



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

Nuevos nanocompuestos para aplicaciones biológicas: óxido de grafeno como plataforma de biosensado y aglomerados de pocos átomos metálicos como agentes oxidantes con potencial biocida.

Tesista: Lic. Juan M. Devida

Director: Prof. Dr. Félix G. Requejo

Codirector: Dr. Diego Pallarola

Codirectora: Prof. Dra. Verónica Milesi

Año: 2023

El presente trabajo de Tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Félix G. Requejo y la codirección del Dr. Diego Pallarola y la Dra. Verónica Milesi en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) perteneciente a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). El mismo se presenta a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP para acceder al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas en el Área de Química.

La Plata, Argentina. 2023
Lic. Juan M. Devida
Email: jmdevida@inifta.unlp.edu.ar

*A mis padres Federico y Fabiana,
A mis hermanos,
A Juliana*

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas y la Universidad Nacional de La Plata, por mi formación de grado y posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el financiamiento para realizar esta tesis doctoral.

A la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación por el financiamiento a través de subsidios que fueron parte de este trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas.

A mi director de esta Tesis, Félix G. Requejo, y mis codirectores, Diego Pallarola Verónica Milesi, por el aprendizaje y el conocimiento transmitido durante estos años.

A mis compañeros del grupo SUNSET a lo largo de estos años de trabajo, José Ramallo López, Leandro Andrini, Lisandro Giovanetti, Martín Mizrahi, Yanina Bava, Pia Quiroga, Facundo Herrera, Fernando Pschunder, Khalil Jori, y Joaquín Silveira quienes desde distintos aspectos colaboraron en el trabajo de esta tesis.

A M. Antonieta Daza Millone por la colaboración con los experimentos SPR.

A M. Ana Huergo y Eduardo Prieto por la colaboración con las medidas AFM.

A los grupos de investigación dirigidos por Arturo López-Quintela, del Departamento de Fisicoquímica y Fernando Domínguez Puente, del Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS), ambos pertenecientes a la Universidad de Santiago de Compostela; por la colaboración en los experimentos de este trabajo.

Al Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón de Brasil, LNLS, por el financiamiento, y a todo el personal que colaboraron con la realización de los experimentos realizados en este trabajo y en las estadías.

A mi familia, amigos y compañeros quienes desde el acompañamiento, sostén y momentos compartidos han sido un pilar fundamental para desarrollo de esta tesis.

A la Universidad Pública, por haberme formado en todos los aspectos.

Resumen

Esta tesis doctoral se enfoca en el estudio de dos grupos de nanomateriales y sus potenciales aplicaciones en sistemas biológicos: el óxido de grafeno como plataforma para el desarrollo de biosensores, y los aglomerados de pocos átomos de plata como agente biocida. El desarrollo de este trabajo comprende la caracterización exhaustiva de los nanomateriales empleados y el análisis de sus propiedades fisicoquímicas, especialmente de aquellas relevantes para sus posibles aplicaciones.

Uno de los aspectos de interés de esta tesis comprende la síntesis, caracterización y aplicación de diferentes óxidos de grafeno para la optimización de superficies que actúen como plataformas sensoras, utilizando como modelo la detección de glucosa mediante la inmovilización enzimática. A lo largo del trabajo se analizan cada una de las variables que intervienen en el desarrollo de este objetivo, realizando ensamblados controlados mediante el uso de balanza de Langmuir-Blodgett y su posterior caracterización a través de técnicas de rayos X, microscopías y técnicas electroquímicas y espectroscopías ópticas. Estos ensamblados son optimizados a través de la reducción del óxido de grafeno y se estudia su interacción con nanoestructuras metálicas. A su vez, se analiza la funcionalidad de las superficies para la detección de glucosa a través de la transducción electroquímica y las características cinéticas en el proceso de reconocimiento.

Por otra parte, se aborda el estudio en el efecto de aglomerados atómicos de plata sobre moléculas con interés biológico, en particular diversos modelos moleculares con grupos tioles en su estructura química. Con este fin se utilizaron técnicas avanzadas para la caracterización de nanomateriales, que involucran fuentes de luz sincrotrón para el análisis cuali-cuantitativo de la catálisis de los aglomerados metálicos sobre estas moléculas de interés biológico. Las técnicas de absorción de rayos X permiten realizar estudios *in-situ* y evaluar las reacciones catalíticas realizando una caracterización precisa de las especies moleculares intervinientes. Esta información se utiliza para proponer mecanismos que no se encuentran descritos hasta el momento. A su vez, se

realizaron estudios preliminares en membranas celulares para evaluar la manera en la que interactúan con estos sistemas, y las implicancias de dichas interacciones en la posible aplicación de estos nanomateriales como agentes biocidas, a partir de su estudio en líneas celulares tumorales.

Índice

Listado de Abreviaturas	12
Capítulo 1	15
Introducción General y Objetivos	15
1.1 Grafeno y Nanomateriales de Carbono	17
1.1.1 Óxidos de grafeno	20
1.1.2 Síntesis de óxidos de grafeno	22
1.1.3 Biosensado	28
1.2 Aglomerados metálicos de pocos átomos	32
1.2.1 Estructura electrónica.....	33
1.2.2 Aplicaciones de los <i>clusters</i> metálicos	35
1.2.3 <i>Clusters</i> de plata de baja atomicidad	37
1.2.4 Síntesis de <i>clusters</i> atómicos metálicos	39
1.3 Objetivos del trabajo	39
Capítulo 2	42
Técnicas Experimentales	42
2.1 Balanza de Langmuir-Blodgett	44
2.1.1 Películas de Langmuir-Blodgett	46
2.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	50
2.3 Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM)	52
2.4 Espectroscopía de Absorción de Rayos X (XAS)	53
2.4.1 Consideraciones teóricas.....	59
2.4.2 Región XANES (X-Ray absorption near edge structure)	60
2.4.3 Región EXAFS (Extended X-Ray absorption fine structure)	65
2.4.4 Descripción de instrumentación experimental	67
2.5 Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)	72
2.6 Espectroscopia de Resonancias de Plasmones Superficiales (SPR)	75
2.7 Técnicas Electroquímicas	77
2.7.1 Conceptos Generales	77
2.7.2 Voltamperometría Cíclica (CV).....	79
2.7.3 Voltamperometría de Pulso Diferencial (DPV)	81
2.7.4 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS).....	82
Capítulo 3	86

Generación de plataformas de óxidos de grafeno	86
3.1 Introducción	88
3.2 Experimental.....	89
3.2.1 Materiales y Reactivos	89
3.2.2 Síntesis de Óxido de Grafeno	90
3.2.3 Ensamblado de películas delgadas de óxido de grafeno mediante balanza de Langmuir-Blodgett	91
3.2.4 Reducción de GO y síntesis de rGO	93
3.2.5 Espectroscopía de Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)	94
3.2.6 Microscopía electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)95	
3.2.7 Técnicas electroquímicas	95
3.3 Resultados y discusión	96
3.3.1 Ensamblado de plataformas de GO y rGO sobre ITO	96
3.3.2 Ensamblado de Nanohilos de Plata	104
3.3.3 Composición química de GO y rGO	106
3.3.4 Morfología superficial	109
3.3.5 Comportamiento electroquímico	111
3.4 Conclusiones Parciales	115
Capítulo 4	118
Ensamblado de biointerfases para la detección de glucosa..	118
4.1 Introducción	120
4.2 Materiales y Métodos	121
4.2.1 Reactivos	121
4.2.2 Ensamblado de glucosa oxidasa sobre electrodos basados en grafenos..	121
4.2.3 Conjugación enzimática	122
4.2.4 Espectroscopía de plasmones superficiales.....	122
4.2.5 Técnicas electroquímicas	123
4.3 Resultados y discusión	124
4.3.1 Ensamblado de biointerfases de GO, pErGO y ErGO con glucosa oxidasa	124
4.3.2 Mecanismos de interacción entre electrodos basados en GO y GOx.....	126
4.3.3 Análisis electrocatalítico	132
4.3.4 Análisis cinético	135
4.3.5 Estabilidad de biointerfases de GOx basadas en GO	142
4.4 Conclusiones.....	143
CAPÍTULO 5	146
Caracterización de clusters metálicos de plata y su efecto catalítico en moléculas de interés con grupos tioles	146

5.1 Introducción	148
5.2 Metodología Experimental	150
5.2.1 Reactivos	150
5.2.2 Síntesis electroquímica de Ag ₅ -AQCs	150
5.2.3 Experimentos XANES Ag-L _{III} , S-K y análisis de datos	151
5.3 Resultados y Discusión	152
5.3.1 Estudio XANES en el borde Ag-L _{III}	152
5.3.2 Efecto oxidante de Ag ₅ -AQCs en tioles de cisteína y glutatión	154
5.3.3 Dependencia con la concentración	157
5.3.4 Dependencia con el sustrato	160
5.4 Conclusiones Parciales	164
Capítulo 6	168
Implicancias Biológicas en la catálisis oxidativa de Ag₅-AQC	168
.....	168
6.1 Introducción	170
6.2 Materiales y métodos	174
6.2.1 Reactivos	174
6.2.2 Reacción de Fenton	175
6.2.3 Caracterización XANES	175
6.3 Resultados y Discusión	176
6.3.1 Efecto oxidante de Ag ₅ -AQC bajo presencia de especies reactivas de oxígeno	176
6.3.2 Análisis Cuantitativo de las especies de azufre según su estado de oxidación	179
6.3.3 Interacción de los Ag ₅ -AQC con membranas Celulares	182
6.4 Conclusiones parciales	186
Capítulo 7	190
Conclusiones Generales y Perspectivas	190
Producción científica	195
Referencias	197

Listado de Abreviaturas

$\Delta\theta$: Cambio de ángulo mínimo de reflectividad

$^{\circ}\text{OH}$: radical hidroxilo

AFM: Microscopía de Fuerzas Atómicas

Ag/AgCl: Electrodo de referencia plata/cloruro de plata

Ag₅-AQC: aglomerados cuánticos de cinco átomos de plata

Ag-L_{III}: Borde de absorción L_{III} de plata

AgNWs: Nanohilos de Plata

AQCs: Aglomerados cuánticos atómicos (*atomic quantum clusters*)

BE: Energía de ligadura (*binding energy*)

CE: Contraelectrodo

CV: Voltamperometría cíclica

CVD: Deposición química de vapores (*chemical vapor deposition*)

Cys: Cisteína

DPV: Voltamperometría de Pulso Diferencial

DPV: Voltamperometría de pulso diferencial

E: Potencial

EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

E_f: Energía de Fermi

EIS: Espectroscopía de impedancia electroquímica

ENH: Electrodo normal de Hidrógeno

E_p: Potencial de pico

ER: Electrodo de referencia

ErGO: Óxido de grafeno reducido electroquímicamente

ET: Electrodo de Trabajo

GO: Óxido de grafeno

GOx: Glucosa Oxidasa

GSH: Glutación

GSSG: Glutación oxidado

HEPES: ácido N-hidroxietil piperazina-N'-2-etanosulfónico

HOMO: orbital molecular ocupado de mayor energía

i_p: Corriente de pico

ITO: Óxido de indio y estaño
j: Densidad de corriente
K_m: Constante cinética de Michaelis-Menten
LB: Langmuir-Blodgett
LUMO: orbital molecular desocupado de menor energía
MES: Ácido 2-etanosulfónico
NHS: N-Hidroxisuccinimida
NPs: Nanopartículas
PBS: Buffer fosfato salino
pErGO: Óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente
PTFE: Politetrafluoroetileno
R_{CT}: Resistencia de transferencia de carga
rGO: Óxido de grafeno reducido
ROS: Especies Reactivas de Oxígeno (*reactive oxygen species*)
Rpm: revoluciones por minuto
SEM: Microscopía electrónica de barrido
S-K: Borde de absorción K de azufre
TrGO: Óxido de grafeno reducido térmicamente
Trx: Tiorredoxina
UHV: Ultra alto vacío
XANES: Espectroscopía de absorción de rayos X del borde cercano
XAS: Espectroscopia de absorción de rayos X
XPS: espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos x
Γ: Cobertura superficial
υ: Velocidad de barrido de potencial

Capítulo 1

Introducción General y Objetivos

1.1 Grafeno y Nanomateriales de Carbono

En el campo de la ciencia y la tecnología, los nanomateriales basados en carbono se convirtieron en nanomateriales atractivos para la investigación y el desarrollo de diversas aplicaciones en un amplio espectro de disciplinas.¹ Debido a la existencia de diversos alótropos de carbono, desde fases alotrópicas como el carbono amorfo, grafito y diamantes, hasta los nuevos descubrimientos con conformaciones nanoestructuradas como los nanotubos de carbono, óxido de grafeno (GO), puntos cuánticos de grafeno (GQDs) y fulerenos, los materiales basados en carbono aumentaron su interés por sus propiedades fisicoquímicas. Cada miembro de la familia de estos materiales exhibe inigualables propiedades y han sido ampliamente explorados en diversas aplicaciones biológicas como biosensado, liberación controlada de fármacos, ingeniería de tejidos, imágenes, diagnóstico y nuevas terapias oncológicas.^{2,3}

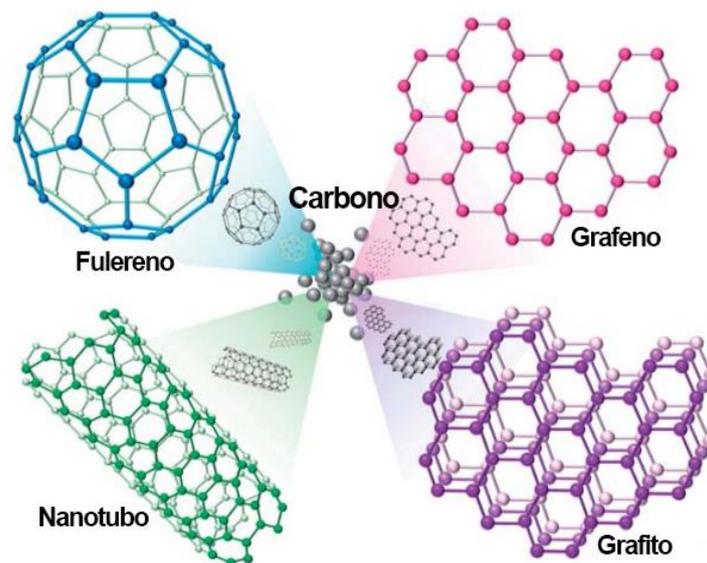


Figura 1.1. Nanomateriales de carbono con estructura sp^2 en diferentes conformaciones y dimensiones. Imagen adaptada de: Cheng *et al.* Nanoscale. 2013

Sin embargo, entre los diversos alótropos de carbono, el grafeno es considerado el material más versátil y atractivo, debido a sus propiedades intrínsecas únicas. El grafeno puede definirse como una monocapa de átomos de carbono con hibridación sp^2 , que están estrechamente empaquetados en una

estructura hexagonal tipo panal de abejas (Figura 1.1). Esta estructura se puede considerar como la unidad básica de distintas estructuras de carbono como el grafito, fullerenos, o nanotubos.

Estructura electrónica y propiedades del Grafeno

Una de las características más importantes del grafeno es su conductividad eléctrica y la posibilidad de utilizarlo en diversos dispositivos de sensado aprovechando de esta. Los materiales se pueden clasificar de acuerdo con su conductividad eléctrica en la que se diferencian entre aislantes, conductores y semiconductores. Sin embargo, debido a la estructura electrónica del grafeno, no es posible agruparlo en ninguno de los anteriores debido a que comparte características entre los conductores y los semiconductores. Esto se debe a que en el caso del grafeno la separación de la banda prohibida (*band-gap*) es igual a cero.

La energía de Fermi (E_f) se define como el nivel de energía máximo hasta el que llegan los electrones de un sólido. Los electrones que se encuentran en la banda de conducción (mayor energía) y la banda de valencia (menor energía) deben superar el umbral de energía que separan estas bandas en el caso de transiciones electrónicas. Para los materiales conductores, los electrones circulan libremente entre las bandas de conducción y valencia, ya que la E_f se encuentra en la banda de conducción, por lo que no existe *band-gap*. En el caso de los semiconductores y aislantes, el nivel de Fermi está entre ambas bandas, y únicamente se diferencian por la magnitud en el *band-gap*. En los semiconductores esta separación no es demasiado grande, por lo que si se les brinda suficiente energía pueden conducir la corriente eléctrica.

En el caso del grafeno, cada átomo de carbono se une a otros tres átomos formando orbitales híbridos sp^2 . Los electrones de los átomos que no se encuentran ligados forman enlaces del tipo π y π^* . Las bandas electrónicas asociadas a estos electrones se intersectan en dos puntos, llamados puntos de Dirac (K y K'), asociados a los dos átomos de carbono de la celda unidad. En los puntos K y K' la estructura de bandas del grafeno tiene forma de doble cono (cono de Dirac) que tienen un solo punto de contacto, en el cual la energía de

Fermi está localizada en el medio de las bandas π , por lo que el *band-gap* es igual a cero.

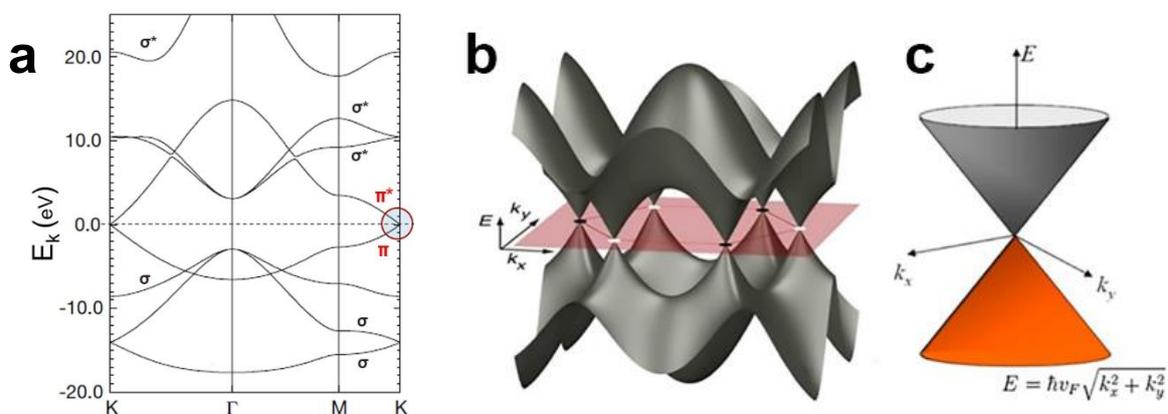


Figura 1.2. (a) Gráfico que muestra las relaciones de energía de dispersión en función del número de onda E_k vs. k , a lo largo de la dirección de alta simetría para las bandas σ y π de una monocapa de grafeno. La línea punteada corresponde a la Energía de Fermi (E_f). (b) Relación de dispersión (E_k vs k) y (c) representación de conos de Dirac para las bandas de energía (π y π^*) cerca del punto de Dirac, K.

La estructura electrónica del grafeno le confiere propiedades que se asemejarían a un semimetal, de manera que lo distingue del resto de los materiales nanoestructurados del carbono. El transporte de carga en el grafeno entre electrones y huecos con una concentración n de hasta 10^{13} cm^{-2} exhibe, a temperatura ambiente, una movilidad de electrones de $\sim 15.000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$.⁴ Además, el grafeno puede considerarse un material de electrodo ideal debido a su extensa superficie teórica ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)⁵ y su alta conductividad eléctrica ($0,96 \times 10^6 \text{ } \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$),⁶ superior a la de elementos utilizados en la actualidad como conductores, como el caso de cobre ($0,60 \times 10^6 \text{ } \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Por otra parte, el grafeno exhibe propiedades electroquímicas notables, como su gran potencial de ventana, baja resistencia de transferencia de carga, excelente actividad electroquímica, alta velocidad de transferencia electrónica, etc.⁷ Las propiedades electroquímicas y físicas del grafeno mencionadas anteriormente lo hacen de gran interés para su aplicación en detección electroquímica.

Gran parte de las ventajas del grafeno como nanomaterial podrían explicarse desde el punto de vista de sus características fisicoquímicas, pero,

además, al ser el carbono el cuarto elemento (en masa) más abundante del planeta, plantea la posibilidad de dar respuesta sustentable a la demanda de desarrollo de nuevas tecnologías utilizando gran parte de sus propiedades. Sin embargo, los métodos que existen actualmente de aislamiento del grafeno limitan su uso para muchas aplicaciones que requieren de funcionalización química para su uso. Si bien en el último tiempo, y sobre todo desde el desarrollo de nuevas técnicas de síntesis, como aquellas basadas en CVD (*chemical vapor deposition*) permiten la síntesis de alta calidad de este material, su utilización requiere metodologías posteriores para su funcionalización y el escalado para la obtención de grandes cantidades de material sigue siendo insuficiente. Para subsanar esta dificultad, en este trabajo de tesis se opta por la estrategia de síntesis del óxido de grafeno para obtener nanomateriales 2D, optimizando las síntesis y los procedimientos posteriores para obtener nanomateriales basados en grafeno que se asemejen a su red prístina.

1.1.1 Óxidos de grafeno

El óxido de grafeno (GO) es un material similar al grafeno, pero con grupos funcionales de oxígeno en su estructura que se obtiene a partir del grafito. Los grupos funcionales de oxígeno pueden ser parcialmente removidos mediante distintos métodos para convertir el GO en óxido de grafeno reducido (rGO), que es similar al grafeno en estructura y propiedades.

El óxido de grafeno tiene propiedades únicas que lo vuelven atractivo respecto al grafeno, en particular sus características eléctricas, mecánicas y térmicas. Esta última, a diferencia del grafeno convierten al GO en un material resistivo térmicamente, debido a su baja conductividad térmica. De esta manera su uso generalmente es apreciable en el desarrollo de materiales aislantes. Desde el punto de vista de sus propiedades mecánicas, el GO puede utilizarse como polímero en nanocompositos debido a su alta tensión de rotura. Esto se debe a que el GO en matrices poliméricas forma interacciones entre sus grupos funcionales de oxígeno y los grupos funcionales de los otros compuestos del nanocomposito, como por ejemplo polivinilalcohol (PVA), mediante interacciones de puentes de hidrógeno, generalmente.⁸ Desde el punto de vista de sus propiedades eléctricas, el GO no se considera un material conductivo, y es

utilizado, de hecho, como un material resistivo. Durante la síntesis de GO, la estructura cristalina sp^2 de la red del grafeno es alterada, inhibiendo la movilidad electrónica del material y convirtiendo al material en un aislante.⁹ De esta manera, existen distintas estrategias para utilizar el GO en dispositivos que impliquen señales eléctricas. Entre ellas se encuentra la combinación con otros nanomateriales que mejoren el movimiento electrónico, como nanopartículas (NPs) metálicas. Por otro lado, la reducción del GO para restituir parte de los dominios sp^3 producto de la oxidación resulta en una opción viable para mejorar las características eléctricas incluso en varios órdenes de magnitud.¹⁰ Las distintas estrategias de reducción del GO se abordarán en próximas secciones.

Debido a su estructura 2D específica y la presencia de varios tipos de grupos funcionales oxígeno, GO exhibe diversas propiedades excelentes. Estas incluyen propiedades electrónicas, ópticas, térmicas, mecánicas y electroquímicas, así como reactividad química. Las propiedades electrónicas, como la conductividad de las láminas de GO, dependen en gran medida de su estructura química y atómica. Más precisamente, dependen del grado de desorden estructural que surge de la presencia de una fracción sustancial de carbono sp^3 . En general, las películas delgadas de GO son típicamente aislantes, con una correlación en la proporción de enlaces C-O sp^3 . Esto, a su vez, representa barreras de transporte, lo que lleva a la ausencia o interrupción de vías de conexión entre los grupos de carbono sp^2 , lo cual permite que ocurra el transporte de cargas. Sin embargo, la reducción del GO, es decir la remoción de grupos funcionales de oxígeno, a partir de diversos métodos permite una disminución de las propiedades aislantes del GO por varios órdenes de magnitud, y de esta manera, transformar al material en un semiconductor y, en última instancia, en láminas semejantes al grafeno. Durante los últimos años, las propiedades electroquímicas del GO como superficies de electrodos han sido abordadas con profundidad debido a su favorable movilidad electrónica y propiedades superficiales únicas, como el grosor de un solo átomo y la extensa área de superficie específica. De esta forma, el estudio de la optimización en las síntesis y su posterior modificación química representan, aún hoy, un área relevante en el desarrollo de nanomateriales de carbono.

1.1.2 Síntesis de óxidos de grafeno

La síntesis del GO puede dividirse esencialmente en dos grandes categorías de acuerdo al enfoque de las metodologías: los métodos “de abajo hacia arriba” (*bottom-up*) donde moléculas simples de carbono son usadas para sintetizar grafeno pristino, y los métodos “de arriba hacia abajo” (*top-down*) en los cuales los derivados del grafeno son extraídos de una fuente de carbono, generalmente grafito (ver figura 1.3).¹¹ Los métodos *bottom-up*, como deposición química de vapores (CVD) y crecimiento epitaxial en carburo de silicio, han demostrado ser eficientes en la síntesis de grafeno, aunque requieren tiempos de síntesis muy largos y enfrentan muchos desafíos en la escalabilidad.¹² Por lo tanto, el enfoque de los métodos *top-down*, que inicialmente generan GO y/o rGO, son más convenientes para sintetizar derivados de grafenos si se buscan

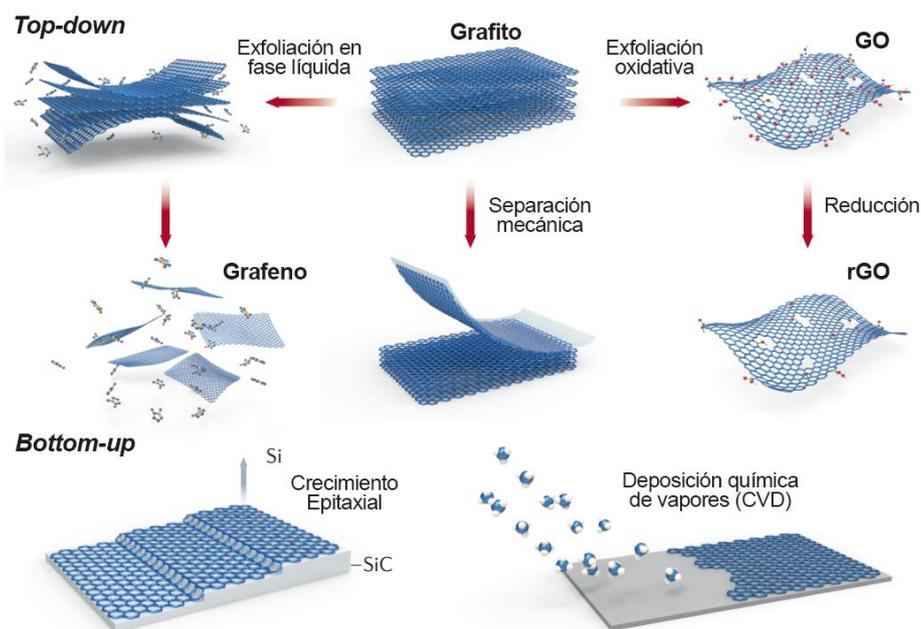


Figura 1.3. Diagrama representativo de los distintos enfoques para la síntesis de derivados de grafeno. Imagen adaptada: Wang *et al.* Nat Rev Chem 2017.

aplicaciones que luego deban ser escaladas.

La síntesis más utilizada para obtener GO es la desarrollada por Hummers y Offeman,¹³ que cuenta con diversas mejoras de las síntesis desarrolladas previamente, sobre todo en términos de la seguridad de los reactivos utilizados. Debido a la naturaleza escalable de este método, es el más utilizado para generar derivados de grafeno con este enfoque, ya que además permite la

modificación del método original que optimiza la síntesis de acuerdo con las necesidades referidas a sus aplicaciones posteriores.

Las características generales de este método de síntesis mediante exfoliación química se basan en colocar una fuente de carbono (generalmente polvos o escamas de grafito) en un solvente protonado ácido (ácido sulfúrico, ácido fosfórico o una mezcla de ambos) y un agente oxidante fuerte (usualmente KMnO_4). Seguido de este paso, es habitual el tratamiento de la mezcla resultante con H_2O_2 para remover los contraiones metálicos del oxidante, que resulta en una mezcla amarilla burbujeante derivando a un líquido con una coloración amarilla-marrón. Los sólidos resultantes son luego separados y tratados con HCl para remover cualquier impureza metálica, y la solución es posteriormente enjuagada y centrifugada en sucesivas oportunidades con agua hasta que el pH de la solución sea neutro. La ruta de síntesis general se puede modificar para adaptarse a las necesidades particulares en la aplicación deseada. Por ejemplo, vale la pena señalar que, en el caso de la utilización de escamas de grafito como fuente de carbono, el tamaño y la forma de las escamas determinarán las mismas variables en el óxido de grafeno resultante de la síntesis. Un abordaje interesante en la modificación del método de Hummers es el desarrollado por Marcano et al., conocido como el método Tour,^{14,15} en el que se sustituye el nitrato de sodio característico del método Hummers, por ácido fosfórico en una mezcla con H_2SO_4 en proporciones 9:1 y aumentando la cantidad de KMnO_4 utilizado. La ventaja de este método consiste en la ausencia de generación de gases tóxicos, como NO_2 , N_2O_4 o ClO_2 , en la reacción y el fácil control de la temperatura de la mezcla de reacción. Los autores afirman que la presencia de H_3PO_4 genera una red grafitica con menos defectos comparados a la prístina. A su vez, el GO obtenido por este método tiene un mayor grado de hidrofiliidad en contraste con el método de Hummers debido a presentar un mayor grado de oxidación, y de esta manera, las suspensiones posteriores son más estables.¹⁶

Estrategias de reducción del óxido de grafeno

A pesar de las ventajas de la presencia de grupos funcionales de oxígeno en el GO, estos grupos deben ser removidos a fin de restablecer las propiedades intrínsecas del grafeno, especialmente la conductividad eléctrica. En la

actualidad existen varios métodos que han sido desarrollados con tal fin entre los que se pueden agrupar en las siguientes categorías: métodos químicos, biológicos, térmicos y electroquímicos.¹⁷ Cada uno de estos grupos de métodos para obtener óxido de grafeno reducido (rGO) ha sido ampliamente estudiado mostrando características en el producto final que lógicamente dependen de la naturaleza en el proceso de reducción. De la misma manera que en lo mencionado para la síntesis del GO, los métodos de reducción poseen pros y contras de acuerdo con las aplicaciones buscadas posteriormente. En esta sección se enumeran las características principales de cada una de las metodologías relevantes.

Reducción química

El reductor químico más utilizado por diversos autores ha sido la hidracina (N_2H_4). El óxido de grafeno reducido (rGO) a través de esta metodología es usualmente considerado como el más parecido a la red prístina del grafeno en términos de las propiedades electrónicas y estructurales. Este método de reducción fue introducido inicialmente por Stankovich y colaboradores en el que reportaron el primer ejemplo de reducción de GO a través del tratamiento con hidracina.¹⁸ Sin embargo, observaron que el tratamiento con hidracina resulta en la incorporación de nitrógeno en la estructura química del rGO obtenido de esta manera, con una proporción de C/N 16:1. Este enfoque en la reducción fue modificado a lo largo de los años optimizando las temperaturas¹⁹ en la que se obtienen las condiciones óptimas de reducción, aunque la contaminación química es una variable que no ha podido ser superada, y que para algunas aplicaciones resulta contraproducente. Han sido utilizados diferentes reductores químicos como borohidruro de sodio ($NaBH_4$),²⁰ ácido iodhídrico (HI),²¹ e hidroquinona,²² entre otros. Sin embargo, la reducción química de GO presenta diversos inconvenientes, entre ellos la toxicidad de los reactivos utilizados (estos reactivos no solo son tóxicos, sino que también presentan naturaleza explosiva), y su consecuente peligrosidad para el ambiente. De esta forma, otros materiales han sido utilizados para subsanar los inconvenientes mencionados, entre ellos nanopartículas metálicas, ácido sulfúrico, fosfito sódico, etc.²³ Sin embargo, estos agentes reductores generan contaminaciones químicas en la superficie del

grafeno que no son adecuados para aplicaciones, sobre todo aquellas biológicas.

Reducción Biológica

En los últimos años ha habido un impulso en intentar utilizar microorganismos como bacterias y levaduras para inducir la reducción del GO. Una de las primeras bacterias utilizadas es la *shewanella* por su capacidad conocida en reducir metales que se atribuye a su capacidad de proporcionar mecanismos de transporte de electrones. *Shewanella* ha demostrado reducir con eficiencia el GO en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.²⁴ Es importante resaltar que no todas las cepas de esta bacteria son igualmente efectivas. A su vez, a diferencia del método de reducción con hidracina, *Shewanella* reduce los grupos hidroxilos (C-OH) pero no los carbonilos o carboxilos (C=O, O=C-OH) debido a la alta energía de enlace en estos últimos comparados con los hidroxilos.²⁵ La capacidad de la reducción del GO por *Shewanella* ha sido reportada en la literatura a través de un complejo proteico de la cadena de respiración sugiriendo que la transferencia de electrones se produce entre las membranas externas e internas que son utilizados por el GO para reducirlo.²⁶ A pesar de que el óxido de grafeno reducido microbiológicamente exhibe una reducción significativa en la resistividad eléctrica comparada con películas de GO, la conductividad de láminas aisladas, el espesor promedio luego de la reducción y la calidad estructural de este tipo de rGO no ha sido estudiada hasta su completa comprensión. A su vez, otros microorganismos han sido utilizados para obtener rGO utilizando mecanismos independientes de los complejos involucrados en la respiración celular, para generar rGO en condiciones anaerobias en las que intervienen especies reactivas de oxígeno, o intermediarios producto de la oxidación química intracelular como agentes reductores; entre los microorganismos utilizados se destacan *Escherichia coli*, y levaduras.²⁷ En todos los casos analizados por diversos autores, la reducción del GO por métodos biológicos resulta en una opción con beneficios respecto a la oxidación química, sobre todo por la ausencia de contaminaciones químicas en el producto final, pero la reducción no alcanza estados completamente reducidos por las limitaciones propias en el contacto entre los microorganismos reductores y el óxido de grafeno.

Reducción Térmica

La reducción térmica del GO es particularmente elegida para diversas aplicaciones en nanoelectrónica. Existe un gran interés en la reducción directa de GO utilizando procesos térmicos para obtener láminas de grafeno con propiedades eléctricas y estructurales similares al grafeno prístino. Con este fin, diversos estudios fueron realizados con diferentes temperaturas de reducción para comprender la cinética y termodinámica que interviene en el proceso de reducción, como también poder elucidar las propiedades resultantes de las láminas de rGO.²⁸ De la misma manera que en las metodologías anteriormente descritas, la selección de la temperatura a la que se lleva a cabo el proceso de reducción es principalmente dependiente de la aplicación deseada del rGO, debido a que existe un compromiso en el balance de las propiedades del rGO y su descomposición estructural. Lógicamente el estado final de la reducción dependerá de la temperatura utilizada como también del tiempo en los tratamientos y la atmósfera empleada para tal fin. Ha sido descrito que la reducción térmica conduce a mejores productos cristalinos en el proceso, generando redes grafiticas de alta calidad,²² aunque la temperatura utilizada promueve relaciones de grupos funcionales diversos, que debe ajustarse de acuerdo a la aplicación deseada, como fue descrito por Tu y colaboradores,³⁰ donde demostraron que la temperatura utilizada genera propiedades distintas de acuerdo al predominio de los grupos funcionales, observándose que los portadores de carga en el rGO para temperaturas de 300-450 °C y 800-1000 °C son electrones (rGO tipo-n) mientras que para temperaturas de 450-800 °C son huecos (rGO tipo-p). Estas diferencias se deben a la predominancia de grupos atractores de electrones (como por ejemplo, carbonilos, carboxilos, epóxidos unidos a C-sp³, etc) que derivan en rGO del tipo-p; mientras que los grupos donantes de electrones (como por ejemplo hidroxilos unidos a C-sp², o éteres) conduce a rGO del tipo-n.

Reducción electroquímica

La reducción electroquímica de GO ha sido estudiada por sus características experimentales en las cuales no son utilizados reactivos tóxicos o que generen contaminaciones en el plano basal de las láminas de GO. La posibilidad de eliminar los grupos funcionales de oxígeno mediante técnicas

electroquímicas reduce los fenómenos que pueden producir daños en la estructura, como en el caso de la reducción térmica. Para ello son utilizadas en general técnicas voltamperométricas (voltamperometría cíclica -CV-, o voltamperometría de barrido lineal), aunque también existen procedimientos en los que se utilizan potenciales constantes, como por ejemplo la amperometría.³¹

Diferentes enfoques fueron desarrollados para obtener la reducción del GO de manera electroquímica. Toh y colaboradores³² agrupan las metodologías en dos diferentes: (i) método de un solo paso en el que una dispersión coloidal de láminas de GO se reducen electroquímicamente *in-situ* en presencia de un buffer electrolito para formar películas delgadas de GO reducido electroquímicamente (ErGO) sobre la superficie de un electrodo. En este tipo de proceso, las propiedades del electrolito utilizado, como su conductividad y pH, junto con el potencial aplicado, gobiernan la eficiencia en la reducción. (ii) Método de dos pasos en el que las láminas de GO son primero depositadas en la superficie de un electrodo, y luego reducidas electroquímicamente en un sistema estándar de tres electrodos en presencia de una solución buffer o electrolito. En el primer método, el potencial aplicado gobierna el grado de reducción, que a su vez controla las propiedades de las láminas de ErGO obtenido. Alternativamente, el segundo método es ventajoso cuando existe un alto control en la síntesis de una capa uniforme, tamaño y espesor de las películas de ErGO que pueden ser fácilmente controlados en la etapa inicial de depósito de GO sobre el electrodo.

Un punto importante a considerar durante la reducción electroquímica de GO es el desgaste del electrodo, que aún no ha sido del todo dilucidado. Este punto se refiere a que posiblemente exista un deslaminado en las películas delgadas de ErGO a causa de la producción de hidrógeno en la interfase entre las películas de ErGO y el electrodo durante el proceso de reducción. Este fenómeno fue estudiado por Wang y colaboradores en donde sistematizaron de qué manera afecta este fenómeno particularmente a la resistividad de las películas en comparación con la reducción química de GO.³³ En los diversos trabajos disponibles en la literatura, se observa que existe una fuerte dependencia en la reducción con el pH del electrolito en la condición de reducción de dos pasos. Esta correlación entre pH y grado de reducción del GO si bien poco clara desde el punto de vista mecanístico demuestra empíricamente que en electrolitos con una mayor concentración de H⁺ la reducción ocurre a

menores potenciales eléctricos, demostrando que es favorecida en medios ácidos.

La reducción electroquímica del GO ofrece diversas ventajas sobre la reducción química y térmica, como la velocidad en el proceso, el cuidado del ambiente, el costo del proceso, el control sobre el tamaño, forma y espesor de las películas de ErGO, la temperatura del proceso, y la ausencia en la necesidad de etapas de purificación posteriores a la reducción, entre otros. Además, la capacidad de recubrir el electrodo directamente con ErGO (*in situ*) hace que este enfoque sea óptimo para aplicaciones de detección y electrocatálisis. A pesar de que la metodología electroquímica permite obtener películas delgadas de ErGO de alta calidad, sin inducir efectos estructurales, la morfología de las láminas de rGO producidas están limitadas por las dimensiones del electrodo utilizado.

1.1.3 Biosensado

Consideración Generales

El avance en las tecnologías que conllevan la detección de analitos relevantes para la salud, ambiente, e industrias requieren el desarrollo de nuevos dispositivos que sean capaces de detectar moléculas de manera rápida y sencilla, y con una alta precisión. Es por ello por lo que en diversas disciplinas se ha puesto un especial énfasis en la investigación y desarrollo de nuevos dispositivos capaces de satisfacer las demandas actuales. Estos dispositivos se denominan sensores y son capaces de detectar cambios físicos o químicos y transformarlos en señales detectables y analizables. De manera simplificada, los sensores contienen dos unidades funcionales denominadas elemento de reconocimiento y transductor. El elemento de reconocimiento es el que le confiere selectividad al sensor convirtiendo el evento de reconocimiento con el analito a medir en algún tipo de señal que es medido por el transductor. Estos eventos de reconocimiento pueden deberse a fenómenos físicos, como cambios en índices de refracción, conductividad, absorbancia, etc, en los cuales no interviene una reacción química; o caso contrario, producto de una reacción química. En este último caso, cuando la reacción química involucra un proceso biológico, por ejemplo, una reacción catalizada por una enzima, los sensores se denominan biosensores.³⁴.

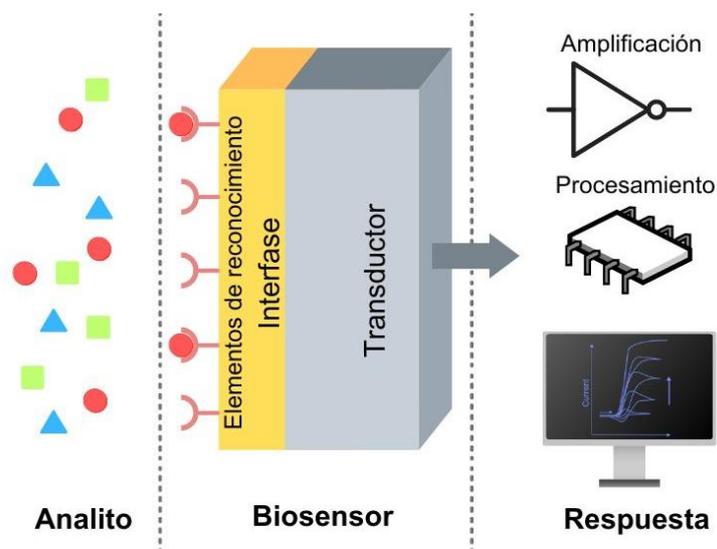


Figura 1.4. Diagrama representativo de las partes que conforman un dispositivo de biosensado

El transductor, por otra parte, transforma la energía del evento de reconocimiento de una forma a otra a fin de obtener información analítica útil. En el caso de los biosensores, convierte el evento de biorreconocimiento en una señal medible (eléctrica, por ejemplo) que es relacionable con la cantidad o con la presencia de un analítico químico o biológico. Los transductores generan señales eléctricas u ópticas, en general, que son proporcionales al número de interacciones entre el analito y el elemento de biorreconocimiento. De acuerdo al principio en el que operan, los transductores pueden categorizarse como electroquímicos, ópticos, térmicos, electrónicos, etc.³⁵

El desarrollo de biosensores tiene como primer antecedente la descripción realizada por Karl Camman³⁶ en 1977 en la que se introducen las reacciones enzimáticas en los sensores químicos. Según la IUPAC, los biosensores son dispositivos capaces de proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa utilizando un elemento de reconocimiento biológico, o receptor bioquímico, el cual se encuentra en contacto directo con el elemento transductor.³⁴ Los biosensores pueden ser clasificados de acuerdo al mecanismo de reconocimiento, o alternativamente, al modo de señal fisicoquímica en el proceso de transducción. En función del elemento de reconocimiento, los biosensores pueden utilizar enzimas, receptores de membrana plasmática, células, anticuerpos, etc. De acuerdo con el mecanismo de detección del

transductor los dispositivos pueden clasificarse como electroquímicos, ópticos, eléctricos, termométricos, piezoeléctricos, etc.³⁷

En particular para el desarrollo de esta Tesis, se utilizan dispositivos electroquímicos y ópticos aprovechando las propiedades de los nanomateriales estudiados, con el fin de optimizar las respuestas obtenidas. Puntualmente, se utilizarán técnicas voltamperométricas y de impedancia para caracterizar no solo el funcionamiento de las plataformas generadas, sino para cuantificar la performance para cada construcción. Las técnicas electroquímicas de transducción presentan como ventaja el aprovechamiento de la señal eléctrica producida en el evento de reconocimiento, para su amplificación y posterior procesamiento en una señal digital.

Los biosensores basados en enzimas fueron los primeros sensores desarrollados, introducidos por Clark y Lyons en 1962, utilizando un electrodo amperométrico enzimático para detectar glucosa con un electrodo con enzimas solubles.³⁸ Desde la introducción del primer biosensor, los biosensores basados en enzimas tuvieron un crecimiento masivo en el uso para diversas aplicaciones hasta el presente. Las enzimas son biocatalizadores altamente eficientes que tienen la capacidad de reconocer específicamente sus sustratos y catalizar su transformación. Estas propiedades únicas convierte a las enzimas en una herramienta poderosa en el desarrollo de dispositivos analíticos.³⁹ Los biosensores basados en enzimas asocian íntimamente una capa de reconocimiento conteniendo estos biocatalizadores con un transductor. El principio de trabajo de estos dispositivos está basado en la acción catalítica y la capacidad de unión para la detección específica de un analito. Estas características principalmente dependerán de la naturaleza enzimática y las condiciones en las que se lleva a cabo la biocatálisis, pero también del transductor, mediante el cual se utiliza alguna de las transformaciones fisicoquímica para convertirlas en señales digitales que permitan la cuantificación o la presencia del analito.⁴⁰

El avance en el desarrollo de nuevos materiales provee la posibilidad de generar o mejorar nuevos nanomateriales transductores para optimizar las señales producidas en los dispositivos enzimáticos. Es objeto de este trabajo de tesis el mejoramiento en el uso de materiales derivados de grafeno para la

sintonización de mejores propiedades transductoras y de inmovilización enzimática brindando condiciones propicias para la biocatálisis.

Óxido de Grafeno para Biosensado

Como se menciona anteriormente, la arquitectura subyacente de un biosensor consiste en la combinación apropiada de una porción biológica para la detección de un analito de interés, un transductor. En cuanto a los materiales de soporte, aquellos nanoestructurados se destacan sobre otros debido a sus características que justifican su uso en el desarrollo de dispositivos biosensores: alta relación de aspecto, buena conductividad eléctrica, alta reactividad, y la capacidad de síntesis de derivados para el correcto soporte enzimático.⁴¹ Como fue abordado anteriormente, el grafeno y sus derivados presentan propiedades particulares que lo convierten como en un material óptimo para su uso en biosensado. A la actualidad, los biosensores basados en grafeno han sido utilizados en diversos modos de transducción. Estos biosensores presentan altas tasas de transferencia electrónica y capacidad de inmovilización. Es conocido que las diferentes metodologías para la síntesis de grafeno y sus derivados pueden impartir diferentes propiedades y funcionalidades en los nanomateriales resultantes y por ende sintonizar alguna de las características para mejorar algún modo de transducción en particular (propiedades ópticas, propiedades electrónicas, etc).⁴²

Particularmente, los derivados del grafeno prístino; GO, rGO, puntos cuánticos de grafeno (GQDs, por sus siglas en inglés) etc; son ampliamente utilizados principalmente por su gran área superficial y la capacidad de interaccionar con muchos tipos de moléculas. A su vez, estos nanomateriales presentan mejores propiedades de solubilidad en medios acuosos, biocompatibilidad y funcionalización que presentan un rol importante en los mecanismos de sensado.⁴³

En comparación con otros métodos mencionados anteriormente de transducción, los biosensores con transductores electroquímicos pueden garantizar ventajas tanto para fines comerciales como de investigación, como el bajo costo, la alta sensibilidad, y la facilidad en la producción.⁴⁴ Sin embargo, gran parte de las propiedades electrónicas de los materiales de grafenos se

deben a la red cristalina prístina, por lo que cualquier modificación a su estructura afectará estas propiedades. De esta manera, en este trabajo de tesis se abordarán diversas alternativas en las modificaciones químicas particularmente del óxido de grafeno, que permita la correcta funcionalización química manteniendo propiedades electroquímicas adecuadas para su uso como transductor, como también la interacción con nanoestructuras metálicas para mejorar la respuesta electroquímica en las plataformas de sensado.

1.2 Aglomerados metálicos de pocos átomos

Los metales en su conformación masiva (*bulk*) y las nanopartículas (NPs) metálicas presentan características y propiedades bien conocidas. Sin embargo, los átomos metálicos pueden encontrarse en conformaciones relativamente nuevas, conocidas como aglomerados cuánticos atómicos, o *atomic quantum clusters* (AQCs, en adelante “*clusters*”). Los *clusters* subnanométricos de metales de transición emergieron en la última década como un nuevo régimen donde las propiedades catalíticas y sus aplicaciones son reportadas frecuentemente.^{45–47} Entre los diversos factores que influyen en el comportamiento catalítico único de los *clusters* metálicos formados por pocos átomos, es decir menos de ~ 50 átomos, los más importantes son los referidos a su estructura electrónica que consta de niveles discretos de energía y orbitales moleculares localizados similares a los presentes en las moléculas, y la baja coordinación y accesibilidad a las moléculas reactivas de todos los átomos presentes en los *clusters*.^{48,49} Su inestabilidad intrínseca supone un desafío para la síntesis de *clusters* “atómicamente precisos”, al que se suman las dificultades asociadas a su posterior anclaje sobre soportes sólidos para aplicaciones en catálisis, la eliminación de los ligandos estabilizadores y la posible progresión de los *clusters* en partículas de mayor tamaño.

Los recientes avances en procedimientos y estrategias de síntesis, junto a las técnicas de caracterizaciones avanzadas han permitido preparar *clusters* atómicamente precisos. Adicionalmente, el estudio mediante espectroscopías y microscopías combinadas con análisis cinéticos y computacionales, está conduciendo a un avance más que relevante en la comprensión del comportamiento catalítico de AQCs.^{50–52}

Los *clusters* atómicos de unos pocos átomos (< 20) son moléculas que presentan propiedades únicas estrictamente dependientes del tamaño en un amplio espectro de aplicaciones, como magnetismo, fotoluminiscencia, catálisis y biomedicina.^{45,48,53,54}

1.2.1 Estructura electrónica

A diferencia de las nanopartículas metálicas, que presentan niveles de energías cuasi-continuos y banda plasmónica, los *clusters* tienen comportamiento similar al de moléculas aisladas. Cuando el tamaño de los *clusters* metálicos se vuelve comparable a la longitud de onda de Fermi, $\lambda_F < 1$ nm, es decir, en el régimen del subnanómetro, los efectos de confinamiento cuántico producen una distribución discreta de estados electrónicos con una brecha HOMO-LUMO (orbital molecular ocupado de mayor energía, y orbital molecular desocupado de menor energía, respectivamente) distinta de cero. Esta característica es decisiva para sus características fisicoquímicas.⁵⁵ Sus estructuras electrónicas tienen niveles de energías discretos y bandas prohibidas (*band gap*) similares a las bandas para orbitales HOMO-LUMO en átomos o moléculas, lo que les quita el comportamiento metálico para presentar propiedades como semiconductores, como se observa en la figura 1.5.^{56,57} El comportamiento de los *clusters*, consecuentemente, depende de la geometría, la estructura electrónica y el tamaño, siendo estas variables estrechamente relacionables entre sí.

Las geometrías de los *clusters* de metales de transición están dominadas por su capa electrónica d parcialmente llena, que favorece las estructuras compactas como una forma de maximizar la interacción entre los orbitales d más bien localizados, y por la hibridación de los orbitales ns-(n-1)d inducidos por la contracción relativista de las capas internas s y p, que favorece las estructuras planas, y que es más fuerte en átomos más pesados como Pt y Au.^{48,58} En general, para los *clusters* con pocos átomos, las configuraciones más estables son las planares, mientras que a medida que se aumenta la atomicidad, la estabilidad es mayor para configuraciones 3D. De esta manera, en configuraciones 3D se forman más enlaces del tipo metal-metal, por lo que los átomos de la superficie están más coordinados, y la contribución de los átomos

internos del *cluster* a la composición de los orbitales de frontera se vuelve más importante con una pérdida concomitante en la capacidad de superposición orbital con moléculas interactuantes. A su vez, el aumento en la atomicidad conlleva a que la distribución electrónica de los *clusters* tienda a estructuras de bandas más similares al metal másico (*bulk*).⁵⁹

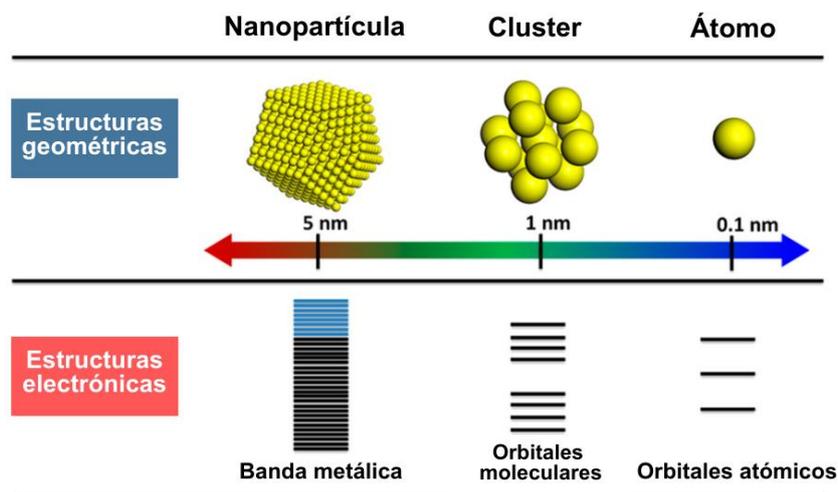


Figura 1.5. Representación esquemática de estructuras electrónicas relacionadas al tamaño de los agregados atómicos. Imagen adaptación de: Liu & Corma Chem. Rev. 2018

El cambio en la estructura electrónica de las partículas a medida que disminuye el tamaño del metal *bulk* se refleja en sus propiedades ópticas.⁶⁰ Así, las nanopartículas metálicas más grandes presentan las denominadas bandas de absorción de plasmones superficiales bajo radiación UV-visible, producidas por la resonancia entre el haz de luz incidente y la oscilación de los electrones confinados en su banda de conducción.⁶¹ Esta resonancia es más fuerte y se desplaza a la parte visible del espectro electromagnético para los metales nobles debido a la mayor polarizabilidad de sus electrones, lo que les proporciona colores característicos y también da lugar a un ancho de banda más agudo en comparación con los metales de transición. En contraste, los espectros UV-visible de los *clusters* son más similares a los de moléculas aisladas, presentando picos estrechos que surgen de su estructura electrónica discreta. Además, la radiación absorbida se emite de manera tal, produciendo radiación fluorescente.^{61,62} Los *clusters* por lo tanto, se comportan como semiconductores, y mientras el plasmón superficial en las NPs cambia principalmente debido a su

forma y tamaño, el espectro de absorción UV-Visible y la longitud de onda de emisión de fluorescencia de los *clusters* cambia significativamente con su tamaño.⁶³ Es esta característica debido a su fuerte dependencia en la atomicidad se puede utilizar para la caracterización del tamaño de los *clusters*. La atomicidad de una muestra de puede ser aproximada mediante la medida del band-gap aplicando el modelo de Jellium⁶⁴, mientras que el band-gap es al mismo tiempo obtenido a partir de un gráfico Tauc del espectro de absorción UV-Visible o de la longitud de onda de emisión del espectro de fotoluminiscencia.⁶⁵

Los *clusters* pueden dividirse principalmente en dos grupos: *clusters* pequeños (\approx 2-20 átomos) y *clusters* grandes (\approx 20-50 átomos). Esta diferenciación se basa en que a mayor tamaño de los aglomerados, menor es el band-gap, además de que en general los *clusters* de más de 20 átomos necesitan la interacción con ligandos para estabilizarse; mientras que los de menor atomicidad, en los cuales prácticamente todos los átomos se encuentran en la superficie del *cluster*, no necesitan de ligando para su estabilización, debido justamente a su prominente *band gap*.⁵⁵

1.2.2 Aplicaciones de los *clusters* metálicos

Los *clusters* han sido estudiados por sus propiedades para diversos campos de aplicación. Particularmente para este trabajo son de interés las aplicaciones biológicas que presentan estos nanomateriales, entre las más relevantes, la estabilidad a pH fisiológico⁵¹, sin la necesidad de estabilizantes o agentes protectores; como también el estado de oxidación cero que facilita la biodistribución. Diversas aplicaciones han demostrado ser de mucha relevancia para las modificaciones de materiales biocompatibles, bioimágenes, y propiedades biocidas; algunas de ellas se describen a continuación:

Debido a las propiedades de fluorescencia de *clusters*, pueden ser utilizados como marcadores. A su vez, la fluorescencia puede ser estimulada con la modificación de ligandos, convirtiéndolos en sensores muy útiles.⁶⁶ El sensado de diferentes moléculas, biomoléculas o compuestos relevantes en general utilizando nanomateriales se ha convertido en el último tiempo en un tema con mucho interés en la ciencia de materiales.⁶⁷⁻⁶⁹ En este caso, los *clusters* de metales nobles han tenido un rol preponderante en el estudio de nuevas

estrategias de detección, utilizando las propiedades antes descritas.^{68,70-72} En la mayoría de los casos, el fenómeno que se utiliza es el de apagado, o *quenching*, de la luminiscencia frente a la detección del analito en cuestión. En otros casos, el fundamento en la detección de moléculas de interés es a través del aumento en la intensidad de la radiación de fluorescencia emitida por los *clusters* al momento del evento de reconocimiento en el sensado. Como gran parte de las propiedades de los *clusters*, la luminiscencia y las propiedades ópticas en general de los clusters de metales nobles son altamente sensibles al entorno local, y dependen de la interacción de analitos externos a su estructura, que convierte a estos *clusters* metálicos en sensores con grandes ventajas.

Las aplicaciones mencionadas anteriormente respecto al sensado, adquiere una relevancia mayor en sus aplicaciones en sistemas biológicos por la posibilidad de utilizarse como reporteros de ciertas biomoléculas para el diagnóstico o el tratamiento de diversas patologías. Particularmente los *clusters* de Au y Ag son los más utilizados con este fin. En el caso de los *clusters* de Au, la química de coordinación con el azufre le permite interactuar con residuos de cisteínas presentes en la estructura de las proteínas, y por ende utilizarse como biomarcadores.⁷³ La utilización de estos nanomateriales presentan grandes ventajas respecto a otros con las mismas aplicaciones, por ejemplo, los puntos cuánticos (QDs) debido a su baja citotoxicidad.⁷⁴ Caso contrario a lo que sucede con los *clusters* de Au, los de Ag presentan mayoritariamente toxicidad para sistema biológicos debido principalmente al efecto de iones de Ag^+ que por diversos motivos se desprenden de la estructura del *cluster*. De esta manera, los *clusters* de este metal se utilizan con fines biocidas o para bioimágenes, principalmente.⁷⁵

Debido a su elevada área superficial, los nanomateriales en general son estudiados por sus propiedades catalíticas. Particularmente los *clusters* metálicos presentan estructuras únicas y propiedades electrónicas “no-metálicas” que los convierten en materiales aún más prometedores y atractivos para su aplicación en esta área.^{76,77} Como se menciona en la sección anterior, los *clusters* de tamaño entre 1-2 nm presentan un fuerte efecto de confinamiento cuántico que se vuelve central en su aplicación en nanocatálisis. Parte de los desafíos en esta área es la estabilidad de los *clusters*. La actividad catalítica de estos nanomateriales dependerá, además de las propiedades fisicoquímicas de

cada tipo de *cluster*, de si se encuentran soportados o no soportados.⁷⁸⁻⁸⁰ Para el caso de reacciones heterogéneas, los sistemas catalíticos basados en *clusters* se conforman principalmente con dos componentes, los *clusters* que actúan como catalizadores y el soporte de éstos, usualmente utilizados diversos óxidos metálicos.^{81,82} El principal rol de estos soportes es el anclaje de los *clusters* a su superficie para prevenir cambios en su estructura. Existen diversos métodos para este fin, algunos de ellos utilizan tratamientos térmicos para eliminar los ligandos que estabilizan los *clusters*, además de favorecer el anclaje al soporte.⁸³ De manera contraria, en el caso de reacciones homogéneas catalizadas por *clusters*, los ligando tienen un rol central en la actividad catalítica como también en la estabilización de los *clusters* en el medio en que se produce la reacción catalítica.^{46,79} Los *clusters* de baja atomicidad han sido investigados por poseer actividad catalítica propia que no se observa en sus análogos másicos, o incluso como nanopartículas, de esta manera los convierte en catalizadores únicos. En parte, esta característica que les confiere una capacidad catalítica única es debida a la baja coordinación de los átomos metálicos en la estructura del *cluster*. Un ejemplo representativo de esta característica es el poder catalítico que presentan los *clusters* de Au de entre 5-10 átomos en la oxidación de tiofenol a disulfuro a temperatura ambiente, comparable con la actividad catalítica de enzimas sulfhidrilo oxidasa.⁸⁴

Gran parte de los desafíos en las aplicaciones de *clusters* metálicos tanto en las aplicaciones mencionadas como en otras aplicaciones, supone la síntesis controlada de *clusters* con una mejor estabilidad sin necesidad de ligandos en su estructura permitiendo mejorar sus propiedades.

1.2.3 Clusters de plata de baja atomicidad

A lo largo de la historia la plata ha sido utilizada en diversas configuraciones estructurales como agente biocida (coloidal, soluciones, nanopartículas, etc). Existen un sin número de aplicaciones de nanoestructuras basada en la plata, principalmente de nanopartículas de Ag que son utilizadas en recubrimientos para prótesis ortopédicas o implantes; o incluso formando parte de matrices textiles por sus propiedades antimicrobianas.⁸⁵ Entre los *clusters* metálicos reportados hasta la fecha, los *clusters* de Ag (Ag-AQCs, por

sus siglas en inglés) son particularmente atractivos para distintas aplicaciones debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, como la fuerte luminiscencia o su pequeño tamaño comparado a otros metales, y a su vez, debido a que presentan propiedades químicas únicas relacionadas con la plata. Estas propiedades son utilizadas en aplicaciones de biomarcado o bioimágenes por su interacción conocida con sistemas biológicos.⁸⁶ También, al igual que otros compuestos de plata, presentan actividad antimicrobiana. Estudios recientes muestran que *clusters* de plata de menos de 1 nm exhiben propiedades antibacterianas superiores a otros compuestos en un amplio espectro de bacterias.⁸⁷ Esta característica se debe a diversos mecanismos que son producto de las características propias de Ag, incluyendo daño en las membranas celulares, interacciones con ácidos nucleicos, y particularmente, la generación de especies reactivas de oxígeno para perturbar el metabolismo celular.⁸⁸⁻⁹⁰ Es sabido que cuando las nanoestructuras de Ag reducen su tamaño, a un régimen subnanométrico, la eficacia de los efectos antimicrobianos aumenta debido a la relación de superficie en estas estructuras. Adicionalmente a esto, los *clusters* con estructuras definidas presentan otras ventajas propias de las características de los *clusters* mencionadas anteriormente. Sin embargo, la mayoría de las aplicaciones listadas corresponden a *clusters* de Ag funcionalizados con diversos ligandos.

En el último tiempo, gran parte del desarrollo de estos nanomateriales ha avanzado, junto a las metodologías de caracterización, para lograr obtener *clusters* de Ag con dimensiones precisas y libre de ligandos. Particularmente son de interés para este trabajo de tesis la utilización de Ag-AQCs sin ligandos, que presentan un comportamiento molecular, para dilucidar propiedades aún no observadas o aplicaciones en sistemas biológicos novedosas. Existen antecedentes que ponen en relevancia el estudio de estos nanomateriales subnanométricos como es el caso de la interacción de Ag-AQCs con ADN actuando como un intercalante y deteniendo los procesos fisiológicos de traducción del ADN, derivando en un efecto letal para las células.⁹¹⁻⁹³ Por otro lado, el rol de *clusters* de Ag de 3 y 5 átomos han sido estudiados en células tumorales observando una relación entre la generación de especies reactivas de oxígeno y los *clusters*, sugiriendo un estrés oxidativo causado por los *clusters*, que deriva en la muerte celular.⁹⁴ A pesar de los avances en la utilización de

clusters de Ag sin ligandos existen mecanismos de los efectos observados que aún no son explicados con precisión, por lo que resulta un desafío en el estudio de estos sistemas poder comprender de manera racional los efectos que presentan los Ag-AQCs.

1.2.4 Síntesis de *clusters* atómicos metálicos

Existen dos enfoques de síntesis de *clusters*, de la misma manera que sucede con la síntesis de nanopartículas, las síntesis “*top-down*” y “*bottom-up*”.

El primer enfoque se realiza a partir de la síntesis de partículas de mayor tamaño que los *clusters*, como nanopartículas o incluso metales *bulk*. El “ataque químico” es una de las técnicas *top-down* más utilizadas en la cual NPs son corroídas a través de agentes químicos logrando nanopartículas de menor tamaño o *clusters*.⁹⁵ Existen también enfoques *top-down* que utilizan agentes físicos para la obtención de *clusters* como es el caso de la ablación láser pulsado de un fragmento del metal.⁹⁶

Por otro lado, las técnicas *bottom-up* de síntesis son realizadas a partir de iones metálicos como precursores que en presencia de agentes reductores son reducidos a estados de oxidación neutro para formar *clusters*. Este enfoque es basado en el control cinético de las reacciones para alcanzar un tamaño particular de *clusters* deseado.⁵⁵ Existen diversos métodos para llevar a cabo este enfoque de síntesis como los métodos químicos,⁹⁷ fotoquímicos, o electroquímicos.^{51,92,93} Independientemente de la metodología utilizada, la atomicidad de los *clusters* sintetizados es modificable durante la síntesis ajustando la cinética de la reacción. Particularmente para este trabajo de tesis, se utilizaron muestras sintetizadas electroquímicamente en colaboración con el grupo del Dr. Arturo López-Quintela de la Universidad de Santiago de Compostela, España.

1.3 Objetivos del trabajo

En esta tesis se aborda el estudio de aplicaciones biológicas de nanomateriales novedosos como el GO y los Ag-AQCs. Para ello se presenta el análisis fisicoquímico de dichos nanomateriales, para determinar el origen de sus

propiedades y poder disponer de un mejor diseño para su posterior aplicación. En una primera parte, se realiza un estudio exhaustivo de las propiedades de diversos tipos de óxidos de grafeno y su interacción tanto con nanoestructuras metálicas como con biomoléculas para su posterior evaluación como interfaces biosensoras. Para ello, se optimizan tanto la síntesis como las técnicas de deposición del material mediante técnica de Langmuir-Blodgett, la que permite una estructuración bidimensional ordenada, y consecuentemente un mejor estudio de sus propiedades mediante diversas técnicas de caracterización. Posteriormente se funcionalizarán las plataformas obtenidas con enzimas para su evaluación funcional mediante técnicas electroquímicas y ópticas.

Por otro lado, en una segunda parte de este trabajo de tesis, se aborda el estudio mediante técnicas avanzadas de luz sincrotrón de las propiedades catalíticas de aglomerados de pocos átomos metálicos y su interacción con sistemas biológicos. Para ello serán diseñadas distintas estrategias de caracterización para evaluar con precisión los cambios fisicoquímicos que permitan identificar mecanismos de acción y posibles aplicaciones. Se espera utilizar un sistema modelo que permita escalar parte de los resultados a experimentos in vitro de sistemas biológicos complejos.

A lo largo de esta tesis, se desarrollarán en los siguientes objetivos:

Capítulo 3: Estudiar y analizar las propiedades fisicoquímicas del óxido de grafeno y la capacidad de deposición en sustratos sólidos para la generación de plataformas de estructura química sintonizable.

Capítulo 4: Explorar la construcción de biointerfaces funcionales mediante la modificación con enzimas para la detección de glucosa

Capítulo 5: Estudiar las propiedades de aglomerados metálicos de plata y su comportamiento catalítico con moléculas de interés biológico mediante técnicas avanzadas de caracterización de nanomateriales.

Capítulo 6: Analizar las implicancias biológicas en el efecto catalítico de aglomerados metálicos de plata mediante la interacción con biomoléculas y biosistemas de interés.

Capítulo 2

Técnicas Experimentales

2.1 Balanza de Langmuir-Blodgett

La Balanza de Langmuir-Blodgett (LB) es un instrumento utilizado con el fin de preparar y estudiar monocapas de moléculas depositadas sobre la superficie de una subfase determinada (por ejemplo, agua) permitiendo de esta manera medir fenómenos superficiales relacionados a la compresión en la interfaz subfase-componente-aire. A su vez, la capacidad de comprimir monocapas sobre la superficie de la subfase elegida, permite, en principio, transferirlas sobre diversos sustratos sólidos con el fin de estudiar sus características y propiedades.

Los principios teóricos que dieron origen a la utilización de la balanza LB para el estudio de monocapas, si bien sistematizados y estandarizados por Irving Langmuir y Katherine Blodgett a comienzos del siglo XX,⁹⁸⁻¹⁰⁰ se remontan a fines del siglo XIX donde Agnes Pockels, una joven ama de casa nacida en la Venecia del imperio Austríaco, autodidacta de la física y sin formación universitaria, desarrollo el primer dispositivo que utilizó para medir la tensión superficial de monocapas hidrofóbicas y anfifílicas y el tamaño de las moléculas. En 1891, y luego de haber leído diversos trabajos publicados por Lord Rayleigh sobre tensión superficial en *Naturwissenschaftlichen Rundschau*, Pockels decidió escribirle a Rayleigh una carta mediante la cual le comentaba sus observaciones y la utilización del dispositivo desarrollado por una cuba de hojalata para medir la tensión superficial de las sustancias que se encontraban en el agua utilizada para el lavado de los platos. El motivo de la carta era la solicitud para que, a través de él, se pudiera publicar su estudio. Posteriormente Lord Rayleigh escribió al editor de la revista, publicándose la carta en la que explica el fenómeno observado, junto a su desarrollo.¹⁰¹

El dispositivo descrito funcionaba a partir de una cuba rectangular, de dimensiones conocidas, en la que Pockles llenaba de agua hasta el borde, junto con una tira de hojalata atravesando perpendicularmente la longitud, de modo que la parte inferior de la tira esté en contacto con la superficie de agua, para dividir la cuba en dos mitades. De esta manera, pudiendo mover esta tira divisoria, la superficie a cada lado aumentaría o disminuiría su área. Al agregar sustancias sobre la superficie del agua, jabón o aceite en el caso de Pockles, se podía medir su tensión superficial con un disco de 6mm, por lo que frente al

movimiento de la tira divisoria se podía ver el aumento de la tensión, frente a la reducción del área. Esta compresión llegaba hasta un cierto punto en el que la tensión cambiaba bruscamente, definido posteriormente como el punto Pockles, y correspondía a la mayor compresión posible. Conociendo la cantidad de material colocado en la superficie, la tensión superficial y el área comprimida, era posible conocer el tamaño de las moléculas.

Este artefacto mencionado en la carta enviada a Lord Rayleigh describe simplifadamente el fundamento de las balanzas LB en la actualidad, aunque con diversas modificaciones que fueron incorporadas posteriormente a fin de optimizar el arreglo experimental para minimizar inconvenientes y lograr medidas más precisas. Lord Rayleigh midió la tensión superficial de agua contaminada entre barreras incorporando el método Wilhelmy, mediante el cual incorporó una placa delgada sobre una balanza de manera vertical y con su borde inferior horizontal sumergido levemente sobre la superficie del agua.

En 1917, Irving Langmuir publicó los primeros estudios sistemáticos de monocapas de moléculas anfifílicas en la interfaz agua/aire conceptualizando teóricamente varios reportes realizados previamente por Rayleigh, de Devaux y Hardy; como también la metodología experimental.⁹⁸ Por la importancia del estudio de estas monocapas, en la actualidad se denominan como *películas de Langmuir*.

Posteriormente, Katherine Blodgett, colaboradora de Langmuir, reportó en 1934 la metodología para la deposición ordenada de monocapas y multicapas de películas de Langmuir sobre sustratos sólidos.^{99,100} De esta manera, se conoce a este equipamiento que permite la deposición de películas sobre sustratos sólidos como balanza de Langmuir-Blodgett.

Las balanzas LB actuales permiten un alto control de los parámetros que intervienen en la deposición de las películas, permitiendo arreglos bidimensionales con densidades, espesor o números y tipos de capas sobre el sustrato perfectamente definidos. La disposición general del equipo LB (Figura 2.1) consiste en una cuba que actúa de contenedor de la subfase y el material de interés, barreras móviles que permiten ajustar la presión superficial del surfactante, una electrobalanza con una placa de Wilhelmy para monitorear la presión superficial, un dispositivo para sumergir y transferir controladamente sustratos sólidos (*dip-coater*) y una interfaz que permite controlar los dispositivos

y comunicarse con el equipo.¹⁰² Tanto la cuba como las barreras móviles son compuestas por politetrafluoroetileno (PTFE o teflón), lo que permite el control de impurezas permitiendo obtener películas libre de contaminantes.

2.1.1 Películas de Langmuir-Blodgett

La principal característica de estas películas es que, al producirse en la interfaz de la subfase acuosa y el aire, los compuestos capaces de formar estas películas deben presentar propiedades anfifílicas. Esto implica que posean dominios o grupos polares, que interaccionarán con el agua de la subfase, y una región no polar, lo que impide la disolución del a monocapa en el agua. Un ejemplo característico de este tipo de compuestos son los fosfolípidos o lipopolisacáridos que conforman las membranas biológicas, y que presentan un grupo polar en un extremo, seguido de una cola hidrofóbica.

Para generar las monocapas sobre la interfaz agua/aire, el material de interés se disuelve o se suspende en un solvente orgánico volátil (por ejemplo, cloroformo) y se incorpora gota a gota de esa disolución sobre la superficie de la

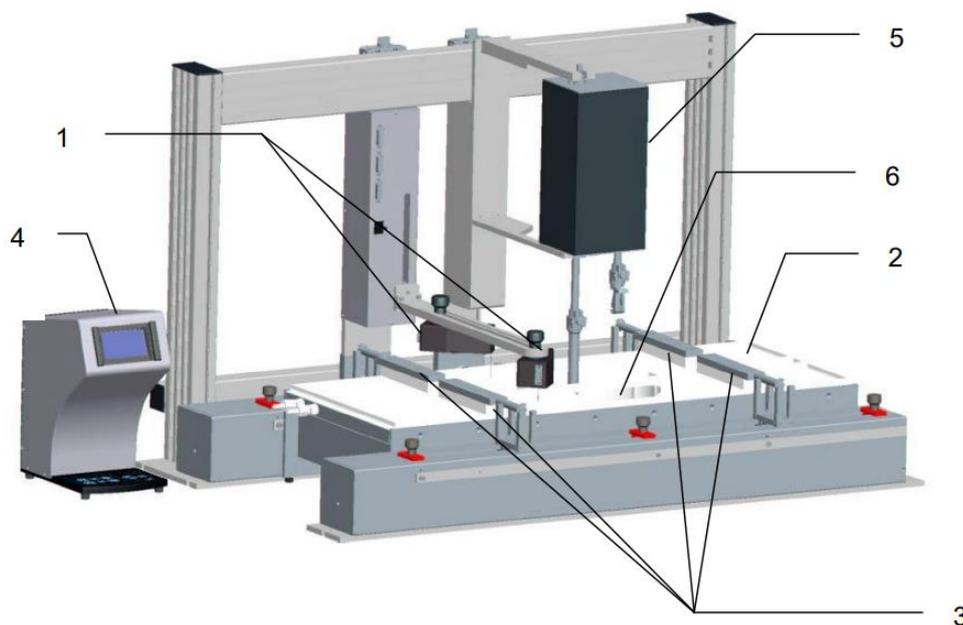


Figura 2.1. Diagrama de Balanza de Langmuir-Blodgett modelo KSV 5000. En el diagrama se indican los componentes de la misma, utilizados en el ensamblado de películas LB en este trabajo. 1) Electrobalanzas 2) Cubas de PTFE 3) Barreras móviles 4) Controlador *layerbuilder* 5) *Dip-coater* (recolector) 6) Hueco para sumersión de sustratos.

subfase acuosa utilizando una jeringa de precisión del tipo "Hamilton". El solvente utilizado debe evaporarse en plazos cortos, de manera que las moléculas del material de la monocapa se esparzan por la superficie sin disolverse en el agua.

La formación de una monocapa anfifílica está relacionada con las propiedades termodinámicas particulares para la interfaz aire/líquido. La superficie de un líquido tiene un exceso de energía libre debido a la diferencia entre el entorno de las moléculas superficiales y aquellas que se encuentran en el seno del líquido (*bulk*). En el líquido, las moléculas presentan un cierto grado de atracción entre ellas, el cual depende de la naturaleza del líquido. En el agua, mayoritariamente las interacciones son del tipo puentes de hidrógeno, permitiendo formar redes tridimensionales y manteniendo de esta manera el balance de las fuerzas atractivas en todas las direcciones. Por otra parte, en la capa superficial del líquido expuesta en la interfaz, cada molécula está en contacto con otras pocas, por lo que el balance resulta alterado, tendiendo espontáneamente a reducir el área expuesta del líquido. En estas condiciones, se debe realizar trabajo para extender la superficie de un líquido contras las fuerzas atractivas, y consecuentemente se produce un aumento en la energía libre del sistema. Para que una interfaz se encuentre en equilibrio, la velocidad de las moléculas que dejan la superficie para ir al seno del líquido debe ser la misma de las que difunden del *bulk* hacia la superficie. La fuerza lineal que actúa en las moléculas superficiales se conoce como *tensión superficial*, γ , y se puede expresar como:

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T,P,n_i} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

donde G es la energía libre de Gibbs y A es el área superficial a temperatura (T), presión (P) y número de componentes (n_i) constantes. Las unidades habituales para la tensión superficial son [mN/m].

De esta manera, la formación espontanea de una monocapa cuando se coloca una sustancia anfifílica en la superficie de un líquido afectará el valor de γ . La presencia de la monocapa actúa como surfactante, disminuyendo la tensión

superficial debido a la creación de interacciones entre las regiones polares del compuesto y el líquido.

Cuando el área superficial es suficientemente grande y hay pocas moléculas surfactantes, la monocapa tiene un efecto mínimo en la γ . Sin embargo, al reducir el área a través de las barreras móviles de la balanza LB, la distancia entre las moléculas de los surfactantes disminuye, así como la tensión superficial. Cuando las moléculas de la monocapa comienzan a interactuar ejercen un efecto repulsivo entre si, y la fuerza ejercida por la película por unidad de área, correspondiente a un análogo bidimensional de la presión, se conoce como presión superficial (π) y se expresa como:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Representando la reducción de la tensión superficial del líquido puro, γ_0 , en presencia de la monocapa. La formación de una monocapa habitualmente se sigue registrando π en función del área a T constante (isotermas).

Las isotermas de películas LB se realizan a través del método de Wilhelmy (Figura 2.2) que se basa en la medida absoluta de la fuerza debida a la tensión superficial una placa, comúnmente una lámina de Pt o un filtro de papel, parcialmente sumergida en la subfase. Conociendo las dimensiones de la placa la alteración en γ es convertida a π para cada valor de área.

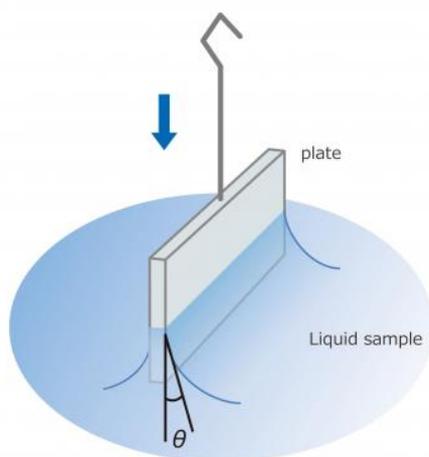


Figura 2.2. Diagrama de funcionamiento del método Wilhelmy para la medición de tensión superficial (γ). Los parámetros tenidos en cuenta son las dimensiones del platillo de Pt, el ángulo de contacto con el líquido de la interfase (θ) y la fuerza que actúa sobre el platillo (F)

Las isotermas de π en función del área se miden en condiciones de pseudo-equilibrio por compresión continua de la monocapa mientras se registra la presión superficial. Estas medidas proveen información de las fases que experimentan las moléculas del surfactante en la superficie. En un experimento típico, estas están muy alejadas entre sí de modo que hay poca interacción y por ende poca contribución al cambio de π . Esta condición puede ser considerada como un “gas” bidimensional debido a la gran distancia entre moléculas (fase gaseosa, Figura 2.3). Esta situación de poca contribución al cambio de π se mantiene hasta que el movimiento de las barreras aproxima a las moléculas hasta el punto en que comienzan a interactuar y se observa un cambio de pendiente en la isoterma, entrando así a la fase líquida.

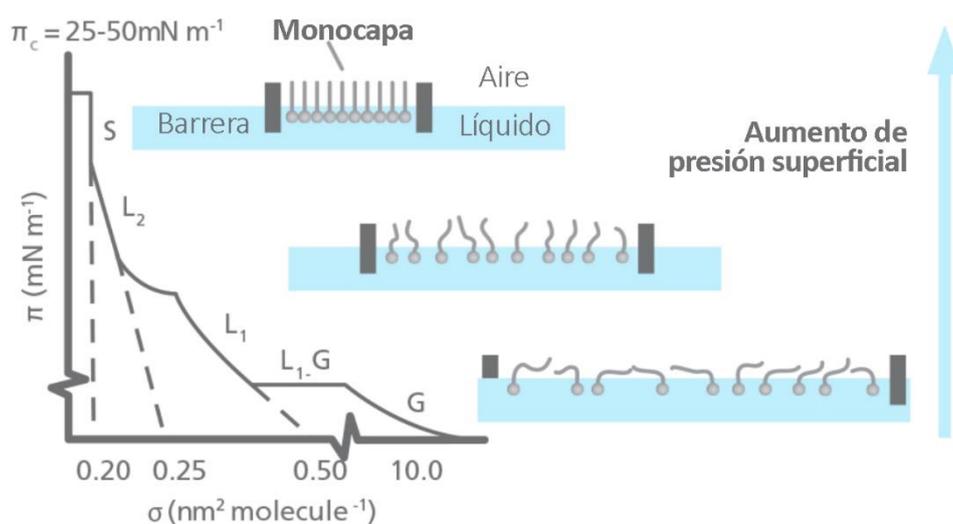


Figura 2.3. Diagrama representativo de una isoterma π -A típica en la que se observan las fases de la monocapa respecto al aumento de la presión superficial debido a la compresión mecánica de las barreras móviles de la balanza LB.

Durante la compresión de la monocapa, las moléculas del surfactante se ensamblan de manera que pueden sufrir distintas transformaciones de fase, que se identifican como discontinuidades en la isoterma. Estas fases corresponden a diferentes organizaciones moleculares que dependen de cada tipo de surfactante. En las fases más condensadas, con menor área de compresión,

existe una fuerte cohesión lateral entre las moléculas, alcanzándose un empaquetamiento compacto, razón por la cual se define como fase sólida.

Finalmente, al aplicar mayor compresión una vez alcanzada la fase sólida, ocurre el fenómeno de colapso de la monocapa por inestabilidad mecánica, expulsando moléculas de la interfaz con la formación de multicapas desordenadas o la precipitación de conglomerados moleculares, lo cual se puede observar como una caída, o en algunos casos, un estado estacionario en la que la monocapa no cambia la presión superficial respecto a la compresión. (figura 2.3).

Con la información obtenida de las isothermas, es posible conocer el área disponible por molécula que conforman la monocapa depositada sobre la superficie de la subfase, dividiendo el área de la monocapa determinada por la posición de las barreras por el total de moléculas depositadas, considerando que el número total es idéntico al “sembrado” inicialmente. Las isothermas se expresan comúnmente en función del área por molécula en [$\text{\AA}^2/\text{molec}$] o [nm^2/molec]. Las fases características de una isoterma π -A, como se mencionó anteriormente, están determinadas principalmente por la naturaleza del surfactante. Sin embargo, la subfase puede influenciar el orden de acuerdo con su composición (pH, concentración de iones, presencia de quelantes, etc.) La temperatura, a su vez, tiene un rol central ya que pequeñas variaciones modifican cada una de las fases tanto por su dependencia en la tensión superficial, como en las interacciones moleculares. De manera general, las isothermas π -A proveen información de la estabilidad de la monocapa en la interfaz aire/líquido, la organización molecular en el sistema bidimensional, y la existencia de transiciones de fase y transformaciones conformacionales.

En este trabajo de tesis se utilizó la Balanza de Langmuir-Blodgett, perteneciente al INIFTA, para el ensamblado de láminas de GO sobre los sustratos sólidos utilizados en los experimentos presentados en el capítulo 3 y 4.

2.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La Microscopía Electrónica de Barrido (“*Scanning electron microscopy*”, SEM), es una técnica muy versátil para el análisis de nanomateriales que

consiste en el análisis de la superficie del material con un haz de electrones. Producto de la interacción entre el haz y la muestra se generan distintas señales las cuales son debidamente detectadas, obteniéndose imágenes de alta magnificación que revelan información acerca del tamaño, forma, composición, cristalografía y otras propiedades físicas y químicas de la muestra. Una de las características más importantes es su alta resolución espacial y la posibilidad de obtener información tridimensional, gracias a su gran profundidad de foco, entre otros parámetros, en comparación con un microscopio óptico convencional.

El principio de operación básico consiste en la emisión de un haz de electrones con energía, E_0 , entre 0,1 a 30 keV. El haz de electrones es modificado por distintas aperturas, lentes y bobinas que actúan sucesivamente para reducir el diámetro del haz y lograr escanear la muestra con un haz focalizado para analizar posiciones discretas. La interacción del haz de electrones con la muestra genera eventos de dispersión que producen electrones retrodispersados, electrones secundarios y rayos X, que brindan información sobre la muestra como topografía, composición química, estructura cristalina y campos eléctricos y magnéticos locales.¹⁰³

En este trabajo de Tesis, se realizaron medidas de caracterización de electrodos basados en GO en el equipo perteneciente al LIMF, de la Facultad de Ingeniería de la UNLP. Los resultados se presentan en los capítulos 3 y 4.



Figura 2.4. Microscopio electrónico de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés), FEI QUANTA 200, perteneciente al LIMF, FI, UNLP.

2.3 Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM)

La microscopía de fuerzas atómicas, AFM por sus siglas en inglés: *atomic force microscopy*), es una técnica dentro del grupo de microscopías de barrido por sondas que permiten generar una imagen topográfica con resolución atómica de superficies a través del control preciso de la posición de una punta delgada que interacciona con la superficie a medir. Estas técnicas permiten, a diferencia de las microscopías electrónicas, realizar medidas además de en UHV, en aire o en líquidos. En particular, la microscopía de fuerzas atómicas permite el mapeo de la superficie a través de fuerzas de distintas naturalezas, magnéticas o electrostáticas, como también a través de la funcionalización de la punta utilizada para la detección química de especies en la superficie.

La instrumentación de esta técnica se basa en una sonda acoplada a una palanca microscópica denominada cantiléver, que presenta una flexibilidad variable que permite la deflexión de este debido a fuerzas electrostáticas, friccionales, de Van der Waals, o capilares entre la punta y la superficie. El control de la posición de la punta sobre la muestra se realiza a través de un elemento piezoeléctrico. Esta configuración permite evaluar las fuerzas superficiales en un rango de 10^{-13} a 10^{-6} N. La detección de las interacciones entre la punta colocada en el cantiléver se realiza mediante la incidencia de un láser que se refleja en la parte posterior del cantiléver, detectando la deflexión de este a través de la desviación en la reflexión del haz medido utilizando un fotodetector.

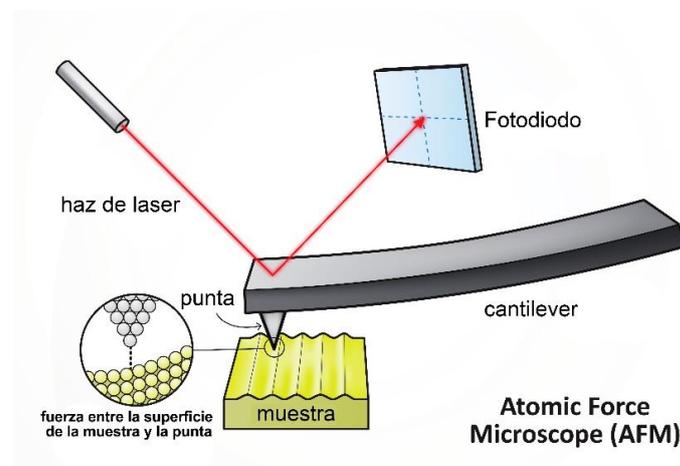


Figura 2.5. Diagrama representativo del funcionamiento y partes de un microscopio de fuerzas atómicas (AFM).

El AFM se puede operar en distintos modos de acuerdo con las fuerzas entre la punta y la superficie de la muestra, ya sea que actúen fuerzas repulsivas, o atractivas, o una combinación de ambas. De esta manera, conforme a las características propias de cada muestra se pueden variar estos parámetros para obtener imágenes más precisas de la superficie. En particular para esta tesis, las imágenes obtenidas se realizaron en el modo intermitente, o *tapping*, que opera entre fuerzas repulsivas y atractivas oscilando el cantiléver a una frecuencia determinada. Este enfoque permite obtener imágenes principalmente sin dañar la superficie de la muestra debido a la ausencia de contacto con la misma. Para ello, fueron utilizados los equipos pertenecientes al INIFTA.

2.4 Espectroscopía de Absorción de Rayos X (XAS)

Las espectroscopías de absorción de rayos X se basan en la interacción entre la radiación y la materia, en la que diferentes efectos (fotoemisión, producción de pares, absorción, etc.) pueden tener lugar¹⁰⁴ de acuerdo a las longitudes de onda de la radiación incidente y la sección eficaz total del material sobre el que tal radiación incide. En la Figura 2.5 se muestra un esquema de los diferentes procesos primarios competitivos y algunos procesos de decaimiento (radiativos y no radiativos) debido a la interacción entre la radiación y la materia.

El proceso de atenuación de la intensidad de los rayos X que atraviesan una determinada muestra de material de espesor x puede ser descrito mediante la ley de Lambert-Beer, como se expresa en la ecuación 2.3, donde el coeficiente de absorción μ , que depende de la energía y de la composición del material puede ser descrito en función de la intensidad incidente I_0 y de la intensidad luego de atravesar la muestra I . El coeficiente de absorción (μ) está determinado por los diversos procesos elementales que suceden en la interacción radiación-materia, como lo son el efecto fotoeléctrico, el efecto Compton, la producción de pares electrón-positrón, y los procesos de decaimiento estimulado, entre otros. Sin embargo, como veremos a continuación, el efecto fotoeléctrico resulta ser el preponderante en la región de energías para los fotones incidentes en un experimento típico de absorción de rayos X.

$$I = I_0 e^{-\mu x}$$

Ecuación 2.3

Cada uno de los procesos elementales antes nombrados tiene asociadas curvas características de probabilidad de ocurrencia, que dependen de la energía del fotón que incide sobre la muestra, y del material que la compone.¹⁰⁵ Para la absorción de rayos X, el efecto dominante es el fotoeléctrico, en el cual los fotones son absorbidos cuando tienen la energía suficiente para promover electrones ligados de un átomo a niveles energéticos superiores (permitidos por las reglas de selección) o al continuo. Dependiendo las energías utilizadas experimentalmente y la probabilidad de estos, tanto el efecto Compton como la creación de pares no resultan relevantes en los estudios realizados para este trabajo (ver Figura 2.5).

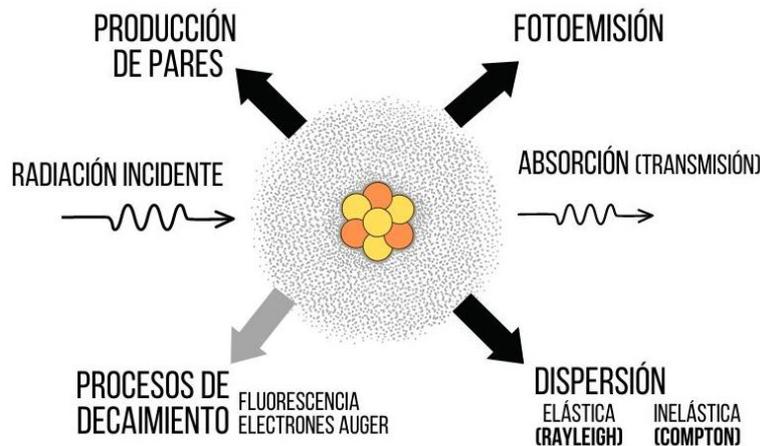


Figura 2.5. Esquema de los diferentes procesos primarios competitivos (fotoemisión, transmisión, dispersión) y procesos de decaimiento (radiativos y no radiativos) debido a la interacción entre la radiación y la materia.

Las espectroscopías por absorción de rayos X constituyen técnicas promedio, ya que la radiación interacciona con los átomos de la región “iluminada” por el haz, y el resultado contiene la contribución de todas las interacciones con el peso estadístico de cada especie que forma el átomo absorbente. La probabilidad de interacción de la radiación incidente con la materia viene dada por la sección eficaz atómica (σ)¹⁰⁶ y es proporcional al

coeficiente de absorción. De esta manera, la sección eficaz contempla todos los procesos posibles durante el proceso de interacción entre los fotones incidentes y la materia (Figura 2.6). De manera simple, se puede describir que:

$$\sigma_{tot} = \tau_{fotoel.} + \kappa_{prod. \text{ de pares}} + \sigma_{Compton} + \sigma_{Rayleigh} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

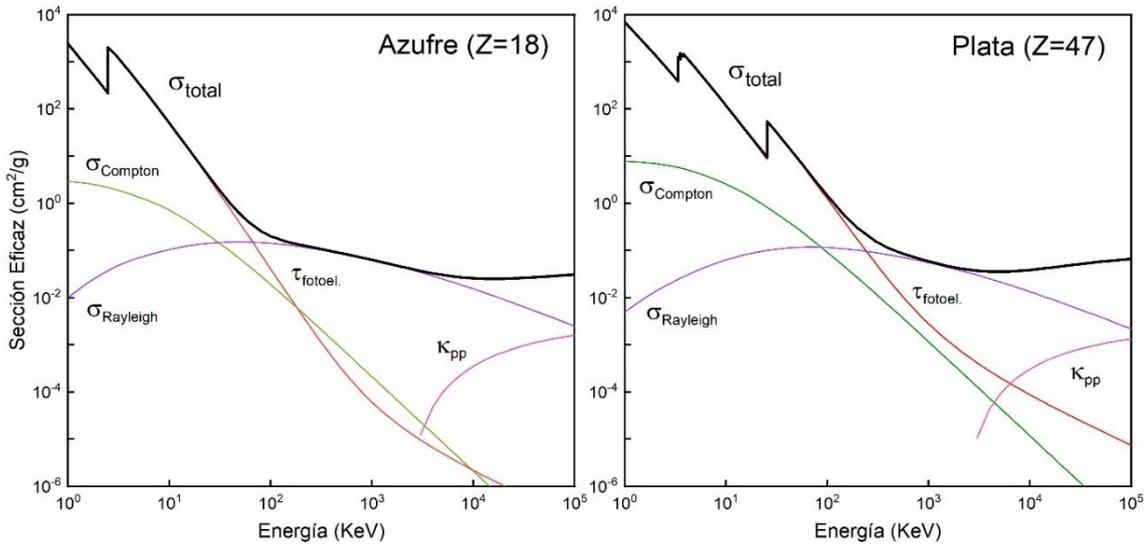


Figura 2.6. Sección eficaz del azufre (izquierda) y de la Plata (derecha) en función de la energía incidente para un experimento de absorción de rayos X⁽¹⁾. Se observa que en el rango de energías hasta 10² keV el proceso dominante en la absorción es el de fotoemisión.

(1) imágenes obtenidas de la base de datos de NIST

Como se observa en la figura 2.6, en energías incidentes de hasta 100 keV se puede aproximar por su contribución mayoritaria dada por los procesos de fotoemisión. A su vez, σ depende proporcionalmente de μ . Excepto en los bordes de absorción, μ es una función suave y decreciente de la energía, y en la región X depende de la densidad de la muestra ρ , el número atómico Z, la masa atómica A, y la energía del fotón de la siguiente manera:

$$\mu = \frac{\rho Z^4}{AE^3} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

Los bordes de absorción se generan cuando el fotón incidente tiene la energía suficiente para promover un electrón de estados profundos ligados al átomo a estados electrónicos superiores desocupados (niveles de valencia) o al

continuo. Para que esta transición sea posible la energía del haz incidente debe ser igual o mayor a la diferencia de energías entre los estados iniciales y finales, además de estos últimos cumplir con las reglas de selección de momento angular. Como tanto los niveles energéticos de los electrones en los átomos y las energías de ligadura están bien definidos y son conocidos para cada elemento, las técnicas de absorción por rayos X permiten estudiar bordes determinados de elementos específicos dentro de la muestra, lo que la hace una técnica “químicamente selectiva”.

Como se mencionó anteriormente, en la espectroscopía XAFS (estructura fina de absorción de rayos X, por sus siglas en inglés) se presentan fenómenos cuánticos que se basan en el efecto fotoeléctrico, mediante el cual un fotón incidente, en el rango de los rayos X, es absorbido por un átomo de la muestra y se libera un electrón. La onda del “fotoelectrón” eyectado es dispersada por los átomos vecinos del átomo absorbente, creando interferencias entre la componente saliente y la dispersada de la función de onda del fotoelectrón. Estos efectos de interferencia cuántica causan variaciones en la probabilidad de absorción de los rayos X, la cual también depende de la energía y es proporcional al coeficiente de absorción μ . Realizando diferentes tratamientos matemáticos de las señales de absorción se puede obtener información acerca de la estructura, el número atómico, el desorden estructural y el movimiento térmico de los átomos vecinos a un elemento dado.

El espectro de absorción puede dividirse en dos regiones, dando información complementaria del sistema: la región XANES (estructura de la absorción de rayos X cerca del borde) y EXAFS (estructura fina de la absorción de rayos X en la región extendida del borde). XANES se limita a estudiar desde algunos eV antes del borde de absorción hasta aproximadamente 50 eV después, mientras que EXAFS abarca desde 50 hasta algunas centenas de eV después del borde (ver figura 2.7). La distinción entre estas dos regiones se debe a que los efectos que contribuyen a la señal en cada caso tienen diferentes abordajes teóricos y aproximaciones, como se presentará en las próximas secciones.

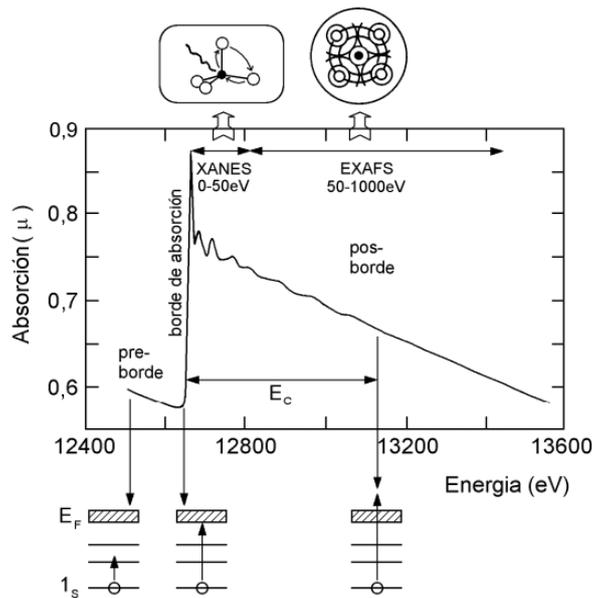


Figura 2.7. Espectro representativo de un experimento XAS donde se visualizan las regiones XANES y EXAFS del espectro, como también las transiciones que representan cada región y sus dispersiones entre los átomos absorbentes.

Así, XAFS permite la construcción de técnicas, XANES y EXAFS, que miden las transiciones electrónicas entre estados iniciales ligados al átomo y estados finales ligados o en el continuo respectivamente, y pueden usarse para probar la naturaleza de los niveles energéticos cerca de la superficie de Fermi o, usando la terminología de orbitales moleculares, transiciones entre el orbital ocupado más alto (HOMO) al orbital desocupado más bajo (LUMO). Este aspecto hace que XAFS sea sensible al estado de oxidación del elemento absorbente, fundamentalmente en la región XANES.

Luego de la absorción, el átomo se encuentra en un estado excitado, con uno de sus estados ligados vacío y un fotoelectrón en un estado final ligado más exterior al átomo (en la región XANES) o en el continuo (región EXAFS). Luego de algunos femtosegundos, el átomo se desexcita y lo hace principalmente a través de tres mecanismos: fluorescencia, emisión Auger o emisión de un fonón. Por fluorescencia, un fotón es emitido cuando un electrón de un estado superior decae y llena la vacante dejada por el fotoelectrón eyectado. Esta radiación de desexcitación es característica de cada átomo debido que los estados iniciales y finales están bien definidos para cada elemento y transición. El proceso de desexcitación mediante efecto Auger consiste en el llenado del hueco por un

electrón de un estado superior y la emisión de un segundo electrón de alguna de las últimas capas de valencia. Ambos procesos pueden ser utilizados para medir el coeficiente de absorción μ . El proceso de fluorescencia es más probable para energías superiores a los 2 keV, y el efecto Auger predomina a bajas energías en la región X. Por último, el átomo puede volver a su estado fundamental liberando energía a la red en forma de vibraciones. Los rayos X utilizados generalmente para experimentos XAFS tienen energías desde cientos de eV hasta cientos de keV, variando desde los rayos X "blandos" (algunos keV de energía) hasta los "duros" (superiores a los 4 o 5 keV).

En el marco de la espectroscopia de rayos X, la notación de los niveles

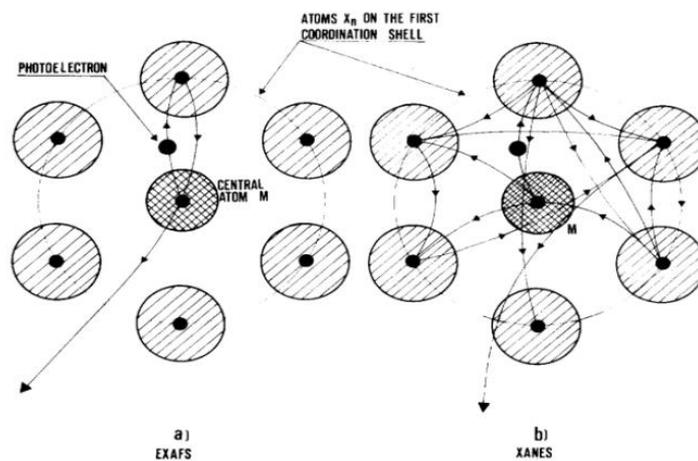


Figura 2.8. Interacción del fotón incidente con los átomos del entorno al absorbente en el que se registran interferencias entre las ondas salientes y las dispersadas para las regiones XANES y EXAFS.

electrónicos es la siguiente:

Notación espectroscópica	Notación moderna
K	1s
L _I	2s
L _{II}	2p _{1/2}
L _{III}	2p _{3/2}
M _I	3s
...	...

2.4.1 Consideraciones teóricas

Es posible conocer la probabilidad de transición entre un nivel electrónico profundo y un estado final, proceso inducido por una perturbación débil dependiente del tiempo, como lo es una onda electromagnética. Utilizando teoría de perturbaciones dependientes del tiempo a primer orden la probabilidad de transición está dada por la regla de oro de Fermi, por lo que el coeficiente de absorción está dado por:

$$\mu \propto \frac{2\pi}{h} |\langle f | \hat{H}' | i \rangle|^2 \rho(E) \quad \text{Ecuación 2.6}$$

donde $|i\rangle$ y $|f\rangle$ son los estados iniciales y finales del electrón con energías E^i y E^f respectivamente, ρ es la densidad de estados y \hat{H}' es el hamiltoniano de interacción entre el campo electromagnético y los electrones.

Para perturbaciones generadas por ondas electromagnéticas, a primer orden en el campo, \hat{H}' es proporcional a $\vec{A} \cdot \vec{p}$, donde \vec{A} es el potencial vector de la onda, y \vec{p} es el momento del electrón. El potencial vector de una onda electromagnética puede escribirse como $\vec{A} \propto \epsilon A e^{i\vec{k}\vec{r}}$ con ϵ el vector de polarización del campo eléctrico, A la amplitud y \vec{k} el número de onda. Usando las reglas de conmutación entre \hat{H}' , \vec{A} , y \vec{p} , el coeficiente de absorción puede escribirse como:

$$\mu \propto \left| \langle f | \vec{\epsilon} \cdot \vec{r} e^{i\vec{k}\vec{r}} | i \rangle \right|^2 \delta(E_f - E_i - \hbar\omega) \quad \text{Ecuación 2.7}$$

donde aquí se usa la aproximación de un solo electrón y la densidad de estados $\rho(E)$ es reemplazada por una delta de Dirac para transiciones posibles sólo si la energía $\hbar\omega$ del fotón X es igual a la diferencia de energías entre los estados atómicos. El elemento de matriz de la ecuación 2.7 puede desarrollarse como:

$$\langle f | \vec{\epsilon} \cdot \vec{r} e^{i\vec{k}\vec{r}} | i \rangle \approx \langle f | \vec{\epsilon} \cdot \vec{r} | i \rangle + i \langle f | (\vec{\epsilon} \cdot \vec{r})(\vec{k} \cdot \vec{r}) | i \rangle + \dots \quad \text{Ecuación 2.8}$$

El primer término de la derecha corresponde al término dipolar y el segundo al cuadrupolar. Bajo la aproximación de átomo hidrogenoide, puede verse que la relación entre el término cuadrupolar y el dipolar es de orden $\frac{Z}{2\alpha}$, con Z el número atómico y α la constante de estructura fina. El término

cuadrupolar es del 10% del término dipolar, y representa un 1% respecto de la probabilidad de transición del término dipolar para el borde K. Por lo tanto, excepto en átomos pesados, los términos superiores al cuadrupolar pueden ser despreciados. Tomando la aproximación dipolar en la ecuación 2.8:

$$\mu \propto |\langle f | \vec{\epsilon} \cdot \vec{r} | i \rangle|^2 \delta(E_f - E_i - \hbar\omega) \quad \text{Ecuación 2.9}$$

El electrón es removido de un estado profundo ligado del átomo central por el fotón X. En consecuencia, el estado inicial se puede aproximar por los estados atómicos descritos por los números cuánticos angulares l y m . Por otro lado, la dependencia espacial de la función de onda del estado final contiene información del entorno al átomo absorbente.

La función de onda del estado final puede expresarse como combinación lineal de funciones con l y m específicos, como armónicos esféricos centrados en el átomo absorbente, que son autofunciones de los operadores \hat{L}^2 y \hat{L}_z . La ortogonalidad de los armónicos esféricos hace que sólo los estados finales con cierta simetría sean proyectados por los elementos de matriz del coeficiente de transición. Dicho de otra manera, en la aproximación dipolar solo las transiciones $\Delta l = \pm 1$ son posibles, y en la cuadrupolar $\Delta l = \pm 2, 0$.

Si se tiene en cuenta el spin del electrón y la interacción spin-órbita, los niveles electrónicos están caracterizados por $\hat{J} = \hat{L} + \hat{S}$ y \hat{J}_z , manteniendo las reglas de selección para los números cuánticos de estos operadores $\Delta J = \pm 1$ y $\Delta m_j = \pm 1$.

2.4.2 Región XANES (X-Ray absorption near edge structure)

Consideraciones Generales

La espectroscopía de absorción de rayos X en la región cercana al borde de absorción, XANES, está asociada con el proceso de excitación de un electrón de niveles profundos ligados a estados desocupados ligados o cuasi-ligados. Los estados ligados desocupados están ubicados por debajo de la energía de

ionización (o energía umbral de absorción) E_0 , y los estados cuasi-ligados están ubicados en el continuo por encima del umbral E_0 en una zona cercana (no mayor a los 100 eV). Por ello XANES es pensada como una espectroscopía complementaria a la espectroscopía de fotoemisión XPS, o dicho de otra manera: los estados ionizados XANES pueden ser considerados en ciertas circunstancias como estados ionizados XPS con un electrón adicional ocupando uno de los niveles de orbitales moleculares desocupados.¹⁰⁷

No existe una teoría única capaz de explicar y predecir todos los efectos presentes en la región XANES. Para cada situación es necesario usar, y en algunos casos implementar *ad-hoc*, una metodología particular y apropiada de análisis.

Para el análisis de los resultados espectroscópicos de estados electrónicos ligados, es necesario describir el estado inicial $|i\rangle$, el estado final $|f\rangle$, y la sección eficaz de absorción en función del hamiltoniano de interacción de la radiación con la materia \hat{H}' . Esto involucra proponer modelos que consideren diversos efectos propios de los procesos involucrados para indagar sobre la estructura atómica.¹⁰⁸ En todo proceso de ionización hay producción de huecos, y esto tiene al menos tres efectos relevantes que deben ser considerados en los modelos propuestos: a) el átomo tiene un electrón menos en sus niveles profundos; b) los estados ligados profundos con momento angular no nulo dan lugar a desdoblamientos propios en el acoplamiento espín-órbita; c) los estados ligados profundos con momento angular no nulo dan lugar a fuertes interacciones coulombianas de valencia.¹⁰⁸

Por otro lado, en la región XANES la energía cinética de los fotoelectrones es pequeña y los átomos vecinos ejercen fuertes efectos dispersivos sobre aquellos. Esto tiene como consecuencia que, para esas energías, la teoría semiclásica de la dispersión contiene factores que son divergentes por lo que dificulta el tratamiento matemático desde este abordaje teórico.¹⁰⁹

En la actualidad coexisten diversos enfoques teóricos para describir la región XANES mediante programas de cálculo computacional. A partir de dichas propuestas es posible a veces describir información relevante del sistema bajo estudio, como las características estructurales y geométricas (simetrías de entornos al átomo absorbente), electrónica (densidad de estados desocupados, transferencia de carga, valencia, estados de oxidación, etc.), tipos de ligandos,

efectos de campo ligando, contribución de orbitales moleculares, interacciones de espín.

Más allá de la imposibilidad de contar con una teoría capaz de sintetizar en ella todos los fenómenos presentes en esta región del espectro de absorción, existe la posibilidad de interpretaciones de índole empírica obtenida por la acumulación de datos experimentales, de los que pueden extraerse determinadas regularidades que se corresponden con algunos aspectos de la naturaleza del sistema estudiado, por lo que es posible utilizar los espectros XANES como huella dactilar de un sistema obteniendo información identitaria.

Interpretación de la región XANES

Región Pre-picos

La región de prepicos está caracterizada por las transiciones que ocurren entre estados ligados de niveles profundos y estados ligados desocupados localizados inmediatamente por debajo del nivel de vacío (a pocos eV de la energía umbral de ionización, E_0). Este tipo de transiciones dependen, en primer orden, del estado de oxidación y de la geometría local, como también de la distribución del espín.¹¹⁰

Los prepicos están asociados con distorsiones geométricas de los entornos (rompimiento de centrosimetrías) lo que transforma en permitidas las transiciones dipolares que en otro caso son prohibidas. A la vez, en la teoría de los orbitales moleculares esto puede ser interpretado como una mezcla de orbitales desocupados accesibles.¹¹¹

Por lo anterior, es necesario el estudio de compuestos de referencias bien conocidos estructural y electrónicamente mediante otras técnicas, con el objetivo de conocer las características de los prepicos, correlacionando la intensidad y la energía de cada uno de ellos con geometría y el estado de oxidación del elemento absorbente.

Es importante resaltar que no todos los elementos presentan estas regiones como características en la región del espectro, pero que en muchos casos son particularmente evidentes, sobre todo en óxidos de metales de transición 3d.

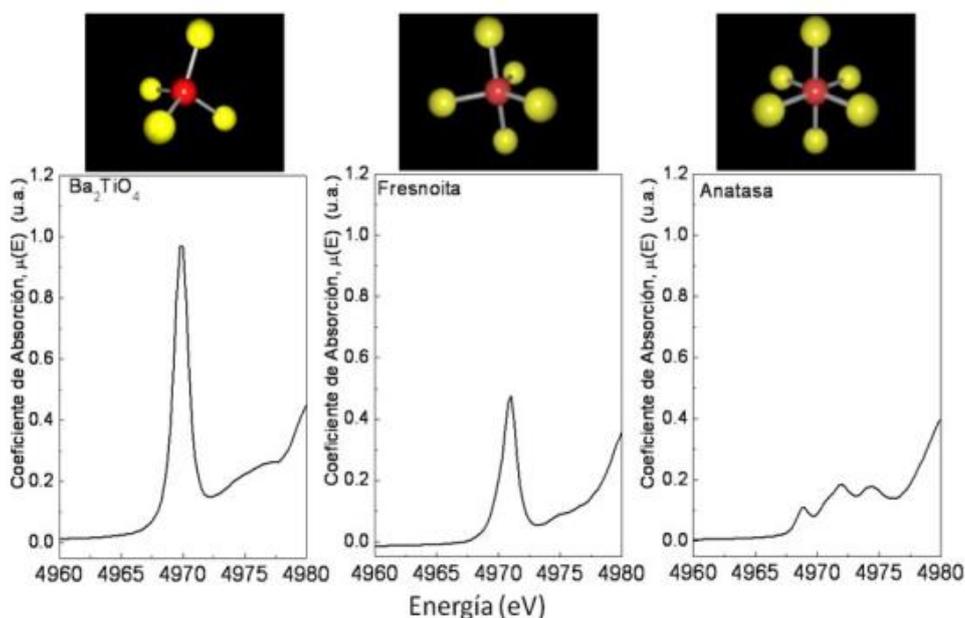


Figura 2.9. Espectros XANES para las regiones de pre-picos del borde K-Ti en Ba_2TiO_4 , Fresnoita y Anatasa.

Posición del Borde de Absorción

Se ha demostrado para toda serie de compuestos químicamente similares, (por ejemplo, óxidos de un mismo metal), que para las transiciones electrónicas de estados ligados existe una relación lineal entre la posición en energía del borde de absorción E_0 y el estado de oxidación estequiométricamente formal.¹¹² Es decir, la comprobación de esta regla general permite conocer el estado de oxidación promedio de un determinado elemento en un sistema dado mediante la determinación de la energía del borde de absorción. Para ello se necesita un conjunto de referencias del mismo tipo de compuestos con estado de oxidación conocida para el elemento en cuestión. Esto permite realizar una calibración que relaciona la energía del borde de absorción con el estado de oxidación promedio. De esta forma se tiene una expresión lineal que relaciona la energía del borde de un dado elemento químico con su estado de oxidación promedio en la muestra, el que puede ser obtenido inmediatamente luego de medir la posición del borde de absorción.

El hecho de que existan corrimientos del borde de absorción para diferentes estados de oxidación está relacionado con las interacciones entre la

densidad electrónica de los estados finales y la densidad electrónica con huecos en los estados ligados más profundos.¹¹²

Picos de Resonancia: Posición e intensidad

En procesos de fotoabsorción y fotoemisión, en general, es típica la presencia de picos de absorción por encima de la energía E_0 del borde de absorción. Estos picos se denominan picos de resonancia (o de resonancia en el continuo). Para describir estos procesos existen dos modelos: a) un electrón eyectado es atrapado por una barrera de potencial, de la cual puede emerger hacia el continuo por efecto túnel, y b) los picos se deben a la presencia de orbitales moleculares desocupados embebidos en el continuo.¹¹³ Debe remarcarse que ambos enfoques son complementarios, y dan una descripción adecuada del fenómeno observado.

La identificación de tales picos está afectada por la resolución, y no siempre puede realizarse una asignación sencilla. Por otro lado, existe una interpretación que permite relacionar la energía de los picos de resonancia con las longitudes r entre los vecinos dispersores o del enlace molecular.¹¹⁴ La validez de esta regla, conocida como regla de Natoli, ha sido ampliamente discutida en la literatura^{110,113} y se sabe que puede ser aplicada en un gran número de ejemplos, en particular cuando los enlaces involucrados son predominantemente iónicos. Cuando el electrón está cuasi-ligado, tiene una energía cinética nula, por lo que esto constituye una dificultad para considerar efectos de dispersión múltiple. Esto se resuelve considerando la energía correspondiente al primer máximo de resonancia E_{r_0} en la región de dispersión múltiple (para energías mayores a E_0). Luego se tiene que la regla de Natoli puede expresarse como se indica en la ecuación 2.10, donde E_{r_i} se corresponde con la posición de energía del i -ésimo máximo de resonancia.

$$(E_{r_i} - E_{r_0})r^2 = \text{constante} \qquad \text{Ecuación 2.10}$$

Mediante dicha regla semiempírica puede obtenerse información de la distancia de los átomos dispersores a sus primeros entornos, y, complementada

con la teoría de orbitales moleculares, permite una asignación a la naturaleza de los entornos dispersores.

A su vez, la intensidad de los picos de resonancia representa la densidad de estados desocupados accesibles para los electrones eyectados en el proceso de fotoabsorción, lo que puede ser correlacionado con la densidad de huecos generados en los niveles profundos ligados.¹¹⁰ Esto, por ejemplo, permite estudiar los efectos de transferencia de carga o los efectos de dislocación que producen el solapamiento de orbitales.

2.4.3 Región EXAFS (Extended X-Ray absorption fine structure)

En la figura 2.10 se observa, de manera esquemática, la interferencia entre una onda de fotoelectrón saliente producida luego de la absorción de la radiación y la onda de retrodispersión originada por la presencia de átomos vecinos. La absorción de la radiación en la región extendida es modulada por la interferencia provocada por la presencia de átomos en un entorno del átomo absorbente, lo que produce una señal oscilante (oscilación EXAFS) la que está intrínsecamente ligada con la distancia y el número de primeros vecinos.

A diferencia de XANES, en la región EXAFS se cuenta con una teoría única que describe el fenómeno en general, lo que permite realizar un tratamiento analítico formal de las oscilaciones y extraer información contenida en esta región.¹¹⁵⁻¹¹⁷ En esta teoría se consideran solamente los procesos de dispersión simple, fundamentando que el camino libre medio del fotoelectrón es típicamente menos a 10 Å, por lo que las dispersiones múltiples tienen baja probabilidad en la mayoría de los casos. A pesar de esta aproximación, en la actualidad otros enfoques han evidenciado que los caminos de dispersión múltiple también deben ser considerados necesariamente.¹¹⁸

Las oscilaciones EXAFS $\chi(E)$ son definidas fenomenológicamente a través del coeficiente de absorción total $\mu(E)$, el coeficiente de absorción para el átomo aislado, $\mu_0(E)$, y un coeficiente de normalización $\Delta\mu_0$ que se deriva del incremento neto en el fondo total de absorción. De esta manera:

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

Ecuación
2.11

Se usa el hecho de que la energía E es función del módulo k del vector de onda del electrón fotoeyectado, por lo que, tanto μ como χ son funciones de k , entonces es posible utilizar el formalismo de transformadas de Fourier para obtener información contenida en tal región.

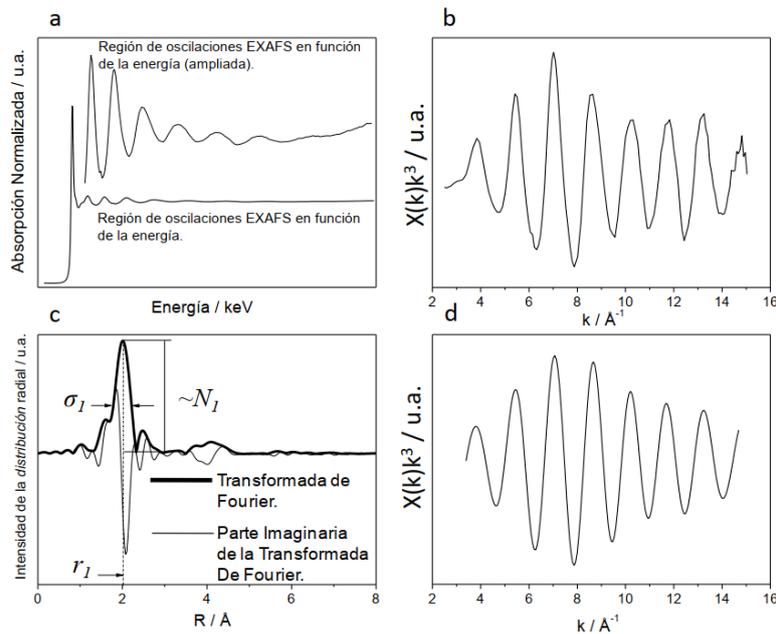


Figura 2.10. a) Espectro de absorción normalizado, en el que se ha ampliado la región EXAFS, b) oscilación EXAFS $\chi(k)$ obtenida a partir del espectro de absorción, c) transformada de Fourier de $\chi(k)$, de la que se obtiene información de la naturaleza de los entornos vecinos al átomo absorbente (número y distancia de primeros vecinos, y desorden térmico estructural) d) transformada inversa de TF (TTF) para la región del primer entorno de vecinos, es decir la oscilación $\chi(k)$ asociada solamente al primer entorno de átomos vecinos al átomo absorbente.

Bajo ciertas suposiciones, es posible obtener una expresión analítica de $\chi(k)$ que luego a partir de aplicar la transformada de Fourier de la señal EXAFS se puede pasar al espacio recíproco de k , que es r ; obteniéndose la distribución radial de las contribuciones atómicas a partir del módulo y la parte imaginaria de $\tilde{\chi}(r)$.

La figura 2.10 ilustra el proceso de extracción de la oscilación EXAFS para una dada esfera de coordinación a partir de un espectro de absorción. Se

presenta un espectro de absorción del Ir en el borde K (figura 2.10.a), y su oscilación EXAFS en el “inset”. En el recuadro b de la misma figura se muestra $\chi(k) \cdot k^3$, es decir la señal EXAFS en función de k multiplicada por un factor para intensificar la señal en función de k ; en el bloque c de la figura se puede ver la transformada de Fourier de $\chi(k) \cdot k^3$ y su parte imaginaria, en tanto se observa la transformada inversa en d para el primer entorno de vecinos.

Existen diversos programas en la actualidad¹¹⁹ que permiten obtener la señal EXAFS, transformada de Fourier, y el correspondiente ajuste para obtener los parámetros estructurales y atómicos, a partir de los datos obtenidos experimentalmente. En particular para este trabajo de tesis, todos los análisis de datos fueron realizados con el software Demeter (software abierto)¹¹⁹.

2.4.4 Descripción de instrumentación experimental

Los equipos de absorción de Rayos X cuentan con una fuente de radiación. En el caso de este trabajo fue utilizada la luz sincrotrón para este propósito. Los laboratorios de luz sincrotrón precisan de componentes sofisticados (óptica de rayos X, sistemas de vacío, controladores, espejos, monocromadores, etc) lo que posibilitan que la radiación sea utilizada en los rangos específicos de energía de fotones con la más alta resolución: desde la radiación ultravioleta hasta los rayos X duros. Entre estos componentes se incluyen dispositivos para enfocar, filtrar y reflejar la radiación X. Los gases absorben fuertemente la radiación UV y los rayos X blandos, por lo que para haces de fotones con energías menores a 4 keV es necesario hacer viajar la radiación en secciones de alto vacío. En cambio, para energías de rayos X duros (energías típicamente mayores a 4 keV) estos caminos de vacío no resultan indispensables y el arreglo experimental resulta menos sofisticado.

A continuación, se detallan algunos de los componentes de un laboratorio de absorción de rayos X:

Instrumentación de vacío: en casos que se necesite trabajar con energías menores a 4 keV, se requieren condiciones extremas que garanticen tanto el mantenimiento de flujo de fotones como las condiciones para las medidas, por lo

que los experimentos se realizan en condiciones de ultra alto vacío (UHV) con una presión de al menos 10^{-7} mbar.

Espejos: tienen funciones variadas como la focalización, división de la radiación, control de la polarización, filtración, etc. Los espejos utilizados pueden ser planos o curvos, de acuerdo a la función para que se lo requiera. Se debe minimizar y optimizar el empleo de estos componentes, dado que en cada reflexión existe pérdida de energía. Típicamente están hechos de metales nobles como Au o Pd.

Monocromadores: Tienen la función de seleccionar un rango específico de longitudes de onda que componen el haz la luz de sincrotrón para que el haz incidente tenga la energía requerida para el experimento. Dado que la luz de sincrotrón emitida tiene un amplio espectro de energías resulta necesario contar con estos arreglos instrumentales, junto con las rendijas, para filtrar la radiación.

Los monocromadores son diferentes de acuerdo a la región de energía en la que se desee trabajar, por ejemplo, en la región VUV se utilizan monocromadores del tipo *grating*, o de rendijas, en tanto que para rayos X duros se utilizan cristales.

Los monocromadores de *grating* consisten en una red de difracción con una superficie reflectante en la que hay una serie periódica de líneas. Los parámetros característicos de este tipo de monocromadores son el período espacial de líneas, el número total de líneas, el perfil de líneas y la forma geométrica de la superficie reflectante.

En los monocromadores de cristal se utiliza la ley de difracción de Bragg que describe la difracción de la radiación electromagnética por un cristal. Incluso para un mismo cristal se tienen diferentes planos de difracción, con diferente orientación y separación interplanar que pueden ser elegidas de acuerdo con las diferentes longitudes de onda de los fotones incidentes. La ley de Bragg establece una relación entre la longitud de onda λ , la distancia interplanar d , y el ángulo de difracción Θ , lo que posibilita la separación de fotones de diferentes energías, según el plano y el ángulo que forma la superficie del monocristal con el haz dispersado.

Rendijas: su función es la de la colimación del haz de fotones incidentes, tanto en la dirección vertical como en la horizontal. Esto permite eliminar, además, las reflexiones espurias, o seleccionar la energía de fotones cuando estos fueran extendidos en ángulo debido a su propia energía. En muchos casos se usa un doble juego de rendijas, colocándose uno de ellos previo al monocromador, y otro posterior al mismo.

Detectores y analizadores: estos componentes son la última parte de toda la línea experimental, en la que se registran los efectos de la interacción entre la radiación y la muestra a medir, ya sea analizando la emisión de electrones, fotones secundarios, iones, etc. Estos deben ser detectados y analizados, desde unos pocos eV hasta las decenas de keV.

Configuración experimental de absorción de Rayos X duros

En la figura 2.11 se muestra esquemáticamente una línea de absorción de rayos X duros.¹²⁰ La radiación, producida en el anillo de almacenamiento, luego de pasar por un espejo de enfoque, es colimada por un par de rendijas antes de incidir en el monocromador. A la salida de este, el haz vuelve a atravesar un par de rendijas, las que en general tienen la función de eliminar la radiación espuria, los armónicos de orden superior y focalizar puntualmente el haz. La intensidad de fotones inicial I_0 , que incide sobre la muestra es medida en una cámara de ionización. Al incidir sobre la muestra, se producen los procesos descritos en la sección anterior (ver figura 2.5).

Existen diferentes arreglos o modos experimentales para registrar en espectro XAS: transmisión, fluorescencia y electrones. En el caso del modo transmisión, se mide la corriente de fotones I_1 que atravesó la muestra en la segunda cámara de ionización. El coeficiente de absorción μ se puede obtener a partir de la ecuación 2.3. En el caso de la detección por fluorescencia, el coeficiente de absorción se obtiene realizando el cociente entre la señal de fluorescencia I_f o I_e y la señal I_0 , respectivamente. Entre la segunda y tercer cámara de ionización se colocan las referencias de compuestos conocidos, cuyos espectros de absorción sirven para realizar la calibración de energía. Para

el caso de la detección en el modo de electrones se registra la corriente generada por la reposición de huecos electrónicos, para lo que la muestra debe estar “conectada” al portamuestras y medir la corriente producida durante el experimento, o bien utilizar un detector de electrones para medir la intensidad de fotoelectrones emitidos en función de la radiación incidente. Para este modo se debe trabajar en vacío debido al limitado camino libre medio de los electrones.

Para el caso de la radiación X emitida desde el anillo, el haz de fotones viaja en vacío hasta abandonar las rendijas post-monocromador. En la región comprendida entre las cámaras, el haz viaja en aire, siempre que no se dispongan configuraciones experimentales que modifiquen esta disposición. La muestra puede estar tanto en aire como en un criostato, un horno o un arreglo experimental propio de la investigación que se esté realizando.

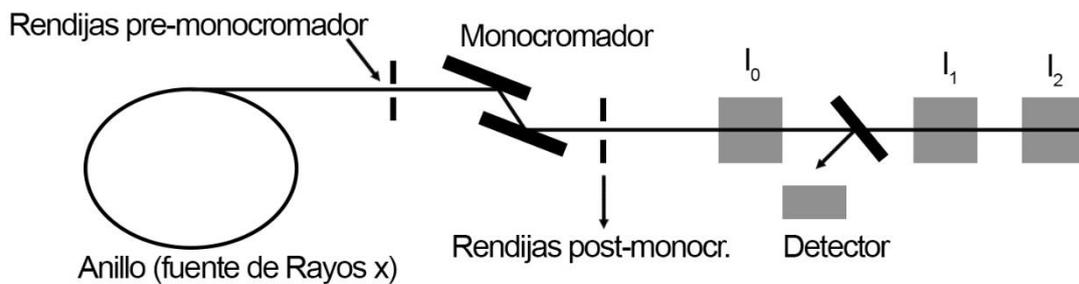


Figura 2.11. Esquema convencional de una línea de absorción de rayos X duros. El haz de fotones, al salir de la fuente de luz sincrotrón, es colimado por rendijas, sintonizando la energía por un monocromador de doble cristal, y vuelto a colimar por una rendija que elimina factores espurios en el haz, definiendo de esta manera el tamaño del haz incidente sobre la muestra. Posteriormente incide sobre la muestra con una intensidad I_0 . En las cámaras de ionización se registran las intensidades del haz antes de incidir sobre la muestra (I_0), luego de atravesarla (I_1), y al atravesar la referencia (I_2). El detector puede ser un detector de fluorescencia o de electrones.

Configuración experimental de absorción en la región de rayos X blandos

En la figura 2.12 se muestra esquemáticamente una línea de absorción de rayos X blandos.¹²¹ Un conjunto de rendijas y filtros coliman el haz de fotones, en las direcciones horizontal y vertical, que emerge del anillo de almacenamiento antes de que el mismo llegue a un espejo de enfoque (toroidal de Au). El haz de fotones vuelve a pasar por un conjunto de rendijas y filtros, lo que permiten ajustar su tamaño horizontal y vertical, y controlar las reflexiones espurias producidas en el espejo. El haz, luego incide sobre un monocromador de doble cristal para sintonizar el rango de energía de trabajo en una posición fija independiente de la energía.

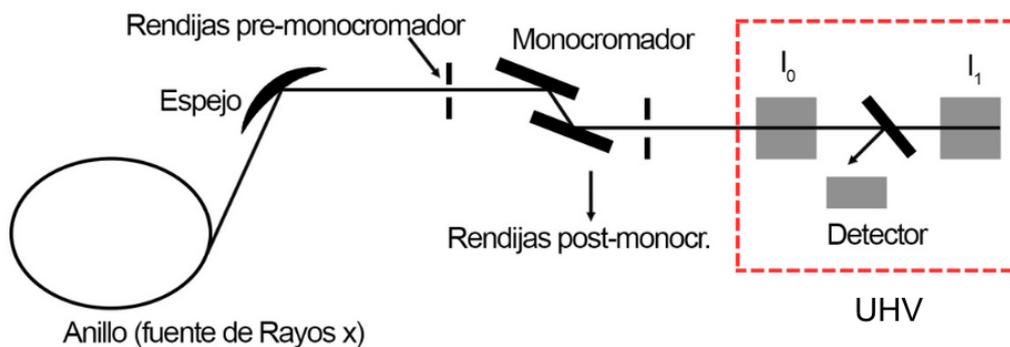


Figura 2.12. Esquema convencional de una línea de absorción en la región de rayos X blandos. El haz de fotones realiza toda su trayectoria en vacío. La muestra se encuentra en una cámara con una presión menor a 10^{-6} mbar.

Como para el caso del modo de detección por electrones para rayos X duros, la intensidad del haz de fotones I_0 se mide a través de la intensidad de la corriente de reposición de electrones en delgadas láminas (Al, C, Au, etc) interpuestas en la trayectoria del haz. Los fotones no absorbidos por la lámina inciden sobre la muestra, y ocurren los procesos inherentes a la absorción de rayos X. Según sea el experimento que se desee realizar, será la modalidad de detección utilizada. Se deben utilizar así detectores de fotones (para el caso de fluorescencia) o de electrones (para medir tanto en modos de corriente total, o

electrones Auger). Uno de los más utilizados por su simpleza es el de la reposición total de electrones TEY (de su sigla en inglés *total electron yield*). Este método de detección se realiza midiendo simplemente la corriente total de reposición de electrones I_1 , que es proporcional a la pérdida de electrones que sufre la muestra al incidir sobre ella la radiación X, y puede ser detectada en el portamuestras cuando la muestra y el portamuestras se encuentran conectados eléctricamente, aislados del resto del montaje experimental. La señal de absorción se obtiene realizando el cociente entre la corriente de reposición I_1 y la corriente incidente I_0 .

A diferencia de lo que sucede utilizando rayos X duros, aquí toda la línea de luz debe encontrarse en UHV. Las muestras están colocadas en cámaras, en las que se debe trabajar típicamente a una presión menor a los 10^{-7} torr. Tanto el espejo como el monocromador están a presiones por debajo de los 10^{-9} torr, lo que hace que se deba trabajar con diferentes tipos de precauciones, como el desgasado repentino de las muestras que podría aumentar drásticamente la presión y dañar válvulas y sensores.

2.5 Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de Rayos X, (XPS - *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) es una espectroscopía cuali y cuantitativa de gran resolución en energías, que habitualmente se utiliza para estudiar el estado químico y la estructura electrónica de los elementos de la superficie (primeras capas atómicas) de un material.¹²²

Cuando se irradia una muestra con un haz de rayos X, los electrones de la muestra se excitan y, si la energía del haz es mayor que la de ligadura del electrón del átomo, se emiten como fotoelectrones debido al efecto fotoeléctrico. La energía cinética (KE, *kinetic energy*) para uno de estos electrones es igual a la diferencia entre la energía del fotón incidente, que es conocida, y la energía de ligadura del electrón al átomo (BE, *binding energy*). Para los gases, la energía de enlace de un electrón es igual a la energía de ionización. En los sólidos, en cambio, existe una influencia por parte de la superficie, y una energía adicional es necesaria para remover un electrón de esta. Esta energía se denomina función de trabajo ϕ . La función de trabajo es la energía mínima requerida para

impulsar un electrón hacia el nivel desocupado más alto en el vacío. Para la determinación de la BE entonces, se utiliza la relación:

$$BE = h\nu - KE - \phi \quad \text{Ecuación 2.12}$$

Como la magnitud de la energía de ligadura de los electrones es característica de la capa electrónica y del elemento a que pertenecen, los espectros XPS permiten identificar los elementos presentes del sólido, concretamente en su superficie. XPS es una técnica de análisis exclusivamente superficial, ya que, aunque los fotones de rayos X penetran en el sólido varios μm , sólo aquellos electrones provenientes de átomos más cercanos a la superficie del sólido logran escapar del mismo sin sufrir procesos de dispersiones inelásticas.

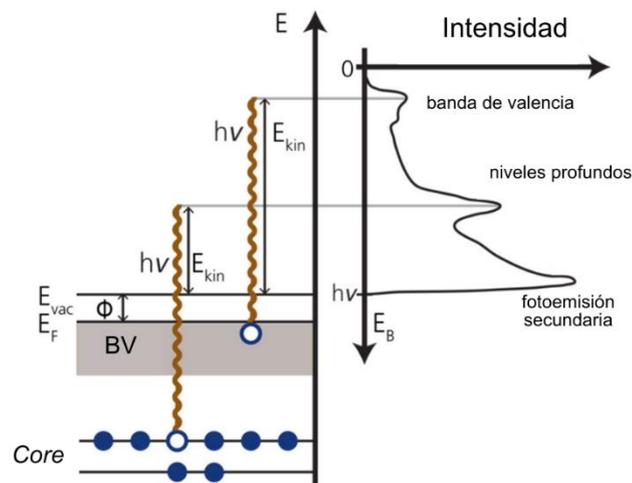


Figura 2.13. Diagrama representativo de transiciones en experimentos XPS y construcción del espectro obtenido.

Un esquema del arreglo experimental se muestra en la 2.14. Los componentes primarios de un instrumento XPS son el sistema de vacío, la fuente de rayos X, el analizador de energías (detector de electrones), y un sistema de almacenamiento de datos. La parte central del equipo lo constituye la cámara principal de vacío en la que la muestra es analizada. Las fuentes de rayos X más utilizadas para equipos con fuentes de tubos de rayos X son las que emplean ánodos de Al o Mg. La radiación X es monocromatizada antes de llegar a la muestra mediante el uso de un cristal de cuarzo. Esto permite aprovechar el rango de energía en la que la intensidad de la radiación X es máxima (normalmente un ancho de 1-2 eV), evitar los picos de fluorescencia de rayos X, e impedir que electrones de alta energía provoquen calentamiento a la muestra y alteren su naturaleza. El área de la muestra que puede ser irradiada por los rayos X varía entre zonas circulares de unos pocos milímetros de diámetro hasta unos $50 \mu m$. Esta focalización depende de la geometría de la fuente y del tipo de cañón de electrones utilizado para estimular la emisión de rayos X. La utilización de un monocromador disminuye la intensidad de rayos X que alcanzan a la muestra. Esta disminución en el flujo es compensada en el sistema analizador, constituido por lentes eficaces de captación de electrones, un analizador de energía y un sistema detector multicanal.

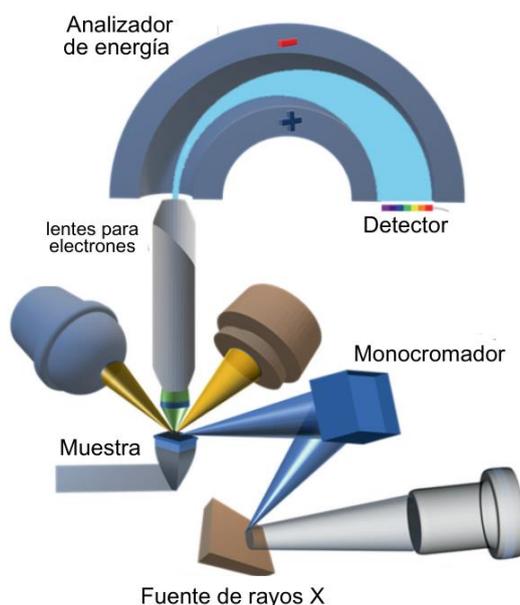


Figura 2.14. Diagrama del arreglo experimental para la espectroscopía fotoelectrónica de rayos X en la que se distinguen los componentes centrales de la instrumentación.

2.6 Espectroscopia de Resonancias de Plasmones Superficiales (SPR)

La espectroscopía de resonancias de plasmones superficiales es una técnica robusta que permite monitorear y estudiar fenómenos superficiales en interacciones químicas o moleculares en interfases metal/aire, metal/líquido y metal/sólido, a partir de cambios en el índice de refracción de una señal óptica incidente.¹²³ Para lograr el fenómeno SPR se requiere de un material que presente un comportamiento de electrones libres, como ocurre con los electrones de banda de conducción en los metales.¹²⁴

Los plasmones son ondas cuantizadas del movimiento colectivo de electrones resultantes de la interacción con fotones de una fuente de luz polarizada p. La propagación de polaritones superficiales de plasma, PSP, o plasmón superficial, produce regiones positivas y negativas alternas que, en contacto con un medio de índice de refracción más bajo, dan como resultado un campo evanescente confinado, que decae exponencialmente en la dirección perpendicular a ambos lados de la interfase (figura 2.15).¹²⁵ Los pequeños cambios en el índice de refracción dentro del campo evanescente alteran en gran medida las propiedades de propagación de los PSP, por lo que este fenómeno es el utilizado con fines analíticos en esta técnica. A través de SPR es posible medir en tiempo real las interacciones entre moléculas de interés y la superficie funcionalizada debido a los cambios del índice de refracción. De esta manera, SPR se vuelve adecuada para analizar los procesos dinámicos que permitan un mayor entendimiento de las interacciones en medios líquidos.

La configuración más utilizada para la espectroscopía SPR es la configuración Kretschmann, que se basa en la reflexión total interna. En este caso, el vector de onda de la luz incidente en el plano de la superficie (campo evanescente) (K_{ev}) coincide con el vector de onda del plasmón superficial en la película metálica (K_{sp}), pudiéndose expresar la condición resonante de la siguiente manera:

$$K_{ev} = \frac{2\pi}{\lambda} \eta_p \text{sen}(\theta)$$

Ecuación 2.12

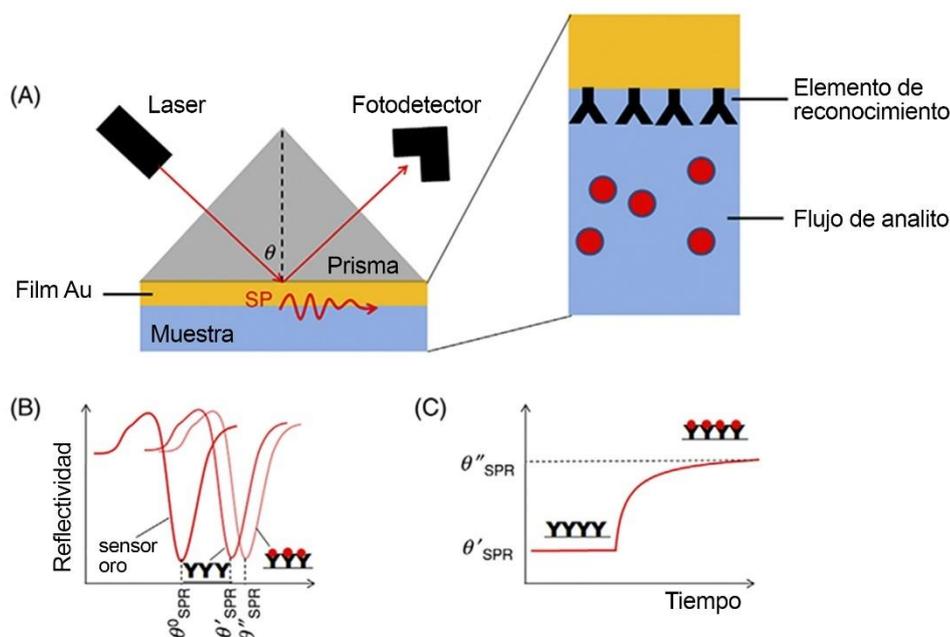


Figura 2.15. (A) Representación esquemática de medidas de SPR en la configuración Kretschmann. A un ángulo específico, la energía del láser es transferida a los plasmones superficiales causando un mínimo en la intensidad en el barrido angular. (B) La posición de la reflectividad mínima, θ^0_{SPR} cambia luego de la modificación de la superficie del sensor (θ'_{SPR}) y frente a interacciones específicas (θ''_{SPR}). (C) El sensograma (variación del ángulo SPR en función del tiempo) permite monitorear en tiempo real el θ^0_{SPR} durante un experimento de interacción entre la superficie y el analito. (Imagen adaptada de Miyasaki *et al* 2017).

donde λ es la longitud de onda de la luz incidente, η_p es el índice de refracción del medio denso (prisma) y θ es el ángulo de incidencia del haz de luz.

$$K_{sp} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_m \eta_s^2}{\epsilon_m + \eta_s^2}} \quad \text{Ecuación 2.13}$$

donde ϵ_m es la constante dieléctrica del film metálico, y η_s es el índice de refracción del medio dieléctrico. De esta manera, cuando K_{ev} y K_{sp} coinciden el plasmón superficial es excitado en resonancia, y esta energía asociada a la excitación genera una disminución en la intensidad del haz reflejado que es detectado por el fotodetector. Esto sucede a un ángulo específico del haz de luz, en el que $K_{ev} = K_{sp}$, por lo que:

$$K_{sp} = K_{ev} \quad \Delta\theta = \text{sen}^{-1} \sqrt{\frac{\epsilon_m \eta_s^2}{\epsilon_m + \eta_s^2}} \quad \text{Ecuación 2.14}$$

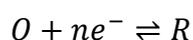
Como se indica en la ecuación 2.14, K_{sp} depende del índice de refracción del medio dieléctrico sobre el film metálico, por lo que si este índice inmediatamente sobre la superficie del metal cambia, por ejemplo debido a la adsorción de proteínas sobre la superficie, se observará un cambio en el ángulo de incidencia ($\Delta\theta$) necesario para cumplir la condición de resonancia de los plasmones superficiales.¹²⁵

En este trabajo de tesis se utilizó la espectroscopía de resonancias de plasmones superficiales para la evaluación y cuantificación de la interacción entre glucosa oxidasa con superficies de óxidos de grafenos. (Capítulo 4).

2.7 Técnicas Electroquímicas

2.7.1 Conceptos Generales

En los sistemas electroquímicos se estudian los procesos y factores que afectan el transporte de carga a través de la interfaz entre fases químicas, por ejemplo, entre un conductor electrónico (un *electrodo*) y un conductor iónico (un *electrolito*) en la superficie del electrodo. La carga es transportada a través del electrodo por el movimiento de electrones (y huecos) mientras que, en la fase del electrolito, la carga es llevada por el movimiento de los iones. Dos tipos de procesos ocurren en los electrodos, uno que comprende reacciones en donde las cargas, por ejemplo, electrones, son transferidas a través de la interfaz entre el electrodo y el seno de la solución (figura 2.16). La transferencia de electrones causa la oxidación o la reducción, de acuerdo a si ocurren procesos anódicos o catódicos, respectivamente. Una reacción electroquímica que sucede en un electrodo podría representarse de manera general como:



donde O y R son las especies oxidadas y reducidas, respectivamente; y n el número de electrones (e^-) que intervienen en la reacción.

Las reacciones electroquímicas están gobernadas por la ley de Faraday, en la cual se establece que la cantidad de sustancia producida por una reacción electroquímica sobre un electrodo es directamente proporcional a la cantidad de carga que fluye a través de la interfase electrodo-solución. Estos procesos se denominan faradaicos. Por otro lado, existen procesos como la redistribución de cargas eléctricas en la cercanía del electrodo, y/o cambios en la distribución de las moléculas cargadas o en la orientación de dipolos electrónicos que no se rigen por dicha Ley, aunque contribuyen al flujo de corriente. Por ello, se denominan no-faradaicos o capacitivos.

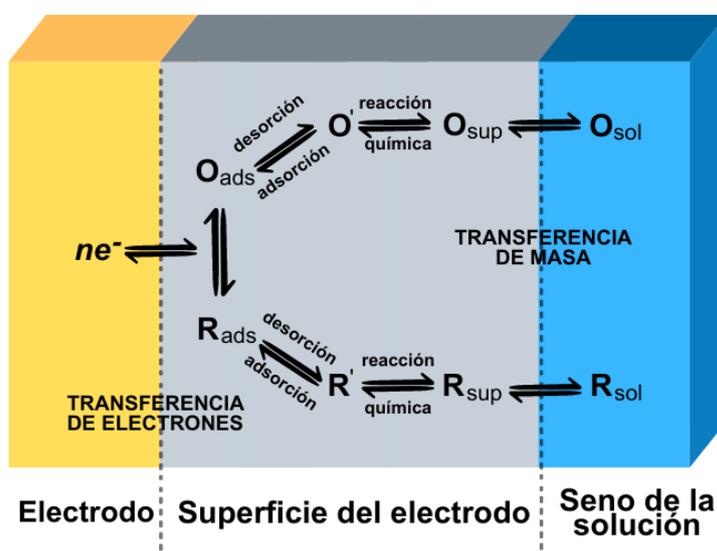


Figura 2.16. Esquema general fenómenos superficiales de un electrodo. Imagen adaptada de: Bard, 2011 Wiley.

Existen una serie de procesos que pueden influenciar la velocidad de las reacciones electroquímicas que suceden en la cercanía del electrodo. Estos de manera abreviada son: (i) la transferencia de masa entre el seno de la solución y la superficie del electrodo, y desde el electrodo al seno de la solución, (ii) la transferencia de electrones en la interfase o reacción de oxido-reducción, y (iii) procesos físicos en la superficie del electrodo, como adsorción o desorción. En la figura 2.16 se observa una representación esquemática de los procesos

involucrados en la transferencia de electrones sobre la interfase electrodo-solución.

Existen diversas técnicas que permiten obtener información acerca de los procesos que ocurren en la superficie del electrodo. De esta manera, el desarrollo de superficies de nuevos electrodos es un factor central en el desarrollo de nuevos enfoques de medidas utilizando técnicas electroquímicas. Para este fin, se utilizan celdas electroquímicas que pueden adquirir diversas configuraciones experimentales. En este trabajo de tesis se utilizaron celdas convencionales de tres electrodos, utilizando un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia, y un contraelectrodo. Gran parte de las técnicas electroquímicas son de implementación sencilla y con instrumental relativamente económico comparado con otras técnicas. Existen diversas obras que explican con profundo detalle las posibilidades y fundamentos de las técnicas electroquímicas, entre las que se destacan la de Bard y Faulkner¹²⁶ y particularmente para bioanálisis la de Patel.¹²⁷ A continuación, se describen las técnicas centrales utilizadas en los sucesivos capítulos.

2.7.2 Voltamperometría Cíclica (CV)

La voltamperometría cíclica, CV por sus siglas en inglés, permite estudiar las propiedades redox de compuestos químicos y del comportamiento electroquímico de una sustancia, incluyendo el mecanismo de reacciones redox, potenciales de oxido-reducción, cinética de reacciones de electrodo, y concentraciones de especies electroactivas presentes.

En la CV se aplica entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia una variación lineal de potencial con el tiempo mientras se mide la corriente que circula entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo. La rampa temporal de potenciales se varía entre un potencial inicial E_1 y un potencial final E_f y luego regresando nuevamente a E_1 ; donde el potencial en función del tiempo viene dado por la ecuación 2.15:

$$E = E_1 + vt$$

Ecuación 2.15

Donde v es la velocidad de variación del potencial con el tiempo (dE/dt). En la figura 2.17 se muestra representativamente la forma en la que se procede a variar el potencial en función del tiempo. La velocidad de barrido del potencial puede variar obteniéndose mayor o menor sensibilidad en la respuesta obtenida.

De esta manera, se obtienen valores de corriente en función del potencial aplicado, pudiendo graficar estos valores para generar curvas i vs. E , conocidas como voltamperogramas (figura 2.17), que brinda información acerca del electrodo de trabajo y sobre las reacciones que ocurren en la superficie del electrodo. El valor de corriente obtenido para cada potencial durante el barrido corresponde a la velocidad en el flujo de carga, o electrones, involucrados en los procesos del electrodo, ya sean faradaicos o no faradaicos.

La instrumentación para esta técnica es principalmente un potenciostato, que controla el potencial aplicado de acuerdo con el barrido de potencial y mide la corriente resultante como consecuencia. Este proceso lo realiza modificando la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo (ET) y el contraelectrodo (CE) y simultáneamente mide la corriente entre estos.

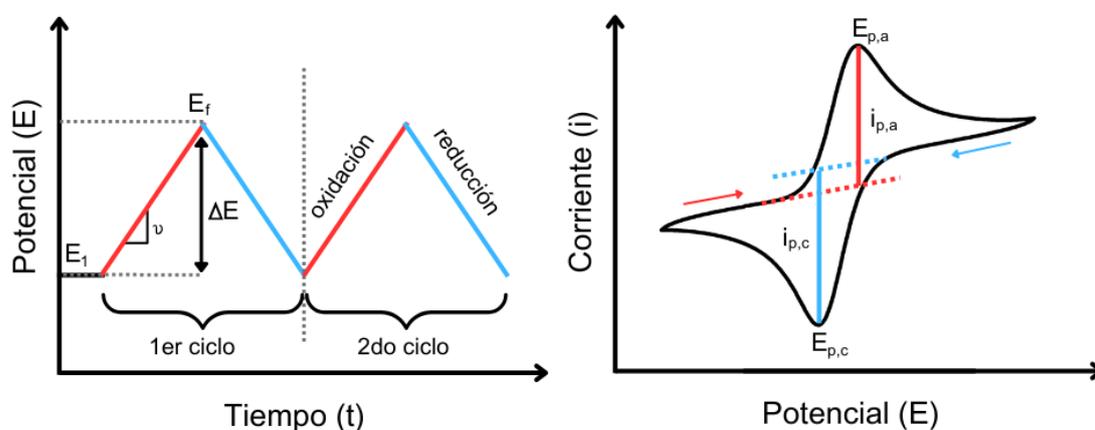


Figura 2.17. a) Barrido cíclico del potencial b) Voltamperograma cíclico resultante usando la convención IUPAC, corrientes anódicas positivas y catódicas negativas.

La figura 2.17 ilustra la respuesta esperada para una cupla redox reversible durante un ciclo de barrido entre E_1 y E_f , en el cual se producen reacciones anódicas y catódicas de acuerdo con los valores de potencial. Aquí se supone que sólo la forma oxidada de la cupla está presente inicialmente. De esta manera, se elige un potencial que barre hacia el sentido positivo para el primer medio ciclo, empezando desde un valor en el que no se produce la

reacción y en los que intervienen los procesos no-faradaicos. A medida que el potencial aplicado se aproxima al E^0 característico del proceso redox, la corriente anódica comienza a aumentar, hasta que se alcanza un pico que corresponde al potencial $E_{p,a}$, en el cual las especies oxidadas son reducidas en su totalidad. Después de atravesar la región de potencial en donde tiene lugar el proceso de oxidación, la dirección del barrido de potencial se invierte y comienza el barrido en el cual las moléculas oxidadas (generadas en el primer medio ciclo, y acumuladas cerca de la superficie) son reducidas y aparece un pico catódico. En sistemas reversibles, como los trabajados en esta tesis, la diferencia entre los potenciales anódicos y catódicos, $\Delta E_p = 59mV$, mientras que la corriente de pico, tanto anódica como catódica, varía linealmente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, $i_p \propto v^{1/2}$.¹²⁶

En este trabajo de tesis, se utilizó la voltamperometría cíclica para producir la reducción electroquímica de películas delgadas de GO, como también para evaluar el comportamiento electrocatalítico de los ensamblados funcionales de óxidos de grafenos con glucosa oxidasa en concentraciones creciente de glucosa, (capítulos 3, y 4 respectivamente).

2.7.3 Voltamperometría de Pulso Diferencial (DPV)

La voltamperometría de pulso diferencial, DPV por sus siglas en inglés, es una técnica que consiste en aplicar pulsos de potencial con una determinada amplitud en una rampa de potencial lineal.¹²⁸ En esta técnica, se utiliza un valor de potencial de base que se aplicará al electrodo en el cual no hay procesos faradaicos. Este potencial de base elegido es aumentado entre los pulsos aplicados en incrementos iguales. La corriente registrada frente a los pulsos de potencial se mide inmediatamente antes del pulso y al final de este, y se registra la diferencia entre ambas corrientes. De esta manera, se restan las contribuciones de corrientes capacitivas y de esta manera, el procedimiento resulta en el análisis de la corriente faradaica libre de las contribuciones capacitivas. Esta característica es la principal ventaja de la técnica, que permite una mayor sensibilidad en la detección de analitos.¹²⁹

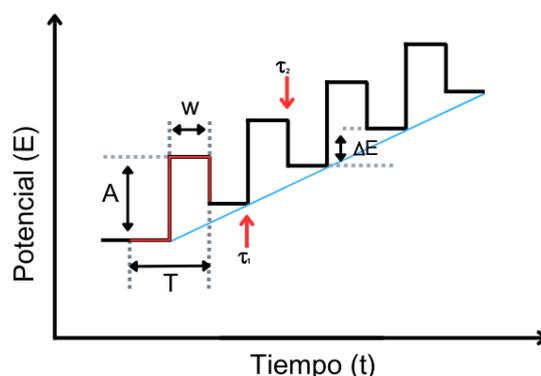


Figura 2.18. Diagrama esquemático de forma de ondas aplicadas en la voltamperometría de pulso diferencial (DPV). Las flechas rojas señalan las regiones del pulso en los cuales se obtienen las medidas de corriente diferencial, τ_1 y τ_2 . Se observan las regiones de amplitud del pulso, A; la duración, w; el tiempo total de cada ciclo de pulso, T; y el aumento de potencial para cada paso, ΔE .

Como se observa en la figura 2.18, la primera medida de corriente es realizada a un tiempo definido, τ_1 , antes de la aplicación del potencial con una determinada amplitud, A, por un tiempo determinado, W. La segunda medida de la corriente se realiza en un período de tiempo similar después del paso del potencial, a τ_2 . Luego de este punto, el potencial aplicado vuelve a un punto determinado de la rampa lineal de potencial, línea celeste en la figura 2.18. Durante cada pulso se aplica un ΔE que aumenta el potencial aplicado sistemáticamente.

Esta metodología fue utilizada en este trabajo de tesis para estudiar la inmovilización de biomoléculas sobre las superficies de óxidos de grafenos, permitiendo una caracterización más sensible a bajas concentraciones de las moléculas a analizar. (Capítulo 4– sección 4.3.2).

2.7.4 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS)

La espectroscopía de impedancia electroquímica, EIS por sus siglas en inglés, es una técnica utilizada en el análisis de procesos electroquímicos que ocurren en la interfase entre el electrodo y la solución electrolito, desde el punto de vista de los mecanismos que intervienen en la transferencia electrónica en

dicha interfase. Esta técnica proporciona información acerca de la cinética involucrada en los procesos de transferencia electrónica entre el electrolito y el electrodo, como también sobre las características difusionales.

En la EIS se utiliza un potencial de amplitud pequeña, o una perturbación periódica de corriente para excitar el sistema electroquímica a diferentes frecuencias.¹³⁰ En el caso de sistemas electroquímicos, la mayor dificultad es que el sistema se mantenga en estado estacionario durante la medida, por lo que se definen las perturbaciones en un rango alejado del E_0 para asumir el estado estacionario del sistema. Al medir la respuesta (corriente o potencial) del sistema a esta perturbación, es posible calcular una función de transferencia que es la impedancia electroquímica del sistema en el caso de una celda electroquímica. La impedancia, Z , puede ser expresada como:

$$\begin{aligned} Z(\omega) &= \frac{\tilde{V}(\omega)}{\tilde{I}(\omega)} && \text{Ecuación 2.16} \\ &= \left| \frac{\tilde{V}(\omega)}{\tilde{I}(\omega)} \right| (\cos \phi(\omega) + j \sin \phi(\omega)) \\ &= Z' + jZ'' \end{aligned}$$

donde ω es la frecuencia angular, relacionada con la frecuencia f (en Hertz) como $\omega = 2\pi f$, ϕ es el ángulo de fase entre las señales de entrada y salida, y $j = -1$, que es el número imaginario. Las variables \tilde{V} y \tilde{I} son fasores, que dan cuenta de la amplitud y la fase de una función sinusoidal. La impedancia electroquímica, definida por la ecuación mencionada anteriormente es un número complejo dependiente de la frecuencia, cuya parte real, Z' , es una resistencia dependiente de la frecuencia, y la parte imaginaria, Z'' , es una reactancia capacitiva dependiente de la frecuencia.¹³⁰

Cuando las componentes real e imaginaria de la impedancia son medidas en un experimento mediante un potencióstato que cuente con el módulo correspondiente para este fin, es posible realizar un gráfico denominado de Nyquist (figura 2.19), que permite obtener información acerca de la impedancia de la celda electroquímica. Para esto, se utilizan circuitos electrónicos equivalentes que permiten la asociación de cada componente del circuito a los procesos ocurridos en la interfase electroquímica.

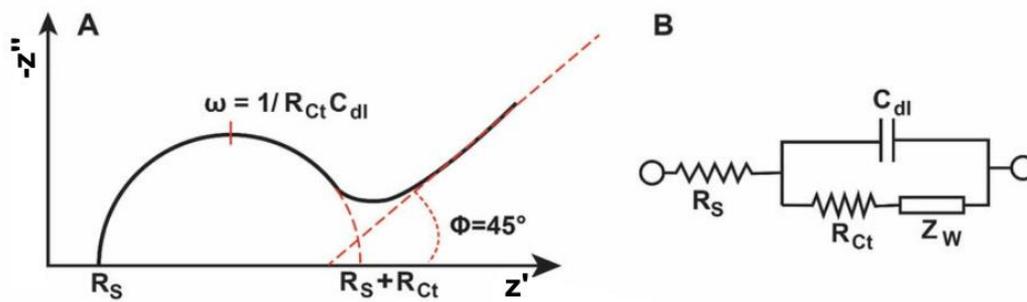


Figura 2.19 (A) Diagrama representativo de un gráfico de Nyquist. R_s y R_{ct} corresponden a los valores de resistencia en la solución y en la interfase del electrodo a la transferencia de carga, respectivamente. La región que corresponde al semicírculo se atribuye al control cinético en el proceso electroquímico, y la región lineal posterior a esta corresponde a los procesos difusionales. (B) Circuito equivalente correspondiente utilizado para modelar el gráfico de Nyquist. C_{dl} corresponde a la capacitancia de la doble capa eléctrica formada en la superficie del electrodo, y Z_w a la impedancia Warburg asociada a la transferencia de carga.

Con la información obtenida a través de medidas de impedancia, en este trabajo de tesis se analizaron las propiedades de transferencia de carga para cada una de las plataformas sensoras desarrolladas, particularmente los valores de resistencia a la transferencia de carga para cada electrodo (capítulos 3 y 4). Esta técnica permite, además, caracterizar cualitativamente la modificación química de los electrodos a partir de procesos de adsorción y desorción, electrodeposición, corrosión, etc.; que cambian las propiedades de transferencia de carga en el electrodo.

Capítulo 3

Generación de plataformas de óxidos
de grafeno

3.1 Introducción

El uso de grafeno y sus derivados como nanosportes para una gran variedad de biointerfaces electroquímicas ha tenido un crecimiento sostenido en los últimos años.^{42,131–133} Esto puede ser atribuido a las numerosas propiedades funcionales que pueden ser aprovechadas para facilitar la transducción eléctrica entre biomoléculas y la superficie del electrodo. Las características estructurales del grafeno, como se menciona en la sección 1.1, le brindan propiedades electrónicas y electroquímicas que son superiores a otro tipo de nanomateriales basados en carbono con conformaciones diferentes a las del grafeno.^{134,135}

Entre los derivados de grafeno más utilizados en aplicaciones de biosensado, se encuentran el óxido de grafeno (GO) y su especie reducida (rGO). El GO es una especie derivada del grafeno altamente oxidada, que contiene múltiples grupos funcionales de oxígeno incluyendo hidroxilos, epoxi, carbonilos y carboxilos tanto en la cara planar como en los bordes de las láminas.¹³⁶ La presencia de estos grupos funcionales facilita la funcionalización de la superficie del óxido de grafeno, que es de suma importancia en el desarrollo de biosensores.^{42,137} El rGO es usualmente obtenido a partir de la reducción de láminas de GO a partir de diversos métodos.^{138–142} Estos procedimientos pretenden restablecer parcialmente la red grafitica, recuperando parcialmente las propiedades electrónicas, por lo que lleva al mejoramiento de la actividad electroquímica comparada con la del GO.^{143–145} Sin embargo, la pérdida de grupos funcionales de oxígeno, que son principalmente los responsables de las propiedades de funcionalización química, lleva a un compromiso entre las características electroquímicas y la funcionalización química de estos materiales.

Por esta razón, en el desarrollo de materiales diseñados para dispositivos de biosensado, controlar la química superficial de las láminas de GO y rGO resulta clave para lograr una inmovilización efectiva de biomoléculas, mientras se conservan las propiedades de alta conductividad eléctrica.

La reducción electroquímica directa del GO es posiblemente el mejor enfoque para fabricar películas delgadas basados en rGO.^{17,146,147} Este método es ventajoso respecto a los métodos mencionados en la sección 1.1.2, (en referencia a los métodos de reducción térmicos, y químicos) debido a que se

puede controlar el proceso fácilmente. De acuerdo a la metodología utilizada, es posible realizar la reducción en etapas, permitiendo obtener especies reducidas parcialmente deteniendo el proceso en el punto deseado con mayor facilidad que con otras técnicas; además de no requerir de materiales contaminantes o que conlleven peligrosidad.^{17,148,149}

Actualmente existen diversos métodos de fabricación de películas de grafenos en diferentes sustratos, que se encuentran bien estudiados y desarrollados, e incluyen recubrimientos por centrifugación o pulverización (*spin o spray-coating*),¹⁵⁰ por goteo (*drop-casting*),¹⁵¹ por inmersión (*dip-coating*),¹⁵² impresión por transferencia (*transfer printing*),¹⁵³ deposición electroforética,¹⁵⁴ y ensamblado de *Langmuir-Blodgett*.¹⁵⁵ Entre los métodos mencionados, el ensamblado a partir de la técnica LB es uno de los más apropiados para este fin, ya que es capaz de controlar el espesor y la uniformidad de las películas delgadas producidas de grafenos, que le confiere una influencia significativa en las propiedades ópticas y eléctricas de la película resultante.^{156,157}

Por otra parte, en la búsqueda de nanocompositos que permitan mejorar la respuesta electroquímica de los ensamblados de GO y rGO, en este capítulo se aborda, no solo la síntesis y caracterización del GO y rGO, sino su interacción con nanohilos de plata (AgNWs) con el fin de mejorar la interconexión entre las láminas de grafenos en los sustratos sólidos. La interacción de derivados de grafenos con nanoestructuras metálicas resulta en general en una mejora notable en las propiedades electrocatalíticas,^{158,159} aunque en el caso de su interacción con AgNWs no ha sido desarrollado completamente.¹⁶⁰

3.2 Experimental

3.2.1 Materiales y Reactivos

Para la síntesis de óxido de grafeno fueron utilizadas escamas de grafito, KMnO₄, H₂SO₄, H₃PO₄, H₂O₂, y HCl. Todas las soluciones para las etapas de la síntesis fueron realizadas en agua Milli-Q® (18,2 MΩ.cm). Para la limpieza de los sustratos sólidos utilizados en este capítulo se utilizó acetona, isopropanol, H₂O₂ y NH₄OH. Para las suspensiones coloidales de GO se utilizaron metanol y agua Milli-Q® (18,2 MΩ.cm). Para la preparación de la balanza de Langmuir-Blodgett se utilizó etanol y cloroformo. Las medidas electroquímicas fueron

realizadas utilizando como mediador redox ferrocenometanol (1 mM) en buffer fosfato salino (PBS). Las dispersiones de AgNWs (nanogap, inc.) se realizaron en isopropanol. Para la construcción de las plataformas de GO y rGO se utilizaron vidrios con recubrimiento de óxido de indio y estaño (ITO) ($35 \Omega/\square$) adquiridos de TFD Inc.

3.2.2 Síntesis de Óxido de Grafeno

Para el presente trabajo de Tesis, en relación a la preparación de plataformas de biosensado basadas en GO, dicho material fue sintetizado mediante exfoliación oxidativa de grafito utilizando una variación del método desarrollado por Marcano y colaboradores,¹⁴ Brevemente, 6 equivalentes en peso de KMnO_4 fueron agregados lentamente bajo agitación a una mezcla concentrada de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_3\text{PO}_4$ en proporciones 9:1. Luego, 1 equivalente en peso de escamas de grafito fue agregado para formar una suspensión uniforme. La reacción se termostató a 50°C y se dejó bajo agitación por 12h. Posteriormente, la mezcla de reacción fue enfriada a temperatura ambiente y se vertió en agua con hielo agregando una solución de H_2O_2 4%, donde se observa un cambio de color de la solución de marrón oscuro a amarillo. El sólido decantado fue luego lavado con una solución de HCl 30% y centrifugado posteriormente a 6500 rpm por 30min.

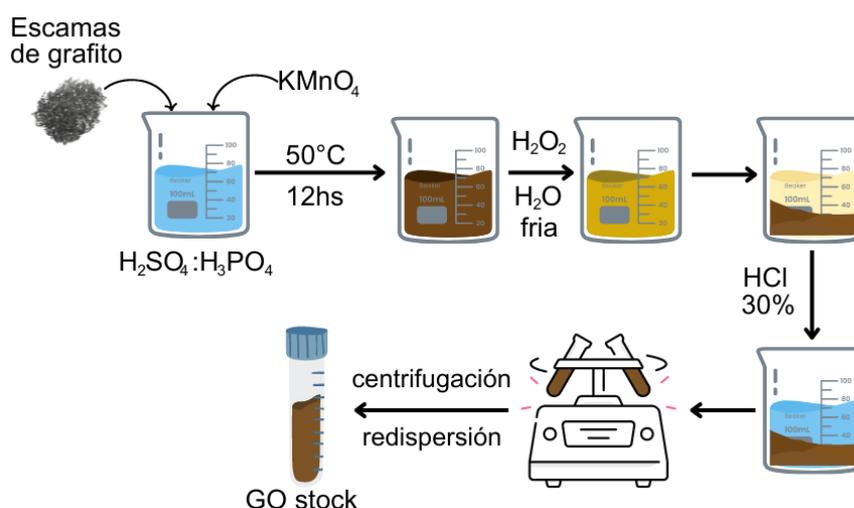


Figura 3.1. Diagrama esquemático del protocolo de síntesis y purificación de GO

El precipitado resultante fue redispersado en agua Milli-Q. Este procedimiento fue repetido sucesivas veces hasta que todas las partículas visibles fueran removidas del precipitado. La pureza fue controlada midiendo la resistividad del sobrenadante hasta obtener valores menores a 90 MΩ.cm. Las suspensiones de GO fueron realizadas mezclando los precipitados recolectados y resuspendiéndolos en agua para formar dispersiones de 4mg/ml.

3.2.3 Ensamblado de películas delgadas de óxido de grafeno mediante balanza de Langmuir-Blodgett

Las soluciones acuosas de GO fueron preparadas utilizando el stock producido en la síntesis de GO presentada en la sección anterior. A fin de obtener dispersiones reproducibles, se estandarizó una metodología con modificaciones a las propuestas por Cote y colaboradores.¹⁵⁵ Las dispersiones de GO se realizaron en una mezcla de agua:metanol en proporciones 5:1 (0,15 mg/ml) a fin de que las láminas del GO permanezcan en la interfaz subfase/aire de la balanza (figura 3.2, B). Previo al depósito sobre la subfase, se realiza una purificación por tamaños de láminas de GO. Para tal fin, se colocó en ultrasonido la suspensión preparada durante 15 minutos y se continuó con dos centrifugaciones. La primera fue realizada a 6500rpm durante 30 minutos para remover las láminas más pequeñas de GO y subproductos presentes en el sobrenadante. El precipitado fue colectado y redispersado en una solución agua:metanol 5:1. La suspensión resultante fue luego centrifugada a 2500rpm por 10 minutos para remover las láminas de gran tamaño y agregados multicapas. Se utilizó posteriormente el sobrenadante resultante para el procedimiento de ensamblado de películas delgadas de LB.

Para el ensamblado LB se utilizó una balanza de Langmuir-Blodgett modelo 500 de KSV NIMA, instalada sobre una mesa antivibratoria suspendida hidráulicamente empleando aire comprimido a fin de minimizar las vibraciones externas. Todos los artefactos de politetrafluoroetileno (PTFE, Teflon®) de la balanza fueron cuidadosamente limpiados con cloroformo y luego llenado con agua Milli-Q®. A fin de medir la tensión superficial de la subfase a través de las barreras móviles, se agregó un platillo de Wilhelmy constituido de Pt, que fue colocado en la electrobalanza correspondiente (Figura 3.2, A).

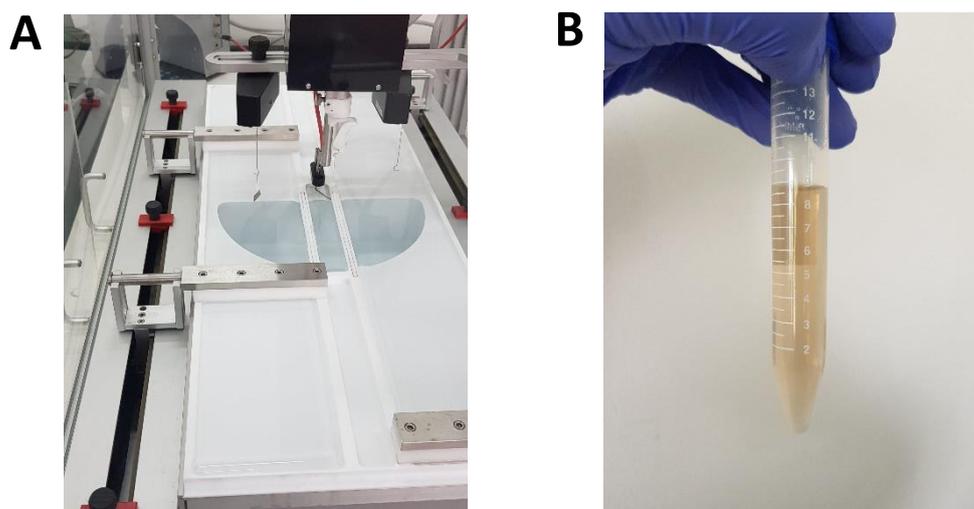


Figura 3.2. (A) Arreglo experimental utilizado para el ensamblado de GO en sustratos sólidos. (B) Suspensiones de GO en agua:metanol utilizadas en balanza LB.

Las impurezas de la interfaz fueron eliminadas aspirando la superficie comprimida hasta alcanzar valores de presión superficial (π) menores a $0,2\text{mN/m}$. Luego fueron colocados $5,5\text{ml}$ de la suspensión de GO cuidadosamente sobre la superficie de la subfase, con ayuda de una jeringa de precisión procurando el depósito gota a gota. La monocapa formada fue estabilizada durante 15 minutos sin perturbaciones antes de la compresión. Se realizaron isotermas π -A para analizar el comportamiento de la monocapa y poder evaluar la presión superficial óptima para la transferencia a sustratos sólidos.

Los sustratos sólidos utilizados en este capítulo fueron *wafers* de Si con su óxido nativo superficial (Si/SiO_2), mica y vidrios con recubrimiento de ITO. En todos los sustratos se realizó el mismo protocolo de limpieza y oxidación para poder utilizarse como soporte en la balanza LB. En primer lugar fueron lavados con acetona a 50°C durante 20 minutos en un baño de ultrasonido y posteriormente el proceso fue repetido con isopropanol. Luego los sustratos fueron lavados con agua y posteriormente tratados con una solución 1:1:5 de NH_4OH 27%: H_2O_2 20%: Agua Milli-Q® por 15 minutos a 70°C . Finalmente, todos los sustratos fueron enjuagado con agua y guardados en sumersión hasta su uso.

Las películas de LB fueron obtenidos a una presión superficial de compresión de 15mN/m, y mediante el *dip-coater* incorporado en la balanza LB fueron transferidos de manera vertical a los distintos sustratos a una velocidad de 0,1 mm/min. Posteriormente las películas depositadas fueron llevadas a un horno a 80 °C por 1 h para la evaporación del agua entre las láminas del GO y los sustratos.¹⁶¹



Figura 3.3. Configuración experimental del proceso de transferencia por *dip-coating* de monocapas de GO sobre sustratos sólidos (en la imagen: vidrio/Au)

3.2.4 Reducción de GO y síntesis de rGO

La reducción del óxido de grafeno se llevó a cabo a través de dos metodologías: reducción térmica y reducción electroquímica, a fin de comparar los resultados obtenidos y optimizar el proceso de reducción. El óxido de grafeno reducido térmicamente (TrGO, en adelante) fue obtenido calentando las películas de GO soportados en ITO a 300 °C por 7 h en UHV utilizando un horno tubular.

El óxido de grafeno reducido electroquímicamente fue llevado a cabo también en un proceso de dos pasos, reduciendo el GO previamente depositado sobre el soporte sólido. Los ciclos de reducción se llevaron a cabo utilizando una configuración de tres electrodos, utilizando el sustrato cubierto por la película de

GO como electrodo de trabajo, un electrodo de Ag/AgCl (3M KCl) como electrodo de referencia, y un alambre de platino como contra-electrodo. La reducción electroquímica fue llevada adelante con un potenciostato *Autolab PGSTAT302N* (Metrohm) utilizando PBS de pH 7.4 como electrolito. Se realizaron los ciclos voltamperométricos en una ventana de potencial desde 0 V hasta -1,1V y una velocidad de barrido de 50mV/s

La síntesis de la muestra rotulada como pErGO, que se menciona en la sección 3.3.2, fue realizada en las mismas condiciones que la reducción de la muestra ErGO, pero deteniendo el ciclado en el primer ciclo voltamperométrico.

3.2.5 Espectroscopía de Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

Las medidas de XPS se realizaron utilizando un equipo SPECS multi-técnica perteneciente a FIQ-UNL INCAPE-CONICET, utilizando una fuente monocromática de rayos X Al-K α operada a 300 W. Los espectros fueron obtenidos utilizando un detector hemisférico PHOBIOS 150 a fin de analizar las señales del nivel C1s.

Las muestras analizadas fueron montadas sobre cinta de cobre y colocadas bajo UHV por 12h previo a las medidas a fin de eliminar la humedad e impurezas volátiles. La presión durante las medidas fue mantenida debajo de los 10⁻⁹ mbar.

El análisis cuantitativo para cada espectro fue realizado utilizando el software CasaXPS asignando los picos para cada grupo funcional característico de acuerdo con la bibliografía.¹⁶²⁻¹⁶⁴ La intensidad de cada pico fue estimada a través de la integración de cada pico luego de la sustracción del fondo utilizando una función *arc-tan*, para luego ajustar el pico experimental para cada componente usando funciones Lorentzianas/Gaussianas. A fin de cuantificar los porcentajes atómicos de cada uno de los grupos funcionales para cada muestra evaluada, los espectros fueron normalizados considerando la intensidad de la señal Si2p, la que fue considerada de la misma intensidad para todas las muestras medidas sobre un sustrato de Si.

3.2.6 Microscopía electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico de barrido FEI Quanta 200 perteneciente al LIMF-FI-UNLP. Por otra parte, la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) fue realizada utilizando un microscopio Nanoscope V (Bruker, Santa Barbara, CA) utilizando puntas de Silicio (Arrow® NCR; NanoWorld, Neuchâtel, Switzerland) y operando en modo *tapping*. La constante elástica del cantiléver utilizado: 42N/m. Frecuencia de resonancia: 285kHz. La resolución de las imágenes obtenidas fue de 512x512 pixeles. El análisis morfológico de las imágenes obtenidas por AFM fue realizado con el software *NanoScope Analysis*. Las medidas presentadas en el capítulo se realizaron junto al Dr. Eduardo Prieto.

3.2.7 Técnicas electroquímicas

Las medidas de Voltamperometría Cíclica (CV) y Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS) se llevaron a cabo en el INIFTA con un potenciostato Autolab PGSTAT302N (Metrohm) en una celda electroquímica de PTFE de tres electrodos con un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3M KCl) y contraelectrodo de platino (ver Figura 3.4).

La celda de PTFE utilizada está diseñada de manera tal que deje expuesta a la solución electrolítica un área geométrica del electrodo de trabajo de 0,18 cm². Previo a cada medida electroquímica, se burbujeó N₂ durante 30 min. para desplazar el O₂ disuelto en solución electrolito. Las medidas de caracterización por CV fueron realizadas a una velocidad de barrido de 10 mV/s desde potenciales de -0,2 a 0,7 V en una solución de PBS con 1mM de ferrocenometanol como mediador redox. Las reducciones electroquímicas de GO fueron realizadas de acuerdo con lo mencionado en la sección 3.2.4. Todas las medidas están expresadas como la densidad de corriente (*j*) que corresponde al valor de corriente por unidad de área del electrodo de trabajo [*j*]: $\mu A/cm^2$.

Los espectros de impedancia se realizaron en un rango de frecuencias de 10⁶-10⁻¹ Hz. con una perturbación de 10 mV a 0,25 V en solución PBS con 1 mM de ferrocenometanol. Para el análisis de los espectros se ajustó un circuito

equivalente Randles, $R_s(CPE[R_{CT}W])$, en el que R_s indica la resistencia de la solución, R_{CT} la resistencia de transferencia de carga, CPE el elemento de fase constante, que modela la capacitancia de doble capa, y W , la impedancia Warburg, que indica la difusión de la sonda electroactiva desde el electrolito a la superficie del electrodo (ver circuito equivalente en Sección 2.7.4).

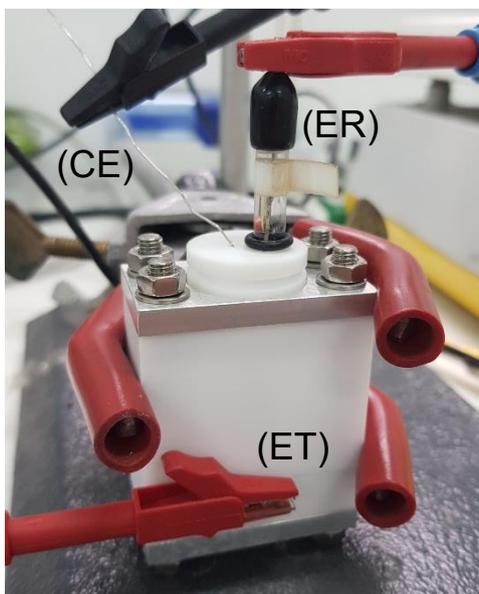


Figura 3.4. Celda electroquímica de PTFE utilizada para las medidas de voltamperometría cíclica y espectroscopía de impedancia electroquímica. (ET) Electrodo de trabajo, (ER) electrodo de referencia (Ag/AgCl), (CE) Contraelectrodo (Pt).

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Ensamblado de plataformas de GO y rGO sobre ITO

Las películas delgadas de GO fueron depositados sobre los sustratos sólidos utilizados con control sobre la densidad y el espesor de este. A fin de constatar el comportamiento de la monocapa del GO sobre la interfaz de agua/aire se realizaron ensayos de compresión y descompresión de la superficie para evaluar las fases observadas y optar por la presión superficial para realizar la transferencia de la monocapa al sustrato sólido. Como se observa en la figura 3.6, a 15 mN/m la monocapa se encuentra en una fase de contacto entre cada lámina que se podría definir como fase líquida. Si bien al transferir la monocapa al sustrato en la fase sólida tendría teóricamente un mayor porcentaje de cobertura, las imágenes obtenidas a través de SEM que se muestran en la

sección 3.3.4 corroboran que, a esta presión superficial, la monocapa se encuentra en estrecho contacto entre las láminas que la componen.

Como se menciona en la sección 3.2.3, la monocapa se deja estabilizar durante 15 minutos antes de realizar la compresión con las barreras móviles de la balanza LB, de la misma manera que cuando se alcanza la presión superficial definida para la transferencia se admiten otros 15 minutos de estabilización. El motivo de estos tiempos se debe a que a medida que las láminas del GO comienzan a estar en contacto entre sí para formar dominios de coloides, las interacciones que intervienen en este proceso deben estabilizarse para que estos dominios no precipiten de la interfaz agua/aire al seno de la subfase. Las fuerzas que intervienen en la estabilización de las dispersiones coloidales son las fuerzas de repulsión. En el caso de las monocapas de GO, existen dos tipos de interacciones que la definen: las electrostáticas y las de Van der Waals. Cuando predominan las primeras sobre las de Van der Waals, la monocapa es estable, y la forma en la que interactúan las láminas de GO son del tipo *edge-to-edge* (borde a borde). Cuando las interacciones que predominan son las del tipo Van der Waals, las láminas se acercan *face-to-face* (cara a cara).¹⁵⁵

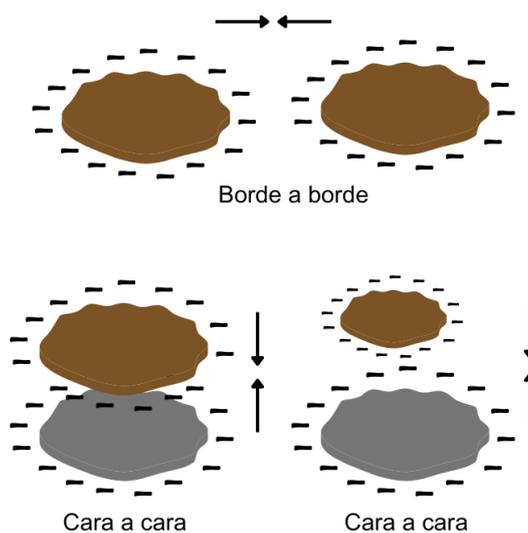


Figura 3.5 Diagrama de interacciones en monocapas de óxido de grafeno: Borde a borde (*Edge-to-edge*) o Cara a cara (*face-to-face*). La competencia entre las fuerzas coulombicas y de Van der Waals determinan la estabilidad coloidal del sistema.

En las condiciones estudiadas, el GO mantuvo un comportamiento estable durante toda la etapa de la compresión y transferencia al sustrato sólido, sin fluctuaciones en la presión superficial que indicara colapsos de la monocapa, o interacciones no deseadas.

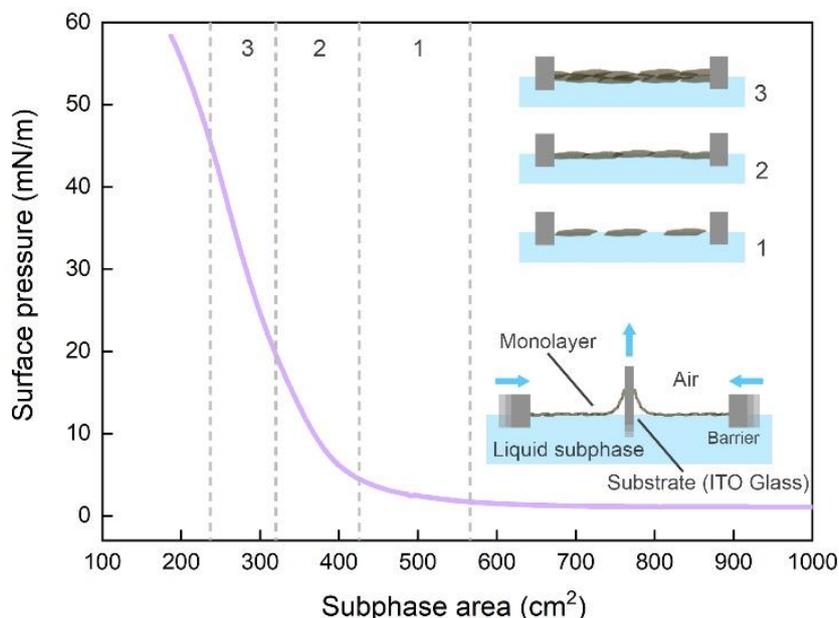


Figura 3.6. Gráfico de presión superficial vs. área de subfase correspondiente a la formación del ensamblado de GO sobre sustratos sólidos. Las líneas discontinuas de la figura corresponden a los diferentes estadios de compresión de la monocapa de GO.

Es de esperar que a presiones superficiales mayores a las utilizadas se generen arrugas en las láminas del GO por los grupos funcionales de las caras planares, que son indeseables frente a la funcionalización con biomoléculas, discusión que se abordará en el Capítulo 4.

Como se muestra en la figura 3.6, se pueden identificar las fases de compresión en el GO, con los quiebres en la pendiente característicos para los distintos niveles de contacto entre las láminas.

Las monocapas de GO fueron transferidas a la presión superficial de 15 mN/m para asegurar que las láminas de GO estuvieran interconectadas sin arrugas importantes ni superposiciones que alteren la posterior funcionalización de la superficie. A mayores presiones superficiales, las láminas de GO tienden a arrugarse mediante interacciones entre los grupos funcionales de su estructura, que podrían potencialmente ser utilizados para inmovilizar biomoléculas,

mientras que a presiones superficiales más bajas este efecto es menor para sustratos con el mismo cubrimiento de la superficie.

La presencia de enlaces del tipo puente de hidrógeno entre los ácidos carboxílicos de las regiones de los bordes de las láminas del GO favorece las interacciones entre los bordes de distintas láminas evitando el deslizamiento y reforzando la estabilidad en el sustrato.¹⁵⁶ A su vez, las velocidades bajas de desplazamiento del sustrato durante el proceso de transferencia favorece a la obtención de láminas de GO más planas que a velocidades mayores, permitiendo la evaporación de la subfase entre el sustrato y las láminas del GO.^{161,165}

La transferencia a los sustratos utilizados se realizó utilizando el *dip-coater* acoplado a la balanza LB, sumergiendo todo el sustrato hasta la compresión de la monocapa hasta la presión superficial deseada, y luego retirando el sustrato a una velocidad de 1mm/min de manera que la formación del menisco en la subfase con el sustrato deposite de forma controlada las láminas del GO sobre el sustrato. Este enfoque es posible gracias al tratamiento realizado luego de la limpieza del sustrato (sección 3.2.3), que funcionaliza la superficie del óxido en el ITO y Si/SiO₂ y permite la interacción con las láminas en la interfaz.

Los parámetros de la transferencia al sustrato se mantuvieron con características similares en diversos experimentos, donde se observa la linealidad entre el número de capas y el índice de transferencia, que indica la uniformidad en el proceso. Durante el tiempo de la transferencia, las barreras de la balanza LB se siguen moviendo por el sistema de retroalimentación del software que compensa la caída de la presión superficial debido a la pérdida de material de la monocapa, de manera que toda la superficie del sustrato se transfiere a la misma π .

Reducción rGO

La reducción de los grupos funcionales de oxígeno presentes en la estructura del GO para sintetizar óxido de grafeno electroquímicamente reducido (ErGO) y óxido de grafeno térmicamente reducido (TrGO) se realizó bajo el enfoque de dos pasos, en donde primero se produjeron las películas delgadas

de GO sobre el sustrato a utilizar y luego se realizó la reducción sobre las películas soportadas.

Con el objetivo de optimizar las superficies del sustrato a fin de utilizarlas como plataformas para la funcionalización con biomoléculas, las reducciones se realizaron por dos metodologías para comparar los resultados obtenidos. Es sabido de acuerdo con diversos trabajos que la reducción del GO por vía tratamiento térmico es un método muy eficiente en la reducción de los grupos funcionales de oxígeno dejando como producto una red grafitica con alto contenido de carbono sp^2 y por ende propiedades eléctricas deseadas para dispositivos de sensado.^{29,142,166,167} Sin embargo, los tiempos y las condiciones experimentales que requiere este método suele ser poco conveniente. El proceso de reducción que se utilizó en este trabajo se encuentra descrito en la sección 3.2.4.

Se realizó la reducción electroquímica aplicando ciclos de reducción mediante voltamperometrías cíclicas. Las películas LB de GO soportados sobre ITO fueron sometidos a 10 ciclos de potenciales desde 0,0 a -1,1 V (vs. Ag/AgCl) en PBS a pH 7,4.

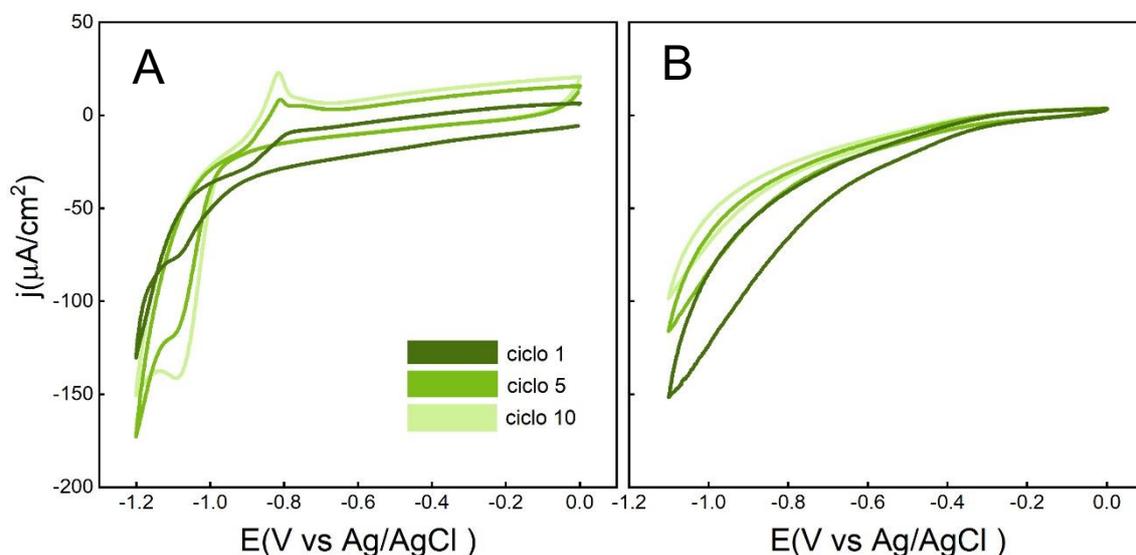


Figura 3.7. Voltamperogramas cíclicos para sustratos de ITO con potenciales límites de los ciclados de: (A) -1,2 V y (B) -1,1 V en PBS pH 7.4 como solución electrolito

Los potenciales utilizados durante los ciclos de reducción se encontraron limitados debido a la utilización de ITO como sustratos en el ensamblado de

películas delgadas de GO (ver Figura 3.7). En pruebas preliminares, e intentando reducir las láminas de GO a potenciales menores, se visualizó que a medida que se disminuye el potencial se produce un pico de corriente catódico debido a la reducción del recubrimiento de ITO que conforman el sustrato utilizado. Este pico de corriente corresponde a la formación de In^0 .¹⁴⁷ Es notable que luego de esta reducción indeseada para los objetivos de este trabajo de Tesis, al aumentar el potencial el electrodo no presenta un pico de corriente anódica de la misma magnitud de intensidad, sugiriendo la destrucción del ITO y por ende la pérdida de sus propiedades.

Por esta razón, diversas condiciones experimentales debieron ser evaluadas para optimizar la reducción electroquímica sin afectar el soporte. El pH de la solución de electrolito también afecta al proceso de reducción, además de los parámetros de la voltamperometría, debido a que, a pesar de no estar de todo claro el mecanismo por el cual se produce la reducción del GO, se ha demostrado empíricamente una dependencia con la concentración de H^+ y la posición de los potenciales característicos para la reducción.¹⁶⁸

En la figura 3.8 se observan tres condiciones de reducción, que varían de acuerdo con el pH de la solución electrolito (figura 3.8, A y B) y velocidad de barrido en los ciclos de reducción (figura 3.8, B y D). Al disminuir el pH de la solución en la celda electroquímica, como se menciona anteriormente, el potencial en el que se observa un pico de reducción correspondiente al GO se observa a valores menos negativos de potencial. Es decir, que es necesario aplicar menos potencial para lograr la reducción completa de las películas de GO sobre ITO. Modificando el pH de 7,4 a 5,0, ajustándolo con el agregado de HCl, se observa una diferencia de 100 mV en la posición, lo que corrobora la dependencia de la posición del potencial de reducción para el GO con la concentración de H^+ presente en el electrolito. Sin embargo, en una solución de electrolito a pH 5 y usando un potencial catódico límite de -1,1 V, se encontró que en algunos casos esta condición modificaba también el potencial en el cual reacciona el sustrato, como se observa en la figura 3.8, C. Por otra parte, al modificar la velocidad de barrido, (figura 3.8, B y D), como es de esperarse, se modifica la posición característica del pico de reducción para el GO, sin observarse, en el caso de la reducción a 100 mV/s, un pico de corriente catódica atribuible a la reducción de grupos funcionales de oxígeno. En los experimentos

desarrollados en este capítulo y el capítulo 4, se utilizaron las condiciones de reducción a pH 7,4 y velocidad de barrido de 50 mV/s, observándose en todos los experimentos los picos de corrientes catódicas relacionados a la reducción electroquímica del GO a potenciales entre -1,0 y -1,05 V sin vislumbrar reacciones indeseables como la destrucción del ITO.

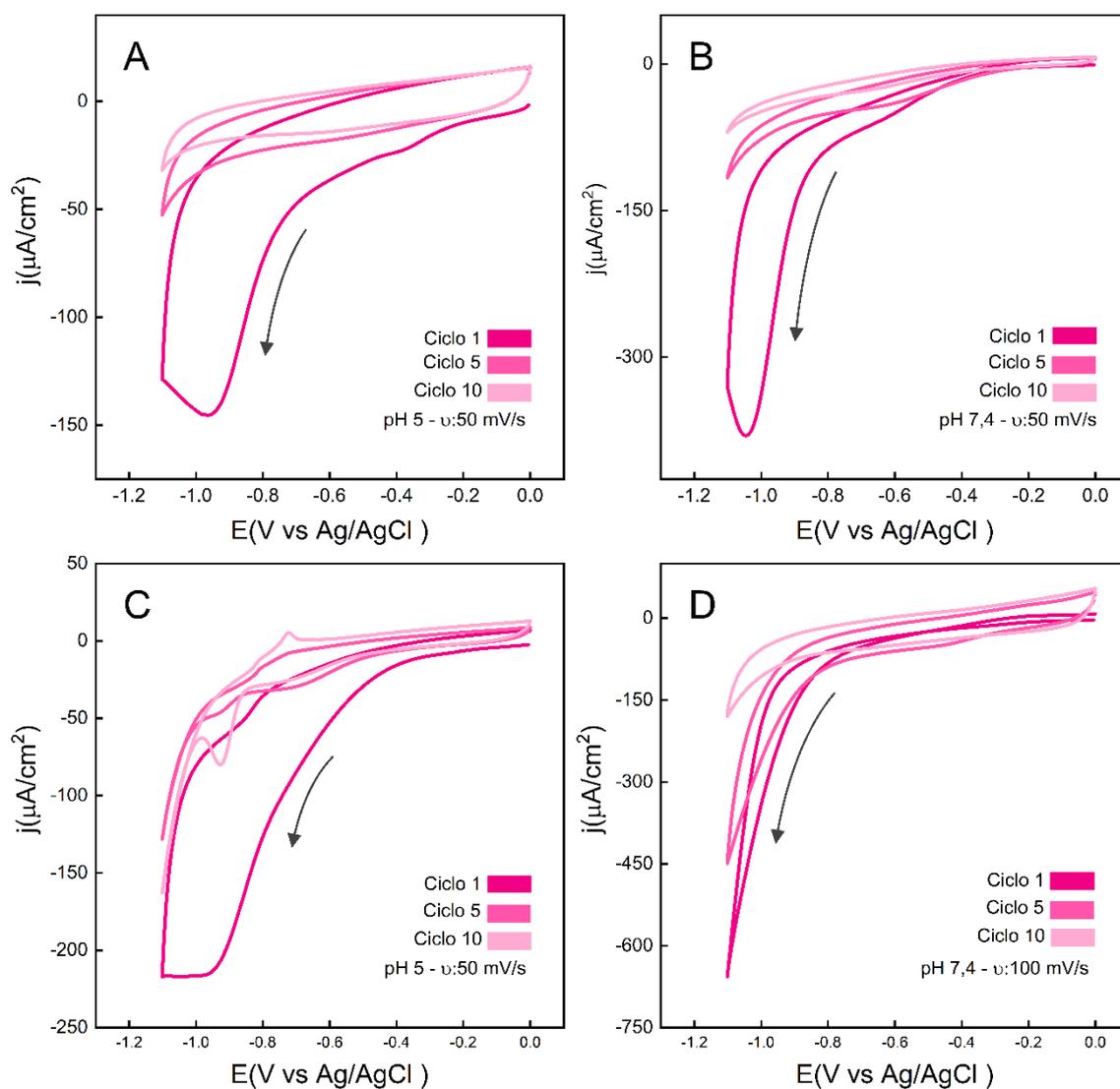


Figura 3.8. Voltamperogramas de ciclos de reducción en distintas condiciones: (A) con solución electrolito a pH 5 y velocidad de barrido (v) 50 mV/s; (B) a pH 7,4 y (v) 50 mV/s; (C) a pH 5 y (v) 50 mV/s con reacción del sustrato sólido; y (D) a pH 7,4 y (v) 100 mV/s.

Como se observa en la figura 3.9 el primer ciclo catódico permite identificar un pico definido a -1,0 V, sin observarse picos anódicos en el ciclo reverso. Esta señal puede atribuirse a la reducción de grupos funcionales

hidroxilos, epoxi, y carbonilos del plano de las láminas del GO, mayoritariamente.^{169,170}

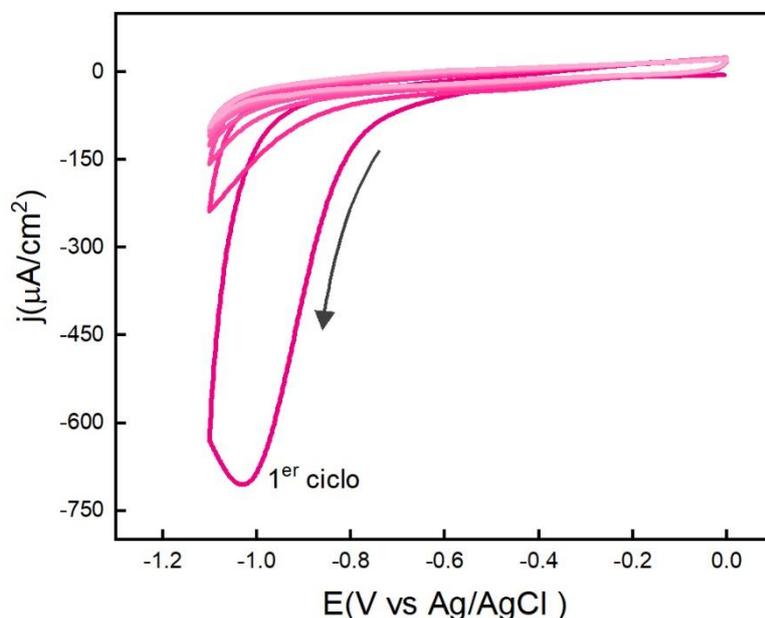


Figura 3.9. Ciclos de reducción realizados por voltamperometría cíclica para la obtención de ErGO. En la figura se muestran diez ciclos de reducción realizados en un barrido de potencial de 0 a -1,1 V en PBS pH 7,4 a una velocidad de barrido de 50 mV/s.

Durante los ciclos consecutivos, se evidencia una disminución en la corriente catódica indicando que una porción significativa de grupos funcionales de oxígeno fue reducida irreversiblemente durante el primer ciclo, y que posteriormente se reduce la fracción de grupos funcionales que durante el primer ciclo de barrido de potencial no fue suficiente para su reducción. Como se menciona anteriormente, la reducción parcial del GO se realizó con un solo ciclo voltamperométrico. Además de la caracterización química realizada para comprobar el grado de reducción del ErGO, TrGO y pErGO (sección 3.3.3) es posible observar un cambio de coloración en la sección en contacto con la solución, de la película delgada de GO (ver Figura 3.10) que es un indicio característico del éxito en el proceso de reducción.

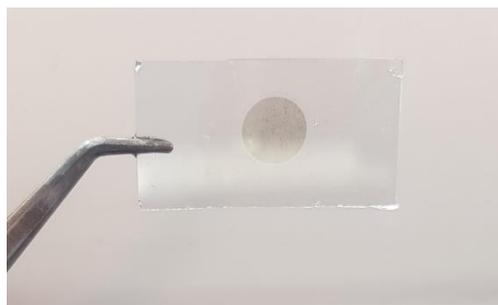


Figura 3.10. Resultado de un electrodo de GO reducido electroquímicamente para formar ErGO. En la imagen se observa el área expuesta al electrolito de la película de GO que se redujo.

3.3.2 Ensamblado de Nanohilos de Plata

Posteriormente a la generación de las películas delgadas de GO sobre diversos sustratos sólidos, se evaluó su interacción con dispersiones de nanohilos de plata en isopropanol con el objetivo de mejorar la interconexión entre las láminas de GO, y por ende optimizar la conductividad de los electrodos fabricados. A través del depósito por goteo sobre los sustratos elaborados, se realizaron experimentos preliminares para analizar la estabilidad de los depósitos de AgNWs sobre el GO. Inicialmente, se realizaron imágenes de microscopía de barrido electrónico con el fin de observar la efectividad en el protocolo utilizado y la dispersión sobre la superficie de GO.

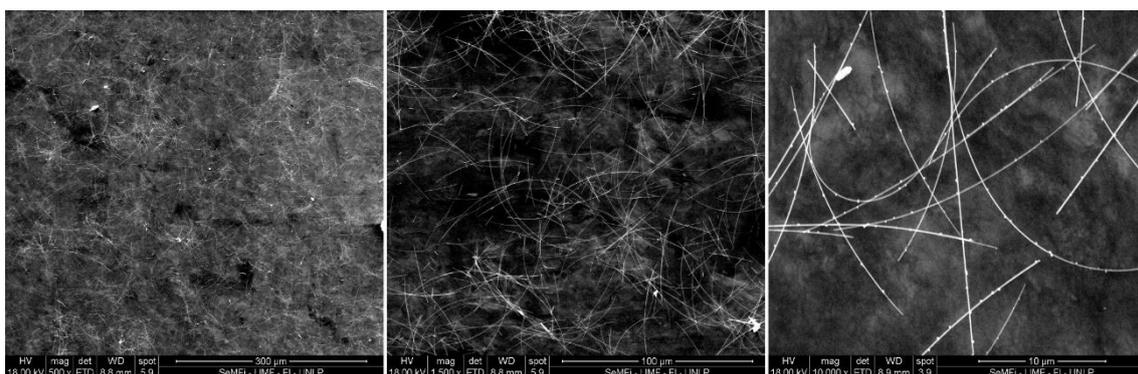


Figura 3.11. Imágenes SEM obtenidas de películas de AgNWs/GO en distintas magnificaciones, de izquierda a derecha: 500X, 1500X y 10000X.

Como se observa en la figura 3.11, los AgNWs se depositaron correctamente sobre la superficie de los sustratos ensamblados con películas de GO entrelazándose y con un cubrimiento alto del área observada. A su vez, en la imagen de la derecha se pueden visualizar conformaciones en la superficie de los AgNWs que se asemejan a nanopartículas. Por otra parte, las dimensiones de los nanohilos se observan variables en longitud, pero con la resolución de la microscopía no es pueden distinguir cambios en los diámetros de estos.

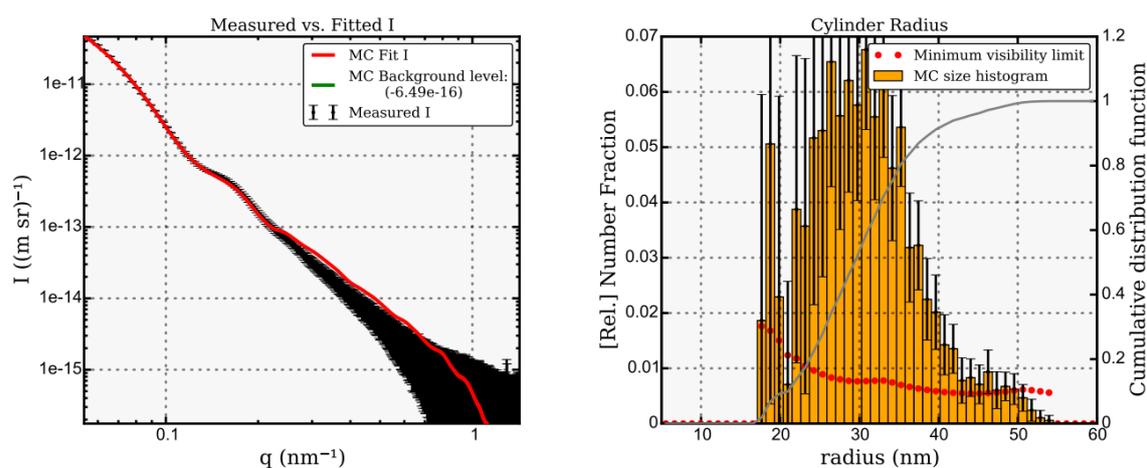


Figura 3.12. Perfil de distribución de los radios de AgNWs obtenidos a través de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)

Para identificar las dimensiones de los AgNWs se realizaron medidas de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) mediante la cual es posible modelar parámetros de la estructura de los nanomateriales dispersos, a través del patrón de dispersión observado, la posición de los ángulos de la dispersión y las oscilaciones correspondientes. En la figura 3.12 se muestran los resultados obtenidos donde es posible observar una dispersión de los radios de los cilindros (AgNWs) de entre 20 a 35nm. Si bien lógicamente no se trata de una población única de tamaños, el rango en el que varían los radios es acorde a las necesidades experimentales en su potencial aplicación, ya que la relación entre diámetro de los nanohilos y sus dimensiones longitudinales varían en varios órdenes de magnitud.

3.3.3 Composición química de GO y rGO

La reducción de los electrodos GO/ITO fue caracterizada mediante espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) como muestra la figura 3.13 para la región de fotoionización para el C 1s.

El óxido de grafeno, previo a cualquiera de los tratamientos de reducción, exhibe dos picos amplios en el rango de energías de ligadura (BE) entre 284 y 291 eV. La deconvolución de esta señal muestra la presencia de seis contribuciones que pueden ser atribuibles a diversos grupos funcionales de oxígenos enlazados al carbono del GO. El pico intenso con BE de 284,6 eV se puede asignar al carbono grafitico (con hibridación sp^2) mientras que el pico que tiene su centro a 285,3 eV se atribuye al carbono con hibridación sp^3 . Ambas contribuciones representan el 47,7% del total de la intensidad para la señal C 1s, como se muestra en la tabla 1.

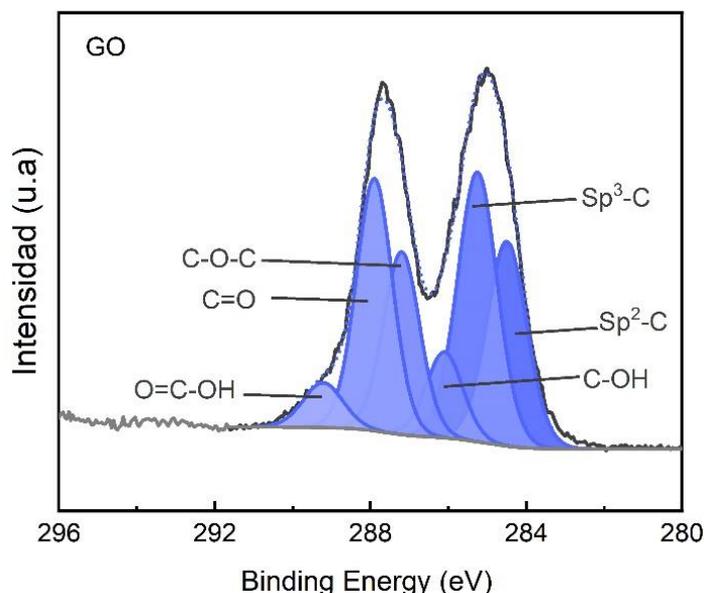


Figura 3.13. Espectro XPS obtenido para la señal C 1s para el GO depositado sobre ITO

Es posible asignar picos en regiones con BE de 286,3; 287,0; 288,1 y 289,2 eV y son atribuibles a los grupos funcionales hidroxilos (C-OH), epoxi (C-O-C), carbonilos (C=O) y carboxilos (C(O)OH) respectivamente.¹⁶²⁻¹⁶⁴ Es notable de los datos observados que los grupos funcionales que dominan la superficie de las láminas del GO son los grupos carbonilos, sugiriendo un compuesto con un alto grado de oxidación.

La caracterización química a partir de los espectros XPS de ErGO y TrGO se muestra en la figura 3.14, donde se observa de manera general la desaparición casi total del segundo pico pronunciado correspondiente a grupos funcionales de oxígeno, indicando que en ambos casos la reducción es eficaz.

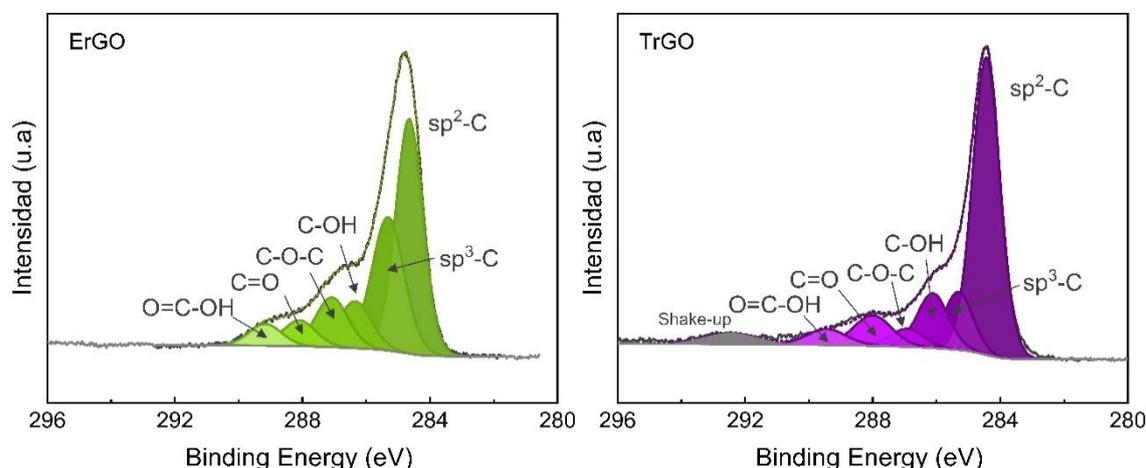


Figura 3.14. Espectro XPS obtenido para la señal C 1s para las películas de GO depositadas sobre ITO luego de la reducción electroquímica (izq.) y la reducción térmica (der.).

En la figura 3.14 se observa que en el caso del TrGO la proporción de carbono con hibridación sp^2 es mayor comparada al ErGO, sugiriendo una mejor restauración de la red gráfitica. La composición atómica de cada una de las transiciones para el C 1s, se encuentran en la tabla 1, donde se vislumbra que no hay diferencias significativas en las contribuciones para los picos adjudicados a los grupos funcionales de oxígeno.

Por otra parte, no se notan diferencias entre la suma de las contribuciones de C- sp^2 y C- sp^3 para los óxidos de grafeno reducidos por ambos métodos, siendo 69,4% para el caso del ErGO y 67,6% para el caso del TrGO, de manera que en ambos casos los métodos permiten tener el mismo porcentaje de funcionalización con oxígeno, con leves diferencias entre la composición.

A su vez, en el caso del TrGO se observa una contribución que corresponde a un satélite *shake-up* atribuible a la restauración de la conjugación π deslocalizada ($\pi \rightarrow \pi^*$), característica de estructuras de C aromático.

Habiendo observado los resultados obtenidos, la metodología electroquímica resultó conveniente respecto de la reducción térmica, en función de los tiempos de cada uno de los procesos y el estado final de cada reducción.

De esta manera, habiendo analizado que en la reducción electroquímica la mayoría de los grupos funcionales son reducidos durante el primer ciclo de la voltamperometría, se realizó la caracterización para los electrodos parcialmente reducidos, deteniendo el ciclado al finalizar el primer ciclo electroquímico y obteniendo de esta manera una especie intermedia en el grado de reducción denominada pErGO (GO parcialmente reducido electroquímicamente - *partially electrochemically reduced graphene oxide*).

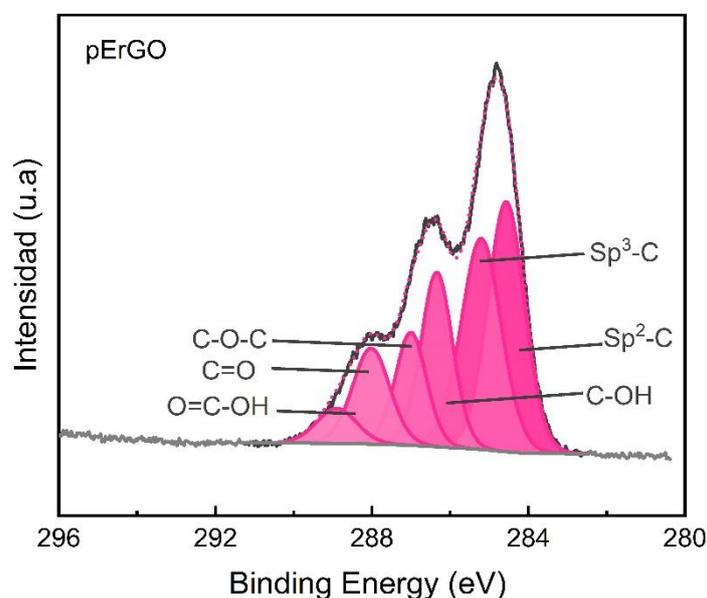


Figura 3.15. Espectro XPS obtenido para la señal C 1s para el GO depositado sobre ITO luego de la reducción parcial electroquímica, a través de voltamperometría cíclica a 50 mV/s en PBS pH 7,4 por un ciclo de potencial.

La caracterización del pErGO se realizó mediante espectros XPS (figura 3.15) asignando los mismos valores para cada contribución de las transiciones del C 1s observándose principalmente una reducción en la intensidad relativa de la señal para C=O de 23,2 a 10,2%. Este cambio fue acompañado de un incremento en la intensidad relativa de la señal C-OH (15,2%) como consecuencia de la reducción de las especies C-O-C y C=O.¹⁷¹

Tabla 1: Energías de ligadura (BE) y porcentajes atómicos relativos para las contribuciones asignadas del espectro XPS para la señal C 1s

Contribuciones asignadas	BE (eV)	Muestras			
		GO	pErGO	ErGO	TrGO
Sp2-C	284,6	20,6	26,7	41,2	56,0
Sp3-C	285,3	27,1	23,9	28,2	11,6
C-OH	286,3	7,9	15,2	9,9	11,7
C-O-C	287,0	16,8	19,6	10,5	4,0
C=O	288,1	23,2	10,2	5,5	8,0
O=C-OH	289,2	4,5	4,4	4,6	4,3
Satélite <i>shake-up</i>	294,2	-	-	-	4,4

La intensidad relativa para la señal de C(=O)OH, por otro lado, se mantuvo prácticamente invariable entre las distintas condiciones de reducción, confirmando que el potencial catódico utilizado experimentalmente no era lo suficientemente negativo para promover la reducción completa de grupos carboxilos.¹⁷² La intensidad del pico asignado a carbono sp² (C=C) aumenta en el proceso de reducción parcial, lo que es consistente con la restauración parcial de la red gráfica.¹⁴⁶

Estos resultados obtenidos de XPS confirman que la reducción electroquímica de monocapas de GO transferidas por la técnica LB sobre ITO es efectiva para preparar electrodos basados en rGO con diferentes grados de oxidación. La reducción parcial del GO proporciona sustratos con una superficie reactiva con grupos funcionales de oxígeno como sitios de unión, y un posible mejoramiento en las propiedades eléctricas de la superficie debido a la restauración parcial de la red de carbono sp² producto de la reducción.

3.3.4 Morfología superficial

La figura 3.16 muestra las imágenes AFM y SEM obtenidas para las películas de GO, pErGO y ErGO transferidos sobre ITO a través de balanza LB.

Para las tres muestras estudiadas, se observa la cobertura casi completa del área analizada por las dos técnicas. Para el caso de los sustratos con películas de GO, se observa una superficie cuya estructura presenta mayor densidad de pliegues y arrugas. A su vez, se distinguen regiones multicapas que en el caso de la microscopía electrónica de barrido se observan por el mayor contraste en la imagen. Esta característica puede deberse principalmente a dos factores: por un lado, la mayor presencia de grupos funcionales de oxígeno, y por el otro, por las condiciones de transferencia a través de la balanza LB, particularmente por los valores de presión superficial a la que se realizó la transferencia de la monocapa al sustrato sólido. Sin embargo, la utilización de presiones superficiales menores, si bien desfavorecería la superposición de láminas de GO, también aportaría un menor cubrimiento de la superficie, y, por ende, una menor área de modificación química posterior para los fines de esta tesis.

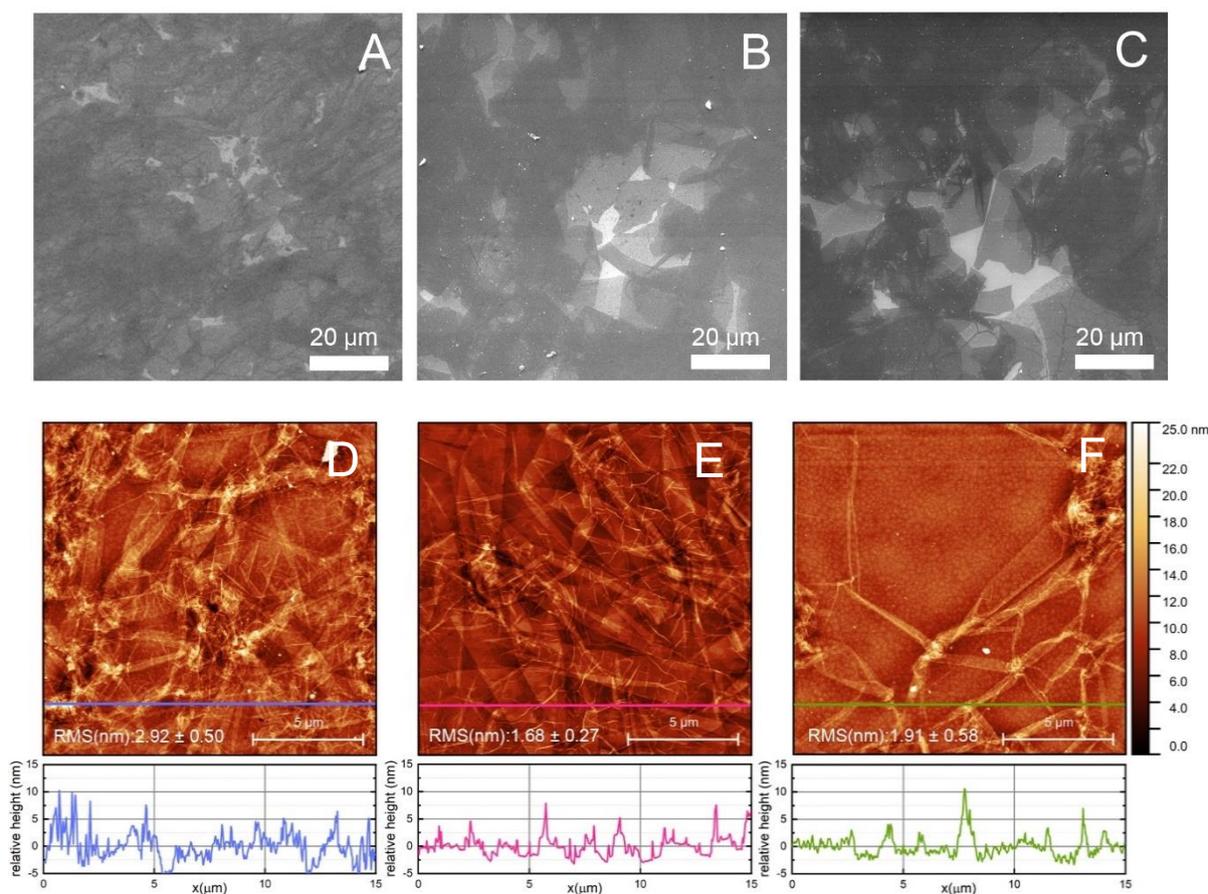


Figura 3.16. Imágenes SEM (panel superior) y AFM (panel inferior) obtenidas para los tres tipos de GO estudiados, A y D: GO, B y E: pErGO, C y F: ErGO

Para el caso de los sustratos con películas de pErGO y ErGO, las características morfológicas cambian respecto de la formación de arrugas y pliegues, aun cuando se observan regiones de mayor contraste en las imágenes SEM. Al eliminar parte de los grupos funcionales de oxígeno, también se distingue en las imágenes AFM que a medida que reducen estos grupos del GO parcial, y totalmente, se reduce la rugosidad de las películas (RMS). A su vez, se pudo observar que la rugosidad que aporta a estos valores por los sustratos sin óxidos de grafenos corresponde a los valores informados por el fabricante, ($\sim 7\text{\AA}$).

3.3.5 Comportamiento electroquímico

Electrodos de GO, pErGO y ErGO sobre ITO

En la figura 3.17 se observan los gráficos Nyquist para los diferentes electrodos en solución PBS con 1mM de ferroceno-metanol como mediador electrónico. Los datos obtenidos pueden ajustarse de acuerdo con un circuito equivalente Randles ($R_s(CPE[R_{CT}W])$), donde R_s es la resistencia de la solución, contactos, etc., CPE representa la capacitancia de la doble capa eléctrica, R_{CT} es la resistencia de transferencia de carga en la interfase electrodo-solución, y W es la impedancia Warburg, que resulta de la impedancia de la corriente debido a la difusión de especies electroactivas desde el seno de la solución a la interfase del electrodo.

En la figura 3.17 se puede observar que el diámetro del semicírculo se reduce de manera inversamente proporcional al número de ciclos de reducción de los electrodos, lo que indica una resistencia de transferencia de carga (R_{CT}) menor entre el mediador redox y la superficie del electrodo.

De acuerdo con el circuito equivalente utilizado, es posible calcular la R_{CT} para cada electrodo (Figura 3.17, *inset*) obteniéndose información acerca de las características electrónicas. Para el caso del GO/ITO la R_{CT} fue de 2,70 k Ω , mientras que este valor decrece a 1,15 k Ω y 0,09 k Ω para pErGO y ErGO respectivamente. Este comportamiento observado, puede ser atribuido al mejoramiento de las propiedades de transferencia electrónica restituidas a partir

de la eliminación de los grupos funcionales de oxígeno producto de las reducciones electroquímicas realizadas.

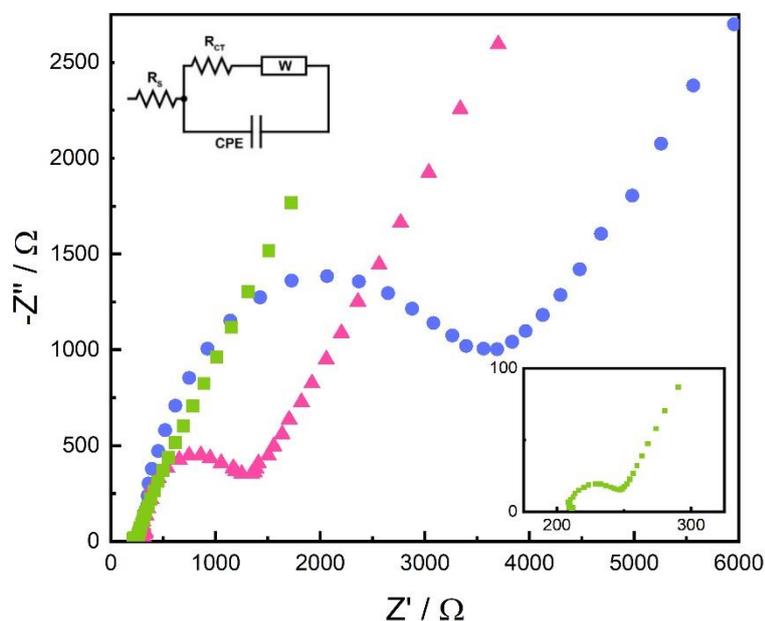


Figura 3.17 – Gráfico Nyquist para los sustratos GO/ITO (círculos azules), pErGO/ITO (triángulos magenta) y ErGO/ITO (cuadrados verdes) en PBS con 1mM de ferrocenometanol como mediador redox. El *inset* superior de la figura corresponde al circuito equivalente utilizado en el ajuste. El *inset* inferior corresponde al espectro de ErGO ampliado

A su vez se evaluaron las respuestas voltamperométricas de los tres tipos de electrodos con el fin de reconocer diferencias en la respuesta de corriente respecto a diversos valores de potenciales. En la Figura 3.18 se muestran los voltamperogramas obtenidos, en los cuales se observan los picos de corriente correspondiente a la cupla redox del ferrocenometanol utilizado como medidor. En los voltamperogramas se nota que a medida que el GO se reduce, el potencial de separación de picos (ΔE_p) disminuye hasta valores cercanos a los teóricos (59mV) para procesos reversibles. Valores menores de ΔE_p indica una mayor reversibilidad del sistema. Para GO, pErGO y ErGO se calculó este parámetro que se indica en la tabla 2. Por otra parte, la corriente de pico (i_p) para cada electrodo también es un indicador de la reversibilidad del sistema, y es deseado, en términos analíticos, mayores i_p debido a que podría traducirse en una mejor respuesta analítica en su potencial uso como plataforma de biosensado.

En el caso de los sistemas analizados, se observan diferencias significativas entre el GO y los dos sustratos reducidos (pErGO y ErGO). En la

tabla 2 se expresan los parámetros obtenidos con al menos tres sustratos de cada óxido de grafeno.

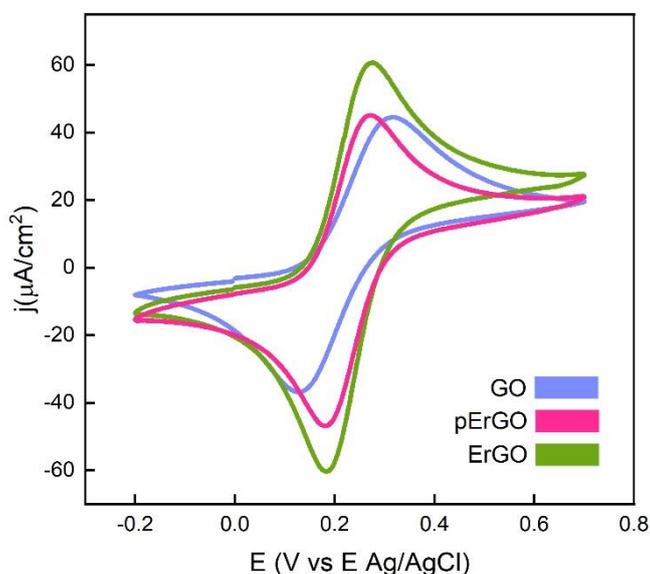


Figura 3.18. Voltamperogramas cíclicos obtenidos para GO (azul), pErGO (magenta) y ErGO(verde) en PBS pH 7.4 conteniendo 1mM de ferroceno-metanol. Los CVs se realizaron a 22°C y velocidad de barrido 10 mV/s

Por otra parte, se evaluó la respuesta de los electrodos de acuerdo a la variación de velocidades de barrido (ν). En la 3.19 se presentan los voltamperogramas obtenidos para electrodos de ErGO y el gráfico de corrientes pico (i_p) vs. $\nu^{1/2}$. Los experimentos se realizaron variando las velocidades de

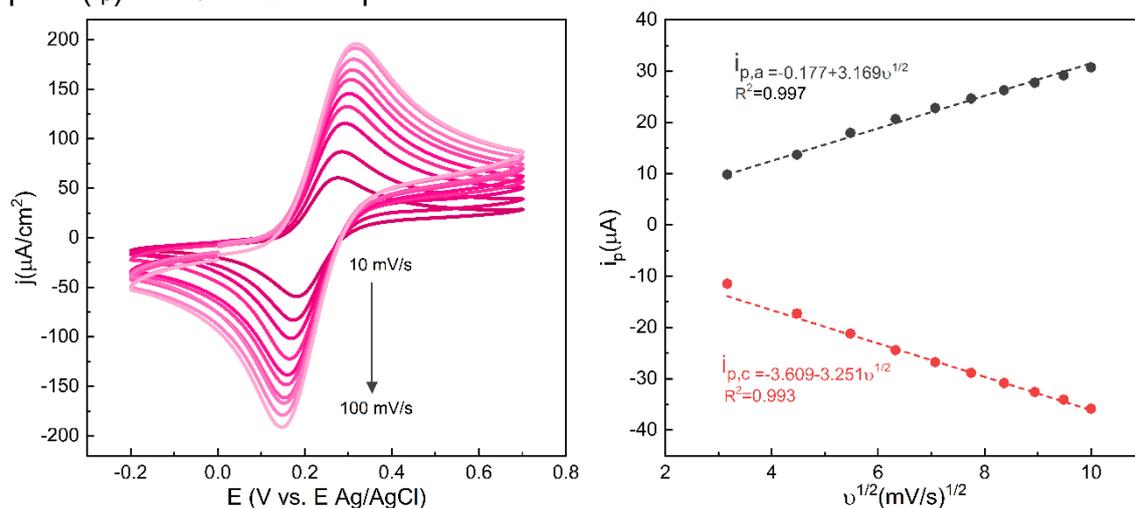


Figura 3.19. (Izq.) Voltamperogramas cíclicos obtenidos para ErGO en PBS pH 7.4 conteniendo 1mM de ferroceno-metanol a velocidades de barrido (ν) de 10 a 100 mV/s (Der.) Relación entre $\nu^{1/2}$ y corrientes pico anódicas y catódicas.

barrido a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 mV/s. La linealidad observada en (i_p) vs. $v^{1/2}$ para las corrientes anódicas y catódicas revela que el mecanismo de transporte de masa en la interfase del electrodo es controlado por difusión.

Tabla 2 – Parámetros electroquímicos de electrodos de GO, pErGO y ErGO

	ΔE_p (mV)	j_{pa} ($\mu A/cm^2$)	j_{pc} ($\mu A/cm^2$)	R_{CT} (k Ω)
GO	184,6	37,3	-39,1	$2,70 \pm 0,14$
pErGO	112,3	41,4	-46,1	$1,15 \pm 0,12$
ErGO	75,7	50,8	-44,6	$0,09 \pm 0,01$

Los parámetros ΔE_p , j_{pa} y j_{pc} fueron extraídos de las voltamperometrías cíclicas de los electrodos basados en GO con ferroceno-metanol 1mM como mediador redox en PBS, pH 7,4 a 22°C con una velocidad de barrido de 10 mV/s. ΔE_p es la diferencia entre el potencial del pico anódico y el potencial del pico catódico. j_{pa} y j_{pc} corresponden a las densidades de corriente de los picos anódicos y catódicos, respectivamente. La resistencia de transferencia de carga (R_{CT}) fue obtenido a través del ajuste de un circuito Randles equivalente, $R_s(CPE[R_{CT}W])$, a los datos obtenidos a través de EIS. Todos los valores representan la media de al menos tres experimentos independientes.

Ensamblados de Nanohilos de Plata sobre GO/ITO

Respecto a los ensamblados de AgNWs se evaluaron las propiedades electroquímicas a fin de analizar una posible mejora en la respuesta debido a la interconexión con las láminas de GO. Para ello se llevaron a cabo medidas de EIS para analizar las características resistivas de los electrodos. En la figura 3.20 se muestran los gráficos de Nyquist obtenidos, observándose diagramas similares para GO/ITO y AgNWs/GO/ITO. Luego de ajustar los datos de acuerdo con un circuito equivalente Randles ($R_s(CPE[R_{CT}W])$) se calcularon los valores de R_{CT} notándose valores sin cambios significativos respecto a los valores obtenidos sin la modificación con AgNWs. Para el electrodo AgNWs/GO/ITO el valor calculado luego de tres experimentos independientes fue de $2,74 \pm 0,22$ (k Ω).

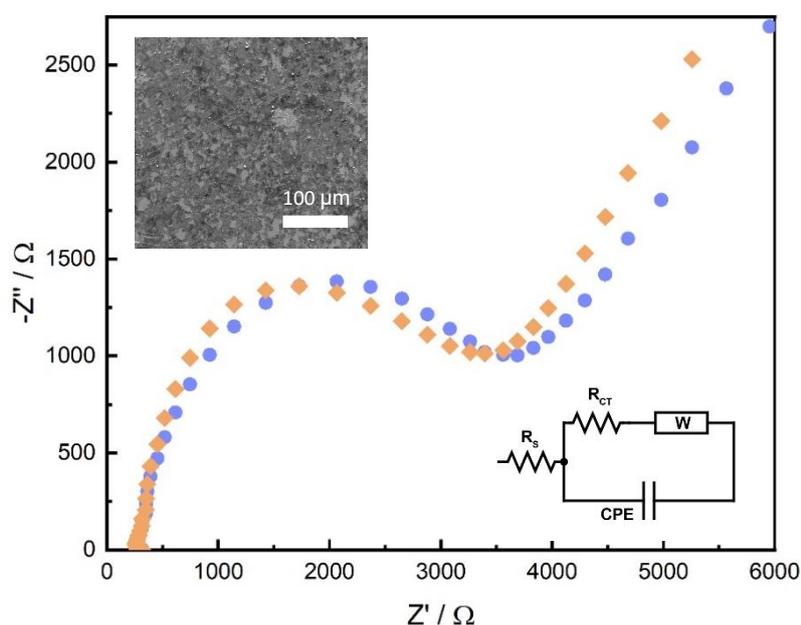


Figura 3.20. Gráfico Nyquist para los sustratos GO/ITO (círculos azules) y AgNWs/GO/ITO (rombos naranjas) en PBS con 1mM de ferroceno-metanol como mediador redox. El *inset* inferior de la figura corresponde al circuito equivalente utilizado en el ajuste. El *inset* superior de la figura corresponde a la imagen SEM del electrodo AgNWs/GO/ITO posterior a la medición de EIS.

Bajo la hipótesis de que la falta de mejoras en las propiedades electroquímicas de los electrodos frente a la modificación con AgNWs se debía a la inestabilidad del ensamblado, se corroboró a través de SEM la morfología del área expuesta del electrodo luego de realizar las medidas de EIS (figura 3.20, *inset* superior). La misma muestra la ausencia de AgNWs, confirmando que la interacción con el GO es débil cuando se somete al electrodo a estar en contacto con una solución acuosa (electrolito).

3.4 Conclusiones Parciales

En este capítulo se ha demostrado la capacidad de la balanza LB para ensamblar monocapas de GO sobre sustratos sólidos mostrando que a las presiones superficiales utilizadas la morfología de las películas permanece invariable en repetidos experimentos confirmando un protocolo reproducible para obtener una superficie cubierta de GO prácticamente en su totalidad. La

rugosidad calculada permite inferir que existen dominios multicapas que son producto de las interacciones entre láminas de GO. Los ensamblados de rGO sobre ITO se lograron realizando un protocolo en dos pasos, reduciendo películas de GO previamente depositadas sobre estos soportes, utilizando voltamperometrías cíclicas para tal fin. Esta metodología arrojó resultados similares a los obtenidos a través de la reducción térmica, permitiendo además disminuir los tiempos experimentales y obtener especies parcialmente reducidas (pErGO). Las características morfológicas de los sustratos con rGO presentan diferencias respecto a los electrodos con GO, como consecuencia de la eliminación de los grupos funcionales de oxígeno de la estructura. Por otra parte, se pudo comprobar un mejoramiento en la respuesta electroquímica para los sustratos reducidos observándose una mejoría en los parámetros electroquímicos de acuerdo a la aplicación buscada como objetivo de esta tesis a medida que se reduce el GO a ErGO.

Respecto a los ensamblados con AgNWs, se mostró una interacción inestable de los AgNWs con GO luego de someter los sustratos en contacto con una solución electrolito, corroborando que luego de medidas electroquímicas, estas estructuras se resuspenden y eliminan de la superficie modificada con GO.

En el capítulo siguiente se aborda la modificación de los electrodos de GO, pErGO y ErGO con glucosa oxidasa, debido a la respuesta obtenida en los experimentos de este capítulo, discontinuando el enfoque de mejoramiento con AgNWs para mejorar la respuesta electroquímica.

Capítulo 4

Ensamblado de biointerfases para la
detección de glucosa

4.1 Introducción

En el capítulo anterior se caracterizaron las capacidades electroquímicas de las plataformas generadas de óxido de grafeno, GO; óxido de grafeno parcialmente reducido electroquímicamente, pErGO; y óxido de grafeno reducido electroquímicamente, ErGO. La presencia de grupos funcionales de oxígeno dota a estos electrodos de la capacidad de modificación con moléculas que sean de interés en el desarrollo de dispositivos que utilicen las propiedades del grafeno como transductores para señales electroquímicas de analitos relevantes. Particularmente en este capítulo se detallan las propiedades de ensamblados enzimáticos sobre las superficies antes mencionadas.

La utilización de enzimas, aprovechando sus capacidades catalíticas únicas, ha sido abordada por diversos autores en el desarrollo de plataformas de biosensado. En particular las enzimas redox catalizan reacciones bioquímicas en las que intervienen electrones para oxidar o reducir los sustratos específicos de estas biomoléculas, posibilitando su cuantificación mediante técnicas electroquímicas que detecten el flujo de electrones propio de la catálisis. Existen diversos enfoques en la construcción de biosensores enzimáticos de acuerdo al acoplamiento electrónico entre las enzimas redox y las superficies de los electrodos, que pueden ser agrupados en tres categorías de acuerdo al mecanismo en que se realice el intercambio electrónico: (i) primera generación, aquellos que monitorean la electrocatálisis del consumo de sustratos o formación de productos; (ii) segunda generación, basados en la restauración electrocatalítica de mediadores redox (MET, por sus siglas en inglés); y (iii) tercera generación, aquellos que realizan transferencia electrónica directa (DET, por sus siglas en inglés) entre el sitio activo de las enzimas y el electrodo.¹⁷³ Si bien la transferencia electrónica directa es deseable, conlleva desafíos en la inmovilización enzimática sobre el electrodo, de manera que los sitios activos estén situados a distancias cortas de la superficie del electrodo. A los fines de este trabajo de Tesis, en la que se desarrollan biointerfases para la detección de glucosa desde el enfoque del nanomaterial se realizarán ensamblados de segunda generación, mediante los cuales se cuantificará el flujo electrónico producto de la catálisis entre el mediador redox y el electrodo modificado.

En este capítulo se aborda el estudio de interacciones entre la glucosa oxidasa (GOx) y las superficies desarrolladas de GO, pErGO, y ErGO con estrategias de inmovilización para dilucidar posibles grupos funcionales de oxígeno que intervengan en este proceso, como también la respuesta electrocatalítica de cada una de las plataformas.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Reactivos

La glucosa oxidasa (GOx) de *Aspergillus niger* para la fabricación de biointerfases estudiadas en este capítulo fue adquirida de Sorachim SA., Suiza. Las soluciones de GOx fueron preparadas en PBS para el caso de la inmovilización directa, y en buffer HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperacina-1-etanosulfónico), para los experimentos de conjugación enzimática. Los reactivos utilizados para los experimentos de conjugación enzimática, EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato), NHS (N-hidroxisuccinimida) y etanolamina fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Merck). Las soluciones de dichos reactivos fueron preparadas en buffer MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico). Las soluciones utilizadas para los experimentos SPR fueron realizadas en PBS. Los sustratos de vidrio recubiertos en oro para dichas medidas fueron comprados a BioNavis Ltd., Finlandia. Las medidas electroquímicas presentadas en este capítulo se realizaron con una solución 1 mM de ferrocenometanol en PBS, pH 7,4.

4.2.2 Ensamblado de glucosa oxidasa sobre electrodos basados en grafenos

Los sustratos de GO, pErGO y ErGO fueron modificados con glucosa oxidasa (GOx) poniéndolos en contacto con una solución de GOx 10 μ M en PBS por 1h. Posteriormente los electrodos fueron enjuagados abundantemente con solución PBS a pH 7,4 para remover de la superficie las enzimas que no fueron inmovilizadas sobre los óxidos de grafenos. La incubación de las enzimas se realizó *in-situ* en la celda electroquímica para modificar únicamente la región expuesta con el electrolito.

4.2.3 Conjugación enzimática

Para el análisis SPR de los electrodos de GO, pErGO y ErGO y su capacidad de funcionalización con GOx, se utilizaron EDC y NHS como activantes de los grupos carboxilos presentes en los óxidos de grafeno, para la reacción de conjugación entre los grupos carboxilos presentes en la superficie de los electrodos de grafenos y los grupos aminas de las enzimas para formar enlaces del tipo amida. Los grupos carboxilos fueron activados con una solución 50mM de EDC y 125mM NHS en buffer MES. Luego del paso de la activación, los electrodos fueron enjuagados con buffer MES y puestos en contacto con una solución de GOx 10 μ M en 50mM de buffer HEPES. Posteriormente los sustratos fueron enjuagados con buffer y tratados con una solución 1M de etanolamina para desactivar los carboxilatos remanentes mediante la reacción con etanolamina. Las reacciones de conjugación fueron realizadas *in-situ* en la celda de microfluídica presente en el equipo SPR utilizado a velocidades de flujo variables hasta optimizar la conjugación.

4.2.4 Espectroscopía de plasmones superficiales

Los experimentos de resonancia de plasmones superficiales multiparamétricos (MP-SPR) fueron realizados en un instrumento SPR-Navi 210^a (BioNavis Ltd.). Todos los experimentos mencionados en este capítulo fueron llevados a cabo a una velocidad de flujo entrante a la celda de 10 μ L/min en PBS pH 7,4 a 22°C para el caso de la inmovilización directa con GOx. La concentración utilizada de la GOx fue de 10 μ M en solución buffer PBS. Para la conjugación con EDC/NHS, las velocidades de flujo permanecieron constantes, y los tiempos de reacción para cada etapa fueron de 10min para la activación, 10 minutos para la incubación con GOx y posteriormente lavado con buffer.

Para estimar la superficie cubierta por GOx, el ángulo SPR de mínima reflectividad, θ_{\min} , fue medido *in-situ* durante el proceso de adsorción. Luego, los cambios en el ángulo de mínima reflectividad, $\Delta\theta$, fueron convertidos a cobertura superficial en masa, Γ (ng/cm²), utilizando la ecuación de De Feijter:^{174,175} Esta ecuación puede modificarse de acuerdo a los parámetros medibles en los

experimentos SPR de acuerdo con la ecuación 4.1 la cual relaciona la cobertura superficial (Γ) con el índice de refracción de la superficie (η_p) y el índice de refracción del medio (η_m), el incremento del índice de refracción ($d\eta/dc$) y el espesor de la superficie (d_p):

$$\Gamma = \frac{(\eta_p - \eta_m) \cdot d_p}{d\eta/dc} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

Los cambios en el ángulo mínimo SPR ($\Delta\theta$) son proporcionales a los cambios en los índices de refracción,¹⁷⁶

$$(\eta_p - \eta_m) = \Delta\eta = \Delta\theta \cdot k \quad \text{Ecuación 4.2}$$

donde la constante k es el coeficiente de sensibilidad del instrumento. De acuerdo con las ecuaciones 4.1 y 4.2, la ecuación para la cobertura de la superficie puede escribirse como:

$$\Gamma = \frac{\Delta\theta \cdot k \cdot d_p}{d\eta/dc} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

Para películas delgadas ($d_p < 100$ nm), el valor de $k \cdot d_p$ es aproximadamente constante¹⁷⁷ y, para soluciones buffer en contacto con sensores de Au irradiados a 670 nm de longitud de onda del láser, es de: $1,9 \times 10^{-7}$ cm/deg. A su vez, con el valor de $d\eta/dc$ para una capa densa de GOx: ($1,77 \times 10^{-10}$ cm³/ng),¹⁷⁸ es posible estimar el cubrimiento en el área evaluada para cada valor de $\Delta\theta$ medido.

Para las medidas con ErGO y pErGO, la reducción electroquímica del GO se llevó a cabo en una celda *in-situ* de tres electrodos acoplada al instrumento SPR, donde el sustrato de oro fue utilizado como electrodo de trabajo, un cable de platino como contraelectrodo y un cable Ag/AgCl como un pseudo-electrodo de referencia.

4.2.5 Técnicas electroquímicas

Los experimentos de voltamperometrías cíclicas (CV) y espectrometría de impedancia electroquímica (EIS) fueron realizadas en un potenciostato Autolab PGSTAT302N (Metrohm®) en una celda electroquímica de PTFE convencional de tres electrodos con una ventana expuesta de 0,18 cm², utilizando un electrodo

de Ag/AgCl (3M KCl) como electrodo de referencia, y un contraelectrodo de platino. Todas las medidas presentes en este capítulo se realizaron a una temperatura de 22°C burbujeando N₂ durante 30min. para desplazar el O₂ disuelto en el electrolito.

Las condiciones de medidas fueron realizadas bajo los potenciales mencionados en la sección 3.2.7, (-0,2 a 0,7 V vs Ag/AgCl (3M KCl)) a una velocidad de barrido de 10 mV/s utilizando una solución de buffer PBS con 1 mM de ferroceno-metanol para el caso de las CV. Los experimentos de electrocatálisis fueron realizados en las mismas condiciones con el agregado de glucosa en la celda electroquímica a distintas concentraciones a fin de evaluar la capacidad electrocatalítica de cada uno de los sustratos construidos.

Los espectros de impedancia se realizaron en un rango de frecuencias de 10⁶-10⁻¹ Hz con una perturbación de 10 mV a 0,25 V en solución PBS con 1mM de ferroceno-metanol.

Los experimentos de voltamperometría de pulso diferencial (DPV) se realizaron desde -0,2 a 0,7 V vs Ag/AgCl (3M KCl), con una amplitud de 25 mV, y un aumento de potencial por cada pulso de 5 mV. Los tiempos de modulación y de intervalo fueron para todas las medidas de 0,05 s y 5 s respectivamente.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Ensamblado de biointerfases de GO, pErGO y ErGO con glucosa oxidasa

Los electrodos ensamblados a partir de GO sobre ITO y sometidos a la reducción electroquímica, como se detalla en la sección 3.3.1, fueron tratados con una solución de GOx en PBS para construir las biointerfases quimioresponsivas analizadas en este capítulo. A su vez, y para evaluar la naturaleza de inmovilización de las enzimas sobre las superficies modificadas con óxidos de grafenos, se realizó la conjugación química mediada por EDC/NHS a fin de comparar la naturaleza del anclaje enzimático en ausencia de estos reactivos.

A fin de evaluar la capacidad de funcionalización de los electrodos construidos, se realizaron experimentos de Espectroscopía de Plasmones Superficiales (SPR) modificando los sustratos en condición de saturación

respecto a GOx por los dos métodos mencionados en las secciones 4.2.2 y 4.2.3, respectivamente. Para llevar a cabo estos experimentos, primero fue depositado el GO en un sustrato preparado para SPR que consiste en un vidrio con una película de espesor nanométrico de Au (50nm) para evaluar, a través de los plasmones de estos átomos, las variaciones en la superficie del electrodo.

El instrumental utilizado para los experimentos SPR permite realizar medidas electroquímicas *in-situ*, por lo que la reducción del pErGO y ErGO se realizaron de ese modo, en las mismas condiciones experimentales realizadas en las secciones previamente mencionadas.

La figura 4.1 muestra los cambios observados en el ángulo mínimo de reflectancia (θ_{\min}) cuando GOx interacciona con los sensores de Au con los distintos óxidos de grafeno. La señal SPR es originada por los cambios en el índice de refracción a medida que la solución buffer es desplazada de la superficie por la molécula adsorbida. La exposición inicial de la solución GOx condujo rápidamente a un aumento en la θ_{\min} seguido de una meseta para todos los sustratos utilizados. El enjuague con PBS se realizó para remover las biomoléculas que no fueron ancladas en las superficies, y como se muestra en la figura 4.1, no se evidenciaron cambios significativos luego del lavado, sugiriendo una interacción fuerte y eficiente con las superficies tanto del GO como del pErGO y ErGO.

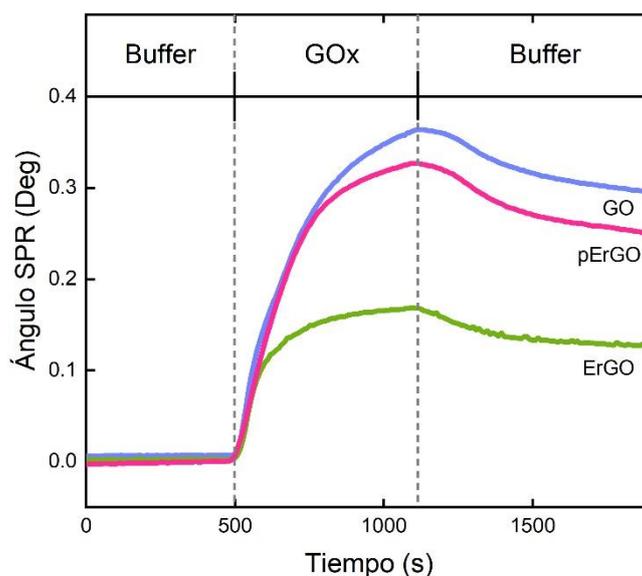


Figura 4.1. Sensogramas obtenidos para la adsorción de GOx en PBS sobre sustratos de GO (azul), pErGO (magenta), y ErGO (verde).

Se puede observar, que la capacidad de inmovilización de GOx en los sustratos aumenta proporcionalmente al grado de oxidación del GO, que es consistente con la proporción de grupos funcionales epóxidos y carbonilos en la superficie del sensor. Estos grupos funcionales presentes en los óxidos de grafeno, además de interactuar de manera no covalente, pueden ser usados para la conjugación de GOx en un procedimiento de un paso. Las aminas primarias en los residuos de lisina de la GOx reaccionan con grupos epóxidos y carbonilos para formar aminas secundarias y bases Schiff, respectivamente.¹⁷⁹ De esta manera, controlando el contenido de los grupos funcionales de oxígeno en la superficie de los sustratos se permitiría optimizar el anclaje de GOx y consecuentemente la respuesta química de los ensamblados enzimáticos basados en GO.

Si bien la cobertura de la enzima sobre las tres superficies analizadas se corresponde con lo esperado de acuerdo con el grado de oxidación en cada uno de los casos, se realizó el cálculo de la relación en masa de la cantidad de enzima inmovilizada combinada con la concentración atómica de los grupos funcionales de C-O-C y C=O para cada superficie, calculada a través de los espectros XPS (sección 3.3.3). En todos los casos, la relación calculada fue similar para las condiciones estudiadas. (ver tabla 3)

Tabla 3. Cobertura superficial de GOx (Γ_{GOx}) determinado por SPR

	Muestra		
	GO	pErGO	ErGO
$\Delta\theta$ (deg)	0,30	0,26	0,13
Γ_{GOx} (ng/cm ²)	168,4	146,3	72,9
Relación $\Gamma_{GOx}/\%(C=O+C-O-C)$	4,2	4,9	4,5

4.3.2 Mecanismos de interacción entre electrodos basados en GO y GOx

A partir de lo observado en la figura 4.1, y analizando la naturaleza en la interacción analizada por SPR, se sugiere que parte del mecanismo de inmovilización de las enzimas sobre las superficies de óxidos de grafeno podría deberse a la formación de aminas secundarias y bases Schiff, además de las

interacciones débiles esperadas para estos sistemas (puentes de hidrógeno, interacciones del tipo dipolo-dipolo, etc.)

Posteriormente se realizaron medidas similares a las realizadas en la sección anterior, utilizando como activadores en la inmovilización EDC y NHS para analizar posibles diferencias con las interacciones observadas en ausencia de estos reactivos. La reacción de conjugación esperada se muestra en la figura 4.2, en la cual mediante la activación de los carboxilos presentes en la estructura de GO, pErGO y ErGO reaccionarían estos grupos activados con los residuos de $-NH_2$ de la glucosa oxidasa.

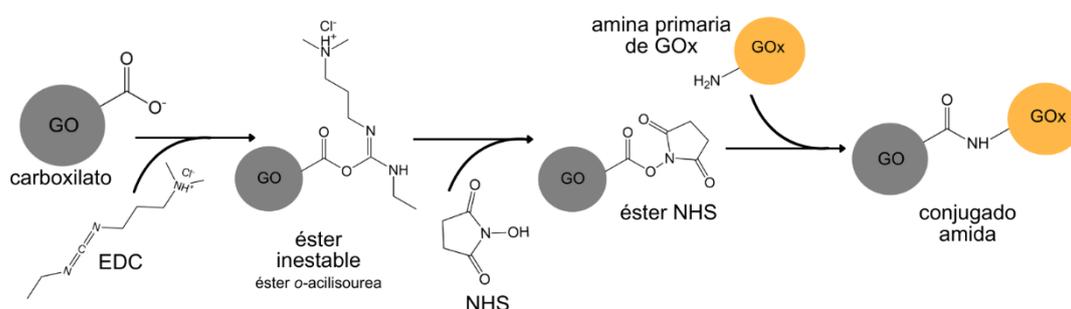


Figura 4.2. Esquema de la reacción de conjugación mediada por EDC y NHS entre los grupos carboxilatos presentes en la estructura de GO, pErGO y ErGO, y los residuos de aminas de la glucosa oxidasa

En la figura 4.3 se muestran los sensogramas obtenidos, comparándolos con los realizados mediante la modificación de los electrodos por inmovilización directa con GOx. De los resultados se puede notar que no existen diferencias significativas en el ángulo mínimo de reflectancia respecto al anclaje de enzimas sobre las superficies. En el caso particular del sensograma para la plataforma de GO, hay un aumento en el ángulo SPR mayor al producirse la activación de la superficie con EDC/NHS que podría atribuirse a la mayor formación del éster succinimida producto de la reacción entre NHS y los carboxilatos activados con EDC del GO. Si bien en el capítulo anterior se cuantificaron los grupos funcionales para cada electrodo (GO, pErGO y ErGO), la proporción relativa se mantuvo invariable para los tres tipos de grafenos, aunque los valores absolutos de cada grupo funcional podrían explicar la diferencia observada en el caso de

la reacción del GO con GOx mediada por EDC y NHS. Sin embargo, no es posible aseverar esta hipótesis con los resultados presentes en esta sección.

Con el objetivo de realizar un análisis más exhaustivo que para cuantificar la capacidad de funcionalización de cada sustrato, los cambios de ángulos calculados por SPR fueron convertidos a la carga en función de la masa a través de la ecuación de De Feijter (ecuación 4.3). El cambio en la señal SPR correspondiente a la adsorción de GOx en GO fue de 0.30 deg. que se traduce en la carga de 1.05×10^{-12} mol/cm² de GOx, mientras que la cobertura de la enzima para pErGO y ErGO fue de 0.92×10^{-12} mol/cm² y 0.46×10^{-12} mol/cm², respectivamente.

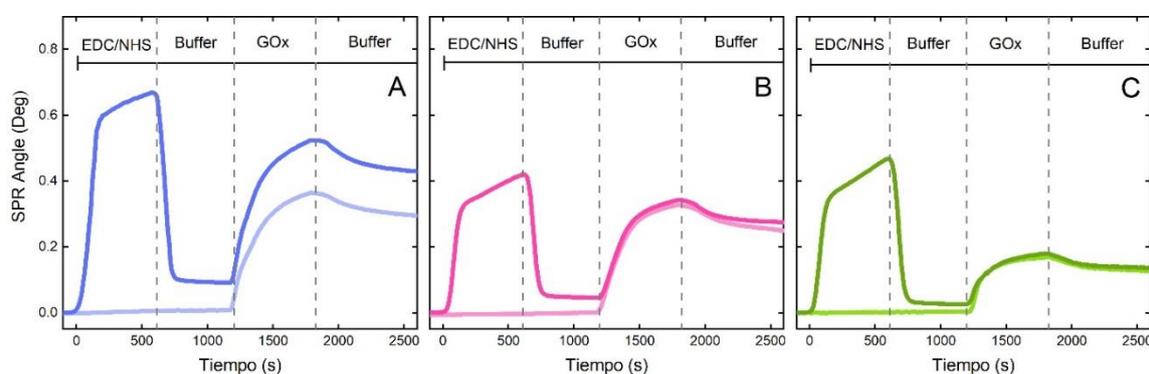


Figura 4.3. Sensogramas obtenidos para la conjugación de GOx mediada por EDC/NHS sobre sustratos de GO (azul), pErGO (magenta), y ErGO (verde). Las líneas con una tonalidad menor indican la comparación con los resultados obtenidos para la adsorción de GOx en PBS.

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que, bajo las condiciones experimentales utilizadas, la inmovilización de la glucosa oxidasa procede, además de a través de interacciones débiles, mediante de enlaces covalentes con los grupos funcionales del GO, en lugar de interacciones del tipo π - π como se reporta para otras proteínas.¹⁸⁰ Si bien este tipo de interacciones son predominantes en proteínas que presenta un alto grado de residuos hidrofóbicos con los electrones deslocalizados de la red gráfica del GO y sus derivados,¹⁸¹ en el caso de la GOx, las interacciones del tipo hidrofóbicas se ven obstaculizadas debido al alto grado de glicosilación que presenta esta enzima.¹⁸²

Análisis de Interacción de GO, pErGO y ErGO con aminoferroceno

Con el fin de validar la vía por la cual la GOx se ancla sobre las superficies de GO, pErGO y ErGO de manera covalente realizamos los mismos protocolos de inmovilización con aminoferroceno ($C_{10}H_{11}FeN$) por contacto directo con los electrodos, poder analizar a través de experimentos XPS y voltamperometrías de pulso diferencial (DPV) los grupos funcionales comprometidos en el proceso de inmovilización. Los sustratos de GO, pErGO y ErGO fueron modificados con aminoferroceno poniendo en contacto las superficies con una solución de $10 \mu M$ de aminoferroceno en PBS por 1hs. Los electrodos fueron enjuagados posteriormente con PBS, y la composición química fue analizada a través de XPS.

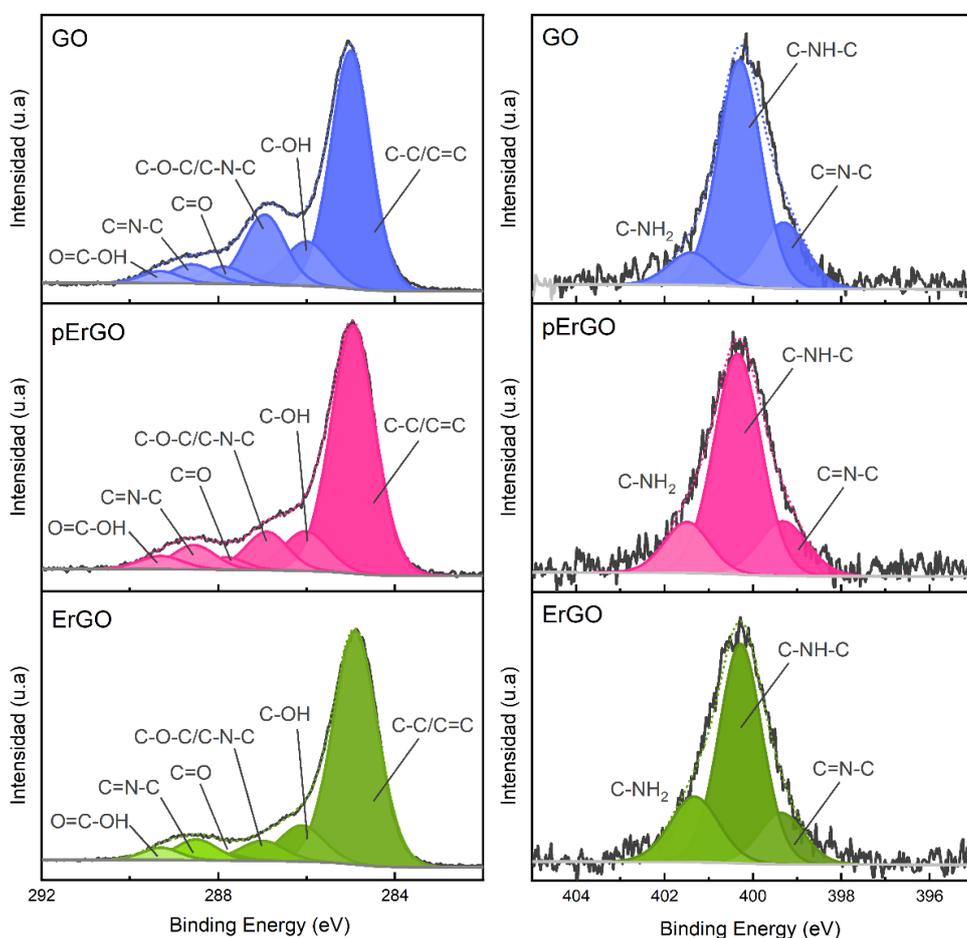


Figura 4.4. Espectros XPS para la señal C1s (panel izquierdo) y N1s (panel derecho) para electrodos de GO, pErGO y ErGO funcionalizados con aminoferroceno.

Una de las dificultades para poder evaluar los grupos funcionales que intervienen en la inmovilización con la GOx, es que esta enzima presenta un gran número de residuos de lisinas, por lo que realizar espectros XPS puede brindar

información equívoca para distinguir los enlaces de nitrógeno formados entre la proteína y los grupos funcionales de los grafenos. Es por ello, que utilizando aminoferroceno en lugar de GOx para analizar la naturaleza de las interacciones permite cuantificar que grupos reaccionan con la amina primaria de esta molécula. La presencia de hierro en esta molécula permite también identificar este elemento por las técnicas propuestas.

En la figura 4.4 se observan las intensidades de las señales de C1s y N1s para los electrodos modificados con aminoferroceno. Las componentes se ajustaron a partir de la asignación de valores de energías para cada grupo funcional probable de acuerdo con la bibliografía y ajustando a la señal obtenida experimentalmente a funciones Lorentzianas/Gaussianas.¹⁸³ La intensidad de la señal para cada componente fue calculada a partir de la integración de cada pico luego de la sustracción del fondo de los espectros. Para cuantificar los porcentajes atómicos relativos de cada componente, todos los espectros fueron normalizados utilizando la señal Si2p del ITO como referencia. Para el caso de la señal de N-1s (figura 4.4 – panel derecho) es posible asignar mayoritariamente las contribuciones a la formación de enlaces covalentes entre los grupos aminos del aminoferroceno y los grupos carbonilos y epoxi presentes en la superficie de los sustratos de GO, pErGO, y ErGO, para formar aminas secundarias (400,3 eV) y bases Schiff (399,3 eV), respectivamente. La componente observada a 401,4 eV puede ser atribuida a aminas primarias, que indican la fisisorción del aminoferroceno.¹⁸⁴ Además, esta señal aumenta con la reducción en la densidad de grupos funcionales de oxígeno en los sustratos evaluados, que promueve las interacciones no covalente π - π entre la estructura del grafeno y los anillos ciclopentadienilos del ferroceno. La cuantificación de todas las contribuciones se encuentra en la tabla 4.

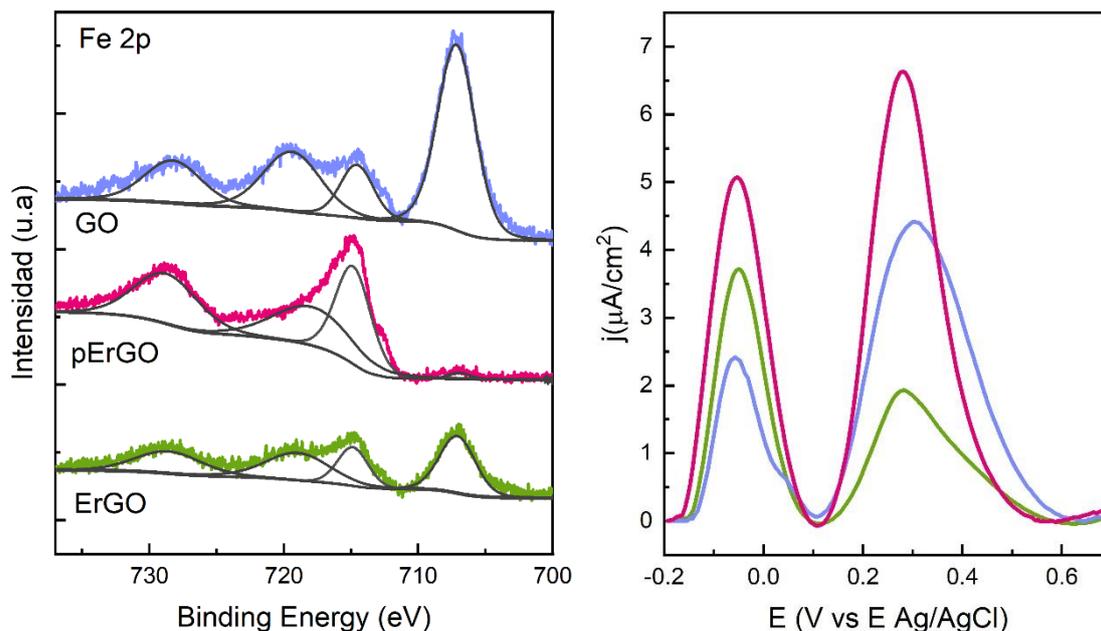


Figura 4.5. (Izq.) espectros XPS para la señal Fe 2p para electrodos de GO, pErGO y ErGO funcionalizados con aminoferroceno. (Der.) Voltagramas de pulso diferencial para los electrodos de GO (azul), pErGO (magenta) y ErGO (verde) modificados con aminoferroceno en PBS pH 7,4.

Los espectros XPS para la señal Fe-2p para los electrodos basados en óxidos de grafeno funcionalizados con aminoferroceno (figura 4.5, panel izquierdo) también muestran una correlación entre el grado de oxidación de los óxidos de grafeno y la intensidad en la señal de Fe-2p. Los porcentajes atómicos relativos para el Fe en GO, pErGO y ErGO fueron estimados en 4,09%, 2,94% y 1,76%, respectivamente. A su vez, los electrodos fueron analizados a través de voltamperometría de pulso diferencia (DPV) para analizar los picos característicos para el aminoferroceno (figura 4.5, panel derecho). Los resultados obtenidos no fueron concluyentes debido a la presencia de dos picos en los experimentos.^{185,186} El pico de corriente para los tres electrodos ubicados entre 280-300 mV podría asignarse al aminoferroceno adsorbido en la superficie de los electrodos, de manera coincidente con los resultados encontrados para la caracterización mediante XPS. Sin embargo, los picos de corriente ubicados a potenciales menores podrían deberse al aminoferroceno en solución producto de la desorción de la superficie. A pesar de haberse obtenido resultados no esperados debido a la presencia de dos picos, para las señales atribuidas potencialmente al aminoferroceno enlazado se observa que la señal que fue

medida en la modificación del pErGO tiene el mayor valor de corriente, seguido de GO y ErGO, respectivamente, manteniéndose la correlación observada hasta estos experimentos respecto de la respuesta electroquímica. Esta información obtenida es consistente con resultados mostrados previamente respecto a la cobertura enzimática evaluada por SPR. La señal electroquímica mayor que los otros electrodos indica que puede existir esta condición en la que la pérdida de grupos funcionales durante la reducción mejora la respuesta electroquímica, pero sin perder la capacidad de funcionalización química.

Tabla 4. Energía de ligadura (BE) y porcentajes atómicos relativos para espectros XPS de la señal N 1s de GO, pErGO y ErGO funcionalizados con aminoferroceno.

Contribuciones asignadas	BE (eV)	Muestra		
		GO	pErGO	ErGO
C=N-C	399,3	21,1	17,4	15,4
C-NH-C	400,3	68,7	67,6	63,3
C-NH ₂	401,4	10,2	15,0	21,3

4.3.3 Análisis electrocatalítico

Luego de ensamblar las plataformas de GO, pErGO y ErGO con glucosa oxidasa, se evaluó la capacidad electrocatalítica a partir del análisis de voltamperometrías cíclicas utilizando concentraciones crecientes de glucosa.

Inicialmente, se realizaron experimentos de espectroscopia de impedancia electroquímica para los electrodos luego de la modificación con GOx para evaluar cualitativamente de qué manera afecta la inmovilización de la enzima a la transferencia electrónica por la modificación de la superficie de los electrodos.

Como se observa en la figura 4.6, en los tres electrodos existe un aumento en la impedancia electroquímica luego de la modificación con GOx. En todos los casos estudiados, esta modificación no sólo indica que efectivamente la superficie de los electrodos es alterada por la enzima, sino que, lógicamente se espera que la respuesta electroquímica se vea disminuida por esta modificación. Para evaluar de qué manera la funcionalización química del grafeno compromete la actividad electrocatalítica con glucosa oxidasa, realizamos la comparación de los resultados obtenidos de las voltamperometrías cíclicas realizadas en presencia de glucosa para los tres tipos de electrodos construidos.¹⁸⁷

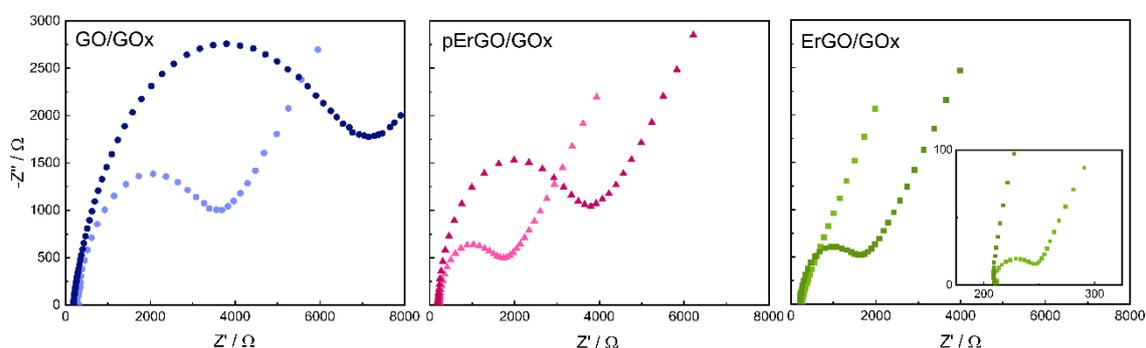


Figura 4.6. Gráfico Nyquist para los electrodos funcionalizados con GOx sobre GO/ITO (círculos azules), pErGO/ITO (triángulos magenta) y ErGO/ITO (cuadrados verdes) en PBS con 1mM de ferroceno-metanol como mediador redox. Las tonalidades más oscuras corresponden a los espectros con GOx.

Los experimentos de voltamperometrías cíclicas utilizando concentraciones crecientes de glucosa muestran picos bien definidos característicos de la cupla oxidada y reducida del ferrocenometanol, que fue utilizado en los experimentos como mediador redox. Para todos los estudios con las biointerfases de GOx, el voltamperograma negro corresponde al ciclo en ausencia de glucosa (figura 4.7). En esta figura, además, se pueden observar los comportamientos cualitativos de los ensamblados con GOx, en donde identifica que el aumento en el nivel de oxidación del grafeno tiene un efecto negativo sobre la capacidad de transferencia electrónica del electrodo, pero, por otro lado, conduce al aumento en la inmovilización enzimática, como se observó en las medidas por SPR (tabla 3). Este comportamiento es consistente con el incremento en el número de defectos en las láminas del GO, que si bien aumenta la capacidad de funcionalización, disminuye la conductividad eléctrica,^{170,188}

arrojando un desempeño electrocatalítico resultante menor que en los otros electrodos analizados. Estos hallazgos se encuentran en sintonía con los experimentos realizados de EIS descritos anteriormente y en el capítulo 3.

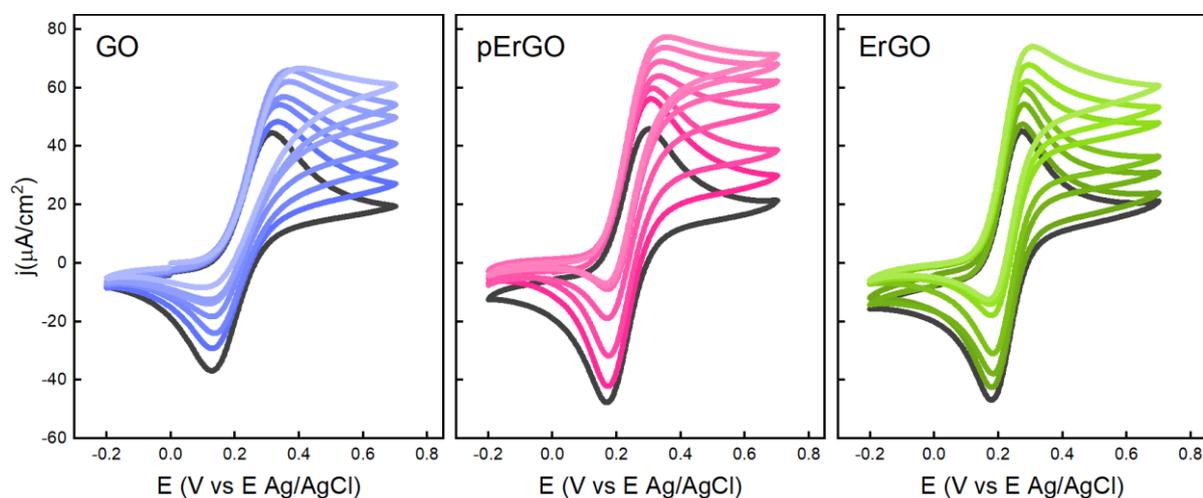


Figura 4.7. Respuesta voltamperométrica de ensamblados de GOx sobre distintas superficies de óxidos de grafeno en presencia de cantidades de glucosa crecientes (0-10 mM), en solución de PBS con 1 mM de ferrocenometanol como mediador redox. pH: 7.4 a 22°C. Velocidad de barrido: 10 mV/s.

Durante la oxidación de glucosa, el grupo prostético de flavina presente en la glucosa oxidasa, FAD, es reducido a FADH₂ al aceptar los electrones provenientes de la glucosa. FADH₂ es luego oxidado para recomponer el FAD reaccionando con la forma oxidada del ferrocenometanol.¹⁸⁹

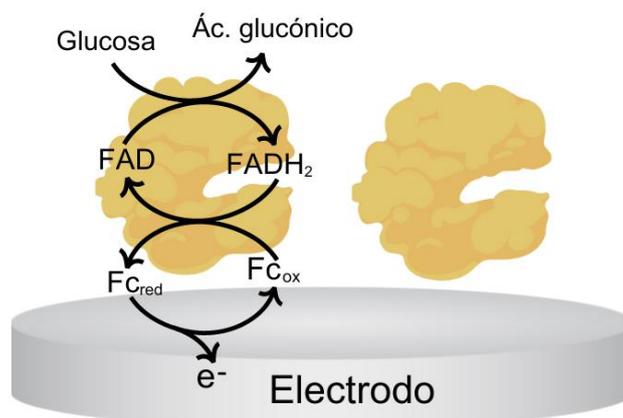


Figura 4.8. Diagrama representativo del proceso de catálisis y transducción de la señal en la oxidación de glucosa por GOx

El potencial del electrodo de trabajo, que en este caso son los bioensamblados con GOx, se barre linealmente en la dirección anódica, es decir, a valores crecientes de potencial, para regenerar la forma oxidada del mediador redox, que dispara el proceso de catálisis enzimática para continuar en un ciclo. En la figura 4.7 se observan curvas catalíticas características en presencia de glucosa, y en concentraciones crecientes, para los diferentes electrodos basados en GO con diferentes condiciones de oxidación.

Luego de analizar los resultados, se puede estimar que la respuesta electrocatalítica para los electrodos GOx/pErGO tuvieron cualitativamente el mejor desempeño electrocatalítico. En la próxima sección se aborda el análisis cuantitativo de los parámetros cinéticos y electroquímicos para dilucidar de manera precisa los fenómenos que dominan la respuesta observada.

4.3.4 Análisis cinético

En la figura 4.9, se representa la corriente bioelectrocatalítica, j_{cat} en función de la concentración de glucosa para los diferentes electrodos GOx/GO, GOx/pErGO y GOx/ErGO. Los valores de j_{cat} fueron obtenidos de los resultados experimentales presentados en la figura 4.7, restando punto a punto la curva voltamperométrica en ausencia de glucosa. Los valores calculados se corresponden a los valores de corriente obtenidos para potenciales de 0,7 V para cada voltamperograma. Todas las condiciones muestran un comportamiento que se ajusta al descrito por curvas del tipo Michaelis-Menten¹⁹⁰ donde el aumento inicial en la corriente catalítica es lineal (rango de glucosa 0-3 mM). A altas concentraciones de sustrato, la velocidad de reacción alcanza una meseta a medida que el sitio activo de la enzima se satura con sustrato, como se reporta para sistemas similares.¹⁹¹⁻¹⁹³

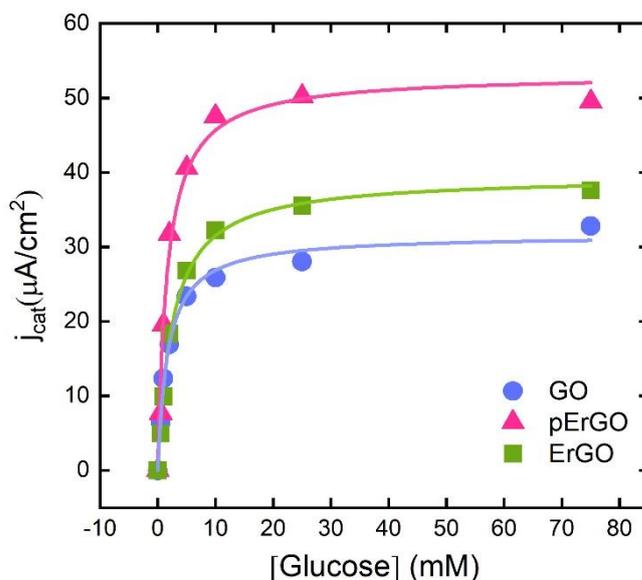


Figura 4.9. Respuesta electrocatalítica de los electrodos basados en GOs recubiertos por GOx en función de la concentración de glucosa con 1 mM de ferroceno-metanol como mediador redox, en PBS pH 7,4 a 22°C. Velocidad de barrido: 10 mV/S

A partir de estos resultados, fueron estimadas para los distintos ensamblados con GOx las constantes aparentes Michaelis-Menten (K_m) que son presentadas en la tabla 5 mediante la cual se observa que los electrodos que contienen pErGO alcanzaron la mayor sensibilidad, seguido por ErGO y GO respectivamente.

La ecuación de Michaelis-Menten permite calcular los parámetros cinéticos en reacciones que involucran enzimas como catalizadores, principalmente mediante la siguiente ecuación expresada para este sistema en particular:

$$V = \frac{j_{cat,max} \cdot [Glucosa]}{K_m + [Glucosa]}$$

donde V es la velocidad de catálisis, $j_{cat,max}$ es la densidad de corriente catalítica máxima, y K_m la constante de Michaelis-Menten

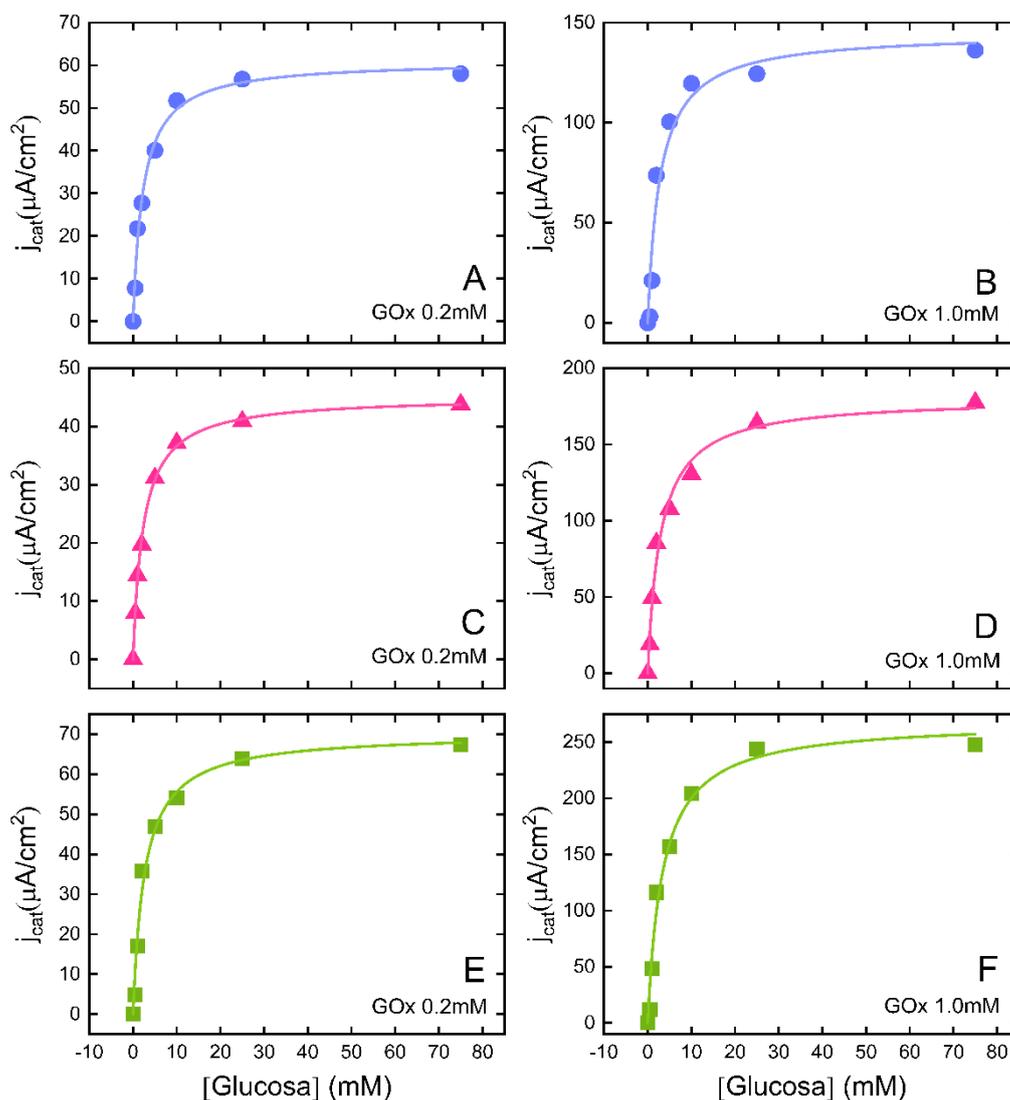


Figura 4.10. Respuesta electrocatalítica de los electrodos basados en GOs con GOx en solución a 0,2 y 1,0 mM en presencia de ferrocenometanol 1 mM como mediador redox, en PBS pH 7,4 a 22°C. Las concentraciones crecientes de glucosa fueron usadas para obtener parámetros cinéticos ajustando los valores a la ecuación de Michaelis-Menten (línea continua). Los datos fueron obtenidos a 10 mV/s. Los gráficos A y B corresponden a electrodos de GO; C y D a pErGO; y E y F a ErGO.

Si bien los valores de K_m no resultan en información precisa para conocer la cinética de la reacción desde el punto de vista de la interfase electrodo-solución, los resultados obtenidos brindan indicios de que la inmovilización sobre las superficies de los tres tipos de electrodos no modifica la actividad funcional de la enzima significativamente.

Tabla 5. Parámetros cinéticos Michaelis-Menten para los ensamblados con GOx de GO, pErGO y ErGO.

	GO	pErGO	ErGO
K_m (mM)	$1,7 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,3$	$2.6 \pm 0,2$
$J_{cat,max}$ ($\mu A/cm^2$)	$35,9 \pm 0,5$	$53,2 \pm 2,0$	$39,5 \pm 0,8$

Estas consideraciones fueron confirmadas a partir de la evaluación de las constantes Michaelis-Menten para cada uno de los electrodos construidos, con dos concentraciones de GOx en disolución y en condiciones experimentales similares a las realizadas en los ensayos previos. Los datos obtenidos a partir de las curvas voltamperométricas fueron tratados substrayendo el voltograma en ausencia de glucosa para obtener los valores de corriente catalítica para cada concentración de glucosa utilizada (figura 4.10).

En la información presentada en la tabla 6, se evidencia que no existen diferencias significativas en los valores de K_m para las distintas concentraciones de GOx. Esto indica que en este rango estudiado los parámetros cinéticos son independientes de la concentración de GOx. En cambio, cuando son analizados los valores de $J_{cat,max}$ se obtienen mayores valores de corriente para ErGO, que es consistente con mejores propiedades de transferencia electrónica.

Los valores obtenidos en los experimentos con la enzima en solución sugieren que la adsorción de GOx en las interfases basadas en GO conserva su actividad catalítica en gran medida. Curiosamente en dichas condiciones, $J_{cat,max}$ toma el valor máximo para pErGO, aunque la concentración de GOx no es la más alta comparada a las otras condiciones. La mejora de la respuesta bioelectrocatalítica cuando se utiliza pErGO como plataforma para la inmovilización de GOx puede atribuirse a una mayor transferencia de electrones entre el ferroceno-metanol y la superficie del electrodo. Esto es consistente con los resultados obtenidos para ErGO, donde, aunque la cobertura superficial de

GOx es menos de la mitad de la de GO, las corrientes bioelectrocatalíticas medidas fueron más altas.

Tabla 6. Parámetros cinéticos Michaelis-Menten para los ensamblados con GOx en solución

	GO		pErGO		ErGO	
[GOx](mM)	0,2	1,0	0,2	1,0	0,2	1,0
K_m (mM)	$2,3 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,8$	$2,6 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,6$
$J_{cat,max}$ ($\mu A/cm^2$)	$61,1 \pm 1,8$	$146,6 \pm 10,2$	$43,8 \pm 1,5$	$180,3 \pm 6,0$	$70,2 \pm 2,7$	$268,9 \pm 12,1$

Con el fin de precisar información respecto al desempeño de las plataformas comparadas a otros nanomateriales basados en grafeno, se realizó la curva de calibración de la densidad de corriente catalítica vs. concentración de glucosa para calcular los parámetros analíticos. En la figura 4.11 se observan los valores de densidades de corrientes en un gráfico semilogarítmico junto al ajuste lineal para cada electrodo hasta concentraciones de glucosa de 10mM. La sensibilidad y los límites de detección para cada biointerfase se encuentran en la tabla 7 junto a la comparación con otros sistemas para el sensado de glucosa.

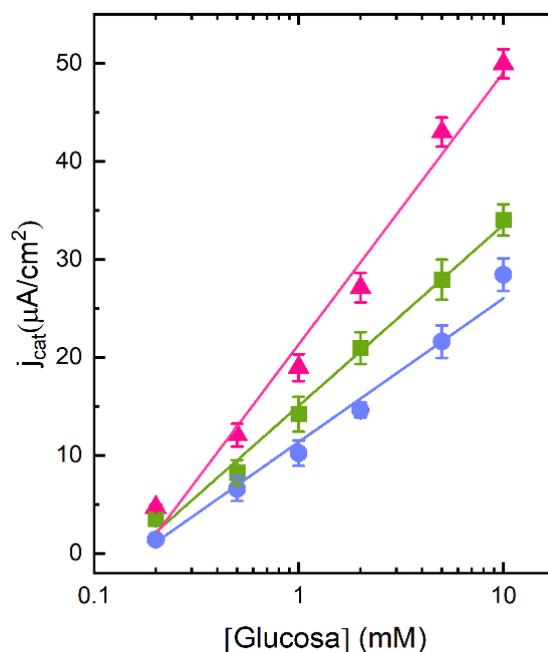


Figura 4.11. Gráfico de calibración (escala semi-log scale) para GOx/GO (círculos azules), GOx/pErGO (triángulos magenta) y GOx/ErGO (cuadrados verdes). El eje Y corresponde a la densidad de corriente catalítica calculada a partir de la substracción de la corriente en ausencia de glucosa.

Los bioelectrodos fabricados exhibieron una sensibilidad en los rangos de 8,3 a 16,1 $\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ para GO con diferentes grados de oxidación en un rango lineal de hasta 3,5 mM para el caso de los electrodos con pErGO (tabla 7). Los electrodos de pErGO exhibieron un límite de detección de 22,3 μM para la detección de glucosa, calculado como $3S_b/S$, donde S_b es la desviación estándar de la señal del blanco y S , la sensibilidad; mientras que los electrodos de GO y ErGO mostraron valores mayores de 57,9 y 59,1 μM , respectivamente. La comparación de la respuesta de los electrodos basados en películas delgadas de GO realizados en este trabajo de tesis con otros tipos de electrodos GOx-GO se muestra en la tabla 4.5.

El enfoque realizado en la fabricación de los electrodos de este trabajo produjo bioelectrodos con una sensibilidad moderada en comparación con otros trabajos similares,¹⁹⁴⁻²⁰⁵ observando que los electrodos de pErGO mostraron el mejor desempeño de los tres tipos de grafenos evaluados como plataforma. Esto se puede atribuir a una menor cobertura enzimática de GOx cuando se inmoviliza a las superficies de GO a través de modificación directa, en contraste con enfoques basados en materiales generados a partir de compuestos poliméricos.^{194,196,197,200,201,203,205} Sin embargo, cabe destacar que en términos de eficiencia calculada por unidad de enzima, los electrodos enzimáticos basados en GO presentados en este capítulo demuestra una clara superioridad. Esto indica un aprovechamiento efectivo del potencial catalítico de la GOx, maximizando su utilización. Estas características indican que la unión de GOx a GO como se describe en este trabajo, permite el acceso sin restricciones a su sitio activo sin afecta la actividad catalítica de la enzima.

Tabla 7. Comparación del desempeño de diferentes electrodos basados en grafenos modificados con GOx

Electrodo Modificado	Sensibilidad (S) ($\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	LOD ^{a)} (μM)	Rango lineal (mM)	$S/\Gamma_{\text{GOx}}^{\text{b)}$ ($\mu\text{A}\cdot\text{ng}\cdot\text{mM}^{-1}$)	Metodo de inmovilización	Ref.
ErGO-MWCNT/Nf ^{c)}	7,95	4,7	0,01 - 6,5	$1,39 \times 10^{-4}$	Fisorción	194
rGO-AuNPs/GCE ^{d)}	0,083	10,0	1,0 - 8,0	$1,47 \times 10^{-6}$	Fisorción	195
rGO-HAp/GCE ^{e)}	16,9	30,0	0,1 - 11,5	$6,54 \times 10^{-5}$	Fisorción	196
GR/MnO ₂ /Nf ^{f)}	3,3	10,0	0,04 - 2	$1,18 \times 10^{-4}$	Fisorción	197
GN/FAD/apo-GOx ^{g)}	ND.	110,0	1,4 - 11,0	-	Conjugación	198
rGO-PtNPs-/GCE ^{h)}	27,5	1,2	2,0 - 10,0	$6,3 \times 10^{-3}$	Conjugación	199
ErGO-PLL/GCE ⁱ⁾	8,00	2,0	1,0 - 9,0	$3,04 \times 10^{-3}$	Fisorción	200
AuNPs/PANI/rGO/NH ₂ - MWCNTs ^{j)}	246,0	63,0	1,0 - 10,0	-	Fisorción	201
DGNs/GRE ^{k)}	ND.	22,0	0,1 - 10,0	-	Conjugación	202
CNT/PEI ^{l)}	63,4	70,0	0,07 - 0,7	-	Fisorción	203
GO-AuNP/GFE ^{m)}	ND.	1,2	ND.	-	Fisorción	204
GA/cGO-CS/Au@Pd ⁿ⁾	64,2	10,4	0,02 - 4,2	-	<i>Cross-link</i>	205
pErGO/ITO	16,1	22,3	0,1 - 3,5	0,11	Modif. directa	Este trabajo
GO/ITO	8,3	57,9	0,1 - 3,0	0,05	Modif. directa	Este trabajo
ErGO/ITO	9,1	59,1	0,1 - 3,5	0,12	Modif. directa	Este trabajo

^{a)}LOD fue calculada como $3S_b/S$. ^{b)} S/Γ_{GOx} es la sensibilidad normalizada por la cobertura superficial de GOx (Γ). ^{c)}MWCNT nanotubos de carbono de paredes múltiples; Nf (nafion). ^{d)}AuNPs nanopartículas de oro; GCE electrodo de carbono vítreo. ^{e)}HAp hidroxiapatita. ^{f)}GR grafeno; MnO₂ dióxido de manganeso. ^{g)}GN nanocintas de grafeno; FAD dinucleótico de flavina-adenina; apo-GOx apoenzima glucosa oxidasa. ^{h)}PtNPs nanopartículas de platino. ⁱ⁾PLL poli-(L-lisina). ^{j)}PANI polianilina; NH₂-MWCNTs nanotubos de carbono de paredes múltiples con amino terminal. ^{k)}DGNs estructuras dendríticas de oro; GRE electrodo de varilla de grafito. ^{l)}CNT nanotubos de carbono; PEI polietilenimida ^{m)}GFE electrodo de fibra de grafito. ⁿ⁾GA glutaraldeido; cGO óxido de grafeno carboxilado CS quitosano; Au@Pd nanopartículas *core-shell* de oro y platino

4.3.5 Estabilidad de biointerfases de GOx basadas en GO

Para estudiar la estabilidad de los electrodos de GO, pErGO y ErGO funcionalizados con GOx, se realizaron análisis a través de SEM para detectar cambios en la morfología de las películas de los óxidos de grafeno posterior a las medidas electroquímicas. En la figura 4.12 se observan las imágenes obtenidas en las cuales no se distinguen alteraciones durante el período de tiempo en el cual se desarrollaron las medidas electroquímicas.

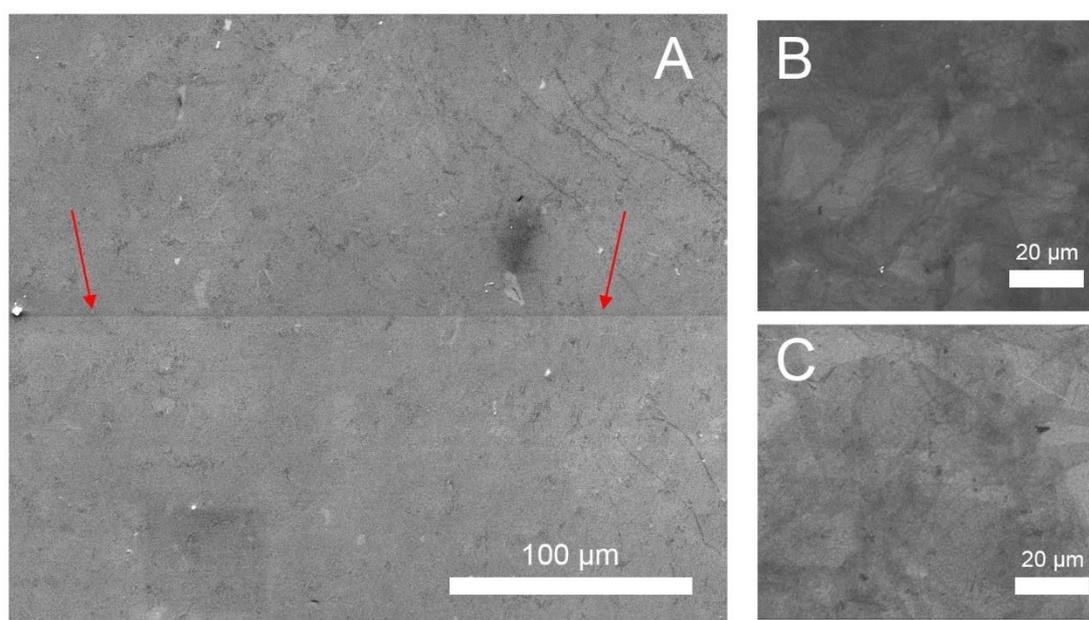


Figura 4.12. Imágenes SEM obtenidas luego de las medidas electroquímicas de GOx/ErGO/ITO. Las flechas rojas en el panel A indican el límite del área del electrodo expuesto a la solución en la que la región superior corresponde al ErGO y la inferior al GO sin exposición a la solución. B y C muestran la morfología de GOx/ErGO y GO, respectivamente, con una magnificación de 3000X

A su vez, se realizaron experimentos SPR para investigar el comportamiento dinámico de las biointerfases frente a estímulos mecánicos en flujo. Estos experimentos se desarrollaron en las mismas condiciones descritas en la sección 4.3.2, incluyendo un tratamiento de una solución 1,0 M de etanolamina para bloquear potenciales grupos reactivos de los electrodos de GO, pErGO y ErGO (ver figura 4.13). La exposición a la solución de etanolamina resultó en un

aumento de θ_{\min} , que posteriormente fue restaurado a valores originales luego de la inyección de PBS sobre las superficies. Esta información sugiere que la interacción entre GOx y las superficies con películas delgadas de GO, pErGO y ErGO se mantiene resistente al estrés mecánico.

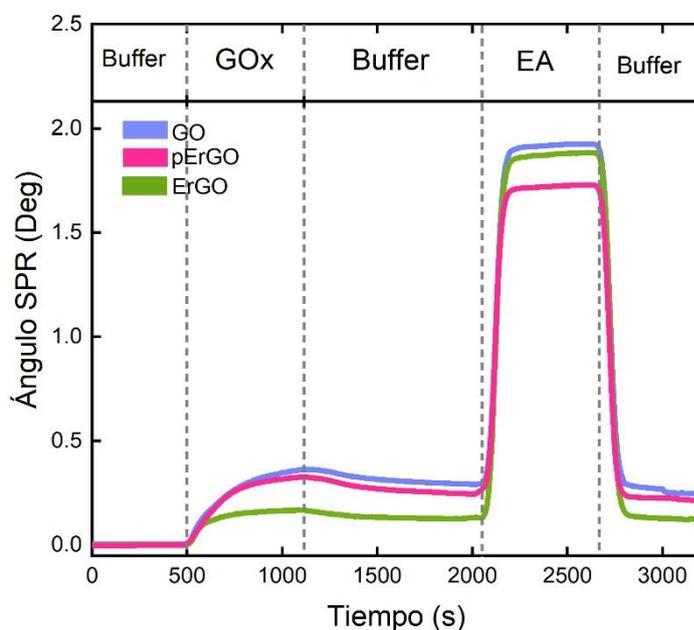


Figura 4.13. Sensogramas SPR para la inmovilización de GOx en buffet PBS sobre GO (azul), pErGO (magenta) y ErGO (verde). Las líneas discontinuas verticales indican el tiempo de cada paso en el experimento.

4.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos resaltan la relevancia de la capacidad de controlar la superficie química del GO con el objetivo de maximizar la respuesta en las biointerfases propuestas.

La interacción de derivados del grafeno y enzimas ha sido investigada por un gran número de autores. Durante el proceso de adsorción, las enzimas sufren cambios estructurales y funcionales. Wei y Ge reportaron que el GO inhibe la actividad de la catalasa induciendo la pérdida de la estructura α -helice y por ende la pérdida de la conformación nativa y funcional del esqueleto proteico.²⁰⁶ Efectos similares fueron observados también por otros grupos de diversas proteínas.^{207–210} También fue identificada esta observación para la glucosa oxidasa.^{211–213} Liang y colaboradores reportaron que tras la adsorción de GOx sobre GO se produce

un reordenamiento estructural masivo, que es responsable de acortar la distancia de FAD a la superficie de GO.²¹² Como resultado, la transferencia electrónica directa de GOx es facilitada en esa condición, aunque la actividad enzimática es atenuada o incluso perdida. Sin embargo, este efecto es disminuido al reducir la densidad de grupos funcionales de oxígeno presentes en la superficie de GO como se muestra en este capítulo. Aun así, en términos de la actividad del electrodo en la oxidación de la glucosa, es crucial ajustar la superficie química del GO para favorecer la inmovilización de la enzima, sin comprometer su actividad y la funcionalidad de transferencia electrónica.

En este capítulo se analizó que, si bien las tres variantes de GO utilizadas: GO, pErGO, y ErGO, presentaron respuestas electrocatalíticas al someter los electrodos a concentraciones crecientes de glucosa, existe un compromiso entre la capacidad de funcionalización química y las propiedades eléctricas, por lo que óxidos de grafeno con menores grado de oxidación, en este caso, pErGO, presentan un balance óptimo que mejora la respuesta en la señal electroquímica con un nivel de cubrimiento enzimático comparable con el GO, sin alterar funcionalmente las enzimas.

Es importante resaltar que los resultados arrojados por los electrodos estudiados en este capítulo corresponden a una sola capa de modificación química, tanto del transductor (GO, pErGO y ErGO) como de GOx, por lo que aún en esas condiciones la respuesta analítica es comparable con otros electrodos basados en nanomateriales de carbono. El enfoque llevado a cabo en este capítulo produjo biointerfases con GOx basados en óxidos de grafeno que presentaron una superioridad respecto a otros sistemas en términos del aprovechamiento efectivo de la actividad catalítica de la GOx, demostrado a través de la normalización de la sensibilidad calculada por unidad de enzima. De esta manera, la inmovilización directa de GOx sobre superficies basadas en GO permite mantener la actividad enzimática en niveles comparables a la enzima en solución.

Por otra parte, los experimentos realizados a través de SPR con películas delgadas de óxidos de grafeno sobre un recubrimiento de oro mostraron una alta sensibilidad a la unión molecular en la interfaz de los electrodos, que podría ser utilizado de manera más eficiente al ajustar el contenido de grupos funcionales de oxígeno del GO.

CAPÍTULO 5

Caracterización de clusters metálicos
de plata y su efecto catalítico en
moléculas de interés con grupos tioles

5.1 Introducción

El azufre contribuye significativamente la diversidad química en la naturaleza debido a sus características fisicoquímicas, permitiendo reacciones biológicas fundamentales que ningún otro elemento permite. Los compuestos naturales que forma dicho elemento son utilizados por gran parte de los organismos vivos, que, dependiendo de la utilidad y de su función, son distribuidos de manera diferente en estos organismos. Entre las utilidades más importantes en procesos bioquímicos, el azufre forma parte de metabolitos primarios, como son los aminoácidos esenciales metionina y cisteína, que presentan un rol central en la estructuración de las proteínas, otorgándoles conformaciones tridimensionales a partir de la formación de enlaces disulfuro entre los residuos tioles de estos aminoácidos. A su vez, forman parte de grupos catalíticos en sitios activos (generalmente en grupos Fe-S) de enzimas, particularmente aquellas que regulan reacciones redox. Por otra parte, debido a que los grupos tioles pueden ser oxidados y reducidos fácilmente, y de manera reversible, el control redox en el metabolismo celular se ha convertido en un foco de investigación cada vez mayor.

En la cisteína (Cys), una de las fuentes de azufre más importante en los organismos, el azufre se encuentra en su estado de oxidación más reducido posible, -2. Debido a esto, el grupo tiol que se encuentra en su estructura puede ser sometido a diversas reacciones en condiciones fisiológicas formando productos con estados de oxidación variable para el azufre. Este aminoácido, cuando se encuentra formando parte de la estructura primaria de las proteínas, participa en una amplia variedad de reacciones redox, que no necesariamente involucran de manera directa, pero que pueden acoplarse, a la transferencia de electrones. Esta característica tiene implicancias de largo alcance para la actividad redox del azufre *in-vivo*, que se ejemplifica con el rol del tripéptido glutatión, formado por glutamato, cisteína y glicina (γ -Glu-Cys-Gly, GSH en adelante). El GSH es un péptido vital intra y extracelular con diversas funciones biológicas, entre ellas la de mantener el balance redox intracelular.²¹⁴⁻²¹⁷

Debido a la importancia de las reacciones bioquímicas en las que intervienen grupos tioles en células, en muchos casos fundamentales para la viabilidad celular, como es la homeostasis redox, éstas cuentan con distintos

mecanismos que regulan dichas reacciones, como es el caso de las enzimas disulfuro reductasas. Este grupo de proteínas intervienen mediante procesos catalíticos a través de la oxidación, y su posterior reducción, de grupos de cisteínas presentes en su sitio activo que son susceptibles a oxidarse en condiciones fisiológicas.²¹⁸ Una de las proteínas centrales que lleva adelante este rol es la Tiorredoxina (Trx), que presenta dos residuos de Cys en su sitio activo.²¹⁹ Las proteínas Trx humanas, por ejemplo, pueden participar en la activación de factores de transcripción y en la actividad de las enzimas redox, y también presentan un rol esencial durante el estrés oxidativo y la apoptosis.²²⁰ La Trx reduce disulfuros in proteínas a través de un mecanismo de intercambio de tiol-disulfuro, y en el proceso forman un enlace disulfuro intramolecular en el sitio activo. Estas enzimas vuelven a ser utilizadas luego de que otras proteínas encargadas de recomponer los residuos de Cys actúan sobre las Trx. En el caso de la Trx, la proteína encargada de esto es la Tiorredoxina reductasa.

La importancia de los procesos antes mencionados pone en relieve la centralidad del azufre en diversos mecanismos bioquímicos para garantizar la viabilidad celular en distintas condiciones. De esta manera, se vuelve de gran interés científico conocer la bioquímica de este elemento para estudiar posibles enfoques relacionados a estas proteínas, sobre todo, en células que son dañinas para los organismos, como es el caso de células tumorales.

Durante la última década, el avance de la nanotecnología y las técnicas de caracterización, han permitido el desarrollo de nuevos nanomateriales con potenciales aplicaciones en sistemas biológicos.^{221,222} En este trabajo de tesis, se aborda el estudio fisicoquímico de las propiedades de pequeños *clusters* de átomos metálicos de Ag con el fin de evaluar su capacidad catalítica. Particularmente en este capítulo se estudia el efecto oxidante de *clusters* de plata de 5 átomos (Ag₅-AQC) sobre moléculas de Cys, GSH y Trx con el fin de analizar cómo afecta en distintas conformaciones químicas la naturaleza química del azufre. Los antecedentes en la bibliografía que describen las propiedades de *clusters* atómicos metálicos en la oxidación de azufre de grupos tioles para formar disulfuros a temperatura ambiente,⁸⁴ permiten hipotetizar acerca de las propiedades esperadas para los *clusters* de Ag.

Con este propósito, en este capítulo se analizan muestras de Ag₅-AQC sintetizadas electroquímicamente con el fin de obtener una caracterización

precisa de su estructura electrónica. Para ello, se utilizan técnicas de absorción de rayos X, que presentan la potencialidad de obtener información sobre su estructura e identidad química (ver sección 2.4). Específicamente, las muestras de Ag₅-AQC_s serán estudiadas a través de experimentos XANES en el borde de absorción Ag-L_{III}. Adicionalmente se analizará el efecto catalítico de Ag₅-AQC_s en reacciones con muestras de Cys, GSH y Trx para analizar el efecto sobre los átomos de azufre de los tioles presentes en dichas moléculas. Este análisis se realizará a través de experimentos XANES en el borde S-K en distintas condiciones de reacción para monitorear el estado químico de las especies de azufre.

5.2 Metodología Experimental

5.2.1 Reactivos

Las soluciones de cisteína y glutatión fueron preparadas en PBS para obtener concentraciones 1 mM. Para las mezclas de reacción de Trx se utilizó Trx recombinante de *E. coli* liofilizada que fue resuspendida en 100 µl de PBS para reproducir la misma fuerza iónica y pH en condiciones fisiológicas. Na₂S₂O₃ fue utilizado para la calibración de los espectros XANES. Se utilizaron discos de carbono (Ted Pella, Inc®) para el montaje de las muestras en los experimentos XANES. Ditioneitol (DTT) fue utilizado para reducir Trx previo a las medidas. Para el filtrado de Trx luego del tratamiento con DTT se utilizaron columnas *Illustra MicroSpin G-25 column*®. Las soluciones utilizadas de Ag₅-AQC_s fueron preparadas a partir de una solución de 2 mg/l en PBS. AgCl y Ag₂O, al igual que todos los reactivos, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Para la preparación de PBS se utilizó agua Milli-Q® (18.2 MΩ/cm).

5.2.2 Síntesis electroquímica de Ag₅-AQC_s

La síntesis de Ag₅-AQC_s se llevó a cabo por el grupo del Dr. López-Quintela de la Universidad de Santiago de Compostela, España, y proveída para el trabajo de esta Tesis mediante el protocolo detallado en Buceta et. Al.⁹³ Brevemente, se utiliza una celda electroquímica convencional de tres electrodos en el que se utilizan dos láminas de Ag⁰ (2,5 cm² de superficie) como

electrodo de trabajo, Pt como contraelectrodo y un electrodo normal de hidrógeno (ENH) como electrodo de referencia. Se aplica un potencial constante de 2 V vs. ENH por 1200 s en agua MilliQ® luego de burbujear con N₂ para desplazar el O₂ disuelto. Previo a la síntesis, el electrodo de Ag es pulido con papel de lija de grano 600, seguido por pulido con alúmina (\approx 50 nm). Posteriormente, los electrodos son lavados en agua MilliQ® y tratados en ultrasonido. El contraelectrodo de platino se limpia electroquímicamente por voltamperometría cíclica en una solución 1 M Metanol / 1 M NaOH seguido de CV en 1M H₂SO₄. Luego de la síntesis, los iones Ag⁺ son eliminados de la solución mediante el agregado de NaCl y su posterior precipitación y filtración. Las muestras purificadas son luego concentradas a 35 °C mediante el uso de rotavapor.

5.2.3 Experimentos XANES Ag-L_{III}, S-K y análisis de datos

Los experimentos de espectroscopía de rayos X del borde cercano (XANES) del borde de absorción K del azufre (2470 eV.) fueron realizados en la línea de luz SXS en el *Laboratório Nacional de Luz Síncrotron* (LNLS, Campinas, Brasil) que se encuentra equipada con un monocromador de cristal doble InSb (111) con una apertura de rendija de 1 mm, para alcanzar una resolución de aproximadamente 0,5 eV. en el borde S-K. Los detalles de la configuración experimental de la línea se encuentra descrita en la bibliografía.²²³ Los espectros de absorción de rayos X para los bordes de absorción analizados, Ag-L_{III} y S-K, se obtuvieron en el modo de fluorescencia, colectando los rayos X emitidos de las líneas de emisión Ag L α_1 (a 2982,7 eV) y S K $\alpha_{1,2}$ (a 2309,5 y 2308,4 eV, respectivamente). Los experimentos de absorción fueron realizados en ultra alto vacío (UHV) a 10⁻⁸ mbar a temperatura ambiente. Para las medidas del borde S-K la calibración fue realizada utilizando el tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃). La energía de los fotones incidentes fue calibrada asignando el valor de 2481,5 eV correspondiente al máximo del espectro de absorción de Na₂S₂O₃, correspondiente al azufre interior de la estructura de la molécula, en concordancia con el criterio reportado previamente por Vairavamurthy y colaboradores.²²⁴ Para los experimentos en el borde Ag-L_{III} se utilizó Ag⁰ para la calibración de los espectros.

Los espectros XANES finales para las muestras utilizadas en este capítulo fueron obtenidos luego de la substracción del fondo y la normalización en la intensidad de la señal luego del borde de absorción. La cuantificación de las contribuciones de los espectros XANES se realizaron utilizando el software Athena.¹¹⁹

Las mezclas de reacción evaluadas tanto para Cys como GSH fueron depositadas sobre discos de carbono poroso para lograr concentraciones detectables en la configuración experimental disponible. Los experimentos con Trx se realizaron en una celda líquida especial para cámara de UHV.

5.3 Resultados y Discusión

5.3.1 Estudio XANES en el borde Ag-L_{III}

Se realizó la caracterización de las muestras utilizadas de Ag₅-AQC_s previo a los experimentos de evaluación de su capacidad catalítica para la oxidación de S en los compuestos de interés antes enumerados. Para ello, se realizaron medidas XANES en el borde L_{III} de Ag, de muestras de Ag₅-AQC_s, utilizando Ag⁰ como referencia, para compararlo con los patrones a los que se podría asemejar químicamente. Los compuestos utilizados fueron AgCl y Ag₂O. El espectro obtenido se muestra en la figura 5.1 junto a la diferencia espectral entre Ag₅-AQC_s y Ag⁰. A su vez, se observa que el espectro no se ajusta a ningún compuesto de referencia reportado, y se encuentran similitudes parciales al obtenido para Ag metálica, de la misma manera que se reporta en trabajos previos de caracterización XANES.^{93,225}

La característica más notable de los espectros obtenidos es que las resonancias en el espectro XANES de Ag₅-AQC_s, indicadas con las líneas verticales discontinuas en la figura 5.1, se encuentran en los mismos valores de energía que las del espectro de Ag metálica. Estas resonancias son dominadas por las contribuciones de dispersiones múltiples en el entorno local de Ag, y la similitud entre ambos espectros indica que la principal contribución en el espectro XANES de Ag₅-AQC_s en esta región se debe a átomos de Ag con estructura atómica similar a la presente en la Ag⁰. Observando la diferencia del espectro de Ag₅-AQC_s con Ag⁰ (*inset* inferior de la figura 5.1) es posible notar que, a pesar de la presencia de oscilaciones similares a las de Ag⁰, hay una reducción

significativa de la intensidad para el caso de Ag₅-AQC. Esta característica de atenuación es consistente con su característica subnanométrica, donde las amplitudes en general resultan atenuadas respecto a la versión masiva para el mismo elemento. La región siguiente a la del borde de absorción brinda información del orbital LUMO de los átomos de Ag, y en el caso particular del borde Ag-L_{III}, es dominada por cambios en la densidad de estados electrónicos desocupados, asociados a la transición electrónica 2p_{3/2}→4d*.²²⁶

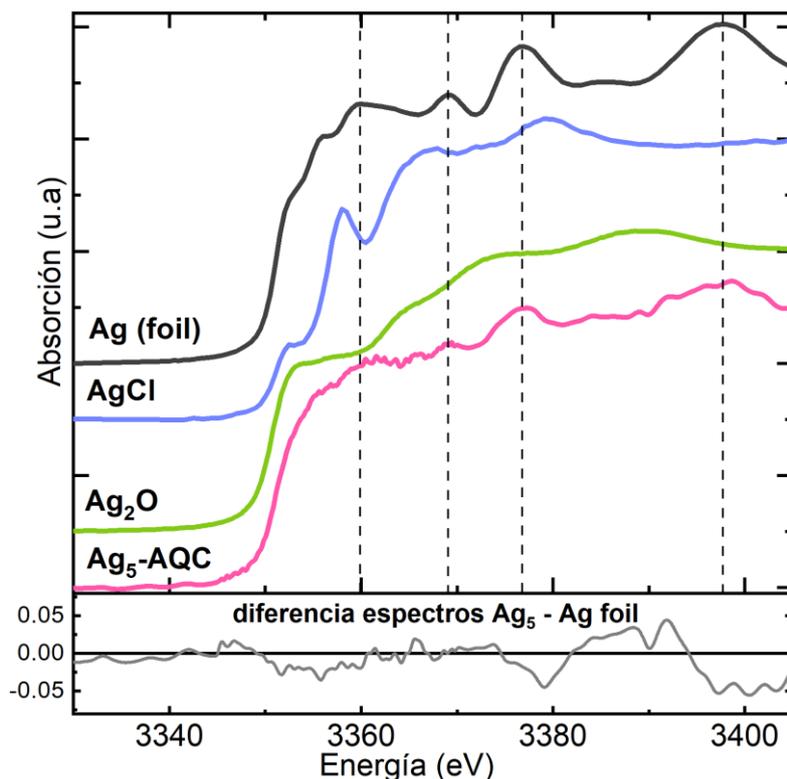


Figura 5.1. Espectros XANES normalizados del borde Ag-L_{III} para Ag metálica, AgCl, Ag₂O y Ag₅-AQC. Las líneas discontinuas verticales indican las resonancias asociadas al estado metálico de Ag. El *inset* inferior muestra la diferencia entre los espectros de Ag₅-AQC y Ag metálica.

La comparación del espectro de Ag₅-AQC con el obtenido para AgCl muestra que la densidad de estados desocupados decrece, evidenciándose por desaparición del pico en el espectro AgCl. Esto indica que los orbitales híbridos s-d de Ag cercanos al nivel de Fermi se encuentran llenos en los átomos de Ag en la configuración de *clusters* de pocos átomos como los analizados en este trabajo.

5.3.2 Efecto oxidante de Ag₅-AQCs en tioles de cisteína y glutatión

Luego de la caracterización de Ag₅-AQCs se realizó la evaluación del efecto de éstos sobre la Cys, que posee un residuo tiol (-SH) terminal al ser un aminoácido aislado, y de GSH, un oligopéptido formado por tres aminoácidos (γ -Glu-Cys-Gly), que presenta un residuo tiol aportado por la cisteína.

Se realizó un seguimiento de los espectros XANES en el borde S-K para poder identificar cambios en el estado de oxidación para cada compuesto en las condiciones analizadas.

El espectro XANES S-K obtenido para la Cys, evidencia un pico a energía de fotones incidentes de 2473,7 eV (ver figura 5.2), que corresponde al S del grupo tiol, y que es atribuible a transiciones S 1s \rightarrow S-H característico de tioles libres con átomos de azufre en estado de oxidación (-2).²²⁷ Esta componente del espectro, fue también observada para el caso del GSH, que como era de esperarse, presenta el mismo estado de oxidación del azufre que para el caso de la Cys. A su vez, la diferencia de intensidad en la línea blanca del espectro es característico de estas moléculas en su forma reducida.²²⁸

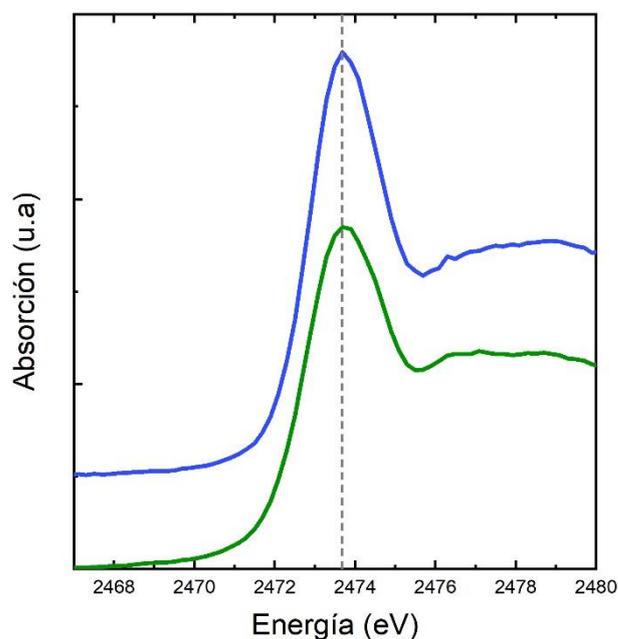


Figura 5.2. Espectros XANES normalizados en el borde S-K para cisteína (verde) y glutatión (azul). La línea discontinua vertical indica el valor característico de energía para S⁻².

Luego, se evaluaron los espectros de estas mismas especies químicas, agregando Ag₅-AQC's a las soluciones de los tioles para obtener los espectros S-K XANES correspondientes y evaluar el efecto catalítico sobre el estado de oxidación del S. Se observaron cambios notables en el espectro S-K XANES respecto de las mismas muestras antes de introducir Ag₅-AQC's, los que se muestran en la figura 5.2. Tanto la Cys como el GSH fueron fuertemente oxidados por la acción de Ag₅-AQC's, notándose un pico prominente a energías de 2482,9 eV, atribuible a especies de azufre con estado de oxidación (+6).²²⁹

Un análisis con mayor profundidad sobre las características de la línea blanca en los espectros S-K XANES obtenidos permite extraer información adicional, observándose dos resonancias a bajas energías para las muestras tratadas con Ag₅-AQC's, 2473 y 2474,3 eV (líneas verticales). La presencia de dichas resonancias a estos valores de energía denota la presencia de especies químicas con estados de oxidación (S⁻¹), características en las moléculas que presentan enlaces disulfuros a través de la dimerización y oxidación de tioles.^{227,230}

Los espectros de S-K XANES de disulfuros ha sido ampliamente estudiado, y se reconoce que exhibe contribuciones con estructuras que dan origen a un doble pico como el obtenido en este trabajo, y que se muestra en la figura 5.3.^{231,232} El pico a menores energías, ubicado a 2473,0 eV para el caso de estos experimentos, es característico de la presencia de transiciones en orbitales moleculares (MOs) debido a la formación de enlaces del tipo disulfuros (S-S), mientras que la segunda resonancia a ligeramente mayores energías (2474,3 eV) puede ser asignado a la formación de MOs en enlaces S-C.^{233,234} A su vez, dichas asignaciones a los picos observados fueron confirmados por espectroscopía de absorción de rayos X polarizados en el borde K del azufre en cristales de dibencil disulfuro en el trabajo realizado por Pickering et. al 2016.²³⁰ El análisis exhaustivo de las señales XANES de estas resonancias puede brindar información acerca del entorno químico en el que se forman los enlaces del tipo S-S. Es sabido que la posición de la resonancia observada a menores energías, que corresponde a las transiciones $1s \rightarrow (S-S)\sigma^*$, cambian relativamente poco de acuerdo a la modificación del entorno químico, es decir, al residuo carbonado que acompaña al tiol previo a la oxidación. De manera contraria, la componente presente en este caso a 2474,3 eV, y que representa las transiciones $1s \rightarrow$

(S-C) σ^* , es más propensa a presentar corrimientos energéticos de acuerdo al entorno que acompaña al tiol, que en algunos casos puede variar hasta 1 eV para distintos disulfuros orgánicos.

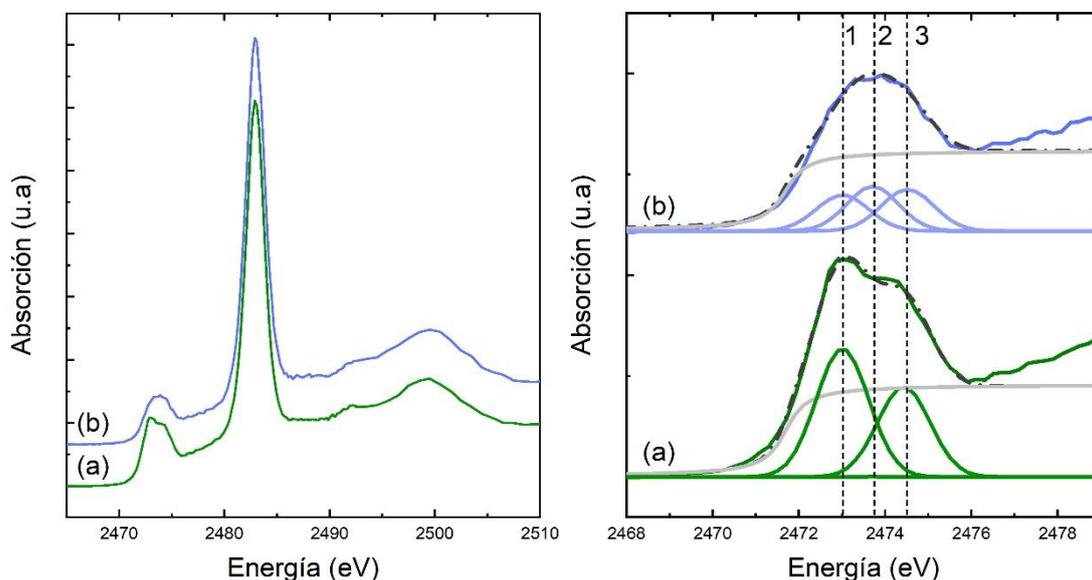


Figura 5.3. Espectros XANES normalizados en el borde S-K para cisteína (a) y glutatión (b) con el agregado de Ag₅-AQCs. La línea discontinua vertical indica el valor característico de energía para S⁻². El panel derecho corresponde a la visualización aumentada para la región de la línea blanca. Las líneas discontinuas verticales indican las posiciones de energía asociadas a diferentes estados de oxidación de azufre. (1) y (3) corresponden a S⁻¹ y (2) a S⁻².

En el caso de las caracterizaciones XANES de las especies de S realizadas en este trabajo, se encontró que la separación entre las resonancias que corresponden a los átomos de azufre de enlaces S-S (Δ) es de 1,4 eV aproximadamente, que acorde a diversos trabajos presentes en la literatura,^{230,235} corresponde a cadenas carbonadas no aromáticas y que presentan una baja atomicidad de carbono. Dicha asignación, se corresponde razonablemente con que para el caso de las componentes observadas de S⁻¹ se condice con la dimerización de la Cys, para formar, a través de un enlace disulfuro, la cistina. Para las medidas realizadas con GSH, estas resonancias no son observadas, posiblemente debido a que la formación de enlaces disulfuros se encuentra desfavorecida por efectos estéricos. Sin embargo, se observa que el pico correspondiente a 2473,7 eV, en esta región posee un ancho que no se corresponde con la presencia única de S⁻², por lo que para analizar otras

contribuciones se realizó la deconvolución asignando componentes con las posiciones observadas en el caso de la Cys. Como se observa en la figura 5.3, panel derecho, es posible afirmar que la formación de enlaces disulfuros es incompleta, al menos en las condiciones utilizadas experimentalmente.

5.3.3 Dependencia con la concentración

De acuerdo con lo observado en la sección anterior respecto a la presencia de resonancias que evidencian transiciones en estados de oxidación S^{-1} , que a su vez denota que este estado de oxidación previo a la oxidación completa a S^{+6} es parte del mecanismo de catálisis de oxidación mediada por los Ag₅-AQC_s, se realizaron experimentos XANES de caracterización en el borde S-K para la Cys variando las mezclas de reacción respecto a la concentración de Ag₅-AQC_s en relación a la concentración de (-SH) con el fin de evaluar posibles diferencias en el estado final de la reacción que permita comprender los resultados observados anteriormente.

Para este propósito, a la solución de Cys con la concentración utilizada en la sección 5.3.2, se agregaron tres diluciones diferentes de Ag₅-AQC_s para formar las mezclas de reacciones, que estuvieron en contacto durante el mismo intervalo de tiempo. Se asume que la reacción catalítica es detenida al momento de la colocación de las muestras en la cámara de UHV del analizador, debido a la eliminación del oxígeno presente en el entorno de las medidas y necesario para la reacción.

Las soluciones utilizadas de Ag₅-AQC_s fueron preparadas a partir de una solución de 2 mg/l, preparándose soluciones con relaciones $[SH]/[Ag_5-AQC_s] \approx 10^5-10^3$, es decir, entre 1000 y 10000 veces más tioles que Ag₅-AQC_s.

Como se muestra en la figura 5.4, es posible observar que el grado de oxidación de la cisteína depende claramente de la concentración de Ag₅-AQC_s en la mezcla de reacción. A diluciones con mayor concentración de Ag₅-AQC_s se observa que el tiol de la cisteína es fuertemente oxidado produciendo en su estado final especies de azufre con estado de oxidación +6, en el que la generación de sulfato como especie libre conllevaría la ruptura estructural de la molécula. Sin embargo, en las diluciones menos concentradas se puede notar

que la cisteína preserva átomos de azufre con estado de oxidación -1, que es compatible con las resonancias observadas para Cys presentadas previamente en los experimentos de la sección 5.3.2.

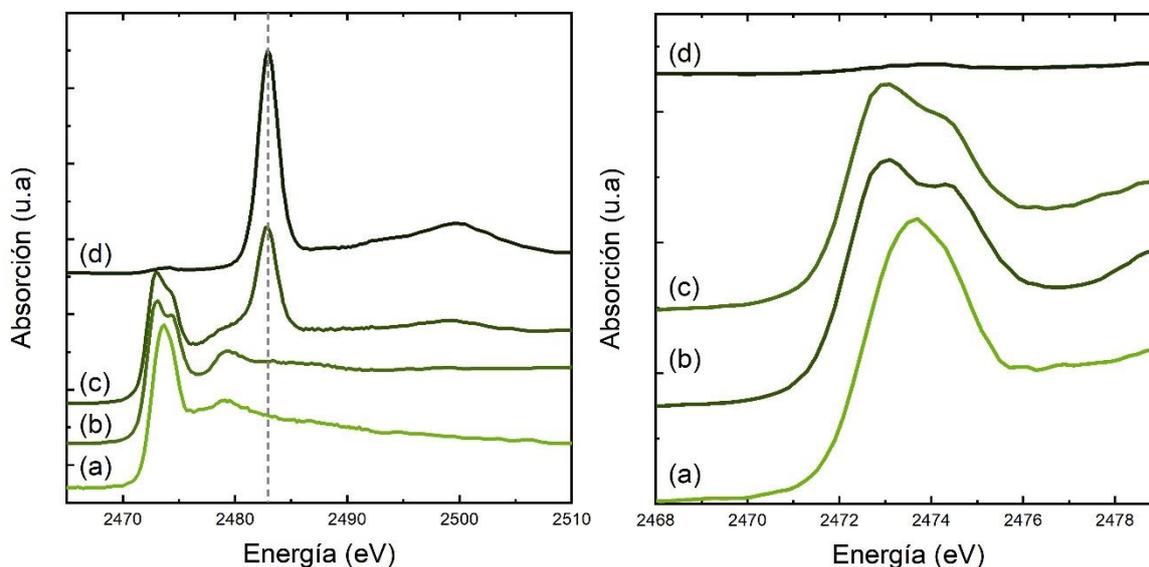


Figura 5.4. Espectros XANES normalizados del borde K del azufre para muestras de (a) cisteína (Cys), (b) Cys + Ag₅-AQCs en relación [SH]/[Ag₅-AQCs] $\approx 10^5$, (c) Ag₅-AQCs en relación [SH]/[Ag₅-AQCs] $\approx 10^4$, y (d) Ag₅-AQCs en relación [SH]/[Ag₅-AQCs] $\approx 10^3$. La línea punteada vertical indica la posición de energía para contribuciones de S⁺⁶. El panel derecho corresponde a la visualización aumentada para la región de la línea blanca.

Dichos resultados confirman el carácter catalítico de los Ag₅-AQCs, no solo por la dependencia de la concentración en el estado final de la reacción, sino porque claramente se ve afectada la velocidad de reacción, ya que dejando avanzar a la reacción durante tiempos mayores, el estado final de la oxidación de la Cys progresa de manera que todo el azufre presente, o al menos la mayoría, es convertido a S⁺⁶. La configuración experimental realizada en estas medidas no permite obtener información cuantitativa acerca de las variables cinéticas de la reacción, aunque nos permite afirmar que existe una dependencia directa entre la concentración de Ag₅-AQCs y el producto obtenido a los tiempos evaluados. A pesar de ello, de la figura 5.4 (derecha) es posible obtener algunas conclusiones respecto al mecanismo de oxidación de la Cys.

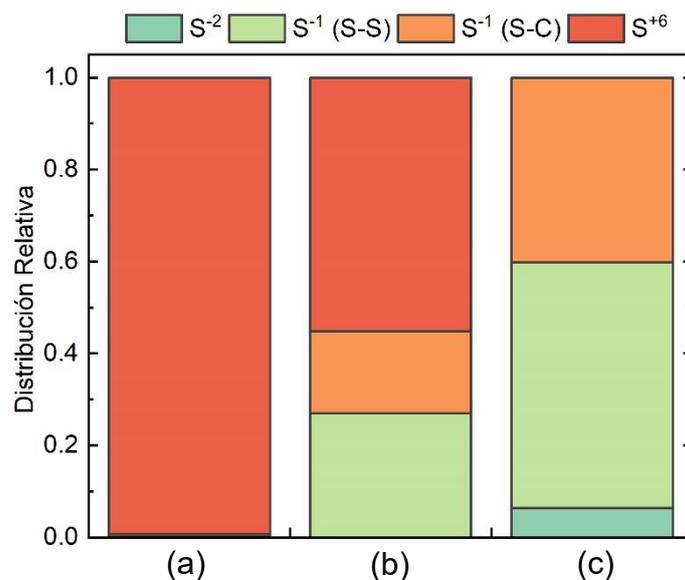


Figura 5.5. Distribución relativa de especies de S de cisteína con Ag_5 -AQCs para relaciones $[SH]/[Ag_5\text{-AQCs}]$ (a) $\approx 10^3$, (b) $\approx 10^4$, y (c) $\approx 10^5$.

Como se mencionó en la sección 5.3.2, las transiciones observadas a 2473,0 eV y 2474,3 eV corresponden a las contribuciones de especies de azufre con estado de oxidación (-1). En el caso del pico de menor energía de fotones incidentes, esta señal es atribuible a la transición $1s \rightarrow (S-S)\sigma^*$ y para el caso del pico observado a 2474,3 eV es atribuible a la transición $1s \rightarrow (S-C)\sigma^*$. De esta forma, tanto la posición como la intensidad de estas resonancias brindan información sobre el entorno químico del átomo de azufre, que para el caso de la transición $1s \rightarrow (S-C)\sigma^*$ depende del residuo carbonado que contiene al tiol que se encuentra oxidándose. Por ello, de la figura 5.5, en la que se ven representadas las distribuciones relativas de cada una de las especies de azufre observadas en los espectros XANES obtenidos (tabla 8), se puede notar que a medida que la catálisis oxidativa es más fuerte, es decir, frente a mezclas de reacción con mayor concentración de Ag_5 -AQCs, la señal que se atribuye a $1s \rightarrow (S-C)\sigma^*$ se hace más débil proporcionalmente a la señal presente a 2473 eV. Esto podría indicar que para la formación de SO_4^{2-} es necesario que se rompa el enlace S-C del esqueleto de la cisteína, y que a medida que la proporción de SO_4^{2-} es mayor, necesariamente la transición que corresponde a la formación de MOs S-C es menos probable. En el caso de la cistina (dímero de Cys formado por enlace disulfuro) la formación de SO_4^{2-} es posible con la ruptura de este dímero, formando un complejo entre Ag_5 -AQCs, y RSS, siendo R el

esqueleto carbonado de la Cys. Estas observaciones experimentales fueron utilizadas como fundamento para establecer un modelo teórico del mecanismo de reacción para la oxidación de Ag₅-AQC's a moléculas con tioles en su estructura.²³⁶

Tabla 8. Distribución relativa de especies de azufre en la catálisis oxidativa de cisteína con Ag₅-AQC's para diferentes relaciones de concentración

Relación [SH]/[Ag ₅ -AQC's]	Especies de azufre			
	S ⁻²	S ⁻¹ (S-S)	S ⁻¹ (S-C)	S ⁺⁶
10 ⁻³	0	0,19	0,54	99,3
10 ⁻⁴	0	27,8	17,8	55,2
10 ⁻⁵	6,3	53,5	40,15	0

5.3.4 Dependencia con el sustrato

Luego del análisis realizado para la catálisis oxidativa de la Cys y el GSH, se realizaron experimentos similares de espectroscopía XANES en el borde S-K para analizar la interacción de los mismos Ag₅-AQC's con Tiorredoxina (Trx), una proteína que interviene en los procesos de estrés oxidativo y homeostasis redox en los entornos intracelulares (ver sección 5.1). La Trx posee dos residuos de Cys en su estructura (isoenzima *E. coli*) localizadas en el sitio activo, que al estar en configuración adyacente cumple su función biológica a partir de la oxidoreducción de estos residuos.

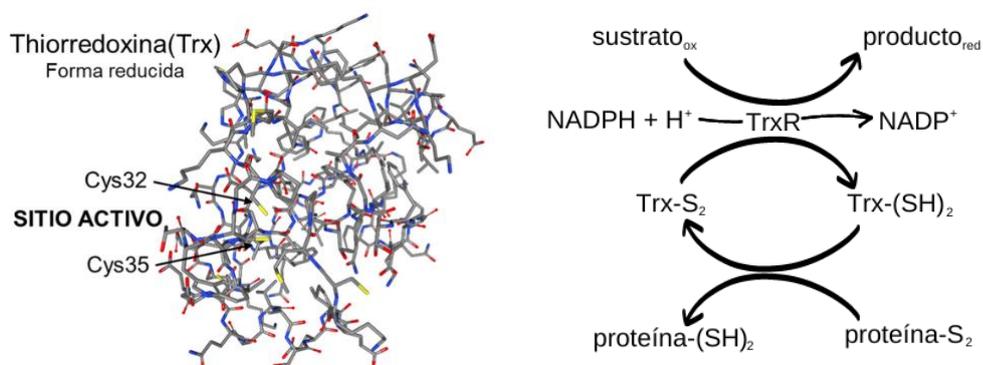


Figura 5.6. (izq) Diagrama de estructura de la Tiorredoxina, y (der.) representación de la función implicada en entornos celulares.

Esta proteína fue elegida como modelo de estudio para analizar las implicancias a nivel biológico de los resultados obtenidos, de acuerdo al mecanismo de acción que tiene en el proceso de biocatálisis a través de transferencia de tioles. Como se observa en la figura 5.6, la Trx interviene en los procesos de óxido-reducción mediada por tioles a través de la reducción y oxidación de su sitio activo, generando un ciclo biocatalítico mediado por la enzima Tiorredoxina reductasa (TrxR) la cual restituye el sitio activo nativo de la Trx para poder seguir cumpliendo su rol biológico. Cuando el entorno celular presenta un ambiente oxidante, la mayoría de las proteínas y sustratos se encuentran oxidados, por lo que el rol de la Trx-(SH)₂ es la de reducirlos oxidando su sitio activo, y completando el ciclo catalítico reduciéndose nuevamente a partir de la acción de la TrxR, mecanismo en el cual interviene una molécula de NADPH por ciclo. La relevancia biológica de este proceso se discutirá en el próximo capítulo, en el que se profundiza sobre la importancia de la Trx para que las células no presenten estrés oxidativo intracelular frente a entornos oxidantes.²³⁴

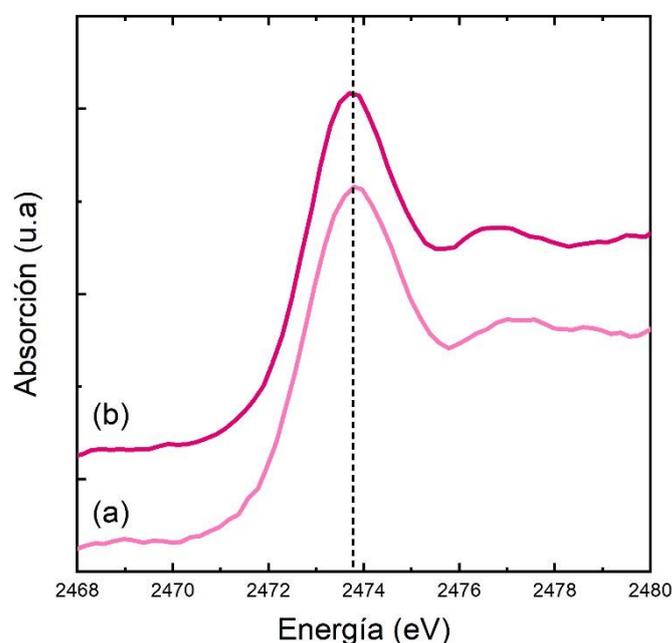


Figura 5.7. Espectros XANES normalizados del borde S-K de: Tiorredoxina en solución de PBS pH 7,4 (a) antes y (b) después del filtrado con DTT. Las líneas verticales discontinuas indican la energía correspondiente al estado de oxidación de S⁻².

A fin de realizar la obtención de los espectros S-K XANES en la oxidación mediada por Ag₅-AQC_s de la Trx, se utilizó PBS con pH y fuerza iónica controlada a fin de mantener la estructura nativa de la proteína durante la reacción. Bajo la hipótesis de que la Trx podría ser oxidada fuera del entorno celular, se realizó un tratamiento previo con ditioneitol (DTT) para asegurar el estado reducido de las cisteínas presentes en el sitio activo de la enzima.

Debido a que el DTT tiene átomos de azufre en su estructura química, realizamos una caracterización de la Trx antes y después del proceso de filtrado que se realizó junto al DTT, a fin de monitorear la remoción de esta molécula previo a la reacción con Ag₅-AQC_s.

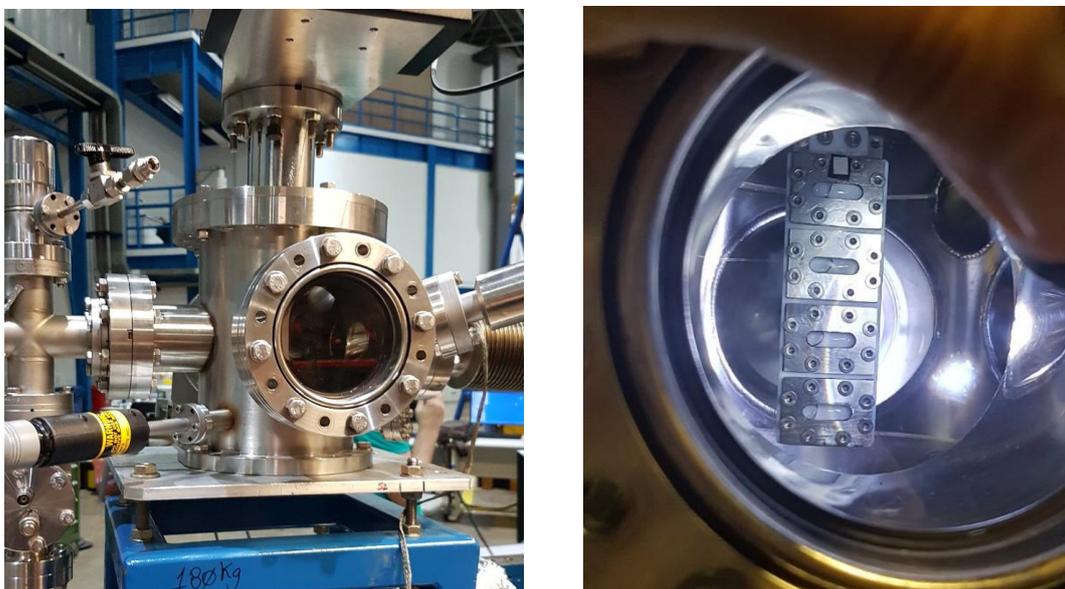


Figura 5.8. (Izq.) Instrumentación de la cámara portamuestras de UHV de la línea SXS del LNLS, (Der.) Imagen de la celda portamuestras líquidas utilizada en los experimentos de Ag₅-AQC_s y Trx.

Una vez filtrada la proteína en PBS, se realizó la mezcla de reacción enfrentándola a Ag₅-AQC_s para realizar la reacción de oxidación mediada por *clusters*. La figura 5.9 muestra el espectro obtenido para el borde S-K XANES en la mezcla de reacción mencionada anteriormente, donde se observa la Trx antes y después del tratamiento con Ag₅-AQC_s (espectros a y b respectivamente).

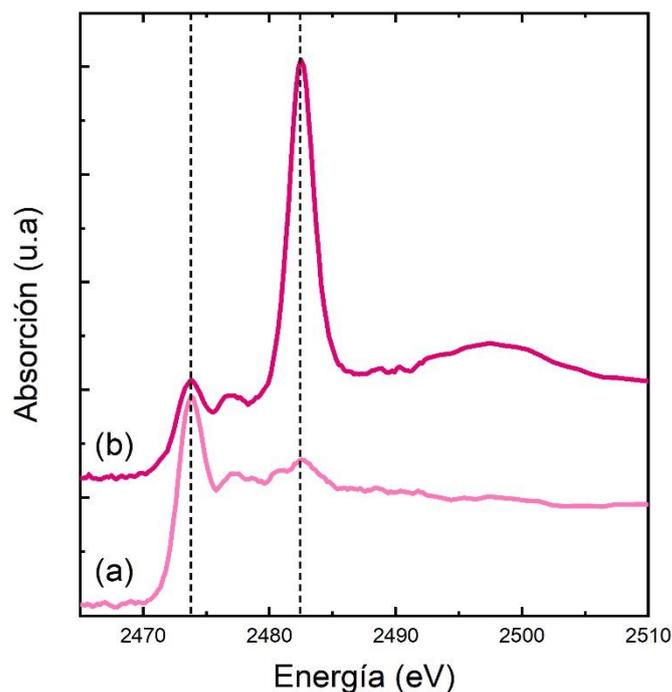


Figura 5.9. Espectros XANES normalizados en el borde S-K de: Tiorredoxina en solución de PBS pH 7,4 (a) antes y (b) después del tratamiento con Ag5-AQCs. Las líneas verticales discontinuas indican la energía correspondiente a los estados de oxidación del azufre.

Como era esperable, la Trx sólo muestra un pico marcado a 2474,3 eV, que es consistente con las asignaciones realizadas anteriormente para Cys y GSH para especies de azufre con estado de oxidación -2, que corresponden a los tioles de los dos residuos de Cys presentes en su sitio activo. Es importante notar que la expresión reducida de esta molécula es confirmada en el espectro S-K XANES (espectro a, figura 5.9) antes del tratamiento catalítico con Ag5-AQCs, debido a que no se observan resonancias características a especies disulfuros, con la separación de los picos observados para el caso de la Cys y en menor medida para el GSH. Sin embargo, luego del tratamiento con Ag5-AQCs, se puede observar un pico bien marcado que se asocia a especies de S^{+6} (espectro b, figura 5.9). Llamativamente, el pico con menor intensidad en la línea blanca del espectro, a 2474,3 eV, sigue presente. Dicha señal se corresponde a la porción de moléculas de la Trx que no fueron oxidadas durante los tiempos evaluados y que mantienen el estado de oxidación original de los tioles presentes en los residuos de cisteína de la proteína. A su vez, se observa la ausencia de

especies de azufre con estado de oxidación -1, características de los enlaces del tipo disulfuros, que indican que los dos residuos de cisteína accesibles de la Trx son completamente oxidados a través de la acción de Ag₅-AQC_s a S⁺⁶, evidenciando una diferencia respecto de las especies oxidadas de Cys y GSH. Es importante resaltar que los espectros obtenidos en la 5.9 fueron realizados para tiempos de reacción de aproximadamente 1hs, por lo que no es posible observar especies intermedias. Sin embargo, en el espectro obtenido para la mezcla de reacción de Trx y Ag₅-AQC_s se observa que la resonancia característica para la Cys presente en energías entre 2477 y 2478 eV tiene, en este caso, una componente con mayor ancho de pico, lo que podría indicar la presencia de especies de S que no fueron identificadas anteriormente. A pesar de ello, no es posible con estos espectros afirmar definitivamente si el ancho del pico se debe a contribuciones de transiciones para otros estados de oxidación del S, o a las resonancias de la Cys en el entorno químico de la proteína.

5.4 Conclusiones Parciales

Los resultados presentados anteriormente permitieron la caracterización precisa, mediante experimentos XANES en los bordes Ag-L_{III} y S-K, de la estructura electrónica de Ag₅-AQC_s y su efecto catalítico en la oxidación de tioles de Cys, GSH y Trx; respectivamente. De esta manera, se comprueba la utilidad de las técnicas de absorción de rayos X para la caracterización de nanoestructuras y procesos catalíticos, permitiendo, a través de esta técnica no destructiva de la muestra, obtener información acerca de la configuración estructural de *clusters* atómicos de baja atomicidad de Ag y por ende del avance del entendimiento en sus propiedades.

Los espectros XANES en el borde Ag-L_{III} para Ag₅-AQC_s mostraron resonancias en regiones de energías similares a las observadas para Ag⁰, lo que comprueba el estado de valencia cero de los átomos de Ag. Por otra parte, la atenuación en la intensidad de estas resonancias demuestra las características subnanométricas de los *clusters*.

Los experimentos XANES en el borde S-K para la Cys y el GSH en reacción con Ag₅-AQC_s mostraron una fuerte oxidación de los átomos de azufre

de los tioles en dichas moléculas, con la formación de especies de azufre con estado de oxidación +6. A su vez, se observaron resonancias características de especies de azufre con estado de oxidación -1, indicando que en la catálisis oxidativa la formación de enlaces del tipo disulfuro es un punto intermedio en la oxidación completa de los tioles a S^{+6} , como se observó en los experimentos en los cuales se varió la relación en la concentración $[SH]/[Ag_5\text{-AQC}]$. En dichos experimentos, además, se corroboró la dependencia de la concentración en la velocidad de la reacción de oxidación, ya que variando la relación de tioles y $Ag_5\text{-AQC}$ s se obtuvieron estados finales de las reacciones distintos en el mismo período de tiempo. Estos resultados novedosos en el grado de la catálisis oxidativa del azufre no habían sido observados en la reacción con otros catalizadores, hasta el momento de la realización de los experimentos de este capítulo.

La posición y la intensidad de las resonancias observadas en los espectros XANES S-K proporcionaron información sobre el entorno químico de los átomos de azufre en Cys, GSH y Trx. Si bien se notaron diferencias en el grado de oxidación, atribuibles a las distintas conformaciones de las moléculas, respecto a la formación de S^{-1} , es posible concluir que a medida que la catálisis oxidativa fue más fuerte, ya sea por aumento en la concentración o por accesibilidad de los grupos tioles en las moléculas estudiadas, la señal correspondiente a la transición $1s \rightarrow (S-C)\sigma^*$ se hizo más débil en comparación con la señal a 2473 eV, lo que sugiere la ruptura del enlace S-C en el esqueleto de la Cys, aislada o en GSH o Trx, durante la formación de SO_4^{2-} . Estos resultados, concuerdan con los estudios de simulaciones teóricas descritos en el trabajo colaborativo realizado con el grupo de la Universidad de Santiago de Compostela publicado recientemente.²³⁶

Con estos experimentos, se demuestra la capacidad catalítica de los aglomerados de pocos átomos de plata, que, en condiciones ambientales de temperatura, y a presión de oxígeno atmosférica se logra la oxidación de especies de azufre desde estados de oxidación de S^{-2} a S^{+6} . Frente a la importancia introducida en este capítulo del rol del azufre en procesos bioquímicos de gran parte de los seres vivos, los resultados presentes en este capítulo proyectan potenciales aplicaciones referidas al uso de $Ag_5\text{-AQC}$ s y sus implicancias en sistemas biológicos para distintas condiciones, en las cuales la

preservación de la actividad de los grupos tioles en GSH y Trx tenga relevancia para la viabilidad de dichos sistemas. Algunas de estas implicancias se abordan en el siguiente capítulo.

Capítulo 6

Implicancias biológicas en la catálisis
oxidativa de Ag5-AQCS

6.1 Introducción

En el capítulo anterior se analizó, a través de la espectroscopía S-K XANES, el efecto en la catálisis oxidativa de Ag₅-AQC sobre Cys, GSH y Trx, observándose una fuerte oxidación en los átomos de azufre que inicialmente se encontraban en las moléculas de tioles y que resultaron oxidados hasta especies conteniendo S⁺⁶ en todas las reacciones analizadas que fueron caracterizadas mediante técnicas de absorción de rayos X. La acción catalítica de Ag₅-AQC sobre las moléculas analizadas, que presentes en entornos celulares cuentan con funciones esenciales para la viabilidad celular, introduce un enfoque novedoso en la investigación de nanomateriales catalíticos con implicancias biológicas.

Los organismos aeróbicos se encuentran constantemente expuestos a reactivos oxidantes de diversos orígenes, cuyos efectos son neutralizados a través de una compleja maquinaria enzimática y molecular antioxidante. Mientras que la exposición a altas dosis de especies oxidantes, o a un bajo nivel de respuesta antioxidante, puede resultar en un daño crítico a los componentes celulares, y por ende convertirse en citotóxico; las alteraciones moderadas de la homeostasis redox, comúnmente, llevan a la señalización de respuesta a esta condición.²³⁷ La señalización redox es una respuesta al estrés oxidativo estudiada en profundidad, que conduce una serie de efectos en cadena en la que se incluye la expresión de enzimas protectoras y reparadoras, entre estas, la Trx. Este proceso no necesariamente sucede únicamente frente a eventuales estímulos externos, sino que, por el contrario, es parte del metabolismo normal en células sin estrés que ocurre frente a la producción endógena de especies oxidantes. Los oxidantes producidos en el interior de las células como parte del metabolismo, actúan como segundos mensajeros pudiendo activar e inactivar factores de transcripción, canales de membrana y enzimas metabólicas, y modular las vías de señalización de fosforilación y dependientes del calcio. Estos procesos incorporan las principales redes reguladoras de las células, dando a las señales redox la capacidad de estimular y sintonizar la mayoría de los aspectos de la fisiología celular.

Un grupo importante de moléculas producidas de manera endógena en las células aeróbicas son las denominadas especies reactivas de oxígeno

(ROS), entre las que se incluyen el oxígeno singlete, H_2O_2 y los radicales superóxido e hidroxilo ($^{\circ}OH$) como productos en el metabolismo de oxígeno.²³⁸ Como se mencionó anteriormente, estas moléculas actúan como señalizadores en diversos procesos metabólicos celulares, aunque en ciertos estados fisiológicos pueden ser letales. Particularmente para este grupo de moléculas, las células desarrollaron una serie de estrategias de defensa, tanto de reparación, como de eliminación de ROS.²³⁹ GSH tiene un rol central en la señalización y neutralización de las ROS, mediante la provisión de equivalentes reductores a las enzimas responsables de eliminar las ROS, a través la oxidación del tiol presente en el residuo de Cys de su estructura para formar un dímero de GSH a partir de un enlace disulfuro (GSSG).^{237,240} Por la importancia en este proceso, y debido a que el GSH es de las moléculas antioxidantes con mayor concentración dentro de las células (1-10 mM), éstas disponen de distintos mecanismos para mantener la relación GSH/GSSG estable en proporciones donde prepondera la especie reducida GSH, $\approx 100:1$.²¹⁶ Esta proporción decrece durante el estrés oxidativo, y por ende afecta indirectamente a las estructuras y componentes celulares. En gran parte de los mecanismos desarrollados por las células para neutralizar las ROS intervienen un extenso grupo de proteínas que, a través de grupos tioles en sus estructuras, neutralizan las ROS para que no se produzca acumulación y por ende no generen citotoxicidad. Particularmente la Trx reduce las proteínas oxidadas por efecto de las ROS mediante los grupos -SH de su sitio activo, desencadenando diversos procesos que detienen el efecto de las ROS. Sin embargo, cuando los mecanismos de protección de las células no son suficientes para neutralizar las ROS, esto induce estrés oxidativo, que implica la acumulación de las moléculas oxidantes que generan citotoxicidad, en muchos casos provocando condiciones patológicas e incluso la muerte celular.^{241,242}

En condiciones fisiológicas normales, los tioles de los residuos Cys de las proteínas pueden encontrarse como Cys-SH o como tiolatos Cys-S⁻, estos últimos con mayor susceptibilidad a la oxidación que Cys-SH.²⁴³ Durante la señalización redox, H_2O_2 oxida el anión tiolato de las Cys en algunas proteínas, formando su especie de ácido sulfénico Cys-SOH, que produce un cambio alostérico en la proteína en cuestión, y por ende modificando su función. Esta especie oxidada de la Cys puede ser reducida nuevamente a Cys-S⁻ mediante

enzimas disulfuro reductasas, Trx y glutarredoxina entre otras.²³⁷ Este mecanismo de señalización ocurre en el orden nanomolar de H₂O₂, mientras que a concentraciones más altas, el anión tiolato es oxidado a especies sulfínicas o sulfónicas (S⁺² y S⁺⁴, respectivamente). Estas modificaciones en los residuos de Cys no son reversibles, y la maquinaria enzimática celular no puede corregirlas, generando de esta manera estrés oxidativo. Esto sucede en diversas condiciones patológicas, donde la producción de ROS supera la capacidad de las células para neutralizarlas, y por ende genera daños en las estructuras y componentes celulares, o en algunos casos, como en ciertos tipos de cáncer, generan efectos como la transcripción de ciertos genes necesarios para la proliferación de las células tumorales.²⁴⁴

Las células tumorales deben mantener la tasa de crecimiento desregulado y su proliferación en condiciones de falta de nutrientes. Por esta razón, necesitan aumentar la actividad mitocondrial para producir ATP, organela en donde se producen mayoritariamente las ROS. Además de los defectos metabólicos que produce el aumento de las ROS, también producen hipoxia, estrés del retículo endoplasmático y transcripción de oncogenes.²⁴⁴ Para compensar esta condición, los niveles de antioxidantes que actúan para compensar el aumento en la concentración de ROS, como GSH, son también aumentados para mantener la homeostasis redox. Se encuentra reportado en la bibliografía que los niveles elevados de ROS ayudan a la tumorigénesis al permitir vías de señalización que son dependientes del factor de crecimiento y de factores de transcripción que favorecen la formación y progresión del tumor.²⁴⁵ Esta condición de aumento en la producción de ROS en el caso de ciertos tipos de cáncer, ha tomado relevancia en la investigación como un enfoque novedoso para combatir este grupo de patologías, particularmente ha sido reportado que la modificación de la homeostasis redox es un buen enfoque en la muerte selectiva de células tumorales.²⁴⁶

Existen dos estrategias que abordan el enfoque anterior: disminuir la concentración de ROS para prevenir la proliferación y la progresión tumoral, o de manera contraria, aumentar la producción de ROS para causar la muerte de las células tumorales.²⁴⁷ Disminuir los niveles de ROS puede ser una estrategia atractiva, sin embargo, algunos estudios muestran que la suplementación de antioxidantes a través de la dieta, como vitamina A o E, aumenta la incidencia

de cáncer.^{248,249} Los antioxidantes dietarios no han mostrado la detención de la señalización protumorigénica por ROS de una manera efectiva, y en cambio, promueve la progresión de ciertos tumores a través de reducción en la toxicidad celular de las ROS.²⁵⁰ Por otra parte, la estrategia contraria, aumentar los niveles de ROS en las células tumorales puede ser una estrategia interesante debido a que estas células presentan niveles basales superiores de ROS que en las células sanas, y por lo tanto, podrían ser más sensibles a un aumento en su concentración. Además, cuando las células tumorales metastásicas se desprenden del tumor primario, los niveles de ROS aumentan para regular vías de señalización y la actividad transcripcional para favorecer la migración celular y su invasión.²⁵¹ Este aumento en los niveles de ROS podría causar daño celular, sin embargo, es evitado mediante las vías antioxidantes propias de las células, que permite la supervivencia y el crecimiento de las células metastásicas. Además, el entorno oxidante de la sangre, al momento de la invasión de las células al torrente sanguíneo, impide la supervivencia y la proliferación de las células tumorales circundantes,²⁵² por lo que se sugiere que la inducción de la generación de ROS podría ser un enfoque acertado en la prevención de la metástasis. Dado que inducir el incremento de las ROS de forma selectiva en las células tumorales podría ser complejo, una opción prometedora es inhibir los sistemas antioxidantes, con el fin de aumentar la efectividad en el daño de las ROS.²⁵³

Muchas estrategias de terapia en el tratamiento de cáncer utilizan drogas quimioterapéuticas o radioterapia que actúan idealmente a través del aumento de las ROS.^{254,255} Sin embargo, existen reportes de resistencia los tratamientos debido a la adaptación redox a través de la expresión de proteínas isoformas o vías compensatorias sobre reguladas.^{256,257} A su vez, ha sido identificado que el metabolismo de GSH se encuentra involucrado en la resistencia de los tratamientos,²⁵⁸ sobre todo asociado a los compuestos de platino, por lo que desarrollar terapias de modulación del GSH podría aumentar la eficiencia de otras terapias. De manera similar, los cambios en el metabolismo relacionado con la acción de la Trx también se encuentran implicados en ciertas resistencias a los tratamientos. Por esta razón, el estudio sobre la inactivación de este grupo moléculas encargadas de regular la homeostasis redox adquiere relevancia desde distintos enfoques disciplinares.

En este contexto, los resultados obtenidos en el capítulo anterior respecto a la catálisis oxidativa de Ag₅-AQCs sobre Cys, GSH y Trx adquieren mayor relevancia por vislumbrar un enfoque en su potencial aplicación con implicancias biológicas. En este capítulo se abordarán experimentos de catálisis oxidativa de Trx en presencia de ROS, para estudiar el efecto de estas moléculas en las reacciones, realizando una caracterización *in situ* de las especies químicas de azufre involucradas a través de técnicas de absorción de rayos X en condiciones que se asemejen a entornos oxidantes para esta proteína. A su vez, se analiza de manera preliminar la interacción de Ag₅-AQCs con membranas biológicas en ensayos *in-vitro*. Los resultados presentados en este capítulo fueron desarrollados colaborativamente con el grupo de investigación del Dr. López-Quintela, del Departamento de Fisicoquímica y del Dr. Fernando Domínguez Puente, del Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS), ambos pertenecientes a la Universidad de Santiago de Compostela, España.

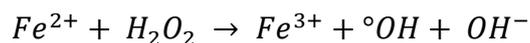
6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Reactivos

Para las mezclas de reacción de Trx con ROS se utilizó Trx recombinante de *E. coli* liofilizada que fue resuspendida en 100 µl de PBS para reproducir la misma fuerza iónica y pH en condiciones fisiológicas. Las especies reactivas de oxígeno utilizadas fueron peróxido de hidrógeno, H₂O₂, y radicales hidroxilos, °OH, en concentraciones 1/10 equivalentes de electrones de O₂ en H₂O a 25 °C. Na₂S₂O₃ fue utilizado para la calibración de los espectros XANES depositado en discos de carbono (Ted Pella, Inc®) para su medición. ditiotreitól (DTT) se utilizó para reducir Trx previo a las medidas. Las soluciones utilizadas de Ag₅-AQCs fueron preparadas a partir de una solución de 2 mg/l en PBS. Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos a de Sigma-Aldrich. Para la preparación de PBS se utilizó agua Milli-Q® (18.2 MΩ/cm).

6.2.2 Reacción de Fenton

Las soluciones utilizadas de radicales hidroxilos ($^{\circ}\text{OH}$) fueron preparadas *in situ* en las mezclas de reacciones a partir de la reacción de Fenton mezclando H_2O_2 y FeCl_2 para obtener las concentraciones deseadas en los experimentos. Las soluciones fueron preparadas en buffer PBS.



6.2.3 Caracterización XANES

Los experimentos de espectroscopía de rayos X del borde cercano (XANES) del borde K del azufre (2470 eV) fueron realizados en la línea de luz SXS en el *Laboratório Nacional de Luz Síncrotron* (LNLS, Campinas, Brasil) que se encuentra equipada con un monocromador de cristal doble InSb (111) con una apertura de rendija de 1 mm, para alcanzar una resolución de aproximadamente 0,5 eV en el borde S-K. Los detalles de la configuración experimental se encuentra descrita en la bibliografía.²²³ Los espectros de absorción de rayos X se obtuvieron en el modo de fluorescencia, colectando los rayos X emitidos de las líneas de emisión S $\text{K}\alpha_{1,2}$ (a 2309,5 y 2308,4 eV, respectivamente) para cada borde medido. Los experimentos de absorción fueron realizados en UHV (10^{-8} mbar) a temperatura ambiente, y en una celda líquida diseñada *ad hoc* para los experimentos realizados con especies reactivas de oxígeno a temperatura ambiente y presión atmosférica, permitiendo determinar los intermediarios de reacción iniciales en la mezcla de reacción. La calibración de los espectros se realizó de manera coincidente con los experimentos realizados en el capítulo 5 (ver sección 5.2.3)

Los espectros XANES normalizados fueron obtenidos luego de la substracción del fondo y la normalización en la intensidad de la señal luego del borde de absorción. La cuantificación de las componentes de los espectros XANES se realizaron utilizando el software Athena.

Para reproducir las condiciones intracelulares, antes de la caracterización para la proteína estudiada, la mezcla fue tratada con ditioneitol (DTT) para reducir los residuos de cisteína de la proteína y posteriormente filtrada.

6.3 Resultados y Discusión

6.3.1 Efecto oxidante de Ag5-AQCs bajo presencia de especies reactivas de oxígeno

En el capítulo anterior se realizó el estudio de la capacidad oxidativa de Ag5-AQCs en Cys, GSH y Trx mostrando que la oxidación de especies de azufre ocurre fuertemente en presencia de Ag5-AQCs en la mezcla de reacción. A fin de poder contar con información precisa respecto de los mecanismos de oxidación de Ag5-AQCs y de las implicancias posibles en sistemas biológicos de interés, se realizaron experimentos S-K XANES para la Trx presencia de ROS. Como se menciona en la sección 6.2 las ROS utilizadas fueron H_2O_2 y $^\circ\text{OH}$, estos últimos producidos a partir de la reacción de Fenton. Las medidas S-K XANES fueron realizadas en condiciones de pH y fuerza iónica controladas (PBS, pH 7.4) a fin de no alterar la estructura nativa de la Trx. Debido a que, tanto H_2O_2 como $^\circ\text{OH}$ tienen carácter fuertemente oxidante, capaz de alterar los tioles de los residuos de Cys presentes en la Trx, se realizaron complementariamente experimentos S-K XANES de control para evaluar la contribución de la oxidación por la acción propia de las ROS utilizadas.

Como se observa en la figura 6.1, en ambos casos (H_2O_2 y $^\circ\text{OH}$) hay un efecto marcado en la oxidación de la Trx que presenta varios cambios respecto a lo observado para la oxidación mediada por Ag5-AQCs (ver figura 5.9). De los espectros S-K XANES obtenidos se observan tres picos bien definidos: por un lado, la contribución para especies de S^{-2} para los átomos de azufre que no reaccionaron en los tiempos de medida; un pico en 2477,3 eV que no había sido observado en los espectros anteriores, y un tercer pico un 2482,3 eV. El pico observado a energías de 2477,3 eV implica la existencia de procesos de oxidación con especies intermedias, que pueden indicar una diferencia en el mecanismo de oxidación frente al observado por Ag5-AQCs. Por otra parte, el pico observado a mayores energías puede ser asignado a especies de S^{+4} , compatible con la formación del ácido sulfónico de cisteína. Es importante resaltar, que en ninguno de los dos espectros obtenidos se observaron contribuciones a energías características para las transiciones en SO_4^{-2} .

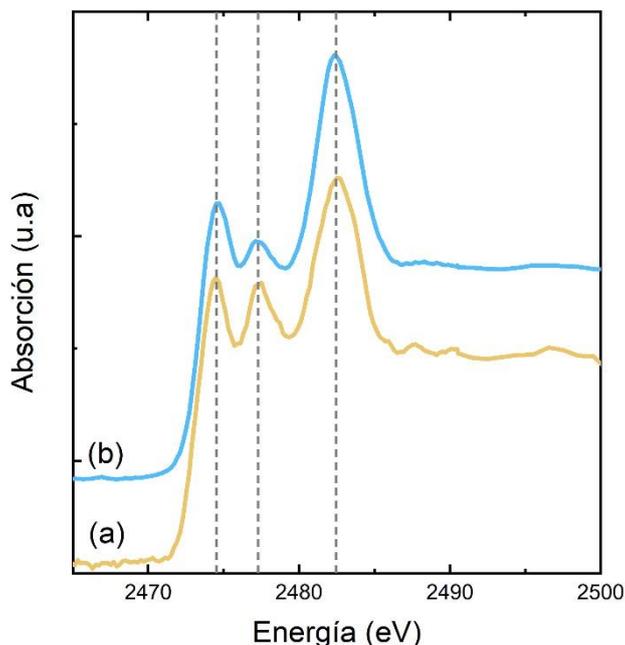


Figura 6.1. Espectros XANES normalizados en el borde S-K de: Tiorredoxina en solución PBS, pH 7,4 luego del agregado de: (a) peróxido de hidrógeno (b) radicales hidroxilos. Las líneas verticales punteadas indican la energía correspondiente a los estados de oxidación del azufre (S^{-2} , S^{+2} , S^{+4} de izquierda a derecha)

A partir de haber evaluado la capacidad oxidativa solo para el caso de las ROS, se obtuvieron los espectros para la Trx en las mezclas de reacciones anteriores, pero ahora agregando Ag5-AQCs a la solución. Los espectros S-K XANES obtenidos se muestran en la figura 6.2. A partir de la observación de los espectros obtenidos en las mezclas de reacción con Ag5-AQCs y las ROS, se evidencia que los picos presentes en las reacciones en ausencia de Ag5-AQCs se encuentran en las mismas posiciones, salvando el caso de la mezcla con $^{\circ}OH$, en los cuales se acentúan las intensidades relativas de cada uno de los picos. La componente a menores energías, asociada a la presencia de los átomos de azufre con estado de oxidación S^{-2} presenta un ensanchamiento, posiblemente por la contribución de especies S^{-1} , que no había sido observado en la reacción en ausencia de AQC y que presenta un corrimiento de 0,2 eV respecto al correspondiente a la mezcla de Trx con Ag5-AQCs. Respecto de la componente observada en ambas reacciones a 2477,3 eV puede ser atribuido a especies de azufre en forma de sulfinato de Cisteína, que es un intermediario en la oxidación completa conocido para el mecanismo oxidativo por H_2O_2 .^{259,260} En dicho

mecanismo oxidativo también se describe como estado final la presencia de especies de S^{+4} correspondiente al ácido sulfónico de la cisteína.

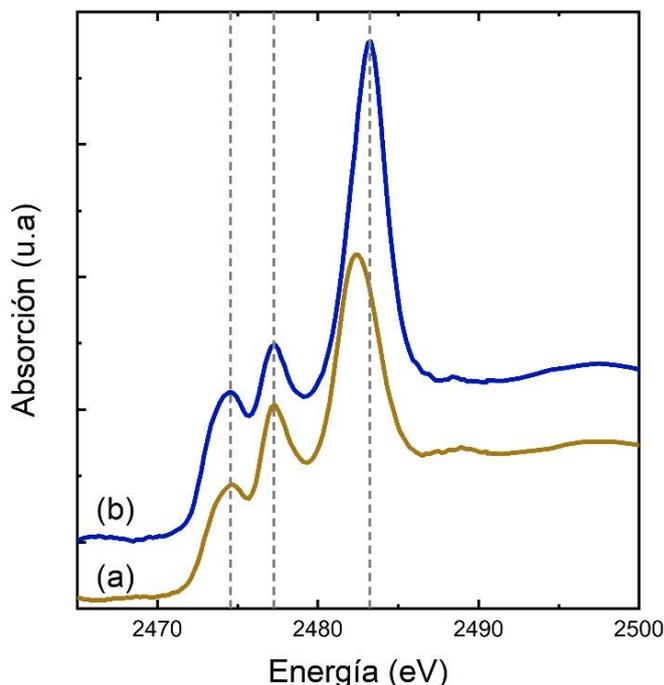


Figura 6.2. Espectros XANES normalizados en el borde S-K de: Tiorredoxina en solución PBS, pH 7,4 luego del agregado de Ag₅-AQC's en: (a) peróxido de hidrógeno (b) radicales hidroxilos. Las líneas verticales punteadas indican la energía correspondiente a los estados de oxidación del azufre (S^{-2} , S^{+2} , S^{+6} de izquierda a derecha)

Analizando comparativamente los estados finales entre las mezclas de reacción $Trx + Ag_5-AQC's + H_2O_2$ y $Trx + Ag_5-AQC's + ^\circ OH$ se puede extraer más información que permite vislumbrar el mecanismo en la catálisis oxidativa. En la figura 6.2 y 6.3 se muestran los espectros XANES con los estados de oxidación (líneas discontinuas) esperados para ambos casos. Es evidente que en el caso de la reacción con $^\circ OH$ el estado final a los tiempos experimentales presenta especies con estados de oxidación S^{+6} , que es consistente con lo esperado para el caso de radicales, debido a que la oxidación suele conducir a rupturas de enlaces. Para el caso del espectro correspondiente a la reacción con H_2O_2 el pico a mayores energías no presenta su máximo en la posición característica de los sulfatos libres (2483,1 eV), sin embargo, el ancho del pico indica que hay más de una contribución, por lo que se asume que el estado final para este caso serían átomos de S con estados de oxidación +4 y +6.

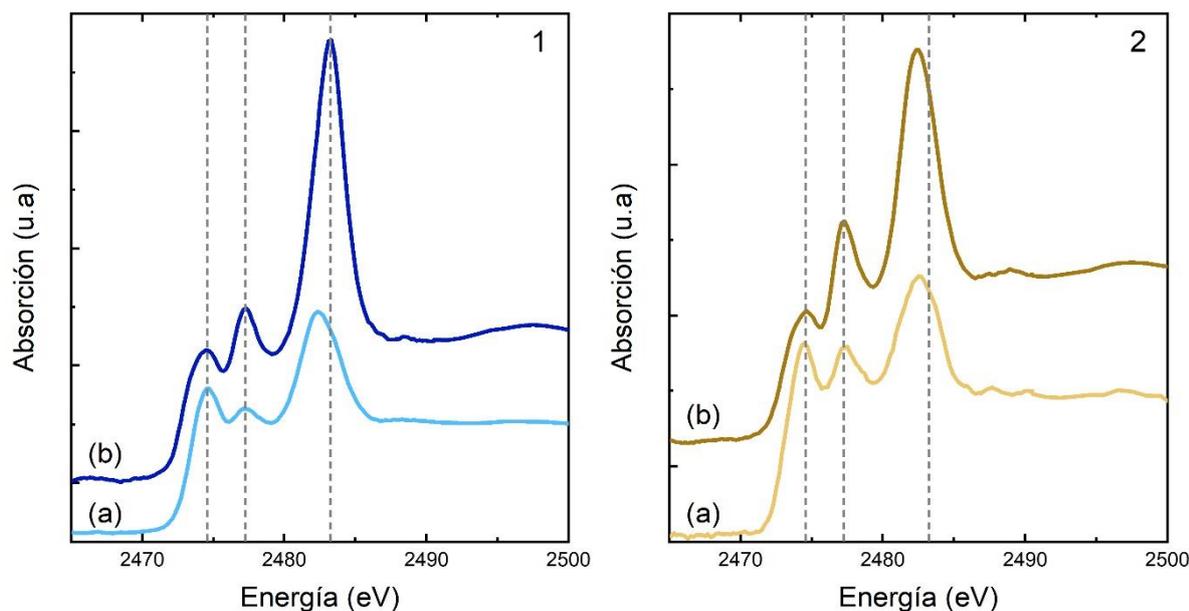


Figura 6.3. Espectros XANES normalizados en el borde S-K de: Tiorredoxina en solución PBS, pH 7,4 para las mezclas de reacción con Ag5-AQCs con (1) peróxido de hidrógeno (2) radicales hidroxilos. Los espectros a y b para cada gráfico corresponden a los obtenidos sin y con Ag5-AQCs, respectivamente. Las líneas verticales discontinuas indican la energía correspondiente a los estados de oxidación del azufre. (S^{-2} , S^{+2} , S^{+6} de izquierda a derecha)

6.3.2 Análisis Cuantitativo de las especies de azufre según su estado de oxidación

Debido a la incerteza en la identificación de las especies oxidadas del azufre luego de la reacción con Ag5-AQCs y especies reactivas de oxígeno, en esta sección se muestra el análisis cuantitativo de cada uno de los espectros S-K XANES que permite tanto un análisis en mayor profundidad para visibilizar el mecanismo de reacción, como también obtener información respecto de las implicancias a nivel biológico que tendrían los Ag5-AQCs respecto a la oxidación de proteínas con Cys presente en los sitios activos.

En la figura 6.4 se muestra la deconvolución de los espectros S-K XANES donde se observa que los Ag5-AQCs incrementan notablemente la actividad catalítica en presencia de especies reactivas de oxígeno. Como se muestra en el panel derecho de dicha figura, que corresponde a las mezclas de reacción con

Ag5-AQCs, la distribución de especies oxidadas presenta diferencias significativas respecto a las reacciones en ausencia de Ag5-AQCs. Para las mezclas de reacción sin Ag5-AQCs se pudieron identificar al menos tres poblaciones de azufre con distintos grados de oxidación: S^{+2} , S^{+4} y S^{+6} . Esta distribución corresponde al poder oxidante propio de las ROS, a través de los mecanismos de oxidación característicos.²⁶¹ Cuando se agrega a estas mezclas de reacción Ag5-AQCs la población de especies oxidadas cambia.

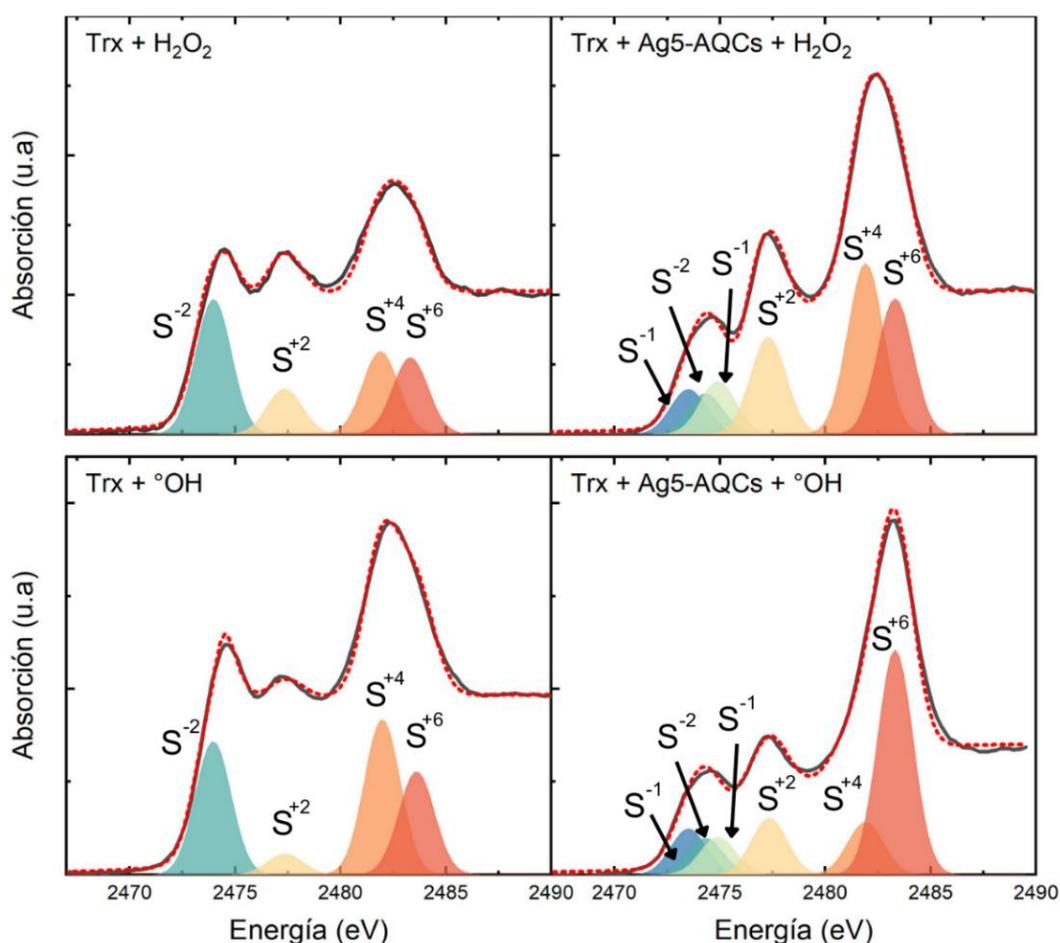


Figura 6.4. Espectros XANES normalizados en el borde S-K de: Tiorredoxina en solución PBS, pH 7,4 para las mezclas de reacción con Ag5-AQCs y ROS junto con el ajuste para cada estado de oxidación del azufre y su asignación correspondiente.

La presencia del catalizador (AQCs) parece modificar el mecanismo de oxidación, debido a que se observan especies de azufre con estado de oxidación -1 a través de la formación de enlaces del tipo disulfuro. A su vez, la proporción entre especies altamente oxidadas y sin oxidar, es notablemente mayor (ver

figura 6.5). Se observa en el panel izquierdo de la figura 6.5 la alta actividad catalítica de Ag₅-AQC_s en presencia de ROS. No se observan diferencias significativas en el poder oxidante entre Trx/H₂O₂/Ag₅-AQC_s y Trx/^oOH/Ag₅-AQC_s, ya que el 92,55% y 91,58% de los átomos de azufre se encuentran oxidados, respectivamente. Cuando las diferentes componentes son analizadas (Ver figura 6.5, panel derecho) se observa que la presencia de Ag₅-AQC_s facilita la oxidación radicalaria convirtiendo a la proteína en un mejor sustrato para la catálisis.

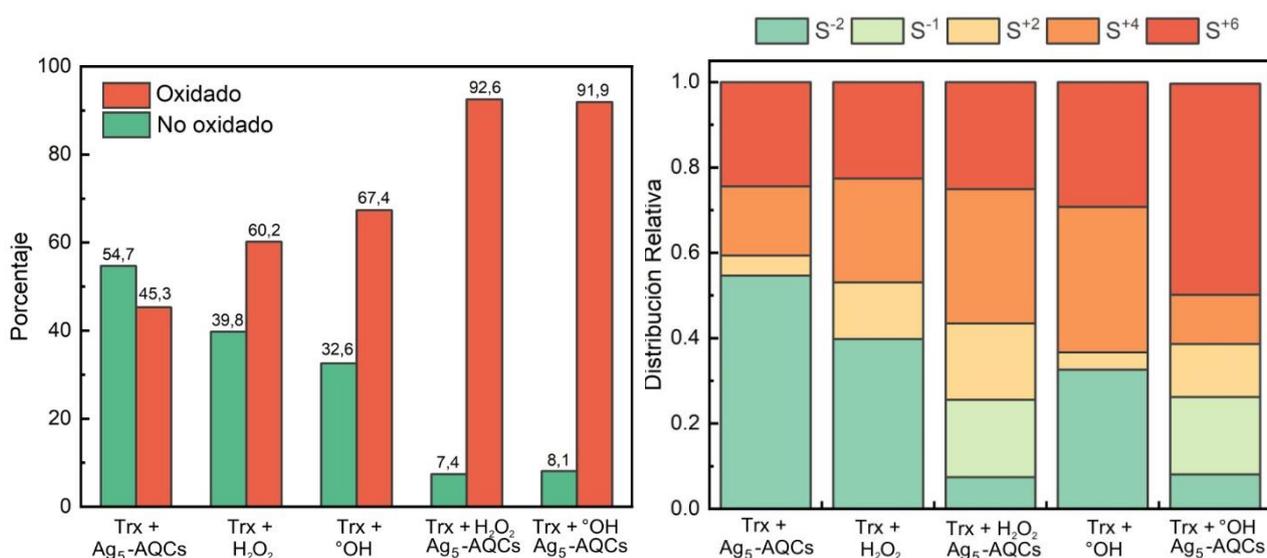


Figura 6.5. Porcentaje de especies oxidadas y no oxidadas para las diferentes mezclas de reacción medidas para la Trx a través de S-K XANES (panel izquierdo). Diferenciación de la población de especies oxidadas a través del cálculo del área bajo la curva de cada componente en la deconvolución de los espectros (panel derecho)

De este modo, se observa una capacidad oxidante notable de Ag₅-AQC_s en presencia de ROS, altamente superior respecto a las reacciones analizadas sin ROS. No se observan procesos aditivos en la oxidación propia de ROS y la de Ag₅-AQC_s por lo que existe un efecto sinérgico en la catálisis en presencia de estos oxidantes. A su vez, para el caso de la oxidación de Trx con Ag₅-AQC_s y ROS, se observan contribuciones de especies de S⁻¹ (ver figura 6.5, panel derecho) que no habían sido observado en los experimentos con Trx + Ag₅-AQC_s, sugiriendo un cambio en el mecanismo de oxidación. A su vez, se muestra que el H₂O₂ sin Ag₅-AQC_s oxida al 60% de la Trx (25 % S⁺⁴ y 22 % S⁺⁶)

mientras que agregando Ag₅-AQC's a la mezcla de reacción, esa proporción aumenta a $\approx 92\%$ (31 % S⁺⁴ y 26 % S⁺⁶). Cuando se analizan las reacciones con °OH la proporción de oxidación de azufre de la Trx sin Ag₅-AQC's es del 88% (34 % S⁺⁴ y 29 % S⁺⁶), mientras que con Ag₅-AQC's este valor aumenta a $\approx 92\%$ (12 % S⁺⁴ y 50 % S⁺⁶), aumentando llamativamente la proporción de especies de S⁺⁶ debido a los efectos de la oxidación radicalaria que favorece la escisión del S del esqueleto de la Cys para formar SO₄²⁻. Con estos resultados, es posible afirmar que la actividad de Ag₅-AQC's en la oxidación de Trx aumenta con diferentes oxidantes con una tendencia O₂ \ll H₂O₂ $<$ °OH. A su vez, se muestra que el efecto oxidante de Ag₅-AQC's en presencia de ROS conduciría a la oxidación irreversible del sitio activo de la proteína, suprimiendo su actividad biológica y la posibilidad de reparación de la misma por mecanismos celulares.²⁶²

6.3.3 Interacción de los Ag₅-AQC's con membranas Celulares

La técnica de *patch-clamp* permite medir corrientes iónicas de transmembrana manteniendo fijo el valor del potencial de membrana en valores prefijados (en inglés, *voltage-clamp*), o medir la variación de potencial de membrana ante un estímulo fijo de corriente (en inglés, *current-clamp*). Esta técnica resulta ideal para estudiar flujos iónicos de transmembrana. Esta técnica puede ser aplicada en células aisladas y consiste en la aproximación de una micropipeta de vidrio, por medio de un micromanipulador, a la superficie de la membrana de la célula elegida. Una vez en contacto con la membrana celular la aplicación de una pequeña presión negativa permite el establecimiento de un sello de alta resistencia de aproximadamente 10 GΩ, entre el vidrio de esta y la membrana celular, denominado *Giga-seal*.

Experimentalmente existen distintas configuraciones que permiten registrar corrientes en función de las necesidades del objetivo planteado. Cada una de ellas aporta una forma diferente de evaluar el flujo iónico (ver Figura 6.6). En este trabajo utilizamos en particular la configuración denominada de célula completa (*whole-cell*) en la cual se registran corrientes macroscópicas representativas del flujo iónico mediado por la totalidad de los canales iónicos y/o transportadores presentes en la membrana celular, mientras que en las configuraciones denominadas de canal único (*single channel*, en inglés) en sus

variantes *cell-attached* e *inside-out* es posible registrar la corriente de un solo canal iónico.

Para la configuración de *Whole-cell* (figura 6.7) partimos de la configuración de *Cell-attached*, y realizamos una segunda presión negativa desde la pipeta, por la cual se logra retirar la porción de la membrana sellada. De esta manera, la solución de la pipeta dializa la célula y se establece una conexión eléctrica entre el electrodo (en contacto con la solución de la micropipeta) y el interior intracelular.

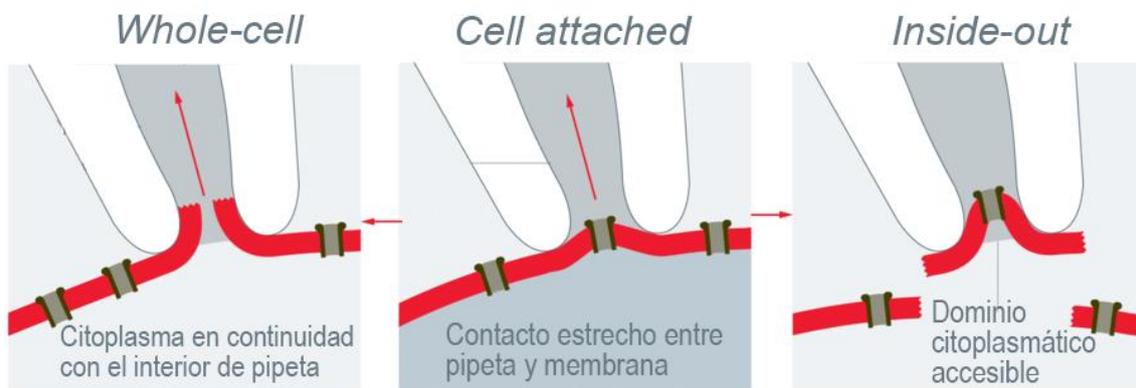


Figura 6.6. Esquema representativo de las configuraciones de la técnica patch-clamp. Imagen adaptada de Leica®

Esta configuración representa un buen modelo para el estudio de canales iónicos en condiciones cercanas a las fisiológicas, dado que permite mantener gran parte de las estructuras intracelulares, establecer gradientes de los distintos iones a ambos lados de la membrana, y registrar las corrientes totales de la célula en condiciones control y luego del agregado de sustancias de interés.

En este trabajo de Tesis se utilizó la Técnica de Patch-Clamp para analizar los potenciales efectos biológicos de los clusters Ag5-AQCs. Se utilizaron células HEK29n cultivo y los registros de corriente se realizaron en configuración de *whole-cell* utilizando una solución intracelular similar al contenido iónico fisiológico (SI) y una solución extracelular (SE) en presencia y ausencia de una concentración de clusters de 40pM partiendo de una solución stock de 20µg/l.

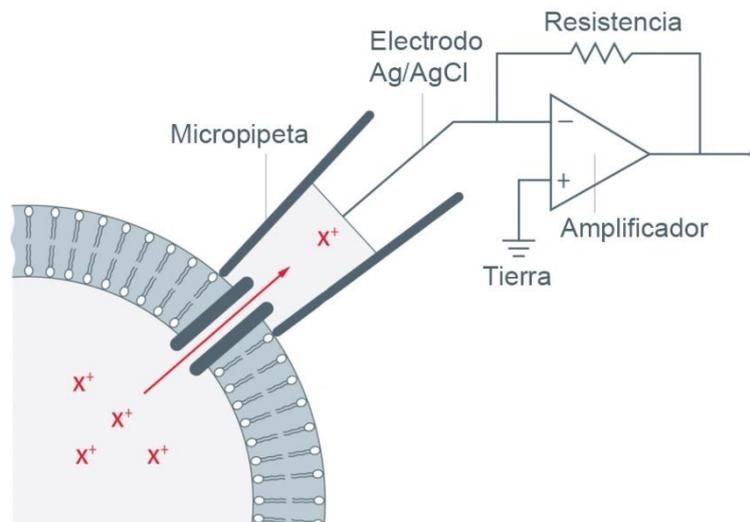


Figura 6.7. Esquema representativo del circuito eléctrico para la configuración *whole-cell*. Imagen adaptada Leica®

Observamos las células con un microscopio invertido (Televal 3; Zeiss, Jena, Alemania) estabilizado mecánicamente sobre una mesa antivibratoria (Newport) recubierto con una caja de Faraday para filtrar los ruidos eléctricos del ambiente. La señal de corriente iónica fue registrada en función del tiempo con un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA), se filtró adecuadamente con un filtro de tipo Bessel de 8 polos a una frecuencia de 2 kHz y se digitalizó (Digidata 1200 Axon Instruments, Foster City, CA) con una frecuencia de muestreo de 20 kHz.

La SE es perfundida mediante una pipeta multivía colocada en la proximidad de la célula investigada y todos los registros fueron realizados a temperatura ambiente. Una vez obtenida la configuración de *whole-cell* se perfunde a la célula con SE y se aplica una rampa de voltaje. En respuesta se registra la corriente macroscópica hasta que alcance estabilidad en su magnitud. Esta condición representa la situación control que permite analizar las características iniciales de la célula. Posteriormente se prosigue a perfundir la SE + Ag₅-AQCs 40 pM y se vuelve a aplicar la rampa de voltaje en estas nuevas condiciones celulares.

En la figura 6.8 se muestra la corriente registrada en respuesta a la rampa de voltaje en una célula HEK293, en condiciones de control (trazado negro), luego de la perfusión de la SE + clusters (rojo) y luego del lavado (azul, perfusión con SE).

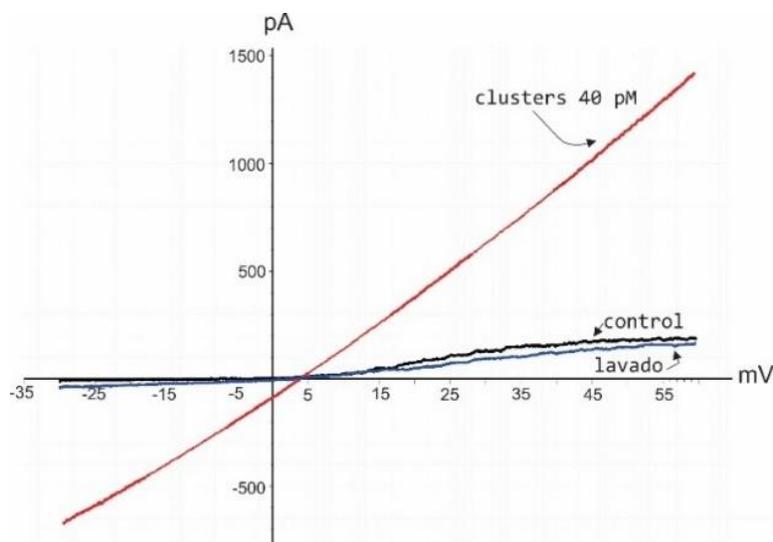


Figura 6.8. Corriente registrada en respuesta a la rampa de voltaje en condiciones de control (negro), luego de la perfusión de la solución extracelular + Ag₅-AQC_s (rojo) y luego del lavado con solución extracelular (azul)

Como se puede observar en las figuras 6.8 y 6.9, Ag₅-AQC_s induce un aumento importante de la corriente iónica a todos los voltajes testeados y el efecto es completamente reversible. Este experimento fue repetido en dos células más con resultados similares. En las barras (figura 6.9) se muestran los valores promedios para dos potenciales de la rampa. Sin embargo, para confirmar la reproducibilidad del efecto es necesaria la realización de experimentos complementarios que confirmen la interacción observada y dilucidar el mecanismo con el cual ocurre. Teniendo en cuenta que Ag₅-AQC_s aumenta la concentración de especies reactivas de oxígeno intracelulares y que oxidan residuos -SH para formar puentes disulfuros, al menos, se podría hipotetizar para futuros ensayos que estos efectos podrían ser la causa de la activación de canales iónicos presentes en la membrana de las células HEK293. Estos resultados muestran también un indicio del proceso por el cual podrían

actuar los Ag₅-AQC_s en los estadios temprano de su aplicación, ya que se muestran activos a una concentración muy inferior a la cual los Ag₅-AQC_s induce muerte celular en células tumorales y en animales.²³⁶

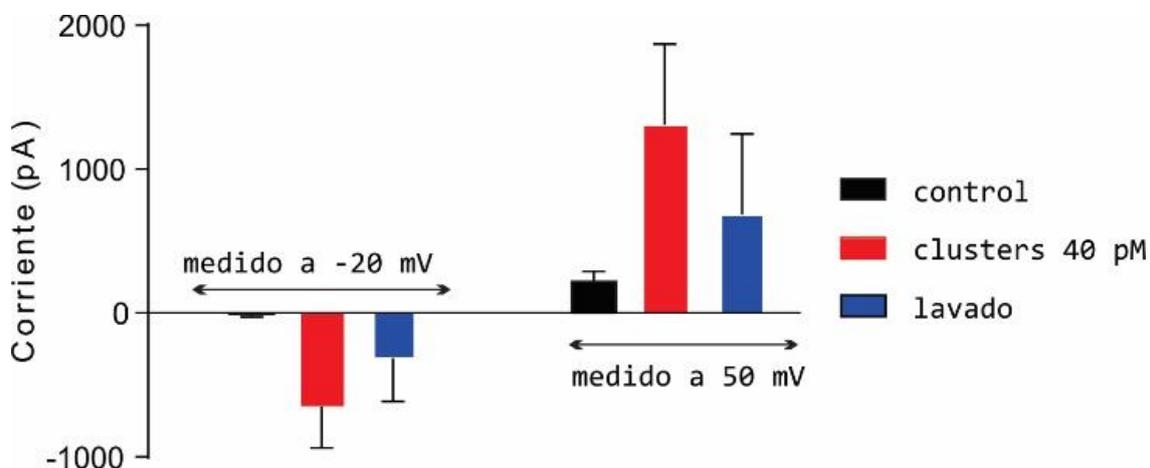


Figura 6.9. Corriente registrada en respuesta a la rampa de voltaje en condiciones de control (negro), luego de la perfusión de la solución extracelular + Ag₅-AQC_s (rojo) y luego del lavado con solución extracelular (azul)

6.4 Conclusiones parciales

Con el fin de obtener información precisa sobre los mecanismos de oxidación de Ag₅-AQC_s y sus implicancias en sistemas biológicos de interés, en este capítulo se realizaron experimentos XANES en el borde S-K de mezclas de reacción de Trx en presencia de ROS. La confrontación de las reacciones en presencia de H₂O₂ y OH[•] permitieron el análisis del proceso catalítico de Ag₅-AQC_s en la oxidación de los tioles de Trx bajo condiciones semejantes a las fisiológicas que colaboraron a comprender si los *clusters* de plata de baja atomicidad presentan potenciales aplicaciones clínicas en patologías en las cuales existe una relevancia característica de la presencia de ROS.

Se presentó en este capítulo la actividad catalítica de Ag₅-AQC_s sobre Trx recombinante de *E. coli* mediante el análisis de espectros XANES en el borde S-K con relaciones de [SH]/[Ag₅-AQC_s]=5000 y durante un período de tiempo de 10 min, debido al carácter oxidante propio de H₂O₂ y OH[•]. Los resultados obtenidos permiten la comparación en el mecanismo catalítico de la reacción de

oxidación en presencia de O₂ exógeno y ROS. En las reacciones estudiadas en presencia únicamente de O₂ a presión ambiental, se observó la formación de ≈ 40% de S en estado de oxidación ≥ -1 (16% S⁺⁴, 24% S⁺⁶). Por otra parte, las reacciones realizadas en presencia de H₂O₂ sin el agregado de Ag₅-AQC_s mostraron especies oxidadas de ≈ 50% de S (25% S⁺⁴ y 22% S⁺⁶) mientras que frente al agregado de *clusters* esta proporción aumentó al 92% de especies de azufre oxidadas. Para el caso de los experimentos con OH[°] sin Ag₅-AQC_s el azufre oxidado de Trx representó ≈ 88% (34% S⁺⁴ y 29% S⁺⁶), mientras que con Ag₅-AQC_s este valor aumenta a ≈ 92% (12% S⁺⁴ y 50% S⁺⁶). En este último caso, el aumento en la proporción de S⁺⁶ formado es atribuible a las características del mecanismo en la oxidación radicalaria.

Los resultados permiten valorizar una tendencia en la catálisis oxidativa en los cuales la capacidad de Ag₅-AQC_s aumenta su actividad O₂ \ll H₂O₂ \ll °OH. Este efecto observado produciría la oxidación irreversible del sitio activo de la Trx, suprimiendo su actividad biológica en el entorno celular.

La configuración experimental utilizada en este capítulo permitió observar especies intermedias en los estados de valencia del azufre, que no habían sido visualizadas en los experimentos XANES del capítulo 5. La identificación de estas resonancias características de especies de azufre +2 y +4 clarifican el mecanismo de catálisis oxidativa mediante la cual Ag₅-AQC_s oxida los átomos de azufre presentes en los tioles del sitio activo de Trx a S⁺⁶. La identificación de estas especies es consistente con los mecanismos propuestos en la bibliografía para la oxidación por estrés oxidativo de proteínas en el entorno celular.²⁶¹

Por otra parte, en los experimentos de interacción de Ag₅-AQC_s con membranas celulares se pudo observar un aumento en la corriente iónica en los voltajes evaluados con un efecto reversible en las concentraciones utilizadas. Si bien con los resultados presentados en la sección 6.3.3 no es posible determinar el mecanismo de la interacción, se puede inferir que la activación de canales iónicos de membrana es inducida por el aumento de la concentración de ROS intracelular o la oxidación de residuos -SH presentes en las proteínas que conforman los canales iónicos, modificando su estructura. Es importante resaltar que las concentraciones utilizadas en estos experimentos fueron del orden de decenas de picomolar, con lo que el efecto a estas concentraciones ya es notable en las estructuras celulares.

Los resultados presentados en este capítulo formaron parte de un trabajo colaborativo junto a los grupos de investigación del Dr. López-Quintela, del Departamento de Fisicoquímica y del Dr. Fernando Domínguez Puente, del Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS), ambos pertenecientes a la Universidad de Santiago de Compostela, España, mediante el cual se estudiaron los efectos de Ag₅-AQC_s en sistemas *in-vitro* e *in-vivo* de células tumorales, donde se observó que efectivamente la aplicación de Ag₅-AQC_s tiene un efecto relevante en la invasividad y proliferación de estas células en diversos estadios de cáncer.²³⁶ Los experimentos desarrollados en el marco de este trabajo de tesis, permitieron dilucidar el mecanismo de acción de Ag₅-AQC_s con estructuras biológicas para fundamentar el efecto observado en sistemas biológicos complejos.

Capítulo 7

Conclusiones Generales y Perspectivas

Esta tesis doctoral tuvo como objetivo general el estudio de aplicaciones al campo de la biotecnología de nanomateriales como las películas delgadas de óxido de grafeno y los aglomerados atómicos de Ag de pocos átomos. El análisis de las características fisicoquímicas de los materiales utilizados permitió comprender el origen de sus propiedades, generando un conjunto de resultados originales y concluyentes sobre la importancia de dichas propiedades para las aplicaciones estudiadas

En el capítulo 3, se sistematizó y optimizó la síntesis de óxido de grafeno, como su posterior reducción a partir del ensamblado controlado de películas delgadas utilizando la técnica de Langmuir-Blodgett, que permitió un control preciso del espesor y morfología de los electrodos resultantes. A su vez, la utilización de técnicas electroquímicas para la reducción de GO permitió generar superficies con distintos grados de reducción que presentaron diferentes propiedades conductoras y químicas. Para la evaluación de las propiedades fueron estandarizados diversos protocolos utilizando técnicas de caracterización como SEM, XPS, AFM, SAXS y técnicas electroquímicas permitiendo obtener una caracterización completa y precisa de la composición química, morfológica y las propiedades relevantes para sus aplicaciones. La optimización en los procesos de síntesis, ensamblado y modificaciones en las superficies de GO estudiadas permitió utilizarlas para el desarrollo de biointerfases enzimáticas funcionales, las que fueron generadas en el capítulo 4. A partir de la optimización de la reducción electroquímica del GO, se evaluaron las plataformas de GO, pErGO y ErGO, demostrándose en todos los casos la existencia de interacciones con la glucosa oxidasa con una fuerte dependencia en la química superficial de los electrodos, y evidenciándose que partir de la “selección” de especies con diferentes grupos C-O y C=O es posible “sintonizar” la superficie para optimizar la señal de reconocimiento en el biosensado mejorando las propiedades eléctricas de las interfases, sin comprometer la actividad enzimática en el proceso de inmovilización. A su vez, se pudieron identificar los grupos funcionales que intervienen en el proceso de inmovilización de GOx sobre las superficies a partir del estudio comparativo con técnicas de caracterizaciones químicas y ópticas, demostrándose que la metodología propuesta es eficiente para generar electrodos con cubrimientos superficiales de la enzima adecuados para su utilización como biointerfases quimioresponsivas. Los estudios aquí

presentados proyectan diversos enfoques sumamente relevantes para la utilización de óxidos de grafeno en plataformas electroquímicas y ópticas de biosensado.

Por otra parte, en el capítulo 5, se realiza un estudio exhaustivo de las propiedades catalíticas de Ag₅-AQC_s, a partir de la espectroscopía Ag-L_{III} y S-K XANES, caracterizando inicialmente las diferencias estructurales respecto de la Ag en estado metálico y iónico, en donde se pudo determinar que la diferencia en las transiciones electrónicas y estados energéticos de las muestras evaluadas es consistente con el estado metálico para los Ag₅-AQC_s. Al evaluar la capacidad catalítica de estos nanocompuestos con tioles de interés biológicos en distintas matrices químicas se pudo comprobar que existe una fuerte dependencia de las reacciones catalíticas en la concentración de los sustratos utilizados y evidenciando un fuerte carácter oxidante de Ag₅-AQC_s frente a los átomos de azufre presente en las estructuras analizadas, llevando a estados de oxidación S⁺⁶ como estado final de la reacción. Posteriormente, la caracterización en moléculas modelo para la oxidación de S permitió evaluar la oxidación de Tiorredoxina en entornos oxidantes comparados en condiciones fisiopatológicas características de ciertas enfermedades, observándose una sinergia entre especies reactivas de oxígeno presentes en la mezcla de reacción y los Ag₅-AQC_s, permitiendo identificar los mecanismos de reacción, a partir de la observación de intermediarios de reacción, como también, las implicancias biológicas que tendría su potencial aplicación como agente biocida. De esta manera, se concluye que la acción de Ag₅-AQC_s generaría procesos de muerte celular mediante la inactivación de mecanismos de respuesta al estrés oxidativo desregulando la homeostasis redox de manera selectiva en entornos con presencia de ROS, como el caso de células tumorales. Los resultados preliminares obtenidos en la interacción de Ag₅-AQC_s en membranas celulares permitieron identificar efectos tempranos en su aplicación en líneas celulares que proyectan estudios posteriores para la determinación de los mecanismos bioquímicos involucrados en el ingreso de Ag₅-AQC_s a las células.

Producción científica

Artículos científicos:

- Porto, V., Buceta, D., Domínguez, B., Carneiro, C., Borrajo, E., Fraile, M., Davila-Ferreira, N., Arias, I. R., Blanco, J. M., Blanco, M. C., **Devida, J. M.**, Giovanetti, L. J., Requejo, F. G., Hernández-Garrido, J. C., Calvino, J. J., López-Haro, M., Barone, G., James, A. M., García-Caballero, T., González-Castaño, D. M., Treder, M., Huber, W., Vidal, A., Murphy, M. P., López-Quintela, M. A., Domínguez, F., **(2022)** Silver Clusters of Five Atoms as Highly Selective Antitumoral Agents Through Irreversible Oxidation of Thiols. *Advanced Functional Materials* 2022, 2113028. <https://doi.org/10.1002/adfm.202113028>
- **Devida, J. M.**, Herrera, F., Daza Millone, M. A., Requejo, F., Pallarola, D. **(2023)** Electrochemical fine-tuning of the chemoresponsiveness of Langmuir-Blodgett graphene oxide films. *ACS Omega* 2023. [10.1021/acsomega.3c03220](https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03220)

Presentaciones congresos y simposios:

- Séptimo Encuentro de Física y Química de Superficies, Santa Fé, Octubre 2016. “Generación de Nanocompuestos de Grafenos y Nanofibras de Plata para biosensado. Herrera F.C.; Anduaga L.; **Devida, J.M**; Huergo, M.A.C; Pallarola, D.; Requejo, F.G.
- VIII Encuentro de Física y Química de Superficies, San Luis, Octubre 2018 – Argentina. “Estudio XANES de la oxidación de Azufre por *clusters* atómicos cuánticos de Ag₅ en cisteína y glutatión”. **Devida, J.M.**, Giovanetti, L.J., Buceta, D.; López-Quintela, M.A.; Requejo, F.G.
- 28th. RAU – Annual Users Meeting LNLS/CNPEM – Noviembre 2018, Campinas, SP, Brazil. “XANES study of Sulfur oxidation by Ag and Cu Atomic Quantum Clusters in Biological Molecules” **Devida, J.M.**, Giovanetti, L.J., Buceta, D.; Lopez-Quintela, M.A.; Requejo, F.G - **Comunicación Oral**
- XIX Encuentro de superficies y materiales nanoestructurados. (Nano 2019) – Junio 2019, San Martín, Buenos Aires. “Generación de biosensor de glucosa a partir de la integración controlada de óxido de grafeno y nanofibras de plata” **Devida, J.M**, Herrera, F.C, Huego, M.A.C, Pallarola, D, Requejo, F.G
- 29th. RAU – Annual Users Meeting LNLS/CNPEM – Noviembre 2019, Campinas, SP, Brazil. “Study of the reaction kinetics of organosulfur compounds oxidation by atomic clusters”., Giovanetti, L.J., **Devida, J.M**, Bava, Y., Mizrahi, M.D, Buceta, D.; Lopez-Quintela, M.A.; Requejo, F.G.
- 1er. Encuentro Virtual de Caracterización de Materiales – Caracterizar 2020. “Estudio XANES de la oxidación de tioles biológicos catalizada por *clusters* atómicos de Ag₅” **Devida, J.M.**, Giovanetti, L.J., Buceta, D.; Lopez-Quintela, M.A.; Requejo, F.G - **Comunicación Oral**
- 30th. RAU – Annual Users Meeting LNLS/CNPEM – Noviembre 2020, Campinas, SP, Brazil. “In situ S K-edge analysis of cysteine oxidation by silver atomic quantum clusters in presence of reactive oxygen species.”., **Devida, J.M** Giovanetti, L.J., Buceta, D.; Lopez-Quintela, M.A.; Requejo, F.G.

- 2do. Simposio de Nanomateriales 2D, Grafeno, Dispositivos y Aplicaciones 2020. “Desarrollo de plataformas de biosensado basadas en la integración controlada de óxido de grafeno y nanofibras de plata” **Devida, J.M**, Herrera, F.C, Huego, M.A.C, Pallarola, D, Requejo, F.G – **1er. Premio Categoría Poster**
- XXII Congreso Argentino de Físicoquímica y Química Inorgánica (2021) – “Optimización de la reducción electroquímica de films de óxido de grafeno. Análisis estructural y funcional” **Devida, J.M**, Pallarola, D., Requejo, F.G

Referencias

1. Maiti, D., Tong, X., Mou, X. & Yang, K. Carbon-Based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Recent Study. *Front. Pharmacol.* **9**, 1401 (2019).
2. Hong, G., Diao, S., Antaris, A. L. & Dai, H. Carbon Nanomaterials for Biological Imaging and Nanomedicinal Therapy. *Chem. Rev.* **115**, 10816–10906 (2015).
3. Bhattacharya, K., Mukherjee, S. P., Gallud, A., Burkert, S. C., Bistarelli, S., Bellucci, S., Bottini, M., Star, A. & Fadeel, B. Biological interactions of carbon-based nanomaterials: From coronation to degradation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **12**, 333–351 (2016).
4. Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V., Grigorieva, I. V. & Firsov, A. A. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science* **306**, 666–669 (2004).
5. Geim, A. K. & Novoselov, K. S. The rise of Graphene. *Nature Materials* **6**, 183–191 (2007).
6. Castro Neto, A. H., Guinea, F., Peres, N. M. R., Novoselov, K. S. & Geim, A. K. The electronic properties of graphene. *Rev. Mod. Phys.* **81**, 109–162 (2009).
7. Zhu, Y., Murali, S., Cai, W., Li, X., Suk, J. W., Potts, J. R. & Ruoff, R. S. Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. *Adv. Mater.* **22**, 3906–3924 (2010).
8. Khoei, A. R. & Khorrami, M. S. Mechanical properties of graphene oxide: A molecular dynamics study. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures* **24**, 594–603 (2016).
9. Smith, A. T., LaChance, A. M., Zeng, S., Liu, B. & Sun, L. Synthesis, properties, and applications of graphene oxide/reduced graphene oxide and their nanocomposites. *Nano Materials Science* **1**, 31–47 (2019).
10. Eda, G., Fanchini, G. & Chhowalla, M. Large-area ultrathin films of reduced graphene oxide as a transparent and flexible electronic material. *Nature Nanotech* **3**, 270–274 (2008).
11. Wang, Z., Liu, J., Wang, W., Chen, H., Liu, Z., Yu, Q., Zeng, H. & Sun, L. Aqueous phase preparation of graphene with low defect density and adjustable layers. *Chem. Commun.* **49**, 10835 (2013).
12. Wang, X.-Y., Narita, A. & Müllen, K. Precision synthesis versus bulk-scale fabrication of graphenes. *Nat Rev Chem* **2**, 0100 (2017).
13. Hummers, W. S. & Offeman, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1339–1339 (1958).
14. Marcano, D. C., Kosynkin, D. V., Berlin, J. M., Sinitskii, A., Sun, Z., Slesarev, A., Alemany, L. B., Lu, W. & Tour, J. M. Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano* **4**, 4806–4814 (2010).
15. Pendolino, F. & Armata, N. *Graphene Oxide in Environmental Remediation Process*. (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-60429-9
16. Yildiz, G., Bolton-Warberg, M. & Awaja, F. Graphene and graphene oxide for bio-sensing: General properties and the effects of graphene ripples. *Acta Biomaterialia* **131**, 62–79 (2021).
17. Agarwal, V. & Zetterlund, P. B. Strategies for reduction of graphene oxide – A comprehensive review. *Chem. Eng. J.* **405**, 127018 (2021).
18. Stankovich, S., Dikin, D. A., Piner, R. D., Kohlhaas, K. A., Kleinhammes, A., Jia, Y., Wu, Y., Nguyen, S. T. & Ruoff, R. S. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. **8** (2007).
19. Ren, P.-G., Yan, D.-X., Ji, X., Chen, T. & Li, Z.-M. Temperature dependence of graphene oxide reduced by hydrazine hydrate. *Nanotechnology* **22**, 055705 (2011).

20. Jose, P. P. A., Kala, M. S., Kalarikkal, N. & Thomas, S. Reduced graphene oxide produced by chemical and hydrothermal methods. *Materials Today: Proceedings* **5**, 16306–16312 (2018).
21. Moon, I. K., Lee, J., Ruoff, R. S. & Lee, H. Reduced graphene oxide by chemical graphitization. *Nat Commun* **1**, 73 (2010).
22. Li, C., Li, L., Sun, L., Pei, Z., Xie, J. & Zhang, S. Transformation of hydroquinone to benzoquinone mediated by reduced graphene oxide in aqueous solution. *Carbon* **89**, 74–81 (2015).
23. *Handbook of Nanocomposite Supercapacitor Materials I: Characteristics*. **300**, (Springer International Publishing, 2020).
24. Wang, G., Qian, F., Saltikov, C. W., Jiao, Y. & Li, Y. Microbial reduction of graphene oxide by *Shewanella*. *Nano Res.* **4**, 563–570 (2011).
25. Lehner, B. A. E., Janssen, V. A. E. C., Spiesz, E. M., Benz, D., Brouns, S. J. J., Meyer, A. S. & van der Zant, H. S. J. Creation of Conductive Graphene Materials by Bacterial Reduction Using *Shewanella Oneidensis*. *ChemistryOpen* **8**, 888–895 (2019).
26. Salas, E. C., Sun, Z., Lüttge, A. & Tour, J. M. Reduction of Graphene Oxide via Bacterial Respiration. *ACS Nano* **4**, 4852–4856 (2010).
27. Akhavan, O. & Ghaderi, E. Escherichia coli bacteria reduce graphene oxide to bactericidal graphene in a self-limiting manner. *Carbon* **50**, 1853–1860 (2012).
28. Yin, K., Li, H., Xia, Y., Bi, H., Sun, J., Liu, Z. & Sun, L. Thermodynamic and Kinetic Analysis of Low- temperature Thermal Reduction of Graphene Oxide. *Nano-Micro Lett.* **3**, 51–55 (2011).
29. Akhavan, O. The effect of heat treatment on formation of graphene thin films from graphene oxide nanosheets. *Carbon* **48**, 509–519 (2010).
30. Tu, N. D. K., Choi, J., Park, C. R. & Kim, H. Remarkable Conversion Between n- and p-Type Reduced Graphene Oxide on Varying the Thermal Annealing Temperature. *Chem. Mater.* **27**, 7362–7369 (2015).
31. Peng, X.-Y., Liu, X.-X., Diamond, D. & Lau, K. T. Synthesis of electrochemically-reduced graphene oxide film with controllable size and thickness and its use in supercapacitor. *Carbon* **49**, 3488–3496 (2011).
32. Toh, S. Y., Loh, K. S., Kamarudin, S. K. & Daud, W. R. W. Graphene production via electrochemical reduction of graphene oxide: Synthesis and characterisation. *Chemical Engineering Journal* **251**, 422–434 (2014).
33. Wang, X., Kholmanov, I., Chou, H. & Ruoff, R. S. Simultaneous Electrochemical Reduction and Delamination of Graphene Oxide Films. *ACS Nano* **9**, 8737–8743 (2015).
34. Thevenot, D. R., Tóth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Pure and Applied Chemistry* **71**, 2333–2348 (1999).
35. Naresh, Varnakavi. & Lee, N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors* **21**, 1109 (2021).
36. Cammann, K. Bio-sensors based on ion-selective electrodes. *Z. Anal. Chem.* **287**, 1–9 (1977).
37. Mehrotra, P. Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* **6**, 153–159 (2016).
38. Clark Jr., L. C. & Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* **102**, 29–45 (1962).
39. Leca-Bouvier, B. D. & Blum, L. J. in *Recognition Receptors in Biosensors* (ed. Zourob, M.) 177–220 (Springer New York, 2010). doi:10.1007/978-1-4419-0919-0_4
40. Cavalcante, F. T. T., De A. Falcão, I. R., Da S. Souza, J. E., Rocha, T. G., De Sousa, I. G., Cavalcante, A. L. G., De Oliveira, A. L. B., De Sousa, M. C. M. & Dos Santos, J. C. S. Designing of Nanomaterials-Based Enzymatic Biosensors: Synthesis, Properties, and Applications. *Electrochem* **2**, 149–184 (2021).

41. Kurbanoglu, S., Ozkan, S. A. & Merkoçi, A. Nanomaterials-based enzyme electrochemical biosensors operating through inhibition for biosensing applications. *Biosensors and Bioelectronics* **89**, 886–898 (2017).
42. Peña-Bahamonde, J., Nguyen, H. N., Fanourakis, S. K. & Rodrigues, D. F. Recent advances in graphene-based biosensor technology with applications in life sciences. *J Nanobiotechnol* **16**, 75 (2018).
43. Suvarnaphaet, P. & Pechprasarn, S. Graphene-Based Materials for Biosensors: A Review. *Sensors* **17**, 2161 (2017).
44. Antiochia, R. Developments in biosensors for CoV detection and future trends. *Biosensors and Bioelectronics* **173**, 112777 (2021).
45. Liu, L. & Corma, A. Metal Catalysts for Heterogeneous Catalysis: From Single Atoms to Nanoclusters and Nanoparticles. *Chem. Rev.* **118**, 4981–5079 (2018).
46. Huseyinova, S., Blanco Trillo, J. M., Ramallo-López, J. M., Requejo, F. G., Buceta, D. & López-Quintela, M. A. Synthesis of photocatalytic cysteine-capped Cu₅ clusters using Cu₅ clusters as catalysts. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **25**, 6025–6031 (2023).
47. Arias, I. R., Buceta, D., Barone, G., Giménez-López, M. C., Lozano, H., Lazzari, M. & López-Quintela, M. A. Ag₅ nanoclusters with dual catalytic antiradical activities. *Journal of Colloid and Interface Science* **628**, 437–447 (2022).
48. Buceta, D., Piñeiro, Y., Vázquez-Vázquez, C., Rivas, J. & López-Quintela, M. Metallic Clusters: Theoretical Background, Properties and Synthesis in Microemulsions. *Catalysts* **4**, 356–374 (2014).
49. Lu, Y. & Chen, W. Sub-nanometre sized metal clusters: from synthetic challenges to the unique property discoveries. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 3594 (2012).
50. Liu, X. & Astruc, D. Atomically precise copper nanoclusters and their applications. *Coordination Chemistry Reviews* **359**, 112–126 (2018).
51. Huseyinova, S., Blanco, J., Requejo, F. G., Ramallo-López, J. M., Blanco, M. C., Buceta, D. & López-Quintela, M. A. Synthesis of Highly Stable Surfactant-free Cu₅ Clusters in Water. *J. Phys. Chem. C* **120**, 15902–15908 (2016).
52. Buceta, D., Huseyinova, S., Cuerva, M., Lozano, H., Giovanetti, L. J., Ramallo-López, J. M., López-Caballero, P., Zanchet, A., Mitrushchenkov, A. O., Hauser, A. W., Barone, G., Huck-Iriart, C., Escudero, C., Hernández-Garrido, J. C., Calvino, J. J., López-Haro, M., de Lara-Castells, M. P., Requejo, F. G. & López-Quintela, M. A. Stability and Reversible Oxidation of Sub-Nanometric Cu₅ Metal Clusters: Integrated Experimental Study and Theoretical Modeling. *Chemistry – A European Journal* e202301517 (2023). doi:<https://doi.org/10.1002/chem.202301517>
53. Jena, P. & Sun, Q. Super Atomic Clusters: Design Rules and Potential for Building Blocks of Materials. *Chem. Rev.* **118**, 5755–5870 (2018).
54. Kang, X. & Zhu, M. Tailoring the photoluminescence of atomically precise nanoclusters. *Chem. Soc. Rev.* **48**, 2422–2457 (2019).
55. Piñeiro, Y., Buceta, D., Calvo, J., Huseyinova, S., Cuerva, M., Pérez, Á., Domínguez, B. & López-Quintela, M. A. Large stability and high catalytic activities of sub-nm metal (0) clusters: Implications into the nucleation and growth theory. *Journal of Colloid and Interface Science* **449**, 279–285 (2015).
56. Edwards, P. P., Johnston, R. L. & Rao, C. N. R. in *Metal Clusters in Chemistry* (eds. Braunstein, P., Oro, L. A. & Raithby, P. R.) 1454–1481 (Wiley-VCH Verlag GmbH, 1999). doi:10.1002/9783527618316.ch4h
57. Li, J., Li, X., Zhai, H.-J. & Wang, L.-S. Au₂₀: A Tetrahedral Cluster. *Science* **299**, 864–867 (2003).
58. Häkkinen, H. Atomic and electronic structure of gold clusters: understanding flakes, cages and superatoms from simple concepts. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1847 (2008).
59. Fernández, E. & Boronat, M. Sub nanometer clusters in catalysis. *J. Phys.: Condens. Matter* **31**, 013002 (2019).

60. Vázquez-Vázquez, C., Bañobre-López, M., Mitra, A., López-Quintela, M. A. & Rivas, J. Synthesis of Small Atomic Copper Clusters in Microemulsions. *Langmuir* **25**, 8208–8216 (2009).
61. Zheng, J., Zhou, C., Yu, M. & Liu, J. Different sized luminescent gold nanoparticles. *Nanoscale* **4**, 4073 (2012).
62. Zheng, J., Zhang, C. & Dickson, R. M. Highly Fluorescent, Water-Soluble, Size-Tunable Gold Quantum Dots. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 077402 (2004).
63. Eustis, S. & El-Sayed, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 209–217 (2006).
64. de Heer, W. A. The physics of simple metal clusters: experimental aspects and simple models. *Rev. Mod. Phys.* **65**, 611–676 (1993).
65. Vilar-Vidal, N., Blanco, M. C., López-Quintela, M. A., Rivas, J. & Serra, C. Electrochemical Synthesis of Very Stable Photoluminescent Copper Clusters. *J. Phys. Chem. C* **114**, 15924–15930 (2010).
66. Wu, Z. & Jin, R. On the Ligand's Role in the Fluorescence of Gold Nanoclusters. *Nano Lett.* **10**, 2568–2573 (2010).
67. Choi, S., Dickson, R. M. & Yu, J. Developing luminescent silver nanodots for biological applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1867–1891 (2012).
68. Shang, L., Dong, S. & Nienhaus, G. U. Ultra-small fluorescent metal nanoclusters: Synthesis and biological applications. *Nano Today* **6**, 401–418 (2011).
69. Chen, X., Zhou, Y., Peng, X. & Yoon, J. Fluorescent and colorimetric probes for detection of thiols. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 2120–2135 (2010).
70. Chakraborty, I., Udayabhaskararao, T. & Pradeep, T. Luminescent sub-nanometer clusters for metal ion sensing: A new direction in nanosensors. *Journal of Hazardous Materials* **211–212**, 396–403 (2012).
71. George, A., Shibu, E. S., Maliyekkal, S. M., Bootharaju, M. S. & Pradeep, T. Luminescent, Freestanding Composite Films of Au₁₅ for Specific Metal Ion Sensing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **4**, 639–644 (2012).
72. Kobayashi, N., Kamei, Y., Shichibu, Y. & Konishi, K. Protonation-Induced Chromism of Pyridylethynyl-Appended [core+exo]-Type Au₈ Clusters. Resonance-Coupled Electronic Perturbation through π -Conjugated Group. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 16078–16081 (2013).
73. Ackerson, C. J., Powell, R. D. & Hainfeld, J. F. in *Cryo-EM Part A Sample Preparation and Data Collection* (ed. Jensen, G. J.) **481**, 195–230 (Academic Press, 2010).
74. Habeeb Muhammed, M. A., Verma, P. K., Pal, S. K., Retnakumari, A., Koyakutty, M., Nair, S. & Pradeep, T. Luminescent Quantum Clusters of Gold in Bulk by Albumin-Induced Core Etching of Nanoparticles: Metal Ion Sensing, Metal-Enhanced Luminescence, and Biolabeling. *Chemistry – A European Journal* **16**, 10103–10112 (2010).
75. Chakraborty, I. & Pradeep, T. Atomically Precise Clusters of Noble Metals: Emerging Link between Atoms and Nanoparticles. *Chem. Rev.* **117**, 8208–8271 (2017).
76. Yamazoe, S., Koyasu, K. & Tsukuda, T. Non-scalable Oxidation Catalysis of Gold Clusters. *Acc. Chem. Res.* **47**, 816–824 (2014).
77. Zhu, Y., Qian, H., Drake, B. A. & Jin, R. Atomically Precise Au₂₅(SR)₁₈ Nanoparticles as Catalysts for the Selective Hydrogenation of α,β -Unsaturated Ketones and Aldehydes. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 1295–1298 (2010).
78. Zhu, Y., Qian, H., Zhu, M. & Jin, R. Thiolate-Protected Au_n Nanoclusters as Catalysts for Selective Oxidation and Hydrogenation Processes. *Advanced Materials* **22**, 1915–1920 (2010).
79. Tsukuda, T., Tsunoyama, H. & Sakurai, H. Aerobic Oxidations Catalyzed by Colloidal Nanogold. *Chemistry – An Asian Journal* **6**, 736–748 (2011).

80. Zhu, Y., Qian, H. & Jin, R. Catalysis opportunities of atomically precise gold nanoclusters. *J. Mater. Chem.* **21**, 6793–6799 (2011).
81. López-Caballero, P., Ramallo-López, J. M., Giovanetti, L. J., Buceta, D., Miret-Artés, S., López-Quintela, M. A., Requejo, F. G. & de Lara-Castells, M. P. Exploring the properties of Ag₅–TiO₂ interfaces: stable surface polaron formation, UV-Vis optical response, and CO₂ photoactivation. *J. Mater. Chem. A* **8**, 6842–6853 (2020).
82. Pilar de Lara-Castells, M., Hauser, A. W., Ramallo-López, J. M., Buceta, D., Giovanetti, L. J., López-Quintela, M. A. & Requejo, F. G. Increasing the optical response of TiO₂ and extending it into the visible region through surface activation with highly stable Cu₅ clusters. *J. Mater. Chem. A* **7**, 7489–7500 (2019).
83. Jirkovský, J. S., Panas, I., Ahlberg, E., Halasa, M., Romani, S. & Schiffrin, D. J. Single Atom Hot-Spots at Au–Pd Nanoalloys for Electrocatalytic H₂O₂ Production. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 19432–19441 (2011).
84. Corma, A., Concepción, P., Boronat, M., Sabater, M. J., Navas, J., Yacaman, M. J., Larios, E., Posadas, A., López-Quintela, M. A., Buceta, D., Mendoza, E., Guilera, G. & Mayoral, A. Exceptional oxidation activity with size-controlled supported gold clusters of low atomicity. *Nature Chemistry* **5**, 775–781 (2013).
85. Naganthran, A., Verasoundarapandian, G., Khalid, F. E., Masarudin, M. J., Zulkharnain, A., Nawawi, N. M., Karim, M., Che Abdullah, C. A. & Ahmad, S. A. Synthesis, Characterization and Biomedical Application of Silver Nanoparticles. *Materials* **15**, (2022).
86. Zheng, K., Yuan, X., Goswami, N., Zhang, Q. & Xie, J. Recent advances in the synthesis, characterization, and biomedical applications of ultrasmall thiolated silver nanoclusters. *RSC Adv.* **4**, 60581–60596 (2014).
87. Yuan, X., Setyawati, M. I., Leong, D. T. & Xie, J. Ultrasmall Ag⁺-rich nanoclusters as highly efficient nanoreservoirs for bacterial killing. *Nano Res.* **7**, 301–307 (2014).
88. Xiu, Z., Zhang, Q., Puppala, H. L., Colvin, V. L. & Alvarez, P. J. J. Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. *Nano Lett.* **12**, 4271–4275 (2012).
89. Chernousova, S. & Epple, M. Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal. *Angewandte Chemie International Edition* **52**, 1636–1653 (2013).
90. Rizzello, L. & Pompa, P. P. Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: Mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 1501–1518 (2014).
91. Neissa, J., Pérez-Arnaiz, C., Porto, V., Busto, N., Borrajo, E., Leal, J. M., López-Quintela, M. A., García, B. & Domínguez, F. Interaction of silver atomic quantum clusters with living organisms: bactericidal effect of Ag₃ clusters mediated by disruption of topoisomerase–DNA complexes. *Chem. Sci.* **6**, 6717–6724 (2015).
92. Porto, V., Borrajo, E., Buceta, D., Carneiro, C., Huseyinova, S., Domínguez, B., Borgman, K. J. E., Lakadamyali, M., Garcia-Parajo, M. F., Neissa, J., García-Caballero, T., Barone, G., Blanco, M. C., Busto, N., García, B., Leal, J. M., Blanco, J., Rivas, J., López-Quintela, M. A. & Domínguez, F. Silver Atomic Quantum Clusters of Three Atoms for Cancer Therapy: Targeting Chromatin Compaction to Increase the Therapeutic Index of Chemotherapy. *Advanced Materials* **30**, 1801317 (2018).
93. Buceta, D., Busto, N., Barone, G., Leal, J. M., Domínguez, F., Giovanetti, L. J., Requejo, F. G., García, B. & López-Quintela, M. A. Ag₂ and Ag₃ Clusters: Synthesis, Characterization, and Interaction with DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 7612–7616 (2015).
94. Porto, V. Importancia de las interacciones de los clusters de plata con células tumorales humanas. (2017).
95. Habeeb Muhammed, M. A., Ramesh, S., Sinha, S. S., Pal, S. K. & Pradeep, T. Two distinct fluorescent quantum clusters of gold starting from metallic nanoparticles by pH-dependent ligand etching. *Nano Res.* **1**, 333–340 (2008).

96. Santillán, J. M. J., Muñetón Arboleda, D., Muraca, D., Schinca, D. C. & Scaffardi, L. B. Highly fluorescent few atoms silver nanoclusters with strong photocatalytic activity synthesized by ultrashort light pulses. *Sci Rep* **10**, 8217 (2020).
97. Schaeffer, N., Tan, B., Dickinson, C., Rosseinsky, M. J., Laromaine, A., McComb, D. W., Stevens, M. M., Wang, Y., Petit, L., Barentin, C., Spiller, D. G., Cooper, A. I. & Lévy, R. Fluorescent or not? Size-dependent fluorescence switching for polymer-stabilized gold clusters in the 1.1–1.7 nm size range. *Chem. Commun.* 3986–3988 (2008). doi:10.1039/B809876J
98. Langmuir, I. THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. II. LIQUIDS.1. *J. Am. Chem. Soc.* **39**, 1848–1906 (1917).
99. Blodgett, K. B. MONOMOLECULAR FILMS OF FATTY ACIDS ON GLASS. *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 495–495 (1934).
100. Blodgett, K. B. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. *J. Am. Chem. Soc.* **57**, 1007–1022 (1935).
101. Rayleigh. Surface Tension. *Nature* **43**, 437–439 (1891).
102. Manual de operación KSV 5000 - KSV NIMA(R). at <<https://www.biolinscientific.com/ksvnima/fabrication-and-deposition-of-thin-films/langmuir-and-langmuir-blodgett-troughs>>
103. Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Echlin, P., Joy, D. C., Lyman, C. E., Lifshin, E., Sawyer, L. & Michael, J. R. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis: Third Edition.* (Springer US, 2003). doi:10.1007/978-1-4615-0215-9
104. Aksenov, V. L., Kuzmin, A. Y., Purans, J. & Tyutyunnikov, S. I. EXAFS Spectroscopy at Synchrotron-Radiation Beams. **32**, (2001).
105. Alonso, M. & Finn, E. *Física, Vol. III.* (1985).
106. Ruiz-Lopez, M. F. & Munoz-Paez, A. A theoretical study of the XANES spectra of rutile and anatase. *Journal of Physics: Condensed Matter* **3**, 8981 (1991).
107. Kosugi, N. Theory and analysis of XANES: MO approach. *X-ray absorption fine structure for catalysts and surfaces* **2**, 60 (1996).
108. de Groot, F. M. F. X-ray absorption and dichroism of transition metals and their compounds. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **67**, 529–622 (1994).
109. de La Peña, L. *Introducción a la Mecánica Cuántica.* (1971).
110. Fernández-García, M. XANES analysis of catalytic systems under reaction conditions. *Catalysis Reviews* **44**, 59–121 (2002).
111. Waychunas, G. A. Synchrotron radiation XANES spectroscopy of Ti in minerals; effects of Ti bonding distances, Ti valence, and site geometry on absorption edge structure. *American Mineralogist* **72**, 89–101 (1987).
112. Wong, J., Lytle, F. W., Messmer, R. P. & Maylotte, D. H. K -edge absorption spectra of selected vanadium compounds. *Phys. Rev. B* **30**, 5596–5610 (1984).
113. Piancastelli, M. N. The neverending story of shape resonances. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **100**, 167–190 (1999).
114. Bianconi, A., Dell’Ariccia, M., Gargano, A. & Natoli, C. R. Bond Length Determination Using XANES. in *EXAFS and Near Edge Structure* (eds. Bianconi, A., Incoccia, L. & Stipcich, S.) 57–61 (Springer Berlin Heidelberg, 1983).
115. Stern, E. A. Theory of the extended x-ray-absorption fine structure. *Phys. Rev. B* **10**, 3027–3037 (1974).
116. Lytle, F. W., Sayers, D. E. & Stern, E. A. Extended x-ray-absorption fine-structure technique. II. Experimental practice and selected results. *Phys. Rev. B* **11**, 4825–4835 (1975).
117. Stern, E. A., Sayers, D. E. & Lytle, F. W. Extended x-ray-absorption fine-structure technique. III. Determination of physical parameters. *Phys. Rev. B* **11**, 4836–4846 (1975).
118. Rehr, J. J. & Albers, R. C. Theoretical approaches to x-ray absorption fine structure. *Rev. Mod. Phys.* **72**, 621–654 (2000).

119. Ravel, B. & Newville, M. It ATHENA, It ARTEMIS, It HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using It IFEFFIT. *Journal of Synchrotron Radiation* **12**, 537–541 (2005).
120. Figueroa, S. J. A., Mauricio, J. C., Murari, J., Beniz, D. B., Piton, J. R., Slepicka, H. H., Sousa, M. F. de, Espíndola, A. M. & Levinsky, A. P. S. Upgrades to the XAFS2 beamline control system and to the endstation at the LNLS. *Journal of Physics: Conference Series* **712**, 012022 (2016).
121. Abbate, M., Vicentin, F. C., Compagnon-Cailhol, V., Rocha, M. C. & Tolentino, H. The soft X-ray spectroscopy beamline at the LNLS: technical description and commissioning results. *Journal of Synchrotron Radiation* **6**, 964–972 (1999).
122. Seah, M. P. The quantitative analysis of surfaces by XPS: A review. *Surface and Interface Analysis* **2**, 222–239 (1980).
123. Patil, P. O., Pandey, G. R., Patil, A. G., Borse, V. B., Deshmukh, P. K., Patil, D. R., Tade, R. S., Nangare, S. N., Khan, Z. G., Patil, A. M., More, M. P., Veerapandian, M. & Bari, S. B. Graphene-based nanocomposites for sensitivity enhancement of surface plasmon resonance sensor for biological and chemical sensing: A review. *Biosensors and Bioelectronics* **139**, 111324 (2019).
124. Maier, S. A. *Plasmonics: fundamentals and applications*. (Springer, 2007).
125. Miyazaki, C. M., Shimizu, F. M. & Ferreira, M. in *Nanocharacterization Techniques* 183–200 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-323-49778-7.00006-0
126. Bard, A. J. & Faulkner, L. R. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. (Wiley, 2001).
127. Patel, B. *Electrochemistry for Bioanalysis*. (Elsevier, 2020).
128. Simões, F. R. & Xavier, M. G. in *Nanoscience and its Applications* 155–178 (William Andrew Publishing, 2017).
129. Venton, B. J. & DiScenza, D. J. in *Electrochemistry for Bioanalysis* (ed. Patel, B.) 27–50 (Elsevier, 2020). doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821203-5.00004-X
130. Wang, S., Zhang, J., Gharbi, O., Vivier, V., Gao, M. & Orazem, M. E. Electrochemical impedance spectroscopy. *Nat Rev Methods Primers* **1**, 41 (2021).
131. Krishnan, S. K., Singh, E., Singh, P., Meyyappan, M. & Nalwa, H. S. A review on graphene-based nanocomposites for electrochemical and fluorescent biosensors. *RSC Adv.* **9**, 8778–8881 (2019).
132. Verma, M. L., Sukriti, Dhanya, B. S., Saini, R., Das, A. & Varma, R. S. Synthesis and application of graphene-based sensors in biology: a review. *Environ Chem Lett* **20**, 2189–2212 (2022).
133. Alhazmi, H. A., Ahsan, W., Mangla, B., Javed, S., Hassan, M. Z., Asmari, M., Bratty, M. A. & Najmi, A. Graphene-based biosensors for disease theranostics: Development, applications, and recent advancements. *Nanotechnology Reviews* **11**, 96–116 (2022).
134. Neto, A. H. C. The electronic properties of graphene. *Rev. Mod. Phys.* **81**, 54 (2009).
135. Kuc, A., Heine, T. & Seifert, G. Structural and electronic properties of graphene nanoflakes. *Physical Review B* **81**, 8 (2010).
136. Aliyev, E., Filiz, V., Khan, M. M., Lee, Y. J., Abetz, C. & Abetz, V. Structural Characterization of Graphene Oxide: Surface Functional Groups and Fractionated Oxidative Debris. **15** (2019). doi:10.3390/nano9081180
137. Lee, J., Kim, J., Kim, S. & Min, D.-H. Biosensors based on graphene oxide and its biomedical application. *Advanced Drug Delivery Reviews* **105**, 275–287 (2016).
138. Li, D., Ller, M. B. M., Gilje, S., Kaner, R. B. & Wallace, G. G. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. *nature nanotechnology* **3**, 5 (2008).
139. Tung, V. C., Allen, M. J., Yang, Y. & Kaner, R. B. High-throughput solution processing of large-scale graphene. *NATURE NANOTECHNOLOGY* **4**, 5 (2009).
140. Wang, Z., Zhou, X., Zhang, J., Boey, F. & Zhang, H. Direct Electrochemical Reduction of Single-Layer Graphene Oxide and Subsequent Functionalization with Glucose Oxidase. *J. Phys. Chem. C* **113**, 14071–14075 (2009).

141. Loh, K. P. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *nature chemistry* **2**, 10 (2010).
142. Acik, M., Lee, G., Mattevi, C., Pirkle, A., Wallace, R. M., Chhowalla, M., Cho, K. & Chabal, Y. The Role of Oxygen during Thermal Reduction of Graphene Oxide Studied by Infrared Absorption Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C* **21** (2011).
143. Gómez-Navarro, C., Meyer, J. C., Sundaram, R. S., Chuvilin, A., Kurasch, S., Burghard, M., Kern, K. & Kaiser, U. Atomic Structure of Reduced Graphene Oxide. *Nano Lett.* **10**, 1144–1148 (2010).
144. Erickson, K., Erni, R., Lee, Z., Alem, N., Gannett, W. & Zettl, A. Determination of the Local Chemical Structure of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide. *Adv. Mater.* **22**, 4467–72 (2010).
145. Negishi, R. & Kobayashi, Y. Extraordinary suppression of carrier scattering in large area graphene oxide films. *Appl. Phys. Lett.* **105**, 253502 (2014).
146. Shao, Y., Wang, J., Wu, H., Liu, J., Aksay, I. A. & Lin, Y. Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *Electroanalysis* **22**, 1027–1036 (2010).
147. Marrani, A. G., Coico, A. C., Giacco, D., Zanoni, R., Motta, A., Schrebler, R., Dini, D., Di Girolamo, D. & Dalchiele, E. A. Flexible Interfaces between Reduced Graphene Oxide and Indium Tin Oxide/Polyethylene Terephthalate for Advanced Optoelectronic Devices. *ACS Appl. Nano Mater.* **2**, 5963–5972 (2019).
148. Guo, H.-L., Wang, X.-F., Qian, Q.-Y., Wang, F.-B. & Xia, X.-H. A Green Approach to the Synthesis of Graphene Nanosheets. *ACS Nano* **3**, 2653–2659 (2009).
149. Zhou, M., Wang, Y., Zhai, Y., Zhai, J., Ren, W., Wang, F. & Dong, S. Controlled Synthesis of Large-Area and Patterned Electrochemically Reduced Graphene Oxide Films. *Chem. Eur. J.* **15**, 6116–6120 (2009).
150. Schniepp, H. C., Li, J.-L., McAllister, M. J., Sai, H., Herrera-Alonso, M., Adamson, D. H., Prud'homme, R. K., Car, R., Saville, D. A. & Aksay, I. A. Functionalized Single Graphene Sheets Derived from Splitting Graphite Oxide. *J. Phys. Chem. B* **110**, 8535–8539 (2006).
151. Gómez-Navarro, C., Weitz, R. T., Bittner, A. M., Scolari, M., Mews, A., Burghard, M. & Kern, K. Electronic Transport Properties of Individual Chemically Reduced Graphene Oxide Sheets. *Nano Lett.* **7**, 3499–3503 (2007).
152. Wang, X., Zhi, L. & Müllen, K. Transparent, Conductive Graphene Electrodes for Dye-Sensitized Solar Cells. *Nano Lett.* **8**, 323–327 (2008).
153. Chang, C. W., Hon, M. H. & Leu, I. C. Patterns of Solution-Processed Graphene Oxide Produced by a Transfer Printing Method. *J. Electrochem. Soc.* **159**, H605–H609 (2012).
154. Chen, L., Tang, Y., Wang, K., Liu, C. & Luo, S. Direct electrodeposition of reduced graphene oxide on glassy carbon electrode and its electrochemical application. *Electrochem. commun.* **13**, 133–137 (2011).
155. Cote, L. J., Kim, F. & Huang, J. Langmuir–Blodgett Assembly of Graphite Oxide Single Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 1043–1049 (2009).
156. Zheng, Q., Ip, W. H., Lin, X., Yousefi, N., Yeung, K. K., Li, Z. & Kim, J.-K. Transparent Conductive Films Consisting of Ultralarge Graphene Sheets Produced by Langmuir–Blodgett Assembly. *ACS Nano* **5**, 6039–6051 (2011).
157. Yang, Y., Yang, X., Yang, W., Li, S., Xu, J. & Jiang, Y. Ordered and ultrathin reduced graphene oxide LB films as hole injection layers for organic light-emitting diode. *Nanoscale Res Lett* **9**, 537 (2014).
158. Hashemi, S. A., Mousavi, S. M., Bahrani, S., Ramakrishna, S., Babapoor, A. & Chiang, W.-H. Coupled graphene oxide with hybrid metallic nanoparticles as potential electrochemical biosensors for precise detection of ascorbic acid within blood. *Analytica Chimica Acta* **1107**, 183–192 (2020).

159. Madni, A., Noreen, S., Maqbool, I., Rehman, F., Batool, A., Kashif, P. M., Rehman, M., Tahir, N. & Khan, M. I. Graphene-based nanocomposites: synthesis and their theranostic applications. *Journal of Drug Targeting* **26**, 858–883 (2018).
160. Xu, L., Hou, Y., Zhang, M., Cheng, T., Huang, W., Yao, C. & Wu, Q. Electrochemical sensor based on a silver nanowires modified electrode for the determination of cholesterol. *Anal. Methods* **7**, 5649–5653 (2015).
161. Zheng, Q., Shi, L., Ma, P.-C., Xue, Q., Li, J., Tang, Z. & Yang, J. Structure control of ultra-large graphene oxide sheets by the Langmuir–Blodgett method. *RSC Adv.* **3**, 4680 (2013).
162. Sutar, D. S., Narayanam, P. K., Singh, G., Botcha, V. D., Talwar, S. S., Srinivasa, R. S. & Major, S. S. Spectroscopic studies of large sheets of graphene oxide and reduced graphene oxide monolayers prepared by Langmuir–Blodgett technique. *Thin Solid Films* **520**, 5991–5996 (2012).
163. Priante, F., Salim, M., Ottaviano, L. & Perrozzi, F. XPS study of graphene oxide reduction induced by (100) and (111)-oriented Si substrates. *Nanotechnology* **29**, 075704 (2018).
164. Al-Gaashani, R., Najjar, A., Zakaria, Y., Mansour, S. & Atieh, M. A. XPS and structural studies of high quality graphene oxide and reduced graphene oxide prepared by different chemical oxidation methods. *Ceram. Int.* **45**, 14439–14448 (2019).
165. Kim, J., Kim, F. & Huang, J. Seeing graphene-based sheets. *Mater. Today* **13**, 28–38 (2010).
166. Becerril, H. A., Mao, J., Liu, Z. & Stoltenberg, R. M. Evaluation of Solution-Processed Reduced Graphene Oxide Films as Transparent Conductors. **2**, 8 (2008).
167. De Silva, K. K. H., Huang, H.-H., Joshi, R. & Yoshimura, M. Restoration of the graphitic structure by defect repair during the thermal reduction of graphene oxide. *Carbon* **166**, 74–90 (2020).
168. Zhou, A., Bai, J., Hong, W. & Bai, H. Electrochemically reduced graphene oxide: Preparation, composites, and applications. *Carbon* **191**, 301–332 (2022).
169. Kauppila, J., Kunnas, P., Damlin, P., Viinikanoja, A. & Kvarnström, C. Electrochemical reduction of graphene oxide films in aqueous and organic solutions. *Electrochim. Acta* **89**, 84–89 (2013).
170. Gao, M., Xu, Y., Wang, X., Sang, Y. & Wang, S. Analysis of Electrochemical Reduction Process of Graphene Oxide and its Electrochemical Behavior. *Electroanalysis* **28**, 1377–1382 (2016).
171. Marrani, A. G., Zanoni, R., Schrebler, R. & Dalchiele, E. A. Toward Graphene/Silicon Interface via Controlled Electrochemical Reduction of Graphene Oxide. *J. Phys. Chem. C* **121**, 5675–5683 (2017).
172. Marrani, A. G., Motta, A., Schrebler, R., Zanoni, R. & Dalchiele, E. A. Insights from experiment and theory into the electrochemical reduction mechanism of graphene oxide. *Electrochim. Acta* **304**, 231–238 (2019).
173. Schachinger, F., Chang, H., Scheiblbrandner, S. & Ludwig, R. Amperometric Biosensors Based on Direct Electron Transfer Enzymes. *Molecules* **26**, 4525 (2021).
174. De Feijter, J. A., Benjamins, J. & Veer, F. A. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface. *Biopolymers* **17**, 1759–1772 (1978).
175. Knoll, W. Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **49**, 569–638 (1998).
176. Albers, W. M. & Vikholm-Lundin, I. in *Nano-Bio-Sensing* (ed. Carrara, S.) 83–125 (Springer New York, 2011). doi:10.1007/978-1-4419-6169-3_4
177. Stenberg, E., Persson, B., Roos, H. & Urbaniczky, C. Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *Journal of Colloid and Interface Science* **143**, 513–526 (1991).
178. Forzani, E. S., Otero, M., Pérez, M. A., Teijelo, M. L. & Calvo, E. J. The Structure of Layer-by-Layer Self-Assembled Glucose Oxidase and Os(Bpy)₂ ClPyCH₂

- NH-Poly(allylamine) Multilayers: Ellipsometric and Quartz Crystal Microbalance Studies. *Langmuir* **18**, 4020–4029 (2002).
179. Alwarappan, S., Liu, C., Kumar, A. & Li, C.-Z. Enzyme-Doped Graphene Nanosheets for Enhanced Glucose Biosensing. *J. Phys. Chem. C* **114**, 12920–12924 (2010).
 180. Zhang, Y., Zhang, J., Huang, X., Zhou, X., Wu, H. & Guo, S. Assembly of Graphene Oxide-Enzyme Conjugates through Hydrophobic Interaction. *Small* **8**, 154–159 (2012).
 181. Karimi, A., Othman, A., Uzunoglu, A., Stanciu, L. & Andreescu, S. Graphene based enzymatic bioelectrodes and biofuel cells. *Nanoscale* **7**, 6909–6923 (2015).
 182. Kalisz, H. M. K., Hecht, H.-J., Schomburg, D. & Schmid, R. D. Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *BBA Volume* **1080**, 138–142 (1991).
 183. Zhao, Q., Bai, C., Zhang, W., Li, Y., Zhang, G., Zhang, F. & Fan, X. Catalytic Epoxidation of Olefins with Graphene Oxide Supported Copper (Salen) Complex. *Ind. Eng. Chem. Res.* **53**, 4232–4238 (2014).
 184. Nigar, S., Wang, H., Imtiaz, M., Yu, J. & Zhou, Z. Adsorption mechanism of ferrocene molecule on pristine and functionalized graphene. *Applied Surface Science* **481**, 1466–1473 (2019).
 185. Lu, Y., Jiang, Y., Wu, H. & Chen, W. Ferrocene-Functionalized Graphene Oxide Nanosheets: Efficient Electronic Communication between Ferrocene Centers across Graphene Nanosheets. *Electrochimica Acta* **156**, 267–273 (2015).
 186. Borenstein, A., Strauss, V., Kowal, M. D., Yoonessi, M., Muni, M., Anderson, M. & Kaner, R. B. Laser-reduced graphene-oxide/ferrocene: a 3-D redox-active composite for supercapacitor electrodes. *J. Mater. Chem. A* **6**, 20463–20472 (2018).
 187. Pallarola, D., Queralto, N., Battaglini, F. & Azzaroni, O. Supramolecular assembly of glucose oxidase on concanavalin A—modified gold electrodes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 8071 (2010).
 188. Rychagov, A. Yu., Gubin, S. P., Chuprov, P. N., Kornilov, D. Yu., Karaseva, A. S., Krasnova, E. S., Voronov, V. A. & Tkachev, S. V. Electrochemical reduction and electric conductivity of graphene oxide films. *Russ J Electrochem* **53**, 721–727 (2017).
 189. Demaille, C., Moiroux, J. & Savéant, J. M. Multimonolayers on Electrodes. *Protein Architecture: Interfacing Molecular Assemblies and Immobilization Biotechnology* **75**, 311 (1999).
 190. Cornish-Bowden, A. in *Fundamentals of Enzyme Kinetics* 200–211 (1979). at <<https://doi.org/10.1016/B978-0-408-10617-7.50015-8>>
 191. Pallarola, D., Queralto, N., Knoll, W., Ceolín, M., Azzaroni, O. & Battaglini, F. Redox-Active Concanavalin A: Synthesis, Characterization, and Recognition-Driven Assembly of Interfacial Architectures for Bioelectronic Applications. *Langmuir* **26**, 13684–13696 (2010).
 192. Pallarola, D., Queralto, N., Knoll, W., Azzaroni, O. & Battaglini, F. Facile Glycoenzyme Wiring to Electrode Supports by Redox-Active Biosupramolecular Glue. *Chem. Eur. J.* **16**, 13970–13975 (2010).
 193. Pallarola, D., Bildering, C. von, Pietrasanta, L. I., Queralto, N., Knoll, W., Battaglini, F. & Azzaroni, O. Recognition-driven layer-by-layer construction of multiprotein assemblies on surfaces: a biomolecular toolkit for building up chemoresponsive bioelectrochemical interfaces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 11027 (2012).
 194. Mani, V., Devadas, B. & Chen, S.-M. Direct electrochemistry of glucose oxidase at electrochemically reduced graphene oxide-multiwalled carbon nanotubes hybrid material modified electrode for glucose biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **41**, 309–315 (2013).
 195. Amouzadeh Tabrizi, M. & Varkani, J. N. Green synthesis of reduced graphene oxide decorated with gold nanoparticles and its glucose sensing application. *Sens. Actuators B: Chem.* **202**, 475–482 (2014).

196. Bharath, G., Madhu, R., Chen, S.-M., Veeramani, V., Balamurugan, A., Mangalaraj, D., Viswanathan, C. & Ponpandian, N. Enzymatic electrochemical glucose biosensors by mesoporous 1D hydroxyapatite-on-2D reduced graphene oxide. *J. Mater. Chem. B* **3**, 1360–1370 (2015).
197. Liu, Y., Zhang, X., He, D., Ma, F., Fu, Q. & Hu, Y. An amperometric glucose biosensor based on a MnO₂/graphene composite modified electrode. *RSC Adv.* **6**, 18654–18661 (2016).
198. Mehmeti, E., Stanković, D. M., Chaiyo, S., Zavasnik, J., Žagar, K. & Kalcher, K. Wiring of glucose oxidase with graphene nanoribbons: an electrochemical third generation glucose biosensor. *Microchim Acta* **184**, 1127–1134 (2017).
199. Akkaya, B., Çakiroğlu, B. & Özacar, M. Tannic Acid-Reduced Graphene Oxide Deposited with Pt Nanoparticles for Switchable Bioelectronics and Biosensors Based on Direct Electrochemistry. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **6**, 3805–3814 (2018).
200. Zhang, D., Chen, X., Ma, W., Yang, T., Li, D., Dai, B. & Zhang, Y. Direct electrochemistry of glucose oxidase based on one step electrodeposition of reduced graphene oxide incorporating polymerized l-lysine and its application in glucose sensing. *Mater. Sci. Eng. C* **104**, 109880 (2019).
201. Maity, D., C.R., M. & R.T., R. K. Glucose oxidase immobilized amine terminated multiwall carbon nanotubes/reduced graphene oxide/polyaniline/gold nanoparticles modified screen-printed carbon electrode for highly sensitive amperometric glucose detection. *Mater. Sci. Eng. C* **105**, 110075 (2019).
202. Sakalauskiene, L., Popov, A., Kausaite-Minkstimiene, A., Ramanavicius, A. & Ramanaviciene, A. The Impact of Glucose Oxidase Immobilization on Dendritic Gold Nanostructures on the Performance of Glucose Biosensors. *Biosensors* **12**, 320 (2022).
203. Lin, M.-H., Gupta, S., Chang, C., Lee, C.-Y. & Tai, N.-H. Carbon nanotubes/polyethylenimine/glucose oxidase as a non-invasive electrochemical biosensor performs high sensitivity for detecting glucose in saliva. *Microchem. J.* **180**, 107547 (2022).
204. Han, Z., Zhang, X., Yuan, H., Li, Z., Li, G., Zhang, H. & Tan, Y. Graphene oxide/gold nanoparticle/graphite fiber microelectrodes for directing electron transfer of glucose oxidase and glucose detection. *Journal of Power Sources* **521**, 230956 (2022).
205. Güler, M., Zengin, A. & Alay, M. Fabrication of glucose bioelectrochemical sensor based on Au@Pd core-shell supported by carboxylated graphene oxide. *Anal. Biochem.* **667**, 115091 (2023).
206. Wei, X.-L. & Ge, Z.-Q. Effect of graphene oxide on conformation and activity of catalase. *Carbon* **60**, 401–409 (2013).
207. Bai, Y., Ming, Z., Cao, Y., Feng, S., Yang, H., Chen, L. & Yang, S.-T. Influence of graphene oxide and reduced graphene oxide on the activity and conformation of lysozyme. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **154**, 96–103 (2017).
208. Feng, R., Yu, Y., Shen, C., Jiao, Y. & Zhou, C. Impact of graphene oxide on the structure and function of important multiple blood components by a dose-dependent pattern: Impact of GO on Structure and Function of Multiple Blood Components. *J. Biomed. Mater. Res.* **103**, 2006–2014 (2015).
209. Wang, Y., Zhu, Z., Zhang, H., Chen, J., Tang, B. & Cao, J. Investigation on the conformational structure of hemoglobin on graphene oxide. *Mater. Chem. Phys.* **182**, 272–279 (2016).
210. Hernández-Cancel, G., Suazo-Dávila, D., Ojeda-Cruzado, A. J., García-Torres, D., Cabrera, C. R. & Griebenow, K. Graphene oxide as a protein matrix: influence on protein biophysical properties. *J Nanobiotechnol* **13**, 70 (2015).
211. Zhou, L., Jiang, Y., Gao, J., Zhao, X., Ma, L. & Zhou, Q. Oriented immobilization of glucose oxidase on graphene oxide. *Biochem. Eng. J.* **69**, 28–31 (2012).
212. Liang, B., Guo, X., Fang, L., Hu, Y., Yang, G., Zhu, Q., Wei, J. & Ye, X. Study of direct electron transfer and enzyme activity of glucose oxidase on graphene surface. *Electrochem. commun.* **50**, 1–5 (2015).

213. Zhou, L., Jiang, Y., Ma, L., He, Y. & Gao, J. Immobilization of Glucose Oxidase on Polydopamine-Functionalized Graphene Oxide. *Appl Biochem Biotechnol* **175**, 1007–1017 (2015).
214. *Glutathione Conjugation: Mechanisms and Biological Significance*. (Academic Press, 1988).
215. Lees, W. J. & Whitesides, G. M. Equilibrium constants for thiol-disulfide interchange reactions: a coherent, corrected set. *J. Org. Chem.* **58**, 642–647 (1993).
216. Akerboom, T. P., Bilzer, M. & Sies, H. The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 4248–4252 (1982).
217. Sies, H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine* **27**, 916–921 (1999).
218. Thomas, J. A., Poland, B. & Honzatko, R. Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**, 1–9 (1995).
219. Collet, J.-F. & Messens, J. Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins. *Antioxidants & Redox Signaling* **13**, 1205–1216 (2010).
220. Nishinaka, Y., Masutani, H., Nakamura, H. & Yodoi, J. Regulatory roles of thioredoxin in oxidative stress-induced cellular responses. *Redox Report* **6**, 289–295 (2001).
221. Gautam, S., Bhatnagar, D., Bansal, D., Batra, H. & Goyal, N. Recent advancements in nanomaterials for biomedical implants. *Biomedical Engineering Advances* **3**, 100029 (2022).
222. Wang, F., Yue, X., Ding, Q., Lin, H., Xu, C. & Li, S. Chiral inorganic nanomaterials for biological applications. *Nanoscale* **15**, 2541–2552 (2023).
223. Abbate, M., Vicentin, F. C., Compagnon-Cailhol, V., Rocha, M. C. & Tolentino, H. The soft X-ray spectroscopy beamline at the LNLS: technical description and commissioning results. *Journal of Synchrotron Radiation* **6**, 964–972 (1999).
224. Vairavamurthy, A. Using X-ray absorption to probe sulfur oxidation states in complex molecules. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **54**, 2009–2017 (1998).
225. Attia, Y. A., Buceta, D., Requejo, F. G., Giovanetti, L. J. & López-Quintela, M. A. Photostability of gold nanoparticles with different shapes: the role of Ag clusters. *Nanoscale* **7**, 11273–11279 (2015).
226. Miyamoto, T., Niimi, H., Kitajima, Y., Naito, T. & Asakura, K. Ag L3-Edge X-ray Absorption Near-Edge Structure of 4d10 (Ag+) Compounds: Origin of the Edge Peak and Its Chemical Relevance. *J. Phys. Chem. A* **114**, 4093–4098 (2010).
227. Castillo-Michel, H., Diaz-Sanchez, A., Martinez-Martinez, A. & Hesse, B. Investigations of Sulfur Chemical Status with Synchrotron Micro Focused X-ray fluorescence and X-ray Absorption Spectroscopy. *Protein Pept Lett.* **23**, 291–299 (2016).
228. Prange, A., Dahl, C., Trüper, H. G., Behnke, M., Hahn, J., Modrow, H. & Hormes, J. Investigation of S-H bonds in biologically important compounds by sulfur K-edge X-ray absorption spectroscopy. *Eur. Phys. J. D* **20**, 589–596 (2002).
229. Bohic, S., Murphy, K., Paulus, W., Cloetens, P., Salomé, M., Susini, J. & Double, K. Intracellular Chemical Imaging of the Developmental Phases of Human Neuromelanin Using Synchrotron X-ray Microspectroscopy. *Anal. Chem.* **80**, 9557–9566 (2008).
230. Pickering, I. J., Barney, M., Cotelesage, J. J. H., Vogt, L., Pushie, M. J., Nissan, A., Prince, R. C. & George, G. N. Chemical Sensitivity of the Sulfur K-Edge X-ray Absorption Spectra of Organic Disulfides. *J. Phys. Chem. A* **120**, 7279–7286 (2016).
231. Hitchcock, A. P., Bodeur, S. & Tronc, M. Sulfur and Chlorine K-shell spectra of gases. *Physica B: Condensed Matter* **158**, 257–258 (1989).
232. Dezarnaud-Dandine, C., Bournel, F., Tronc, M., Jones, D. & Modelli, A. resonances in electron transmission (ETS) and x-ray absorption (XAS) spectroscopies of dimethyl(poly)sulphides (, 2, 3). *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.* **31**, L497–L502 (1998).

233. Mijovilovich, A., Pettersson, L. G. M., de Groot, F. M. F. & Weckhuysen, B. M. Functional Groups and Sulfur K-Edge XANES Spectra: Divalent Sulfur and Disulfides. *J. Phys. Chem. A* **114**, 9523–9528 (2010).
234. Behyan, S., Hu, Y. & Urquhart, S. G. Chemical sensitivity of sulfur 1s NEXAFS spectroscopy II: Speciation of disulfide functional groups. *Chemical Physics Letters* **592**, 109–113 (2014).
235. Hallmeier, K.-H., Pavlychev, A. A., Szargan, R., Beyer, L., Hennig, C. & Thiel, F. Splitting of the 1s–1 3p resonance in sulfur K XANES by surroundings in compounds with sulfur–carbon double bond. *Chemical Physics* **178**, 349–356 (1993).
236. Porto, V., Buceta, D., Domínguez, B., Carneiro, C., Borrajo, E., Fraile, M., Davila-Ferreira, N., Arias, I. R., Blanco, J. M., Blanco, M. C., Devida, J. M., Giovanetti, L. J., Requejo, F. G., Hernández-Garrido, J. C., Calvino, J. J., López-Haro, M., Barone, G., James, A. M., García-Caballero, T., González-Castaño, D. M., Treder, M., Huber, W., Vidal, A., Murphy, M. P., López-Quintela, M. A. & Domínguez, F. Silver Clusters of Five Atoms as Highly Selective Antitumoral Agents Through Irreversible Oxidation of Thiols. *Adv Funct Materials* **32**, 2113028 (2022).
237. Winterbourn, C. C. & Hampton, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine* **45**, 549–561 (2008).
238. Gille, G. & Sigler, K. Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol* **40**, 131–152 (1995).
239. Sies, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* **215**, 213–219 (1993).
240. Hayes, J. D. & McLellan, L. I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research* **31**, 273–300 (1999).
241. Reczek, C. R. & Chandel, N. S. The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Annual Review of Cancer Biology* **1**, 79–98 (2017).
242. Chen, Y., Azad, M. B. & Gibson, S. B. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ* **16**, 1040–1052 (2009).
243. Finkel, T. From Sulfenylation to Sulfhydration: What a Thiolate Needs to Tolerate. *Science Signaling* **5**, pe10–pe10 (2012).
244. Gorrini, C., Harris, I. S. & Mak, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 931–947 (2013).
245. DeBerardinis, R. J. & Chandel, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances* **2**, e1600200 (2016).
246. Kshattray, S., Saha, A., Gries, P., Tiziani, S., Stone, E., Georgiou, G. & DiGiovanni, J. Enzyme-mediated depletion of l-cyst(e)ine synergizes with thioredoxin reductase inhibition for suppression of pancreatic tumor growth. *npj Precis. Onc.* **3**, 16 (2019).
247. Ippolito, L., Giannoni, E., Chiarugi, P. & Parri, M. Mitochondrial Redox Hubs as Promising Targets for Anticancer Therapy. *Frontiers in Oncology* **10**, (2020).
248. Klein, E. A., Thompson, I. M., Tangen, C. M., Crowley, J. J., Lucia, M. S., Goodman, P. J., Minasian, L. M., Ford, L. G., Parnes, H. L., Gaziano, J. M., Karp, D. D., Lieber, M. M., Walther, P. J., Klotz, L., Parsons, J. K., Chin, J. L., Darke, A. K., Lippman, S. M., Goodman, G. E., Meyskens, F. L. & Baker, L. H. Vitamin E and the Risk of Prostate Cancer: The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA* **306**, 1549–1556 (2011).
249. Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Valanis, B., Williams, J. H., Barnhart, S. & Hammar, S. Effects of a Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine* **334**, 1150–1155 (1996).
250. Chandel, N. S. & Tuveson, D. A. The Promise and Perils of Antioxidants for Cancer Patients. *New England Journal of Medicine* **371**, 177–178 (2014).
251. Tothhawang, L., Deng, S., Pervaiz, S. & Yap, C. T. Redox regulation of cancer cell migration and invasion. *Mitochondrion* **13**, 246–253 (2013).

252. Piskounova, E., Agathocleous, M., Murphy, M. M., Hu, Z., Huddlestun, S. E., Zhao, Z., Leitch, A. M., Johnson, T. M., DeBerardinis, R. J. & Morrison, S. J. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature* **527**, 186–191 (2015).
253. Sullivan, L. B. & Chandel, N. S. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. *Cancer Metab* **2**, 17 (2014).
254. Conklin, K. A. Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. *Integrative Cancer Therapies* **3**, 294–300 (2004).
255. Yoshida, T., Goto, S., Kawakatsu, M., Urata, Y. & Li, T. Mitochondrial dysfunction, a probable cause of persistent oxidative stress after exposure to ionizing radiation. *Free Radical Research* **46**, 147–153 (2012).
256. Ramanathan, B., Jan, K.-Y., Chen, C.-H., Hour, T.-C., Yu, H.-J. & Pu, Y.-S. Resistance to Paclitaxel Is Proportional to Cellular Total Antioxidant Capacity. *Cancer Research* **65**, 8455–8460 (2005).
257. Attia, S., Kolesar, J., Mahoney, M. R., Pitot, H. C., Laheru, D., Heun, J., Huang, W., Eickhoff, J., Erlichman, C. & Holen, K. D. A phase 2 consortium (P2C) trial of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) for advanced adenocarcinoma of the pancreas. *Invest New Drugs* **26**, 369–379 (2008).
258. Tai, D.-J., Jin, W.-S., Wu, C.-S., Si, H.-W., Cao, X.-D., Guo, A.-J. & Chang, J.-C. Changes in intracellular redox status influence multidrug resistance in gastric adenocarcinoma cells. *Experimental and Therapeutic Medicine* **4**, 291–296 (2012).
259. Corpuz, N. & Schwans, J. P. Generation of a cysteine sulfinic acid analog for incorporation in peptides using solid phase peptide synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **27**, 2410–2414 (2017).
260. Ito, A., Inoue, T., Takehara, K., Shimizu, N., Kitajima, Y. & Shinohara, K. Application of XANES profiles to X-ray spectromicroscopy for biomedical specimens: Part I. Discrimination of macromolecules with sulfur atoms. *Journal of X-Ray Science and Technology* **19**, 249–260 (2011).
261. Stadtman, E. R. Protein oxidation and aging. *Science* **257**, 1220–1224 (1992).
262. Klatt, P. & Lamas, S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *European Journal of Biochemistry* **267**, 4928–4944 (2000).