



Departamento de Química Física  
y Termodinámica Aplicada  
Universidad de Córdoba

# DISEÑO Y APLICACIÓN DE SISTEMAS NANOESTRUCTURADOS BASADOS EN ORO Y SUS BIOCONJUGADOS

*DESIGN AND APPLICATION OF GOLD BASED NANOSTRUCTURED  
SYSTEMS AND THEIR BIOCONJUGATES*

Tesis Doctoral  
David Alba Molina

Córdoba, 12 Mayo 2020

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	1/224



TITULO: *Diseño y aplicación de sistemas nanoestructurados basados en oro y sus bioconjugados*

AUTOR: *David Alba Molina*

---

© Edita: UCOPress. 2020  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>

---

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY</a>	Página	2/224





DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA  
Y TERMODINÁMICA APLICADA  
UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

D<sup>a</sup>. María Teresa Pineda Rodríguez, Catedrática y Directora del Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada de la Universidad de Córdoba,

**INFORMA:**

Que el trabajo presentado como Tesis Doctoral por D. David Alba Molina, titulado “*Diseño y Aplicación de Sistemas Nanoestructurados Basados en Oro y sus Bioconjugados*”, ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento y reúne las condiciones exigidas según legislación vigente.

Y para que conste, firmo el presente en Córdoba a 12 de Mayo de 2020.

Fdo. : María Teresa Pineda Rodríguez

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	3/224



Registro Electrónico de la Universidad de Córdoba
ENTRADA
03/06/2020 12:16
2020022100

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	4/224



---

***DISEÑO Y APLICACIÓN DE SISTEMAS NANOESTRUCTURADOS  
BASADOS EN ORO Y SUS BIOCONJUGADOS***

LOS DIRECTORES,

Fdo.: Juan José Giner Casares  
Personal Contratado dentro del  
Programa Ramón y Cajal

Fdo.: Manuel Cano Luna  
Personal Contratado Investigador  
Posdoctoral del Departamento de  
Química Física y Termodinámica  
Aplicada de la Universidad de Córdoba

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

Fdo.: David Alba Molina  
Graduado en Química

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY</a>	Página	5/224



Registro Electrónico de la Universidad de Córdoba
ENTRADA
03/06/2020 12:16
2020022100


Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	6/224



---

El trabajo que engloba la presente Memoria se ha realizado durante el periodo de disfrute de los siguientes proyectos: “Mecanismos de Interacción de Nanopartículas Plasmónicas con Biointerfases” (CTQ2017-83961-R) y “Jardines Químicos para Producción a gran Escala de Nanopartículas Mesoporosas” (CTQ2017-92264-EXP). Ambos financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad de España.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	7/224





Registro Electrónico de la Universidad de Córdoba
ENTRADA
03/06/2020 12:16
2020022100

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	8/224



---

**JUAN JOSÉ GINER CASARES**, Personal Contratado dentro del Programa Ramón y Cajal del Departamento de Química Física y Termodinámica aplicada de la Universidad de Córdoba.

**INFORMA:**

Que el trabajo presentado como Tesis Doctoral por D. David Alba Molina, titulado “Diseño y Aplicación de Sistemas Nanoestructurados Basados en Oro y sus Bioconjugados”, ha sido realizado bajo mi dirección en los laboratorios de este departamento y reúne las condiciones exigidas según la legislación vigente.


Y para que conste, firmo el presente en

Córdoba, a 12 Mayo de 2020

Firma del director:

Fdo. Juan José Giner Casares

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	9/224



Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	10/224



---

**MANUEL CANO LUNA**, Personal Contratado Investigador Posdoctoral en el Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada de la Universidad de Córdoba,

**INFORMA:**

Que el trabajo presentado como Tesis Doctoral por D. David Alba Molina, titulado “Diseño y Aplicación de Sistemas Nanoestructurados Basados en Oro y sus Bioconjugados”, ha sido realizado bajo mi dirección en los laboratorios de este departamento y reúne las condiciones exigidas según la legislación vigente.

Y para que conste, firmo el presente en

Córdoba, 12 a Mayo de 2019

Firma del director:

Fdo. Manuel Cano Luna

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	11/224



Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY</a>	Página	12/224



---

Gracias a todos los que me han ayudado a avanzar en este camino de una forma u otra, gracias a cada uno de los componentes de mi grupo de investigación FQM-204, al cual me siento muy orgulloso de pertenecer. Gracias en especial a mis directores, a Juanjo por su confianza en mi desde el primer momento y a Manolo por su paciencia conmigo. Gracias por vuestra ayuda y guía, sin ella no habría llegado hasta aquí.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUFLYY</a>	Página	13/224



Registro Electrónico de la Universidad de Córdoba
ENTRADA
03/06/2020 12:16
2020022100

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	14/224



---

*"Homo Homini Lupus Est."  
-Thomas Hobbes  
Leviatán (1651)*

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	15/224





Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	16/224



## Índice

Objetivos .....	1
<b>Capítulo I: Introducción .....</b>	<b>5</b>
1.1 Introducción a la nanotecnología .....	7
1.2 Desarrollo histórico.....	8
1.3 Obtención de nanomateriales.....	10
1.3.1 El movimiento Browniano.....	11
1.3.2 Teoría DLVO.....	11
1.3.3 Principales estrategias de síntesis .....	13
1.3.4 Mecanismos de formación de NPs metálicas.....	14
1.3.5 Influencia en el mecanismo de crecimiento.....	17
1.3.6 Reactividad de las NPs y métodos de estabilización .....	18
1.3.7 Morfología de las NPs metálicas .....	21
1.4 Propiedades características de las NPs plasmónicas.....	22
1.4.1 Resonancia del plasmón superficial.....	25
1.5 Electrocatálisis. tecnologías de hidrógeno.....	27
1.5.1 Electrólisis de agua .....	28
1.5.2 Pila de hidrógeno o celda de combustible.....	31
1.6 Toxicidad de las NPs .....	34
1.7 Bibliografía .....	37
<b>Capítulo II: Técnicas Experimentales .....</b>	<b>47</b>
2.1 Técnicas de microscopía.....	49
2.1.1 Microscopía TEM.....	51
2.2 Técnicas espectroscópicas .....	53
2.2.1 Espectroscopía UV-visible.....	53
2.2.2 Espectroscopía Infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR) .....	55
2.3 Técnicas electroquímicas.....	58

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	17/224



2.3.1 La celda electroquímica .....	58
2.3.2 Voltamperometría cíclica .....	59
2.3.3 Estudio de procesos cinéticos en electrocatalizadores para ORR y HER ..	64
2.3.4 Estudio de las facetas cristalinas presentes en AuNPs mediante electrodeposición de plomo a bajo potencial .....	66
2.4 Técnicas complementarias .....	67
2.4.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS) .....	67
2.4.2 Potencial zeta (ZP) .....	70
2.4.3 Difracción de rayos X (DRX) .....	73
2.4.4 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) .....	78
2.5 Tratamiento de datos .....	81
2.6 Bibliografía .....	82
<b>Capítulo III: Publicaciones</b> .....	85
<b>I</b> “ <i>Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles as High-Performance Electrocatalysts: The Role of Size in the Electroreduction of Oxygen</i> ” .....	87
Supporting information .....	104
<b>II</b> “ <i>Tailoring the ORR and HER electrocatalytic performances of gold nanoparticles through metal-ligand interfaces</i> ” .....	111
Supporting information .....	134
<b>III</b> “ <i>Mimicking the bioelectrocatalytic function of recombinant CotA laccase through electrostatically self-assembled bioconjugates</i> ” .....	145
Supporting information .....	161
<b>IV</b> “ <i>Bioconjugated Plasmonic Nanoparticles for Enhanced Skin Penetration</i> ” ...	167
<b>Conclusiones</b> .....	197
<b>Apéndices</b> .....	201

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	18/224



# *Objetivos*

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	19/224



Registro Electrónico de la Universidad de Córdoba
ENTRADA
03/06/2020 12:16
2020022100

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAFXLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAFXLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAFXLYY</a>	Página	20/224




## OBJETIVOS

Los trabajos desarrollados en la presente memoria de Tesis Doctoral se encuadran en la línea de investigación “*Organización Molecular*” del grupo FQM-204 de la Universidad de Córdoba. Los objetivos globales que se han marcado son:

1. Síntesis de materiales metálicos nanoestructurados basados en oro con diferentes morfologías y tamaños. Formación de materiales compuestos y bioconjugados a partir de los materiales obtenidos.
2. Caracterización exhaustiva de los materiales nanoestructurados obtenidos mediante las siguientes técnicas: Espectroscopías UV-visible, de infrarrojo por transformadas de Fourier (FT-IR) y fotoelectrónica de rayos X (XPS), Microscopía electrónica de transmisión (TEM); Medidas de tamaño hidrodinámico (Dynamic Light scattering, DLS) y de carga superficial (potencial Zeta, ZP); Medidas de difracción de rayos X (XRD).
3. Desarrollo de análisis electroquímicos de las propiedades electrocatalíticas de los materiales metálicos nanoestructurados fabricados en función de su composición química, tamaño y ligando de superficie para las reacciones de reducción de oxígeno (ORR) y de evolución de hidrógeno (HER).
4. Búsqueda bibliográfica y realización de una revisión de las diferentes estrategias de funcionalización para sistemas nanoestructurados basados en oro y cuya finalidad es la mejora en la penetración dérmica, en ausencia de métodos físicos, empleando diferentes estrategias o enfoques químicos y distintos tipos de fármacos (quimioterápicos, genes y proteínas).

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	21/224



Registro Electrónico de la Universidad de Córdoba
ENTRADA
03/06/2020 12:16
2020022100

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY</a>	Página	22/224



# *Capítulo I*

## *Introducción*

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	23/224



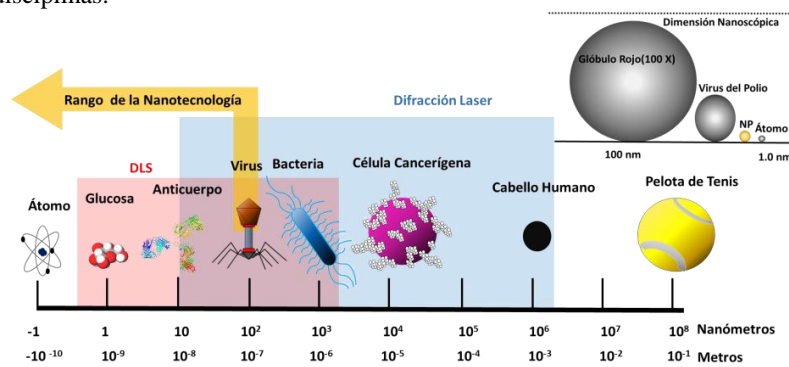


Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	24/224



### 1.1 INTRODUCCIÓN A LA NANOTECNOLOGÍA.

La nanociencia se encarga de estudiar los fenómenos y las propiedades fisicoquímicas de los materiales en la escala nanométrica, así como su síntesis y manipulación. Estos nanomateriales suelen poseer un tamaño comprendido entre 1 y varios centenares de nanómetros (Figura 1), aunque todos aquellos que posean al menos una de sus dimensiones dentro de este rango se consideran nanopartículas (NPs). Debido a su reducido tamaño, las NPs presentan propiedades coloidales y efectos cuánticos que tienen un gran número de aplicaciones en diferentes áreas y/o disciplinas.<sup>1</sup>



**Figura 1.** Rango de dominio de la nanotecnología y dimensión de las NPs.

La nanotecnología es una rama de la ciencia que reúne a investigadores de distintas áreas (Química, Física, Biología, Ingeniería, etc.) y ha provocado una revolución del conocimiento científico-técnico y de las industrias, facilitando el desarrollo de procesos que no serían posibles por métodos convencionales. Algunos ejemplos de aplicación se encuentran en áreas como: energía (nuevos combustibles, baterías y pilas de combustible), electrónica (dispositivos nanoelectrónicos), biomedicina (NPs multifuncionales como agentes teragnósticos), construcción (nuevos materiales), medioambiente (sistemas selectivos de purificación), química (catalizadores nanoestructurados, sensores, membranas).<sup>2</sup> En resumen, la nanotecnología es una disciplina de futuro que tiene el potencial de desencadenar

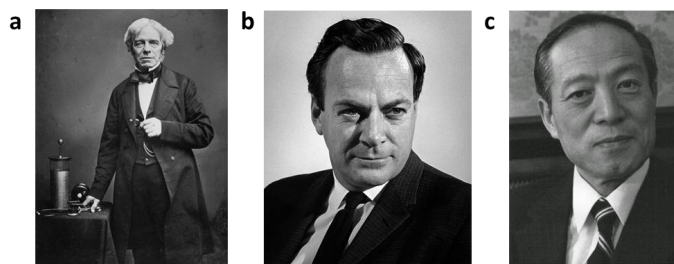
Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	25/224



grandes avances tecnológicos y prueba de ello, es su consideración como área prioritaria de investigación en todos los planes de investigación y desarrollo I+D+i a nivel mundial.

## 1.2 DESARROLLO HISTÓRICO.

Las propiedades ópticas de los metales nobles “finamente divididos” han sido aplicadas desde tiempos antiguos, a pesar de ser consideradas una invención del siglo XX. En el siglo IV a.c., los romanos utilizaban vidrio que contenía partículas metálicas de dimensiones nanométricas, ya que les otorgaba diferentes colores dependiendo de la cantidad de luz que los atravesaba. Un ejemplo es la copa de *Lycurgus*.<sup>1-5</sup>



**Figura 2.** a) Michael Faraday (imagen de dominio público), b) Richard Feynman (imagen adaptada de <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1965/feynman/biographical/>) c) Norio Taniguchi (imagen adaptada de Tokyo University of Science).

En 1857, Michael Faraday (Figura 2a) publicó el artículo “*Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light*”, en el cual explicaba como las pequeñas partículas afectaban al color de los vidrios presentes en las iglesias. También investigó las propiedades ópticas de películas finas preparadas con disoluciones coloidales y fue el primero en preparar oro coloidal por reducción del cloruro de oro con fósforo, atribuyendo el color rojo resultante a la obtención de partículas de tamaño muy pequeño.<sup>6</sup> Años después, en 1908, Gustav Mie publicó un estudio donde corroboraba que el color del oro coloidal era dependiente del tamaño.<sup>7</sup> El Premio

8

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	26/224



Nobel de Física de 1965, Richard Feynman (Figura 2b), presentó en 1959 la que más tarde se consideraría como la primera conferencia acerca de nanotecnología e ingeniería a nivel atómico (*There's Plenty of Room at the Bottom*),<sup>8</sup> en la cual sugería la posibilidad de desarrollar la manipulación de átomos y moléculas para diseñar sistemas nanoestructurados. Sería el profesor Norio Taniguchi (Figura 2c), de la Universidad de Ciencias de Tokio, quien utilizó por primera vez el término “Nanopartículas” en 1974. La naturaleza cuantificada de las NPs se reconoció por primera vez en la década de los años 1980, en la descripción de Ekimov-Efros de la excitación electrónica dependiente del tamaño de varios nanocristales semiconductores (calcogenuros y halogenuros de cadmio, tales como CdS, CdSe, CuCl y CuBr),<sup>9</sup> que más tarde serían denominados puntos cuánticos en el artículo de Louis Burs sobre interacciones electrón-electrón y electrón-hueco en pequeños cristales de CdS.<sup>10</sup> La investigación en nanotecnología se aceleró con el descubrimiento de los fullerenos en 1985 por Harold Kroto, Robert F. Curl y Richard Smalley, los cuales fueron galardonados con el Premio Nobel de Química en 1996.<sup>11</sup> Los fullerenos pertenecen a la familia del carbono, contienen entre 60 y 120 átomos, los cuales forman una estructura hueca. La evolución de estos materiales condujo al descubrimiento de lo que ahora conocemos como nanotubos de carbono (CNTs).<sup>12,13</sup>

Hitos representativos en el desarrollo de la Nanotecnología:

- **1857:** M. Faraday sintetiza oro coloidal de tamaño nanométrico.
- **1915:** W. Ostwald escribe el libro ‘*World of Neglected Dimensions*’ (*Die Welt der vernachlässigten Dimensionen*).<sup>14</sup>
- **1931:** E. Ruska y M. Knoll desarrollan el primer microscopio electrónico.<sup>15</sup>
- **1936:** E. Muller desarrolla un microscopio de iones de campo que permite la obtención de imágenes de átomos desde la punta de muestras metálicas.<sup>16</sup>
- **1959:** R. Feynman realiza su charla ‘*There is plenty of room at the bottom*’.
- **1970:** L. Esaki demostró los efectos cuánticos debidos al tamaño en semiconductores (QSE acrónimo ingles de “*Quantum Size Effects*”).

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	27/224



- **1974:** El profesor N. Taniguchi emplea por primera vez el término Nanopartículas.<sup>17</sup>
- **1977:** K. E. Drexler publica su Tesis Doctoral, en el Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT), titulada “*Molecular machinery and manufacturing with applications to computation*” popularizando la nanotecnología.<sup>18</sup>
- **1980:** A. I. Akimov muestra los efectos cuánticos (QSE) en partículas CdS y CdSe dispersas en vidrio, lo que desencadena la investigación sobre NPs.
- **1981:** G. Binnig y H. Rohrer desarrollan el microscopio de barrido por efecto túnel (STM acrónimo en inglés de *Scanning Tunelling Microscope*) que permitía obtener imágenes a resolución atómica.<sup>19</sup>
- **1985:** R. F. Curl, H. W. Kroto y R. F. Smalley sintetizan moléculas con 60 átomos de carbono llamados Fullerenos.
- **1991:** S. Iijima descubre los nanotubos de carbono (CNTs).
- **1999:** C. A. Mirkin desarrolla la nanolitografía “dip-pen” (DPN).<sup>20</sup>
- **2011:** Desarrollo de los primeros circuitos de nanocables programables para nanoprocesadores.<sup>21</sup>
- **2016:** J.P. Sauvage, J.F. Stoddart, y B.L. Feringa reciben el premio Nobel en química por el desarrollo de máquinas moleculares controlables de forma externa.<sup>22</sup>

### 1.3. OBTENCIÓN DE NANOMATERIALES.

El desarrollo de técnicas para la obtención de NPs estables ha ido evolucionando hasta nuestros días, poniendo especial énfasis en el control de características como el tamaño, estrecha distribución de tamaños (baja polidispersidad), morfología, composición química, estructura cristalina y estabilidad coloidal, carga superficial y adecuada funcionalización con ligandos. En algunos casos, es posible generar NPs con capacidad de aglomeración reversible, pudiéndose recuperar el estado inicial mediante simple agitación.

A continuación, se detallan los principales efectos físicos que se deben de tener en cuenta a la hora de sintetizar nanomateriales, ya que influyen de manera significativa en la estabilidad coloidal de este tipo de sistemas.

### 1.3.1 El movimiento Browniano.

El movimiento browniano se puede definir como un movimiento aleatorio de partículas suspendidas en un fluido (líquido o gas) debido a la colisión con los distintos átomos o moléculas que lo componen. En base a la teoría del movimiento browniano se pretende predecir el comportamiento de las NPs en una dispersión coloidal. La distancia de transferencia media tridimensional ( $\Delta x$ ) producida por el movimiento browniano se puede calcular a partir de la ecuación de Einstein-Smoluchowski (1), según la teoría de la difusión en líquidos en tres dimensiones, siendo  $D_B$  el coeficiente de difusión y  $\Delta t$  el tiempo browniano:

$$\Delta x = \sqrt{6D_B \Delta t} \quad (1)$$


Mientras que el coeficiente de difusión browniano puede ser calculado a partir de la ecuación de Stokes-Einstein (2), donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura en escala Kelvins,  $\mu$  es la viscosidad del medio y  $r$  es el radio de partícula. Analizando ambas ecuaciones, se puede deducir que el movimiento browniano aumenta a medida que disminuye el tamaño de partícula. Dicho de otro modo, las NPs tienen mayores posibilidades de acercarse y colisionar con otras NPs, cualquiera que sea el medio.<sup>23,24</sup> La fuerza de atracción de Van der Waals presente también en las NPs hace necesaria la existencia de una barrera de potencial entre las NPs para evitar agregaciones fuertes (son las denominadas fuerzas electrostáticas de repulsión).

$$D_B = \frac{kT}{3\pi\mu r} \quad (2)$$

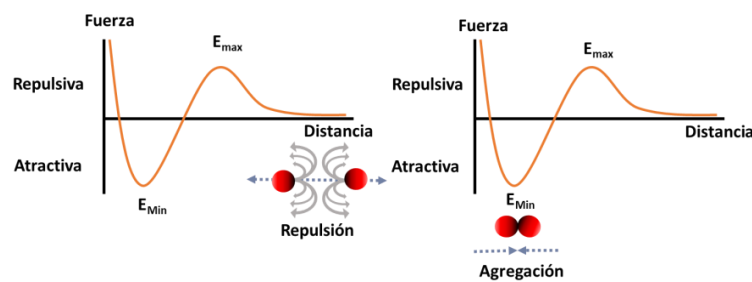
### 1.3.2. Teoría DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek).

Esta teoría propone que las partículas coloidales están sometidas tanto a fuerzas de atracción de Van der Waals como a fuerzas de repulsión electrostáticas, existiendo

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	29/224



un equilibrio entre dichas fuerzas. El movimiento Browniano produce colisiones entre las distintas partículas (fuerzas de atracción) mientras que las fuerzas de repulsión provienen de la interacción entre las dobles capas eléctricas que rodean a las NPs (fenómenos de carga superficial). Es común en partículas coloidales dispersas en un disolvente polar como el agua, que éstas adquieran una carga superficial debido a la pérdida de iones de su superficie (ionización o disolución) o bien a la ganancia de iones procedentes de la disolución (adsorción). De esta forma, las partículas cargadas atraen a iones de carga opuesta y repelen iones con carga del mismo signo. Como resultado, estos contraiones y las moléculas del disolvente polar adquieren una disposición ordenada alrededor de las NPs cargadas. La superficie cargada de las partículas y los contraiones vecinos constituyen la denominada “doble capa eléctrica”.



**Figura 3.** Representación esquemática de las interacciones entre NPs por la teoría DLVO.

La teoría DLVO también describe la fuerza entre las superficies cargadas que interactúan a través de un medio líquido y explica la agregación de dispersiones acuosas cuantitativamente.<sup>25,26</sup> De acuerdo a esta teoría, la estabilidad de una suspensión coloidal se basa en el equilibrio que existe entre ambas fuerzas, donde la repulsión electrostática producida por la doble capa cargada impide la agregación mientras que la atracción de Van der Waals trata de unir las (Figura 3). Cuando aumenta la fuerza iónica del medio, la doble capa eléctrica se comprime, disminuyendo las fuerzas de repulsión y aumentando las de atracción de Van der

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	30/224



Waals. De este modo, el potencial de interacción predomina a largo y corto alcance, lo que conduce a la aglomeración y posterior sedimentación de las NPs. Sin embargo, en disoluciones diluidas con baja concentración de electrolito, los contraiones que compensan la carga en la superficie de las NPs se extienden lejos de la misma, lo que hace que la interacción de doble capa sea una interacción de largo alcance. La atracción de Van der Waals es relativamente débil a largo alcance, dominando de esta forma la repulsión electrostática. Se origina así una suspensión estable de NPs.

### 1.3.3. Principales estrategias de síntesis.

En la actualidad, los métodos de síntesis de NPs se clasifican en dos grandes grupos (Figura 4). Por un lado, las técnicas denominadas “top-down” (de arriba hacia abajo) son aquellas que efectúan la miniaturización de un material sólido macroscópico en partes más pequeñas, hasta alcanzar las dimensiones nanométricas. Dentro de este grupo, se incluyen métodos físicos, litográficos (tanto UV como por haz de electrones), técnicas mecánicas (como pulimiento y molienda). Por otro lado, están las técnicas denominadas “bottom-up” (de abajo hacia arriba), en las cuales la formación de NPs ocurre a partir del enlace de átomos o moléculas, en fase gas o en disolución, partiendo de sales inorgánicas. Por ejemplo, para la síntesis de NPs plasmónicas de oro los métodos más utilizados suelen ser la reducción de sales metálicas, la descomposición térmica, fotoquímica, reducción o desplazamiento de ligandos, síntesis del metal en fase vapor y reducción en fase vapor.

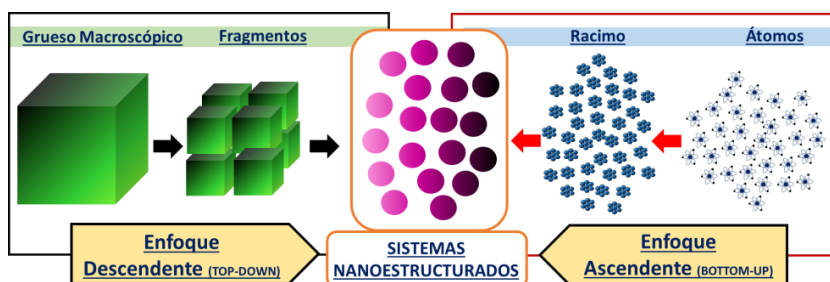


Figura 4. Esquema general de las técnicas de obtención de NPs.



De todos los métodos de preparación de NPs mencionados, la ruta más empleada es la síntesis química en disolución, ya que tiene las ventajas intrínsecas de producir muestras más uniformes y estables en comparación con otros enfoques sintéticos.<sup>27</sup> Más concretamente, las nanopartículas de oro (AuNPs) se pueden preparar fácilmente, obteniéndose sistemas coloidales monodispersos y estables con un tamaño controlado. Además, existe una extensa bibliografía sobre diferentes metodologías de síntesis de AuNPs, las cuales suelen emplear distintas estrategias para controlar el tamaño y la forma de partícula, que a su vez proporcionan AuNPs con diferentes propiedades ópticas.<sup>1-4,28</sup> Algunas de las estrategias actuales basadas en disolución permiten variar la estructura superficial de las NPs obtenidas, generando sistemas de mayor complejidad. Estas estrategias se pueden clasificar según la siguiente lista, si bien pueden darse estrategias complejas que combinen dos o más de la misma:

- Crecimiento mediado por semillas, el cual permite ajustar el tamaño y la forma de las NPs mediante la adición controlada de los precursores.<sup>29,30</sup>
- Competición mediante combinación de agentes reductores para desarrollar simultáneamente la generación de semillas y su posterior crecimiento en un mismo medio de reacción (en inglés se denomina “*one-pot synthesis*”).<sup>30-32</sup>
- Funcionalización de las NPs con biomoléculas para generar sistemas nano-bioconjugados.<sup>33</sup>
- Uso de intercambio catiónico para controlar la composición química y la fase cristalina en el caso de nanocristales semiconductores.<sup>34</sup>
- Uso de NPs como catalizadores para la formación de nanomateriales híbridos a través de procesos de mineralización y el crecimiento en su superficie.<sup>35</sup>
- Uso de NPs como bloques de construcción y gestión de su autoensamblaje en superestructuras más grandes.<sup>36</sup>
- Combinación de corrosión galvánica y efecto Kirkendall para la transformación de NPs sólidas en nanoestructuras huecas.<sup>37</sup>

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	32/224



**1.3.4. Mecanismos de formación de NPs metálicas.**

Existen dos teorías clásicas que abordan los procesos de nucleación y crecimiento para sistemas coloidales en disolución. El mecanismo de LaMer mediante el cual se explican los fenómenos de nucleación y la maduración de Ostwald que nos explica la variación de tamaños en las NPs. El mecanismo de LaMer (Figura 5A) establece un proceso que consta de tres etapas, una etapa inicial en la que los cationes de una disolución de precursor se reducen a estado de oxidación igual a cero para formar los denominados “monómeros” de reacción, incrementando su concentración rápidamente. En una segunda etapa se produce la formación de multitud de núcleos de forma simultánea, a partir de los monómeros recién formados (estallido), reduciendo drásticamente la concentración de monómeros en disolución. Debido a la reducción en la concentración de los monómeros disponibles y a la rapidez con la que ocurre, el proceso de nucleación prácticamente se detiene en este punto. En la tercera y última etapa, la nucleación continua pero ahora está limitada por la difusión de los monómeros a través de la disolución. Estudiando el proceso desde un punto de vista cinético, la velocidad de nucleación ( $R_N$ ) responde a la variación en la energía Gibbs crítica ( $\Delta G^*$ ) del sistema, al número de especies en crecimiento que actuaran como centros de nucleación y a la frecuencia de interacción de los monómeros de crecimiento con los núcleos formados según:

$$R_N = \left[ \frac{C_0 k T}{3 \pi \lambda^3 \eta} \right] \exp \left( - \frac{\Delta G^*}{k T} \right) \tag{3}$$

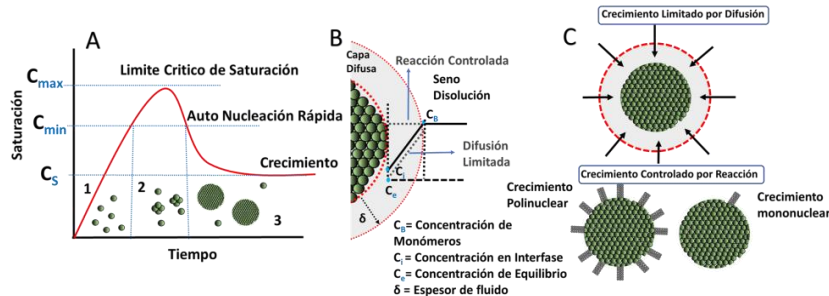
donde  $\lambda$  hace referencia al diámetro de la especie en crecimiento,  $\eta$  se refiere a la viscosidad de la disolución,  $C_0$  es la concentración inicial de la especie que actúa como centro de nucleación y  $k$  es la constante de Boltzmann. Según esta ecuación, un gran número de sitios de nucleación, baja viscosidad y una baja barrera de energía Gibbs, favorece la formación de un gran número de núcleos. Para una concentración determinada, esto significa obtener núcleos pequeños y si todos los núcleos se forman simultáneamente o en tiempos similares se obtiene una distribución de

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	33/224



tamaños uniforme. La cinética del proceso va a determinar la distribución de tamaños de los núcleos iniciales. El proceso de nucleación se completa tras alcanzar el límite crítico de sobresaturación de monómeros en disolución, es en este punto cuando se inicia la etapa de crecimiento. El crecimiento de los núcleos va a estar determinado por la generación de las especies en crecimiento y especialmente por su difusión desde el seno de la disolución hasta la superficie en crecimiento, la adsorción sobre la misma y el propio proceso de crecimiento superficial gracias a la incorporación de nuevas especies sobre el sólido que se va formando (Figura 5B, 5C).

Si la difusión es lo suficientemente rápida, la velocidad de crecimiento estará determinada por el crecimiento superficial. Este crecimiento puede ser mononuclear, debido al crecimiento capa a capa y va a depender en gran medida del área superficial, o bien puede ser crecimiento polinuclear, en el que varias capas crecen a la vez. Esto dependerá de la rapidez a la que ocurren los distintos procesos superficiales, por lo que el crecimiento de una nueva capa comienza antes de que se complete la primera. Sin embargo, cuando es la difusión el fenómeno que controla el proceso de crecimiento, se favorece la formación de tamaños de forma uniforme.<sup>38,39</sup>



**Figura 5.** Proceso de crecimiento. A) El diagrama de LaMer representa esquemáticamente que los procesos de nucleación y crecimiento están separados temporalmente. El pico muestra el nivel crítico de sobresaturación. La curva cualitativa (teórica) describe la concentración de monómero en función del tiempo. B) Perfil de concentración de soluto para crecimiento limitado por difusión y crecimiento controlado por reacción. C) Esquemas de los tres modelos de crecimiento diferentes.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Página	34/224



Este proceso de crecimiento controlado por difusión es conocido como maduración de Ostwald, en el cual las NPs más grandes crecen a costa de las más pequeñas. La maduración de Ostwald se origina debido a la reducción de energía superficial, ya que las partículas con mayor área superficial (las más pequeñas) son termodinámicamente más inestables que aquellas de mayor tamaño.<sup>40,41</sup> A medida que el sistema intenta disminuir su energía, los átomos en la superficie de una partícula pequeña tenderán a desprenderse de ésta y difundirse en disolución. Por lo tanto, la concentración de átomos libres en la disolución aumenta, tendiendo a unirse a la superficie de las partículas más grandes. Las partículas más pequeñas se reducen, mientras que las partículas grandes crecen, y el tamaño promedio de las partículas aumenta. Existen otros mecanismos propuestos en bibliografía para explicar los distintos procesos de nucleación y crecimiento, como pueden ser el proceso Finke-Watzky, en el que se propone que nucleación y crecimiento ocurren de forma simultánea y no están controlados por la difusión de las especies,<sup>42</sup> o el mecanismo de orientación y coalescencia, cuya principal diferencia es la existencia de una orientación de la red cristalina en el límite del grano que permite el desarrollo de ciertos planos cristalográficos.<sup>43-45</sup> Por último, también se ha descrito el mecanismo de crecimiento condicionado por la energía de los monómeros en disolución, pues esta es inferior a la de las facetas de cristal que está creciendo desarrollándose así la forma final de las nanopartículas.<sup>46,47</sup>

### 1.3.5. Influencia en el mecanismo de crecimiento.

Cuando el objetivo es la obtención de NPs monodispersas, es necesario controlar el crecimiento mediante difusión, aunque realmente están implicados los tres mecanismos descritos anteriormente (crecimiento controlado por difusión, por reacción mononuclear y reacción polinuclear). Cuando se empieza a formar el núcleo y este aún es pequeño, el crecimiento por monocapas es predominante, mientras que el crecimiento polinuclear comienza a aparecer a medida que los núcleos van creciendo, siendo la difusión el mecanismo predominante cuando las partículas alcanzan un tamaño relativamente grande.<sup>48</sup> Existen varias metodologías para poder

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	35/224



controlar el mecanismo de crecimiento por difusión en NPs con el fin de poder aumentar la monodispersidad. Cuando los monómeros de crecimiento se generan a partir de reacciones químicas, la velocidad de reacción puede manipularse a través del control sobre las concentraciones de reactivo y catalizador. También es posible controlar la concentración de los monómeros de crecimiento y mantenerla lo suficientemente baja. Otras estrategias se basan en controlar la distancia de difusión, la viscosidad de la disolución o la introducción de una barrera de difusión. En la síntesis de NPs, el tamaño puede ser controlado cinéticamente provocando una etapa de terminación durante el crecimiento. Consiste en la aplicación de moléculas orgánicas o la adición de diferentes iones al medio de reacción, generando de esta forma una etapa de adsorción en la que estos iones se unen fuertemente a la superficie de la partícula en crecimiento ocupando los sitios disponibles, se inhibe de este modo el crecimiento. Un incremento en la cantidad de estos iones/moléculas en relación con el precursor del monómero de crecimiento produce un reducido tamaño de partícula. Se puede de este modo controlar el tamaño de estas partículas mediante el ajuste de las concentraciones relativas entre ambos.<sup>49,50</sup>

### 1.3.6. Reactividad de las NPs y métodos de estabilización.

Como se ha visto, los átomos en la superficie de las NPs son muy inestables debido a que se encuentran mucho más expuestos que sus homólogos en el seno del material. Aunque los átomos de la superficie presentan una menor coordinación, no disponen de la movilidad suficiente para permitirles disipar el exceso de energía que concentran. Por ello, la única vía de la que disponen para poder reducir este exceso de energía es a través de distintas reacciones químicas, generando procesos de degradación rápida o de agregación irreversible, los cuales reducen el área superficial disponible afectando a su vez, de manera progresiva, a las propiedades fisicoquímicas asociadas a la escala nanométrica. El grado de agregación tiene generalmente consecuencias negativas sobre las propiedades fisicoquímicas de las NPs, por este motivo la agregación es un proceso no deseado que debe ser controlado. Este hecho sugiere la necesidad de controlar la superficie de las NPs

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	36/224



mediante la adición de diferentes moléculas o ligandos orgánicos que reduzcan este exceso de energía superficial. Los requisitos que se han de tener en cuenta a la hora de modificar la superficie en las NPs son:

- Mantener una estabilidad coloidal controlada (agregación, sedimentación y adherencia).<sup>51,52</sup>
- Interacción controlada con el medio en casos de funcionalización (recubrimiento con proteínas, intercambios de ligando, etc.).<sup>53,54</sup>
- Control sobre la reactividad química.<sup>55,56</sup>

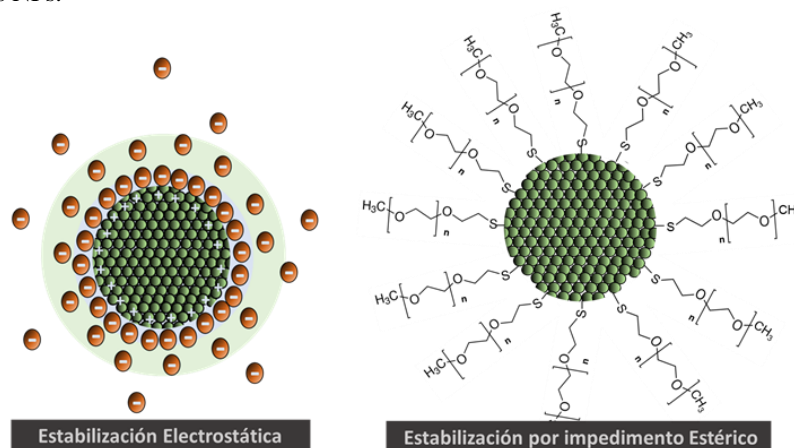
En general, existen dos tipos de estrategias de estabilización de NPs (Figura 6), la repulsión estérica y la electrostática. La primera de ellas se basa en el recubrimiento de la superficie de las NPs con surfactantes, polímeros u otras especies orgánicas. Este tipo de ligandos, por su tamaño y forma, generan impedimento estérico entre diferentes NPs, evitando el contacto directo y manteniendo las fuerzas de atracción Van der Waals por debajo del umbral de agregación. Algunas propiedades físicas de las NPs, tales como el color o la conductividad eléctrica, también pueden verse afectadas por la presencia de determinados ligandos, ya que éstos pueden mejorar o empeorar características propias de las NPs. Cuantitativamente, se sabe que una partícula de oro de 2 nm podría estar conjugada con aproximadamente 100 moléculas de ligandos.<sup>1,3,4,28</sup> Algunos de estos recubrimientos utilizados pueden no ser persistentes y desplazarse al medio de reacción exponiendo al núcleo metálico y quedando este expuesto a distintos procesos adversos. Generalmente, las moléculas o ligandos empleados para el recubrimiento interaccionan con la superficie de las NPs mediante sus grupos terminales, entre los que destacan los tioles, aminas y grupos carboxílicos. Por ejemplo, en el caso de las AuNPs, la unión química Au-Ligando mediante tioles es mucho más fuerte que con grupos amino y esta a su vez mayor que con los grupos carboxílicos.<sup>57</sup> Una manera relativamente sencilla de producir el intercambio de ligando tendría lugar exponiendo las NPs a un gradiente de concentración. Para ello, las NPs se introducirían en un medio concentrado con el nuevo ligando, favorecido así el desplazamiento del ligando inicial en la superficie. Este es el caso de AuNPs recubiertas con ligandos que presenten grupos

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	37/224



aminos o ácidos carboxílicos, ya que la interacción es de carácter débil y permite un fácil intercambio. En el caso de AuNPs recubiertas con moléculas a través de una unión fuerte, como es la producida con el grupo tiol, gracias a la elevada afinidad del oro con el azufre del grupo terminal, sólo se podría llevar a cabo el proceso de intercambio si el nuevo ligando tuviera grupos tiol y estuviera en concentraciones similares o más altas que el ligando inicial.<sup>58-60</sup>

La estrategia de estabilización basada en repulsiones electrostáticas, consiste en exponer las NPs a un medio donde su carga superficial (positiva o negativa) sea elevada. Se sabe que aquellas NPs que poseen un elevado potencial zeta, ya sea positivo o negativo, presentarán una buena estabilización electrostática. Hay que tener en cuenta que la presencia de compuestos iónicos y el pH del medio pueden favorecer o perjudicar este efecto. Por ejemplo, en un medio cuyo pH coincida con el punto isoeléctrico de la NP, su carga superficial será prácticamente nula, disminuyendo las fuerzas electrostáticas de repulsión y favoreciendo la agregación de las NPs.<sup>1</sup>



**Figura 6.** Representación de los mecanismos principales de estabilización para AuNPs.

Existen otros factores a considerar a la hora de obtener una preparación de NPs con buena estabilidad coloidal. Entre ellos, encontramos la concentración de NP en el medio, ya que a partir de un cierto valor sobrepasado (que va a depender del

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	38/224




tamaño y la morfología) el exceso de NPs presentes en el medio y los movimientos inherentes de las mismas van a generar interacciones suficientemente fuertes como para provocar la agregación. Otro factor es la fuerza iónica del medio, que si se aumenta de forma incontrolada puede llegar a disminuir la carga superficial de las NPs, favoreciendo su agregación.<sup>61</sup>

### 1.3.7. Morfología de las NPs metálicas.

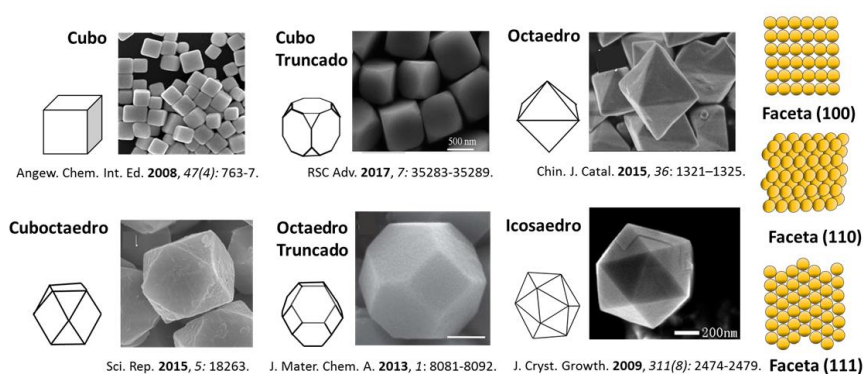
Desde un punto de vista termodinámico, los materiales alcanzan la estabilidad cuando se encuentran en un estado de mínima energía global del sistema (energía superficial y energía interna). Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, debido a la falta de coordinación, los átomos superficiales en las NPs presentan una mayor energía. Teniendo en cuenta que una de las características de las NPs es su elevada área superficial, se hace necesario un mecanismo que ayude a minimizar este exceso de energía. Aparte de los mecanismos ya propuestos, existen otros mecanismos que permiten reducir dicho exceso energía superficial. Por ejemplo, los procesos de relajación y reconstrucción superficial que tienden a minimizar la superficie expuesta adoptando la forma esférica. Las NPs son cristales con diferentes facetas cristalinas de distinta energía superficial y pueden llegar a un estado de equilibrio termodinámico mediante una configuración óptima de todas sus facetas, alcanzando una energía superficial mínima. Experimentalmente se sabe que un icosaedro, un decaedro y un cubo octaedro, al igual que sus modificaciones truncadas, son las formas más comunes que presentan las NPs (Figura 7). La construcción de Wulff predice que las formas de simetría con eje de orden cinco, como son un icosaedro o un decaedro, son las estructuras más estables para las NPs de pequeño tamaño. Mientras que las NPs cubo-octaédricas, que tienen una red cristalina centrada en las caras, son energéticamente más favorables para las NPs de mayor tamaño. A partir de los cálculos de Wulff se obtiene que, para un monocristal de estructura cúbica centrada en las caras (FCC) en disolución, la secuencia de mínima energía superficial para las distintas facetas presentes es: (111) > (110) > (100). Además, la morfología de los cristales está determinada por factores cinéticos,

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	39/224





los cuales dependen a su vez de las condiciones establecidas en el proceso de crecimiento del cristal. Un control preciso de la forma y la estructura superficial de las NPs puede emplearse como una estrategia simple para adaptar el rendimiento de las partículas a una aplicación específica, como en el caso de la catálisis. Como veremos más adelante, las reacciones catalíticas van a depender en gran medida de las facetas presentes en el material nanoestructurado. La reacción ocurre en las caras (100) y (110), y cerca de átomos que posean una baja coordinación. NPs con una configuración FCC, al poseer más átomos de baja coordinación cataliza mejor en comparación con otras estructuras.<sup>62-65</sup>



**Figura 7.** Representación e imágenes de ejemplos significativos de formas poliédricas y facetas que pueden presentar las NPs metálicas.

#### 1.4. PROPIEDADES CARACTERÍSTICAS DE LAS NPs PLASMÓNICAS.

Las NPs metálicas presentan propiedades ópticas y electrónicas muy diferentes de las que tienen estos mismos materiales a escala macroscópica, debido fundamentalmente a la combinación de su pequeño tamaño y a la alta relación superficie/volumen. Una forma de ilustrar las propiedades características de las NPs es mediante el efecto Tyndall (Figura 8), el cual permite comprobar la presencia de partículas coloidales en suspensión. Se trata de una propiedad por la cual las partículas (aunque también se da en gases) gracias a su pequeño tamaño son capaces

22

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Página	40/224



de dispersar la luz de un haz al pasar por la disolución que las contiene (Figura 8). Esta propiedad proviene de su estructura electrónica híbrida, la cual contiene niveles de energía discretos, como en átomos o moléculas y la estructura de bandas desde un punto de vista macroscópico. El límite superior de tamaño de partícula de 100 nm no es un límite fijo. Es posible, que objetos con mayores dimensiones (siendo el límite superior las micras) puedan ser definidos como nanomateriales. La razón por la cual el "rango se sitúa en el intervalo de 1 a varias centenas nm" se debe a que la aparición de un fenómeno cuántico en un material particular ocurre dentro de este rango. Entre estos efectos cuánticos, uno de los más espectaculares se presentan en las NPs basadas en metales nobles, como es el caso del oro (AuNPs) y la plata (AgNPs), que confieren a los coloides resultantes colores característicos en función de su forma y tamaño final.<sup>66</sup> Durante los últimos años, se han hecho importantes esfuerzos en la preparación por reducción de sales de oro empleando citrato u otros agentes reductores y en presencia de agentes estabilizantes que permitían mantener las NPs prácticamente monodispersas y de tamaño controlado.<sup>67</sup>

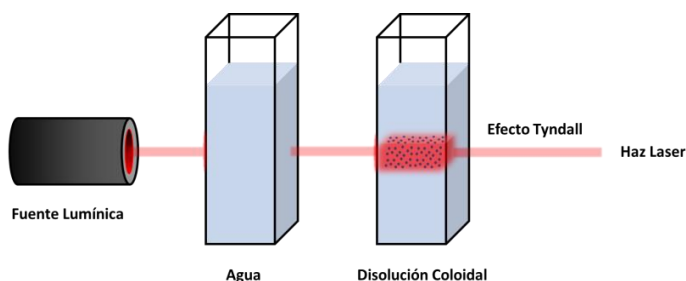


Figura 8. Efecto Tyndall.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	41/224

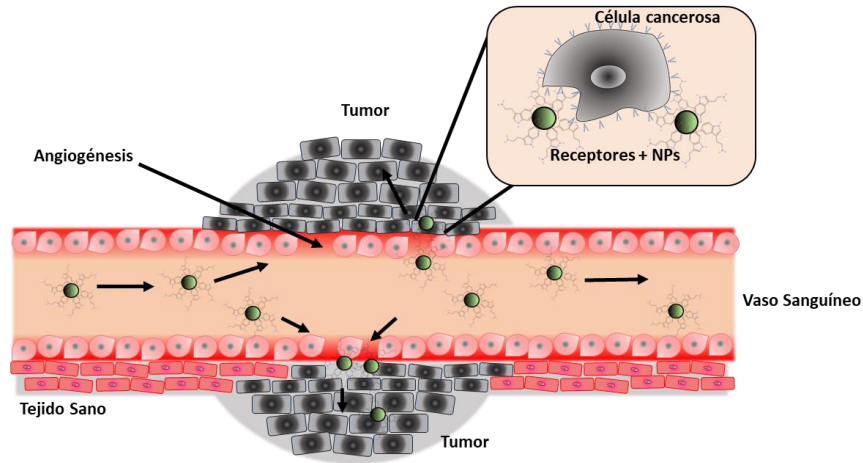


Las propiedades electrónicas de las AuNPs y AgNPs han despertado un enorme interés en los últimos años, especialmente en el campo de la catálisis. Los catalizadores basados en AuNPs pueden usarse en una amplia variedad de reacciones, tanto aplicadas en descontaminación (reducción de dióxido de carbono) como en energía (electrólisis de agua, pilas de hidrógeno o celdas de combustible).<sup>68,69</sup> Esta tesis se centra principalmente en el estudio de este último tipo de aplicación, investigando el efecto del tamaño de partícula y del ligando superficial en las propiedades electrocatalíticas de dichas NPs.

Otras propiedades características de las AuNPs son su baja citotoxicidad y elevada biocompatibilidad, lo que ha facilitado su aplicación en biomedicina. Por ejemplo, destaca su uso como agente de contraste en tomografía computarizada de rayos X (RX-CT), basado en la elevada masa atómica del oro y en el efecto local de atenuación de los rayos X producido.<sup>70,71</sup> También, hay que mencionar su uso en el desarrollo de sensores y biosensores ópticos, basados en cambios de la banda de resonancia del plasmón y en su relativa facilidad de funcionalización con biomoléculas de interés a través de la unión Au-S. Otro efecto muy interesante de estos materiales, debido a su elevada sensibilidad, es el denominado Espectroscopía Raman de superficie aumentada (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*, SERS) que se basa en el incremento de la señal Raman de la molécula unida o cercana en la escala de los nanómetros a la NPs.<sup>72</sup> Por otro lado, se está investigando el empleo de estas AuNPs para la vehiculización selectiva de medicamentos, ya que se ha demostrado que las NPs tienden a acumularse de manera pasiva en los tejidos tumorales por el efecto mejorado de permeabilidad y retención (EPR, *enhanced permeability and retention effect*) (Figura 9).<sup>73</sup> Además de minimizar los efectos secundarios por una administración más selectiva, estos nanosistemas terapéuticos también pueden liberar de manera controlada el medicamento. Es el caso de las AuNPs que se pueden sintetizar con formas anisotrópicas que desplacen su banda (o bandas) del plasmón a la región del espectro Infrarrojo cercano (NIR), pudiéndose excitar mediante un láser y produciendo un aumento de la temperatura local (efecto fototérmico) que permite la liberación del fármaco.<sup>74</sup>

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	42/224





**Figura 9.** Representación esquemática de la acumulación pasiva de NPs en células tumorales por el efecto EPR.

Las NPs basadas en plata destacan por sus excelentes propiedades antimicrobianas. Esta capacidad se debe a la reacción de hidrólisis o de descomposición de las AgNPs cuando entran en contacto con las membranas ácidas de las bacterias, provocando la liberación de iones plata. Dichos iones se internalizan en la bacteria, reaccionan con las enzimas presentes a través de los grupos “tiol” (muy frecuentes en estas enzimas) y las inactivan, impidiendo su metabolismo y provocando su muerte.<sup>75</sup>

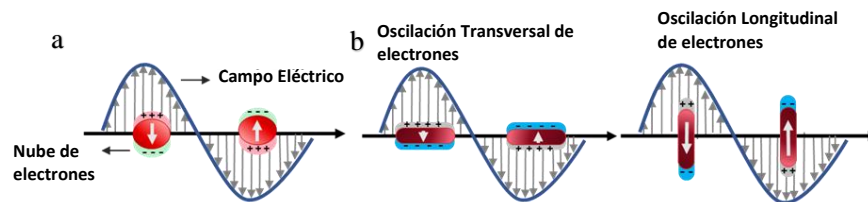
#### 1.4.1. Resonancia del plasmón superficial.

Como ya se ha mencionado, las propiedades ópticas y eléctricas de las NPs plasmónicas son directamente dependientes de la forma y el tamaño de las partículas constituyentes. Las propiedades ópticas se caracterizan principalmente por la aparición de una fuerte banda de extinción ubicada en la región ultravioleta visible (UV-visible) del espectro electromagnético, denominada banda de resonancia del plasmón superficial (el acrónimo inglés es SPR). La resonancia del plasmón se

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	43/224



define como el movimiento coherente de los electrones superficiales que se produce en ciertos metales. En Física un plasmón es un cuanto de oscilación del plasma. Es la cuasipartícula resultado de la cuantización de las oscilaciones del plasma, de la misma forma que un fotón o un fonón son cuantizaciones de ondas electromagnéticas y mecánicas. En las NPs metálicas donde los electrones están confinados en las tres dimensiones, las oscilaciones de estos inducen un campo eléctrico alrededor de las NPs. Al interactuar con la radiación electromagnética, los electrones confinados dentro de las NPs generan una acumulación de carga negativa en un lado y una acumulación de la carga positiva en el contrario, creando un dipolo eléctrico. Este dipolo genera un campo eléctrico opuesto al de la luz que obligará a los electrones a regresar al equilibrio. Estos electrones oscilarán con una cierta frecuencia resonante del plasmón (SPR).<sup>66,76</sup> La energía de esta resonancia del plasmón superficial va a depender tanto de la densidad de electrones libres como del medio dieléctrico que rodea a la partícula, situándose en el rango de la luz visible para metales nobles.<sup>77</sup> Por tanto, los plasmones son oscilaciones de la densidad del gas de Fermi (gas de electrones libres), comúnmente a frecuencias ópticas (Figura 10). Hay que resaltar que NPs con morfologías anisotrópicas permiten la resonancia de los electrones en dos (o más) direcciones, generando así dos plasmones superficiales (uno longitudinal y otro transversal) que resuenan a diferentes longitudes de onda.



**Figura 10.** a) Interacción plasmón con el campo eléctrico externo, b) Representación de la resonancia de los plasmones superficiales en NPs anisotrópicas.

La teoría de Mie de absorción y dispersión de luz por esferas se basa en las ecuaciones de Maxwell para explicar la interacción de una onda electromagnética


con pequeñas esferas metálicas (aproximando el tamaño de las NPs a esferas casi perfectas). Cuando el rango de tamaños se sitúa entre 1-3 nm, la banda sufre un desplazamiento hacia el azul y una abrupta caída en intensidad, llegando hasta el ultravioleta.<sup>78</sup> La longitud de onda exacta y el máximo de intensidad de absorbancia dependen de factores como funcionalidad superficial, temperatura y el disolvente presente. Como se verá más adelante, el espectro obtenido puede ser usado para dar una estimación de la concentración de NPs y el tamaño aproximado de las partículas en disolución.

### 1.5. ELECTROCATÁLISIS. TECNOLOGÍAS DE HIDRÓGENO.

El cambio climático está obligando a la humanidad a cambiar el modelo de producción actual basado en la obtención de energía a partir de combustibles fósiles. Las energías renovables han surgido como la alternativa más sostenible con el medio ambiente, entre las que destacan la solar, eólica, hidroeléctrica. Una de las limitaciones de este tipo de tecnologías es el transporte de la energía producida hasta el lugar de empleo. En algunas ocasiones, es inviable el coste económico que conllevaría la instalación eléctrica necesaria para llevar la energía eléctrica de un lugar a otro. Una opción bastante interesante de transportar dicha energía eléctrica sería transformándola en energía química. Esto requeriría tanto de una reacción química reversible como de un reactivo químico económico, abundante y seguro. Es ahí cuando surge el proceso de electrólisis de agua y la formación de hidrógeno como almacenamiento de energía. Por este motivo, las tecnologías de hidrógeno suponen una opción viable y prometedora para la descarbonización a nivel mundial. Aunque los últimos progresos permiten abaratar su coste y mejorar su rendimiento, aún se deben superar varios desafíos para que la generación de hidrógeno y el empleo de celdas de combustible finalmente alcancen su máximo potencial.<sup>79,80</sup> Entre las barreras más importantes que existen, cabe destacar:

- Debido a las propiedades físicas y químicas del hidrógeno, la energía necesaria para la producción de hidrógeno por electrolisis será siempre

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	45/224



mayor que la energía que va a liberar. Esto requiere que la fuente de energía renovable empleada sea barata y abundante.

- La reacción de hidrógeno con oxígeno es muy exotérmica y difícil de controlar, lo que requiere una evolución importante de los medios de almacenamiento de hidrógeno para evitar problemas de seguridad, eficiencia y coste.
- El hidrógeno puede generar problemas futuros, pues se estima que alrededor del 10-20 % del hidrógeno se escapará y entrará en la estratosfera oxidándose a moléculas de agua, pudiendo interferir en el proceso de formación de ozono. Además, existe la limitación actual de que solo es posible usar agua dulce para realizar la electrolisis.
- La tecnología de conversión más prometedora son las pilas de hidrógeno o celdas de combustible, pero, su elevado coste, la inestabilidad, la baja confiabilidad, una durabilidad inadecuada y la dependencia de catalizadores metálicos limitan en gran medida la aplicabilidad de esta tecnología,

En resumen puede concluirse que la falta de una metodología que permita producir hidrógeno con un bajo coste y a gran escala es la mayor limitación en la implementación de estas tecnologías.<sup>81</sup>

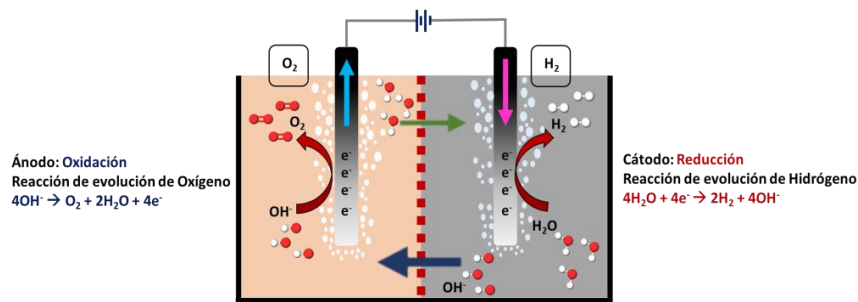
### 1.5.1 Electrólisis de agua.

El proceso de división del agua permite la descomposición directa del agua en sus elementos, generando hidrógeno y oxígeno. La energía necesaria para poder romper los enlaces O-H puede ser suministrada por diferentes fuentes de energía, tales como eléctrica, térmica o electromagnética (luz). Según la fuente de energía empleada para conseguir la división del agua, el proceso se denominará electrolisis, termólisis o fotólisis. Desde el punto de vista electroquímico, la división del agua se consigue mediante la aplicación de una corriente eléctrica al medio (Figuras 11 y 12). Esta corriente eléctrica pasa a través del electrodo y llega al agua, originando la reacción de evolución de oxígeno (OER acrónimo inglés de “*Oxygen evolution reaction*”) en el ánodo para formar oxígeno y protones, mientras que en el cátodo

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	46/224



ocurre la reacción de evolución de hidrógeno (HER acrónico inglés de “*Hydrogen evolution reaction*”) y se genera hidrógeno por reducción de protones aportados al medio en forma de agua.<sup>82</sup>



**Figura 11.** Representación esquemática de una celda electrolítica en la que mediante separador se llevan a cabo las dos semirreacciones de la electrólisis de agua en medio **alcalino**.

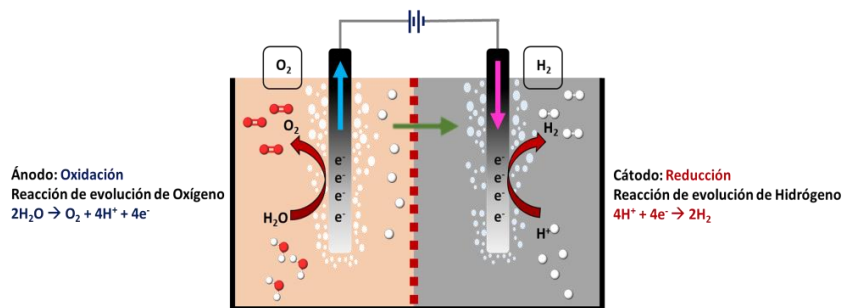
La diferencia energética entre el potencial de evolución del oxígeno (OER) y el del hidrógeno (HER) es de 1.229 eV a 25 °C. Estas reacciones se pueden llevar a cabo tanto en medio **alcalino** como en medio **ácido**, presentando distintas ventajas e inconvenientes que son mostrados en la tabla 1:

**Tabla 1:** Comparación del proceso de electrólisis de agua en medio ácido y básico.

MEDIO	VENTAJAS	INCONVENIENTES
<b>ÁCIDO</b>	Densidad corriente alta	Alto coste
	Obtención de gases puros	Ambiente corrosivo
	Respuesta rápida	No comercial
<b>ALCALINO</b>	Barato y efectivo	Densidad de corriente baja
	Durabilidad alta	Mezcla de calidad gases obtenidos
	Comercial	Respuesta lenta



De forma general, durante el proceso de electrólisis en medio alcalino, los protones suministrados en forma de agua se reducen para dar el hidrógeno en la semirreacción que ocurre en el cátodo, liberándose moléculas de hidroxilo. Estas moléculas viajan hasta el ánodo, donde se produce la semirreacción de oxidación para formar oxígeno y se liberan moléculas de agua que viajan hacia el cátodo. El diafragma se encuentra en la región central de la celda, separa el cátodo y el ánodo, permitiendo el paso de las especies formadas ( $H_2O$  y  $OH^-$ ). También separa los gases producidos de sus respectivos electrodos, evitando que se mezclen durante el proceso de electrólisis. En el caso de la electrólisis en medio ácido, la reacción ocurre de manera similar y comienza con el bombeo de agua al ánodo, donde se forma el oxígeno y se desprenden protones y electrones. Estos protones viajan a través de la membrana hacia el cátodo, donde protones y electrones se combinan para producir hidrógeno (Figura 12).



**Figura 12.** Representación esquemática de una celda electrolítica en la que se muestra la función del separador sobre ambas semirreacciones de la electrólisis de agua en medio **ácido**.

Como ya se ha mencionado, el principal inconveniente es el coste energético necesario para que la reacción ocurra. El empleo de un catalizador permite la mejora de la eficiencia del proceso de electrólisis, ya que produce una disminución

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	48/224



importante en la energía de activación de la reacción. La cinética de reacción, tanto para la HER como para la OER, va a depender en gran medida de la actividad del catalizador. Los catalizadores más comunes se basan en platino, para el caso de la HER, y óxidos de iridio o rutenio, para la OER, los cuales se obtienen de forma comercial. Pero dado que estos metales nobles poseen un elevado precio, como consecuencia de su escasez en la tierra, su empleo encarece el proceso en gran medida, limitando su aplicabilidad e impidiendo su producción a gran escala. Por este motivo, es necesario el estudio y desarrollo de nuevos catalizadores, basados en materiales nanoestructurados, permitiendo abaratar costes en comparación con los materiales macroscópicos y mejorando el rendimiento electrocatalítico de estos procesos.<sup>83,84</sup>

### 1.5.2. Pila de hidrógeno o celda de combustible.

Desde que en el año 1839 el científico suizo Christian Friedrich Schönbein descubriese las celdas de combustible o pilas de hidrógeno, estas han sufrido una constante evolución hasta la actualidad que aún no se ha detenido. En una celda de combustible se produce energía eléctrica y calor empleando hidrógeno como combustible, generando agua como único residuo. Por ello, es considerado un sistema de generar energía de manera limpia y sostenible con el medio ambiente. Por definición, una celda de combustible es una celda electroquímica que debe ser alimentada con combustible de forma continua, permitiendo producir energía eléctrica de forma constante. La celda de combustible también puede emplear otros combustibles basados en hidrógeno, tales como etanol, metanol, derivados carboxílicos y compuestos relacionados.<sup>80,85</sup> La reacción global que ocurre en la celda de combustible es la reacción inversa a la electrólisis:

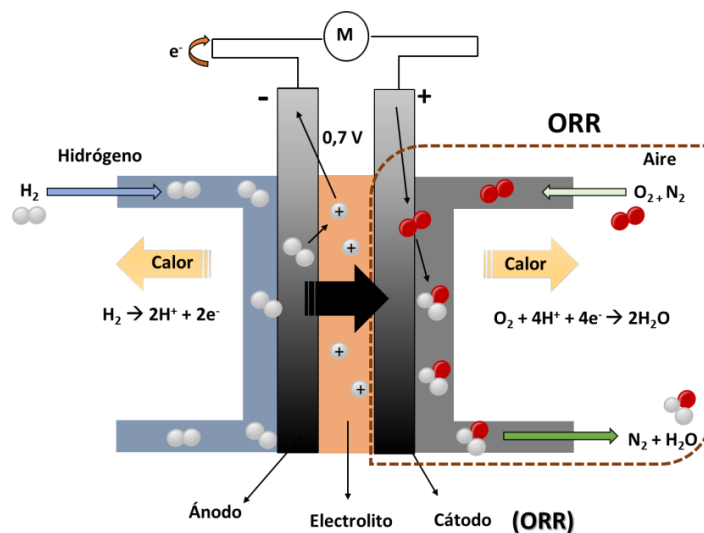


En el interior de la celda de combustible, los gases de hidrógeno y oxígeno se recombinan electroquímicamente para formar agua y producir energía, de forma eficiente, silenciosa y sin emisiones contaminantes de gases de efecto invernadero. Estas son ventajas evidentes sobre los motores térmicos. Las pilas de hidrógeno

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY</a>	Página	49/224



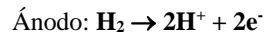
tienen un funcionamiento similar al de una batería, aunque no se agotan ni requieren procesos de recarga, sí necesita un aporte continuo de combustible (Figura 13). En la bibliografía se pueden encontrar distintos tipos de pilas de combustible, las cuales se diferencian por el electrolito utilizado y se clasifican en función de la temperatura de trabajo. Comúnmente, la configuración habitual de una celda de combustible consiste en un electrolito que se encuentra en contacto con los dos electrodos, uno a cada lado de la celda. El hidrógeno es el combustible que alimenta continuamente el ánodo, encargado de oxidarlo en agua. El hidrógeno se descompone en protones y electrones. La membrana electrolítica permite que los protones fluyan del ánodo hacia el cátodo, actuando como aislante de electrones. Una corriente de aire (rica en oxígeno) alimenta de forma continua el cátodo, donde se produce la recombinación de los protones con las moléculas de oxígeno formando como subproducto agua pura.



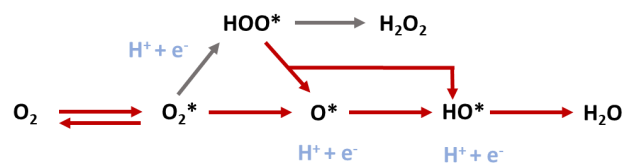
**Figura 13.** Representación esquemática de una celda de combustible en la que se indica su funcionamiento.

Analizando las semirreacciones que tienen lugar en la celda de combustible, encontramos la semirreacción de oxidación (ánodo) en la que el hidrógeno se oxida

y, por el otro lado, la semirreacción de reducción (cátodo) del oxígeno a agua, denominada reacción de reducción de oxígeno (ORR de su acrónimo en inglés: “oxygen reduction reaction”). Esta última es la reacción que requiere de mayor catálisis, debido al coste energético. Ambas semirreacciones se desarrollan según:



Cuando la ORR se desarrolla en disoluciones acuosas, esta ocurre principalmente de dos formas diferentes (Figura 14): (a) Mediante un proceso de reducción de 2 electrones, pasando desde  $O_2$  a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y (b), la más deseada, a través de un proceso de 4 electrones, produciendo la reducción directa desde  $O_2$  a  $H_2O$ .



**Figura 14.** Mecanismos en la reacción reducción del oxígeno (ORR).

En ausencia de catalizador la cinética de la ORR es lenta, limitando el rendimiento de la pila de hidrógeno. Por ello, es necesario el uso de catalizadores que permitan acelerar la cinética de esta reacción, permitiendo alcanzar un nivel práctico para el empleo de las celdas de combustible. Los materiales basados en platino (Pt) o paladio (Pd) son los catalizadores más utilizados, pero su elevado coste y su fácil contaminación asociada a su alta capacidad de adsorción limitan la aplicabilidad de estos sistemas. En los últimos años, se están desarrollando nuevos materiales electrocatalizadores para ORR, como alternativa al empleo de Pt o Pd. Una de las estrategias planteadas se basa en el uso de otros metales nobles (como el oro o la plata), metales de transición y/o aleaciones, que pueden ser sintetizados con tamaños nanométricos, con morfologías y composición química controlada. También, se está

trabajando en soportar estos materiales en soportes conductores porosos (grafito, carbonitruros, grafeno y sus derivados), para aumentar el área superficial activa de los mismos. Las principales características de estos nuevos electrocatalizadores deben ser: elevada actividad catalítica, conductividad, estabilidad química y electroquímica.<sup>86,87</sup>

### 1.6. TOXICIDAD DE LAS NPs.

Aunque la obtención de distintos materiales a tamaños nanométricos puede tener un enorme interés tecnológico, estos nuevos nanomateriales pueden a su vez generar efectos adversos para la salud, representando un riesgo significativo para el medio ambiente y la salud humana. Esto es debido fundamentalmente a las características propias derivadas de sus dimensiones (combinación de pequeño tamaño con alta relación superficie/volumen), que le otorgan una elevada capacidad de absorción celular y de bio-distribución en mamíferos. Incluso es posible la aparición de otro tipo de interacciones desconocidas hasta la fecha con células, tejidos y órganos, que pudieran conducir a impactos perjudiciales en la salud. En la actualidad, se sabe que el tamaño de las NPs es inversamente proporcional a su toxicidad potencial. Debido a su alta reactividad, las NPs pueden llegar a producir daño mitocondrial, mutaciones en el ADN e incluso provocar la muerte celular (apoptosis). En algunas ocasiones, las NPs pueden llegar a sufrir reacciones de corrosión/oxidación, aumentando su toxicidad y modificando la actividad bioquímica redox de los medios biológicos circundantes, provocando estrés oxidativo.<sup>88,89</sup> Alternativas como la encapsulación de NPs en micelas o su funcionalización con monocapas autoensambladas (SAM) pueden ayudar a prevenir esta corrosión. En cualquier caso, es necesaria la evaluación de la degradación y la persistencia de las NPs en medios biológicos, teniendo en cuenta la composición y la morfología del material que compone el núcleo, además del revestimiento de la superficie para evaluar la reactividad y toxicidad de las NPs.<sup>90-94</sup> En resumen, es necesario un estudio exhaustivo de la posible toxicidad que pudieran presentar los distintos nanomateriales, así como el

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	52/224




desarrollo y aplicación de una serie de normas de manejo, para poder mantener unas condiciones mínimas de seguridad y eficacia a la hora de su aplicación práctica.

A continuación, se citan algunas medidas de seguridad mínimas para el empleo de las NPs:

- Se recomienda el uso de máscara y guantes de nitrilo como medida de precaución, así como establecer un área de bioseguridad.
- El laboratorio en el cual se trabaja con NPs debe estar limpio y bien acondicionado.
- Los distintos equipos y el material utilizado durante el proceso de síntesis de NPs requiere de una correcta limpieza, así como mantenimiento.
- Recogida y limpieza en caso de derrames y desecho de materiales que contienen NPs.
- Los trabajadores deben recibir formación y capacitación adecuadas para el manejo de NPs.


Dentro de las NPs basadas en metales nobles, más biocompatibles en un principio, las NPs de oro con distintas morfologías, como pueden ser las nanobarras o nanoesferas se han estudiado y explotado ampliamente en el campo médico para la administración selectiva de fármacos debido a su fácil funcionalización. Aunque se pueden encontrar problemas de estabilidad coloidal en presencia de distintas sales bajo condiciones fisiológicas, lo que limita en cierta medida su rango de aplicabilidad.<sup>95</sup> La presencia de efectos citotóxicos causados por las NPs de oro, van a depender del tipo y la concentración del ligando estabilizador utilizado.<sup>91</sup> La citotoxicidad asociada por ejemplo con las nanobarras de oro, se puede atribuir al ligando bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). Aunque se puede eliminar en gran medida mediante procesos de intercambio que nos permitan funcionalizar hacia un ligando más biocompatible, no es posible asegurar la desaparición completa del CTAB. Además, el propio proceso de eliminación de NPs de oro del medio ambiente puede causar impactos negativos. Esto se debe a las distintas técnicas empleadas para poder recuperar el metal que forma parte de estas nanopartículas.<sup>96,97</sup> También se

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	53/224



encuentran efectos adversos si se consideran otras NPs metálicas como pueden ser las NPs basadas en aluminio, cuya toxicidad tiene efectos sobre el mecanismo mitocondrial y la expresión de ciertas proteínas de la barrera hematoencefálica.<sup>98</sup> Las NPs de óxido de hierro que administradas por inhalación causan efectos tóxicos al depositarse en los pulmones, el hígado, el bazo y el cerebro.<sup>99,100</sup> Las NPs que contienen cobre afectan en gran medida a la integridad de la membrana celular e inducen estrés oxidativo.<sup>101</sup> Las NPs de plata al introducirse en el sistema fisiológico, causan toxicidad debido a su bioacumulación en órganos, como el hígado, pulmones, riñones, llegando a penetrar en el sistema nervioso central.<sup>102</sup> Además, debido a sus propiedades antibacterianas cuando estas llegan al suelo afectan de forma significativa a la presencia de bacterias que son beneficiosas interfiriendo de esta forma en procesos vitales regulados por el suelo.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	54/224



**1.7. BIBLIOGRAFÍA.**

- (1) Schaming, D.; Remita, H. Nanotechnology: from the ancient time to nowadays. *Found. Chem.* **2015**, 17, 187–205.
- (2) Heiligtag, F. J.; Niederberger, M. The fascinating world of nanoparticle research. *Mater. Today.*, **2013**, 16, (7-8) 262-271.
- (3) Garusso, F. Colloids and Colloid Assemblies. *John Wiley & Sons* **2003**.
- (4) Madhavan, G. Handbook of Nanoscience, Engineering and Technology. *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* **2006**, 25 (4), 11–12.
- (5) Murphy, C. J.; Buriak, J. M. Best Practices for the Reporting of Colloidal Inorganic Nanomaterials. *Chem. Mater.* **2015**, 27 (14), 4911–4913.
- (6) Faraday, M. X. The Bakerian Lecture. —Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1857**, 147, 145–181.
- (7) Bekshaev, A. Y.; Bliokh, K. Y.; Nori, F. Mie Scattering and Optical Forces from Evanescent Fields: A Complex-Angle Approach. *Opt. Express* **2013**, 21 (6), 7082-7095.
- (8) Feynman, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics. In *Handbook of Nanoscience, Engineering, and Technology*; **2002**. CRC Press. 530 B/W Illustrations
- (9) Ekimov, A. I.; Onushchenko, A. A. Quantum Size Effect in the Optical Spectra of Semiconductor Microcrystals. *Sov. physics. Semicond.* **1982**, 56, 921-924.
- (10) Brus, L. E. Electron–Electron and Electron-hole Interactions in Small Semiconductor Crystallites: The Size Dependence of the Lowest Excited Electronic State. *J. Chem. Phys.* **1984**, 80 (9), 4403–4409.
- (11) Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. C60: Buckminsterfullerene. *Nature* **1985**, 318 (6042), 162–163.
- (12) Iijima, S. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature* **1991**, 354, 56–58.
- (13) Thomas C. Maganas, Alan L. Harrington. Intermittent Film Deposition

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHVHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHVHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHVHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	55/224





- Method and System. **1992**. *Patent* 5,143,745,
- (14) Ostwald, W.; Fischer, M. An Introduction to Theoretical and Applied Colloid Chemistry: "The World of Neglected Dimensions"; *John Wiley & Sons*; **1917** New York.
- (15) Lambert, L.; Mulvey, T. Designer Extraordinaire of the electron Microscope: A memoir. *Adv. Imag. Elect. Phys.* **1996**, 95, 2-62
- (16) Erwin W. Müller "Study of Atomic Structure of Metal Surfaces in the Field Ion Microscope. **1957**. *J. Appl. Phys.* 28, 1
- (17) Taniguchi, N. On the Basic Concept of 'Nano-Technology. In *Japan Society of Precision Engineering*; **1974** Tokyo.
- (18) Drexler, E. K. Molecular Machinery and Manufacturing With Applications to Computation, *Doctoral Thesis*. **1991**. Massachusetts Institute of Technology. <http://hdl.handle.net/1721.1/27999>
- (19) Binnig, G.; Rohrer, H. Scanning Tunneling Microscopy. *Surf. Sci.* **1983**, 126 (1-3), 236-244.
- (20) Piner, R. D.; Zhu, J.; Xu, F.; Hong, S.; Mirkin, C. A. "Dip-Pen" Nanolithography. *Science* **1999**, 283 (5402), 661-663.
- (21) Yan, H.; Choe, H. S.; Nam, S.; Hu, Y.; Das, S.; Klemic, J. F.; Ellenbogen, J. C.; Lieber, C. M. Programmable Nanowire Circuits for Nanoprocessors. *Nature* **2011**, 470 (7333), 240-244.
- (22) J.P. Sauvage, J.F. Stoddart, B. L. Feringa for the design and synthesis of molecular machines. *The Nobel Prize in Chemistry* **2016**. NobelPrize.org
- (23) Woolard, E. W.; Einstein, A.; Furth, R.; Cowper, A. D. Investigations on the Theory of the Brownian Movement. *Am. Math. Mon.* **1928**, 35 (6), 318-320.
- (24) Feynman, R. Vol 1 Ch 41 - The Brownian Movement. *The Feynman Lectures on Physics*. **1963**. Addison-Wesley Publishing.
- (25) Derjaguin, B.; Landau, L. Theory of the Stability of Strongly Charged Lyophobic Sols and of the Adhesion of Strongly Charged Particles in Solutions of Electrolytes. *Prog. Surf. Sci.* **1993**, 43 (1-4), 30-59.
- (26) Verwey, E. J. W. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. *J. Phys.* 38

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	56/224



- Colloid Chem.* **1947**, 51 (3), 631–636.
- (27) Park, J.; Joo, J.; Kwon, S. G.; Jang, Y.; Hyeon, T. Synthesis of Monodisperse Spherical Nanocrystals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46 (25), 4630–4660.
- (28) Hühn, J.; Carrillo-Carrion, C.; Soliman, M. G.; Pfeiffer, C.; Valdeperez, D.; Masood, A.; Chakraborty, I.; Zhu, L.; Gallego, M.; Yue, Z.; et al. Selected Standard Protocols for the Synthesis, Phase Transfer, and Characterization of Inorganic Colloidal Nanoparticles. *Chem. Mater.* **2017**, 29 (1), 399–461.
- (29) Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puentes, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir* **2011**, 27 (17), 11098–11105.
- (30) Piella, J.; Bastús, N. G.; Puentes, V. Size-Controlled Synthesis of Sub-10-Nanometer Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles and Related Optical Properties. *Chem. Mater.* **2016**, 28 (4), 1066–1075.
- (31) Lim, S. I.; Varón, M.; Ojea-Jiménez, I.; Arbiol, J.; Puentes, V. Exploring the Limitations of the Use of Competing Reducers to Control the Morphology and Composition of Pt and PtCo Nanocrystals. *Chem. Mater.* **2010**, 22 (15), 4495–4504.
- (32) Sperling, R. A.; García-Fernández, L.; Ojea-Jiménez, I.; Piella, J.; Bastús, N. G.; Puentes, V. One-Pot Synthesis of Cationic Gold Nanoparticles by Differential Reduction. *Zeitschrift für Phys. Chemie* **2017**, 231 (1) 7-18.
- (33) Ojea-Jiménez, I.; García-Fernández, L.; Lorenzo, J.; Puentes, V. F. Facile Preparation of Cationic Gold Nanoparticle-Bioconjugates for Cell Penetration and Nuclear Targeting. *ACS Nano* **2012**, 6 (9), 7692–7702.
- (34) Beberwyck, B. J.; Surendranath, Y.; Alivisatos, A. P. Cation Exchange: A Versatile Tool for Nanomaterials Synthesis. *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117 (39), 19759–19770.
- (35) Lim, S. I.; Varon, M.; Ojea-Jiménez, I.; Arbiol, J.; Puentes, V. Pt Nanocrystal Evolution in the Presence of Au(III)-Salts at Room Temperature: Spontaneous Formation of AuPt Heterodimers. *J. Mater. Chem.* **2011**, 21 (31), 11518-11523.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	57/224



- (36) Iida, R.; Mitomo, H.; Niikura, K.; Matsuo, Y.; Ijiro, K. Two-Step Assembly of Thermoresponsive Gold Nanorods Coated with a Single Kind of Ligand. *Small* **2018**, *14* (14), 1704230.
- (37) Gonzalez E.; Arbiol J.; Puentes V. F.; Carving at the Nanoscale: Sequential Galvanic Exchange and Kirkendall Growth at Room Temperature. *Science* **2011**, *334* (6061), 1377-1380.
- (38) Thanh, N. T. K.; Maclean, N.; Mahiddine, S. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (15), 7610–7630.
- (39) Polte, J. Fundamental Growth Principles of Colloidal Metal Nanoparticles – a New Perspective. *Cryst.Eng.Comm.* **2015**, *17* (36), 6809–6830.
- (40) Lorenz, R. Lehrbuch Der Allgemeinen Chemie, von W. Ostwald. II. Band. 2. Teil: Verwandtschaftslehre. 1. Lieferung. (Leipzig, 1896.) 5 Mark. *Zeitschrift für Anorg. Chemie* **1897**, *15* (1), 239–239.
- (41) Ostwald, W. Studien Über Die Bildung Und Umwandlung Fester Körper I. Abhandlung: Übersättigung Und Überkaltung. *Zeitschrift für Phys. Chemie Int. J. Res. Phys. Chem. Chem. Phys.* **1897**.
- (42) Vekilov, P. G. The Two-Step Mechanism of Nucleation of Crystals in Solution. *Nanoscale* **2010**, *2* (11), 2346-2357.
- (43) Zheng, H.; Smith, R. K.; Jun, Y. W.; Kisielowski, C.; Dahmen, U.; Alivisatos, A. P. Observation of Single Colloidal Platinum Nanocrystal Growth Trajectories. *Science* **2009**, *324* (5932), 1309–1312.
- (44) Niederberger, M.; Cölfen, H. Oriented Attachment and Mesocrystals: Non-Classical Crystallization Mechanisms Based on Nanoparticle Assembly. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8* (28), 3271–3287.
- (45) Sánchez-Iglesias, A.; Winckelmans, N.; Altantzis, T.; Bals, S.; Grzelczak, M.; Liz-Marzán, L. M. High-Yield Seeded Growth of Monodisperse Pentatwinned Gold Nanoparticles through Thermally Induced Seed Twinning. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (1), 107–110.
- (46) Peng, X.; Manna, L.; Yang, W.; Wickham, J.; Scher, E.; Kadavanich, A.; Alivisatos, A. P. Shape Control of CdSe Nanocrystals. *Nature* **2000**, *404*

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	58/224



- (47) Peng, Z. A.; Peng, X. Mechanisms of the Shape Evolution of CdSe Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (7), 1389–1395.
- (48) Karatutlu, A.; Barhoum, A.; Sapelkin, A. Theories of Nanoparticle and Nanostructure Formation in Liquid Phase. In *Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures*; Elsevier, **2018**, 597–619.
- (49) Lawrence, M.; Testen, A.; Koklic, T.; Smithies, O. A Simple Method for the Size Controlled Synthesis of Stable Oligomeric Clusters of Gold Nanoparticles under Ambient Conditions. *J. Vis. Exp.* **2016**, 108. e53388
- (50) Herron, N.; Wang, Y.; Eckert, H. Synthesis and Characterization of Surface-Capped, Size-Quantized Cadmium Sulfide Clusters. Chemical Control of Cluster Size. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (4), 1322–1326.
- (51) Singh, K.; Raghav, A.; Jha, P. K.; Satapathi, S. Effect of Size and Charge Asymmetry on Aggregation Kinetics of Oppositely Charged Nanoparticles. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 3762.
- (52) Lee, C.-F.; You, P.-Y.; Lin, Y.-C.; Hsu, T.-L.; Cheng, P.-Y.; Wu, Y.-X.; Tseng, C.-S.; Chen, S.-W.; Chang, H.-P.; Lin, Y.-W. Exploring the Stability of Gold Nanoparticles by Experimenting with Adsorption Interactions of Nanomaterials in an Undergraduate Lab. *J. Chem. Educ.* **2015**, *92* (6), 1066–1070.
- (53) Alex, S.; Tiwari, A. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications—A Review. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15* (3), 1869–1894.
- (54) Xu, X.; Rosi, N. L.; Wang, Y.; Huo, F.; Mirkin, C. A. Asymmetric Functionalization of Gold Nanoparticles with Oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (29), 9286–9287.
- (55) Maus, L.; Spatz, J. P.; Fiammengo, R. Quantification and Reactivity of Functional Groups in the Ligand Shell of PEGylated Gold Nanoparticles via a Fluorescence-Based Assay. *Langmuir* **2009**, *25* (14), 7910–7917.
- (56) Younis, N. S.; Bakir, E. M.; Mohamed, M. E.; El Semary, N. A. Cyanobacteria as Nanogold Factories II: Chemical Reactivity and Anti-

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	59/224



- Myocardial Infraction Properties of Customized Gold Nanoparticles Biosynthesized by *Cyanothece* Sp. *Mar. Drugs* **2019**, *17* (7), 402.
- (57) Sperling, R. A.; Parak, W. J. Surface Modification, Functionalization and Bioconjugation of Colloidal Inorganic Nanoparticles. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2010**, *368* (1915), 1333–1383.
- (58) Smith, A. M.; Marbella, L. E.; Johnston, K. A.; Hartmann, M. J.; Crawford, S. E.; Kozycz, L. M.; Seferos, D. S.; Millstone, J. E. Quantitative Analysis of Thiolated Ligand Exchange on Gold Nanoparticles Monitored by  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (5), 2771–2778.
- (59) Klueker, M.; Mondeshki, M.; Nawaz Tahir, M.; Tremel, W. Monitoring Thiol–Ligand Exchange on Au Nanoparticle Surfaces. *Langmuir* **2018**, *34* (4), 1700–1710.
- (60) Woehle, G. H.; Brown, L. O.; Hutchison, J. E. Thiol-Functionalized, 1.5-Nm Gold Nanoparticles through Ligand Exchange Reactions: Scope and Mechanism of Ligand Exchange. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (7), 2172–2183.
- (61) Burns, C.; Spindel, W.; Puckett, S.; Pacey, G. Solution Ionic Strength Effect on Gold Nanoparticle Solution Color Transition. *Talanta* **2006**, *69* (4), 873–876.
- (62) Svalova, A. I.; Stishenko, P. V. The Statistical Modeling of the Platinum Nanoparticles in the Transition Area from the Five-Fold Symmetry Structure to the Crystal Lattice. *Procedia Eng.* **2015**, *113*, 429–434.
- (63) Pal, J.; Pal, T. Faceted Metal and Metal Oxide Nanoparticles: Design, Fabrication and Catalysis. *Nanoscale* **2015**, *7* (34), 14159–14190.
- (64) Svalova, A. I.; Stishenko, P. V. Distribution of Active Site Types on Au Nanoparticles with Different Structures: Study of Thermal Dependence. *Procedia Eng.* **2016**, *152*, 67–72.
- (65) Wulff, G. *Zeitschrift Fur Kristallographie Und Mineralogie.* **1901**, *34*, 449.
- (66) García, M. A. Surface Plasmons in Metallic Nanoparticles: Fundamentals and Applications. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2011**, *44* (28), 283001.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	60/224



- (67) Edwards, P. P.; Thomas, J. M. Gold in a Metallic Divided State—From Faraday to Present-Day Nanoscience. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (29), 5480–5486.
- (68) Johnston, R. L. Metal Nanoparticles and Nanoalloys. *Front. Nanosci.*; **2012**, 1–42.
- (69) Carabineiro, S. A. C. Special Issue: Gold Nanoparticles for Catalytic Applications. *Appl. Sci.* **2019**, *9* (14), 2890.
- (70) Xi, D.; Dong, S.; Meng, X.; Lu, Q.; Meng, L.; Ye, J. Gold Nanoparticles as Computerized Tomography (CT) Contrast Agents. *RSC Adv.* **2012**, *2* (33), 12515–12524.
- (71) Mahan, M. M.; Doiron, A. L. Gold Nanoparticles as X-Ray, CT, and Multimodal Imaging Contrast Agents: Formulation, Targeting, and Methodology. *J. Nanomater.* **2018**, *2018*, 1–15.
- (72) Tian, F.; Bonnier, F.; Casey, A.; Shanahan, A. E.; Byrne, H. J. Surface Enhanced Raman Scattering with Gold Nanoparticles: Effect of Particle Shape. *Anal. Methods* **2014**, *6* (22), 9116–9123.
- (73) Greish, K. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting. In *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*; **2010**, 25–37.
- (74) Goodman, A. M.; Neumann, O.; Nørregaard, K.; Henderson, L.; Choi, M.-R.; Clare, S. E.; Halas, N. J. Near-Infrared Remotely Triggered Drug-Release Strategies for Cancer Treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114* (47), 12419–12424.
- (75) Sharma, V. K.; Yngard, R. A.; Lin, Y. Silver Nanoparticles: Green Synthesis and Their Antimicrobial Activities. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *145* (1–2), 83–96.
- (76) Chen, Y.; Ming, H. Review of Surface Plasmon Resonance and Localized Surface Plasmon Resonance Sensor. *Photonic Sensors* **2012**, *2* (1), 37–49.
- (77) Cao, G. *Nanostructures and Nanomaterials - Synthesis, Properties and Applications*; Imperial College Press: London, **2004**.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	61/224



- (78) Mie, G. Beiträge Zur Optik Trüber Medien, Speziell Kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* **1908**, 330 (3), 377–445.
- (79) Staffell, I.; Scamman, D.; Velazquez Abad, A.; Balcombe, P.; Dodds, P. E.; Ekins, P.; Shah, N.; Ward, K. R. The Role of Hydrogen and Fuel Cells in the Global Energy System. *Energy Environ. Sci.* **2019**, 12 (2), 463–491.
- (80) Dodds, P. E.; Staffell, L.; Hawkes, D. A.; Li, F.; Grunewald, P.; McDowall, W.; Ekins, P. Hydrogen and fuel cell technologies for heating: A review. *International Journal of Hydrogen Energy.* **2015**, 40 (5), 2065–2083.
- (81) Zhang, J.; Ji, L. C.; Jin, B. Hydrogen: Technologies, Policies and Challenges. *Appl. Mech. Mater.* **2012**, 260–261, 28–33.
- (82) Tee, S. Y.; Win, K. Y.; Teo, W. S.; Koh, L.-D.; Liu, S.; Teng, C. P.; Han, M.-Y. Recent Progress in Energy-Driven Water Splitting. *Adv. Sci.* **2017**, 4 (5), 1600337.
- (83) Hu, C.; Zhang, L.; Gong, J. Recent Progress Made in the Mechanism Comprehension and Design of Electrocatalysts for Alkaline Water Splitting. *Energy Environ. Sci.* **2019**, 12 (9), 2620–2645.
- (84) Kumar, S.; Himabindu, V. Hydrogen Production by PEM Water Electrolysis – A Review. *Mater. Sci. Energy Technol.* **2019**, 2 (3), 442–454.
- (85) Felseghi, R. A.; Carcadea, E.; Raboaca, M. S.; Trufin, C. N.; Filote, C. Hydrogen Fuel Cell Technology for the Sustainable Future of Stationary Applications. *Energies* **2019**, 12 (23), 4593.
- (86) Shao, M.; Chang, Q.; Dodelet, J. P.; Chenitz, R. Recent Advances in Electrocatalysts for Oxygen Reduction Reaction. *Chem. Rev.* **2016**, 116 (6), 3594–3657.
- (87) Xing, W.; Yin, G.; Zhang, J. *Rotating Electrode Methods and Oxygen Reduction Electrocatalysts*; Elsevier, **2014**.
- (88) Shrivastava, R.; Kushwaha, P.; Bhutia, Y. C.; Flora, S. Oxidative Stress Following Exposure to Silver and Gold Nanoparticles in Mice. *Toxicol. Ind. Health* **2016**, 32 (8), 1391–1404.
- (89) Choi, J.; Sun, N. Nanoparticles in Biomedical Applications and Their Safety

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	62/224



- Concerns. In *Biomedical Engineering - From Theory to Applications*; InTech, **2011**. InTechOpen, UK.
- (90) de Jong. Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards. *Int. J. Nanomedicine* **2008**, 133-149.
- (91) Karlsson, H. L.; Toprak, M. S.; Fadeel, B.;. Chapter 4 - Toxicity of Metal and Metal Oxide Nanoparticles. *Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition)* **2015**. 1, 75-112 Elsevier
- (92) Shin, S.; Song, I.; Um, S. Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity. *Nanomaterials* **2015**, 5 (3), 1351–1365.
- (93) Kang, M.; Lim, C. H.; Han, J. H. Comparison of Toxicity and Deposition of Nano-Sized Carbon Black Aerosol Prepared With or Without Dispersing Sonication. *Toxicol. Res.* **2013**, 29 (2), 121–127.
- (94) Gautam, A.; van Veggel, F. C. J. M. Synthesis of Nanoparticles, Their Biocompatibility, and Toxicity Behavior for Biomedical Applications. *J. Mater. Chem. B* **2013**, 1 (39), 5186-5200.
- (95) Alkilany, M. A.; Murphy, J. C.; Toxicity and Cellular Uptake of Gold Nanoparticles: What we Have Learned so Far. **2010**, *J. Nanopart. Res.* 12, 2313–2333.
- (96) Pati, P.; McGinnis, S.; Vikesland, P. J. Waste Not Want Not: Life Cycle Implications of Gold Recovery and Recycling from Nanowaste. *Environ. Sci. Nano* **2016**, 3 (5), 1133–1143.
- (97) Ray, P. C.; Yu, H.; Fu, P. P. Toxicity and Environmental Risks of Nanomaterials: Challenges and Future Needs. *J. Environ. Sci. Heal. Part C* **2009**, 27 (1), 1–35.
- (98) Chen, L.; Yokel, R. A.; Hennig, B.; Toborek, M. Manufactured Aluminum Oxide Nanoparticles Decrease Expression of Tight Junction Proteins in Brain Vasculature. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2008**, 3 (4), 286–295.
- (99) Liu, G.; Gao, J.; Ai, H.; Chen, X. Applications and Potential Toxicity of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Small* **2013**, 9 (9–10), 1533–1545.
- (100) Zhu, M.-T.; Feng, W.-Y.; Wang, B.; Wang, T.-C.; Gu, Y.-Q.; Wang, M.;


Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	63/224





- Wang, Y.; Ouyang, H.; Zhao, Y.-L.; Chai, Z.-F. Comparative Study of Pulmonary Responses to Nano- and Submicron-Sized Ferric Oxide in Rats. *Toxicology* **2008**, *247* (2–3), 102–111.
- (101) Ahamed, M.; Siddiqui, M. A.; Akhtar, M. J.; Ahmad, I.; Pant, A. B.; Alhadlaq, H. A. Genotoxic Potential of Copper Oxide Nanoparticles in Human Lung Epithelial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *396* (2), 578–583.
- (102) Tang, J.; Xiong, L.; Wang, S.; Wang, J.; Liu, L.; Li, J.; Yuan, F.; Xi, T. Distribution, Translocation and Accumulation of Silver Nanoparticles in Rats. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, *9* (8), 4924–4932.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	64/224



# *Capítulo II*

## *Técnicas Experimentales*

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	65/224



Registro Electrónico de la Universidad de Córdoba
ENTRADA
03/06/2020 12:16
2020022100

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	66/224




## 2.1. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

La microscopía electrónica está directamente relacionada con la evolución de la nanotecnología. Gracias a su desarrollo fue posible observar las partículas preparadas en la escala nanoscópica y determinar de forma visual su tamaño, morfología, así como su polidispersidad. Se trata de una tecnología compleja que ha estado evolucionado durante los últimos 80 años. Cuando se habla de microscopía, tanto óptica como electrónica, la resolución de un microscopio es el parámetro más importante que debe tenerse en cuenta. La resolución indica la distancia mínima a la que se pueden discriminar dos puntos y este límite viene determinado por la longitud de onda de la fuente de iluminación. De acuerdo con Ernest Abbe, la resolución ( $R$ ) se puede calcular como la distancia mínima detectable entre dos puntos de una imagen según la ecuación:

$$R = K \frac{\lambda}{n \cdot \text{sen}(\alpha)} \quad (1)$$

donde  $K$  es una constante que depende del aparato de medida,  $\lambda$  es la longitud de onda del haz de luz con la que se ilumina la muestra,  $n$  es el índice de refracción y  $\alpha$  es el ángulo de apertura entre el objetivo y la muestra a observar. Según esta ecuación, si se pretende aumentar la resolución de un microscopio habría que disminuir el numerador o aumentar el denominador. En el caso de  $\lambda$  para un microscopio óptico, el límite es impuesto por la longitud de onda de la radiación de luz visible, que tiene su valor más bajo a 400 nm (azul) y el más alto a 700 nm (rojo). Si se considera el espectro electromagnético al completo, las longitudes de onda más pequeñas que la luz visible serían la radiación ultravioleta (100-400 nm) y los rayos X (10 pm-10 nm) pero su implementación está limitada debido a las características propias de este tipo de radiación. En caso del denominador  $n \cdot \text{sen}(\alpha)$ , habría que incrementar el índice de refracción del medio entre la lente y el objeto, o aumentar el seno del ángulo  $\alpha$ . Una vez que se elige el material óptico, el índice de refracción

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	67/224



se convierte en una variable fija. Por otro lado, si se aumenta el diámetro de las lentes o se reduce la distancia focal de los objetivos se incrementa el ángulo  $\alpha$ .<sup>1</sup>

Las partículas como los electrones pueden comportarse como ondas, este hecho es conocido como dualidad onda-partícula. En 1924, de Broglie estableció la relación inversamente proporcional entre la longitud de onda de un haz de electrones y la cantidad de movimiento del electrón según la ecuación:

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{mv} \quad (2)$$

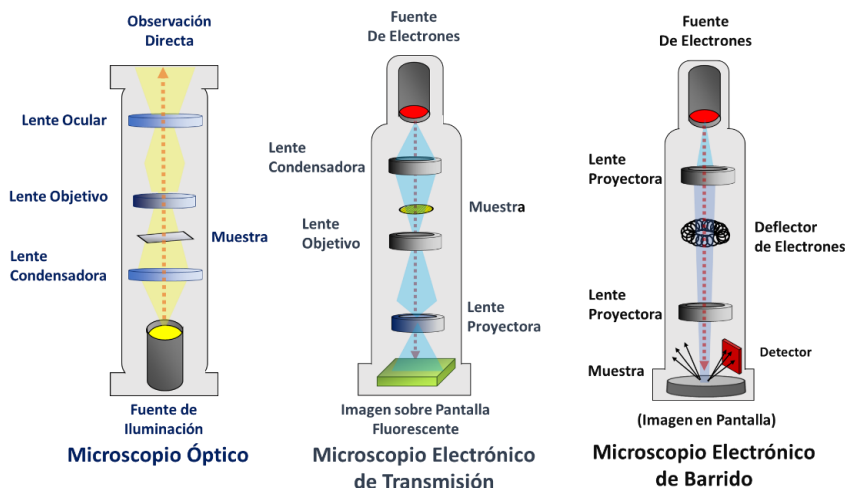
donde  $\lambda$  es la longitud de onda de haz de electrones,  $h$  es la constante de Planck,  $p$  es la cantidad de movimiento que es equivalente al producto de la masa  $m$  y la velocidad  $v$  del electrón. Analizando esta expresión se puede determinar que las longitudes de onda de los electrones dependen de su velocidad.<sup>2,3</sup> La velocidad a la que se mueven los electrones se puede cambiar a través de un rango de voltajes. Cuando los voltajes aplicados son altos, más se aceleran los electrones y se obtienen longitudes de onda más pequeñas. Por ejemplo, electrones acelerados con voltajes de 1 a 300 keV poseen longitudes de onda comprendidas entre 0.040 y 0.001 nm. Un microscopio diseñado para usar electrones acelerados en voltajes entre 200-300 keV ofrece la posibilidad de llegar a obtener resoluciones por debajo de 0.1 nm.

Los microscopios electrónicos poseen una configuración basada en la de los microscopios ópticos, pero en vez de lentes ópticas se emplean lentes magnéticas para concentrar y guiar el haz de electrones. De forma general, todos los microscopios electrónicos cuentan con cuatro partes principales. Disponen de un cañón de electrones, una columna constituida por una serie de lentes (que crean campos magnéticos para dirigir y enfocar el haz de electrones hacia la muestra), un sistema de enfriamiento y un sistema de vacío. Una de las partes más importantes, la constituye el sistema de vacío que se encarga de mantener la integridad del haz de electrones, ya que estos pueden ser desviados por las moléculas de aire (Figura 1). Dentro de las ventajas de este tipo de microscopía, es necesario remarcar la alta

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	68/224



resolución como principal característica, especialmente cuando se compara con otras, como la óptica. Los microscopios electrónicos poseen altos rangos de magnificación, o lo que es lo mismo, obtienen imágenes más grandes de la muestra independientemente de la resolución del equipo. Gracias a la interacción de los electrones del haz con los átomos de la muestra, se puede obtener información del tamaño, así como información sobre la composición química de la muestra. Pero existen desventajas, como el hecho de trabajar en alto vacío que limita el tipo de muestra que se puede estudiar. Comúnmente, los microscopios electrónicos trabajan en el rango de 1-300 keV, por lo que la elevada energía de los electrones producidos en el haz pueden producir cambios químicos en la muestra.



**Figura 1.** Esquema de las configuraciones para microscopio óptico, electrónico de transmisión y de barrido.

### 2.1.1. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

En TEM se transmite un haz de electrones a través de una muestra ultrafina, la cual está insertada sobre una sonda porta muestras que interactúa con el haz. De esta forma, se genera una imagen de la muestra, que luego se amplía y enfoca en una pantalla fluorescente o cámara CCD. Los electrones que componen el haz son conducidos a través de un voltaje de aceleración, para darles la energía suficiente y

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	69/224



así pasar a través del material que se pretende estudiar. En el modo habitual de trabajo los electrones son acelerados con energías de 200-300 keV. Sin embargo, es posible trabajar en rangos más bajos de energía al acelerar los electrones por debajo de los 100 keV. De esta forma, se consigue analizar elementos más ligeros, reduciendo el daño que se le podría ocasionar a la muestra. Las lentes condensadoras se encargan de guiar y enfocar este haz de electrones hacia la muestra. Una parte de los electrones son dispersados y otra parte absorbidos. Los electrones que se transmiten forman una imagen aumentada de la muestra, donde las zonas de mayor densidad electrónica se observan más oscuras, mientras que las zonas de menor densidad electrónica aparecen más claras. La gran ventaja que ofrece TEM reside en su elevado rango de magnificación, así como de resolución. Esto es el resultado de la pequeña longitud de onda del haz de electrones de trabajo, la cual viene dada por la relación de De Broglie y su capacidad para suministrar tanto imágenes como información de difracción para una única muestra. Una limitación de TEM es que la intensidad del haz depende de la cantidad de electrones que llegan a la muestra y el uso de intensidades altas puede en muchos casos llegar a dañarlas durante su observación.<sup>4</sup>



**Figura 2.** Equipo de microscopía electrónica de transmisión JEOL JEM 2100 del SCAI-UCO, imagen obtenida de “<https://www.jeol.co.jp/en/products/detail/JEM-2100.html>”

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	70/224



Todas las imágenes de TEM presentadas en esta Tesis Doctoral fueron obtenidas mediante el microscopio de alta resolución JEOL JEM 2010 (con sistema de microanálisis de rayos X por dispersión de energías) del servicio centralizado de apoyo a la investigación de la Universidad de Córdoba (SCAI-UCO) (Figura 2). Las muestras fueron preparadas sobre rejillas de cobre recubiertas con una película de carbono (Ref.: Formvar/Carbon 200 mesh, Copper, FCF200-Cu), depositando una gota de la muestra diluida (volumen aproximado 7-8  $\mu\text{L}$ ) y dejándola secar a temperatura ambiente.

## 2.2 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

### 2.2.1. Espectroscopía de absorción UV-Visible.

Es una técnica de caracterización básica para analizar las muestras obtenidas en la síntesis de NPs plasmónicas, debido a la presencia del plasmón superficial. Desde un punto de vista general, esta técnica permite registrar los cambios que ocurren cuando la radiación electromagnética, en la región del ultravioleta-visible, interacciona con una muestra. Electrónicamente, se produce la absorción de fotones por los distintos materiales que constituyen la muestra y la promoción de los electrones de valencia de un nivel fundamental a otro excitado. De este modo, cada molécula absorberá a distintas longitudes de onda que son determinadas por la diferencia entre los niveles de energía disponibles del material de estudio. En el caso de NPs plasmónicas, existe una relación directa entre el espectro de absorción obtenido y la forma y tamaño de las partículas, debido a la presencia del plasmón superficial (movimiento coherente de los electrones que componen la nube electrónica superficial de las NPs y que induce un campo eléctrico alrededor). Además, las propiedades ópticas de estas NPs van a depender de su naturaleza y de las condiciones fisicoquímicas del medio que les rodean. Al interactuar con la radiación electromagnética, los electrones confinados en las NPs plasmónicas generan una acumulación de carga negativa en un lado y una acumulación de la carga positiva en el contrario, creando un dipolo eléctrico. Este dipolo genera un campo eléctrico opuesto al de la luz, que obliga a los electrones a regresar al equilibrio.<sup>5</sup>

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	71/224





En un espectrofotómetro UV-Visible, un haz de intensidad conocida  $I_0$  se hace incidir sobre la muestra en estudio y se compara con la intensidad del haz  $I$  que resulta de atravesar la muestra. La transmitancia  $T$  es la relación entre ambas intensidades, y la absorbancia  $A$ , se define mediante la siguiente ecuación:

$$A = -\log_{10} T = -\log_{10} \left( \frac{I}{I_0} \right) \quad (3)$$

Cuando las especies absorbentes se encuentran en disolución, la absorbancia se puede relacionar con la concentración  $c$  mediante la Ley de Lambert-Beer:<sup>6-8</sup>:

$$A = -\log_{10} \left( \frac{I}{I_0} \right) = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (4)$$

donde  $\epsilon$  es la constante de absortividad molar o coeficiente de extinción específico del compuesto en estudio,  $l$  es el paso óptico de la muestra y  $c$  la concentración de la especie absorbente. Normalmente, el haz de luz de un espectrofotómetro proviene de una bombilla incandescente para las longitudes de onda de la región del visible y de una lámpara de arco de deuterio para el ultravioleta. A continuación, el haz llega a un monocromador, donde se separan las diferentes longitudes de onda, y se hace incidir sobre la muestra, tras lo que se mide la intensidad  $I$  en un detector de fotodiodo o CCD.



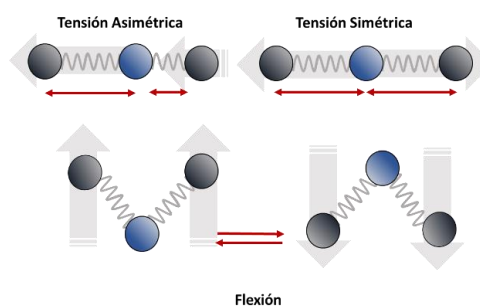
**Figura 3.** Espectrofotómetro de absorción UV-visible Cary 100 Bio (Imagen obtenida de “<https://www.agilent.com/en/products/uv-vis-uv-vis-nir/uv-vis-uv-vis-nir-systems/cary-100-uv-vis>”)

Todos los espectros de absorción incluidos en esta Tesis Doctoral se midieron en un espectrofotómetro UV-Visible Cary 100bio (Figura 3). Para ello, se emplearon

cubetas de plástico desechables de 1cm de paso óptico y, como blanco, el propio disolvente en el que estaban dispersas las NPs.

### 2.2.2. Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR).

La mayoría de las moléculas y cristales vibran, y la energía necesaria para generar dicho movimiento se encuentra en la región infrarroja (IR, entre 700 nm y 1 mm) del espectro electromagnético. El principio fundamental de la espectrometría molecular se basa en considerar que las moléculas absorben energía de la luz a longitudes de ondas específicas. En el caso de la espectroscopía IR, el hecho de que absorban esta radiación provoca una serie de vibraciones características, las cuales suelen estar asociadas a ciertos grupos funcionales presentes en una molécula. Dicho de otro modo, las moléculas tienen la capacidad de rotar y vibrar a distintas frecuencias (modos vibracionales). Al realizar una medida de FT-IR, se obtiene un espectro en el que se observan distintas bandas asociadas a los distintos movimientos vibracionales de los enlaces que posee la molécula (Figura 4). Este conjunto de bandas constituye lo que se denomina “huella dactilar” del compuesto. Cada compuesto tendrá entonces un comportamiento particular frente a al haz de radiación IR. Los modos vibracionales inducen estas oscilaciones al entrar en resonancia con la radiación IR, produciendo un intercambio de energía entre el haz y las moléculas constituyentes del compuesto en estudio.



**Figura 4.** Representación de los distintos modos vibracionales para una molécula triatómica.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	73/224



A partir de las siguientes ecuaciones es posible calcular la frecuencia de vibración para una molécula diatómica:


$$\nu_o = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (5)$$

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (6)$$

donde  $\nu$  es la frecuencia vibracional de un enlace entre dos átomos que depende directamente de  $k$ , que es la fuerza del enlace, y de  $\mu$ , la masa reducida. Las masas  $m_1$  y  $m_2$  son las masas de los átomos que forman la molécula. La absorción de radiación IR se producirá siempre que la frecuencia del haz incidente se corresponda con  $\nu_o$ . Cuanto más fuertes y rígidos sean los enlaces, mayores serán las frecuencias de vibración. Además, las masas atómicas más ligeras suelen originar mayores frecuencias de absorción. Por ejemplo, una molécula lineal formada por N átomos puede vibrar de 3N-5 formas diferentes, mientras que si no es lineal lo hará de 3N-6 formas. Se denomina “modo normal de vibración” a cada una de las formas en la cual la molécula vibra, y cada modo tiene una frecuencia que depende de las masas de los átomos que se mueven y de las constantes de estos movimientos. Desde el punto de vista de la mecánica cuántica, no todas las vibraciones atómicas son capaces de absorber radiación IR. La regla de selección nos indica que para que una molécula sea visible en el IR, el momento dipolar de la misma debe cambiar mientras dure la vibración de los enlaces.<sup>9</sup> Cuando se aplica esta técnica para estudiar un compuesto, se obtienen espectros de transmitancia o absorbancia frente al número de onda. El empleo del número de onda es debido a que este varía de forma lineal con la energía.

$$\nu = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} = \frac{E}{hc} \quad (7)$$

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	74/224



siendo  $\nu$  el número de onda,  $\lambda$  la longitud de onda,  $\nu$  la frecuencia de vibración,  $h$  la constante de Planck y  $E$  la energía del haz incidente. La espectroscopia IR por transformadas de Fourier (FT-IR), emplea la interferometría para obtener información sobre la molécula en estudio. Su funcionamiento está basado en el principio del interferómetro de Michelson, en donde un haz IR golpea a un separador basado en un espejo semirreflejante que divide el haz de la luz en dos partes iguales. Estos dos haces de luz se unen de nuevo en el separador durante su viaje de vuelta, tras ser reflejados sobre otros dos espejos. Uno de ellos móvil dispuesto frente a la trayectoria del haz original, y el otro fijo perpendicular al primero. El espejo móvil se encarga de generar un pequeño desfase, haciendo que el camino óptico de cada haz sea diferente. Desde el separador, el haz se enfoca hacia el compartimento de muestra y de ahí hacia el detector. El gráfico resultante (Intensidad vs. Desfase) se denomina interferograma. Para interpretar la información contenida en los interferogramas, hay que calcular los espectros de absorción mediante transformadas de Fourier. Las transformadas permiten calcular la intensidad de luz para cada longitud de onda (o número de onda) a partir de la suma contenida en el interferograma. La transformada de Fourier está constituida por el sumatorio de senos y cosenos de las distintas frecuencias ópticas que componen la radiación.<sup>10,11</sup>



**Figura 5.** Espectrofotómetro FT-IR (imagen obtenida de <https://www.bruker.com/products/infrared-near-infrared-and-raman-spectroscopy/ft-ir-routine-spectrometers/compact-ftir-alpha-ii.html>)

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	75/224



Los espectros FTIR de transmisión presentados en esta memoria se obtuvieron con un espectrofotómetro Alpha de la marca comercial Bruke (Figura 5), propiedad del Departamento de Química Física y Termodinámica Aplicada. Para ello, las muestras en estado sólido se mezclaban con la sal de bromuro potásico y se preparaban pastillas con la ayuda de una prensa hidráulica (10 toneladas de presión durante 5 minutos).

### 2.3. TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS.

Este tipo de técnicas electroanalíticas permiten analizar las propiedades eléctricas de una muestra en disolución o sobre la superficie de un electrodo empleando una celda electroquímica. La información se obtiene a partir de analizar la respuesta eléctrica, mediada por una reacción química, que el sistema genera al aplicarle una determinada señal eléctrica. Este conjunto de técnicas se caracteriza por una alta sensibilidad, gran selectividad y elevada precisión. Mediante el empleo de un potencióstato/galvanostato se pueden realizar medidas de potenciales de oxidación y reducción de materiales, de intensidad de corriente, de capacidad de transferencia electrónica, análisis de corrosión de materiales. Por lo tanto, los análisis electroquímicos también pueden ser interesantes para caracterización de nanomateriales.

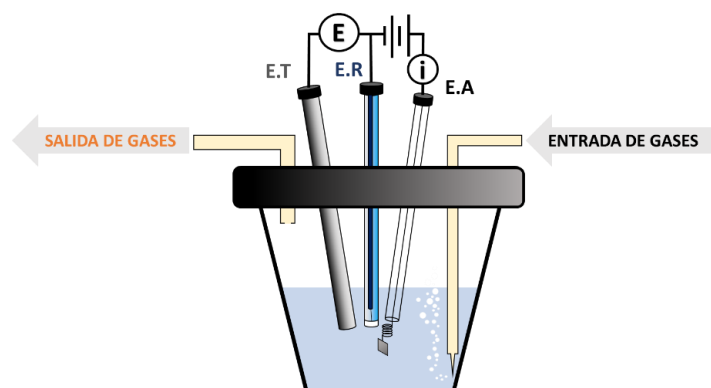
#### 2.3.1. La Celda Electroquímica.

Una celda electroquímica es un dispositivo que es capaz de obtener energía eléctrica a partir de reacciones químicas o bien producir las reacciones a partir de un aporte de energía eléctrica externo (Figura 6). Para ello, es necesario disponer de al menos dos electrodos: Un electrodo de trabajo (E.T.), que proporciona el potencial de manera controlada y facilita la transferencia de electrones hasta la muestra en estudio, y un segundo electrodo de referencia (E.R., que debe tener un potencial conocido) con el que se mide el potencial del electrodo de trabajo. El inconveniente de esta configuración está en la dificultad de mantener un potencial constante mientras pasa la corriente por el electrodo. Por este motivo, se suele emplear una

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	76/224



configuración de tres electrodos, la cual incorpora un contraelectrodo o electrodo auxiliar (E.A). El E.R. actúa como referencia en la medición y es un electrodo por el que no pasa ninguna corriente. Por el contrario, a través del E.A., pasa toda la corriente necesaria equilibrando al E.T.<sup>12</sup> Todas las mediciones experimentales se realizaron con un potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT30 y/o con PalmSens EmStat3. En todos los casos, se usó una celda electroquímica de tres electrodos, siendo el E.T. un disco de carbón vitrificado de 5 mm. Dicho electrodo era modificado con las NPs sintetizadas, por la técnica de evaporación de gota (“*drop-casting*”), empleando un volumen de muestra fue de 25  $\mu\text{L}$  y con la misma concentración de oro en todos los casos. Como E.R. se usó un electrodo de Ag/AgCl y como E.A. se usó una lámina de platino.



**Figura 6.** Representación esquemática de una celda electroquímica de tres electrodos.

### 2.3.2. Voltamperometría cíclica (VC).

En la voltamperometría se mide la intensidad de corriente en función del potencial aplicado y como resultado se obtiene un voltamperograma, que nos da información sobre los procesos de oxidación y reducción de la muestra objeto de estudio. Cuando se realiza una medida voltamperométrica es necesario tener en cuenta la cinética, además de la termodinámica del sistema en estudio. Dentro de la voltamperometría, la voltamperometría cíclica es una de las técnicas electroquímicas más empleadas,

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	77/224



debido a su versatilidad y a la cantidad de información que se puede obtener a partir de sus resultados. Durante la medida se realiza un barrido de potenciales en sentido anódico y catódico, observándose a lo largo del proceso diferentes bandas que se generan como resultado de los procesos de oxidación y reducción de las especies sometidas al estudio, pudiéndose realizar los ciclos de barrido "n" cantidad de veces. Se obtiene información acerca de los potenciales redox, la cantidad de carga, concentración, reversibilidad de las reacciones, información de las interacciones de especies absorbidas sobre los electrodos de trabajo y los coeficientes de difusión de las especies en estudio, entre otras. La medida se realiza midiendo la intensidad de corriente que pasa por el E.T. sumergido en un electrolito sin agitación (condiciones estáticas), aunque también es posible realizar el estudio anulando el movimiento por difusión de las especies en estudio (condiciones dinámicas). El potencial aplicado va desde un potencial inicial ( $E_0$ ) hasta un potencial final ( $E_f$ ), conocido como potencial de inversión, momento en el que se produce una inversión en el sentido del barrido y de vuelta al valor inicial  $E_0$ . El intervalo de potencial de inversión impuesto en cada experimento es aquel en el que ocurre la oxidación o la reducción controladas por difusión de una o varias de las especies en estudio, mientras que la dirección en la que se sucede el barrido dependerá de la composición de la muestra.

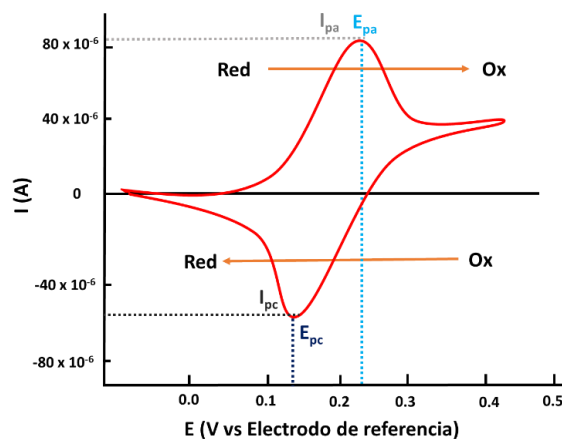
Cuando se analiza un voltamperograma (Figura 7), al principio no se observan cambios en la intensidad de corriente, puesto que no hay especies que sean reducibles u oxidables en el intervalo inicial de potencial. Cuando el potencial alcanza valores más positivos, se comienza a desarrollar una corriente anódica debida a la oxidación del material de estudio. Seguidamente, se produce un rápido aumento de la corriente a medida que la concentración superficial de iones se hace cada vez mayor. El total de la corriente de pico se debe a dos componentes:

- Una corriente inicial transitoria necesaria para ajustar la concentración superficial de reactivo a su concentración de equilibrio dada por la ecuación de Nernst (ecuación 8).

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	78/224



- Una corriente controlada por la difusión normal.



**Figura 7.** Representación de un voltamperograma cíclico en el que se indican los distintos parámetros obtenidos del proceso: Potencial del pico catódico ( $E_{pc}$ ), potencial del pico anódico ( $E_{pa}$ ), intensidad del pico catódico ( $I_{pc}$ ) e intensidad del pico anódico ( $I_{pa}$ ).

Esta corriente disminuye rápidamente a medida que la capa de difusión se extiende hacia el exterior de la superficie del electrodo. Seguidamente, se alcanza el potencial de inversión donde se invierte el sentido del barrido, en este punto la corriente sigue siendo anódica. Una vez el potencial comienza a disminuir la corriente cae a cero y pasa a ser catódica, como consecuencia de la reducción de la especie en estudio. Se genera un pico y comienza a disminuir a medida que se agota la especie.

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \log \frac{[Ox]^{C.E}}{[Re]^{C.E}} \quad (8)$$

Esta es la ecuación de Nernst, donde  $n$  es el número de electrones intercambiados,  $R$  la constante de los gases,  $T$  la temperatura,  $E_0$  es el potencial estándar,  $F$  la constante de Faraday, y  $Ox$  y  $Re$  son las concentraciones de las especies oxidadas y reducidas elevadas a sus correspondientes coeficientes estequiométricos (al utilizar

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY	Página	79/224





disoluciones diluidas el coeficiente de actividad de estas especies es aproximadamente la unidad).

La voltamperometría es usada como una herramienta de análisis cualitativo. Los parámetros más importantes que se obtienen son el potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ), el potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ), la corriente de pico anódica ( $I_{pa}$ ) y la corriente de pico catódica ( $I_{pc}$ ).

En reacciones de especies reversibles, aquellas lo suficientemente rápidas para mantener las concentraciones de las especies oxidadas y reducidas en equilibrio en la interfase del electrodo, es posible aplicar la ecuación de Randles-Sevcik. Esta expresión cuantifica la intensidad máxima según:

$$I_p = (2.69 \cdot 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} \nu^{1/2} \quad (9)$$

donde  $n$  es el número de electrones intercambiados en la reacción,  $A$  es el área del electrodo en  $\text{cm}^2$ ,  $C$  es la concentración de reactivo en el seno de la disolución en  $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$ ,  $D$  es el coeficiente de difusión en  $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  de las especies oxidada y reducida, y  $\nu$  es la velocidad de barrido. Como norma general, en un sistema reversible se cumple que:

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} \cong \frac{59 \text{mV}}{n} \quad (10)$$

donde  $E_p$  es independiente de la velocidad de barrido, mientras que  $I_p$  es proporcional a  $\nu^{1/2}$ .

Que un proceso redox sea reversible o irreversible depende no solo de la naturaleza química de la muestra en estudio, sino también de las velocidades de barrido empleadas. En el caso de sistemas irreversibles y cuasirreversibles, la separación de los potenciales depende de la velocidad de barrido. También las corrientes de pico se ven afectadas, de forma que cuanto más irreversible sea el proceso mayor será la disminución de la intensidad del pico en el barrido inverso. Esto se debe a que en sistemas irreversibles generalmente ocurre que las especies oxidadas se difunden al seno de la disolución, por lo que, al aplicar el potencial

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	80/224



inverso, no se encuentran disponibles a tiempo en la interfase para dar lugar al pico en el barrido inverso.

En sistemas cuasi reversibles la ecuación de Randles-Sevcik adquiere la forma:

$$I_p = 0.4463K(\Lambda, \alpha)nFAC_A^*D^{1/2}v^{1/2}\left(\frac{nF}{RT}\right)^{1/2} \quad (11)$$

donde  $A$  es el área del E.T.,  $F$  es la constante de Faraday,  $C_A^*$  es la concentración de la especie electroactiva,  $D$  es el coeficiente de difusión,  $\alpha$  el coeficiente de transferencia de carga,  $n$  el número de electrones en la reacción,  $T$  la temperatura,  $R$  la constante de los gases y  $v$  es la velocidad de barrido empleada. En estos sistemas,  $I_p$  aumenta con  $v^{1/2}$  pero no de forma proporcional.

En los sistemas irreversibles no hay pico de vuelta,  $E_p$  es una función de la velocidad de barrido y la ecuación Randles-Sevcik adquiere la forma:

$$I_p = (2.99 \cdot 10^{-5})n(\alpha n_a)^{1/2}ACD^{1/2}v^{1/2} \quad (12)$$

Para procesos irreversibles, la intensidad de pico es proporcional al producto del número de electrones  $n$  por el coeficiente de transferencia de carga  $\alpha$  y el número de electrones transferidos en la etapa que limita la velocidad  $n_a$ . Además, la intensidad de pico depende también de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido.

En el caso de voltamperometría de barrido lineal, se mide la corriente en el E.T. mientras se hace un barrido lineal de potencial y se registra el cambio en función del tiempo. Tenemos de este modo que el potencial es igual a:

$$E = E_i + vt \quad (13)$$

donde  $E_i$  es el potencial inicial,  $v$  la velocidad del barrido potencial y  $t$  el tiempo transcurrido.

Una voltamperometría de pulso diferencial (VPD) consiste en una serie de pulsos donde el potencial de base aumenta gradualmente en pequeños intervalos entre 10 y 100 mV. La amplitud del pulso se mantendrá constante respecto al potencial de base. La intensidad de corriente que resulta del proceso se mide antes de la aplicación del

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	81/224



pulso y al final de este, de este modo al representar la diferencia de corrientes que se obtienen se puede relacionar la intensidad de corriente máxima con la concentración de especies que reaccionan. Además, VPD nos permite identificar a partir de los picos generados cuantos procesos redox ocurren en el sistema.<sup>13,14</sup>

### 2.3.3. Estudio de procesos cinéticos en electrocatalizadores para ORR y HER.

Hasta el momento se han tenido en cuenta medidas de voltamperometría en condiciones estáticas, donde la muestra en estudio alcanza la superficie del electrodo gracias a fenómenos de transporte como la difusión por el gradiente de concentración, la migración por la influencia del campo eléctrico generado, o la convección natural debido a diferencias de temperatura o densidad. Mediante el empleo de un electrodo de disco rotatorio (RDE) es posible estudiar la cinética del proceso (Figura 8), especialmente interesantes en procesos de electrocatálisis como son la ORR (es decir, medidas voltamperométricas en condiciones dinámicas). El uso de este tipo de electrodos gracias a su movimiento de rotación elimina los movimientos por difusión y migración quedando únicamente el movimiento mecánico de convección (Figura 8). Cuando se estudia la electrocatálisis mediante voltamperometría dinámica en reacciones como en la ORR, podemos emplear las ecuaciones de Koutecký–Levich para calcular los parámetros cinéticos:

$$\frac{1}{J} = \frac{1}{J_L} + \frac{1}{J_k} = \frac{1}{B\omega^{1/2}} + \frac{1}{J_k} \quad (14)$$

$$J_k = nFKC_0 \quad (15)$$

$$B = 0.62nFC_0D_0^{2/3}\nu^{-1/6} = B*n \quad (16)$$

donde  $J$  es la densidad de corriente medida,  $J_k$  y  $J_L$  son las densidades de corriente limitadas por la cinética y difusión respectivamente,  $\omega$  es la velocidad de rotación del electrodo,  $n$  es el número de electrones totales transferidos en la reacción,  $F$  es la constante de Faraday,  $C_0$  es la concentración de la especie en estudio disuelta en el electrolito,  $D_0$  es el coeficiente de difusión de la especie en estudio,  $\nu$  es la viscosidad cinemática del electrolito,  $k$  es la velocidad de transferencia constante de electrones

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	82/224



durante la reacción y  $B^*$  es una constante (con valor de  $2.76 \times 10^{-5} \text{ A cm}^{-2} \text{ rpm}^{-1/2}$  para los experimentos de ORR, en nuestro caso). De los distintos parámetros cinéticos que se pueden calcular con un RDE, el número de electrones transferidos es el de mayor importancia para la ORR, ya que está directamente relacionado con el mecanismo de reacción.<sup>15</sup> Generalmente, en medio alcalino y dependiendo del electrocatalizador, se pueden observar dos mecanismos distintos: (1) Un proceso de una etapa donde se transfieren cuatro electrones por cada molécula de oxígeno y/o (2) un proceso de dos etapas donde se transfieren dos electrones por cada una.

- Proceso de 4 e<sup>-</sup>:  $\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \rightarrow 4\text{OH}^-$
- Proceso de 2 e<sup>-</sup>:  $\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{HO}_2^- + \text{OH}^-$   
 $\text{H}_2\text{O} + \text{HO}_2^- + 2\text{e}^- \rightarrow 3\text{OH}^-$

En el caso de la HER en la electrólisis de agua para la obtención de hidrógeno, cuando la reacción se desarrolla en medio ácido ocurren tres etapas principales que definen el mecanismo. De esta forma, los protones adquieren los electrones para ser reducidos y formar hidrógeno sobre la superficie del electrodo:


- Etapa de Volmer:  $\text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_{\text{ads}}$
- Etapa de Tafel:  $2\text{H}_{\text{ads}} \rightarrow \text{H}_2$
- Etapa de Heyrovsky:  $\text{H}^+ + \text{H}_{\text{ads}} + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$

El estudio en condiciones dinámicas permite identificar cuál de las distintas etapas es la determinante de la velocidad de reacción para el proceso. Mediante la representación de las curvas de polarización de Tafel, obtenidas a partir de la voltamperometría lineal, representando el logaritmo de la densidad de corriente (eje X) frente al sobrepotencial (eje Y), se puede obtener una línea recta cuya pendiente nos da la constante cinética de la reacción:

- Procesos Anódicos  $\rightarrow b = (1 - \alpha)nF / 2.3032RT$  (17)

- Procesos Catódicos  $\rightarrow b = -\alpha nF / 2.3032RT$  (18)

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	83/224



En general la pendiente de Tafel ( $b$ ) es un parámetro que determina la capacidad catalítica de un material para la HER. Cuanto menor sea el valor obtenido de  $b$  mejor será la actividad electrocatalítica del material estudiado. Hay que tener en cuenta que para el platino, material de referencia, es  $35 \text{ mV} \cdot \text{dec}^{-1}$ .<sup>16</sup>

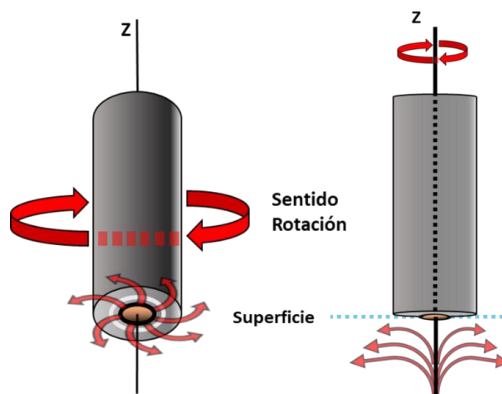


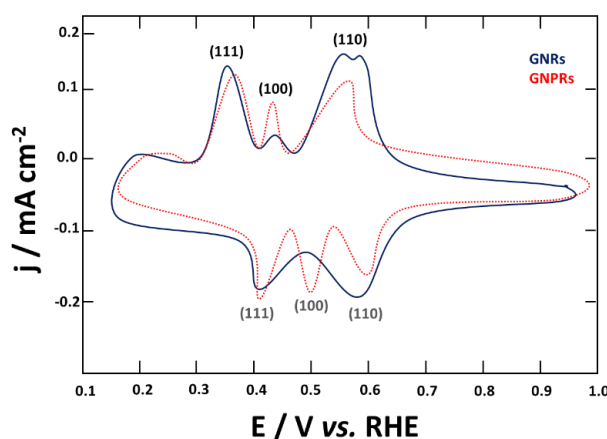
Figura 8. Representación de electrodo de disco rotatorio (RDE).

### 2.3.4. Estudio de las facetas cristalinas presentes en AuNPs mediante electrodeposición de plomo a bajo potencial.

La electrodeposición es un tratamiento electroquímico mediante el cual cationes metálicos presentes en una disolución se depositan sobre el E.T., generando de este modo una capa continua de dicho metal debido al aporte de una corriente continua de reducción. En el caso de los materiales basados en oro, se suele emplear la electrodeposición de plomo a bajo potencial para estudiar su estructura superficial o facetas cristalinas presentes, debido a que el potencial de deposición y disolución depende de la simetría de la superficie, dando lugar a varios picos característicos observables en el voltamperograma cíclico (VC) obtenido (figura 9). La comparación de los VCs obtenidos con los que existen en bibliografía para electrodos de oro monocristalinos, permite identificar y cuantificar la presencia de

diferentes facetas superficiales.<sup>17,18</sup> De esta forma pueden observarse tres contribuciones principales:

- El pico situado a 0.44 V (RHE) se corresponde con las facetas (111).
- El pico situado a 0.47 V (RHE) se corresponde con las facetas (100).
- El pico situado a 0.56 V (RHE) se corresponde con las facetas (110).



**Figura 9.** Representación de un voltamperograma UPD en el que se indican las bandas correspondientes a las distintas facetas cristalinas para nanobarras y nanoprismas de oro.

## 2.4. TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS

### 2.4.1. Dispersión dinámica de luz (DLS).

Mediante esta técnica se puede obtener información sobre el tamaño y la distribución de tamaños hidrodinámicos que presenta una suspensión acuosa de NPs, empleando los coeficientes de difusión resultantes del movimiento browniano que estas presentan.<sup>19</sup> La técnica DLS considera que todas las partículas son esféricas y que los posibles agregados se van a comportar como una sola unidad de mayor tamaño. Un haz de luz láser de 632 nm de longitud de onda interacciona con la muestra líquida contenida en una cubeta de cuarzo o plástico, de sección cuadrada, con las cuatro paredes translúcidas. El tamaño se obtiene a partir de la detección de la luz dispersada por las NPs. Cuando la luz atraviesa la dispersión coloidal gran

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	85/224



parte del haz traspasa la muestra (luz transmitida) pero una pequeña parte es dispersada por las NPs, a consecuencia de la diferencia entre los índices de refracción de éstas y del disolvente, desviando de este modo la trayectoria de la luz en todas direcciones (luz dispersada). La intensidad dependerá de la posición relativa de las NPs en ese instante, mientras que la posición estará condicionada por el movimiento browniano. Las fluctuaciones de la intensidad de luz dispersada llegan a un detector colocado a 173°, cercano a la detección de retrodispersión. La retrodispersión reduce posibles efectos de dispersión múltiple, donde la luz dispersada por una partícula es de nuevo dispersada por otras partículas, evitando la medición de contaminantes como el polvo, que al ser más grandes que nuestras partículas dispersa hacia adelante, al pasar el haz por una ruta más corta de la muestra, permite medir a mayores concentraciones. Por otro lado, la intensidad puede aumentar o disminuir con el tiempo de forma aleatoria, dependiendo del coeficiente de difusión de las NPs (dependiente de la composición química y el tamaño), esto hace necesario comparar medidas sucesivas mediante tratamiento matemático. La función que se ocupa de ello se denomina función de autocorrelación y es el fundamento básico de la técnica.<sup>20</sup>

Durante una medida de DLS, la variación de la intensidad de luz dispersada se registra en intervalos de tiempo de nanosegundos hasta microsegundos en representación logarítmica, dando lugar a la función de correlación que es una función de decaimiento exponencial. La función de autocorrelación de intensidades normalizada  $g^{(2)}(t)$ , está directamente relacionada con la función de autocorrelación de campo eléctrico normalizada  $g^{(1)}(t)$  mediante la relación de Siegert:

$$g^{(2)}(t) \equiv \frac{G^{(2)}(t)}{\langle i(0)i(0) \rangle} = 1 + B |g^{(1)}(t)|^2 \quad (19)$$

donde  $\beta$  es un factor óptico cercano a la unidad, denominado factor de coherencia. La función de autocorrelación de campo eléctrico normalizada  $g^{(1)}(t)$  está a su vez relacionada con el factor de estructura dinámico  $S(q,t)$  o función de dispersión intermedia, en el caso de partículas pequeñas comparadas con  $q^{-1}$ :

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	86/224



$$g^{(1)}(t) = \frac{\langle E^*(t)E(t) \rangle}{\langle E^*(0)E(0) \rangle} = \frac{S(q,t)}{S(q)} \quad (20)$$

Sabiendo que  $q$  está definido como el vector de onda:

$$q = \frac{4\pi n_o}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (21)$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda del láser incidente,  $n_o$  el índice de refracción de la muestra y  $\theta$  el ángulo en que el detector está ubicado respecto al haz de luz transmitido. Sólo en el caso de muestras donde nuestro sistema en disolución está compuesto de partículas esféricas, monodispersas y pequeñas, la función de autocorrelación de campo eléctrico normalizada  $g^{(1)}(t)$  permite obtener el coeficiente de difusión según la ecuación:

$$g^{(1)}(t) = e^{(-\Gamma t)} = e\left(-\frac{t}{t}\right) = e^{(-Dq^2 t)} \quad (22)$$

donde  $\Gamma$  es la tasa de decaimiento,  $t$  el tiempo de relajación característico y  $D$  el coeficiente de difusión de la partícula. En muestras de elevada polidispersidad, debido a su complejidad, se utilizan métodos alternativos en los que se contempla la suma de todas las caídas exponenciales para obtener la distribución de coeficientes de difusión y con ello los tamaños. En este caso la ecuación sin normalizar viene dada por:

$$G(\tau) = A[1 + Bg_I(\tau)^2] \quad (23)$$

siendo  $g_I(t)$  la suma de todas las caídas exponenciales contenidas en la función de correlación. Finalmente, siempre que se estudien muestras con elevada dilución en las que las interacciones entre las partículas son mínimas o ninguna, es posible aplicar la ecuación de Stokes-Einstein para obtener el tamaño hidrodinámico promedio de las partículas:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_h} \quad (24)$$

siendo  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura absoluta,  $\eta$  la viscosidad de cizalla del disolvente y  $r_h$  el radio hidrodinámico de la partícula.<sup>21</sup>

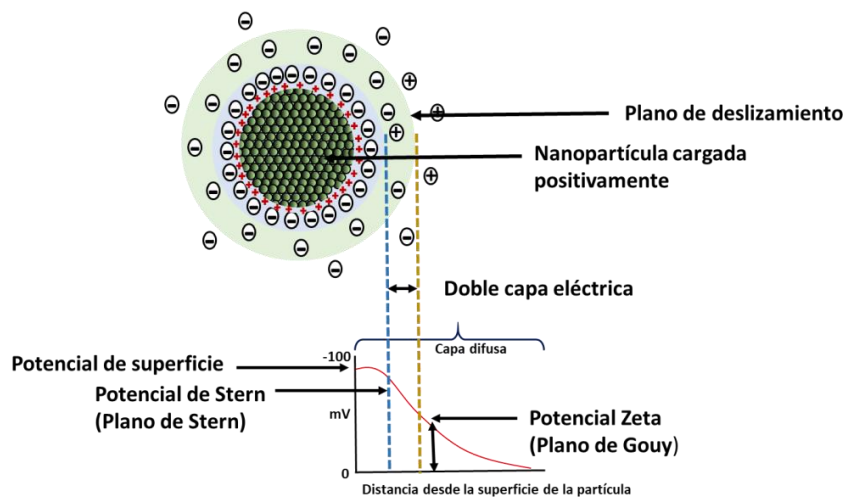
Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	87/224





**2.4.2. Potencial Zeta (ZP).**

Mediante el modelo de la doble capa eléctrica se pretende explicar la presencia de una carga en la superficie de las NPs y en la distribución de iones en los alrededores, debido a la existencia de una concentración de iones de carga opuesta, la cual conforma la denominada doble capa eléctrica alrededor de cada partícula. Dicha doble capa está compuesta por una primera capa interna, que contiene las moléculas de especies que se encuentran asociadas más fuertemente y cargadas con signo opuesto, denominada capa de Stern. La segunda capa la forman iones asociados más débilmente, ya que se aproximan a la primera capa por la atracción de la carga superficial de la partícula pero que al aproximarse sufren fuerzas de repulsión por las cargas que componen la capa de Stern, siendo llamada capa difusa (Figura 10).



**Figura 10.** Representación esquemática del modelo de doble capa eléctrica.


La diferencia de potencial entre el seno de la disolución y el sistema descrito se denomina el potencial Zeta (ZP) de la partícula. De esta manera, el ZP permite definir la carga neta que presentan las partículas en disolución, con lo que conocemos la repulsión o atracción electrostática a la que se ven sometidas y cuya medición se

realiza de forma indirecta a través de medidas en presencia de un campo eléctrico aplicado. La presencia de este campo hace que las partículas se desplacen hacia el electrodo que proporciona la carga opuesta. La medida del ZP permite conocer información detallada de las causas que producen la dispersión, agregación o floculación.<sup>22</sup> Uno de los principales factores que afectan a la medida de ZP es el pH. En medios acuosos, es necesario conocer el valor de pH de la muestra. Un valor de ZP por sí solo, sin definir las condiciones de la disolución, puede inducir a error. Generalmente, a valores altos de pH el ZP será negativo y a valores bajos de pH el ZP será positivo. Al igual que ocurre con las proteínas, puede existir un punto isoelectrico en el que el ZP se hace cero y la estabilidad coloidal es mínima debido a la ausencia de cargas superficiales, facilitando de este modo la agregación. El espesor de la doble capa va a depender en gran medida de la concentración de iones presentes en disolución y es posible estimar su espesor a partir de la fuerza iónica del medio. Cuanto mayor es la fuerza iónica más se comprime la doble capa y hay una mayor tendencia hacia la agregación. Este proceso también se ve influenciado por el estado de valencia de los iones, así, un ion trivalente comprimirá la doble capa en mayor medida que lo hará un ion monovalente.

Cuando se aplica un campo eléctrico, las partículas cargadas son atraídas hacia el electrodo de carga opuesta. La viscosidad del medio actuará como fuerza que se opondrá a este movimiento y, cuando se alcance un equilibrio entre ambas fuerzas, las partículas alcanzaran un movimiento a velocidad constante. Esta velocidad va a depender en gran medida de la fuerza del campo eléctrico aplicado, la constante dieléctrica propia del medio, su viscosidad y la diferencia de potencial entre la partícula y el medio o ZP. Se define como movilidad electroforética a la velocidad con la que una partícula se desplaza en presencia de un campo eléctrico. El ZP y la movilidad electroforética están relacionados por la ecuación de Henry:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta} \tag{25}$$

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	89/224




donde  $U_E$  es la movilidad electroforética,  $z$  se corresponde con el ZP,  $\epsilon$  hace referencia a la constante dieléctrica,  $\eta$  indica la viscosidad del medio y  $f(ka)$  es la función de Henry. Las determinaciones electroforéticas del ZP se realizan normalmente en medios acuosos y en presencia de concentraciones controladas de electrolitos. Según la aproximación de Smoluchowski  $f(ka)$  tiene un valor aproximado de 1.5 en medio polar y de 1 en medios no polares. Por lo tanto, el cálculo del ZP no se realiza directamente, sino que se obtiene a través de su movilidad electroforética.<sup>23</sup> A pesar de que la medición del ZP no es una medida directa de la carga superficial, permite estimar la carga neta de las partículas y con ello nos da idea de su estabilidad coloidal. Cuando el valor obtenido de ZP esté por encima de +30 mV o por debajo de -30 mV, para un determinado pH, la muestra se situará en una zona de estabilidad, evitando la formación de agregados.



**Figura 11.** Equipo Zeta-sizer Nano que permite medir DLS y ZP (imagen obtenida de “<https://www.malvernpanalytical.com/es/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs>”)

La medida de ZP se lleva a cabo introduciendo la disolución con la muestra de estudio en una celda, con forma de U, que contiene dos electrodos de oro en cada extremo. A través de dichos electrodos se aplica un voltaje, provocando que las partículas se muevan hacia el electrodo con carga opuesta. Se utiliza una técnica Doppler para medir la velocidad de las partículas en función del voltaje. De forma similar a la técnica DLS, un haz láser se divide para proporcionar un haz de

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	90/224

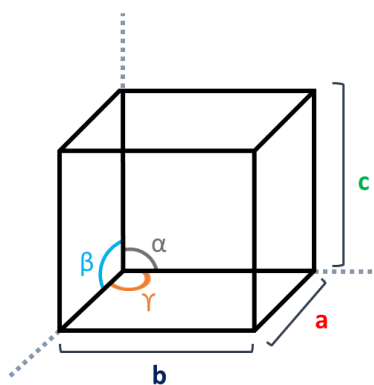


referencia y otro incidente que atraviesa la celda y, a medida que las partículas se mueven a través del haz, la intensidad de la luz dispersada fluctúa a una frecuencia proporcional a la velocidad de la partícula. Se mide la velocidad de las partículas a múltiples voltajes, y estos datos se utilizan para calcular el ZP mediante la ecuación de Henry. La intensidad de la luz dispersada cuando llega al detector debe ser atenuada para estar dentro de un rango específico y no saturar.<sup>24</sup>

Tanto los valores de tamaño hidrodinámico (DLS) como de carga superficial (ZP) de las distintas AuNPs sintetizadas en esta Tesis Doctoral fueron obtenidos en un equipo Zetasizer NANO ZSP (Figura 11), propiedad del Instituto Universitario de Nanoquímica (IUNAN) de la UCO.


### 2.4.3. Difracción de Rayos X (DRX).

DRX es una técnica que proporciona información sobre las estructuras cristalinas y geometrías de compuestos químicos. Se puede emplear para identificar muestras a partir de sus patrones de difracción, ya que cada sustancia cristalina tiene un patrón de difracción característico. El número de índices de Miller observados en un difractograma está relacionada con la simetría que posee la celda unidad del cristal.



**Figura 12.** Ilustración de una celda unidad y de los distintos parámetros que la identifican.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	91/224



En todos los casos las celdas unidad (Figura 12) son paralelepípedos que pueden dar lugar mediante diferencias en sus parámetros a un total de 7 sistemas cristalinos que son recogidos en la tabla 1.

Un material cristalino contiene en su estructura un patrón de ordenamiento de los átomos e iones que lo componen. Por este motivo, podemos definir la celda unidad como la porción más simple de su estructura que al repetirse por translación reproduce todo el cristal. Las restricciones en ángulos, simetría y distancias interatómicas determinan los distintos tipos de sistemas cristalinos, así como sus simetrías.

**Tabla 1.** Diferentes parámetros de la celda unidad que conforman los siete principales sistemas cristalinos.

SISTEMA CRISTALINO	PARÁMETROS DE CELDA UNIDAD	SIMETRÍA	RED CRISTALINA
CÚBICA	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	m3m	P, I, F
TETRAGONAL	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	4/mmm	P, I
ORTORROMBICA	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	6/mmm	P
MONOCLINICA	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^\circ; \beta \neq 90^\circ$	3m	R
TRICLINICA	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	mmm	P, C, I, F
HEXAGONAL	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$	2/m	P, C
TRIGONAL	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$	1	P

Combinando los 7 sistemas cristalinos y dependiendo de la simetría traslacional de la estructura cristalina, se obtienen 14 configuraciones básicas diferentes que




reciben el nombre de redes de Bravais. Se trata de operaciones que aplicando las funciones de traslación y rotación de la celda unidad completan todas las posibilidades disponibles.

Estas redes pueden ser:

- Tipo P: Denominada primitiva y tiene puntos de red en los vértices de la celda.
- Tipo I: Red Centrada en el interior. Esta presenta puntos de red en los vértices de la celda y en el centro de la celda.
- Tipo F: Red centrada en todas las caras. Presenta puntos de red en los centros de todas las caras, así como en los vértices.
- Tipo C: Red centrada en la base.

Además de la simetría traslacional en una red cristalina, existen también elementos de simetría como centros de inversión, plano de reflexión, ejes de rotación de diferentes ordenes ( $C_1$ ,  $C_3$ ,  $C_4$  y  $C_6$ ) y ejes de rotación-inversión (de orden  $S_3$ ,  $S_4$ ,  $S_6$ ). Todos estos elementos de simetría pueden coexistir en una estructura cristalina generando los grupos puntuales de simetría. Estos 32 grupos cuando se combinan con los elementos de simetría y las 14 redes de Bravais dan lugar a los 230 grupos espaciales que son posibles para una estructura cristalina. Los puntos de red que muestran la simetría traslacional del cristal quedan concentrados en los distintos planos presentes en la estructura cristalina. Los índices de Miller describen el conjunto de planos que presentan una misma simetría. La notación usada es (h,k,l) y son números enteros, positivos o negativos e incluso cero. De este modo, los índices de Miller especifican la orientación de los planos respecto a la celda unidad y se calculan a partir de los recíprocos de las intersecciones de los planos con los ejes (x,y,z).<sup>25</sup> La separación existente entre planos se conoce como espaciado reticular, y cuando hace referencia a una familia de planos (hkl) se simboliza por  $d_{hkl}$ . La relación entre el espaciado reticular y los parámetros de red pueden determinarse geoméricamente y dependen de cada sistema cristalino. A medida que se disminuye la simetría del sistema cristalino aumenta la complejidad de la expresión  $d_{hkl}$ . Según

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	93/224



la ley de Bragg (Figura 13), cuando un haz de radiación X choca con la estructura cristalina, debido a la presencia de los átomos y su periodicidad en la red, sufre fenómenos de difracción en todas las direcciones. En la mayoría de estas ocurrirán interferencias destructivas, pero en algunas direcciones la radiación difractada se mantendrá en fase, y se producirán interferencias constructivas siempre que la diferencia en el camino óptico entre átomos equidistantes sea igual a un número entero de longitudes de onda ( $n\lambda$ ):

$$n\lambda = 2d \cdot \text{sen}\theta \tag{26}$$

donde  $d$  es la distancia entre los planos imaginarios que unen los puntos equivalentes de la red cristalina. Se establece así la condición esencial para que ocurra la difracción del haz. A pesar de que físicamente es un proceso de refracción, debido a las interferencias constructivas que ocurren, se genera un efecto similar al de reflexión, motivo por el cual se emplean los términos como planos de reflexión y haz reflejado.<sup>26</sup>

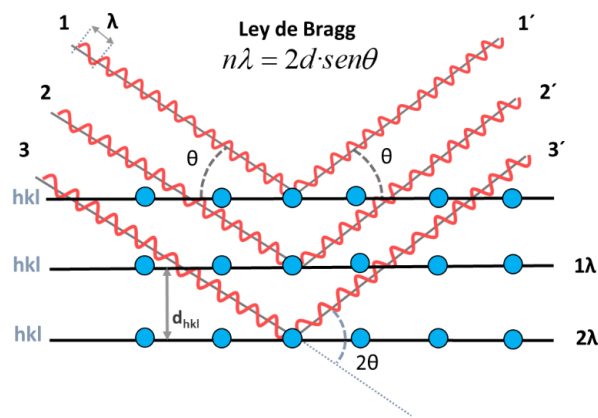


Figura 13. Esquema que representa la ley de Bragg

Un diagrama de difracción de rayos X (difractograma) proporciona las intensidades en función de los ángulos de difracción  $2\theta$ , obteniéndose una serie de índices de Miller característicos del compuesto. A partir del análisis de un difractograma de rayos X se pueden obtener los siguientes parámetros:

- La posición de los picos expresados en valores normalmente  $2\theta$ , pero también se pueden poner en función de  $\theta$ ,  $d$  o  $1/d^2$ .
- Intensidad de pico tomando la altura del pico o en casos de análisis más específicos incluso el área.
- Perfil de picos presente en la muestra, permite obtener información sobre el tamaño de grano y las tensiones.

Respecto al funcionamiento de un equipo de DRX, consiste en un haz colimado de rayos X con una longitud de onda en el rango de  $1.5406 \text{ \AA}$ , el cual se hace incidir sobre una muestra preparada sobre un soporte. El haz de radiación X es difractado por las fases cristalinas de la muestra en estudio de acuerdo con la ley de Bragg. El experimento requiere de la programación previa mediante el software correspondiente del rango de ángulos de trabajo y tiempo de exposición que durará el experimento.



**Figura 14.** Equipo de DRX Bruker D8 DISCOVER, (imagen obtenida de “<https://www.bruker.com/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis/x-ray-diffraction/d8-discover-family.html>”)

Los distintos difractogramas de las AuNPs presentados en esta Tesis Doctoral fueron obtenidos empleando un soporte de vidrio recubierto por un óxido mixto de

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	95/224





indio y estaño (ITO), previa deposición y secado de una dispersión coloidal concentrada de la muestra, y empleando un equipo de DRX Bruker D8 DISCOVER VARIO (Figura 14). Dicho equipo es propiedad del IUNAN-UCO, el cual emplea un tubo de rayos X de Cu,  $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ , y opera a 40 kV y 40 mA. El equipo está provisto de un goniómetro Bragg Brentano de alta precisión, un monocromador de haz primario y un detector de alta sensibilidad ultrarrápido.

#### 2.4.4. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS).

La espectroscopía XPS es una técnica analítica de superficie que permite determinar la composición, de manera tanto cualitativa como cuantitativa, y determinar el estado de oxidación de los elementos químicos presentes en la superficie de un material. Su fundamento físico está basado en el efecto fotoeléctrico que causa la irradiación con rayos X sobre la superficie de una muestra, causando la fotoionización de los átomos de la misma y permitiendo la emisión de fotoelectrones a partir de los niveles de energía determinados por la estructura electrónica propia del material (Figura 15). El registro de las energías cinéticas y el número de estos fotoelectrones emitidos de la capa superior (0-10 nm de penetración) del material analizado proporciona información acerca de la distribución y población de los niveles de energía electrónicos, permitiendo determinar la composición química de la muestra, los estados de oxidación de los elementos químicos que la constituyen y las cantidades en las que están presentes. Comúnmente, como fuente de radiación X se emplea la línea  $K\alpha_{1,2}$  de Mg o Al con energías de 1253.6 y 1486 eV, respectivamente. El proceso de fotoemisión es extremadamente rápido, del orden de  $10^{-16}$  s y queda descrito por la ecuación de Einstein para el efecto fotoeléctrico:

$$E_B = h\nu - KE \tag{27}$$

donde  $E_B$  es la energía de enlace del electrón en el átomo,  $h\nu$  es la energía de la fuente de radiación X y  $KE$  es la energía cinética del electrón detectado.

Debido a la carga negativa del electrón, este es atraído hacia el núcleo del átomo del que forma parte. Cuanto más interno es el electrón, más fuerte es la atracción que sufre y más fuerte es enlace entre ambos, por lo que la energía de enlace varía según

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	96/224

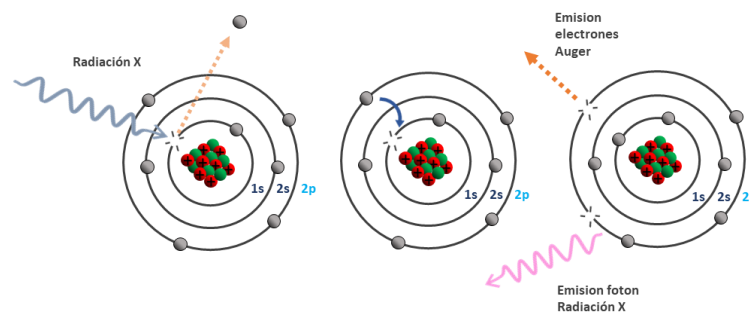


el tipo de átomo al que está unido y los átomos que forman parte de su entorno (esta influencia se debe a la distribución electrónica). Aunque en gases la energía para romper el enlace es igual a la energía para ionizarlos, en el caso de los sólidos debido a la influencia de la superficie se requiere una energía adicional para remover el electrón. Dicha energía extra es conocida como la función de trabajo del espectrofotómetro y va a depender tanto del material como del propio equipo. De este modo, la energía cinética y la energía de enlace no es igual a la energía de la radiación X. La energía de unión de cada electrón emitido se puede determinar usando la ecuación de Ernest Rutherford:

$$E_B(i) = E_{hv} - (E_f + \phi) \quad (28)$$

donde  $E_B(i)$  es la energía de unión del electrón en el nivel  $i$ ,  $E_{hv}$  es la energía del fotón de la radiación X,  $E_f$  es la energía cinética del electrón y  $\phi$  es la función de trabajo.<sup>27</sup>

Existe la posibilidad de que al irradiar un sólido se emitan los llamados electrones de Auger (Figura 15), electrones cuyo análisis es posible llevar a cabo. Cuando un electrón de un nivel interior es expulsado de un átomo, un electrón de un nivel superior ocupará la vacante que ha quedado disponible. A veces, esta transición está acompañada por la emisión de un fotón, cuya energía coincide con la diferencia de energías entre el nivel superior e inferior. Por lo que estos electrones se diferencian de los fotoelectrones en que su energía es independiente de la energía de irradiación.<sup>28</sup>

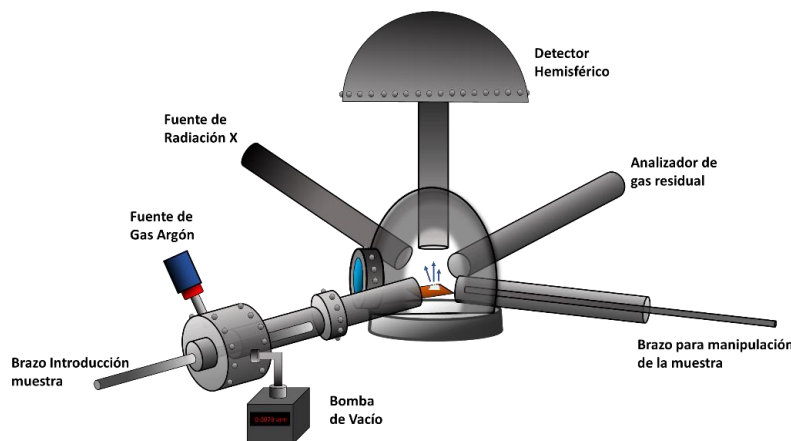


**Figura 15.** Representación esquemática de los distintos procesos de emisión de fotoelectrones por interacción con radiación X.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	97/224



La espectroscopía XPS estudia la superficie de las muestras hasta un máximo de 10 nm de profundidad, ya que los electrones poseen menor capacidad para atravesar los sólidos en comparación con la radiación X. Por tanto, los electrones que son emitidos a causa de la radiación X, que ha penetrado más allá de las primeras capas de la superficie, no pueden escapar de la muestra y alcanzar el detector. También existe el problema de que se formen capas de contaminación en la superficie de la muestra por exposición ambiental. Por ello, se requieren condiciones de ultra-alto vacío para poder medir la superficie que se quiere analizar. La metodología de trabajo, en análisis de XPS, consiste en realizar un amplio barrido del espectro (llamado Survey), cubriendo un rango de unos 1000 eV. Posteriormente, empleando mayor resolución y mayor número de convoluciones, se analiza con más detalle rangos más pequeños de energía de enlace de unos 20 eV.



**Figura 16.** Representación esquemática de un equipo de espectroscopía XPS.

Los principales componentes de un equipo XPS son: el sistema de vacío, la fuente de rayos X, un analizador de energía del electrón y un sistema para poder procesar los datos (Figura 16). Las distintas muestras son introducidas en una primera cámara, donde se procede a generar un vacío entorno a valores de 0.013 – 0.0079 atm. En la

80

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	98/224




siguiente etapa, es necesario alcanzar condiciones de ultra-alto vacío en el equipo, un proceso que es lento y que puede llegar a ocupar horas. La introducción de la muestra en el interior de la cámara se realiza mediante una barra extensora porta muestras. Una vez en el interior de la cámara principal, la muestra puede ser orientada en distintas posiciones, y se puede elegir la zona de la superficie a estudiar gestionando la correcta posición de la muestra mediante la ayuda de una cámara de vídeo.

Al igual que para las medidas de DRX, las medidas de XPS presentadas en esta Tesis Doctoral se realizaron depositando una gota de la dispersión de NPs sobre un ITO y dejando evaporar el disolvente durante al menos 12 horas. Las medidas fueron adquiridas en un espectrómetro Physical Electronics PHI 5700, propiedad del SCAI-UCO, el cual cuenta con una fuente de radiación X no monocromática Mg-K $\alpha$   $E_{hv}$ = 1253.6 eV, 15kV y 300W, que se encuentra en posición perpendicular al eje analizador y ha sido calibrado empleando la línea 3d<sub>5/2</sub> de Ag con una anchura a media altura de 1.1 eV. El alto vacío generado en el sistema fue de 7.9·10<sup>-11</sup> atm.

## 2.5. Tratamiento de datos.

Para el tratamiento y representación del conjunto de datos obtenidos experimentalmente en cada técnica, se emplearon los programas: Zetasizer 7.12 software, Opus 6.5 software, Casa-XPS versión 2.3.16 PR 1.6, PSTrace 5 versión 5.5.2231, OriginPro 2018 64bit, Microsoft Office: Excel 2016 y Microsoft Word 2016. Para el tratamiento y diseño de las distintas imágenes mostradas en esta Tesis Doctoral se han usado los editores gráficos: Microsoft Power Point 2016, XnConvert, GIMP 2.10.2 y CorelDRAW X7.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	99/224



## 2.6 BIBLIOGRAFÍA.

- (1) Reimer, L.; Kohl, H. *Transmission Electron Microscopy Physics of Image Formation*; **2008**. Springer, NY
- (2) Wave-Particle Duality: De Broglie, Einstein, and Schrödinger. In: *Critical Appraisal of Physical Science as a Human Enterprise*. Science & Technology Education Library, vol 36, **2009**. Springer, Dordrecht
- (3) De Broglie, L. Recherches Sur La Théorie Des Quanta. *Ann. Phys. (Paris)*. **1925**, 10 (3), 22–128.
- (4) Inkson, B. J. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for Materials Characterization. In *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*; Elsevier, **2016**, 17–43.
- (5) Eccles, J. W. L.; Bangert, U.; Bromfield, M.; Christian, P.; Harvey, A. J.; Thomas, P. UV-Vis Plasmon Studies of Metal Nanoparticles. *J. Phys. Conf. Ser.* **2010**, 241, 012090.
- (6) Bouguer, P. Essai d'Optique Sur La Gradation de La Lumière. *J. Röntgen Soc.* **1922**, 18 (71), 93–93.
- (7) Lambert, J. Photometria, Sive de Mensura et Gradinus Luminis, Colorum et Umbrae. *Ann. der Phys. und Chemie* **1892**. 1728-1777
- (8) Beer. Bestimmung Der Absorption Des Rothen Lichts in Farbigen Flüssigkeiten. *Ann. der Phys. und Chemie* **1852**, 162 (5), 78–88.
- (9) Stuart, B. H. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*; Analytical Techniques in the Sciences; John Wiley & Sons, Ltd **2004**. Chichester, UK
- (10) Griffiths, P. R.; de Haseth, J. A. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken **2007**. NJ, USA
- (11) Ismail, A. A.; van de Voort, F. R.; Sedman, J. Chapter 4 Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Principles and Applications. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*; **1997**, 93–139.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	100/224




- (12) Oldham, K.; Myland, J.; A. B. *Electrochemical Science and Technology: Fundamentals and Applications*, Chichester.; John Wiley, **2011**.
- (13) Compton, R. G.; Banks, C. E. *Understanding Voltammetry*; World Scientific, **2007**.
- (14) Cano Luna, M. *Diseño y Aplicación de Sensores Electroquímicos Basados En Moléculas Orgánicas Conductoras*, Tesis Doctoral. Córdoba, **2009**.
- (15) Jayabal, S.; Saranya, G.; Wu, J.; Liu, Y.; Geng, D.; Meng, X. Understanding the High-Electrocatalytic Performance of Two-Dimensional MoS<sub>2</sub> Nanosheets and Their Composite Materials. *J. Mater. Chem. A* **2017**, *5* (47), 24540–24563.
- (16) Chen, Z.; Cummins, D.; Reinecke, B. N.; Clark, E.; Sunkara, M. K.; Jaramillo, T. F. Core–Shell MoO<sub>3</sub> MoS<sub>2</sub> Nanowires for Hydrogen Evolution: A Functional Design for Electrocatalytic Materials. *Nano Lett.* **2011**, *11* (10), 4168–4175.
- (17) Hernández, J.; Solla-Gullón, J.; Herrero, E.; Aldaz, A.; Feliu, J. M. Electrochemistry of Shape-Controlled Catalysts: Oxygen Reduction Reaction on Cubic Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (38), 14078–14083.
- (18) Wang, J.; Gong, J.; Xiong, Y.; Yang, J.; Gao, Y.; Liu, Y.; Lu, X.; Tang, Z. Shape-Dependent Electrocatalytic Activity of Monodispersed Gold Nanocrystals toward Glucose Oxidation. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (24), 6894–6896.
- (19) Joseph, N. Chapter 4 Brownian Movement and Diffusion. In *Physicochemical Anthropology*; Basel, K., Ed.; S. Karger AG: Chicago, IL, **1979**, 56–69.
- (20) Chu, B. Laser Light Scattering. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1970**, *21* (1), 145–174.
- (21) Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R. Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences. *Biophys. Rev.* **2016**, *8* (4), 409–427.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	101/224



- (22) Vold, M. J. Zeta Potential in Colloid Science. Principles and Applications. *J. Colloid Interface Sci.* **1982**, 88 (2), 313-611.
- (23) Anurag Rathore, A. G. *Electrokinetic Phenomena: Principles and Applications in Analytica*; Academic Press, Ed. **2003**. London, England,
- (24) Kaszuba, M.; Corbett, J.; Watson, F. M.; Jones, A. High-Concentration Zeta Potential Measurements Using Light-Scattering Techniques. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2010**, 368 (1927), 4439–4451.
- (25) Hargittai, I. Christopher Hammond: The Basics of Crystallography and Diffraction. Third Edition. *Struct. Chem.* **2009**, 20 (4), 751–751.
- (26) Bragg, W. L. The Diffraction of Short Electromagnetic Waves by a Crystal. *Proc. Camb. Philol. Soc.* **1913**.
- (27) Van der Heide, P. *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken **2011**. NJ, USA
- (28) Hofmann, S. *Auger- and X-Ray Photoelectron Spectroscopy in Materials Science*; Springer Series in Surface Sciences; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2013**; Vol. 49.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	102/224



# *Capítulo III*

## *Publicaciones*

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY</a>	Página	103/224





Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	104/224



Received January 9, 2019

Accepted March 27, 2019

DOI:

10.1021/acs.jpcc.9b00249

## Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles as High-Performance Electrocatalyst: The Role of the Size on the Electroreduction of Oxygen

David Alba-Molina,<sup>1</sup> Alain R. Puente Santiago,<sup>2</sup> Juan J. Giner-Casares,<sup>1,\*</sup> María T. Martín-Romero,<sup>1</sup> Luis Camacho,<sup>1</sup> Rafael Luque,<sup>2</sup> Manuel Cano<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Physical Chemistry and Applied Thermodynamics, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, University of Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Marie Curie, Córdoba, Spain E-14014.

<sup>2</sup>Department of Organic Chemistry, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, University of Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Marie Curie, Córdoba, Spain E-14014.

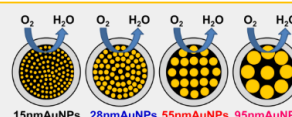
### Corresponding Authors

\*jjginer@uco.es, q82calum@uco.es

Fuel cells stand out as one of the most promising alternatives for non-sustainable fossil-based economy.

Efficient electrocatalysts for the Oxygen Reduction

Reaction (ORR) are required for the mass application of fuel cells. Citrate-stabilized gold nanoparticles (AuNPs) are proposed as potential-dependent electrocatalysts for the ORR. AuNPs were synthesized by a green, reproducible and easy scale-up method. After exhaustive characterization, the electrocatalytic activity of the resulting AuNPs was investigated in alkaline media. Static and dynamic electrochemical studies showed a core-size dependent tendency both for their potentials and intensities. For the first time ever, the hysteresis effect in the ORR profile over Au nanoelectrocatalysts is reported herein. In addition, the electrocatalytic efficiency was comparable to those obtained for Au clusters, suggesting the benefits of citrate stabilizing agent on the electrocatalyst performance of nanomaterials based on noble metals for ORR. These results pave the way for the design of non-coated AuNPs as strong candidate for ORR.



Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Página	105/224



### Introduction

The development of effective and easily scaled-up nanomaterials which can achieve needed current densities for the fabrication of ORR cathodes electrodes for practical applications constitute one of the hottest research topic in the field of electrocatalysis in sustainable energy.<sup>1-4</sup> Pt-based nanomaterials have been widely investigated as active catalysts for ORR cathode reactions in the last decade owed to their highly efficient electrocatalytic properties.<sup>5</sup> Nevertheless, their instability as ORR electrocatalysts together with sluggish reaction dynamics and the high cost of Pt precious metal have considerably limited the wide-spread commercialization of fuel cells based on the aforementioned materials.<sup>6</sup> Consequently, in recent years, a number of endeavors has been focused to the developed of non-platinum nanoelectrocatalysts such as nitrogen-doped carbon nanotubes,<sup>6</sup> porous gold nanoparticles,<sup>7</sup> gold-nanoparticle/graphene as nanocomposites materials,<sup>8</sup> porous carbon-supported gold nanoparticles<sup>9</sup> or even atomically dispersed Fe–Nx species on porous porphyrinic triazine-based frameworks.<sup>10</sup>

Gold nanostructures are revealed as promising electrocatalytic platforms given that gold nanoclusters acts an electron transfer (ET) enhancer and their large active surface area improve the oxygen adsorption.<sup>11-14</sup> Gold nanoclusters have been proposed as relevant nanomaterials for electrocatalysis for the ORR.<sup>15</sup> The effect of the gold core size on the electrocatalytic performances was deeply addressed. Despite the afore mentioned studies, the elucidation of the electrocatalytic size dependence behavior as well as the kinetics properties of gold nanoparticles (AuNPs) with size above 10 nm has not been reported.

We propose herein a green and an easily scaled-up seeded growth method previously reported by Bastus et al., for the synthesis of high-quality and long-term stable citrate-stabilized AuNPs with sizes of 15 nm, 28 nm, 55 nm and 95 nm, respectively.<sup>16,17</sup> After exhaustive characterization, citrate-stabilized AuNPs with different size were tested for the electroreduction of oxygen by detailed static and dynamic electrochemical measurements.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	106/224



### Experimental

**Synthesis of citrate-stabilized AuNPs.** 15 nm (step 2), 28 nm (step 4), 55 nm (step 8) and 95 nm (step 11) citrate-stabilized gold nanoparticles (AuNPs) with a uniform quasi spherical shape and a narrow size distribution were synthesized, by sequential manner, following a kinetically controlled seeded growth strategy via the reduction of H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> by sodium citrate.<sup>16,17</sup> Briefly, 150 mL of 2.2 mM sodium citrate solution was heated in a 250 mL three-neck round-bottom flask for 15 min under vigorous stirring. Once the boiling starts, 1 mL of 25 mM H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> was injected. After 30 minutes, the reaction was finished. After that, the sample was diluted by extracting 55 mL of sample (step 1) and adding 53 mL of ultrapure water and 2 mL of 60 mM sodium citrate. The resulting solution was then used as a seed solution to the next growing step, and the process was repeated (i.e. the dilution was heated until the boiling starts, and then 1 mL of 25 mM of H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> was injected. After 30 minutes, the reaction was finished and 55 mL of sample (step 2) was extracted). In this way, a total of eleven growth steps were performed obtaining finally citrate-stabilized 95 nm AuNPs (step 11).

For the resulting AuNPs, the molar gold concentration was estimated from the absorbance at 400 nm, which is assumed to have a size independent absorption coefficient.<sup>16</sup>

**Material characterization.** UV-visible spectra were recorded on a Cary 100 Bio UV-Vis spectrometer in disposable polystyrene cuvettes with 1.0 cm path length. Samples for transmission electron microscopy (TEM) were prepared by drying, under ambient conditions, a dispersion of the particles on 200 mesh copper grids coated with Formvar/Carbon film. TEM images were obtained in a JEOL JEM 1400 TEM microscope, operated at an accelerating voltage of 80 kV. Powder X-ray diffraction (XRD) experiments were performing using a Bruker D8 ADVANCE diffractometer operating at 40 kV and 40 mA and using Cu K $\alpha$  radiation (1.5406 Å).

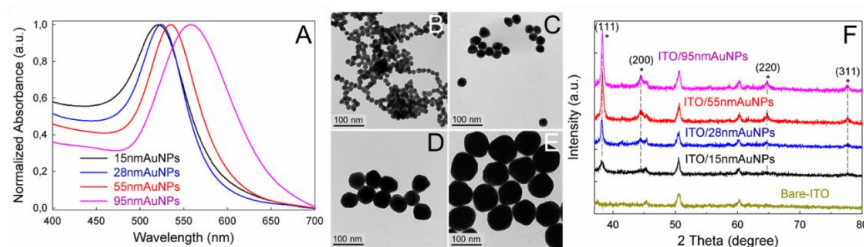
**Electrochemical experiments.** Chronoamperometric, cyclic (CVs) and differential pulse (DPVs) voltammetric measurements were recorded on an AUTOLAB PGSTAT30 electrochemical analyzer using a three-electrode system. A

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	107/224



glassy carbon (GC) disc (5 mm in diameter; Pine Instruments Company) were used as working electrodes. A drop of 25  $\mu\text{L}$  of AuNPs sample ( $\text{Au}^0$ -concentration  $\sim 0.7$  mM) was loaded onto the clean surface of GC electrode and then dried overnight at 4  $^\circ\text{C}$ . A platinum sheet and an Ag/AgCl electrode were used as counter and reference electrodes, respectively. A 0.5 M KOH was used as supporting electrolyte. All the solutions were purged prior to electrochemical measurements using nitrogen ( $\text{N}_2$ ) or oxygen ( $\text{O}_2$ ) gas, depending on the experiment.

## Results and Discussion



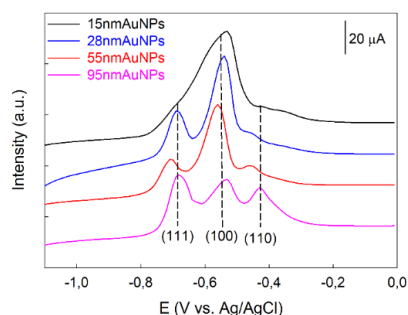
**Figure 1.** (A) UV–visible spectra and (F) XRD of citrate-stabilized AuNPs with different particle sizes. (B–E) TEM images of 15 nm (B), 28 nm (C), 55 nm (D), and 95 nm AuNPs (E).

Figure 1A shows the normalized spectra of each growth step of the citrate-stabilized AuNPs. The surface plasmon resonance (SPR) band maxima were located at 521, 525, 535, and 558 nm, respectively. The expected particle size values were ca. 18, 24, 52, and 96 nm, respectively.<sup>16</sup> The morphological characterization of the AuNPs was performed by TEM, see Figure 1B–E. The citrate-stabilized AuNPs were quasi-spherical in shape with a narrow distribution in size. Figure S1 shows the size-distribution histograms obtained from TEM images, demonstrating a good correlation with the theoretical sizes obtained from SPR bands. X-Ray diffraction (XRD) analysis was performed to confirm the crystalline structure of the resulting AuNPs. Figure 1F shows the XRD patterns for the four different growth steps on

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY	Página	108/224



ITO support, which presented diffraction patterns at  $38.9^\circ$ ,  $44.5^\circ$ ,  $65^\circ$ , and  $77.7^\circ$  corresponding to the (111), (200), (220), and (311) planes of a face centered cubic (fcc) structure, respectively. The latter Miller indices were almost identical to the given values in the standard JCPDS file 4-0784 of fcc Au.<sup>18</sup> Furthermore, as it was expected for larger crystalline nanomaterials, the relative intensity of the XRD peaks increase with the particle size.

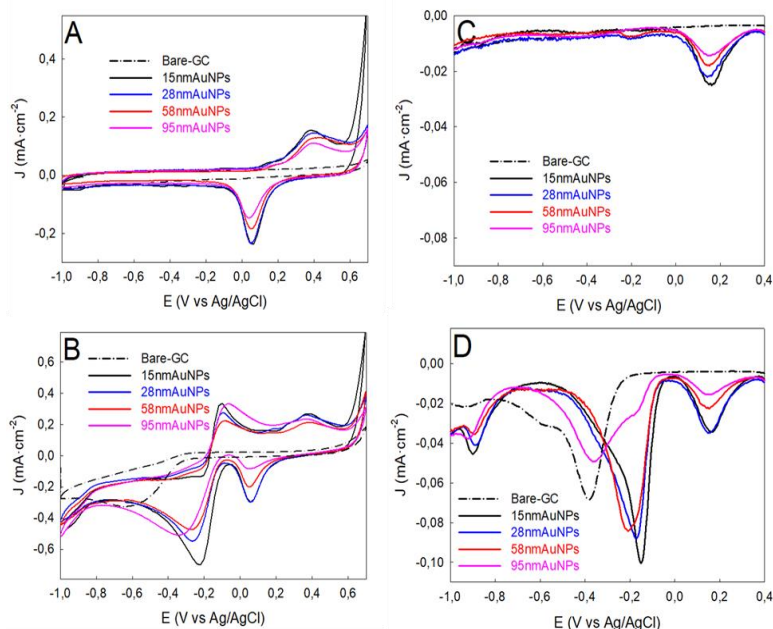


**Figure 2.** Desorption voltammetric profiles of the different AuNPs in 0.1 M NaOH and 1 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  recorded under a  $\text{N}_2$ -saturated atmosphere. Scan rate:  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .

To study the electrochemical behavior of the resulting citrate-stabilized AuNPs, they were deposited by drop-casting, and subsequent drying, on the surface of a glassy carbon electrode. First, the surface structure and the ratio of the existing facets on AuNPs of four different sizes were studied by lead underpotential deposition (Pb-UPD).<sup>19</sup> During the positive potential sweep, three stripping peaks corresponding to the desorption of lead layer on Au(111), (100) and (110) facets can be observed at around -0.7, -0.57 and -0.47 V, respectively (Figure 2). Overall, variations in the relative intensity of these three desorption peaks can be observed with the increase of the particle size. For instance, 15 nm AuNPs showed a single broad desorption peak, indicating that the most of their surface sites have (100) symmetry. Whilst, 95 nm AuNPs showed well-defined three domains (i.e. (111), (100) and (110)) with a similar relative intensity. These results suggest that citrate-stabilized 15 nm AuNPs are the best candidates as ORR electrocatalysts.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	109/224





**Figure 3.** (A,B) Cyclic and (C,D) differential pulse voltammograms of GC electrodes modified with citrate-stabilized AuNPs of different particle sizes in  $N_2$ -saturated (A,C) and  $O_2$ -saturated (B,D) 0.5 M KOH. Scan rate:  $0.1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Figure 3A,B displays the cyclic voltammograms (CVs) of the citrate-stabilized AuNPs in alkaline medium (0.5 M) saturated with  $N_2$  and  $O_2$ , respectively. No electrochemical response within the potential ranges of -1.0 and -0.10 V in  $N_2$ -saturated solution was found, whereas well-defined cathodic peaks arise at -0.20 V in  $O_2$ -saturated conditions indicating the electrocatalytic effect of the citrate-stabilized AuNPs in oxygen reduction processes. Importantly, the intensities of the cathodic peaks as well as the onset potential of the  $O_2$  reduction varied significantly with the size of the citrate-stabilized AuNPs, suggesting a clear dependence of the electrocatalytic activity with the nanoparticle size. These findings were supported by the differential pulse voltammograms (DPVs) of the AuNPs/GC electrodes in  $N_2$ - and  $O_2$ -saturated conditions (Figure 3C,D). In the absence of  $O_2$ , the resulting peaks

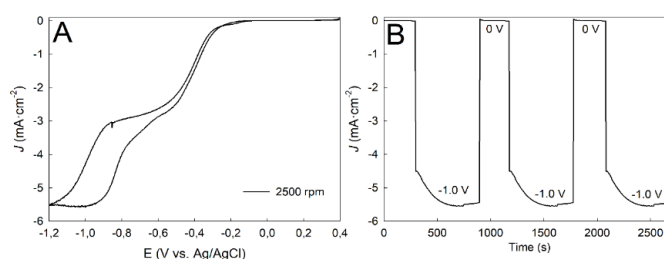
Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	110/224



were associated with the Au/AuOx redox process of the AuNPs. On the other hand, the peaks located between -0.20 and -0.38 V in the DPV curves correspond to the 2-electron oxygen reduction processes in the presence of O<sub>2</sub>.

The variation of the intensity values of the DPV curves clearly revealed a significant influence of the size of the citrate-stabilized AuNPs on the ORR processes. Interestingly, the peaks located between -0.80 and -1.00 V correspond to ORR via 4-electron processes, showing the same core-size dependent tendency both for the potential and intensity values.

Further insights on the effect of citrate-stabilized AuNP core size on the electrocatalytic activity in ORR were pursued by analyzing the reaction kinetics properties by rotating-disk voltammetry. Note that the maximum current density values obtained at the initial forward scan were lower than those at the return scan during the rotating-disk voltammograms (RDVs), see Figure 4A.



**Figure 4.** Hysteresis effect during measurements with the rotating disk electrode. (A) Rotating-disk voltammograms and (B) chronoamperograms of GC/15 nm AuNP electrode at a rotating rate of 2500 rpm in O<sub>2</sub>-saturated 0.5 M KOH. Scan rate: 10 mV·s<sup>-1</sup>.

The hysteresis might be attributed to the different interaction between Au surfaces and dioxygen in each scan. The dioxygen adsorption requires the displacement of the capping ligands on the Au surface during the initial forward scan, which might require a higher amount of energy than the one during the return scan. Probably, in the latter case, the oxygen adsorption is much favored because it requires the

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Página	111/224






displacement of the reaction product (i.e. OH- or HO<sub>2</sub><sup>-</sup>).<sup>20</sup> Figure 4B demonstrates that the same value of maximum current density obtained during the return scan of the CV was achieved applying a constant potential of -1.0 V, see Figure 2B. Thus, the latter result validates the use of return scan for the following kinetic analysis. Figure S2 compares the hysteresis effect on ORR for the different citrate stabilized AuNPs, showing clear size dependence.

In order to further understand the latter mentioned hysteresis effect on AuNPs-based electrocatalysts toward ORR reaction, two types of dynamic experiments were carried out using rotating-disc electrode modified with citrate-stabilized 15 nm AuNPs (Figure S3). The first experiment was performed by decreasing the amount of citrate-stabilized 15 nm AuNPs deposited on the surface of the GC electrode (Figure S3A-D), and the second one, shortening the initial potential applied during the cyclic voltammetry measurements (Figure S3D,E). These results demonstrated that, at least, the hysteresis effect is a process dependent both on the amount of electrocatalyst deposited on the surface of GC electrode and on the range of applied potential during the voltammetric measurements.

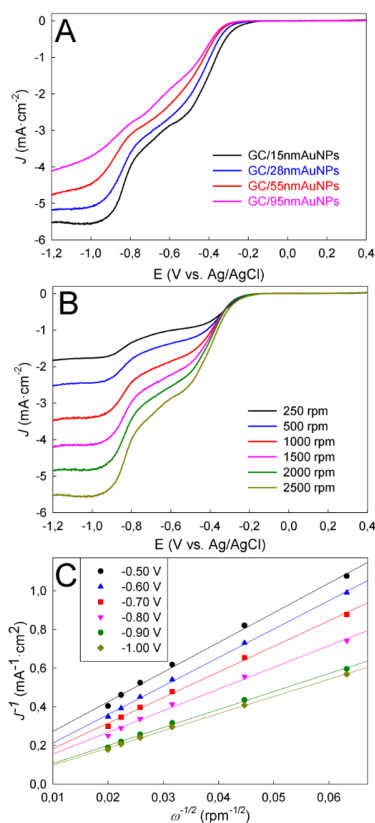
Figure 5A shows the comparative rotating-disk voltammograms (RDVs) for ORR of the four different AuNPs/GC electrodes at the same rotating rate of 2500 rpm. On the one hand, the maximum current density at -1.0 V increased with decreasing the particle size, obtaining values of -5.58, -5.08, -4.47 and -3.71 mA·cm<sup>-2</sup> for 15nm-, 28nm-, 55nm- and 95nm-AuNPs/GC electrodes, respectively. A clear core-size dependence can be observed, in agreement with our previous CVs and DPVs analysis. This dependence can be attributed to the comparatively higher surface area of the smaller AuNPs. Noticeably that the limiting current density obtained for our citrate-stabilized 15nmAuNPs/GC electrode at 2500 rpm was the maximum possible value following a four-electron pathway and considering the geometrical area of the GC working electrode.<sup>21</sup> It is a clear evidence of the suitability as electrocatalyst for the ORR of the citrate-stabilized 15nmAuNPs.

The onset potential values of ORR shift negatively with the increase of the AuNP

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	112/224



size, see Table 1. Note that the same onset value (i.e. -0.20 V) is obtained for citrate-stabilized 15nmAuNPs/GC and Au<sub>55</sub>C<sub>16</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>12</sub> clusters.<sup>22</sup> These interesting results can be attributed to the different capped ligands, which can block catalytically active sites of metal NPs and lower the catalytic activity.<sup>23</sup> Therefore, the electrostatically adsorbed citrate ligand appears as a much more suitable ligand for oxygen adsorption than covalently bound thiol- and tertiary phosphine- binding ligands.



**Figure 5.** (A) Rotating-disk voltammograms (RDVs) of GC electrodes modified with citrate-stabilized AuNPs of different particle sizes at the same rotating rate of 2500 rpm and (B) RDVs for a GC/15nmAuNP modified electrode at different rotation rates in O<sub>2</sub>-saturated 0.5

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	113/224



M KOH. Scan rate: 10 mV·s<sup>-1</sup>. (C) Koutecky–Levich plots at different electrode potentials obtained from panel (B).

**Table 1.** Kinetic parameters for ORR of the GC electrodes modified with citrate-stabilized AuNPs of different particle sizes.

	15nmAuNPs	28nmAuNPs	55nmAuNPs	95nmAuNPs
<b>Onset potential (V)</b>	-0.20	-0.24	-0.28	-0.30
<b>Number of electrons transferred at -0.50 V</b>	2.36	2.34	2.68	2.01
<b><math>J_K</math> (mA·cm<sup>-2</sup>) at -0.50 V</b>	-8.33	-5.11	-2.95	-2.55
<b>k (cm·s<sup>-1</sup>) at -0.50 V</b>	0.035	0.022	0.011	0.012
<b>Number of electrons transferred at -1.00 V</b>	4.07	4.08	3.92	3.56
<b><math>J_K</math> (mA·cm<sup>-2</sup>) at -1.00 V</b>	-115.2	-43.97	-21.25	-12.64
<b>k (cm·s<sup>-1</sup>) at -1.00 V</b>	0.285	0.108	0.054	0.035

Figure 5B shows the resulting RDVs for 15nmAuNPs/GC electrode at different rotation rates from 2500 to 250 rpm. The shape of our curves was similar to the one reported previously for 1 nm Au thin film/GC electrode prepared by vacuum evaporation of gold at a base pressure of 2·10<sup>-6</sup> Torr, requiring a rotation rate of 4600 rpm for obtaining a similar limiting current density at -1.0 V (i.e. -5.58 mA·cm<sup>-2</sup>).<sup>24</sup> RDV was applied to citrate-stabilized AuNPs of different sizes; see Figure S4 and Table 1:

$$\frac{1}{J} = \frac{1}{J_L} + \frac{1}{J_K} = \frac{1}{B\omega^{1/2}} + \frac{1}{J_K} \quad (1)$$

$$B = 0.62nFC_0D_0^{2/3}\nu^{-1/6} \quad (2)$$

$$J_K = nFkC_0 \quad (3)$$

where  $J$  is the measured current density,  $J_K$  and  $J_L$  are the kinetic and diffusion limiting current densities, respectively,  $\omega$  is the electrode rotation rate,  $n$  is the overall number of electrons transferred in oxygen reduction,  $F$  is the Faraday constant,  $C_0$  is the bulk concentration of  $O_2$  dissolved in the electrolyte ( $1.03 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 0.5 M KOH),  $D_0$  is the diffusion coefficient of  $O_2$  ( $1.63 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  for 0.5 M KOH),  $\nu$  is the kinematic viscosity of the electrolyte ( $0.01 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  for 0.5 M KOH), and  $k$  is the electron transfer rate constant during ORR.<sup>25</sup> Figure 5C shows the Koutecky–Levich (K-L) plot obtained from the RDVs of the 15 nm AuNPs/GC electrode. The excellent linearity of the experimental points demonstrates a first-order reaction kinetic toward dissolved  $O_2$ . According to equations (1) and (2), the values of  $J_K$  and  $n$  can be obtained from the slope and intercept of this K-L plot, respectively. The rate constants ( $k$ ) were estimated using the equation (3). Table 1 summarized the resulting kinetic parameters of our 4 different AuNPs/GC electrodes, both at -0.50 V and at -1.00 V. Overall, the ORR was found to proceed by a four-electron reaction pathway at -1.00 V, while at -0.50 V the ORR was performed by a two-electron reaction route. In other words, depending of the applied potential, the formation of  $\text{OH}^-$  or  $\text{HO}_2^-$  as byproduct of the ORR can be conveniently controlled.<sup>26</sup> Therefore, the present concept of potential-dependent electrocatalyst using exclusively citrate-stabilized AuNPs/GC electrode could be extrapolated to other reduction reactions and improve the control of product selectivity in electrocatalytic processes. Finally, the stability of citrate-stabilized 15 nm AuNPs was evaluated using an accelerated aging test (AAT), which uses thousand scanned potential performed by cyclic voltammeteries in oxygen-saturated 0.1 M KOH

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	115/224



solution.<sup>27,28</sup> Figure S5 shows that, after ATT, the ORR onset- and peak-potential associated with 2 electrons transfer pathway were negatively shifted by 92 mV, while these same parameters were positively shifted by 170 mV for the 4 electrons transfer pathway. Moreover, the peak current densities for both ORR mechanisms have clearly increased after ATT, indicating a possible activation process of this type of Au-electrocatalyst. These results clearly demonstrated its excellent suitability as ORR electrocatalyst in alkaline electrolyte.

### Conclusions.

The nano-size effect on the electrocatalytic properties of citrate-stabilized AuNPs for ORR has been assessed. The proposed nanoelectrocatalysts were synthesized by a green and scaled-up synthesis method. The particle size of the citrate-stabilized AuNPs influences the maximum current density and the onset potential values, being two relevant parameters in the quantitative assessments of electrocatalytic performance. The citrate-stabilized AuNPs render a comparable electrocatalytic performance to those reported for Au-clusters. This work highlights the crucial role of the capping ligands coating the Au-core even for Au nanoclusters. Therefore, our work paves the way for ligand-oriented and surface chemistry design of highly efficient nanomaterials for electrocatalysis of the ORR. We consider that our findings may remarkably impact their possible application in fuel cell technology, where the high cost of the electrocatalyst is one of the critical aspects.

**Supporting Information Description.** Size-distribution histograms obtained from the TEM images for each growth step, additional rotating-disk voltammograms and the AAT. The following files are available free of charge Supporting Information (PDF).


**Acknowledgment.** Support from the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain is acknowledged through the CTQ2017-83961-R project. J.J.G.-C.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	116/224



acknowledges the Ministry of Economy and Competitiveness for a “Ramon y Cajal” contract (#RyC-2014-14956). M. C. thanks the “Plan Propio de Investigación” from the Universidad de Córdoba (UCO) and the “Programa Operativo de fondos FEDER Andalucía” for its financial support through a postdoctoral contract (Modality 5.2.A). The publication has been prepared with support from RUDN University Program 5-100. Rafael Luque gratefully acknowledges MINECO for funding project CTQ2016-78289-P, co-financed with FEDER funds. Alain R. Puente-Santiago gratefully acknowledge MINECO for their research contracts associated to the aforementioned project, and to the Research Program of the UCO for its financial support through a postdoctoral contract (Modality 5.1). They also thank Prof. Dr. J. M. Rodríguez-Mellado of the Department of Physical Chemistry and Applied Thermodynamics at the UCO for kind access to the rotating disk equipment.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	117/224



**Notes and References**

- (1) Liu, L.; Corma, A. Metal Catalysts for Heterogeneous Catalysis: From Single Atoms to Nanoclusters and Nanoparticles. *Chem. Rev.* **2018**, 118 (10), 4981–5079.
- (2) Fei, H.; Dong, J.; Feng, Y.; Allen, C. S.; Wan, C.; Voloskiy, B.; Li, M.; Zhao, Z.; Wang, Y.; Sun, H.; et al. General Synthesis and Definitive Structural Identification of MN<sub>4</sub>C<sub>4</sub> Single-Atom Catalysts with Tunable Electrocatalytic Activities. *Nat. Catal.* **2018**, 1 (1), 63–72.
- (3) Rück, M.; Bandarenka, A.; Calle-Vallejo, F.; Gagliardi, A. Oxygen Reduction Reaction: Rapid Prediction of Mass Activity of Nanostructured Platinum Electrocatalysts. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, 9 (15), 4463–4468.
- (4) Liu, K.; Zhang, C.; Sun, Y.; Zhang, G.; Shen, X.; Zou, F.; Zhang, H.; Wu, Z.; Wegener, E. C.; Taubert, C. J.; et al. High-Performance Transition Metal Phosphide Alloy Catalyst for Oxygen Evolution Reaction. *ACS Nano* **2018**, 12 (1), 158–167.
- (5) Wu, J.; Yang, H. Platinum-Based Oxygen Reduction Electrocatalysts. *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46 (8), 1848–1857.
- (6) Xia, B. Y.; Yan, Y.; Li, N.; Wu, H. Bin; Lou, X. W. (David); Wang, X. A Metal–organic Framework-Derived Bifunctional Oxygen Electrocatalyst. *Nat. Energy* **2016**, 1 (1), 15006.
- (7) Wan, L.; Qin, Y.; Xiang, J. Rapid Electrochemical Fabrication of Porous Gold Nanoparticles for High-Performance Electrocatalysis towards Oxygen Reduction. *Electrochim. Acta* **2017**, 238, 220–226.
- (8) Seselj, N.; Engelbrekt, C.; Ding, Y.; Hjuler, H. A.; Ulstrup, J.; Zhang, J. Tailored Electron Transfer Pathways in Au Core /Pt Shell-Graphene Nanocatalysts for Fuel Cells. *Adv. Energy Mater.* **2018**, 8 (13), 1702609.
- (9) Wang, L.; Tang, Z.; Yan, W.; Yang, H.; Wang, Q.; Chen, S. Porous Carbon-Supported Gold Nanoparticles for Oxygen Reduction Reaction: Effects of Nanoparticle Size. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, 8 (32), 20635–20641.
- (10) Yi, J.-D.; Xu, R.; Wu, Q.; Zhang, T.; Zang, K.-T.; Luo, J.; Liang, Y.-L.; Huang, Y.-B.; Cao, R. Atomically Dispersed Iron–Nitrogen Active Sites within Porphyrinic

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	118/224



Triazine-Based Frameworks for Oxygen Reduction Reaction in Both Alkaline and Acidic Media. *ACS Energy Lett.* **2018**, 3 (4), 883–889.

(11) Chakraborty, S.; Babanova, S.; Rocha, R. C.; Desireddy, A.; Artyushkova, K.; Boncella, A. E.; Atanassov, P.; Martinez, J. S. A Hybrid DNA-Templated Gold Nanocluster for Enhanced Enzymatic Reduction of Oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (36), 11678–11687.

(12) Lalaoui, N.; Rousselot-Pailley, P.; Robert, V.; Mekmouche, Y.; Villalonga, R.; Holzinger, M.; Cosnier, S.; Tron, T.; Le Goff, A. Direct Electron Transfer between a Site-Specific Pyrene-Modified Laccase and Carbon Nanotube/Gold Nanoparticle Supramolecular Assemblies for Bioelectrocatalytic Dioxygen Reduction. *ACS Catal.* **2016**, 6 (3), 1894–1900.

(13) Zhou, Y.; Zeng, H. C. Metal–Hydroxide and Gold–Nanocluster Interfaces: Enhancing Catalyst Activity and Stability for Oxygen Evolution Reaction. *J. Phys. Chem. C* **2016**, 120 (51), 29348–29357.

(14) Seitz, L. C.; Hersbach, T. J. P.; Nordlund, D.; Jaramillo, T. F. Enhancement Effect of Noble Metals on Manganese Oxide for the Oxygen Evolution Reaction. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, 6 (20), 4178–4183.

(15) Sumner, L.; Sakthivel, N. A.; Schrock, H.; Artyushkova, K.; Dass, A.; Chakraborty, S. Electrocatalytic Oxygen Reduction Activities of Thiol-Protected Nanomolecules Ranging in Size from Au 28 (SR) 20 to Au 279 (SR) 84. *J. Phys. Chem. C* **2018**, 122 (43), 24809–24817.

(16) Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puentes, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir* **2011**, 27 (17), 11098–11105.

(17) Alba-Molina, D.; Rodríguez-Padrón, D.; Puente-Santiago, A.R.; Giner-Casares, J.J.; Martín-Romero, M. T.; Camacho, L.; Martins, L. O.; Muñoz-Batista, M. J.; Cano, M.; Luque, R. Mimicking the bioelectrocatalytic function of recombinant CotA laccase via electrostatically self-assembled nanobioconjugates. *Nanoscale* **2019**, 11, 1549-1554.

(18) Turkevich, J.; Kim, G. Palladium: Preparation and Catalytic Properties of

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	119/224





Particles of Uniform Size. *Science* **1970**, 169 (3948), 873–879.

(19) Hernández, J.; Solla-Gullón, J.; Herrero, E.; Aldaz, A.; Feliu, J.M. Electrochemistry of Shape-Controlled Catalysts: Oxygen Reduction Reaction on Cubic Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111 (38), 14078-14083.

(20) Rizo, R.; Arán-Ais, R. M.; Padgett, E.; Muller, D. A.; Lázaro, M. J.; Solla-Gullón, J.; Feliu, J. M.; Pastor, E.; Abruña, H. D. Pt-Rich Core /Sn-Rich Subsurface /Pt Skin Nanocubes As Highly Active and Stable Electrocatalysts for the Ethanol Oxidation Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140 (10), 3791–3797.

(21) Xing, W.; Yin, G.; Zhang, J. Rotating Electrode Methods and Oxygen Reduction Electrocatalysis; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, **2014**.

(22) Chen, W.; Chen, S. Oxygen Electroreduction Catalyzed by Gold Nanoclusters: Strong Core Size Effects. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48 (24), 4386–4389.

(23) Cao, Z.; Zacate, S. B.; Sun, X.; Liu, J.; Hale, E. M.; Carson, W. P.; Tyndall, S. B.; Xu, J.; Liu, X.; Liu, X.; et al. Tuning Gold Nanoparticles with Chelating Ligands for Highly Efficient Electrocatalytic CO<sub>2</sub> Reduction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57 (39), 12675–12679.

(24) Sarapuu, A.; Nurmik, M.; Mändar, H.; Rosental, A.; Laaksonen, T.; Kontturi, K.; Schiffrin, D. J.; Tammeveski, K. Electrochemical Reduction of Oxygen on Nanostructured Gold Electrodes. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, 612 (1), 78–86.

(25) Mukherjee, D.; P, M. A.; Sampath, S. Few-Layer Iron Selenophosphate, FePSe<sub>3</sub>: Efficient Electrocatalyst toward Water Splitting and Oxygen Reduction Reactions. *ACS Appl. Energy Mater.* **2018**, 1 (1), 220–231.

(26) Hernández, J.; Solla-Gullón, J.; Herrero, E.; Aldaz, A.; Feliu, J. M. Characterization of the Surface Structure of Gold Nanoparticles and Nanorods Using Structure Sensitive Reactions. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109 (26), 12651–12654.

(27) Guo, C.; Liao, W.; Li, Z.; Sun, L.; Chen, C. Easy conversion of protein-rich enoki mushroom biomass to a nitrogen-doped carbon nanomaterial as a promising metal-free catalyst for oxygen reduction reaction. *Nanoscale* **2015**, 7, 15990-15998.

(28) Franco, A.; Cano, M.; Giner-Casares, J. J.; Rodríguez-Castellon, E.; Luque, R.;

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	120/224




*Artículo I*

*Capítulo III*

---


Puente Santiago, A. R. Boosting electrochemical oxygen reduction activity of hemoglobin onto fructose@graphene-oxide nanoplatfoms. *Chem. Commun.* **2019**, 55, 4671-4674.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	121/224



## Supporting Information

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	122/224



## Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles as High-Performance Electrocatalyst: The Role of the Size on the Electroreduction of Oxygen

David Alba-Molina,<sup>1</sup> Alain R. Puente Santiago,<sup>2</sup> Juan J. Giner-Casares,<sup>1,\*</sup> María T.  
Martín-Romero,<sup>1</sup> Luis Camacho,<sup>1</sup> Rafael Luque,<sup>2</sup> Manuel Cano<sup>1,\*</sup>


<sup>1</sup>Department of Physical Chemistry and Applied Thermodynamics, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, University of Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Marie Curie, Córdoba, Spain E-14014.

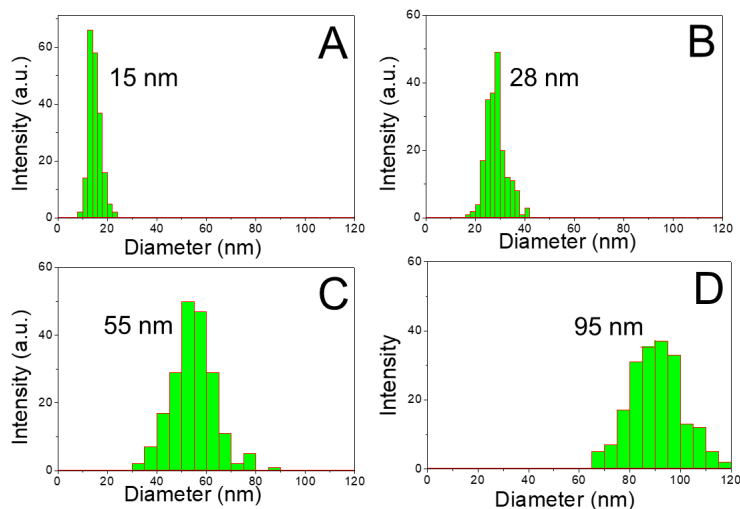
<sup>2</sup>Department of Organic Chemistry, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, University of Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Marie Curie, Córdoba, Spain E-14014.

Corresponding Authors:

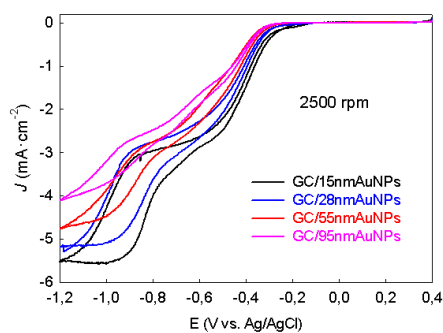
\*jgginer@uco.es, q82calum@uco.es

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	123/224





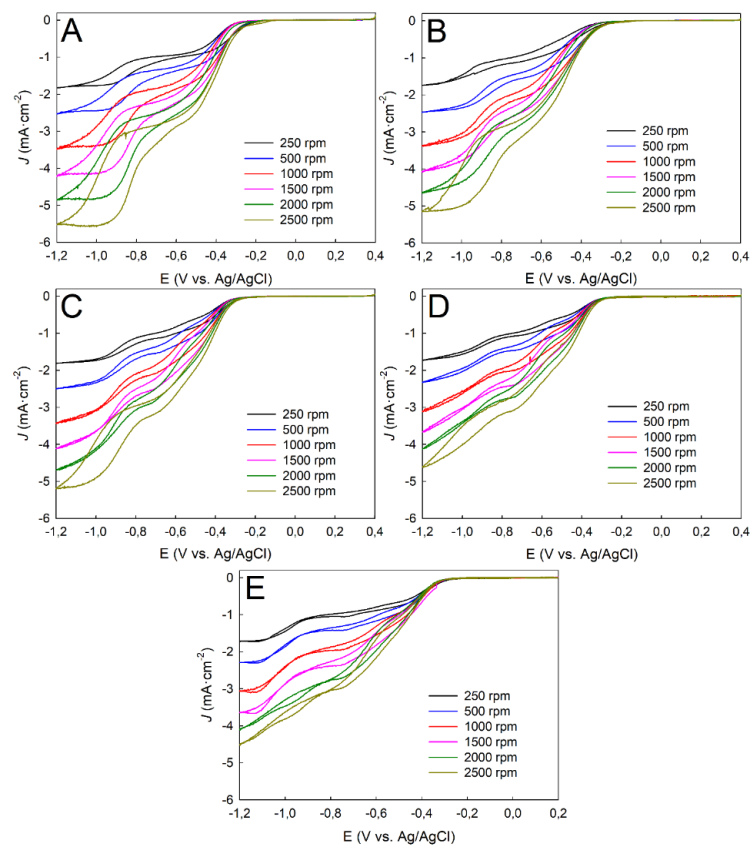
**Figure S1.** Size-distribution histograms from TEM images of citrate-stabilized AuNPs: (A) 15nmAuNPs, (B) 28nmAuNPs, (C) 55nmAuNPs and (D) 95nmAuNPs.



**Figure S2.** Hysteresis effect during measurements with rotating disk electrode of GC electrodes modified with citrate-stabilized AuNPs of different particle size at same rotating rate of 2500 rpm.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	124/224

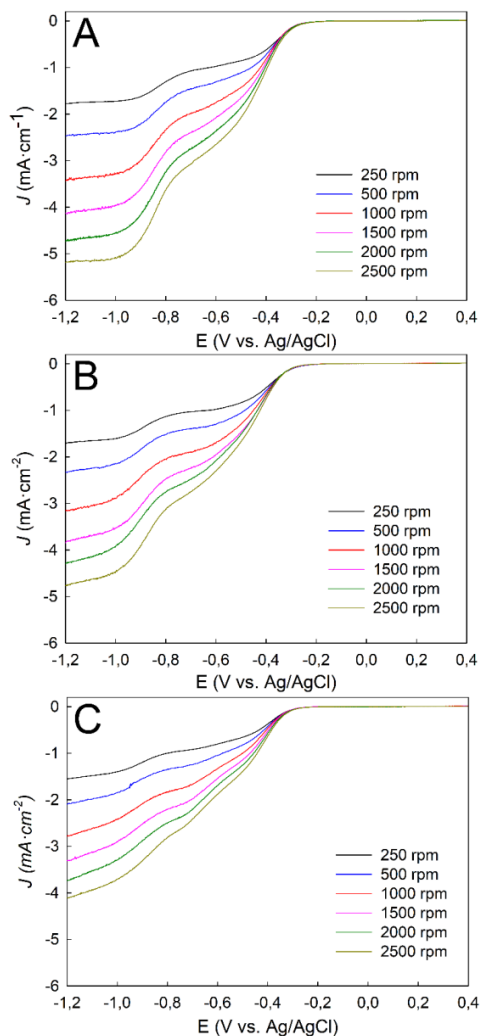




**Figure S3.** Cyclic voltammies (CVs) using rotating-disc GC electrodes modified with different amount of citrate-stabilized 15 nm AuNPs, without dilution (A) and diluted to 1:2 (B), 1:4 (C) and 1:8 (D), respectively. (E) The latter dilution but shortening the initial potential applied for the CV.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	125/224

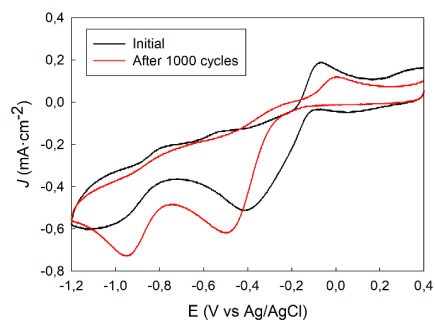




**Figure S4.** Rotating-disk voltammograms for (A) GC/28nmAuNPs, (B) GC/55nmAuNPs, and (C) GC/95nmAuNPs electrodes at different rotation rates in  $\text{O}_2$ -saturated 0.5 M KOH. Scan rate  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	126/224






**Figure S5.** CVs of GC electrode modified with citrate-stabilized 15 nm AuNPs in  $O_2$ -saturated 0.1 M KOH solution, before and after 1000 cycling stability tests. Scan rate of  $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	127/224





Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	128/224





## Tailoring the ORR and HER electrocatalytic performances of gold nanoparticles through metal-ligand interfaces

David Alba-Molina,<sup>a</sup> Alain R. Puente Santiago,<sup>bc</sup> Juan J. Giner-Casares,<sup>\*a</sup> Enrique Rodríguez-Castellón,<sup>d</sup> María T. Martín-Romero,<sup>a</sup> Luis Camacho,<sup>a</sup> Rafael Luque,<sup>be</sup> and Manuel Cano<sup>\*a</sup>

<sup>a</sup>Department of Physical Chemistry and Applied Thermodynamics, Institute of Nanochemistry (IUNAN), University of Cordoba (UCO), Campus Universitario de Rabanales, Ed. Marie Curie, Cordoba, Spain E-14014. E-mail: jgginer@uco.es; q82calum@uco.es

<sup>b</sup>Department of Organic Chemistry, IUNAN, UCO, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Marie Curie, Cordoba, Spain E-14014. E-mail: q62alsor@uco.es

<sup>c</sup>Department of Chemistry, University of Texas at El Paso, 500 W. University Avenue, El Paso, Texas 79968, USA.

<sup>d</sup>Department of Inorganic Chemistry, Crystallography and Mineralogy, Faculty of Sciences University of Málaga, Málaga, Spain.

<sup>e</sup>Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6 Miklukho-Maklaya str., Moscow, Russia.

Oxygen reduction (ORR) and hydrogen evolution (HER) reactions are the most important cathodic processes involved on fuel cell and water splitting technologies, respectively. The development of bifunctional electrocatalysts materials plays a key role on the rapid advance of these renewable energy strategies. This work proposes citrate-stabilized gold nanoparticles (AuNPs) as bifunctional electrocatalysts for ORR and HER. The capping ligand shows a great influence on their resulting electrocatalytic performance. A simple ligand exchange method based on concentration gradient has been optimized. The surface structure of the different ligand-stabilized AuNPs was inferred by lead underpotential deposition (Pb-UPD). Static and dynamic electrochemical studies for both ORR and HER have been performed using different ligand-stabilized AuNPs as electrocatalysts, demonstrating that citrate ligand confers the best performance. This work suggests that AuNPs may be suitable as bifunctional electrocatalyst in fuel cells and hydrogen production.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Página	129/224



### Introduction

Electrocatalysis appears as key process for mass hydrogen production and fuel cell in the essential energy economy for mitigating the climate change and fossil fuels exhaustion.<sup>1-4</sup> The precise design of bare metallic surfaces in nanostructures is receiving intense attention.<sup>5-10</sup> Controlling catalytic rates of organic ligand-capped metal nanoparticles through a precise tuning of metal-ligand interfaces is ultimately becoming a fundamental task to design boosted catalytic nanosystems.<sup>11-15</sup>

Traditionally, organic ligands have been closely associated to play an active role over the control of the size and shape of metal nanoparticles as well as their surface properties, such as electron transfer and hot electron cooling processes,<sup>16</sup> switchable dynamic self-assembly,<sup>17</sup> metal-support interactions<sup>18</sup> or colloidal stability.<sup>19,20</sup> Organic surface ligands have a significant impact on both electronic and steric states of nanostructured systems. The choice of the surface chemistry of nanomaterials modulates their electronic densities and reactant accessibilities.<sup>21-23</sup> Consequently, the rationale design of ligand coating of the electrocatalysts can potentially tune the activity and selectivity of metal nanoparticles in a wide range of catalytic reactions.<sup>24-27</sup>

Organic linkers have recently emerged as promising strategy to increase the catalytic performances of nano-sized structures. Guo *et al.* stated that the electron-donating properties of phosphine ligands (PPh<sub>3</sub>) magnify the surface electronic density of PdNPs improving the chemoselective catalytic hydrogenation of acetophenone.<sup>28</sup> In the same direction, Zheng *et al.* have concluded that interfacial electronic effects provoked by simple organic variations performed on Pt nanowires can greatly modify their performances towards the catalytic hydrogenation of nitroaromatics.<sup>29</sup> Additionally, controlling the molecular arrangement of organic modifiers could be changed the strength of the Brønsted acid sites and therefore markedly improve the catalytic efficiency.<sup>30</sup> In summary, the aforementioned works have opened new horizons to take advantages of the versatility of organic ligands to tune the catalytic function of nanostructured materials in a large variety of reactions.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	130/224



Despite the tremendous endeavors performed in this emerging field, only a few works have investigated the organic ligands influence applying an electrochemical potential at the metal-ligand interface. Indeed, no reports are available on the effects of organic linkers over the activity of bifunctional nanoparticle electrocatalysts for oxygen reduction (ORR) and hydrogen evolution reactions (HER), which are currently the keystone for the development of renewable-energy technologies.<sup>31-33</sup>

### Experimental


#### Synthesis of AuNPs@Citrate

15 nm citrate-stabilized gold nanoparticles (AuNPs) with a uniform quasi spherical shape and a narrow size distribution were synthesized following a kinetically controlled seeded growth strategy via the reduction of HAuCl<sub>4</sub> by sodium citrate.<sup>34,35</sup> Briefly, 150 mL of 2.2 mM sodium citrate solution was heated at ~90 °C in a 250 mL three-neck round-bottom flask for 15 min under vigorous stirring. Once the boiling starts, 1 mL of 25 mM HAuCl<sub>4</sub> was injected. After 30 minutes, the reaction was finished. The molar gold concentration of the resulting AuNPs@Citrate was estimated from the absorbance at 400 nm.<sup>36</sup>

#### Ligand exchange processes

Citrate ligand-exchange to CTAB was performed by a simple method based on concentration gradients. For this, 100 mM CTAB solution at 28-30 °C was added to a previously synthesized AuNPs@Citrate dispersion, with an Au<sup>0</sup> concentration of around 0.7 mM, in a ratio of 3:2 v/v. The resulting mixture was incubated overnight at 28-30 °C to allow the incorporation of the CTAB ligands on the surface of the AuNPs. Afterwards, the sample was centrifugated at 7500 rpm for 50 minutes. Then, the supernatant was discarded, and the solid was resuspended into a 100 mM CTAB solution at 28-30 °C. After overnight incubation, the sample was centrifugated again at the same conditions. This incubation/centrifugation procedure was performed twice in order to guarantee a complete ligand exchange. Finally, the resulting AuNPs@CTAB were suspended in 10 mM CTAB solution and stored at 28-30 °C until used.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	131/224



Citrate ligand-exchange to PSS to obtain AuNPs@PSS was performed using similar protocol described above. The main difference was the used PSS solutions, which had concentrations of 0.4 wt % and 0.15 wt % Na-PSS ( $M_w = 70$  kDa) for the incubation steps and the storage, respectively.

To perform citrate ligand-exchange to MUA, the most difficult stage was to control the pH~12, both to allow the aqueous solubility of MUA, which requires basic conditions, and to avoid the aggregation of AuNPs. For this, an aqueous solution containing 300 mM MUA and 0.1 M NaOH was prepared. Once MUA was perfectly dissolved with the help of sonication, the resulting solution was water diluted 1:10, and subsequently added to the previously synthesized AuNPs@Citrate as previously described ligand exchange processes (i.e. in a ratio of 3:2 v/v with an  $Au^0$  concentration of ~0.7 mM). After overnight incubation at 28-30 °C, the sample was centrifugated at 7500 rpm for 50 min. Then, the supernatant was discarded, and the solid was resuspended into the 1:10 diluted MUA solution (30 mM, pH~12) at 28-30 °C. As described above, the incubation/centrifugation procedure was performed twice in order to guarantee a complete ligand exchange. Finally, the resulting AuNPs@MUA were suspended in 30 mM MUA solution (pH~12) and stored at 28-30 °C until used.

### Material characterization

UV-visible spectra were recorded on a Cary 100 Bio UV-Vis spectrometer in disposable polystyrene cuvettes with 1.0 cm path length. Samples for transmission electron microscopy (TEM) were prepared by drying, under ambient conditions, a diluted dispersion of the particles on 200 mesh copper grids coated with Formvar/Carbon film. TEM images were obtained in a JEOL JEM 1400 TEM microscope, operated at an accelerating voltage of 80 kV.

XPS studies were performed on a Physical Electronics PHI 5700 spectrometer (non-monochromatic Mg-K $\alpha$  radiation, 300 W, 15 kV and 1253.6 eV). Spectra were recorded in the constant pass energy mode at 29.35 eV, using a 720  $\mu$ m diameter

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	132/224



analysis area. Charge referencing was carried out using the adventitious carbon peak (C 1s at 284.8 eV). The energy scale was calibrated using Cu  $2p_{3/2}$ , Ag  $3d_{5/2}$ , and Au  $4f_{7/2}$  lines at 932.7, 368.2 and 84.0 eV, respectively. A PHI ACCESS ESCAV6.0 F and MULTIPAK V9.6 software packages were used for acquisition and data analysis, respectively.

Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy was performed in an ALPHA-T Bruker spectrometer. Spectra were recorded from dried-samples diluted in KBr, at room temperature in a 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  wavenumber range, using the OPUS software.

### Electrochemical experiments


Cyclic (CVs) and differential pulse (DPVs) voltammetric measurements were recorded on an AUTOLAB PGSTAT30 electrochemical analyzer using a three-electrode system. A glassy carbon (GC) disc (5 mm in diameter; Pine Instruments Company) were used as working electrode. A drop of 25  $\mu\text{L}$  of AuNPs sample (Au<sup>0</sup>-concentration  $\sim 0.7$  mM) was loaded onto the clean surface of GC electrode and then dried overnight at 4 °C. A platinum sheet and an Ag/AgCl electrode were used as counter and reference electrodes, respectively. 0.5 M KOH O<sub>2</sub>-saturated and 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> N<sub>2</sub>-saturated solutions were used as supporting electrolytes for ORR and HER, respectively.

For the HER measurements, all the potentials versus the Ag/AgCl (3 M KCl) reference electrode were converted to the reversible hydrogen electrode (RHE) scale using the Nernst equation:<sup>37</sup>

$$E_{RHE} = E_{Ag/AgCl} + 0.059 pH + E_{Ag/AgCl}^{\theta} \quad (1)$$

Where  $E_{RHE}$  is the converted potential versus RHE,  $E_{Ag/AgCl}$  is the experimental potential measured against the Ag/AgCl reference electrode, and  $E_{Ag/AgCl}^{\theta}$  is the standard potential of Ag/AgCl (3 M KCl) at 25 °C (0.205 V). The HER electrochemical measurements were carried out in 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH = 0.29) at room temperature: therefore,  $E_{RHE} = E_{Ag/AgCl} + 0.222$  V.

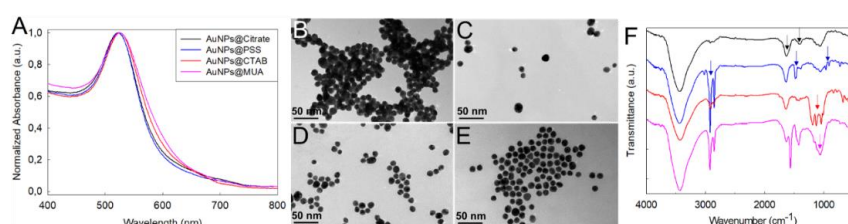
Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	133/224



## Results and Discussion

### Ligand exchange characterization

Stable aqueous dispersions of AuNPs@CTAB, AuNPs@PSS and AuNPs@MUA were successfully prepared from AuNPs@Citrate through simple ligand-exchange processes based on concentration gradient. To demonstrate the efficient functionalization of AuNPs with different capping ligands, UV-visible, Fourier-transmission infrared (FTIR), transmission electron microscopy (TEM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis were performed.



**Fig. 1** (A) UV-visible spectra of the different ligand-stabilized AuNPs. (B-E) TEM images of AuNPs@Citrate, AuNPs@CTAB, AuNPs@PSS and AuNPs@MUA, respectively. Inset their size distribution histograms. (F) FTIR spectra of all these AuNPs.

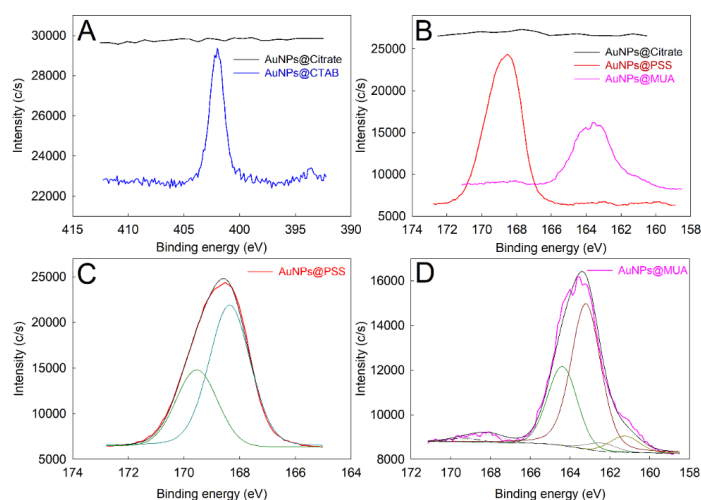
Fig. 1A shows the normalized UV-vis spectra for the ligand-stabilized AuNPs. Slight variations on the broadening of the surface plasmon resonance (SPR) band related to the different electronic interactions between Au-core and the surface capping ligands were observed. The SPR band maxima ( $\lambda_{\max} = 521$  nm) did not show a significant change after the ligand-exchange processes, suggesting good preservation of the Au core. TEM images of the different ligand-stabilized AuNPs further confirmed the absence of significant changes both on size distribution and on morphological parameters, see Fig. 1B-E.

The molecular species associated with the obtained AuNPs from the reported ligand-exchange processes could be identified by FTIR analysis (Fig. 1F). AuNPs@Citrate showed the expected carboxylate bands of the citrate coating, such

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	134/224



as the asymmetric C=O ( $1637\text{ cm}^{-1}$ ) and symmetric C-O ( $1408\text{ cm}^{-1}$ ) stretching bands.<sup>35,38</sup> The presence of CTAB on the AuNPs@CTAB was verified by strong bands associated with  $\text{sp}^3$  C-H stretching ( $2800\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$ ), -CH<sub>3</sub> deformation ( $1477\text{ cm}^{-1}$ ), and C-N stretching ( $920$  and  $966\text{ cm}^{-1}$ ).<sup>39</sup> While citrate ligand-exchange to PSS, AuNPs@PSS showed additional peaks associated with the  $\text{-SO}_3^-$  groups ( $1010\text{--}1220\text{ cm}^{-1}$ ).<sup>39</sup> Finally, after exchange with MUA, the FTIR spectrum of AuNPs@MUA exhibited a typical COO stretch at  $1637\text{ cm}^{-1}$ , which red-shifted from the COOH stretch in MUA ( $1690\text{ cm}^{-1}$  in Fig. S1) due to the formation of H-bonds between neighboring carboxylic acids. In addition, the lack of S-H stretching band ( $2520\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$  in pure MUA, Fig. S1) and the appearance of a C-S stretch at  $\approx 580\text{ cm}^{-1}$  confirmed both the presence of MUA and the formation of Au-S bonds.<sup>40,41</sup>



**Fig. 2** High-resolution XPS spectra of N 1s for AuNPs@Citrate and AuNPs@CTAB (A), and of S 2p for AuNPs@Citrate, AuNPs@PSS and AuNPs@MUA (B). The deconvoluted high-resolution S 2p core level spectra for AuNPs@PSS (C) and AuNPs@MUA (D).

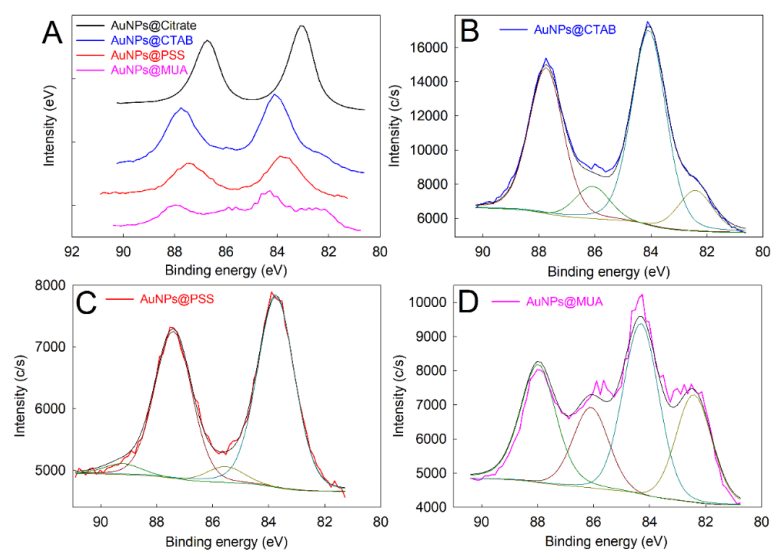
XPS measurements not only assisted in further confirming the ligand-exchange procedure, but also offered insights on the oxidation state of Au-surface. Fig. 2 plots

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	135/224





the survey spectra of the different ligand-stabilized AuNPs on ITO supports, showing the presence of Au 4*f*, C 1*s* and Au 4*d* in all samples. As expected, Na 1*s* and O 1*s* were detected in all AuNPs, except in the case of AuNPs@CTAB. On the other hand, S 2*p* and S 2*s* were only detected in AuNPs@PSS and AuNPs@MUA samples displaying significant differences between both signals, while N 1*s*, Br 3*p* (180 eV) and Br 3*d* (68 eV) were only detected in AuNPs@CTAB.<sup>41</sup>



**Fig. 3** High-resolution XPS spectra of Au 4*f* for the different ligand-stabilized AuNPs (A), and the deconvoluted high-resolution Au 4*f* core level spectra for AuNPs@CTAB (B), AuNPs@PSS (C) and AuNPs@MUA (D).

Fig. 2A compares in greater detail the high-resolution N 1*s* core level spectrum of AuNPs@Citrate and AuNPs@CTAB, showing a single contribution at 402 eV typical of an alkylammonium cation.<sup>39</sup> The deconvoluted S 2*p* core level spectra of S-containing AuNPs@PSS and AuNPs@MUA show the typical doublet S 2*p*<sub>3/2</sub> and S 2*p*<sub>1/2</sub>. The peaks at 168.4 and 169.6 eV were assigned to the sulfonic group on the Au surface of AuNPs@PSS (Fig. 2C), whereas the main doublet at 163.2 and 164.4 eV

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	136/224



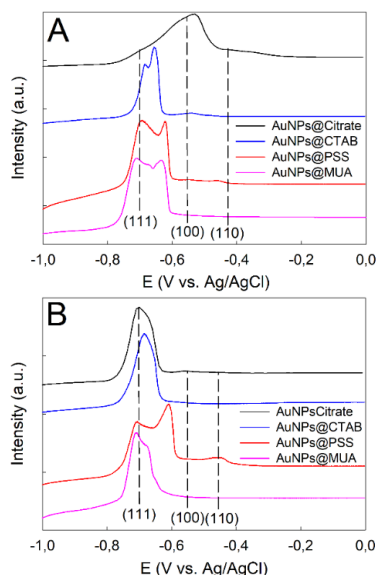
eV was assigned to thiolated AuNPs in AuNPs@MUA (Fig. 2D).<sup>41</sup> Additional contributions with comparatively much lower relative intensity were assigned to sulfide groups at low binding.

To gain further insights in Au binding energies associated with distinct capping ligands, high-resolution XPS spectra of Au 4*f* were compared in Fig. 3A. Significant shifts on the Au 4*f* states of the different decorated AuNPs can be observed, which can be attributes to changes in their interfacial composition due to the influence of the surface ligands. Fig. 3B-D show the deconvoluted high resolution Au 4*f* core level spectra for AuNPs@CTAB, AuNPs@PSS and AuNPs@MUA, respectively. The Au 4*f* signal for AuNPs@Citrate did not require deconvolution, where the peaks at 83.1 eV and 86.7 eV were assigned to Au 4*f*<sub>7/2</sub> and Au 4*f*<sub>5/2</sub>, respectively, belonging both photoemissions to Au(0).<sup>41,42</sup> Intriguingly, the Au 4*f*<sub>7/2</sub> binding energy (83.1 eV) was clearly shifted to lower value energy compared with the same signature reported for a pure metallic Au, which was attributed to the negatively surface charged AuNPs@Citrate.<sup>43</sup> The Au-CTAB interaction also provided the appearance of two doublets, where two contributions of Au 4*f*<sub>7/2</sub> appear at 82.4 eV (17 %) and 84.1 eV (83 %), respectively (Fig. 2B). The low binding energy signal was assigned to the positively charged AuNPs@CTAB whilst the second one, much more intense, to Au interacting with bromide ion. For AuNPs@PSS (Fig. 3C), the Au 4*f* spectrum also showed two doublets, but two contributions of Au 4*f*<sub>7/2</sub> located at 83.7 eV (92 %) and 85.6 eV (8 %), respectively. The main signal was assigned to Au interacting with sulfonic group and the weaker one to metallic Au. Fig. 3D shows the deconvoluted spectrum for AuNPs@MUA with two doublets, with the Au 4*f*<sub>7/2</sub> signals at 82.4 eV (39 %) and 84.3 eV (61 %), respectively. Although the resulting binding energy values of the Au 4*f* core level were quite similar to the one obtained for AuNPs@CTAB, the relative intensities for the latter presented more intense signal probably due to the high binding energy of the Au-S interaction.

The variations in Au binding energies of the different ligand-stabilized AuNPs and the influence on their surface structure and the ratio of the existing facets were further investigated by lead underpotential deposition (Pb-UPD).

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	137/224





**Fig.4** Desorption voltammetric profiles of the different ligand-stabilized AuNPs, before (A) and after (B) ORR measurements, in 0.1 M NaOH and 1 mM  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  recorded under  $\text{N}_2$ -saturated recorded at  $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Typically, during the positive potential sweep, three stripping peaks corresponding to the lead layer desorption on the Au (111), (100) and (110) facets could be observed at around -0.7, -0.57, and -0.47 V, respectively.<sup>44,45</sup> Fig. 4A shows that AuNPs@Citrate mostly presents (100) symmetry whilst the surface sites of AuNPs@CTAB, AuNPs@PSS and AuNPs@MUA display (111) domains but with two peaks of different relative intensities and widths. The latter electrochemical analysis supports our hypothesis that binding energy shifts were associated with variations on the surface structure of the AuNPs due to the influence of the capping ligands.<sup>46</sup> Although the Au(111) surface is the most populated facet due to having the lowest surface energy, our results for AuNPs@Citrate agreed with Park et al., demonstrating that citrate chains also fit to the surfaces of Au(100) and Au(110) with the same configuration of van der Waals and hydrogen bond interactions that

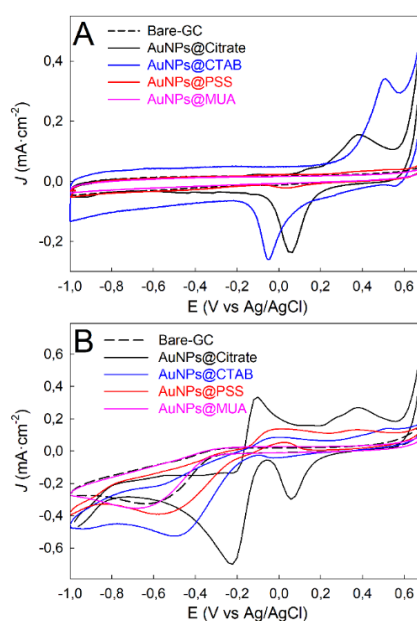
Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	138/224



Au(111) facets.<sup>38</sup> The obtained surface structure for AuNPs@CTAB was surprising, given that CTAB shows preferential adsorption on gold facets as:  $(100) \approx (110) > (111)$ .<sup>47</sup> Concerning AuNPs@MUA, Kumar et al. proposed that thiol derivatives preferentially bind onto the (111) planes because they provide the lowest surface energy among other facets,<sup>48</sup> whereas Chen et al. concluded the following sequence for thiol adsorption at different sites: corner > edge > (100) ~ (111) facets.<sup>49</sup> No reports are available for AuNPs@PSS to the best of our knowledge. According to our results PSS seemed to present preferential adsorption by facets (111).

### ORR analysis

Static and dynamic electrochemical studies were performed using the ORR as model to investigate the influence of the Au-ligand interface on their electrocatalytic properties.



**Fig. 5** CVs curves obtained for GC electrodes modified with different ligand-stabilized AuNPs in N<sub>2</sub>-saturated (A) and O<sub>2</sub>-saturated (B) 0.5 M KOH at 0.1 V·s<sup>-1</sup>.

Fig. 5A shows the electrochemical response of the Au-core under N<sub>2</sub>- saturated

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	139/224




conditions. AuNPs@MUA and AuNPs@PSS do not show the typical Au/AuOx redox process associated with AuNPs due to both steric and electronic effects of these capping ligands, which passivate the Au-surface. While the cathodic peak maximum of AuNPs@CTAB was located at -0.05 V that is approximately 0.1 V negatively shifted regarding AuNPs@Citrate. Fig. 5B includes the electrocatalytic effect of AuNPs in oxygen reduction processes. It should be noted that the intensities of the cathodic peaks as well as the onset potential of the O<sub>2</sub> reduction varied significantly with the capping ligands, demonstrating a clear dependence of the metal-ligand interface. This observation is consistent with the DPVs measurements (Fig. S3). Further insight of the ligand-capping effect on the electrocatalytic activity of AuNPs towards ORR were provided by analyzing the reaction kinetics properties using rotating-disk electrode voltammetry (RDV). A significant hysteresis between the initial forward- and the return-scan attributed to the different interaction between Au surfaces and dioxygen molecules was found, see Fig. S4.<sup>45</sup> Hysteresis has been reported to depend on several factors, such as: particle size, amount of loaded sample and applied potential range.

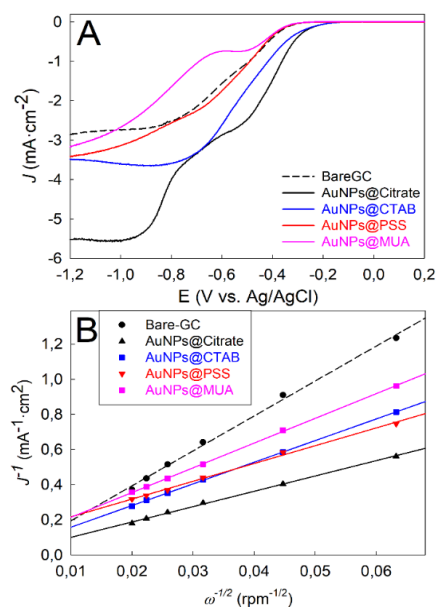
We provided herein experimental evidence on the dependence of hysteresis with the Au-ligand interface. The physicochemical process leading to the observed hysteresis is the of the capping ligand required for the dioxygen adsorption during the initial forward scan, which is highly dependent on the ligand type and bonding interaction with gold surface. Moreover, secondly, the limited current density at -1.0 V using the return scan for the kinetic analysis varies significantly according to the following order: AuNPs@Citrate > AuNPs@CTAB > AuNPs@PSS > AuNPs@MUA, obtaining values of -5.58, -3.64, -3.15, and -2.67 mA·cm<sup>-2</sup>, respectively (Fig. 6A).

The onset potential values were quite similar for the different ligand-stabilized AuNPs (Table 1). The passivation both the AuNPs and GC surfaces was confirmed by the lower resulting maximum current density at -1.00 V for AuNPs@MUA than for bare-GC. The striking influence of the ligand coating on the ORR electrocatalytic

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	140/224



performance was revealed by the comparatively higher differences in the obtained intensity values for AuNPs with different capping ligands than for varying size of the AuNPs, e. g., from 15 to 95 nm.<sup>45</sup>



**Fig. 6** (A) RDVs curves of GC electrodes modified with different ligand-stabilized AuNPs at same rotating rate of 2500 rpm. Scan rate: 10 mV·s<sup>-1</sup>. (B) Koutecky-Levich plots obtained from the RDVs in Fig. S4 at -1.00 V.

Table 1 summaries the kinetic parameters at -1.00 V for the different ligand-stabilized AuNPs obtained from Plots in Fig. S5 by applying the Koutecky-Levich (K-L) equations:

$$\frac{1}{J} = \frac{1}{J_L} + \frac{1}{J_K} = \frac{1}{B\omega^{1/2}} + \frac{1}{J_K} \quad (2)$$

$$J_K = nFkC_0 \quad (3)$$

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Página	141/224



where  $J$  is the measured current density,  $J_K$  and  $J_L$  are the kinetic and diffusion limiting current densities, respectively,  $\omega$  is the electrode rotation rate,  $n$  is the overall number of electrons transferred in oxygen reduction,  $F$  is the Faraday constant,  $C_0$  is the bulk concentration of  $O_2$  dissolved in the electrolyte ( $1.03 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 0.5 M KOH),  $D_0$  is the diffusion coefficient of  $O_2$  ( $1.63 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  for 0.5 M KOH),  $\nu$  is the kinematic viscosity of the electrolyte ( $0.01 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  for 0.5 M KOH), and  $k$  is the electron transfer rate constant during ORR.<sup>45</sup>  $B^*$  is a constant ( $2.76 \cdot 10^{-5} \text{ A} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{rpm}^{-1/2}$ ) that is the same for all the performed experiments. Fig. 6B shows the resulting K-L plots for all AuNPs samples, demonstrating first-order reaction kinetics toward dissolved oxygen due to the excellent linearity of the experimental points. Overall, the obtained values for  $n$ ,  $J_k$  and  $k$  during ORR decrease as a function of the capping ligand in the following order: AuNPs@Citrate > AuNPs@PSS ~ AuNPs@CTAB > AuNPs@MUA. Therefore, AuNPs coated with citrate ligand revealed as highly efficient electrocatalysts, whereas coating of the AuNPs with MUA ligands significantly decreased the electrocatalytic performance. directed by the sequence of each dipeptide and might be tuned by including the adequate residues.

$$B = 0.62nFC_0D_0^{2/3}\nu^{-1/6} = B^*n \quad (4)$$

**Table 1.** Kinetic parameters for ORR of the GC electrodes modified with different ligand-stabilized AuNPs at -1.00 V, obtained from Plots in Fig. S5.

ORR Kinetic parameters at -1.00 V	AuNPs@ Citrate	AuNPs @CTAB	AuNPs @PSS	AuNPs @MUA	Bare-GC
Onset potential (V)	-0.20	-0.20	-0.24	-0.24	-0.27
$n$	4.07	2.94*	3.57*	2.58*	1.82
$J_k$ ( $\text{mA} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	-115.2	-29.2	-8.7	-13.6	-2.2
$k$ ( $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ )	0.285	0.100	0.024	0.053	0.012

\* $n$  is an apparent value, please see comment in the main text.




The K-L equations model considers that, at high overpotential, the electrolytic process is controlled by mass transport (i.e.  $J_k$  tends to infinity), and therefore,  $J \sim J_L$ . Thus, the current density must show a plateau (i. e., a constant value and equal to  $J_L$ ) at high overpotential. The expected behaviour was clearly observed for Bare-GC and AuNPs@Citrate at  $E < -0.90$  V. However, AuNPs@CTAB, AuNPs@PSS and AuNPs@MUA displayed a different behavior, where the resulting current density monotonically increased for AuNPs@PSS and AuNPs@MUA, whilst it decreased for AuNPs@CTAB (Fig. 6A). As a consequence of this, the K-L equations model is not applicable to those systems probably due to the electrochemical processes are more complex than in the mentioned model. The calculation of the overall number of electrons transferred in oxygen reduction for these ligand-coated AuNPs cannot be made with the mentioned equations, and the  $n$  values might be considered as apparent, Table 1. This finding is supported by the crossing of the K-L plots for the CTAB, PSS and MUA ligand-stabilized AuNPs that can be considered as an inconsistency of the K-L model, given that no crossing is expected when the process is purely controlled by mass transport (i.e. at rotating conditions), see Fig. 6B. Additionally, Pb-UPD analysis after ORR measurements were performed on the different ligand-stabilized AuNPs (Figure 4B). Surprisingly, significant faceting transformation can be observed for AuNPs@Citrate with a clear tendency to acquire (111) symmetry, which is the one of the lowest surface energies.<sup>48</sup>

### HER analysis

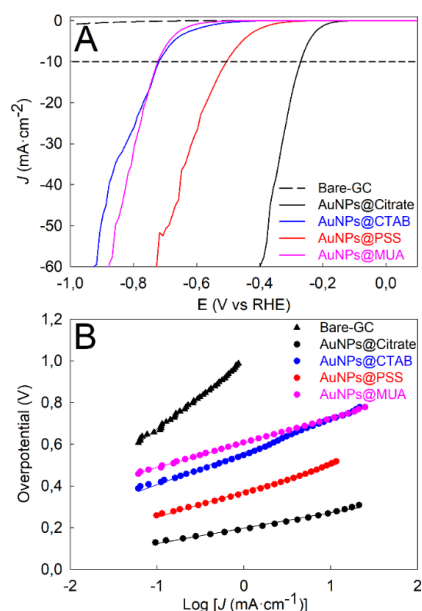
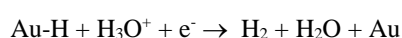
The influence of the capping ligands on the electrocatalytic properties of AuNPs for HER in  $N_2$ -saturated acidic solution was also assessed. Figure 7A shows the resulting linear sweep voltammograms (LSVs) for HER. Table 2 summaries the values of onset overpotential ( $\eta$ ), the  $\eta$  at 10 and 50  $mV \cdot cm^{-2}$  obtained from LSVs in Fig. 7A. An evident effect of the capping ligand can be observed for HER similarly to ORR, obtaining the best performance for the citrate-stabilized AuNPs. The Tafel slopes were calculated from Fig. 7B. The resulting overpotential ( $\eta$ ) at -10  $mV \cdot cm^{-2}$

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	143/224





<sup>2</sup> and Tafel slope values for AuNPs@Citrate were quite similar to those reported recently by Tran *et al.* for 350 $\mu$ g-Au-NPs-13nm/FTO electrode.<sup>43</sup> In addition, the obtained catalytic activity is only 2-fold lower than the best reported for a Pt-based electrocatalyst.<sup>50</sup> The mechanistic pathway in the HER process for the different ligand-stabilized AuNPs was examined by RDVs measurements (Fig. S6). The hydrogen evolution rate increases at the rotation rate of 1600 rpm, further confirming that for AuNPs-based catalysts the mass diffusion of proton is limiting stage, and thus, the Heyrovsky step may be the rate-determining step (RDS):<sup>51</sup>



**Fig. 7** (A) Linear sweep voltammograms (LSVs), without  $iR$ -correction, of GC electrodes modified with different ligand-stabilized AuNPs in  $\text{N}_2$ -saturated 0.5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Scan rate: 2  $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ , and (B) the resulting Tafel polarization plots.

Next, durability test of the different ligand-stabilized AuNPs was performed by

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	144/224



chronopotentiometry at a current density of  $-10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$  for 12 h.<sup>52</sup> As can be observed in Fig. S7A, in all cases the overpotential remained almost constant for 12 h, demonstrating the good electrochemical stability of AuNPs. In order to further confirm the good long-term stability of the different AuNPs toward HER, linear sweep voltammograms were performed after durability test. Fig. S7B shows that AuNPs not only maintained the electrocatalytic capabilities for AuNPs@CTAB and AuNPs@MUA, but also enhanced for AuNPs@Citrate and AuNPs@PSS. The latter improvement could be associated with the ligand loss during the long-term measurements because it was only observed for AuNPs with the weaker Au-ligand bonding interactions.

Finally, Turn Over Frequency (TOF) and Faradaic Efficiency (FE) values were calculated for AuNPs@Citrate. The resulting TOF value at  $-200 \text{ mV}$  was  $0.1 \text{ s}^{-1}$ , which was obtained from Fig. 7A and using the equation (5) that considers two electrons to produce one  $\text{H}_2$  molecule:<sup>52</sup>


$$\text{TOF} = J \cdot A / 2 \cdot F \cdot m \quad (5)$$

Where J is the current density at a given overpotential ( $\eta = -200 \text{ mV}$ ), A is the surface area of the electrode ( $0.2 \text{ cm}^2$ ), F is the Faraday constant (a value of  $96485 \text{ C/mol}$ ), and m is the number of mol of gold on the electrode ( $1.75 \cdot 10^{-8} \text{ mol de Au}$ ). Whilst to calculate the FE value for AuNPs@Citrate, chronoamperometry measurements at a constant potential ( $E = -270 \text{ mV}$ ) for two specific times were carried out, and the volumes of the generated hydrogen were measured by water displacement method.<sup>53</sup> Then, FE values were estimated by comparing the experimental volume of produced hydrogen with the theoretically calculated for the charge passed (e.g. considering a conversion of 100 %, 1 C should produce 0.116 mL of  $\text{H}_2$ ), using the following equation:

$$\text{FE} = 2 \cdot F \cdot n\text{H}_2 / Q \quad (6)$$

Where  $n\text{H}_2(\text{mol})$  is the total amount of hydrogen produced and  $Q(\text{C})$  is the total amount of charge passed through the cell. As it can be observed in Fig. S8, the resulting faradaic yield of AuNPs@Citrate for HER was nearly 100 %.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	145/224



### Post ORR and HER analysis

XPS analysis of the different ligand-stabilized AuNPs were performed after ORR and HER measurements (Fig. S9–S13). Overall, the oxidation state of gold cores does not vary after both cathodic processes, whilst the ligands display two different behaviours: On the one hand, AuNPs@Citrate and AuNPs@PSS (i.e. Au-O bonds) show significant loss of their respective surface coverage of ligands. And on the other hand, AuNPs@CTAB (i.e. Au-N bond) y AuNPs@MUA (i.e. Au-S bond) almost do not change. This difference can be attributed to the distinct bonding interaction forces between Au-core and each stabilizing ligand (i.e. Au-S and Au-N bonds are stronger than Au-O interactions).

**Table 2.** HER electrochemical parameters for HER of the GC electrodes modified with different ligand-stabilized AuNPs, obtained from Plots in Fig. 7.

HER activity	AuNPs@Citrate	AuNPs@CTAB	AuNPs@PSS	AuNPs@MUA
<b>Onset</b>				
<b>Overpotential</b>	-0.12	-0.40	-0.25	-0.47
<b><math>\eta</math> (V)</b>				
<b><math>\eta</math> (V) at 10 mV·cm<sup>-2</sup></b>	-0.27	-0.72	-0.50	-0.72
<b><math>\eta</math> (V) at 50 mV·cm<sup>-2</sup></b>	-0.37	-0.90	-0.69	-0.86
<b>Tafel slope (mV·dec<sup>-1</sup>)</b>	74	154	122	118

### Conclusions

For the first time ever, non-doped chemically synthesized AuNPs with suitable bi-functional electrocatalytic performance for ORR and HER was reported. The resulting catalytic parameters of AuNPs@Citrate were quite similar to the one obtained for another recently reported bifunctional electrocatalysts (see Table S1). In addition, the drastic influence of the Au-ligand interface on the electrocatalytic

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Página	146/224




performance for both cathodic reactions were demonstrated. Both the metal-ligand bonding interaction force and the degree of surface coverage are dependent parameters of the organic ligand type that affect not only to the available surface of metal for the reactant adsorption (e.g. O<sub>2</sub> and H<sup>+</sup> for ORR and HER, respectively) but also to facilitate the ligand displacement. Therefore, the capping ligand plays an important role on the resulting electrocatalytic performances of nanoparticles-based electrocatalysts. In this direction, the outstanding electrocatalytic properties of the AuNPs@Citrate towards ORR and HER reactions were attributed to the ability of this molecule to allow the efficient adsorption of O<sub>2</sub> and hydronium ions onto the nanoparticle's surfaces. The small dimensions of citrate molecules combined with both their weak attachment to the Au-cores and the high overall negative surface charge density may strongly increase the number of O<sub>2</sub> molecules and hydronium species at the electrochemical interfaces and in turn decrease the activation energy of the electrocatalytic processes. The chemical versatility of citrate is a weak binding ligand for allowing successful ligand exchange processes based on simple concentration gradients has been proven. The proposed procedure paves the way for exploring other organic and organic/inorganic ligand derivatives for tuning the electrocatalytic performance of bifunctional Au-cores. Our approach can be readily extrapolated to other metal-based nanocatalysts. Significant Au-faceting transformations on AuNPs can be observed after ligand exchange process and oxygen electroreduction reaction. This work suggests that easy, on-demand chemical functionalization of the metallic surface of nanostructures can finely adjust the electrocatalytic activity in renewable energy applications.

### Acknowledgements

Support from the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain is acknowledged through the MANA project CTQ2017-83961-R. J.J.G.-C. acknowledges the Ministry of Economy and Competitiveness for a “Ramon y Cajal” contract (#RyC-2014-14956). M. C. thanks the “Plan Propio de Investigación” from the Universidad de Córdoba (UCO) and the “Programa Operativo de fondos FEDER

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	147/224



Andalucía” for its financial support through a postdoctoral contract (Modality 5.2.A). The publication has been prepared with support from RUDN University Program 5-100. Rafael Luque gratefully acknowledges MINECO for funding project CTQ2016-78289-P, co-financed with FEDER funds. Enrique Rodríguez-Castellón acknowledges Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades of Spain for funding project RTI2018-099668-B-C22 and FEDER funds. Alain R. Puente-Santiago gratefully acknowledge MINECO for their research contracts associated to the aforementioned project, and to the Research Program of the UCO for its financial support through a postdoctoral contract (Modality 5.1).

### Notes and references

- 1 X. Yuan, L. Zhang, L. Li, H. Dong, S. Chen, W. Zhu, C. Hu, W. Deng, Z.-J. Zhao, J. Gong, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, **141**, 4791-4794.
- 2 J. H. Montoya, L. C. Seitz, P. Chakthranont, A. Vojvodic, T.F. Jaramillo, J. K. Nørskov, *Nat. Mat.*, 2017, **16**, 70-81.
- 3 Y. P. Zhu, C. Guo, Y. Zheng, S.-Z. Qiao, *Acc. Chem. Res.*, 2017, **50**, 915-923.
- 4 M. Shao, Q. Chang, J.-P. Dodelet, R. Chenitz, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 3594-3657.
- 5 X.-B. Han, X.-Y. Tang, Y. Lin, E. Gracia-Espino, S.-G. Liu, H.-W. Liang, G.-Z. Hu, X.-J. Zhao, H.-G. Liao, Y.-Z. Tan, T. Wagberg, S.-Y. Xie, L.-S. Zheng, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, **141**, 232-239.
- 6 C. L. Bentley, M. Kang, P. R. Unwin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, **141**, 2179-2193.
- 7 J.-C. Dong, X.-G. Zhang, X. Jin, J. Yang, S. Chen, Z.-L. Yang, D.-Y. Wu, J. M. Feliu, C. T. Williams, Z.-Q. Tian, J.-F. Li, *Nat. Energy*, 2019, **4**, 60-67.
- 8 A. M. Gómez-Marín, J. M. Feliu, E. Ticianelli, *ACS Catal.*, 2019, **9**, 2238-2251.
- 9 K. Kusada, D. Wu, T. Yamamoto, T. Toriyama, S. Matsumura, W. Xie, M. Koyama, S. Kawaguchi, Y. Kubotag, H. Kitagawa, *Chem. Sci.*, 2019, **10**, 652-656.
- 10 L. Bu, Q. Shao, B. E. J. Guo, J. Yao, X. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 9576-9582.
- 11 B. Wu, N. Zheng, *Nano Today*, 2013, **8**, 168-197.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	148/224



- 12 R.-Y. Zhong, K.-Q. Sun, Y.-C. Hong, B.-Q. Xu, *ACS Catal.*, 2014, **4**, 3982-3993.
- 13 L. Lu, S. Zou, Y. Zhou, J. Liu, R. Li, Z. Xu, L. Xiao, J. Fan, *Catal. Sci. Technol.*, 2018, **8**, 746-754.
- 14 E. L. Clark, S. Ringe, M. Tang, A. Walton, C. Hahn, T. F. Jaramillo, K. Chan, A. T. Bell, *ACS Catal.*, 2019, **9**, 4006-4014.
- 15 T. Su, Q. Shao, Z. Qin, Z. Guo, Z. Wu, *ACS Catal.*, 2018, **8**, 2253-2276.
- 16 K. O. Aruda, M. Tagliacucchi, C. M. Sweeney, D. C. Hannah, E. A. Weiss, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 7441-7449.
- 17 W. Lewandowski, M. Fruhnert, J. Mieczkowski, C. Rockstuhl, E. Górecka, *Nat. Commun.*, 2015, **6**, 6590.
- 18 P. Sonström, D. Arndt, X. Wang, V. Zielasek, M. Bäumer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 3888-3891.
- 19 S. Elbasuney, *Appl. Surf. Sci.*, 2017, **409**, 438-447.
- 20 S. Zhou, D. Huo, S. Goines, T.-H. Yang, Z. Lyu, M. Zhao, K. D. Gilroy, Y. Wu, Z. D. Hood, M. Xie, Y. Xia, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 11898-11901.
- 21 Z.-Y. Zhou, X. Kang, Y. Song, S. Chen, *J. Phys. Chem. C*, 2012, **116**, 10592-10598.
- 22 B. Genorio, R. Subbaraman, D. Strmcnik, D. Tripkovic, V. R. Stamenkovic, N. M. Markovic, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 5468-5472.
- 23 P. N. Duchesne, Z. Y. Li, C. P. Deming, V. Fung, X. Zhao, J. Yuan, T. Regier, A. Aldalbahi, Z. Almarhoon, S. Chen, D.-e. Jiang, N. Zheng, P. Zhang, *Nat. Mat.*, 2018, **17**, 1033-1039.
- 24 M. Babucci, C.-Y. Fang, J. E. Perez-Aguilar, A. S. Hoffman, A. Boubnov, E. Guan, S. R. Bare, B. C. Gates, A. Uzun, *Chem. Sci.*, 2019, **10**, 2623-2632.
- 25 F. P. Da Silva, J. L. Fiorio, L. M. Rossi, *ACS Omega*, 2017, **2**, 6014-6022.
- 26 L. Jin, B. Liu, S. S. Duay, J. He, *Catalysts*, 2017, **7**, 44.
- 27 Y. Zhao, L. Tao, W. Dang, L. Wang, M. Xia, B. Wang, M. Liu, F. Gao, J. Zhang, Y. Zhao, *Small*, 2019, **15**, 1900288.
- 28 M. Guo, H. Li, Y. Ren, X. Ren, Q. Yang, C. Li, *ACS Catal.*, 2018, **8**, 6476-6485.
- 29 G. Chen, C. Xu, X. Huang, J. Ye, L. Gu, G. Li, Z. Tang, B. Wu, H. Yang, Z.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	149/224




- Zhao, Z. Zhou, G. Fu, N. Zheng, *Nat. Mat.*, 2016, **15**, 564-569.
- 30 J. Zhang, L. D. Ellis, B. Wang, M. J. Dzara, C. Sievers, S. Pylypenko, E. Nikolla, J. W. Medlin, *Nat. Catal.*, 2018, **1**, 148-155.
- 31 Z. W. Seh, J. Kibsgaard, C. F. Dickens, I. Chorkendorff, J. K. Nørskov, T. F. Jaramillo, *Science*, 2017, **355**, eaad4998.
- 32 D. Mukherjee, P. M. Austeria, S. Sampath, *ACS Appl. Energy Mater.*, 2018, **1**, 220-231.
- 33 S. Ghosh, R. N. Basu, *Nanoscale*, 2018, **10**, 11241-11280.
- 34 J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.*, 1951, 55-75.
- 35 D. Alba-Molina, D. Rodríguez-Padrón, A. R. Puente-Santiago, J. J. Giner-Casares, M. T. Martín-Romero, L. Camacho, L. O. Martins, M. J. Muñoz-Batista, M. Cano, R. Luque, *Nanoscale*, 2019, **11**, 1549-1554.
- 36 N. G. Bastús, J. Comenge, V. Puentes, *Langmuir*, 2011, **27**, 11098-11105.
- 37 C. M. Cova, A. Zuliani, A. R. Puente Santiago, A. Caballero, M. J. Muñoz-Batista, R. Luque, *J. Mater. Chem. A*, 2018, **6**, 21516-21523.
- 38 J.-W. Park, J. S. Shumaker-Parry, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 1907-1921.
- 39 J. G. Mehtala, D. Y. Zemlyanov, J. P. Max, N. Kadasala, S. Zhao, A. Wei, *Langmuir*, 2014, **30**, 13727-13730.
- 40 B. M. Amoli, S. Gumfekar, A. Hu, Y. N. Zhou, B. Zhao, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 20048-20056.
- 41 L. Su, S. Hu, L. Zhang, Z. Wang, W. Gao, J. Yuan, M. Liu, *Small*, 2017, **13**, 1602809.
- 42 M. Murdoch, G. Waterhouse, M. A. Nadeem, J. B. Metson, M. A. Keane, R. F. Howe, J. Llorca, H. Idriss, *Nat. Chem.*, 2011, **3**, 489-492.
- 43 T. D. Tran, M. T. T. Nguyen, H. V. Le, D. N. Nguyen, Q. D. Truong, P. D. Tran, *Chem. Commun.*, 2018, **54**, 3363-3366.
- 44 F. Lu, Y. Zhang, S. Liu, D. Lu, D. Su, M. Liu, Y. Zhang, P. Liu, J. X. Wang, R. R. Adzic, O. Gang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 7310-7317.
- 45 D. Alba-Molina, A. R. Puente Santiago, J. J. Giner-Casares, M. T. Martín-

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHVMVHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHVMVHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHVMVHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	150/224



- Romero, L. Camacho, R. Luque, M. Cano, *J. Phys. Chem. C*, 2019, 123, 9807-9812.
- 46 H. Al-Johani, et al. *Nat. Chem.*, 2017, **9**, 890-895.
- 47 J. Pérez-Juste, I. Pastoriza-Santos, L. M. Liz-Marzán, P. Mulvaney, *Coord. Chem. Rev.*, 2005, **249**, 1870-1901.
- 48 J. Kumar, K. G. Thomas, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2011, **2**, 610-615.
- 49 H. Cheng, L. Yang, Y. Jiang, Y. Huang, Z. Sun, J. Zhang, T. Hu, Z. Pan, G. Pan, T. Yao, Q. Bian, S. Wei, *Nanoscale*, 2013, **5**, 11795-11800.
- 50 Z. Chen, D. Cummins, B. N. Reinecke, E. Clark, M. K. Sunkara, T. F. Jaramillo, *Nano Lett.*, 2011, **11**, 4168-4175.
- 51 C. Costentin, M. Robert, J.-M. Savéant, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, PR1-PR40.
- 52 F. Song, X. Hu, *Nat. Commun.*, 2014, **5**, 4477-4486.
- 53 Z. Huang, Z. Chen, Z. Chen, C. Lv, M. G. Humphrey, C. Zhang, *Nano Energy*, 2014, **9**, 373-382.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	151/224





## Supporting Information

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	152/224



**ELECTRONIC SUPPLEMENTARY INFORMATION**  
**Tailoring ORR and HER electrocatalytic performances of gold nanoparticles through metal-ligand interfaces**

David Alba-Molina,<sup>a</sup> Alain R. Puente Santiago,<sup>bc</sup> Juan J. Giner-Casares,<sup>\*a</sup> Enrique Rodríguez-Castellón,<sup>d</sup> María T. Martín-Romero,<sup>a</sup> Luis Camacho,<sup>a</sup> Rafael Luque,<sup>\*be</sup> and Manuel Cano<sup>\*a</sup>

<sup>a</sup>Department of Physical Chemistry and Applied Thermodynamics, University Institute of Nanochemistry (IUNAN), University of Córdoba (UCO), Campus Universitario de Rabanales, Ed. Marie Curie, Córdoba, Spain E-14014. E-mail: jjginer@uco.es; q82calum@uco.es.


<sup>b</sup>Department of Organic Chemistry, IUNAN, UCO, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Marie Curie, Córdoba, Spain E-14014. E-mail: q62alsor@uco.es.

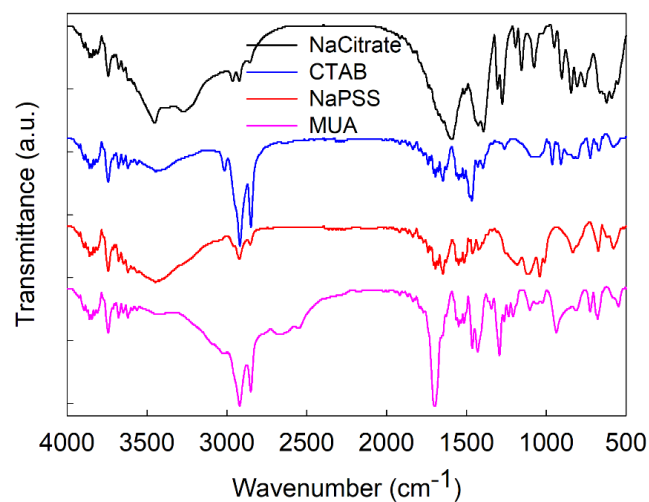
<sup>c</sup>Department of Chemistry, University of Texas at El Paso, 500 W. University Avenue, El Paso, Texas 79968, United States.

<sup>d</sup>Department of Inorganic Chemistry, Crystallography and Mineralogy, Faculty of Sciences University of Málaga, Málaga, Spain.

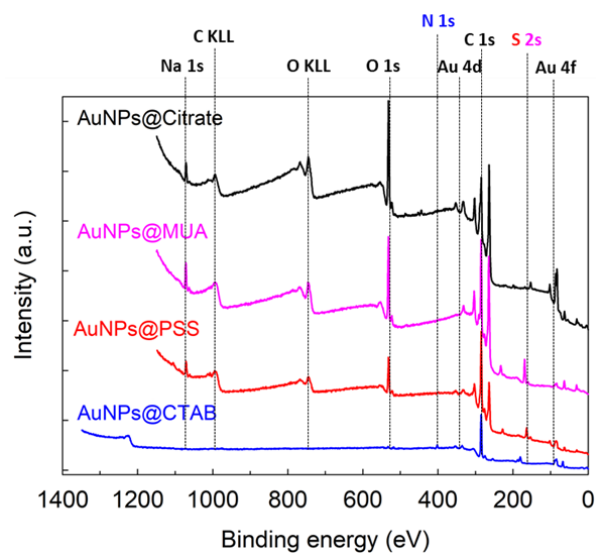
<sup>e</sup>Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6 Miklukho-Maklaya str., Moscow, Russia.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	153/224





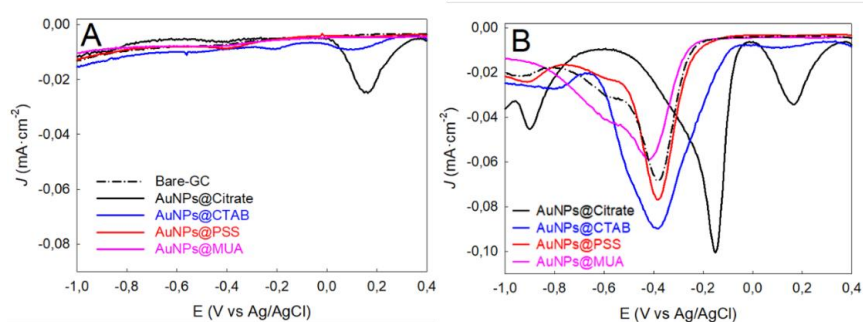
**Fig. S1** FTIR spectra of the four pure ligands used in this work.



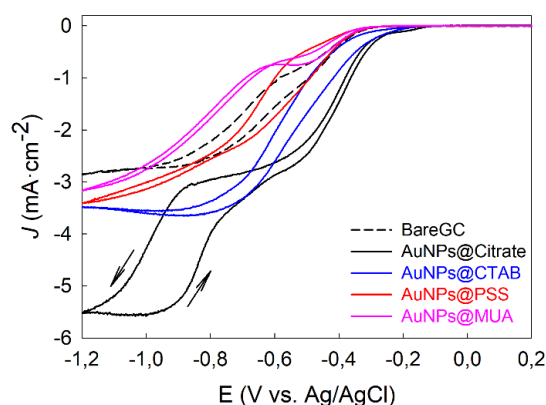
**Fig. S2** XPS survey spectra of the different ligand-stabilized AuNPs on ITO.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	154/224





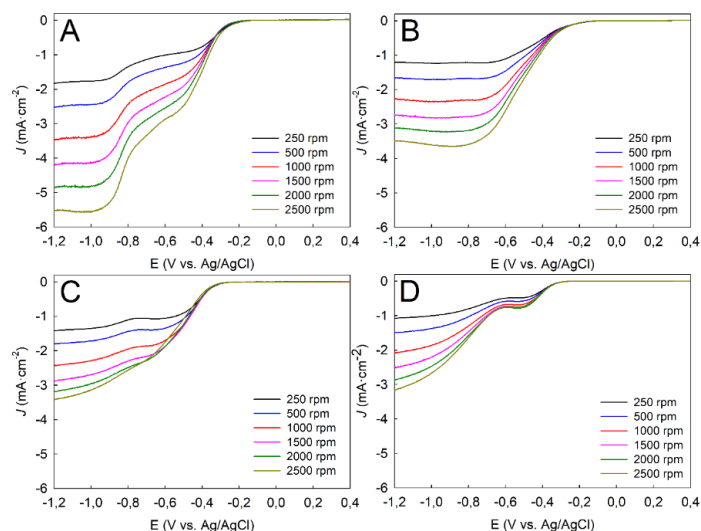
**Fig. S3** DPVs curves obtained for GC electrodes modified with different ligand-stabilized AuNPs in  $N_2$ -saturated (A) and  $O_2$ -saturated (B) 0.5 M KOH at  $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ .



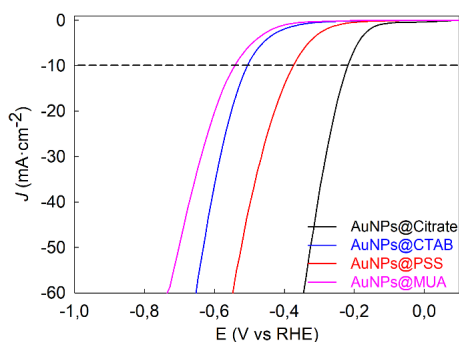
**Fig. S4** Hysteresis effect during measurements with rotating disk electrode of GC electrodes modified with different ligand-stabilized AuNPs at same rotating rate of 2500 rpm. Scan rate:  $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	155/224





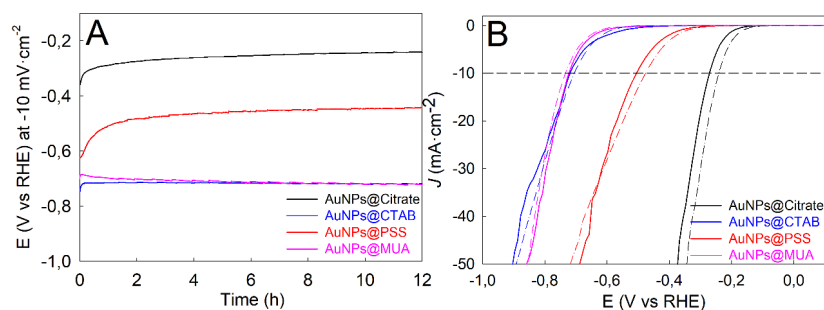
**Fig. S5** Rotating-disk voltammograms for AuNPs@Citrate (A), AuNPs@CTAB (B), AuNPs@PSS (C) and AuNPs@MUA (D) modified GC electrodes at different rotation rates in  $O_2$ -saturated 0.5 M KOH. Scan rate  $10 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .



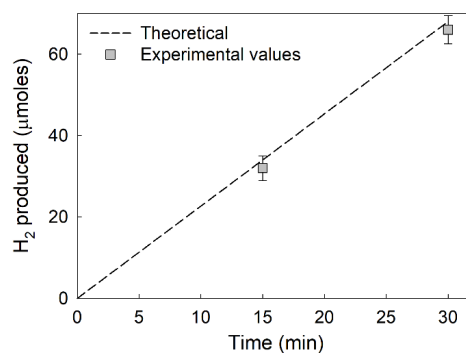
**Fig. S6** Linear sweep voltammograms, without  $iR$ -correction, of GC electrodes modified with different ligand-stabilized AuNPs in  $N_2$ -saturated 0.5 M  $H_2SO_4$  at rotation rate of 1600 rpm. Scan rate:  $2 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	156/224





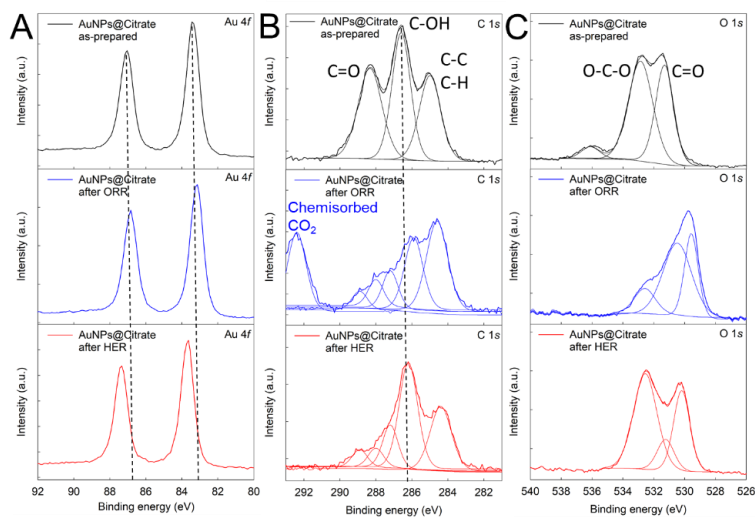
**Fig. S7** (A) Chronopotentiometry measurements at  $J = -10 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$  for the different ligand-stabilized AuNPs. (B) LSV curves, without iR-correction, of the different ligand-stabilized AuNPs before (solid lines) and after (dash-dotted lines) the long-term stability test.



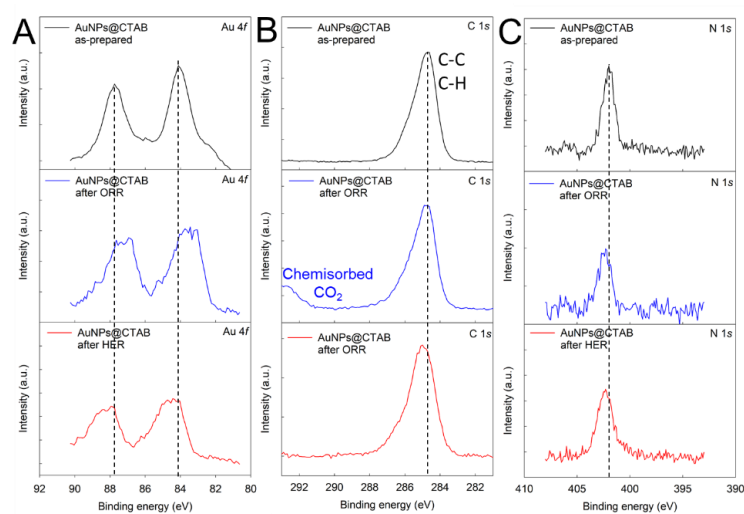
**Fig. S8** Faradaic efficiency plot of AuNPs@Citrate for HER at  $-270 \text{ mV}$  (E vs. RHE).

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	157/224



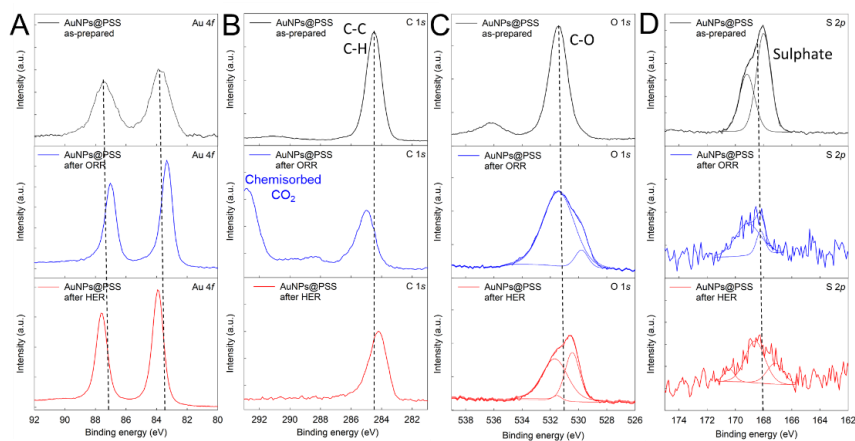


**Fig. S9** High-resolution XPS spectra of Au 4f (A), C 1s (B) and O 1s (C) for AuNPs@Citrate, before and after ORR and HER measurements.

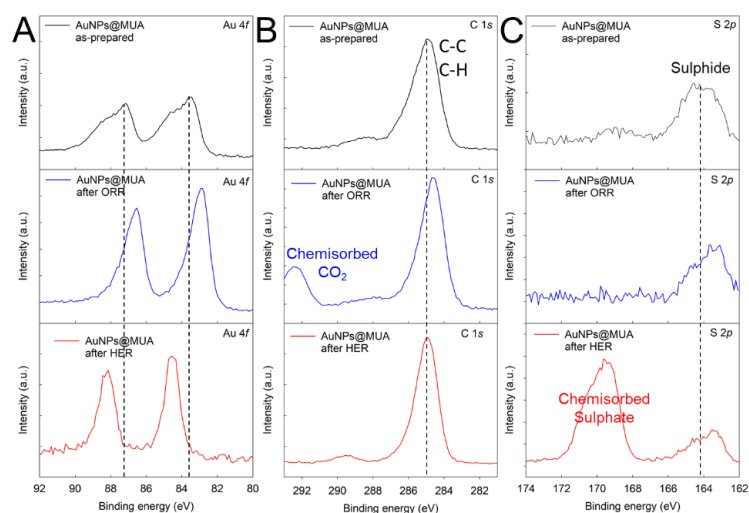


**Fig. S10** High-resolution XPS spectra of Au 4f (A), C 1s (B) and N 1s (C) for AuNPs@CTAB, before and after ORR and HER measurements.



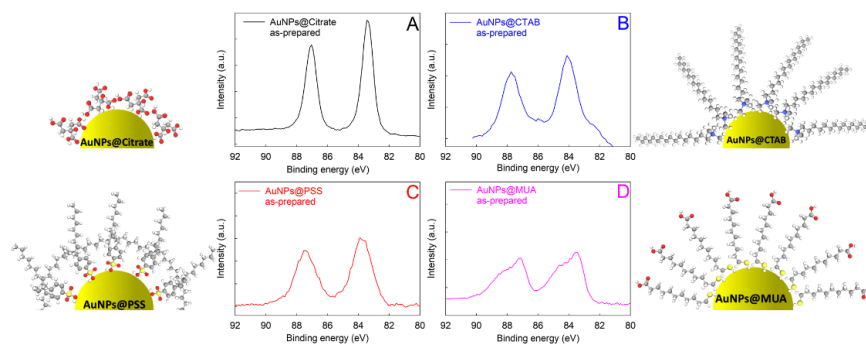


**Fig. S11** High-resolution XPS spectra of Au 4*f* (A), C 1*s* (B), O 1*s* (C) and S 2*p* (D) for AuNPs@PSS, before and after ORR and HER measurements.



**Fig. S12** High-resolution XPS spectra of Au 4*f* (A), C 1*s* (B) and S 2*p* (C) for AuNPs@MUA, before and after ORR and HER measurements.





**Fig. S13** High-Resolution XPS spectra of Au 4f for AuNPs@Citrate (A), AuNPs@CTAB (B), AuNPs@PSS (C) and AuNPs@MUA (D), including schematic representation of the spatial distribution of each capping ligand on AuNPs surface (not drawn to scale).

**CTAB** → Cetyltrimethylammonium Bromide

**PSS** → Polystyrene Sodium Sulfonate

**MUA** → 11-Mercaptoundecanoic acid

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	160/224



Table S1. Summary of the ORR and HER performance of recently reported bi-functional electrocatalysts.

Catalyst <sup>a</sup>	Substrate	Mass density (mg/cm <sup>2</sup> )	Reaction	$\eta_{\text{onset}}$ (V)	Tafel slope (mV/dec)	$J_{\text{air}}^b$ (mA/cm <sup>2</sup> )	Overpotential	Electrolyte	Ref.
Au@Pd <sub>1.0</sub>	GCE (vs RHE)	101.90	ORR	0.93	68.10	4.91	-	0.1 M KOH	S1
Au@Pd <sub>1.0</sub>	GCE (vs RHE)	0.36	HER	-0.29	66.00	-	0.116 V at 20 mA/cm <sup>2</sup>	0.5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	S1
NCN-1000-5	RDE (vs RHE)	0.20	ORR	0.95	86.00	6.43	-	0.1 M KOH	S2
NCN-1000-5	RDE (vs RHE)	0.20	HER	-0.03	43.00	-	0.090 V at 10 mA/cm <sup>2</sup>	0.5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	S2
CoSAs/PTFs-600	RRDE (vs RHE)	-	ORR	0.88	57.00	6.14	-	0.1 M KOH	S3
CoSAs/PTFs-600	RRDE (vs RHE)	-	HER	-0.02	50.00	-	0.094 V at 10 mA/cm <sup>2</sup>	0.5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	S3
Co <sub>1-x</sub> S/NC	RRDE (vs RHE)	0.20	ORR	-	70.80	-	-	0.1 M KOH	S4
Co <sub>1-x</sub> S/NC	RRDE (vs RHE)	0.20	HER	-0.03	71.00	-	0.073 V at 10 mA/cm <sup>2</sup>	0.5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	S4
Mo <sub>2</sub> C@NC nanomesh	RDE (vs RHE)	0.50	ORR	1.00	50.10	4.50	-	0.1 M KOH	S5
Mo <sub>2</sub> C@NC nanomesh	RDE (vs RHE)	0.50	HER	-0.02	33.70	-	0.036 V at 10 mA/cm <sup>2</sup>	-	S5

<sup>a</sup>The most proficient version of the electrocatalysts.


<sup>b</sup>Diffusion-limiting current density.



**References**

- S1 J.-D. Yi, R. Xu, Q. Wu, T. Zhang, K.-T. Zang, J. Luo, Y.-L. Liang, Y.-B. Huang, R. Cao. *ACS Energy Lett.*, 2018, **3**, 883-889.
- S2 Z. Zong, K. Xu, D. Li, Z. Tang, W. He, Z. Liu, X. Wang, Y. Tian. *J. Catal.*, 2018, **361**, 168-176.
- S3 J.-D. Yi, R. Xu, G.-L. Chai, T. Zhang, K. Zang, B. Nan, H. Lin, Y.-L. Liang, J. Lv, J. Luo, R. Si, Y.-B. Huang, R. Cao. *J. Mater. Chem. A*, 2019, **7**, 1252-1259.
- S4 J. Ding, S. Ji, H. Wang, B. G. Pollet, R. Wang. *ChemCatChem*, 2019, **11**, 1026-1032.
- S5 Z. Cheng, Q. Fu, Q. Han, Y. Xiao, Y. Liang, Y. Zhao, L. Qu. *Adv. Funct. Mat.*, 2018, **28**, 1705967.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	162/224





Nanoscale



Received 25th July 2018,  
Accepted 18th December  
2018

DOI: 10.1039/c8nr06001k

## Mimicking the bioelectrocatalytic function of recombinant CotA laccase through electrostatically self-assembled bioconjugates

David Alba-Molina,<sup>a</sup> Daily Rodríguez-Padrón,<sup>b</sup> Alain R. Puente-Santiago,<sup>b\*</sup> Juan J. Giner-Casares,<sup>a</sup> María T. Martín-Romero,<sup>a</sup> Luis Camacho,<sup>a</sup> Lúgia O. Martins,<sup>c</sup> Mario J. Muñoz-Batista,<sup>b</sup> Manuel Cano<sup>a\*</sup> and Rafael Luque<sup>b, d\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química Física y T. Aplicada, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica IUIQFN, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Ed. Marie Curie, E-14071 Córdoba, Spain. Email: q82calum@uco.es

<sup>b</sup>Departamento de Química Orgánica, Instituto Universitario de Investigación en Química Fina y Nanoquímica IUIQFN, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Ed. Marie Curie, E-14071 Córdoba, Spain. Email: rafael.luque@uco.es, z02pusaa@uco.es

<sup>c</sup>Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade Nova de Lisboa Av da Republica, 2780-157, Oeiras, Portugal.

<sup>d</sup>Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), 6 Miklukho-Maklaya str., 117198, Moscow, Russia

### Corresponding Authors

\*jginer@uco.es, q82calum@uco.es

Unprecedented 3D nanobiosystems composed of recombinant CotA laccases and citrate-stabilised gold nanoparticles have been successfully achieved by an electrostatic self-assembly strategy. The bioelectrochemical reduction of O<sub>2</sub> driven by CotA laccase at the spore coat was mimicked. Consequently, key insights of its bioelectrocatalytic function were unravelled.

The hierarchical arrangement of multiple building blocks to form complex structures with specific functionalities, from well-ordered protein aggregates to more sophisticated nanomachines like nucleosomes and ribosomes, is often observed in Nature.<sup>1-5</sup> Such well-organized biological structures can be found performing vital

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Página	163/224



functions in the cells such as protein synthesis, genome packing, cellular structural support, information storage and regulation of metabolic reactions.<sup>6,7</sup> As a result, the building of artificial self-assembled nanostructures to mimic the function of natural systems has become an attractive research topic in the last years.<sup>8</sup>

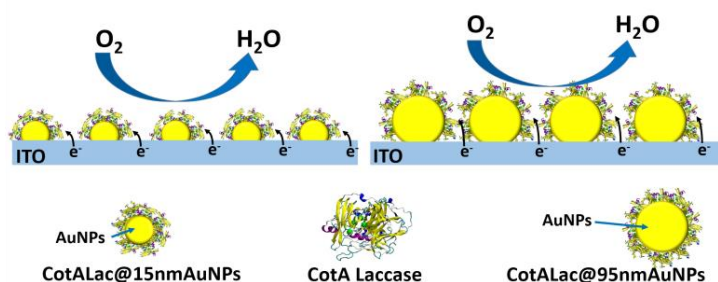
Recent advances in supramolecular and synthetic chemistry have triggered the development of useful techniques towards the design of new artificial biomaterials with unique properties.<sup>9-13</sup> Up to now, a wide range of strategies have been developed to construct well-organized nanostructures from the self-assembly of nanoparticles and proteins as principal building blocks for a myriad of applications such as drug delivery,<sup>14</sup> drugs design<sup>15</sup> and biocatalysis.<sup>16</sup> With this aim, electrostatic self-assembly has been successfully used to achieve CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates<sup>17</sup> and protein-ArgNPs superstructures,<sup>18</sup> among others.<sup>19,20</sup>

Multicopper oxidases (MCOs) are a family of metalloenzymes that couple the one-electron oxidation of a variety of substrate molecules, both inorganic and organic, to with four-electron reduction of dioxygen to water. These enzymes are distinguished by having three distinct copper sites, Cu types 1, 2 and 3; the oxidation of the reducing substrate occurs at the type 1 (T1) Cu site while the reduction of O<sub>2</sub> occurs at the T2/T3 trinuclear cluster. Specifically, CotA laccase, is a bacterial MCO that is abundant in outer coat layer of spores of the soil bacterium *Bacillus subtilis*.<sup>21</sup> Spores are cellular structures designed to resist a wide-range of physical-chemical extremes such as wet and dry heat, desiccation, radiation and UV light. Although CotA-laccase exact function within the spore coat is still not fully understood, it was proposed its involvement in the formation of the spore brown pigment that contribute to spore resistance against UV-light and hydrogen peroxide.<sup>22</sup> Particularly, it has been shown that spore coat components of marine *Bacillus* species promote, using molecular oxygen, the oxidation of Mn<sup>2+</sup> by a biologically catalysed process.<sup>23</sup> Consequently, the analysis of the bioelectrochemical oxygen reduction processes on 3D-nanobiomimetic systems composed of recombinant CotA laccases and AuNPs can shed light over the catalytic function of these metalloenzymes in spore coat. The

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	164/224



aforementioned systems are taking a core-shell configuration where enzymes are disposed along the nanoparticles surfaces that in turn simulate the spore coat shape. In this work, the recombinant CotA laccase was electrostatically attached to citrate-stabilised AuNPs of 15 nm and 95 nm, respectively, at physiological pH using a simple one-pot electrostatic self-assembly approach (Scheme 1).



**Scheme 1.** Overview of the direct bioelectrocatalytic reduction of oxygen by the electrostatically self-assembled nanobioconjugates.

To the best of our knowledge, this is the first time that the bioelectrocatalytic function of CotA laccase is mimicked by electrically active 3D nanobioarchitectures and linked to the nanoparticles size, ionic environment and temperature effects.

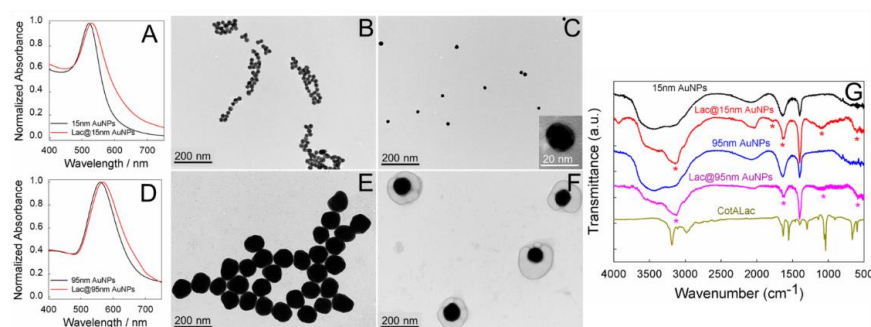
The isoelectric point (pI) of the CotA laccase is 7.7<sup>24</sup> and the overall charge of the enzyme surface is positive at neutral pH, which facilitates its electrostatic anchorage onto the negatively charged citrate groups of the AuNPs. Indeed, citrate groups can provide not only suitable 3-D platforms for tethering enzymes, but also a flexible linker to trigger the electronic communication between the redox biomolecules and the gold nanoparticles.<sup>25</sup> Additionally, the electrostatic self-assembly was achieved from solution allowing thus the full coverage of the nanoparticles. This strategy differs from previous reports where laccases were immobilised onto AuNP-covered electrodes.<sup>26</sup> UV-vis measurements were carried out to determine the effects of the enzyme immobilization on the surface plasmon resonance (SPR) bands of the gold nanoparticles.

Figure 1A,D displays the UV-vis spectra of the unbonded AuNPs as well as the

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	165/224



corresponding electrostatically assembled bioconjugates CotALac@15nmAuNPs and CotALac@95nmAuNPs. It can be noted a slight shift of the SPR bands of both AuNPs from 600 nm to 610 nm upon the immobilization process. These results indicate a change in the dielectric nature surrounding of the metal surface nanoparticles driven by the possible salt-bridges mediated interactions (i.e. combination of two non-covalent interactions: hydrogen- and ionic-bonding) between AuNPs and enzymes as well as the maintenance of a relatively good dispersity of the nanoparticles.<sup>27</sup> The similar wavelength up-shifts observed for both bioconjugates suggest a similar protein layer thickness surrounding the nanoparticles surfaces. The absence of agglomeration and the efficient enzyme coating after bioconjugation were confirmed by TEM analysis (Fig. 1 B-F). The resulting TEM images of the particles, before and after the electrostatic self-assembly process, showed no variation in Au-core size and shape but with a significant variation in their protein-corona, which was especially evident in CotALac@95nmAuNPs (Fig. 1F).



**Fig. 1.** (A) UV-visible spectra of 15nmAuNPs and its bioconjugate CotALac@15nmAuNPs. (B and C) TEM images of 15nmAuNPs and its bioconjugate CotALac@15nmAuNPs, respectively. (D) Same as (A) but for 95nmAuNPs. (E and F) TEM images of 95nmAuNPs and its bioconjugate CotALac@95nmAuNPs, respectively. (G) FTIR spectra of 15nmAuNPs (black line), CotALac@15nmAuNPs (red line), 95nmAuNPs (blue line), CotALac@95nmAuNPs (pink line), and CotALac (dark-yellow line).

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY	Página	166/224



The immobilization of CotA laccase was confirmed by FT-IR (Figure 1G). AuNPs, with both 15 nm and 95 nm particle sizes, showed the typical carboxylate bands of the citrate coating, such as asymmetric C=O stretching ( $1641\text{ cm}^{-1}$ ) and symmetric C-O stretching ( $1400\text{ cm}^{-1}$ ).<sup>28</sup> FT-IR spectra of CotALac@15nmAuNPs and CotALac@95nmAuNPs exhibited the presence of amide I vibrations (C=O stretch and C-N in-plane bending) overlapped with carboxylate ones. The appearance of a double peak ( $1639$  and  $1619\text{ cm}^{-1}$ ) can be attributed to C=O stretching from Amide I and asymmetric C=O stretching from carboxylate groups, respectively. On the other hand, significance changes in intensity of the peak at  $1400\text{ cm}^{-1}$  can be assigned to a combination of C-N in-plane bending from Amide I and symmetric C-O stretching from carboxylate groups.<sup>29</sup> Also, both bioconjugates presented C-O-C ( $1102\text{ cm}^{-1}$ ) and C-C ( $600\text{ cm}^{-1}$ ) stretching modes observed in pristine CotA laccase spectra. These observations clearly confirmed the presence of CotA laccase in the coating. Surprisingly, amide II band of the CotA laccase, which is located at  $1554\text{ cm}^{-1}$ , disappeared upon the immobilization step for both bioconjugates suggesting the existence of an interaction between the N-H groups of the enzymes and the carboxylate groups of the citrate capped AuNPs.<sup>30</sup> Although the amide I band contribution of both bioconjugates retained the same positions in comparison to the free-CotA laccase, the absence of the amide II bands clearly suggest that the enzymes underwent slight conformational changes due to the salt-bridges interactions between the carboxylate groups of the citrate-stabilized AuNPs and the amine and/or quaternary ammonium groups of the CotALaccase.<sup>30</sup>

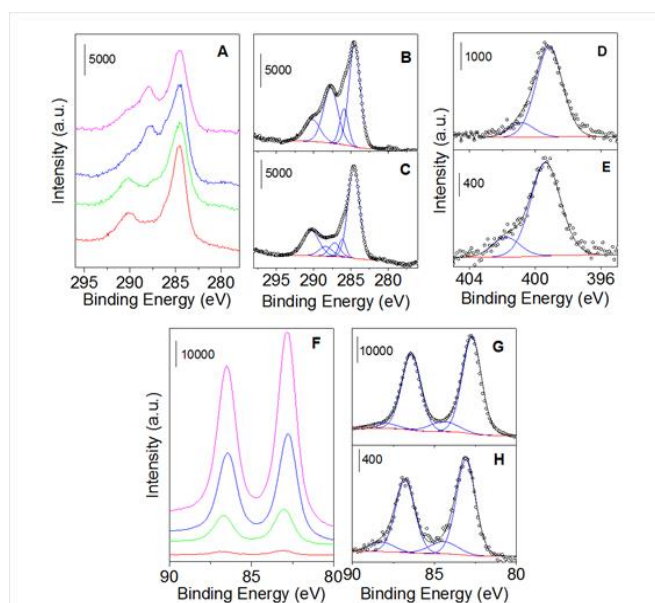
The formation of both bioconjugates was also monitored by Dynamic Light Scattering (DLS) and Zeta-Potential (ZP) measurements (Table S1). As it was expected for the electrostatic adsorption of enzyme molecules to AuNPs surface, DLS analysis showed an increase in the hydrodynamic diameters (HD) of the particles after bioconjugation. Considering the given HD of the CotALac and assuming a slight variation of the hydration shell of the AuNPs, the resulting bioconjugate volumes indicate both, the formation of a monolayer of CotA laccase molecules and the absence of aggregation during the self-assembly process. In

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	167/224





addition, ZP analysis displayed a decrease of the surface charge of the particles after bioconjugation. A similar behaviour was recently reported after conjugation of *Rhus vernicifera* laccase to negatively charged AuNPs by using a non-covalent binding approach.<sup>31</sup>



**Fig. 2.** (A) XPS spectra of the prepared bioconjugates for C1s; Deconvoluted high-resolution C1s XPS spectra of (B) 95nmAuNPs and (C) CotALac@15nmAuNPs; Deconvoluted high-resolution N1s XPS spectra of (D) CotALac@95nmAuNPs and (E) CotALac@15nmAuNPs; (F) XPS spectra of the prepared bioconjugates for Au4f, Deconvoluted high-resolution Au4f XPS spectra of (G) CotALac@95nmAuNPs and (H) CotALac@15nm AuNPs 95nm AuNPs (pink line), 15nmAuNPs (blue line), CotALac@95nmAuNPs (green line) and CotALac@15nmAuNPs (red line).

XPS measurements were performed in order to fully understand the chemical properties of the prepared nanomaterials, as well as, to corroborate the successful protein immobilization on the nanoparticles surface. The obtained spectra revealed

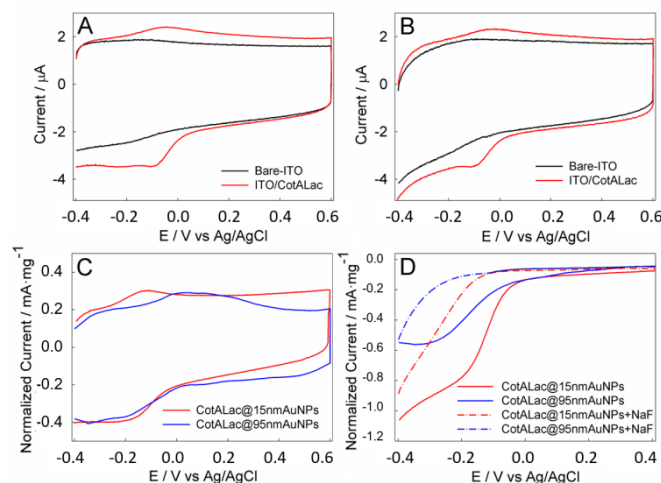
Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	168/224



the presence of C, Au and O for all the samples. Particularly, XPS analysis of the protein modified materials showed a band around 399 eV, which can be assigned to N1s, confirming the effectiveness of the functionalization process. N1s spectra of both CotALac@95nmAuNPs and CotALac@15nmAuNPs (Figure 2D-E) displayed two contributions associated to N from peptide bonds and pyrimidinic groups. In addition, not Au–N coordination was observed, since it is well known that N1s binding energy decreases by 1–3 eV upon binding to metallic surfaces due to a transfer of electron density from nitrogen to metals.<sup>32</sup> Deconvoluted high-resolution C1s XPS spectrum of 15nmAuNPs (Figure 2B) exhibited four well-defined contributions at 284.6, 285.9, 287.9 and 290.2 eV, which can be attributed to C-C/C=C, CH<sub>2</sub>-COH, COO-(Au) and COO-(H), respectively. In turn, C1s XPS spectrum of CotALac@15nmAuNPs (Figure 2C) can be deconvoluted in five peaks at 284.6, 286.2, 287.2, 288.1 and 290.3 eV, related to C-C/C=C, CH<sub>2</sub>-COH, C-N, COO-(Au) and COO-(H), respectively.<sup>25</sup> Specially, the band at 287.2 eV corroborated the successful protein immobilization. It is also worth to mention that the relative intensity of the peak assigned to COO-(Au), consistent with the presence of citrate coordination to Au surface, decreases for the laccase functionalized nanoparticles, most likely due to the salt-bridge mediated interaction of the protein with the citrate groups (contributing to the C-N peak) and partial citrate displacement after the immobilization process.<sup>33</sup> Furthermore, high-resolution XPS spectra of the Au 4f core level exhibited two peaks around 82.9 and 84.4 eV from Au(0) and Au(I), respectively, suggesting that the dominant oxidation state of gold in the samples is Au(0), with minimal charge transfer at the citrate/AuNPs interface.<sup>34</sup> Noticeably, the N/Au ratio was determined for both CotALac@95nmAuNPs and CotALac@15nmAuNPs, being 4 times higher for CotALac@15nmAuNPs than for CotALac@95nmAuNPs (protein content higher for functionalized 15nmAuNPs, Table S2) The electrocatalytic properties toward the reduction of oxygen of the CotA laccases, CotALac@15nmAuNPs and CotALac@95nmAuNPs deposited onto ITO electrodes, were subsequently evaluated by cyclic voltammetry (Figure 3).

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	169/224





**Fig. 3.** Cyclic voltammograms (CVs) of Bare-ITO and ITO electrode modified with pristine CotALac in N<sub>2</sub>-saturated (A) and O<sub>2</sub>-saturated (B) sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0). (C) CVs of ITOs modified with CotALac@15nmAuNPs and CotALac@95nmAuNPs in N<sub>2</sub>-saturated sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0). (D) CVs of ITOs modified with CotALac@15nmAuNPs and CotALac@95nmAuNPs in O<sub>2</sub>-saturated sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) in the absence or presence of NaF (30 mM). 100 mV·sec<sup>-1</sup>.

Free-CotA laccases exhibited a poor electrocatalytic activity (Figure 3B) most probably due to unsuitable orientations of the enzymes onto the ITO surfaces towards the electroreduction of oxygen, which adopt mainly a random orientation.<sup>35</sup> On the other hand, when the redox biomolecules were electrostatically anchored to gold nanoparticles, remarkable electrocatalytic currents were observed (Figure 3D). These results suggest that AuNPs allow the direct electron transfer (DET) of the enzymes, act as efficient electronic bridges between the proteins and the surface electrodes, provide active ET orientations and thus greatly enhance their bioelectrocatalytic performances. It is well-established that the difference in the electrocatalytic behaviour of redox enzymes is driven by their orientation distribution patterns. A random distribution of enzyme orientation commonly leads

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	170/224



to low electrocatalytic signal<sup>36</sup> whereas the immobilization of proteins at highly oriented active ET configurations produces excellent bioelectronic yields.<sup>37</sup> Rudiger et al. have proved that both orientation and electrocatalytic properties of enzymes bearing a dipole moment can be controlled by electrostatic interactions at the protein/amino-terminated monolayer interfaces.<sup>38</sup> Since CotA laccase exhibits two well-defined positively and negatively charged regions at the surface (Figure S2), it can adopt, after the electrostatic attachment, a preferential orientation resulting in efficient ET configurations, with a very positive impact on their bioelectrocatalytic activities.

Also, the apparent midpoint potential ( $E^0$ ) of the resulting bioconjugates in  $N_2$ -saturated sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) were -0.156 and -0.154 V for CotALac@15nmAuNPs and CotALac@95nmAuNPs, respectively, more negative as compared to -0.072 V, the value obtained for the free-CotA laccase (Figure 3A and 3C). This result could be understood by the influence of the negatively charged surface nanoenvironment of the citrate groups.<sup>39-41</sup> Interestingly, enzymes immobilized onto the smallest nanoparticles delivered higher electrocatalytic currents indicating that the nanometric dimensions of the AuNPs provides an extra-improvement of the electrostatically tied enzyme DET reaction rate. Such remarks are in good agreement with the Antonio D. Lacey et al. work, where laccases were covalently attached to gold nanoparticles of 5 and 16 nm respectively, following an oriented immobilization approach.<sup>26</sup> On the opposite trend, Sergey Shleev et al. concluded by strong experimental evidences that bioelectrocatalytic reaction rates do not changes with particle sizes of the gold nanoparticles in the 20-80 nm range.<sup>42</sup> In order to explain the influence of the nanoparticle size on the bioelectrocatalytic performances of CotA laccase-citrate capped AuNPs bionanostructures, we propose the following ideas. Firstly, the bioelectrocatalytic features of each electrically active nanobioarchitecture is strongly related with the particular methodology used to synthesize the pristine nanostructures as well as the immobilization approach used to anchor the redox enzymes. In these sense, it is worth to point out that spherical character of the nanoparticles suffers a significant decreasing at larger sizes using

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	171/224




our synthetic approach.<sup>43</sup> Therefore, it could be expected a lesser organization of the citrate layer structure at the smallest nanoparticles due to the increase of the nanoparticles curvature, which in fact may induce some disorganization on the citrate nanodomains as described in various works for monolayer-protected gold nanoparticles.<sup>44</sup> Bearing in mind these facts, CotA laccases immobilized onto disordered citrate nanodomains of the 15 nm AuNPs can more easily penetrate and accommodate their redox sites closer to the electrodes surfaces and consequently improve both the DET responses and the enzymatic bioelectrocatalytic yields.

The pronounced shifting toward negative potentials of the onset potential values of the CotA laccase immobilised on citrate-stabilised gold nanoparticles (0.005 V (vs Ag/AgCl)) is remarkable compared with the values of 0.60 V and 0.37 V (vs Ag/AgCl) obtained for fungus and recombinant laccases immobilized on carbon nanotubes (CNTs), respectively.<sup>45,46</sup> The remarkable changes in the onset potential of the CotALac@AuNPs can be explained by the structural and functional differences among the enzymes and/or the singular nanoenvironmental conditions created by the citrate groups at the enzymes/AuNPs interfaces.<sup>45,47</sup>

The influence of halides ions over the electrocatalytic activity of laccases has been widely investigated to provide additional insights into their ET pathways. It is well known that fluoride anions binds to T2/T3 trinuclear copper center and suppress the intramolecular ET (IET) from the type 1 copper centre (T1) to the T2/T3 Cu cluster.<sup>48</sup> In order to obtain a deeper understanding of the prepared nanobiomimetic systems, the electrocatalytic behaviour of the bioconjugates were assessed upon the addition of 30 mM of NaF, which in fact have never been investigated so far. Surprisingly, the electrocatalytic activity of the CotA laccases (Figure 3D) did not drastically changes in the presence of NaF, in strong contrast with previous works where a totally hindered of the bioelectrochemical reduction of O<sub>2</sub>, even at very low concentrations (1-30 mM), was observed.<sup>49,50</sup> At the same time, onset potentials shifted to -0.11 V for both bioconjugates, which constitute a very unusual performance of laccases exposed to fluoride anions solutions. This is in accordance with the seminal work of

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	172/224




Marius Dagens et al., which have elegantly demonstrated that the electronic wiring of laccases to gold nanoparticles takes place via T2/T3 Cu cluster instead of T1 redox sites, with the trinuclear copper centre facing the electrode surfaces, bypassing the intramolecular electron transfer, which under certain conditions is the rate-limiting step of oxygen bioelectroreduction.<sup>51</sup> Thus, the unusual electrocatalytic behaviour of the CotALac@AuNPs bioconjugates may be related to the effective electronic connection of CotA laccases to citrate stabilised AuNPs via the T2/T3 Cu redox center.

Finally, we have conducted electrocatalytic experiments at 60°C taking into account the high thermophilic character of the CotA laccases<sup>21</sup> (Figure S3). At this temperature the bioelectrocatalytic activity of the bioconjugates significantly dropped likely due to a partial break-up of the electrostatic interactions between the enzymes and the AuNPs. This work opens the doors towards the development of laccase-based nanobioelectrocatalytic materials constructed by electrostatic self-assembly methodology. To deeply study the salt-bridges interaction in our systems, it could be interesting to address in future works the electrostatic or enthalpy-driven nature of these types of interactions following previous protein-protein binding studies.<sup>52</sup>

### Conclusions

A mimicking of the CotA laccase bioelectrocatalytic function in the spore coat components was successfully accomplished through the formation of a full monolayer of metalloenzymes onto citrate-coated AuNPs, lead by attractive electrostatic interactions. Such interactions can modulate the orientation of the enzymes and in turn their bioelectrocatalytic performances. Noteworthy, the onset potential values of the bioconjugates for the bioelectrochemical reduction of O<sub>2</sub> were very close to 0 V (0.005 V), which suggest that CotA Laccase need low overpotentials in spore coat to reduce molecular oxygen and participate in enzymatic physiological processes, giving support for the location and function of an oxidoreductase in the thickest spore coat layer where the diffusion of oxygen is

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	173/224



hampered. Interestingly, the electronic wiring of the enzymes is likely produced via a T2/T3 trinuclear with the T2/T3 redox groups facing the electrodes surfaces. This work paves the way towards the design of new nanobioelectrocatalytic systems for a deeper understanding of the biological structure and function of recombinant metalloenzymes.


### Acknowledgements

Rafael Luque gratefully acknowledges MINECO for funding project CTQ2016-78289-P, co-financed with FEDER funds. Daily Rodriguez-Padron and Alain R. Puente-Santiago gratefully acknowledge MINECO for their research contracts associated to the aforementioned project.

Alain R. Puente-Santiago also acknowledges to COST FP1306 (LignoVal, [http://www.cost.eu/COST\\_Actions/fps/FP1306](http://www.cost.eu/COST_Actions/fps/FP1306)) for support under an STSM short stay in the lab of Prof. Ligia O Martins and to the Research Program of the University of Cordoba for its financial support through a postdoctoral contract (Modality 5.1).

Mario J. Munoz-Batista gratefully acknowledges MINECO for a JdC contract (Ref. FJCI-2016-29014). J.J.G.-C. acknowledges the Ministry of Economy and Competitiveness for a “Ramon y Cajal” contract (#RyC-2014-14956) and the project CTQ2017-83961-R. M. C. thanks the “Plan Propio de Investigación” from the Universidad de Córdoba and the “Pro-grama Operativo de fondos FEDER Andalucía” for its financial support through a postdoctoral contract (Modality A).

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	174/224



**Notes and References**

1. P. Fratzl and R. Weinkamer, *Prog. Mater. Sci.*, 2007, **52**, 1263-1334.
2. G. M. Whitesides and B. Grzybowski, *Science*, 2002, **295**, 2418-2421.
3. Y. S. Bai, Q. Luo and J. Q. Liu, *Chem. Soc. Rev.*, 2016, **45**, 2756-2767.
4. J. Zhou, X. W. Du, C. Berciu, H. J. He, J. F. Shi, D. Nicastro and B. Xu, *Chem.*, 2016, **1**, 7-9.
5. J. A. Marsh, H. Hernandez, Z. Hall, S. E. Ahnert, T. Perica, C. V. Robinson and S. A. Teichmann, *Cell*, 2013, **153**, 461-470.
6. Q. Luo, C. X. Hou, Y. S. Bai, R. B. Wang and J. Q. Liu, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 13571-13632.
7. D. S. Goodsell and A. J. Olson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2000, **29**, 105-153.
8. H. C. Sun, Q. Luo, C. X. Hou and J. Q. Liu, *Nano Today*, 2017, **14**, 16-41.
9. K. Kinbara and T. Aida, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 1377-1400.
10. S. G. Zhang, *Nat. Biotechnol.*, 2003, **21**, 1171-1178.
11. C. E. Zhao, J. S. Wu, S. Kjelleberg, J. S. C. Loo and Q. C. Zhang, *Small*, 2015, **11**, 3440-3443.
12. R. B. Song, Y. C. Wu, Z. Q. Lin, J. Xie, C. H. Tan, J. S. C. Loo, B. Cao, J. R. Zhang, J. J. Zhu and Q. C. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2017, **56**, 10516-10520.
13. V. B. Wang, J. Du, X. F. Chen, A. W. Thomas, N. D. Kirchhofer, L. E. Garner, M. T. Maw, W. H. Poh, J. Hinks, S. Wuertz, S. Kjelleberg, Q. C. Zhang, J. S. C. Loo and G. C. Bazan, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 5867-5872.
14. F. Scaletti, J. Hardie, Y. W. Lee, D. C. Luther, M. Ray and V. M. Rotello, *Chem. Soc. Rev.*, 2018, **47**, 3421-3432.
15. N. Serna, L. Sanchez-Garcia, A. Sanchez-Chardi, U. Unzueta, M. Roldan, R. Mangues, E. Vazquez and A. Villaverde, *Acta Biomater.*, 2017, **60**, 256-263.
16. M. Holdrich, A. Sievers-Engler and M. Lammerhofer, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5415-5427.
17. H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec and M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 12142-12150.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	175/224





18. R. Mout, G. Y. Tonga, L. S. Wang, M. Ray, T. Roy and V. M. Rotello, *ACS Nano*, 2017, **11**, 3456-3462.
19. Y. C. Yeh, R. Tang, R. Mout, Y. Jeong and V. M. Rotello, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 5137-5141.
20. C. M. Yu, Y. D. Wang, L. Wang, Z. K. Zhu, N. Bao and H. Y. Gu, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2013, **103**, 231-237.
21. F. J. Enguita, L. O. Martins, A. O. Henriques and M. A. Carrondo, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 19416-19425.
22. L. O. Martins, P. Durao, V. Brissos and P. F. Lindley, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2015, **72**, 911-922.
23. J. P. M. Devrind, E. W. Devrindejong, J. W. H. Devoogt, P. Westbroek, F. C. Boogerd and R. A. Rosson, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, **52**, 1096-1100.
24. L. O. Martins, C. M. Soares, M. M. Pereira, M. Teixeira, T. Costa, G. H. Jones and A. O. Henriques, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 18849-18859.
25. E. Koposova, G. Shumilova, Y. Ermolenko, A. Kisner, A. Offenhausser and Y. Mourzina, *Sens. Actuator B-Chem.*, 2015, **207**, 1045-1052.
26. C. Gutierrez-Sanchez, M. Pita, C. Vaz-Dominguez, S. Shleev and A. L. De Lacey, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 17212-17220.
27. Y. Liu, R. L. Mernaugh and X. Q. Zeng, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **24**, 2853-2857.
28. J. W. Park and J. S. Shumaker-Parry, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 1907-1921.
29. E. Mueller and A. Blume, *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, **1146**, 45-51.
30. A. Kowalczyk, E. Matysiak-Brynda, M. Bystrzejewski, D. S. Sutherland, Z. Stojek and A. M. Nowicka, *Acta Biomater.*, 2016, **45**, 367-374.
31. M. P. de Almeida, P. Quaresma, S. Sousa, C. Couto, I. Gomes, L. Krippahl, R. Franco and E. Pereira, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, **20**, 16761-16769.
32. D. Curry, A. Cameron, B. MacDonald, C. Nganou, H. Scheller, J. Marsh, S. Beale, M. S. Lu, Z. Shan, R. Kaliaperumal, H. P. Xu, M. Servos, C. Bennett, S. MacQuarrie, K. D. Oakes, M. Mkandawire and X. Zhang, *Nanoscale*, 2015, **7**,

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	176/224



19611-19619.

33. G. S. Perera, S. A. Athukorale, F. Perez, C. U. Pittman and D. M. Zhang, *J. Colloid Interface Sci.*, 2018, **511**, 335-343.

34. H. Al-Johani, E. Abou-Hamad, A. Jedidi, C. M. Widdifield, J. Viger-Gravel, S. S. Sangaru, D. Gajan, D. H. Anjum, S. Ould-Chikh, M. N. Hedhili, A. Gurinov, M. J. Kelly, M. El Eter, L. Cavallo, L. Emsley and J. M. Basset, *Nat. Chem.*, 2017, **9**, 890-895.

35. A. Franco, S. Cebrián-García, D. Rodríguez-Padron, A. R. Puente-Santiago, M. Muñoz-Batista, A. Caballero, A. M. Balu, A. A. Romero and R. Luque, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2018, **6**, 11058-11062.

36. G. A. Huerta-Miranda, A. A. Arrocha-Arcos and M. Miranda-Hernandez, *Bioelectrochemistry*, 2018, **122**, 77-83.

37. M. Bourourou, K. Elouarzaki, N. Lalaoui, C. Agnes, A. Le Goff, M. Holzinger, A. Maaref and S. Cosnier, *Chem. Eur. J.*, 2013, **19**, 9371-9375.

38. O. Rudiger, J. M. Abad, E. C. Hatchikian, V. M. Fernandez and A. L. De Lacey, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 16008-16009.

39. L. L. Xue, Y. H. Wang, Y. Xie, P. Yao, W. H. Wang, W. Qian, Z. X. Huang, J. Wu and Z. X. Xia, *Biochemistry*, 1999, **38**, 11961-11972.

40. J. Zhou, J. Zheng and S. Y. Jiang, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 17418-17424.

41. A. R. Puente-Santiago, D. Rodríguez-Padron, Xuebo Quan, M. J. Muñoz Batista, L. O. Martins, S. Verma, R. S. Varma, J. Zhou and R. Luque, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2019, **7**, 1474-1484.

42. D. Pankratov, R. Sundberg, D. B. Suyatin, J. Sotres, A. Barrantes, T. Ruzgas, I. Maximov, L. Montelius and S. Shleev, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 38164-38168.

43. N. G. Bastus, J. Comenge and V. Puentes, *Langmuir*, 2011, **27**, 11098-11105.

44. J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo and G. M. Whitesides, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 1103-1169.

45. J. Atalah, Y. Zhou, G. Espina, J. M. Blamey and R. P. Ramasamy, *Catal. Sci. Technol.*, 2018, **8**, 1272-1276.


46. F. Wu, L. Su, P. Yu and L. Q. Mao, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 1565-1574.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	177/224




47. S. Shleev, A. Jarosz-Wilkolazka, A. Khalunina, O. Morozova, A. Yaropolov, T. Ruzgas and L. Gorton, *Bioelectrochemistry*, 2005, **67**, 115-124.
48. T. Beneyton, Y. Beyl, D. A. Guschin, A. D. Griffiths, V. Taly and W. Schuhmann, *Electroanalysis*, 2011, **23**, 1781-1789.
49. S. Holmberg, M. Rodriguez-Delgado, R. D. Milton, N. Ornelas-Soto, S. D. Minter, R. Parra and M. J. Madou, *ACS Catal.*, 2015, **5**, 7507-7518.
50. M. Dagys, K. Haberska, S. Shleev, T. Arnebrant, J. Kulys and T. Ruzgas, *Electrochem. Commun.*, 2010, **12**, 933-935.
51. M. Dagys, A. Laurynenas, D. Ratautas, J. Kulys, R. Vidziunaite, M. Talaikis, G. Niaura, L. Marcinkeviciene, R. Meskys and S. Shleev, *Energy Environ. Sci.*, 2017, **10**, 498-502.
52. K. Okazaki, T. Sato and M. Takano, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 8918-8925.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	178/224



## Supporting Information

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	179/224



## ELECTRONIC SUPPLEMENTARY INFORMATION

**Mimicking the bioelectrocatalytic function of recombinant CotA laccase through electrostatically self-assembled bioconjugates**

David Alba-Molina,<sup>a</sup> Daily Rodríguez-Padrón,<sup>b</sup> Alain R. Puente-Santiago,<sup>b,\*</sup> Juan J. Giner-Casares,<sup>a</sup> María T. Martín-Romero,<sup>a</sup> Luis Camacho,<sup>a</sup> Lúgia O. Martins,<sup>c</sup> Mario J. Muñoz-Batista,<sup>b</sup> Manuel Cano<sup>a,\*</sup> and Rafael Luque<sup>b,d,\*</sup>

**Experimental Part****Production of the recombinant CotA Laccase (CotALac)**

Recombinant CotA Laccase from *Bacillus subtilis* was produced using a previously described protocol.<sup>1,2</sup> Briefly, pLOM10 plasmid encoding the CotA-laccase gene was transformed into *Escherichia coli* Tuner (DE3) pLacI strain (Novagen) and cells were grown in Luria-Bertani medium supplemented with ampicillin (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) at 37 °C. Gene expression was induced at OD<sub>600nm</sub>≈0.6 with 0.1 mM isopropyl-D-thiogalactopyranoside, at that time 0.25 mM CuCl<sub>2</sub> was added for full copper loaded protein production and growth temperature was switched to 25 °C. Agitation was stopped after 4 h and cells were harvested by centrifugation after 24 h of growth. Cells were disrupted using a French-Press apparatus and purification was performed using a two-step protocol with a cationic-exchange SP-Sepharose followed by a Superdex-200 size-exclusion column. Purified enzyme was stored at -20 °C.

**Synthesis of CotALac functionalized AuNPs**

First, 15 nm and 95 nm monodisperse citrate-stabilized gold nanoparticles (AuNPs) with a uniform quasi spherical shape and a narrow size distribution were synthesized following a kinetically controlled seeded growth strategy via the reduction of HAuCl<sub>4</sub> by sodium citrate.<sup>3</sup> Both 15 nm (step 1) and 95 nm (step 11) AuNPs, the molar gold concentration was estimated from the absorbance at 400 nm, which is assumed to have a size independent absorption coefficient.<sup>4</sup>

Next, the resulting 15 nm AuNPs (step 1) and 95 nm AuNPs (step 11) were

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	180/224



functionalized with the CotALac enzyme by exploiting the electrostatic self-assembly of the positively charged redox enzyme on the surface of the negatively charged citrate capped AuNPs. For this, 1 mg of CotALac was dissolved in 2 mL of 50 mM sodium phosphate buffer (PBS; pH 7.0; free chloride and fluoride) solution and subsequently added to 2 mL of AuNPs solution (~0.63 mM Au). This mixture was incubated for 24 hours at 4 °C under gentle stirring. Then, both bioconjugates were collected by centrifugation at 5000 rpm for 5 min at 4 °C. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 2 mL of 50 mM PBS (pH 7.0; free chloride and fluoride) solution. The resulting bioconjugates was stored in the dark at 4 °C.

**Material characterization**

The electrostatic surface potential calculations were carried out using the AMBER algorithm to generate the PQR file (PDB2PKA package) and Adaptive Poisson-Boltzmann Solver (APBS package) to generate the DX file. Color representation of the molecules was performed employing the UCSF Chimera 1.11.2 software package and considering a color range from red to blue (from -10 to 10 kT/e, respectively).


UV-visible spectra were recorded on a Cary 100 Bio UV-Vis spectrometer in disposable polystyrene cuvettes with 1.0 cm path length.

Samples for transmission electron microscopy (TEM) were prepared by drying, under ambient conditions, a dispersion of the particles on 200 mesh copper grids coated with Formvar/Carbon film. TEM images were obtained in a JEOL JEM 1400 TEM microscope, operated at an accelerating voltage of 80 kV.

Dynamic light scattering (DLS) and Zeta-potential measurements were carried out using a Malvern Zetasizer Nano ZSP ZEN5600 analyzer equipped with 10 mW laser He-Ne (633 nm). Samples were dispersed in ultrapure water and the measurements were recorded in triplicate (n = 3) at 25 °C.

Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy was performed in an ALPHA-T Bruker spectrometer. Spectra were recorded at room temperature in a 4000-600 cm<sup>-1</sup> wavenumber range, using the OPUS software.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	181/224



X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was carried out in a SPECS mod. PHOIBOS 150 MCD. Prior to the analysis, the sample was evacuated overnight under vacuum ( $<10^{-6}$  Torr). The experiment was accomplished at pressures  $<10^{-10}$  mbar, using a conventional X-ray source (XR-50, Specs, Mg-K $\alpha$ ,  $h\nu=1253.6$  eV,  $1$  eV =  $1.603 \times 10^{-19}$  J) in a "stop and go" mode. The deconvolution of the obtained curves and element quantification was carried out using the XPS CASA program.

### Electrochemical experiments

Cyclic and linear sweep voltammetries were recorded on an AUTOLAB PGSTAT30 electrochemical analyser using a three-electrode system. ITOs (Naranja Substrates) were used as working electrodes. A drop of 25  $\mu$ L of sample (i.e. AuNPs, CotALac@AuNPs or pristine CotALac) was loaded onto the clean surface of ITO or GC electrode and then dried overnight at 4 °C. A platinum sheet and an Ag/AgCl electrode were used as counter and reference electrodes, respectively. A 50 mM phosphate buffer solution (PBS, pH 7.0) was used as supporting electrolyte. All the solutions were purged prior to electrochemical measurements using nitrogen (N<sub>2</sub>) or oxygen (O<sub>2</sub>) gas.

**Table S1.** Particle-diameters determined by TEM and DLS measurements, and Z-potential values of the NPs under physiological conditions.

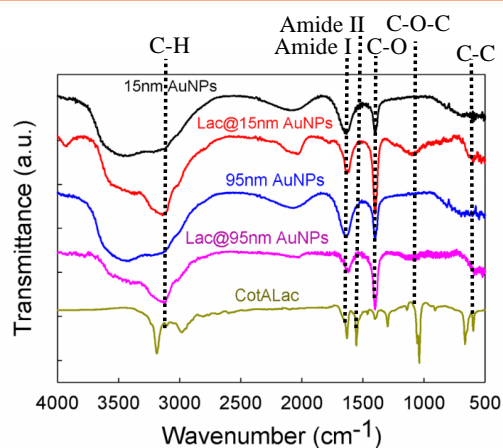
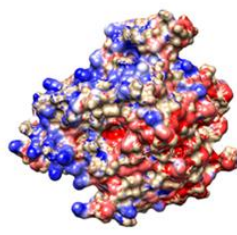
NPs	TEM size (nm)	Hydrodynamic size (nm) / PDI	Zeta-Potential (mV)
CotALac	-	19.7 / 0.249	-6.9 $\pm$ 2.8
15nmAuNPs	14.9 $\pm$ 2.4	29.4 / 0.158	-27.4 $\pm$ 4.7
CotALac@15nmAuNPs	20.4 $\pm$ 3.2	63.9 / 0.264	-9.2 $\pm$ 6.2
95nmAuNPs	95.3 $\pm$ 5.1	110.3 / 0.173	-30.3 $\pm$ 6.1
CotALac@95nmAuNPs	128.3 $\pm$ 8.5	141.2 / 0.244	-16.8 $\pm$ 8.3

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	182/224



**Table S2.** XPS binding energy and N/Au atomic ratio.

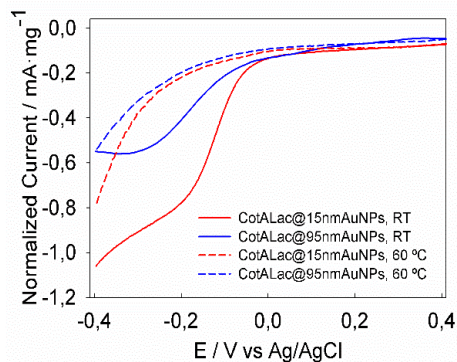
Sample	Position (eV)					
	C1s	N1s	O1s	Au 4f <sub>7/2</sub>		N/Au (at.)
				Au(0)	Au(I)	
15nmAuNPs	284.6	-	530.8	82.8	84.3	-
95nmAuNPs	284.6	-	530.9	82.9	84.3	-
CotALac@15nmAuNPs	284.6	399.2	530.9	83.0	84.5	7.3
CotALac@95nmAuNPs	284.6	399.3	530.8	82.9	84.4	1.8


**Fig. S1.** FTIR spectra of 15nmAuNPs (black line), CotALac@15nmAuNPs (red line), 95nmAuNPs (blue line), CotALac@95nmAuNPs (pink line), and CotALac (dark-yellow line).

**Fig. S2.** Electrostatic surface distribution of CotALac at pH 7.0 (PDBID 4YVU) generated by the AMBER algorithm and Adaptive Poisson-Boltzmann Solver package. Blue and red areas represent the positively and negatively charged surface domains respectively.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	183/224







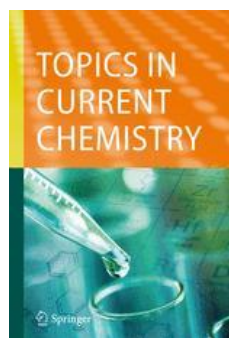
**Fig. S3** CVs of ITO modified with CotALac@15nmAuNPs and CotALac@95nmAuNPs in O<sub>2</sub>-saturated sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) at room temperature (RT) and at 60 °C. Scan rate: 100 mV·s<sup>-1</sup>.

### References

1. I. Bento, L. O. Martins, G. G. Lopes, M. A. Carrondo and P. F. Lindley, *Dalton Trans.*, 2005, 3507-3513.
2. Z. J. Chen, P. Durao, A. T. Fernandes, P. Hildebrandt, D. H. Murgida, S. Todorovic, M. M. Pereira, E. P. Melo and L. O. Martins, *J. Biotechnol.*, 2008, **136**, S320-S320.
3. N. G. Bastus, J. Comenge and V. Puentes, *Langmuir*, 2011, **27**, 11098-11105.
4. J. Rodriguez-Fernandez, J. Perez-Juste, P. Mulvaney and L. M. Liz-Marzan, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 14257-14261.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	184/224





Received November 2019

Accepted December 2019

**DOI:**

10.1007/s41061-019-0273-0

## Bioconjugated Plasmonic Nanoparticles for Enhanced Skin Penetration

David Alba-Molina, Juan J. Giner-Casares,\* Manuel Cano\*

*Department of Physical Chemistry and Applied Thermodynamics, Institute of Nanochemistry (IUNAN), University of Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Ed. Marie Curie, Córdoba, Spain E-14014.*

### Corresponding Authors

\*jjginer@uco.es, q82calum@uco.es

Plasmonic nanoparticles (NPs) are one of the most promising and studied inorganic nanomaterials for different biomedical applications. Plasmonic NPs provide excellent biocompatibility, long-term stability against physical and chemical degradation, relevant optical properties, well-known synthesis methods and tuneable surface functionalities. Herein, a review of recently reported bioconjugated plasmonic NPs using different chemical approaches and loading cargoes (such as drug, gene, and proteins) for enhancement of transdermal delivery across biological tissues is presented. The main aim is the understanding of the interaction of the complex skin structure with biomimetic plasmonic NPs. This knowledge not only plays an important role for enhancing transdermal delivery of pharmaceutical formulations but also for controlling undesired skin penetration of industrial products, such as cosmetic, sunscreen formulations and any other mass-usage consumable containing nanoparticles.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	185/224



### 1. Introduction

This review is focused on plasmonic nanoparticles (NPs) throughout the whole range of inorganic NPs. Plasmonic NPs are composed of colloidal particles of noble metals which present a characteristic surface plasmon resonance (SPR) band. The SPR band is attributed to the electric field of incident light, which induces coherent oscillation of conduction band electrons of the positively charged metallic core (Fig. 1). These optical and electronic properties of the plasmonic NPs can be easily tuned by changing the size, shape, and surface chemistry [1-3].

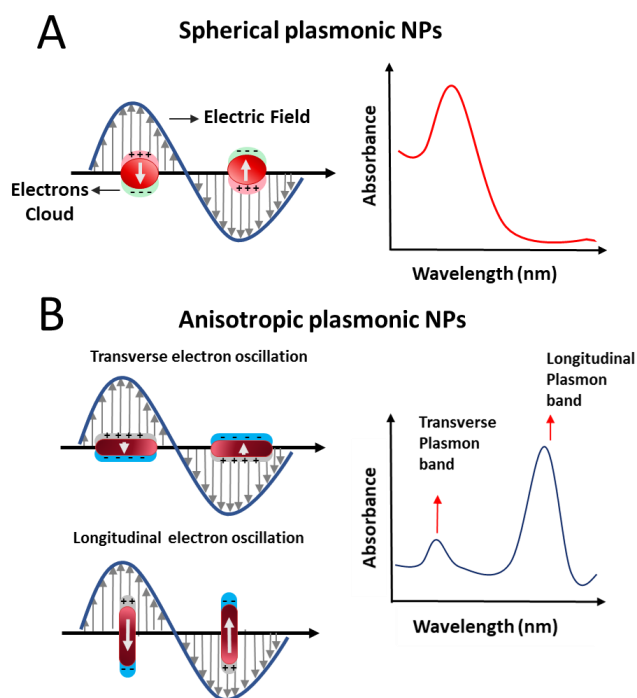
Among the different plasmonic NPs, this work is mainly focus on Au and Ag-based NPs, which are considered as non-allergenic compounds that should not induce cytotoxicity, therefore being highly attractive for biomedical applications [4, 5]. In addition to their inherent characteristic properties of nanometric materials, such as small size and high surface area-to-volume, the surface chemistry of the AuNPs can be easily modified through the covalent Au-S bond [6, 7]. These features have made AuNPs one of the most widely used nanomaterials both in technological and in biomedical applications, such as electronics [8, 9], catalysis [10, 11], sensory probes [12, 13], plasmonic photothermal therapy [14, 15], targeted drug delivery carrier [16, 17], contrast agents in x-ray imaging and computed tomography for cancer diagnosis [18, 19], to name only a few. AgNPs display an inherent antimicrobial capacity against bacteria, viruses, and other eukaryotic microorganisms [20, 21]. For this, silver compounds have been historically used in fields to prevent microbial growth, in wound care and in products such as odour-reducing clothing, acne creams, and face masks [22, 23].

Topical administration of compounds presents several advantages against other routes, such as oral, nasal, and intravenous administration. Transdermal delivery overcomes the first-pass hepatic metabolism and can reduce harmful side-effects [24-26]. However, skin is a complex multilayer structure (mainly composed of epidermis, dermis, and hypodermis) with highly impermeable barriers to most molecules on the basis of particle size, water-solubility and surface charge [24]. In

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	186/224



addition, hair follicles have also been explored as a more permeable transporting channel for transdermal drug delivery [27-29]. An excellent review of the influence of size on the penetration of both metal and non-metal NPs through skin was published by Larese Filon et al. [30].



**Fig. 1** Schematic representation of Surface Plasmon Resonance (SPR) band in spherical (A) and rod-shape (B) plasmonic NPs.

Bare NPs do not overcome skin barriers efficiently as reported by Núñez-Lozano et al.[31] In other words, non-functionalized NPs constitute poor transdermal drug delivery systems [32, 33]. Therefore, many efforts have been made to enhance the skin penetration of the NPs through purposefully designed chemical functionalization with biomolecules and bioinspired polymers to form biomimetic

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	187/224



NPs and providing additional abilities in skin penetration. Herein we aim at compiling the latest advances on the development of different approaches to fabricate bioconjugated plasmonic NPs for enhanced skin penetration. This review is organized as follow: Firstly, the influence of the key parameters on the skin penetration of non-bioconjugated plasmonic NPs is discussed and, secondly, some of the more recently reported bioconjugated plasmonic NPs for enhanced skin penetration is presented.


## 2. Influence of key-parameters on the skin penetration of non-bioconjugated plasmonic NPs.

The ability of plasmonic NPs for skin penetration can be tuned by controlling their core-composition, particle-size and -shape, surface charge, water solubility and the functionalization strategy, including both capping-ligands and delivered cargoes, i.e., drugs, genes, and proteins. Relevant examples of the most prominent studies in each of these parameters are mentioned below:

### 2.1. Core composition (noble metal type).

The literature indicates a significant difference in terms of skin penetration behaviour between organic and inorganics NPs. There are also significant differences for skin internalization depending on its chemical composition (i.e. TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, ZnO, FeO, CdSe, Pd, etc.) within the latter group, as previously reported by Lares Filon et al., [30]. In the case of plasmonic NPs, the in vitro penetration of AgNPs through intact human skin samples has been reported for several authors (with particle size in a narrow range between 19 and 25 nm), suggesting that ions release is the most feasible penetration mechanism [34, 35]. Whilst for AuNPs, its penetration through intact human skin samples has been demonstrated by several authors (size ~12 nm), although the penetration process is unclear, being discarded the ions release mechanism. The absence of Au ions in physiological solutions of AuNPs has been reported, indicating its higher long-term colloidal stability than

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	188/224



AgNPs [30, 36]. This high stability could explain the absence or low cytotoxicity of this type of plasmonic NPs.


## 2.2. Particle size-effect.

Although the literature shows contradictory results in this issue, skin penetration of NPs is considered a size-dependent process [30]. Note that the stability of the NP coating should be taken into account because it plays a key role both in the interaction between skin and NP core (see section 2.4), and between the NPs (i.e. steric stabilization) by avoiding the particle aggregation when they come into contact with the stratum corneum and constituent cells of the skin, mainly keratinocytes.

A representative study showing that AuNPs penetrate through intact skin samples in a size-dependent manner was reported by Sonavane et al., who analysed the penetration of 15, 102 and 198 nm citrate-capped AuNPs, with spherical shapes and surface negative charge, through rat-skin and rat-intestine using Franz diffusion cells [37]. The smallest AuNPs showed higher permeation than the larger particles. In a similar study with rats, Raju and co-workers reported that 22 nm citrate-capped AuNPs showed higher penetration than 105 and 186 nm particles across the thick stratum corneum of the plantar rat skin [38].

A key aspect on the experimental design for assessing the skin penetration of plasmonic nanoparticles is the *in vitro* or *in vivo* model used to perform the analysis. Indeed, the choice of biologically relevant and realistic model for studying the biological effect of nanoparticles is a comparatively unexplored field [39]. Although rat, mouse and rabbits have been extensively used for these penetration studies, pig skin is probably the most similar animal model to the human skin [40]. Pig and human skin are structurally very similar in thickness and dermal-epidermal thickness ratio. Hair follicles and blood vessel patterns in the skin are also similar. In addition, the thickness of the human skin varies considerably as a function of the body region, gender and age, among other factors. For this reason, the results obtained are quite different depending on the used *in vivo* model, and even depending on the part used of human body. An interesting study on porcine skin using AgNPs was reported by

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	189/224




Samberg and co-workers [22], who evaluated the in vitro and in vivo toxicity of eight different commercial AgNPs supplied by nanoComposix (San Diego, CA), such as unwashed/uncoated (diameter of 20, 50, and 80 nm), washed/uncoated (20, 50, and 80 nm), and carbon-coated (25 and 35 nm). They observed that the toxicity of AgNPs in human embryonic kidney (HEKs) was influenced significantly by residual contaminants in their supernatant, and that AgNPs themselves may not be responsible for the observed increase in cell mortality. The degradation of AgNPs within the cell was also considered as a source of reactive oxygen species that would be damaging to the cell machinery and DNA [41].

Obviously, human skin would be ideal to perform in vitro skin penetration analysis. In 2012, Liu et co-workers [42] investigated the in vitro penetration and metabolic effects of 10, 30 and 60 nm citrate-capped AuNPs within viable excised human abdominal skin after 24-hour exposure. Using multiphoton tomograph-fluorescence lifetime imaging microscopy, they only observed penetration into the stratum corneum, without significant penetration into the lower layers. They demonstrated that viable human skin resists permeation of small NPs, which had been previously reported to penetrate deeply in other animal skin models.

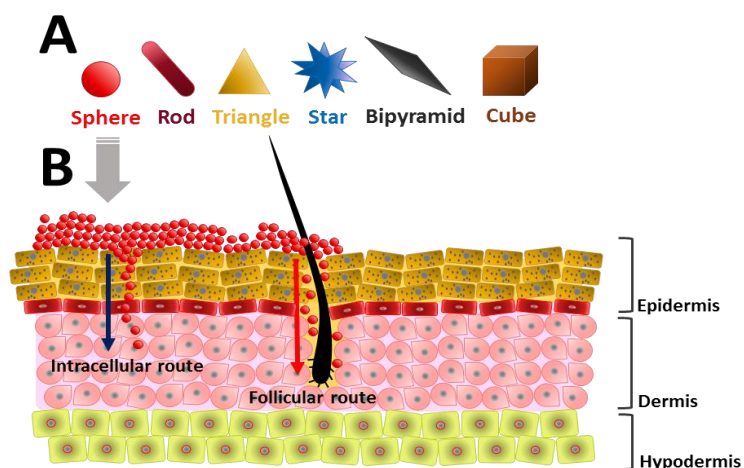
Note that a remarkable attempt to categorize the size range with its skin penetration ability was carried out by Larese Filon et al.[30] They suggested that: (i) NPs smaller than 4 nm can both penetrate and permeate intact skin, (ii) NPs in the size range between 4 and 20 nm can permeate both intact and damaged skin, (iii) NPs with diameter between 21 and 45 nm can penetrate and permeate damaged skin, and (iv) NPs higher than 45 nm can neither penetrate nor permeate the skin. They also considered the hydrodynamic diameter of the NPs, which is an important parameter of the colloidal particles that can be greatly affected both for the ligand-coating and the electrolyte composition of the colloidal solution [43].

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	190/224



### 2.3. Shape-effect

Despite the enormous literature reporting protocols for the synthesis of plasmonic NPs with different morphologies, such as rod, triangle, bipyramid, star, cube and others [44-46], as well as the important effect on the resulting NP flow characteristic that alters cell membrane interactions, macrophage uptake and circulating lifetimes [47-49], research papers investigating the influence of the NPs shape on skin penetration has been rarely reported (Fig. 2). This fact could be attributed mainly to the resulting higher size (e. g. > 45 nm) and to the lower resulting long-term stability of the anisotropic NPs (i.e. non-spherical geometries). Only comparative studies between spherical and rod-shape AuNPs can be found in the literature.



**Fig. 2** Schematic representation of plasmonic NPs with different geometries (A) and of the human skin layers (B).

A relevant study was reported by Fernandes et al. [50], showing from their culture experiments in mouse and human skin samples that the percentage of PEG-capped Au-nanorods (with an aspect ratio  $2.8 \pm 0.5$  nm) found in all samples was higher than the one obtained for the similar PEG-capped spherical  $15 \pm 1$  nm AuNPs. These results were obtained both for positively and for negatively surface charged NPs, suggesting the great influence of the NP-shape on its penetration capacity. In the

173

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	191/224





case of AgNPs, Tak and co-workers reported a skin penetration study of differently shaped NPs using both in vitro and in vivo models [51]. They used spherical, rod-shape and triangular AgNPs with similar hydrodynamic diameter (~50 nm) and zeta-potential (+ 30 mV) to perform in vitro analysis on ultra-thin mouse skin section by Franz cell system, and in vivo analysis on hairless mice. In agreement with previous results for AuNPs, they showed that rod-shape AgNPs presented higher permeability index than the spherical and triangular ones. They concluded that different shapes of AgNPs may exhibit diverse antimicrobial activities and skin penetration capabilities depending upon their active metallic facets.

#### 2.4 Influence of the capping-ligand, including surface-chemistry and -charge.

Another important parameter that greatly affects the skin penetration rate of the NPs is the surface charge and chemistry, which is directly associated with the stabilizing ligand composition and the type of the metal-ligand bonding interaction. Fig. 3 summarizes the most frequently found capping ligands, including the type of interaction with the metallic core. Citrate is the main ligand for the synthesis of plasmonic NPs [52, 53], and it is the most widely reported. Despite the resulting water-soluble NPs present a good long-term stability, with a negatively charged surface due to their carboxylate groups, the NPs tended to aggregate easily in contact with the skin (specially for the smallest sizes) due to their relatively weak metal-ligand interaction [7]. Labouta and co-workers [54] showed that water-soluble spherical-shape 15 nm citrate-capped AuNPs tended to aggregate on the superficial stratum corneum. In this study, the penetration rate of hydrophilic 15 nm citrate-capped AuNPs versus hydrophobic 6 nm dodecanethiol-capped AuNPs was also compared, showing that non-water-soluble particles penetrated through the stratum corneum and into viable epidermal layers of human skin. This enhance on the skin penetration using dodecanethiol as capping ligand could be attributed to: (a) The stronger Au-S binding interaction, which avoid aggregation of NPs in contact with the stratum corneum, and (b) to the solubility in organic solvent (i.e. toluene) that

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	192/224





are well suited to stabilize the surface of AuNPs for skin penetration, despite of the weak metal-ligand interactions via pyrrolidone groups [56]. Huang and co-workers [56] showed that water-soluble 5 nm PVP-capped AuNPs with spherical shape were mice skin permeable. They attributed this effect to the nano-bio interaction with skin lipids and the consequent induction of transient and reversible openings on the stratum corneum. In addition, they highlighted that co-administration of these PVP-capped AuNPs with protein drugs could enhance transdermal drug delivery.

Additionally, the capping ligand confers a given surface charge to the NPs, which greatly affects to the resulting skin penetration rate. For instance, positively charged drug carriers, such as dendrimers and liposomes, are well-known to induce greater drug delivery in the skin [57, 58]. In this direction, Fernandes et al. [50] showed that positively charged PEG-capped AuNPs were found in the skin in 2-6 folds higher amount than their negative counterparts. These results were obtained both for spherical- and for rod-shaped NPs, and were in agreement with the enhanced skin permeation of cationic liposomes, which was attributed to the “Donnan exclusion effect” and to the better interaction of cationic particles with the negatively charged skin cells [59]. Furthermore, in this study, they also showed that AuNPs functionalized with cell penetrating peptides (CPPs) TAT and R7 were found in the skin in larger quantities than PEGylated AuNPs, demonstrating that bioconjugation greatly enhance the skin penetration rate [50].

In an alternative strategy, Lee and co-workers investigated the influence of the surface charge of Au-nanorods on skin penetration using layer-by-layer (LbL) polyelectrolyte coating technique [60]. They observed that negatively charged CTAB/PSS-capped Au-nanorods penetrated more rapidly through the skin than the positively ones (CTAB- and CTAB/PSS/PDADMAC-capped). For this, three different multi-layer coated Au-nanorods with particle size of 18 x 40 nm were used: Two positively charged, CTAB- and CTAB/PSS/PDADMAC-capped, and one negatively charged, CTAB/PSS-capped. These surprising results were attributed to both the aggregation of the positively charged Au-nanorods on the stratum corneum

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	194/224



and the adsorption of proteins released from the dermis layer to the surface of Au-nanorods. In line with these results, Mahmoud et al. [61] observed that positively charged Au-nanorods aggregated extensively upon exposure to human skin compared to negatively and neutrally charged ones. They attributed these findings to the adsorption of proteins released from the dermis layer to the surface of Au-nanorods. In this study, they prepared 49.5 x 12.0 nm Au-nanorods capped with four different surface ligands: cetyltrimethylammonium (CTAB), poly acrylic acid (PAA), poly(allylamine hydrochloride) (PAH), and methoxy-polyethylene glycol-thiol (m-PEG-SH). Conversely, Hao et al. [62] also investigated the influence of the surface charge on the skin penetration of spherical AuNPs using human reconstructed 3D Episkin model. In this study, three different surfaces charged 5 nm-AuNPs capped with citrate (negative), PVP (neutral), and CTAB (positive) were tested. They observed that, although all AuNPs induced the phase change of lipid lamella and pass through the epidermis, positively charged ones exhibited the most efficient skin penetration through both the paracellular routes and the transcellular pathway, when compared to neutrally or negatively charged NPs.

An interesting alternative for stabilizing NPs surface is the PEGylation, which is a commonly used approach for improving the drug and gene delivery efficiency of NP-based systems to target cells and tissues [63]. Hsiao and co-workers employed this approach to investigate the positive effects of polyethylene glycol (HS-PEG-COOH) and HS-PEG-oleylamine (OAm) functionalization on the skin permeation of spherical 10 nm AuNPs [64]. Using an in vivo rat model, they showed that PEG- and PEG-OAm-functionalized AuNPs were able to overcome the skin barrier and deposit in the deeper subcutaneous adipose tissue. Moreover, the follicular deposition of AuNPs increased 2-fold after PEG-OAm functionalization, demonstrating a preferential accumulation mediated by the stabilizing ligand. Mahmoud et al. [65] evaluated the preferential accumulation of Au-nanorods into abdominal human skin hair follicles. To this end, they prepared 11.4 x 46.6 nm Au-nanorods with five different surface chemistries (i.e. neutral, anionic, cationic, and hydrophobic), such as CTAB, PAA, methoxy-polyethylene glycol-thiol (m-PEG-

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	195/224



SH), PEG-Cystamine, and polystyrene (PS). They observed that the lipophilic properties of sebum-rich hair follicles enhanced the accumulation of hydrophobic PS-Au-nanorods into hair follicles, while neutral m-PEG-S-Au-nanorods were distributed into all skin compartments, especially the dermis, which exhibits hydrophilic characteristics. In addition, both charged Au-nanorods showed a negligible percentage of penetration into any of the skin compartments.

### 3. Bioconjugated plasmonic NPs for transdermal delivery of different cargoes.

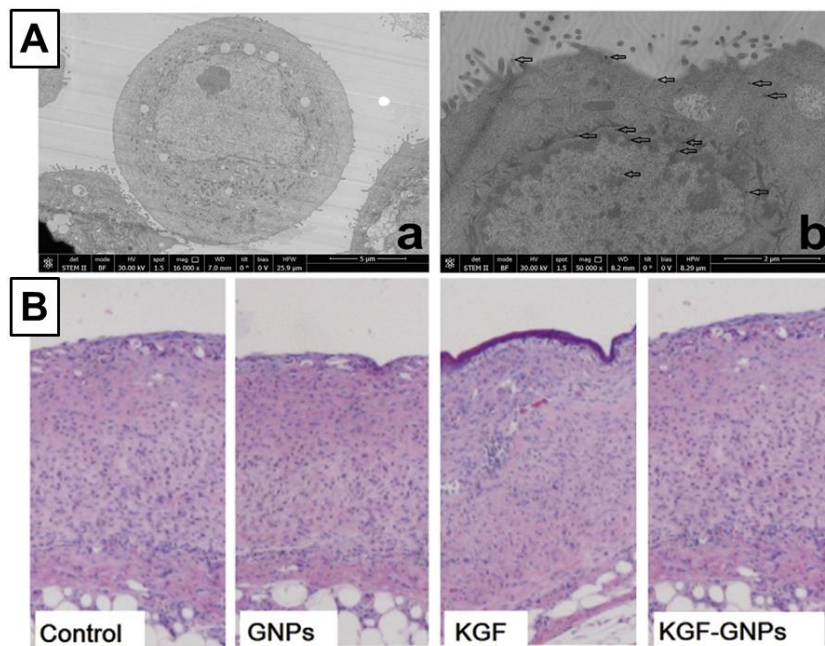
A seminal study on the development of bioconjugated plasmonic NPs for enhancing the skin penetration of different cargoes was reported in 2010 by Huang and co-workers [56]. They demonstrated a significant enhance of the transdermal delivery of protein-drugs by co-administration with 5 nm PVP-capped AuNPs. This fact was attributed to the nano-bio interaction with skin lipids, which allowed a reversible openings of the stratum corneum. Thus, this work provided a simple and efficient NPs-mediated method for overcoming the skin barrier for percutaneous protein drug delivery. Labala et al. [66] reported the first bioconjugated plasmonic NPs for iontophoretic transdermal delivery of imatinib mesylate to treat melanoma, using a LbL assembly approach. This LbL polymer capped AuNPs contained PVP and polyethylene imine (PEI), and was subsequently coated with anionic poly(styrenesulfonate) (PSS) and cationic PEI for the drug loading. The resulting bioconjugated nanosystem showed an average particle size and a zeta-potential of  $98 \pm 4$  nm and  $+ 32 \pm 1$  mV, respectively, and a shift of the SPR wavelength from 518 to 530 nm. The in vitro skin penetration studies were performed on excised porcine ear, and they demonstrated that iontophoresis application enhanced the skin penetration of imatinib mesylate loaded AuNP by 6.2-fold compared to passive application.

Bessar et al. [67] prepared a water-soluble sodium 3-mercaptopropansulfonate(3MPS)-capped AuNPs, which were loaded with methotrexate (MTX) via electrostatic adsorption. The resulting Au-3MPS@MTX conjugate

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	196/224



showed an average size and a zeta-potential of  $\sim 5$  nm and  $-32 \pm 1$  mV, respectively. Then, it was topically administrated on C57BL/6 mouse normal skin in order to assess the absorption behaviour. In vitro and in vivo studies showed that MTX-AuNPs was much more efficient than MTX alone, suggesting this nanosystem as a potential candidate for topical treatment of psoriasis, see Fig. 4A [67].



**Fig. 4** A) Electron microscopy pictures of normal human keratinocytes. a) control b) treated cells with bioconjugated plasmonic NPs [67]. Copyright from Elsevier, 2016. B) Wounds treated with non-coated and bioconjugated plasmonic NPs, showing the absence of granulation tissue [68]. Copyright from Elsevier, 2018.

An interesting application of bioconjugated plasmonic NPs for enhance transdermal gene delivery was the reported by Niu and co-workers [69]. In order to facilitate the skin penetration of plasmid DNA (i.e. pDNA encoding miRNA-221 inhibitor -Mi221-) deeply into the melanoma tissues, they synthesized an 20-25 nm conjugated AuNPs containing a cell-penetrating TAT peptide and the cationic PEI

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	197/224



that could compact the pDNAs into cationic nanocomplexes (i.e. zeta-potential ~ +35 mV). They demonstrated that the resulting plasmonic bioconjugates can penetrate through the intact stratum corneum without any additional enhancement physical method. This study proposed a novel topical gene therapy strategy for skin cancer with great priority to reverse both the progression and metastasis of advanced melanoma. Chen et al. fabricated a bioconjugate plasmonic NPs for the transdermal delivery of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in wound repair [70]. To that end, they performed the bioconjugation of AuNP-PEG-COOH with VEGF through carbodiimide bonds, obtaining a negative surface charged nanosystem, whose absorption capability was evaluated by a mouse skin model. After the treatment, they observed not only the presence of VEGF into the dermis but also its effect for promoting the angiogenesis, demonstrating that in this case the binding of protein biological factors to AuNPs could preserve the activity of the protein. Other study reported by Safwat el al., who fabricated AuNPs capped with benzalkonium chloride and with PEI for enhanced loading and skin permeability of 5-fluorouracil (i.e. 5-FU/BC-AuNPs and 5-FU/PEI-AuNPs, respectively) [71]. They performed ex vivo permeability studies of different 5-FU preparations using mice skin, demonstrating that the permeability of 5-FU was significantly higher for drug-loaded AuNPs compared with the other tested 5-FU samples. This same research group also prepared 5-FU loaded through ionic interactions onto CTAB capped AuNPs, and the resulting nanocomposite was incorporated into gel and cream bases to evaluate its permeability both ex vivo in mice dorsal skin and in vivo A431 tumor-bearing mice [72]. They observed that the nano-formulation provided around 2-fold higher permeability through mice skin compared with free 5-FU gel and cream formulations, and achieved 6.8- and 18.4-fold lower tumour volume compared with the untreated control with the gel- and the cream-based nano-formulation, respectively. On the other hand, Boca et al. [73] performed the first preliminar study to evaluate the potential use under dermatological conditions of Ruxolitinib-conjugated 15 nm AuNPs as alternative for treating alopecia. Using in vitro

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	198/224



preclinical setting, they showed that AuNPs@TWEEN-20@Ruxolitinib inhibited the proliferation of fibroblasts by inhibiting JAK2 protein, suggesting it as a potential strategy to treat alopecia.

Another novel and alternative administration strategy of bioconjugated plasmonic NPs was proposed by Anirudhan et al. [74], who fabricated a nanocomposite film containing methacrylate-stitched  $\beta$ -cyclodextrin embedded with AuNPs and hydrophobic titanium nanotube (TNT) and tested the transdermal delivery of ibuprofen through in vitro rat skin. They showed that the resulting film exhibited an improved drug-delivery performance, which was attributed to synergistic action of AuNP and hydrophobic TNT. They proposed this nanocomposite film as an alternative skin permeation strategy for transdermal drug delivery. Similarly, this same research group proposed a polyelectrolyte membrane fabricated with guar gum, poly(vinyl alcohol) and a nanogold-nanocellulose composite for the topical administration of diltiazem hydrochloride. In vivo analysis on human skin of this film were performed, suggesting its potential use for transdermal drug delivery [75].

Pan et al. [68] explored the effects on wound healing of keratinocyte growth factor (KGF) cross-linked to AuNPs. Using an animal full-thickness wound model, they showed that KGF-AuNPs were more favourable to wound healing than bare AuNPs or KGF, thus being proposed as a promising wound healing drug for clinical application, see Figure 4B. Crisan et al. [76] evaluated the impact on psoriatic inflammation of AgNPs and AuNPs complexed with Cornus mas (i.e. polyphenols-rich extracts) by using an in vitro model based on pro-inflammatory macrophages. The results obtained from all the performed in vitro analysis suggested that these bioconjugated plasmonic NPs provided an efficient tool for modern psoriasis therapy, circumventing immunosuppression-related side effects of biologicals. In another study, Wang et al. [77] fabricated an antimicrobial peptide (LL37) grafted ultra-small AuNPs (AuNPs@LL37, ~7 nm), which was combined with pro-angiogenic (VEGF) plasmids to analyse its potential use for the topical treatment of diabetic wounds with or without bacterial infection. The resulting bioconjugate (AuNPs@LL37/pDNAs) combined the advantages of cationic surface charged NPs

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	199/224





that condense DNA with those of antibacterial peptides and enhance the cellular and nucleus entry to achieve high gene delivery efficiency. AuNPs@LL37/pDNAs were shown to greatly improve the gene transfection efficiency in keratinocytes compared with pristine AuNPs/pDNAs, exhibiting a similar expression to Lipo2000/pDNAs (a well-known highly efficient gene transfection agent), whilst displaying higher antibacterial ability. Thus, this bioconjugated plasmonic NPs were suggested as a suitable strategy for treating chronic diabetic wounds.

More recently, Fratoddi et al. [78] analysed the effects of AuNPs functionalized with 3-mercaptopropylsulfonate (AuNPs-3MPS) and loading MTX topically administered in vitro on skin model and in vivo on imiquimod-induced psoriasis-like mice model. The showed that the treatment with this system was able to induce a reduction of keratinocytes hyperproliferation, epidermal thickness and also inflammatory infiltrate in the used in vivo model. Hernández-Martínez et al. [79] synthesized and evaluated a nanocomposite of AuNPs functionalized with calreticulin. Using in vitro and in vivo wound healing mice models of diabetes, they assessed the ability of the nanocomposite to promote proliferation and migration. Their results confirmed the utility of this bioconjugated plasmonic NPs (AuNPs-calreticulin) as potential treatment for wound healing of diabetic ulcers.

In the case of AgNPs-based bioconjugates, Mandal and co-workers [80] fabricated a nanocomposite hydrogel comprised of in situ formed Ag nanowires (AgNWs) deposited chemically cross-linked carboxymethyl cellulose (CMC), which demonstrated superior efficacy as transdermal anticancer drug-curcumin carrier. This plasmonic bioconjugate had the capability to encapsulate both hydrophobic/hydrophilic transdermal drugs. The in vitro experiments suggested that the presence of AgNWs on cross-linked CMC enhanced both the penetration power of nanocomposite hydrogel and the drug release in sustained manner. Whilst the ex vivo rat skin permeation analysis confirmed that the drug delivery through the nanocomposite hydrogel was permeable through the rat skin in controlled fashion, killing efficiently the MG 63 cancer cells.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	200/224



Table 1 summarises the bioconjugated plasmonic NPs cited in this review, indicating both the loaded active molecule and the potential application.

**Table 1.** Representative cargoes in through bioconjugated plasmonic NPs for skin disease treatments.

Active molecule	Cargo type	Activity/Application	NPs	Ref.
<b>Imatinib mesylate</b>	Drug	Anticancer	Au	[66]
<b>Methotrexate (MTX)</b>	Drug	Anti-inflammatory (psoriasis)	Au	[67,78]
<b>microRNA mir-221</b>	Gene	Tumour suppressor (melanoma)	Au	[69]
<b>Vascular endothelial growth factor (VEGF)</b>	Protein	Wound repair	Au	[70]
<b>Ibuprofen</b>	Drug	Anti-inflammatory	Au	[74]
<b>Diltiazem hydrochloride</b>	Drug	Vasodilator	Au	[75]
<b>5-fluorouracil (5-FU)</b>	Drug	Anticancer	Au	[71,72]
<b>Ruxolitinib</b>	Drug	Anti-alopecia	Au	[73]
<b>Keratinocyte growth factor (KGF)</b>	Protein	Wound repair	Au	[68]
<b>Polyphenols-rich extracts (Cornus mas)</b>	Natural extract	Anti-inflammatory (psoriasis)	Au & Ag	[76]
<b>Antimicrobial peptide LL-37 &amp; pDNA: Pro-angiogenic (VEGF) plasmids</b>	Protein & Gene	Diabetic wound healing	Au	[77]
<b>Calreticulin</b>	Protein	Diabetic wound healing	Au	[79]
<b>Curcumin</b>	Natural extract	Anticancer	Ag	[80]



### Conclusions

Bioconjugated plasmonic NPs are a promising approach for topical administration of different cargos for several diseases. The excellent biocompatibility and the readily adjustable physical and chemical features of the plasmonic NPs are highly attractive options for purposefully designed nanomaterials aimed at biomedical applications. Several examples have been presented herein, illustrating the wide range of cargoes and functionalization strategies that might be included when designing a bioconjugated plasmonic NPs. Different physical and chemical parameters should be taken into account when analysing the effect of plasmonic NPs in human skin. While the chemical routes for obtaining on-demand plasmonic NPs are relatively well-established and a large number of simple and reproducible experimental protocols are available, the main frontier for mass usage is still a correct assessment of the toxicity of the NPs. Provided a relevant model for human skin, the experimental conditions for studying location and local concentration of plasmonic NPs greatly differs from those found in the synthesis laboratories. Therefore, this fruitful field of research requires more efforts are to fully understand the penetration mechanism of these bioconjugated plasmonic NPs, enabling the decrease of associated toxicity and the potential long-term environmental impacts. In view of the latest contribution to the field, we speculate that a reliable framework will be available in the short term, enabling the second wave of research for directed synthesis and application of plasmonic NPs at in vivo conditions.

### Acknowledgements

We apologize to authors whose work could not be included in this review due to space restrictions. Support from the Ministry of Science, Innovation and Universities of Spain is acknowledged through the MANA project CTQ2017-83961-R. J.J.G.-C. acknowledges the Ministry of Science, Innovation and Universities of Spain for a “Ramon y Cajal” contract (#RyC-2014-14956). M. C. thanks the “Plan Propio de Investigación” from the Universidad de Córdoba (UCO) and the “Programa

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	202/224




Operativo de fondos FEDER Andalucía” for its financial support through both postdoctoral contracts (Modality 5.2.A).

**Notes and References**

1. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA (2007) Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine* 2:681–693. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.5.681>
2. Giner-Casares JJ, Henriksen-Lacey M, Coronado-Puchau M, Liz-Marzán LM (2016) Inorganic nanoparticles for biomedicine: where materials scientists meet medical research. *Mater Today* 19:19–28. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.07.004>
3. Ogarev VA, Rudoï VM, Dement’eva O V. (2018) Gold Nanoparticles: Synthesis, Optical Properties, and Application. *Inorg Mater Appl Res* 9:134–140. <https://doi.org/10.1134/S2075113318010197>
4. Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, et al (2005) Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview. *Langmuir* 21:10644–10654. <https://doi.org/10.1021/la0513712>
5. Burduşel A-C, Gherasim O, Grumezescu AM, et al (2018) Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials* 8:681. <https://doi.org/10.3390/nano8090681>
6. Woehrle GH, Brown LO, Hutchison JE (2005) Thiol-Functionalized, 1.5-nm Gold Nanoparticles through Ligand Exchange Reactions: Scope and Mechanism of Ligand Exchange. *J Am Chem Soc* 127:2172–2183. <https://doi.org/10.1021/ja0457718>
7. Alba-Molina D, Puente Santiago AR, Giner-Casares JJ, et al (2019)

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	203/224




- Tailoring the ORR and HER electrocatalytic performances of gold nanoparticles through metal–ligand interfaces. *J Mater Chem A* 7:20425–20434. <https://doi.org/10.1039/C9TA05492H>
8. Berry V, Saraf RF (2005) Self-Assembly of Nanoparticles on Live Bacterium: An Avenue to Fabricate Electronic Devices. *Angew Chem Int Ed* 44:6668–6673. <https://doi.org/10.1002/anie.200501711>
  9. Chen Y-S, Hong M-Y, Huang GS (2012) A protein transistor made of an antibody molecule and two gold nanoparticles. *Nat Nanotechnol* 7:197–203. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.7>
  10. Alba-Molina D, Rodriguez-Padron D, Puente Santiago ARR, et al (2018) Mimicking the bioelectrocatalytic function of recombinant CotA laccase via electrostatically self-assembled nanobioconjugates. *Nanoscale*. 11:1549-15554 <https://doi.org/10.1039/C8NR06001K>
  11. Alba-Molina D, Puente Santiago AR, Giner-Casares JJ, et al (2019) Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles as High-Performance Electrocatalysts: The Role of Size in the Electroreduction of Oxygen. *J Phys Chem C* 123:9807–9812. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b00249>
  12. Upadhyayula VKK (2012) Functionalized gold nanoparticle supported sensory mechanisms applied in detection of chemical and biological threat agents: A review. *Anal Chim Acta* 715:1–18. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.008>
  13. Draz MS, Shafiee H (2018) Applications of gold nanoparticles in virus detection. *Theranostics* 8:1985–2017. <https://doi.org/10.7150/thno.23856>
  14. Huang X, El-Sayed MA (2010) Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *J*

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAUXFLYY</a>	Página	204/224



- Adv Res 1:13–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>
15. Vines JB, Yoon J-H, Ryu N-E, et al (2019) Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Front Chem* 7:167. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00167>
  16. Dreaden EC, Austin LA, Mackey MA, El-Sayed MA (2012) Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. *Ther Deliv* 3:457–478. <https://doi.org/10.4155/tde.12.21>
  17. Farooq MU, Novosad V, Rozhkova EA, et al (2018) Gold Nanoparticles-enabled Efficient Dual Delivery of Anticancer Therapeutics to HeLa Cells. *Sci Rep* 8:2907. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21331-y>
  18. Cole LE, Ross RD, Tilley JM, et al (2015) Gold nanoparticles as contrast agents in x-ray imaging and computed tomography. *Nanomedicine* 10:321–341. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.171>
  19. Mahan MM, Doiron AL (2018) Gold Nanoparticles as X-Ray, CT, and Multimodal Imaging Contrast Agents: Formulation, Targeting, and Methodology. *J Nanomater* 2018:1–15. <https://doi.org/10.1155/2018/5837276>
  20. Gong P, Li H, He X, et al (2007) Preparation and antibacterial activity of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ag nanoparticles. *Nanotechnology* 18:285604. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/28/285604>
  21. Durán N, Durán M, de Jesus MB, et al (2016) Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 12:789–799. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.016>
  22. Samberg ME, Oldenburg SJ, Monteiro-Riviere NA (2010) Evaluation of Silver Nanoparticle Toxicity in Skin in Vivo and Keratinocytes in

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	205/224




- Vitro. *Environ Health Perspect* 118:407–413.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.0901398>
23. Brandt O, Mildner M, Egger AE, et al (2012) Nanoscale silver possesses broad-spectrum antimicrobial activities and exhibits fewer toxicological side effects than silver sulfadiazine. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 8:478–488.  
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.07.005>
24. Pegoraro C, MacNeil S, Battaglia G (2012) Transdermal drug delivery: from micro to nano. *Nanoscale* 4:1881.  
<https://doi.org/10.1039/c2nr11606e>
25. Amjadi M, Mostaghaci B, Sitti M (2017) Recent Advances in Skin Penetration Enhancers for Transdermal Gene and Drug Delivery. *Curr Gene Ther* 17:139-146.  
<https://doi.org/10.2174/1566523217666170510151540>
26. Prausnitz MR, Mitragotri S, Langer R (2004) Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 3:115–124. <https://doi.org/10.1038/nrd1304>
27. Patzelt A, Lademann J (2013) Drug delivery to hair follicles. *Expert Opin Drug Deliv* 10:787–797.  
<https://doi.org/10.1517/17425247.2013.776038>
28. Lauterbach A, Müller-Goymann CC (2015) Applications and limitations of lipid nanoparticles in dermal and transdermal drug delivery via the follicular route. *Eur J Pharm Biopharm* 97:152–163.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.06.020>
29. Vogt A, Wischke C, Neffe AT, et al (2016) Nanocarriers for drug delivery into and through the skin — Do existing technologies match clinical challenges? *J Control Release* 242:3–15.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	206/224



- <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.027>
30. Larese Filon F, Mauro M, Adami G, et al (2015) Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regul Toxicol Pharmacol* 72:310–322. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.05.005>
  31. Núñez-Lozano R, Cano M, Pimentel B, de la Cueva-Méndez G (2015) ‘Smartening’ anticancer therapeutic nanosystems using biomolecules. *Curr Opin Biotechnol* 35:135–140. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.07.005>
  32. Campbell CSJ, Contreras-Rojas LR, Delgado-Charro MB, Guy RH (2012) Objective assessment of nanoparticle disposition in mammalian skin after topical exposure. *J Control Release* 162:201–207. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.024>
  33. Zhou Y, Damasceno PF, Somashekar BS, et al (2018) Unusual multiscale mechanics of biomimetic nanoparticle hydrogels. *Nat Commun* 9:181. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02579-w>
  34. Larese Filon F, D’Agostin F, Crosera M, et al (2009) Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* 255:33–37. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.09.025>
  35. Bianco C, Adami G, Crosera M, et al (2014) Silver percutaneous absorption after exposure to silver nanoparticles: A comparison study of three human skin graft samples used for clinical applications. *Burns* 40:1390–1396. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.02.003>
  36. Larese Filon F, Crosera M, Adami G, et al (2011) Human skin penetration of gold nanoparticles through intact and damaged skin. *Nanotoxicology* 5:493–501. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.551428>
  37. Sonavane G, Tomoda K, Sano A, et al (2008) In vitro permeation of

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	207/224





- gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 65:1–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.02.013>
38. Raju G, Katiyar N, Vadukumpully S, Shankarappa SA (2018) Penetration of gold nanoparticles across the stratum corneum layer of thick-Skin. *J Dermatol Sci* 89:146–154.  
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.11.001>
39. Rivera-Gil P, Jimenez De Aberasturi D, Wulf V, et al (2013) The Challenge To Relate the Physicochemical Properties of Colloidal Nanoparticles to Their Cytotoxicity. *Acc Chem Res* 46:743–749.  
<https://doi.org/10.1021/ar300039j>
40. Avci P, Sadasivam M, Gupta A, et al (2013) Animal models of skin disease for drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 8:331–355.  
<https://doi.org/10.1517/17460441.2013.761202>
41. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM (2008) Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicol Lett* 179:93–100. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.04.009>
42. Liu DC, Raphael AP, Sundh D, et al (2012) The Human Stratum Corneum Prevents Small Gold Nanoparticle Penetration and Their Potential Toxic Metabolic Consequences. *J Nanomater* 2012:1–8.  
<https://doi.org/10.1155/2012/721706>
43. Cano M, Núñez-Lozano R, Lumbreras R, et al (2017) Partial PEGylation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles thinly coated with amine-silane as a source of ultrastable tunable nanosystems for biomedical applications. *Nanoscale* 9:812–822.  
<https://doi.org/10.1039/C6NR07462F>
44. Grzelczak M, Pérez-Juste J, Mulvaney P, Liz-Marzán LM (2008)

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	208/224



- Shape control in gold nanoparticle synthesis. *Chem Soc Rev* 37:1783. <https://doi.org/10.1039/b711490g>
45. Hühn J, Carrillo-Carrion C, Soliman MG, et al (2017) Selected Standard Protocols for the Synthesis, Phase Transfer, and Characterization of Inorganic Colloidal Nanoparticles. *Chem Mater* 29:399–461. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b04738>
  46. Sánchez-Iglesias A, Winckelmans N, Altantzis T, et al (2017) High-Yield Seeded Growth of Monodisperse Pentatwinned Gold Nanoparticles through Thermally Induced Seed Twinning. *J Am Chem Soc* 139:107–110. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b12143>
  47. Toy R, Peiris PM, Ghaghada KB, Karathanasis E (2014) Shaping cancer nanomedicine: the effect of particle shape on the in vivo journey of nanoparticles. *Nanomedicine* 9:121–134. <https://doi.org/10.2217/nmm.13.191>
  48. Blanco E, Shen H, Ferrari M (2015) Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol* 33:941–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>
  49. Wang W, Gaus K, Tilley RD, Gooding JJ (2019) The impact of nanoparticle shape on cellular internalisation and transport: what do the different analysis methods tell us? *Mater Horizons* 6:1538–1547. <https://doi.org/10.1039/C9MH00664H>
  50. Fernandes R, Smyth NR, Muskens OL, et al (2015) Interactions of Skin with Gold Nanoparticles of Different Surface Charge, Shape, and Functionality. *Small* 11:713–721. <https://doi.org/10.1002/sml.201401913>
  51. Tak YK, Pal S, Naoghare PK, et al (2015) Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter? *Sci Rep*

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	209/224



- 5:16908. <https://doi.org/10.1038/srep16908>
52. Turkevich J, Kim G (1970) Palladium: Preparation and Catalytic Properties of Particles of Uniform Size. *Science* (80- ) 169:873–879. <https://doi.org/10.1126/science.169.3948.873>
53. Kimling J, Maier M, Okenve B, et al (2006) Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J Phys Chem B* 110:15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>
54. Labouta HI, Liu DC, Lin LL, et al (2011) Gold Nanoparticle Penetration and Reduced Metabolism in Human Skin by Toluene. *Pharm Res* 28:2931–2944. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0561-z>
55. Labouta HI, El-Khordagui LK, Kraus T, Schneider M (2011) Mechanism and determinants of nanoparticle penetration through human skin. *Nanoscale* 3:4989. <https://doi.org/10.1039/c1nr11109d>
56. Huang Y, Yu F, Park Y-S, et al (2010) Co-administration of protein drugs with gold nanoparticles to enable percutaneous delivery. *Biomaterials* 31:9086–9091. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.046>
57. Hong S, Bielinska AU, Mecke A, et al (2004) Interaction of Poly(amidoamine) Dendrimers with Supported Lipid Bilayers and Cells: Hole Formation and the Relation to Transport. *Bioconjug Chem* 15:774–782. <https://doi.org/10.1021/bc049962b>
58. Kirjavainen M, Urtti A, Jääskeläinen I, et al (1996) Interaction of liposomes with human skin in vitro — The influence of lipid composition and structure. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab* 1304:179–189. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(96\)00126-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(96)00126-9)
59. Shanmugam S, Song C-K, Nagayya-Sriraman S, et al (2009)

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	210/224



- Physicochemical characterization and skin permeation of liposome formulations containing clindamycin phosphate. Arch Pharm Res 32:1067–1075. <https://doi.org/10.1007/s12272-009-1713-0>
60. Lee O, Jeong SH, Shin WU, et al (2013) Influence of surface charge of gold nanorods on skin penetration. Ski Res Technol 19:e390–e396. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2012.00656.x>
  61. Mahmoud NN, Al-Qaoud KM, Al-Bakri AG, et al (2016) Colloidal stability of gold nanorod solution upon exposure to excised human skin: Effect of surface chemistry and protein adsorption. Int J Biochem Cell Biol 75:223–231. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.02.020>
  62. Hao F, Jin X, Liu QS, et al (2017) Epidermal Penetration of Gold Nanoparticles and Its Underlying Mechanism Based on Human Reconstructed 3D Episkin Model. ACS Appl Mater Interfaces 9:42577–42588. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b13700>
  63. Suk JS, Xu Q, Kim N, et al (2016) PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. Adv Drug Deliv Rev 99:28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>
  64. Tsai H-C, Hsiao PF, Peng S, et al (2016) Enhancing the in vivo transdermal delivery of gold nanoparticles using poly(ethylene glycol) and its oleylamine conjugate. Int J Nanomedicine 11:1867-1878. <https://doi.org/10.2147/IJN.S102599>
  65. Mahmoud NN, Alkilany AM, Dietrich D, et al (2017) Preferential accumulation of gold nanorods into human skin hair follicles: Effect of nanoparticle surface chemistry. J Colloid Interface Sci 503:95–102. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.05.011>
  66. Labala S, Mandapalli PK, Kurumaddali A, Venuganti VVK (2015) Layer-by-Layer Polymer Coated Gold Nanoparticles for Topical

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	211/224




- Delivery of Imatinib Mesylate To Treat Melanoma. *Mol Pharm* 12:878–888. <https://doi.org/10.1021/mp5007163>
67. Bessar H, Venditti I, Benassi L, et al (2016) Functionalized gold nanoparticles for topical delivery of methotrexate for the possible treatment of psoriasis. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 141:141–147. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.021>
68. Pan A, Zhong M, Wu H, et al (2018) Topical Application of Keratinocyte Growth Factor Conjugated Gold Nanoparticles Accelerate Wound Healing. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 14:1619–1628. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.04.007>
69. Niu J, Chu Y, Huang Y-F, et al (2017) Transdermal Gene Delivery by Functional Peptide-Conjugated Cationic Gold Nanoparticle Reverses the Progression and Metastasis of Cutaneous Melanoma. *ACS Appl Mater Interfaces* 9:9388–9401. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b16378>
70. Chen Y, Wu Y, Gao J, et al (2017) Transdermal Vascular Endothelial Growth Factor Delivery with Surface Engineered Gold Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces* 9:5173–5180. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b15914>
71. Safwat MA, Soliman GM, Sayed D, Attia MA (2017) Gold nanoparticles capped with benzalkonium chloride and poly (ethylene imine) for enhanced loading and skin permeability of 5-fluorouracil. *Drug Dev Ind Pharm* 43:1780–1791. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1339082>
72. Safwat MA, Soliman GM, Sayed D, Attia MA (2018) Fluorouracil-Loaded Gold Nanoparticles for the Treatment of Skin Cancer: Development, in Vitro Characterization, and in Vivo Evaluation in a

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAXFLYY</a>	Página	212/224



- Mouse Skin Cancer Xenograft Model. *Mol Pharm* 15:2194–2205. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00047>
73. Boca S, Berce C, Jurj A, et al (2017) Ruxolitinib-conjugated gold nanoparticles for topical administration: An alternative for treating alopecia? *Med Hypotheses* 109:42–45. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.09.023>
74. Anirudhan TS, Nair SS, Sasidharan A V. (2017) Methacrylate-Stitched  $\beta$ -Cyclodextrin Embedded with Nanogold/Nanotitania: A Skin Adhesive Device for Enhanced Transdermal Drug Delivery. *ACS Appl Mater Interfaces* 9:44377–44391. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b16686>
75. Anirudhan TS, Nair SS, Sekhar. V C (2017) Deposition of gold-cellulose hybrid nanofiller on a polyelectrolyte membrane constructed using guar gum and poly(vinyl alcohol) for transdermal drug delivery. *J Memb Sci* 539:344–357. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.05.054>
76. Crisan D, Scharffetter-Kochanek K, Crisan M, et al (2018) Topical silver and gold nanoparticles complexed with *Cornus mas* suppress inflammation in human psoriasis plaques by inhibiting NF- $\kappa$ B activity. *Exp Dermatol* 27:1166–1169. <https://doi.org/10.1111/exd.13707>
77. Wang S, Yan C, Zhang X, et al (2018) Antimicrobial peptide modification enhances the gene delivery and bactericidal efficiency of gold nanoparticles for accelerating diabetic wound healing. *Biomater Sci* 6:2757–2772. <https://doi.org/10.1039/C8BM00807H>
78. Fratoddi I, Benassi L, Botti E, et al (2019) Effects of topical methotrexate loaded gold nanoparticle in cutaneous inflammatory mouse model. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 17:276–286.


Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	213/224



<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.01.006>

79. Hernández Martínez SP, Rivera González TI, Franco Molina MA, et al (2019) A Novel Gold Calreticulin Nanocomposite Based on Chitosan for Wound Healing in a Diabetic Mice Model. *Nanomaterials* 9:75. <https://doi.org/10.3390/nano9010075>
80. Mandal B, Rameshbabu AP, Soni SR, et al (2017) In Situ Silver Nanowire Deposited Cross-Linked Carboxymethyl Cellulose: A Potential Transdermal Anticancer Drug Carrier. *ACS Appl Mater Interfaces* 9:36583–36595. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b10716>

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	214/224



# *Conclusiones*

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAFXLYY</a>	Página	215/224





Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	216/224



## CONCLUSIONES

Al final de cada artículo en el capítulo III de esta Memoria se incluye un conjunto de conclusiones particulares del estudio desarrollado. En este apartado se presentan de forma general las conclusiones de toda la investigación realizada durante el periodo de formación del doctorando.

De manera general, los resultados presentados a lo largo de esta memoria contribuyen a la comprensión sobre la síntesis y adecuada funcionalización de nanoestructuras basadas en oro, que abre nuevas vías hacia futuras aplicaciones de estos materiales que exploten las propiedades fisicoquímicas aquí demostradas, así como su enorme potencial como electrocatalizadores y como vehículos para el transporte de fármacos en biomedicina. Más concretamente:

1. Empleando AuNPs estabilizadas con citrato, se ha evaluado la influencia del tamaño de partícula sobre las propiedades electrocatalíticas para la reacción de reducción de oxígeno (ORR). Las AuNPs de 15 nm de diámetro y estabilizadas con citrato tienen un rendimiento electrocatalítico comparable a los reportados previamente para clústeres de Au. Este trabajo adelanta el posible papel crucial que los ligandos estabilizantes que recubren el núcleo de Au juegan en la actividad electrocatalítica de estos nanomateriales.
2. Por primera vez, se emplearon AuNPs sin dopar, sintetizadas químicamente, como material electrocatalizador bifuncional, para las reacciones catódicas de ORR y HER, mostrando un elevado rendimiento electrocatalítico en ambos casos. Además, se demostró la influencia drástica que ejerce la interfase metal-ligando en el rendimiento electrocatalítico de ambas reacciones. Experimentalmente, se ha demostrado que la funcionalización química de la superficie metálica de las nanoestructuras puede ajustar finamente la actividad electrocatalítica, especialmente interesante para las tecnologías de hidrógeno, tales como celdas de combustible y electrólisis de agua.
3. Mediante autoensamblaje electrostático, se ha preparado un bioconjugado de AuNPs recubiertas de citrato y la enzima lacasa CotA. Como resultado de la formación de una monocapa perfectamente ordenada de múltiples moléculas de

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	217/224



### Conclusiones

---

enzima sobre la superficie de cada partícula de oro, se observa la función bioelectrocatalítica para la ORR de dicha biomolécula, imitando su comportamiento en las membranas de las bacterias. De este modo, se abre el camino hacia el diseño de nuevos sistemas nanobioelectrocatalíticos.

- Los sistemas bioconjugados basados en NPs plasmónicas son una alternativa prometedora para la administración directa de diferentes tipos de medicamentos por vía dérmica. En esta revisión bibliográfica, se han recopilado los últimos avances reportados en el campo, haciendo especial énfasis en la estrategia empleada para la funcionalización, el tipo de fármaco transportado y la enfermedad tratada.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUUXFLYY</a>	Página	218/224



# *Apéndices*

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	219/224



Registro Electrónico de la Universidad de Córdoba
ENTRADA
03/06/2020 12:16
2020022100

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	220/224



• **Publicaciones derivadas directamente de la Tesis:**

– “*Bioconjugated plasmonic nanoparticles for enhanced skin penetration*” by Alba-Molina, David; Giner-Casares, Juan J.; Cano, Manuel, *TOPICS IN CURRENT CHEMISTRY* Volumen: 378 Número: 1 Número de artículo: 8, **2020**  
JCR Impact Factor

**Impact factor (2018):** 5.5

**Category:** Chemistry, Multidisciplinary

**Quartile (2018):** 1 (34/171)

– “*Tailoring the ORR and HER electrocatalytic performances of gold nanoparticles through metal-ligand interfaces*” by Alba-Molina, David; Puente Santiago, Alain R.; Giner-Casares, Juan J.; Rodriguez-Castellon, Enrique; Martin-Romero, Maria T.; Camacho, Luis; Luque, Rafael; Cano, Manuel, *JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY A* Volumen: 7 Número: 35 Páginas: 20425-20434, **2019**

JCR Impact Factor

**Impact factor (2018):** 9.9

**Category:** Chemistry, Physical

**Quartile (2018):** 1 (D1, 14/146)

– “*Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles as High-Performance Electrocatalysts: The Role of Size in the Electroreduction of Oxygen*” by Alba-Molina, David; Puente Santiago, Alain R.; Giner-Casares, Juan J.; Martin-Romero, Maria T.; Camacho, Luis; Luque, Rafael; Cano, Manuel, *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY C* Volumen: 123 Número: 15 Páginas: 9807-9812, **2019**


JCR Impact Factor

**Impact factor (2018):** 5.9

**Category:** Materials science, Multidisciplinary

**Quartile (2018):** 1 (42/285)

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMVHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	221/224



*Apéndice I*

---

– “*Mimicking the bioelectrocatalytic function of recombinant CotA laccase through electrostatically self-assembled bioconjugates*” by Alba-Molina, David; Rodriguez-Padron, Daily; Puente-Santiago, Alain R.; Giner-Casares, Juan J.; Martin-Romero, Maria T.; Camacho, Luis; Martins, Ligia O.; Munoz-Batista, Mario J.; Cano, Manuel; Luque, Rafael, *NANOSCALE* Volumen: 11 Número: 4 Páginas: 1549-1554, **2019**

JCR Impact Factor

**Impact factor (2018): 7.2**

**Category:** Chemistry, Multidisciplinary

**Quartile (2018): 1 (25/171)**

- **Publicaciones no derivadas directamente de la Tesis:**

– “*Unravelling the 2D self-assembly of Fmoc-dipeptides at fluid interfaces*” by Pablo G. Argudo, Rafael Contreras-Montoya, Luis Álvarez de Cienfuegos, Juan M. Cuerva, Manuel Cano, David Alba-Molina, María T. Martín-Romero, Luis Camacho and Juan J. Giner-Casares, *SOFT MATTER* Volumen 14, Páginas: 9343-9350, **2018**

- JCR Impact Factor

- **Impact factor (2018): 3.709**

- **Category:** Chemistry, Physical

- **Quartile (2018): 2**

A-2

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWUAUXFLYY</a>	Página	222/224



- **Becas y ayudas competitivas:**

- Beca para estancia de investigación en el Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT, Boston, EEUU) por un periodo de 2 meses “programa MISTI - Spain "la Caixa" Foundation Seed Fund.” año 2018/2019. Período de estancia: 29/09/2019 a 01/12/2019.

- **Comunicaciones orales y poster en congresos:**

- • JICI 2020 Reunión de jóvenes investigadores en coloides e interfaces: Ponencia Oral “Ligand-Regulated Bifunctional Electrocatalytic Activity of Gold Nanoparticles for Hydrogen-Based Energy Technologies” Zaragoza (España), **2020**.


- • VIII Congreso de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba: Ponencia Oral “Influencia del ligando en el rendimiento electrocatalítico de cátodos para tecnologías de hidrógeno basados en nanopartículas de oro”, Córdoba (España), **2020**.

- • RICI 8th Iberian meeting on colloids and interfaces, Póster: “Ligand-Regulated Photothermal Performance of Bipyramidal Gold Nanoparticles”, Ponencia Oral: “Effect of the Capping Ligand on the Electrocatalytic Performance of Gold Nanoparticles for Fuel Cell-and Water Splitting-Cathodes” Aveiro (Portugal), **2019**.

- • SECAT´19: Póster “Influence of the Metal-Ligand Interface on the Electrocatalytic Performance of Gold Nanoparticles for the Oxygen Reduction Reaction”, Córdoba (España), **2019**.

- • NANO UCO: Póster 1 “Influencia del Tamaño en las Propiedades Catalíticas de Nanopartículas de Oro Estabilizadas con Citrato para la Electroreducción de Oxígeno”, Póster 2: “Effect of Plasmonic Gold Nanoparticles on the Fluorescence of an Hybrid Organic-Imorganic Perovskite film”, Córdoba (España), **2019**.

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAWUXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAWUXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAWUXFLYY</a>	Página	223/224





*Apéndice I*

---

A-4

Código Seguro de Verificación	VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY	Fecha	03/06/2020 12:16:37
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 59/2003, 19 de diciembre, de firma electrónica		
Firmante	DAVID ALBA MOLINA		
Url de verificación	<a href="http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY">http://sede.uco.es/verifirma/code/VCECPGAYHMHU25XQEWAXFLYY</a>	Página	224/224

