



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Desarrollo de electrodos modificados con matrices de
sílice para posibles aplicaciones en sensores y
biosensores electroquímicos

Daniel Alonso Gamero Quijano



Tesis **Doctorales**

www.eltallerdigital.com

UNIVERSIDAD de ALICANTE

UNIVERSIDAD DE ALICANTE



Instituto Universitario de Materiales de Alicante

Departamento de Química Física

Desarrollo de electrodos modificados con matrices de sílice para posibles aplicaciones en sensores y biosensores electroquímicos

Daniel Alonso Gamero Quijano

Directores del trabajo

D. Francisco Montilla Jiménez D. Francisco Huerta Arráez

Alicante, Julio 2104

Índice

Desarrollo de electrodos modificados con matrices de sílice para posibles aplicaciones en sensores y biosensores electroquímicos

<i>Estructura de la Tesis</i>	3
-------------------------------------	---

Capítulo 1

<i>1. Introducción General</i>	9
1.1 La química del proceso sol-gel	18
1.2 Aplicaciones emergentes de materiales compuestos de sílice	27
1.2.1 Pre-concentración y permeabilidad asociadas con la detección voltamétrica.....	27
a) Acumulación por adsorción o por complejación (quelación)	28
b) Intercambio iónico.....	28
c) Recubrimientos perm-selectivos	29
d) Impronta molecular	30
1.2.2 Sensores químicos.....	31
1.2.3 Biosensores	36
1.3 Nanotubos de Carbono	46
Nanotubos de Carbono. Antecedentes	48
1.4 Polímeros conductores	51
1.4.1 La Polianilina	54
Métodos de síntesis.....	56
a) Síntesis química.....	56
b) Síntesis electroquímica.....	57
1.5 El citocromo c como proteína modelo	61
2. Referencias	67

Capítulo 2

Técnicas de caracterización y métodos de preparación.

1. Técnicas y métodos Analíticos	79
1.1 Técnicas para el análisis de muestras sólidas	79
1.1.1. Espectroscopía FT-IR	79
1.1.2. Espectroscopía Raman	82
Espectroscopía Raman y Nanotubos de carbono de pared única (SWCNT).....	84
1.1.3. Análisis Termogravimétrico (TGA)	88
1.1.4. Adsorción física de gases.....	89
1.2. Técnicas electroquímicas	92
1.2.1. Celda electroquímica de tres electrodos	93
1.2.2.- Dispositivos electrónicos para estudios electroquímicos	96
1.2.3. Voltametría cíclica.....	97
1.2.4 Caracterización superficial electródica haciendo uso de la voltametría cíclica y sondas redox específicas.	100
1.2.5. Salto potencioestático o cronoamperometría.....	102
1.3. Técnicas espectroelectroquímicas	103
1.3.1. Espectroscopia in situ UV-Vis.....	104
1.4. Técnicas de análisis microscópico	106
1.4.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	107
1.4.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	110
2. Procedimientos experimentales	113
2.1. Protocolos de limpieza y acondicionamiento del material	113
2.1.1. Limpieza del material de vidrio	113
2.1.2. Pretratamiento de electrodos.....	115
3. Referencias	117

Objetivos de la tesis doctoral

Objetivo global del trabajo 119

Objetivos específicos 119

Preámbulo del capítulo 3 121

Capítulo 3

Modification of electrodes by electrodeposited sol-gel silica: Mass transport effects on the electrochemical behavior of redox probes.

Abstract 127

1. Introduction 129

2. Experimental part 131

2.1 Reagents and equipment 131

2.2. Preparation of SiO₂-PSS 133

3. Results and discussion 135

3.1 Characterization of GC/SiO₂-PSS electrodes 135

3.2. Cyclic voltammetry of redox probes 139

3.3. Kinetic analysis of the voltammetric data 145

4. Conclusions	151
5. References	153

Preámbulo del capítulo 4.....	157
--------------------------------------	------------

Capítulo 4

Electrocatalytic performance of SiO₂-SWCNT nanocomposites prepared by electroassisted deposition

Abstract	161
1. Introduction.....	163
2. Experimental part	165
2.1. Reagents and equipment	165
2.2. Preparation of SWCNT@SiO₂ modified electrodes	167
3. Results and discussion	169
3.1. Characterization of SWCNT@SiO₂ composites	169
3.2. Analysis of the electrochemical performance of SWCNT@SiO₂- modified electrodes	175
4. Conclusions	182
5. References	184

<i>Preámbulo del capítulo 5</i>	187
---------------------------------------	-----

Capítulo 5

Enhancement of the Electrochemical Performance of SWCNT dispersed in a Silica Sol-gel Matrix by Reactive Insertion of a Conducting Polymer.

<i>Abstract</i>	193
1. Introduction	195
2. Experimental Part	198
2.1. Preparation of SWCNT@SiO₂ modified electrodes	200
3. Results and discussion	202
3.1. Electrochemical insertion of PANI into SWCNT@SiO₂ modified electrodes	202
3.2. Electrochemical characterization of SWCNT@SiO₂-PANI composite electrodes	207
4. Conclusions	216
5. References	218

<i>Preámbulo del capítulo 6</i>	221
---------------------------------------	-----

Capítulo 6

Modulation of the Silica Sol-gel Composition for the Promotion of Direct Electron Transfer to Encapsulated Cytochrome c.

<i>Abstract</i>	227
-----------------------	-----

<i>1. Introduction</i>	229
------------------------------	-----

<i>2. Experimental part</i>	232
-----------------------------------	-----

2.1. Reagents and equipment	232
-----------------------------------	-----

2.2 Preparation of electrodes.....	233
------------------------------------	-----

<i>3. Results and discussion</i>	234
--	-----

3.1. Characterization of cyt c in solution	234
--	-----

3.2. Characterization of encapsulated cyt c in silica.....	239
--	-----

<i>4. Conclusions</i>	250
-----------------------------	-----

<i>5. References</i>	251
----------------------------	-----

Capítulo 7

<i>Conclusiones finales</i>	255
-----------------------------------	-----

<i>Apéndice</i>	261
-----------------------	-----

**Desarrollo de electrodos modificados
con matrices de sílice para posibles
aplicaciones en sensores y biosensores
electroquímicos**

Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Estructura de la Tesis

La presente tesis está dividida en 6 capítulos. El capítulo 1 incluye una introducción general con antecedentes actuales en el ámbito de Ciencia de Materiales y el porqué del uso de la sílice como material soporte y bio-compatible. En el segundo capítulo se hace una revisión de las principales técnicas y métodos experimentales empleados para el desarrollo de los cuatro capítulos siguientes, además de una descripción de los materiales utilizados en el desarrollo de los electrodos modificados con sílice.

Los siguientes cuatro capítulos son secuenciales y presentados en formato de manuscrito en inglés. Cada capítulo posee: una introducción específica titulada “preámbulo” en castellano que explica el propósito del desarrollo del capítulo y su relación con el capítulo precedente, además de una parte experimental, discusiones y conclusiones.

El Capítulo 3 está enfocado en el estudio electroquímico de electrodos convencionales de carbono vítreo modificados con matrices sol-gel de sílice mediante depósito electroquímico. Este capítulo nos introduce en la síntesis de materiales de sílice y las diversas variantes para obtener un electrodo modificado con vistas al desarrollo de materiales compuestos aplicados en electrocatálisis (introducción de ionómeros o encapsulamiento de materiales con propiedades electrocatalíticas importantes). Por otro lado,

el capítulo 3 demuestra cómo un material considerado desde el punto de vista electrónico como un aislante, puede mejorar la respuesta electroquímica tan solo por fenómenos electrostáticos entre las matrices de sílice electrodepositadas y las especies en disolución (sondas redox), interacciones que están relacionadas directamente con procesos de transporte de materia .

El capítulo 4 está enfocado en el estudio electroquímico de electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono de pared simple encapsulados en matrices sol-gel de sílice mediante depósito electroquímico. Este capítulo sigue la misma filosofía que el capítulo 3, con la única diferencia que el rol de la sílice no fue tan solo el de soporte sino también el de dispersante del material electrocatalítico. Análogamente al capítulo 3, se realizó un estudio de la electrocatálisis del composite frente a reacciones redox específicas, evaluándose la cinética del proceso y el área electroactiva del electrodo, demostrándose cómo el encapsulamiento de materiales de propiedades electrocatalíticas atractivas pueden mejorar la respuesta electroquímica de los procesos redox.

El capítulo 5 está enfocado en el estudio electroquímico de electrodos de carbono vítreo modificados con nanotubos de carbono de pared simple encapsulados en matrices sol-gel de sílice e interconectados con polianilina (PANI), la cual ha sido sintetizada electroquímicamente. Este capítulo se basa en la mejora de la respuesta electroquímica de los electrodos

preparados previamente en el capítulo 4, haciendo uso de un polímero conductor que servirá de hilo conector para poner en contacto el electrodo soporte de carbono vítreo con los nanotubos de carbono más alejados de la superficie. En el capítulo 5 se demostró una sinergia de los dos materiales electrocatalíticos (nanotubos de carbono y polianilina), sinergia que se ve reflejada en la mejora de la cinética de transferencia electrónica y del área electroactiva.

Con el conocimiento adquirido en electroquímica inorgánica para el desarrollo de los capítulos anteriores (3-5) procedemos a experimentar en bio-electroquímica con el encapsulamiento del citocromo c dentro de matrices de sílice convencionales y matrices de sílice orgánicamente modificadas. El Capítulo 6 se centra en la transferencia electrónica directa de proteínas inmovilizadas dentro de matrices de sílice depositadas químicamente. En este capítulo se demuestra como la respuesta electroquímica de proteínas o enzimas encapsuladas en matrices de sílice está fuertemente influenciada por el grupo terminal presente en el poro de la matriz. Finalmente, el capítulo 7 recoge las conclusiones generales de la tesis.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Capítulo 1

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. Introducción General

El ser humano lleva milenios sintiendo fascinación por ciertas habilidades y características que hacen únicos a los seres vivos de nuestro planeta; habilidades y características que han sido adquiridas producto de la evolución de cada especie. Hay, por ello, infinidad de estudios realizados sobre esta temática en las distintas áreas de la ciencia y otros muchos siguen realizándose en la actualidad.

Si llevamos a cabo una breve búsqueda bibliográfica que sea relacionada a sustancias y materiales “bioinspirados” o “biomaterializados” desarrollados o comercializados en estos últimos años, encontraremos una diversidad de ejemplos innovadores, por ejemplo, no es novedad que los chalecos a prueba de balas, piel sintética, botellas biodegradables para el almacenamiento de agua y materiales electrónicos para computadoras, sean productos desarrollados a partir del estudio de las propiedades de la seda de araña, que resultó ser 5 veces más fuerte que el acero y 3 veces más fuerte que el Kevlar [1, 2]. Siguiendo la misma tendencia de materiales resistentes, con el estudio de la endocutícula de las tenazas del camarón Mantis (específicamente, *Odontodactylus scyllarus*) ha sido posible el desarrollo de materiales protectores para aviones, coches y el desarrollo de armaduras, ya que ésta presenta una estructura multiregional caracterizada por un arreglo helicoidal de capas fibrilares mineralizadas, que tienen alta

resistencia y absorción de impactos [2]. En medicina cientos de péptidos (conotoxinas) presentes en el veneno de caracoles marinos pueden ser 100 veces más efectivas para aliviar el dolor de enfermedades crónicas en comparación con los analgésicos convencionales como la morfina y la gabapentina, siendo el mayor mérito de las conotoxinas el no crear fármaco dependencia en los pacientes [3]. Tampoco nos debería de sorprender la posibilidad de que las plantas ornamentales caseras sean fuente de energía para televisores, computadoras y electrodomésticos [4].

El mundo de los microorganismos tampoco ha sido dejado de lado por los científicos, existen microbios capaces de “comer” electricidad, los estudios revelan que las bacterias gram-negativas *Rhodospseudomonas palustris* pueden ser usadas para crear fuentes de energía eficientes (bio-pilas combustible) [5]. La levadura, otro microorganismo unicelular, también ha sido razón de estudio donde el código del ADN de su cromosoma ha sufrido más de 50.000 modificaciones con el objetivo de diseñar levaduras que puedan generar más etanol y que sean más resistentes en ambientes difíciles; e incluso cabe la posibilidad de convertirlos en pequeñas fábricas de vacunas [6].

Con todo lo expuesto, se puede aseverar que mucha de la revolución a la que asistimos en nuevos materiales, compuestos y productos ha sido inspirada en características o habilidades inherentes a los seres vivos.

Sin embargo, se tiene una noción un tanto confusa o engañosa si nos referimos a la rápida evolución de compuestos “híbridos biológicos-inorgánicos” y que estos fueran resultado de la inspiración de características propias de organismos vivos, ya que el desarrollo de esta interfase biológico-inorgánica no es dependiente de referentes o prototipos de la naturaleza. Por ejemplo, tenemos el desarrollo *in situ* de nanofibras poliméricas biocompatibles, utilizadas para sellar incisiones quirúrgicas y evitar posibles infecciones [7]. Otro ejemplo más futurista es el ensamblaje entre nanotubos de carbono de pared simple y cloroplastos, lo que implica el uso de plantas ornamentales o arbustos como sensores químicos que podrían detectar y seguir los niveles de contaminación o la infección bacteriana / micótica [8]. Ambos ejemplos bio-inorgánicos no son émulos de la naturaleza sino producto de nuestro intelecto e investigación.

Por lo tanto, curiosidad, ideas e innovación son necesarias para el desarrollo de los materiales biológicos-inorgánicos, lo que implica, que el desarrollo de los materiales híbridos o bio-híbridos de sílice no fue una excepción, esto último quiere decir que muchos “años-hombre” siendo más específicos “años-investigador” fueron necesarios para un profundo entendimiento y su desarrollo en posibles aplicaciones con fines analíticos, médicos o tecnológicos.

Si bien, la abundancia del silicio en la corteza terrestre es muy elevada (en realidad es el segundo elemento más abundante), quizás, cabría esperar que la bioquímica del silicio fuera similar a la bioquímica del carbono pero, como sabemos, no hay punto de comparación entre ellas, ya que si se piensa en la bioquímica del silicio estaríamos tratando con una bioquímica hipotética extraterrestre debido a que ninguno de los bloques básicos universales comunes para todas las formas de vida terrestres (aminoácidos monosacáridos, lípidos y oligonucleótidos) contienen silicio. Incluso cuando hablamos de órganos rígidos, “la madre naturaleza tiende a ignorar” los beneficios potenciales de los silicatos y prefiere hidroxapatitas para la formación de esqueletos, huesos y dientes o carbonatos de calcio para la formación de corazas y las cutículas en crustáceos. Y por ello los más optimistas y estudiosos de la metodología sol-gel de sílice tendrán que admitir que las bio-estructuras de sílice están pobremente representadas por los organismos vivos. Quizás por ello desde 1846 pasó desapercibida hasta 1990, desde que J. Ebelmen un científico francés en 1846 sintetizara monolitos de sílice a partir de tetra-etoxisilano (TEOS) [9], hasta que Braun dirigiera su interés en bio-encapsulamiento de enzimas con matrices de sílice sintetizadas con el mismo precursor de silanos utilizado en el trabajo de Ebelmen (TEOS) [10], sin embargo, la gran diferencia en la síntesis de monolitos de uno y de otro, radicaba en que al primero le

tomaba años obtener un monolito y al segundo días ya que los preparaba aplicando el proceso sol-gel.

Como se ha mencionado, la sílice mantuvo un bajo perfil en el mundo de la ciencia hasta finales del siglo XX, a pesar que ya se tenía conocimiento de que algunas formas de vida marina se servían de la sílice para formar sus paredes celulares o esqueletos (diatomeas, esponjas, radiolarias). En el caso de las diatomeas (una clase de algas unicelulares microscópicas) tuvieron que desarrollar sus propios métodos para utilizar la transparencia de un material disponible en su medio como requisito para realizar la fotosíntesis, y lo desarrollaron con meticulosa eficiencia rodeándose por una pared celular única hecha de sílice conocida como frústula. Las diatomeas fueron conocidas por la belleza de sus frústulas, pero la belleza no es lo único atractivo de este biomaterial. Estas conchas de sílice son fuertes ya que su propósito también es de proteger a las diatomeas de los depredadores y son porosas para permitir que los nutrientes y metabolitos difundan dentro y fuera de esta pared celular. Esta variedad de formas sofisticadas (más de 100 000 especies, cada una con su propia morfología) podrían conducir a nuevos avances en el campo de los materiales nanoestructurados. La Fig. 1.1 muestra diversas morfologías de frústulas que presentan las diatomeas, estructuras micrométricas porosas, estables y protectoras.

Pero, “estos microorganismos no tienen en consideración” la versatilidad de la sílice y las interesantes características que presentan los materiales híbridos (orgánico-inorgánico) de sílice con sus posibles aplicaciones, un aspecto que se pretende profundizar en la presente memoria de tesis. El ejemplo de las diatomeas demuestra que las células individuales podrían vivir y poseer una actividad metabólica cuando son encerradas o “encapsuladas” dentro de una red de sílice fundamento recién propuesto por Carturan et al.[11] hace unos de 20 años.

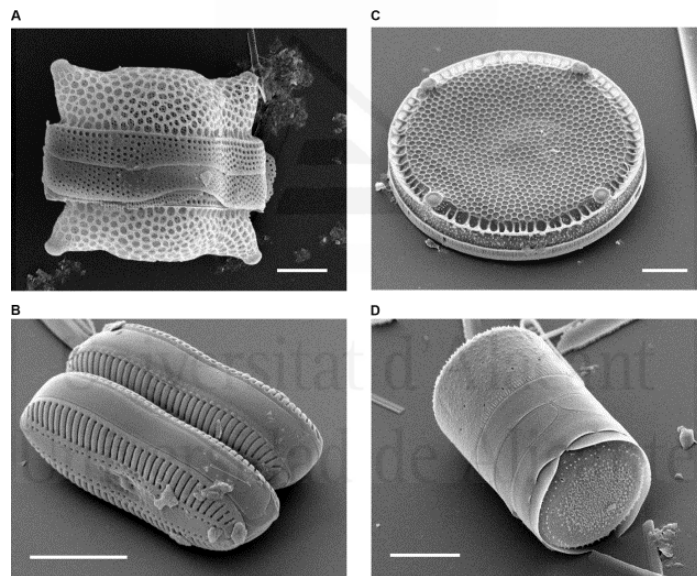


Figura 1.1.- Micrografías SEM de diatomeas con frústulas de diversas morfologías. (A) *Biddulphia reticulata*. (B) *Diploneis* sp.(C) *Eupodiscus radiatus*.D) *Melosira varians*. (Tamaño de las escalas = 10 micrometros).[12]

Pero recapitulando hasta el momento, se podría inferir que la sílice está pobremente representada por los seres vivos a nivel macroscópico y a nivel microscópico como material “protector” en especies marinas, esto

significa no tener muchos ejemplos de posibles aplicaciones inmediatas, entonces ¿Cuál es la utilidad de un material transparente, poroso y permeable? O mejor aún, ¿cuál es la ventaja de desarrollar una sólida red nanoestructurada de sílice y en qué campos de la ciencia pueden ser utilizados? y por último ¿por qué interesarnos en la síntesis de la sílice mediante el proceso sol-gel? Estas preguntas nos sumergen en la interfase organica-inorgánica de la sílice, y serán resueltas a continuación, a lo largo de una breve introducción histórica y bibliográfica que hace un seguimiento a la evolución de la sílice como material y sus diversas aplicaciones.

Entre 1983 y 1989 el interés científico por la sílice y otros óxidos metálicos sintetizados por el proceso sol-gel estuvo centrado en sus características ópticas al poder sintetizarse como materiales translúcidos con la posibilidad de obtener cristales de alta densidad. Por ello en Estados Unidos se llevaron a cabo una serie de conferencias internacionales relacionadas con el procesado de ultraestructuras (*Conferences on Ultrastructure Processing*) promovidas por la dirección de química y ciencias atmosféricas de la oficina de investigación científica de la fuerza aérea (AFOSR), cuyo propósito era el desarrollo de una nueva generación de materiales avanzados para aplicaciones en estructuras, óptica, y dispositivos optoelectrónicos [13].

Paralelamente, ya en 1980 la tecnología sol-gel había despertado el interés de la comunidad electroquímica y de otras especialidades a fines. Inicialmente, los físico-químicos se interesaron en la tecnología sol-gel como un método para mezclar íntimamente diferentes óxidos metálicos, con miras a la producción de materiales cristalinos. En muchos casos los xerogeles sintetizados a partir de precursores disueltos podían ser sinterizados a bajas temperaturas en comparación con los métodos convencionales a partir de una mezcla de materiales pulverulentos. Esta fue la motivación para la síntesis de los denominados *nasicons* (superconductores de ion sodio $\text{Na}_{1+x}\text{Zr}_2\text{Si}_x\text{P}_{3-x}\text{O}_{12}$) que fueron preparados mediante el método sol-gel y publicado por primera vez en 1980 por Quon et al. [14]. En 1984 Livage y colaboradores [15] sintetizaron óxido de tungsteno para aplicaciones electrocrómicas; en 1986 Yoko et al. [16] introdujeron electrodos de dióxido de titanio derivados del sol-gel para la electrólisis del agua en células fotoelectroquímicas. Esto fue casi dos décadas después de la primera publicación sobre semiconductores fotoelectroquímicos, a pesar que en aquella época ya se comercializaban ventanas antireflejantes con este tipo de óxidos ($\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$) [17]. Como vemos los materiales de sílice pasaban casi desapercibidos optándose preferentemente por el desarrollo de óxidos metálicos mediante el proceso sol-gel.

Murray y colaboradores fueron los primeros en aplicar películas redox entrecruzadas basadas en siloxanos modificados [18] sobre electrodos metálicos tales como platino, oro, etc. Inicialmente se realizaban recubrimientos de monocapas o películas delgadas basadas en tricloro- o trimetoxiaminosilanos y luego las especies redox eran ancladas sobre las capas preparadas. A pesar que la intención inicial era obtener un electrodo modificado con una monocapa de modificadores redox, un recubrimiento polimérico entrecruzado era frecuentemente observado. Posteriormente, Wrighton y colaboradores utilizaron modificadores de cloro-etoxisilil ferroceno sobre metales nobles y semiconductores tipo n [19, 20]. Debido a que la formación de las películas en los estudios de Wrighton y Murray fueron desarrolladas por policondensación y la formación de un sol, estos estudios pueden ser considerados como las primeras experiencias electroquímicas relacionadas a materiales sol-gel. Sin embargo la terminología sol-gel nunca fue mencionada como tal en estos estudios.

Ya en la década de los 90, los materiales amorfos derivados del proceso sol-gel se habían convertido en una referencia para la comunidad electroquímica. Aplicaciones con xerogeles, aerogeles, e incluso hidrogeles conductores fueron materializadas. Desarrollándose el concepto del mejor desempeño de los materiales amorfos para algunas aplicaciones en comparación al desempeño de su estructura cristalina, especialmente para

aquellas que requieren una rápida difusión de iones, como en las baterías intercaladas de litio [21,22] , supercondensadores [23] y electrolitos sólidos [24].

Luego, se infiere con esta breve reseña histórica que tuvo que pasar alrededor de siglo y medio para desarrollarse una metodología del proceso sol-gel y que la década de los noventa resulto ser clave para el desarrollo de aplicaciones futuras en electroquímica mediante la metodología sol-gel. Si bien, en toda esta introducción se ha mencionado el término proceso sol-gel, ya sea de sílice o de óxidos metálicos, es totalmente válido cuestionarse ¿en qué consiste este proceso y por qué es interesante su aplicación en materiales sensores u ópticos?, cuestión que es resuelta a continuación.

1.1 La química del proceso sol-gel

El proceso sol-gel provee un camino relativamente directo para fabricar materiales tipo vidrio o materiales cerámicos mediante la hidrólisis y la condensación de alcóxidos metálicos adecuados [25]. Los precursores más populares para la fabricación de materiales basados en sílice son tetrametoxisilano (TMOS) y tetra-etoxisilano (TEOS), estos reactivos pueden ser hidrolizados y condensados bajo condiciones relativamente suaves

(temperatura y presión ambiente en medios relativamente ácidos o básicos) con la secuencia de reacciones que se muestra en la Fig. 1.2.

El proceso sol-gel se realiza en dos etapas, una primera etapa de hidrólisis, basada en un procedimiento mecánico que consiste en la mezcla de TEOS (u otro precursor de sílice) con agua en presencia de un co-solvente (comúnmente etanol) y la adición de un catalizador de la reacción (catálisis ácida con HCl, catálisis básica NH_3 o catálisis nucleofílica F^-).

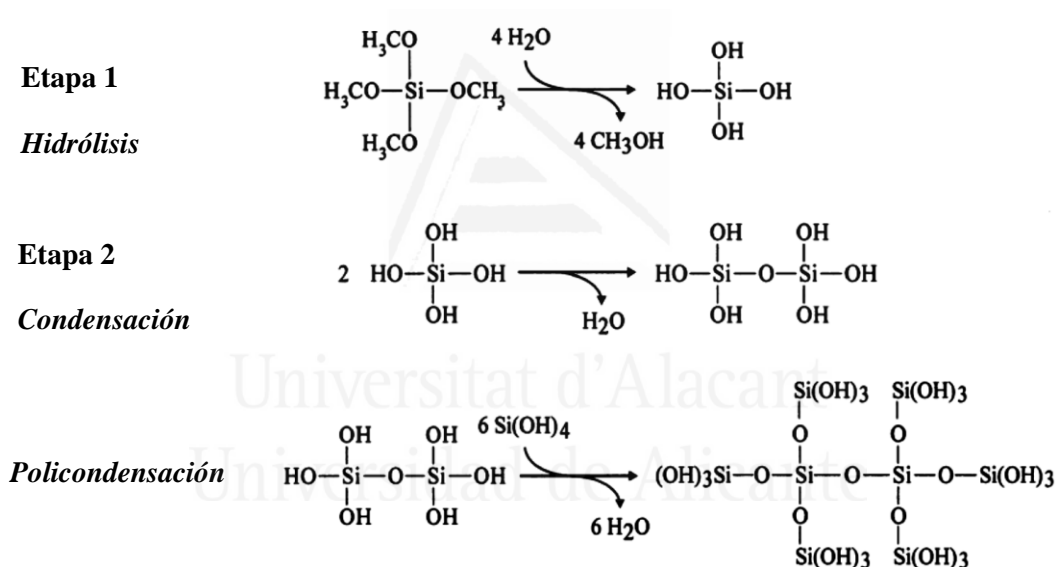


Figura 1.2.- Descripción del proceso sol-gel para el precursor tetrametoxisilano (TMOS) [26].

Durante la etapa de hidrólisis la viscosidad de la disolución aumenta gradualmente generándose un sol (suspensión coloidal de partículas pequeñas).

La segunda etapa es la condensación; ésta se lleva a cabo entre silanos hidrolizados (silanoles) con la generación de enlaces $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ especies conocidas como siloxanos, que a su vez continuaran reaccionando con silanoles en disolución (policondensación). La viscosidad de la disolución continúa en aumento generándose una suspensión submicrométrica de especies interconectadas (entrecruzamiento) que posteriormente durante la gelificación formaran una estructura rígida y porosa (Fig.1.3a). El tiempo de gelificación puede darse sobre un intervalo considerable de tiempo desde segundos a meses dependiendo de las condiciones del proceso (relación Si:H₂O, concentración y tipo de catalizador, alcóxido precursor ,etc). Durante el secado, el alcohol (producto de la hidrólisis) y el agua y se evaporan de los poros provocando una contracción de la matriz. Los xerogeles o geles completamente secos, son significativamente menos porosos que sus contrapartes hidratadas. Si se desea mantener la porosidad de la estructura los geles pueden ser secados bajo condiciones supercríticas, formándose un aerogel. Las propiedades físicas de la estructura resultante, como el tamaño de poro promedio, distribución de tamaño de poro, forma del poro, y área superficial dependen de los parámetros utilizados en el proceso sol-gel.

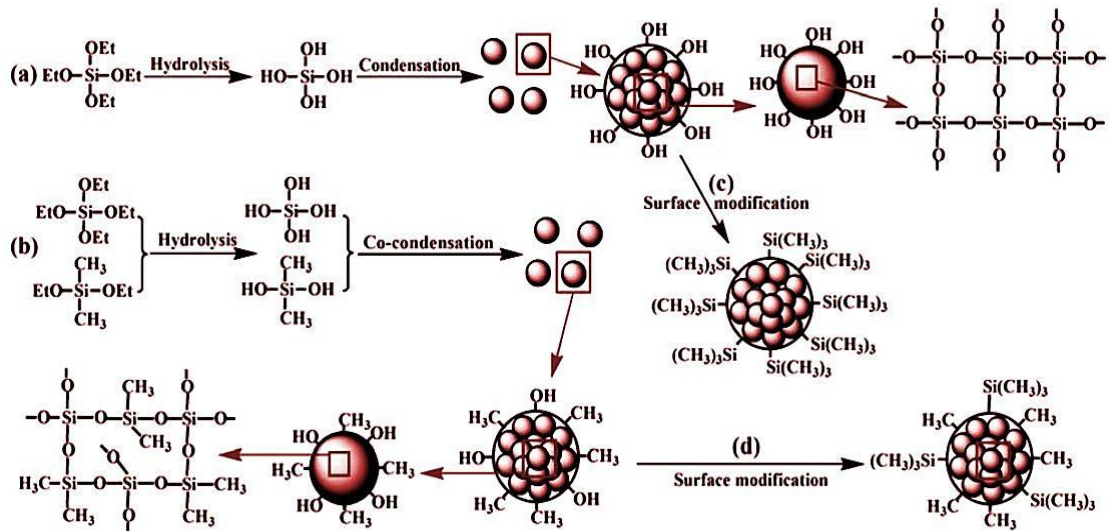


Figura 1.3. Representación esquemática del proceso de crecimiento de partículas de sílice a partir de TEOS a), partículas de Ormosiles a partir de TEOS y di-metil di-etoxisilano (DDS) b), partículas luego de una modificación superficial c) y d).[27]

Desde una perspectiva al diseño de materiales, el enfoque sol-gel presenta muchas ventajas por la versatilidad con la que muchos materiales pueden ser sintetizados. El recubrimiento de electrodos con películas delgadas de sílice puede llevarse a cabo mediante spin-casting (recubrimiento por giro) o dip-coating (recubrimiento por inmersión), estas técnicas de recubrimientos con películas de sílice han sido utilizadas para recubrir láminas de vidrio, fibras ópticas y materiales de carbono [28-34].

Con respecto a los electrodos recubiertos con películas delgadas de sílice, éstos han sido aplicados al desarrollo de sensores químicos, ya que el tiempo de recorrido del analito durante su difusión a través de la red de sílice porosa es relativamente corto, mejorándose así el tiempo de respuesta

del sensor y la velocidad de recuperación. Otra de las facilidades que otorga el proceso sol-gel es la preparación de monolitos de sílice (gel, xerogel), éstos son frecuentemente utilizados en investigaciones espectroscópicas debido al amplio recorrido óptico que ofrecen. Una aplicación adicional se da en catálisis actuando como soporte y dispersor del material catalítico [35-38].

Otra ruta alternativa para la síntesis de matrices de sílice mediante el proceso sol-gel implica la realización de depósitos electroasistidos de películas de sílice que constituye un método experimental adecuado, versátil y rápido para la preparación de electrodos modificados con sílice [39-42]. El método consiste en la aplicación de un potencial de reducción sobre el electrodo, el cual es lo suficientemente negativo para generar hidrógeno en la interfase electrodo-disolución (Fig.1.4a). La evolución de hidrógeno conduce a un aumento de pH en las cercanías del electrodo, que conduce a la agregación de partículas coloidales que coalescen para la formación de la capa de sílice (fig.1.4b). Las propiedades finales del depósito dependerán de un número de variables como la densidad de corriente empleada, la composición de la disolución precursora, la concentración del precursor y la composición de la superficie del electrodo.

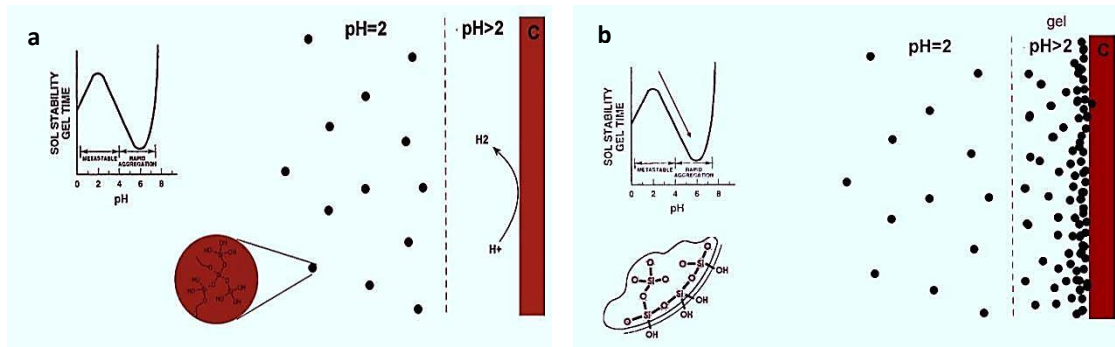


Figura 1.4.- Esquema de la síntesis electro-asistida de matrices sol-gel de sílice. Inicialmente el electrodo es sometido a un potencial de reducción para la generación de hidrógeno en la interfase a); el consumo de protones favorece al incremento del pH en las cercanías del electrodo, favoreciéndose la agregación de partículas coloidales de siloxanos que coalescen para la formación de la capa de sílice en la superficie del electrodo b).

Hasta el momento se ha descrito el proceso físico-químico sol-gel y los métodos de recubrimientos con capas de sílice. Sin embargo desde el punto de vista químico, el proceso sol-gel también ofrece numerosas ventajas ya que permite el uso de precursores de sílice orgánicamente modificados (ormosiles) cuya fórmula generalmente en bibliografía es expresada como $R-Si(OR')_3$ (donde R es el grupo funcional y R' representa CH_3 o CH_2CH_3). Estos precursores pueden ser hidrolizados y co-condensados con TMOS o TEOS (fig. 1.3b) para la fabricación de materiales híbridos orgánicos-inorgánicos con una polaridad hecha a medida, con un índice de refracción modulable y cierta flexibilidad. Adicionalmente, la superficie de la red coloidal, al presentar grupos terminales hidroxilos, puede ser modificada superficialmente en una etapa adicional con una sílice

orgánicamente modificada, como se puede observar en la Fig.1.3 c y d, obteniéndose matrices superhidrofóbicas [27].

El primer reporte relacionado a la síntesis de materiales híbridos orgánicos-inorgánicos se dio en 1984 [43], posteriormente estos materiales híbridos emergieron como modificadores versátiles de electrodos y han tenido un profundo impacto en la electroquímica sol-gel contemporánea. Se introdujeron novedosas vías para la incorporación de grupos terminales orgánicos en xerogeles, desarrollándose por primera vez el concepto de “encapsulamiento o atrapamiento”. Phillipp y Schimidt [44] basándose en la alta estabilidad de los enlaces Si-C, ya que no son hidrolizables, desarrollaron a partir de precursores alcoxisilanos (MTMOS) y trialcóxidos materiales cerámicos orgánicamente modificados (ormocers) y silicatos orgánicamente modificados (ormosils) encaminados a su aplicación como lentes de contacto. Además, Avnir y colaboradores [45] demostraron que es posible inmovilizar compuestos orgánicos (Rodamina 6G) en xerogeles mezclándolos con los precursores sol-gel (esta fue la base para el encapsulamiento a posteriori de una variedad de especies moleculares). Estas innovaciones fueron el inicio para la combinación de propiedades físicas de materiales inorgánicos-orgánicos con una variedad de especies a inmovilizar dentro de una red porosa amorfa o nanoestructurada.

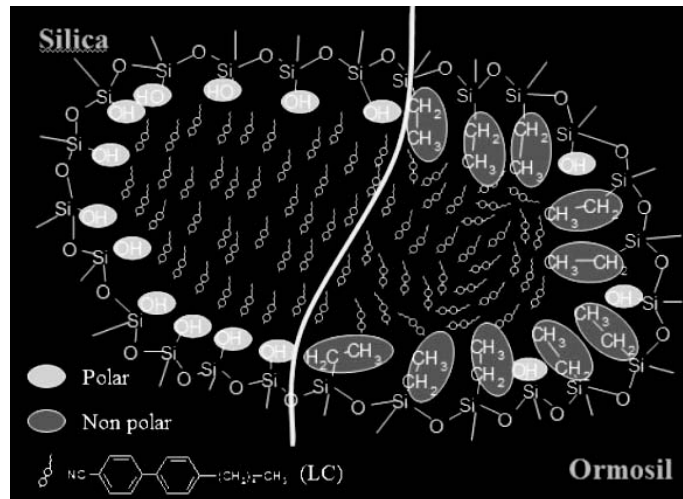


Figura 1.5. Representación esquemática de una copolimerización de sílice de donde se obtiene un poro híbrido con propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas útiles para el encapsulamiento de especies de interés como los cristales líquidos (*liquid crystals*, LC). [46]

Un ejemplo directo de cómo ha ido evolucionando el concepto del desarrollo de materiales híbridos conjuntamente con el encapsulamiento de especies de interés en óptica se puede observar en la Fig. 1.5, donde el método sol-gel es utilizado para la dispersión de cristales líquidos (*liquid crystals*, LC), los cuales se encuentran localizados dentro de los poros de sílice-ormosil (encapsulados) en donde la polaridad superficial y tamaño de poro puede ser modulado para la obtención de un dispositivo con propiedades electro-ópticas específicas[46].

Cabe mencionar que dentro de los materiales híbridos orgánico-inorgánicos de sílice, están definidos dos clases de materiales (Sanchez y Ribot)[47], materiales de sílice de clase I (de enlaces débiles entre las especies orgánicas y sus contrapartes inorgánicas) y materiales de sílice de clase II

(de enlaces covalentes fuertes o iono-covalentes). Estos materiales exhiben características químicas y fisicoquímicas que podrían ser fácilmente utilizadas para modificar la superficie de los electrodos. En la presente memoria se desarrollan ambos tipos de materiales y se especificará en el preámbulo de cada capítulo.

Las aplicaciones de los materiales híbridos basados en sílice han sido descritas en varios campos, como sensores químicos y biológicos (electrocatalisis, pre-concentración, electrodos enzimáticos, etc), electroquímica, electropolimerización, baterías y pilas combustible [22, 39, 43, 48-57]. Estas aplicaciones quedan representadas por unos 200 artículos hasta el 2001, el 85 % de ellos publicados en un lapso de 5 años entre 1995 y 2000 y un 50% durante el corto periodo de 1999-2000, lo que revela la importancia que ha llegado a adquirir la sílice en distintas áreas de investigación [43, 58, 59]. Y actualmente si realizamos una búsqueda de acuerdo al número de publicaciones hasta el año 2013 en una base de datos como *Web of science*TM (WOS) con las palabras clave "*sol-gel*" or "*silica*" or "*ormosil**" and "*hybrid-materials*" obtenemos como resultado más de 3000 artículos en el tema, lo que indica la importancia que fue adquiriendo el estudio de materiales híbridos hasta la fecha.

1.2 Aplicaciones emergentes de materiales compuestos de sílice

1.2.1 Pre-concentración y permeabilidad asociadas con la detección voltamétrica

Una práctica común con electrodos “químicamente” modificados es el aprovechamiento de las propiedades enlazantes del modificador para acumular un analito de interés, como un paso previo a la cuantificación electroquímica. De este modo se espera una mejora en la selectividad y la sensibilidad en comparación con electrodos no modificados. La selectividad podría elevarse con una apropiada elección del modificador responsable para interactuar preferentemente con el analito de interés y por otro lado repeler o evitar otras especies interferentes y la sensibilidad sería mejorada por la pre-concentración química.

Los materiales híbridos orgánicos–inorgánicos de sílice parecen prometedores porque la parte orgánica puede ser seleccionada basándose en su afinidad particular con el analito de interés, y la matriz inorgánica puede presentar estructuras múltiples, modulándose así la porosidad, facilitando el acceso del analito a los sitios de enlace y obteniéndose una alta eficiencia de pre-concentración. Con el propósito de mejora en la selectividad y sensibilidad se a venido desarrollando diversos tipos de materiales clase I y II cada uno con características específicas que se describen a continuación:

a) Acumulación por adsorción o por complejación (quelación)

Ambas clases I y II de materiales orgánicos-inorgánicos basados en sílice fueron empleados con este propósito. El concepto de usar un quelante orgánico inmovilizado dentro de una matriz (material de sílice clase I) y soportarlo sobre un electrodo carbonoso para la detección de metales previa pre-concentración voltamétrica fue la estrategia propuesta por Wang et al. (Ni^{II}-dimetilglioxima) [60] y Ji-Guadalupe (Fe^{II}-dimetilglioxima) [61] inmovilizando dimetilglioxima. En cromatografía, Hernández y colaboradores investigaron en profundidad las propiedades de unión del híbrido C₁₈-sílice como fase estacionaria, para la determinación de varias drogas y pesticidas [62, 63].

b) Intercambio iónico

La mayoría de artículos de esta temática fueron enfocados al desarrollo de películas compuestas de polímeros orgánicos-inorgánicos interpenetrantes, donde el componente orgánico fue una larga cadena poli-electrolítica con características de intercambio aniónico o catiónico [32, 33, 64, 65]. Su utilidad analítica como modificador de electrodos fue descrita por el grupo de investigación de Heineman quienes demostraron que el coeficiente de partición de los analitos catiónicos $([\text{Re}^{\text{I}}(\text{DMPE})_3]^+)$ siendo DMPE=1,2 bi-

(dimetilfosfino)etano) era mucho mayor en un electrodo composite de sol-gel-Nafion en comparación a un electrodo modificado con Nafion puro.

Esta mejora fue atribuida a la estructura rígida porosa tridimensional de la película híbrida, que fue inducida por su componente inorgánico (matriz de sílice). Esta estructura porosa favorece el transporte de masa desde y hacia los sitios de intercambio localizados en el interior de la película de sílice. Mejorándose así el proceso de difusión en Nafion mediante su dispersión dentro de la matriz de sílice sintetizada por el proceso sol-gel. Este comportamiento fue aprovechado para la detección electroquímica de $[\text{Re}^{\text{I}}(\text{DMPE})_3]^+$ sobre electrodos planos de grafito y microelectrodos de fibra de carbono modificados con una película sol-gel-Nafion, observándose una mejora en los límites de detección de hasta 10 000 veces, en comparación con electrodos sin modificar, esta mejora era atribuida a la preconcentración que experimentada el analito dentro de la película[64, 65]. Este concepto fue utilizado para el análisis de cationes y aniones como $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ y $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$.

c) Recubrimientos perm-selectivos

Siguiendo la misma filosofía expuesta anteriormente, donde ionómeros polianiónicos concentran cationes y ionómeros policationicos concentran aniones, cabría esperar que ocurriera el contraproceto, esto implicaría que aniones y cationes serian repelidos por cada especie ionomérica aniónica o

catiónica respectivamente en cada caso. Este fenómeno permeable-selectivo meramente producto de repulsiones o atracciones electrostáticas fue aplicado en electroanálisis e investigado por Collinson y colaboradores [29, 66] quienes recubrieron electrodos de carbono vítreo con películas de sílice modificadas orgánicamente con grupos $-\text{NH}_2$ o $-\text{COOH}$. El resultado fue que los electrodos modificados con sílice y grupos $-\text{COOH}$ eran selectivos para especies catiónicas como viológeno de metilo o hexaminrutenio, mientras que los electrodos modificados con sílice y grupos $-\text{NH}_2$ suprimieron la respuesta electroquímica de éstas especies. Sin embargo, el comportamiento contrario se observó con especies aniónicas como el ferricianuro. De los estudios realizados se concluyó que la magnitud de este fenómeno tenía una fuerte dependencia con la cantidad de sitios de intercambio iónico, el tipo de modificador (ionómero), y la estructura de la sílice híbrida (poros más abiertos o más cerrados).

d) Impronta molecular

Un campo interesante en ciencia de materiales es la búsqueda de sistemas integrados que permitan el reconocimiento y la discriminación a nivel molecular. Una elegante forma de alcanzar estos objetivos es obtenida con polímeros impresos molecularmente con los cuales ya se han desarrollado algunas aplicaciones analíticas [67-69]. Sin embargo su aplicación en electroanálisis es algo limitada debido a que frecuentemente es necesario

tiempos largos de respuesta debido a la lenta difusión del analito dentro del material. Una forma de superar este impedimento fue aportada por Makote y Collinson [70] con la fabricación de un material sol-gel híbrido orgánico-inorgánico en este caso impreso molecularmente con dopamina para su detección frente a un interferente como el ácido ascórbico.

1.2.2 Sensores químicos

Comúnmente, como ha ocurrido en muchos estudios vinculados a electrodos modificados, los investigadores en la electroquímica de materiales de sílice (sean híbridos orgánico-inorgánico o híbridos biológico-inorgánico), tienden o se ven en la situación de transportar el concepto de la investigación fundamental en interfases químicamente sensibles hacia aplicaciones más prácticas. Y es aquí en el campo de los sensores químicos donde los conocimientos fundamentales pueden ser acoplados a las necesidades de las aplicaciones del mundo real, y a un amplio rango de las disciplinas científicas más allá de las ciencias químicas.

Entre éstas aplicaciones tenemos, sensores de gases, sensores iónicos, sensores desechables, detectores para cromatografía, y electrocatálisis siendo este último el tema interés en la presente memoria. Kubota, Gushikem y colaboradores [71-74] investigaron ampliamente las propiedades electrocatalíticas de una variedad de compuestos

organometálicos adsorbidos sobre superficies modificadas de gel de sílice (materiales de clase I). Por ejemplo, ellos describieron sensores atractivos para la detección de oxígeno disuelto, NADH, hidracina, ácido oxálico con: rutenio-(etilendiamino)-tetraacético ácido, Azul de Meldola, y ftalocianinas de níquel y cobalto como mediadores. También electrodos con matrices hidrofóbicas sílice-carbono (CCEs) fueron utilizados para inmovilizar catalizadores. Wang y colaboradores [75-77] construyeron sensores amperométricos para determinar aniones inorgánicos (NO_2^- y BrO_3^-) y ácido ascórbico encapsulando compuestos de molibdeno dentro de matrices de sílice-carbono. Como era de esperarse dentro de la gama de los catalizadores existentes los catalizadores metalodendriméricos de Rh y Ru también fueron dispersados sobre matrices basadas en sílice para la determinación de péptidos y proteínas [78-80].

Sin embargo no todos los materiales electrocatalíticos están basados en metales nobles u otros metales (Pt, Rh, Ir, Ru, Pd, Au, Ag, Cu, etc). También existen materiales electrocatalíticos derivados del carbono como el grafeno, nanotubos de carbono, polímeros conductores y biomoléculas. Siendo éstas últimas un campo aparte en el área de la bio-electroquímica. Su historia, desarrollo y aplicación será explicado en la sección 1.2.3 Biosensores.

Con respecto a los materiales compuestos exclusivamente de carbono (alótropos de carbono), como son el grafeno y los nanotubos de carbono (incluye nanotubos de carbono de pared simple, SWCNT, y de pared múltiple, MWCNT), se puede decir que ambos tienen una estrecha relación estructural. El grafeno es una capa de un átomo de espesor, conformada por moléculas de carbono con hibridación sp^2 dispuestas hexagonalmente con un patrón regular, mientras que los nanotubos de carbono son el resultado del enrollamiento de esta monocapa de carbono alrededor de un eje de simetría, cada material presenta características específicas y de gran interés en el mundo de la electroquímica ya que presentan propiedades electrónicas excepcionales [81]. El grafeno y los nanotubos de carbono han sido soportados sobre matrices de sílice para el desarrollo de electrodos modificados encaminados a la detección o producción de analitos de interés [82-86].

Por ejemplo, Yang y colaboradores [84, 87] desarrollaron nanolaminas de grafeno recubiertas por sílice meso-estructurada sintetizadas por la metodología sol-gel, este diseño de nanomateriales bidimensionales presentaría futuras aplicaciones en catálisis, sensores, baterías y condensadores. Adicionalmente las nanolámimas bidimensionales de grafeno-sílice fueron dopadas con N y S desarrollándose grafenos dopados con heteroátomos presentando buenas propiedades electrocatalíticas para la

reacción de reducción de oxígeno (ORR) en pilas combustible. Por otro lado, Gavalas y colaboradores [82] demostraron que los materiales compuestos conformados por nanotubos de carbono y sílice sol-gel otorgan nuevos enfoques para el desarrollo de dispositivos electroquímicos. Estos materiales compuestos integran las facilidades y ventajas del proceso sol-gel y las buenas características electroquímicas de los nanotubos de carbono (capacitancia, velocidad de transferencia electrónica, y selectividad) para la detección de ácido ascórbico donde la respuesta electroquímica en la oxidación del analito dependía directamente de la composición de los precursores de sílice y la cantidad de nanotubos de carbono depositados.

También para la determinación de ácido ascórbico frente a interferentes como la dopamina materiales un poco más elaborados fueron desarrollados por Ragupathy y colaboradores [88], donde un electrodo de carbono vítreo era modificado con nanotubos de carbono, sílice y nanopartículas de oro, en este caso los nanotubos de carbono fueron funcionalizados con precursores de sílice desarrollándose así una red nanoestructurada porosa con características conductoras, este híbrido clase II fue depositado sobre el electrodo de carbono vítreo y posteriormente se electrodepositaron las nanopartículas de oro sobre la superficie del electrodo modificado por voltametría cíclica. Una descripción fisicoquímica más detallada sobre

nanotubos de carbono es desarrollada en una sección aparte (ver sección 1.3 Nanotubos de Carbono).

Otro tipo de materiales derivados del carbono y con propiedades electrocatalíticas son los polímeros conductores. Estos materiales se caracterizan por contener cadenas poliméricas de carbono con dobles enlaces conjugados deslocalizados, y que de acuerdo a su estado de oxidación presentan un carácter conductor o aislante. Estos polímeros conductores π -conjugados pueden proceder de heterocíclicos (polipirrol, politiofeno, etc) y miembros de la familia de la polianilina entre otros. Su importancia es debido a las propiedades ópticas y quizás su propiedad más atractiva sea el ser un material electroquímico transportador de carga.

Los polímeros conductores son útiles en diversas aplicaciones como baterías intercaladas de litio, capacitores, dispositivos electrocrómicos, transductores electroquímicos y transistores de efecto campo [89-91]. Existe numerosa bibliografía [92-95] que demuestra que los polímeros conductores pueden relacionarse con los materiales de sílice, al ser esta última una estructura porosa interpenetrante que permite el crecimiento del polímero conductor a través de su red. Con estos antecedentes en nuestro grupo de investigación se desarrollaron electrodos modificados con mejores propiedades electrocatalíticas y capacitivas en comparación con electrodos modificados en ausencia de sílice [96]. De esta manera

combinando las propiedades características de los geles inorgánicos con las propiedades de los polímeros orgánicos es posible solucionar los problemas de estabilidad y adhesión que presentan comúnmente los polímeros π -conjugados frente a otros tipos de soportes.

1.2.3 Biosensores

El interés por el estudio del encapsulamiento o inmovilización de biomoléculas en matrices sol-gel de sílice en la actualidad está expandido en diversos campos de investigación (química, bioquímica, medicina, etc) tal y como lo exponen la infinidad de trabajos, patentes y aplicaciones industriales y analíticas que surgen año tras año.

En general, el término “inmovilizar” hace referencia al acto de limitar o restringir el movimiento, llegando incluso a impedirlo totalmente; aunque aplicado al campo de la biotecnología, esta definición puede provocar un malentendido. Así, cuando se habla de estrategias de inmovilización de biomoléculas, el término no implica que las biomoléculas se encuentren “rígidas”, “estáticas” o como “congeladas”, lo que quizás llevaría a pensar que las propiedades dinámicas, actividad y plasticidad del sistema biológico inmovilizado son limitadas. Dicho término hace referencia a un confinamiento físico o localización específica en una cierta región definida del espacio, lo que de alguna manera va generalmente asociado a la fijación o atrapamiento en un soporte sólido. Idealmente, la inmovilización dota a la

biomolécula de una serie de ventajas, como son una mayor facilidad de manipulación, separación y reutilización y un aumento de su estabilidad, manteniendo por otro lado las propiedades o actividad de interés que presenta en disolución. No obstante, las entidades biológicas son muy sensibles a su entorno y a menudo la inmovilización altera de forma dramática sus propiedades y estabilidad. Además, el sistema híbrido (biomolécula-soporte) debe presentar ciertas características que puedan variar en función de la aplicación final deseada, como la transparencia óptica, conductividad, alta estabilidad térmica, química o mecánica, alta superficie de contacto biomolécula-medio externo, etc. Dado que no existe un método de inmovilización ideal que reúna todas estas características a la vez y que retenga las propiedades de las biomoléculas de manera adecuada, la optimización y desarrollo de sistemas de inmovilización es una disciplina en continua expansión. y es aquí donde el uso de materiales de sílice ha tomado protagonismo en los últimos años por las ventajas que ofrece en inmovilización.

La inmovilización de biomoléculas en matrices de sílice está incluida como método de inmovilización en membranas semipermeables o en matrices poliméricas e hidrogeles. En general este método de atrapamiento se basa en encerrar la biomolécula de interés dentro de una membrana sólida porosa o matriz, generalmente, de naturaleza polimérica. Es uno de los

métodos menos agresivos ya que consiste en una simple retención física o confinamiento en una cavidad, sin que deban mediar interacciones entre el soporte y la biomolécula. No requiere la presencia de grupos funcionales específicos en la biomolécula, como ocurre en la inmovilización covalente, ni se ve limitada por el tamaño relativo de los poros de la matriz con respecto a la biomolécula, como en la inmovilización por adsorción, ya que las matrices generalmente crecen y se forman rodeando a la especie a inmovilizar.

Si bien el primer intento de incorporación de una enzima dentro de una matriz de sílice fue realizado por Dickey en 1955 [97], el experimento resultó ser poco fructífero ya que las enzimas encapsuladas (ureasa y catalasa) presentaban poca actividad durante solo un día. Luego de casi dos décadas, en 1971 Jhonson y Whateley [98] lograron por primera vez la inmovilización de una biomolécula con actividad enzimática dentro de una matriz de sílice. Sin embargo, este aporte científico paso desapercibido posiblemente porque la revista de coloides y ciencia de interfases, donde se publicó, no era muy popular entre los bioquímicos o bioelectroquímicos de la época.

El comienzo de la inmovilización de moléculas coincide con la gran ola de desarrollo de materiales orgánicos-inorgánicos. En la década de los 80, Mosbach y colaboradores lograron inmovilizar levadura en matrices de sol-

gel derivadas de aminopropil-silano [99]. Sin embargo el equipo de Mosbach no evaluó la actividad del bio-híbrido. A finales de los 80 e inicios de los 90 Carturan y sus colaboradores [11, 100] lideraron el campo de la inmovilización de células y encapsularon la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (un hongo unicelular) en matrices sol-gel de sílice. Este microorganismo es conocido como la levadura del panadero o del cervecero y viene a ser el hongo más importante de éstas industrias. Sin embargo el encapsulamiento de levaduras tiene una ventaja sobre las enzimas, proteínas o microorganismos celulares, y es que éstas son utilizadas para transformar el azúcar en alcohol y dióxido de carbono, por lo tanto, éstas naturalmente soportan el alcohol (producto de la hidrólisis y co-solvente) presente durante el proceso de encapsulamiento sol-gel, cualidad que no presentan muchas biomoléculas (enzimas, proteínas o microorganismos celulares) quienes en presencia de alcohol (etanol, metanol) pierden parcialmente o totalmente su actividad enzimática.

Ya en los años 90 fueron Braun y colaboradores [10, 101] quienes realizaron inmovilizaciones de enzimas (como la fosfatasa alcalina) en matrices sol-gel haciendo uso de un precursor de silanos convencional TEOS (tetra-etoxisilano), estas biomoléculas encapsuladas presentaron un 30% de actividad enzimática. El procedimiento de inmovilización que desarrollaron fue rápidamente extendido para anticuerpos y otras

biomoléculas permitiendo el diseño de biosensores [48, 57, 102] y biorreactores [103, 104] basados en la metodología sol-gel, desarrollándose así un campo de investigación en biomateriales.

De todos los estudios realizados se concluyó que el procedimiento de encapsulamiento convencional mediante el proceso sol-gel presentaba condiciones que eran aparentemente perjudiciales (pH extremos y altas concentraciones de alcohol) para la estabilidad de las biomoléculas, obteniéndose generalmente un cristal opaco que contenía la biomolécula desnaturalizada. Con el objetivo de superar estos obstáculos se realizó un refinamiento del proceso de encapsulamiento biomolecular. Una primera mejora fue la preparación de sol de sílice sin adición de alcohol al inicio de la reacción. La segunda mejora estuvo relacionada con el uso de una solución tamponada luego de la hidrólisis ácida del precursor de sílice, antes de la adición de la proteína al medio reactivo. El tampón incrementa el pH a valores biológicamente compatibles previniéndose la desnaturalización por medio ácido y la agregación de las proteínas [102] desarrollándose así monolitos de sílice con biomoléculas distribuidas homogéneamente y con mayor eficiencia enzimática. Una tercera mejora vino a ser la fusión de las mejoras precedentes, fue desarrollada por Ferrer y colaboradores [105], quienes desarrollaron un proceso sol-gel libre de alcohol, este consiste en un proceso de encapsulamiento de dos etapas (ver

Fig. 1.6), en la primera etapa se lleva a cabo la hidrólisis con la formación del sol de sílice del cual se elimina el etanol mediante técnicas físicas (rotavaporización al vacío, calentamiento en vacío, ultrasonidos). En la segunda etapa, el sol-gel de sílice es mezclado con una solución tamponada que contiene la biomolécula de interés (generalmente pH 7). El cambio del pH favorece la gelificación de la sílice y el encapsulamiento de la biomolécula. La ventaja de este método es la reproducibilidad y la rapidez con la que se pueden obtener recubrimientos o monolitos, ya que el tiempo de espera depende de la velocidad con que gelifica la matriz de sílice.

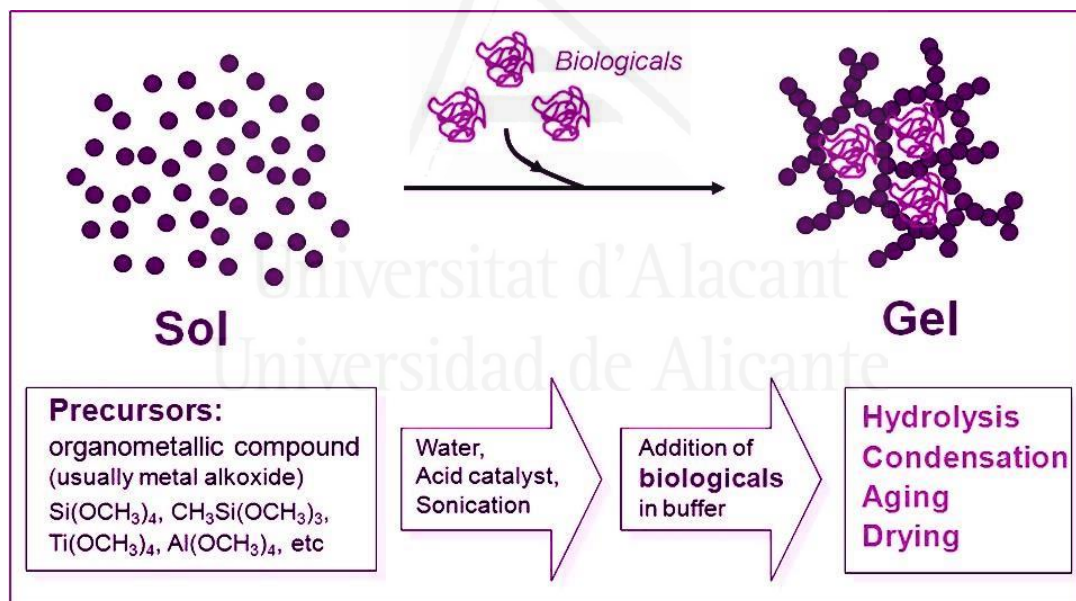


Figura 1.6.- Esquema del procedimiento a seguir para el encapsulamiento de biomoléculas en matrices de sílice.

La evolución del proceso de encapsulamiento estuvo en su mayoría dirigido al desarrollo de sensores ópticos [102], ya que se buscaba

aprovechar la transparencia del gel de sílice y así realizar un seguimiento de los cambios conformacionales de las biomoléculas, y los cambios de concentraciones del sustrato o producto [106].

En la actualidad la bioelectroquímica sol-gel está despertando interés debido a la posibilidad del uso de biosensores electroquímicos para monitoreo en tiempo real, una ventaja que no se tiene con los biosensores fotométricos.

Un biosensor electroquímico contiene, básicamente, tres componentes: un sistema biológico activo, un transductor electroquímico y un sistema de salida. Un dispositivo que muestre alta sensibilidad, buena selectividad y estabilidad a largo plazo requiere una optimización de parámetros : 1) una apropiada inmovilización de la biomolécula evitando pérdida de su actividad y previniendo la desnaturalización (actividad biológica, sensibilidad, y estabilidad); 2) el transporte de carga entre el material electródico y los centros activos de la biomolécula tienen que llevarse a cabo (transducción y sensibilidad); 3) los sobrepotenciales deben de ser minimizados haciendo uso de un mediador para la transferencia de carga apropiado. Con estos requisitos podríamos definir lo que viene a ser un biosensor electroquímico, un dispositivo sensor que consiste en un elemento de reconocimiento biológico en contacto íntimo con un transductor apropiado, el cual es capaz de convertir la reacción de

reconocimiento biológico o el proceso eventual biocatalítico en una señal electrónica medible.

Los biosensores electroquímicos derivados de materiales sol-gel presentan una de las dos de configuraciones reportadas hasta la fecha [107-109]. La primera configuración utiliza la sílice dopada con materiales conductores para crear una biocerámica conductora. Esto es típicamente alcanzado con la dispersión de carbón en polvo o metales en polvo o sus respectivos coloides con las biomoléculas y mediadores (cuando son necesarios) dentro del sol, antes de que ocurra la gelificación. Esta configuración desarrolla biocomposites conductores, rígidos y porosos que pueden ser moldeados en tubos de vidrio para obtener un electrodo en forma de disco. En particular esta configuración es viable para la microfabricación. La segunda configuración implica la formación de películas delgadas mediante spin-coating (recubrimiento por giro) o dip-coating (recubrimiento por inmersión) o simplemente expandiendo el sol que contiene las biomoléculas y los mediadores sobre la superficie de un electrodo convencional. Esta configuración usualmente evita la necesidad de dispersión de un componente conductor y es el biosensor electroquímico más útil y práctico debido a su corto camino de difusión.

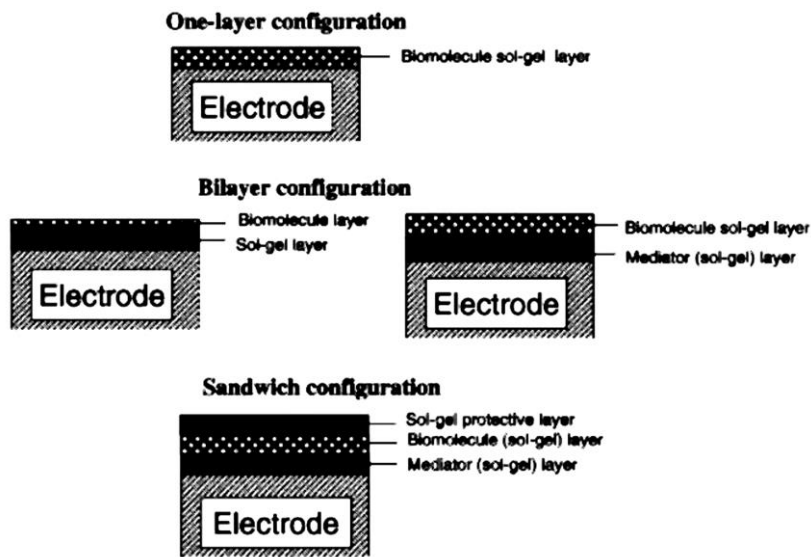


Figura 1.7.- Configuraciones electródicas típicas con películas delgadas de sílice para el desarrollo de biosensores electroquímicos. [107]

La Fig. 1.7 muestra tres de las conformaciones más comunes cuando se hace uso de recubrimientos de películas delgadas en biosensores electroquímicos. En la configuración de una capa, la película delgada dopada con la biomolécula es directamente depositada sobre la superficie del electrodo [110-112]. Para biosensores electroquímicos con mediadores [113], éstos pueden ser encapsulados conjuntamente con las biomoléculas en la película sol-gel o también puede estar presente en disolución. En la configuración de bicapa [114, 115], una capa sol-gel primero es depositada sobre la superficie del electrodo y luego la biomolécula es encajada mediante simple adsorción o en ocasiones por enlace covalente a través de grupos funcionales como tioles o aminas que están presentes en la superficie sol-gel, posteriormente una película sol-gel es depositada como

capa protectora para prevenir lixiviación. En la configuración sándwich [116], la sílice dopada con el mediador es inicialmente depositada sobre la superficie del electrodo. Luego la capa de proteína puede ser formada a partir de una disolución de proteína y ser esparcida o también puede ser una disolución sol que recubrirá la capa del mediador. Finalmente otra capa sol-gel es añadida como capa protectora para evitar la lixiviación y el ataque microbiano.

La mayor ventaja de los biosensores electroquímicos basados en el proceso sol-gel es que no están limitados al uso de silicio como elemento central, ya que las películas no tienen que ser ópticamente transparentes. Por ello, los recubrimientos sol-gel pueden ser fabricados de alúmina, aluminosilicatos, vanadio, titanio para alterar las propiedades ópticas y eléctricas del material [117-120].

Otra ventaja de los electrodos de materiales sol-gel compuestos es que tienden a ser más homogéneos que los electrodos de pasta de carbón, obteniéndose así una transferencia electrónica más homogénea y mejores respuestas de corriente en detecciones amperométricas[107].

En la presente memoria se trabajará con la configuración de una capa que viene a ser la más simple de desarrollar experimentalmente ya que se basa en recubrir al electrodo con el sol de sílice que ya tiene incorporada la

biomolécula de interés, obteniéndose un electrodo listo para las respectivas pruebas electroquímicas.

1.3 Nanotubos de Carbono

Como ya habíamos mencionado previamente, los nanotubos de carbono han sido en los últimos años uno de los materiales de mayor interés en la comunidad electroquímica, y en concreto, los nanotubos de carbono de pared única (SWCNT) han sido los materiales carbonosos con más aplicaciones de interés en la actualidad gracias a sus excepcionales propiedades electrónicas y mecánicas, que los hacen candidatos para el desarrollo de dispositivos electrónicos, ópticos y materiales compuestos [121-125]. Las dimensiones de los nanotubos de carbono son de un átomo de grosor, unas decenas de átomos de circunferencia y, típicamente, varias micras de longitud (Fig. 1.8b) [126-128].

Los nanotubos de carbono de pared única son láminas de grafeno con diferente tipo de enrollamiento y cuyo diámetro oscila entre 0.4 y 2 nm. El enrollamiento puede producirse de varias formas en función de la orientación del llamado vector quiral $\mathbf{C}_h = n\mathbf{a}_1 + m\mathbf{a}_2$, donde \mathbf{a}_1 y \mathbf{a}_2 son los vectores unitarios de la red hexagonal del grafito y el par (n,m) caracteriza el correspondiente CNT (figura 1.8a).

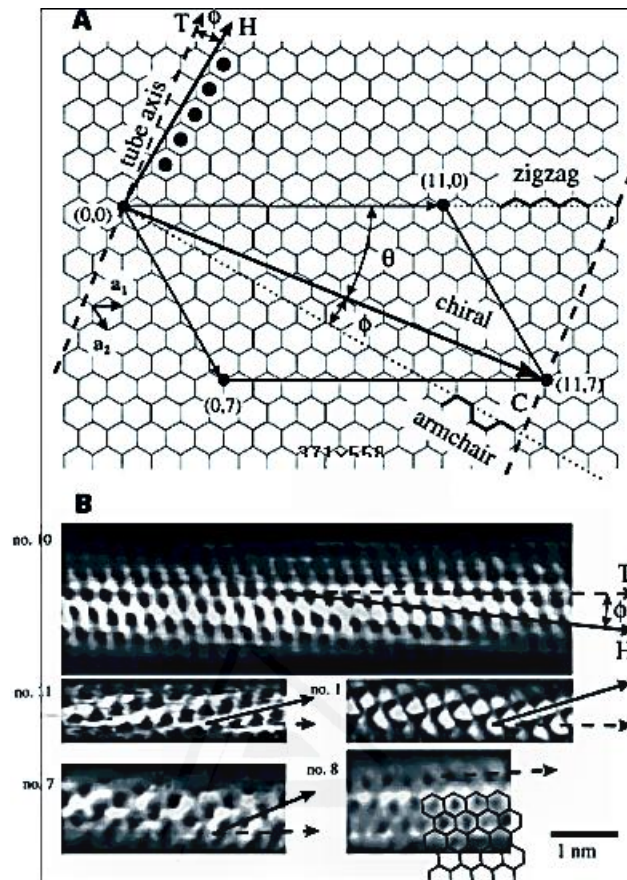


Figura 1.8.- a) Celda unidad del nanotubo (4,2); b) ejemplos de SWCNTs quiral n°: 10, 11, 1, zig-zag n°: 7 y “armchair” n°: 8. En los nanotubos armchair uno de los tres enlaces de cada carbono es perpendicular al eje del nanotubo mientras que en los zigzag es paralelo.

Las tres estructuras básicas de SWCNTs son: zig-zag $(n,0) \equiv \theta=0^\circ$, “armchair” $(n,n) \equiv \theta=30^\circ$, y quirales $(n,m) \equiv 0^\circ < \theta < 30^\circ$, éstas estructuras son mostradas en la figura 1.8b. Los cálculos predicen que los nanotubos tipo *armchair* ($n=m$) tienen bandas que cruzan el nivel de Fermi y son por lo tanto metálicos. Para todos los demás nanotubos (quirales y zig-zag), existen dos posibilidades. Cuando $n-m=3l$ (donde l es un número entero),

se espera que los nanotubos también sean metálicos, en el caso que $n-m \neq 3l$, se predice que los tubos son semiconductores, con una energía de banda prohibida del orden aproximadamente de 0.5eV que depende solo del diámetro del tubo.

Nanotubos de Carbono. Antecedentes

En estudios previos desarrollados por nuestro grupo de investigación se pudo comprobar las adecuadas propiedades electrocatalíticas que ofrecían los electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared única (SWCNT). Estos estudios electroquímicos pusieron de manifiesto que el comportamiento electroquímico de los SWCNT está fuertemente ligado a las propiedades electrónicas y a su química superficial. Haciendo uso de varios sistemas redox (sondas redox) se pudo determinar la reactividad electroquímica de las distintas zonas de los nanotubos: las puntas y las paredes laterales [129].

Los electrodos modificados con nanotubos mostraron una superficie electroactiva superior a los electrodos de carbono vítreo (GC) sin modificar, dando lugar a densidades de corriente más altas (relacionadas con el área geométrica expuesta a la disolución). Del conjunto de sondas redox que se estudiaron, se observó que la presencia de nanotubos

mejoraba la cinética de las reacciones de todos los pares redox estudiados en comparación con el electrodo de GC sin modificar, obteniéndose modificaciones de la constante de velocidad de transferencia heterogénea superiores en 5 órdenes de magnitud, en el mejor de los casos. Sin embargo, en la mayoría de las reacciones estudiadas se observó que menos del 3% de la superficie del electrodo transfiere realmente carga a especies en disolución [129]. Más detalles relacionados a la caracterización de superficies carbonosas mediante el uso de sistemas redox son descritos en técnicas experimentales en el capítulo 2 en la sección 1.2.4.

Debido a la particular morfología de los SWCNT y, en concreto, a su alta relación longitud/diámetro, estos materiales exponen una gran área superficial. Sin embargo, los SWCNT presentan una gran tendencia a sufrir aglomeración formando “ramilletes” (bundles) debido a las interacciones por fuerzas de Van der Waals[130]. Esta tendencia a la aglomeración en “ramilletes” plantea problemas en nanotecnología cuando se desea estudiar las propiedades individuales de cada nanotubo de carbono y, además, problemas de “solubilización” o “suspensión” de los nanotubos en el disolvente de trabajo. Diversas estrategias se han utilizado para obtener dispersiones estables de CNT's en disolución: a) uso de tensioactivos (aniónico, catiónico, no-iónico); b) enrollamiento con polímeros

(wrapping); c) funcionalización química covalente; d) dispersión en ADN, proteínas o almidón.

Aunque es relativamente sencillo obtener suspensiones estables de nanotubos adecuadamente dispersados, la obtención de un electrodo modificado con este tipo de nanosistemas se complica debido a las interacciones de Van der Waals entre las paredes de los nanotubos provocando de nuevo la agregación entre ellos en el estado sólido. De esta forma se pierde gran parte de las extraordinarias propiedades que tienen cuando están aislados lo que, obviamente, perjudica a las propiedades electroquímicas finales del material [130-132].

Por ejemplo, una reducción en la área de transferencia electrónica en electrodos modificados con nanotubos de carbono se podría deber a la formación de ramilletes que se observan fácilmente por microscopia electrónica de barrido (SEM). La Fig 1.9 muestra un electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono de pared única por drop-casting, donde se muestra la presencia de formaciones tubulares correspondientes a agregados de entre 500-2000 nanotubos de carbono.

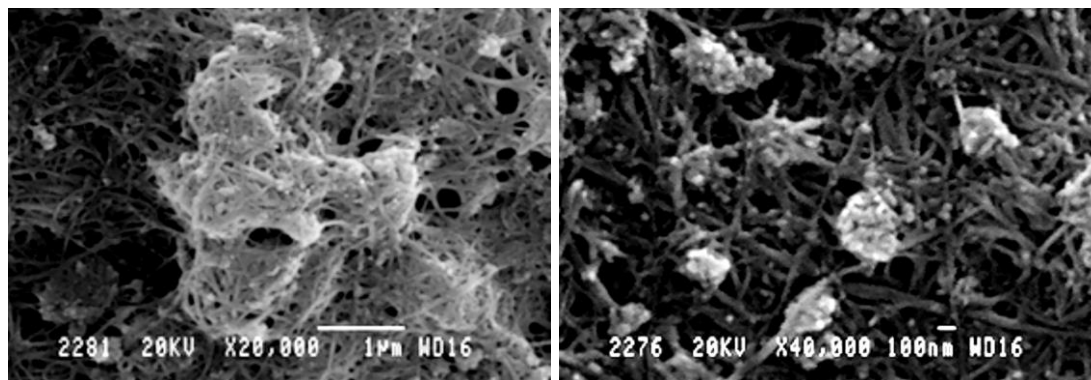


Figura 1.9.- Micrografías SEM de un electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos carbono de pared única (SWCNT) [129].

Ante estos inconvenientes presentados en el desarrollo de electrodos modificados con SWCNT, el capítulo 4 de la presente memoria se estudia la posibilidad de dispersar nanotubos de carbono en estado sólido incorporándolos dentro de matrices sólidas y porosas de sílice sintetizadas por el proceso sol-gel con la síntesis de una capa delgada de sílice que lleva nanotubos de carbono incorporados que es depositada sobre un electrodo soporte de carbono vítreo.

1.4 Polímeros conductores

El término polímero conductor se viene empleando en las últimas tres décadas para denominar a aquellos materiales sintéticos de naturaleza polimérica que presentan la capacidad de conducir la corriente eléctrica. Generalmente se usa este apelativo haciendo referencia de forma exclusiva

a aquellos polímeros en los que la conductividad eléctrica es una propiedad inherente a la naturaleza del material.

Sin embargo, la denominación exacta para este caso concreto es la de polímero conductor intrínseco (*Intrinsically Conducting Polymer*, ICP), por contraposición con los denominados conductores extrínsecos que son aquellos polímeros que adquieren dicha propiedad por adición de un material conductor que sí es conductor de electricidad. La conductividad en este último grupo se rige según el modelo de percolación, es decir, el movimiento de electrones se produce a través de los dominios conductores del material adicionado que forman rutas de conducción en el seno de la matriz polimérica aislante.

Los polímeros conductores se caracterizan por tener sistemas con conjugación extendida. Químicamente son polímeros conjugados y se caracterizan por ser semiconductores en estado nativo, pero su conductividad aumenta en varios órdenes de magnitud cuando se les hace reaccionar con agentes oxidantes o reductores (dopado). Éstos son ampliamente usados en varias aplicaciones debido a su conductividad, propiedades ópticas, y propiedades electrónicas.

Las estructuras moleculares de algunos polímeros conductores son presentadas en la Fig. 1.10 de todos ellos, los polímeros más clásicos en materia de estudio han sido la polianilina (PANI), el polipirrol (PPy), el poliacetileno (PA) y derivados de sus monómeros base [133-141]. Otra clase de polímeros conductores, poseedores de propiedades ópticas y electrónicas modulables únicas son el politiofeno (PT) y el polifenileno (PP) y derivados, que actualmente son atractivos para el desarrollo de dispositivos opto-electrónicos y luminiscentes [142-144].

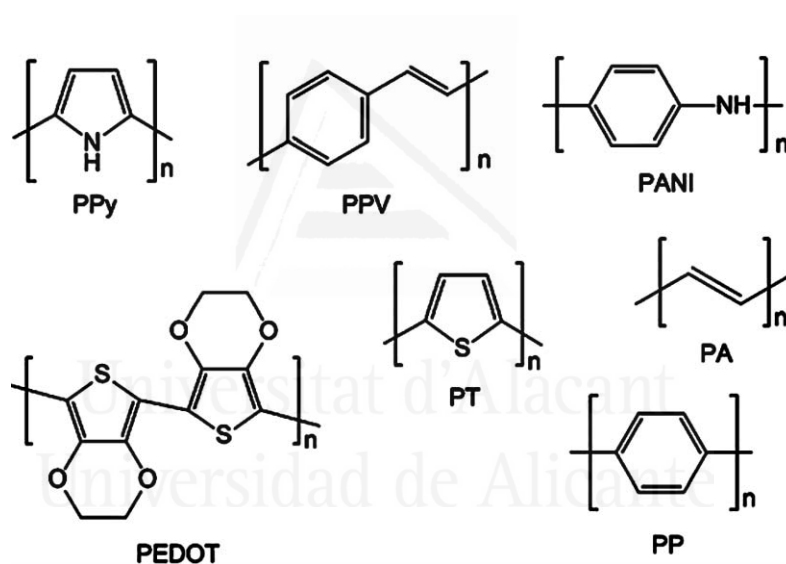


Figura 1.10.-Estructuras moleculares de diversos polímeros conductores

Entre los polímeros considerados habitualmente conductores encontramos también los polímeros redox y los polímeros conductores de iones. En el primer caso, la conducción se debe al salto de electrones entre centros redox que habitualmente se encuentran anclados al esqueleto polimérico. Este tipo de polímeros no posee la capacidad de deslocalizar electrones, por

lo que carecen de la mayor parte de las propiedades que hacen interesantes a los ICP. Por su parte, los polímeros conductores de iones se comportan como electrolitos sólidos, donde el fenómeno de conducción es el resultado de la difusión de iones en el interior de la matriz polimérica.

1.4.1 La Polianilina

La polianilina (PANI) es formalmente una poli-fenilenamina en su estado totalmente reducido. No obstante, una descripción más general del material es posible si se asume la posibilidad de una estructura con anillos oxidados. Los fragmentos fundamentales serían segmentos de 2 unidades: aril-amina y quinona-imina (Fig. 1.11). En el estado completamente oxidado la mitad de los anillos del polímero son de tipo quinonide y se encuentran alternados con anillos aromáticos ($n=0$, 100% de fragmentos tipo quinona-imina).

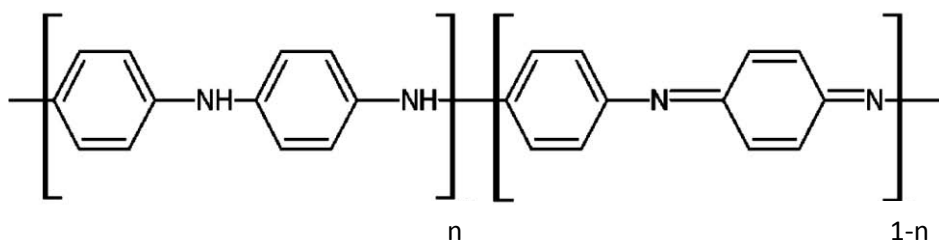


Figura 1.11.- Modelo estructural de la PANI compuesta por fragmentos de tipo aril-amina “n” y fragmentos de tipo quinona-imina “1-n”.

Se trata, sin lugar a dudas, del polímero conductor que mayor interés ha despertado en la comunidad científica debido a la sencillez de su preparación, bajo coste de los reactivos necesarios y buena estabilidad térmica y ambiental de su forma conductora [133, 135, 145].

La polianilina existe en una variedad de formas que difieren en propiedades químicas y físicas. La forma más común es de color verde y se le denomina emeraldina sal, tiene una conductividad similar a la de los semiconductores, del orden de 1 S cm^{-1} , un valor varios órdenes de magnitud superior que los polímeros comunes ($<10^{-9} \text{ S cm}^{-1}$) pero inferior a la conductividad de metales típicos ($>10^4 \text{ S cm}^{-1}$). La PANI (emeraldina sal) protonada se torna no conductora cuando es tratada con hidróxido de amonio presentando un color azul característico (emeraldina base) (Fig. 1.12).

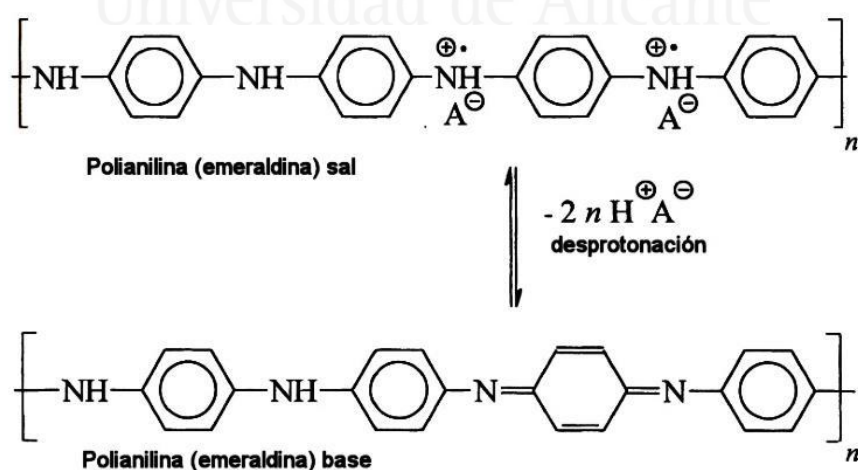


Figura 1.12.- Polianilina (emeraldina) sal es desprotonada en medio alcalino formándose la polianilina (emeraldina) base. A⁻ es un anión arbitrario (ej. Cl⁻)

Métodos de síntesis

La polimerización de la anilina se consigue habitualmente mediante la oxidación química o electroquímica del monómero, preferentemente en medio ácido acuoso aunque también se ha estudiado la polimerización en medios neutro y básico[146].

a) Síntesis química

La denominada síntesis química consiste en adicionar una especie oxidante a una disolución acuosa ácida de anilina, siendo comúnmente empleado el peroxodisulfato amónico ((NH₄)₂S₂O₈) [147]. La cantidad del oxidante suele fijarse estequiométricamente respecto a la del monómero, sin embargo algunas publicaciones indican que añadir el oxidante en defecto minimiza la aparición de defectos por sobre-oxidación del polímero[148]. La temperatura a la que procede la reacción es crucial en las propiedades fisicoquímicas del polímero resultante (peso molecular, grado de linealidad y conductividad), habiéndose comprobado que temperaturas bajas dan lugar a PANI de mayor calidad[149]. Las cadenas de PANI sintetizadas químicamente a 0 °C alcanzan regularmente pesos del orden de 10⁴ a 10⁵ Da [148, 149]. El producto es un polímero insoluble en medio acuoso que debe ser purificado de los restos del oxidante, subproductos y oligómeros solubles.

b) Síntesis electroquímica

La síntesis electroquímica también parte de disoluciones acuosas ácidas del monómero, pero en este caso a temperatura ambiente. La oxidación del monómero y el crecimiento polimérico ocurren en la interfase de un electrodo inerte polarizado anódicamente. De esta forma se obtienen películas poliméricas “limpias y suaves” [150] y con buena adherencia al sustrato [148]. El régimen potenciodinámico (voltametría cíclica) conduce a depósitos homogéneos [151], usando una ventana de potencial típica de 0.0 – 1.0 V vs NHE (*Normal Hydrogen Electrode*, NHE) a velocidades de barrido habituales (50-100 mV/s). La síntesis por salto potencioestático con polarización anódica del electrodo, es una alternativa también usada de manera habitual.

Por último, “algo curioso” al realizar estudios electroquímicos de la polianilina a un pH muy ácido, es que presenta un electrocromismo variado, ya que se observan una variedad de tonalidades a diferentes potenciales. La Fig. 1.13 presenta el voltagrama cíclico de una pastilla de polianilina sintetizada químicamente (las mismas tonalidades se observan para una película de polímero sintetizada electroquímicamente) en una disolución de HCl 1M, en donde se indican las tonalidades obtenidas a

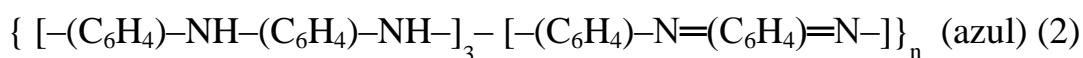
diferentes potenciales. La composición equivalente a cada color con sus nombres clásicos es descrita a continuación:

Leucoemeraldina base (polímero completamente reducido)



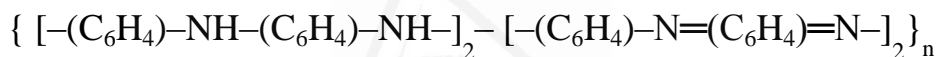
(Su forma protonada: Amarillo pálido)

Protoemeraldina base



(forma protonada: verde claro) (2')

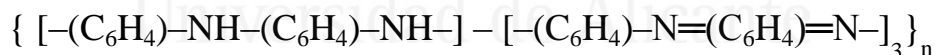
Emeraldina base



(Azul oscuro) (3)

(forma protonada: verde) (3')

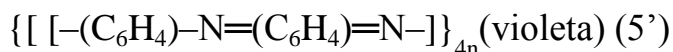
Nigranilina base



(Azul muy oscuro) (4)

(forma protonada: azul) (4')

Pernigranilina (material totalmente oxidado) (5)



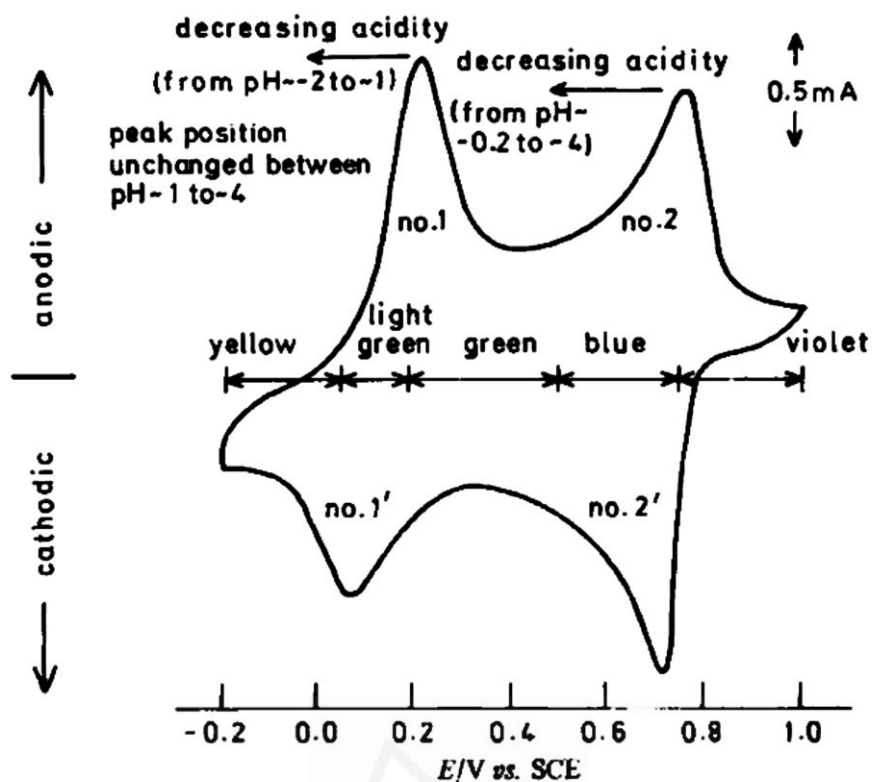
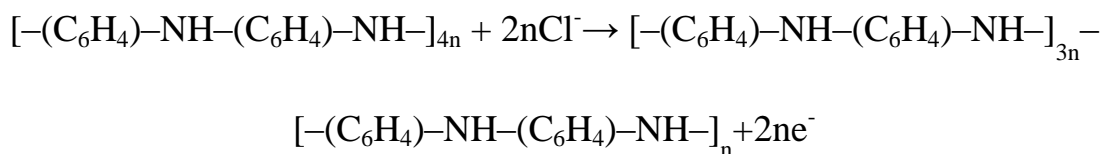
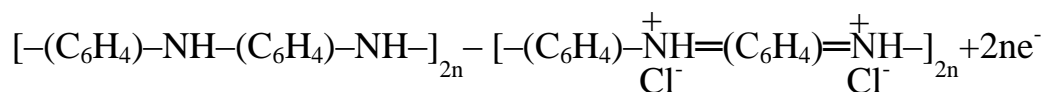
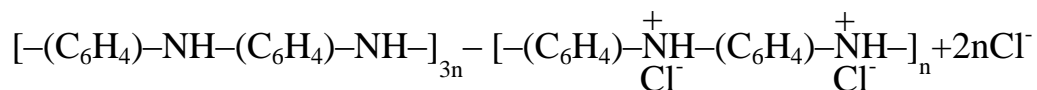


Figura 1.13.- Voltograma cíclico de polianilina sintetizada químicamente en una disolución de HCl 1M. Además se incluye una representación esquemática del cambio del potencial de pico en función del pH del electrolito y las tonalidades de color observadas en distintas etapas de oxidación [150].

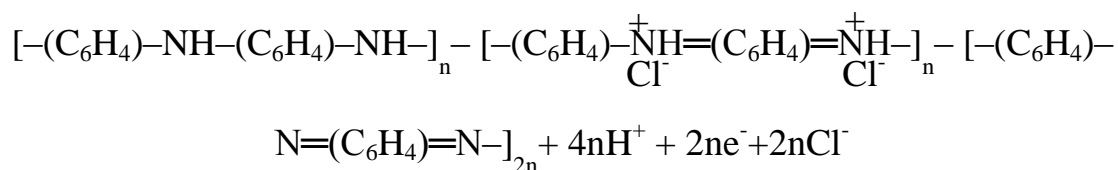
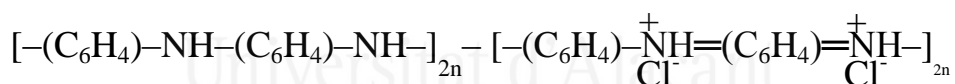
La reacción de asociada a la primera mitad del pico 1 (Fig. 1.13) es independiente del pH, por ello ningún protón está asociado a esta etapa de oxidación. El cambio de color de un amarillo pálido de la leucoemeraldina base (1) a un verde claro de la forma protonada protoemeraldina es producto de la siguiente reacción de oxidación (2^o):



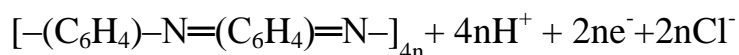
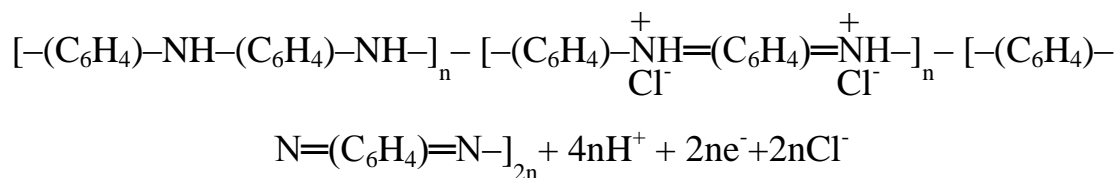
La segunda reacción de oxidación ocurre en la segunda mitad del pico 1 dando lugar a la especie emeraldina protonada (3') con un color verde oscuro característico.



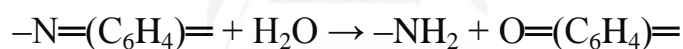
La reacción de asociada a la primera mitad del pico 2 está relacionada a la oxidación de la emeraldina protonada (3') con un color verde oscuro característico a la forma parcialmente protonada nigranilina de color azul (4').



La segunda reacción de oxidación ocurre en la segunda mitad del pico 2 dando lugar a la reacción final de oxidación y desprotonación del producto obteniéndose la pernigranilina (5) de color violeta.



Generalmente se observa una degradación irreversible del pico 2 luego de varios ciclados voltamétricos, especialmente en medios ácidos. Esto se atribuye a la hidrólisis del grupo imina (enlace N-C) en $\text{O}=(\text{C}_6\text{H}_4)=$, especie que se vuelve más abundante a medida que se alcanzan niveles de oxidación más altos en el polímero.



Las reacciones de reducción electroquímica (pico 1' y 2') son el contraproceto de las reacciones anteriormente expuestas.

1.5 El citocromo c como proteína modelo

Una proteína es una macromolécula orgánica que puede estar formada por decenas, cientos o incluso miles de unidades monoméricas: los aminoácidos. Por ejemplo los músculos de los seres vivos están constituidos fundamentalmente por proteínas y agua, pero no solo eso, sino que muchas de las entidades funcionales biológicas son proteínas. Por

ejemplo, la mayoría de las enzimas, los catalizadores biológicos por excelencia, están conformadas en base a proteínas.

Muchas proteínas y enzimas, a parte de la muy conocida hemoglobina, contienen el grupo *hemo* y la mayoría de ellas están relacionadas con el sistema respiratorio celular. Uno ingiere y digiere alimentos y luego los oxida con el oxígeno que se inhala. Este proceso de quemar carbohidratos para extraer su energía (convirtiéndola en ATP) se conoce como respiración celular. Los carbohidratos son oxidados paso a paso y eventualmente los electrones que son extraídos de los compuestos químicos (metabolitos) derivados de los carbohidratos son transportados al oxígeno. El oxígeno gana electrones y es reducido hasta la formación de agua. Este proceso en el cual los electrones son transportados de una especie a otra es llevado a cabo usualmente por las proteínas que contienen hierro (hemoproteínas). En el caso de estas hemoproteínas, es el átomo central de hierro quien se encarga de transportar los electrones cambiando su estado de oxidación. Esto quiere decir que cuando un grupo hemo está en el estado reducido (átomo central de Fe^{2+}) puede dar un electrón a la proteína adyacente en estado oxidado (átomo central de Fe^{3+}). La primera proteína se oxidará a Fe^{3+} y la última se reducirá a Fe^{2+} . El hierro puede realizar este tipo de procesos redox muy fácilmente y, por ello, las proteínas que contienen grupos hemo son frecuentemente usadas en las cadenas

transportadoras de electrones. Generalmente este tipo de proteínas son denominadas citocromos al derivar de las palabras griegas clásicas *κύτος* (célula) y *chróma* (color) porque generalmente son las sustancias de color presentes en las células.

Existen tres clases de citocromos en las mitocondrias, y se distinguen por las diferencias presentes en sus espectros de absorción UV-visible y éstos son designados como citocromos a, b, c. Cada tipo de citocromo en su estado reducido (Fe^{2+}) tiene tres bandas de absorción en el espectro visible. Y esencialmente se distinguen por la banda de longitud de onda más larga que está cerca de los 600 nm en los citocromos del tipo a, cerca de 560 nm en los del tipo b y cerca de 550 nm en los del tipo c. Para distinguir entre citocromos de un tipo estrechamente relacionados, se utiliza en su nombre la absorción máxima exacta, tal como sucede con el citocromo b_{562} .

Los cofactores hemo de los citocromos a y b están unidos muy fuertemente, aunque no de manera covalente, a sus proteínas asociadas; los grupos hemo de los citocromos del tipo c están unidos de forma covalente a través de residuos de la cisteína (Cys) (Fig. 1.14). Al igual que las flavoproteínas, el potencial de reducción estándar del átomo de hierro en el grupo hemo de un citocromo depende de su interacción con las cadenas laterales de la proteína, por lo que es diferente para cada citocromo. Los citocromos del

tipo a y b así como algunos del tipo c son proteínas integrales de la membrana mitocondrial interna. Una excepción sorprendente es el citocromo c de las mitocondrias, que es una proteína soluble que se asocia mediante interacciones electrostáticas con la parte externa de la membrana mitocondrial interna.

El citocromo c es una proteína pequeña de un solo dominio con una estructura tridimensional bien definida [152] como se ilustra en la Fig. 1.14A. El grupo prostético protoporfirina IX está unido covalentemente a los grupos funcionales de la proteína a través de enlaces tioéter con la cisteína 14 (Cys 14) y la cisteína 17 (Cys 17). La sólida arquitectura de la proteína es posible gracias a la red de enlaces puente hidrógeno entre la histidina 18 (His 18) y metionina 80 (Met 80) con el átomo central hemo de hierro (Fig. 1.14A modelo estructural).

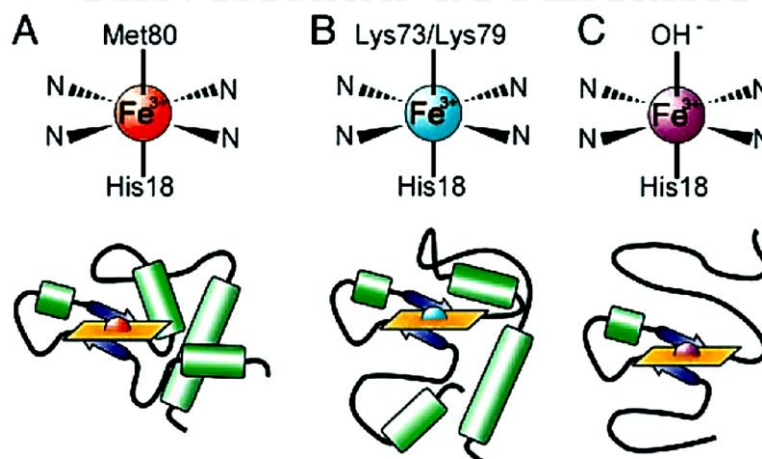


Figura 1.14.- Esquemas del enlace hemo (Parte superior) y modelos estructurales del ferri-citocromo c (parte inferior) en estado nativo (A), en medio alcalino (B), y proteína desnaturizada (C).[153]

En la Fig. 1.14 adicionalmente se esquematiza los cambios conformacionales en la estructura tridimensional que experimenta la proteína a medida que se incrementa el pH en la disolución hasta un completo despliegue (*unfolding*) (Fig. 1.14 C) de la estructura, este cambio conformacional de la estructura compacta inicial puede llevar a una pérdida total de la actividad de la proteína.

Esto último es un dato relevante ya que la actividad biológica de una proteína depende de su estructura específica tri-dimensional, y de los enlaces intramoleculares, especialmente de los puentes de hidrógeno que juegan un rol clave en la conservación de la estructura conformacional. Un aumento o disminución del pH, un incremento de la temperatura, o un aumento de la fuerza iónica de la disolución pueden romper los puentes de hidrógeno y producir que la molécula se despliegue y pierda su forma específica tri-dimensional. En esos casos se dice que la proteína está *desnaturalizada* (hay que tener en cuenta que no se ha dado una descomposición de la molécula, sino tan solo un cambio en su forma).

Una proteína desnaturalizada no puede jugar su rol fisiológico en el organismo debido a que su función depende de sus *sitios activos* en su superficie, que capaces de interactuar con otras moléculas de carga y forma complementarias. El despliegue de la proteína, producto de la ruptura de los enlaces puente hidrógeno, hace que los átomos que participan en los

sitios activos se coloquen demasiado lejos en la cadena primaria, destruyendo su actividad. Un ejemplo se tiene en la hemoglobina, que se vuelve totalmente inactiva (no puede transportar oxígeno) cuando el pH de la sangre es demasiado ácido.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

2. Referencias

1. M. Jacoby, *Chemical & Engineering News*, 90 (2012) 48.
2. L. K. Grunenfelder, N. Suksangpanya, C. Salinas, G. Milliron, N. Yaraghi, S. Herrera, K. Evans-Lutterodt, S. R. Nutt, P. Zavattieri, D. Kisailus, 2014.
3. R. Halai, D. J. Craik, *Nat. Prod. Rep.*, 26 (2009) 526.
4. J. O. Calkins, Y. Umasankar, H. O'Neill, R. P. Ramasamy, *Energy Environ. Sci.*, 6 (2013) 1891.
5. A. Bose, E. J. Gardel, C. Vidoudez, E. A. Parra, P. R. Girguis, *Nat Commun*, 5 (2014).
6. N. Annaluru, H. +. Muller, L. A. Mitchell, S. Ramalingam, G. Stracquadanio, S. M. Richardson, J. S. Dymond, Z. Kuang, L. Z. Scheifele, E. M. Cooper, Y. Cai, K. Zeller, N. Agmon, J. S. Han, M. Hadjithomas, J. Tullman, K. Caravelli, K. Cirelli, Z. Guo, V. London, A. Yeluru, S. Murugan, K. Kandavelou, N. Agier, G. Fischer, K. Yang, J. A. Martin, M. Bilgel, P. Bohutskyi, K. M. Boulier, B. J. Capaldo, J. Chang, K. Charoen, W. J. Choi, P. Deng, J. E. DiCarlo, J. Doong, J. Dunn, J. I. Feinberg, C. Fernandez, C. E. Floria, D. Gladowski, P. Hadidi, I. Ishizuka, J. Jabbari, C. Y. L. Lau, P. A. Lee, S. Li, D. Lin, M. E. Linder, J. Ling, J. Liu, J. Liu, M. London, H. Ma, J. Mao, J. E. McDade, A. McMillan, A. M. Moore, W. C. Oh, Y. Ouyang, R. Patel, M. Paul, L. C. Paulsen, J. Qiu, A. Rhee, M. G. Rubashkin, I. Y. Soh, N. E. Sotuyo, V. Srinivas, A. Suarez, A. Wong, R. Wong, W. R. Xie, Y. Xu, A. T. Yu, R. Koszul, J. S. Bader, J. D. Boeke, S. Chandrasegaran, *Science*, 344 (2014) 55.
7. A. M. Behrens, B. J. Casey, M. J. Sikorski, K. L. Wu, W. Tutak, A. D. Sandler, P. Kofinas, *ACS Macro Lett.*, 3 (2014) 249.
8. J. P. Giraldo, M. P. Landry, S. M. Faltermeier, T. P. McNicholas, N. M. Iverson, A. A. Boghossian, N. F. Reuel, A. J. Hilmer, F. Sen, J. A. Brew, M. S. Strano, *Nat Mater*, 13 (2014) 400.
9. M. Ebelmen, *Ann Chim Phys*, 16 (1846) 129.
10. S. Braun, S. Rappoport, R. Zusman, D. Avnir, M. Ottolenghi, *Materials Letters*, 10 (1990) 1.

11. G. Carturan, R. Camprostrini, S. Dire, V. Scardi, E. De Alteriis, *Journal of molecular catalysis*, 57 (1989) L13-L16.
12. J. Bradbury, *PLoS Biol*, 2 (2004) e306.
13. L. L. Hench, J. K. West, *Chem. Rev.*, 90 (1990) 33.
14. D. H. H. Quon, T. A. Wheat, W. Nesbitt, *Materials Research Bulletin*, 15 (1980) 1533.
15. A. Chemseddine, M. Henry, J. Livage, *Rev. Chim. Miner*, 21 (1984) 487.
16. T. Yoko, K. Kamiya, S. Sakka, *Kagaku*, 54 (1986) 284.
17. L. C. Klein, *Sol-gel technology for thin films, fibers, preforms, electronics, and specialty shapes*, William Andrew Inc., 1988.
18. J. R. Lenhard, R. W. Murray, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 78 (1977) 195.
19. D. C. Bookbinder, M. S. Wrighton, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 5123.
20. M. S. Wrighton, R. G. Austin, A. B. Bocarsly, J. M. Bolts, O. Haas, K. D. Legg, L. Nadjó, M. C. Palazzotto, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 87 (1978) 429.
21. J. Livage, *Solid State Ionics*, 86–88, Part 2 (1996) 935.
22. B. Dunn, G. C. Farrington, B. Katz, *Solid State Ionics*, 70–71, Part 1 (1994) 3.
23. J. P. Zheng, P. J. Cygan, T. R. Jow, *Journal of the Electrochemical Society*, 142 (1995) 2699.
24. E. Mouchon, L. C. Klein, V. Picard, M. Greenblatt, *MRS Online Proceedings Library*, 346 (1994) 189.
25. C. F. S. G. W. Brinker, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press Limited, San Diego, CA 92101, 1990.
26. M. E. Tess, J. A. Cox, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19 (1999) 55.

27. X. Zhang, F. Zheng, L. Ye, P. Xiong, L. Yan, W. Yang, B. Jiang, *RSC Adv.*, 4 (2014) 9838.
28. M. M. Collinson, C. G. Rausch, A. Voigt, *Langmuir*, 13 (1997) 7245.
29. C. Hsueh, M. M. Collinson, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 420 (1997) 243.
30. S. Ikeda, N. Oyama, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 1910.
31. A. Merz, H. Bachmann, *J. Am. Chem. Soc.*, 117 (1995) 901.
32. M. D. Petit-Dominguez, H. Shen, W. R. Heineman, C. J. Seliskar, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 703.
33. Y. Shi, C. J. Seliskar, *Chem. Mater.*, 9 (1997) 821.
34. B. Barroso-Fernandez, M. Theresa Lee-Alvarez, C. J. Seliskar, W. R. Heineman, *Analytica Chimica Acta*, 370 (1998) 221.
35. D. J. Dickson, B. Lassetter, B. Glassy, C. J. Page, A. F. T. Yokochi, R. L. Ely, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 102 (2013) 611.
36. A. R. Howells, P. J. Zambrano, M. M. Collinson, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 5265.
37. M. Ita, Y. Uchida, K. Matsui, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 26 (2003) 479.
38. H. Schmidt, G. Jonschker, S. Goedicke, M. Mennig, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 19 (2000) 39.
39. M. M. Collinson, *Acc. Chem. Res.*, 40 (2007) 777.
40. R. Shacham, D. Avnir, D. Mandler, *Adv. Mater.*, 11 (1999) 384.
41. M. M. Collinson, N. Moore, P. N. Deepa, M. Kanungo, *Langmuir*, 19 (2003) 7669.
42. A. Walcarius, E. Sibottier, M. Etienne, J. Ghanbaja, *Nat Mater*, 6 (2007) 602.
43. O. Lev, Z. Wu, S. Bharathi, V. Glezer, A. Modestov, J. Gun, L. Rabinovich, S. Sampath, *Chem. Mater.*, 9 (1997) 2354.

44. G. Philipp, H. Schmidt, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 63 (1984) 283.
45. D. Avnir, D. Levy, R. Reisfeld, *J. Phys. Chem.*, 88 (1984) 5956.
46. M. Zayat, D. Levy, *J. Mater. Chem.*, 15 (2005) 3769.
47. C. Sanchez, F. Ribot, B. Lebeau, *J. Mater. Chem.*, 9 (1999) 35.
48. D. Avnir, S. Braun, O. Lev, M. Ottolenghi, *Chem. Mater.*, 6 (1994) 1605.
49. D. Avnir, T. Coradin, O. Lev, J. Livage, *J. Mater. Chem.*, 16 (2006) 1013.
50. R. A. Caruso, M. Antonietti, *Chem. Mater.*, 13 (2001) 3272.
51. Q. Chen, G. L. Kenausis, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (1998) 4582.
52. M. M. Collinson, A. R. Howells, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 702.
53. I. Gill, A. Ballesteros, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (1998) 8587.
54. I. Gill, A. Ballesteros, *Trends in Biotechnology*, 18 (2000) 282.
55. O. Lev, M. Tsionsky, L. Rabinovich, V. Glezer, S. Sampath, I. Pankratov, *J. Anal. Chem.*, 67 (1995) 22A.
56. A. Walcarius, *Electroanalysis*, 13 (2001) 701.
57. J. Wang, *Analytica Chimica Acta*, 399 (1999) 21.
58. A. Walcarius, *Electroanalysis*, 10 (1998) 1217.
59. M. Collinson, *Mikrochim Acta*, 129 (1998) 149.
60. J. Wang, P. V. A. Pamidi, V. B. Nascimento, L. Angnes, *Electroanalysis*, 9 (1997) 689.
61. Z. Ji, A. R. Guadalupe, *Electroanalysis*, 11 (1999) 167.
62. E. González, P. Hernández, L. Hernández, *Analytica Chimica Acta*, 228 (1990) 265.
63. M. Chicharro, A. Zapardiel, I. E. Bermejo, J. A. Perez, L. Hernandez, *Analytical letters*, 27 (1994) 1809.

64. Z. Hu, C. J. Seliskar, W. R. Heineman, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 5230.
65. Z. Hu, W. R. Heineman, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 2395.
66. H. Wei, M. M. Collinson, *Analytica Chimica Acta*, 397 (1999) 113.
67. P. R. Teasdale, G. G. Wallace, *Analyst*, 118 (1993) 329.
68. D. Kriz, O. Ramström, K. Mosbach, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 345A.
69. S. Vidyasankar, F. H. Arnold, *Current Opinion in Biotechnology*, 6 (1995) 218.
70. R. Makote, M. M. Collinson, *Chem. Mater.*, 10 (1998) 2440.
71. L. T. Kubota, Y. Gushikem, J. Perez, A. A. Tanaka, *Langmuir*, 11 (1995) 1009.
72. L. T. Kubota, F. Gouvea, A. N. Andrade, B. G. Milagres, G. De Oliveira Neto, *Electrochimica Acta*, 41 (1996) 1465.
73. C. A. Pessôa, Y. Gushikem, L. T. Kubota, *Electroanalysis*, 9 (1997) 800.
74. A. R. de Lucca, A. de S. Santos, A. C. Pereira, L. T. Kubota, *Journal of Colloid and Interface Science*, 254 (2002) 113.
75. P. Wang, X. Wang, X. Jing, G. Zhu, *Analytica Chimica Acta*, 424 (2000) 51.
76. P. Wang, X. Wang, L. Bi, G. Zhu, *Analyst*, 125 (2000) 1291.
77. P. Wang, X. Wang, G. Zhu, *Electroanalysis*, 12 (2000) 1493.
78. M. E. Tess, J. A. Cox, *Electroanalysis*, 10 (1998) 1237.
79. J. A. Cox, S. D. Holmstrom, M. E. Tess, *Talanta*, 52 (2000) 1081.
80. S. D. Holmstrom, J. A. Cox, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 3191.
81. Y. Zhu, S. Murali, W. Cai, X. Li, J. W. Suk, J. R. Potts, R. S. Ruoff, *Adv. Mater.*, 22 (2010) 3906.
82. V. G. Gavalas, R. Andrews, D. Bhattacharyya, L. G. Bachas, *Nano Lett.*, 1 (2001) 719.

83. S. Watcharotone, D. A. Dikin, S. Stankovich, R. Piner, I. Jung, G. H. B. Dommett, G. Evmenenko, S. E. Wu, S. F. Chen, C. P. Liu, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, *Nano Lett.*, 7 (2007) 1888.
84. S. Yang, L. Zhi, K. Tang, X. Feng, J. Maier, K. Müllen, *Adv. Funct. Mater.*, 22 (2012) 3634.
85. B. S. Kim, C. Xu, J. M. Lee, J. H. Lee, K. Son, S. W. Hwang, J. J. Park, D. Whang, *Applied Physics Letters*, 103 (2013) 013101.
86. K. Gong, M. Zhang, Y. Yan, L. Su, L. Mao, S. Xiong, Y. Chen, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 6500.
87. S. Yang, X. Feng, L. Wang, K. Tang, J. Maier, K. Müllen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (2010) 4795.
88. D. Ragupathy, A. I. Gopalan, K. P. Lee, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 143 (2010) 696.
89. J. Heinze, in E. Steckhan (Ed.), *Electrochemistry IV*, Springer Berlin Heidelberg, 1990.
90. J. L. Brédas, R. Silbey, *Conjugated polymers: the novel science and technology of highly conducting and nonlinear optically active materials*, Springer, 1991.
91. A. G. MacDiarmid, *Synthetic Metals*, 125 (2001) 11.
92. T. Q. Nguyen, J. Wu, S. H. Tolbert, B. J. Schwartz, *Adv. Mater.*, 13 (2001) 609.
93. C. Wu, C. Szymanski, J. McNeill, *Langmuir*, 22 (2006) 2956.
94. T. Q. Nguyen, J. Wu, V. Doan, B. J. Schwartz, S. H. Tolbert, *Science*, 288 (2000) 652.
95. B. J. Schwartz, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 54 (2003) 141.
96. F. Montilla, M. A. Cotarelo, E. Morallon, *J. Mater. Chem.*, 19 (2009) 305.
97. F. H. Dickey, *J. Phys. Chem.*, 59 (1955) 695.
98. P. Johnson, T. L. Whateley, *Journal of Colloid and Interface Science*, 37 (1971) 557.

99. C. F. Mandenius, S. Welin, B. Danielsson, I. Lundström, K. Mosbach, *Analytical Biochemistry*, 137 (1984) 106.
100. L. Inama, S. Diré, G. Carturan, A. Cavazza, *Journal of Biotechnology*, 30 (1993) 197.
101. S. Braun, S. Shtelzer, S. Rappoport, D. Avnir, M. Ottolenghi, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 147–148 (1992) 739.
102. B. C. Dave, B. Dunn, J. S. Valentine, J. I. Zink, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1120A.
103. M. Kato, K. Inuzuka, K. Sakai-Kato, T. Toyo'oka, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 1813.
104. N. Nassif, O. Bouvet, M. Noelle Rager, C. Roux, T. Coradin, J. Livage, *Nat Mater*, 1 (2002) 42.
105. M. L. Ferrer, F. del Monte, D. Levy, *Chem. Mater.*, 14 (2002) 3619.
106. L. M. Ellerby, C. R. Nishida, F. Nishida, S. A. Yamanaka, B. Dunn, J. S. Valentine, J. I. Zink, *Science*, 255 (1992) 1113.
107. W. Jin, J. D. Brennan, *Analytica Chimica Acta*, 461 (2002) 1.
108. L. Rabinovich, O. Lev, *Electroanalysis*, 13 (2001) 265.
109. J. Wang, *Analytica Chimica Acta*, 399 (1999) 21.
110. B. Wang, B. Li, Z. Wang, G. Xu, Q. Wang, S. Dong, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 1935.
111. P. C. Pandey, S. Upadhyay, H. C. Pathak, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 60 (1999) 83.
112. A. Kane, I. Iwuoha, R. Smyth, *Analyst*, 123 (1998) 2001.
113. Z. Liu, J. Deng, D. Li, *Analytica Chimica Acta*, 407 (2000) 87.
114. R. Collino, J. I. Therasse, F. d. r. Chaput, J. P. Boilot, Y. Levy, *J Sol-Gel Sci Technol*, 7 (1996) 81.
115. U. Narang, P. N. Prasad, F. V. Bright, K. Ramanathan, N. D. Kumar, B. D. Malhotra, M. N. Kamalasanan, S. Chandra, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 3139.

116. T. M. Park, E. I. Iwuoha, M. R. Smyth, *Electroanalysis*, 9 (1997) 1120.
117. J. Wang, P. V. A. Pamidi, D. S. Park, *Electroanalysis*, 9 (1997) 52.
118. Z. Liu, J. Deng, D. Li, *Analytica Chimica Acta*, 407 (2000) 87.
119. Z. Liu, B. Liu, J. Kong, J. Deng, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4707.
120. X. Xu, J. Zhao, D. Jiang, J. Kong, B. Liu, J. Deng, *Anal Bioanal Chem*, 374 (2002) 1261.
121. K. Balasubramanian, M. Burghard, *Anal Bioanal Chem*, 385 (2006) 452.
122. J. J. Gooding, *Electrochimica Acta*, 50 (2005) 3049.
123. S. N. Kim, J. F. Rusling, F. Papadimitrakopoulos, *Adv. Mater.*, 19 (2007) 3214.
124. P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, J. Riu, F. X. Rius, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29 (2010) 939.
125. J. Manso, M. L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, J. Pingarrón, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 603 (2007) 1.
126. J. W. G. Wilder, L. C. Venema, A. G. Rinzler, R. E. Smalley, C. Dekker, *Nature*, 391 (1998) 59.
127. S. Iijima, *Nature*, 354 (1991) 56.
128. S. Iijima, T. Ichihashi, *Nature*, 363 (1993) 603.
129. D. Salinas-Torres, F. Huerta, F. Montilla, E. Morallón, *Electrochimica Acta*, 56 (2011) 2464.
130. L. Henrard, E. Hernández, P. Bernier, A. Rubio, *Phys. Rev. B*, 60 (1999) R8521-R8524.
131. D. Tasis, N. Tagmatarchis, V. Georgakilas, M. Prato, *Chem. Eur. J.*, 9 (2003) 4000.
132. V. A. Sinani, M. K. Gheith, A. A. Yaroslavov, A. A. Rakhnyanskaya, K. Sun, A. A. Mamedov, J. P. Wicksted, N. A. Kotov, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 3463.

133. N. Gospodinova, L. Terlemezyan, *Progress in Polymer Science*, 23 (1998) 1443.
134. A. Malinauskas, *Synthetic Metals*, 107 (1999) 75.
135. L. Duic', Z. Mandic', S. Kovac', *Electrochimica Acta*, 40 (1995) 1681.
136. C. Jérôme, S. Demoustier-Champagne, R. Legras, R. Jérôme, *Chem. Eur. J.*, 6 (2000) 3089.
137. S. Asavapiriyant, G. K. Chandler, G. A. Gunawardena, D. Pletcher, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 177 (1984) 229.
138. A. J. Heeger, S. Kivelson, J. R. Schrieffer, W.-P. Su, *Rev. Mod. Phys.*, 60 (1988) 781.
139. C. K. Chiang, C. R. Fincher, Y. W. Park, A. J. Heeger, H. Shirakawa, E. J. Louis, S. C. Gau, A. G. MacDiarmid, *Phys. Rev. Lett.*, 39 (1977) 1098.
140. T. Otero, in R. White, J.O. Bockris, B.E. Conway (Eds.), *Modern Aspects of Electrochemistry*, Springer US, 1999.
141. T. F. Otero, M. Bengoechea, *Langmuir*, 15 (1999) 1323.
142. R. Cernini, X. C. Li, G. W. C. Spencer, A. B. Holmes, S. C. Moratti, R. H. Friend, *Synthetic Metals*, 84 (1997) 359.
143. A. Dodabalapur, Z. Bao, A. Makhija, J. G. Laquindanum, V. R. Raju, Y. Feng, H. E. Katz, J. Rogers, *Applied Physics Letters*, 73 (1998) 142.
144. G. Leising, S. Tasch, F. Meghdadi, L. Athouel, G. Froyer, U. Scherf, *Synthetic Metals*, 81 (1996) 185.
145. Z. Mandic', L. Duic', *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 403 (1996) 133.
146. A. Volkov, G. Tourillon, P. C. Lacaze, J. E. Dubois, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 115 (1980) 279.
147. J. Stejskal, R. G. Gilbert, *Pure and applied Chemistry*, 74 (2002) 857.

148. E. M. Genies, A. A. Syed, C. Tsintavis, *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 121 (1985) 181.
149. P. N. Adams, P. J. Laughlin, A. P. Monkman, *Synthetic Metals*, 76 (1996) 157.
150. W. S. Huang, B. D. Humphrey, A. G. MacDiarmid, *J. Chem. Soc. , Faraday Trans. 1*, 82 (1986) 2385.
151. A. Thyssen, A. Hochfeld, R. Kessel, A. Meyer, J. W. Schultze, *Synthetic Metals*, 29 (1989) 357.
152. G. W. Bushnell, G. V. Louie, G. D. Brayer, *Journal of Molecular Biology*, 214 (1990) 585.
153. T. D. Perroud, M. P. Bokoch, R. N. Zare, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (2005) 17570.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Capítulo 2

Técnicas de caracterización y métodos
de preparación.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Técnicas de caracterización y métodos de preparación

En el presente capítulo se describen de manera resumida las principales técnicas de caracterización, métodos de preparación y algunos detalles de los procedimientos experimentales empleados en los siguientes 4 capítulos. Cabe mencionar que cada capítulo incluye su respectivo procedimiento experimental y los materiales y reactivos empleados para cada experiencia.

1. Técnicas y métodos Analíticos

1.1 Técnicas para el análisis de muestras sólidas

1.1.1. Espectroscopía FT-IR

La espectroscopía infrarroja es una de las técnicas que más ha contribuido en la determinación estructural de moléculas orgánicas y de polímeros, debido a su rapidez de muestreo y excelente sensibilidad se ha convertido en una técnica de análisis rutinario en ciencia de materiales. Su variante más extendida ha sido la espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared*, FT-IR),

Ésta técnica se basa en el análisis de la información vibracional contenida en un haz de luz infrarroja tras su interacción con una muestra problema. Los espectros resultantes representan la intensidad (I) de la radiación transmitida (I/I_0 , transmitancia) o absorbida ($-\log(I/I_0)$, absorbancia) por la muestra frente al número de onda, o número de ciclos por unidad de longitud, ν en cm^{-1} , que es una magnitud proporcional a la frecuencia y, por tanto, a la energía de la radiación.

Los enlaces entre los átomos que conforman las moléculas discretas y las macromoléculas presentan energías características para la excitación de sus distintos modos vibracionales, los cuales quedan en el intervalo de energías de la radiación infrarroja, típicamente 4000 a 400 cm^{-1} (0.50 a 0.05 eV). Dichas energías dependen de la naturaleza de los átomos directamente enlazados, del orden del enlace, del tipo de vibración (tensión simétrica/antisimétrica, ν -flexión/deformación en el plano y fuera del plano) y en menor medida de efectos electrónicos del entorno molecular o del medio que lo rodea. A la frecuencia característica para excitar uno de los modos vibracionales de un determinado enlace o grupo funcional presente en la muestra, el espectro de infrarrojo presentará un pico en el espectro de transmisión, correspondiente a la absorción de radiación que ha tenido lugar. La intensidad de este pico depende de la concentración del

grupo responsable, así como de un parámetro cuántico que describe la eficiencia con que se da la absorción.

El impulso definitivo a la espectroscopía infrarroja puede atribuirse a la aparición de los aparatos de FT-IR. Estos espectrofotómetros están provistos de un dispositivo denominado interferómetro de Michelson que permite obtener de forma instantánea el espectro IR completo, mediante el tratamiento matemático de las señales previamente interferidas mediante la transformada de Fourier. Los espectrofotómetros FT-IR permiten obtener buenas relaciones señal-ruido mediante el acumulado de varios espectros consecutivos en tiempos de operación inferiores al minuto.

La configuración de transmisión es la más extendida para muestras sólidas pulverulentas. En esta configuración la muestra (previamente secada en vacío) es molida junto con un gran exceso de bromuro potásico anhidro KBr (500:1) y se coloca en un molde de acero formador de pastillas aplicando una fuerza de 10 Tn (~75 MPa) durante 10 minutos. La pastilla obtenida se interpone en la trayectoria de paso del haz de infrarrojo en su camino hacia el detector, dentro de una cámara purgada de manera continua con aire libre de humedad y CO₂, que son los interferentes comunes en este tipo de experiencias. Obviamente con el fin de mejorar la

calidad del espectro obtenido se le subtrae un espectro adquirido en ausencia de la muestra.

El equipo utilizado en la caracterización de materiales de sílice fue un espectrofotómetro *Nicolet 5700* con detector sulfato de triglicina deuterada, (*deuterated triglicine sulfate*, DTGS). Cada espectro se obtuvo mediante la acumulación de 100 interferogramas, con una resolución de 8 cm^{-1} .

1.1.2. Espectroscopía Raman

En general, un espectro Raman es interpretado como un espectro vibracional que ofrece información muy similar al espectro de infrarrojo. Sin embargo, las vibraciones que son observadas en un espectro Raman no son siempre las mismas que las de un espectro de infrarrojo, ya que las reglas de selección de esta espectroscopía son distintas. Para que un modo vibracional sea activo en espectroscopía Raman es necesario que se produzcan cambios en la polarizabilidad del enlace o la molécula considerada, lo que conlleva la producción de un momento dipolar inducido.

Cuando una radiación monocromática pasa a través de un medio transparente la mayor parte de ella es transmitida, algo de la radiación es absorbida y una pequeñísima parte es dispersada (scattering). El efecto Raman se define como un fenómeno de dispersión inelástica de la luz por

la materia, el cual está relacionado con la vibración de los átomos que la componen.[1]

Durante la dispersión, 1) un electrón es excitado por la absorción de un fotón desde la banda de valencia a una banda de transición denominada banda virtual 2) el electrón excitado es dispersado emitiendo (o absorbiendo) fonones, y 3) el electrón se relaja hasta la banda de valencia emitiendo un fotón. Si bien la dispersión Raman puede ocurrir por emisión o por absorción de fonones, siendo estos dos procesos denominados proceso Stokes y proceso anti-Stokes, respectivamente, la dispersión Raman está referida a la dispersión inelástica de la luz, y no sólo los fonones sino cualquier excitación elemental (como plasmones, etc) puede estar involucrada en un proceso de dispersión donde la excitación elemental satisface la conservación de energía-momento en el proceso de dispersión.[2]

Los análisis mediante espectroscopía Raman fueron realizados con un equipo modelo FT-Raman Bruker RFS/100 usando un dispositivo de emisión laser de estado sólido **Nd-YAG** (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*), cuya emisión característica posee una longitud de onda de 1064 nanómetros, es decir, emite en el infrarrojo.

Espectroscopía Raman y Nanotubos de carbono de pared única (SWCNT).

Los nanotubos de carbono además de presentar vibraciones en IR, también presentan vibraciones activas en Raman, las cuales se asocian con las diferentes configuraciones según el enrollamiento de los nanotubos respecto al vector quiral. Al igual que los espectros FT-IR ordinarios de materiales carbonosos, los espectros Raman típicos de los SWCNT están dominados por vibraciones parásitas de grupos funcionales oxigenados asociados a defectos, como son las vibraciones C=O y C-O-C. Las vibraciones activas en espectroscopía IR son difíciles de detectar, ya que los SWCNT no muestran momento dipolar estático, por lo que se han hecho pocos estudios mediante esta técnica. Por el contrario, la espectroscopía Raman se ha convertido en una técnica muy común para la caracterización de éstos alótropos de carbono, ya que las transiciones ópticas permitidas entre las singularidades de van Hove y/o las transiciones excitónicas causan un aumento de la dispersión. La intensidad de la dispersión puede ser expresada mediante la siguiente relación:

$$I \cong |(E_L - \Delta E_{ii} - i\gamma)(E_L - \Delta E_{ii} - \Delta E_{ph} - i\gamma)|^{-2}$$

Siendo E_L la energía del láser, ΔE_{ii} la transición óptica, ΔE_{ph} la energía del fonón y γ constante de amortiguación (damping). El aumento típico es de 2-4 órdenes de magnitud. El scattering en SWCNT es muy selectivo, los cuales resuenan con una particular transición óptica.

El espectro Raman de los SWCNT es muy característico y ha sido estudiado detalladamente [2], éste presenta características similares al espectro Raman del grafito, como la banda espectral G que se encuentra alrededor de 1580cm^{-1} (ver Fig. 2.1)

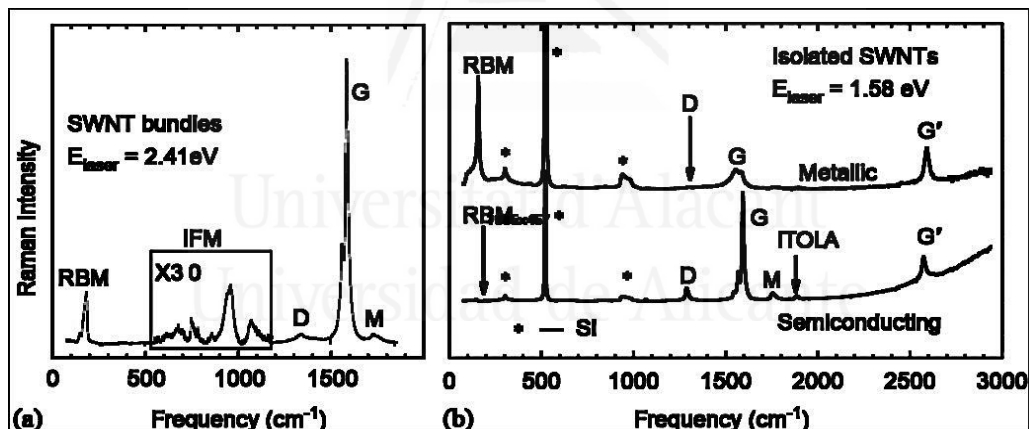


Figura 2.1.- a) Espectro Raman de SCWNT aglomerados (bundles), b) Espectro Raman de SWCNT metálico (arriba) y semiconductor (abajo), el espectro muestra los modos de vibración característicos RBM, banda D, banda G, y banda G' [2].

Los estudios realizados demuestran que la frecuencia de la banda G (ω_G) puede ser utilizada para: (1) la determinación del diámetro del nanotubo, (2) la distinción entre nanotubo metálico y nanotubo semiconductor

(diferencias espectrales bien definidas) y 3) para probar la transferencia de carga de SWCNT dopados. Se estima que la frecuencia donde aparece la banda G viene dada por la siguiente relación:

$$\omega_G = \omega_o + \frac{\beta}{d^n}$$

Donde d^n =diámetro del nanotubo, $n=2$ (según datos bibliograficos) [2], $\omega_o = 1591 \text{ cm}^{-1}$, y β será -45.7 nm^{-1} ó -79.5 nm^{-1} para nanotubos semiconductores o metálicos, respectivamente. Pudiéndose así obtener el diámetro del nanotubo en análisis.

Adicionalmente en la Fig. 2.1 se observan a bajas frecuencias modos de vibración únicos, que son denominados como los modos de respiración radial (*Radial Breathing Mode*, RBM), éstos solo aparecen en nanotubos de carbono de pared simple. Por lo tanto, si un espectro Raman de una muestra analizada presenta estos modos de vibración característicos nos indicaría que la muestra contiene SWCNTs. El modo de vibración radial es un fonón de estiramiento-enlace fuera del plano, donde todos los átomos de carbono se mueven coherentemente en la dirección radial, “como si el nanotubo estuviera respirando”, y cuyas frecuencias (ω_{RBM}) están alrededor de $100\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$ [2].

Por ello la región de bajas frecuencias del espectro Raman es frecuentemente usada como medida relativa de la variedad de nanotubos presentes en la muestra. La frecuencia ω_{RBM} varia con el diámetro (d) del tubo según: $\omega_{\text{RBM}} = A/d + B$ (donde A es una constante de proporcionalidad y B está relacionado a la amortiguación proporcionada por el medio). Para ramilletes de nanotubos con un diámetro $d=1.5 \pm 0.2$ nm se ha encontrado que $A= 234 \text{ nm cm}^{-1}$ y $B=10\text{cm}^{-1}$. Para SWCNT aislados sobre un sustrato de Si, $A= 248.\text{nm cm}^{-1}$ y $B=0 \text{ cm}^{-1}$. En el caso de nanotubos con diámetros superiores a 2nm la intensidad de los picos RBM es débil y difícilmente observable. [2, 3]

Además de los modos de vibración de primer orden (G y RBM), un espectro Raman de nanotubos de carbono puede presentar modos de vibración de segundo orden que son relativamente intensos (ver figura 2.1), las bandas más estudiadas son las D y G'. La banda D es tradicionalmente asignada a los defectos y hoy en día es interpretada en términos de la teoría de doble resonancia [4]. Mientras que la banda G' se relaciona con un sobretono de la banda D (en ocasiones es denominada *D*-band*).

1.1.3. Análisis Termogravimétrico (TGA)

La termogravimetría (*Thermo-Gravimetric Analysis*, TGA) es una técnica sencilla basada en la medida de la variación de la masa de una muestra cuando se le aplica un programa de temperatura en una atmósfera controlada. Generalmente durante el calentamiento de la muestra, ésta suele experimentar un descenso de la masa debido a la deshidratación, la desorción de grupos funcionales que evolucionan para formar gases, o la combustión del material másico si este es de naturaleza carbonosa y la atmósfera contiene O₂. En presencia de O₂ también pueden registrarse ganancias de masa por formación de óxidos a partir de materiales en estado reducido.

El perfil de la gravimetría da información poco específica sobre el material, no obstante, informa con precisión sobre su estabilidad frente al tratamiento térmico en unas determinadas condiciones. Es útil, no obstante, para determinar la presencia de humedad y agua de hidratación en las muestras, ya que su desorción suele ocurrir en el intervalo de temperaturas más bajo antes de que comience su descomposición. El acoplamiento a un espectrómetro de masas (TGA-MS) es una de las estrategias más habituales para explotar el potencial de especiación de la termogravimetría y ha encontrado gran aplicación en el estudio de carbones activos entre otros materiales. En el caso de materiales susceptibles de ser consumidos

mediante combustión en atmósfera de O₂, el TGA permite estimar el contenido en componentes inorgánicos de la muestra, convirtiéndose en una valiosa técnica cuantitativa. Es por ello que su aplicación es rutinaria en la determinación del porcentaje másico en catalizadores formados por una fase inorgánica soportada sobre una base carbonosa o polimérica.

Los análisis de TGA de las distintas muestras de sílice fueron realizados empleando un equipo TG-DTA de METTLER TOLEDO modelo TGA/SDTA851/1600/LG. La atmósfera elegida para lograr la combustión de los soportes está compuesta por una mezcla al 10% de O₂ en He, empleando una rampa de calentamiento de 10 °C/min desde temperatura ambiente hasta 800 °C.

1.1.4. Adsorción física de gases

Cuando un gas o vapor entra en contacto con la superficie de un material sólido, parte de sus moléculas son atraídas y se asocian a dicha superficie, recubriéndola en forma de capas moleculares[5]. Este fenómeno se debe a que las fuerzas de cohesión en la superficie del sólido no están compensadas, ya que, los átomos superficiales no están enlazados al mismo número de átomos que un átomo ubicado en el interior del sólido. A este

fenómeno se le denomina adsorción[6], al sólido, adsorbente y al gas, adsorbato (si no está adsorbido) o adsorativo si se encuentra adsorbido.

La adsorción se puede dividir en dos grupos, adsorción por fisisorción o adsorción por quimisorción. En el caso de la fisisorción (adsorción física), ésta presenta interacciones adsorbente-adsorbato débiles ($Q_{ads} < 40$ kJ/mol), son del tipo van der Waals, pudiéndose adsorber en forma de multicapa y se encuentra favorecida a temperaturas bajas. En cambio, para que se produzca la quimisorción, deben de producirse enlaces químicos ($Q_{ads} > 40$ kJ/mol) con al formación sólo de una monocapa.

El objetivo de caracterización de un sólido (adsorbente) mediante esta técnica es determinar su área superficial y el tipo de poros que presenta. La IUPAC ha propuesto una clasificación de porosidad en función del tamaño del poro basándose en el mecanismo de adsorción de los mismos [7]:

- Macroporos: un tamaño de poro superior a 50nm (0.05 μ m).
- Mesoporos: un tamaño de poro entre 2nm y 50nm.
- Microporos: un tamaño de poro inferior a 2nm.
- Supermicroporos: un tamaño de poro entre 0.7 nm y 2nm.
- Ultramicroporo: un tamaño de poro inferior a 0.7nm.

De forma general, en un sólido poroso, los macroporos actúan como poros de transporte , permitiendo que las moléculas del adsorativo alcancen los

poros más pequeños situados en el interior del sólido poroso. Los mesoporos actúan como unión entre macroporos y microporos, produciéndose la condensación capilar. Los microporos constituyen la mayor parte de la porosidad interna del sólido poroso y debido a su tamaño, se llenan a presiones relativas del adsorbato bajas.

Para el estudio de la porosidad en muestras de sílice se empleó la adsorción de N_2 a $-196^\circ C$ y CO_2 a $0^\circ C$ [8]. Sin embargo la adsorción de N_2 presenta limitaciones para la determinación de la porosidad estrecha (alrededor de 0.4nm). Sin embargo, la adsorción de CO_2 en la porosidad estrecha ocurre más rápidamente. Por lo tanto podemos decir que la adsorción de CO_2 es un complemento a la adsorción de N_2 para la determinación de la porosidad estrecha (tamaño menor de 0.7nm)[9].

A partir de la adsorción física de gases se obtiene de forma gráfica lo que se conoce como isoterma de adsorción, que consiste en la representación de la cantidad adsorbida de un gas por un sólido en función de la presión de equilibrio a temperatura constante. En bibliografía [10, 11] existen varios modelos que se pueden utilizar para interpretar los datos de las isotermas de adsorción y extraer información acerca de la textura porosa del sólido, como el área superficial específica, el volumen de porosidad o la distribución del tamaño de poros. Para la determinación de estos

parámetros se han empleado la teoría Brunauer-Emmett-Teller (B.E.T) y la teoría de Dubinin-Radushkevich (DR).

El equipo de adsorción volumétrica utilizado para la realización de las isothermas de N₂ y CO₂ ha sido un Autosorb 6. Previamente la matriz de sílice fue desgasificada a 150°C durante 4 horas mediante una bomba de vacío con el fin de eliminar las impurezas adsorbidas por la muestra.

1.2. Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas permiten el análisis de los procesos que ocurren en la superficie de un electrodo (electrodo de trabajo o *working electrode*, WE) sumergido en un electrolito. La información fundamental de esta técnica viene dada por la cantidad de corriente eléctrica (i) que pasa a través del electrodo como respuesta a un estímulo, en una determinada escala de tiempo.

El estímulo al que se hace referencia es una diferencia de potencial (ΔE) aplicada respecto a otro electrodo (electrodo no polarizable, electrodo de referencia o *reference electrode*, RE). La corriente medida sobre el electrodo tiene un doble origen, ya que puede proceder tanto de i) la migración de iones para compensar cargas fijas en la superficie del electrodo (fenómenos capacitivos), o de ii) moléculas que experimentan

una reacción de oxidación-reducción como resultado del potencial electroquímico aplicado (fenómenos farádicos).

1.2.1. Celda electroquímica de tres electrodos

Las medidas electroquímicas requieren el uso de dos electrodos auxiliares además del electrodo que se desea caracterizar. Estos son cuidadosamente seleccionados para alcanzar unas condiciones óptimas de análisis:

- Para que circule corriente es necesario un segundo electrodo sumergido en la disolución (contra-electrodo o *counter electrode*, CE). Sobre él tiene lugar una reacción complementaria a las del WE que cierra el tránsito de cargas a través del sistema. Generalmente se trata de un material inerte cuya reactividad electroquímica no implique la disolución de iones metálicos, siendo el Pt, el Au y los materiales carbonosos inertes candidatos comunes para realizar esta función.

- Para un adecuado control del potencial aplicado sobre el WE es necesario un tercer electrodo (electrodo de referencia, RE). Si bien es cierto que para aplicar una diferencia de potencial solo es necesaria la presencia de dos electrodos en una disolución, el control sobre el potencial electroquímico experimentado por un electrodo en concreto (WE) solo puede establecerse con precisión cuando sobre el segundo electrodo (RE) no circula una corriente.

Entre los electrodos de referencia más comunes se encuentran los electrodos de referencia de $H_2(g)$ en el cual se burbujea H_2 sobre un electrodo de Pt sumergido en una disolución con electrolito soporte (*Normal Hydrogen Electrode*, NHE, para $pH=0$ y *Reversible Hydrogen Electrode*, RHE para pH igual al de la disolución de trabajo); los electrodos de segunda especie como el Ag/AgCl y el de calomelanos (Hg/Hg_2Cl_2) generalmente sumergidos en disoluciones concentradas de NaCl o KCl; y por último los electrodos denominados *pseudo*-referencias por tener un potencial sensible a las condiciones de trabajo, siendo el más típico un hilo de Ag el cual es sumergido directamente en el electrolito de trabajo.

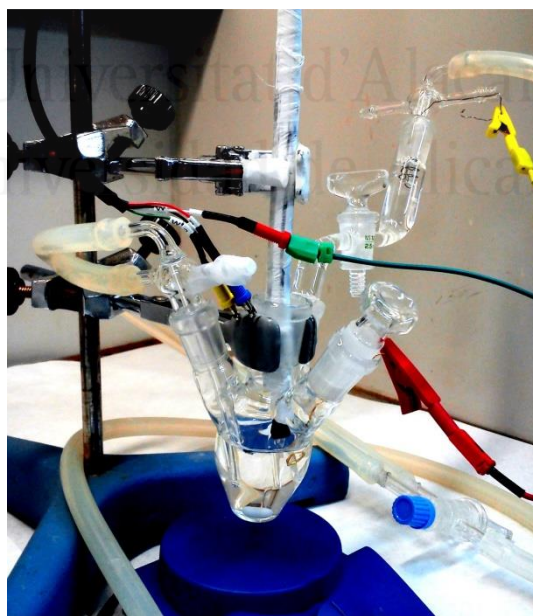


Figura 2.2. Celda electroquímica de 3 electrodos, compuesta por un electrodo de trabajo WE (boca central), un electrodo de referencia de hidrógeno ubicado en un capilar de Luggin, un contra-electrodo de oro sumergido en disolución, y un pasador de gases (boca izquierda).

Como se puede observar en la figura 2.2 además de los tres electrodos ya descritos se hace uso de un pasador de gases con el objetivo de eliminar oxígeno disuelto en disolución mediante purga de N_2 (g). Esto suele realizarse a través de un burbujeo constante durante al menos 10 minutos antes de comenzar el experimento, y a continuación se pasa a mantener purgado el ambiente interno de la celda con N_2 , con el objetivo de mantener una atmósfera inerte durante las medidas electroquímicas.

Otro accesorio habitual es el capilar Luggin provisto de una llave que permite mantener al electrodo de referencia en un pequeño compartimento saturado de H_2 (g) y ajeno a posibles cambios en la composición de la disolución. El uso de un hilo de Pt como parte del sistema referencia aconseja llenar el Luggin con una disolución que sólo contenga el electrolito soporte y quede libre de cualquier especie que pueda reaccionar sobre la superficie del metal. Este accesorio es prescindible en caso de emplearse electrodos de Ag/AgCl, calomelanos o pseudoreferencias.

Los electrodos auxiliares comúnmente empleados en la presente memoria son:

-contra-electrodo, CE: hilo de Pt.

-electrodo de referencia, RE: RHE ($E = -0.059 \cdot pH$ Vs NHE) o pseudo-referencia de Ag para casos específicos.

1.2.2.- Dispositivos electrónicos para estudios electroquímicos

Además de los electrodos, se necesita un dispositivo electrónico que permita fijar el potencial entre el WE y el RE, a la vez que mide la corriente entre WE y CE. Para explotar todas las posibilidades de la electroquímica es necesario que estos dispositivos sean capaces de generar programas de potencial complejos tales como: barridos de potencial a distintas velocidades, saltos sencillos o múltiples entre distintos valores de potencial, programas cíclicos, etc. Es por ello que un sistema electroquímico completo implica además de la célula los siguientes componentes:

- Un potencióstato.
- Un dispositivo generador de señales (programable), que indica al potencióstato el potencial que debe establecer en cada instante.
- Un registrador que digitalice de la señal de corriente circulada como función de la variable potencial/tiempo.

Estos componentes se conectan tal como se muestra en la Fig. 2.3

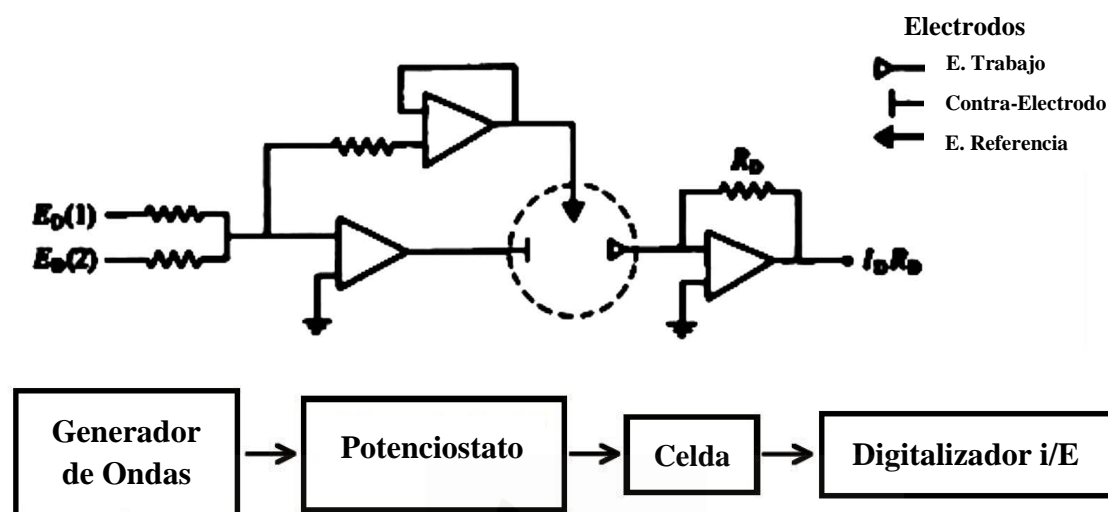


Figura 2.3. Zona superior, esquema de un potenciostato conectado a una celda electroquímica, zona inferior diagrama representativo de un sistema electroquímico completo.

En la presente memoria los equipos usados fueron un generador de señales EG&G Parc (*Princeton Applied Research*) Mod. 175, un potenciostato eDAQ EA161 y registrador digital eDAQ ED401 controlados por el software eDAQ EChart.

1.2.3. Voltametría cíclica

La voltametría cíclica es una de las técnicas electroquímicas más empleadas por su sencillez operacional y la cantidad de información que puede obtener con un simple voltagrama. Se trata de un método potenciodinámico en que el potencial aplicado sobre el electrodo de trabajo

es variado a velocidad constante entre dos valores límite de potencial de forma cíclica. El perfil potencial-tiempo de un ciclo es de tipo triangular (Fig. 2.4), en el que el vértice es el límite superior de potencial y la pendiente de los lados la velocidad de barrido.

La respuesta típica de un proceso farádico de una especie O en disolución se muestra en la Fig. 2.4. La corriente aumenta a medida que lo hace el sobre-potencial aplicado ($E-E_0$), hasta que se alcanza el máximo gradiente de concentración para la especie reactiva, O , que es el que determina la velocidad a la que difunden las moléculas hacia la superficie. En el máximo de corriente, la concentración de la especie reactiva en la superficie desciende a cero, mientras que el gradiente comienza a disminuir por empobrecimiento del entorno del electrodo en dicha especie. En el barrido catódico el entorno del electrodo se ha enriquecido en la especie R , la reducción de esta especie produce la corriente negativa observada en el voltagrama.

Una particularidad de la voltametría cíclica es que cualquier disolución preparada a partir de O o de R , siempre registrará los picos correspondientes a las dos especies, debido a que durante el barrido (catódico o anódico) se generan en las inmediaciones del electrodo la especie que originalmente estaba ausente.

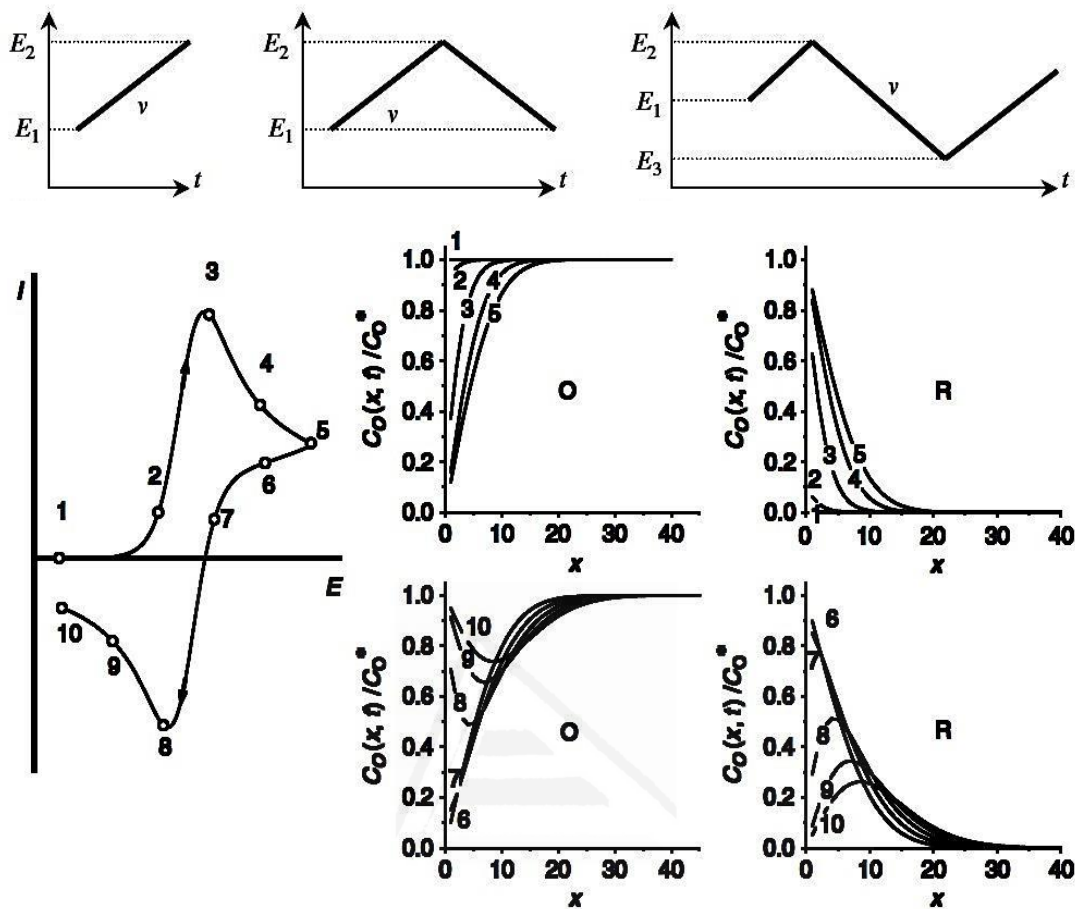


Figura 2.4. Zona superior, diagramas potencial-tiempo a distintas condiciones de potencial de inicio, potencial máximo y potencial infimo. Zona inferior izquierda, voltagrama típico de una especie redox en disolución, derecha perfiles de gradiente de concentración en un punto específico de potencial. [12]

Por lo general, cuando las especies están adsorbidas sobre la superficie del electrodo el pico registrado es simétrico y no presenta cola difusional, además que su máximo coincide en los dos sentidos del barrido, al no tener influencia el control difusional (procesos de superficie).

A parte de los procesos farádicos descritos se deben tener en cuenta los procesos de origen capacitivo, que dan lugar a una corriente base de signo positivo en el barrido anódico (hacia potenciales más positivos) y una corriente base negativa en el barrido catódico (hacia potenciales más negativos), como resultado de la migración de iones para compensar la creciente densidad de carga de la superficie del electrodo. A esta contribución "de fondo" se le denomina comúnmente "doble capa capacitiva" y su magnitud en coulombios (carga encerrada) está relacionada con el área activa real del electrodo. Luego, a la hora de estimar la corriente de pico relacionada a un proceso farádico será necesario trazar una línea base para la sustracción de la corriente de fondo relacionada con esta doble capa capacitiva.

1.2.4 Caracterización superficial electrodoica haciendo uso de la voltametría cíclica y sondas redox específicas.

La reactividad electroquímica de las distintas zonas superficiales de especies derivadas en electrodos carbonosos puede ser determinada (zonas oxidadas, planos basales) a partir del voltagrama cíclico del electrodo carbonoso [13] en una disolución (ya sea ácida o básica) que contenga sistemas redox específicos (sondas redox).

Atendiendo al mecanismo de transferencia electrónica las sondas redox se pueden clasificar como sondas de esfera externa o de esfera interna. De este modo, los sistemas redox de esfera externa son aquellos en los que no existe un paso previo de adsorción antes de la transferencia de electrones. Normalmente estos sistemas redox muestran valores bajos de energía de reorganización en reacciones electroquímicas. Entre los pares redox de esfera externa más comunes encontramos $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}/[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+2}$ y ferroceno/ferricinio. Para estas sondas, la cinética no está afectada por la presencia de monocapas fisisorbidas o quimisorbidas sobre la superficie del material carbonoso, ni por la microestructura de la superficie carbonosa. El comportamiento electrocatalítico depende principalmente de la estructura electrónica del electrodo y su densidad de estados.

Otros sistemas redox son sensibles a la superficie y el proceso electrocatalítico está afectado por la química superficial o la microestructura del material carbonoso. En este punto, se pueden encontrar sondas redox sensibles a la microestructura como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$ o dopamina y otros sistemas fuertemente influenciados por la presencia de óxidos superficiales como las disoluciones acuosas del par $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$. La electrocatálisis de varias sondas redox sobre electrodos de carbono ha sido estudiada por McCreery y colaboradores [13], quienes detallan

esquemáticamente las especies redox disponibles para la caracterización superficial de electrodos de carbono (Fig. 2.5).

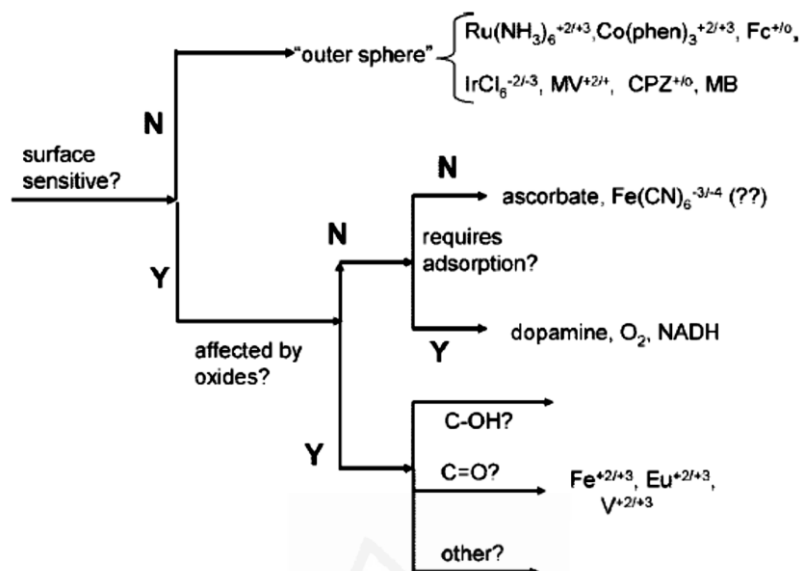


Figura 2.5.- Clasificación de los sistemas redox de acuerdo a su sensibilidad con la superficie del electrodo. [13]

1.2.5. Salto potencioestático o cronoamperometría

Esta técnica electroquímica consiste en aplicar un salto de potencial sobre el electrodo de trabajo, desde un potencial inicial E_1 hasta un potencial final E_2 (Fig. 2.6), registrándose la variación de la corriente en el tiempo.

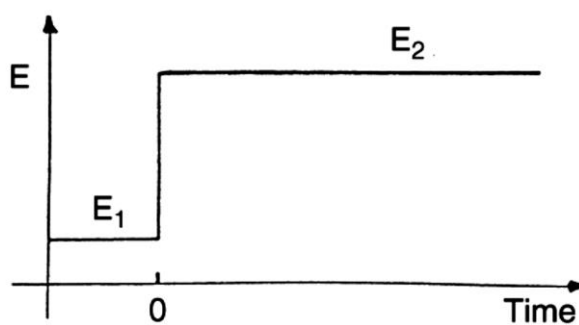


Figura 2.6.- Curva E (V) vs t(s) para un salto potencioestático simple.

La Fig. 2.6 muestra una curva $E(V)$ vs $t(s)$ donde el inicio del experimento se da a un potencial E_1 (generalmente a un potencial donde no se observan procesos farádicos) y a continuación se aplica un potencial continuo E_2 hasta la finalización del experimento, este potencial puede ser de oxidación o de reducción.

El dispositivo utilizado para este tipo de experiencias fue el mismo que se utiliza para los estudios por voltametría cíclica.

1.3. Técnicas espectroelectroquímicas

Se conocen como técnicas espectroelectroquímicas, o espectroscópicas *in situ*, a todas aquellas técnicas espectroscópicas que pueden ser acopladas con éxito a una célula electroquímica, permitiendo el análisis espectroscópico de los cambios asociados a la polarización del electrodo de trabajo, sin necesidad de interrumpir el tratamiento electroquímico, siendo las técnicas más conocidas la espectroscopia in-situ UV-Vis, fluorescencia y FT-IR. Estas técnicas presentan un gran potencialidad para el estudio del comportamiento de recubrimientos superficiales. En el caso particular de materiales complejos como los polímeros conductores, matrices de sílice, o especies biomoleculares inmovilizadas, las técnicas espectroelectroquímicas son cruciales para avanzar en la comprensión de su comportamiento.

Una característica común a todas las técnicas *in situ* es la necesidad de adaptar la célula electroquímica a las dimensiones del equipo de medida espectroscópicas y a las condiciones de trabajo de la técnica en cuestión. En la presente tesis se ha hecho uso de la espectroscopía *in situ* UV-Visible habiéndose utilizado para estas experiencias los mismos equipos electrónicos para voltametría ya descritos anteriormente.

1.3.1. Espectroscopia in situ UV-Vis

La espectroscopía ultravioleta-visible (*Ultraviolet-Visible*, UV-Vis) proporciona fundamentalmente información de las transiciones electrónicas permitidas en un material, con intervención de los orbitales moleculares llenos de mayor energía, los desocupados de menor energía, así como niveles parcialmente ocupados. Esta técnica es especialmente relevante para el estudio de polímeros conductores y biomoléculas, ya que para el primero se puede realizar el seguimiento del proceso de dopado (oxidación de la estructura) y para el segundo se puede determinar el grado de desnaturalización y el estado de oxidación de biomoléculas específicas.

La adaptación de una célula electroquímica para la realización de estudios *in situ* UV-Vis es muy sencilla en comparación con la mayoría de técnicas espectroelectroquímicas. El principal requisito es emplear un electrodo de trabajo transparente, por ejemplo, un electrodo de óxido de indio dopado con estaño (*Indium Tin Oxide*, ITO) que pertenece a la familia de electrodos ópticamente transparentes (*Optically Transparent Electrodes*, OTES) donde el óxido comúnmente es depositado sobre láminas de vidrio. Sin embargo hay que tener en cuenta que los electrodos de ITO imponen algunas restricciones debido a la labilización de la capa del óxido en determinadas condiciones. Así pues, es conveniente no realizar barridos a potenciales muy negativos en la escala del NHE, así como evitar electrolitos que contengan cloruros.

Adicionalmente, es necesario adaptar el tamaño y la forma de estos electrodos a las dimensiones de una cubeta de cuarzo (Fig. 2.7). Una tapa de teflón con las ranuras adecuadas, fija los electrodos impidiendo la posibilidad de contactos indeseados en el interior de la célula. Al igual que en una celda de tres electrodos es necesaria la desoxigenación de la disolución para cada experiencia.

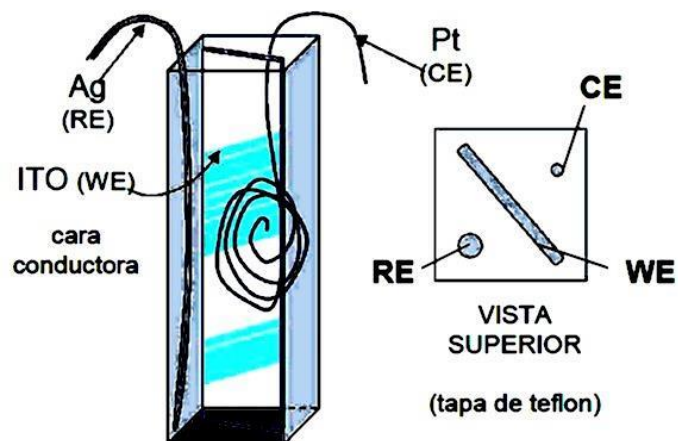


Figura 2.7.- Ilustración de una cubeta de cuarzo para UV adaptada como célula electroquímica.

El equipo utilizado en las experiencias realizadas en la presente memoria fue un espectrofotómetro Jasco V-670. El barrido se realizó desde 700 hasta 300 nm, a una velocidad de 2000 nm/min, con toma de datos a intervalos de 1.0 nm. El equipo realiza el cambio automático entre la lámpara halógena y la de deuterio, en la región de transición del intervalo visible al UV. El contra-electrodo empleado es un hilo de Pt y el tercer electrodo es un *pseudoreferencia* de Ag, convenientemente calibrado en la escala RHE.

1.4. Técnicas de análisis microscópico

Las técnicas experimentales empleadas han sido: Microscopía Electrónica de Barrido (SEM); y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM); las cuales se basan en la interacción de la radiación electromagnética, u otras

partículas (como electrones, etc.), con una muestra para identificarla o determinar su composición y/o su estructura. Cuando un haz de electrones o una radiación incide sobre la superficie de un sólido, tienen lugar varios fenómenos: reemisión de una parte de la radiación incidente, emisión de luz, electrones secundarios y Auger, rayos X, etc. (ver Fig. 2.8.). Todas estas señales se pueden emplear para obtener información sobre la naturaleza de la muestra (morfología, composición, estructura cristalina, estructura electrónica, etc.).

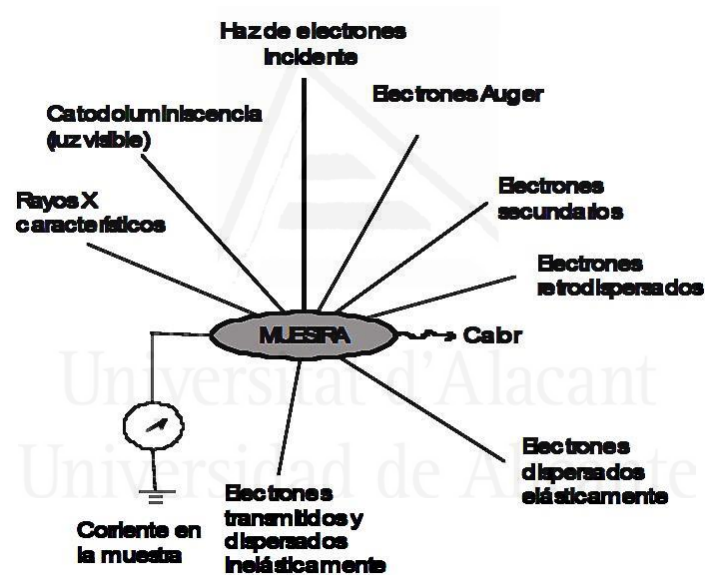


Figura 2.8.- Esquema de las posibles señales emergentes producidas por la interacción de un haz de electrones con la muestra.

1.4.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) es una técnica que permite visualizar la morfología de muestras sólidas sobre el límite físico de la óptica, permitiendo una resolución de

unos miles de Å, dependiendo de la naturaleza de la muestra [1, 14, 15]. La técnica emplea una fuente de emisión de electrones, generalmente de wolframio o lantano, y un haz de electrones acelerados de entre 5 y 30 keV. Ésta consiste, principalmente, en enviar un haz de electrones a la superficie de la muestra y, mediante un detector apropiado, registrar los electrones secundarios y retrodispersados. El haz se desplaza sobre la muestra realizando un barrido en las direcciones X e Y, de tal forma que la intensidad de la imagen varía, en cada punto con la intensidad del haz de electrones generado en la superficie.

Los electrones arrancados de los átomos de la muestra producto del bombardeo de electrones del haz primario, son denominados electrones secundarios. Éstos proporcionan información acerca de la topografía superficial y es la señal con la que se obtiene una imagen de la muestra. Debido a la baja energía de los electrones secundarios (menos de 50 eV), en su viaje hacia el exterior de la muestra van perdiendo energía por diferentes interacciones, de forma que solo los que están muy próximos a la superficie tienen alguna probabilidad de escapar del material y llegar al detector. Por tanto, la señal de los electrones secundarios procede de la misma superficie y de una pequeñísima zona por debajo de ella, en torno a unos pocos nanómetros (del orden de 5 a 10 nm). Por otra parte, al ser electrones de baja energía, pueden ser desviados fácilmente de su

trayectoria emergente inicial, y se puede obtener información de zonas que no están a la vista del detector. Esta particularidad es fundamental para otorgar a esta señal la posibilidad de aportar información “en relieve”.

Los electrones que rebotan elásticamente sobre la superficie se denominan electrones retrodispersados. Su energía es superior a 50 eV y la profundidad del sitio de la que proceden (del orden de centenas de nanómetros) es mayor que la de los electrones secundarios. La intensidad de la señal de electrones retrodispersados, para una energía dada del haz, depende del número atómico de los átomos del material (a mayor número atómico, mayor intensidad de la señal).

Este hecho permite, a partir de diferencias de intensidad, distinguir fases de un material de diferente composición química, aunque no exista ninguna diferencia de topografía entre ellas. Las zonas con menor número atómico (Z) se verán más oscuras que las zonas que tienen mayor número atómico. Esta es la principal aplicación de la señal de electrones retrodispersados.



Figura 2.9. Microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-840.

El microscopio electrónico de barrido que se ha empleado en este trabajo es de la marca JEOL JSM-840 (Figura 2.9). El cual consta de un detector de electrones secundarios tipo centelleador fotomultiplicador con resolución de 4 o 3.5nm, respectivamente, un detector de electrones retrodispersados tipo Si P-N con resolución de 10 o 5 nm, respectivamente.

1.4.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

En la microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) una muestra delgada se irradia con un haz de electrones de densidad de corriente uniforme, cuya energía está dentro del intervalo de 100 a 200 keV. Parte de esos electrones son transmitidos, otra parte son dispersados y otra parte da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios y Auger, rayos X, etc. El microscopio electrónico de transmisión emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes [1, 14, 16]; la difracción de los electrones para obtener información acerca de la estructura cristalina; y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra (composición química, de fases o mezcla de fases).

Una condición para que se produzca la transmisión de electrones a través de la muestra es que ésta sea delgada, es decir, transparente a los

electrones. Es recomendable no utilizar muestras de más de 100 nm de grosor ya que cuanto menor sea el espesor de la muestra mejor calidad de imágenes se puede obtener.

Formación de la imagen: Los electrones muestran características tanto de onda como de partícula. Cuando se atiende a su comportamiento ondulatorio se pueden observar variaciones tanto en la amplitud como en la fase de la onda al atravesar la muestra y ambos tipos de variación dan lugar al contraste en la imagen. Se define el contraste como diferencias en intensidad entre dos zonas adyacentes. Así, en la microscopia TEM se hace una distinción fundamental entre contraste de amplitud y contraste de fase. En la mayoría de situaciones ambos tipos contribuyen a la formación de la imagen pero uno de ellos tiende a dominar. En las imágenes de contraste de amplitud se obtienen imágenes de campo claro o campo oscuro seleccionando, mediante diafragmas o aperturas, el haz directo o los haces dispersados, respectivamente. Dentro del contraste de amplitud existen dos tipos principales: contraste debido al grosor o masa de la muestra y el contraste debido a la difracción de los electrones. En el primer caso el contraste se produce debido a la dispersión incoherente y elástica de los electrones al atravesar la muestra y depende fuertemente del número atómico y del grosor de la misma. Este contraste es el más importante en el caso de muestras no cristalinas, como polímeros, y es el contraste crítico de

las muestras biológicas. El contraste de difracción se produce debido a la dispersión coherente y elástica de los electrones al atravesar la muestra y está controlado por la estructura cristalina y la orientación de la misma. Se da cuando la dispersión de los electrones se produce a un ángulo (de Bragg) determinado y por tanto sólo aparece en muestras cristalinas.

La preparación de las muestras consiste en la dispersión de ésta en acetona o etanol. Posteriormente, el material se deposita sobre una rejilla de carbón y es introducida directamente en el microscopio. Esta técnica se ha utilizado para determinar la morfología y dimensiones de los cristales o partículas de los materiales preparados. La microscopía electrónica de transmisión permite conseguir resoluciones de hasta 3 Å y está indicada para materiales que presentan tamaños d cristal reducidos (< 1 nm).



Figura 2.10.- Microscopio JEOL empleado en los análisis TEM.

En la presente memoria se ha empleado el Microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo JEM-2010 (fig. 2.10). La fuente de electrones empleada consiste en un filamento caliente de wolframio que por efecto termoiónico emite electrones, los cuales son acelerados por un potencial de 100 a 200 kV. Se obtiene una resolución entre líneas de 0,14 nm y entre puntos de 0,25 nm. El microscopio lleva acoplado un sistema de microanálisis (EDX), de la marca OXFORD instruments, modelo INCA Energy TEM100. El detector es de Si(Li) con un área de detección de 30 mm². La ventana es del tipo SATW y el intervalo de detección es del Be al U. La cámara de adquisición de imágenes es de la marca GATAN modelo ORIUS SC600. Está montada en eje con el microscopio en la parte inferior y está integrada dentro del programa de adquisición y tratamiento de imágenes GATAN DigitalMicrograph 1.80.70 para GMS 1.8.0.

2. Procedimientos experimentales

2.1. Protocolos de limpieza y acondicionamiento del material

2.1.1. Limpieza del material de vidrio

El grado de la limpieza en el material empleado está sujeto al uso para el que se destine. En el caso de la voltametría cíclica y técnicas espectroelectroquímicas, una adecuada limpieza del material de vidrio en contacto con las disoluciones es necesaria.

El protocolo de limpieza comprende los siguientes pasos:

1) Sumergir el material de vidrio en una disolución ácida concentrada de permanganato potásico en un lapso de 12 a 24 horas. Una receta para la preparación de la disolución oxidante es la siguiente: 30 g KMnO_4 + 5 mL H_2SO_4 (96%) en 2 L de agua. De esta forma se oxida la materia orgánica presente a especies más sencillas de eliminar.

2) Extraer el material de vidrio de la mezcla oxidante y enjuagar con una disolución ácida de peróxido de hidrógeno (10% w/w, H_2O_2). Esta disolución reduce los restos de MnO_2 (óxido insoluble formado por la reducción del anión MnO_4^-) a Mn^{+2} . Seguidamente el material es lavado con abundante agua ultrapura (18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$) para eliminar las sales, residuos y los productos de la oxidación.

3) Tras el lavado se procede a hervir repetidamente el material de vidrio en placas calefactoras o en microondas con agua ultrapura, con el objetivo de desprender las sustancias que aún puedan quedar adheridas a las paredes del material. Finalmente se espera a enfriar el material de vidrio y queda listo para ser empleado.

4) Como último paso del protocolo, se comprueba el grado de limpieza de la celda electroquímica, realizando un voltagrama cíclico de un electrodo policristalino de Pt en la disolución de trabajo (usualmente H_2SO_4 0.5M, o

tampón fosfato), dicho voltograma deberá presentar los picos característicos de adsorción-desorción de hidrógeno, la zona no farádica completamente horizontal y el proceso de oxidación-reducción superficial del Pt. Este último paso de control de la limpieza es útil además para tener un control del calibrado del electrodo de referencia (RHE, Ag/AgCl, pseudoreferencia), teniendo como axioma que la producción de hidrógeno con un electrodo de Pt se da a 0.0 V vs NHE.

2.1.2. Pretratamiento de electrodos

Otro aspecto importante en la voltametría es el acondicionamiento de la superficie del electrodo. Generalmente se desean superficies de acabado especular tanto en electrodos metálicos como carbonosos, con el objetivo de minimizar el área real y con ella la contribución de la doble capa capacitiva en los voltogramas. El pulido es pues el pre-tratamiento clásico para los electrodos de disco.

El protocolo de pulido comprende una serie de pasos que consisten en el uso de suspensiones de diamante o alúmina de tamaño de partícula progresivamente más pequeño. Es habitual comenzar por suspensiones de tamaño de grano de 1 μ m, para posteriormente refinar con partículas más finas del orden de 0.5 o 0.25 μ m. El último pulido vendrá seguido de una sonicación exhaustiva del electrodo (5-10 minutos) para desprender los

restos adheridos durante el pulido. En el caso de los pulidos con alúmina, dicho lavado en ultrasonidos se realiza en una disolución alcalina (0.01 M NaOH) para favorecer la solubilización de posibles granos incrustados. En el caso de electrodos de carbono vítreo, si el material es muy poroso como ocurre con determinados lotes, el pulido no es suficiente para regenerar una superficie limpia tras un uso anterior. En este caso es preferible recurrir al desbastado en húmedo con una lija fina (grano 400 o 1000). Ocasionalmente, es posible recurrir a unas tenazas para retirar la porción más externa de la varilla, tras lo cual es imprescindible recurrir a la lija para generar una nueva superficie lisa.

En el caso de los electrodos de ITO soportados sobre vidrio, el pretratamiento se reduce un lavado ultrasónico en acetona para eliminar la contaminación superficial. La superficie expuesta para recubrimientos con sílice es un rectángulo de 0.5 x1.5 cm.

3. Referencias

1. J. J. Leary, D. A. Skoog, McGraw-Hill, 1993.
2. M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito, A. Jorio, *Physics Reports*, 409 (2005) 47.
3. Q. Cheng, S. Debnath, E. Gregan, H. Byrne, *Appl. Phys. A*, 102 (2011) 309.
4. C. Thomsen, S. Reich, in M. Cardona, R. Merlin (Eds.), *Light Scattering in Solid IX*, Springer Berlin Heidelberg, 2007.
5. J. M. A. Martín, *Introducción a la ciencia de materiales: técnicas de preparación y caracterización*, 20 ed., Editorial CSIC-CSIC Press, 1993.
6. J. Rouquerol, F. Rouquerol, P. Llewellyn, G. Maurin, K. S. Sing, *Adsorption by powders and porous solids: principles, methodology and applications*, Academic press, 2013.
7. R. A. Pierotti, J. Rouquerol, *Pure Appl Chem*, 57 (1985) 603.
8. P. A. Thrower, *Chemistry & Physics of Carbon*, 21 ed., CRC Press, 1988.
9. D. Cazorla-Amorós, J. Alcañiz-Monge, M. A. Casa-Lillo, A. Linares-Solano, *Langmuir*, 14 (1998) 4589.
10. S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, 60 (1938) 309.
11. M. M. Dubinin, *Chem. Rev.*, 60 (1960) 235.
12. C. G. Zoski, *Handbook of Electrochemistry*, First Edition ed., Elsevier, Amsterdam, 2007.
13. R. L. McCreery, *Chem. Rev*, 108 (2008) 2646.
14. Y. Leng, *Materials characterization: introduction to microscopic and spectroscopic methods*, John Wiley & Sons, 2013.
15. R. Wiesendanger, *Scanning probe microscopy and spectroscopy: methods and applications*, Cambridge University Press, 1994.

16. H. H. Rose, *Science and Technology of Advanced Materials*, 9 (2008) 014107.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Objetivos de la tesis doctoral

Objetivo global del trabajo

A partir de los antecedentes expuestos en los apartados anteriores, se plantea un trabajo de investigación encaminado al uso de la sílice sintetizada por un procedimiento sol-gel como modificador superficial de electrodos y como soporte inmovilizador de especies de relevancia en electrocatálisis y en bioelectroquímica.

Objetivos específicos

1. Realizar un estudio electroquímico fundamental para determinar el efecto de la presencia de los depósitos electroasistidos de sílice en los procesos de oxidación-reducción de distintas especies redox en disolución acuosa.
2. Conseguir el encapsulamiento de nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) dentro de matrices de sílice preparadas por depósito electroasistido para obtener un electrodo modificado que posea propiedades electrocatalíticas mejoradas.

3. Mejorar las conexiones eléctricas, tanto entre los nanotubos de carbono encapsulados como entre éstos y el substrato electródico de carbono vítreo, mediante la inserción electroquímica de un polímero conductor en la matriz de sílice.

4. Siendo la sílice un material biocompatible y útil para la inmovilización de biomoléculas, se pretende encapsular en su interior la molécula modelo citocromo c y estudiar la posibilidad de transferencia electrónica directa de proteínas encapsuladas.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Preámbulo del capítulo 3

El objetivo global de esta memoria de Tesis es el desarrollo de sensores y biosensores electroquímicos empleando sílice como soporte de especies electroactivas. Sin embargo, lo más adecuado para el estudio electroquímico de un sistema complejo conviene comenzar con la descripción y el estudio de un sistema básico electrodo-sílice, para luego ir evolucionando a sistemas más complejos, con especies electroactivas inmovilizadas. Por ello, si se desea realizar un estudio electroquímico fundamental se debe comenzar con un sistema fundamental y básico; un electrodo de trabajo modificado superficialmente con una película delgada de sílice.

La sílice desde el punto de vista electroquímico es considerada como un material inerte no electroactivo. Sin embargo, presenta ciertas características fisicoquímicas que deben ser tenidas en cuenta. En primer lugar, posee una carga neta asociada a los grupos hidroxilos terminales en su estructura porosa que, sin embargo, es dependiente del medio (ácido, neutro o básico) al que está sometida. Esta dependencia con el pH conduce incluso a la posibilidad de obtener un material de sílice neutro (en su punto isoelectrico) en disolución. Por lo tanto, depositar en la interfase del electrodo un material polarizable por el medio sería un factor

electroquímico a tener en cuenta. Sería apropiado definir la carga neta de la sílice en un amplio intervalo de pH y esto se podría lograr con la incorporación de una especie molecular en la red que defina la carga neta de la interfase. Ejemplos que combinen la estructura rígida de la red de sílice con la carga neta de un compuesto orgánico (polímeros intercambiadores de iones, agentes preconcentrantes y ionómeros) pueden ser encontrados con facilidad en la bibliografía. Estos modificadores suelen ser inmovilizados físicamente en la red de sílice mediante el dopado del sol precursor con la especie de interés. El material resultante es una película de características aniónicas o catiónicas que promueve la transferencia de masa de especies de carga opuesta presentes en la disolución, siendo este fenómeno el concepto que se aplica para el desarrollo de membranas permeable-selectivas para iones aplicadas en electroanálisis

En el capítulo que se presenta a continuación, se escogió como sistema fundamental (electrodo-ionómero@silice) un electrodo de uso común en electroquímica como es el carbono vítreo. Este electrodo fue modificado superficialmente con una matriz de sílice dopada con un ionómero aniónico de uso común, el poli-estirensulfónico ácido (PSS⁻), otorgándole así a la red de sílice una carga neta negativa en un amplio intervalo de pH. El material resultante es, por tanto, una red afín a especies catiónicas en disolución. La síntesis de este material se realizó por completo mediante técnicas

electroquímicas. Esto quiere decir que la sílice fue depositada por un método sol-gel electroasistido y, simultáneamente, el PSS⁻ fue atrapado dentro de la red de sílice. Se obtiene así un electrodo de carbono vítreo modificado con una película delgada sílice de clase I de carácter catiónico.

Finalmente, una vez definidas las características del electrodo de trabajo, el análisis electroquímico fundamental tiene que ser dirigido al estudio de las velocidades de transferencia de carga y de masa de especies redox en disolución ya que éstas tienen que atravesar una interfase adicional (la película de sílice clase I) previa a la transferencia electrónica en la superficie del electrodo.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 3

Modification of electrodes by electrodeposited sol-gel silica: Mass transport effects on the electrochemical behavior of redox probes.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Abstract

Porous, electrically insulating SiO₂ layers containing polystyrene sulfonate (PSS) were deposited on glassy carbon electrodes by an electrochemically assisted deposition method. The obtained material was characterized by microscopic, spectroscopic and thermal techniques. Silica-PSS films modify the electrochemical response of the glassy carbon electrodes against selected redox probes. Positively charged species show reduced diffusivities across the SiO₂-PSS pores, which resulted in a concentration ratio higher than 1 for these species. The opposite behaviour was found for negatively charged redox probes. These observations can be interpreted in terms of the different affinity of the GC/SiO₂-PSS modified electrode for the electroactive species, as a consequence of the negatively charged porous silica.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. Introduction

An overall electrode process can be divided into a number of more simple consecutive steps among which, the transport of the electroactive species from the bulk solution to the electrode interface and the charge transfer to the electrode are the most significant. The performance of electrode materials can be improved by altering the charge transfer kinetics with different electroactive surface modifiers. Surface modification of electrodes usually involves both physical changes in the morphology of the electrode material and chemical changes in the composition of the active layer at the electrode-solution interface. In this way, commonly used modifiers are metallic nanoparticles, carbon nanotubes, metal oxides or conducting polymers among others [1, 2]. All these species modify the electronic structure of the electrode thus modulating the electron transfer through the interface.

However, less attention has been paid to electrode modification with non-electroactive materials. Such modifiers, being usually electrically insulating, cannot improve the electron transfer kinetics. The effect of these materials is restricted to the modification of the mass transport characteristics.

Among the number of electrically insulating porous layers used for electrode modification, SiO₂ prepared by sol-gel methods has received consideration because of its simple preparation process and soft synthesis conditions [3, 4]. Furthermore, the biocompatibility of SiO₂ makes this material attractive for electro-bio analytical applications such as molecular recognition [5, 6], shape-selective catalysis [7, 8], molecular sieving [9] and as the immobilizing substrate for enzymatic electrochemical biosensors [10, 11].

Owing to the high relevance of this silica material for the development of the mentioned applications, our goal is to gain a deeper insight on how an amorphous, porous, electrically insulating layer is able to modify the voltammetric response of the substrate electrode. This will allow distinguishing between electrochemical effects coming from the encapsulated materials and matrix effects. In the present contribution we focus on the mass transport modification induced by the presence of a SiO₂ film electrodeposited on glassy carbon substrates. To achieve this, we will compare the electrochemical behaviour of selected redox probes on bare glassy carbon (GC) with that recorded on SiO₂-modified GC. The results will be interpreted in the light of pure electrochemical data with the

assistance of several microscopic, spectroscopic and thermal characterization techniques.

2. Experimental part

2.1 Reagents and equipment

Tetraethyl orthosilicate (TEOS, Sigma-Aldrich), iron (II) sulfate heptahydrate (Merck, p.a.), potassium chloride (Merck, p.a.), iron(III) sulfate hydrate (Panreac, p.a.), dopamine (DA, Sigma-Aldrich p.a.), 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid, sodium salt, 97% (NQ, Sigma-Aldrich), poly(4-styrenesulfonic acid) 18% wt. (PSS, Sigma-Aldrich), hydrochloric acid (Merck, p.a.), sulfuric acid (Merck, p.a.) were used as received. All solutions were prepared with purified water obtained from an Elga Labwater Purelab system (18.2 MΩ cm).

The electrochemical experiments were performed in conventional electrochemical pyrex glass cells. The working electrode was a glassy carbon disk (GC, V-25 model, Carbone Lorraine). The GC electrode was carefully polished with fine emery paper and alumina suspensions (Buehler, 1 μm and 0.25 μm) over cloth and then ultrasonically cleaned in distilled water. The current density was calculated from the geometric area of the electrode (0.07 cm²). A platinum wire was employed as counter

electrode, and a reversible hydrogen electrode (RHE) introduced in the same electrolyte solution placed in a Luggin capillary was used as reference electrode.

The surface morphology of the electrodes was studied by scanning electron microscopy (SEM JEOL JSM-840) and transmission electron microscopy (TEM, JEOL model JEM-2010). The SEM images were taken directly from the surface of the electrode of glassy carbon. For transmission electron microscopy studies, the electrodeposited silica samples were carefully scratched from the surface of the glassy carbon electrode. This silica powder was dried by vacuum heating at 40 °C, subsequently dispersed with ethanol and dosed over the sample holder.

The porosity of the samples was characterized by physical adsorption of N₂ at -196°C and CO₂ at 0 °C, using an automatic adsorption system (Autosorb-6, Quantachrome). The samples were outgassed at 150 °C under vacuum for 4 h. The micropore volumes were obtained by application of the Dubinin–Radushkevich equation[12].

The micropore volume obtained by N₂ adsorption gives the total micropore volume and the micropore volume measured by CO₂ adsorption up to 1 atm gives the narrow micropore volume [13, 14].The surface area was obtained by the application of BET equation [12]. Pore size distributions were obtained applying the DFT method to the CO₂

adsorption isotherms at 0°C, using the software supplied by Autosorb-6 (Quantachrome).

Thermogravimetric analysis was performed by thermal treatment at 10 °C/min up to 900 °C in 100 mL/min of nitrogen-oxygen flow (ratio, 4:1).

Infrared spectroscopy measurements were performed in a FT-IR Nicolet 5700 instrument at 8 cm⁻¹ resolution. The samples were dispersed in dry KBr powder and then pressed to form 1 cm² disc pellets. Typically, 100 scans were processed to obtain both the background and the sample spectra.

2.2. Preparation of SiO₂-PSS

Glassy carbon electrodes were modified by silica films obtained by electroassisted deposition. Silica stock solution was prepared through the alcohol-free sol-gel route [15, 16] for which 1.00 mL of TEOS was mixed under vigorous stirring with 2.52 mL of a 0.46M KCl + 0.01M HCl solution in a closed vessel. After 2 hours, the resulting sol was submitted to evaporation by vacuum heating until the complete removal of the released ethanol coming from alkoxyde hydrolysis. Subsequently, 1 mL of 1% poly(4-styrenesulfonic acid) aqueous solution was added and the mixture was stirred for 15 minutes.

The deposition of silica was performed potentiostatically after the immersion of a polished GC working electrode in the precursor solution, where it was pre-conditioned at a constant potential of 0.0 V and then stepped down to -1.2V for 60 seconds to trigger the deposition of the silica film. Hydrogen evolution upon electrochemical reduction of water at this potential leads to a pH rise in the electrode surroundings. This induces the collapse of silica colloids near the electrode surface and favours their deposition. Further details on the deposition method are given elsewhere [17].

The silica gel prepared by this way present pores containing different functional groups, siloxane (Si-O-Si), silanol (Si-OH) and siloxide (SiO^-) groups [18-21]. As the isoelectric point of silica (pI) is 2, silica walls will be negatively charged in solutions of higher pH. However, the addition of the PSS plasticizer assures the presence of a negatively charged sulfonate groups in the gel surface even under strong acidic conditions.

Table 3.1 summarizes the porous texture of the SiO_2 -PSS sample. The N_2 adsorption isotherm (Fig. A1 in Appendix) is type I, according to the IUPAC classification [12]. Interestingly, the microporous volumes obtained from both N_2 and CO_2 adsorption are very similar, indicating that the material has a narrow micropore size distribution with an average pore size

about 0.7 nm [13, 14]. DFT micropore size distribution obtained from CO₂ adsorption is in very good agreement with this.

Table 3.1. Textural properties of the SiO₂-PSS sample obtained from the N₂ and CO₂ adsorption isotherms.

Sample	S _{BET} (m ² g ⁻¹)	V _{DR} N ₂ (cm ³ g ⁻¹)	V _{DR} CO ₂ (cm ³ g ⁻¹)
SiO ₂ -PSS	410	0.20	0.22

3. Results and discussion

3.1 Characterization of GC/SiO₂-PSS electrodes

The surface morphology of a glassy carbon electrode coated with a thick, electroassisted deposit of SiO₂ (GC/SiO₂-PSS) after 60s at -1.2V was examined by electron microscopy and the results displayed in Fig. 3.1. The long range image in Fig. 3.1a shows that the GC surface appears completely covered by a layer of silica on which globular aggregates of SiO₂ microparticles have grown. These globular SiO₂ spots are uniformly distributed, being their average particle size of about 0.2 μm, as deduced from the magnified picture of Fig. 3.1b.

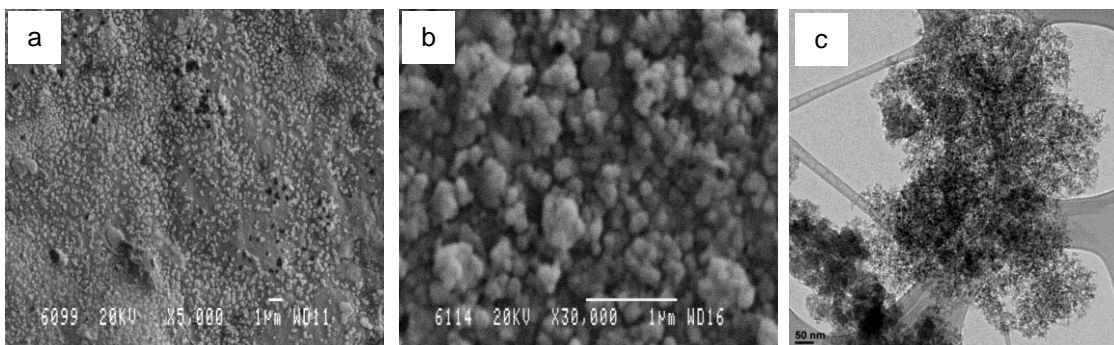


Figure 3.1.- SEM micrographs acquired from a glassy carbon substrate after the electroassisted deposition of a SiO₂-PSS layer for 60 s (a and b) and TEM micrograph obtained from the SiO₂-PSS sample (c).

The SiO₂-PSS layer was analysed by means of transmission electron microscopy. The TEM image in Fig. 3.1c reveals a globular and uniform aspect for the silica deposit due to the formation of microstructured SiO₂ with no oriented porous structure. The appearance of the silica deposits is very similar to that of silica-carbon nanotubes composites prepared by electroassisted deposition [22]. Therefore, the imaging techniques show that the electro-assisted deposition method provides homogeneous silica films formed by the collapse of silica colloids from the sol precursor.

FTIR spectroscopy constitutes a unique characterization tool for the structural analysis of composite materials. Besides, in this case, from the analysis of the infrared spectra additional evidence for the incorporation of PSS within the SiO₂ matrix could be obtained. Infrared spectra presented at a common scale in Fig. 3.2 were obtained from (a) silica prepared by the

sol-gel method in the absence of PSS (PSS-free SiO₂); (b) pure PSS and, finally, (c) a SiO₂-PSS composite prepared by electroassisted deposition.

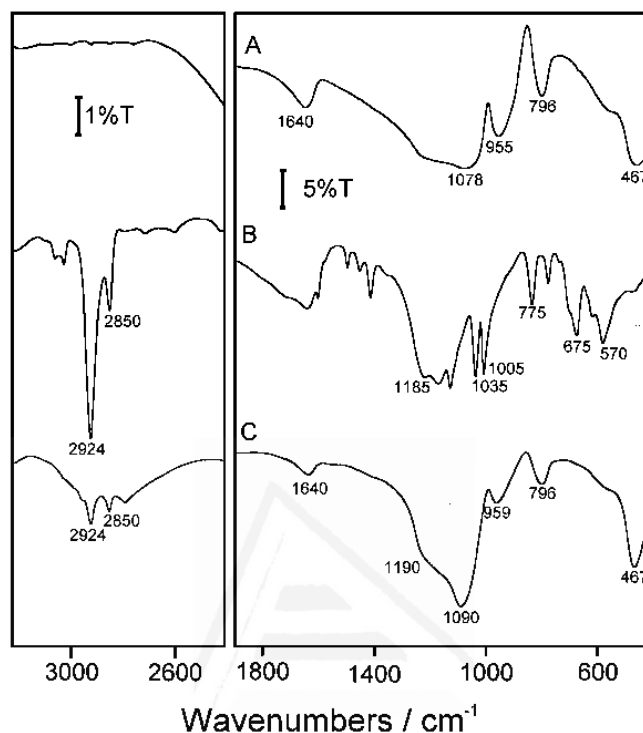


Figure 3.2.- FT-IR spectra recorded for: **A)** PSS-free SiO₂, **B)** Pure PSS **C)** SiO₂-PSS composite synthesized by the electrochemical method. 100 scans. 8 cm⁻¹ resolution.

The low frequency spectral region of the FTIR spectrum for PSS-free silica presented in Fig. 3.2a is characterized by the presence of a broad absorption band at 467 cm⁻¹ and a couple of features at 796 and 955 cm⁻¹. At higher frequencies, a broad band at 1078 cm⁻¹ appears overlapped with several absorptions in the 1100-1250 cm⁻¹ spectral region. It is known that both the intensity and the peak frequency of these features are affected by

the synthesis procedure and treatment of the silica sample. In this way, most of the bands found in Fig. 3.2a have been ascribed to network or skeletal vibrations of the Si-O-Si structure [23-25]. More precisely, the absorption band at 467 cm^{-1} is related with oxygen rocking motions perpendicular to the Si-O-Si plane [25], the 796 cm^{-1} feature to Si-O-Si symmetric stretching [23, 25] and the band at 1078 cm^{-1} to the asymmetric Si-O-Si stretching vibration [23]. Finally, the 955 cm^{-1} band is probably ascribed to the presence of unreacted TEOS [25] while the feature at 1640 cm^{-1} reveals that some adsorbed water is still present in the solid sample.

The IR spectrum in Fig. 3.2b shows characteristic polystyrene sulfonic acid infrared features at 2924 cm^{-1} and 2850 cm^{-1} frequency. This couple of bands, assigned to the C-H stretching vibration of the aliphatic backbone, will be used to assess the incorporation of PSS into the SiO_2 matrix because of the interfering absorptions of silica in the fingerprint region of the composite. Moreover Fig. 3.2b shows a complex spectrum with an absorption band at 1035 cm^{-1} that can be easily assigned to the sulfonic SO_3 symmetric stretching vibration. The corresponding SO_3 antisymmetric mode appears at 1185 cm^{-1} [26, 27]. On the other hand, the band at around 1000 cm^{-1} seems to be related with symmetric ring stretching mode while the features near 775 cm^{-1} and 675 cm^{-1} are characteristic of substituted aromatic groups (CH out-of plane vibration and ring out-of-plane

deformation, respectively). Finally, the band observed at 570 cm^{-1} seems related with the crystalline structure of polystyrene [28, 29].

The incorporation of PSS into the silica matrix is confirmed by the presence of several bands in the spectrum of the composite material (Fig. 3.2c). As mentioned above, the most obvious contribution of PSS to this spectrum is found in the aliphatic CH region ($2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$) but the strong overlapping band at $1090\text{-}1190\text{ cm}^{-1}$ arising from two contributions, also supports the successful incorporation of PSS: S-O stretching vibration from PSS and Si-O-Si stretching vibration from silica. Besides, PSS could contribute to the shoulder appearing in this spectrum at 570 cm^{-1} .

The amount of PSS encapsulated into the silica samples was estimated by thermogravimetric analysis. This technique revealed that the mass fraction of PSS within the silica layer was around 4.7 wt% (details on TG analysis can be found in Fig. A2 in Appendix).

3.2. Cyclic voltammetry of redox probes

After successfully placing the $\text{SiO}_2\text{-PSS}$ inert film at the GC electrode surface, we should examine whether the mass transport of different redox probe molecules are affected or not by the presence of this layer. Firstly, the electrochemical activity of a bare glassy carbon electrode against the $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ redox couple is shown and then, the comparison with the

electrochemical response recorded after the electroassisted deposition of SiO₂-PSS on the same electrode is performed. So, dashed line in Fig. 3.3a illustrates how the voltammogram of the GC electrode displays an anodic peak centred at 1.03 V during the forward sweep, which is related with the oxidation of Fe²⁺. In the reverse scan, the faradaic counter-process occurs due to the Fe³⁺ reduction at 0.32 V. The peak separation between anodic and cathodic features (ΔE_p) is 718 mV which is higher than the value for a reversible process.

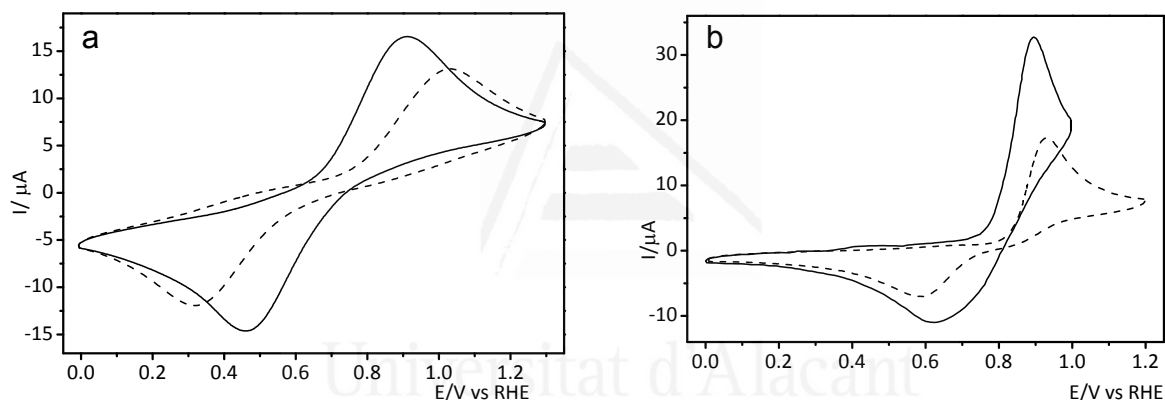


Figure 3.3. Steady-state cyclic voltammograms recorded for either bare glassy carbon electrode (dashed line) or SiO₂-PSS modified glassy carbon electrode (solid line) in 0.5 M H₂SO₄ test solution containing: **(a)** 1 mM FeSO₄ + 1 mM Fe₂(SO₄)₃ **(b)** 1mM dopamine. Scan rate: 50 mV s⁻¹.

The electrode modified with the insulating SiO₂-PSS layer (solid line) shifts both the onset potential and the peak current for the oxidation reaction to less positive values. Simultaneously, the cathodic reduction of Fe³⁺ species is moved to more positive potentials and the combined effect is a decrease in the peak-to-peak separation to 455 mV.

A similar result is obtained in Fig. 3.3b for an organic redox probe such as dopamine (DA). The oxidation peak for dopamine over the pristine GC electrode appears at 0.91V in the forward scan whereas the counter-process takes place under the reduction peak centered at 0.56V in the reverse sweep. Therefore, the peak separation is 350 mV. On the other hand, DA oxidation peak appears at 0.89V in the forward scan over the GC/SiO₂-PSS electrode (solid line) and the faradic counter-process takes place under the reduction peak centered at 0.63V in the reverse sweep. As a result, the peak separation falls to 260 mV in the presence of the SiO₂-PSS layer. The nature of this phenomenon will be analysed below.

It is worth mentioning that the redox probes tested in Fig. 3.3 are positively charged in the strongly acidic medium used. The addition of PSS to the silica matrix deposited on the glassy carbon substrate preserves its negatively surface charge even in this electrolyte. Hence, it would be very interesting to perform an electrochemical analysis on the activity of the GC/SiO₂-PSS electrode towards an anionic species. Care must be taken in selecting the suitable negatively charged redox probe because of the low pH electrolyte. Folin's reagent, 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate (HN4S), has been used because of the stability of its redox response and the strong acidity of the sulfonic group. In addition to this probe, the widely employed [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ redox couple has been also tested because no

significant dissociation of the complex is expected during the time interval required for the measurements.

The stabilized cyclic voltammograms are shown in Fig. 3.4. These voltammograms reveal that both 1,2-dihydroxynaphthalene-4-sulfonate to 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate (Fig. 3.4a) and ferrocyanide to ferricyanide (Fig. 3.4b) redox transformations are favoured on bare glassy carbon surfaces in comparison to GC/SiO₂-PSS electrodes. In this way, for the [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻ couple, a peak separation of 56 mV is obtained for the GC electrode and it rises up to 109 mV for the GC/SiO₂-PSS electrode.

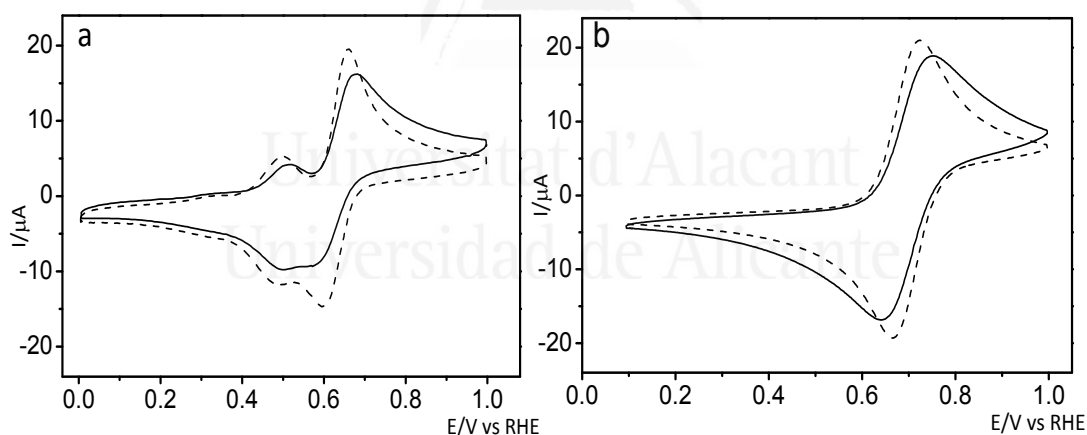


Figure 3.4. Stabilized cyclic voltammograms for bare glassy carbon electrode (dashed line) or GC/SiO₂-PSS electrode (solid line) in 0.5 M H₂SO₄ test solution containing: **a)** 1 mM 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate. **b)** 1 mM K₃[Fe(CN)₆] + 1 mM K₄[Fe(CN)₆]. Scan rate: 50 mV s⁻¹.

Regarding to the Folin's reagent, two oxidation peaks appear at 0.50 V and 0.66V in the forward scan (Fig. 3.4a). The corresponding counter-processes appear during the reverse scan at 0.49V and 0.60V, respectively.

The first redox process ($\Delta E_p < 10$ mV) strongly suggests that the electron transfer occurs from adsorbed species. The larger ΔE_p of the second redox process is compatible with electron transfer to species in solution. The ΔE_p values obtained for this latter process are 60 mV for the glassy carbon electrode (dashed line) and 110 mV in the presence of the silica layer (solid line).

This is confirmed when we check the voltammetric response of the Folin's reagent at different scan rates (see Fig.A3 in the supporting information). As the scan rate is increased, the peak current of the first voltammetric feature raises linearly, the expected result for a surface electron transfer. However, peak current grows slower for the second peak. More specifically, it is observed a square root dependence on the scan rate, thus revealing an electron transfer process to species in solution. The behaviour described above for both the Folin's reagent and the ferro/ferricyanide couple is opposite to that found in Fig. 3.3 for the cationic probes, pointing that the ionic nature of the redox probes has relevance in the electrochemical behaviour. For both electrodes, glassy carbon is the electrochemically active substrate but in the case of the GC/SiO₂-PSS electrode, the silica layer acts like a selective interface, discerning the charge of the target molecule. Therefore, a kinetic study for the redox probes at the GC/SiO₂-PSS modified electrode may put more

light on its electrochemical performance. Cyclic voltammograms were carried out at different scan rates for glassy carbon and GC/SiO₂-PSS electrodes (see Figs. A3 to A6 provided in the Appendix as supporting information). From these CVs, plots of peak current vs. the square root of the scan rate (Randles-Sevcik plots) are derived and then presented in Fig. 3.5. The linear trend observed for the four redox probes indicates that the electronic transfer takes place from the electrode surface to dissolved species.

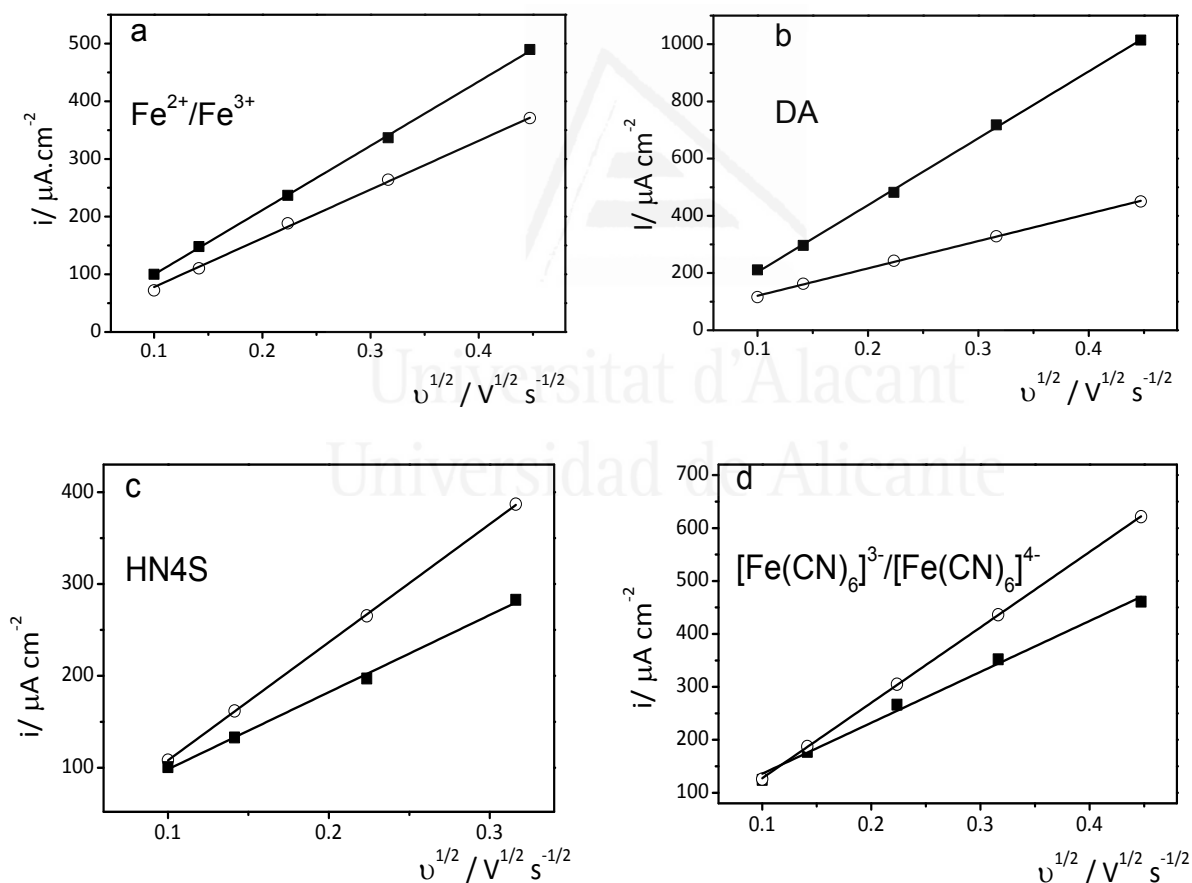


Figure 3.5: Randles-Sevcik plots obtained for bare glassy carbon (○) and SiO₂-PSS modified glassy carbon electrode (■) electrodes from sets of CV recorded at different scan rates for the following redox probes: **a)** 1 mM FeSO₄ + 1 mM Fe₂(SO₄)₃; **b)** 1 mM Dopamine; **c)** 1 mM HN4S; **d)** 1mM [Fe(CN)₆]³⁻/[Fe(CN)₆]⁴⁻

In addition, it is observed that the presence of the silica layer affects the slope of the linear fits. For cationic redox probes, higher slopes are obtained at silica-modified electrodes (Figs. 3.5a and 3.5b). The opposite effect is observed for anionic species (Figs. 3.5c and 3.5d); that is, lower slopes for the GC/SiO₂-PSS electrodes. These results reveal an apparent improvement in the voltammetry performance of silica modified electrodes for the positive charged probes and a worsening for the negative ones. The observed phenomenon is not related with an improvement in the electron transfer, but with a change in mass transport through the silica film. Similar observations were reported for silica modified electrodes elsewhere [30-32].

3.3. Kinetic analysis of the voltammetric data

To go more deeply into the behavior of GC/SiO₂-PSS electrodes, a kinetic analysis of their electrochemical performance has been carried out. Two assumptions have been taken into account: First, both oxidized and reduced forms of the electroactive species have similar diffusion coefficients, $D_O \sim D_R$. The second assumption was that the energy barriers for the electron transfer are symmetrical, which means that $\alpha \sim 0.5$.

The kinetic reversibility of an electrochemical reaction can be evaluated from cyclic voltammetry experiments thanks to a dimensionless parameter ψ , which is derived from the voltammetric peak-to-peak separation (ΔE_p), as determined by the Nicholson method [33]. The numerical values of ψ can be obtained either from the original Nicholson's paper for quasi-reversible reactions or from the numerical approach developed by Mahé et al [34]. Alternatively, the system reversibility can be evaluated by means of an equivalent parameter, Λ , which was defined by Matsuda and Ayabe [35, 36] as:

$$\Lambda = \psi\sqrt{\pi} \quad (\text{Eq. 1})$$

It is usually assumed that an electrode process will be kinetically reversible for $\Lambda > 15$, quasi-reversible for $15 \geq \Lambda \geq 0.001$ and irreversible for Λ values lower than 0.001.

The values of ΔE_p in bare GC electrodes allows to determine Λ_{50}^{GC} (Λ at 50 mV s^{-1} scan rate). These values of Λ_{50} for each redox probe are collected in table 3.2. According to those data the redox probes can be classified kinetically as: (i) *irreversible*: $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ couple, (ii) *quasireversible*: organic probes, (dopamine, HNS4) and (iii) *reversible*: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ couple. The electrochemical response of each redox probe remains in the same kinetic category for all the scan rates checked (from 10 to 200 mV s^{-1}).

Table 3.2: Electrochemical reversibility parameter for different redox probes at a scan rate of 50 mV s⁻¹ for glassy carbon electrodes (Λ_{50}^{GC}) and GC/SiO₂-PSS modified electrodes ($\Lambda_{50}^{SiO_2}$). Diffusion coefficients ratio and concentrations ratio obtained from the voltammetric parameters.

Redox Probe, 1mM	Λ_{50}^{GC}	$\Lambda_{50}^{SiO_2}$	D^{SiO_2}/D	C^{SiO_2}/C
Fe ³⁺ /Fe ²⁺	7.9×10^{-4}	0.017	2.2×10^{-3}	28
Dopamine	9.7×10^{-4}	0.011	7.6×10^{-3}	28
HN4S	0.65	0.16	17	0.16
[Fe(CN) ₆] ³⁻ /[Fe(CN) ₆] ⁴⁻	>15*	0.79	>1	<1

* Λ_{50}^{GC} cannot be evaluated for this probe because of its high reversibility

As shown in Figs. 3.3 and 3.4, the presence of the silica on the electrode surface modifies the peak-to-peak separation for each redox probe. The electron transfer still takes place on the underlying glassy carbon, but new Λ values are required for the coated electrode (Λ^{SiO_2}).

The values obtained at 50 mV s⁻¹ are listed in Table 3.2, where the redox processes involving dopamine and Fe³⁺/Fe²⁺ show higher $\Lambda_{50}^{SiO_2}$ (more reversibility) at SiO₂-modified electrodes than at bare GC. For example, for the cationic Fe³⁺/Fe²⁺ couple it rises from $\Lambda_{50}^{GC} = 7.9 \times 10^{-4}$ to $\Lambda_{50}^{SiO_2} = 0.017$.

The relationship between the standard rate constant, k^o , for the electron transfer of the electrochemical reaction and the Λ parameter was shown by Matsuda [35]:

$$\Lambda = k^o \sqrt{\frac{RT}{nFDv}} \quad (\text{Eq. 2})$$

According to this Eq. 2 two factors govern the value of Λ at constant temperature: the diffusion coefficient (D) and the standard rate constant for the charge transfer (k^o).

The value of k^o is not affected by the deposited SiO_2 , because this layer is non-electroactive. Consequently, the ratio between parameters $\Lambda^{GC}/\Lambda^{\text{SiO}_2}$ can be used to estimate the ratio between diffusion coefficients, since:

$$\frac{\Lambda^{GC}}{\Lambda^{\text{SiO}_2}} = \sqrt{\frac{D^{\text{SiO}_2}}{D}} \quad (\text{Eq. 3})$$

where D^{SiO_2} is the apparent diffusion coefficient across the silica film and the D is the bulk diffusion coefficient. Table 3.2 shows values of D^{SiO_2}/D for dopamine and iron cations, that are in good agreement with the results reported by other authors using SiO_2 matrices [37-41].

It has been also reported that the ionic mobility within SiO_2 materials can be affected by electrostatic interactions with pore walls [31, 32, 42]. This is very significant in our particular case because under the experimental conditions employed in this work, SiO_2 is negatively charged due to the presence of PSS. As a result, it can be observed that the reversibility of the

redox process for the negatively-charged redox couples (monitored by Λ_{50}) decreases considerably at silica modified electrodes.

The diffusion coefficient ratios listed in Table 3.2 strongly suggest that positively charged ions show electrostatic affinity with the sulfonated silica walls while negative species diffuse faster through the layer.

The magnitude of the interaction between SiO₂-PSS and each redox probe can be estimated from the electrochemical data by means of a Randles-Sevcik analysis. The voltammetric peak current evolution with the scan rate is displayed in Fig. 3.5. Despite the high linearity of those plots, the classical Randles-Sevcik equation can be only applied to reversible systems:

$$I_p(rev) = 2.687 \times 10^5 A C n^{3/2} (D\nu)^{1/2} \quad (\text{Eq. 4})$$

where A is the electrode area in square centimeters, C the concentration of the redox probe in mol cm⁻³, n the number of electrons transferred, D the diffusion coefficient of the redox probe in cm² s⁻¹ and ν the scan rate in V s⁻¹. The application of this equation to both quasireversible and irreversible systems is possible provided that the experimental peak current value, $I_p(exp)$, is corrected by a new function, $K(\Lambda)$, which depends on the peak-to-peak separation and then on the scan rate employed:

$$I_p(rev) = \frac{I_p(exp)}{K(\Lambda)} \quad (\text{Eq. 5})$$

where $K(\Lambda)$ was defined by Matsuda and Ayabe [35] and accounts for the kinetic factor that governs the peak current. Indeed, Eq. 5 can be inserted in Eq. 4 to obtain a generalized form of the Randles-Sevcik expression that can be applied to non-reversible systems [36]. In order to fit with the Randles-Sevcik equation, the value of the experimental peak current, $I_p(exp)$, should be divided by the particular values of $K(\Lambda)$ obtained at different scan rates (those values are provided in the Appendix as supporting information, Figs. A7 to A10). In this way, a corrected value for the peak current, $I_p(rev)$, is obtained at each scan rate for each redox probe. Assuming that the electrode area remains constant after silica deposition, the quotient between $I_p^{GC}(rev)$ for bare glassy carbon electrodes and for silica-modified electrodes, $I_p^{SiO_2}(rev)$, provides the relative concentration of the redox probe:

$$\frac{I_p^{SiO_2}(rev)}{I_p^{GC}(rev)} = \frac{C^{SiO_2}}{C} \sqrt{\frac{D^{SiO_2}}{D}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Where C^{SiO_2} is the apparent concentration inside the SiO_2 matrix. Additional cyclic voltammetry experiments demonstrated that the electrode active area was not affected by the deposited silica (see Appendix, Fig. A11).

The values of C^{SiO_2}/C listed in table 3.2 indicate that the apparent concentration of the cationic redox probes inside silica is higher than the bulk analytical concentrations. This result can be interpreted in the light of the electrostatic interactions between negatively charged SiO₂-PSS and positive redox probes. Similar confinement of cationic redox probes was reported for sulfonated-ormosil hydrogels [43].

Regarding the anionic redox probes, HN4S and ferro/ferricyanide, table 2 shows that their apparent concentration inside silica are lower than in the bulk solution. There exist electrostatic repulsions between the silica pores and these anions.

4. Conclusions

Porous, electrically insulating SiO₂ layers containing polystyrene sulfonate were deposited on glassy carbon electrodes by an electrochemically assisted deposition method. The obtained material was characterized by microscopic, spectroscopic and thermal techniques. FTIR spectroscopy assured the incorporation of PSS to the SiO₂ matrix and the amount of PSS in the dry material was close to 5% wt, as estimated from TG experiments. The porosity of the samples was characterized by physical adsorption of N₂ and CO₂, BET and DFT analysis confirmed that the pore size of the hydrogel is not a hindrance for diffusion because is larger than

the redox probes sizes. Obviously, hydrogel pores should be significantly larger than dry sample pores and, consequently, higher than the molecular size of the redox probes used for the voltammetric experiments.

It was found that the presence of SiO₂-PSS modifies the electrochemical response of the glassy carbon substrate against selected redox probes. Positively charged species show reduced diffusivities and increased apparent concentrations within the SiO₂-PSS pores in comparison with the bare GC electrode. The opposite behaviour was found for negatively charged redox probes. In conclusion the silica matrix modulates the affinity of the electrode for the electroactive species.

5. References

1. R. Gangopadhyay, A. De, *Chem. Mater.*, 12 (2000) 608.
2. J. J. Gooding, *Electrochimica Acta*, 50 (2005) 3049.
3. M. M. Collinson, A. R. Howells, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 702.
4. C. F. S. G. W. Brinker, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press Limited, San Diego, CA 92101, 1990.
5. A. G. Mayes, K. Mosbach, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 16 (1997) 321.
6. A. Bossi, F. Bonini, A. P. F. Turner, S. A. Piletsky, *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 1131.
7. A. Walcarius, *Electroanalysis*, 13 (2001) 701.
8. A. Katz, M. E. Davis, *Nature*, 403 (2000) 286.
9. C. W. Jones, K. Tsuji, M. E. Davis, *Nature*, 393 (1998) 52.
10. A. Walcarius, *Chem. Mater.*, 13 (2001) 3351.
11. A. Walcarius, *Electroanalysis*, 10 (1998) 1217.
12. S. Lowell, Joan E. Shields, Martin A. Thomas, Matthias Thommes, *Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2006.
13. D. Cazorla-Amorós, J. Alcañiz-Monge, A. Linares-Solano, *Langmuir*, 12 (1996) 2820.
14. D. Cazorla-Amorós, J. Alcañiz-Monge, M. A. Casa-Lillo, A. Linares-Solano, *Langmuir*, 14 (1998) 4589.
15. R. Esquembre, J. A. Poveda, C. R. Mateo, *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009) 7534.
16. U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem. Soc. Rev.* Y1 - 2009///, 38 (2009) 453.

17. D. Salinas-Torres, F. Montilla, F. Huerta, E. Morallón, *Electrochimica Acta*, 56 (2011) 3620.
18. O. Lev, Z. Wu, S. Bharathi, V. Glezer, A. Modestov, J. Gun, L. Rabinovich, S. Sampath, *Chem. Mater.*, 9 (1997) 2354.
19. R. Shacham, D. Avnir, D. Mandler, *Adv. Mater.*, 11 (1999) 384.
20. M. Sheffer, A. Groysman, D. Mandler, *Corrosion Science*, 45 (2003) 2893.
21. G. H. A. Therese, P. V. Kamath, *Chem. Mater.*, 12 (2000) 1195.
22. A. Gamero-Quijano, F. Huerta, D. Salinas-Torres, E. Morallón, F. Montilla, *Electrocatalysis*, 4 (2013) 259.
23. M. Muroya, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 157 (1999) 147.
24. J. R. Martinez, F. Ruiz, Y. V. Vorobiev, F. Perez-Robles, J. Gonzalez-Hernandez, *The Journal of Chemical Physics*, 109 (1998) 7511.
25. P. Innocenzi, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 316 (2003) 309.
26. E. B. Orlor, D. J. Yontz, R. B. Moore, *Macromolecules*, 26 (1993) 5157.
27. J. C. Yang, M. J. Jablonsky, J. W. Mays, *Polymer*, 43 (2002) 5125.
28. N. M. Reynolds, J. D. Savage, S. L. Hsu, *Macromolecules*, 22 (1989) 2867.
29. N. Ishihara, T. Seimiya, M. Kuramoto, M. Uoi, *Macromolecules*, 19 (1986) 2464.
30. M. Etienne, A. Quach, D. Grosso, L. Nicole, C. m. Sanchez, A. Walcarius, *Chem. Mater.*, 19 (2007) 844.
31. V. Ganesan, A. Walcarius, *Langmuir*, 20 (2004) 3632.
32. M. D. Petit-Dominguez, H. Shen, W. R. Heineman, C. J. Seliskar, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 703.
33. R. S. Nicholson, *Anal. Chem.*, 37 (1965) 1351.
34. E. Mahe, D. Devilliers, C. Comminellis, *Electrochimica Acta*, 50 (2005) 2263.

35. H. Matsuda, Y. Ayabe, *Zeitschrift fur Elektrochemie*, 59 (1955) 494.
36. A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, 1980.
37. D. J. Dickson, B. Lassetter, B. Glassy, C. J. Page, A. F. T. Yokochi, R. L. Ely, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 102 (2013) 611.
38. M. Kanungo, M. M. Collinson, *Langmuir*, 21 (2005) 827.
39. J. Kukulka-Walkiewicz, M. Opallo, *Solid State Ionics*, 157 (2003) 263.
40. M. Opallo, J. Kukulka-Walkiewicz, *Electrochimica Acta*, 46 (2001) 4235.
41. A. Walcarius, V. Ganesant, *Langmuir*, 22 (2006) 469.
42. A. R. Howells, P. J. Zambrano, M. M. Collinson, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 5265.
43. W. M. Aylward, P. G. Pickup, *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 3897.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Preámbulo del capítulo 4

En el capítulo 3 se realizó el atrapamiento de especies poliméricas mientras se efectuaba el depósito electroasistido del sol-gel de sílice. En el presente capítulo se plantea un objetivo adicional como es el de atrapar materiales nanoestructurados de interés electroquímico en las matrices de sílice. De entre esos materiales, se escogió los nanotubos de carbono de pared única (SWCNT) por presentar conocidas propiedades electrocatalíticas y estar bien caracterizados en la bibliografía.

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación (*D. Salinas-Torres y colaboradores; “Study on electroactive and electrocatalytic surfaces of single walled carbon nanotube-modified electrodes”*) habían indicado que los nanotubos de carbono de pared simple poseen propiedades electrocatalíticas particulares. En concreto, se había observado que los SWCNT depositados directamente sobre substratos electródicos de carbono vítreo eran capaces de transferir la carga eléctrica al analito en disolución a través de sus paredes o de sus puntas, en función de cuál fuera la naturaleza química de ese analito. Por otro lado, el método empleado para depositar los SWCNT (drop-casting) mostraba uno de los problemas más habituales que se presentan al trabajar con nanomateriales en estado sólido: el de la “aglomeración” de las nanoestructuras debida las fuertes interacciones

intermoleculares superficiales. Esta aglomeración de nanotubos de carbono, sin afectar a la cinética del proceso electrocatalítico, generaba ramilletes (bundles) que contenían cientos de nanotubos y que terminaban por disminuir el área electroactiva expuesta a la disolución, un parámetro significativo desde el punto de vista del rendimiento catalítico del material.

Con estos antecedentes, en el capítulo que se presenta a continuación se propone un nuevo método para atrapar nanotubos de carbono de pared única en capas delgadas de sílice. La novedad consiste en realizar simultáneamente en una misma etapa el depósito de la sílice y la inclusión del material electrocatalítico. Es decir, se pretende obtener un co-depósito electroasistido de ambos materiales para conseguir una mejor dispersión de los SWCNT.

Después de caracterizar el electrodo, se realizará un análisis electroquímico fundamental que, en este caso, estará dirigido al estudio de las velocidades de transferencia de carga a especies redox en disolución. Se espera que al incorporar un material de propiedades electrónicas superiores en comparación con el substrato de carbono vítreo y la película sílice, se obtenga una mejora de los perfiles voltamétricos que se puedan interpretar como mejora de la electrocatálisis.

Capítulo 4

Electrocatalytic performance of
SiO₂-SWCNT nanocomposites prepared
by electroassisted deposition



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Abstract

Composite materials made of porous SiO₂ matrices filled with single-walled carbon nanotubes (SWCNT) were deposited on electrodes by an electro-assisted deposition method. The synthesized materials were characterized by several techniques, showing that porous silica prevents the aggregation of SWCNT on the electrodes, as could be observed by TEM microscopy and Raman spectroscopy. Different redox probes were employed to test their electrochemical sensing properties. The silica layer allows the permeation of the redox probes to the electrode surface and improves the electrochemical reversibility indicating an electrocatalytic effect by the incorporation of dispersed SWCNT onto the silica films.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. Introduction

The detection and measurement of extremely small amounts of molecules of biological interest is a recent challenge in chemical analysis and biomedicine. The need for smaller, faster, and simpler sensors for molecular analysis has stimulated the development of new electrocatalytic materials and therefore of new electrochemical devices [1, 2]. In this evolution process, the size of the working materials reached soon the nanometer scale (thin films, nanoparticles, nanotubes, graphene, etc.), approaching the size of the target molecules [2-5]. This point is of significant interest because most of the nanomaterials exhibit novel electronic, optical or mechanical properties, which are inherent to the nanoscale dimension.

Most of nanomaterials are isotropic, however single-walled carbon nanotubes (SWCNT) can be considered as one-dimensional structures because of their large length-to-width ratio. Besides, they constitute an interesting group of materials in electrocatalysis due to their outstanding results as sensing elements. Electrodes modified with carbon nanotubes have been applied to the electroanalytical determination of a great amount of species (tyrosine, insulin, quercetin, dopamine, uric acid, NADH, among others) [6-11] and have been used as transducers for direct electron transfer to redox enzymes [12, 13].

However, carbon nanotubes show strong tendency to aggregation when they are deposited on the substrate (as a result of the strong π - π attractive interaction between the tube walls). It results in a limited sensibility of the electrochemical devices [14]. This is a common problem shared by most of the electrodes modified with nanomaterials [15-19].

When the aggregation takes place, some of the physicochemical properties, which appeared thanks to the nanostructured character of the material, are usually lost in the macroscopic measurement. A clear example of that was presented in our previous work in which glassy carbon electrodes were modified with SWCNT. Those electrodes presented enhanced electrocatalytic performance for several redox probes (such as dopamine, ascorbic acid, quinones and $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) [20]. However, despite the significant enlargement of the heterogeneous electron transfer rate observed, in most cases less than 1% of the electrode surface was actually transferring charge to species in solution. Such a low value revealed that most carbon nanotubes were aggregated and therefore, that the surface corresponding to the carbon nanotube walls was blocked.

Hence, achieving a real dispersion of the active material onto the supporting electrode is a key point in the field of nanostructured sensors. A simple way could be the immobilization of the material inside a porous inorganic matrix. Some reports show how carbon nanotubes or

nanoparticles can be dispersed in mesoporous SiO₂ structures obtained by either chemical vapor deposition [21-23] or sol-gel methods [24-28].

In previous studies, we showed that the pores of an electrochemically deposited SiO₂ matrix could be filled with a conducting polymer like polyaniline [29, 30]. Such a result opened up the possibility of producing other hybrid SiO₂-based nanostructures with a conductive character and therefore appropriate for electrochemical applications.

The present work shows the preparation of silica matrices filled with single-walled carbon nanotubes (SWCNT) in a single electrochemical step on glassy carbon substrates. Raman spectroscopy, imaging techniques and electrochemical methods have been used to characterize the obtained material. The modified electrodes have been applied to the electrochemical sensing of standard redox probes.

2. Experimental part

2.1. Reagents and equipment

SWCNT were purchased from Cheap Tubes Inc. (Brattleboro, VT, USA) with a purity of 95% and 1-2 nm of diameter. SWCNT were used without further purification. Tetraethyl orthosilicate (TEOS) (Sigma-Aldrich), iron (II) sulfate heptahydrate (Merck, p.a.), Potassium chloride (Merck, p.a.),

iron (III) sulfate hydrate (Panreac, p.a.), dopamine (DA, Sigma-Aldrich p.a.), poly(4-styrenesulfonic acid) 18% wt. (PSS, Sigma-Aldrich), hydrochloric acid (Merck, p.a.) and sulfuric acid (Merck, p.a.) were also used as received. All solutions were prepared with purified water obtained from an Elga Labwater Purelab system (18.2 M Ω cm).

Electrochemical experiments were performed in conventional electrochemical glass cells. The working electrode was a glassy carbon bar (GC, Carbone Lorraine). The working electrode GC was carefully polished with fine emery paper and diamond suspension (Buehler, 1 μ m and 0.25 μ m) over cloth and then ultrasonically cleaned in distilled water. A platinum wire was employed as counter electrode, and a reversible hydrogen electrode (RHE) introduced in the same electrolyte solution placed in a Luggin capillary was used as reference electrode.

Cyclic voltammograms were performed with an Autolab PGSTAT30 equipped with a SCAN-GEN module. The current density was calculated from the geometric area of the electrode. The surface texture of the electrodes was studied by scanning electron microscopy (SEM JEOL JSM-840) and transmission electron microscopy (TEM JEOL model JEM-2010). Confocal raman spectra were collected with a FT-Raman (Bruker RFS/100) model using a Nd-YAG laser source (1064 nm).

2.2. Preparation of SWCNT@SiO₂ modified electrodes

The carbon nanotubes were encapsulated in pure silica matrices, during its deposition on glassy carbon electrodes. Initially, 2 stock solutions were prepared following the next procedure:

Solution 1: Stable SWCNT aqueous suspensions were obtained as follows, 100 mg of SWCNT were poured into a vial containing 20 ml of 1% poly(4-styrenesulfonic acid) aqueous solution. This mixture was stirred with an ultrasonic probe VIRTIS (Virsonic 475, 475W maximum output power) at 1 minute intervals for 1h. To avoid overheating, samples were air-cooled between sonication intervals. This suspension is stable for several months, due to the formation of SWCNT-PSS assemblies, as described by Dobbins and co-workers[31].

Solution 2: Silica stock solution was prepared through the alcohol-free sol-gel route [32, 33]. 1.00 mL of TEOS was mixed under vigorous stirring with 2.52 mL of a 0.46M KCl+0.01M HCl solution in a closed vessel. After 2 hours, the resulting sol was submitted to evaporation by vacuum heating till the complete removal of the released ethanol coming from alkoxyde hydrolysis.

For the modification of glassy carbon electrodes 2.52 mL of solution **1** – SWCNT suspension– was poured into solution **2** –alcohol-free silica

precursor—. Achieving the complete removal of ethanol from the silica precursor solution is a key point, since the SWCNT-PSS assemblies are unstable in the presence of alcohol.

This mixture containing SWCNT and the hydrolyzed silica precursor was placed in an electrochemical glass cell which contained a platinum wire counter electrode and a reversible hydrogen reference electrode.

The deposition of silica was performed potentiostatically by the immersion of a polished GC working electrode in the precursor solution, where was pre-conditioned at a constant potential of 0.0 V and then stepped down to -1.2V for 60 seconds to trigger the deposition of the silica film. Hydrogen evolution upon electrochemical reduction of water at this potential leads to a pH rise in the electrode surroundings. This induces the collapse of silica colloids near the electrode surface and favours their deposition. As a result, the silica film traps the suspended SWCNT to form the material called SWCNT@SiO₂. Further details on the deposition method are given elsewhere [30].

3. Results and discussion

3.1. Characterization of SWCNT@SiO₂ composites

Fig. 4.1 shows SEM micrographs obtained from a bare glassy carbon electrode and the same electrode after the electrochemically assisted deposition of the SWCNT@SiO₂ composite.

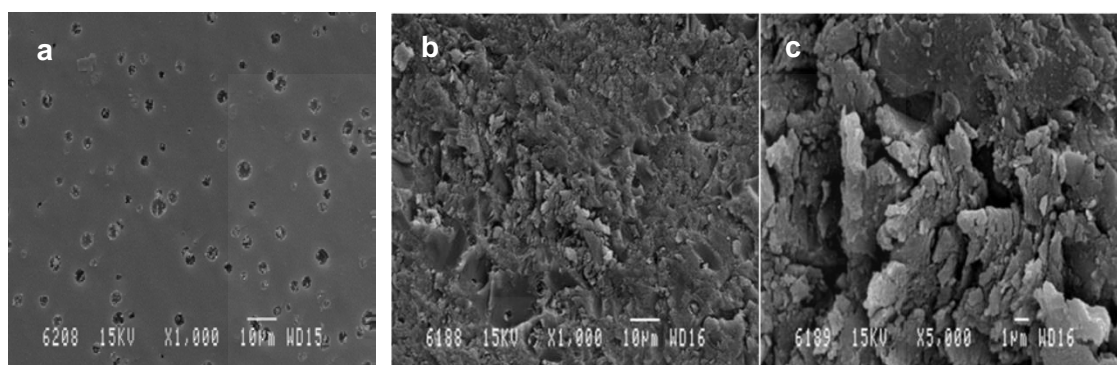


Figure 4.1.- SEM micrographs acquired at different magnifications from: a) bare glassy carbon electrode, b) and c) glassy carbon substrate after the electroassisted deposition of the SWCNT@SiO₂ composite.

The surface morphology of the silica-encapsulated SWCNT looks very rough compared with bare glassy carbon substrate, although SWCNT structures cannot be detected at these magnifications. Both images contrast with the surface morphology observed for a SWCNT-modified glassy carbon electrode prepared by drop-casting from DMF suspensions. In that case, the morphology was characterized by the presence of carbon nanotube aggregates with diameters ranging between 30 and 80 nm. It was

attributed to the presence of nanotube bundles formed by 200–1600 units [20].

Transmission electron microscopy seems more appropriate to observe the inner structure of the silica matrix and, hence, to check the eventual incorporation of carbon nanotubes. TEM images recorded from the SWCNT@SiO₂ deposit are presented in figure 2 at different magnifications.

In contrast, the images of Fig. 4.1 are compatible with a better SWCNT dispersion after the electrochemically assisted deposition. Obviously, the presence of SWCNT encapsulated within the silica film must be confirmed by additional techniques, as TEM microscopy or Raman spectroscopy.

The silica deposits are characterized by its globular aspect, which is due to the electrochemically assisted deposition of silica colloids. Some SWCNT aggregates can be observed in Fig 4.2b and 4.2c. These aggregates comprise around 3-10 SWCNT, and in some cases, isolated single-walled carbon nanotubes can be observed, as in Fig. 4.2d. These images prove that SWCNT can be effectively incorporated and isolated within the porous silica matrix.

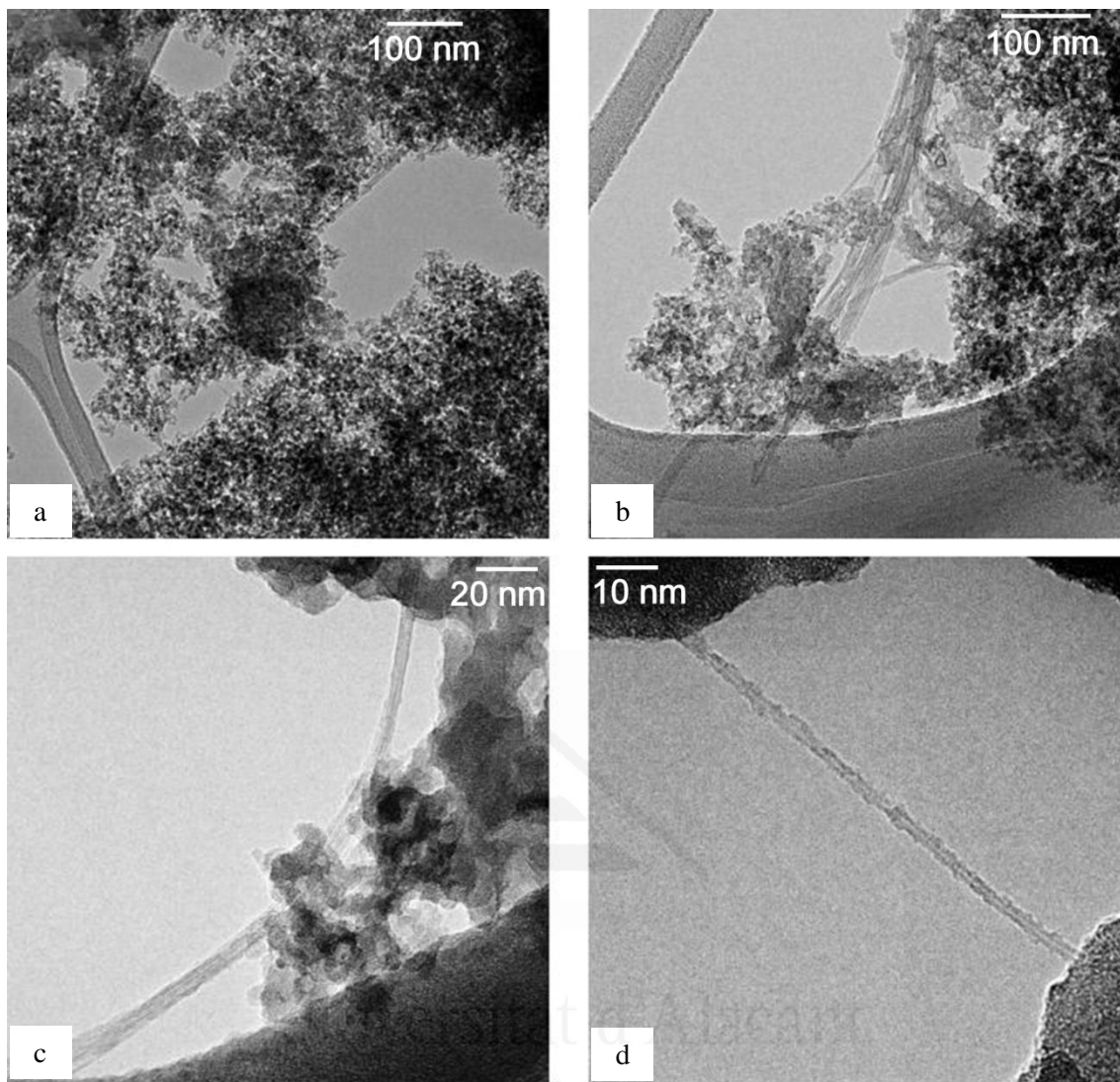


Figure 4.2.- TEM micrographs of SWCNT@SiO₂ composites prepared by electroassisted deposition. (a) General view of the SWCNT@SiO₂ composite; (b) and (c) details of nanotubes bundles; (d) isolated SWNT found in-between SiO₂ aggregates.

Raman spectroscopy has become an important tool in the characterization of carbon materials because this technique is particularly sensitive to the microstructure of the carbon. The Raman response of these materials results from the scattering of light from carbon lattice phonons. So, additional evidences on the incorporation and aggregation state of SWCNT into SiO₂ are expected from Raman spectroscopy experiments.

Fig. 4.3 shows two set of spectra recorded in different frequency regions from the bare glassy carbon substrate (GC), carbon nanotubes deposited on glassy carbon from DMF solutions (SWCNT) and carbon nanotubes electrochemically incorporated into the silica structure (SWCNT@SiO₂).

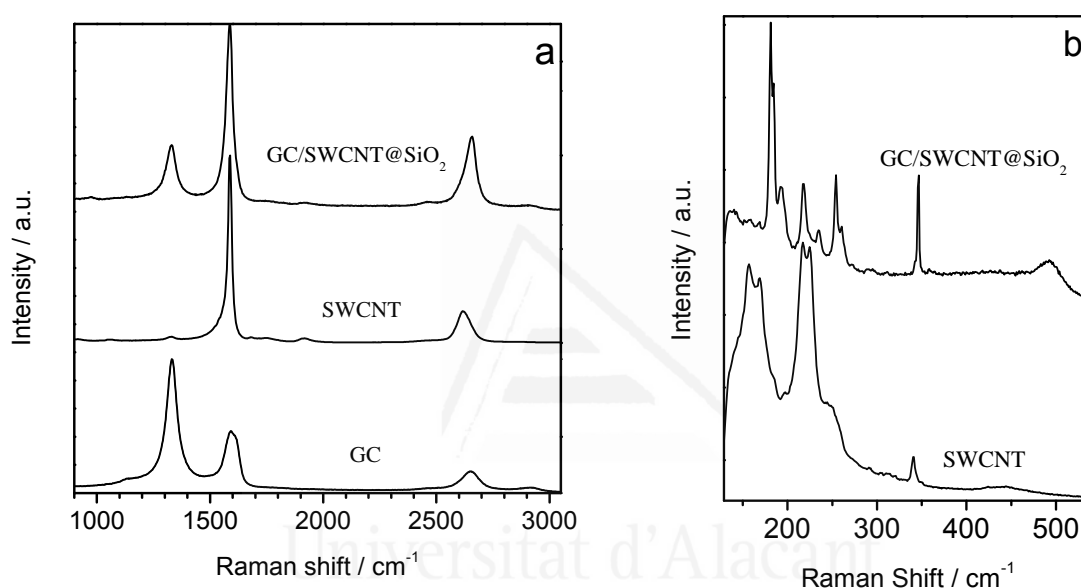


Figure 4.3:- Raman spectra recorded (a) in the full frequency range and (b) RBM frequency region for: Bare glassy carbon electrode (labelled as GC), SWCNT powder from a DMF suspension (labelled as SWCNT) and SWCNT@SiO₂ prepared by electroassisted deposition deposited on a GC electrode (labelled as GC/SWCNT@SiO₂).

The spectrum of GC is characterized by the presence of bands at 1331, 1592 and 2652 cm⁻¹. The former band is known as D-band and it is originated from the A_{1g} in-plane breathing vibration and corresponds to disordered sp² bonds or defects. The band at 1592 cm⁻¹, G-band or graphite tangential band arises from the E_{2g} in-plane vibration and comes from

carbon atoms showing sp^2 hybridization and planar configuration. Finally, the high-energy band around 2600 cm^{-1} corresponds to an overtone of the D-band.

The intensity ratio of the former two bands (I_D/I_G) is considered as a parameter to assess the degree of disorder of the sample. The spectrum of the bare glassy carbon substrate is characterized by the high relative intensity of the feature assigned to disordered carbon species. On the contrary, D-band vanishes when SWCNT powder is deposited on a GC electrode, and the spectrum is dominated by the G-band, which reveals the presence of well-ordered sp^2 carbon domains. Fig. 4.3(a) shows, for the GC/SiO₂-SWCNT electrode, both G and D bands sample. It should be noted that the relative intensity of the G band is significantly higher than in the case of the bare GC spectrum. From this observation, it is confirmed the presence of highly ordered carbon species, which supports the incorporation of SWCNT into the silica matrix.

An additional proof on the presence and aggregation state of the SWCNT at silica is obtained from the examination of the low-energy Raman spectrum in fig. 4.3b. That spectral region corresponds to the *Radial Breathing Modes* (RBM) of carbon nanotubes. As expected, bare GC do not show active modes in this frequency range (spectrum not shown), but

the presence of RBM bands in the other two samples proves the incorporation of carbon nanotubes to the SiO₂ host matrix.

The RBM features are extremely sensitive to the presence of aggregated carbon nanotubes. The spectrum of the SWCNT prepared from DMF suspensions are characterized by the presence of two main convoluted bands at wavenumbers (around 160 and 220 cm⁻¹). It has been shown by O'Connell et al [34] that bundling effects produce red shifting of the RBM frequency, compared with the spectra of isolated nanotubes.

The spectrum of the GC/SWCNT@SiO₂ sample presents several well-defined and narrow bands at 180, 193, 218, 236, 254 and 347 cm⁻¹. Assuming that these modes correspond to individual nanotubes (according to the above TEM results the assumption is feasible) the recorded frequencies can be related with diameters ranging between 0.73 and 1.44 nm [35, 36]. The higher energies of those vibrations indicate that SWCNT present a better dispersion than the previous sample. The results obtained from both spectroscopic and microscopic techniques reveal that SWCNT are properly incorporated, and well dispersed within the silica porous matrix.

3.2. Analysis of the electrochemical performance of SWCNT@SiO₂-modified electrodes

An organic (dopamine) and an inorganic (Fe²⁺/Fe³⁺ couple) standard redox probes have been employed to study the electrochemical properties of SWCNT@SiO₂-modified electrodes. Those redox probes were chosen for the evaluation of electron transfer kinetics from the different carbon electroactive sites. The Fe²⁺/Fe³⁺ redox couple is strongly electrocatalyzed at oxidized carbon surfaces [37]. This redox system is particularly sensitive to the presence of the surface oxygen groups, specifically to the presence of carbonyl species on the carbon surface, which happens mainly in the nanotubes tips [20]. Dopamine redox probe is characterized by the specific adsorption of the quinone-like species on basal planes of the carbon electrodes, i.e. nanotube walls [37]

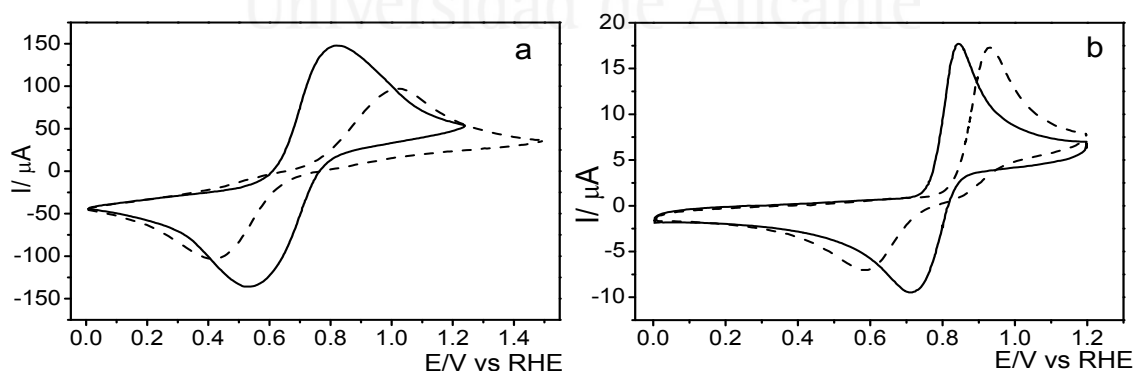


Figure 4.4.- Stabilized cyclic voltammograms of glassy carbon electrodes (GC, dashed lines) or glassy carbon electrodes modified with single walled carbon nanotubes incorporated into silica layers (GC/SWCNT@SiO₂, solid lines). Test solutions: (a) 0.5 M H₂SO₄ + 10 mM iron (II) sulfate/ 10 mM iron (III) sulfate solution and (b): 0.5 M H₂SO₄ + 1mM dopamine solution; scan rate: 50 mV/s; electrode geometric area: 0.07 cm².

Fig. 4.4a shows the stabilized voltammograms recorded in 10 mM iron (II) sulfate / iron (III) sulfate solution for bare glassy carbon electrodes or covered with the SWCNT@SiO₂ composite. For the GC electrode, an anodic peak appears at 1.03 V reflecting the Fe²⁺ to Fe³⁺ oxidation (E_{ox}) during the positive-going potential sweep. In the reverse scan the faradaic counter-process takes place and a reduction peak is recorded at E_{red}= 0.42 V. For the GC/SWCNT@SiO₂ electrode, the oxidation peak appears shifted to lower values (E_{ox}=0.82V). The same electrocatalytic effect can be observed for the cathodic process, which is shifted to more positive potentials (E_{red}=0.52V). The peak separation drops from 610 mV, for the bare GC electrode, down to 300 mV in the presence of SWCNT.

Fig. 4.4.b shows the stabilized cyclic voltammogram for the dopamine probe. The oxidation peak for dopamine on the GC electrode appears at 0.93V in the forward scan, whereas the counter-process (dopaminequinone reduction) takes place with a reduction peak centered at 0.58V in the backward sweep, peak separation amounts to 350 mV for the bare GC electrode.

Strong electrocatalytic effect is observed for both anodic and cathodic processes after the modification of the electrode with SWCNT@SiO₂. The oxidation peak shifts to 0.84V and the reduction peak moves to 0.71V, which yields a peak separation of 130 mV.

The electrocatalytic effect observed can be quantified by the calculation of the heterogeneous transfer rate constant K° (cm s^{-1}). From the voltammetric peak-to-peak separations obtained at different scan rates, a value for K° can be obtained by applying the Nicholson's method. More details on the procedure for this analysis can be found in our previous paper [20].

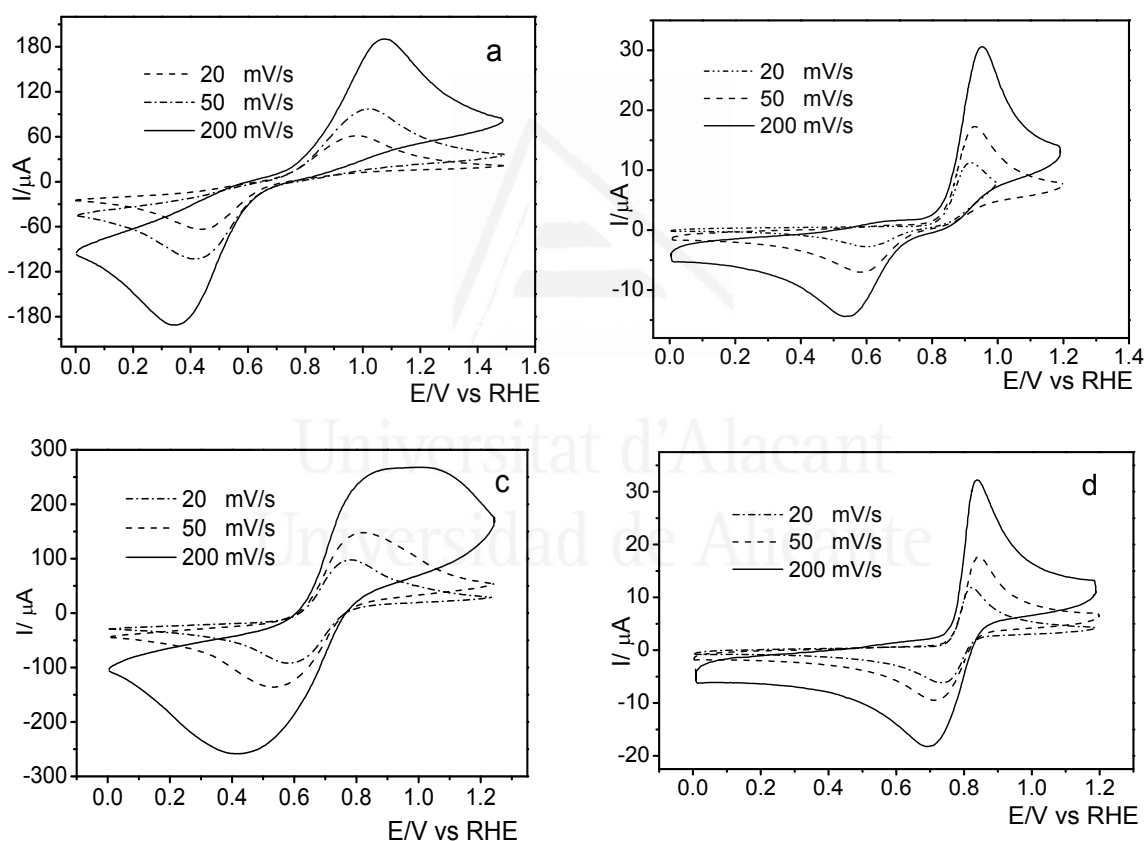


Figure 4.5: Steady state cyclic voltammograms recorded at different scan rates for: a) GC in 0.5 M H_2SO_4 + 10 mM iron (II) sulfate/ 10 mM iron (III) sulfate solution; b) GC in 0.5 M H_2SO_4 + 1 mM dopamine solution. c) GC/SWCNT@ SiO_2 in 0.5 M H_2SO_4 + 10 mM iron (II) sulfate/ 10 mM iron (III) sulfate solution; d) GC/SWCNT@ SiO_2 in 0.5 M H_2SO_4 + 1 mM dopamine solution. Electrode geometric area: 0.07 cm^2 in all cases.

Fig. 4.5 shows stabilized cyclic voltammograms of GC and GC/SWCNT@SiO₂ electrodes recorded at various scan rates in the test solutions. As expected, both the oxidation and the reduction currents raise as the scan rate is increased. The peak separation becomes higher as higher the scan rate, which reveals the quasireversible character of the redox processes involved.

Table 4.1 shows the peak separations, ΔE_p , and corresponding K° values calculated for the redox probes. The obtained K° values on the bare glassy carbon electrodes were $4.9 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ for dopamine and $1.1 \times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ for Fe²⁺/Fe³⁺ system. After the chemical modification of GC with SWCNT, the transfer rate constant increases significantly in more than one order of magnitude for both redox probes.

Table 4.1. Values for the voltammetric peak separation (ΔE_p) at 50 mV s^{-1} and heterogeneous transfer rate constant (K°) for dopamine and Fe²⁺/Fe³⁺ redox probes

Redox Probe	Electrode	ΔE_p (mV)	K° (cm·s ⁻¹)
Fe ²⁺ /Fe ³⁺	GC	610	1.1×10^{-5}
	GC/SWCNT@SiO ₂	300	2.4×10^{-4}
Dopamine	GC	350	4.9×10^{-6}
	GC/SWCNT@SiO ₂	130	5.9×10^{-4}

A similar improvement of the transfer rate was already observed in our previous studies, where GC electrode surface were modified SWCNT deposited from a DMF suspension [20]. The methodology for the SWCNT deposition presented here provides much higher dispersion of SWCNT on the electrode surface than in the previous study. In other words, a similar electrocatalytic efficiency is obtained with much less quantity of carbon nanotubes deposited.

Another physicochemical factor of particular interest in electrocatalysis is the so-called *electroactive area*. Obviously, the electroactive area of an electrocatalyst is related with its geometric area. As a result, the higher the exposed surface, the higher currents recorded across the electrode-solution interface. Nevertheless, the true significance of the electroactive area is that reveals which portion of surface remains available for the transfer of charge to species in solution. In other words, it measures the efficiency of the exposed surface to the electrocatalytic reaction.

The electroactive area can be estimated by the Randles-Sevcik equation [38], which relates the peak current, I_p , with the square root of the scan rate. A linear plot means that the process is controlled by the electron transfer as follows:

$$I_p = 2.687 \times 10^5 A C n^{3/2} (D\nu)^{1/2} \quad (2)$$

Where I_P is the peak current, C is the bulk concentration of the electroactive redox species, n is the number of electrons transferred, D is the diffusion coefficient, ν is the scan rate and A is the electroactive area.

Fig. 4.6 shows Randles-Sevcik plots for the different redox probes. The linear trend across the whole range of scan rates reveals that the processes are controlled by the diffusion of species in the electrolytic solution. The actual values of electroactive area for each reaction were obtained from the slope of the Randles-Sevcik representations and listed in Table 4.2.

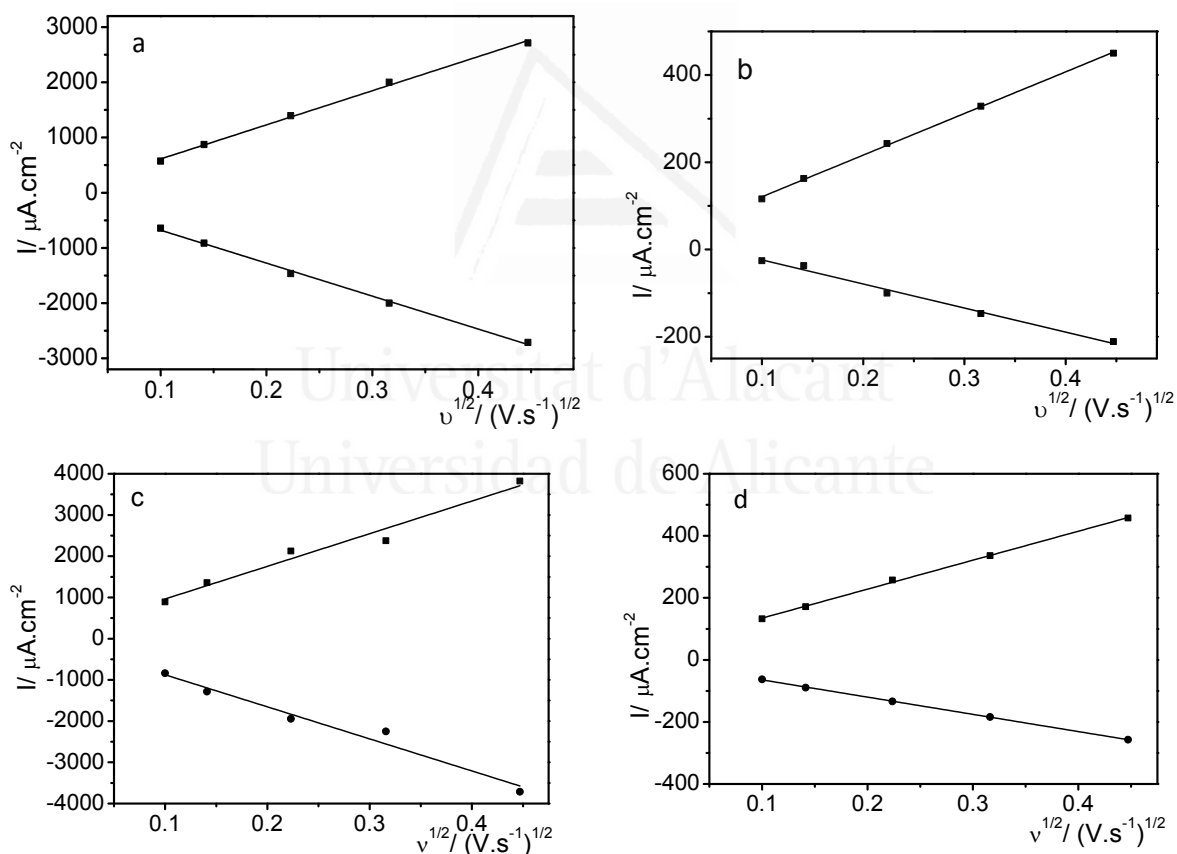


Figure 4.6: Randles-Sevcik plots obtained from voltammetric data for: a) GC in 10 mM $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ solution; b) GC in 1 mM dopamine solution; c) GC/SWCNT@ SiO_2 in 10 mM $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ solution; d) GC/SWCNT@ SiO_2 in 1 mM dopamine solution. Electrode geometric area: 0.07 cm^2 in all cases.

It has been demonstrated above that the nanotubes have been incorporated within the silica matrix by the different experimental techniques (TEM, Raman and cyclic voltammetry). However, it is remarkable that little or no variation is observed in the electroactive area.

This latter point is particularly intriguing because of the significantly higher K^\bullet reported in Table 4.1 for the SWCNT@SiO₂ deposit. It seems like only a small fraction of carbon nanotubes are electrochemically active for the charge transfer. It indicates that many SWCNT remain electrically isolated from the conducting substrate and, consequently, part of their electrochemical properties goes to waste. The future challenge is actually to find a suitable way to connect the dispersed nanotubes with the electrode surface.

Table 4.2: Electroactive area for the electron transfer derived from the Randles-Sevcik equation for Fe²⁺/Fe³⁺ and dopamine redox probes.

Redox probe	Electrode	Randles-Sevcik slope	Electroactive Area (cm²)
Fe ²⁺ /Fe ³⁺	GC	4.33 x10 ⁻⁴	0.066
	GC/SWCNT@SiO ₂	5.54 x10 ⁻⁴	0.084
Dopamine	GC	6.69 x10 ⁻⁵	0.034
	GC/SWCNT@SiO ₂	6.54 x10 ⁻⁵	0.033

4. Conclusions

The present work shows the synthesis of silica matrices filled with SWCNT. The composite material was prepared on glassy carbon substrates by an electroassisted-deposition method. TEM images and Raman spectroscopy results show that the electroassisted deposition constitutes an effective way to achieve high dispersions of SWCNT within porous layers of SiO₂.

The electrochemical properties of the SWCNT@SiO₂ composite material were tested against either organic (dopamine) or inorganic (Fe³⁺/Fe²⁺) redox probes. Thanks to its porous structure, the silica layer allows the permeation of the redox probes to the electrode surface. The improved reversibility for the redox probes studied is due to the electrocatalytic effect provided by the SWCNT dispersed within the silica matrix.

The value of electroactive area, which measures the efficiency of the exposed surface to the catalytic reaction, rises after dispersion of SWCNT in SiO₂. However, the obtained figures are still far from their theoretical maxima, probably showing that a significant number of nanotubes, being accessible, remain electrically isolated from the electrode surface.

This work shows that the electroassisted deposition of silica is a suitable technique to deposit dispersed nanotubes. Generally, nanostructured materials such as graphene, nanoparticles, nanotubes or quantum dots, among others, present a strong tendency to aggregation causing a significant loss of their special properties when deposited on a solid substrate. The results shown in this work make the electro-assisted deposition a feasible way to prevent aggregation and to improve the electrocatalytic performance of nanostructured catalysts.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

5. References

1. P. Alivisatos, *Nature Biotechnology*, 22 (2004) 47.
2. S. Stankovich, D. A. Dikin, G. H. Dommett, K. M. Kohlhaas, E. J. Zimney, E. A. Stach, R. D. Piner, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, *Nature*, 442 (2006) 282.
3. D. W. Schaefer, R. S. Justice, *Macromolecules*, 40 (2007) 8501.
4. M. Endo, M. S. Strano, P. M. Ajayan, *Carbon Nanotubes*, 111 (2008) 13.
5. C. E. Banks, R. G. Compton, *Analyst*, 131 (2006) 15.
6. R. H. Baughman, A. A. Zakhidov, W. A. de Heer, *Science*, 297 (2002) 787.
7. Y. H. Lin, F. Lu, Y. Tu, Z. F. Ren, *Nano Letters*, 4 (2004) 191.
8. B. R. Azamian, J. J. Davis, K. S. Coleman, C. B. Bagshaw, M. L. H. Green, *Journal of the American Chemical Society*, 124 (2002) 12664.
9. W. Yang, K. Ratinac, S. Ringer, P. Thordarson, J. F. Gooding, F. Braet, *Angewandte Chemie International Edition*, 49 (2010) 2114.
10. C. E. Banks, R. G. Compton, *Analyst*, 130 (2005) 1232.
11. I. Mazurenko, M. Etienne, O. Tananaiko, V. Zaitsev, A. Walcarius, *Electrochimica Acta*, 83 (2012) 359.
12. J. M. P. Paloma Yáñez-Sedeño, J. Riu, F. X. Rius, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29 (2010) 939.
13. Z. Wang, M. Etienne, S. P+Àller, W. Schuhmann, G. W. Kohring, V. Mamane, A. Walcarius, *Electroanalysis*, 24 (2012) 376.
14. R. Bandyopadhyaya, E. Nativ-Roth, O. Regev, R. Yerushalmi-Rozen, *Nano Letters*, 2 (2002) 25.
15. C. Park, Z. Ounaies, K. A. Watson, R. E. Crooks, J. Smith, S. E. Lowther, J. W. Connell, E. J. Siochi, J. S. Harrison, T. L. S. Clair, *Chemical Physics Letters*, 364 (2002) 303.
16. O. Matarredona, H. Rhoads, Z. R. Li, J. H. Harwell, L. Balzano, D. E. Resasco, *Journal of Physical Chemistry B*, 107 (2003) 13357.

17. L. Vaisman, H. Wagner, G. Marom, *Advances in Colloid and Interface Science*, 128 (2006) 37.
18. Y. Xing, *J. Phys. Chem. B*, 108 (2004) 19255.
19. J. Liang, Y. Huang, L. Zhang, Y. Wang, Y. Ma, T. Guo, Y. Chen, *Adv. Funct. Mater.*, 19 (2009) 2297.
20. D. Salinas-Torres, F. Huerta, F. Montilla, E. Morallón, *Electrochimica Acta*, 56 (2011) 2464.
21. Z. F. Ren, Z. P. Huang, J. W. Xu, J. H. Wang, P. Bush, M. P. Siegal, P. N. Provencio, *Science*, 282 (1998) 1105.
22. W. Z. Li, S. S. Xie, L. X. Qian, B. H. Chang, B. S. Zou, W. Y. Zhou, R. A. Zhao, G. Wang, *Science*, 274 (1996) 1701.
23. M. Terrones, N. Grobert, J. Olivares, J. P. Zhang, H. Terrones, K. Kordatos, W. K. Hsu, J. P. Hare, P. D. Townsend, K. Prassides, A. K. Cheetham, H. W. Kroto, D. R. M. Walton, *Nature*, 388 (1997) 52.
24. J. H. Rouse, *Langmuir*, 21 (2005) 1055.
25. X. B. Yan, B. K. Tay, Y. Yang, *Journal of Physical Chemistry B*, 110 (2006) 25844.
26. J. Lim, P. Malati, F. Bonet, B. Dunn, *Journal of the Electrochemical Society*, 154 (2007) A140-A145.
27. L. D. Zhu, C. Y. Tian, J. L. Zhai, R. L. Yang, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 125 (2007) 254.
28. R. Toledano, D. Mandler, *Chem. Mater.*, 22 (2010) 3943.
29. F. Montilla, M. A. Cotarelo, E. Morallón, *J. Mater. Chem.*, 19 (2009) 305.
30. D. Salinas-Torres, F. Montilla, F. Huerta, E. Morallón, *Electrochimica Acta*, 56 (2011) 3620.
31. T. Dobbins, R. Chevious, Y. Lvov, *Polymers*, 3 (2011) 942.
32. R. o. Esquembre, J. A. Poveda, C. R. Mateo, *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009) 7534.
33. M. L. Ferrer, R. Esquembre, I. Ortega, C. R. Mateo, F. del Monte, *Chem. Mater.*, 18 (2005) 554.

34. M. J. O'Connell, S. Sivaram, S. K. Doorn, *Phys. Rev. B*, 69 (2004) 235415.
35. Domingo C., Santoro G., *Opt. Pura Apl*, **40** (2007) 175.
36. M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito, A. Jorio, *Physics Reports*, 409 (2005) 47.
37. R. L. McCreery, *Chem. Rev.*, 108 (2008) 2646.
38. C.G.Zoski, *Handbook of Electrochemistry*; 1^a ed.; Elsevier: Amsterdam, 2007.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Preámbulo del capítulo 5

El uso de materiales de sílice como soportes de especies electrocatalíticas nanoestructuradas permite aprovechar el proceso sol-gel por depósito electroasistido para su atrapamiento físico a partir las suspensiones coloidales precursoras. Sin embargo, precisamente el carácter dieléctrico de la matriz de sílice parece constituir, a priori, un punto en contra para su uso en electrocatálisis. Debe tenerse en cuenta que en electrocatálisis se suelen emplear catalizadores de precio elevado (metales nobles, nanotubos de carbono, grafeno, etc) o difíciles de sintetizar o de extraer (enzimas sintéticas, enzimas naturales, metaloproteínas, etc). Si, finalmente, estos materiales quedan aislados dentro de la matriz de sílice, lejanos a la superficie del electrodo e inactivos por no poder interactuar eléctricamente con éste, el resultado podría ser, por un lado, poco estimulante desde el punto de vista científico y, por otro, claramente antieconómico. Esto es precisamente lo que ha ocurrido con los nanotubos de carbono encapsulados en el electrodo modificado desarrollado en el capítulo 4.

Es, por lo tanto, necesario solucionar este problema buscando la forma de poner en contacto las especies que se encuentran aisladas eléctricamente en el seno de la sílice con el electrodo soporte. Una primera idea que podría solucionar el problema consistiría en la introducción de un hilo conductor

que interconecte la superficie del electrodo soporte con el electrocatalizador. Este hilo podría ser metálico pero hay que tener en cuenta que la superficie del electrodo se encuentra recubierta de sílice amorfa con una porosidad aleatoria que dificultaría la nucleación del metal además una razón de mayor importancia es el costo monetario relacionado a las cantidades de masa relativa de metal noble necesaria para rellenar los poros, siendo este último argumento el que terminaría por descartar la hipótesis planteada con hilos metálicos. Otra alternativa sería emplear un material conductor, no necesariamente metálico, sino que se comportara “como un metal”, que pudiera crecer a pesar de los impedimentos morfológicos que presenta la sílice y que fuera fácil de sintetizar electroquímicamente. Los materiales de este tipo son los polímeros conductores intrínsecos o polímeros π conjugados.

Nuestro grupo de investigación ya había realizado estudios (Montilla y colaboradores; “*Hybrid sol-gel-conducting polymer synthesised by electrochemical insertion: tailoring the capacitance of polyaniline*”) relacionados con el crecimiento de un polímero conductor a través de la porosidad de la sílice mediante inserción reactiva (polimerización electroasistida). En estos trabajos se polimerizó anilina a través de los poros de la sílice utilizándola como plantilla (*template*) para minimizar el

entrecruzamiento de las cadenas poliméricas y permitir obtener un electrodo modificado con capacidades electroquímicas mejoradas.

En el capítulo que se presenta a continuación, se busca reforzar la deficiencia electrónica que presenta la matriz de sílice encargada de inmovilizar nanotubos de carbono. Esto se realizará mediante la inserción de un polímero conductor como la polianilina dentro de la red de sílice. Se intentará que el polímero conductor actúe como “hilo conductor” (wiring) entre el electrodo soporte de carbono vítreo y aquellos nanotubos de carbono que se encuentran aislados eléctricamente en el seno de la red de sílice. De esta manera, se pretende obtener una mejora en el desempeño electroquímico del material electrodo frente a sondas redox específicas. Se espera que esto conduzca a una mejora de la cinética de la reacción y a un incremento del área electroactiva frente a los valores obtenidos para los electrodos de carbono vítreo modificados únicamente con SWCNT y SiO₂.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 5

Enhancement of the Electrochemical
Performance of SWCNT dispersed in a
Silica Sol-gel Matrix by Reactive
Insertion of a Conducting Polymer.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Abstract

The electroassisted encapsulation of Single-Walled Carbon Nanotubes was performed into silica matrices (SWCNT@SiO₂). This material was used as the host for the potentiostatic growth of polyaniline (PANI) to yield a hybrid nanocomposite electrode, which was then characterized by both electrochemical and imaging techniques. The electrochemical properties of the SWCNT@SiO₂-PANI composite material were tested against inorganic (Fe³⁺/Fe²⁺) and organic (dopamine) redox probes. It was observed that the electron transfer constants for the electrochemical reactions increased significantly when a dispersion of either SWCNT or PANI was carried out inside of the SiO₂ matrix. However, the best results were obtained when polyaniline was grown through the pores of the SWCNT@SiO₂ material. The enhanced reversibility of the redox reactions was ascribed to the synergy between the two electrocatalytic components (SWCNTs and PANI) of the composite material.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. Introduction

The use of sol-gel chemistry to prepare inorganic and organic-inorganic composite materials has become a matter of interest [1, 2]. From the analytical point of view, the sol-gel process provides a relatively simple way to encapsulate chemical species in a stable host matrix like silica [3]. Besides, the versatility of the sol-gel chemistry offers many advantages for designing electrode devices and microscopic electrochemical reactors. Several synthetic routes for the production of sol-gel modified electrodes have been reported, including ways to produce surface and bulk modified electrodes, redox or electron conducting polymers, and their possible use in electrochemical sensing [2].

The sol-gel methodology applied to electrode surface modification is typically performed by coating the electrode with thin films obtained from a sol, which is obtained by the hydrolysis of metal alkoxyde precursors in water/alcohol solutions [4]. The production of sol-gel modified electrodes is usually performed by either spin coating or dip coating of the precursor solution on adequate supports.

An alternative method, which has been the focus of several studies, is the electrochemical or electro-assisted deposition method [5-9]. In particular, Shacham et al. applied the electrochemically assisted method for the deposition of titania thin films[10]. Electro-encapsulation within silica networks of several species, including conventional redox probes has been reported by Deepa et. al [11], who entrapped molecules such as basic blue 41, methylene-blue, $\text{Fe}(\text{bpy})_3^{2+}$ and $\text{Ru}(\text{bpy})_3^2$. More recently Walcarius et al. [12]succeeded in the immobilization of redox active biomolecules such as glucose oxidase and hemoglobin.

However, from an electrochemical point of view, the use of silica networks in electrodes comes up against some difficulties, such as the lack of intrinsic electron conductivity. In order to overcome this problem, some chemical modifiers (namely, carbon nanomaterials, metal nanoparticles and conducting polymers) have been included in the inorganic matrix giving rise to hybrid silica materials [13-18]. The presence of this kind of modifiers yields enhanced electrocatalytic activity in addition to the improvement in electron conductivity.

Our research group has been recently interested in the use of electrochemistry to produce hybrid silica materials with no chemical gelification steps [19, 20]. In particular, the electrocatalytic activity of Single-Walled Carbon Nanotubes dispersed within a SiO_2 matrix was

examined against several redox probes in a recent contribution [20]. It was reported in this study that the electroencapsulation of SWCNT gives rise to a well-dispersed SWCNT load within the silica film. The electrochemical performance of glassy carbon electrodes modified by SWCNT@SiO₂ was tested against inorganic (Fe³⁺/Fe²⁺) and organic (dopamine) redox probes. Both redox couples were chosen due to their different kinetic sensitivity to specific surface sites on carbon electrodes [21]. The iron redox couple is an oxide-sensitive probe, whose electrochemical behavior allows the quantification of the electroactive area related with the graphitic edges of SWCNT i.e., the nanotube tips [20, 22]. On the other hand, the dopamine organic probe reacts preferentially at the basal planes of the graphitic domains favored by π - π interactions. In this way, the electron transfer takes place through the walls of the carbon nanotubes [22].

In our previous studies, the SWCNT@SiO₂ hybrid material showed a good electrochemical performance that improved the heterogeneous rate transfer for several redox probes [20]. However, this was followed by a minor increase in the electroactive area (the electrode area transferring the charge effectively). It was concluded that most SWCNTs remain isolated into the silica network and had not direct electrical connection with the supporting electrode. The goal of the present work is to improve the electrical contact of the dispersed carbon nanotubes by creating a conducting molecular wire

between the SWCNT and the supporting electrode. For this purpose, we have grown polyaniline through the silica pores by reactive insertion [19, 23]. The electrochemical performance of the new nanocomposite electrode, SWCNT@SiO₂-PANI, was tested against either inorganic (Fe³⁺/Fe²⁺) or organic (dopamine) redox probes and the morphology of the nanocomposite electrodes was characterized by electron microscopy.

2. Experimental Part

SWCNTs were purchased from Cheap Tubes Inc. (Brattleboro, VT, USA) with a purity of 95% and 1-2nm of diameter. SWCNTs were used without further purification. Tetraethyl orthosilicate (TEOS) (Sigma-Aldrich), iron(II) sulfate heptahydrate (Merck, PA), iron(III) sulfate hydrate (Panreac, PA), potassium chloride (Merck, PA), dopamine (Sigma-Aldrich, PA), poly(4-styrenesulfonic acid) 18wt% (PSS, Sigma-Aldrich), hydrochloric acid (Merck, PA), and sulfuric acid (Merck, PA) were also used as received. All solutions were prepared with purified water obtained from an ELGA LabWater Purelab system (18.2MΩcm).

Electrochemical experiments were performed in conventional electrochemical glass cells. The working electrode was a glassy carbon bar (GC, V-25 model, Carbone Lorraine). The GC electrode was carefully

polished with fine emery paper and alumina (Buehler, 1 and 0.5 μm) over cloth and then ultrasonically cleaned in distilled water. A platinum wire was employed as counter electrode, and a reversible hydrogen electrode introduced in the same electrolyte solution placed in a Luggin capillary was used as reference electrode.

Cyclic voltammograms were performed with a potentiostat (eDAQ EA161) and a digital recorder (eDAQ, ED401) with eDAQ EChart data acquisition software. The current density was calculated from the geometric area of the electrode (0.07 cm^2). The surface morphology of the electrodes was studied by scanning electron microscopy (SEM, JEOL JSM-840) and transmission electron microscopy (TEM, JEOL model JEM-2010). The scanning electron microscopy was performed directly on the glassy carbon working electrode. For transmission electron microscopy studies, the electrodeposited silica samples were carefully scratched from the surface of the glassy carbon electrode. This silica powder was dried by vacuum heating at 40 $^{\circ}\text{C}$, subsequently dispersed with ethanol and dosed over the sample holder. Thermogravimetric analyses were carried out for the estimation of the amount of carbon nanotubes incorporated within the silica matrices. The silica samples were subjected to thermal treatment at 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to 900 $^{\circ}\text{C}$ in 100 mL/min of nitrogen/oxygen flow (ratio 4:1).

2.1. Preparation of SWCNT@SiO₂ modified electrodes

Carbon nanotubes were encapsulated into the SiO₂ matrix simultaneously to its electrodeposition on glassy carbon electrodes. Initially, two solutions were prepared according to the following procedure:

Solution 1: Stable SWCNT aqueous suspensions were obtained as follows, 20 mg of SWCNT were poured into a vial containing 20 ml of 1% poly(4-styrenesulfonic acid) aqueous solution. The carbon nanotubes were dispersed and suspended by the applications of ultrasonic field by a VIRTIS probe (Virsonic 475, 475W maximum output power) at 1 minute intervals for 1h. To avoid overheating, samples were air-cooled between sonication intervals. This suspension is stable for several months, due to the formation of SWCNT-PSS assemblies[24].

Solution 2: Silica solution was prepared through the alcohol-free sol-gel route[20, 25-27]. 1.00 mL of TEOS was mixed under vigorous stirring with 2.52 mL of a 0.46M KCl+0.01M HCl solution in a closed vessel. After 2 hours, the resulting sol was submitted to evaporation by vacuum heating until the complete removal of the released ethanol coming from alkoxyde hydrolysis.

For the modification of the electrodes 2.52 mL of solution 1 –SWCNT suspension– was poured into solution 2 –alcohol-free silica precursor–. The complete removal of ethanol from solution 2 is a key point, since the dispersion of SWCNT-PSS assemblies are unstable in the presence of alcohol.

This mixture containing SWCNT and the hydrolyzed silica precursor was placed in an electrochemical glass cell which contained a platinum wire counter electrode and a reversible hydrogen reference electrode.

The deposition of silica was performed potentiostatically by the immersion of a polished GC electrode in the precursor solution, pre-conditioned at a constant potential of 0.0 V and then stepped down to -1.2V for 60 seconds to trigger the deposition of the silica film. Hydrogen evolution upon electrochemical reduction of water at this potential leads to a pH rise in the electrode surroundings. This induces the collapse of silica colloids near the electrode surface and favors their deposition[19, 28]. During the collapse of silica colloids near the electrode surface, the suspended SWCNT are trapped to form SWCNT@SiO₂. Further details of the deposition method are given elsewhere[19, 20]. The amount of carbon nanotubes incorporated into the electrodeposited silica matrices were determined to be around 4% by thermogravimetric analysis (see Fig. A12 in Appendix).

3. Results and discussion

3.1. Electrochemical insertion of PANI into SWCNT@SiO₂ modified electrodes

A glassy carbon electrode modified with SWCNT@SiO₂ was removed from the electrochemical cell and rinsed carefully with ultrapure water. Then, it was transferred to another cell containing a 0.5M H₂SO₄ + 0.1M aniline solution for the polymerization of PANI.

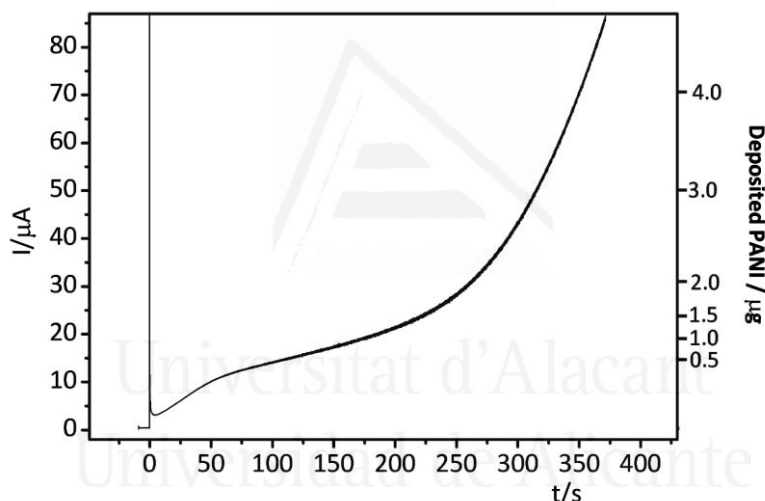


Figure 5.1.- Potentiostatic growth of polyaniline within a SWCNT@SiO₂ modified electrode. Polymerization solution: 0.5M H₂SO₄+ 0.1M aniline hydrochloride. Initial potential: +0.0V vs RHE, final potential: +1.05V vs RHE.

In order to facilitate the diffusion of aniline monomers within the silica pores, a potential of 0.0 V was applied for 60s. Then, it was applied a potential step up to +1.05 V to trigger the oxidation of aniline monomers. Fig. 5.1 shows the recorded chronoamperometric curve, where an initial

sharp current can be observed due to the charge of the electrical double-layer.

After that process, the recorded current is due to the oxidation of aniline monomers to yield polyaniline. Two well-defined current regimes can be distinguished in the chronoamperogram. The first one is characterized by a curve with concave shape and comprises the time period between the start of the experiment and the inflection point at 148 s. After that time the chronoamperometric curve changes to a convex shape and the current follows an exponential dependence.

The shape of this curve resembles the chronoamperograms obtained in some of our previous papers[19, 23]. The current recorded at times lower than the inflection point is related with the growth of PANI confined within the silica pores. On the contrary, the exponential region observed above 148 s is characteristic of the autocatalytic PANI growth. It is known that chronoamperometric curves showing exponential shape are recorded during aniline electropolymerization on bare electrode surfaces. Consequently, in Fig.5.1 the characteristic shape reveals that the polymeric chain has eventually filled up the silica pores and is spreading out of this material [19, 23]. The amount of polymer deposited in the composite material can

be controlled by monitoring the oxidation charge and assuming 2 electrons per deposited monomer unit [29].

Scanning electron microscopy has been used to examine and compare the surface of SWCNT@SiO₂-PANI composite electrodes loaded with different amounts of polyaniline. Firstly, Fig. 5.2a shows a glassy carbon electrode modified with a deposit of SiO₂ without nanotubes. It can be observed a very rough SiO₂ layer which covers all the glassy carbon substrate and shows silica particles approaching the micrometer scale.

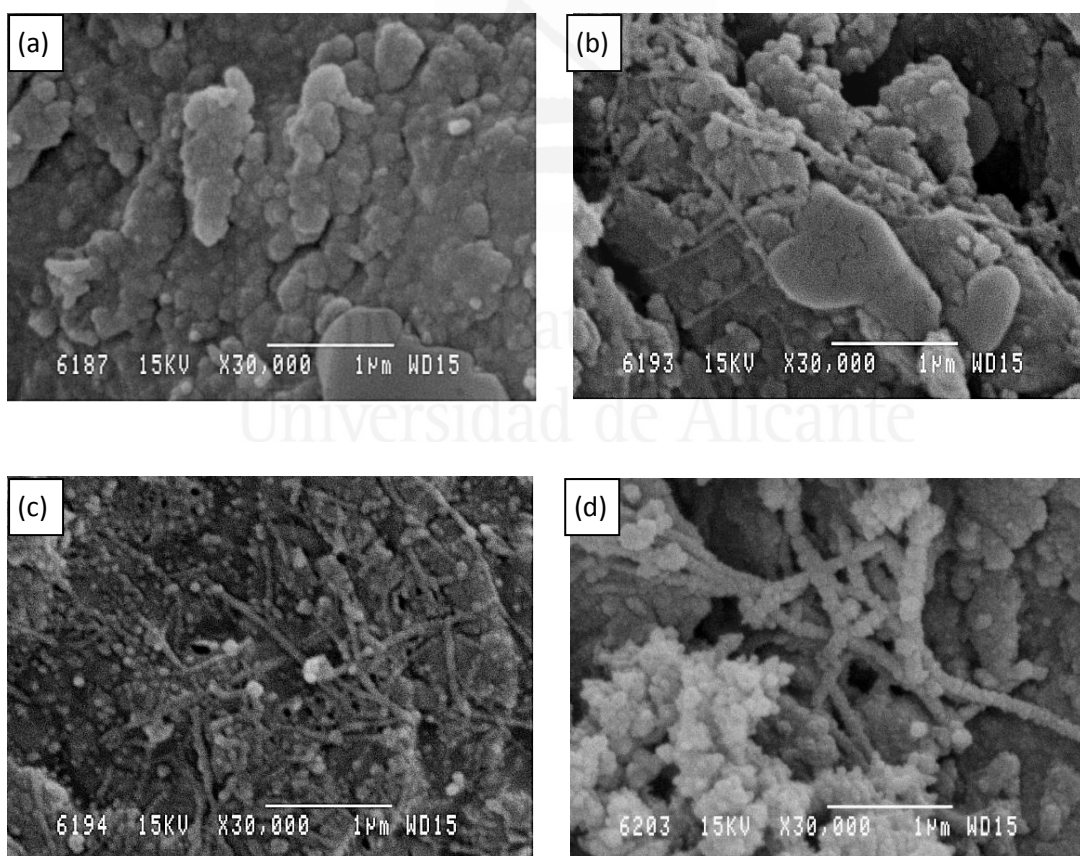


Figure 5.2.- SEM micrographs acquired at the same magnification for glassy carbon substrates modified with (a) deposit of SiO₂ and (b-d) SWCNT@SiO₂ composite filled with polyaniline: (b) 0.472 μg, (c) 0.944 μg, (d) 4.72 μg.

On the other hand, Figs. 5.2b to 5.2d show different stages of polyaniline growth on the SWCNT@SiO₂ electrode. These stages correspond to polyaniline loads of 0.472 μg (deposition time=106 s), 0.944 μg (deposition time=165 s) and 4.72 μg (deposition time=370s) along the chronoamperometric curve shown in Fig. 5.1. The surface structure of the SWCNT@SiO₂-PANI composite material loaded with 0.472 μg polyaniline shows only some dispersed SWCNT bundles, since polyaniline growth is limited to the inner surface of the material and, therefore, is not visible in the outer zone of this electrode.

However, for a higher PANI load of 0.944 μg (immediately after the inflection point in the chronoamperogram) some polymer chains have reached the outer surface of the silica layer. They appear in Fig. 5.2c as dispersed particles with diameters ranging from 50 to 100 nm. These aggregates are similar in size to those obtained on a ITO-SiO₂ electrode modified with an electrochemically synthesized PANI layer[23].

Finally, when PANI was loaded at higher amounts (Fig. 5.2d), the formation of polymer aggregates surfacing from the silica pores can be more clearly observed. The carbon nanotube bundles on the surface appear thicker, indicating that PANI grew around them. It should be noted that PANI spreads over a space that already contained SWCNT and,

consequently, an improvement of the connection between the carbon nanostructures is expected to occur.

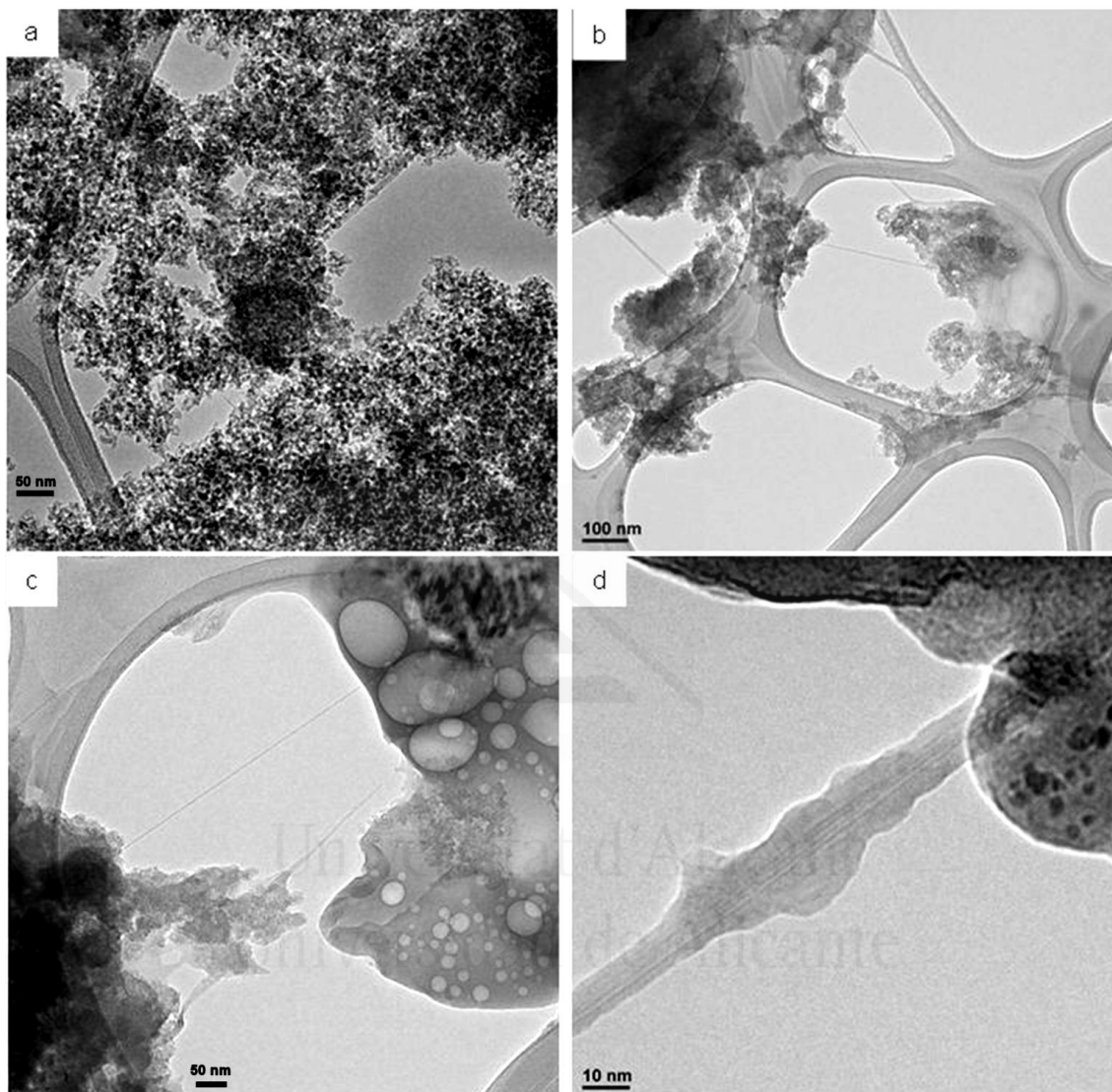


Figure 5.3.- TEM micrographs obtained for (a) SWCNT@SiO₂ composite and (b-d) SWCNT@SiO₂ composite filled with 4.72 μg of polyaniline at different magnifications.

TEM microscopy has been used to access the inner structure of the synthesized materials. Fig 5.3 shows TEM images obtained from a SWCNT@SiO₂ composite without PANI (Fig. 5.3a) and after the

deposition of 4.72 μg PANI (Fig. 5.3b-5.3d). The composite materials were scratched from the electrode surface and then deposited on the sample holder to acquire the TEM images.

The SWCNT@SiO₂ deposits in Fig. 5.3a present a globular and uniform aspect related to silica collapsed colloids. Some isolated carbon nanotubes appear in the borders of the silica island [20]. In addition to the globular silica deposits, Fig. 5.3b shows regions where electrogenerated PANI has grown. These regions can be observed in more detail in Fig. 5.3c, where also several carbon nanotubes threads crossing the silica-PANI composite can be observed. A detailed view of one of these threads is shown in Fig. 5.3d, where the nanotube structures, of around 3 nm width, appear covered with PANI.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

3.2. Electrochemical characterization of SWCNT@SiO₂-PANI composite electrodes

SWCNT@SiO₂-PANI modified electrode loaded with 0.944 μg PANI was prepared to check its electrochemical performance. That PANI load was chosen because it corresponds to the complete filling up of the SWCNT@SiO₂ film. Fig. 5.4 shows the steady-state cyclic voltammogram recorded for this material in 0.5M H₂SO₄.

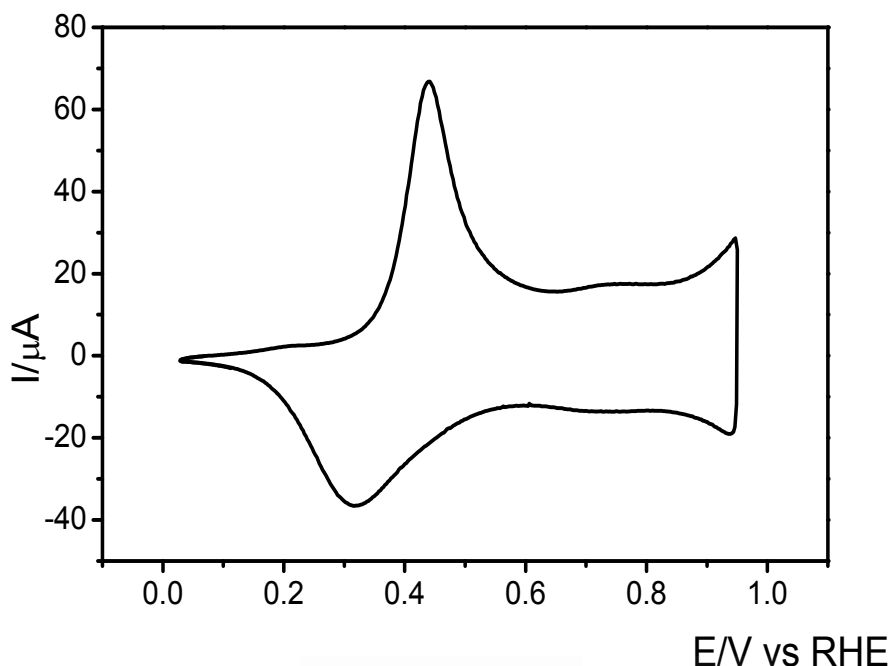


Figure 5.4.- Steady-state cyclic voltammogram for a SWCNT@SiO₂-PANI modified glassy carbon electrode in 0.5M H₂SO₄ supporting electrolyte. Scan rate: 50 mV s⁻¹.

During the forward potential scan, a sharp peak centered at 0.44V appears in the CV. This peak is related with the first redox transition of PANI from the leucoemeraldine (insulating) state to emeraldine (electronically conducting) state. On the other hand, the broad peak that can be hardly perceived at around 0.75V has been usually ascribed to the presence of quinone-like defects in the structure of the conducting polymer [23, 30]. Finally, the current arising from +0.9 V is due to the onset of the second redox transition of polyaniline from emeraldine to pernigraniline state. During the reverse scan, the corresponding reduction of emeraldine to leucoemeraldine occurs under the cathodic peak at 0.31V. In essence, the

voltammetric profile described here is very similar to that obtained for conventional polyaniline layers deposited over smooth surfaces.

The modified electrode was tested against Fe(II)/Fe(III) and dopamine (DA) redox probes. It has been reported that the iron redox couple is a surface probe sensitive to the SWCNT tips whereas the dopamine redox couple is more sensitive to the nanotube walls. Accordingly, the use of these probes allows the characterization of both types of surface sites at the composite electrode.

The electrochemical response of the iron probe at different electrodes is exposed in Fig. 5.5. The dotted line shows the behavior of Fe²⁺/Fe³⁺ couple over the bare glassy carbon electrode. The broad anodic peak centered at 1.03V appearing during the forward potential sweep is related with the iron(II) oxidation. During the reverse scan, the faradaic counter-process takes place and a reduction peak is recorded at 0.42V. These values yield a peak separation, $\Delta E_p = 610$ mV, which shows the poor electrochemical performance of this electrode towards the iron redox couple.

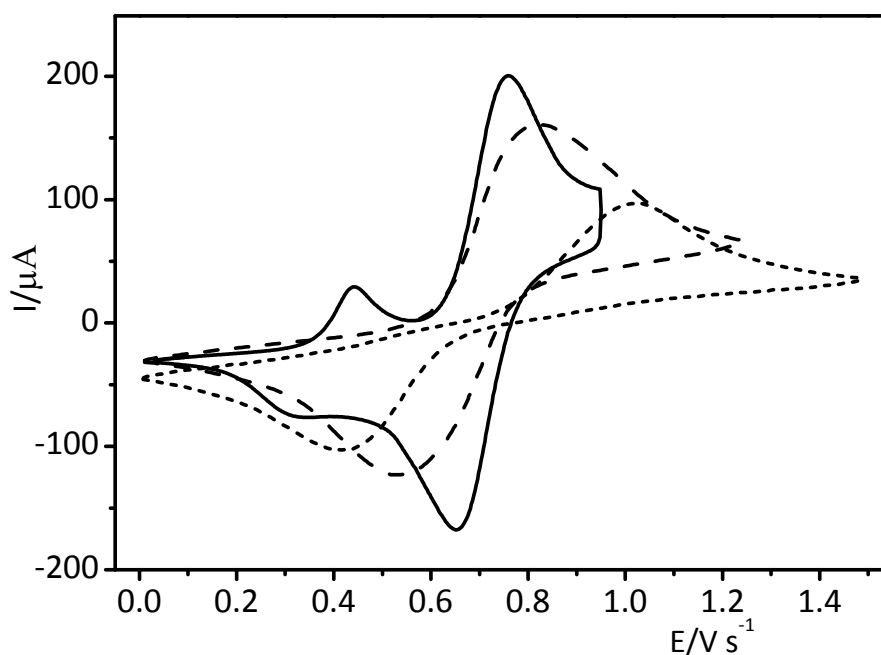


Figure 5.5.- Electrochemical response of a bare glassy carbon electrode (dotted line); electrode modified with SWCNT@SiO₂ (dashed line) and SWCNT@SiO₂-PANI composite electrodes loaded with 0.944 μg PANI (solid line) in 0.5M H₂SO₄ + 10mM FeSO₄/Fe₂(SO₄)₃.
Scan rate: 50mV s⁻¹.

When the electrode surface is modified with carbon nanotubes dispersed within the silica network (dashed line), the electrochemical reversibility of the Fe²⁺/Fe³⁺ redox couple improves considerably. The oxidation peak for iron (II) falls down to 0.82V and the reduction peak for iron (III) shifts oppositely up to 0.52V. As a result, the peak to peak separation narrows to 300 mV [20].

Finally, the response of SWCNT@SiO₂-PANI modified electrode appears as a solid line in the voltammograms. In this case, two anodic peaks appear during the forward scan. The first one, at 0.45V, is related with the

leucoemeraldine-emeraldine transition of the inserted polyaniline and the second oxidation peak at around 0.75V is related with the iron(II) oxidation. During the reverse scan, the reduction of iron (III) species appears at around 0.66V. So, the peak potential separation for this latter pair of peaks drops down to 107 mV. Table 1 summarizes these results for the $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ redox reaction at the electrodes studied.

Table 5.1. Values for the voltammetric peak separation (ΔE_p) at 50 mV s^{-1} , heterogeneous transfer rate constant (k^o) and Electroactive Surface Area (ESA) obtained in either 10mM $\text{FeSO}_4/\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ or 1mM DA solutions for different electrodes.

Electrode	ΔE_p		k^o		ESA	
	(mV)		(cm s^{-1})		(cm^2)	
	$\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$	DA	$\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$	DA	$\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$	DA
GC	610	350	1.06×10^{-5}	4.95×10^{-6}	0.0887	0.0429
SWCNT@SiO ₂	300	125	2.86×10^{-4}	3.61×10^{-4}	0.0964	0.0431
SWCNT@SiO ₂ -PANI	107	60	3.50×10^{-3}	2.04×10^{-3}	0.153	0.233
SiO ₂ -PANI	141	79	1.81×10^{-3}	1.08×10^{-3}	0.154	0.164

At this point, it is worth considering the possibility that inserted polyaniline could contribute to the improvement of the electrochemical reversibility of the iron redox reaction. To check this, a new experiment was performed in which polyaniline was grown through the pores of a SiO₂ layer without SWCNT. When this material was used as electrode for the $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$

reaction, it was found a peak to peak separation close to 141 mV (the voltammogram is shown in the Supporting Information, Fig. A13). Such a value falls between those for SWCNT@SiO₂ and SWCNT@SiO₂-PANI. So, the electrode containing both carbon nanotubes and polyaniline shows better electrochemical reversibility. It seems that there exists a synergistic effect of SWCNT and polyaniline on the redox behavior of Fe²⁺/Fe³⁺.

The electrochemical response of these electrodes was also tested against the dopamine redox probe as shown in Fig. 5.6.

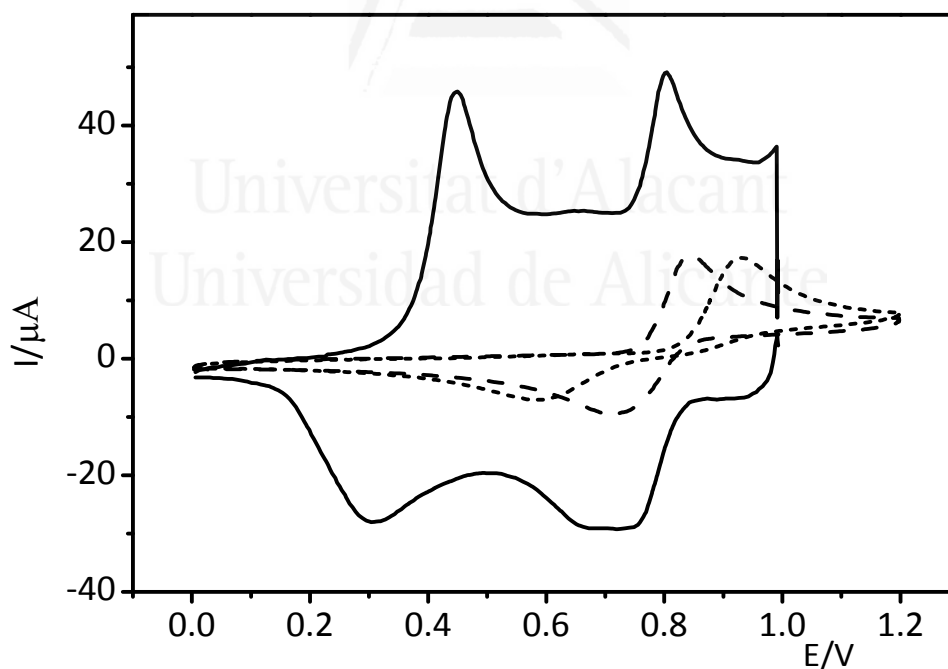


Figure 5.6.- Electrochemical response of a bare glassy carbon electrode (dotted line); electrode modified with SWCNT@SiO₂ (dashed line) and SWCNT@SiO₂-PANI composite electrodes loaded with 0.944 μg PANI (solid line) in 0.5M H₂SO₄ + 1mM dopamine. Scan rate: 50mV s⁻¹.

Steady-state cyclic voltammograms were recorded for GC (dotted line) SWCNT@SiO₂ (dashed line) and SWCNT@SiO₂-PANI (solid line) in 0.5M H₂SO₄ + 1mM dopamine solution. It is clearly derived from these voltammetric curves that the improvement in electrochemical reversibility for DA redox reaction follows a similar pattern to that of Fe²⁺/Fe³⁺. Table 1 shows the peak to peak separation for the glassy carbon electrode, 350 mV. Such a value decreases to 125 mV when the electrodes are modified with carbon nanotubes dispersed within the silica matrix. The best electrochemical response is found for the silica deposit modified with both PANI and SWCNT. In that case the measured ΔE_p is as low as 60 mV.

The contribution of polyaniline to the improvement of the electrochemical reversibility of this redox reaction was determined by checking the response of an electrode modified with hollow SiO₂ (with no nanotubes inserted) and polyaniline grown through its pores. In this case, the peak separation is 79 mV (the voltammogram is shown in the Supporting Information, Fig. A14). All these results confirm a clear synergistic effect between carbon nanotubes and PANI.

From ΔE_p data shown in Table 1, standard rate constants for the electron transfer, k^o , have been calculated according to the Nicholson method [31]. The obtained parameters for each redox reaction and modified electrode are summarized in Table 1. Regarding the standard rate constants (k^o) it can be

observed that the GC electrodes show the lowest figures for both redox probes. An improvement of this parameter was achieved after the modification with carbon nanotubes-silica matrices. However, the best result is attained for the silica network that contains SWCNT connected by conducting polyaniline, with an improvement of the rate constant higher than 2 orders of magnitude for each redox probe. The k^o values obtained for SWCNT@SiO₂-PANI modified electrodes are in the order of 10⁻³ cm s⁻¹ for both redox probes. These values are similar to those obtained after the modification of GC electrodes with SWCNT prepared by drop-casting[22]. The major advantage of the method presented in this work is the lower amount of electrocatalytic material (SWCNT) used, which is 20 times lower than in that previous work.

Also the Electroactive Surface Area (ESA) of the electrode materials, i.e. the real area transferring charge to redox probes, has been evaluated. This has been done from Randles-Sevcik plots of peak current vs the square root of the scan rate (see Fig. A15 and A16 in the Supporting Information). The linear trends show that the electron transfer takes place from the modified electrode surface to dissolved species in all cases.

Significant differences in the electroactive area can be found in Table 1 between the two redox probes studied. For the GC electrode the Fe²⁺/Fe³⁺ reaction occurs at an effective electrode area close to 0.09 cm². This value

slightly increases when the transfer takes place at SiO₂ filled with SWCNT, but almost doubles when polyaniline is added to the composite electrode. The presence of carbon nanotubes has little effect in this parameter and the ESA measured is similar for SWCNT@SiO₂-PANI or SiO₂-PANI modified electrodes (0.15 cm²). To interpret correctly this result, it should be noted that the surface sites for the electron transfer from iron ions are located at both the oxidized tips of SWCNT and the inserted PANI chains. Since the active area of the SWCNT tips is as low as 0.4% of their geometric area for this particular probe[19], the addition of polyaniline to the electrode material will dominate the final number of active sites. As a result, those electrodes filled with PANI show almost the same electroactive area for the Fe²⁺/Fe³⁺ redox reaction. The effect of SWCNT is then restricted to an improvement of the electrode kinetics by means of k^o .

More important effects, in terms of changes in ESA, are due to carbon nanotubes are expected for dopamine redox probe, since it is known that the electron transfer for this organic compound occurs at the walls of SWCNT[19]. From the Randles-Sevcik slope, the electroactive surface area was calculated for this redox probe and the values are shown in the last column in Table 1. For the dopamine reaction taking place on either bare glassy carbon or SWCNT@SiO₂ modified electrodes, the area remains as low as 0.04 cm². A significant improvement of this figure is obtained after

electrode modification with PANI but the best result in terms of ESA is obtained in the presence of carbon nanotubes. The electrode modified only with PANI shows an area of 0.16 cm^2 , which is similar to that for the iron redox probe. However the electrode modified with carbon nanotubes and PANI shows an area of 0.23 cm^2 , a value five times higher for the same reaction than the area of a SWCNT@SiO₂ modified electrode. This result strongly suggests that PANI serves as a conducting connector for the carbon nanotubes dispersed in the silica matrix.

4. Conclusions

The present contribution shows the electrochemical synthesis of porous composite electrodes prepared on glassy carbon substrates and made of silica, single walled carbon nanotubes and polyaniline. The imaging techniques reveal a good dispersion of SWCNT within the porous layer of SiO₂ and the successful coating of these structures by the potentiostatically inserted polyaniline.

The electrochemical properties of the SWCNT@SiO₂-PANI composite material were tested against either inorganic (Fe³⁺/Fe²⁺) or organic (dopamine) redox probes. Thanks to its porous structure, the silica layer allows the permeation of the redox probes to the inner material.

Consequently, the electron transfer takes place inside of the nanocomposite electrode to species in solution, a point that is confirmed by the kinetic analysis.

The electrochemical reversibility of these redox probes at a glassy carbon electrode is rather poor. The electron transfer constants for the electrochemical reactions increased significantly when a dispersion of either SWCNT or PANI was carried out inside of the SiO₂ matrix. However, the best results were obtained when polyaniline was grown through the pores of the SWCNT@SiO₂ material. It was concluded that the improved electrochemical reversibility was due to synergistic effects between the electrocatalytic components of the composite.

5. References

1. A. Walcarius, *Chem. Mater.*, 13 (2001) 3351.
2. O. Lev, Z. Wu, S. Bharathi, V. Glezer, A. Modestov, J. Gun, L. Rabinovich, S. Sampath, *Chem. Mater.*, 9 (1997) 2354.
3. M. M. Collinson, A. R. Howells, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 702.
4. C. J. Brinker, G. C. Frye, A. J. Hurd, C. S. Ashley, *Thin Solid Films*, 201 (1991) 97.
5. M. M. Collinson, D. A. Higgins, R. Kommidi, D. Campbell-Rance, *Anal. Chem.*, 80 (2008) 651.
6. M. M. Collinson, N. Moore, P. N. Deepa, M. Kanungo, *Langmuir*, 19 (2003) 7669.
7. I. Zhitomirsky, *Advances in Colloid and Interface Science*, 97 (2002) 279.
8. A. Walcarius, E. Sibottier, M. Etienne, J. Ghanbaja, *Nat Mater*, 6 (2007) 602.
9. M. M. Collinson, *Acc. Chem. Res.*, 40 (2007) 777.
10. R. Shacham, D. Avnir, D. Mandler, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 31 (2004) 329.
11. P. N. Deepa, M. Kanungo, G. Claycomb, P. M. A. Sherwood, M. M. Collinson, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 5399.
12. O. Nadzhafova, M. Etienne, A. Walcarius, *Electrochemistry Communications*, 9 (2007) 1189.
13. D. K. Yi, S. T. Selvan, S. S. Lee, G. C. Papaefthymiou, D. Kundaliya, J. Y. Ying, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 4990.
14. J. Wang, P. V. A. Pamidi, D. S. Park, *Electroanalysis*, 9 (1997) 52.
15. K. Gong, M. Zhang, Y. Yan, L. Su, L. Mao, S. Xiong, Y. Chen, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 6500.
16. S. Watcharotone, D. A. Dikin, S. Stankovich, R. Piner, I. Jung, G. H. B. Dommett, G. Evmenenko, S. E. Wu, S. F. Chen, C. P. Liu, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, *Nano Lett.*, 7 (2007) 1888.

17. H. Schmidt, *J Sol-Gel Sci Technol*, 1 (1994) 217.
18. S. H. Joo, J. Y. Park, C. K. Tsung, Y. Yamada, P. Yang, G. A. Somorjai, *Nat Mater*, 8 (2009) 126.
19. D. Salinas-Torres, F. Montilla, F. Huerta, E. Morallón, *Electrochimica Acta*, 56 (2011) 3620.
20. A. Gamero-Quijano, F. Huerta, D. Salinas-Torres, E. Morallón, F. Montilla, *Electrocatalysis*, 4 (2013) 259.
21. R. L. McCreery, *Chem. Rev.*, 108 (2008) 2646.
22. D. Salinas-Torres, F. Huerta, F. Montilla, E. Morallón, *Electrochimica Acta*, 56 (2011) 2464.
23. F. Montilla, M. A. Cotarelo, E. Morallon, *J. Mater. Chem.*, 19 (2009) 305.
24. T. Dobbins, R. Chevious, Y. Lvov, 2011.
25. I. Pastor, A. Salinas-Castillo, R. Esquembre, R. Mallavia, C. R. Mateo, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2010) 1526.
26. M. L. Ferrer, F. del Monte, D. Levy, *Chem. Mater.*, 14 (2002) 3619.
27. R. Esquembre, J. A. Poveda, C. R. Mateo, *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009) 7534.
28. R. Shacham, D. Avnir, D. Mandler, *Adv. Mater.*, 11 (1999) 384.
29. G. Inzelt, M. Pineri, J. W. Schultze, M. A. Vorotyntsev, *Electrochimica Acta*, 45 (2000) 2403.
30. L. Duic', Z. Mandic', S. Kovac', *Electrochimica Acta*, 40 (1995) 1681.
31. R. S. Nicholson, *Anal. Chem.*, 37 (1965) 1351.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Preámbulo del capítulo 6

En los capítulos anteriores, cuando se caracterizó electroquímicamente un electrodo modificado con sílice, nos preocupamos por la superficie del electrodo y los fenómenos de transporte de masa que se experimentan, por la cinética de la reacción y por la reversibilidad del proceso de oxidación-reducción, todo ello con el objetivo de mejorar el proceso global de transferencia electrónica.

El movimiento de electrones a través materiales inorgánicos u orgánicos no biológicos como los metales, los nanotubos de carbono o los polímeros conductores ha sido objeto de intensa investigación por parte de la ciencia electroquímica desde sus inicios hasta la actualidad. Sin embargo, el estudio de los procesos de transferencia electrónica en materiales biológicos ha experimentado un auge mucho más reciente. Se sabe que las células vivas también utilizan esta transferencia de carga eléctrica para llevar a cabo muchos procesos biológicos pero que, en estos casos, los electrones fluyen de una manera muy diferente a como lo hacen en los materiales no biológicos: por ejemplo, el movimiento de electrones no se realiza, en ningún caso, a lo largo de cables o alambres metálicos. En lugar de ello, en las células y tejidos vivos los electrones son transportados de

uno en uno, transfiriéndose habitualmente de proteína en proteína o, en otros casos, de una especie química a otra. De esta manera, los electrones pueden ser recogidos en una ubicación particular y ser entregados exactamente donde se requieren para completar su función bioquímica.

En los capítulos precedentes aprendimos que, en función de las condiciones de síntesis, la sílice electrodepositada puede presentar cierta carga eléctrica que es inherente al material y que afecta al transporte de masa desde el seno de la disolución hasta la superficie del electrodo. También se señaló que el proceso sol-gel es óptimo para realizar inmobilizaciones y dispersar materiales electroactivos y que el carácter dieléctrico de la sílice es un factor a tener en cuenta si se desea que la mayor cantidad posible de especies inmobilizadas posean actividad electrocatalítica.

Este último capítulo lo dedicaremos a inmobilizar citocromo c como especie electroactiva. El citocromo c, del que ya se ha hablado en la sección 1.5 en la introducción general de la presente memoria, fue denominada “biomolécula modelo” al ser una de las proteínas más sencillas encargada de transportar electrones y por ser una proteína clave en muchos procesos biológicos, por ello ha sido objeto de numerosos estudios desde el punto de vista funcional y filogenético.

Ahora nos sumergiremos en la optimización del proceso de inmovilización de proteínas en materiales de sílice. Esta optimización va a implicar el empleo tanto de sílice convencional como de sílice orgánicamente modificada y resulta ser de gran importancia para el desarrollo de ciertos dispositivos como los biosensores electroquímicos o las bio-fuel cells. Buscar la optimización de un sistema modelo básico como el constituido por el material citocromo c-SiO₂ puede permitir obtener procesos biocatalíticos eficientes con enzimas de mayor tamaño en el futuro. Esto abriría nuevas vías para su aplicación en biosensores electroquímicos o para conseguir transferencias electrónicas más eficientes entre bacterias y electrodos, de forma que se pudiera hacer uso del citocromo c como mediador electroquímico inmovilizado en sílice para aplicaciones en biopilas de combustible.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 6

**Modulation of the Silica Sol-gel
Composition for the Promotion of
Direct Electron Transfer to
Encapsulated Cytochrome c.**



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Abstract

The direct electron transfer between indium-tin oxide electrodes (ITO) and cytochrome c encapsulated in different sol-gel silica networks were studied. Cyt c@silica modified electrodes were synthesized by a two-step encapsulation method mixing a phosphate buffer solution with dissolved cytochrome c and a silica sol prepared by the alcohol free sol-gel route. These modified electrodes were characterized by cyclic voltammetry, UV-visible spectroscopy and in situ UV-visible spectroelectrochemistry. The electrochemical response of encapsulated protein is influenced by the terminal groups of the silica pores. Cyt c does not presents electrochemical response in conventional silica (hydroxyl terminated) or phenyl terminated silica. Direct electron transfer to encapsulated cytochrome c and ITO electrodes only takes place when the protein was encapsulated in methyl modified silica networks.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1. Introduction

The direct electron transfer from conducting materials to biomolecules, particularly proteins, has become a central issue in the development of certain biotechnological devices such as biofuel cells or chemical biosensors [1-3]. Bioelectrochemical studies on proteins have reported useful information about the structural organization of these molecules in contact with surfaces, the electron transfer characteristics to electrodes or the electron transfer processes in biological systems [2, 4-7].

Enzymes, as specific protein catalysts, have been used for the detection of a number of analytes, triggering the development of electrochemical biosensors and becoming a trending topic in electroanalysis during the last few years. Usual amperometric biosensors make use of redox mediators which are immobilized on the electrode surface. These mediators, usually ferrocene species, have the ability of carrying electrons from the enzyme molecule to the electrode [8-10]. However, current scientific attention focuses on the development of the so-called third generation of biosensors. In such devices, the direct electron transfer take place between enzyme molecules and electrode surfaces with no redox mediation [11-14].

For the development of these applications, direct electron transfer to immobilized proteins is preferable because it delivers better

electrochemical responses. Accordingly, several strategies for the immobilization of enzymes have been assayed: covalent binding [15, 16], physical adsorption [17-21] or encapsulation within polymeric matrices [22]. Promising results have been obtained for enzyme encapsulation in inorganic matrices such as silica synthesized by sol-gel processes [9, 23-25]. Encapsulation within silica networks provides soft immobilization conditions that prevent denaturalization of biomolecules upon encapsulation [26, 27]. In addition, the silica structure offers protection against some bulk solution components, thus reducing the risk of denaturation because of pH or ionic strength effects [28].

The electrostatic interactions between silica materials and encapsulated biomolecules are very relevant in the optimization of these systems for bioelectrochemical applications [29, 30]. Specifically, it is known that silica pores may be tailored to favor certain enzyme orientations which allow the substrates reaching their active sites easily. A key aspect in pore modification is the tuning of their polarity, which can be achieved by copolymerization of suitable organosilane precursors with the usual tetralkoxide silica precursor. The resulting organic-inorganic hybrid material is known as *ormosil*, i.e. an *organic-modified silica*. These hybrid materials show different affinity for polar structures thereby modulating the stability and functionality of the encapsulated biomolecules [24, 27].

In the present work we have examined the viability of inducing direct electron transfer between electrode surfaces and biomolecules encapsulated in silica materials. The selected model molecule was the redox active protein cytochrome c (cyt c). Cyt c is a water soluble hemoprotein acting as electron transducer during the biological respiratory chain thanks to its capability to undergo redox transformations [31]. Several bioelectrochemical devices take advantage of this redox ability, for example cyt c has been used as electron acceptor in the cathode of glucose-oxygen biofuel cells [1, 32]. It has been also demonstrated that the electrical current in microbial fuel cells is wired to the electrode through this type of proteins, which are present in the membrane of *Geobacter sulfurreducens* bacteria. Walcarius et al. have shown in a recent report the physical entrapment of bacteria (*Pseudomonas fluorescens*) in a porous sol-gel matrix deposited as a thin layer onto an electrode along with cytochrome c [33]. The protein acts as redox mediator providing an effective way to develop an 'artificial' biofilm that mimics the charge transfer processes of natural biofilms.

Our goal is to develop a suitable method for the encapsulation of cyt c in different silica sol-gel materials (based on both inorganic and hybrid networks). A detailed electrochemical study of the electrode modified with encapsulated cyt c will be performed. Finally, the influence of the protein

structural state on its electrochemical behavior and the effect of the silica matrix composition on the electrochemistry of the encapsulated biomolecule will also be investigated.

2. Experimental part

2.1. Reagents and equipment

Tetraethyl orthosilicate (TEOS) were purchased from Sigma-Aldrich, hydrochloric acid (Merck, p.a.), triethoxy(methyl)silane (MTES) Sigma-Aldrich, triethoxy(phenyl)silane PhTES Sigma-Aldrich, cytochrome c (cyt c) from horse-heart 98% Sigma-Aldrich, Potassium dihydrogen phosphate (Merck, p.a.), Di-potassium hydrogen phosphate (Merck, p.a.), all the solutions were prepared with ultrapure water obtained from an Elga Labwater Purelab system (18.2 M Ω cm). The electrochemical cells were purged by bubbling a N₂ flow for 20 min, and the N₂ atmosphere was maintained during all the experiments. The counter electrode was a platinum wire. All potentials were measured against a reversible hydrogen electrode (RHE). Indium-tin oxide (ITO) covered glass substrates (60 S cm⁻¹) were used as working electrodes. Prior to its use, the ITO glass was degreased by sonication in an acetone bath and rinsed with an excess of deionized water, then an etching treatment was carry out with 37% w/w

HCl to define a working geometric area of 1cm^2 for each ITO electrode. Cyclic voltammograms were performed with a potentiostat (eDAQ EA161) and a digital recorder (eDAQ, ED401) with eDAQ EChart data acquisition software. UV-vis spectra were acquired with a JASCO V-670 spectrophotometer using quartz cells with 1cm of optical path. *In-situ* UV-vis spectra were performed using an ALS model SEC-C05 Thin Layer Quartz Glass Spectroelectrochemical cell. The wettability (contact angle) of silica materials were measured with a Ramé-Hart 100 (Ramé-hart, inc, Mountain Lakes, NJ, USA) instrument at 25°C .

2.2 Preparation of electrodes

Two stock solutions were prepared as follows:

Solution 1, silica precursor solution, prepared by mixing 2.00 mL of TEOS (8.96 mmol) with 1.26mL of HCl 0.01M under vigorous stirring at room temperature in a closed vessel. After 2 hours, the resulting sol was submitted to rota-evaporation to remove the alcohol released from the hydrolysis. Alternatively, organic-modified silica (ormosil) was prepared following a similar procedure, but replacing part of the TEOS precursor by an organic triethoxysilane precursor (PhTES or MTES). The total moles of silica precursor were kept constant (8.96 mmol). The resulting ormosil

network is labeled as $\text{SiO}_{(2-0.5x)}\text{R}_x$ where x represent the mole fraction of the organic moieties in the resulting solid gel.

Solution 2, cytochrome c solution (1 mg/mL) was prepared by dissolving the protein in a phosphate buffer solution (PBS, pH 7) made of K_2HPO_4 0.15M + KH_2PO_4 0.1M.

For the encapsulation and immobilization of cytochrome c on the electrode 40 μL of solution 1 were placed in an Eppendorf vial and mixed with 40 μL of solution 2. The concentration of the protein in this solution was 40 μM . This mixture was dispensed over a clean ITO electrode. After a time period of 20-40 s a homogeneous silica gel is formed over the ITO surface.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of cyt c in solution

UV-visible spectroscopy has been used to get information on the structural state of dissolved cytochrome c at different pH values. Fig. 6.1 shows the UV-visible spectra of cytochrome c in either PBS or 0.5M H_2SO_4 electrolyte solutions.

Under neutral pH conditions, cytochrome c is in its native state and two characteristic bands can be observed in the electronic spectrum. On the one

hand, the so-called Soret band at 409 nm and, on the other, a broad band centered at around 535nm. This latter feature holds the contribution from the poorly defined α and β absorption bands of the heme group [32, 34].

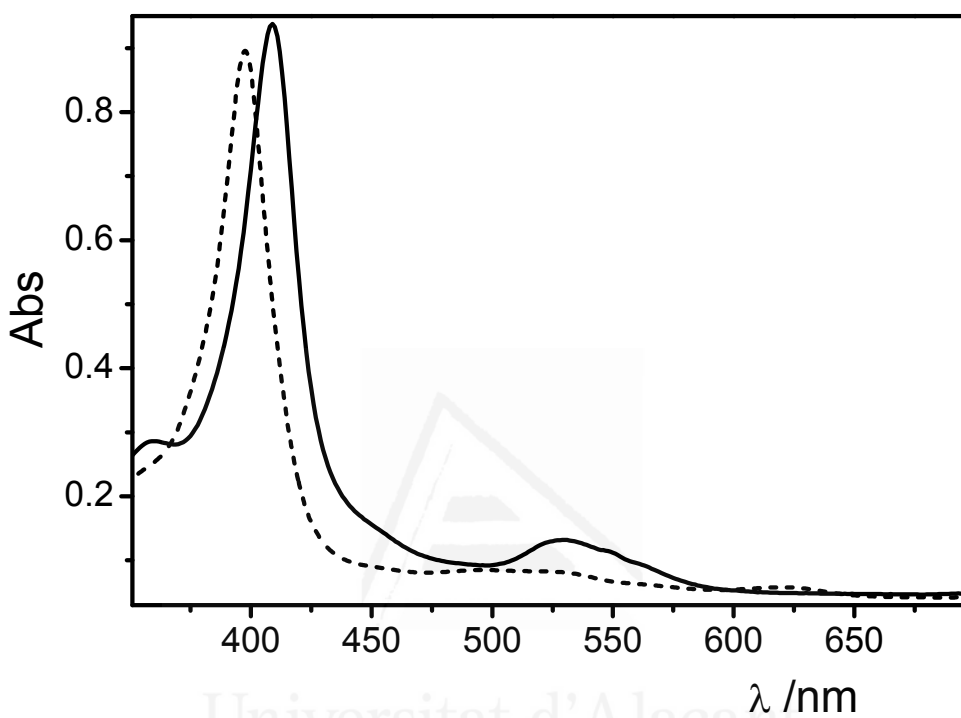


Figure 6.1.- UV-visible spectra recorded for cytochrome c in PBS (pH=7, solid line) and in 0.5M H₂SO₄ (dashed line) solutions.

The UV-visible spectrum of cyt c in strong acidic conditions shows a blue-shifted Soret band peaking at 398 nm and an almost undetectable couple of α and β bands. The latter spectrum is characteristic of the denaturalized state of cyt c.

The electrochemical characterization of cyt c in aqueous solution was carried out by cyclic voltammetry. Fig. 6.2.a shows the steady-state cyclic

voltammogram recorded for an ITO electrode immersed in a solution containing 0.5 mg/mL cyt c in phosphate buffer.

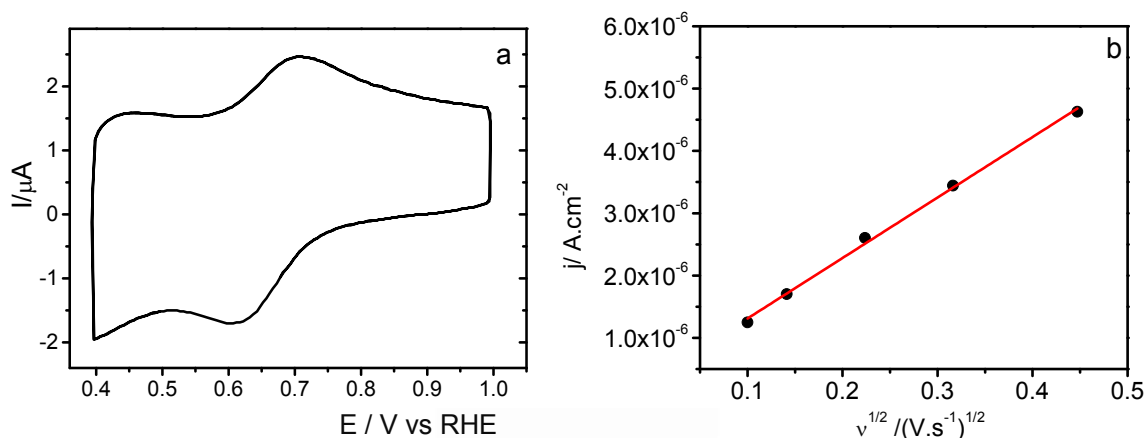


Figure 6.2.- (a) Steady-state cyclic voltammogram of an ITO electrode in a 0.5 mg/mL cyt c in PBS. Scan rate: 100mV/s; (b) Randles-Sevcik plot of anodic peak current vs the square root of the scan rate.

During the forward potential scan, a broad anodic peak appears centered at 0.71V. This feature is linked with the oxidation of the ferrocyanochrome c to form ferricytochrome c. During the reverse scan, the cathodic peak centered at 0.61V reveals the reduction of ferricytochrome c. The formal potential for cyt c redox transition can be evaluated from the mean of the peak potentials, $E^{o'} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} = 0.25\text{V vs RHE}$. This value is in good agreement with literature data [35-39]. From ΔE_p we have determined the value of the standard heterogeneous rate constant for the electron transfer, k^o , which amounts to $6.60 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$. Such a value is also consistent with bibliographic data reported for graphite and ITO electrodes[36, 38].

Cyclic voltammograms were carried out at different scan rates and the plot of anodic peak currents vs the square root of scan rates shows a linear trend, as can be observed in Fig. 6.2.b. From the Randles-Sevcik equation, a value of $4.7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ for the diffusion coefficient of cytochrome c in solution was calculated, in good agreement with the literature data [36, 38, 40]. These voltammetric experiments were conducted in PBS solution, where the cytochrome c molecule remains in its native state. Cyclic voltammetry studies performed in strongly acidic conditions (0.5M H_2SO_4) resulted in no electrochemical response for the dissolved protein, indicating that the protein in denaturalized state shows no redox activity in solution at ITO electrodes.

The evolution of the spectral features upon electrochemical reduction was studied by in situ electrochemical UV-vis spectroscopy in a solution containing cyt c in PBS medium and the results are presented in Fig. 6.3. The experiment was initiated by acquiring one spectrum under open-circuit conditions (dotted lines) and then a reduction potential of +0.2 V was applied. Additional spectra were subsequently acquired every 600 s to gain information about the effect of the applied potential on the UV-visible spectrum. Initially, the Soret band at 409 nm together with the couple of overlapped α and β -bands in the vicinity of 535 nm can be clearly

observed. Both the frequency and the intensity of these features are typical of the oxidized state of cytochrome c [32, 34].

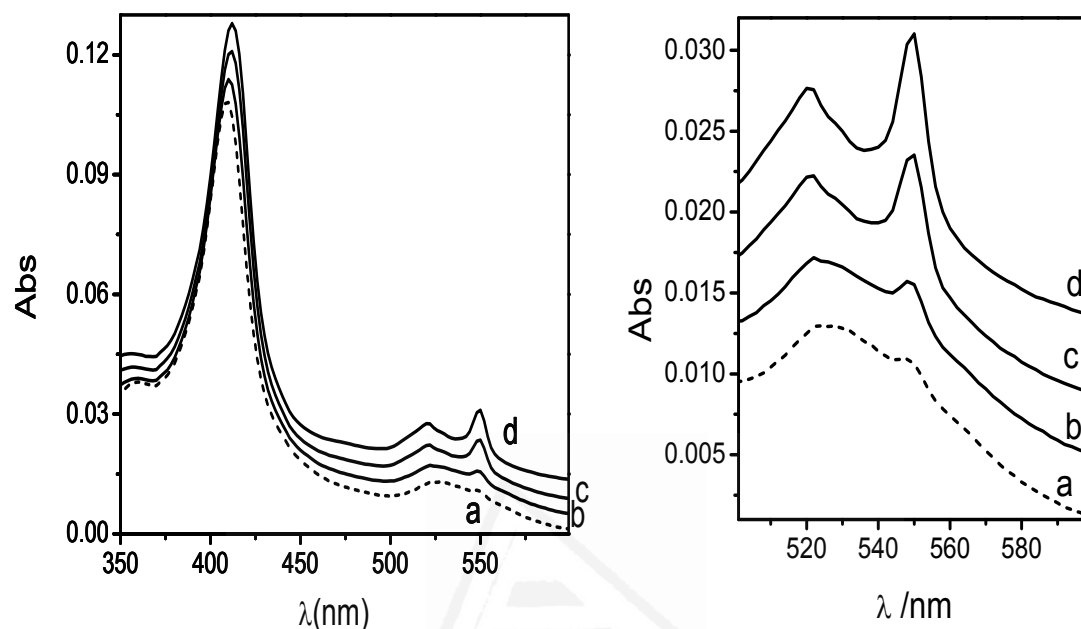


Figure 6.3.- In situ UV-visible spectra of cytochrome c (0.2mg/mL) in PBS at open circuit (a) and after the application of a reduction potential of +0.2 V vs RHE for: 600 s (b), 1200 s (c) and 1800 s (d).

When the potential is stepped to +0.2 V vs RHE the spectrum undergoes slight but significant modifications due to the reduction of cyt c. The Soret band shifts 3 nm to red and its intensity increases upon electrochemical reduction. More important changes are observed for α and β bands. The intensity of both features increases progressively during the reduction treatment and, simultaneously, they become resolved after 1800 s. The α -band peaks at 549 nm and the β -band at 520 nm at the end of the experiment.

3.2. Characterization of encapsulated cyt c in silica

Fig. 6.4.a shows the cyclic voltammogram of cyt c@SiO₂ modified electrode immersed in a PBS solution. This voltammogram exhibits the characteristic double layer of an ITO electrode with no redox process related with cytochrome activity.

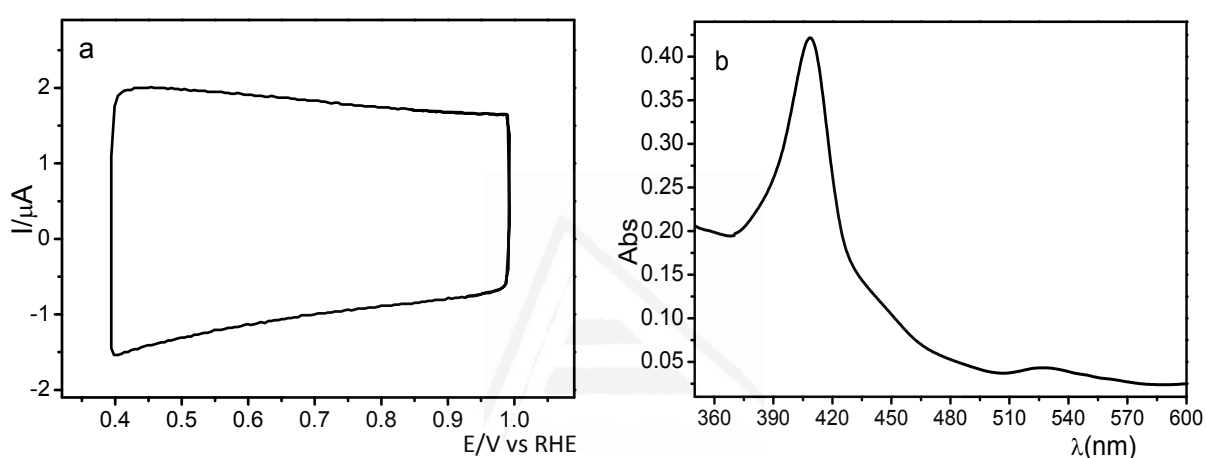


Figure 6.4.- (a) Steady-state cyclic voltammogram recorded in PBS medium for a cyt c@SiO₂ modified electrode. Scan rate: 100mV/s; (b) UV-Vis spectrum acquired for a ITO-cyt c@SiO₂ immersed in PBS solution.

The UV-visible spectrum in Fig. 6.4.b was recorded to check both the presence of encapsulated cytochrome and its structural state. The spectrum shows the two characteristic set of features: a Soret band at 409 nm and overlapped bands at around 535 nm. The frequency of both features reveals that cyt c is encapsulated in its native form, while the lack of band resolution at around 535 nm indicates that the biomolecule is in the oxidized state. This result points that cyt c, like other hemoproteins, retains

its characteristic optical signatures upon sol-gel encapsulation [25, 41-45]. In addition to the *ex situ* spectrum of Fig. 6.4.b, *in situ* spectroelectrochemical experiments were also carried out to follow the possible electrochemical reduction of encapsulated cyt c through the evolution of the corresponding absorption bands. However, no spectral modifications can be observed in such experiment (see Fig. A18 in the Appendix), which confirms the lack of electron transfer between the ITO electrode and the encapsulated molecule.

The lack of charge transfer may be ascribed to the electrostatic interactions appearing between cyt c and the surface of the silica pores. It is known that the isoelectric point of cyt c is around 10, so this molecule is positively charged at the neutral pH of the experiments [46]. On the contrary, silica presents an isoelectric point in the range of 1.7-3.5 and, therefore, it is negatively charged in the PBS electrolyte used here [47, 48]. The opposite charges cause an electrostatic interaction of cyt c and silica walls which probably prevents the protein to reach more favorable orientation for the electron transfer, as suggested by Keeling-Tucker et al. [29, 49].

It is known that ormosils can provide silica structures with different degrees of hydrophobicity and the associated change in the pore polarity may favor the electron transfer with the electrode [50-52]. So, at this point, the chemical modification of the silica is studied in order to obtain

structures able to modulate the electrostatic interactions between the silica walls and cyt c.

Fig. 6.5 shows cyclic voltammograms and UV-vis spectra for cyt c encapsulated within two different ormosil-modified electrodes: phenyl-modified silica (dashed line) and methyl-modified silica (solid line). The chemical formula $\text{SiO}_{(2-0.5x)}\text{R}_x$, where R can be either Ph or Me group, has been used to describe the expected degree of substitution in the chemical structure of the resulting material. The amount of organic groups was set at $x=0.1$ for the experiments shown in Fig. 6.5.

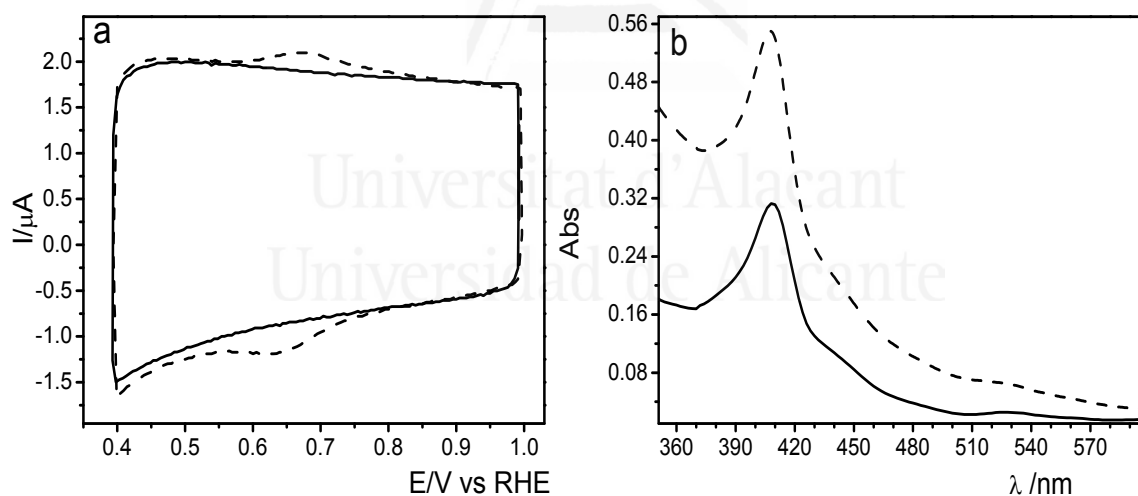


Figure 6.5.- (a) Steady-state cyclic voltammograms of cyt c@ $\text{SiO}_{1.95}\text{Ph}_{0.1}$ (solid line) and cyt c@ $\text{SiO}_{1.95}\text{Me}_{0.1}$ (dashed line) modified electrodes in PBS. Scan rate: 100mV/s; (b) UV-Vis spectra of Cyt C@ $\text{SiO}_{1.95}\text{Ph}_{0.1}$ (solid line) and cyt c@ $\text{SiO}_{1.95}\text{Me}_{0.1}$ (dashed line) immersed in PBS.

The cyclic voltammogram for $\text{cyt c}@SiO_{1.95}Ph_{0.1}$ of Fig.6.5a shows only the characteristic double layer charging of the supporting electrode. Cyt c

offers no electrochemical response from the inside of the phenyl-modified *ormosil*. Phenyl moieties introduce hydrophobic terminal groups in the silica gel which decrease the pore polarity. The corresponding increase in hydrophobicity of the resulting *ormosil* was assessed by contact angle measurement (see Table S1 in Supporting Information). Although phenyl-modified silica is more hydrophobic than pure SiO₂, no electrochemical response is obtained after the inclusion of these groups. Furthermore, the introduction of higher amounts of phenyl groups (up to $x= 0.32$) does not modify the obtained result.

The lack of electrochemical response could have been attributed to the denaturalization of the encapsulated protein. However, the UV-visible spectrum displayed in Fig. 6.5b shows that the characteristic cyt c electronic absorptions are retained and, accordingly, that the biomolecule is in its oxidized and native state. Additional in situ electrochemical UV-vis studies were carried out to confirm that no direct electron transfer takes place under the experimental conditions employed. A reduction potential of 0.2V was applied during 2000 s to the phenyl modified silica containing the encapsulated biomolecule (see Fig. A19 in the Appendix). Since no changes in the UV-vis spectra are observed, it is deduced that the immobilized cyt c does not undergo any change in its oxidation state, in

agreement with the absence of redox response observed in the voltammogram of Fig 6.5a.

Fig. 6.5 also shows the electrochemical and the spectroscopic characterization of cyt c encapsulated in a silica gel containing methyl groups ($\text{SiO}_{1.95}\text{Me}_{0.1}$). Methyl-modified silicas present higher hydrophobicity than the corresponding phenyl derivatives, as deduced from the contact angle measurements (see Table A17 in the Appendix). The dashed line in the cyclic voltammogram of Fig.6.5a shows a pair of peaks (oxidation at 0.68V and reduction at 0.63V) clearly related with a redox process at the cytochrome heme center.

The intensity of this electrochemical response of the encapsulated protein depends strongly on the amount of methyl groups in the silica network. Figure 6.6 shows cyclic voltammograms recorded for different cyt c@ $\text{SiO}_{(2-0.5x)}\text{Me}_x$ modified electrodes, where the mole fraction of methyl groups was varied from 0.1 to 0.42.

The electrochemical studies have been limited to methyl mole fractions below $x= 0.42$ because the mechanical stability of the silica film is poor beyond that value. This effect is probably due to the lower cross-linking induced by the excess of methyl groups in the final material [29].

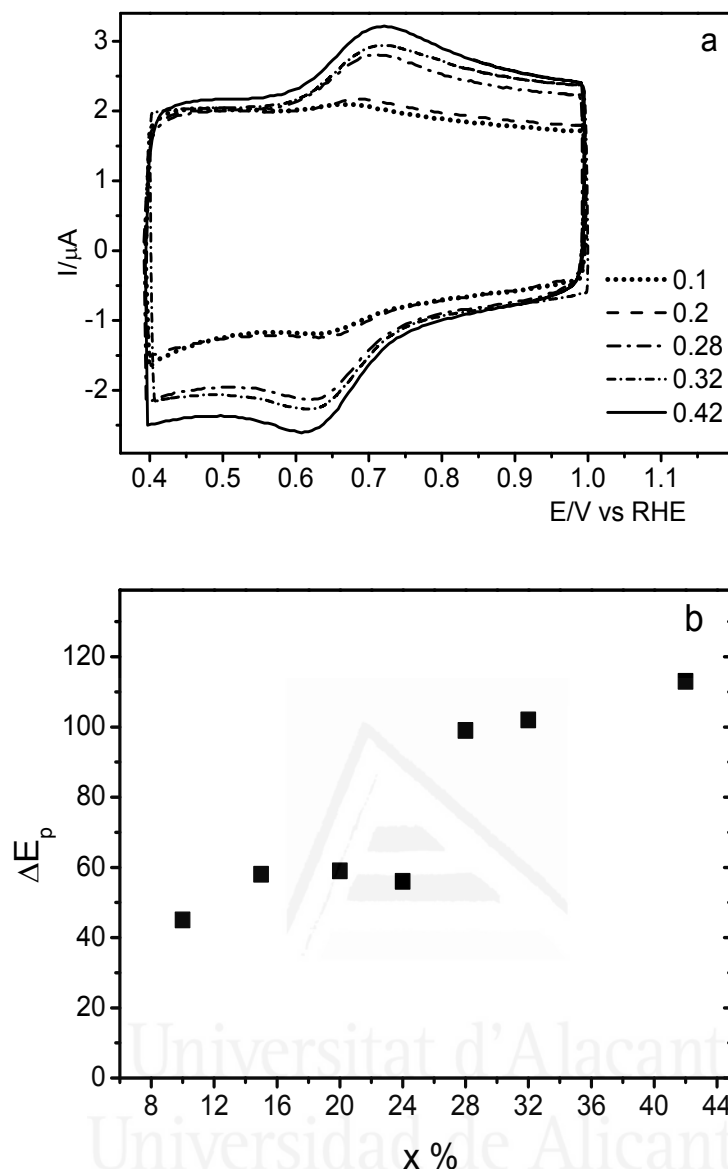


Figure 6.6.- (A) Cyclic voltammograms for cyt $c@SiO_{(2-0.5x)}Me_x$ modified electrodes in PBS. The mole fraction of methyl groups (x) is indicated for each line. Scan rate: 100mV/s. (B) Voltammetric peak separation for encapsulated cyt c redox process as a function of the methyl mole fraction in the ormosil structure.

These voltammetric curves show that the cytochrome redox process is barely detected for methyl-modified electrodes with x lower than 0.2, but well-defined features can be observed for higher methyl amounts. Since the encapsulated cyt c formal potential derived from these curves keeps constant at 0.25 V, it can be assumed that the inclusion of methyl groups

inside the silica network does not induce conformational changes in the cytochrome structure. This assumption will be confirmed later by UV-vis spectroscopy.

From the CVs in Fig. 6.6a it is possible to follow the evolution of the peak separation for the iron redox process, ΔE_p , with the mole fraction of methyl groups present in the silica gel. The results obtained are shown in Fig. 6.6b, where it is observed that mole fractions below 0.28 lead to low peak separations of about 40-60 mV. Such figures strongly suggest that the redox process is electrochemically reversible at moderate methyl substitution. However, a sudden increase of the peak separation is observed for mole fractions above 0.28. Indeed, cytochrome immobilized in highly methylated silica materials shows ΔE_p around 100 mV, a value which is characteristic of quasi-reversible electrochemical processes.

In order to gain more insight into the nature of the electron transfer process, cyclic voltammetry experiments for cyt c encapsulated in a set of methyl-modified silica were performed at different scan rates (see Fig. 6.7a).

In any case, linear dependences of the peak current on the square root of the scan rate are found. Since this behavior implies a diffusion-controlled electrode process, it should be assumed that the electron transfer takes place from the electrode surface to cyt c molecules which retain part of

their bulk free movement although they are encapsulated. Indeed, the silica hydrogel is often considered as a two-phase system consisting in a porous solid and a trapped aqueous phase [52]. We have found that the results obtained here contrast with those reported previously by Wang et al. for several hemoproteins, including cyt c, entrapped in agarose gel [53] for which, a linear dependence of the current with the scan rate was observed.

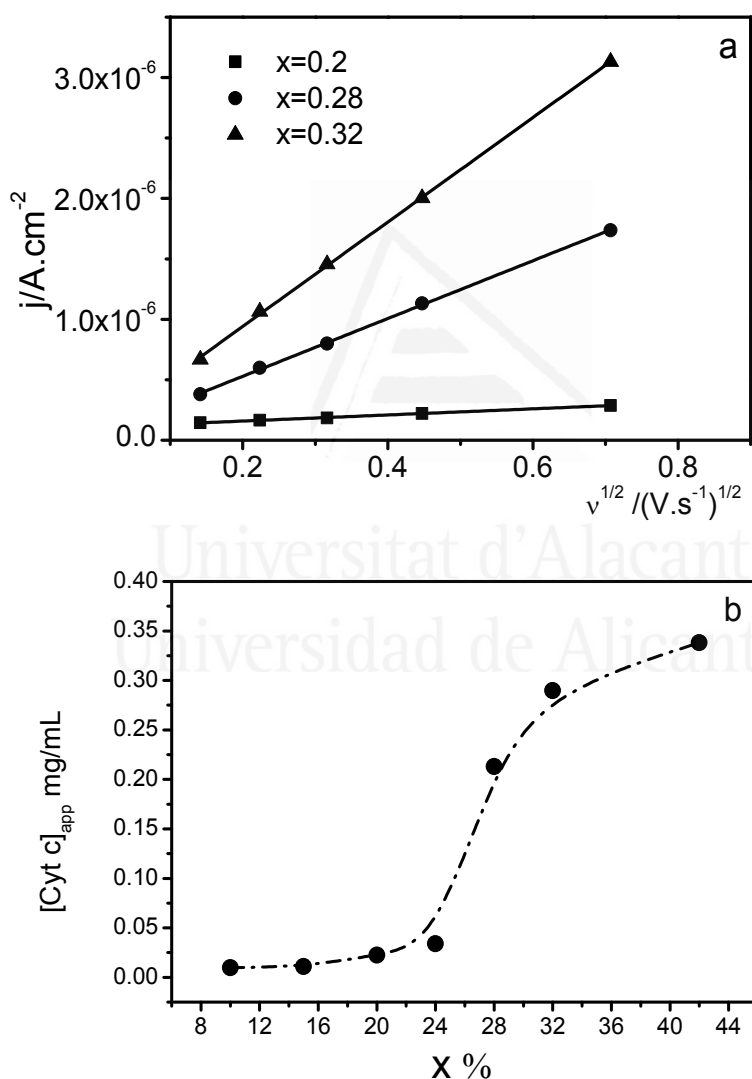


Figure 6.7.- (a) Plot of anodic peak current versus the square root of the scan rate for cyt c@SiO_(2-0.5x)Me_x modified electrodes in PBS. (b) Dependence of the encapsulated cyt c apparent concentration on the mole fraction of methyl groups present in the ormosil structure.

Accordingly, it was suggested that the electron transfer could take place to hemoproteins fixed to the polysaccharide chains. Later, these results were revised by Lo Gorton [54] who pointed that heme groups fully, or partially, detached from the protein were responsible for the observed electrochemical reaction.

So, assuming that the immobilized cyt c stands in an encapsulating aqueous environment similar to the bulk solution, Randles-Sevcik equations can be used to obtain the apparent concentration of this biomolecule within the silica pore. Values of the apparent concentration are presented in Fig. 6.7b as a function of the molar fraction of methyl groups in the silica. It can be observed that for silica gels containing up to 24% methyl groups, the apparent concentration of cyt c remains really low (less than $3\mu\text{M}$, that is less than 8% of the encapsulated protein). However, when the methyl group content exceeds a threshold value of 24%, an abrupt increase in the apparent concentration of cyt c occurs and values as high as $20\mu\text{M}$ are then obtained.

This behavior may be related with the structural characteristics of *ormosils*. It is thought that low levels of organosilanes in the precursor solution facilitate their homogeneous dispersion within the pores of the final material. This is because the triethoxymethylsilane precursor is preferentially located at the pore interface, as the methyl group prevents the

polymer chain growth at its position. This leads to a regular change in the polarity of the material as the amount of organosilane is increased. However, high triethoxymethylsilane levels may lead to phase segregation owing to the existence of a critical point for the self-association of the organic components. This yields an open porous structure showing little interactions with cyt c [29].

It has been observed that the amount of methyl groups has an effect on both the electrochemical reversibility of the redox process (Fig. 6.6) and the cyt c apparent concentration inside the silica material (Fig. 6.7). In other words, it appears a correlation between reversibility and concentration which has already been reported by other authors [36, 53, 55]. According to the literature, this behavior can be due to the affinity shown by cyt c to the surface of metal oxide electrodes [56]. At low apparent concentrations, the electrochemical behavior of cyt c corresponds to an ideal reversible system, whose peak separation approaches 59 mV, revealing fast electron transfer to the bare ITO surface. However, higher cyt c concentrations may favor the adsorption of a protein layer on the ITO surface which hinders the electron transfer process and, obviously, disturbs the reversibility of the electrochemical reaction.

Now, we will return to the question of the possible conformational changes induced in cyt c by the presence of methyl groups in the silica

pores. To check this, further in-situ UV-visible experiments have been conducted for the $\text{cyt } c@\text{SiO}_{1.86}\text{Me}_{0.28}$ electrode in PBS electrolyte. The spectrum (a) in Fig. 6.8 was acquired at open circuit and shows clearly the characteristic features of ferricytochrome *c*: the Soret band located at 409 nm and the poorly resolved α and β bands that appear in the vicinity of 530 nm. Upon electrochemical reduction at 0.2V, the shape of the UV-vis spectra changes to the characteristic profile of reduced cytochrome. In this way, the Soret band shifts slightly to 410 nm, whereas α and β bands get resolved appearing at 549 nm and 520 nm, respectively. Cyt *c* is retained inside the silica during the experiments as revealed by the stability of the cyclic voltammograms recorded during the time interval of the experiments, which was longer than 2 hours.

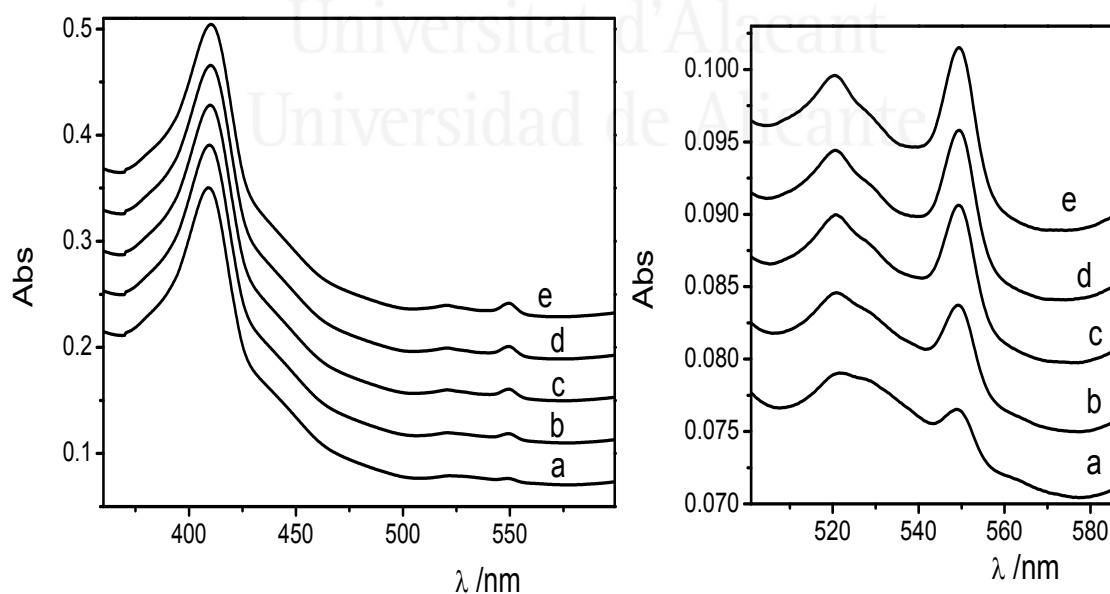


Figure 6.8.- In situ UV-Vis spectra collected for a $\text{cyt } c@\text{SiO}_{1.86}\text{Me}_{0.28}$ modified electrode in PBS medium. Spectrum (a) was obtained first under open circuit conditions. After the application of a reduction potential of +0.2 V vs RHE, the following spectra were acquired at different times: 600 s (b), 1200s (c), 1600s (d) and 2000 s (e).

4. Conclusions

Cytochrome c encapsulated in different silica matrices were deposited on ITO electrodes. Cyt c@SiO₂ was synthesized via a two-step encapsulation method, mixing a buffer solution with dissolved cytochrome c and a silica sol prepared by the alcohol free sol-gel route. These modified electrodes were characterized by cyclic voltammetry and UV-visible spectroscopy. Cyclic voltammetry indicates that the direct electron transfer between encapsulated cytochrome c and ITO electrodes takes place only for silica films where the methyl groups were incorporated, while conventional silica synthesized from pure TEOS or phenyl-modified silica do not show any electrochemical response. UV-visible spectroscopy experiments reveal negligible changes in the structural conformation of the encapsulated cytochrome c. The optical features of cytochrome c in silica were similar to cytochrome c in solution. From the experimental, results we concluded that the electrochemical response of the encapsulated proteins will be influenced by the terminal groups of the silica pores. These groups induce changes in both the polarity and the hydrophobicity of the micro-environment that surround the biomolecule.

5. References

1. J. P. Busalmen, A. Esteve-Núñez, A. Berná, J. M. Feliu, *Angewandte Chemie*, 120 (2008) 4952.
2. U. Schroder, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 9 (2007) 2619.
3. M. Rosenbaum, F. Aulenta, M. Villano, L. T. Angenent, *Bioresource Technology*, 102 (2011) 324.
4. A. Jain, X. Zhang, G. Pastorella, J. O. Connolly, N. Barry, R. Woolley, S. Krishnamurthy, E. Marsili, *Bioelectrochemistry*, 87 (2012) 28.
5. V. R. Dodhia, C. Sassone, A. Fantuzzi, G. D. Nardo, S. J. Sadeghi, G. Gilardi, *Electrochemistry Communications*, 10 (2008) 1744.
6. C. Renault, C. P. Andrieux, R. T. Tucker, M. J. Brett, V. +. Balland, B. t. Limoges, *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (2012) 6834.
7. W. Qian, Y. L. Sun, Y. H. Wang, J. H. Zhuang, Y. Xie, Z. X. Huang, *Biochemistry*, 37 (1998) 14137.
8. A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. A. Hill, W. J. Aston, I. J. Higgins, E. V. Plotkin, L. D. L. Scott, A. P. F. Turner, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 667.
9. B. Wang, B. Li, Q. Deng, S. Dong, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 3170.
10. E. Kosela, H. Elzanowska, W. Kutner, *Anal Bioanal Chem*, 373 (2002) 724.
11. Z. Guo, J. Chen, H. Liu, C. Cha, *Analytica Chimica Acta*, 607 (2008) 30.
12. J. Jia, B. Wang, A. Wu, G. Cheng, Z. Li, S. Dong, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 2217.
13. J. S. Xu, G. C. Zhao, *Electroanalysis*, 20 (2008) 1200.
14. G. C. Zhao, Z. Z. Yin, L. Zhang, X. W. Wei, *Electrochemistry Communications*, 7 (2005) 256.
15. A. K. M. Kafi, D. Y. Lee, S. H. Park, Y. S. Kwon, *Microchemical Journal*, 85 (2007) 308.

16. G. Suárez, C. Santschi, O. J. F. Martin, V. I. Slaveykova, *Biosensors and Bioelectronics*, 42 (2013) 385.
17. C. Fu, W. Yang, X. Chen, D. G. Evans, *Electrochemistry Communications*, 11 (2009) 997.
18. S. Deng, G. Jian, J. Lei, Z. Hu, H. Ju, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2009) 373.
19. L. Stoica, R. Ludwig, D. Haltrich, L. Gorton, *Anal. Chem.*, 78 (2005) 393.
20. B. Jin, G. X. Wang, D. Millo, P. Hildebrandt, X. H. Xia, *J. Phys. Chem. C*, 116 (2012) 13038.
21. E. Kuposova, A. Kisner, G. Shumilova, Y. Ermolenko, A. Offen+ñusser, Y. Mourzina, *J. Phys. Chem. C*, 117 (2013) 13944.
22. S. Alegret, F. Céspedes, E. Martínez-Fábregas, D. Martorell, A. Morales, E. Centelles, J. Muñoz, *Biosensors and Bioelectronics*, 11 (1996) 35.
23. Q. Wang, G. Lu, B. Yang, *Langmuir*, 20 (2004) 1342.
24. V. S. Tripathi, V. B. Kandimalla, H. Ju, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114 (2006) 1071.
25. W. Jin, J. D. Brennan, *Analytica Chimica Acta*, 461 (2002) 1.
26. I. Gill, A. Ballesteros, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (1998) 8587.
27. D. I. Fried, F. J. Brieler, M. Fröba, *ChemCatChem*, 5 (2013) 862.
28. R. B. Bhatia, C. J. Brinker, A. K. Gupta, A. K. Singh, *Chem. Mater.*, 12 (2000) 2434.
29. T. Keeling-Tucker, J. D. Brennan, *Chem. Mater.*, 13 (2001) 3331.
30. B. Dunn, J. I. Zink, *Chem. Mater.*, 9 (1997) 2280.
31. M. P. Murphy, *Biochem J*, 417 (2009) 1.
32. D. R. Green, J. C. Reed, *Science-AAAS-Weekly Paper Edition*, 281 (1998) 1309.
33. W. Ghach, M. Etienne, V. Urbanova, F. P. A. Jorand, A. Walcarius, *Electrochemistry Communications*, 38 (2014) 71.

34. M. Collinson, E. F. Bowden, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1470.
35. M. J. Eddowes, H. A. Hill, *J. Am. Chem. Soc.*, 101 (1979) 4461.
36. E. F. Bowden, F. M. Hawkrige, J. F. Chlebowski, E. E. Bancroft, C. Thorpe, H. N. Blount, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 7641.
37. F. Hawkrige, T. Kuwana, *Anal. Chem.*, 45 (1973) 1021.
38. F. A. Armstrong, H. A. Hill, B. N. Oliver, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (1984) 976.
39. A. El Kasmi, M. C. Leopold, R. Galligan, R. T. Robertson, S. S. Saavedra, K. El Kacemi, E. F. Bowden, *Electrochemistry Communications*, 4 (2002) 177.
40. S. Haymond, G. T. Babcock, G. M. Swain, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 10634.
41. M. M. Collinson, A. R. Howells, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 702.
42. L. Washmon-Kriel, V. L. Jimenez, J. Balkus, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10 (2000) 453.
43. H. Lan, C. Dave, M. Fukuto, B. Dunn, I. Zink, S. Valentine, *J. Mater. Chem.*, 9 (1999) 45.
44. B. C. Dave, H. Soyezy, J. M. Miller, B. Dunn, J. S. Valentine, J. I. Zink, *Chem. Mater.*, 7 (1995) 1431.
45. K. Flora, J. D. Brennan, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 4505.
46. A. Vinu, V. Murugesan, O. Tangermann, M. Hartmann, *Chem. Mater.*, 16 (2004) 3056.
47. C. F. S. G. W. Brinker, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press Limited, San Diego, CA 92101, 1990.
48. J.P. Brunelle, *Pure Appl. Chem.*, 50 (1978) 1211.
49. T. Keeling-Tucker, M. Rakic, C. Spong, J. D. Brennan, *Chem. Mater.*, 12 (2000) 3695.
50. J. Wen, G. L. Wilkes, *Chem. Mater.*, 8 (1996) 1667.

51. O. Nadzhafova, M. Etienne, A. Walcarius, *Electrochemistry Communications*, 9 (2007) 1189.
52. C. Shen, N. M. Kostic', *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (1997) 1304.
53. S. F. Wang, T. Chen, Z. L. Zhang, X. C. Shen, Z. X. Lu, D. W. Pang, K. Y. Wong, *Langmuir*, 21 (2005) 9260.
54. Z. Brusova, L. Gorton, E. Magner, *Langmuir*, 22 (2006) 11453.
55. K. Yoshioka, D. Kato, T. Kamata, O. Niwa, *Anal. Chem.*, 85 (2013) 9996.
56. K. J. McKenzie, F. Marken, *Langmuir*, 19 (2003) 4327.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Capítulo 7

Conclusiones finales



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Conclusiones Finales

- Se han sintetizado capas de sílice mediante metodología sol-gel y han sido depositadas sobre electrodos de carbono vítreo por métodos electroquímicos. Se ha estudiado la reactividad redox de algunas sondas convencionales sobre estos electrodos.
- Las capas de sílice han sido codepositadas con ácido poliestirensulfónico (PSS). La respuesta electroquímica de las sondas redox está afectada por la presencia de la capa de sílice-PSS.
- Las interacciones electrostáticas entre las capas de sílice y las sondas redox modifican el transporte de masa de estas especies hacia el electrodo soporte. La magnitud de estas interacciones fue estimada mediante el cálculo del coeficiente de difusión aparente y de la concentración aparente dentro de las matrices de sílice.
- Los depósitos de sílice-PSS actúan como una barrera electrostática para las sondas redox aniónicas y como una capa concentradora de sondas catiónicas.

- Se ha realizado el codepósito electroquímico de sílice y nanotubos de carbono de pared sencilla (SWCNT@SiO₂). De esta forma se obtienen nanotubos de carbono individuales bien dispersados y encapsulados sobre la superficie del electrodo.
- La incorporación de los nanotubos de carbono en la matriz inorgánica quedó confirmada por la mejora de la cinética de transferencia de carga a las sondas redox a través de las capas de SWCNT@SiO₂.
- El área electroactiva de los electrodos modificados con capas de SWCNT@SiO₂ no aumenta significativamente. Esto se debe a que las matrices de sílice son eléctricamente aislantes y gran parte de los nanotubos encapsulados no tienen contacto eléctrico directo con la superficie del electrodo soporte.
- Se han conectado eléctricamente los nanotubos de carbono con el electrodo soporte empleando un polímero conductor (polianilina). La polianilina se ha introducido en la matriz porosa mediante inserción reactiva electroquímica.

- La polianilina crecida a través de la red de sílice con nanotubos de carbono produce una mejora en las propiedades electrocatalíticas de este material. Se ha demostrado la existencia de una sinergia entre los materiales electrocatalíticos (polianilina y nanotubos de carbono) incorporados en la sílice, ya que tanto los valores de corriente como las constantes de transferencia heterogénea del *composite* SWCNT@SiO₂-PANI son superiores a los valores mostrados individualmente por cada material.
- Se ha encapsulado la proteína citocromo c en matrices de sílice convencional (SiO₂) y en sílice modificada con grupos orgánicos (*ormosil*) mediante la ruta sol-gel libre de alcohol. La proteína permanece en estado nativo y no sufre procesos de desnaturalización durante el proceso de encapsulamiento en las diferentes matrices de sílice.
- El citocromo c encapsulado en matrices de sílice convencional o en sílice modificada con grupos fenilos no presenta respuesta redox sobre electrodos transparentes de ITO. Sin embargo, se producen respuestas electroquímicas bien definidas cuando el citocromo c es encapsulado en matrices de sílice modificadas con grupos metilo.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Apéndice

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

**Modification of electrodes by
electrodeposited sol-gel silica: Mass
transport effects on the
electrochemical behavior of redox
probes.**

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

N₂ adsorption isotherms are of type I, what corroborates that these silica thin film is a microporous layer.

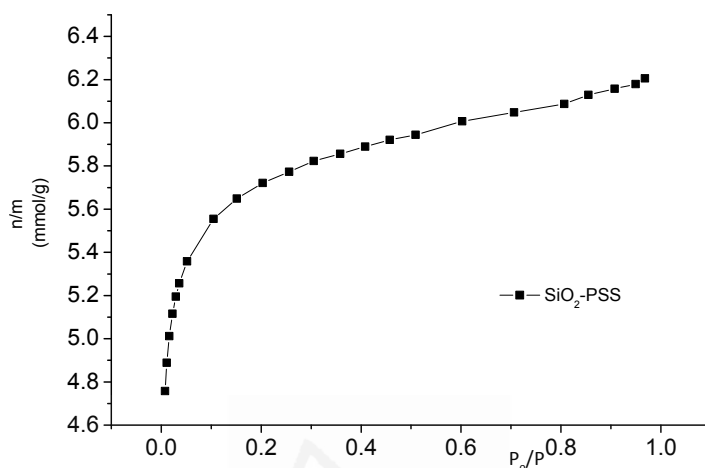


Figure A1.- N₂ adsorption isotherms at 77 K for a SiO₂-PSS sample.

TG and DTG curves are shown below. The loss of physically adsorbed water is observed at 100°C and during all the degradation, SO₂ is the main product evolved between 190°C and 530°C, Carbonyl sulfide (COS) is observed between 350°C and 400°C. Between 450 and 500°C methane and products coming from polystyrene degradation (benzene, styrene, toluene, and methylstyrene) are evolved. Between 550°C and 580°C, is related to CO production.

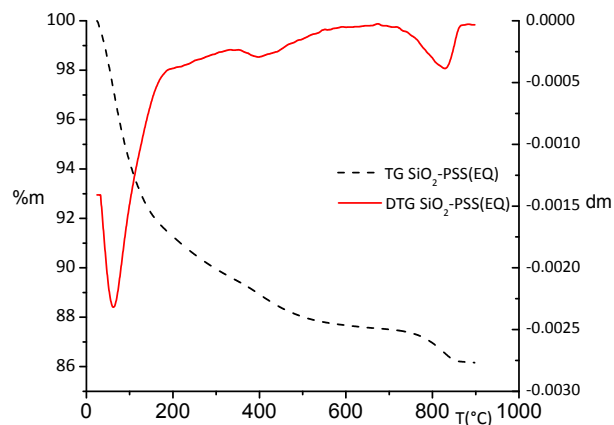


Figure A2.- Thermogravimetric curve and differential thermogravimetric curve of SiO₂-PSS deposited at -1.2V vs RHE, the thermal treatment was at 10 °C/min up to 900 °C in 100 mL/min of nitrogen/oxygen flow (4:1 ratio). Mass weight: 14.8996mg.

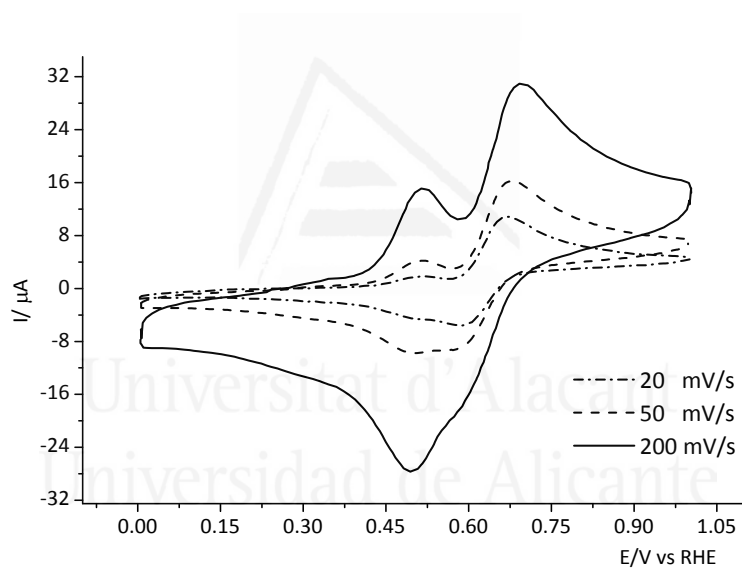


Figure A3.- Stabilized cyclic voltammograms recorded at different scan rates for SiO₂-PSS-modified glassy carbon in 0.5 M H₂SO₄ + 1mM 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate

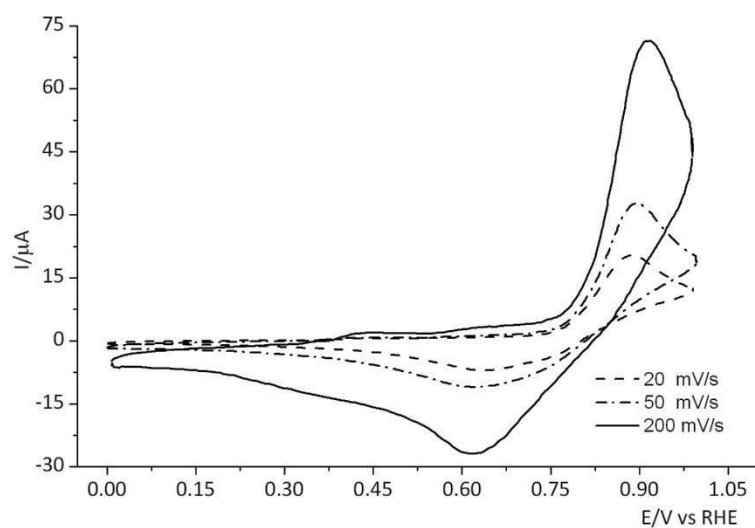


Figure A4.- Stabilized cyclic voltammograms recorded at different scan rates for SiO₂-PSS-modified glassy carbon in 0.5 M H₂SO₄ + 1mM dopamine

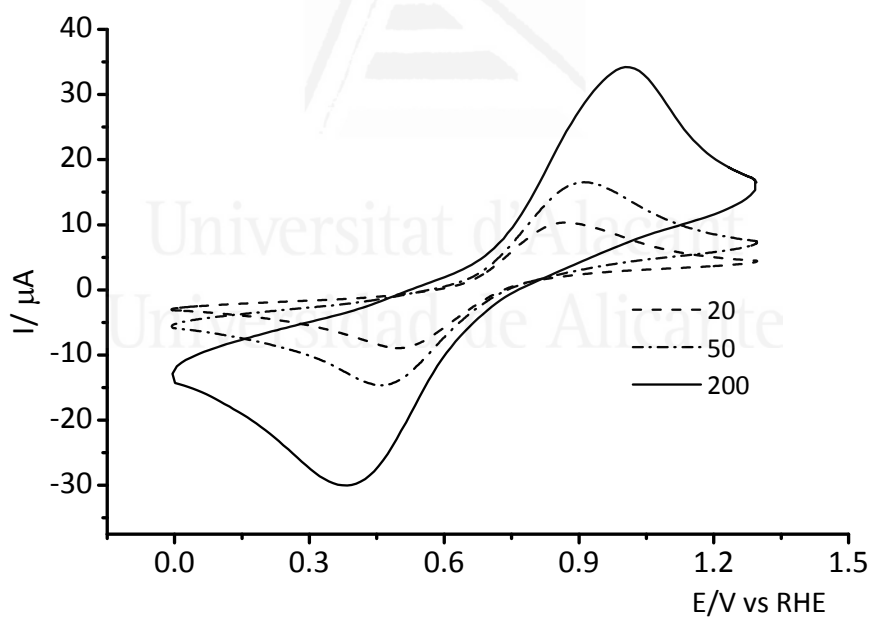


Figure A5.- Stabilized cyclic voltammograms recorded at different scan rates for SiO₂-PSS-modified glassy carbon in 0.5 M H₂SO₄ + 1 mM FeSO₄/ 1 mM Fe₂(SO₄)₃

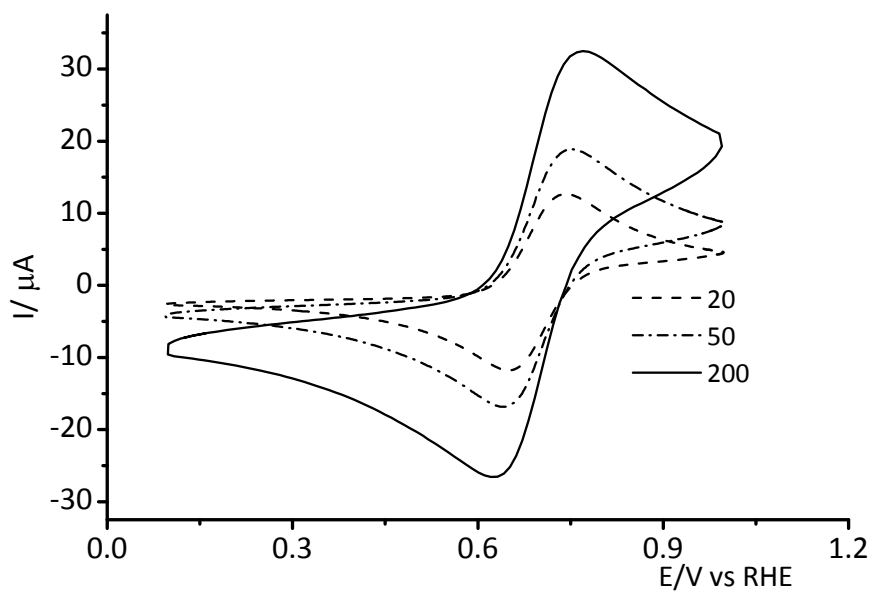


Figure A6.- Stabilized cyclic voltammograms recorded at different scan rates for SiO₂-PSS-modified glassy carbon in 0.5 M H₂SO₄ + 1 mM K₃[Fe(CN)₆] + 1 mM K₄[Fe(CN)₆]

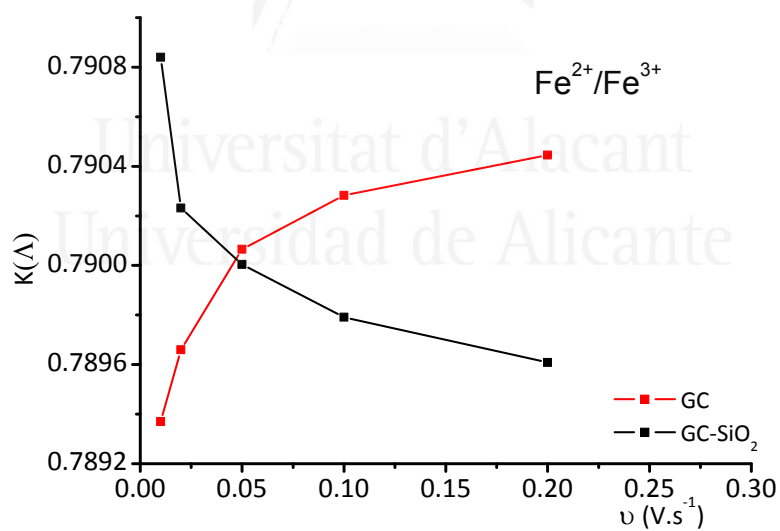


Figure A7.- K(Δ) values of Fe³⁺/Fe²⁺ redox couple for glassy carbon (GC) and silica-modified (GC-SiO₂) electrodes determined at different scan rates

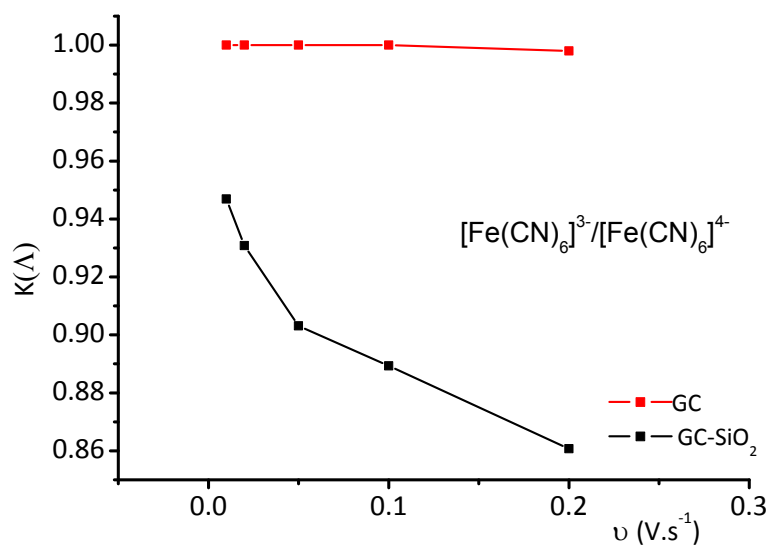


Figure A8.- $K(\Lambda)$ values of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ redox couple for glassy carbon (GC) and silica-modified (GC-SiO₂) electrodes determined at different scan rates

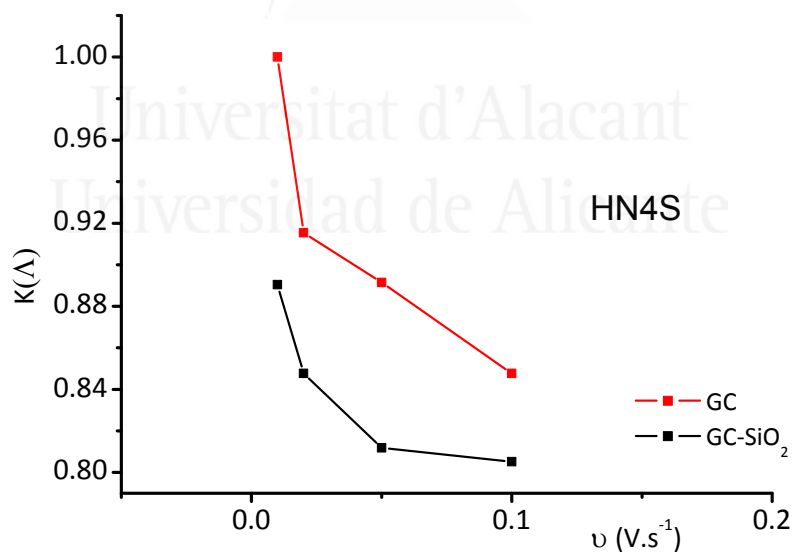


Figure A9.- $K(\Lambda)$ values of 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate for glassy carbon (GC) and silica-modified (GC-SiO₂) electrodes determined at different scan rates

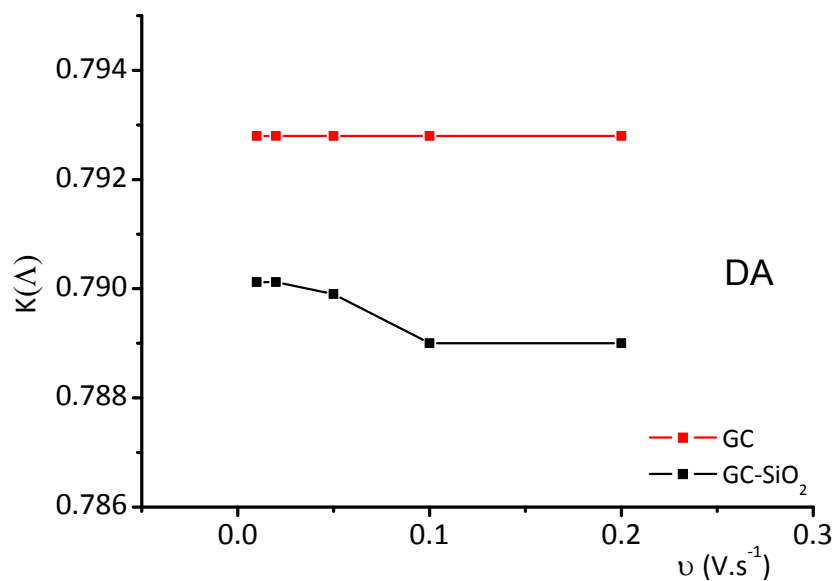


Figure A10.- $K(\Lambda)$ values of dopamine for glassy carbon (GC) and silica-modified (GC-SiO₂) electrodes determined at different scan rates

Silica-PSS was electrodeposited over a platinum polyoriented single-crystal electrode. After the deposition, the resulting Pt/SiO₂-PSS electrode was tested in a blank solution. Both the shape and the voltammetric charge of the modified electrode are very similar to the response of the unmodified Pt in the same solution, thus proving the electro-inactivity of the electrodeposited silica.

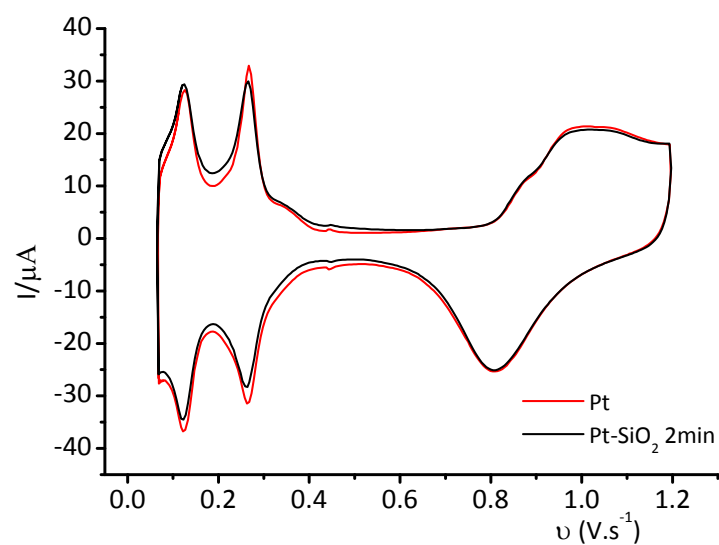


Figure A11.- Stabilized cyclic voltammograms recorded for a Pt electrode before (red line) and after (black line) the electrochemical deposition during 2 minutes of SiO₂-PSS (solid line) in 0.5 M H₂SO₄ .



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

**Enhancement of the Electrochemical
Performance of SWCNT dispersed in
a Silica Sol-gel Matrix by Reactive
Insertion of a Conducting Polymer**



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

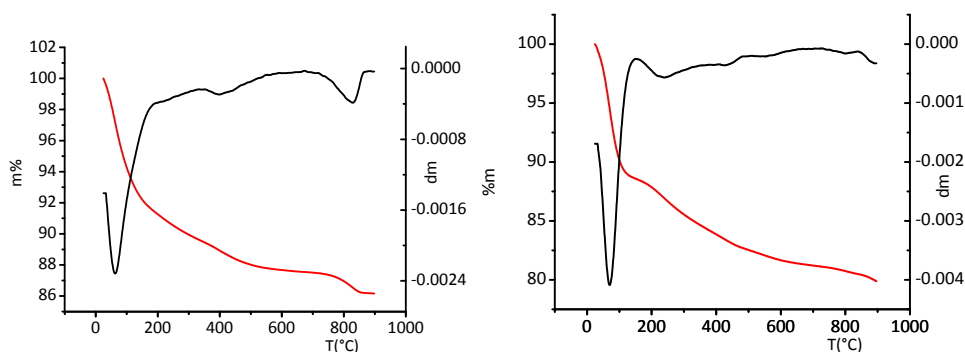


Figure A12.- Thermogravimetric curves for SiO₂ (left figure) and SWCNT@SiO₂ (right figure) synthesized by electroassisted deposition. Red lines: TG; Black lines; Differential TG.

Thermogravimetric studies were carried out. The silica samples were subjected to thermal treatment at 10°C/min up to 900 °C in 100mL/min of nitrogen/oxygen flow (ratio, 4:1). Additionally with the aim of compare the chemical method and electrochemical method for silica deposition, the amount of SWCNT trapped by chemical deposits were measured. The thermogravimetric analysis shows that the mass percent of SWCNT incorporated by electroassisted deposition is around 4%.

Deposited material	Mass difference, % (200 to 800°C)
SiO ₂	4.72
SWCNT@SiO ₂	8.67

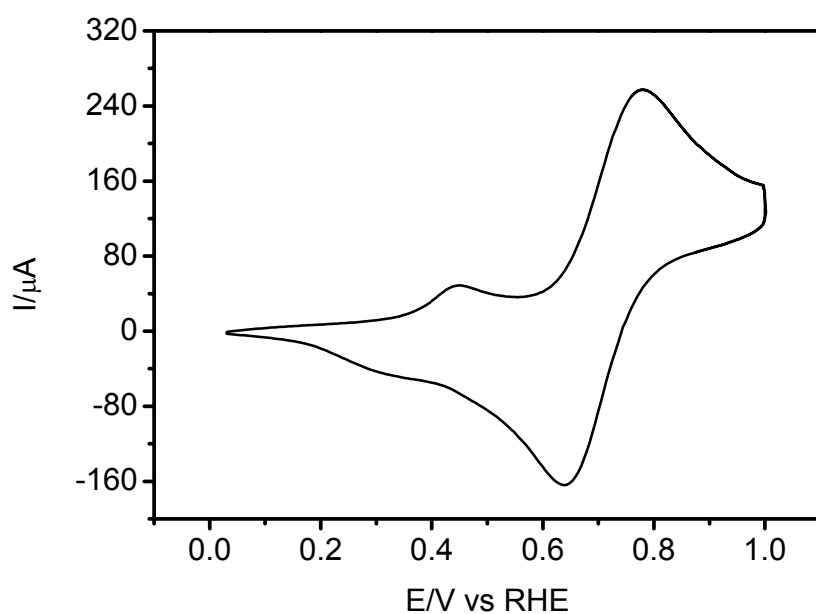


Figure A13.- Electrochemical response of a SiO₂-PANI composite electrodes loaded with 0.944 μg PANI in 0.5M H₂SO₄ + 10mM FeSO₄/Fe₂(SO₄)₃. Scan rate: 50mV s⁻¹.

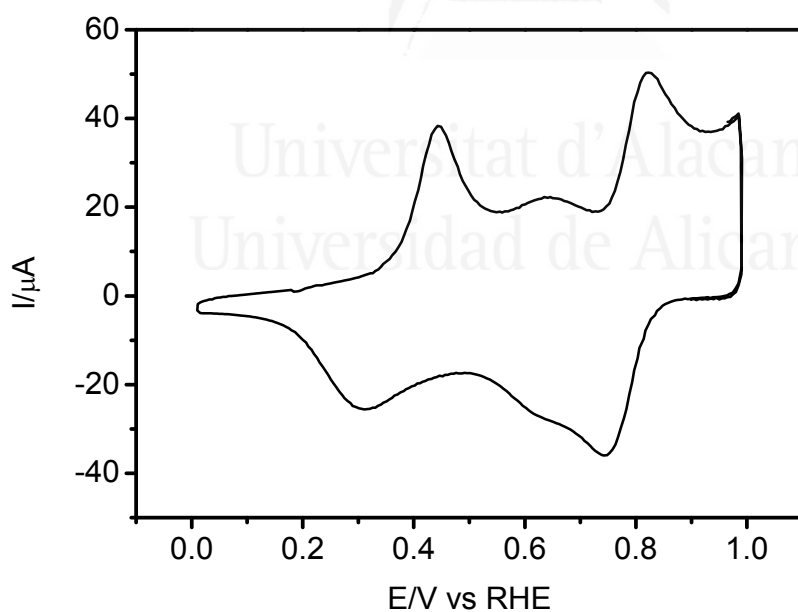


Figure A14.- Electrochemical response of a SiO₂-PANI composite electrodes loaded with 0.944 μg PANI in 0.5M H₂SO₄ + 1mM dopamine. Scan rate: 50mV s⁻¹.

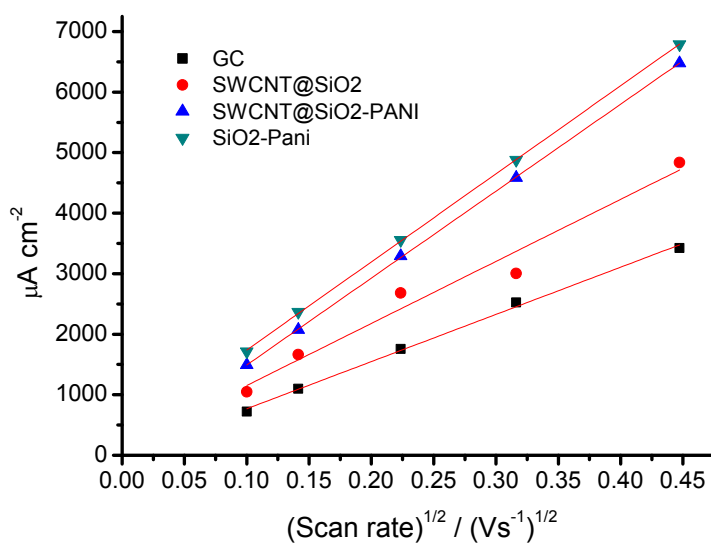


Figure A15.-Randles-Sevcik plots obtained in H_2SO_4 0.5M for different modified electrodes for 10mM $\text{FeSO}_4/\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ redox probe.

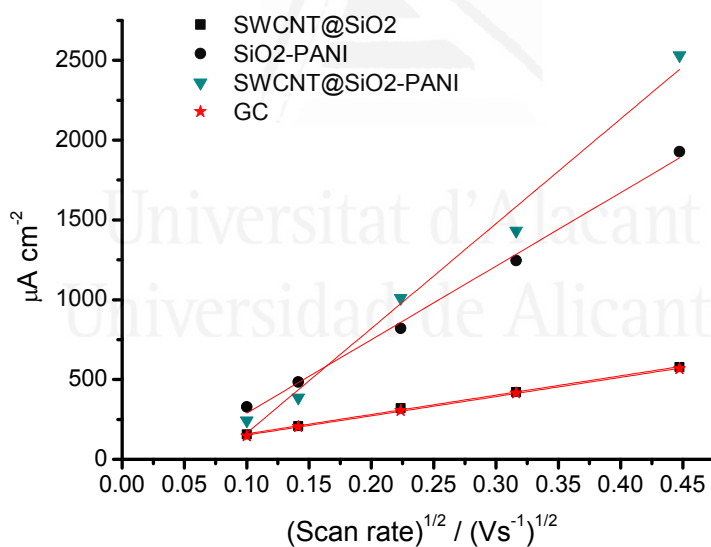


Figure A16.-Randles-Sevcik plots obtained in 0.5M H_2SO_4 for the modified electrodes at different scan rates. 1mM dopamine redox probe.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Capítulo 6

Modulation of the Silica Sol-gel
Composition for the Promotion of
Direct Electron Transfer to
Encapsulated Cytochrome c.

Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Table A17: Wettability (contact angle)

Electrode	Contact Angle
SiO ₂	63
SiO _{1.9} Ph _{0.2}	67
SiO _{1.86} Me _{0.28}	79

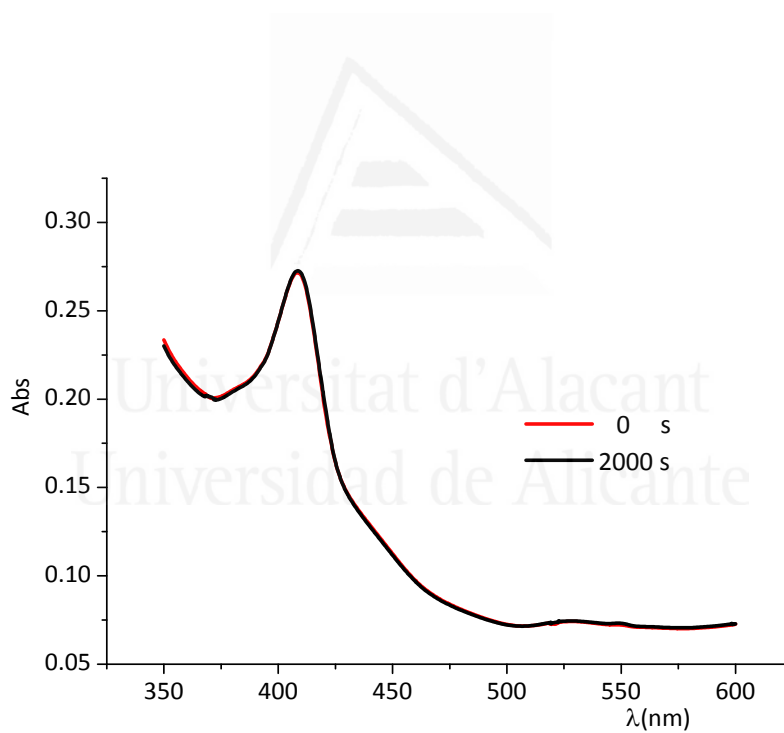


Figure A18.- In situ UV-vis spectra recorded during the application 0.2V vs RHE to an ITO electrode modified with cyt c@SiO₂.

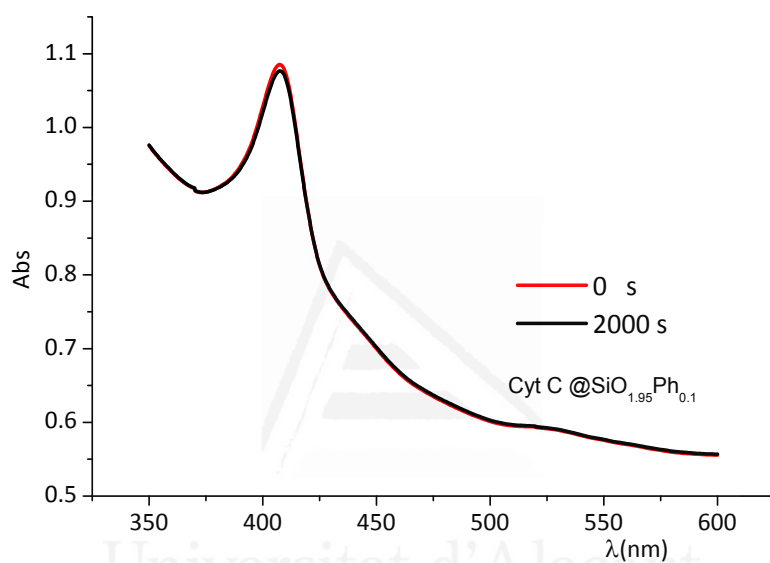


Figure A19.- In situ UV-vis spectra recorded during the application of 0.2V vs RHE to an ITO electrode modified with cyt c@ SiO_{1.95}Ph_{0.1}.