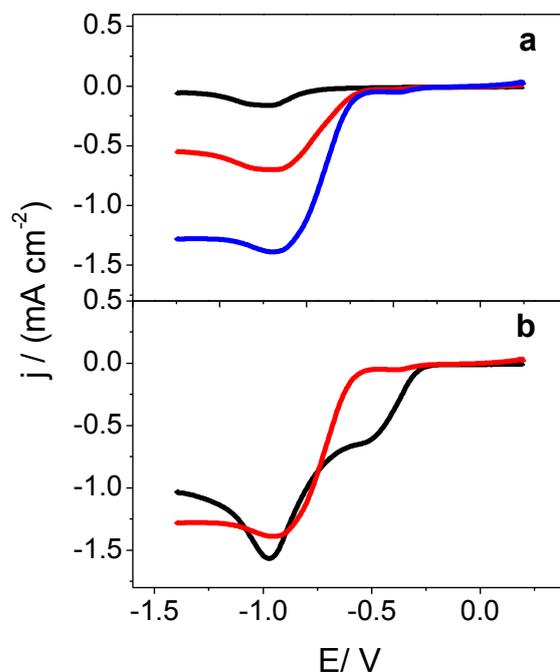
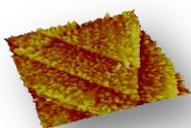


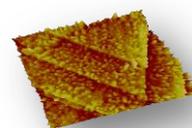
Figura IV.3.26. (a) Voltamogramas registrados para una película de melanina de $t_a = 8$ horas sobre HOPG a $0,2 \text{ V s}^{-1}$ en NaOH $0,1 \text{ M}$ en presencia de diferentes concentraciones de HO_2^- : 0 mM (negro), 4 mM (rojo) y 12 mM (azul). (b) Voltamogramas registrados para un electrodepósito de melanina-hierro de $t_a = 8$ horas sobre HOPG a $0,2 \text{ V s}^{-1}$: 12 mM de HO_2^- en solución desoxigenada de NaOH $0,1 \text{ M}$ (color rojo) y $2,4 \times 10^{-4} \text{ M}$ de O_2 en NaOH $0,1 \text{ M}$.

Con objeto de avanzar en la elucidación de los picos voltamétricos observados en los electrodepósitos de melanina-hierro en la reducción de oxígeno, se compararon los resultados obtenidos en NaOH $0,1 \text{ M}$ en saturación



de oxígeno con los obtenidos en la misma solución desoxigenada en presencia de 12 mM de HO_2^- , fig. IV.3.26b. A partir de este gráfico es posible concluir que el pico voltamétrico a -0,9 V corresponde a la electroreducción de peróxido de hidrógeno. De hecho, en la fig. IV.3.25d se observa que la presencia, casi anecdótica, de la segunda onda a -0,9 V es demasiado reducida en relación al primer pico voltamétrico a -0,5 V lo que indicaría que la contribución en densidad de corriente debida a la electroreducción de HO_2^- no es, como se esperaba en cualquier caso, significativa en el HOPG modificado con el sistema QH/ Q.^{75c} Llegados a este punto se deben valorar en su justa medida las exaltadas habilidades catalíticas frente a la reducción de O_2 y HO_2^- exhibidas por los electrodepósitos de melanina en comparación con el plano basal del sustrato y las películas de QH/ Q sobre HOPG, fig. IV.3.25 y IV.3.26.

En este sentido, en la Figura IV.3.27 se han destacado los resultados obtenidos para la ORR mediante la representación de las densidades de corriente frente a la concentración de oxígeno tanto para el HOPG como para las películas de melanina de $t_a = 4$ y 8 horas, en buffer TRIS a pH 7,4, fig. IV.3.27a, y en NaOH 0,1 M, fig. IV.3.27b.



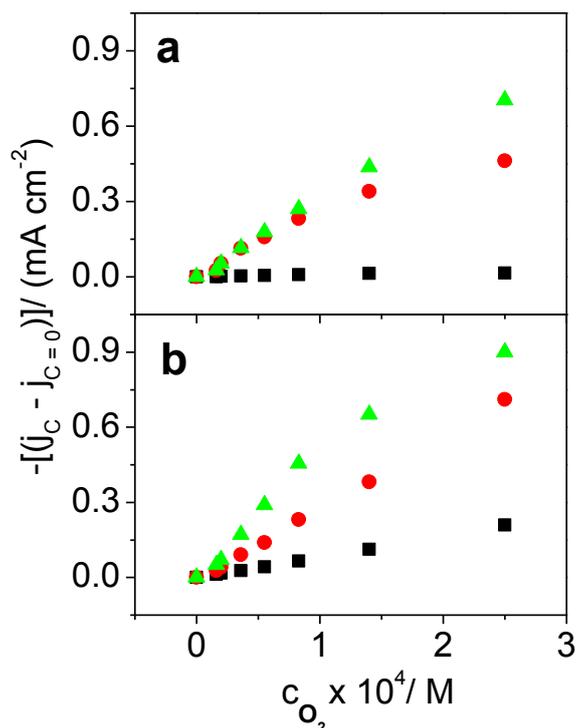
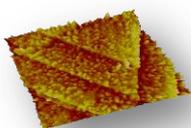


Figura IV.3.27. Densidad de corriente estacionaria, $j_C - j_{(C=0)}$, frente a la concentración de oxígeno para HOPG (cuadrado negro) y películas de melanina sobre HOPG de $t_a = 4$ horas (círculo rojo) y 8 horas (triángulo verde). Así, j_C sería la densidad de corriente estacionaria registrada a $-0,5$ V para buffer TRIS a pH 7,4 (a) y a $-0,9$ V en NaOH 0,1 M pH 12,6 (b). Por su parte, $j_{C=0}$ es la densidad de corriente medida en ausencia de O_2 a cada potencial en cada electrolito.

Por tanto, tales gráficos ponen de manifiesto una correlación esencialmente lineal entre las densidades de corriente registradas y la concentración de oxígeno y, adicionalmente, la gran influencia que ejerce el depósito de melanina-hierro, tras la modificación del sustrato de HOPG, en cuanto a la significativa mejora en el rendimiento experimentado por sus capacidades electrocatalíticas.

Se ha medido el potencial de circuito abierto (OCP) del electrodeposición de melanina en buffer TRIS de pH 7,4 en saturación de oxígeno, resultando éste de $-0,05$ V que, como ya se mostró, coincide con la región de potencial donde el sistema QH/ Q es activo, fig. IV.3.10c. Cuando el pH aumenta hasta 12,6, entonces el OCP se estabiliza en $-0,15$ V. La dependencia observada de 0,02 V/ unidad de pH es consistente con lo que se ha podido registrar para



ftalocianinas de Fe(II).⁸² Además, tanto el burbujeo con nitrógeno de la solución, con objeto de retirar el oxígeno presente en la misma, como el aumento del pH se traducen en un desplazamiento del OCP hacia valores más negativos. Por tanto, el potencial que la película de melanina adquiere espontáneamente en medios neutros está determinado por las especies quinol/quinona incorporadas en el biopolímero, por el O₂ disuelto y, por supuesto, por el pH.

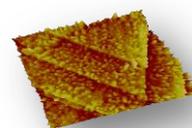
En lo sucesivo se pretende abordar en la medida de lo posible todos aquellos procesos que tienen lugar durante la reducción del O₂ sobre los electrodepósitos de melanina-hierro sobre HOPG. En primer lugar, parece razonable considerar que la primera onda voltamétrica, a -0,5 V, corresponde, como se ha indicado anteriormente, a la electroreducción de O₂ a HO₂⁻ mediada por los grupos quinol/quinona presentes en las películas de melanina sobre HOPG y que ya se detectaron por medio de IR, fig. IV.3.6. Así, en la región de potencial entre -0,2/ -0,4 V donde comienza a observarse el proceso electrocatalítico para la reducción de O₂, fig. IV.3.26b-c, en la medida en que las especies quinona son reducidas a quinol, se generan radicales semiquinona. De hecho, se ha argumentado que la velocidad de reducción de oxígeno es proporcional a la concentración superficial de radicales semiquinona producidos por la reducción electroquímica de grupos quinona, Q.^{64,75a} El anión radical semiquinona, Q^{•-}, reaccionaría con el oxígeno molecular para dar lugar al anión superóxido, O₂^{•-}, que posteriormente dismuta o bien sigue un mecanismo electroquímico-químico, EC, que podría describirse de la siguiente manera:



ó

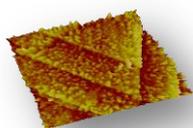


Como se ha dicho, Q representa a los grupos quinona superficiales y Q^{•-} serían los radicales semiquinona generados en la reducción de Q. En general,



se admite que la reacción (6) constituye la etapa determinante de la velocidad de la reacción. Por su parte, el anión superóxido, $O_2^{\cdot-}$, formado en (6) puede dismutar, reacción (7), o ser reducido electroquímicamente en la superficie del electrodo, reacción (8), dando lugar en ambos casos a HO_2^- . El modelo descrito es el que se da en la reducción de oxígeno sobre electrodos carbonosos modificados con quinonas, especialmente con ortoquinonas como las que incorpora la melanina, generándose peróxido de hidrógeno como producto final.^{75c}

Se debe tener en cuenta que la participación de las diferentes especies de hierro presentes en las películas de melanina es poco probable en la región de potenciales donde se da esta primera onda voltamétrica. Es más, en la ventana de potenciales comprendida entre -0,2 y -0,4 V, los átomos de Fe, coordinados a los dos pares de átomos de oxígeno que forman parte de sendas estructuras tipo quinona, tabla 2, deberían estar en el estado de oxidación de Fe(III) como, de hecho, ocurre en el caso de las muestras de eumelanina sintética expuesta a condiciones ambientales donde la relación Fe(III)/ Fe(II), obtenida a partir de las experiencias XANES, es próxima a 9. Es bien conocido que el estado de oxidación Fe(III) está poco favorecido para la reducción de oxígeno puesto que el H_2O se enlaza fuertemente, de la misma forma en que ocurre en la eumelanina sintética (moléculas de hidratación asignadas en las medidas EXAFS, tabla IV.3.2), bloqueando de esta manera la adsorción de O_2 .⁸³ Por el contrario, se ha propuesto que el estado de oxidación Fe(II) constituye el sitio más activo para la reducción completa de 4 electrones en macrociclos de Fe.^{71a,84} De hecho, a potenciales más negativos que -0,6/ -0,7 V, fig. IV.3.9, las especies de Fe(II) pasan por ser necesariamente las predominantes. Así, en esta ventana de potenciales, las moléculas de O_2 pueden enlazarse a los sitios de Fe(II) para formar especies (OH₂O).⁸³ Su estabilización sobre el Fe(II) es la clave para evitar el desprendimiento de HO_2^- como producto de una reacción de 2 electrones, favoreciéndose así la reducción completa de cuatro electrones a agua. De esta forma, es posible sugerir un mecanismo electroquímico-químico para la reducción de oxígeno sobre el sistema melanina-hierro, en función de que el producto final sea peróxido o agua:



Resultados y Discusión



También el radical superóxido, O_2^- , producido en la reducción de oxígeno catalizada por el sistema quinol/ quinona puede ser el causante de la reducción de Fe(III) a Fe(II) de acuerdo⁸⁵ a la siguiente reacción:

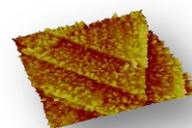


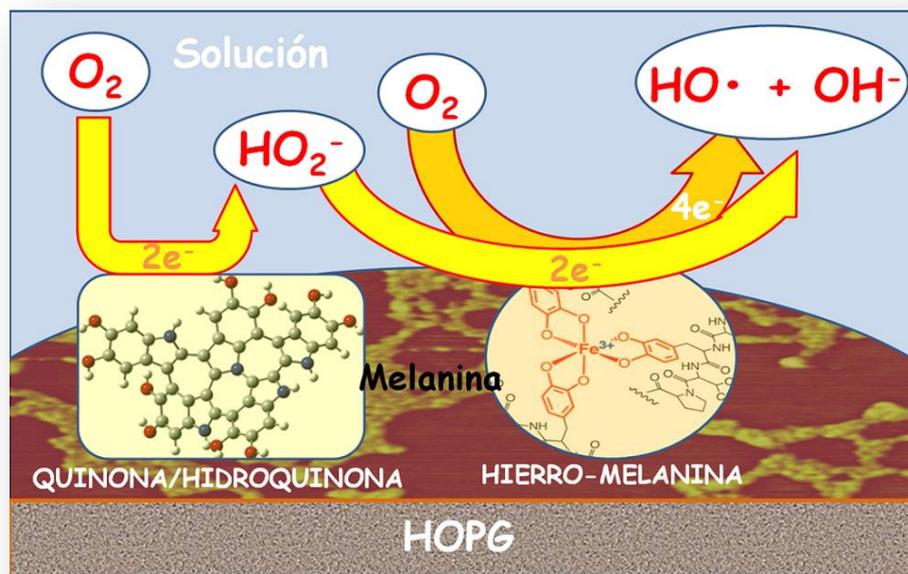
Por tanto, la presencia de especies Fe(II) en el biopolímero, tanto del que se encuentra coordinado en la matriz polimérica como del que se encuentra en forma de óxidos, explicarían el segundo pico de reducción observado en soluciones alcalinas, fig. IV.3.25b-c. De hecho, como ya se ha comentado, tanto diferentes complejos macrociclos de $\text{Fe}^{71\text{a-b}}$ como composites de óxidos de hierro^{73,86} son capaces de catalizar eficientemente ORR, bien en una reducción completa de 4 electrones a agua, bien en una reducción de 2 electrones a peróxido y una ulterior reducción, también de dos electrones, de HO_2^- a H_2O . En nuestro caso, las reacciones que darían lugar a la formación de especies radicalarias catalizadas por el sistema Fe(II)-quinol/ quinona, presente en los gránulos de melanina, y que, en general, se pueden representar como:



En medios neutros, fig. IV.3.24b-c, la única onda de reducción sugiere por tanto una reducción completa de 4 electrones debida a especies de hierro, (12), o, en su defecto, un solapamiento parcial de las ventanas de potencial donde tienen lugar el conjunto de reacciones (5)-(8) y la (13), reacción de Fenton, catalizadas, como se ha especificado anteriormente, por los pares rédox quinol/ quinona y Fe(II)/ Fe(III), respectivamente.

Con la firme intención de clarificar lo expuesto hasta el momento acerca de la actividad catalítica del sistema melanina-hierro, los mecanismos descritos se han representado gráficamente en el Esquema 1:



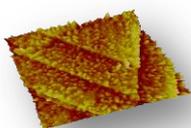


Esquema IV.3.1. Posible mecanismo de reacción para la actividad electrocatalítica de las películas de melanina-hierro frente a oxígeno en soluciones alcalinas o neutras.

El modelo propuesto adquiere una especial relevancia desde el punto de vista del papel que desarrolla el sistema melanina-hierro en la peroxidación lipídica. De hecho, la gran capacidad de las melaninas naturales de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) surge como consecuencia de la sinergia entre los pares rédox quinol/quinona y Fe(II)/Fe(III)-quinol/quinona que permiten la reducción de oxígeno en un amplio rango de potenciales. Así, la actividad catalítica del sistema quinol/quinona conduce, vía reducción del oxígeno molecular, a la formación de peróxidos que, a su vez, pueden entrar en el mecanismo promovido por las especies Fe(II)/Fe(III)-quinol/quinona, generándose de esta forma radicales hidroxilos altamente reactivos. Estas últimas especies, resultantes de las reacciones (12) y (13), desencadenan la peroxidación lipídica de acuerdo a:



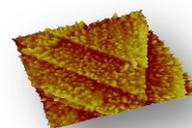
No obstante, a diferencia de $\text{HO}\cdot$, el radical superóxido $\text{O}_2^{\cdot -}$ generado en la reacción (6) pasa por ser un oxidante demasiado débil como para dar lugar a la reacción (14).⁸⁷ En este sentido, hay que añadir que en neuronas dopaminérgicas de pacientes con Parkinson se han detectado niveles



significativamente altos de hierro.⁸⁸ Además, las características exhibidas por algunas quinonas en cuanto a su capacidad para atrapar iones hierro junto a su moderada hidrofobicidad constituyen requisitos indispensables para la peroxidación lipídica.⁸⁹ Por tanto, las regiones altamente ricas en hierro presentes en la película granular de melanina podrían ser las responsables de la producción de especies radicalarias tipo HO[•] capaces, como se ha visto, de desencadenar la reacción (14).

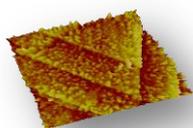
En relación a lo anterior, se debe comentar que se ha descrito en la bibliografía que las eumelaninas no son capaces de reducir oxígeno por sí solas.⁹⁰ De hecho, el potencial electroquímico de gránulos de neuromelanina y de melanosomas es de $-0,35 \pm 0,2$ V, lo que parece no ser lo suficientemente catódico como para generar niveles altos de estrés oxidativo.⁸⁹ Es, en cualquier caso, difícil asignar el potencial electroquímico del biopolímero a alguna especie química específica presente en la superficie del mismo dado que la estructura química de este pigmento permanece aún bajo debate y también debido a la inevitable presencia de lípidos, proteínas y cationes metálicos que los acompañan.⁹⁰ Sin embargo, lo que sí se ha determinado es que este potencial es independiente de la concentración de Fe(III).⁹¹ Ahora bien, el valor del potencial, de $-0,35 \pm 0,2$ V, es bastante próximo a la ventana de potencial correspondiente al par rédox quinol/ quinona que se deduce de las experiencias electroquímicas mostradas en fig. IV.3.10. Por tanto, parece razonable asumir que el potencial electroquímico de las eumelaninas naturales está condicionado fundamentalmente por tales grupos funcionales.

Por último y aunque ya se hizo referencia a este hecho en la fig. IV.3.26, en lo que sigue se ha abordado en mayor detalle el estudio de la habilidad de los electrodepositos del sistema melanina-hierro sobre HOPG para catalizar la electroreducción de HO₂⁻. Hay que decir que el desarrollo de biosensores de peróxido de hidrógeno es importante desde el punto de vista de diversos campos como pueden ser las industrias farmacéutica y alimentaria y el análisis medioambiental.⁹² Por otro lado, el peróxido de hidrógeno resulta ser un analito de gran importancia toda vez que pasa por ser uno de los productos/intermedios/ sustratos más relevantes en multitud de reacciones catalizadas



por enzimas.⁹² En este sentido, hay que decir que la reacción de reducción de peróxido de hidrógeno ha sido ampliamente estudiada sobre diversas superficies y materiales electródicos. Incluso se ha descrito que superficies carbonosas convenientemente oxidadas son capaces de catalizar esta reacción, tradicionalmente bastante bloqueada en tales sustratos,^{75a} en soluciones alcalinas.⁹³ Además, la electrocatálisis de la reducción de peróxido es también interesante desde el punto de vista del empleo de materiales basados en óxidos de hierro como cátodos para bioceldas de combustible, dada la alta solubilidad que el H_2O_2 ofrece en electrolitos acuosos, su alto potencial termodinámico y la facilidad para su almacenamiento. De hecho, existen en la bibliografía distintos ejemplos en los que los óxidos de hierro y nanocomposites de éstos son objeto del estudio de la electrorreducción de peróxido de hidrógeno.^{73,94} Incluso, se ha probado recientemente que la actividad catalítica de los nanotubos de carbono frente al peróxido deben atribuirse a las impurezas de óxidos de hierro presentes en los mismos en detrimento de la actividad catalítica debida a los bordes, como se creía previamente.^{77b}

A tal fin se han representado en la Figura IV.3.28a los barridos catódicos correspondientes a voltamogramas registrados en presencia de 12 mM de HO_2^- en NaOH 0,1 M para HOPG y películas de melanina de diferentes tiempos de adsorción sobre HOPG. Como ya se ha visto, el primer pico catódico, CA, sólo visible en películas gruesas, corresponde a la electrorreducción de O_2 a HO_2^- . Este hecho se justificaría en términos de la mayor presencia de especies quinol/ quinona sobre el plano basal, fig. IV.3.1d y IV.3.9d, capaces de catalizar la reducción de las pequeñas cantidades de oxígeno generadas por la rápida descomposición del HO_2^- en NaOH 0,1 M. Por su parte, el pico CB que aparece a potenciales más negativos corresponde, dada la dependencia existente entre la densidad de corriente medida en dicho pico y la concentración de peróxido, fig. IV.3.26a, a la electrorreducción de 2 electrones de HO_2^- a H_2O .



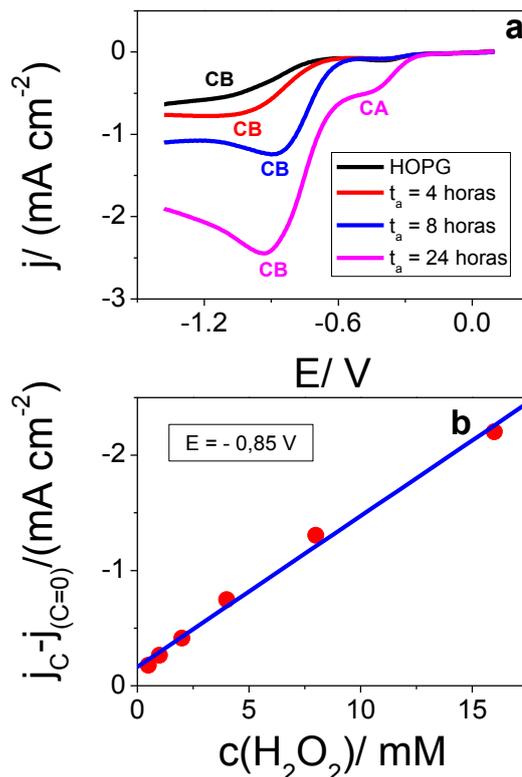
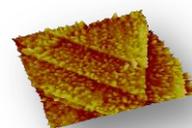


Figura IV.3.28. (a) Voltamogramas estabilizados registrados a $0,2 V s^{-1}$ en $12 mM$ de HO_2^- + $0,1 M$ de NaOH para HOPG (línea negra) y películas de melanina sobre HOPG de diferentes tiempos de adsorción: $t_a = 4$ horas (roja), 8 horas (azul) y 24 horas (magenta). (b) Densidad de corriente estacionaria, $j_C - j_{(C=0)}$, frente a la concentración de HO_2^- para una película de melanina sobre HOPG de $t_a = 24$ horas (círculo rojo). Así, j_C sería la densidad de corriente registrada a $-0,85 V$ en NaOH $0,1 M$. Por su parte, $j_{C=0}$ es la densidad de corriente medida en ausencia de HO_2^- .

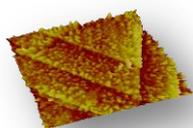
Parece claro que en la medida en que el recubrimiento del plano basal con el sistema melanina-hierro se incrementa, el potencial correspondiente al pico CB se va desplazando hacia potenciales menos negativos, pasando desde los $-1,1 V$ para el HOPG hasta los $-0,85 V$ que se han podido registrar para los electrodepositos más gruesos, esto es, $t_a = 4$ y 24 horas. Además, las densidades de corrientes relacionadas con esta reacción también se ven notablemente aumentadas en la medida en que crece el tiempo de adsorción. Llegados a este punto es interesante advertir el hecho de que el efecto catalítico es más reducido en el caso de la película de $t_a = 4$ horas donde el contenido en hierro del electrodeposito es, como se mostró en la fig. IV.3.3b, poco significativo. Por otro lado, las experiencias realizadas en el caso de las películas de especies oxo-hidroxidas de hierro sobre HOPG, fig. IV.3.11b,

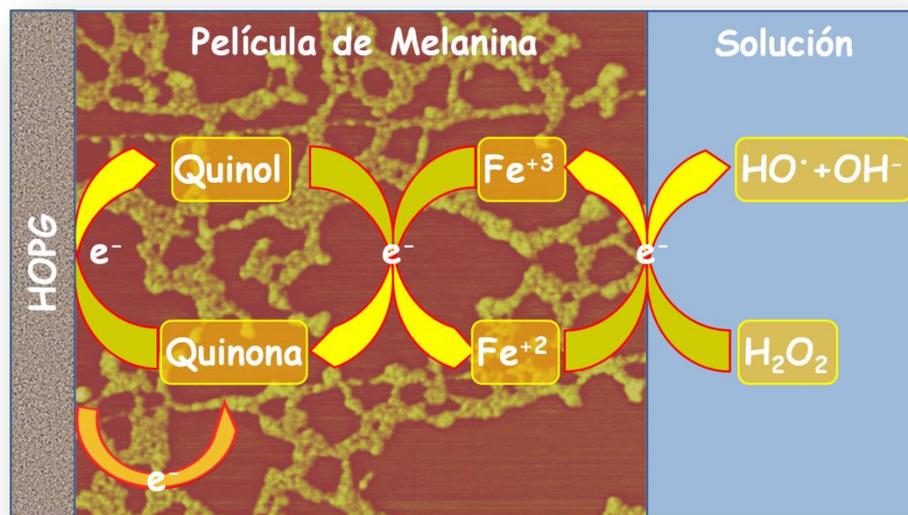


mostraron una débil actividad catalítica en comparación con el sustrato de HOPG frente a la reducción de peróxido. Por tanto, los mejores resultados se obtuvieron para el sistema melanina-hierro, demostrándose así que ambos componentes, es decir los pares rédox Fe(II)/ Fe(III)-quinol/ quinona contribuyen al desplazamiento hacia potenciales más positivos del potencial requerido para la reducción de HO_2^- .

En general, a partir de los resultados mostrados, se puede concluir que la presencia de los electrodepositos de melanina-hierro reduce el sobrepotencial para la electroreducción de peróxido en aproximadamente 0,25 V y, además, aumenta significativamente el área superficial activa con respecto al plano basal del HOPG. Por su parte, la figura IV.3.28b muestra el comportamiento lineal exhibido por la densidad de corriente, registrada a -0,85 V, frente a la concentración de peróxido de hidrógeno. Si bien es cierto que la electroreducción de HO_2^- acontecía en el rango de potenciales entre -0,75/ -0,8 V en el caso de películas de melanina electrodepositadas sobre Au(111),^{21,22} no lo es menos el hecho de que los sustratos en base carbón ofrecen la ventaja de ser significativamente más baratos y de ser materiales biocompatibles. Ya se han apuntado en capítulos anteriores y en las líneas precedentes aspectos concernientes al mecanismo involucrado en la electroreducción. De hecho, es comúnmente reconocido que el sistema melanina-hierro cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno produciendo especies radicalarias causantes del estrés oxidativo en el cerebro.⁹⁵ Así, de la misma forma que en el caso de los electrodepositos de melanina sobre Au(111), la reacción que se propone para la electroreducción de HO_2^- es la (13), catalizada por pares rédox Fe(II)/ Fe(III)-quinol/ quinona presentes en las películas sobre HOPG que favorecen la transferencia electrónica al sustrato.

Se ha representado gráficamente el mecanismo propuesto en el Esquema IV.3.2:

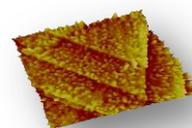




Esquema IV.3.2. Posible mecanismo de reacción para la actividad electrocatalítica de las películas de melanina-hierro en la región de potencial del pico CB (-0.85 V).

IV.3.3. Conclusiones

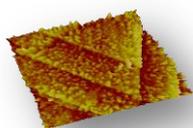
En general se ha demostrado que es posible implementar significativamente la reactividad química de la superficie del grafito mediante la electrodeposición de melanina. Tales depósitos son estables y activos electroquímicamente en una amplia ventana de potenciales y de pH. Estas películas se han mostrado capaces de atrapar pequeñas cantidades de especies de hierro y de otros cationes metálicos, Cu en concreto, por simple inmersión. Además, nuestros resultados demuestran que el electrodeposito granular de melanina-hierro reduce el sobrepotencial para la electroreducción de oxígeno y peróxido de hidrógeno a agua, produciendo así especies radicalarias oxigenadas en el transcurso de la reacción, al tiempo que aumentan el área superficial activa con respecto al plano basal del HOPG. De esta forma, los gránulos de melanina ricos en hierro serían capaces de acoplar la reducción de oxígeno a la peroxidación lipídica. Así, el estudio electroquímico de estas películas proporciona nuevas evidencias para entender mejor el efecto neurotóxico del sistema melanina-hierro. Por último, cabe decir que las superficies de HOPG modificadas con melanina-hierro pueden ser interesantes en diversos campos como la electrocatálisis, el electroanálisis y como sistema biomimético para estudiar las interacciones de este biopolímero con nanopartículas y con



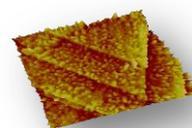
distintos cationes metálicos. Los resultados descritos en el presente capítulo han sido recientemente publicados en medios de difusión internacional.⁹⁶

IV.3.4. Bibliografía

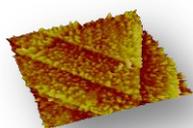
- 1) (a) M.A.T. Gilmartin, J.P. Hart, *Analyst*, **1995**, *120*, 1029-1045. (b) D. Martorell, F. Cespedes, E. Martinez-Fabregas, E. Alegret, *Anal. Chim. Acta*, **1994**, *290*, 343-348. (c) F. Scholz, B. Meyer, *Voltammetry of Solid Microparticles Immobilized on Electrode Surfaces*, A.J. Bard, I. Rubinstein, Eds.; Marcel Dekker: New York, **1998**; Vol. 20. (d) F. Scholz, U. Schröder, R. Gulaboski, *Electrochemistry of Immobilized Particles and Droplets*; Springer: Heidelberg, Berlin, **2005**.
- 2) C.E. Banks, R.G. Compton, *Anal. Sci.*, **2005**, *21*, 1263-1268.
- 3) C.M. Welch, C.E. Banks, A.O. Simm, R.G. Compton, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, *382*, 12-21.
- 4) S.B. Sinnotti, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **2002**, *2*, 113.
- 5) K. Balasubramanian, M. Burghard, *Small*, **2004**, *1*, 180.
- 6) Z. Klusek, P. Kobierski, W. Olejniczak, *Appl. Phys. A*, **1998**, *66*, S129.
- 7) S. Kwon, R. Vidic, E. Borguet, *Carbon*, **2002**, *40*, 2351.
- 8) A. Perez, L. Bardotti, B. Prevel, P. Jensen, M. Treilleux, P. Mélinon, J. Gierak, G. Faini, D. Mailly, *New J. Phys.*, **2002**, *4*, 76.
- 9) A.V. Ellis, K. Vijayamohan, R. Goswami, N. Chakrapani, L. Ramanathan, P. MAjayan, G. Ramanath, *Nano Lett.*, **2003**, *3*, 279.
- 10)(a) B.R. Goldsmith, J.G. Coroneus, V.R. Khalap, A.A. Kane, G.A. Weiss, P.G. Collins, *Science*, **2007**, *315*, 77. (b) T. Ramanathan, F.T. Fisher, R.S. Ruoff, L.C. Brinson, *Chem.Mater.*, **2005**, *17*, 1290. (c) Y.-Y. Ou, M.H. Huang, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*, 2031.
- 11)S. Subianto, G. Hill, P. Meredith, *Polymer*, **2005**, *46*, 11505.
- 12)M. Chicharro, A. Sánchez, A. Zapardiel, M.D. Rubianes, G. Rivas, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, *523*, 185.
- 13)M.D. Rubianes, G.A. Rivas, *Anal. Lett.*, **2003**, *36*, 1311.
- 14)S.H. DuVall, R.L. McCreery, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 6759–6764.
- 15)C.L. Serpentine, C. Gauchet, D. Montauzon, M. Comtat, J. Ginestar, N. Paillous, *Electrochim. Acta*, **2000**, *45*, 1663–1668.



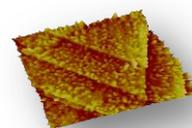
- 16) C.E. Turick, A.A. Ekechukwu, C.E. Milliken, A. Casadevall, E. Dadachova, *Bioelectrochemistry*, **2011**, *82*, 69-73.
- 17) I. Kruusenberg, N. Alexeyeva, K. Tammeveski, *Carbon*, **2009**, *47*, 651-658.
- 18) A. Sarapuu, K. Helstein, D.J. Schiffrin, K. Tammeveski, *Electrochem Solid-State Lett.*, **2005**, *8*:E30-3.
- 19) K.K. Cline, M.T. McDermott, R.L. McCreery, *J. Phys. Chem.*, **1994**, *98*, 5314.
- 20) S. Gidanian, P.J. Farmer, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, *89*, 54.
- 21) P. Díaz, Y. Gimeno, P. Carro, S. González, P.L. Schilardi, G. Benítez, R.C. Salvarezza, A. Hernández Creus, *Langmuir*, **2005**, *21*, 5924.
- 22) A. Orive, P. Dip, Y. Gimeno, P. Diaz, P. Carro, A. Hernandez Creus, G. Benitez, P.L. Schilardi, L. Andrini, F. Requejo, R.C. Salvarezza, *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 473.
- 23) (a) Y. Liu, V. Kempf, A. Samokhvalov, J.D. Simon, *Pigment Cell Res.*, **2003**, *16*, 608. (b) B. Szpoganicz, S. Gidanian, P. Kong, P. Farmer, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, *89*, 45.
- 24) M.B. Clark, J.A. Gardella Jr., J.M. Schultz, D.G. Patil, L. Salvati Jr., *Anal. Chem.*, **1990**, *62*, 949.
- 25) G.M. Gadd, *Mycologist*, **2004**, *18*, 60.
- 26) M.L. Tran, J.B. Powell, P. Meredith, *Biophys. J.*, **2006**, *90*, 743.
- 27) S.A. Centeno, J. Shamir, *J. Mol. Struct.*, **2008**, *873*, 149-159.
- 28) (a) V. Capozzi, G. Perna, A. Gallone, P.F. Biagi, P. Carmone, A. Fratello, G. Guida, P. Zanna, R. Cicero, *J. Mol. Struct.* **2005**, *744-747*, 717-721. (b) A. Samokhvalov, Y. Liu, J.D. Simon, *Photochem. Photobiol.*, **2004**, *80*, 84-88.
- 29) (a) B. Bilinska, *Spectrochim. Acta Part A*, **1996**, *52*, 1157-1162. (b) C.M. Cheng, G. Kou, X.L. Wang, S.H. Wang, H.C. Gu, Y.J. Guo, *J. Magn. Magn. Matter.*, **2009**, *321*, 2663-2669. (c) M.C. Bautista, O. Bomati-Miguel, M.P. Morales, C.J. Serna, S. Veintemillas-Verdaguer, *J. Magn. Magn. Matter.*, **2005**, *293*, 20-27. (d) P.S.R. Prasad, K. Shiva Prasad, C. Krishna, E. V. S. S. K. Babu, B. Sreedhar, M.S. Ramana, *J. Asian Earth Sci.*, **2006**, *27*, 503-511. (e) M.P. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer,



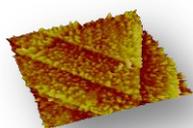
- M.I. Montero, C.J. Serna, *Chem. Mater.*, **1999**, 11, 3058.
- 30) F. Cataldo, *Polym. Int.*, **1998**, 46, 263.
- 31) A. Salimi, H. Eshghi, H. Sharghi, S.M. Golabi, M. Shamsipur, *Electroanalysis*, **1999**, 11, 114.
- 32) S.A. Trammell, D.A. Lowy, D.S. Seferos, M. Moore, G.C. Bazan, N. Lebedev, *J. Electroanal. Chem.*, **2007**, 603, 33.
- 33) P.A. Carneiro, N. Boralle, N.R. Stradiotto, M. Furlan, M.V. Zanoni, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2004**, 15, 587.
- 34) M.E. Vela, J.R. Vilche, A.J. Arvia, *Electrochim. Acta*, **1986**, 31, 1633.
- 35) A.G. Orive, P. Dip, Y. Gimeno, P. Diaz, P. Carro, A. Hernandez Creus, G. Benitez, P.L. Schilardi, L. Andrini, F. Requejo, R.C. Salvarezza, *Chem. Eur. J.*, **2007**, 13, 473.
- 36) A.J. Kropf, B.A. Bunker, M. Eisner, S.C. Moss, L. Zecca, A. Stroppolo, P.R. Crippa, *Biophys. J.*, **1998**, 75, 3135.
- 37) L. Hong, J.D. Simon. *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 7938.
- 38) J. Kunze, V. Maurice, L.H. Klein, H.H. Strehblow, P. Marcus, *Electrochim. Acta*, **2003**, 48, 1157.
- 39) P. Shen, N. Chi, K.-Y. Chan, D.L. Phillips, *Appl. Surf. Sci.*, **2001**, 172, 159.
- 40) Y. Gimeno, A. Hernández Creus, P. Carro, S. González, R.C. Salvarezza, A.J. Arvia, *J. Phys. Chem. B*, **2002**, 106, 4232.
- 41) J. McLean, O.W. Purvis, B.J. Williamson, E.H. Bailey, *Nature*, **1998**, 391, 649.
- 42) S. Yu, G.M. Chow, *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 2781.
- 43) M.C. Bautista, O. Bomati-Miguel, M. del Puerto Morales, C.J. Serna, S. Veintemillas-Verdaguer, *J. Magnet. Magnet. Mater.*, **2005**, 293, 20.
- 44) M.A. Muñoz Pérez, M.C. Carmona Guzmán, J. Hidalgo Toledo, M. Balón Almeida, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1986**, 2, 1573.
- 45) B.H. Lower, L. Shi, R. Yongsunthon, T.C. Droubay, D.E. McCready, S.K. Lower, *J. Bacteriol.*, **2007**, 189, 4944.
- 46) (a) A. Hengerer, J. Grimm, *Biomed. Imaging Interv. J.*, **2006**, 2, e8. (b) W.S. Enochs, P. Petherick, A. Bogdanova, U. Mohr, R. Weissleder, *Radiology*, **1997**, 204, 417.



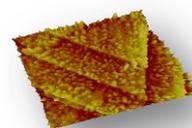
- 47) L. Hong, Y. Liu, J.D. Simon, *Photochem. Photobiol.*, **2004**, *80*, 477.
- 48) G.S. Huang, M.T.Wang, C.W. Sua, Y.S. Chen, M.Y. Hong, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, *23*, 319.
- 49) P.J. Farmer, S. Gidanian, B. Shahandeh, A.J. Di Bilio, N. Tohidian, F.L. Meyskens, *Pigment Cell. Res.*, **2003**, *16*, 273.
- 50) F.M.F. de Groot, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, **1994**, *67*, 529.
- 51) J.M. Ramallo-López, E.J. Lede, F.G. Requejo, J. Rodríguez, J.Y. Kim, R. Rosas-Salas, J.M. Domínguez, *J. Phys. Chem.*, **2004**, *108*, 20005.
- 52) B. Ravel, D. Haskel, J.J. Rehr, E.A. Stern, Y. Yacoby, *Physica B*, **1995**, *208*, 154.
- 53) P. Meredith, T. Sarna, *Pigment Cell Res.*, **2006**, *19*, 572.
- 54) F. Bolzoni, S. Giraud, L. Lopiano, B. Bergamasco, M. Fasano, P.R. Crippa, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2002**, *1586*, 210.
- 55) (a) S. Porthun, L. Abelmann, C. Lodder, J. Magn. Magn. Mater., **1998**, *182*, 238. (b) M. Kleiber, F. Kümmerlen, M. Löhndorf, A. Wadas, R. Wiesendanger, *Phys. Rev. B: Condens. Matter*, **1998**, *58*, 5563. (c) S. Gider, J. Shi, D. D. Awschalom, P. F. Hopkins, K. F. Campman, A. C. Gossard, A. D. Kent, S. von Molnar, *Appl. Phys. Lett.*, **1996**, *69*, 3269. (d) D. H. Qin, H. Yi, H. L. Li, L. Cao, J. B. Ding, *Chem. Phys. Lett.*, **2001**, *350*, 51. (e) G. Guo, L. J. Wan, C. F. Zhu, D. L. Yang, D. M. Chen, C. L. Bai, *Chem. Mater.*, **2003**, *15*, 664. (f) M. Cavallini, J. Gómez-Segura, D. Ruiz-Molina, M. Massi, C. Albonetti, C. Rovira, J. Veciana, F. Biscarini, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2005**, *44*, 888.
- 56) S. Sun, S. Anders, H.F. Hamann, J.U. Thiele, J.E.E. Baglin, T. Thomson, E.E. Fullerton, C.B. Murray, B.D. Terris, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 2884.
- 57) M. Rasa, B.W.M Kuipers, A. Philipse, *J. Colloid Interface Sci.*, **2002**, *250*, 303.
- 58) V. Franco-Puntes, X. Batlle, A. Labarta, *European Phys. J. B*, **2000**, *17*, 43.
- 59) V.F. Puntes, P. Gorostiza, D.M. Aruguete, N.G. Bastus, A.P. Alivisatos, *Nat. Mater.*, **2004**, *3*, 263.
- 60) J. Hu, X.-D. Xiao, D.F. Ogletree, M. Salmeron, *Science*, **1995**, *269*, 267.



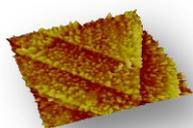
- 61) S. Schreiber, M. Savla, D.V. Pelekhov, D.F. Iscru, C. Selcu, P.C. Hammel, G. Agarwal, *Small*, **2008**, 4 (2), 270.
- 62) (a) C.S. Neves, P. Quaresma, P.V. Baptista, P.A. Carvalho, J.P. Araujo, E. Pereira, P. Eaton, *Nanotechnology*, **2010**, 21, 305706. (b) N. Domingo, E. Bellido, D. Ruiz-Molina, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 258. (c) S. Singamaneni, V.N. Bliznyuk, C. Binek, E.Y. Tsybmal, *J. Mater. Chem.*, **2011**, 21, 16819.
- 63) R.B. Frankel, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1984**, 13, 85.
- 64) B. Slijukic, C.E. Banks, R.G. Compton, *J. Iran. Chem. Soc.*, **2005**, 2, 1.
- 65) (a) E. Yaeger, *Electrochim. Acta*, **1984**, 29, 1527. (b) E. Yaeger, *J. Mol. Catal.*, **1986**, 38, 5.
- 66) D.T. Sawyer, G.J. Chlericato, C.T. Angelis, E.J.J. Nanni, T. Tsuchlya, *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 1720.
- 67) A. Salimi, H. Eshghi, H. Sharghi, S.M. Golabi, M. Shamsipur, *Electroanalysis*, **1999**, 11, 114.
- 68) I. Bhugun, F. C. Anson, *Inorg. Chem.*, **1996**, 35, 7253.
- 69) J. Yang, J.J. Xu, *Electrochem. Commun*, **2003**, 5, 306.
- 70) S. Cere, M. Vazquez, S. R. de Sanchez, D.J. Schiffrin, *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, 505, 118.
- 71) (a) M. Khorasani-Motlagh, M. Noroozifar, A. Ghaemi, N. Safari, *J. Electroanal. Chem.*, **2004**, 565, 115. (b) S. A. Mamuru, K.I. Ozoemena, *Electrochem. Commun.*, **2010**, 12, 1539. (c) W. Lu, C. Wang, Q. Lv, X. Zhou, *J. Electroanal. Chem.*, **2003**, 558, 59. (d) D. van den Ham, C. Hinnen, G. Magner, M. Savyf, *J. Phys. Chem.*, **1987**, 91, 4743.
- 72) (a) F. Mirkhalaf, K. Tammeveski, D.J. Schiffrin, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, 11, 3463. (b) J.S. Jirkovsky, M. Halasa, D.J. Schiffrin, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, 12, 8042.
- 73) M.V.A. Martins, C. Bonfim, W.C. da Silva, F.N. Crespilho, *Electrochem. Commun.*, **2010**, 1509.
- 74) (a) J. Qu, Y. Shen, X. Qu, S. Dong, *Chem. Commun.*, **2004**, 1, 34. (b) G. Jürmann, K. Tammeveski, *J. Electroanal. Chem.*, **2006**, 597, 119. (c) I. Kruusenberg, N. Alexeyeva, K. Tammeveski, *Carbon*, **2009**, 47, 651.
- 75) (a) K. Tammeveski, K. Kontturi, R.J. Nichols, R.J. Potter, D.J. Schiffrin,



- J. Electroanal. Chem.*, **2001**, 515, 101. (b) J.R. Tobias, J. Johnson, E. Wass, E. Ahlberg, I. Panas, D.J. Schiffrin, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2006**, 8, 4189. (c) G. Jürmann, D.J. Schiffrin, K. Tammeveski, *Electrochim. Acta*, **2007**, 53, 390.
- 76) A. Sarapuu, K. Helstein, D.J. Schiffrin, K. Tammeveski, *Electrochem. Solid-State Lett.*, **2005**, 8, 30.
- 77) (a) M.T. McDermott, R.L. McCreery, *J. Phys. Chem.*, **1994**, 10, 4307. (b) C.E. Banks, A. Crossley, C. Salter, S.J. Wilkins, R.G. Compton, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 2533.
- 78) (a) R. McIntyre, D. Scherson, W. Storek, H. Gerischer, *Electrochim. Acta*, **1987**, 32, 51. (b) K.K. Cline, M.T. McDermott, R.L. McCreery, *J. Phys. Chem.*, **1994**, 98, 5314.
- 79) (a) J.P. Randin, E. Yeager, *J. Electroanal. Chem.*, **1972**, 36, 257. (b) J.P. Randin, E. Yeager, *J. Electrochem. Soc.* **1971**, 118, 711.
- 80) F. Cataldo, *Polym. Int.*, **1998**, 46, 263.
- 81) M.S. Hossain, D. Tryk, E. Yeager, *Electrochim. Acta*, **1989**, 34, 1733.
- 82) Zhao, F.; Harnisch, F.; Schro, U; Scholz, F.; Bogdanoff, P.; Herrmann, I. *Electrochem. Commun.*, **2005**, 7, 1405.
- 83) A.B. Anderson, R.A. Sidik, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, 5031.
- 84) N. Kobayashi, Y. Nishiyama, *J. Phys. Chem.*, **1985**, 89, 1167.
- 85) L. Benov, *Protoplasma*, **2001**, 217, 1.
- 86) C.W.B. Bezerra, L. Zhang, K. Lee, H. Liu, J. Zhang, Z. Shi, A.L.B. Marques, E.P. Marques, S. Wu, J. Zhang, *Electrochim. Acta*, **2008**, 53, 7703.
- 87) (a) D. Ben-Shachar, M.B. Youdim, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.*, **1993**, 17, 139. (b) L. Zecca, F.A. Zucca, H. Wilms, D. Sulzer, *Trends Neurosci.*, **2003**, 26, 578.
- 88) A.E. Oakley, J.F. Collingwood, J. Dobson, G. Love, H.R. Perrott, J.A. Edwardson, M. Elstner, C.M. Morris, *Neurology*, **2007**, 68, 1820.
- 89) C. Depboylu, A. Matusch, F. Tribl, M. Zoriy, P.P. Michel, P. Riederer, M. Gerlach, S. Becker, W.H. Oertel, G.U. Höglinger, *Neurodegenerative Dis.*, **2007**, 4, 2.
- 90) W.D. Bush, J. Garguilo, F.A. Zucca, A. Albertini, L. Zecca, G.S.



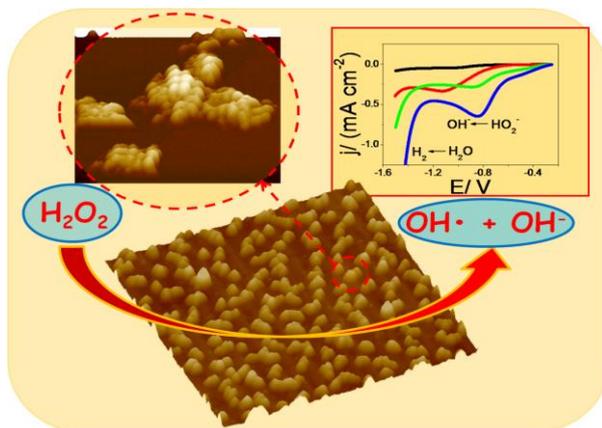
- Edwards, R.J. Nemanich, J.D. Simon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, *103*, 14785.
- 91) J.D. Simon, *Pigment Cell Res.*, **2006**, *19*, 527.
- 92) L. Giannoudi, E.V. Piletska, S.A. Piletsky, *Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips Biosensors and Biodevices*, M.T. Giardi, E.V. Piletska, Eds.; Springer, New York, **2006**.
- 93) J. Xu, W. Huang, R.L. McCreery, *J. Electroanal. Chem.*, **1996**, *410*, 235.
- 94) (a) B. Slijukic, C.E. Banks, R.G. Compton, *Nano Lett.*, **2006**, *6*, 1556. (b) K.J. McKenzie, F. Marken, M. Hyde, R.G. Compton, *New J. Chem.*, **2002**, *26*, 625.
- 95) (a) S. Husain, S.M. Hadi, *Mutat. Res.*, **1998**, *397*, 161. (b) M. Gerlach, K.L. Double, D. Ben-Shachar, L. Zecca, M.B. Youdim, P. Riederer, *Neurotoxicol. Res.*, **2003**, *5*, 35.
- 96) (a) A. González Orive, Y. Gimeno, A. Hernández Creus, D. Grumelli, C. Vericat, G. Benítez, R.C. Salvarezza, *Electrochim. Acta*, **2009**, *54*, 1589. (b) A. González Orive, A. Hernández Creus, D. Grumelli, G. Benítez, I. Andrini, F.G. Requejo, C. Bonazzola, R.C. Salvarezza, *J. Phys. Chem. C*, **2009**, *113*, 17097.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.4. MODIFICACIÓN ELECTROQUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CON EL SISTEMA HIERRO-MELANINA

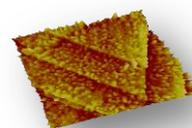
En este capítulo se presenta un nuevo método para la modificación de nanopartículas de oro de 3 nm de diámetro con eumelanina sintética. Con objeto de evaluar tanto la morfología, composición química y características de los depósitos así como su actividad electrocatalítica, se hará uso de técnicas de microscopía de sonda, de variadas técnicas espectroscópicas y de las metodologías electroquímicas habituales.



IV.4.1. Antecedentes

En la actualidad uno de los campos más activos en lo concerniente a la investigación en nanociencia y nanotecnología consiste en la preparación de nanopartículas metálicas (NPs) con potencial aplicación en catálisis heterogénea,¹ electrocatálisis,² biosensores³ y diagnósticos médicos.⁴ Su interés, desde un punto de vista catalítico, radica en su gran área superficial específica así como en la dependencia existente entre las dimensiones y geometría de las partículas y su actividad catalítica y selectividad frente a reacciones específicas. Así, estas NPs se han empleado profusamente en la modificación, por diferentes métodos tales como la deposición física en fase vapor, electrodeposición⁵ y evaporación a partir de disoluciones de las propias NPs,⁶ sobre superficies de metales, zeolitas, Si, mica, HOPG, carbón vítreo, de sustratos nano y mesoporosos y nanotubos de carbono.⁷

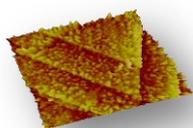
En este sentido, las nanopartículas de Au (AuNPs) destacan en el colectivo de NPs debido a la disponibilidad de un número significativamente alto de diferentes métodos de síntesis que permiten, de forma simple en la mayoría de los casos, obtener partículas de las dimensiones y geometrías deseadas con



una distribución de tamaños más o menos monodispersa, dotadas de una gran estabilidad en el tiempo y de propiedades fisicoquímicas características,⁸⁻¹⁰ según el caso. Además, previamente depositadas sobre sustratos de diferente naturaleza, son capaces de catalizar diversas reacciones tales como oxidación, hidrogenación e hidroclicación.¹¹⁻¹⁶

En general, las AuNPs se pueden preparar bien por codeposición de una sal de Au y un óxido metálico,¹⁷ por deposición-precipitación, por bombardeo iónico en fase gaseosa o por deposición química en fase vapor,¹¹ entre otros. Ahora bien, estos métodos de síntesis producen nanopartículas con una distribución de tamaños que no es lo suficientemente reducida como para poner de manifiesto propiedades dependientes de las dimensiones de la partícula. Por contra, las estrategias de síntesis de AuNPs basadas en la incorporación de recubrimientos orgánicos estabilizantes como, por ejemplo, el de tiolato¹⁸ (TAuNPs), resultan más efectivas y ofrecen mejores resultados en este sentido. La presencia de esta capa de ligandos protectores permite, por un lado, evitar la tendencia natural de las nanopartículas a agregarse para disminuir su energía superficial, una vez formadas, y, por otro, controlando la estequiometría del ión metálico precursor accesible y la pasivación del ulterior crecimiento por parte de la capa protectora, determinar las dimensiones de la nanopartícula.¹⁹ Además, estas TAuNPs poseen una amplia variedad de aplicaciones tecnológicas que abarcan desde la electrónica molecular²⁰ a la medicina.²¹ Nótese, no obstante, que con fines catalíticos y electrocatalíticos, este recubrimiento debe ser completamente retirado en la mayoría de los casos, aunque éste hecho pueda desembocar en la agregación de las NPs.²² Así, existe una apreciable variedad de procedimientos descritos en la bibliografía reciente que permiten obtener AuNPs desprovistas de su recubrimiento protector de tiolato entre los que destacan sobremanera el tratamiento térmico, la exposición a radiación UV, la electrodesorción reductiva, etc.²³

Por su parte, el grafito en sus diferentes variantes resulta ser uno de los electrodos sólidos más ampliamente utilizados en estudios electroquímicos y electroanalíticos.²⁴ En los últimos tiempos la inmovilización de AuNPs sobre sustratos carbonosos ha atraído considerablemente la atención de la

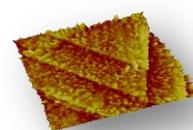


comunidad científica, especialmente en lo que hace referencia al desarrollo de diversas estrategias de funcionalización de nanotubos de carbono (CNT) que permiten anclar covalentemente las AuNPs en su superficie.²⁵ Sin embargo, no debe obviarse el hecho de que tal modificación suele, en ocasiones, venir acompañada de la alteración de las propiedades electrónicas de los CNT.²⁶ Desde este punto de vista el desarrollo de otros métodos de inmovilización de NPs resultaría de especial interés.

Por último, cabe destacar que la modificación de NPs con recubrimientos orgánicos, biorgánicos y de óxidos metálicos resulta notablemente atractiva si se tiene en cuenta el vasto número de potenciales aplicaciones que presentan tanto en nanociencia como en nanotecnología.²⁷ En este sentido, se debe comentar que distintos recubrimientos bio-orgánicos de hierro exhiben óptimos rendimientos en el campo de la catálisis. En concreto, distintas moléculas que contienen hierro como pueden ser ftalocianinas,²⁸ porfirinas²⁹ y melaninas³⁰ han mostrado propiedades electrocatalíticas interesantes frente a una amplia variedad de reacciones.

IV.4.2. Preparación y liberación por medios electroquímicos de AuNPs modificadas con melanina

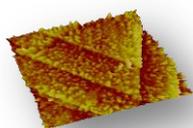
La adsorción espontánea de TAuNPs por inmersión de sustratos carbonosos sin modificar en soluciones que las contengan, se presenta como una alternativa más que interesante a los métodos más comúnmente empleados de inmovilización de AuNPs sobre sistemas de base carbón. Entre estos últimos destacan sobremanera la deposición electroquímica³¹ y en fase vapor³² y la evaporación del disolvente de AuNPs preparadas químicamente en solución.³³ Sin embargo, todos ellos presentan inconvenientes relacionados con una poco definida distribución de tamaños y con un escaso control sobre la cantidad de partículas retenidas sobre la superficie, respectivamente. En esta línea de razonamiento, se ha descrito recientemente en la bibliografía la adsorción de TAuNPs con distintos recubrimientos de tioles sobre HOPG por simple inmersión en soluciones de las mismas.^{8,34} Además, la cantidad de partículas inmovilizadas de esta forma en la superficie depende tanto de la concentración



de AuNPs como del tiempo de adsorción. Es más, por electrodesorción reductiva del recubrimiento de tiolato, resulta posible desorber eficientemente las AuNPs, liberándolas al medio electrolítico de donde pueden ser recuperadas por sucesivas extracciones en hexano. Por otro lado, las conclusiones extraídas en el caso del HOPG pueden ser directamente extrapoladas a la inmovilización de NPs sobre CNTs o sobre otros electrodos carbonosos de forma que se puedan exaltar las propiedades catalíticas de tales superficies de manera notablemente sencilla o también con objeto de retirar, de forma controlada, NPs recubiertas de tiol de los medios líquidos que las contengan, hecho relevante desde el punto de vista del tratamiento de residuos de NPs.

En el caso que nos ocupa, se ha utilizado la electroquímica para modificar con el sistema melanina-hierro depósitos de AuNPs esféricas de 3 nm de diámetro, recubiertas o no de nonanotiol o de dodecanotiol (*NT* y *DT*, respectivamente), adsorbidas sobre HOPG. Tal y como se ha comentado (ver sección de materiales y métodos experimentales), las T AuNPs fueron sintetizadas de acuerdo a una modificación del método de Brust.¹⁸ Hecho esto, la inmovilización de las mismas se llevó a cabo por inmersión del sustrato en una solución 2 mg mL^{-1} de las T AuNPs en hexano durante 24 horas. Concluido el tiempo de incubación, las muestras fueron escrupulosamente lavadas en hexano repetidas veces y secadas en atmósfera de nitrógeno.

Con objeto de caracterizar la composición química del depósito así obtenido, se han representado en la Figura IV.4.1 los espectros XPS registrados para el sustrato de HOPG modificado. La presencia de la señal Au 4f indica que las AuNPs han quedado eficientemente adsorbidas sobre la superficie, fig. 1a. Por su parte, la señal S 2p con un claro máximo a 162 eV, fig. IV.4.1b, indica la existencia de enlaces Au-tiolato en la superficie de las AuNPs.³⁶ De hecho, el espectro representado en negro en la fig. IV.4.1b puede ser ajustado tomando en consideración las tres componentes habituales que corresponden a tioles sin enlazar (163 eV), tioles quimisorbidos (162 eV) e impurezas de S (161 eV).³⁶ No obstante, sólo la contribución de los tioles quimisorbidos a 162 eV resultó verdaderamente significativa puesto que las otras componentes, 161 eV



y 163 eV, sólo representaron un 5 y un 10%, respectivamente.

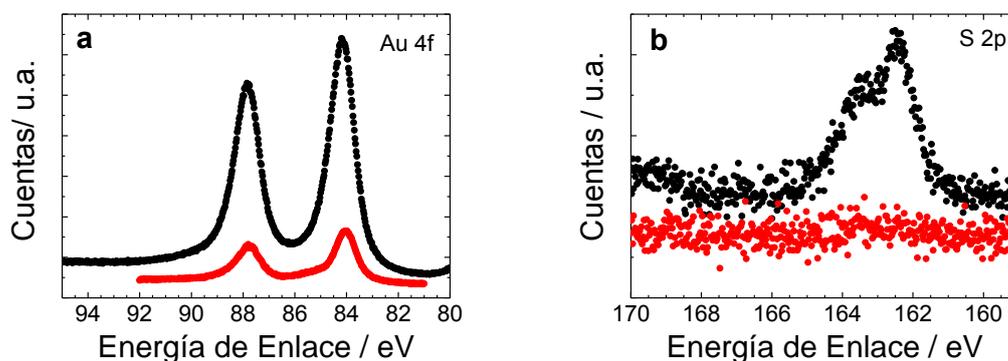
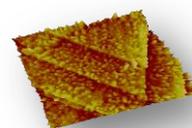


Figura IV.4.1. Espectros XPS de HOPG tras 24 h. de inmersión en solución 2 mg mL^{-1} de NT-AuNPs en hexano antes (negro) y después (rojo) de electrodesorción reductiva de NT: (a) señal Au 4f y (b) señal S 2p.

Posteriormente, se retiró el recubrimiento de NT o DT, según el caso, por electrodesorción reductiva del electrodo realizando varios ciclos voltamétricos entre $-0,2$ y $-1,7 \text{ V}$ a $0,050 \text{ V s}^{-1}$ en NaOH $0,1 \text{ M}$.³⁷ Llegados a este punto merece la pena comentar que todas las medidas electroquímicas descritas en este capítulo se llevaron a cabo en una celda específica de Teflón diseñada con la intención de eliminar la contribución de los bordes del electrodo de HOPG de los voltamogramas obtenidos. El área geométrica del electrodo de trabajo accesible a la disolución electrolítica es de $0,28 \text{ cm}^2$. Los primeros barridos en sentido negativo, justo antes del comienzo de la reacción de evolución de hidrógeno (HER), exhibieron un amplio pico catódico, fig. IV.4.2a, que se puede asociar a la desorción reductiva de los recubrimientos de NT y DT,⁸ de acuerdo a la reacción (1) que se indica a continuación:



Se necesitan aproximadamente entre 5-6 ciclos voltamétricos para eliminar completamente los recubrimientos estabilizantes de NT y DT de la superficie del HOPG modificado con AuNPs. Este hecho se pone de manifiesto por la desaparición de los picos catódicos mostrados en la fig. IV.4.2, dado que, en cada ciclo sucesivo, cada vez menores cantidades de tiolatos previamente desorbidos pueden reabsorberse sobre las AuNPs que permanecen sobre el



HOPG en el barrido anódico de vuelta.

Debe llamarse la atención sobre el hecho de que los potenciales correspondientes a la desorción de moléculas de alcanotioles en las AuNPs aparecen a sobrepotenciales mayores que los que se han observado para los mismas moléculas en el caso de monocapas autoensambladas (SAMs) sobre Au(111) o sobre Au nanoestructurado descritos en la bibliografía.³⁸ La explicación a este fenómeno hay que buscarla en la mayor energía de enlace de las moléculas de tioles en superficies de Au con gran número de defectos como adátomos y escalones.³⁹ Esto conferiría, por tanto, una mayor estabilidad a las SAMs formadas sobre las AuNPs, con gran número de defectos, en detrimento de las obtenidas sobre superficies más planas y con menor número de defectos como, por ejemplo, las de terrazas de Au(111).

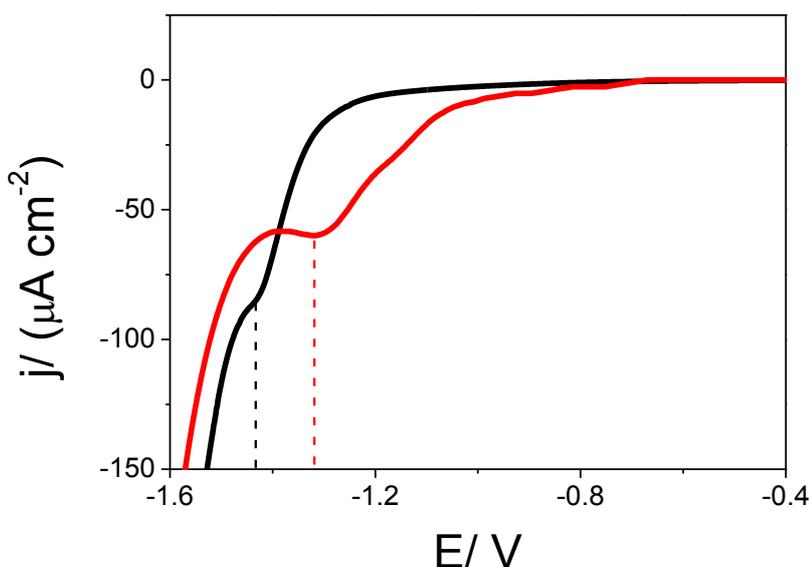
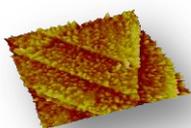


Figura IV.4.2. Curvas de densidad de corriente-potencial correspondientes a la desorción reductiva del recubrimiento de DT, negro, y NT, rojo de AuNPs depositadas sobre HOPG registradas a $0,050 \text{ V s}^{-1}$ en $\text{NaOH } 0,1 \text{ M}$.

Por otro lado, la observación de la Figura IV.4.2 permite extraer la conclusión de que las moléculas de DT se desorben electroquímicamente de las AuNPs a potenciales más catódicos que las de NT como consecuencia del incremento en el efecto estabilizante de las interacciones entre las cadenas hidrocarbonadas (van der Waals) en las primeras, debido a su mayor longitud,



en relación a las segundas.⁴⁰ Estos valores de potencial a los que tiene lugar la desorción de moléculas de tioles de AuNPs adquieren relevancia desde el punto de vista de la posibilidad de la monitorización de la descarga inducida por potencial eléctrico de determinadas sustancias y biomoléculas inmovilizadas sobre NPs por medio de alcanotioles.

La presencia de AuNPs en la disolución de NaOH tras el ciclado electroquímico del sustrato, se puso de manifiesto por medio de medidas de espectroscopía UV-Visible. Así, tras la desorción del recubrimiento de tiol por voltametría cíclica, se llevó a cabo una extracción en hexano de la disolución electrolítica con objeto de poder extraer las AuNPs que fueron desorbidas durante el proceso electroquímico. Los espectros obtenidos antes y después de la adsorción de las AuNPs sobre el HOPG, la posterior desorción del tiol y la recuperación de las AuNPs liberadas por extracción en hexano, son apreciablemente similares. Nótese, en cualquier caso, que el comportamiento del pico de absorción de plasmón en ambos espectros está en concordancia con lo que se ha observado para AuNPs de reducidas dimensiones.⁴¹

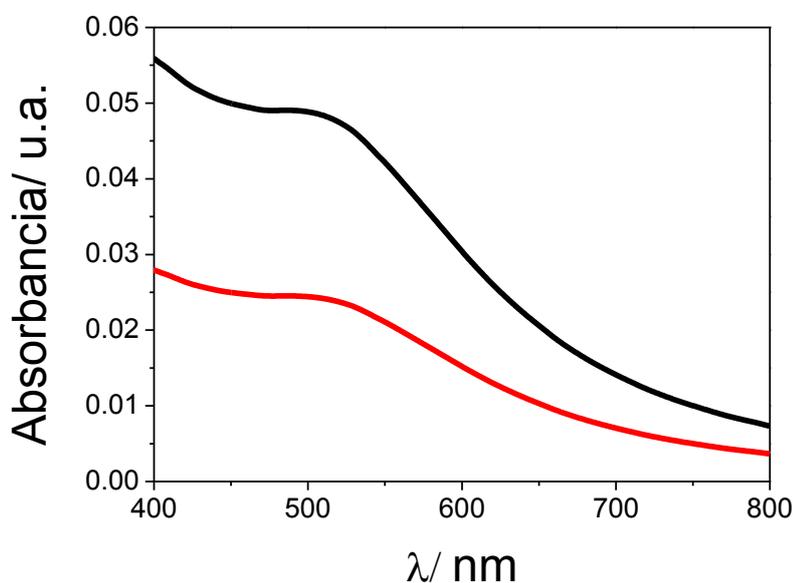
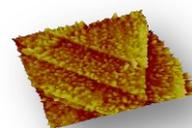


Figura IV.4.3. Espectros UV-Visible registrados en hexano para AuNPs recubiertas de NT antes de la adsorción sobre HOPG, color negro, y después de la electrodesorción reductiva de la capa de tiol en NaOH 0,1 M y posterior extracción en hexano, color rojo.



Por tanto, de acuerdo a lo descrito en la referencia [8], mientras una cantidad significativa de las AuNPs es liberada, tras la electrodesorción reductiva, a la disolución electrolítica, el resto de las AuNPs, libres ya del recubrimiento de tiol, permanece retenida sobre la superficie del HOPG. En este sentido, los espectros XPS obtenidos después del ciclado voltamétrico y de haber limpiado la muestra cuidadosamente, muestran la señal Au 4f, fig. IV.4.1a rojo, mientras que no resulta posible apreciar la de S 2p correspondiente a las moléculas de tiol, fig. IV.4.1b rojo. Por tanto, tales espectros XPS confirman que resulta posible eliminar completamente, incluso en el caso de tioles de cadena hidrocarbonada relativamente larga, por ciclado electroquímico, el recubrimiento de tiolato permitiendo, así, obtener AuNPs limpias sobre la superficie del HOPG.

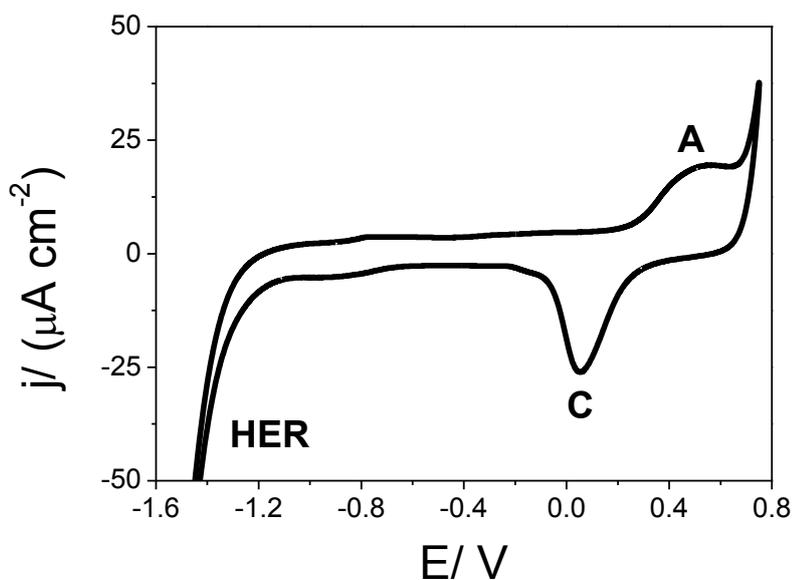
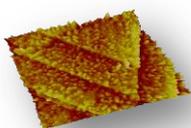


Figura IV.4.4. Voltametría cíclica de las AuNPs sobre HOPG tras la desorción del recubrimiento de tiolato. El electrolito empleado fue NaOH 0,1 M y la velocidad de barrido $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

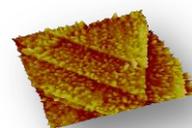
Con la intención de confirmar lo apuntado anteriormente se registraron ciclovoltagramas en NaOH 0,1 M de la superficie basal del HOPG modificado con las AuNPs tras la electrodesorción del recubrimiento de tiol. El resultado es el que se muestra en la Figura IV.4.4. Así, el voltamograma exhibe características propias de los sustratos de Au como son la formación (A) y electroreducción (C) de la monocapa de óxido de Au (AuO) que permanecen



sin alteración alguna tras ciclar repetidas veces entre las reacciones de evolución de hidrógeno, HER, y de oxígeno (*OER*).

Por su parte y con objeto de estimar la cantidad de AuNPs adsorbidas sobre el sustrato de HOPG tras 24 h de inmersión, se recurrió a la integración de la densidad de carga implicada en los picos de electrodesorción del tiol, fig. IV.4.2, magnitud que es proporcional al área electroactiva de TAuNPs, es decir, área superficial de Au, adsorbidas sobre el plano basal. Los resultados así obtenidos fueron de $0,78 \pm 0,09 \text{ cm}^2$ de área de AuNPs inmovilizadas en la superficie. Por su parte, tras la electrodesorción reductiva de la capa de tiolato, la cantidad de AuNPs limpias que permanecen sobre la superficie del HOPG se pudo estimar, a su vez, mediante la integración de la densidad de carga del pico de reducción de la monocapa de óxido de Au (C), fig. IV.4.4. En este caso, las medidas realizadas arrojaron promedios de $0,08 \pm 0,02 \text{ cm}^2$ de área de Au en forma de AuNPs retenidas en la superficie. Por tanto, la cantidad de AuNPs limpias que quedaron adsorbidas sobre el HOPG, tras la desorción del recubrimiento de tiol, representa en torno al 10% de la estimada antes de la desorción. Llegados a este punto se hace necesario comentar que los resultados obtenidos de esta forma resultaron prácticamente idénticos con independencia de la longitud de la cadena hidrocarbonada empleada en la estabilización de las AuNPs.

En este sentido, las imágenes obtenidas por AFM en modo resonante antes y después de la electrodesorción reductiva, Figura IV.4.5, permiten corroborar la liberación al medio electrolítico de una considerable cantidad de las AuNPs previamente adsorbidas:



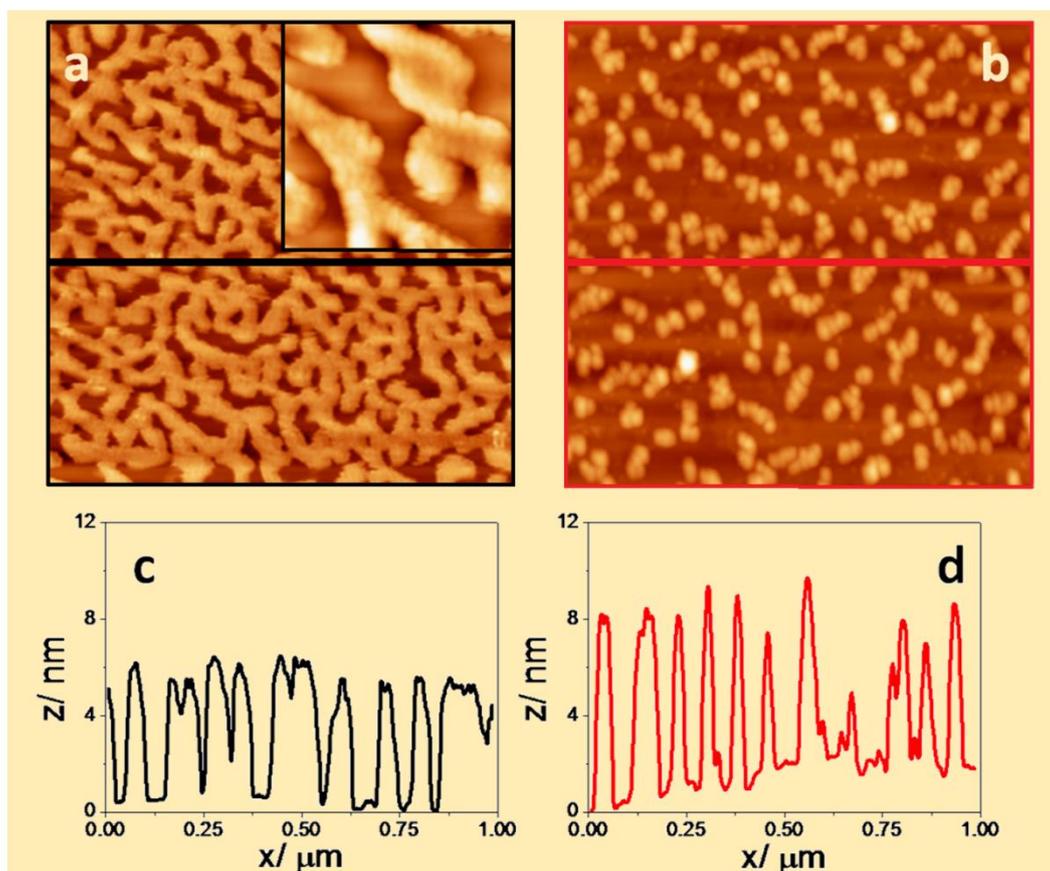
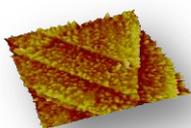


Figura IV.4.5. Imágenes AFM en modo resonante de $1,0 \times 1,0 \mu\text{m}^2$ mostrando islas de AuNPs sobre HOPG: (a) antes y (b) después de electrodesorción de DT. De igual forma, sus correspondientes secciones transversales (c) antes y (d) después, mostrando la altura de las islas. La imagen AFM insertada en (a), de $250 \times 250 \text{ nm}^2$, muestra las islas 2D con mayor detalle.

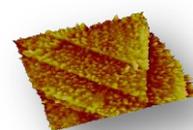
En el caso de las superficies de TAuNPs/ HOPG, fig. IV.4.5a y c, se observa la presencia de un conjunto de estructuras laminares alargadas a modo de cintas, interconectadas entre sí de, aproximadamente, 40-60 nm de ancho que no alcanzan a cubrir la totalidad de la superficie, dejando zonas de HOPG libres. La altura promedio registrada para estas cintas es de $(5,02 \pm 0,22) \text{ nm}$, valor que se ajusta fielmente a lo que cabría esperar para la altura de una monocapa de AuNPs de 3 nm recubiertas de NT/ DT. Aunque no resulta posible resolver partículas aisladas, sí es cierto que se advierte en las imágenes que tales estructuras están formadas por TAuNPs individuales, ver detalle en la fig. IV.4.5a. En cuanto a la formación de las morfologías observadas, es probable que su origen se deba a que las primeras TAuNPs, adsorbidas en las terrazas de HOPG, puedan atrapar otras nanopartículas



procedentes de la disolución formando así islas 2D. Estas islas, en la medida en que aumenta el tiempo de adsorción, incorporarían nuevas T AuNPs en sus extremos incrementando así sus dimensiones. Finalmente, estas islas colapsarían formando el conjunto de estructuras laminares enzarzadas mostradas en las imágenes.

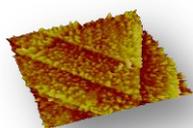
Tras la desorción, las imágenes AFM y sus correspondientes secciones transversales, fig. IV.4.5b y d, muestran la presencia de islas de AuNPs de entre 40-100 nm de envergadura y entre 3 y 10 nm de altura presentes en las terrazas del HOPG. La altura de las islas sugiere que éstas están constituidas por entre 1 a 3 capas de AuNPs. Como se ha dicho, la electrodesorción reductiva trae consigo la liberación a la solución electrolítica de una apreciable cantidad de partículas, dejando, tal y como se aprecia en las imágenes, un conjunto de islas de AuNPs que permanecen adsorbidas sobre la superficie. Estas islas podrían finalmente desarrollarse en 3D por la incorporación de otras partículas, previamente desorbidas durante el ciclado electroquímico, justificándose así el incremento en altura.

El análisis estadístico, cuantitativo y morfológico de los espectros XPS, de las imágenes STM y AFM, así como de los ciclovoltamogramas de las diferentes sustratos preparados por modificación de superficies de HOPG con AuNPs de iguales dimensiones pero con diferente recubrimiento protector de alcanotioles, esto es NT y DT, antes y después de la electrodesorción reductiva de la capa protectora, arrojó como conclusión más relevante la ausencia de diferencias significativas en cuanto a composición, estructura, dimensiones y densidad de islas de AuNPs sobre la superficie basal del HOPG. Por tanto, se puede concluir que la separación relativa existente entre las NPs, una vez quedan éstas adsorbidas formando depósitos más o menos empaquetados sobre el HOPG, que está condicionada por la interacción, la longitud de las cadenas hidrocarbonadas y el grado de interdigitalización de las mismas entre partículas vecinas, parece no ejercer, en el caso de las cadenas de alcanotioles comparadas, un efecto determinante sobre la estructuración de las islas de AuNPs.



En cuanto a las interacciones implicadas en la inmovilización de las TAuNPs sobre la superficie del HOPG, hay que decir que, en principio, las fuerzas de estabilización son consecuencia de las interacciones no polares entre el plano basal del HOPG y las cadenas hidrocarbonadas,⁴² si bien no se puede descartar una cierta contribución de pequeñas cantidades de especies de S, presentes, como ya se ha comentado, en los espectros XPS en un 5%, fig. IV.4.1b, toda vez que la adsorción de especies de S sobre sustratos de carbono ha sido descrita en la bibliografía.⁴³ Ahora bien, tomando en consideración el hecho de que basta con enjuagar ligeramente en hexano para retirar todas las moléculas de alcanotioles de la superficie del HOPG mientras que, por el contrario, las TAuNPs permanecen sobre la misma, aún tras cuantos lavados con hexano se lleven a cabo, se deberían tener en cuenta otras posibles contribuciones en lo que respecta a la estabilización de las AuNPs. En este sentido, habría que añadir que existen estudios que demuestran una transferencia de carga parcial entre NPs y superficies de HOPG a través de monocapas de alcanotioles.⁴⁴ Lo más probable, por tanto, es que todas estas interacciones contribuyan a inmovilizar las TAuNPs sobre la, por otro lado, químicamente inerte e hidrofóbica superficie del HOPG. Por último, cabe comentar que, indudablemente, la interacción entre las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de tioles adsorbidas también desempeña su papel en la estabilización de las AuNPs en las islas, como se deduce de la gran cantidad de AuNPs, rondando el 90%, que son liberadas a la disolución tras la desorción del recubrimiento de tiolato.

En general, se puede concluir, a partir de los datos mostrados hasta ahora, que el procedimiento propuesto permite modificar la superficie basal del HOPG con AuNPs. Después de ser desprovistas de forma sencilla de su capa estabilizante de tiol por electrodesorción reductiva, la mayor parte de las mismas son liberadas a la solución de donde pueden ser recuperadas por sucesivas extracciones en hexano⁸ mientras que el resto permanecen conectadas eléctricamente al sustrato. Esto último resulta fundamental desde el punto de vista de su potencial aplicación como electrodo, bien sea de forma directa o tras una posterior funcionalización, en electrocatálisis y en el diseño



de biosensores.

IV.4.2.1. Modificación de AuNPs con el sistema melanina-hierro

Los sustratos de HOPG modificados con AuNPs desprovistas del recubrimiento estabilizante de tiol fueron, a su vez, modificados electroquímicamente con eumelanina sintética por inmersión en soluciones de ésta $0,3 \text{ g L}^{-1}$ en NaOH $0,1 \text{ M}$ y polarización catódica a $-1,0 \text{ V}$ durante 120 minutos. Tras esto, las muestras fueron cuidadosamente lavadas en agua milli-Q y sumergidas en NaOH $0,1 \text{ M}$ con vistas a su caracterización electroquímica que se exhibe en la Figura IV.4.6. Los ciclovoltamogramas registrados entre $-0,2$ y $-1,6 \text{ V}$ a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ exhiben tres parejas de picos voltamétricos que aparecen a $-0,65/ -0,75 \text{ V}$ (AI/ CI), $-0,85/ -0,95 \text{ V}$ (AII/ CII) y $-1,05/ -1,1 \text{ V}$ (AIII/ CIII), fig. 6 color negro.

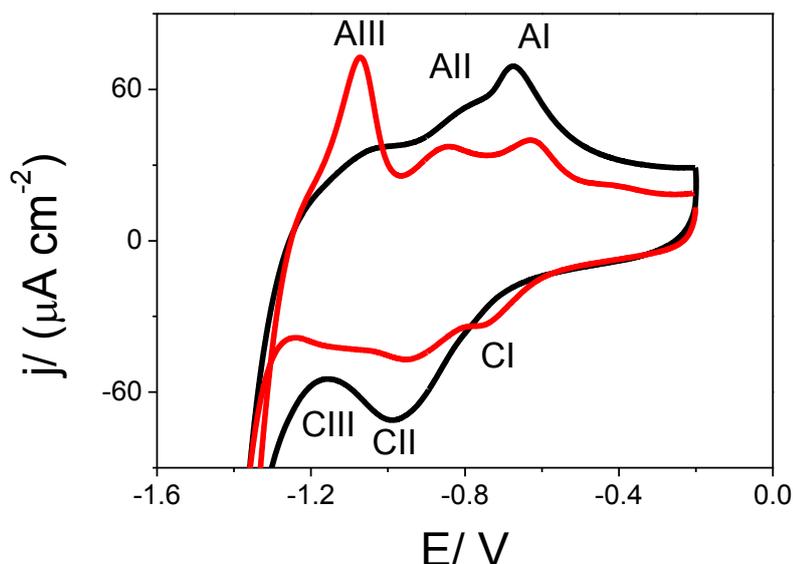
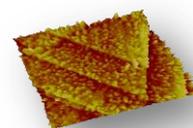


Figura IV.4.6. Voltamogramas registrados a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ en NaOH $0,1 \text{ M}$ de AuNPs previamente depositadas sobre HOPG y modificadas con melanina, en negro, y de película de melanina de igual tiempo de adsorción, 120 minutos, sobre Au(111) en color rojo.

Tales pares rédox son similares a los que se han podido detectar en el caso de películas de melanina preparadas de igual forma sobre Au(111), voltamograma rojo, y corresponden a procesos rédox relacionados con el par quinol/ quinona y a especies de Fe(II)/ Fe(III) coordinadas a subunidades DHI/ DHICA en configuración tetraédrica y octaédrica, respectivamente, en la matriz polimérica de melanina.^{30a} Por su parte, el área voltamétrica implicada en los



picos AlIII/ CIII, asociados a la oxidación y reducción de especies de óxidos de hierro, es bastante menor en el caso de las AuNPs en comparación con la observada sobre Au(111).

Las muestras así preparadas fueron asimismo caracterizadas por espectroscopía XPS después de la deposición de 120 minutos de melanina. Los resultados son los que se muestran en la Figura IV.4.7. Debe destacarse el hecho de que la presencia de la señal de Au 4f, fig. IV.4.7a, correspondiente a las AuNPs adsorbidas sobre el HOPG indica, por tanto, que el proceso de electropolimerización de melanina a -1,0 V sobre las AuNPs no trae consigo la desorción de éstas de la superficie. De hecho, experiencias posteriores llevadas a cabo consistentes en la medida de las densidades de carga implicadas en el proceso de reducción de la monocapa de AuO tras la oxidación electroquímica de la capa de melanina, mostraron que el área electroquímica de Au, antes y después de la deposición potencioestática de melanina, no sufrió alteraciones significativas.

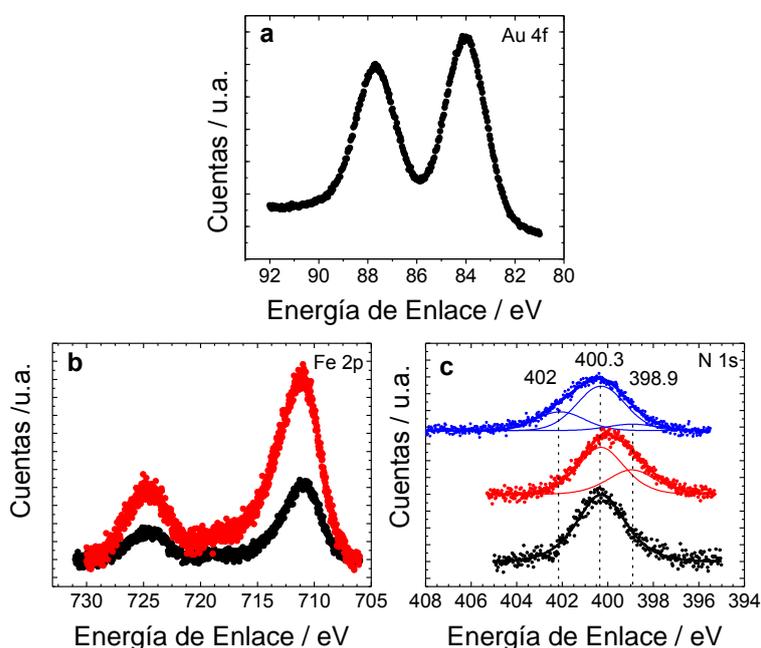
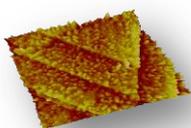
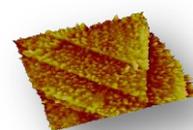


Figura IV.4.7. Espectros XPS: (a) señal Au 4f de AuNPs recubiertas de de melanina, (b) señal Fe 2p para películas de melanina de 120 minutos sobre AuNPs, en color negro y sobre Au(111), en color rojo, (c) señal de N 1s para melanina en polvo evaporada sobre Au(111), en color azul y para películas de melanina sobre AuNPs, en color negro y sobre Au(111), en color rojo.



Los espectros exhiben igualmente las señales de Fe 2p y de N 1s correspondientes al depósito de melanina, fig. IV.4.7b y c, respectivamente.^{30a} Estos resultados obtenidos para la modificación de las AuNPs con melanina se compararon con los que se han podido registrar para muestras preparadas por evaporación de disoluciones etanólicas de melanina sobre Au(111) y con películas preparadas por el mismo procedimiento potencioestático e igual tiempo de adsorción sobre Au(111). Así, mientras que no resulta posible detectar señal de Fe alguna en el caso de las muestras preparadas por evaporación lo que está de acuerdo con el escaso contenido en hierro presente en el polvo de melanina, ésta sí puede apreciarse claramente en el caso de la película preparada electroquímicamente sobre Au(111), fig. IV.4.7b. Este hecho implica que durante la deposición electroquímica se produce una notable concentración de especies ricas en hierro en la película de melanina. Es más, los datos de XPS indican que se trata de hierro en estados oxidados.

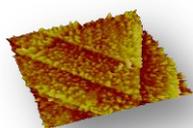
Por su parte, la señal de N 1s correspondiente a la muestra de melanina evaporada puede ajustarse de acuerdo a las tres componentes habituales (399, 400,3 y 402 eV) observadas en las melaninas, ver fig. IV.4.7c en color azul.⁴⁵ Así, mientras que la señal 400,3 eV se asocia a nitrógenos indólicos en monómeros y dímeros de DHICA,⁴⁶ la componente a 399,4 eV se relaciona comúnmente a anillos pirrólicos.⁴⁷ Por su parte, en el caso de agregados de melanina, las componentes a 400 eV y 402 eV se han asignado por medidas de espectroscopía de absorción de rayos X (XAS) a la excitación de orbitales π y σ , respectivamente.⁴⁸ Obsérvese que en el caso de la película de melanina electrodepositada sobre Au(111), sólo las componentes a 399 eV y a 400,3 eV están presentes, fig. IV.4.7c en rojo. Ahora bien, en el caso de los electrodepositos sobre AuNPs, sólo la componente a 400,3 eV de la señal de N 1s está representada. Por tanto, en general se puede concluir que el método electroquímico induce no sólo un apreciable enriquecimiento en especies de hierro sino también la adsorción selectiva de ciertas fracciones de la melanina sobre las superficies de Au. Este efecto es, como se ha demostrado, aún más notable en el caso de las AuNPs. Tal circunstancia abre la puerta al empleo de sistemas como los descritos en la separación analítica de ciertas especies



oligoméricas presentes en la solución de melanina.

Por último se debe comentar que se han realizado, a modo de blanco para las experiencias relatadas, medidas de XPS sobre sustratos de HOPG sin AuNPs que, para los mismos tiempos de adsorción que se han estudiado para las AuNPs, esto es 120 minutos, sólo mostraron un ínfimo rastro de señal de N 1s y, especialmente relevante, no se hallaron evidencias de señal de Fe 2p. De hecho, como ya se ha comentado en capítulos anteriores, sobre HOPG y tras sólo 2 horas de polarización catódica a -1,0 V, la cantidad del sistema melanina-hierro depositada es muy reducida.^{30b} Por tanto, las señales de N1s y de Fe 2p registradas en los electrodeósitos sobre las AuNPs corresponden a melanina adsorbida precisamente sobre las AuNPs.

Con objeto de establecer la naturaleza del hierro en estados oxidados presente en las muestras sintetizadas, se recurrió a la espectroscopía XANES. En la Figura IV.4.8 se han representado los espectros XANES en los umbrales L_{2,3} de una película de melanina de 120 minutos sobre AuNPs adsorbidas sobre HOPG y de una muestra de Fe₂O₃ cristalino utilizados como referencia. La energía del umbral L₃ en la muestra de melanina es la misma que la de la referencia indicando, por tanto, que el principal estado de oxidación del Fe en la melanina sobre la AuNPs es el mismo que en el Fe₂O₃⁴⁹ y en los datos XANES obtenidos para la melanina sólida utilizada en estas medidas.^{30a} Se aprecia por tanto una gran similitud en la morfología de ambos espectros.



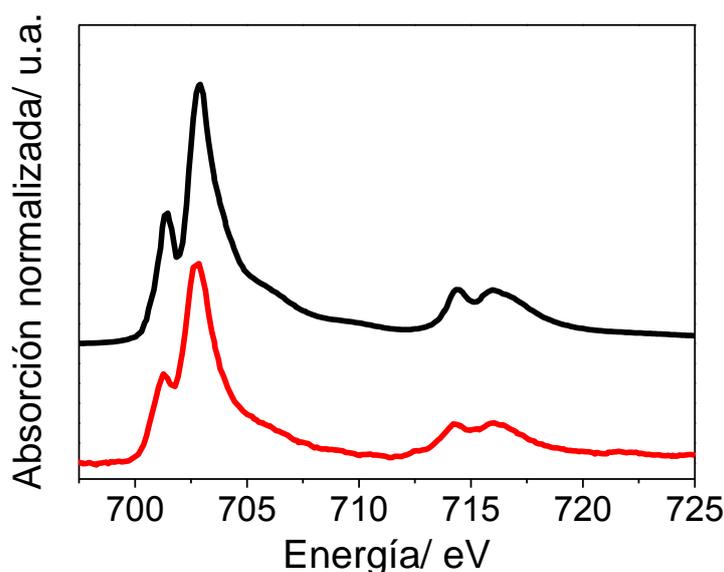
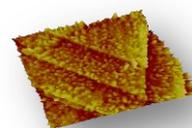


Figura IV.4.8. Espectros XANES en los umbrales de Fe $L_{2,3}$ obtenidos para Fe_2O_3 en color negro y para depósito de melanina de 120 minutos sobre AuNPs adsorbidas en HOPG.

No obstante, como ya se ha indicado en capítulos precedentes, los espectros XANES obtenidos para películas de melanina de tiempos de adsorción grandes depositadas sobre Au(111), mostraron un estado de oxidación más reducido para las especies de hierro, más próximo a la magnetita (Fe_3O_4) que a la hematita (Fe_2O_3).^{30a} De hecho, las nanopartículas de magnetita presentes en tales películas ya fueron identificadas por MFM y asociadas al pico voltamétrico AIII. Por tanto, los datos obtenidos a partir de los espectros XANES, fig. IV.4.8, y la ausencia del pico voltamétrico AIII en los ciclovoltagramas, fig. IV.4.6, ponen de manifiesto que las especies de hierro presentes en mayor proporción en las películas de melanina sobre AuNPs adsorbidas en HOPG son los iones Fe(III) enlazados a monómeros de la melanina en configuración octaédrica.⁴⁹

En la Figura IV.4.9 se han dispuesto las transformadas de Fourier de los espectros EXAFS y el correspondiente ajuste obtenidos para la suspensión original de T AuNPs en hexano, de las AuNP desprovistas del recubrimiento de tiol adsorbidas sobre HOPG, de estas últimas modificadas con el sistema hierro-melanina y de otras muestras de Au. El número de coordinación promedio (ACM) para el par Au-Au en todas las muestras de AuNPs es menor



que 12, valor esperado para el Au masivo. El descenso en el ACN se asocia comúnmente a las pequeñas dimensiones de las partículas.⁵⁰

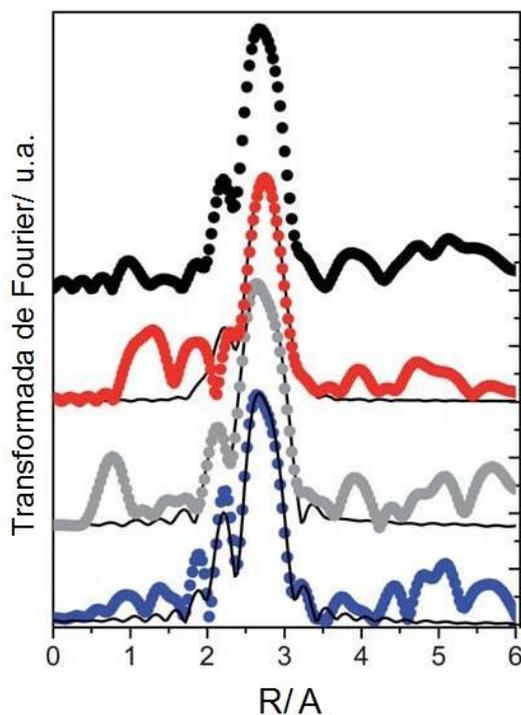
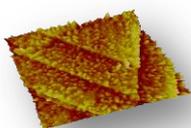


Figura IV.4.9. Transformada de Fourier de las señales EXAFS de Au L_3 correspondientes a Au masivo (puntos negros), TAuNPs en hexano (rojo), AuNPs desprovistas del recubrimiento de NT sobre HOPG (color gris) y AuNPs modificadas con el sistema melanina-hierro (azul). Las líneas continuas representan las transformadas de Fourier de las funciones ajustadas.

Los resultados obtenidos muestran que el ACN para las AuNPs recubiertas de tiol en hexano es de $8,6 \pm 1$, el de las AuNPs sin tiol adsorbidas sobre HOPG es $9,5 \pm 1$, y, por último, el de las AuNPs modificadas con melanina es $9,6 \pm 1$. Estos datos indican que, aunque quizás tenga lugar un ligero aumento en las dimensiones de las nanopartículas después de la desorción del tiol, las AuNPs aún conservan su identidad, es decir, no sinterizan una vez se ven desprovistas del recubrimiento estabilizante de tiol. Es más, las dimensiones de estas AuNPs tampoco se ven significativamente alteradas tras la modificación potencioestática de las mismas con el sistema hierro-melanina.

Con objeto de caracterizar su morfología, las superficies de las AuNPs sin recubrimiento de tiol adsorbidas sobre HOPG, antes y después de la deposición electroquímica de melanina, fueron exploradas por AFM en modo resonante, Figura IV.4.10. En ambos casos, la superficie de HOPG aparece



cubierta de una serie de islas, de forma irregular, aisladas entre sí y con dimensiones que varían entre 40-100 nm. En el caso de las AuNPs libres de tiol, fig. IV.4.10a y c, si bien resulta posible detectar islas con alturas en torno a los 3 nm, la mayoría alcanzan alturas que rondan los 6 nm, aproximadamente. Lógicamente, los valores de las alturas descritas corresponderían a islas formadas por una y dos capas de AuNPs, respectivamente.

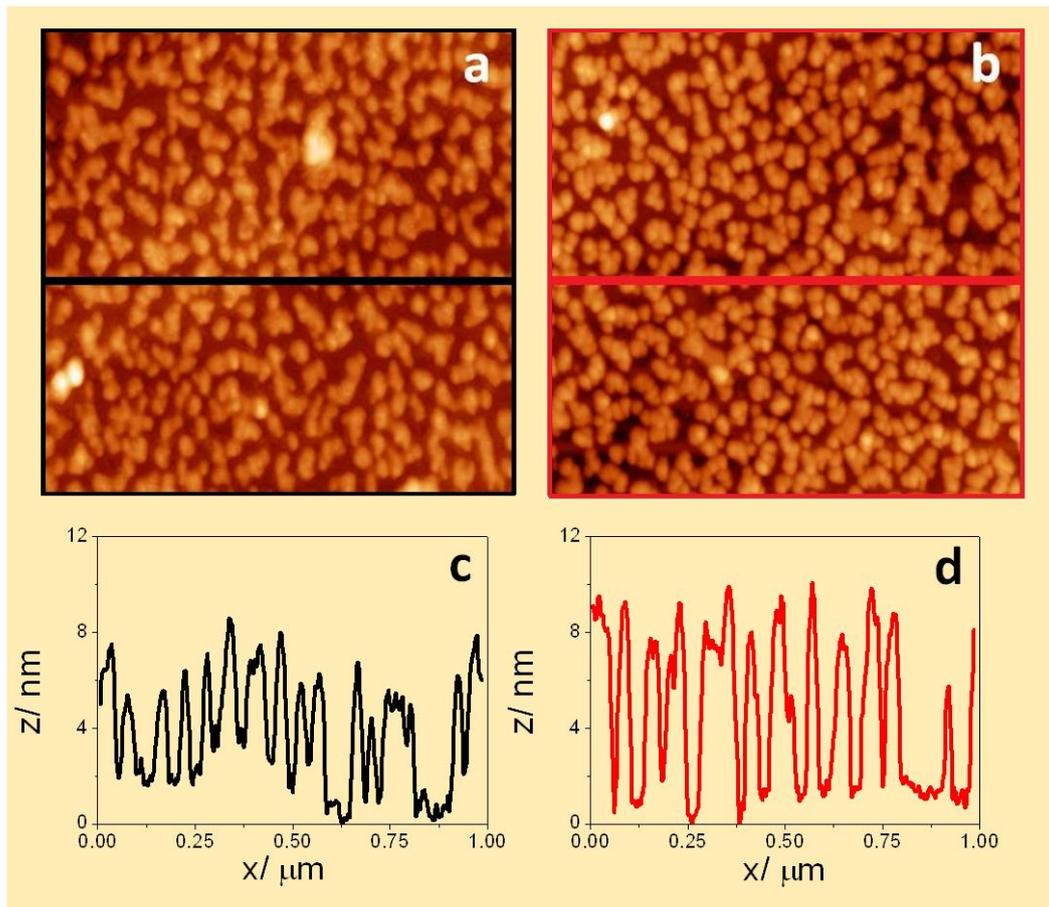
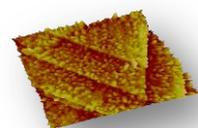


Figura IV.4.10. Imágenes AFM de $1,0 \times 1,0 \mu\text{m}^2$ de AuNPs mostrando islas de AuNPs sobre HOPG: (a) antes y (b) después de electrodeposición de 120 minutos de melanina. De igual forma, sus correspondientes secciones transversales (c) antes y (d) después, mostrando la altura de las islas.

Tras modificar el sustrato de partida con el sistema melanina-hierro, ver fig. IV.4.10 c y d, la altura más frecuentemente observada para las islas de AuNPs es de 8 nm, equivalente a dos capas de nanopartículas. No obstante, también en este caso, pueden observarse sobre la superficie de HOPG islas con alturas correspondientes a lo que vendría a suponer una única capa de nanopartículas, esto es 4 nm, aproximadamente. Por tanto, se puede concluir que el



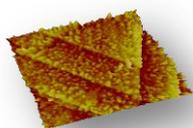
recubrimiento de melanina-hierro aumentaría la altura de las islas en una cantidad que rondaría 1 nm. En este sentido se ha llevado a cabo un análisis estadístico tanto de la altura de las islas de AuNPs como de la rugosidad superficial (rms) de las muestras, antes y después de la deposición electroquímica de melanina. Los resultados obtenidos se han representado en la tabla IV.4.1.

	Islas de AuNP / nm	Islas de AuNP – melanina / nm
Altura promedio	5,10 ± 0,30	6,33 ± 0,53
Altura máxima	12,63 ± 1,00	16,21 ± 2,80
RMS	2,37 ± 0,23	2,95 ± 0,32

Tabla IV.4.1. Altura promedio, altura máxima y rms medidas para las islas de AuNPs desnudas y recubiertas de melanina.

Todos los datos recabados apuntan a que las AuNPs adsorbidas sobre la superficie de HOPG han sido eficientemente modificadas con el sistema melanina-hierro. De hecho, el aumento en la altura media de las islas debe interpretarse como una medida del espesor de la capa de melanina depositada, en torno a 1 nm, mientras que los datos de la altura máxima reflejan que también las islas compuestas de varias capas de nanopartículas se han cubierto de la película de melanina. Por su parte, el análisis de los valores de rms confirma, efectivamente, el incremento en la altura de las AuNPs tras la modificación potencioestática con el biopolímero.

Como ya se ha dicho, las superficies de HOPG con AuNPs adsorbidas antes y después de la deposición de melanina también fueron minuciosamente estudiadas por STM. Los resultados se muestran en la Figura IV.4.11. La gran resolución de esta técnica permite apreciar las AuNPs individuales que conforman las islas. Además las alturas registradas para la primera capa de AuNPs modificadas o no con melanina es de 3-4 nm con lo que corroboran los datos previamente obtenidos por AFM. Desgraciadamente no fue posible llevar a cabo un análisis estadístico de las alturas de las islas por STM debido a lo difícil que resulta obtener imágenes limpias, libres de ruido, ya que, si bien se trabajó en condiciones de corriente túnel muy bajas, la punta desplaza continuamente las islas más débilmente adsorbidas sobre el HOPG de lado a



lado.

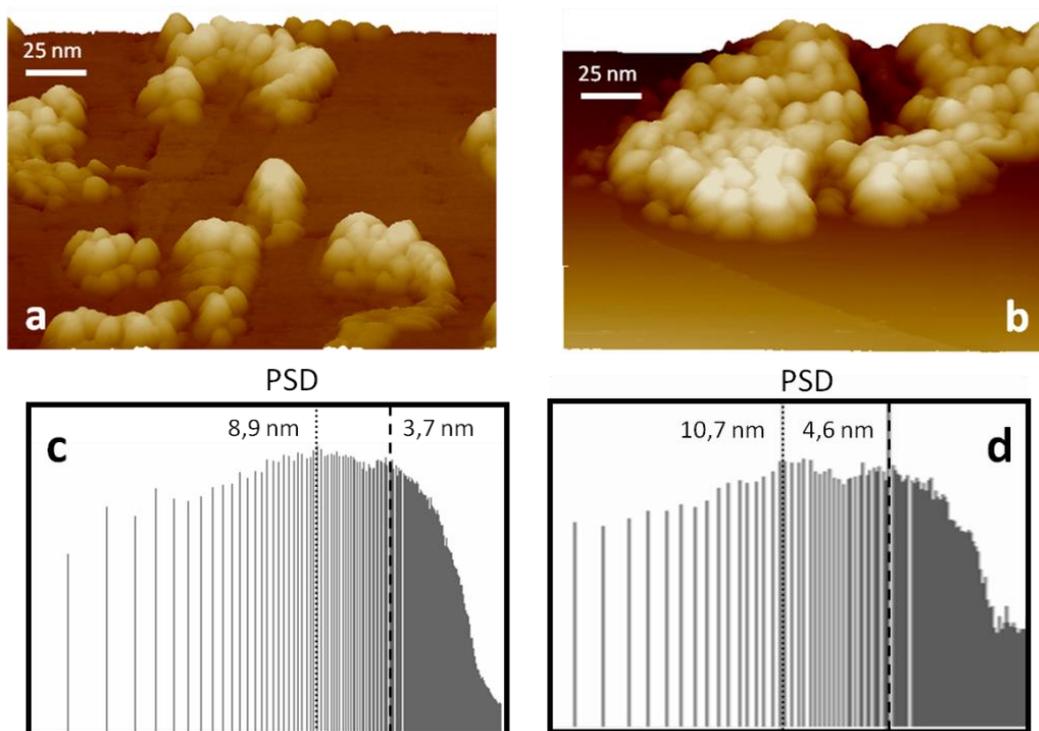
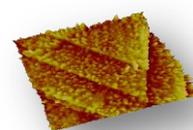


Figura IV.4.11. Imágenes STM de $200 \times 165 \text{ nm}^2$ de AuNPs mostrando islas de AuNPs sobre HOPG: (a) antes y (b) después de electrodeposición de 120 minutos de melanina. De igual forma, sus correspondientes espectros de potencia, PSD, (c) antes y (d) después, mostrando las dimensiones de las partículas.

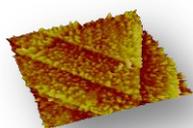
El análisis de la densidad espectral de potencia (*PSD*), antes y después de la modificación electroquímica con el sistema hierro-melanina, muestra aspectos interesantes relacionados con la aparición de dos máximos bien definidos. En ambos casos, si bien el primero de los mismos es un fiel reflejo de las dimensiones previstas para las AuNPs, no es menos cierto que los segundos, de 9 y 11 nm, son mayores de lo que cabría esperar de acuerdo a los datos de altura obtenidos tanto por AFM como por STM. Este hecho sería coherente con los datos obtenidos por EXAFS, fig. IV.4.9, que reflejaban un ligero incremento en la magnitud de las AuNPs tras la desorción del recubrimiento estabilizante de tiol, si bien éstas, como se ha visto, aún conservan su individualidad. No obstante, no deben descartarse la contribución de la convolución punta-muestra y el hecho de que, quizás, la punta no sea capaz, en todos los casos, de resolver las partículas de menor tamaño, mostrando así a dos o tres partículas adyacentes, especialmente en el interior

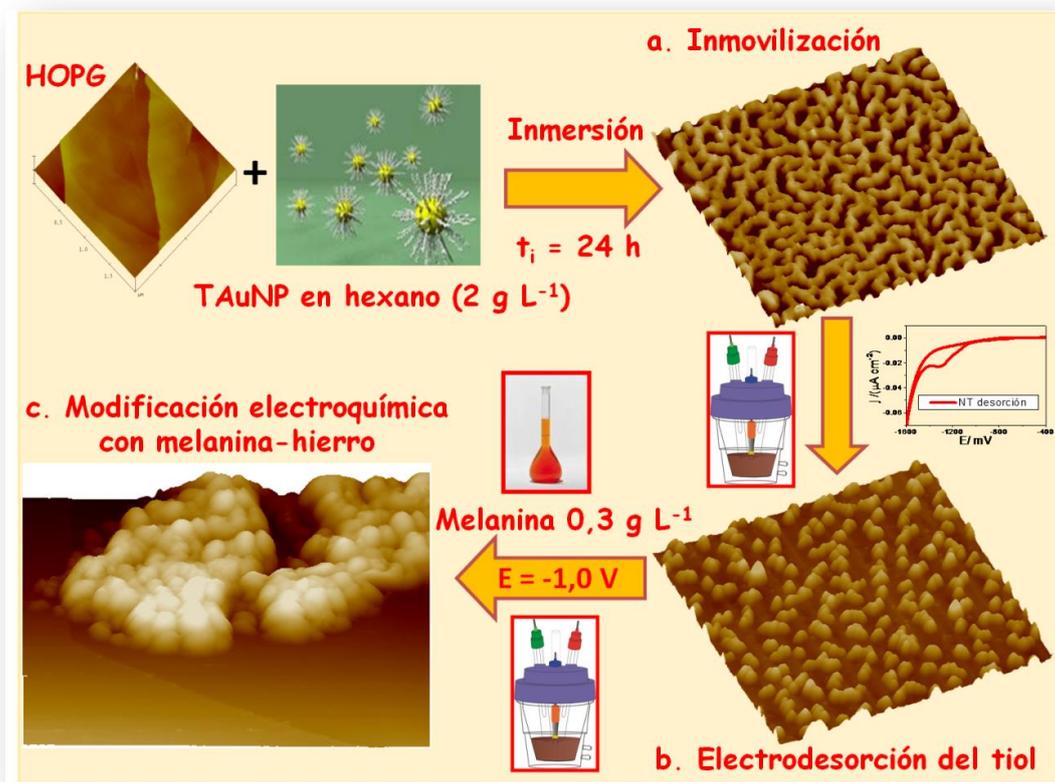


de las islas, como a una sola, con lo que las dimensiones reales de las AuNPs se verían incrementadas.

Por tanto, tomando en consideración los datos obtenidos por AFM, STM y EXAFS, se puede concluir que éstos son consistentes con la presencia de AuNPs esféricas de 3 nm de diámetro, adsorbidas sobre la superficie del HOPG, cubiertas por una película de melanina de 1 nm de espesor, asumiendo, claro, una capa uniforme de biopolímero. De hecho, se han descrito en la bibliografía películas de dopamina-melanina sobre sustratos de Si, tras una hora de inmersión en soluciones de dopamina, con un espesor de 1,8 nm tal y como se ha podido estimar por XPS.⁵¹ En cualquier caso, el reducido espesor de la capa de melanina explicaría la presencia de la señal Au 4f registrada en los espectros XPS, fig. IV.4.7a. Llegados a este punto, merece la pena comentar que si bien parece claro que la presencia de iones metálicos puede inducir en cierta medida la formación de nano y micropartículas esféricas de melanina,⁵² también lo es que sobre las AuNPs sólo se depositan capas de melanina notablemente delgadas y sin estructura aparente. Este hecho se justifica por el bajo contenido en hierro presente en el depósito, puesto que las películas de melanina sintética, formadas a partir de disoluciones sin contenido metálico alguno, parecen carecer de una estructura definida.

El procedimiento seguido para la obtención de AuNPs modificadas con el sistema melanina-hierro y adsorbidas sobre HOPG se resume en el Esquema 1 que se muestra a continuación:

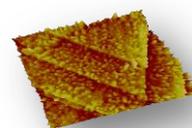




Esquema IV.4.1. Se recogen las siguientes etapas correspondientes a la síntesis de las AuNPs modificadas con melanina: (a) Inmovilización por inmersión de HOPG durante 24 h en solución de hexano de las T AuNPs, (b) Electrodesorción del recubrimiento de NT o DT en NaOH 0,1 M y (c) Polarización catódica a -1,0 V en solución 0,3 g L⁻¹ de melanina en NaOH 0,1 M.

IV.4.2.2. Actividad electrocatalítica de las AuNPs modificadas con melanina

El desarrollo de biosensores de H₂O₂ ofrece multitud de posibles aplicaciones en diversas áreas de la ciencia y la tecnología entre las que destacan las industrias farmacéuticas, clínicas, alimentarias, etc. También es relevante su utilización en análisis medioambientales.⁵³ Además, el peróxido de hidrógeno se emplea también como agente bacteriano en la industria alimentaria y de bebidas. Su extendido uso ha hecho surgir la necesidad de establecer protocolos y métodos para su detección cualitativa y cuantitativa en productos de diversa índole. En el caso que nos ocupa, el interés en el peróxido de hidrógeno reside en que se trata de uno de los más importantes productos/intermedios/ sustratos en variadas reacciones catalizadas por enzimas.⁵³



Desde este punto de vista, se decidió evaluar la actividad electroquímica frente a la reducción de H_2O_2 tanto de las AuNPs adsorbidas sobre HOPG como la de los propios depósitos de melanina sobre las AuNPs. Como es bien conocido, la electrorreducción del peróxido de hidrógeno da como resultado OH^\bullet y especies OH^- de acuerdo a la siguiente reacción^{30a}:



En la Figura IV.4.12 se han representado los barridos catódicos de los ciclovoltamogramas registrados para HOPG, Au(111), AuNPs adsorbidas sobre HOPG y AuNPs modificadas con melanina en una solución 4 mM H_2O_2 en NaOH 0,1 M.

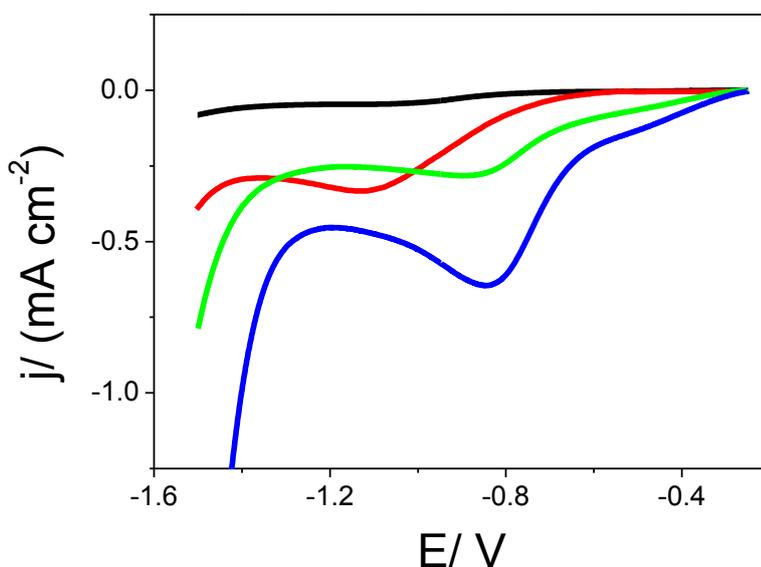
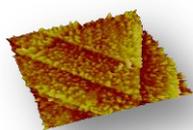


Figura IV.4.12. Voltamogramas registrados a 25 mV/s en 4 mM H_2O_2 en NaOH 0,1 M para distintos sustratos: HOPG (color negro), Au (rojo), AuNPs sobre HOPG (verde) y AuNPs modificadas con el sistema hierro-melanina sobre HOPG (azul). La densidad de corriente, j , está referida al área geométrica del sustrato de HOPG.

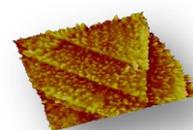
Mientras que prácticamente no se observa la electrorreducción de peróxido de hidrógeno sobre el HOPG, sí que se aprecia un pico de corriente catódica precediendo a la reacción de evolución de hidrogeno, HER, a -1,15 V, asociado a la reducción de H_2O_2 . No obstante, es obvio que la actividad catalítica en el caso del Au(111) es bastante reducida toda vez que tiene lugar a sobrepotenciales bastante altos. De hecho, es bien conocido que el Au no pasa



por ser un buen catalizador para esta reacción, especialmente el plano Au(111).⁵⁴ Por otro lado, la presencia de las AuNPs ejerce un efecto considerable, desde el punto de vista de la electrocatálisis, ya que hacen de la inerte superficie del HOPG un sustrato más activo electroquímicamente con un pico de reducción de peróxido de hidrógeno que aparece a -0,9 V. Además, debe destacarse el hecho de que estas AuNPs adsorbidas sobre HOPG son apreciablemente más activas frente a la electrorreducción de H₂O₂ que las superficies de Au(111), reduciendo el sobrepotencial para esta reacción en 0,25 V. En este sentido hay que decir que, en el caso del Pt, la electrorreducción del peróxido de hidrógeno tiene lugar a través de la previa adsorción de HO-OH con los dos átomos de oxígeno apuntando a la superficie del metal. En tal situación, a la adsorción le sigue un proceso de elongación y posterior ruptura del enlace O-O con la consiguiente formación de especies Pt-OH.⁵⁴ Por su parte, en el caso de las facetas de Au(111) y de Au(110), no tiene lugar el proceso de elongación antes referido y observado para el Pt. Este hecho trae como consecuencia su escasa actividad catalítica frente a esta reacción en concreto.

No obstante, no se debe obviar la circunstancia de que las interacciones O-O sobre AuNPs de 2 nm son bastante diferentes de las que exhiben las superficies planas de Au(111) puesto que los átomos de Au poco coordinados permiten una fuerte adsorción de O-O, si bien este hecho no bastaría para explicar del todo la disociación del enlace O-O.⁵⁵ La ruta de mínima energía se da en el caso de las caras Au(100) con las especies O-O en posición puente. En el caso referido, se ha predicho la elongación del enlace O-O que conduce a su posterior disociación aunque este efecto está limitado a AuNPs formadas por menos de 55 átomos.^{55,56}

Los datos mostrados hasta el momento indicarían que las AuNPs de 3 nm de diámetro empleadas en las experiencias relatadas son bastante activas desde el punto de vista de la electrorreducción del peróxido de hidrógeno. Sin embargo, no debe obviarse la posibilidad de una cierta contribución a la actividad catalítica debida a las AuNPs de menor tamaño, inferiores a los 2 nm de diámetro, que aparecen en la función de distribución de tamaños mostrada



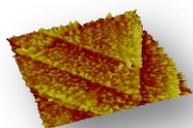
en la sección experimental de la presente memoria.⁵⁷

Volviendo a la figura IV.4.12, queda claro que las AuNPs recubiertas de melanina exhiben la mejor actividad electrocatalítica, con el pico de reducción de H₂O₂ a -0,80 V y, además, la mayor densidad de corriente. Se debe tener en cuenta que este efecto electrocatalítico se observa en un rango de potencial donde la película de melanina es electroquímicamente activa, ver picos CI y CII en fig. IV.4.6. Por tanto, basta con una pequeña cantidad del sistema hierro-melanina depositado sobre las AuNPs para reducir el sobrepotencial necesario para la reducción del peróxido de hidrógeno con respecto al observado para las AuNPs. Este hecho se justificaría de acuerdo a la exaltada transferencia electrónica entre el H₂O₂ y la superficie de Au, mediada por los procesos rédox que implican los pares quinol/ quinona y Fe(II)/ Fe(III).^{30a}

El detallado escrutinio de la fig. IV.4.12 arroja una conclusión adicional: la reacción de evolución de hidrógeno, HER, también tiene lugar a menores sobrepotenciales en el caso de las AuNPs sobre HOPG, especialmente en el caso de las AuNPs modificadas con melanina. La reacción propuesta es la siguiente:



Con objeto de poder clarificar este extremo, se han representado con más detalle en la Figura IV.4.13 las respuestas electroquímicas frente a HER registradas para los diferentes sustratos de Au modificados o no con el sistema melanina-hierro.



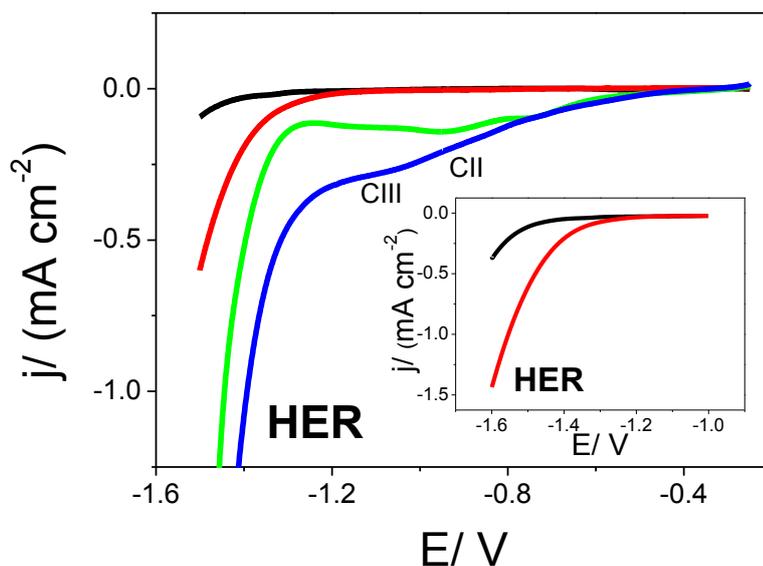
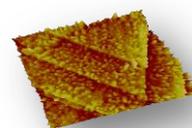


Figura IV.4.13. Voltamogramas registrados a $0,025 \text{ V s}^{-1}$ en $\text{NaOH } 0,1 \text{ M}$ para distintos sustratos de Au: Au(111) (color negro), AuNPs sobre HOPG (rojo) y películas de melanina de 120 minutos sobre Au(111) (verde) y AuNPs (azul). La densidad de corriente, j , está referida al área geométrica del sustrato de HOPG. El gráfico insertado muestra en más detalle la reacción de HER para Au(111), color negro, y AuNPs sobre HOPG en color rojo.

Se aprecia con claridad que las AuNPs adsorbidas sobre HOPG son más eficaces en cuanto a la reacción de HER que el Au(111), ver fig. IV.4.13. Las superficies de las AuNPs ofrecen un gran número de sitios electroquímicamente activos para la adsorción de moléculas de agua, presentes en el medio alcalino, que son catalíticamente reducidas a hidrógeno por medio de la aplicación del potencial adecuado.⁵⁸ Este hecho trae como consecuencia el incremento en la velocidad de HER. La disociación de las moléculas de agua en nanopartículas de Au y de Cu tiene lugar predominantemente en los bordes y esquinas de las mismas, esto es, en los sitios de menor coordinación. Como consecuencia, las NPs son más activas para la ruptura del enlace O-H que las correspondientes superficies planas.⁵⁹

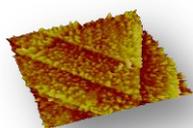
Ahora bien, tanto en el caso del Au(111) como en el de las AuNPs adsorbidas sobre HOPG, el recubrimiento de hierro-melanina consigue mejorar las prestaciones frente a HER en relación a las ofrecidas por ambos sustratos desnudos. De hecho, son las AuNPs recubiertas de melanina las que exhiben los mayores valores de densidad de corriente, fig. IV.4.9, color azul. Además, a



la exaltada reacción de HER le preceden los picos catódicos CII y CIII, a -0,95 y -1,1 V, respectivamente, asociados al comportamiento rédox de especies de Fe.^{30a} Es bien sabido que las enzimas hidrogenasas y análogos de éstas implican en su funcionamiento un aceptor de protones, normalmente un sitio no metálico cargado negativamente, para retener fuertemente a los protones y un aceptor de hidruros, habitualmente un átomo o ión metálico aislado de alta coordinación, que dé lugar a un enlace con el hidrógeno. Así, las superficies que cuentan con un efecto cooperativo de dos sitios como los descritos, muestran una alta actividad catalítica frente a HER.⁶⁰ Por tanto, las especies de hierro presentes en los depósitos de melanina cumplen con los requisitos antes enumerados ya que, como ya se ha comentado, se corresponden con un arreglo de seis átomos de O en una estructura octaédrica distorsionada con una distancia de enlace Fe-O de 0,199 nm.⁴⁹ Es más, por ejemplo, porfirinas de Fe, con una longitud de enlace Fe-N de 0,2 nm,⁶¹ muestran una notable actividad electrocatalítica frente a HER que se ha relacionado con la especie Fe(0)-porfirina que se origina a potenciales negativos tras reducción de la especie Fe(II)-porfirina. De forma análoga, en el caso que nos ocupa, parece razonable que la actividad catalítica apreciada en los depósitos de hierro-melanina implique la reducción de agua a H₂ y grupos hidroxilo así como la correspondiente oxidación de Fe(0)-melanina a Fe(II)-melanina. Lógicamente, a los sobrepotenciales tan negativos donde se da esta reacción, las especies Fe(II)-melanina se reducen a Fe(0)-melanina, cerrándose entonces el ciclo catalítico.

IV.4.2.3. Modificación de TAuNPs con el sistema melanina-hierro y posterior liberación al medio electrolítico

De acuerdo al procedimiento anterior, se modificaron electroquímicamente las AuNPs previamente adsorbidas sobre HOPG con el biopolímero pero, en este caso, sin retirar previamente el recubrimiento de NT. La razón para mantener tal recubrimiento no es otra que permitir la liberación de las AuNPs modificadas de la superficie del HOPG a la disolución electrolítica como se ha descrito en la referencia [8]. En el Esquema IV.4.2 se describe gráficamente el procedimiento

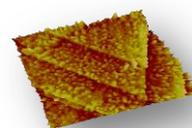


llevado a cabo:



Esquema IV.4.2. Se recogen las siguientes etapas correspondientes a la síntesis de las TAU NPs modificadas con melanina: (a) Inmovilización por inmersión de HOPG durante 24 h en solución de hexano de las TAU NPs, (b) Polarización catódica a $-1,0$ V en solución $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de melanina en NaOH $0,1 \text{ M}$ y (c) Electrodesorción del recubrimiento de NT en NaOH $0,1 \text{ M}$, liberación y extracción en hexano de las NPs modificadas.

Tras la deposición de melanina durante 120 minutos a $-1,0$ V sobre las TAU NPs y después de enjuagar cuidadosamente con agua milli-Q, se registraron los XPS de las muestras obtenidas, fig. IV.4.14. La presencia en los mismos de las señales Au 4f, fig. 14a, con la componente Au $4f_{7/2}$ a $84,0$ eV que indica que el Au es metálico y de S 2p, fig. IV.4.14b, con la componente S $2p_{3/2}$ a $162,0$ eV que se ha asignado a tioles enlazados,³⁶ confirman la presencia, tras el tratamiento electroquímico de modificación, de AuNPs recubiertas de NT adsorbidas sobre la superficie del HOPG.



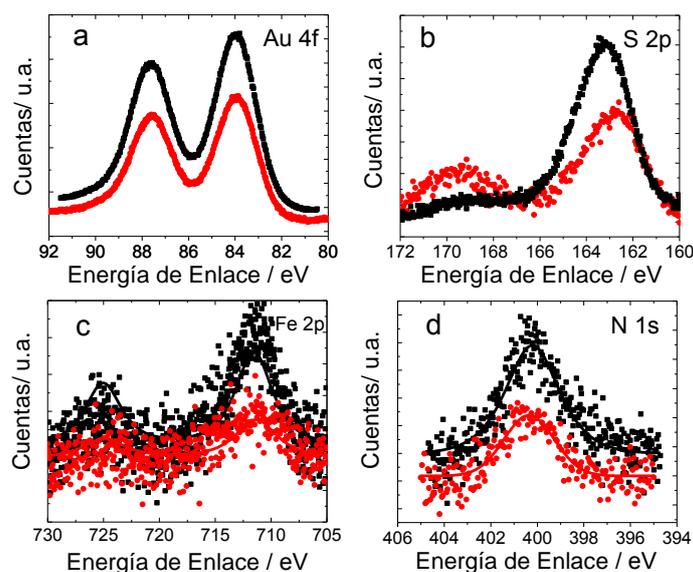
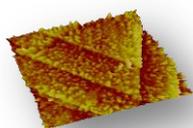


Figura IV.4.14. Espectros XPS obtenidos para películas de melanina de 120 minutos sobre T AuNPs, en color negro, y para las mismas tras liberación de éstas en NaOH 0,1 M por electrodesorción reductiva, posterior extracción en hexano y readsorción sobre HOPG, en color rojo. Señales: (a) Au 4f, (b) S 2p, (c) Fe 2p y (d) N 1s.

Ahora bien, tomando en consideración el hecho de que la señal de S 2p se pueda ajustar sin tener en cuenta las otras componentes de S, entre 163-164 eV, se debe concluir que durante la deposición de melanina a -1,0 V no se desorben cantidades significativas de NT. Esto es debido a que la electrodesorción del NT tiene lugar, ver fig. IV.4.2 en color rojo, a potenciales más negativos que aquellos a los que acontece la formación de las películas de melanina. Además, junto a las señales de Au 4f y S 2p, aparecen también las correspondientes al sistema melanina-hierro, es decir, la de Fe 2p, fig. IV.4.14c, y la de N 1s a 400,3 eV, fig. IV.4.14 d, indicando, por tanto, que las T AuNPs se han modificado exitosamente con el biopolímero.

No obstante, en este caso, las relaciones entre las señales N/ Au y Fe/ Au son menores que las observadas para películas de melanina del mismo tiempo de adsorción, 120 minutos, preparadas sobre AuNPs desprovistas de su recubrimiento de NT adsorbidas sobre HOPG, ver tabla IV.4.2.



Sustrato	Relación Atómica		
	N/ Au	Fe/ Au	Fe/ N
Au(111)	0,08	0,04	0,50
Melanina/ AuNP	0,60	0,28	0,47
Melanina/ T AuNP	0,14	0,02	0,14

Tabla IV.4.2. Relación de señales XPS de N/ Au, Fe/ Au y Fe/ N para diferentes sustratos de Au recubiertos de una película de melanina de 120 minutos.

Si bien tanto las señales de N 1s como la de Fe 2p exhibieron valores inferiores a los de sus análogas en las AuNPs desnudas, es cierto que este efecto es aun más pronunciado en el caso del Fe. De acuerdo a esta conclusión, los voltamogramas obtenidos para las T AuNPs modificadas con melanina mostraron, fig. IV.4.15, que la densidad de carga implicada en los procesos rédox correspondientes al sistema melanina-hierro se ve notablemente reducida en comparación a la registrada para las AuNPs desprovistas de NT, fig. IV.4.6 en color negro, si bien resulta aún apreciable.

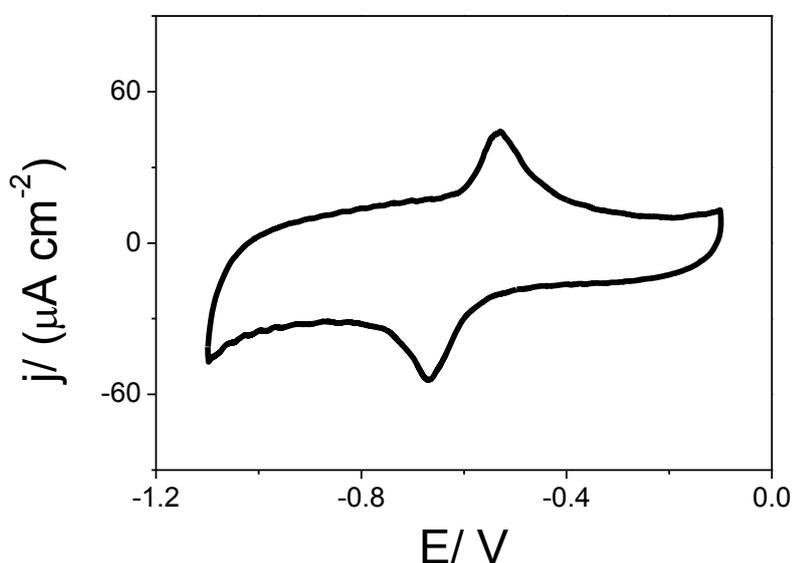
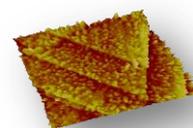


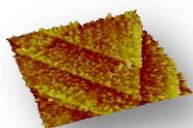
Figura IV.4.15. Voltamograma registrado a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ en NaOH $0,1 \text{ M}$ de T AuNPs previamente depositadas sobre HOPG y modificadas con película de melanina de 120 minutos.

Esto significa que la superficie hidrofóbica de la capa de NT dificulta en cierta medida la deposición electroquímica de melanina, siendo este hecho especialmente destacado en el caso de las especies de óxidos de hierro como



se deduce de la poca notoriedad o, incluso, de la ausencia de las parejas de picos voltamétricos más catódicos, asociados a éstos como ya se ha explicado previamente. En este sentido, el perfil voltamétrico es, en este caso, más parecido a los registrados para películas de melanina crecidas directamente sobre HOPG, con un amplio pico voltamétrico que implica contribuciones de las parejas rédox quinol/ quinona y de especies Fe(II)/ Fe(III) coordinadas al biopolímero. Se debe tener en cuenta que las relaciones N/ Au y Fe/ Au en el caso de las películas de melanina de 120 minutos crecidas sobre Au(111) son notablemente más pequeñas debido a la gran contribución del Au masivo a la intensidad de la señal de Au 4f, la cual, obviamente, es menor en el caso de las AuNPs. No obstante, resulta de interés tener en cuenta que la relación Fe/ N, debida únicamente a la película del biopolímero, es prácticamente la misma para las películas crecidas sobre Au(111) y sobre las AuNPs desnudas. Por el contrario, dicha relación es menor en el caso de las T AuNPs, confirmando así los resultados mostrados por medio de la voltametría cíclica. De hecho, el valor de 0,14, obtenido a partir de los datos de XPS, es incluso menor a 0,25 que es el valor esperado para la relación Fe/ N en caso de una completa saturación de protomoléculas de melanina, es decir, en el caso más general un átomo de hierro coordinado a 4 unidades de DHI.^{30a} Es evidente, por tanto, que en el caso de las películas crecidas sobre Au(111) y sobre las AuNPs desnudas, con una relación Fe/ N en torno a 0,5, tiene lugar un enriquecimiento en especies de Fe, especialmente óxidos de hierro, debido al proceso electroquímico de deposición, con respecto a la melanina sintética de la muestra evaporada. Por tanto, mediante el uso de AuNPs con o sin el recubrimiento estabilizante de tiol, es posible elegir el tipo de especies de Fe dominante en el recubrimiento polimérico obtenido.

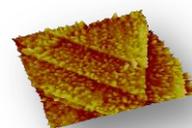
Parece razonable considerar entonces que las especies de melanina-hierro pueden quedar inmovilizadas sobre las T AuNPs por incorporación a la estructura de la SAM de tiol, más abierta sobre las superficies curvas de las AuNPs en relación a las superficies planas, y/ o debido a la presencia de defectos en dicha capa, quizás inducidos por la polarización a -1,0 V durante 120 minutos, potencial razonablemente próximo al umbral de la



electrodesorción del NT, en torno a $-1,3$ V, ver fig. IV.4.2 en color rojo. No obstante y tal como se ha mencionado anteriormente, durante la deposición de melanina no se desorben cantidades significativas de NT y, de hecho, la relación S/ Au permanece prácticamente inalterada antes y después de la modificación con el biopolímero.

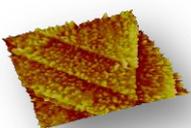
Llegados a este punto hay que añadir que los datos obtenidos tanto por voltametría cíclica como por XPS de muestras de HOPG mantenidas durante 120 minutos a polarización catódica de $-1,0$ V en solución $0,3$ g L⁻¹ de melanina en NaOH $0,1$ M, no exhibieron cantidades significativas de melanina. Por lo tanto, a tenor de lo visto, se puede concluir que las T AuNPs han sido exitosamente modificadas con el sistema hierro-melanina.

Como se ha comentado, un aspecto enormemente relevante de este sistema es poder recuperar las T AuNPs, ahora modificadas con el composite orgánico-inorgánico, adsorbidas sobre el HOPG, por medios electroquímicos. A tal fin se llevaron a cabo entre 5 y 6 ciclos voltamétricos entre $-0,2$ y $-1,6$ V en NaOH $0,1$ M a $0,050$ V s⁻¹, fig. IV.4.2. Esta solución electrolítica que contiene a las nanopartículas fue puesta en contacto con hexano durante 24 horas con objeto de extraerlas en la fase orgánica. Tras esto, un nuevo sustrato de HOPG fue sumergido en esta solución de hexano durante otras 24 horas, transcurridas las cuales fue cuidadosamente lavado en hexano y secado en atmósfera de nitrógeno. Los espectros XPS registrados para esta muestra se han recogido, en color rojo, en la figura IV.4.14a-d. Tales resultados muestran nuevamente la presencia de las señales de Au y S, indicativo de la presencia de las T AuNPs, y de Fe y N, correspondientes al biopolímero, siendo en este caso relevante la presencia de la componente de S a energía de enlace superiores a los 165 eV asignada a especies de S oxidado, producidas, presumiblemente, como consecuencia de la prolongada exposición de las muestras a oxígeno y luz.⁶² Huelga decir que no se han encontrado trazas de Fe y de N cuando se ha llevado a cabo el mismo procedimiento pero, en este caso, usando T AuNPs sin el biopolímero. Estos resultados demuestran que las T AuNPs, modificadas con el depósito de melanina, son liberadas a la solución de NaOH por medios electroquímicos de donde pueden ser fácilmente recuperadas por extracción en



hexano.

Con objeto de poder caracterizar las variaciones producidas en las dimensiones del núcleo de Au en las T AuNPs tras ser modificadas con melanina se recurrió al TEM ya que, debido al escaso contraste de la materia orgánica frente al haz de electrones, el biopolímero no puede ser observado mediante esta técnica. De hecho, el contenido en hierro del electrodeósito es también demasiado escaso como para ser detectado por HRTEM. Así, en la Figura IV.4.16 se han representado las funciones de distribución de tamaños tanto de las T AuNPs originales, de las propias T AuNPs adsorbidas sobre HOPG y desorbidas del mismo por aplicación de potencial y, por último, las T AuNPs modificadas con el sistema melanina-hierro y desorbidas de la superficie de HOPG, fig. IV.4.16a-c, junto a sus correspondientes imágenes TEM, fig. IV.4.16d-f, respectivamente.



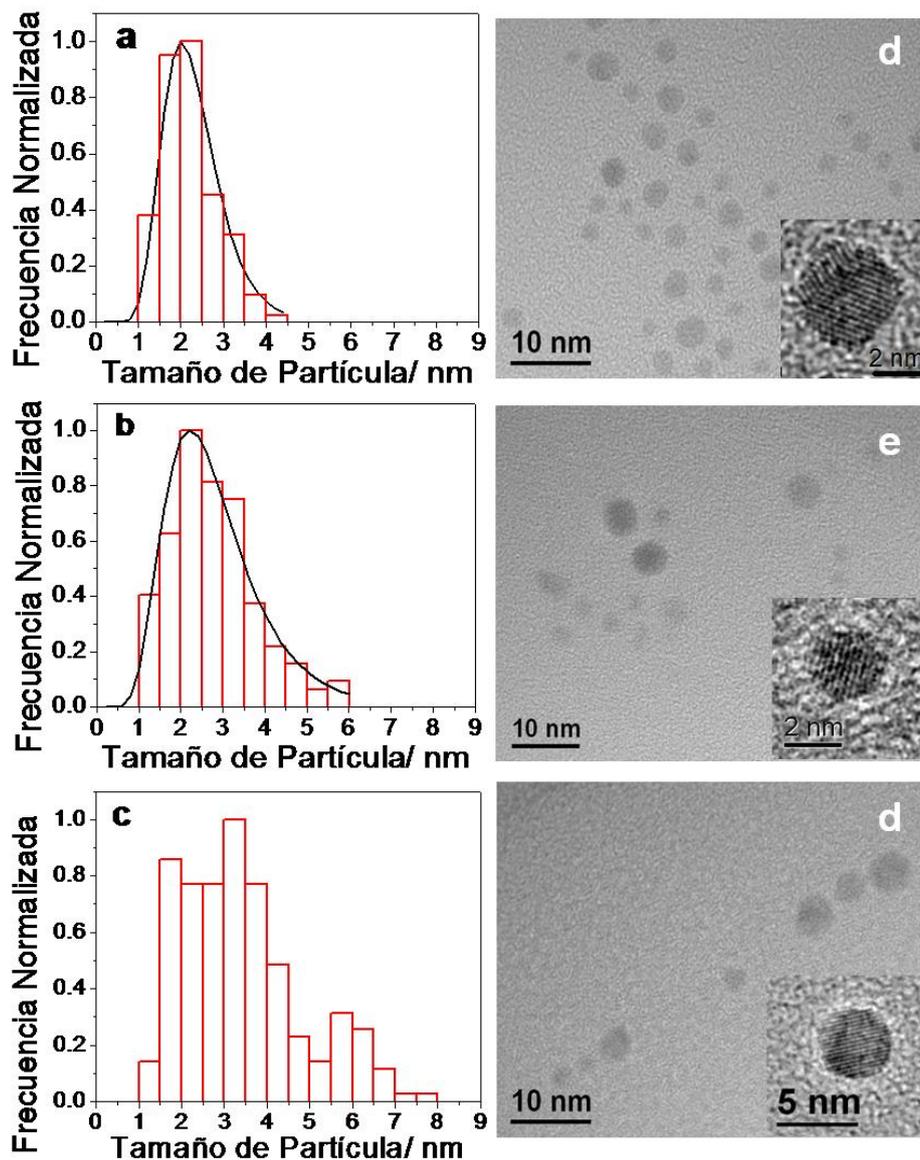
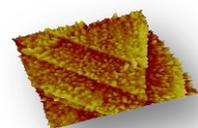


Figura IV.4.16. Funciones de distribución de tamaños de (a) las TAuNPs originales, de (b) las propias TAuNPs adsorbidas sobre HOPG y desorbidas del mismo por aplicación de potencial y (c) las TAuNPs modificadas con el sistema melanina-hierro y desorbidas de la superficie de HOPG, junto a sus correspondientes imágenes TEM, d-f, respectivamente.

Los resultados exhibidos muestran que la distribución de tamaños de las partículas se hace más ancha tras la modificación con el sistema melanina-hierro si bien el tamaño promedio, en torno a los 3 nm, permanece prácticamente inalterado y muy próximo, en cualquier caso, al observado para las TAuNPs originales y para las mismas tras el ciclo de adsorción-desorción. Por tanto, el proceso de electrogeneración de la película de melanina no altera



en demasía la identidad de las AuNPs.

Como es bien sabido, la técnica SAXS permite estimar tanto la forma como el tamaño promedio de NPs, proteínas⁶³ y melaninas,⁶⁴ siendo además sensible, en el caso que nos ocupa, tanto al núcleo de Au metálico como a su recubrimiento polimérico. Por tanto, se han realizado medidas SAXS de las T AuNPs antes y después de ser modificadas con el sistema melanina-hierro con objeto de cuantificar el efecto que dicho depósito ejerce sobre las T AuNPs. Así, en la Figura IV.4.17 se han representado las correspondientes curvas de intensidad de dispersión SAXS como función del módulo del vector de dispersión, q , registradas para ambos tipos de partículas en hexano.

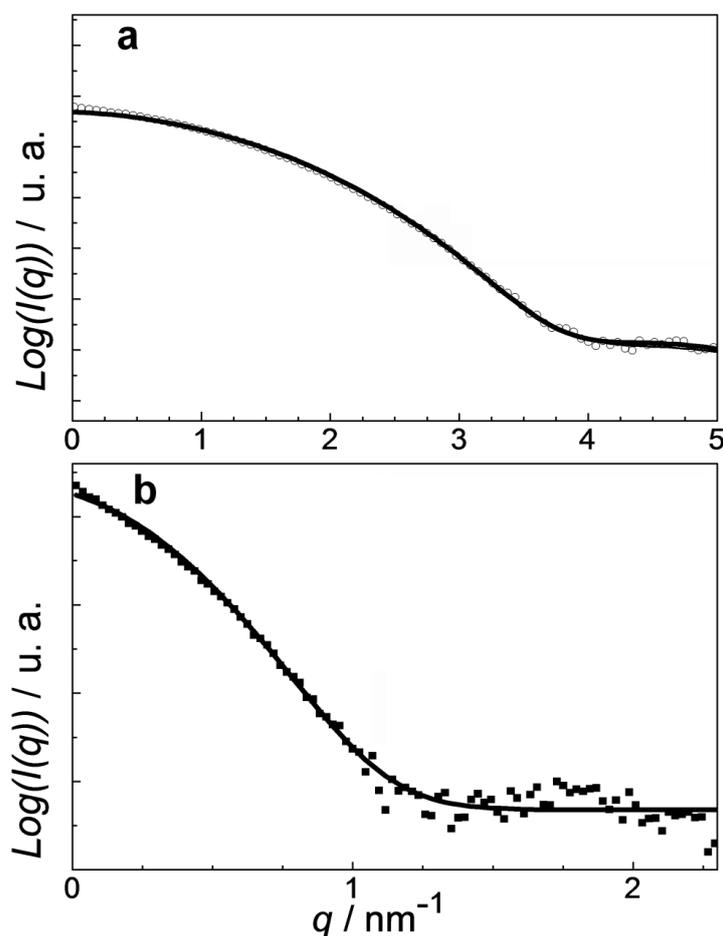
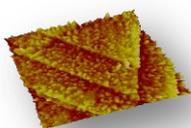


Figura IV.4.17. Curvas SAXS registradas para (a) T AuNPs y (b) T AuNPs modificadas con melanina.

El cambio observado en la morfología de las curvas de dispersión constituye una clara evidencia de que ha tenido lugar una alteración en las dimensiones



de las NPs después de ser estas modificadas con el sistema melanina-hierro.

Con vistas a poder estimar tales cambios producidos, se analizaron los resultados obtenidos por medio del gráfico de Guinier,⁶⁵ ver Figura IV.4.18a. Las modificaciones producidas en la pendiente, α_G , en dicho gráfico indicarían un incremento en el radio promedio de rotación de las NPs tras la electrodeposición. El radio de rotación $R_g = \sqrt{3\alpha_G}$ de un objeto esférico y homogéneo se relaciona con su radio geométrico, R , de acuerdo a la siguiente

$$\text{expresión } R_g = \sqrt{\frac{3}{5}} R.$$

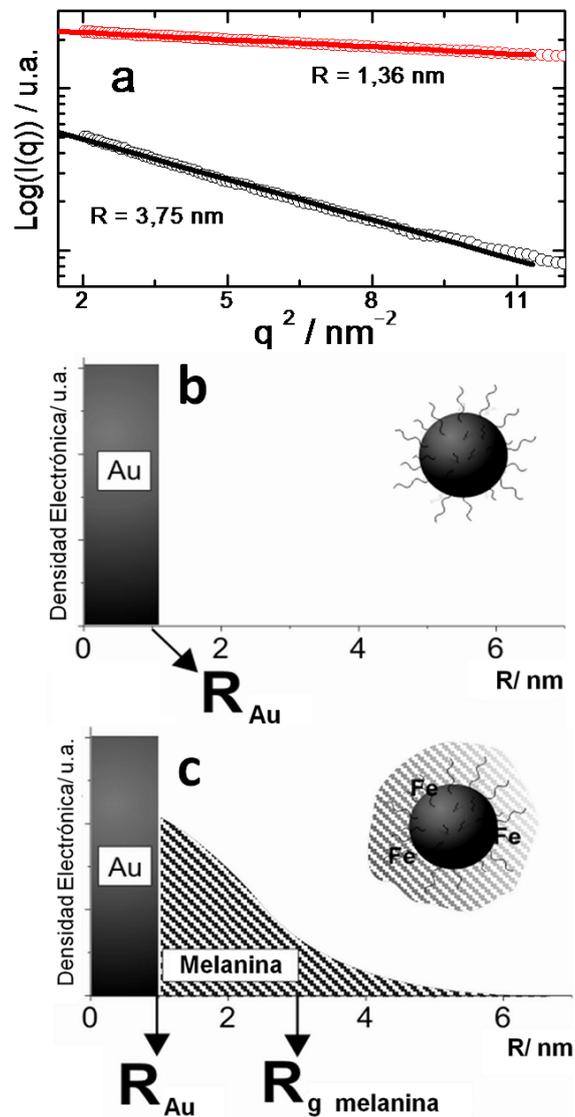
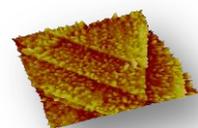
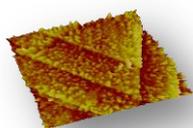


Figura IV.4.18. Gráfico de Guinier para TAuNPs, color rojo, y para las TAuNPs con recubrimiento de melanina, color negro. Esquemas del perfil de densidades electrónicas empleado en el proceso de ajuste para TAuNPs (b) y TAuNPs modificadas con melanina.



Se han ajustado las curvas de dispersión de las T AuNPs asumiendo que las nanopartículas son esféricas con una distribución de tamaños como la que sugieren los datos obtenidos por TEM, fig. IV.4.16 y fig. IV.4.18b. Nótese que debido al escaso contraste electrónico frente a la solución de hexano, el recubrimiento de tiol se puede considerar transparente a las medidas SAXS, fig. IV.4.18b. En el caso de las T AuNPs con recubrimiento de melanina se optó por un modelo de dos densidades electrónicas: un perfil constante atribuido al núcleo de Au de las AuNPs y una densidad electrónica tipo gaussiana correspondiente al recubrimiento del biopolímero, fig. IV.4.18c. Así las cosas, el radio de rotación obtenido para el recubrimiento de melanina de densidad electrónica gaussiana es de $R_{g \text{ Melanina}} = 2,89 \text{ nm}$, o sea un R de $3,75 \text{ nm}$. Por su parte, el radio de rotación promedio para el núcleo de Au fue de $R_{g \text{ Au}} = 1,05 \text{ nm}$, es decir, un R de $1,36 \text{ nm}$, lo que, una vez más, es consistente con los datos extraídos de las imágenes TEM.

Por tanto, se puede concluir que durante la polarización a $-1,0 \text{ V}$, necesaria para el crecimiento electroquímico del depósito de melanina-hierro sobre las T AuNPs previamente adsorbidas sobre la superficie del HOPG, tiene lugar presumiblemente un ligero desordenamiento de la SAM de NT y, quizás, la desorción de una reducida cantidad de moléculas del tiol. Este hecho sin duda favorecería la incorporación de pequeños oligómeros de melanina y especies de Fe en estos defectos, ya presentes o causados por la polarización. Dado que la melanina es un polímero conductor, a medida que aumenta el tiempo de adsorción, las T AuNPs se irían recubriendo progresivamente de la película de melanina-hierro, a excepción, probablemente, de la región de interfase entre las T AuNPs y la superficie del HOPG. Parece razonable considerar que la electrodesorción reductiva de las moléculas de NT se inicie en la primera capa de AuNPs, decreciendo drásticamente tanto la interdigitación como las interacciones con las cadenas hidrocarbonadas de las T AuNPs adyacentes o de capas superiores, si existieran. Esto tendría como consecuencia la liberación al medio electrolítico de las T AuNPs modificadas con el sistema hierro-melanina.

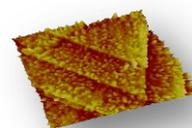


IV.4.3. Conclusiones

Se han podido modificar AuNPs previamente adsorbidas sobre HOPG por medios electroquímicos dando lugar a un composite biorgánico-inorgánico. En este sentido, sobre las AuNPs, de 3 nm de diámetro, que pueden ser desprovistas o no de su recubrimiento estabilizante de tiol, se depositó el sistema melanina-hierro, de forma controlada, mediante polarización catódica a -1,0 V, durante 120 minutos. El estado de oxidación de las especies de Fe presentes en el depósito puede ser variado de metálico, Fe(0), a Fe(III) por medios electroquímicos. Además, se ha demostrado que las AuNPs, cubiertas de pequeñas cantidades de melanina, exhiben propiedades electrocatalíticas exaltadas frente a la reducción del peróxido de hidrógeno y HER.

Las AuNPs mostraron igualmente una cierta selectividad frente a ciertas fracciones de melanina, posiblemente debido a su reducido tamaño que únicamente permite la adsorción de monómeros y pequeños oligómeros. Este hecho abre la interesante posibilidad de su empleo en separaciones analíticas de determinadas especies presentes en muestras complejas. Así, estas AuNPs depositadas sobre sustratos carbonosos podrían ser utilizadas como electrodos de gran área de captura con vistas a la detección cuantitativa del contenido de melaninas en fluidos biológicos por métodos electroquímicos o espectroscópicos. De hecho, se han descrito estudios que relacionan fehacientemente la presencia de gránulos de melanina en sangre con la existencia de melanomas.⁶⁶

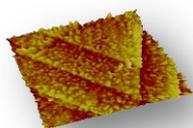
La cantidad de especies de Fe pudo ser reducida depositando la melanina directamente sobre la T AuNPs, sin retirar el recubrimiento de tiol. Hecho esto, las NPs son fácilmente liberadas a la disolución electrolítica por electrodesorción reductiva del recubrimiento de tiol. Por tanto, haciendo uso de moléculas de tioles solubles en soluciones acuosas sería posible liberar AuNPs que contengan especies de hierro y monómeros y oligómeros de melanina, con actividad citotóxica en diferentes líneas celulares y que han sido estudiados en terapias cancerígenas,⁶⁷ en sistemas biológicos de interés, guiadas por medio de campos magnéticos.



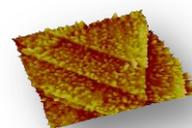
Por último cabe comentar que los resultados expresados en este capítulo de la presente memoria han sido publicados recientemente en medios científicos de amplia difusión internacional.^{68,69}

IV.4.4. Bibliografía

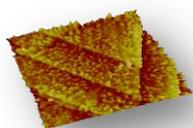
- 1) (a) A.T. Bell, *Science*, **2003**, 299, 1688; (b) Q. Fu, H. Saltsburg, M. Flytzani-Stephanopoulos, *Science*, **2003**, 301, 935; (c) G.J. Hutchings, M. Haruta, *Appl. Catal. A*, 2005, 291, 2.
- 2) P. Sivakumar, R. Ishak, V. Tricoli, *Electrochim. Acta*, **2005**, 50, 3312.
- 3) (a) Y. Xian, Y. Hu, F. Liu, Y. Xian, H. Wang, L. Jin, *Biosens. Bioelectron.* **2005** 21, 1996. (b) K. Yang, H. Wang, K. Zou, X. Zhang, *Nanotechnology*, **2006** 17, S276-S279. (c) K. Glynou, P. Ioannou, T.K. Christopoulos, V. Syriopoulou, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 4155.
- 4) G.A. Baker, D.S. Moore, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 382, 1751.
- 5) M.S. El-Deab, T. Ohsaka, *J. Electrochem. Soc.* **2006**, 153, A1365.
- 6) M. Brust, C.J. Kiely, *Colloids Surf. A* **2002**, 202, 175.
- 7) (a) P. Zhang, X.T. Zhou, Y.H. Tang, T.K. Sham, *Langmuir* **2005**, 21, 8502. (b) J. Zhu, Z. Kenya, V.F. Puentes, I. Kiricsi, C.X. Miao, Z.W. Ager, P. Alivisatos, G.A. Somorjai, *Langmuir* **2003**, 19, 4396.
- 8) D. Grumelli, C. Vericat, G. Benitez, M.E. Vela, R.C. Salvarezza, L.J. Giovanetti, J.M. Ramallo-Lopez, F.G. Requejo, A.F. Craievich, Y.S. Shon, *J. Phys. Chem. C*, **2007**, 111, 7179-7184.
- 9) Z. Bastl, J. Franc, P. Janda, H. Pelouchova, Z. Samec, *J. Electroanal. Chem.* **2007**, 605, 31-40.
- 10) M. Chirea, V. Garcia-Morales, J.A. Manzares, C. Pereira, R. Gulaboski, F. Silva, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 21808-21817.
- 11) M. Haruta, *Catal. Today*, **1997**, 36, 153-166.
- 12) M. Haruta, *Gold Bull.*, **2004**, 37, 27-36.
- 13) M. Haruta, S. Tsubota, T. Kobayashi, H. Kageyama, M. J. Genet, B. Delmon, *J. Catal.*, **1993**, 144, 175-192.
- 14) M. Haruta, N. Yamada, T. Kobayashi, S. Iijima, *J. Catal.*, **1989**, 115, 301-309.
- 15) S. Peng, Y. M. Lee, C. Wang, H. F. Yin, S. Dai, S. H. Sun, *Nano Res.*,



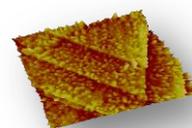
- 2008**, 1, 229–234.
- 16) H. G. Zhu, C. D. Liang, W. F. Yan, S. H. Overbury and S. Dai, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, 110, 10842–10848.
- 17) J. Chou, N. R. Franklin, S. H. Baeck, T. F. Jaramillo, E. W. McFarland, *Catal. Lett.*, **2004**, 95, 107–111.
- 18) M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 801–802.
- 19) R. Sardar, A.M. Funston, P. Mulvaney, R.W. Murray, *Langmuir*, **2009**, 25, 13840.
- 20) (a) D.I. Gittins, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R.J. Nichols, *Nature*, **2000**, 408, 67. (b) A.M. Rawlett, T.J. Hopson, J. Amlani, R. Zhang, J. Tresek, L.A. Nagahara, R.A. Tsui, H. Goronkin, *Nanotechnology*, **2000**, 14, 377. (c) C.J. Kiely, J. Finck, M. Brust, D. Bethell, D.J. Schiffrin, *Nature*, **1998**, 396, 444.
- 21) N.L. Rosi, D.A. Giljohann, C.S. Thaxton, A.K.R. Lytton-Jean, M.S. Han, C.A. Mirkin, *Science*, **2006**, 312, 1027.
- 22) (a) J.E. Martin, J.T. Odinek, J.P. Wilcoxon, R.A. Anderson, P. Provencio, *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107, 430. (b) T. Shimizu, T. Teranishi, S. Hasegawa, M. Miyake, *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107, 2719.
- 23) C. Vericat, M. E. Vela, G. Benitez, P. Carro, R. C. Salvarezza, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 1805–1834.
- 24) (a) F. Scholz, B. Meyer, *Voltammetry of Solid Microparticles Immobilized on Electrode Surfaces*, A.J. Bard, I. Rubinstein, Eds.; Marcel Dekker: New York, **1998**; Vol. 20. (b) F. Scholz, U. Schröder, R. Gulaboski, *Electrochemistry of Immobilized Particles and Droplets*; Springer: Heidelberg, Berlin, **2005**.
- 25) (a) K. Kim, S.H. Lee, W. Yi, J. Kim, J.W. Choi, Y. Park, J-I Jin, *Adv. Mat.* **2003**, 15, 1618. (b) A.V. Ellis, K. Vijayamohanan, R. Goswami, N. Chakrapani, L. Ramanathan, P.M. Ajayan, G. Ramanath, *Nano Lett.* **2003**, 3, 279.
- 26) M.A. Correa-Duarte, L.M. Liz-Marzan, *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 22.
- 27) U. Drechsler, B. Erdogan, V. M. Rotello, *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 5570.
- 28) K. I. Ozoemena, T. Nyokong, *Talanta*, **2005**, 67, 162.



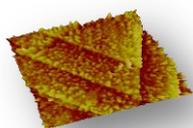
- 29) J. P. Collman, M. Kaplun, C. J. Sunderland, R. Boulatov, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 11166.
- 30) (a) A. González Orive, P. Dip, Y. Gimeno, P. Díaz, P. Carro, A. Hernández Creus, G. Benítez, P.L. Schilardi, L. Andrini, F. Requejo, R.C. Salvarezza, *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 473. (b) A. González Orive, Y. Gimeno, A. Hernández Creus, D. Grumelli, C. Vericat, G. Benitez, R.C. Salvarezza, *Electrochim. Acta*, **2009**, *54*, 1589. (c) A. González Orive, A. Hernández Creus, D. Grumelli, G. A. Benítez, L. Andrini, F. G. Requejo, C. Bonazzola, R. C. Salvarezza, *J. Phys. Chem. C*, **2009**, *113*, 17097.
- 31) M.S. El-Deab, T. Ohsaka, *J. Electrochem. Soc.*, **2006**, *153*, A1365.
- 32) H. Takele, U. Schürmann, H. Greve, D. Paretkar, V. Zaporojtchenko, F. Faupel, *Eur. Phys. J. Appl. Phys.* **2006**, *33*, 83.
- 33) M. Brust, C.J. Kiely, *Colloids Surf. A*, **2002**, *202*, 175.
- 34) R. Gulaboski, M. Chirea, C.M. Pereira, M.N.D.S. Cordeiro, R.B. Costa, A.F. Silva, *J. Phys. Chem. C*, **2008**, *112*, 2428.
- 35) M. D. Abramoff, P. J. Magelhaes, S. J. Ram, *Biophotonics Int.*, **2004**, *11*, 36.
- 36) C.J. Zhong, R.C. Brush, J. Anderegg, M.D. Porter, *Langmuir*, **1999**, *15*, 518.
- 37) C. Vericat, G. Andreasen, M. E. Vela, R. C. Salvarezza, *J. Phys.Chem. B*, **2000**, *104*, 302.
- 38) E. Cortes, A. A. Rubert, G. Benitez, P. Carro, M. E. Vela, R. C. Salvarezza, *Langmuir*, **2009**, *25*, 5661.
- 39) J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 1103.
- 40) M.E. Vela, H. Martin, C. Vericat, G. Andreasen, A. Hernandez Creus, R.C. Salvarezza, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, *104*, 11878.
- 41) P. Zhang, T.K. Sham, *Phys. Rev. Lett.*, **2003**, *90*, 245502.
- 42) F. Lux, G. Lemercier, C. Andraud, G. Schull, F. Charra, *Langmuir*, **2006**, *22*, 10874.
- 43) J.L. Zubimendi, R.C. Salvarezza, L. Vázquez, A.J. Arvia, *Langmuir*, **1996**, *12*, 2.
- 44) I. Lopez-Salido, D.C. Lim, R. Dietsche, N. Bertram, Y.D. Kim, *J. Phys.*



- Chem. B*, **2006**, 110, 1128.
- 45) M. B. Clark, J. A. Gardella, T. M. Schultz, D. G. Patil, L. Salvati, *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 949.
- 46) M. L. Tran, B. J. Powell, P. Meredith, *Biophys. J.*, **2006**, 90, 743.
- 47) C. Malitesta, I. Losito, L. Sabbatini, P. G. Zambonin, *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.*, **1995**, 76, 629.
- 48) L. Sangaletti, S. Pagliara, P. Vilmercati, C. Castellarin-Cudia, P. Borghetti, P. Galinetto, R. Gebauer, A. Goldoni, *J. Phys. Chem. B*, **2007**, 111, 5372.
- 49) A. J. Kropf, B. A. Bunker, M. Eisner, S. C. Moss, L. Zecca, A. Stroppolo, P. R. Crippa, *Biophys. J.*, **1998**, 75, 3135.
- 50) M. A. Ramallo-Lopez, F. G. Requejo, A. F. Craievich, J. Wei, M. Avalos-Borja, E. Iglesia, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **2005**, 228, 299.
- 51) F. Bernsmann, A. Ponche, C. Ringwald, J. Hemmerle, J. Raya, B. Bechinger, J. C. Voegel, P. Schaaf, V. Ball, *J. Phys. Chem. C*, **2009**, 113, 8234.
- 52) P. Borghetti, A. Goldoni, C. Castellarin-Cudia, F. H. Casalis, L. Floreano, A. Cossaro, A. Verdini, R. Gebauer, P. t. Ghosh, L. Sangaletti, *Langmuir*, **2010**, 26, 19007.
- 53) L. Giannoudi, E. V. Piletska, S. A. Piletsky, *Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevices*, ed. M. T. Giardi, E. V. Piletska, Springer, New York, **2006**, c. 4.
- 54) X. Li, D. Heryadi, A. A. Gewirth, *Langmuir*, **2005**, 21, 9251.
- 55) A. Roldan, S. Gonzalez, J. M. Ricart, F. Illas, *ChemPhysChem*, **2009**, 10, 348.
- 56) L. Barrio, P. Liu, J. A. Rodriguez, J. M. Campos-Martin, J. L. G. Fierro, *J. Phys. Chem. C*, **2007**, 111, 19001.
- 57) M. Turner, V. B. Golovko, O. P. H. Vaughan, P. Abdulkin, A. Berenguer-Murcia, M. S. Tikhov, B. F. G. Johnson, R. M. Lambert, *Nature*, **2008**, 454, 981.
- 58) M. Maltez-da Costa, A. de la Escosura-Muñiz, A. Merkoçia, *Electrochem. Commun.*, **2010**, 12, 1501.
- 59) P. Liu, J. A. Rodriguez, *J. Chem. Phys.*, **2007**, 126, 164705.



- 60) J. A. Rodriguez, P. Liu, *New Developments in Quantum Chemistry*, ed. J. L. Paz, A. J. Hernández, **2008**, p. 135.
- 61) J. P. Collman, R. R. Gagne, C. A. Reed, W. T. Robinson, G. A. Rodley, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **1974**, *71*, 1326.
- 62) M. T. Lee, C. C. Hsueh, M. S. Freund, G. S. Ferguson, *Langmuir*, **1998**, *14*, 6419.
- 63) F. Förster, B. Webb, Kristin A. Krukenberg, H. Tsuruta, D. A. Agard, A. Sali, *J. Mol. Biol.*, **2008**, *382*, 1089.
- 64) K.C. Littrell, J.M. Gallas, G.W. Zajac, P. Thiyagarajan, *Photochem. Photobiol.*, **2003**, *77*, 115.
- 65) A. Guinier, G. Fournet, *Small-Angle Scattering of X-rays*, John Wiley, New York, **1955**.
- 66) R.M. Weight, J.A. Viator, P.S. Dale, C.W. Cadwell, A.E. Lisle, *Optics Letters*, **2006**, *31*, 2998.
- 67) K. Urabe, P. Aroca, K. Tsukamoto, D. Mascagna, A. Palumbo, G. Prota, V.J. Hearing, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1994**, *1221*,272.
- 68) D. Grumelli, C. Vericat, G. Benítez, R. C. Salvarezza, J. M. Ramallo-López, L. Giovanetti, F. G. Requejo, M. Sergio-Moreno, A. González-Orive, A. Hernández-Creus, R.C. Salvarezza, *ChemPhysChem*, **2009**, *10*(2), 370.
- 69) A. González Orive, D. Grumelli, C. Vericat, J. M. Ramallo-López, L. Giovanetti, G. Benitez, J. C. Azcárate, G. Corthey, M. H. Fonticelli, F. G. Requejo, A. Hernández Creus, R. C. Salvarezza, *Nanoscale*, **2011**, *3*, 1708.



CAPÍTULO V

Conclusiones

V. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

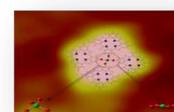
V.1. CONCLUSIONES

En la presente tesis doctoral se han abordado el estudio, la preparación y la caracterización de películas de eumelanina sintética electrodepositadas sobre distintos sustratos conductores. La preparación de estas películas resultó de vital importancia desde el punto de vista del estudio de las propiedades electrónicas y opto-electrónicas del biopolímero así como para la detección de las moléculas de protomelanina, clave a la hora de poder elucidar el modelo secuencial de agregación de oligómeros y cuya posibilidad de control y manipulación encierra todo el potencial de las melaninas. Se ha tratado, por tanto, de adaptar el método empleado para el autoensamblado electroquímico de películas de melanina sobre Au(111), ya descrito, a la preparación de películas de eumelanina usando diferentes soportes. Estas experiencias tuvieron como objeto comprobar la influencia ejercida por el sustrato elegido sobre la composición química, la morfología y las propiedades electroquímicas y electrocatalíticas del depósito durante la formación de las películas por medios electroquímicos. En este sentido se han alcanzado resultados de gran interés sobre HOPG y sobre AuNPs previamente adsorbidas sobre HOPG.

A partir de los resultados que se han mostrado en esta memoria, pueden extraerse las siguientes conclusiones, estructuradas de acuerdo al sustrato de partida:

V.1.1 Au(111)

1. Hemos preparado películas ultradelgadas y nanoestructuradas de melanina depositadas sobre Au(111) por autoensamblado electroquímico a través de un método electroquímico potenciostático. La formación de las películas tiene lugar tras la inmersión de un electrodo de Au(111) en disolución $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de melanina en $0,1 \text{ M}$ de NaOH por aplicación de $-1,0 \text{ V}$ (vs Ag/ AgCl).
2. Los datos recabados por medio de las espectroscopías Auger, XPS y XANES mostraron resultados altamente reveladores acerca de la composición de estas películas. La espectroscopía Auger mostró la presencia de hierro enlazado a oxígeno en las películas de eumelanina en una relación frente al



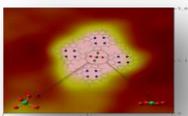
nitrógeno de $Fe/N = 3$, frente al máximo esperado para la melanina sólida de 0,25. Esto indica que, durante el proceso de autoensamblado de la película, se ha producido un notable enriquecimiento en especies de óxido de hierro.

Por su parte los datos obtenidos por XPS donde el electrodepósito exhibe las señales típicas del Fe 2p, confirman el enriquecimiento en especies de hierro durante el crecimiento electroquímico de las películas de melanina. Más interesante aún son los resultados correspondientes a la señal de N 1s: mientras que en la película evaporada se detectan las tres componentes características presentes en las melaninas naturales, en la película electrodepositada sólo están presentes las contribuciones de las señales a 400 y 399 eV. Esto es indicativo, por tanto, de una cierta selectividad frente a las especies de N durante el proceso de formación de las películas.

Por otro lado, las concentraciones relativas de especies de hierro en películas de eumelanina sobre Au(111) pudieron ser estimadas como una superposición lineal de sólo dos sitios de absorción del hierro: Fe^{+2} en Fe_3O_4 y Fe^{+3} en la melanina, a partir de los espectros XANES. En general, ha sido posible concluir que el hierro en la melanina sólida es más similar al Fe_2O_3 que a cualquier otro óxido. Por su parte, el hierro en la película de melanina crecida sobre Au es más próximo al hierro en la magnetita.

3. Las imágenes STM de la superficie del Au(111) tras la inmersión en una disolución alcalina de eumelanina sintética durante $t_a = 10$ minutos a potencial de circuito abierto mostraron la presencia en la misma de pequeñas partículas de entre 1,6-3,2 nm de ancho y de aproximadamente 0,3 nm de altura, valor éste similar a la separación entre capas encontrada en el grafito. Estos resultados son consistentes con la existencia de una protomolécula de melanina y de pequeños oligómeros organizados en una estructura tipo grafito.

Las unidades de menor tamaño, de 1,6 nm, exhiben unas dimensiones próximas a las que exhiben los tetrámeros IMIM y IHHH constituidos por unidades de DHI y DHICA. Por su parte, las partículas de 3,2 nm corresponden a pequeños oligómeros constituidos a su vez por cuatro de los tetrámeros anteriores.



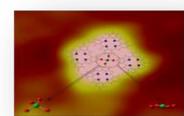
Las imágenes STM de alta resolución, obtenidas en las primeras etapas de adsorción a partir de películas de $t_a = 100$ minutos, mostraron que las unidades más pequeñas presentes en la película, de entre 5 y 8 nanómetros de ancho y entre 0,3 y 1 nm de altura, forman agrupaciones ordenadas que siguen aproximadamente la topografía del Au(111).

4. Por su parte, la Microscopía de Fuerzas Magnéticas (MFM) mostró la existencia de campos magnéticos bien definidos que se concentraban en algunos gránulos mientras que eran bastante débiles en otros, con independencia del tamaño topográfico de los mismos. Resulta razonable asumir que los gránulos que muestran grandes contrastes de fase están mayoritariamente formados por nanopartículas ricas en compuestos tipo Fe_3O_4 ya determinadas por XANES.

La comparación de las imágenes y sus secciones transversales puso de manifiesto la presencia de determinadas zonas con magnetización paralela, similares a los dominios que se han podido observar en el caso de películas continuas de materiales ferromagnéticos. En este caso, las regiones con contraste de fase magnético, bien positivo bien negativo, que se alternan entre sí, corresponden a interacciones punta-muestra repulsivas o atractivas, respectivamente.

5. A partir de los resultados de Auger, XANES, STM y MFM, se pudo concluir que, en las películas de eumelanina depositadas sobre Au(111), existen dos componentes distintos: por un lado, nanopartículas de melanina que contienen Fe^{+3} enlazado a grupos hidroxilos fenólicos en una configuración octaédrica similar a la encontrada para el Fe_2O_3 y, por otro, nanopartículas ricas en compuestos tipo Fe_3O_4 .

6. Las películas crecidas por medios electroquímicos sobre el sustrato de Au(111) muestran una respuesta electroquímica extraordinariamente estable y reproducible a pesar de tratarse de un biopolímero orgánico que cubre la superficie electródica. Los voltamogramas registrados en NaOH 0,1 M ponen en evidencia la existencia de, al menos, cuatro procesos rédox localizados en la región de doble capa del Au(111), precediendo a la evolución de hidrógeno,



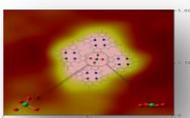
HER.

7. Estas películas de eumelanina sobre Au(111) exhiben actividad electrocatalítica frente a la reducción de peróxido de hidrógeno en el rango de potenciales donde la película es electroquímicamente activa (pareja de picos voltamétricos Al/ Cl). La principal contribución a la actividad electrocatalítica de las películas corresponde al Fe(III) octaédrico coordinado a las unidades catecol. El hecho de que dicha capacidad electrocatalítica mostrada por estas películas de melanina también se diera incluso tras lavado ácido o por ciclado en tampón fosfato, indica que las nanopartículas ricas en magnetita no son esenciales para la electrocatálisis. Por tanto, el sistema hierro-melanina puede ser descrito como un compuesto orgánico-inorgánico, *composite*, con propiedades magnéticas y electrocatalíticas.

8. Los resultados de las medidas, realizadas por STM y AFM, sobre estas películas de eumelanina sometidas a crecientes tiempos de inmersión en disoluciones de EDTANa₂, mostraron que la eliminación del hierro de la película, por complejación con EDTA, tanto del que se encuentra en forma de óxidos como del enlazado al material orgánico, afecta drásticamente al contenido en material conductor o semiconductor de la película.

En este sentido, el hecho de que el hierro pueda ser extraído de la película sin que ésta sufra alteraciones significativas, más allá de un ligero aumento en las dimensiones de las partículas, coincide con lo que ya se había apuntado en la bibliografía para la eumelanina natural. Es decir, resulta razonable suponer la existencia en la película de una serie de canales que permitiría el flujo de iones hierro a través de la misma sin que su estructura se vea notablemente afectada.

9. La voltametría cíclica y las imágenes STM y AFM obtenidas a partir de películas de eumelanina crecidas en disoluciones de eumelanina en NaOH 0,1 M que también contenían EDTANa₂ mostraron que la formación en la disolución de trabajo de un complejo tan estable como es el Fe(III)-EDTA dificulta enormemente la electroadsorción de la eumelanina sobre el sustrato de Au(111). Por tanto, el hierro desempeña un papel fundamental para el

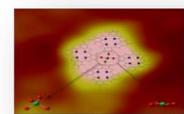


ensamblado de estas películas de eumelanina.

10. Como se ha dicho, las unidades de melanina de menor tamaño, detectadas en las primeras etapas de adsorción, exhiben tamaños similares a las de los tetrámeros IMIM e IHHH y a pequeños oligómeros formados a partir de los anteriores. Los cálculos de DFT mostraron que la estructura π de los tetrámeros está involucrada en el proceso de quimisorción por medio de sus orbitales frontera (HOMO y LUMO). Este hecho se refleja en los cambios producidos en ciertos enlaces intramoleculares.

Las películas de melanina muestran una buena conductancia molecular debido a la presencia de estados localizados en el nivel de Fermi. En el caso de películas más gruesas se observa un comportamiento típico de semiconductor con una separación HOMO-LUMO de aproximadamente 1 eV.

11. La combinación de una fuente de radiación electromagnética con las capacidades de obtención de imágenes y de caracterización electrónica de la microscopía de efecto túnel, proporcionan un método adecuado para la determinación de propiedades óptico-electrónicas de las películas de eumelanina. Así, es posible detectar aumentos significativos de las corrientes túnel tras irradiar la superficie de dichas películas semiconductoras. Los valores de corriente foto-inducida tras irradiación de las películas de eumelanina son mucho mayores que los que se registraron para el Au(111). La magnitud de la respuesta de corriente túnel tras pulso del flash, es significativamente dependiente de la polaridad del potencial *bias* aplicado, si bien resulta independiente de su valor absoluto. Es decir, para potenciales negativos (los electrones atraviesan la barrera túnel desde la muestra hacia la punta), los valores de corriente foto-inducidas son notablemente superiores a los que se han registrado para potenciales positivos del mismo valor absoluto (en este caso, los electrones cruzan desde la punta hacia la muestra). Este hecho confirma la contribución a la corriente túnel de electrones foto-excitados, es decir, foto-conductividad.



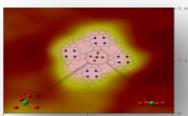
V.1.2 HOPG

1. En general se ha demostrado que es posible implementar significativamente la reactividad química de la superficie del grafito mediante la electrodeposición de melanina. Tales depósitos son estables y activos electroquímicamente en una amplia ventana de potenciales y de pH. Con objeto de sintetizar las películas, los sustratos de HOPG fueron sometidos a polarización catódica de -1,0 V en soluciones $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de eumelanina sintética en NaOH 0,1 M, diferentes tiempos de adsorción, en una celda electroquímica de tres electrodos. Dicha celda fue diseñada de tal forma que sólo permitiera la exposición del plano basal del HOPG a la solución electrolítica. De esta forma se obtuvieron películas de eumelanina nanoestructuradas sobre el electrodo de HOPG.

2. Las imágenes AFM mostraron la formación de un electrodeósito granular que, gradualmente, cubre la superficie del HOPG. El proceso de deposición comienza en los escalones y defectos del grafito basal con la formación de pequeñas partículas de entre 8-18 nm de ancho por 1 nm de alto. Para tiempos de adsorción superiores a las 2 horas, las partículas comienzan a agregarse formando grandes islas ramificadas que, finalmente, colapsan. Después de 24 horas de polarización, la película prácticamente cubre toda la superficie del HOPG alcanzándose alturas entre 3 y 10 nm. Incluso pueden observarse en estas películas de gran espesor, unas cuantas partículas con tamaños de talla micrométrica.

3. Los espectros XPS, realizados en películas de tiempos de adsorción crecientes, demostraron que el incremento en el tiempo de adsorción da como resultado un aumento en la señal N 1s indicando que el sustrato se va cubriendo progresivamente por el biopolímero. En contraste a lo observado para 100 minutos y 4 h, la película de 24 h exhibió una fuerte señal Fe 2p que indica la incorporación de una cantidad notable de especies de hierro oxidado.

Por tanto, tras una inicial modificación de la superficie del HOPG por el polímero, grandes cantidades de hierro quedan atrapadas en la película de eumelanina.



4. La presencia de partículas ricas en óxidos de hierro en las películas de melanina de tiempos de adsorción grandes se verificó por SEM y EDAX. El análisis por EDX de los gránulos presentes en películas de 24 h mostró fuertes señales de Fe y O indicando, por tanto, que corresponden a especies de óxidos de Fe.

5. Las espectroscopias XANES y EXAFS nos permitieron obtener información acerca de los estados de oxidación y la simetría de las especies de Fe presentes en las películas.

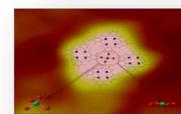
Los experimentos EXAFS que permiten establecer la estructura del ambiente circundante a los iones de Fe en la eumelanina establecieron que el ión Fe(III) se presenta en una estructura octaédrica distorsionada próxima al Fe(III) en la hematita. Dos pares de los oxígenos forman parte de sendas estructuras tipo quinona mientras que el par de oxígenos restantes, fuera del plano determinado por las dos quinonas, se atribuyen a la hidratación de la muestra.

En general, se pudo concluir que, en nuestras películas de eumelanina, existen dos componentes: nanopartículas ricas en especies de óxidos de Fe tipo Fe_3O_4 y nanopartículas de melanina que contienen iones Fe^{+3} enlazado a oxígenos tipo o-quinona en configuración octaédrica.

6. La MFM mostró la existencia, en zonas de terrazas amplias, de dominios magnéticos, más o menos globulares, de talla submicrométrica y que exhiben signos de contraste de fase alternados. Es decir, positivos (interacción punta-muestra de tipo repulsiva) y negativos (interacción atractiva).

Por su parte las grandes partículas identificadas por EDX como óxidos de Fe exhibieron un contraste de fase magnético tipo dipolo que es característico de las partículas ferromagnéticas tipo magnetita.

7. Estas películas sobre HOPG resultaron ser estables y activas electroquímicamente en una amplia ventana de potenciales y de pH. La pareja de picos reversibles A¹/C¹ pudo asociarse al par rédox quinona/ hidroquinona por comparación con películas de hidroquinona sobre HOPG.



El significativo aumento de los picos Al/Cl, CII y CIII con el tiempo de adsorción se debió principalmente a la acumulación de especies de Fe, es decir, tanto del que se encuentra en forma de óxidos de hierro como del que está coordinado a la melanina, tal y como se desprende de los datos de XPS y de los voltamogramas registrados para multicapas de hidróxido ferroso.

8. Las películas de melanina sobre HOPG se mostraron capaces de atrapar iones Cu desplazando así al Fe. De hecho, se ha descrito que el Cu^{+2} y el Fe^{+3} se coordinan a los grupos catecol en las melaninas y que las constantes de afinidad de los complejos melanina-Cu son superiores a los de melanina-Fe.

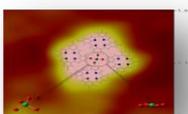
9. Dada la capacidad de las melaninas para amortiguar la actividad de algunos productos oxidantes en medios celulares, se decidió estudiar la respuesta electroquímica de las películas de melanina, de Q/HQ y del propio HOPG en presencia de O_2 y H_2O_2 .

La preonda que aparece en todos los sistemas a $-0,5$ V pudo ser asignada a la actividad catalítica de grupos quinona frente a la reducción de oxígeno a peróxido a través del radical semiquinona.

La segunda onda, fuertemente presente en la melanina, correspondería a la reducción del peróxido a radicales e iones hidroxilo catalizada por el sistema Fe-melanina, como se desprende de la comparación con voltamogramas obtenidos en presencia de peróxido de hidrógeno.

Si bien es cierto que la electroreducción del peróxido de hidrógeno en el sistema hierro-melanina se desplaza hasta los $-0,75$ V, el carbón ofrece la ventaja de ser mucho más barato que el Au y ser un material altamente biocompatible.

10. Nuestros resultados demuestran que el electrodepósito granular de melanina-hierro reduce el sobrepotencial para la electroreducción de oxígeno y peróxido de hidrógeno a agua, produciendo así especies radicalarias oxigenadas en el transcurso de la reacción, al tiempo que aumentan el área superficial activa con respecto al plano basal del HOPG. De esta forma, los gránulos de melanina ricos en hierro serían capaces de acoplar la reducción de



oxígeno a la peroxidación lipídica. Por tanto, el estudio electroquímico de estas películas proporciona nuevas evidencias para entender mejor el efecto neurotóxico del sistema melanina-hierro.

V.1.3. AuNPs adsorbidas HOPG

1. La síntesis de NPs metálicas con recubrimientos biorgánicos de Fe es interesante toda vez que confieren biocompatibilidad a las NPs y permite que éstas sean guiadas hasta objetivos específicos por aplicación de un campo magnético. En este sentido, se han modificado electroquímicamente AuNPs recubiertas de nonanotiol, NT, con el sistema Fe-melanina.

La estrategia fue la siguiente:

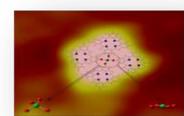
- i) Inmovilización de AuNPs-NT en HOPG tras 24 h de inmersión de éste en solución en hexano de NPs
- ii) Deposición electroquímica potencioestática del sistema Fe-melanina
- iii) Electrodesorción reductiva del tiol que libera las AuNPs modificadas al medio electrolítico de donde pueden ser extraídas en hexano

2. Los espectros XPS de las AuNPs modificadas mostraron las señales de Au y de S, y también las de Fe y N indicando así que las NPs han sido modificadas con el composite orgánico-inorgánico.

La respuesta voltamétrica tras la modificación exhibió un perfil similar al que se ha mostrado para el sistema Fe-melanina sobre Au(111).

Las medidas de SAXS demostraron que, tras la modificación, el diámetro de partícula pasa de 2,7 nm a cerca de 7 nm.

3. Si con anterioridad a llevar a cabo el electrodeposición de melanina, se electrodesorbe el recubrimiento de tiol de las AuNPs, algunas se liberaban a la solución mientras que el resto, en torno al 10 %, permanecían sobre la superficie del plano basal del HOPG formando islas. Tales islas de AuNPs sobre HOPG fueron posteriormente modificadas con el sistema melanina-hierro.



Los espectros XPS mostraron las señales de Au, Fe y N, confirmando que las AuNPs se han modificado exitosamente con el biopolímero.

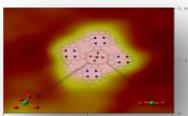
4. Las imágenes de AFM y STM, tomadas antes y después de la electrodeposición, demostraron que las islas de AuNPs se habían recubierto con una película de melanina-hierro de, aproximadamente, 1nm de espesor.

5. En cuanto a la actividad electroquímica de las AuNPs sobre HOPG, se debe comentar que, tras la electrodesorción reductiva del tiol, el voltamograma exhibió características propias de los sustratos de Au como son la formación (A) y electroreducción (C) de la monocapa de óxido de Au (AuO) que permanecieron sin alteración alguna tras ciclar repetidas veces.

Tras la modificación con el sistema melanina-hierro, el voltamograma mostró procesos rédox similares a los que se han podido detectar en el caso de películas de melanina preparadas de igual forma sobre Au(111) y que corresponden a procesos rédox relacionados con los pares rédox quinona/semiquinona/ hidroquinona y Fe(III)/ Fe(II).

6. Por último, se ha evaluado la actividad electrocatalítica de estas AuNPs modificadas con melanina frente a H₂O₂. La presencia de las AuNPs hace de la inerte superficie del HOPG un sustrato más activo electroquímicamente y además resultan apreciablemente más activas frente a la electroreducción de H₂O₂ que la superficie del Au(111). Por su parte, las AuNPs recubiertas de melanina exhibieron la mejor actividad electrocatalítica, con el pico de reducción de H₂O₂ a -0,80 V y, además, la mayor densidad de corriente, mediada por los procesos rédox que implican los pares rédox quinona/semiquinona/ hidroquinona y Fe(III)/ Fe(II).

Adicionalmente el recubrimiento de hierro-melanina consiguió mejorar las prestaciones frente a *HER* en relación a las ofrecidas por los otros sustratos sin modificar. De forma análoga a lo que ocurre en el caso de las porfirinas de hierro, la actividad catalítica apreciada en los depósitos de hierro-melanina implica la reducción de agua a H₂ y grupos hidroxilo así como la correspondiente oxidación de Fe(0)-melanina a Fe(II)-melanina



V.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

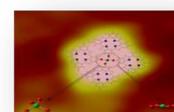
Basándonos en los resultados presentados en esta memoria, se pretende, en un futuro inmediato abordar una gran variedad de posibles experiencias, algunas actualmente en estudio o aún por desarrollar, entre las que destacan las que se citan a continuación:

1. En los últimos tiempos hemos podido adaptar de forma exitosa el método desarrollado por nuestro grupo para el crecimiento potencioestático de melanina sobre sustratos tales como Au(111) y HOPG¹ a la formación de películas de este biopolímero sobre AuNPs recubiertas o no de monocapas autoensambladas de alcanotioles con diferente longitud de cadena, fundamentalmente C₉ y C₁₂,² previamente adsorbidas sobre HOPG. La comparación e interpretación de los resultados así obtenidos ponen de manifiesto una serie de cuestiones que deben ser tenidas en cuenta:

- El ratio de especies oxo-hidróxidos de hierro/ partículas de melanina que contienen iones Fe(III) presentes en las películas y, por tanto, su actividad electroquímica/electrocatalítica dependen drásticamente de las características del sustrato elegido.
- El método de deposición electroquímico no sólo induce un significativo enriquecimiento en especies de hierro sino que además permite seleccionar, de forma controlada y dependiendo del sustrato elegido, ciertos oligómeros de melanina.

De forma análoga a los trabajos recientemente publicados por diferentes grupos de investigación en los que se funcionalizan electrodos de HOPG mediante la reducción de sales de diazonio,³ obteniéndose así superficies modificadas terminadas en grupos aminados donde pueden fijarse distintos aniones metálicos, se pretende llevar a cabo la síntesis electroquímica de AuNPs y/o PtNPs cuyas dimensiones puedan ser rigurosamente controladas por estrategias de nucleación y crecimiento donde nuestro grupo posee una dilatada experiencia.⁴

A tal fin el HOPG es modificado químicamente mediante la reducción, química o electroquímica, de sales de diazonio en el medio adecuado lo que

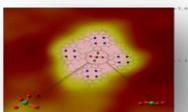


deja la superficie cubierta, en una primera fase, de grupos nitro. Tales grupos son posteriormente reducidos químicamente con sales de estaño a grupos amino. Entonces resulta posible fijar electrostáticamente en la superficie modificada del HOPG aniones tales como AuCl_4^- o PtCl_4^- , por simple inmersión en disoluciones de sus sales, y que son a continuación reducidas a nanopartículas metálicas con algún agente reductor como borohidruro sódico. Posteriormente se hacen crecer bien por repetición del ciclo de inmersión-reducción química o electroquímica, obteniéndose así la superficie deseada.

La posibilidad de disponer de nanopartículas metálicas ancladas a la superficie a través de la fuerte interacción amino-metal en un entorno menos hidrófobo e inerte químicamente que el del HOPG de partida, junto al hecho de que no se requiere para su síntesis del uso de estabilizadores (tioles, dendrímeros, micelas, citrato, etc.) que puedan inhibir sus propiedades catalíticas y afectar tanto a la cinética como a la composición química del depósito de melanina, ofrecen la posibilidad de disponer, variando las dimensiones de las AuNPs y el tiempo de deposición (espesor) de la capa de melanina, de un electrodo basado en AuNPs con, presumiblemente, una mayor presencia de especies de óxidos Fe con respecto a los sistemas con base HOPG que hemos sintetizado hasta la fecha.^{1a,2b}

Se pretende, por tanto, evaluar la actividad electrocatalítica de tales sistemas frente a la reducción de oxígeno y de peróxido de hidrógeno en medios neutros y alcalinos, donde las películas de melanina se han mostrado especialmente activas, de cara a su posible uso en el diseño de cátodos para celdas de combustibles para los que ya se han reportado sistemas basados en N/C⁵ y Fe/N/C⁶ y biosensores electroquímicos, respectivamente. En este sentido, resulta igualmente interesante estudiar la reacción de oxidación de CO en función de las dimensiones de las AuNPs y la corona (*Shell*) de especies de óxidos de Fe.⁷

Por otro lado existen en la bibliografía diferentes trabajos que recogen la actividad electrocatalítica de complejos azamacrociclos de Fe(III) en porfirinas, ftalocianinas, hemoglobina, etc., y de electrodos basados en óxidos de Fe^{8,9} frente a la reducción de iones NO_2^- . Así, parece lógico estudiar la respuesta

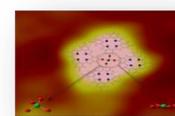


electroquímica frente a esta reacción tanto con estas AuNPs modificadas con el sistema hierro-melanina como con las resultantes de incorporar iones Cu(II) a la película^{1c} con la intención de exaltar la actividad electrocatalítica del sistema.¹⁰

Otra aplicación de interés para este sistema radica en su capacidad para poder ser utilizado en separaciones analíticas toda vez que se ha demostrado que, por deposición electroquímica, se seleccionan determinadas fracciones del biopolímero como se ha determinado por espectroscopía XPS.^{2b} De igual forma, estos electrodos pueden usarse, teniendo en cuenta que en las primeras etapas de formación de las películas se seleccionan los oligómeros de menor tamaño que son, por tanto, el resultado de las primeras reacciones de agregación de monómeros, para establecer el ratio de los monómeros básicos DHI/DHICA en la protomelanina.¹¹

Estos estudios adquieren especial relevancia desde el punto de vista de la producción de nanopartículas metálicas con forma y dimensión controladas con recubrimientos biorgánicos biocompatibles con propiedades magnéticas que permitan que éstas puedan ser guiadas hacia objetivos específicos con vistas a sus posibles aplicaciones biomédicas. Además, desde el punto de vista de su aplicación como biosensores o, según sea, como ánodos o como cátodos en bioceldas de combustible, resultan de mayor eficiencia y de menor costo que los correspondientes monocristales de Au(111) modificados con melanina. Por otro lado, el estudio de estos sistemas constituye el punto de partida para la ulterior aplicación de esta estrategia de modificación de sistemas tipo grafeno con AuNPs y melanina a la síntesis de materiales electrónicos basados en nanotubos de carbono.

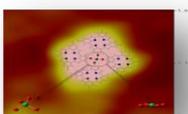
2. Otra aplicación de interés para este sistema radica en su capacidad para poder ser utilizado como sustrato para la inmovilización de enzimas del tipo glucosa oxidasa (*GOD*) con objeto de diseñar y caracterizar un nuevo biosensor electroquímico que pueda ser empleado para monitorizar la cantidad de glucosa en sangre con vistas al tratamiento y control de la diabetes. Como se sabe, esta enzima cataliza la transferencia electrónica entre glucosa y oxígeno dando lugar a la producción de peróxido de hidrógeno. Por tanto, la



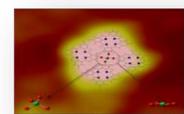
cantidad de glucosa puede ser unívocamente cuantificada a partir de la detección electroquímica potencioestática del peróxido de hidrógeno liberado en la reacción enzimática. En este sentido, la presencia de nanopartículas de metales nobles como Pt u Au¹² así como del composite hierro-melanina debe, presumiblemente, contribuir a rebajar significativamente el sobrepotencial para la electroreducción del peróxido de hidrógeno.^{1b-d,2b} Además se ha reportado que la presencia de biopolímeros tipo melanina contribuye no sólo a fijar la GOD en la superficie del electrodo sino que también actúan a modo de barrera evitando la interferencia del ácido ascórbico y del ácido úrico, compuestos presentes habitualmente en la sangre.¹³

V.3. Bibliografía

- 1) (a) P. Díaz, Y. Gimeno, P. Carro, S. González, P.L. Schilardi, G. Benítez, R.C. Salvarezza, A. Hernández Creus, *Langmuir*, **2005**, *21*, 5924. (b) A. Orive, P. Dip, Y. Gimeno, P. Diaz, P. Carro, A. Hernandez Creus, G. Benitez, P.L. Schilardi, L. Andrini, F. Requejo, R.C. Salvarezza, *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 473. (c) A. González Orive, Y. Gimeno, A. Hernández Creus, D. Grumelli, C. Vericat, G. Benítez, R.C. Salvarezza, *Electrochim. Acta*, **2009**, *54*, 1589. (d) A. González Orive, A. Hernández Creus, D. Grumelli, G. Benítez, I. Andrini, F.G. Requejo, C. Bonazzola, R.C. Salvarezza, *J. Phys. Chem. C*, **2009**, *113*, 17097.
- 2) (a) D. Grumelli, C. Vericat, G. Benítez, R. C. Salvarezza, J. M. Ramallo-López, L. Giovanetti, F. G. Requejo, M. Sergio-Moreno, A. González-Orive, A. Hernández-Creus, R.C. Salvarezza, *ChemPhysChem*, **2009**, *10(2)*, 370. (b) A. González Orive, D. Grumelli, C. Vericat, J. M. Ramallo-López, L. Giovanetti, G. Benitez, J. C. Azcárate, G. Corthey, M. H. Fonticelli, F. G. Requejo, A. Hernández Creus, R. C. Salvarezza, *Nanoscale*, **2011**, *3*, 1708.
- 3) (a) S. Liu, Z. Tang, E. Wang, S. Dong, *Electrochem. Commun.*, **2000**, *2*, 800. (b) H.-G. Boyen, P. Ziemann, U. Wiedwald, V. Ivanova, D.M. Kolb, S. Sakong, A. Gross, A. Romanyuk, B. Büttner, P. Oelhafen, *Nat. Mater.*, **2006**, *5*, 394. (c) M. Bayati, J.M. Abad, C.A. Bridges, M.J. Rosseinsky, D.J. Schiffrin, *J. Electroanal. Chem.*, **2008**, *623*, 19.
- 4) (a) H. Martín, P. Carro, A. Hernández Creus, S. González, R.C.



- Salvarezza, A.J. Arvía, *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103*, 3900. (b) H. Martín, P. Carro, A. Hernández Creus, S. González, R.C. Salvarezza, A.J. Arvía, *Langmuir*, **2000**, *16*, 2915. (c) Y. Gimeno, A. Hernández Creus, P. Carro, S. González, R.C. Salvarezza, A.J. Arvía, *J. Phys. Chem. B*, **2002**, *106*, 4232.
- 5) K. Gong, F. Du, Z. Xhia, M. Durstock, L. Dai, *Science*, **2009**, *323*, 760.
- 6) F. Jaouen, J.P. Dodolet, *J. Phys. Chem. C*, **2009**, *113*, 15422.
- 7) (a) A. Roldán, S. González, J.M. Ricart, F. Illas, *ChemPhysChem*, **2009**, *10*, 348. (b) A.A. Herzing, C.J. Kiely, A.F. Carley, P. Landon, G.J. Hutchins, *Science*, **2008**, *321*, 1331.
- 8) (a) G.L. Turdean, I.C. Popescu, A. Curulli, G. Palleschi, *Electrochimica Acta*, **2006**, *51*, 6435. (b) H.J. Choi, G. Kwag, S. Kim, *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, *508*, 105. (c) D. Mimica, J.H. Zagal, F. Bedioui, *J. Electroanal. Chem.*, **2001**, *497*, 106.
- 9) Y.-X. Chen, S.-P. Chen, Q.-S. Chen, Z.-Y. Zhou, S.-G. Sun, *Electrochimica Acta*, **2008**, *53*, 6938.
- 10) S.-H. Chen, *J. Electroanal. Chem.*, **1998**, *457*, 23.
- 11) M. d' Ischia, A. Napolitano, A. Pezzella, P. Meredith, T. Sarna, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 3914.
- 12) R.B. Rackhi, K. Sethupathi, S. Ramaprabhu, *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 3190.
- 13) R. González, A. Sánchez, M. Chicharro, M.D. Rubianes, G.A. Rivas, *Electroanalysis*, **2004**, *16*, 1244.



CAPÍTULO VI

Publicaciones

APÉNDICE

Abreviaturas, Siglas y Acrónimos

APÉNDICE

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ADN	Acido Desoxirribonucleico
AFM	Atomic Force Microscopy
AES	Auger Electron Spectroscopy
AM-AFM	Amplitude Modulation Atomic Force Microscopy
CCD	Charge Coupled Device
CE	Contraelectrodo
CNT	Carbon Nanotube
DHI	5,6-dihidroxiindol
DHICA	5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico
DFT	Density Functional Theory
DOPA	3,4-hidroxifenilalanina
DT	Dodecanotiol
ECS	Electrodo de Calomelano Saturado
EDX	Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy
ENH	Electrodo Normal de Hidrógeno
EPG	Edge Pyrolytic Graphite
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
ESR	Electron Spin Resonance
EXAFS	Extended X-ray Absorption Fine Structure
FM-AFM	Frequency Modulation Atomic Force Microscopy
FS	Force Spectroscopy
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GEPS	General Purpose Electrochemical System
GGA	Generalized Gradient Approximation
HER	Hydrogen Evolution Reaction
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HOPG	Highly Ordered Pyrolytic Graphite

Abreviaturas, Siglas y Acrónimos

HQ	Hidroquinona
HRTEM	High-Resolution Transmission Electron Microscopy
IHHH	tetrámero formado por las unidades IQ-HQ-HQ-HQ
IQ	Indol quinona
IMIM	tetrámero formado por las unidades IQ-SQ-SQ-HQ
IQ	Imina Quinona
IR	Infrarrojo
ITO	Indium Tin Oxide
LDOS	Local Density of States
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
MFM	Microscopia de Fuerzas Magnéticas
MNP	Magnetite Nanoparticle
NIR	Near Infrared
NM	Neuromelanina
NP	Nanopartícula
NT	Nonanotiol
OCP	Open circuit Potential
OER	Oxygen Evolution Reaction
ORR	Oxygen Reduction Reaction
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDOS	Projected Density of Sates
PSD	Power Spectral Density
PW91	Perdew 91
QI	quinona imina
RE	Reference electrode
SAXS	Small-Angle X-ray Scattering
SCAM	Scanning Capacitance Microscope
SECM	Scanning Electrochemical Microscopy
SEM	Scanning Electron Microscope

Abreviaturas, Siglas y Acrónimos

SNTM	Scanning Thermal Microscope
SPM	Scanning Probe Microscope
SPMNP	Nanopartícula superparamagnética
SQ	Semiquinona
SQUID	Superconducting Quantum Interference Device
STM	Scanning Tunneling Microscope
STS	Scanning Tunneling Spectroscopy
TAPP	Tetrakis-5,10,15,20-(4-aminophenyl)porphyrin)
TAuNP	Thiolated Au Nanoparticle
TEM	Transmission Electron Microscope
TEY	Total Electron Yield
UV	Ultravioleta
vdW	van der Waals
VIS	Visible
VSM	Vibrating Sample Magnetometer
WAXS	Wide angle X-ray Scattering
WE	Working Electrode
XANES	X-ray Absorption Near Edge Structure
XAS	X-ray Absorption Spectroscopy
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy
ZCP	Zero Charge Potential