



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Aplicaciones de los metalacboranos en el campo de la biomedicina y de la energía

Isabel Fuentes Sempere

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Química

Director: Prof. Francesc Teixidor Bombardó

Tutora: Prof. Josefina Pons Picart

Departament de Química

Facultat de Ciències

2019

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor por

Isabel Fuentes Sempere

Con el visto bueno de

Prof. Francesc Teixidor Bombardó

Prof. Josefina Pons Picart

Bellaterra, 17 de Junio de 2019



El Prof. Francesc Teixidor Bombardó, Profesor Investigador del *Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)* del *Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona (ICMAB)*.

CERTIFICA:

Que Isabel Fuentes Sempere, graduada en Química y con el máster en Ciencia de los Materiales, ha realizado bajo su dirección el trabajo de tesis que lleva el título *“Aplicaciones de los metalacarboranos en el campo de la biomedicina y de la energía”* que queda recogido en esta memoria para optar al título de Doctora por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Para que así conste y tenga los efectos correspondientes, firma este certificado en Bellaterra, a 17 de Junio de 2019.

Prof. Francesc Teixidor Bombardó

ICMAB-CSIC

Este trabajo de investigación ha estado financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología CICYT mediante los proyectos CTQ2013-44670-R y CTQ2016-75150-R, por la Generalitat de Catalunya con el proyecto 2014/SGR/149 y por los proyectos de la Unión Europea FP7-OCEAN-2013 y H2020-NMBP-13-2017.

Este trabajo de investigación, con fecha de defensa 16 de Julio de 2019, tiene como miembros del tribunal a:

- Presidente: Prof. Abdelhamid Errachid El Salhi, Investigador del Institut de Sciences Analytiques

- Vocal: Dr. Olivier Diat, Investigador del Institut de Chimie Séparative de Marcoule, Francia.

- Secretario: Dr. Gonzalo Guirado López, Profesor Titular del Departamento de Química Física de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Como miembros suplentes:

- Suplente 1: Dra. Rosario Núñez Aguilera, Investigadora Científica del Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona (ICMAB-CSIC).

- Suplente 2: Dra. María Isabel Romero García, Profesora Titular del Departamento de Química de la Universitat de Girona.

Agradecimientos

La primera persona a la que quiero agradecer el trabajo realizado en esta tesis doctoral es a mi director de tesis el Prof. Francesc Teixidor. Gracias Francesc por darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en tu grupo de investigación durante estos cuatro años, en los que me he formado como científica y he crecido como persona. Gracias por tus sabios consejos y por enseñarme a no tirar la toalla cuando los experimentos no salen. Gracias por darme la oportunidad de enseñar a dos estudiantes de máster (Ekta y Sara), sobretodo de mejorar mi inglés con ellas jajaja. Gracias por confiar en mí al darme los temas de investigación, me han encantado excepto el del SO₂, como ya sabes jajaja. Gracias por poder acabar la tesis con 8 artículos publicados.. y los que quedan!! Mil gracias Francesc!!!

También quiero agradecer el trabajo realizado en esta tesis doctoral a la Prof. Clara Viñas, que aunque no sea mi directora de tesis para mí es como si lo fuese. Gracias Clara por todos los consejos, por la dedicación y la paciencia que has tenido conmigo. Gracias por dejarme trabajar contigo en el campo de la biomedicina con los estudios del ADN, realmente me han fascinado. Gracias por toda la ayuda que me has ofrecido, tanto en el ámbito académico como personal. Mil gracias Clara!!!

A la Dr. Rosario Núñez y al Dr. Pepe Giner por sus consejos y por su total disponibilidad para hablar de cualquier tema. Gracias por organizar las excursiones anuales del grupo, la verdad que se agradece desconectar una vez al año y hacer alguna actividad al aire libre, ya sea haciendo barbacoas o alguna excursión por la montaña. Y gracias por vuestro apoyo y ánimo durante todo el periodo de mi tesis doctoral, sobre todo al final.

Al director del Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona (ICMAB-CSIC) el Prof. Xavier Obradors por acogerme en el centro. A todo el personal de administración y mantenimiento que siempre han sido tan amables ayudándome en cualquier problema que he tenido.

A la Prof. Josefina Pons Picart de la Universidad Autónoma de Barcelona por haber aceptado la tutoría de esta tesis doctoral y por estar siempre disponible cuando la he necesitado.

También quiero dar las gracias al Prof. Diego Cazorla Amorós y a la Prof. Emilia Morallón que fueron mis directores del Máster en la Universidad de Alicante. Gracias a vosotros me empezó a gustar la investigación y decidí hacer el doctorado. Gracias a vosotros me especialicé en electroquímica y conseguí la plaza vacante para hacer el doctorado con el Prof. Francesc Teixidor. Y tuve la gran suerte de colaborar con vosotros durante la tesis y hacer dos estancias muy fructíferas.

Al Dr. Ramiro Ruiz Rosas, gracias por tus consejos, por tu predisposición, por enseñarme el nivel experto del Excel y por tu colaboración en el trabajo de los supercondensadores. A la Dr. María José Mostazo por tu paciencia, tus consejos y tu colaboración durante mi segunda estancia en Alicante.

Gracias a todas las personas que he conocido durante las dos estancias en la Universidad de Alicante, por compartir buenos momentos en comidas, cenas, jugando al pádel, en tesis y congresos. En especial gracias a Sara López, María José, Carolina, María, Sandra, Alejandro, Javi C. y Javi Q.

Al Prof. Vicente Compañ, al Dr. Andreu Andrio, al Dr. Jorge Escorihuela y al Dr. Abel García por su paciencia, dedicación y colaboración en las medidas de impedancia para calcular las conductividades iónicas.

A la Prof. Encarnación Lorenzo, la Dr. Tania Garcia, la Prof. Fernanda Marques y el Prof. Hiroyuki Nakamura por su colaboración en el campo de la biomedicina y hacer posible que esta tesis doctoral sea más completa.

Al Prof. Salvador Ventura y a Jordi Pujols por sus consejos, dedicación y colaboración con el tema de las proteínas. Gracias al grupo de investigación del Prof. Salvador Ventura, me he sentido como una más en vuestro grupo cada vez que he ido a hacer experimentos con vosotros. Gracias a Marta Díaz por poder participar en un trocito de tu tesis.

Al servicio de análisis químico por los análisis elementales y por el dicroísmo circular. Al servicio de microscopia de la UAB por las imágenes de Cryo-TEM, a Pablo y a Martí. A Judit y Ana Esther por las imágenes de TEM y de SEM. A Amable por tener tanta paciencia en enseñarme el DLS y el ξ -potencial. A Roberta por los ATGs. A Anna y a Jaume por los RMNs. A Nanoquim por usar el fluorímetro. Gracias a todos.

A Jordi Cortés por encargarse de la compra de los productos del grupo, de tener siempre el laboratorio ordenado y limpio y por su ayuda cuando la he necesitado. A Víctor Arderiu y a Bego Buades por hacer los MALDI-TOF de todas mis muestras y las de todo el grupo.

A mis compañeros de grupo que ahora están: Bego, Arpita, Abhishek, Flavia, Lei, Sohini, Zheng, Mahdi, Albert, Zsolt, Miquel, Joan, Isabel G y Pol; y a los que se fueron: Víctor, Justo, Inés, Adnana, Elena y Màrius. En especial quiero darle las gracias a Bego, por estar siempre cuando he necesitado a alguien en los malos y buenos momentos, por tus sabios consejos tanto en ciencia como en cosas personales, por compartir experiencias en viajes, excursiones, cenas, comidas, barbacoas, en el saf... Gracias amiga!!

A la gente del ICMAB que he ido conociendo durante los cuatro años de doctorado, con los que he compartido viajes y excursiones, cumpleaños, cenas de tesis, pádel y squash... a Bego, Cristiano, Juanan, Cristina, Javi, Quique, Edu, Martí, Cristina, Pau, Camilla, Francesco, Roxana, Aleandro, Adri, Mayte, Osnat, Jose, Elena. Y a la gente de squash, sobre todo a las chicas Mar, Helena, Helena M., Ari, Josune, Rachel y Sonia, con las que he compartido buenos momentos.

A mi familia por su gran apoyo durante estos cuatro años de tesis, aunque he estado lejos de todos vosotros siempre os he tenido presente. Y a mi gran amor y compañero de vida, Uri, gracias por apoyarme y darme ánimos cuando más lo necesitaba, gracias por confiar en mí y por tener paciencia sobre todo en la recta final de la tesis, en la escritura. Gracias por compartir conmigo momentos inolvidables.

*Sólo aquellos que intentan el absurdo
pueden lograr lo imposible.*

Albert Einstein

Organización del manuscrito

De acuerdo con la normativa vigente y previa aceptación por la Comisión de Doctorado de la Universidad Autónoma de Barcelona esta memoria se presenta como compendio de publicaciones, fue aprobada el 30 de Abril de 2019 con las siguientes publicaciones:

- “Metallacarboranes as tunable redox potential electrochemical indicators for screening of gene mutation” Tania García-Mendiola, Victoria Bayon-Pizarro, Adnana Zaulet, Isabel Fuentes, Félix Pariente, Francesc Teixidor, Clara Vinas and Encarnación Lorenzo, *Chem. Sci.*, **2016**, 7, 5786-5797.
- “Metallacarboranes on the road to anticancer therapies: celular uptake, DNA interaction, and biological evaluation of cobaltabisdicarbollide [COSAN]” Isabel Fuentes, Tania García-Mendiola, Shinichi Sato, Marcos Pita, Hiroyuki Nakamura, Encarnación Lorenzo, Francesc Teixidor, Fernanda Marques and Clara Viñas, *Chem. Eur. J.*, **2018**, 24, 17239-17254.
- “Enhanced conductivity of sodium versus lithium salts measured by impedance spectroscopy. Sodium cobaltacarboranes as electrolytes of choice” Isabel Fuentes, Andreu Andrio, Francesc Teixidor, Clara Viñas and Vicente Compañ, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2017**, 19, 15177-15186.
- “Structural and dielectric properties of cobaltacarborane composite polybenzimidazole membranes as solid polymer electrolytes at high temperature” Isabel Fuentes, Andreu Andrio, Abel García-Bernabé, Jorge Escorihuela, Clara Viñas, Francesc Teixidor and Vicente Compañ, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2018**, 20, 10173-10184.
- “Tailored metallacarboranes as mediators for boosting the stability of carbon-based aqueous supercapacitors” Ramiro Ruiz-Rosas, Isabel Fuentes, Clara Viñas, Francesc Teixidor, Emilia Morallón and Diego Cazorla-Amorós, *Sustainable Energy Fuels*, **2018**, 2, 345-352.

Abstract

The work presented in this thesis is part of the research that has been done in boron chemistry within the group of Inorganic Materials and Catalysis at the Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC) during the last 4 years, in particular on cobalt and ferrabisdicarbollide metallocarboranes ($[3,3'\text{-Co}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]$, COSANE; and $[3,3'\text{-Fe}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]$, FESANE, respectively). The research has been focused mainly on the use of metallocarboranes in different applications in the field of biomedicine and energy. The thesis has been divided in the following 5 chapters:

➤ Chapter 1: Introduction.

This chapter explains the different types of boron clusters (boranes, carboranes and metallocarboranes) and the most important properties (self-assembly and redox properties) and applications (biomedicine, materials science and energy) of metallocarboranes to understand the research done in the chapters 2, 3, 4 and 5.

➤ Chapter 2: Interaction between DNA and metallocarboranes, biodistribution and application as mutagenic sensor.

This chapter is divided in three parts: 1) The study of interaction between DNA and the metallocarboranes Na[COSANE], Na[FESANE] and Na[Cl₆-FESANE] using the techniques: melting curve, circular dichroism, UV-Visible, DLS, Cryo-TEM, TEM, IR, raman and optical microscope. 2) The study of the cellular viability, the cellular uptake and distribution of Na[COSANE] in glioblastoma U87 and melanoma A375 cells, the cellular uptake and distribution of boron in horse blood and the biodistribution of boron in normal mice. And 3) the study of Na[FESANE] and Na[Cl₆-FESANE] as redox mediators in DNA sensors to detect mutations.

➤ Chapter 3: Interaction between BSA and metallocarboranes and their application as protective agent in front of denaturation.

This chapter is divided in two parts: 1) The study of interaction between BSA and the metallocarborane Na[COSANE] using the techniques: DLS,

TEM, RMN, circular dichroism, fluorescence, ξ -potential, IR, SEM-EDX and elemental analysis. Due to the self-assembling properties of Na[COSANE], each individual BSA is coated with 100 Na[COSANE] molecules, due to hydrogen and di-hydrogen bonds with amine residues. And 2) the study of the stability of BSA in presence and absence of Na[COSANE] upon thermal and chemical induced denaturation.

➤ Chapter 4: Polymers doped with metallacarboranes and study of their properties to be used in fuel cells, batteries and supercapacitors.

This chapter is divided in two parts: 1) The study of the physicochemical and thermal properties and the ionic conductivity of the polymer PBI doped with different salts of metallacarboranes (M [COSANE], where $M = Na^+$, Li^+ and H^+) and tetraphenylborate (M' [TPB], where $M' = Na^+$ and Li^+) to be used in fuel cells and batteries. And 2) the study of electrochemical properties (specific capacitance and overoxidation limit resistance), SEM-EDX, electrical conductivity and thermal properties of the polymer PEDOT doped with different salts (M [COSANE], where $M = Cs^+$, Na^+ , Li^+ and H^+) and derivatives ($Cs[Cl_x-COSANE]$, where $x = 2, 4$ and 6) of metallacarboranes to be used in supercapacitors.

➤ Chapter 5: Metallacarboranes as mediator to enhance the stability of aqueous supercapacitors based on activated carbon.

This chapter is mainly focussed on the use of the metallacarborane $Na[Cl_4-COSANE]$ as additive in YP50F commercial activated carbon in asymmetric aqueous supercapacitor to enhance the stability. For that, different quantities of $Cl_4-COSANE$ are adsorbed in the porous of activated carbon (0.15, 0.45 and 1.00 mmol/g). These samples are characterized using N_2 adsorption isotherm, DRX and XPS. The specific capacitance and the electrochemical stability windows (positive and negative windows) are measured in a three compartment cell to know the conditions to construct the asymmetric aqueous supercapacitor. Therefore, the GCD curves obtained for the sample with 0.15 mmol/g confirms that the $Cl_4-COSANE$ enhances the stability and can act as inhibitor of carbon oxidation and water decomposition of aqueous supercapacitors.

Abreviaciones

| | |
|------------------------|--|
| A375 | Melanoma |
| ACN | Acetonitrilo |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AFM | Microscopio de fuerza atómica |
| Ala | Alanina |
| Arg | Arginina |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| A-T | Adenina-Timina |
| ATG | Análisis termogravimétrico |
| A-U | Adenina-Uracilo |
| BNCT | Terapia de captura neutrónica en boro |
| BPA | L-p-dihidroxiboro-fenilalanina |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| BSH | Mercapto-closo-dodecaborato de sodio |
| C_c-H | Hidrógeno del carbono del clúster |
| CD | Dicroísmo circular |
| C_g | Capacidad específica |
| CNTs | Nanotubos de carbono |
| COSANE | Cobaltabis(dicarbolluro) |
| CryoTEM | Microscopio electrónico criogénico |
| CT-<i>ds</i>DNA | ADN de doble cadena del timo del ternero |

| | |
|-----------------|--|
| CT-ssDNA | ADN de cadena simple del timo del ternero |
| CV | voltametría cíclica |
| Cys | Cisteína |
| DBS | Dodecilbenceno sulfonato |
| DFT | Teoría de densidad funcional |
| DLS | Dispersión dinámica de luz |
| DMEM | Medio de cultivo <i>Dubelcco's modified Eagle medium</i> |
| DPV | Voltametría de pulso diferencial |
| DRX | Difracción de Rayos-X |
| EC:DMC | Carbonato de etileno : Dimetil carbonato |
| EDX | Energía dispersiva de Rayos-X |
| EELS | Espectroscopia de pérdida de energía de electrones |
| EFTEM | Microscopio electrónico de transmisión de energía filtrada |
| ESI | Ionización por electrospray |
| FBS | Suero fetal bovino |
| Fc | Ferroceno |
| FESANE | Ferrabis(dicarballuro) |
| GC | <i>Glassy carbon</i> |
| G-C | Guanina-Citosina |
| GCD | Curva de carga y descarga |
| Gly | Glicina |
| GO | Óxido de grafeno |

| | |
|------------------------|--|
| HEK 293 | Células embrionarias del riñón humano |
| HEPES | Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico |
| His | Histidina |
| HRTEM | Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución |
| HSA | Albúmina sérica humana |
| IC₅₀ | Concentración con el 50% de inhibición de viabilidad celular |
| ICP-MS | Plasma acoplado inductivamente - Espectroscopia de masas |
| ICP-OES | Plasma acoplado inductivamente – Emisión óptica |
| IR | Infrarrojo |
| K_b | Constante intrínseca de enlace |
| LSV | Voltametría de barrido lineal |
| Lys | Lisina |
| MALDI-TOF | Desorción/ionización láser asistida matriz – Tiempo de vuelo |
| Met | Metionina |
| MOF | <i>Metal-organic framework</i> |
| MTT | Sal de tetrazolio |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |
| OCP | Potencial a circuito abierto |
| PAM | Poliacrilamida |
| PAN | Poliacrilonitrilo |
| PANI | Polianilina |
| PBI | Polibenzimidazol |

| | |
|-----------------|--|
| PCBM | [6,6]fenil-C ₆₁ -ácido butírico metil éster |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PEDOT | Poli(3,4-etilendioxitiofeno) |
| PEI | Polietilenimina |
| PEM | Membrana polimérica electrolítica |
| PEO | Óxido de polietileno |
| PEOX | Poli(etiloxazolina) |
| PF | Polifurano |
| pI | punto isoeléctrico |
| PMMA | Polimetilmetacrilato |
| PPy | Polipirrol |
| PSS | Poliestirensulfonato |
| PSSA | Ácido poliestireno sulfónico |
| PTFE | Politetrafluoroetileno |
| PTh | Politiofeno |
| PVA | Alcohol de polivinilo |
| PVDF | Polifluoruro de vinilideno |
| PVDF-HFP | Polifluoruro de vinilideno – Hexafluoruro de propileno |
| PVP | Polivinilpirrolidona |
| PVPA | Ácido polivinilfosfónico |
| RH | Humedad relativa |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |

| | |
|------------------------|--|
| S | Secuencia |
| S_{BET} | Área superficial específica |
| SC | Secuencia complementaria |
| SEM | Microscopio electrónico de barrido |
| SM | Secuencia mutada |
| SNC | Secuencia no complementaria |
| SP | Secuencia con polimorfismos |
| SPEEK | Poli(éter éter corona sulfonado) |
| ssDNA | ADN de cadena sencilla |
| STEM | Microscopio electrónico de transmisión de barrido |
| TEM | Microscopio electrónico de transmisión |
| THF | Tetrahidrofurano |
| T_m | Temperatura de desnaturalización |
| TPB | Tetrafenilborato |
| TPD | Desorción a temperatura programada |
| U87 | Glioblastoma |
| V79 | Fibroblastos |
| V_{DR} | Volumen de microporos |
| XPS | Espectroscopia fotoelectrónica de Rayos-X |
| YP50F | Carbón activado comercial |
| Y-XXX | XXX = mmol de Cl ₄ -COSANE por gramo de YP50F |

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1. Antecedentes históricos del boro y de los boranos. | 3 |
| 1.2. Clústeres de boro. | 4 |
| 1.2.1. Boranos. | 4 |
| 1.2.2. Carboranos. | 6 |
| 1.2.3. Metalacarboranos. | 8 |
| 1.3. Propiedades fisicoquímicas de los metalacarboranos. | 11 |
| 1.3.1. Capacidad de autoensamblaje. | 12 |
| 1.3.2. Propiedades redox. | 14 |
| 1.4. Aplicaciones de los metalacarboranos. | 17 |
| 1.4.1. Aplicaciones en biomedicina. | 17 |
| 1.4.2. Aplicaciones en ciencia de los materiales. | 18 |
| 1.4.3. Aplicaciones en energía. | 20 |
| 1.5. Objetivos generales. | 22 |
| 1.6. Referencias. | 22 |
| 2. INTERACCIÓN ENTRE EL ADN Y LOS METALACARBORANOS, BIODISTRIBUCIÓN Y APLICACIÓN COMO SENSOR MUTAGÉNICO | 31 |
| 2.1. Estado actual. | 31 |
| 2.1.1. Ácidos nucleicos. | 31 |
| 2.1.2. Ácidos nucleicos y metalacarboranos. | 33 |
| 2.2. Objetivos. | 36 |
| 2.3. Interacción entre el ADN y los metalacarboranos. | 36 |
| 2.3.1. Curva de desnaturalización y dicroísmo circular. | 37 |
| 2.3.2. Absorción UV-Visible. | 41 |
| 2.3.3. Dispersión dinámica de luz (DLS), CryoTEM y TEM. | 44 |

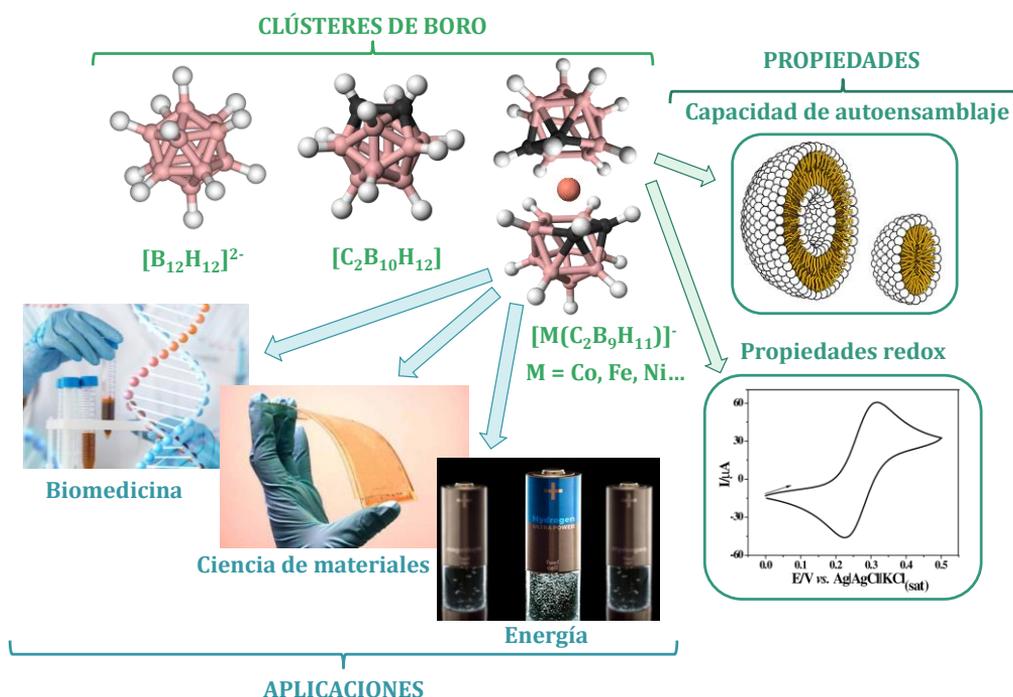
| | |
|--|----|
| 2.3.4. Aislamiento de CT- <i>ds</i> DNA-Na[COSANE] y caracterización por IR, Raman, Microscopio Óptico y TEM. | 49 |
| 2.4. Distribución de Na[COSANE] en células, sangre y ratones. | 50 |
| 2.4.1. Distribución de Na[COSANE] en células. | 52 |
| 2.4.2. Distribución de Na[COSANE] en sangre. | 55 |
| 2.4.3. Distribución de Na[COSANE] en ratones. | 57 |
| 2.5. Marcadores electroquímicos en sensores de ADN. | 58 |
| 2.5.1. Interacción entre CT- <i>ds</i> DNA y Na[FESANE]/Na[Cl ₆ -FESANE] mediante voltametría de pulso diferencial (DPV). | 62 |
| 2.5.2. Sensor de ADN. | 63 |
| 2.5.3. Biosensor para detectar mutaciones genéticas. | 66 |
| 2.6. Conclusiones. | 69 |
| 2.7. Referencias. | 71 |
| 3. INTERACCIÓN ENTRE LA ALBÚMINA SÉRICA BOVINA Y LOS METALACARBORANOS Y SU APLICACIÓN COMO AGENTE PROTECTOR A LA DESNATURALIZACIÓN | 75 |
| 3.1. Estado actual. | 75 |
| 3.1.1. Proteínas. | 75 |
| 3.1.2. Proteínas y metalacarboranos. | 78 |
| 3.2. Objetivos. | 79 |
| 3.3. Interacción entre la BSA y los metalacarboranos. | 80 |
| 3.3.1. Dispersión dinámica de luz, TEM y RMN. | 81 |
| 3.3.2. Dicroísmo circular y fluorescencia. | 87 |
| 3.3.3. ξ -potencial, IR, SEM-EDX y análisis elemental. | 88 |
| 3.4. Aplicación como agente protector a la desnaturalización. | 94 |
| 3.4.1. Agente protector a la desnaturalización térmica. | 94 |

| | |
|---|-----|
| 3.4.2. Agente protector a la desnaturalización química. | 98 |
| 3.5. Conclusiones. | 99 |
| 3.6. Referencias. | 101 |
| 4. POLÍMEROS DOPADOS CON METALACARBORANOS Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES PARA SU APLICACIÓN EN PILAS DE COMBUSTIBLE, BATERÍAS Y SUPERCONDENSADORES. | 105 |
| 4.1. Estado actual. | 105 |
| 4.1.1. Polímeros. | 105 |
| 4.1.2. Polímeros utilizados en pilas de combustible. | 106 |
| 4.1.3. Polímeros utilizados en baterías. | 108 |
| 4.1.4. Polímeros utilizados en supercondensadores. | 110 |
| 4.1.5. Polímeros dopados con metalacarboranos. | 112 |
| 4.2. Objetivos. | 114 |
| 4.3. Propiedades del PBI dopado con M[COSANE] y con M'[TPB] para su uso en pilas de combustible y baterías. | 114 |
| 4.3.1. Conductividad iónica del M[COSANE] y del M'[TPB]. | 115 |
| 4.3.2. PBI@M[COSANE] y PBI@M'[TPB], propiedades fisicoquímicas y térmicas. | 117 |
| 4.3.3. PBI@M[COSANE] y PBI@M'[TPB], conductividad iónica. | 119 |
| 4.4. Propiedades del PEDOT dopado con M[COSANE] y con Cs[Cl _x -COSANE] para su uso en supercondensadores. | 121 |
| 4.4.1. Síntesis del Cl _x -COSANE (x = 2, 4 y 6). | 122 |
| 4.4.2. Electropolimerización del PEDOT:M[COSANE]. | 123 |
| 4.4.3. Propiedades electroquímicas del PEDOT:M[COSANE]. | 125 |
| 4.4.4. SEM-EDX, cond. eléctrica y ATG del PEDOT:M[COSANE]. | 127 |
| 4.4.5. Electropolimerización del PEDOT:Cs[Cl _x -COSANE]. | 129 |
| 4.4.6. Propiedades electroquímicas del PEDOT:Cs[Cl _x -COSANE]. | 131 |
| 4.4.7. SEM-EDX, cond. eléctrica y ATG del PEDOT:Cs[Cl _x -COSANE] | 134 |
| 4.5. Conclusiones. | 136 |

| | |
|--|-----|
| 4.6. Referencias. | 139 |
| 5. USO DEL METALACARBORANO COMO MEDIADOR PARA AUMENTAR LA ESTABILIDAD DE SUPERCONDENSADORES ACUOSOS BASADOS EN CARBÓN ACTIVADO | 143 |
| 5.1. Estado actual. | 143 |
| 5.1.1. Carbones activados. | 143 |
| 5.1.2. Supercondensadores basados en carbón activado. | 144 |
| 5.1.3. Materiales carbonosos y metalacboranos. | 146 |
| 5.2. Objetivos. | 147 |
| 5.3. Adsorción del Cl ₄ -COSANE como aditivo del carbón activado. | 147 |
| 5.3.1. Isotherma de adsorción del Cl ₄ -COSANE en carbón activado. | 148 |
| 5.3.2. Isotherma de adsorción de N ₂ , DRX y XPS. | 149 |
| 5.4. Supercondensador acuoso asimétrico. | 151 |
| 5.4.1. Caracterización mediante una celda de 3 electrodos. | 152 |
| 5.4.2. Caracterización del supercondensador acuoso. | 154 |
| 5.5. Conclusiones. | 158 |
| 5.6. Referencia. | 160 |
| 6. CONCLUSIONES | 165 |
| 6.1. Conclusiones del Capítulo 2. | 165 |
| 6.2. Conclusiones del Capítulo 3. | 166 |
| 6.3. Conclusiones del Capítulo 4. | 167 |
| 6.4. Conclusiones del Capítulo 5. | 169 |
| ANEXO I | 171 |

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN



RESUMEN DEL CAPÍTULO 1

Este capítulo se basa principalmente en explicar los diferentes tipos de clústeres de boro (boranos, carboranos y metalacarboranos) y algunas de sus propiedades, así como la clasificación según las reglas de Wade en clústeres tipo nido, closo y aracno. Al utilizarse en toda la tesis únicamente los metalacarboranos, se explica con mayor profundidad sus propiedades y aplicaciones. Dos de las propiedades más importantes son la capacidad de autoensamblaje ya que forman micelas y vesículas, y las propiedades redox ya que son moléculas electroactivas con potenciales redox regulables. Dentro de las aplicaciones se detallan varios ejemplos utilizados en el campo de la biomedicina, de ciencia de materiales y de la energía.

Índice del Capítulo

| | pag. |
|--|------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1. Antecedentes históricos del boro y de los boranos. | 3 |
| 1.2. Clústeres de boro. | 4 |
| 1.2.1. Boranos. | 4 |
| 1.2.2. Carboranos. | 6 |
| 1.2.3. Metalacarboranos. | 8 |
| 1.3. Propiedades fisicoquímicas de los metalacarboranos. | 11 |
| 1.3.1. Capacidad de autoensamblaje. | 12 |
| 1.3.2. Propiedades redox. | 14 |
| 1.4. Aplicaciones de los metalacarboranos. | 17 |
| 1.4.1. Aplicaciones en biomedicina. | 17 |
| 1.4.2. Aplicaciones en ciencia de materiales. | 18 |
| 1.4.3. Aplicaciones en energía. | 20 |
| 1.5. Objetivos generales. | 22 |
| 1.6. Referencias. | 22 |

1. INTRODUCCIÓN

El boro representado por el símbolo B, es el quinto elemento de la tabla periódica y el primero del grupo 13 con una masa atómica de 10.81 g/mol (**Figura 1. 1**). Es el único en su grupo que no tiene carácter metálico, sino metaloide, se comporta como un semiconductor. Es capaz de formar enlaces covalentes como el silicio y el carbono aunque sea un elemento trivalente. En la naturaleza se encuentran dos isótopos estables ^{11}B (80.1%) y ^{10}B (19.9%) no como boro elemental, sino en forma de boratos como el bórax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$).

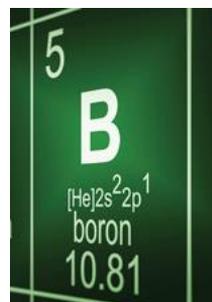


Figura 1. 1. Imagen del boro en la tabla periódica.

1.1. Antecedentes históricos del boro y de los boranos.

Los compuestos de boro son conocidos desde hace más de 4000 años. El nombre proviene del árabe *buraq* y del persa *burah*. Se han empleado desde el antiguo Egipto en el proceso de momificación, en metalurgia y en medicina; hasta en la Antigua Roma y China para ser utilizado en la fabricación del vidrio y en la refinación de oro y plata.¹

En 1808 H. Davy, J.L. Gay-Lussac y L.J. Thenard obtuvieron boro con una pureza aproximada del 50% al calentar ácido bórico con potasio metálico;² aunque ninguno de ellos reconoció tal sustancia como nuevo elemento, sí que lo hizo J. Berzelius 16 años más tarde, en 1824.³ Pero no fue hasta el año 1911 cuando E. Weintraub aisló por primera vez boro con una pureza del 99%.⁴

Aunque en 1878 ya se sabía de la existencia de compuestos basados en boro e hidrógeno (hidruros de boro o boranos), no fue hasta 1912 cuando el químico alemán A. Stock sintetizó y caracterizó los primeros boranos.⁵ Las estructuras inicialmente propuestas para los boranos fueron erróneas hasta 1948, ya que tan sólo unos años antes H.C. Longuet-Higgins había introducido el concepto de enlaces deficientes en electrones mediante la teoría de los tres-centros dos-electrones (3c-2e), basada en los enlaces puente B-H-B, cumpliendo la teoría de Lewis y la de orbitales moleculares, confirmando la alta conectividad de los boranos.⁶

---Introducción---

Pero no fue hasta finales de la II Guerra Mundial cuando se invirtieron grandes cantidades de dinero, por parte de Estados Unidos y de la antigua URSS, en la síntesis de algunos boranos (principalmente pentaborano y decaborano) para su aplicación en combustibles de cohetes.⁷ Esta época supuso un gran impulso en el desarrollo de la química del boro, ya que en 1976 W.N. Lipscomb recibió el premio Nobel de Química por sus trabajos sobre la estructura de los boranos,⁸ y en 1979 H.C. Brown conjuntamente con G. Wittig recibieron también el mismo premio por sus investigaciones sobre compuestos de boro y fósforo para ser utilizados como reactivos en síntesis orgánica.⁹

1.2. Clústeres de boro.

El boro permite la formación de estructuras tridimensionales debido a que presenta la propiedad de catenación como el carbono y además dispone de 4 orbitales y 3 electrones de valencia, favoreciendo más la formación de clústeres que la de cadenas.¹⁰ Estos clústeres se pueden clasificar en boranos, carboranos y metallocarboranos dependiendo de los átomos que presenten. Así, los boranos están formados únicamente por átomos de boro e hidrógeno, los carboranos presentan además de boro e hidrógeno átomos de carbono, y los metallocarboranos incorporan boro, hidrógeno, carbono y un metal.

1.2.1. Boranos.

En 1912 Alfred Stock descubrió los boranos,⁵ compuestos basados en boro e hidrógeno de fórmula molecular $[B_nH_m]^x$. Son compuestos que no existen en la naturaleza, pero hay una gran variedad de rutas sintéticas a partir de minerales como el bórax para su preparación.^{11, 12} El más sencillo de ellos es el BH_3 que dimeriza dando lugar al diborano (B_2H_6), siendo uno de los boranos más importantes junto con el pentaborano (B_5H_9) y el decaborano ($B_{10}H_{14}$).

Algunas propiedades que presentan es que son compuestos diamagnéticos, incoloros, blancos o amarillos que pueden estar en forma neutra o aniónica. Además, cuando hay más de 5 átomos de boro forman clústeres poliédricos de caras triangulares con vértices formados por unidades B-H.

Así los clústeres con menor número de vértices son gases a temperatura ambiente, aunque reactivos; mientras que, a medida que aumenta el número de vértices, los boranos pasan a ser líquidos volátiles o sólidos y estables térmicamente.¹¹

Un ejemplo de borano con alto número de vértices es el [closo-B₁₂H₁₂]²⁻ (Figura 1. 2), que debido a su gran estabilidad,¹³ sus propiedades electrónicas (sus electrones están deslocalizados por todo el clúster), su reactividad química y sus propiedades magnéticas,¹⁴ es considerado un compuesto con aromaticidad tridimensional,¹³⁻¹⁶ recientemente relacionada por Teixidor y *col.* con la aromaticidad clásica de la química orgánica.^{17, 18}

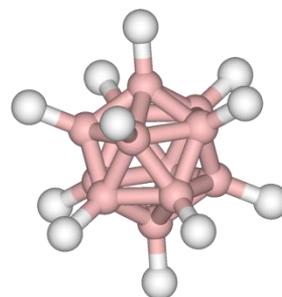


Figura 1. 2. Estructura del [closo-B₁₂H₁₂]²⁻ (B = rosa; H = blanco).

Como se ha mencionado anteriormente, es importante comprender el concepto de 3c-2e para poder entender la conectividad que existe en los boranos. En el caso del B₂H₆ (Figura 1. 3. a) los átomos B-H-B se encuentran conectados a través de dos electrones deslocalizados, mientras que los H externos (B-H) forman enlaces clásicos 2c-2e. En el caso de boranos de mayor tamaño, Lipscomb^{19, 20} propuso que además de enlaces 2c-2e (B-H y B-B), están involucrados enlaces de 3c-2e abiertos y 3c-2e cerrados entre tres átomos de boro (B-B-B) localizados en los vértices del clúster, ver Figura 1. 3. b).

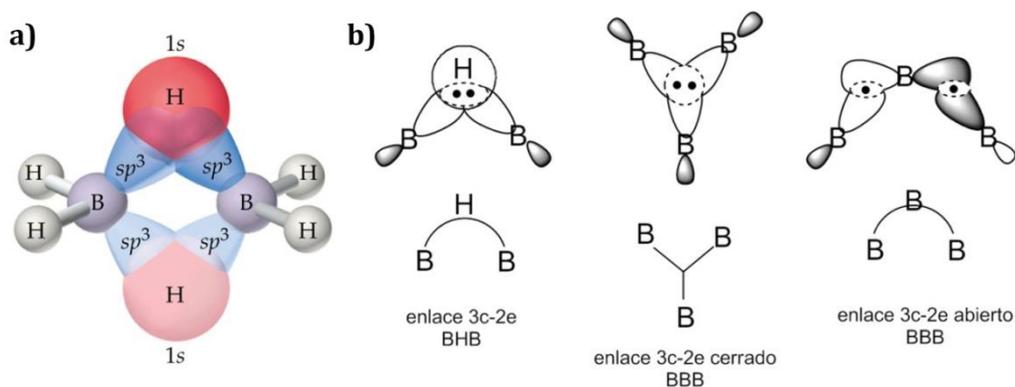


Figura 1. 3. a) Estructura del B₂H₆ donde se reflejan los enlaces 3c-2e intermedios; b) enlaces de 3c-2e propuestos por Lipscomb para los boranos.

1.2.2. Carboranos.

La sustitución de 1 o más átomos de boro en el clúster por heteroátomos como C, N, O, Si, P, As, S, Se, Sb y/o Te,^{21, 22} da lugar a la extensa familia de los heteroboranos. De todos ellos, los más estudiados son los carboranos, en el que se ha sustituido 1 o más átomos de boro por átomos de carbono.

Debido a la gran variedad de boranos y heteroboranos, en 1971 R. E. Williams clasificó a los diferentes clústeres en 3 grandes grupos: *closo*, *nido* y *aracno* (**Figura 1. 4**), en función de sus características estructurales y estequiométricas determinadas por el número de vértices y por el número de electrones disponibles. Esta clasificación sigue los requerimientos electrónicos impuestos por las *Reglas de Wade*,²³⁻²⁵ estudiados por K. Wade, R. E. Williams, R. W. Rudolph y D. M. P. Mingos en 1971.^{23, 26-28}

Así, los clústeres de tipo *closo* son poliedros con las caras cerradas y triangulares formados por n vértices que necesitan un total de $2n + 2$ electrones. Si se eliminara un vértice del clúster *closo*, se formaría el clúster *nido*, donde una cara quedaría abierta y se necesitarían un total de $2n + 4$ electrones para que fuera estable. De la misma forma, si se eliminara un vértice al clúster *nido*, se formaría el clúster *aracno* con una estructura aún más abierta, pero necesitando un total de $2n + 6$ electrones. Años más tarde en 1976, R. W. Rudolph descubrió los clústeres *hypho* que necesitan un total de $2n + 8$ electrones para estar cohesionado el clúster, aunque sólo existen en forma de aductos.²⁶

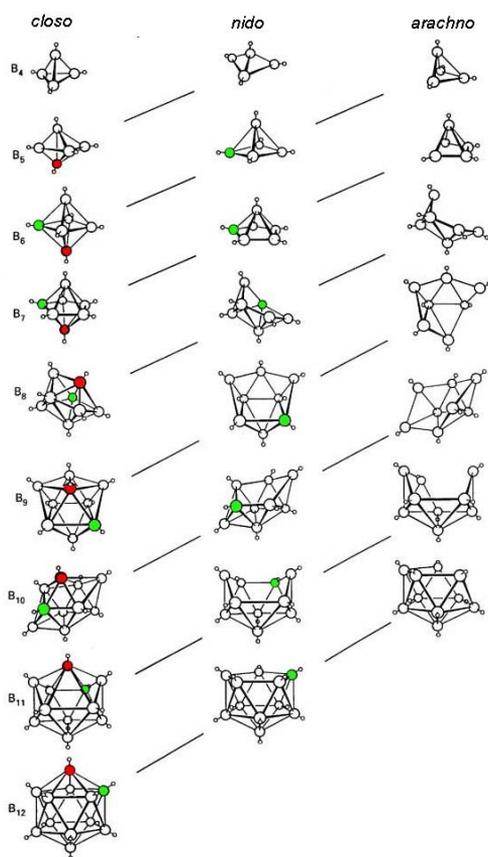


Figura 1. 4. Relación estructural entre boranos y heteroboranos de tipo *closo*, *nido* y *aracno*.

Para contar los electrones que presenta el clúster, se considera que cada vértice B-H aporta 2 electrones al clúster que provienen del átomo de boro, ya que el tercer electrón del boro y el electrón del hidrógeno se utilizan para formar el enlace B-H. Si el clúster tiene H_{puntales} , cada uno de ellos aporta un electrón al clúster. Y en el caso concreto de los carboranos, cada vértice C-H o C-R aporta tres electrones al clúster que provienen del átomo de carbono.

Una vez explicada la clasificación de los boranos y heteroboranos, y volviendo a los carboranos, la fórmula molecular de estos compuestos es: $[C_nB_mH_{n+m+p}]^x$, donde n es el número de átomos de carbono en el clúster, m el número de átomos de boro en el clúster, p el número de hidrógenos puntales y x la carga de la molécula.²¹

Los carboranos más conocidos y estudiados son aquellos en los que se ha sustituido dos átomos de boro por dos átomos de carbono, formando la familia de los dicarba-*closo*-dodecaboranos con fórmula $C_2B_{10}H_{12}$, comúnmente se les llama carboranos. En la **Figura 1. 5** se muestra la estructura del 1,2- $C_2B_{10}H_{12}$ o también llamado *orto*-carborano^{29, 30} donde si se compara con la **Figura 1. 2** se han sustituido dos átomos de boro por dos átomos de carbono adyacentes.

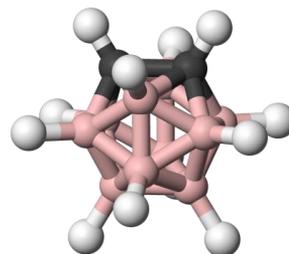


Figura 1. 5. Estructura del 1,2- $C_2B_{10}H_{12}$ (C = gris; B = rosa; H = blanco).

En 1963, D. Grafstein y J. Dvorak³¹ establecieron la posibilidad de realizar una isomerización térmica bajo vacío con temperaturas entre 450-500 °C del *orto*-carborano, produciendo irreversiblemente el derivado 1,7- $C_2B_{10}H_{12}$ o *meta*-carborano (los dos átomos de carbono están separados por un átomo de boro, ver **Figura 1. 6**). Además, en 1964³² se observó que a temperaturas entre 600-700 °C la isomerización térmica continuaba desde el *meta*-carborano para la formación del isómero 1,12- $C_2B_{10}H_{12}$ o *para*-carborano (los dos átomos de carbono están separados por dos átomos de boro, ver **Figura 1. 6**). A estas temperaturas se produce un equilibrio entre los isómeros *meta*- y *para*-.

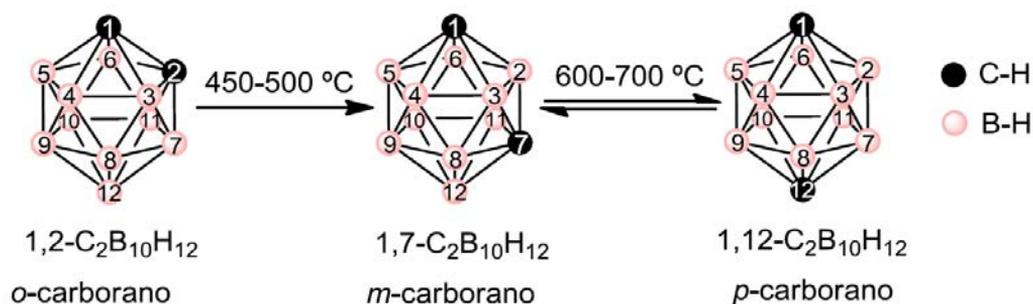


Figura 1. 6. Isomerización térmica del clúster $[\text{C}_2\text{B}_{10}\text{H}_{12}]$ con la numeración de los vértices. La nomenclatura *o*-, *m*- y *p*- hace referencia a la posición relativa de los carboranos: orto, meta y para, respectivamente.

1.2.3. Metalacarboranos.

Los metalacarboranos pertenecen a una amplia familia de compuestos que consisten en carboranos que contienen uno o más metales de transición o lantánidos formando parte del esqueleto del clúster.^{33, 34} De todos los metalacarboranos que hay, los más estudiados son los que derivan de la estructura tipo sándwich entre dos unidades dicarbolluro $[1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11}]^{2-}$ con un metal de transición central (M), pudiendo ser $M = \text{Co(III)}, \text{Co(II)}, \text{Fe(III)}, \text{Fe(II)}, \text{Ni(III)}, \text{Cu(III)}, \text{Au(III)}$, entre otros.

En 1965 M. F. Hawthorne y *col.* sintetizaron el primer metalacarborano;³⁵ obtuvieron un complejo tipo sándwich con dos ligandos dicarbolluro unidos a un átomo de hierro central $[3,3\text{-Fe}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^-$; también llamado ferrabis(dicarbolluro) o coloquialmente llamado FESANE. Poco tiempo después, los mismos autores publicaron la síntesis de un complejo tipo sándwich pero en vez de hierro con cobalto³⁶ $[3,3\text{-Co}(1,2\text{-C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^-$; también llamado cobaltabis(dicarbolluro) o COSANE. Dos años más tarde, el mismo grupo de investigación consiguió sintetizar metalacarboranos con Ni³⁷ y Cr.³⁸ Y en 1968 con Cu, Au y Pd.³⁹

El metalacarborano más ampliamente estudiado y sintetizado es el COSANE,³⁶ donde el átomo central de cobalto tiene un estado de oxidación de +3 coordinándose con dos ligandos dicarbolluros que aportan dos cargas negativas cada uno (-4) y teniendo una carga global negativa, es decir, es un compuesto monoaniónico. El hecho que la carga negativa se

encuentre deslocalizada por toda la molécula hace que el complejo tenga una baja densidad de carga. Además de tener un alto volumen molecular y presentar una gran estabilidad térmica y química.^{40, 41}

Para sintetizar el metalacarborano es necesario en primer lugar degradar parcialmente el clúster de *orto*-carborano hasta obtener el derivado nido [7,8-C₂B₉H₁₂]⁻.³⁵ Luego con una base fuerte como el K[tBuO], NaH o el n-BuLi en condiciones anhidras se extrae el H_{pontal} para formar el clúster dianiónico dicarballuro [C₂B₉H₁₁]²⁻ (primer paso de la **Figura 1. 7**).⁴² Por último, se añade CoCl₂ o FeCl₂ anhidro para dar lugar a la complejación y formar así el metalacarborano de cobalto o hierro, respectivamente (segundo paso de la **Figura 1. 7**).^{35, 36}

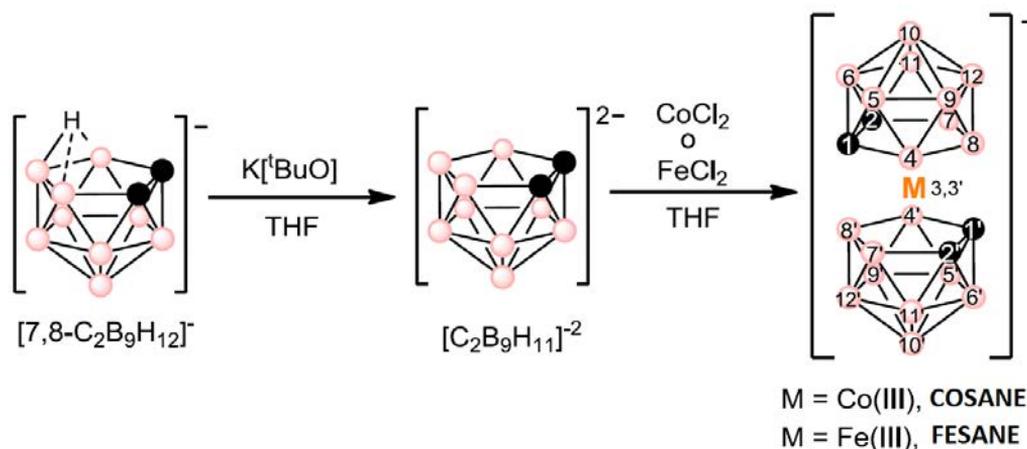


Figura 1. 7. Esquema de síntesis del COSANE (M = Co) y FESANE (M = Fe) con la correspondiente numeración de los vértices en la estructura del metalacarborano.

Recientemente se ha hecho un gran avance en la síntesis del COSANE con una reacción en estado sólido entre el [HNMe₃][C₂B₉H₁₂] y el CoCl₂·xH₂O, siendo una síntesis rápida y limpia de disolvente con un alto rendimiento.⁴³

En cuanto a la reactividad de los metalacarboranos hay dos puntos bien diferenciados, los vértices C_c-H y B-H, siendo los dos vértices de boro más reactivos el B(8) y el B(8').⁴⁴⁻⁴⁶ Estas dos posiciones son las más reactivas debido a que se encuentran en las antípodas de los dos átomos de carbono del clúster y presentan una cierta densidad de carga negativa, favoreciendo la reacción de sustitución nucleofílica inducida electrofílicamente (EINS).⁴⁷

---Introducción---

Otro de los metalacarboranos más conocidos y utilizados es el complejo zwitteriónico $[3,3'-M(8-C_4H_8O_2-1,2-C_2B_9H_{10})(1',2'-C_2B_9H_{11})]$ o también llamado coloquialmente COSANE-DIOXANATO cuando $M = Co^{48, 49}$ y FESANE-DIOXANATO cuando $M = Fe^{50}$. Esta especie zwitteriónica se obtiene a partir de una reacción tipo EINS cuando un ácido de Lewis como el $BF_3 \cdot Et_2O$ extrae el hidrógeno unido al boro en la posición B(8) y es seguido por un ataque nucleofílico por parte del anillo del dioxano (que también actúa como disolvente), ver primer paso de la **Figura 1. 8**.⁵¹

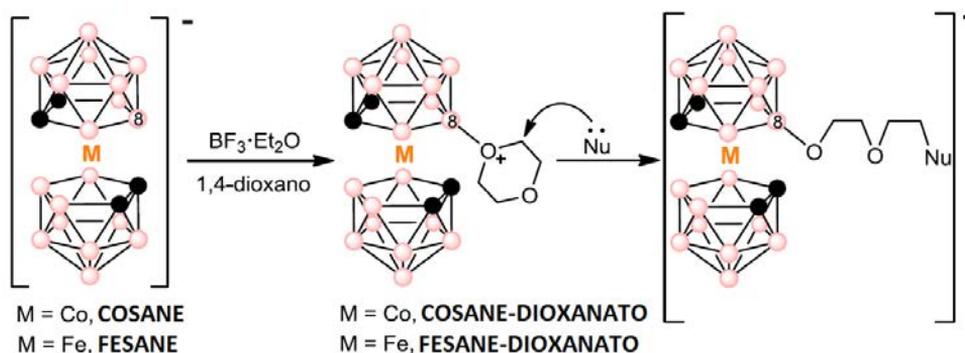


Figura 1. 8. Síntesis de las especies zwitteriónicas COSANE-DIOXANATO y FESANE-DIOXANATO, y su posterior funcionalización con nucleófilos mediante reacciones de apertura del ciclo.

El enlace entre el vértice B(8) y el oxonio del compuesto zwitteriónico es muy reactivo dando lugar a la apertura del ciclo de dioxano con una gran cantidad de agentes nucleófilos o bases de Lewis (segundo paso de la **Figura 1. 8**). Algunos de los nucleófilos o bases de Lewis utilizados son: halógenos y tioles,⁵² azidas,⁵³ imidas, cianuro o aminas,⁵⁴⁻⁵⁶ pirrolil,⁵⁷ fenolatos y carboxilatos,⁵⁸ fosfitos,⁵⁹ alcóxidos,⁶⁰ nucleósidos,⁶¹ y derivados del carborano.^{58, 59, 62}

Otra de las reacciones de sustitución que se pueden realizar sobre los vértices de boro del metalacarborano es la halogenación electrofílica.⁶³⁻⁶⁵ Las posiciones más susceptibles de ser atacadas, debido a que los vértices son más ricos en electrones, siguen el orden $B(8, 8') > B(9, 9', 12, 12') > B(10, 10')$.⁶³ Es difícil la obtención de compuestos con un grado de halogenación puro, debido a la dificultad en la regioselectividad que suponen estas reacciones. Por ello, comúnmente se obtienen mezclas de compuestos con diferentes grados de halogenación.

1.3. Propiedades fisicoquímicas de los metalacarboranos.

Una vez vistos los diferentes tipos de clústeres de boro, se explicará con mayor profundidad algunas de las propiedades fisicoquímicas y algunas aplicaciones de los metalacarboranos; ya que éstos son los clústeres de boro utilizados para realizar esta tesis, concretamente COSANE y FESANE.

Hace unos años la investigación de los metalacarboranos estaba enfocada en su derivatización, en la incorporación de nuevos grupos funcionales.⁶⁶ Pero no hace mucho tiempo, la búsqueda de nuevas aplicaciones para los metalacarboranos ha dado lugar a estudios exhaustivos de sus propiedades físico-químicas, siendo la capacidad de autoensamblaje y sus propiedades redox las más llamativas.

Otras propiedades no tan estudiadas pero no menos importantes son que los metalacarboranos presentan una baja densidad de carga, un alto volumen molecular y una gran estabilidad térmica y química; debido a que la carga global se encuentra deslocalizada por toda la molécula.^{40, 41} Además, son considerados compuestos hidrofóbicos con una geometría rígida haciendo que el movimiento de rotación de la molécula sea limitado, tienen un carácter nucleofílico bajo, son aniones coordinantes débiles y son capaces de producir enlaces di-hidrógeno.^{16, 55, 67, 68}

Cabe destacar dentro de las propiedades de los metalacarboranos la solubilidad;³³ ya que dependiendo del estado de oxidación del metal, la molécula puede ser neutra o iónica. Si es neutra sólo será soluble en disolventes orgánicos, pero si es iónica podrá ser soluble en disolventes orgánicos y en acuosos dependiendo del contraion. En el caso del COSANE y del FESANE como el cobalto y el hierro tienen un estado de oxidación de +3, la carga global de la molécula es -1 y al ser un compuesto monoaniónico podrá ser soluble en ambos disolventes dependiendo de los cationes. Por ejemplo: con Cs⁺ tanto el COSANE como el FESANE serán solubles en medio orgánico, pero insolubles en medio acuoso; en cambio con H⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺ serán solubles tanto en medio orgánico como en medio acuoso.

1.3.1. Capacidad de autoensamblaje.

Los metalacarboranos presentan la capacidad de autoensamblaje debido a que están formados por elementos con diferentes electronegatividades. Este hecho hace que haya hidrógenos ácidos en la estructura del clúster e hidrógenos con un carácter de hidruro, dando lugar a la formación de puentes de hidrógeno o de di-hidrógeno entre ellos y obtener de esta manera estructuras supramoleculares.

En 2005 Teixidor y *col.* describieron la formación de puentes de hidrógeno (C-H ... S) y de di-hidrógeno (S-H ... H-B) en la estructura del mercaptano-metalacarborano de rutenio, a partir de cálculos de DFT y de su estructura cristalina. En la **Figura 1. 9** se pueden observar ambos tipos de enlaces y como forman una estructura supramolecular creando una red polimérica de dos dimensiones.⁶⁹

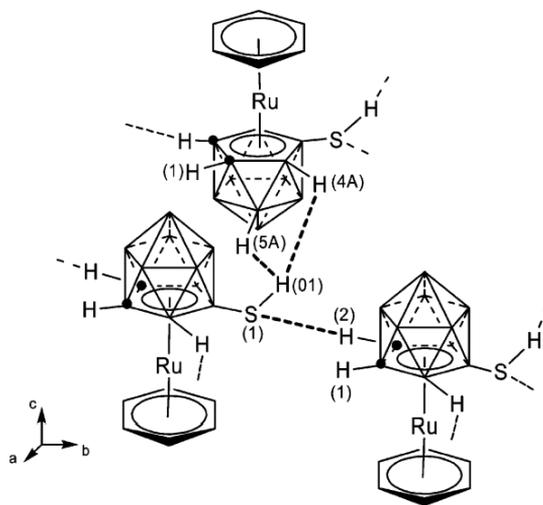


Figura 1. 9. Dibujo de la estructura cristalina del mercaptano-metalacarborano de rutenio.

En 2006 el mismo grupo enlazó químicamente dos metalacarboranos de cobalto a partir del enlace boro-boro en las posiciones B(8) y B(9') de las unidades dicarballuro formando puentes de di-hidrógeno intramoleculares entre las unidades no enlazadas de los metalacarboranos.⁷⁰ Un año más tarde, monohalogenó el metalacarborano de cobalto con I, Cl y Br, y a partir de las estructuras cristalinas obtenidas observaron que se formaban puentes de hidrógeno C_c-H ... X-B (X = I > Br > Cl) intermoleculares creando estructuras supramoleculares de dos dimensiones.⁷¹

Pero ahora bien, si nos fijamos en el metalacarborano más estudiado con estructura tipo sándwich, el COSANE, al tener un centro de simetría con las dos unidades dicarballuro y el metal, se ha comprobado que en medio acuoso forma puentes de hidrógeno y de di-hidrógeno intermoleculares creando estructuras supramoleculares de tres dimensiones.⁶⁷

Estas estructuras tridimensionales son debidas a que el COSANE tiene carácter hidrofóbico y en medio acuoso tiende a crear partículas esféricas, llegando a formar agregados de gran dimensión. El tamaño de estos agregados varía en función de la concentración y del tiempo de maduración del COSANE en la disolución acuosa. Estudios realizados mediante *dynamic light scattering* (DLS) señalan que cuanto más diluida es la muestra, más monodispersa es, mientras que la muestra más concentrada presenta mayor polidispersión formando agregados de mayor tamaño. En cuanto al tiempo de maduración, las partículas de COSANE crecen a medida que pasan los días y las semanas llegando a un equilibrio al cabo de un par de meses, donde el tamaño de los agregados se mantiene constante.⁶⁷

En 2011 Bauduin y *col.* estudiaron las propiedades de autoensamblaje del H[COSANE] en agua y encontraron que dependiendo de la concentración se formaban vesículas monocapa o micelas, siendo la concentración crítica de la transición de fase de vesículas a micelas de 18.6 mM. En la **Figura 1. 10** se puede ver el dibujo representativo de estas estructuras tridimensionales.⁷²

Las vesículas monocapa están formadas por COSANEs distribuidos ortogonalmente entre ellos y con un diámetro aproximado de 40 nm. Mientras que las micelas tienen un diámetro aproximado de 2.32 nm y están constituidas por 14 unidades de COSANE. Por debajo de 18.6 mM sólo existen las vesículas monocapa, pero por encima de 18.6 mM coexisten las micelas y las vesículas.⁷²

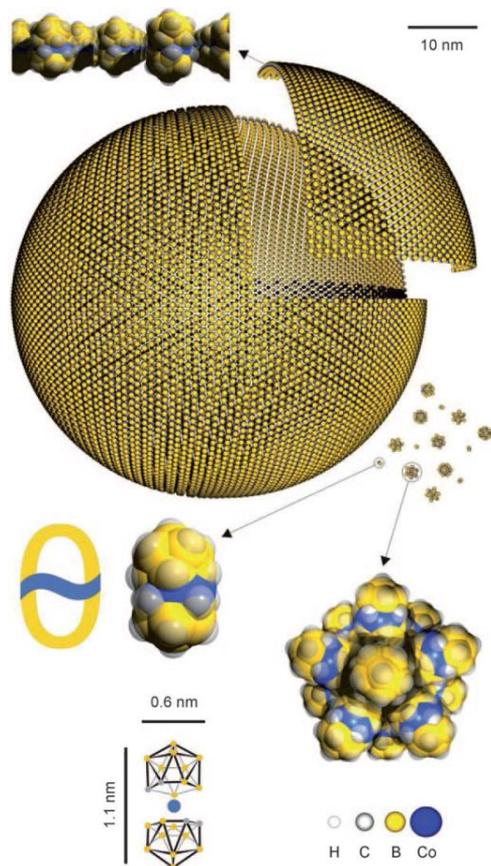


Figura 1. 10. Esquema de las vesículas monocapa (arriba), las micelas (abajo a la derecha) y H[COSANE] (abajo a la izquierda).

---Introducción---

La formación de ambas estructuras se debe principalmente a que las unidades dicarballuro del clúster son muy hidrofóbicas, mientras que el metal es la parte polar, presentando así una analogía con los surfactantes y comportándose en agua como tales con la única diferencia que el COSANE forma vesículas con una monocapa, mientras que los surfactantes lo hacen formando una bicapa.⁷²

Dos años más tarde en 2013, el mismo grupo estudió las propiedades de autoensamblaje de un derivado del COSANE, el H[I₂-COSANE], para ver si con la incorporación de dos yodos en la estructura del COSANE seguían formándose los agregados tridimensionales. A concentraciones bajas observaron la formación de vesículas al igual que en el H[COSANE], pero a concentraciones altas (por encima del 35% v/v) observaron que en vez de formarse micelas se formaron lamelas. Estas lamelas están constituidas por capas monomoleculares de H[I₂-COSANE] orientadas ortogonalmente al plano de la lamela. La interacción entre las diferentes moléculas de H[I₂-COSANE] en una capa se debe a los puentes de hidrógeno y de di-hidrógeno intermoleculares entre el B-H y el C_c-H.⁷³

1.3.2. Propiedades redox.

Las propiedades redox de los metalacarboranos se basan principalmente en los potenciales redox ($E_{1/2}$) de los metales. Así, dependiendo del número de estados de oxidación del metal ($M^{4+/3+}$, $M^{3+/2+}$ y $M^{2+/+}$) y de la posición respecto a la ventana electroquímica, se encontrarán más o menos valores de potencial redox para cada metalacarborano. Además, como se irá viendo, dependiendo de los sustituyentes presentes en las unidades dicarballuro de los clústeres, dichos potenciales redox se desplazarán a valores más negativos o más positivos.

Los metalacarboranos tipo sándwich más estudiados son el FESANE, el COSANE y el NISANE. Aunque también se han estudiado los potenciales redox de los metalacarboranos de Cu, Ru, Rh, Pd y Au (todos los valores de potencial redox están recogidos en el *review* de Teixidor y *col.* del 2016).⁷⁴ Pero se explicarán con más detalle las propiedades redox del FESANE y del COSANE que son los metalacarboranos utilizados en esta tesis.

Como se puede ver en la **Tabla 1. 1** los valores de $E_{1/2}$ encontrados en la bibliografía para el FESANE (representado en color verde) son 0.76 y -0.78 V vs Fc para las parejas redox $Fe^{4+/3+}$ y $Fe^{3+/2+}$, respectivamente. Pero si las unidades dicarballuro del clúster presentan sustituciones, dichos valores de potencial redox cambian. Si las sustituciones son en los carbonos del clúster (posición 1 y 2, representado en color gris en la **Tabla 1. 1**), los valores de potencial redox se hacen más negativos para los sustituyentes metilos y fenilos, mientras que para el tiofeno se desplaza muy levemente hacia valores más positivos (sólo 40 mV). Pero si las sustituciones son en el B(8) con los halógenos Br y I (representado en color azul en la **Tabla 1. 1**), el potencial redox se desplaza hacia valores más positivos. Dependiendo del número de halógenos sustituidos en el clúster y del tipo de halógeno, el $E_{1/2}$ será aún más positivo.

Tabla 1. 1. Valores de potencial redox para el FESANE (en verde), con sustituyentes enlazados al carbono del clúster (en gris) o con los sustituyentes enlazados al B(8) (en azul).⁷⁴

| Metal | Metalacarborano | | $E_{1/2}$ (V vs Fc) | | |
|-------|---|---|---------------------|-------------|--------|
| | Ligando 1 | Ligando 2 | $M^{4+/3+}$ | $M^{3+/2+}$ | Ref. |
| | 1,2-C ₂ B ₉ H ₁₁ | 1,2-C ₂ B ₉ H ₁₁ | 0.76 | -0.78 | 75 |
| | 1-Tioph-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 1-Tioph-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | - | -0.74 | 76, 77 |
| | 1,2-Me ₂ -1,2-C ₂ B ₉ H ₉ | 1,2-Me ₂ -1,2-C ₂ B ₉ H ₉ | - | -0.94 | 78 |
| | 1,2-Ph ₂ -1,2-C ₂ B ₉ H ₉ | 1,2-Ph ₂ -1,2-C ₂ B ₉ H ₉ | - | -0.87 | 78 |
| Fe | 8-Br-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 1,2-C ₂ B ₉ H ₁₁ | - | -0.60 | 79 |
| | 8-Br-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 8-Br-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | - | -0.43 | 79 |
| | 8-I-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 1,2-C ₂ B ₉ H ₁₁ | - | -0.56 | 75 |
| | 8-I-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 8-I-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | - | -0.35 | 75 |
| | | | | | |

Por lo que respecta a las propiedades redox del COSANE, como puede verse en la **Tabla 1. 2**, se han realizado más estudios que en el caso del FESANE. Este hecho se debe a que al ser el metalacarborano tipo sándwich más estudiado de todos, se han conseguido sintetizar más derivados de COSANE que de FESANE tanto en sustituciones en el carbono (posición 1 y 2) como en los boros.

Así, como se puede ver en la **Tabla 1. 2** en color verde, los valores de $E_{1/2}$ para el COSANE son -1.75 y -2.64 V vs Fc para las parejas redox $Co^{3+/2+}$ y $Co^{2+}/+$, respectivamente (para la pareja $Co^{4+/3+}$ el $E_{1/2}$ es 1.22 V vs Fc).⁷⁴

---Introducción---

Todos los derivados de COSANE con la sustitución en los carbonos (representado en color gris en la **Tabla 1. 2**) presentan valores de potencial redox más positivos respecto al del COSANE puro, a diferencia de los derivados de FESANE. En cambio, cuando el mismo sustituyente como el metilo está enlazado en el boro (derivados de COSANE en color azul en la **Tabla 1. 2**), los valores de potencial redox se desplazan hacia valores más negativos. Por lo que respecta a las halogenaciones del COSANE se sigue la misma tendencia que en el caso del FESANE, dependiendo del número de halógenos sustituidos en el clúster (1, 2, 6 o 8) y del tipo de halógeno (Cl < Br < I), el potencial redox será más positivo.

Tabla 1. 2. Valores de potencial redox para el COSANE (en verde), con sustituyentes enlazados al carbono del clúster (en gris) o con los sustituyentes enlazados al B(8) (en azul).⁷⁴

| M | Metalacarborano | | E _{1/2} (V vs Fc) | | |
|----|---|---|----------------------------|-------------------|------|
| | Ligando 1 | Ligando 2 | M ^{3+/2+} | M ^{2+/+} | Ref. |
| | 1,2-C ₂ B ₉ H ₁₁ | 1,2-C ₂ B ₉ H ₁₁ | -1.75 | -2.64 | 75 |
| | 1-Tioph-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 1-Tioph-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | -1.46 | - | 80 |
| | 1-SEt-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 1-SEt-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | -1.45 | - | 81 |
| | 1-Me-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 1-Me-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | -1.69 | - | 81 |
| | 1-Ph-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 1-Ph-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | -1.69 | - | 78 |
| | 1,2-Me ₂ -1,2-C ₂ B ₉ H ₉ | 1,2-Me ₂ -1,2-C ₂ B ₉ H ₉ | -1.54 | - | 82 |
| | 1,2-Et ₂ -1,2-C ₂ B ₉ H ₉ | 1,2-Et ₂ -1,2-C ₂ B ₉ H ₉ | -1.56 | - | 81 |
| | 1,2-Ph ₂ -1,2-C ₂ B ₉ H ₉ | 1,2-Ph ₂ -1,2-C ₂ B ₉ H ₉ | -1.68 | - | 78 |
| | 1-Me,2-SEt-1,2-C ₂ B ₉ H ₉ | 1-Me,2-SEt-1,2-C ₂ B ₉ H ₉ | -1.23 | - | 81 |
| | 1-Ph,2-SEt-1,2-C ₂ B ₉ H ₉ | 1-Ph,2-SEt-1,2-C ₂ B ₉ H ₉ | -1.34 | - | 81 |
| Co | 8-Me-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 1,2-C ₂ B ₉ H ₁₁ | -1.90 | - | 83 |
| | 8-Et-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 1,2-C ₂ B ₉ H ₁₁ | -1.81 | - | 83 |
| | 8-Ph-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 1,2-C ₂ B ₉ H ₁₁ | -1.74 | - | 83 |
| | 8-I-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 1,2-C ₂ B ₉ H ₁₁ | -1.58 | - | 83 |
| | 8-Me-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 8-Me-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | -1.82 | - | 84 |
| | 8-SMe ₂ -1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 8-SMe ₂ -1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | -0.77 | -1.65 | 85 |
| | 8-Cl-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 8-Cl-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | -1.39 | -2.41 | 86 |
| | 8-Br-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 8-Br-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | -1.34 | -2.37 | 86 |
| | 8-I-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | 8-I-1,2-C ₂ B ₉ H ₁₀ | -1.25 | -2.27 | 75 |
| | 8,9,12-Me ₃ -1,2-C ₂ B ₉ H ₈ | 8,9,12-Me ₃ -1,2-C ₂ B ₉ H ₈ | -1.89 | - | 84 |
| | 8,9,12-I ₃ -1,2-C ₂ B ₉ H ₈ | 8,9,12-I ₃ -1,2-C ₂ B ₉ H ₈ | -0.82 | - | 75 |
| | 8,11,12-Br ₃ -1,2-C ₂ B ₉ H ₈ | 8,11,12-Br ₃ -1,2-C ₂ B ₉ H ₈ | -0.89 | - | 82 |
| | 8,9,10,12-Me ₄ -1,2-C ₂ B ₉ H ₇ | 8,9,10,12-Me ₄ -1,2-C ₂ B ₉ H ₇ | -1.92 | - | 84 |
| | 8,9,10,12-I ₄ -1,2-C ₂ B ₉ H ₇ | 8,9,10,12-I ₄ -1,2-C ₂ B ₉ H ₇ | -0.68 | - | 84 |

A partir del cálculo del potencial redox de los diferentes derivados de FESANE, COSANE y de los otros metalacarboranos,⁷⁴ se ha podido crear un amplio registro desde 2.73 hasta -2.88 V vs Fc. Así, al poder modular el potencial redox deseado, podrán utilizarse los metalacarboranos para diferentes aplicaciones.

1.4. Aplicaciones de los metalacarboranos.

Debido a las magníficas propiedades que presentan los metalacarboranos, la gran acidez de sus ácidos conjugados, la variedad de estructuras que existen, la gran estabilidad térmica y química que presentan, el amplio rango de potenciales redox, su hidrofobicidad para formar vesículas o micelas, etc., se han utilizado en diferentes aplicaciones en los campos de biomedicina, energía, catálisis, ciencia de materiales y medioambiente.^{87, 88}

1.4.1. Aplicaciones en biomedicina.

Dentro del campo de la biomedicina, una de las aplicaciones con más relevancia es el tratamiento del cáncer mediante la terapia llamada *Boron Neutron Capture Therapy* (BNCT), que consiste en introducir compuestos con un alto contenido en el isótopo ^{10}B en la zona donde se encuentra el tumor e irradiar con neutrones desde el exterior. Así, se consigue la fisión de los núcleos de ^{10}B liberando las partículas α de alta energía que dan lugar a la muerte de las células cancerígenas.^{89, 90}

Para ello, aunque hay muchos compuestos con alto contenido en boro, sólo dos se han utilizado clínicamente en pacientes con tumores cerebrales y melanomas. Estos compuestos de boro son *L-p*-dihidroxiboro-fenilalanina (BPA)⁹¹ y el mercapto-*closo*-dodecaborato de sodio (BSH)⁹². Aunque se están estudiando nuevos compuestos de boro para la BNCT, es importante diseñar moléculas que se acumulen principalmente y mayoritariamente en los tumores y no en las células sanas para un tratamiento más eficaz. Con este fin, existen numerosos trabajos donde se han incorporado clústeres de boro sobre porfirinas,⁹³ dendrímeros,⁹⁴ nucleótidos,⁹⁵ péptidos,⁹⁶ micelas,⁹⁷ etc. siendo los metalacarboranos, los clústeres de boro con mayor contenido en boro (18 boros en su estructura).

---Introducción---

Otra de las aplicaciones biomédicas de los metalacarboranos en la que se basa una parte de esta tesis es la capacidad de traspasar la membrana celular y acumularse dentro de la célula. Se ha comprobado que el COSANE y el I₂-COSANE traspasan la membrana celular de las células embrionarias de riñón humano (HEK 293) y se acumulan en su interior al menos 4 horas. Debido a que la banda B-H de los metalacarboranos da lugar a una señal intensa en Raman, se confirmó que tanto el COSANE como el I₂-COSANE se localizaban en el interior de la célula y no en el exterior.⁹⁸ También se realizaron estudios en otros tipos de células (HeLa, THP-1, 3T3, E. Coli B/r, entre otras) y en todos los casos los metalacarboranos traspasaban la membrana celular y se acumulaban en el interior. En este estudio en concreto se vio que tanto el COSANE como el I₂-COSANE no son citotóxicos pero sí que son citostáticos, inhibiendo el crecimiento de las células.⁹⁹

1.4.2. Aplicaciones en ciencia de materiales.

Dentro del campo de la ciencia de materiales, los metalacarboranos se han utilizado en líquidos iónicos,¹⁰⁰ en *metal-organic frameworks* (MOFs),¹⁰¹ en materiales híbridos como los siloxanos,¹⁰² en la funcionalización de nanopartículas poliméricas¹⁰³. Pero una de las aplicaciones en que se basa una parte de esta tesis es la de los polímeros orgánicos conductores.

Los polímeros orgánicos conductores como el poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT), el polipirrol (PPy), la polianilina (PANI), el politiofeno (PTh) y el polifurano (PF) han sido muy utilizados en los últimos años debido a sus aplicaciones en supercondensadores, baterías, biosensores, electrocatálisis, fotoelectroquímica y corrosión.¹⁰⁴ La síntesis de estos polímeros se basa principalmente en la oxidación química o electroquímica del monómero para generar polarones o bipolarones, formando una matriz polimérica cargada positivamente que es compensada con agentes dopantes aniónicos (ver **Figura 1. 11. a**), siendo el polímero aislante en su estado reducido y conductor en su estado oxidado.¹⁰⁵

Los agentes dopantes aniónicos comúnmente utilizados son cloruros, nitratos, percloratos y sulfatos. Aunque también se han utilizado dopantes orgánicos (CF₃COOH), poliméricos (poliestirenosulfonato, PSS), neutros (I₂) y surfactantes (dodecibenceno sulfonato, DBS).¹⁰⁵

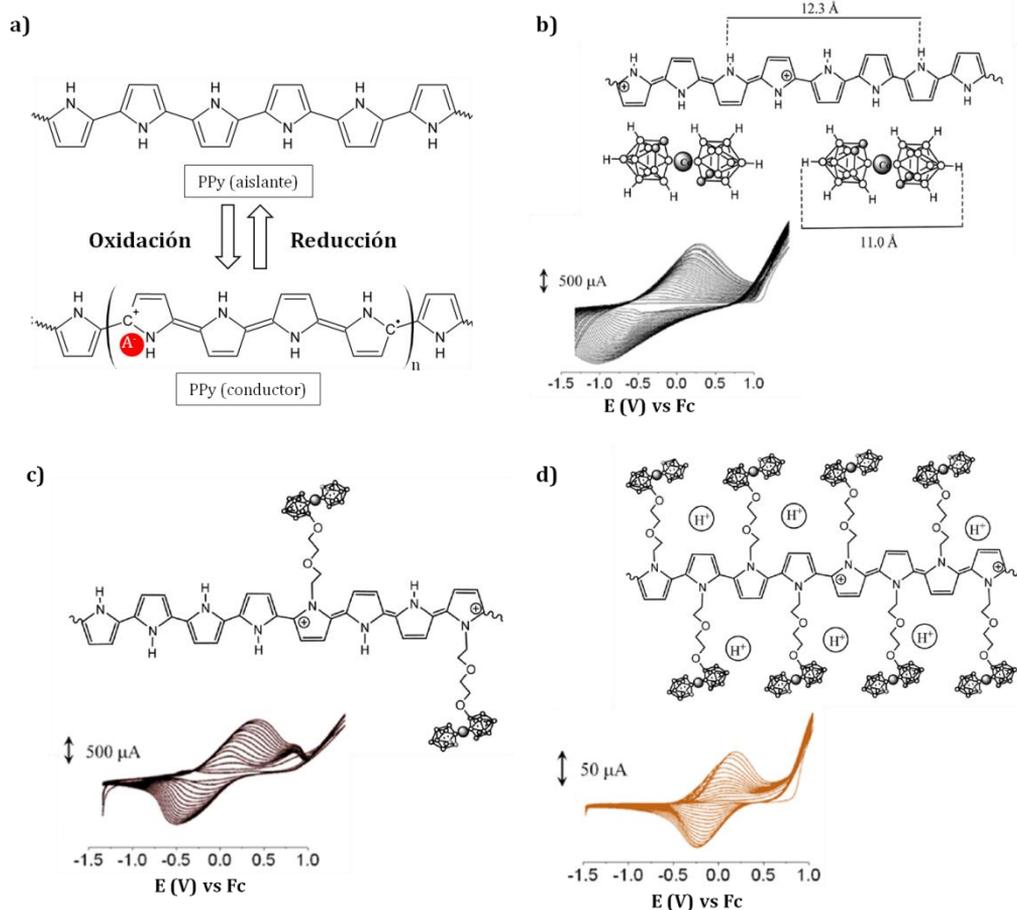


Figura 1. 11. a) Esquema de la reducción y la oxidación del polipirrol con la formación de polarones compensados con agentes dopantes aniónicos (A⁻); b) Electropolimerización del polipirrol con COSANE libre; c) Electropolimerización de unidades de pirrol y pirrol enlazado a COSANE; d) Electropolimerización de pirrol enlazado a COSANE.

En el año 2000 Teixidor y *col.* utilizaron el COSANE como agente dopante aniónico para electropolimerizar pirrol (ver **Figura 1. 11. b**). Comprobaron por espectroscopía fotoelectrónica de rayos-X (XPS) que cada molécula de COSANE interaccionaba con cuatro unidades de pirrol y que además, el material polimérico formado presentaba un límite de resistencia a la sobreoxidación superior a otros agentes dopantes como el DBS y el PF₆⁻.⁴⁰

Dos años más tarde, el mismo grupo enlazó covalentemente una unidad de pirrol con una unidad de COSANE mediante el COSANE-DIOXANATO. De esta forma obtuvo un copolímero formado por unidades de pirrol y pirrol

---Introducción---

enlazado al COSANE (ver **Figura 1. 11. c**) y un material polimérico formado por unidades de pirrol enlazado al COSANE (ver **Figura 1. 11. d**). Sólo en el caso del copolímero observaron que al sobreoxidarlo no aparecía ningún pico de degradación, dando lugar a un material aún más resistente que el PPy con COSANE libre.⁴¹

El polímero conductor más estudiado utilizando el metalacborano como agente dopante es el PPy. Se han hecho estudios para calcular el límite de resistencia a la sobreoxidación,¹⁰⁶ se ha utilizado como intercambiador de cationes,¹⁰⁷ se ha estudiado la influencia de utilizar metalacboranos con diferente carga, sustituyente, forma y composición,^{106, 108, 109} se ha estudiado la capacidad de recuperación después de sobreoxidarse el polímero¹¹⁰ y se ha utilizado como capa conductora en electrodos selectivos de iones.^{111, 112} Además del PPy también se ha utilizado el PTh y el PEDOT, aunque han sido estudios preliminares.^{80, 113}

1.4.3. Aplicaciones en energía.

Las aplicaciones en energía como el almacenamiento de hidrógeno, las pilas de combustible, las baterías, los supercondensadores, las celdas solares, entre otras, han sido muy estudiadas en los últimos años debido al enorme interés en encontrar materiales o dispositivos alternativos a los convencionales que contaminen menos el medio ambiente y que puedan satisfacer la demanda energética actual.

Singh y *col.* estudiaron la capacidad de diferentes metalacboranos para almacenar hidrógeno, utilizando distintos metales de transición (Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co y Ni) y distintas estructuras ($C_2B_4H_6M$, $C_2B_9H_{11}M$, $C_2B_8H_{10}M_2$ y $C_4B_8H_{12}M_2$). Además, la presencia de átomos de carbono permitió la formación de MOFs donde la adsorción de H_2 se produce por la interacción de Kubas (permite el enlace de un átomo metálico con múltiples moléculas de H_2) y por fisisorción en los poros, dando lugar a una mayor adsorción de hidrógeno.¹¹⁴

Según cálculos teóricos los mejores metales de transición fueron el Sc y el Ti, ya que la capacidad de almacenar H_2 disminuye a medida que aumenta el número de electrones en la capa d. Respecto a las distintas estructuras,

cuando sólo hay un metal se adsorben 5 moléculas de H₂, pero cuando participan dos metales de transición el número de moléculas adsorbidas aumenta (10 para el Sc y 8 para el Ti), llegando a un máximo de un ~7-8% en peso adsorbido.¹¹⁴

Dentro de las aplicaciones de pilas de combustible, supercondensadores y baterías los metalacarboranos podrían ser utilizados como electrolitos, ya que varios autores han utilizado sales de boranos y carboranos para tal fin. Jena y *col.* estudiaron mediante cálculos teóricos si los clústeres de boro Li₂[B₁₂H₁₂] y Li[CB₁₁H₁₂] se podían utilizar como electrolitos en baterías de ion-Li, a partir del cálculo de la energía necesaria para quitar un ion Li⁺ y de su afinidad hacia moléculas de agua.¹¹⁵ Mientras que otros autores investigaron las conductividades iónicas de Na₂[B₁₂H₁₂],¹¹⁶ Na₂[B₁₀H₁₀],¹¹⁷ Li[CB₁₁H₁₂]¹¹⁸ y Na[CB₁₁H₁₂]¹¹⁸, dando lugar a materiales con una conductividad iónica rápida o conductividad superiónica que puede ser utilizada en la nueva generación de baterías como electrolitos sólidos. En cambio, los metalacarboranos no han sido tan estudiados como los boranos y los carboranos, y por este motivo, una parte de esta tesis se basa en el estudio de diferentes sales de metalacarborano para ser utilizadas en pilas de combustible, supercondensadores y baterías.

Por último, dentro de la aplicación de celdas solares el metalacarborano de níquel ha sido utilizado como electrolito redox en las celdas Graetzel para sustituir el par redox I⁻/I₃⁻.¹¹⁹ Aunque no llega a mejorar la eficiencia de la celda respecto al I⁻/I₃⁻, sí que lo hace cuando se compara con otros complejos metálicos de Co o Cu y con el par redox Fc/Fc⁺.¹¹⁹ También se han sintetizado varios derivados del metalacarborano de níquel para ser utilizados como electrolitos redox, incorporando grupos funcionales que cambian la polaridad, la solubilidad y otras propiedades del material para así interactuar mejor con el colorante.¹²⁰

Aunque sólo el metalacarborano de níquel haya sido probado en celdas solares Graetzel, hay varios estudios con los metalacarboranos de cobalto y de hierro que tienen como finalidad ser utilizados en estas celdas solares. Granier y *col.* sintetizaron dos derivados del COSANE (con el grupo funcional fosfato y fosfinato) que fueron anclados covalentemente a la

---Introducción---

superficie de nanopartículas de TiO₂ para ser utilizados como colorantes en las celdas.¹²¹ Mientras que Teixidor y *col.* sintetizaron derivados de COSANE y de FESANE con unidades bipyridina para así obtener moléculas con una alta capacidad para aceptar electrones. Estas moléculas fueron comparadas con el fullereno C₆₀ y con su derivado PCBM (compuestos muy utilizados en celdas solares orgánicas), resultando ser mucho más solubles y teniendo el mismo número de electrones.¹²²

1.5. Objetivos generales.

Los objetivos generales de esta tesis doctoral se basan principalmente en utilizar distintos metalacarboranos, COSANE y FESANE y cuando sea necesario algún derivado de ellos, para estudiar su aplicabilidad en el campo de la biomedicina y de la energía.

- Dentro del campo de la biomedicina se estudiará la interacción entre los metalacarboranos y las biomoléculas como el ADN y las proteínas, siguiendo uno de los trabajos realizados por el grupo de investigación donde se estudió que el COSANE traspasaba la membrana celular y se acumulaba dentro de la célula (Capítulos 2 y 3 de la tesis, respectivamente).
- Dentro del campo de la energía se estudiarán las propiedades más relevantes de polímeros dopados con metalacarboranos para su uso en pilas de combustible, baterías y supercondensadores (Capítulo 4 de la tesis) y se caracterizará un supercondensador acuoso basado en carbón activado utilizando como aditivo electroactivo del carbón activado un derivado clorado del COSANE (Capítulo 5 de la tesis).

1.6. Referencias.

1. W. G. Woods, *Environ. Health Perspect.*, 1994, **102**, 5.
2. H. Davy, *Phil. Trans. R. Soc. A*, 1808, **98**, 333-370.
3. J. J. Berzelius, *Ann. Phys.*, 1824, **77**, 169-230.
4. E. Weintraub, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1911, **3**, 299-301.
5. A. Stock and C. Massenez, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1912, **45**, 3539-3568.
6. H. Longuet-Higgins and R. Bell, *J. Chem. Soc.*, 1943, 250-255.
7. S. Hermanek, *Chem. Rev.*, 1992, **92**, 175-175.

8. W. N. Lipscomb, *Science*, 1977, **196**, 1047-1055.
9. H. Brown, *Inc, New York*, 1975.
10. H. Longuet-Higgins, *J. Chim. Phys.*, 1949, **46**, 268-275.
11. N. Greenwood and A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements 2nd Edition*, Butterworth-Heinemann, 1997.
12. W. N. Lipscomb, *Boron hydrides*, Courier Corporation, 2012.
13. J. Aihara, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 3339-3342.
14. V. Volkov and V. Ikorskii, *J. Struct. Chem.*, 2004, **45**, 694-705.
15. R. King, *Russ. Chem. Bull.*, 1993, **42**, 1283-1291.
16. R. B. King, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 1119-1152.
17. J. Poater, M. Solà, C. Viñas and F. Teixidor, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 12191-12195.
18. J. Poater, M. Solà, C. Viñas and F. Teixidor, *Chem. Eur. J.*, 2016, **22**, 7437-7443.
19. W. Eberhardt, B. Crawford Jr and W. N. Lipscomb, *J. Chem. Phys.*, 1954, **22**, 989-1001.
20. R. Hoffmann and W. N. Lipscomb, *J. Chem. Phys.*, 1962, **37**, 2872-2883.
21. R. N. Grimes, *Carboranes*, Academic Press, 2016.
22. D. M. Schubert, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 2004.
23. D. Mingos, *Nature*, 1972, **236**, 99-102.
24. R. Rudolph and W. Pretzer, *Inorg. Chem.*, 1972, **11**, 1974-1978.
25. R. E. Williams, *Inorg. Chem.*, 1971, **10**, 210-214.
26. R. W. Rudolph, *Acc. Chem. Res.*, 1976, **9**, 446-452.
27. K. Wade, in *Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry*, eds. H. J. Emeléus and A. G. Sharpe, Academic Press, 1976, vol. 18, pp. 1-66.
28. R. E. Williams, *Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry*, 1976, **18**, 67-142.
29. M. M. Fein, J. Bobinski, N. Mayes, N. Schwartz and M. S. Cohen, *Inorg. Chem.*, 1963, **2**, 1111-1115.
30. T. Heying, J. Ager Jr, S. Clark, D. Mangold, H. Goldstein, M. Hillman, R. Polak and J. Szymanski, *Inorg. Chem.*, 1963, **2**, 1089-1092.
31. D. Grafstein and J. Dvorak, *Inorg. Chem.*, 1963, **2**, 1128-1133.
32. S. Papetti and T. L. Heying, *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, **86**, 2295-2295.
33. R. N. Grimes, *Coord. Chem. Rev.*, 2000, **200**, 773-811.
34. N. Hosmane and J. Maguire, *Comprehensive Organometallic Chemistry III*, 2007, **3**, 175-264.
35. M. F. Hawthorne, D. C. Young and P. A. Wegner, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, **87**, 1818-1819.
36. M. F. Hawthorne and T. D. Andrews, *Chem. Commun.*, 1965, 443-444.
37. L. F. Warren and M. F. Hawthorne, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 470-471.
38. H. W. Rühle and M. F. Hawthorne, *Inorg. Chem.*, 1968, **7**, 2279-2282.
39. L. F. Warren Jr and M. F. Hawthorne, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 4823-4828.
40. C. Masalles, S. Borrós, C. Viñas and F. Teixidor, *Adv. Mater.*, 2000, **12**, 1199-1202.
41. C. Masalles, J. Llop, C. Vinas and F. Teixidor, *Adv. Mater.*, 2002, **14**, 826.

42. M. F. Hawthorne, D. C. Young, T. D. Andrews, D. V. Howe, R. L. Pilling, A. D. Pitts, M. Reintjes, L. F. Warren Jr and P. A. Wegner, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 879-896.
43. I. Bennour, A. M. Cioran, F. Teixidor and C. Vinas, *Green Chem.*, 2019.
44. M. R. Churchill, K. Gold, J. N. Francis and M. F. Hawthorne, *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, **91**, 1222-1223.
45. A. Franken, J. Plešek and C. Nachtigal, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1997, **62**, 746-751.
46. I. B. Sivaev and V. I. Bregadze, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1999, **64**, 783-805.
47. J. Plešek, S. Heřmánek, K. Baše, L. J. Todd and W. Wright, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1976, **41**, 3509-3515.
48. J. Plešek, S. Heřmánek, A. Franken, I. Císařová and C. Nachtigal, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1997, **62**, 47-56.
49. F. Teixidor, J. Pedrajas, I. Rojo, C. Viñas, R. Kivekäs, R. Sillanpää, I. Sivaev, V. Bregadze and S. Sjöberg, *Organometallics*, 2003, **22**, 3414-3423.
50. J. Plešek, B. Grüner, J. Macháček, I. Císařová and J. Čáslavský, *J. Organomet. Chem.*, 2007, **692**, 4801-4804.
51. V. I. Bregadze, S. V. Timofeev, I. B. Sivaev and I. A. Lobanova, *Russ. Chem. Rev.*, 2004, **73**, 433-453.
52. A. M. Cioran, F. Teixidor and C. Viñas, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 2809-2818.
53. B. A. Wojtczak, A. Andrysiak, B. Grüner and Z. J. Lesnikowski, *Chem. Eur. J.*, 2008, **14**, 10675-10682.
54. E. J. Juárez-Pérez, M. Granier, C. Viñas, P. H. Mutin and R. Núñez, *Chem. Asian J.*, 2012, **7**, 277-281.
55. J. Rak, B. Dejlová, H. Lampová, R. Kaplánek, P. Matějčík, P. Cígler and V. Král, *Mol. Pharm.*, 2013, **10**, 1751-1759.
56. I. B. Sivaev, Z. A. Starikova, S. Sjöberg and V. I. Bregadze, *J. Organomet. Chem.*, 2002, **649**, 1-8.
57. J. Llop, C. Masalles, C. Viñas, F. Teixidor, R. Sillanpää and R. Kivekäs, *Dalton Trans.*, 2003, 556-561.
58. P. Farràs, F. Teixidor, R. Kivekäs, R. Sillanpää, C. Viñas, B. Grüner and I. Cisarova, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 9497-9508.
59. J. r. Plešek, B. r. Grüner, S. Heřmánek, J. Báča, V. r. Mareček, J. Jänchenová, A. Lhotský, K. Holub, P. Selucký and J. Rais, *Polyhedron*, 2002, **21**, 975-986.
60. B. Grüner, L. Mikulášek, J. Báča, I. Císařová, V. Böhmer, C. Danila, M. M. Reinoso-García, W. Verboom, D. N. Reinhoudt and A. Casnati, *Eur. J. Org. Chem.*, 2005, **2005**, 2022-2039.
61. P. Matějčík, P. Cígler, A. B. Olejniczak, A. Andrysiak, B. Wojtczak, K. Procházka and Z. J. Lesnikowski, *Langmuir*, 2008, **24**, 2625-2630.
62. P. Farras, A. M. Cioran, V. c. Šícha, F. Teixidor, B. Štíbr, B. r. Grüner and C. Viñas, *Inorg. Chem.*, 2009, **48**, 8210-8219.
63. P. Farràs, C. Viñas and F. Teixidor, *J. Organomet. Chem.*, 2013, **747**, 119-125.

64. A. N. Gashti, J. C. Huffman, A. Edwards, G. Szekeley, A. R. Siedle, J. A. Karty, J. P. Reilly and L. J. Todd, *J. Organomet. Chem.*, 2000, **614**, 120-124.
65. P. K. Hurlburt, R. L. Miller, K. D. Abney, T. M. Foreman, R. J. Butcher and S. A. Kinkhead, *Inorg. Chem.*, 1995, **34**, 5215-5219.
66. D. Olid, R. Núñez, C. Viñas and F. Teixidor, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 3318-3336.
67. P. Matějček, P. Cígler, K. Procházka and V. Král, *Langmuir*, 2006, **22**, 575-581.
68. I. B. Sivaev and V. V. Bregadze, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2009, **2009**, 1433-1450.
69. J. G. Planas, C. Viñas, F. Teixidor, A. Comas-Vives, G. Ujaque, A. Lledós, M. E. Light and M. B. Hursthouse, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 15976-15982.
70. J. G. Planas, C. Viñas, F. Teixidor, M. E. Light and M. B. Hursthouse, *J. Organomet. Chem.*, 2006, **691**, 3472-3476.
71. J. G. Planas, F. Teixidor, C. Vinas, M. E. Light and M. B. Hursthouse, *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**, 2493-2502.
72. P. Bauduin, S. Prevost, P. Farràs, F. Teixidor, O. Diat and T. Zemb, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 5298-5300.
73. D. Brusselle, P. Bauduin, L. Girard, A. Zaulet, C. Viñas, F. Teixidor, I. Ly and O. Diat, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 12114-12118.
74. R. Núñez, M. r. Tarrés, A. Ferrer-Ugalde, F. F. de Biani and F. Teixidor, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 14307-14378.
75. M. Tarrés, V. S. Arderiu, A. Zaulet, C. Viñas, F. F. de Biani and F. Teixidor, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 11690-11695.
76. Y.-K. Yan, D. M. P. Mingos, M. Kurmoo, W.-S. Li, I. J. Scowen, M. McPartlin, A. T. Coomber and R. H. Friend, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1995, 2851-2860.
77. Y.-K. Yan, D. M. P. Mingos, D. J. Williams and M. Kurmoo, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1995, 3221-3230.
78. L. Todd, *Advances in Organometallic Chemistry*, 1970, **8**, 87.
79. S. S. Graham and P. A. Jelliss, *Inorg. Chim. Acta*, 2014, **410**, 195-201.
80. B. Fabre, E. Hao, Z. M. LeJeune, E. K. Amuhaya, F. Barrière, J. C. Garno and M. G. H. Vicente, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2010, **2**, 691-702.
81. C. Viñas, J. Pedrajas, J. Bertran, F. Teixidor, R. Kivekäs and R. Sillanpää, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 2482-2486.
82. R. N. Grimes, *Metal interactions with boron clusters*, Springer Science & Business Media, 2013.
83. I. Rojo, F. Teixidor, C. Viñas, R. Kivekäs and R. Sillanpää, *Chem. Eur. J.*, 2003, **9**, 4311-4323.
84. M. Lupu, A. Zaulet, F. Teixidor, E. Ruiz and C. Viñas, *Chem. Eur. J.*, 2015, **21**, 6888-6897.
85. R. Núñez, O. Tutusaus, F. Teixidor, C. Viñas, R. Sillanpää and R. Kivekäs, *Chem. Eur. J.*, 2005, **11**, 5637-5647.
86. D. Rudakov, V. Shirokii, V. Knizhnikov, A. Bazhanov, E. Vecher, N. Maier, V. Potkin, A. Ryabtsev, P. Petrovskii and I. Sivaev, *Russ. Chem. Bull.*, 2004, **53**, 2554-2557.

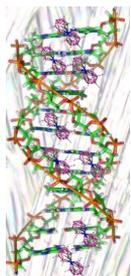
87. N. S. Hosmane, *Boron science: new technologies and applications*, CRC press, 2016.
88. J. Plešek, *Chem. Rev.*, 1992, **92**, 269-278.
89. R. F. Barth, A. H. Soloway, J. H. Goodman, R. A. Gahbauer, N. Gupta, T. E. Blue, W. Yang and W. Tjarks, *Neurosurg.*, 1999, **44**, 433-450.
90. A. A. Vitale, G. Hoffmann and A. B. Pomilio, *Mol. Med. Chem.*, 2005, **8**, 1-49.
91. H. Joensuu, L. Kankaanranta, T. Seppälä, I. Auterinen, M. Kallio, M. Kulvik, J. Laakso, J. Vähätalo, M. Kortesianiemi and P. Kotiluoto, *J. Neuro-Oncol.*, 2003, **62**, 123-134.
92. A. Soloway, H. Hatanaka and M. Davis, *J. Med. Chem.*, 1967, **10**, 714-717.
93. E. Hao, M. Sibrian-Vazquez, W. Serem, J. C. Garno, F. R. Fronczek and M. G. H. Vicente, *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**, 9035-9042.
94. C. Viñas, F. Teixidor and R. Núñez, *Inorg. Chim. Acta*, 2014, **409**, 12-25.
95. D. Kaniowski, K. Ebenryter-Olbińska, M. Sobczak, B. Wojtczak, S. Janczak, Z. Leśnikowski and B. Nawrot, *Molecules*, 2017, **22**, 1393.
96. R. Frank, V. M. Ahrens, S. Boehnke, A. G. Beck-Sickingler and E. Hey-Hawkins, *Chem. Bio. Chem.*, 2016, **17**, 308-317.
97. M. Białek-Pietras, A. B. Olejniczak, S. Tachikawa, H. Nakamura and Z. J. Leśnikowski, *Bioorganic Med. Chem.*, 2013, **21**, 1136-1142.
98. M. Tarrés, E. Canetta, C. Viñas, F. Teixidor and A. J. Harwood, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 3370-3372.
99. M. Tarrés, E. Canetta, E. Paul, J. Forbes, K. Azzouni, C. Vinas, F. Teixidor and A. J. Harwood, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 7804.
100. M. Nieuwenhuyzen, K. R. Seddon, F. Teixidor, A. V. Puga and C. Viñas, *Inorg. Chem.*, 2009, **48**, 889-901.
101. R. D. Kennedy, D. J. Clingerman, W. Morris, C. E. Wilmer, A. A. Sarjeant, C. L. Stern, M. O’Keeffe, R. Q. Snurr, J. T. Hupp and O. K. Farha, *Cryst. Growth Des.*, 2014, **14**, 1324-1330.
102. E. J. Juárez-Pérez, C. Viñas, F. Teixidor and R. Núñez, *Organomet.*, 2009, **28**, 5550-5559.
103. V. Ďord’ovič, M. Uchman, M. Reza, J. Ruokolainen, A. Zhigunov, O. I. Ivankov and P. Matějček, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 9884-9892.
104. G. Inzelt, *J. Solid State Electrochem.*, 2017, **21**, 1965-1975.
105. N. K. Jangid, N. P. S. Chauhan, K. Meghwal, R. Ameta and P. Punjabi, *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, 2014, **5**, 383-412.
106. S. Gentil, E. Crespo, I. Rojo, A. Friang, C. Viñas, F. Teixidor, B. Grüner and D. Gabel, *Polymer*, 2005, **46**, 12218-12225.
107. C. Masalles, S. Borrós, C. Viñas and F. Teixidor, *Adv. Mater.*, 2002, **14**, 449-452.
108. A. Pepiol, F. Teixidor, R. Sillanpää, M. Lupu and C. Viñas, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 12491-12495.
109. M. Tarrés, C. Viñas, A. M. Cioran, M. M. Hänninen, R. Sillanpää and F. Teixidor, *Chem. Eur. J.*, 2014, **20**, 15808-15815.

110. E. Crespo, S. Gentil, C. Vinas and F. Teixidor, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 18381-18386.
111. I. M. De Oliveira, D. Risco, F. Vocanson, E. Crespo, F. Teixidor, N. Zine, J. Bausells, J. Samitier and A. Errachid, *Sens. Actuators B Chem.*, 2008, **130**, 295-299.
112. C. Masalles, S. Borros, C. Vinas and F. Teixidor, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **372**, 513-518.
113. V. David, C. Viñas and F. Teixidor, *Polymer*, 2006, **47**, 4694-4702.
114. A. K. Singh, A. Sadrzadeh and B. I. Yakobson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 14126-14129.
115. S. Giri, S. Behera and P. Jena, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 13916-13919.
116. T. J. Udovic, M. Matsuo, A. Unemoto, N. Verdal, V. Stavila, A. V. Skripov, J. J. Rush, H. Takamura and S.-i. Orimo, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 3750-3752.
117. T. J. Udovic, M. Matsuo, W. S. Tang, H. Wu, V. Stavila, A. V. Soloninin, R. V. Skoryunov, O. A. Babanova, A. V. Skripov and J. J. Rush, *Adv. Mater.*, 2014, **26**, 7622-7626.
118. W. S. Tang, A. Unemoto, W. Zhou, V. Stavila, M. Matsuo, H. Wu, S.-i. Orimo and T. J. Udovic, *Energy Environ. Sci.*, 2015, **8**, 3637-3645.
119. T. C. Li, A. M. Spokoyny, C. She, O. K. Farha, C. A. Mirkin, T. J. Marks and J. T. Hupp, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 4580-4582.
120. A. M. Spokoyny, T. C. Li, O. K. Farha, C. W. Machan, C. She, C. L. Stern, T. J. Marks, J. T. Hupp and C. A. Mirkin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **122**, 5467-5471.
121. E. J. Juárez-Pérez, P. H. Mutin, M. Granier, F. Teixidor and R. Núñez, *Langmuir*, 2010, **26**, 12185-12189.
122. A. B. Buades, V. c. Sanchez Arderiu, D. Olid-Britos, C. Viñas, R. Sillanpää, M. Haukka, X. Fontrodona, M. Paradinas, C. Ocal and F. Teixidor, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 2957-2970.

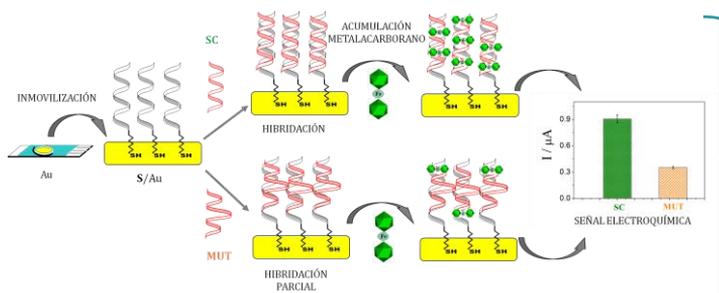
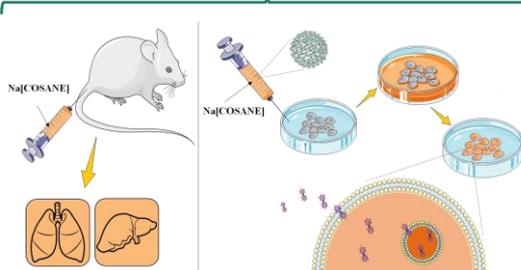
CAPÍTULO 2

INTERACCIÓN ENTRE EL ADN Y LOS METALACARBORANOS, BIODISTRIBUCIÓN Y APLICACIÓN COMO SENSOR MUTAGÉNICO

INTERACCIÓN ENTRE EL ADN Y LOS METALACARBORANOS



DISTRIBUCIÓN DE Na[COSANE] EN CÉLULAS, SANGRE Y RATONES



MARCADORES ELECTROQUÍMICOS EN SENSORES DE ADN

RESUMEN DEL CAPÍTULO 2^{1, 2}

Este capítulo se basa principalmente en el estudio de la interacción entre el ADN y los metalacarboranos Na[COSANE], Na[FESANE] y Na[Cl₆-FESANE] mediante las siguientes técnicas: curva de desnaturalización, dicroísmo circular, UV-Visible, DLS, CryoTEM, TEM, IR, raman y microscopio óptico. Además de estudiar la distribución y citotoxicidad del Na[COSANE] en las células glioblastoma U87 y melanoma A375, y la distribución de boro en la sangre de caballo y en los órganos de ratones. También se ha estudiado si el Na[FESANE] y el Na[Cl₆-FESANE] pueden actuar como marcadores electroquímicos en sensores de ADN para detectar mutaciones, ya sea en secuencias de ADN sintéticas o por PCR.

Índice del Capítulo

| | pag. |
|--|------|
| 2. INTERACCIÓN ENTRE EL ADN Y LOS METALACARBORANOS, BIODISTRIBUCIÓN Y APLICACIÓN COMO SENSOR MUTAGÉNICO | 31 |
| 2.1. Estado actual. | 31 |
| 2.1.1. Ácidos nucleicos. | 31 |
| 2.1.2. Ácidos nucleicos y metalacboranos. | 33 |
| 2.2. Objetivos. | 36 |
| 2.3. Interacción entre el ADN y los metalacboranos. | 36 |
| 2.3.1. Curva de desnaturalización y dicroísmo circular. | 37 |
| 2.3.2. Absorción UV-Visible. | 41 |
| 2.3.3. Dispersión dinámica de luz (DLS), CryoTEM y TEM. | 44 |
| 2.3.4. Aislamiento de CT- <i>ds</i> DNA-Na[COSANE] y caracterización por IR, Raman, Microscopio Óptico y TEM. | 49 |
| 2.4. Distribución de Na[COSANE] en células, sangre y ratones. | 50 |
| 2.4.1. Distribución de Na[COSANE] en células. | 52 |
| 2.4.2. Distribución de Na[COSANE] en sangre. | 55 |
| 2.4.3. Distribución de Na[COSANE] en ratones. | 57 |
| 2.5. Marcadores electroquímicos en sensores de ADN. | 58 |
| 2.5.1. Interacción entre CT- <i>ds</i> DNA y Na[FESANE]/Na[Cl ₆ -FESANE] mediante voltametría de pulso diferencial (DPV). | 62 |
| 2.5.2. Sensor de ADN. | 63 |
| 2.5.3. Biosensor para detectar mutaciones genéticas. | 66 |
| 2.6. Conclusiones. | 69 |
| 2.7. Referencias. | 71 |

2. INTERACCIÓN ENTRE EL ADN Y LOS METALACARBORANOS, BIODISTRIBUCIÓN Y APLICACIÓN COMO SENSOR MUTAGÉNICO

2.1. Estado actual.

A partir de los estudios realizados por Viñas y *col.* donde se investigó la capacidad de los metalacarboranos para traspasar la membrana celular y acumularse dentro de la célula,³ además de comprobar que estas moléculas no son citotóxicas pero sí citoestáticas;⁴ se empezó a cuestionar sobre: ¿Por qué el metalacarborano tiene más afinidad dentro de la célula que fuera? ¿Qué biomoléculas hay dentro de la célula con las que pueda interactuar?

Respondiendo a estas preguntas, las biomoléculas más abundantes dentro de la célula son los hidratos de carbono, las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos. Y teniendo en cuenta que los metalacarboranos tienen afinidad para formar puentes de hidrógeno y dihidrógeno con moléculas que tengan átomos electronegativos como el nitrógeno y el oxígeno, sobre todo con grupos amino,⁵⁻⁷ las moléculas biológicas con más probabilidad de interactuar son los ácidos nucleicos y las proteínas.

Este capítulo de tesis se basa en el estudio de la interacción entre los ácidos nucleicos y los metalacarboranos. Mientras que el capítulo 3 se basará en el estudio de la interacción entre las proteínas y los metalacarboranos. Así de esta forma se intenta responder a las preguntas formuladas estudiando las dos biomoléculas con más probabilidad de interactuar.

2.1.1. Ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos son biomacromoléculas constituidas por nucleótidos, encargadas de almacenar, transmitir y expresar la información genética. Estas biomoléculas están presentes en las células animales, vegetales y bacterianas, concretamente en el núcleo, mitocondrias y cloroplastos de las células eucariotas y en el citoplasma de las células procariotas. Existen dos tipos de ácidos nucleicos distintos: el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). La principal diferencia entre ellos se basa en la composición y estructura de sus nucleótidos.⁸

Interacción entre el ADN y los metalacarboranos

Los nucleótidos están formados por un grupo fosfato, que es el causante de las cargas negativas de los ácidos nucleicos, pudiendo ser un nucleótido monofosfatado, difosfatado o trifosfatado (ver **Figura 2. 1** en rojo); por una pentosa, siendo desoxirribosa para el ADN o ribosa para el ARN (ver **Figura 2. 1** en amarillo); y por una base nitrogenada, siendo purina (adenina o guanina) o pirimidina (timina, citosina y uracilo), ver **Figura 2. 1** en azul.⁸

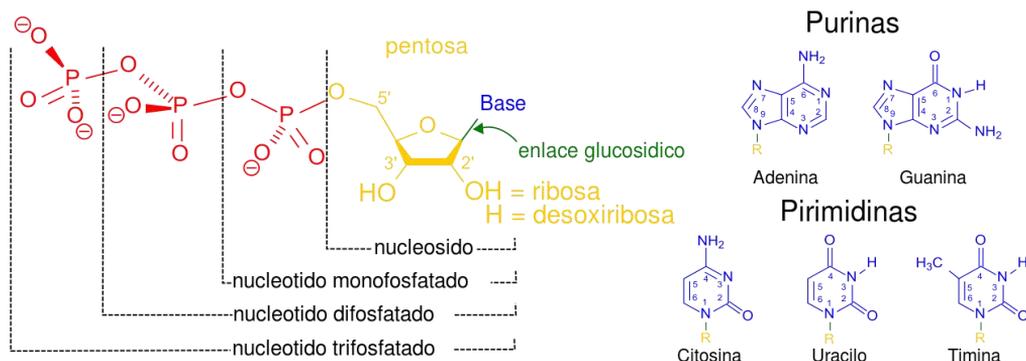


Figura 2. 1. Elementos estructurales de los nucleótidos más comunes.

Además de la pentosa, el ADN y el ARN se diferencian en los pares de bases nitrogenadas, en el caso del ADN los pares de bases son adenina-timina (A-T) y guanina-citosina (G-C); mientras que en el ARN son adenina-uracilo (A-U) y G-C. La interacción entre los distintos pares de bases es mediante puentes de hidrógeno; mientras que la interacción entre los grupos fosfatos y las pentosas es por enlace covalente, dando lugar a la formación de una cadena polimérica (ver **Figura 2. 2** derecha).⁸

La estructura secundaria del ADN se basa en dos hebras de nucleótidos enrolladas en forma de doble hélice, quedando en el exterior los grupos fosfatos con la carga negativa y en el interior las bases nitrogenadas con los puentes de hidrógeno (ver **Figura 2. 2**). El diámetro de la doble hélice es de 2 nm, la distancia entre un nucleótido y el siguiente es de 0.34 nm y la distancia entre una vuelta de hélice es de 3.4 nm, es decir, que por cada vuelta de hélice hay 10 nucleótidos. Por tanto, las dos cadenas que forman el ADN son antiparalelas y complementarias. Por otro lado, la estructura secundaria del ARN se basa en una sola hebra de nucleótidos, que puede o no estar enrollada entre sí.⁸

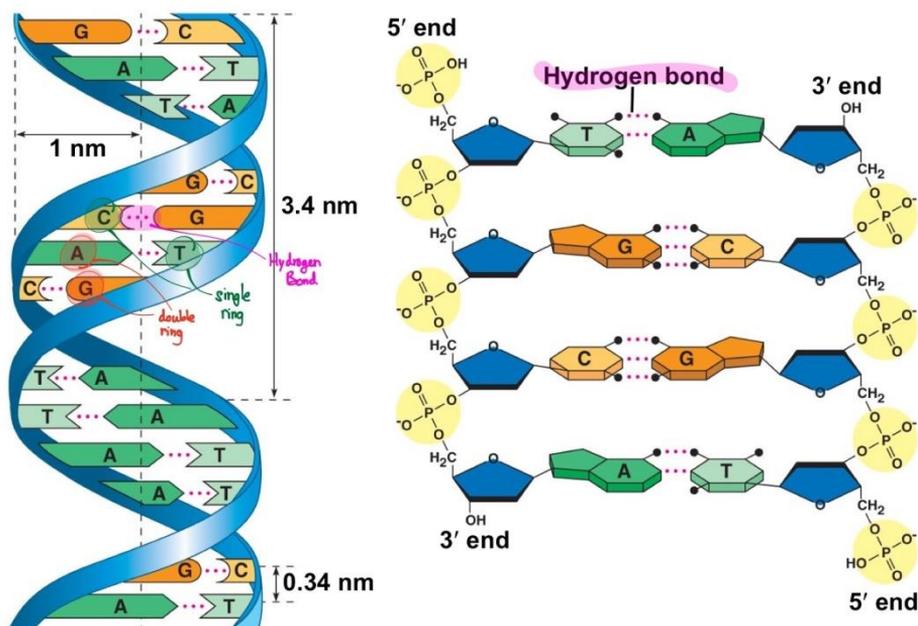


Figura 2. Estructura secundaria del ADN. A la derecha se observan los tipos de enlace entre los pares de bases nitrogenadas (puentes de hidrógeno) y entre los grupos fosfatos y las pentosas (enlace fosfodiéster). A la izquierda se observan los tamaños del radio de la doble hélice, de la distancia de un nucleótido al contiguo y de una vuelta de hélice.

Una vez explicado brevemente qué son los ácidos nucleicos, cuáles son los elementos estructurales de los nucleótidos, cuáles son las diferencias entre el ADN y el ARN, y cómo es la estructura secundaria del ADN; se va a profundizar sobre los estudios realizados entre los ácidos nucleicos y los metalacarboranos en los últimos años.

2.1.2. Ácidos nucleicos y metalacarboranos.

En 2003 Lesnikowski y *col.* sintetizaron por primera vez el COSANE unido al nucleósido de timina a partir del COSANE-DIOXANATO y enlazado a uno de los oxígenos de la timina.⁹ Utilizaron este nuevo compuesto para hacer un oligonucleótido de catorce nucleótidos estando el COSANE-DIOXANATO-TIMINA en la posición 5', comprobaron que no era citotóxico, que podía ser utilizado en BNCT¹⁰ y que al tener propiedades redox podría ser utilizado como marcador redox para nucleósidos.⁹

Años más tarde, el mismo grupo enlazó el COSANE-DIOXANATO con los nucleósidos de timina, adenina, guanina y citosina (con guanina y timina

---Interacción entre el ADN y los metalacarboranos---

sintetizaron isómeros estructurales, ver **Figura 2. 3**),¹¹ para utilizarlos como marcadores de oligonucleótidos de ADN mediante la técnica de IR. Ya que el COSANE presenta una banda estrecha y muy marcada en el espectro de IR sobre 2500 cm^{-1} y no solapa con ninguna banda característica de los nucleósidos.¹² También estudiaron las propiedades de complejación con el catión Na^+ de los diferentes isómeros estructurales de guanina y timina (**Figura 2. 3**) mediante ^{23}Na -RMN y espectroscopía de ESI masas.¹³

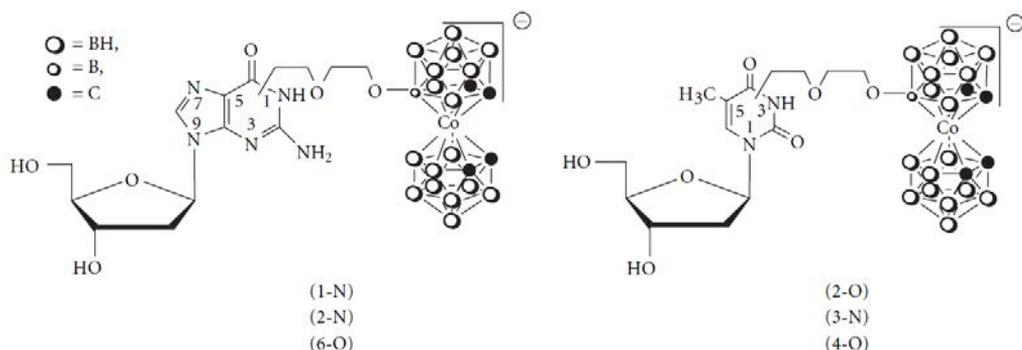


Figura 2. 3. COSANE-DIOXANATO-GUANINA (izquierda) y COSANE-DIOXANATO-TIMINA (derecha) con sus respectivos isómeros estructurales.

Una vez conocido como enlazar el COSANE-DIOXANATO con el nucleósido de adenina, el mismo grupo también sintetizó el FESANE-DIOXANATO-ADENINA,¹⁴ el metalacarborano de cromo-DIOXANATO-ADENINA¹⁵ y formaron dinucleótidos enlazados al metalacarborano de cobalto y de hierro.¹⁴ Además, estudiaron las propiedades electroquímicas mediante voltametría cíclica de los diferentes nucleósidos de ADN enlazados con COSANE¹⁶ y del metalacarborano de cromo y de hierro con el nucleósido de adenina.^{15, 16} Los valores de potencial redox para el Co están desplazados ligeramente para los diferentes nucleósidos ($E_{\text{COSANE-DIOXANATO-TIMINA}} = -1.23\text{ V}$, $E_{\text{COSANE-DIOXANATO-ADENINA}} = -1.13\text{ V}$, $E_{\text{COSANE-DIOXANATO-GUANINA}} = -1.05\text{ V}$ y $E_{\text{COSANE-DIOXANATO-CITOSINA}} = -1.14\text{ V vs Ag/AgCl}$), pudiendo utilizarse como marcadores electroquímicos para la detección de la hibridación del ADN.¹⁷ Mientras que el potencial redox para el Fe y para el Cr es $-0.07\text{ V vs Ag/AgCl}$ ¹⁷ y 1.59 V vs Pd ¹⁵ respectivamente, y también podrían ser utilizados como marcadores electroquímicos para el ADN, ya que para un mismo nucleósido se obtienen valores diferentes de potencial redox.

Interacción entre el ADN y los metalacarboranos

Por tanto, a partir de los estudios de las propiedades electroquímicas de los metalacarboranos de Co, Fe y Cr enlazados al nucleósido de adenina, se ha investigado su aplicación como marcador electroquímico. Para ello, se ha incorporado el nucleótido enlazado al metalacarborano en la posición 5' de una secuencia de una sola cadena de ADN (ssDNA) con 19 nucleótidos (ver **Figura 2. 4**).¹⁸

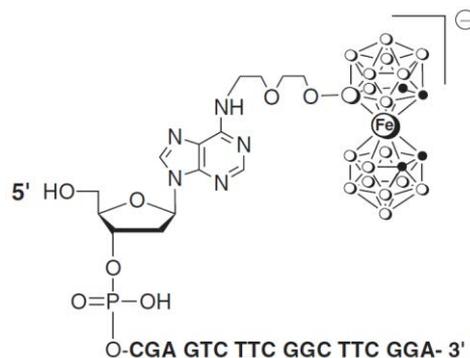


Figura 2. 4. Secuencia de ADN de 19 nucleótidos con el FESANE unido al nucleótido de adenina en la posición 5'.

Por otro lado, en un electrodo de oro se ha depositado la secuencia de 19 nucleótidos complementaria a la de la **Figura 2. 4** sin el metalacarborano y con un grupo tiol en la posición 5'. De los tres posibles metalacarboranos se eligió el de Fe, ya que el de Cr no daba ninguna señal de corriente y el de Co tiene un potencial redox sobre -1 V que dificulta trabajar con un electrodo de oro. Después del proceso de hibridación de la secuencia depositada sobre el electrodo de oro y de la secuencia con el marcador de FESANE, se comprobó mediante técnicas electroquímicas que el FESANE se puede usar como marcador redox en la hibridación del ADN, ya que se obtuvo una señal de corriente sobre -0.45 V correspondiente al Fe.¹⁸

Una vez comprobado que el FESANE actúa como marcador electroquímico en la hibridación del ADN, se realizó otro experimento donde se depositó sobre un electrodo de oro una secuencia de oligonucleótidos con FESANE en la posición 5', es decir, en contacto con la superficie del electrodo, dando lugar a una respuesta electroquímica al potencial redox del FESANE. Con el proceso de hibridación de una secuencia complementaria se observó que la señal electroquímica disminuía a medida que aumentaba la concentración de ésta. En cambio, si la secuencia de ADN no era complementaria la señal electroquímica del FESANE quedaba constante.¹⁹ Pero si el ADN tiene 180-190 pares de bases y la secuencia complementaria (19 nucleótidos) se encuentra al principio, al final o en medio de la cadena, sólo funcionará el FESANE como marcador redox cuando la secuencia complementaria se encuentre al principio o en medio de la cadena.¹⁹

-----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

2.2. Objetivos.

Los objetivos de este capítulo se basan principalmente en responder a las preguntas formuladas a partir de las investigaciones realizadas por Viñas y *col.*^{3,4} y que se resumen a continuación:

- Estudio de la interacción entre el ADN y los metalacarboranos de Co, Fe y un derivado de Fe, COSANE, FESANE y Cl₆-FESANE. En vez de estar enlazados covalentemente a un nucleótido se estudiará su interacción en disolución.
- Estudio de la biodistribución del COSANE en células, en sangre y en ratones para ver en qué partes de la célula y en qué órganos tiene tendencia a acumularse, y estudio de citotoxicidad en células.
- Estudio de FESANE y Cl₆-FESANE como marcadores electroquímicos para ser utilizados en sensores de ADN.

2.3. Interacción entre el ADN y los metalacarboranos.

Los metalacarboranos elegidos para este estudio son COSANE, FESANE y Cl₆-FESANE (**Figura 2. 5**). En todos los casos se ha utilizado la sal de Na para que sean solubles en agua y que el pH sea neutro. El Cl₆-FESANE se sintetizó a partir de FESANE con SO₂Cl₂ en acetonitrilo.²

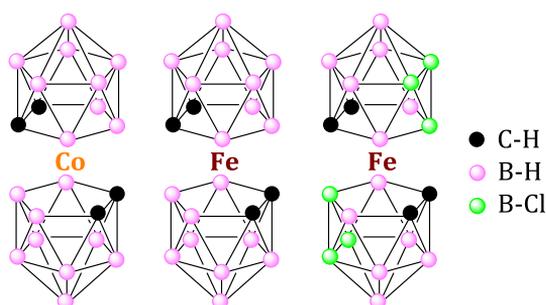


Figura 2. 5. Estructura del COSANE, FESANE y Cl₆-FESANE (de izquierda a derecha).

Para saber los pesos moleculares exactos de todos los metalacarboranos y poder hacer el estudio de interacción con precisión, es necesario saber cuántas aguas de hidratación lleva el Na. Para ello, se realizó un análisis termogravimétrico (ATG) del Na[COSANE] (**Figura 2. 6**), donde se observa una pérdida de masa del 11.47% correspondiente a 2.49 moléculas de agua. Por tanto, los pesos moleculares serían: [Na·2.5H₂O][COSANE] = 391 g/mol; [Na·2.5H₂O][FESANE] = 388 g/mol y [Na·2.5H₂O][Cl₆-FESANE] = 595 g/mol. Para simplificar la fórmula de los distintos metalacarboranos se abrevia a Na[COSANE], Na[FESANE] y Na[Cl₆-FESANE].

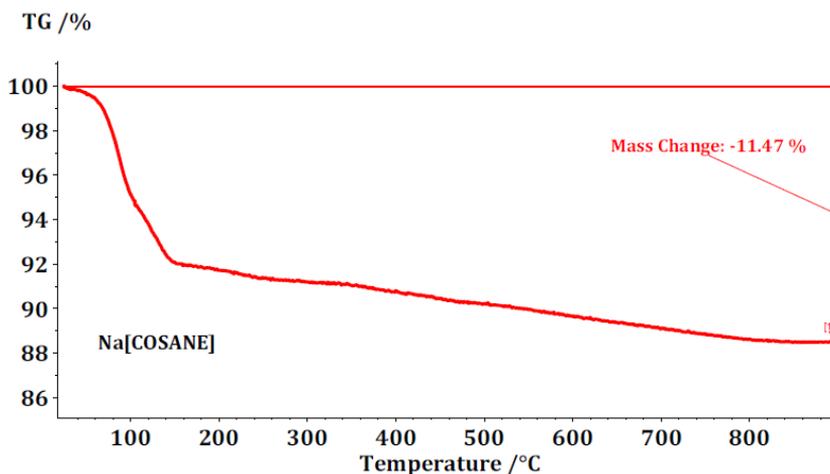


Figura 2. 6. Curva de ATG de Na[COSANE] en atmósfera de N₂ de 25 a 900°C.

El ADN utilizado en este estudio es de doble cadena y ha sido aislado del timo del ternero, en inglés *Calf Thymus*, se abrevia como CT-*dsDNA*. Tiene un coeficiente de extinción molar de 6600 L mol⁻¹ cm⁻¹ y un máximo de absorción a 260 nm. A partir del ADN de doble cadena se puede obtener el de cadena sencilla (CT-*ssDNA*) calentando la disolución durante 30 min a 100°C y luego enfriando rápidamente con un baño de hielo. Todas las disoluciones han sido preparadas con agua Milli-Q, en tampón fosfato a pH 7 o en medio salino para ver cómo afecta la fuerza iónica. Esta parte del trabajo y el apartado 2.5 se han realizado en colaboración con la doctora Tánia García y la catedrática Encarnación Lorenzo de la Universidad Autónoma de Madrid.

2.3.1. Curva de desnaturalización y dicroísmo circular.

Las diferentes interacciones que puede presentar el ADN con moléculas pequeñas como los metalacboranos (1.1 x 0.60 nm para Na[COSANE] y Na[FESANE] y 1.1 x 0.68 nm para Na[Cl₆-FESANE]) son tres. Las moléculas pequeñas se pueden colocar en los surcos del ADN, o bien intercaladas entre dos nitrógenos de los pares de bases y electrostáticamente en el exterior de la doble hélice. Mayoritariamente las moléculas pequeñas interaccionan con los surcos del ADN o intercalando. Entre el surco mayor (2.2 nm) y el surco menor (1.2 nm) interaccionan más en el surco menor, ya que caben mejor y tienen menor impedimento estérico. En el caso de la intercalación entre los pares de bases A-T y G-C interaccionan más con la A-T, ya que la distancia entre los dos nitrógenos es más corta que en G-C.²⁰

---Interacción entre el ADN y los metalacarboranos---

Para saber qué tipo de interacción (surcos, intercalación o electrostática) a la doble hélice presentan los distintos metalacarboranos, se realiza una curva de desnaturalización del ADN. Cuando el ADN está sometido a cierta temperatura se rompen los puentes de hidrógeno que unen los pares de bases nitrogenadas, dando lugar a dos cadenas sencillas de ADN. Si los metalacarboranos se colocaran entre los nitrógenos de los pares de bases, la temperatura de desnaturalización del ADN (T_m) sería mayor, ya que conseguiría estabilizar la rotura de los puentes de hidrógeno unos grados más. Pero si los metalacarboranos se encontraran interaccionando con los surcos o electrostáticamente, la temperatura de desnaturalización del ADN se mantendría igual o incluso podría disminuir.

En la **Figura 2. 7. a** se puede observar la curva de desnaturalización en tampón fosfato a pH 7 del CT-*ds*DNA en negro, siendo su T_m de 66°C. En presencia de los distintos metalacarboranos dicha T_m varía. En el caso del Na[COSANE] (curva en rojo) la T_m decrece $5.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$ respecto a la del ADN, indicando que el tipo de interacción que tiene lugar es por surco o electrostática a la doble hélice. Como el COSANE es un anión y la cadena del ADN está formada por fosfatos, la interacción más probable que tiene lugar es en los surcos. En cambio, tanto el Na[FESANE] (curva en azul) como el Na[Cl₆-FESANE] (curva en verde) estabilizan la rotura de los puentes de hidrógeno dando lugar a un aumento de la T_m de $4.9 \pm 0.2^\circ\text{C}$ y $7.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$, respectivamente. En este caso el tipo de interacción con el ADN en ambos compuestos es por intercalación entre los nitrógenos de los pares de bases, siendo la interacción más fuerte en presencia de Na[Cl₆-FESANE]. Una posible explicación de este hecho es que al tener cloruros en su estructura den lugar a un carácter más ácido al C-H, mejorando su capacidad de formar puentes de hidrógeno y de di-hidrógeno.

Como el Na[COSANE] en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 interacciona en los surcos del ADN, se prueba a repetir la curva de desnaturalización pero aumentando la fuerza iónica con NaCl 0.4 M (**Figura 2. 7. b**). Al aumentar la fuerza iónica, los iones Na⁺ y Cl⁻ interaccionan electrostáticamente con la doble hélice, haciendo que los surcos sean más estrechos y favoreciendo que el Na[COSANE] se intercale en los nitrógenos de los pares de bases del ADN, aumentando así la T_m $13.0 \pm 0.7^\circ\text{C}$ más.

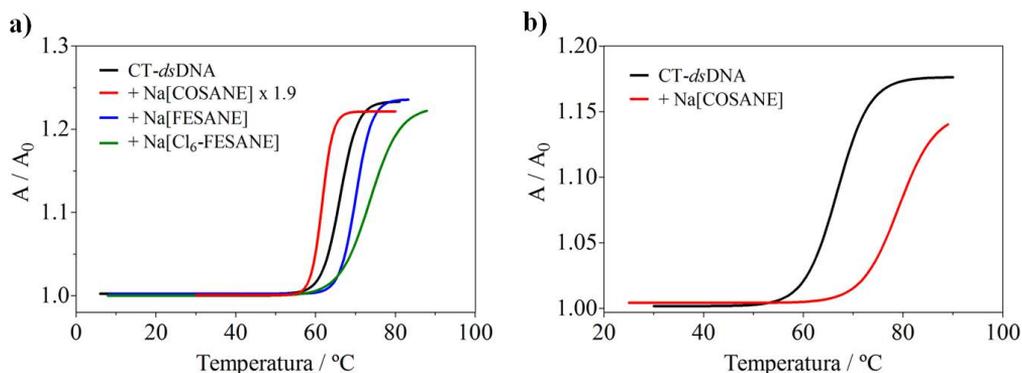


Figura 2. 7. a) Curva de desnaturalización del CT-*ds*DNA en ausencia (negro) y en presencia de Na[COSANE] (rojo), Na[FESANE] (azul) y Na[Cl₆-FESANE] (verde) en tampón fosfato 0.1 M a pH 7; b) Curva de desnaturalización del CT-*ds*DNA en ausencia (negro) y en presencia de Na[COSANE] (rojo) en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 + NaCl 0.4 M. Absorbancia a 260 nm.

Una vez conocido el tipo de interacción entre los metalacarboranos y el ADN en tampón fosfato y en el caso del Na[COSANE] también aumentando la fuerza iónica, se estudiará mediante dicroísmo circular como afectan los distintos metalacarboranos a la estructura secundaria del ADN.

El Na[COSANE], Na[FESANE] y Na[Cl₆-FESANE] no exhiben ninguna señal en el espectro de dicroísmo circular, ya que son compuestos aquirales con un plano de simetría. En cambio, el ADN es una macromolécula quiral que puede tener tres conformaciones distintas (A-ADN, B-ADN y Z-ADN) que dan lugar a tres espectros de dicroísmo circular diferentes. El A-ADN y B-ADN son dextrógiros y tienen un máximo a 270 y 275 nm y un mínimo a 210 y 245 nm, respectivamente, siendo el máximo del A-ADN más del doble de intenso que el del B-ADN. Mientras que el Z-ADN es levógiro y tiene un máximo a 260 nm y un mínimo a 290 nm.²¹

La conformación que presenta el CT-*ds*DNA corresponde a la del B-ADN, es decir, presenta un máximo a 275 nm debido al apilamiento de los pares de bases, un mínimo a 245 nm debido a la helicidad del ADN y un máximo a 221 nm debido a la formación de puentes de hidrógeno.²² La **Figura 2. 8** muestra el dicroísmo circular del CT-*ds*DNA en ausencia (en negro) y en presencia de concentraciones crecientes de los distintos metalacarboranos en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 (**Figura 2. 8. a b c**) y en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 + NaCl 0.4 M (**Figura 2. 8. d**).

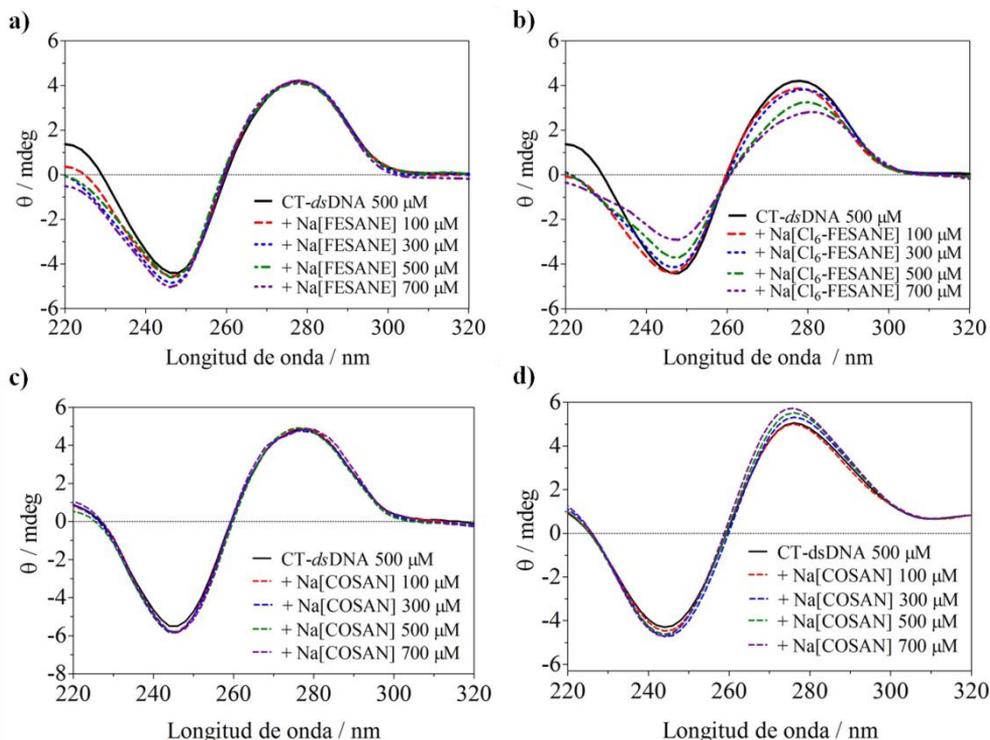


Figura 2. 8. Espectros de dicroísmo circular de 500 μ M CT-*ds*DNA en presencia de diferentes concentraciones de a) Na[FESANE], b) Na[Cl₆-FESANE], c) Na[COSANE] en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 y d) en presencia de Na[COSANE] en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 + NaCl 0.4 M.

En la **Figura 2. 8. a** se puede observar como el Na[FESANE] no perturba el apilamiento de los pares de bases, pero sí la helicidad de las cadenas del ADN y la formación de los puentes de hidrógeno. En cambio, el Na[Cl₆-FESANE] perturba tanto el apilamiento de las bases como la helicidad y la formación de los puentes de hidrógeno (ver **Figura 2. 8. b**). A diferencia del Na[FESANE], la perturbación que provoca el Na[Cl₆-FESANE] al CT-*ds*DNA es mucho mayor; ya que, la elipticidad molar en 245 y 275 nm disminuye notablemente y además se produce un desplazamiento del máximo de la banda de 275 a 281 nm. Todo ello indica que la interacción es intercalativa en ambos casos y que el Na[Cl₆-FESANE] presenta una interacción más fuerte con el CT-*ds*DNA, en concordancia con los resultados de la curva de desnaturalización.

Por el contrario, el Na[COSANE] en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 (**Figura 2. 8. c**) no perturba ni el apilamiento de los pares de bases, ni la formación de

-----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

puentes de hidrógeno, sólo perturba muy poco la helicidad de las cadenas de ADN. Este hecho indica que la interacción no es intercalativa, sino que es por surco. En cambio, si en vez de tampón fosfato se añade NaCl 0.4 M para incrementar la fuerza iónica (**Figura 2. 8. d**), se puede observar como el Na[COSANE] altera además de la helicidad del ADN, el apilamiento de los pares de bases, cambiando el tipo de interacción a intercalativa, como en la curva de desnaturalización.

2.3.2. Absorción UV-Visible.

Los tres metalacarboranos estudiados presentan diferentes espectros de absorción en el UV-Visible. El Na[FESANE] tiene máximos de absorción en la región UV a 270 y 295 nm y en la región del visible a 445 nm. El Na[Cl₆-FESANE] presenta máximos de absorción en el UV a 250 y 295 nm y en el visible a 620 nm. Y el Na[COSANE] muestra un máximo de absorción en la región UV a 280 nm y otro en la región del visible a 446 nm. El Na[FESANE] (ϵ_{270}), Na[Cl₆-FESANE] (ϵ_{250}) y Na[COSANE] (ϵ_{280}) tienen los coeficientes de extinción molar a 19620, 6210 y 17700 Lmol⁻¹cm⁻¹, respectivamente.

Como el CT-*ds*DNA tiene un máximo de absorción a 260 nm y solaparía con las bandas de absorción de los metalacarboranos en la región UV, se hace un estudio manteniendo fija la concentración de los metalacarboranos a 1 mM y añadiendo concentraciones crecientes de CT-*ds*DNA (de 0 a 200 o 600 μ M en pares de bases) en la región del visible (ver **Figura 2. 9**). En todos los casos se observa un incremento significativo de la banda de absorción a medida que la concentración de CT-*ds*DNA aumenta, tanto estando los metalacarboranos en tampón fosfato (**Figura 2. 9. a b c**) como estando el Na[COSANE] en tampón fosfato + NaCl 0.4 M (**Figura 2. 9. d**). Este aumento de absorción se debe al efecto hipercrómico que presenta el ADN cuando interacciona fuertemente con pequeñas moléculas.²³

A partir de los datos obtenidos en la **Figura 2. 9** se puede representar la absorbancia del máximo de absorción vs. la relación de concentraciones [CT-*ds*DNA]/[Metalacarborano] en tampón fosfato (**Figura 2. 10. a b c**) y en tampón fosfato + NaCl 0.4 M (**Figura 2. 10. d**). Ello da lugar a dos rectas en todos los casos, cuya intersección indica el número de metalacarboranos que hay por cada par de base de ADN.

-----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

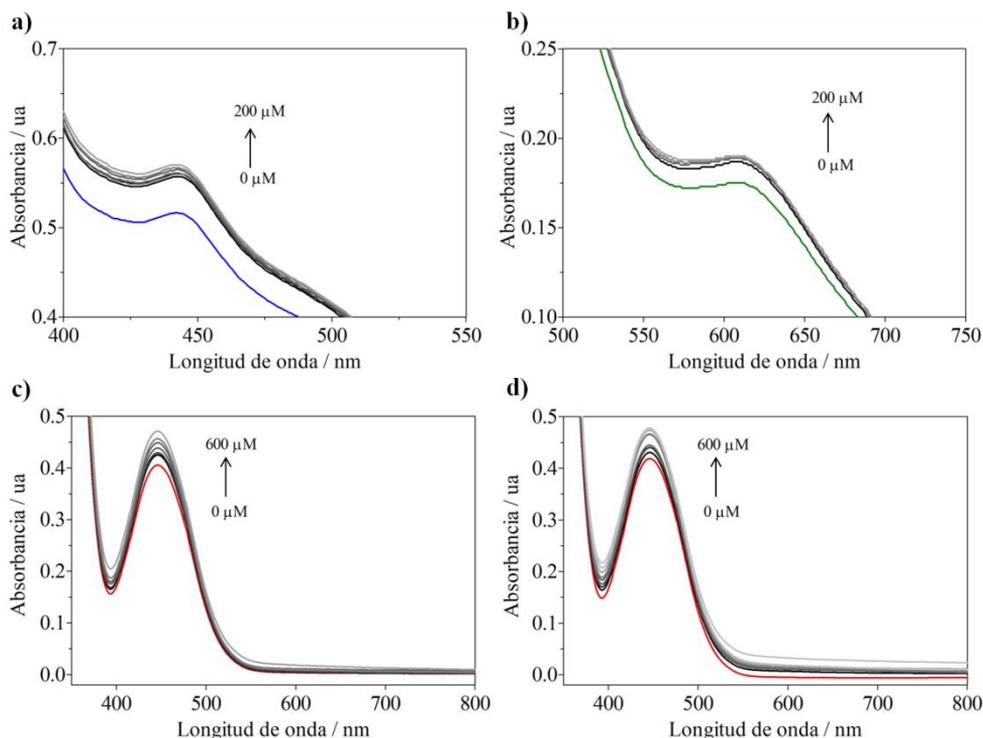


Figura 2. 9. Espectros de absorción de a) Na[FESANE] (azul), b) Na[Cl₆-FESANE] (verde) y c) Na[COSANE] (rojo) 1 mM en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 y d) Na[COSANE] (rojo) 1mM en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 + NaCl 0.4 M en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de CT-dsDNA (de 0 a 200 o 600 μM en pares de bases, de negro a gris).

En el caso del Na[FESANE] (**Figura 2. 10. a**) la intersección se encuentra a 0.053 [CT-dsDNA]/[FESANE] dando lugar a 18 moléculas de FESANE por cada par de base de ADN. El valor de intersección para el Na[Cl₆-FESANE] (**Figura 2. 10. b**) es similar al del Na[FESANE] con 0.054 [CT-dsDNA]/[Cl₆-FESANE] y 18 moléculas de Cl₆-FESANE por cada par de base de ADN. En cambio, para el Na[COSANE] (**Figura 2. 10. c**) la intersección se encuentra a 0.036 [CT-dsDNA]/[COSANE] con 28 moléculas de COSANE por cada par de base. Mientras que al incrementar la fuerza iónica, el Na[COSANE] (**Figura 2. 10. d**) tiene la intersección en 0.179 [CT-dsDNA]/[COSANE] y por cada par de base de ADN, hay 6 moléculas de COSANE. En todos los casos el número de moléculas por par de bases de ADN es grande, pero como bien se ha explicado en el Capítulo 1, los metalacarboranos tienen la habilidad de formar vesículas y micelas de tamaños nanométricos en medio acuoso, haciendo posible que quepan todas las moléculas por cada par de bases.

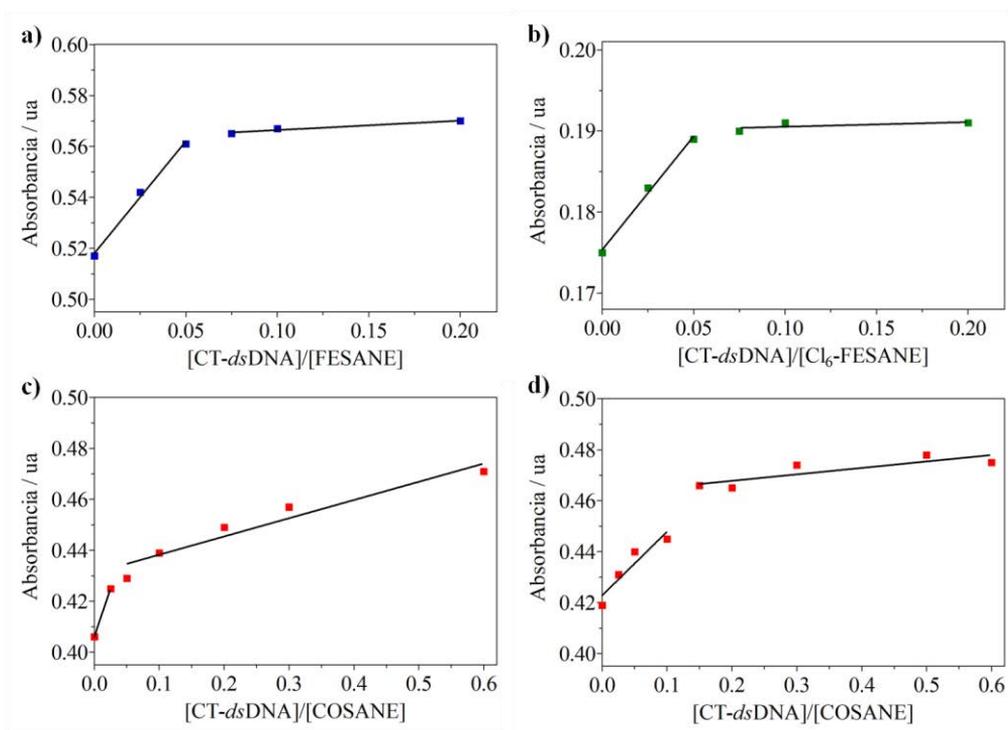


Figura 2. 10. Representación gráfica de la absorbancia en el máximo de absorción de la **Figura 2. 9** respecto a la relación de concentraciones entre CT-dsDNA y a) FESANE, b) Cl₆-FESANE y c) COSANE en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 y d) COSANE en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 + NaCl 0.4 M.

Además del número de moléculas de metalacarborano por par de bases de ADN, también se pueden calcular con los datos obtenidos en la **Figura 2. 9** las constantes intrínsecas de enlace (K_b) de cada metalacarborano, a partir de la siguiente ecuación:^{24, 25}

$$\frac{[CT-dsDNA]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[CT-dsDNA]}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} \quad (1)$$

Siendo [CT-dsDNA] la concentración molar del ADN utilizado en cada una de las bandas de absorción de la **Figura 2. 9**, ε_a el coeficiente de extinción molar de cada uno de los puntos (es decir, el cociente entre la absorbancia observada y la concentración del metalacarborano), ε_f el coeficiente de extinción molar del metalacarborano y ε_b el coeficiente de extinción molar del complejo CT-dsDNA-Metalacarborano.

---Interacción entre el ADN y los metalacarboranos---

Las constantes intrínsecas de enlace obtenidas son: 2.8×10^5 , 4.8×10^5 , 1.0×10^5 y $7.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, para Na[FESANE], Na[Cl₆-FESANE], Na[COSANE] en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 y Na[COSANE] en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 + NaCl 0.4 M, respectivamente. Esta constante K_b permite determinar la fortaleza de unión entre los distintos metalacarboranos y el CT-*ds*DNA, siendo la interacción más fuerte en el caso del Na[Cl₆-FESANE]. Además, en el caso del Na[COSANE] se ha comprobado que la interacción con el ADN depende de la fuerza iónica del medio.

2.3.3. Dispersión dinámica de luz (DLS), CryoTEM y TEM.

Una vez se ha estudiado el tipo de interacción que existe entre los distintos metalacarboranos y el CT-*ds*DNA, la fortaleza de enlace y el número de moléculas de metalacarborano que hay en cada par de bases, se estudiará mediante dispersión dinámica de luz el tamaño del nanohíbrido formado.

Como se explicó en el Capítulo 1, los metalacarboranos tienen la capacidad de formar vesículas o micelas en medio acuoso.^{26, 27} En el rango de concentraciones en que se han hecho los estudios anteriores, todos los metalacarboranos se encuentran inicialmente en forma de vesículas, lo cual no implica que cuando interaccionen con el ADN se deban mantener las vesículas y no puedan formarse micelas más compactas. Como la técnica de DLS permite estudiar el diámetro hidrodinámico de nanopartículas en disolución, se ha elegido esta técnica para seguir la evolución del tamaño de las distintas vesículas de los metalacarboranos a medida que se añade concentraciones crecientes de CT-*ds*DNA (ver **Figura 2. 11**). Las medidas se han realizado en agua Milli-Q porque la presencia de iones como el tampón fosfato hace que el tamaño de las vesículas aumente.²⁷

Inicialmente el diámetro hidrodinámico de los metalacarboranos es: 39.71, 16.87 y 61.44 nm para el Na[FESANE], Na[Cl₆-FESANE] y Na[COSANE], respectivamente (**Figura 2. 11**). La diferencia de tamaños indica que la electronegatividad de los hidrógenos del clúster es distinta haciendo que la capacidad de autoensamblaje varíe de un metalacarborano a otro. En el caso del Na[Cl₆-FESANE], al tener seis halógenos en su estructura y sólo 16 hidrógenos en vez de 22, su capacidad de autoensamblaje se ve reducida dando lugar a vesículas de menor tamaño.

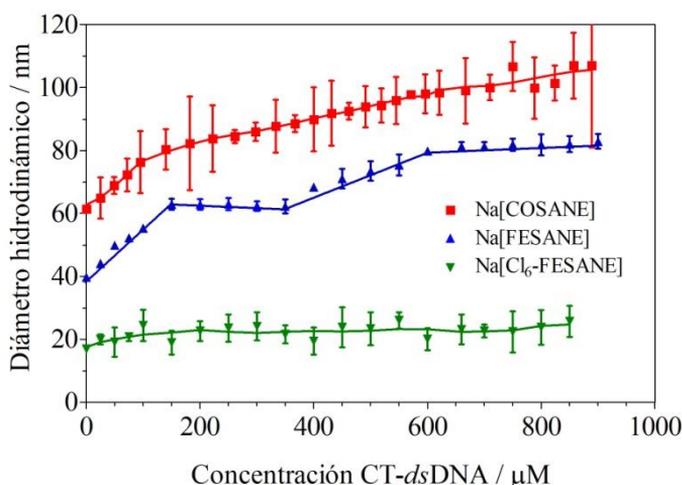


Figura 2. 11. Diámetro hidrodinámico de Na[COSANE] (en rojo), Na[FESANE] (en azul) y Na[Cl₆-FESANE] (en verde) en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de CT-dsDNA en agua.

Como se puede observar en la **Figura 2. 11**, a medida que la concentración de CT-dsDNA va aumentando, los tamaños de las vesículas de los distintos metalacarboranos siguen comportamientos diferentes. El Na[COSANE] tiene una subida rápida de tamaño hasta 100 μM de CT-dsDNA, luego el incremento de tamaño no es tan acusado hasta llegar a un valor de 107.00 nm. En el caso del Na[FESANE], se pueden observar dos escalones a 150-350 y a 600-900 μM de CT-dsDNA, llegando a un valor de 82.91 nm. Y por último el Na[Cl₆-FESANE] tiene un comportamiento casi constante durante toda la adición de CT-dsDNA llegando al valor de 25.71 nm.

Como en los experimentos anteriores se estudió la influencia de la fuerza iónica en la interacción del Na[COSANE] con el CT-dsDNA, se ha estudiado por DLS el tamaño del nanohíbrido formado (**Figura 2. 12**) cuando el medio de interacción es agua Milli-Q, tampón fosfato 0.1 M a pH 7 y tampón fosfato 0.1 M a pH 7 + NaCl 0.4 M. En todos los casos se observa un aumento del tamaño a medida que se incrementa la concentración de CT-dsDNA, pero como era de esperar a más concentración de iones en el medio, más grandes son las vesículas. En ausencia de ADN, la vesícula de Na[COSANE] mide 61.44, 99.84 y 91.31 nm en agua, tampón fosfato y tampón fosfato + NaCl 0.4 M, respectivamente; mientras que a 900 μM de CT-dsDNA miden 107.00, 135.47 y 161.80 nm, respectivamente.

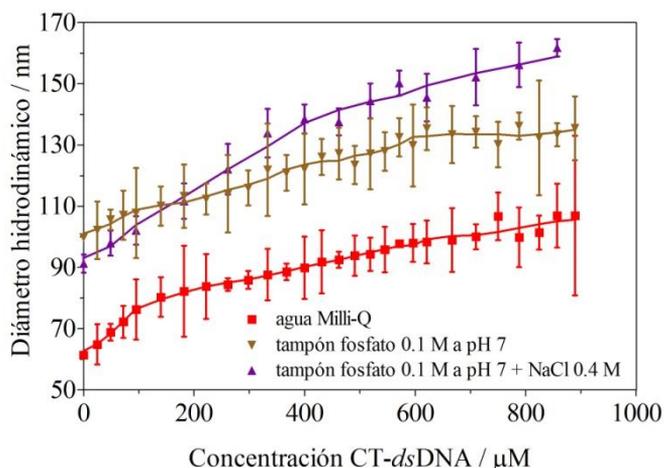


Figura 2. 12. Diámetro hidrodinámico de Na[COSANE] en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de CT-*ds*DNA en agua Milli-Q (en rojo), en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 (en marrón) y en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 + NaCl 0.4 M (en morado).

Aunque los valores obtenidos de diámetro hidrodinámico en la **Figura 2. 11** y en la **Figura 2. 12** presenten una incertidumbre grande, sobretodo en el caso del Na[COSANE], indicando que el índice de polidispersión es alto, hay que tener en cuenta que la técnica de DLS mide diámetros hidrodinámicos de partículas consideradas como esferas. Por esta razón, se utiliza como técnica complementaria el CryoTEM, para confirmar que los valores de DLS obtenidos son próximos a los tamaños adquiridos por esta técnica.

La técnica de CryoTEM se basa en criogenizar una disolución con la muestra a examinar con etano líquido, con tal de evitar la formación de cristales de hielo, y así observar por microscopio electrónico de transmisión cómo se encuentra la muestra en disolución. En la **Figura 2. 13** se puede ver la imagen de CryoTEM del CT-*ds*DNA en disolución, presentando un tamaño aproximado de 875.30 nm de largo x 265.03 nm de ancho. En esta imagen el CT-*ds*DNA está agregado.

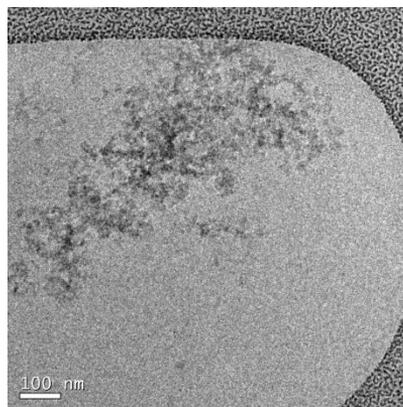


Figura 2. 13. Imagen de CryoTEM de una disolución de CT-*ds*DNA en agua Milli-Q.

-----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

Como el Na[COSANE] presenta grandes valores de incertidumbre en el DLS, se examina por CryoTEM las dimensiones de las vesículas en ausencia de CT-*ds*DNA en agua (Figura 2. 14. a), en tampón fosfato (Figura 2. 14. b) y en tampón fosfato + NaCl 0.4 M (Figura 2. 14. c); y en presencia de 850 μ M de CT-*ds*DNA en agua (Figura 2. 14. d), en tampón fosfato (Figura 2. 14. e) y en tampón fosfato + NaCl 0.4 M (Figura 2. 14. f).

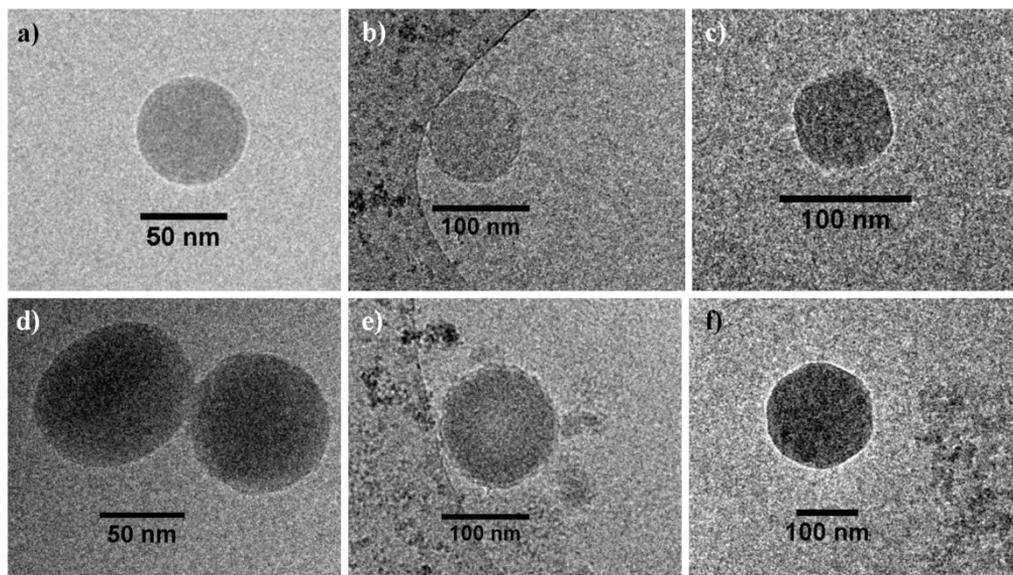


Figura 2. 14. Imágenes de CryoTEM de las vesículas de Na[COSANE] en ausencia de CT-*ds*DNA en a) agua, b) tampón fosfato 0.1 M a pH 7 y c) tampón fosfato 0.1 M a pH 7 + NaCl 0.4 M; y en presencia de 850 μ M de CT-*ds*DNA en d) agua, e) tampón fosfato 0.1 M a pH 7 y f) tampón fosfato 0.1 M a pH 7 + NaCl 0.4 M.

Las vesículas de Na[COSANE] en agua se ven mucho más definidas, más redondas, en comparación con las imágenes obtenidas en tampón fosfato o en tampón fosfato + NaCl 0.4 M, ya que la presencia de iones y sobretodo de NaCl acelera el proceso de descongelación, lo que hace más difícil el enfoque de la imagen y su captura y por tanto ocasiona que la imagen de CryoTEM esté más sucia, con artefactos y haciendo que el contraste de color entre las distintas partes de la rejilla no sea el óptimo.

Aun así, las dimensiones obtenidas por CryoTEM son comparadas con las del DLS en la **Tabla 2. 1**, donde se puede observar en todos los casos que los valores son muy similares entre las dos técnicas, confirmando que las curvas de DLS de Na[COSANE] son correctas.

----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

Tabla 2. 1. Valores de los tamaños de las vesículas de Na[COSANE] en nm, medidas en DLS y en CryoTEM en agua Milli-Q, tampón fosfato y tampón fosfato + NaCl 0.4 M, en ausencia y en presencia de 850 μM de CT-*dsDNA*.

| Na[COSANE] | DLS / nm | | CryoTEM / nm | |
|-----------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| | 0 μM | 850 μM | 0 μM | 850 μM |
| Agua Milli-Q | 61.44 | 107.00 | 64.46 | 96.32 |
| Tampón fosfato | 99.84 | 135.47 | 96.76 | 132.02 |
| Tampón fosfato + NaCl 0.4 M | 91.31 | 161.80 | 82.66 | 169.39 |

También se comparan los tamaños de las vesículas de Na[FESANE] libre y en presencia de 850 μM de CT-*dsDNA* (39.71 y 82.91 nm respectivamente por DLS) con las dimensiones obtenidas por CryoTEM y TEM (**Figura 2. 15**). La **Figura 2. 15 a c** muestra los tamaños de distintas vesículas por CryoTEM y TEM del Na[FESANE] libre con valores de diámetro muy similares a los obtenidos por DLS, al igual que en la **Figura 2. 15. b d** en presencia de 850 μM de CT-*dsDNA*, donde incluso en la imagen de TEM se puede observar una capa de ADN con 10 nm de espesor alrededor del Na[FESANE].

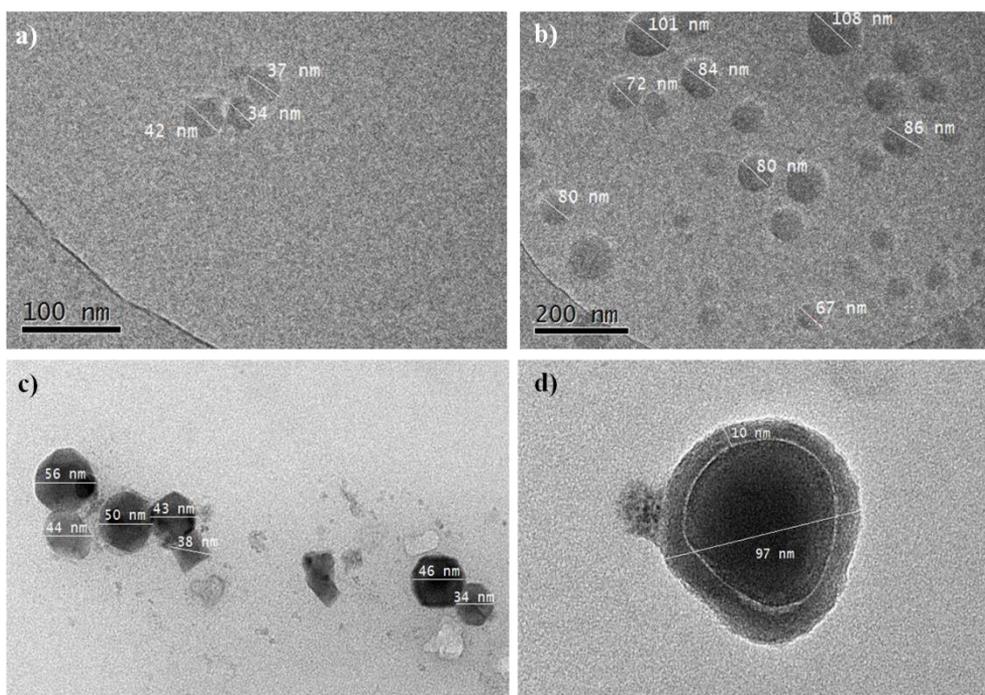


Figura 2. 15. Imágenes de CryoTEM de las vesículas de Na[FESANE] en a) ausencia de CT-*dsDNA* y b) en presencia de 850 μM de CT-*dsDNA*. Imágenes de TEM de Na[FESANE] en c) ausencia de CT-*dsDNA* y d) en presencia de 850 μM de CT-*dsDNA*.

2.3.4. Aislamiento de CT-*ds*DNA-Na[COSANE] y caracterización por IR, Raman, Microscopio Óptico y TEM.

Una vez estudiado la interacción de los distintos metalacarboranos con el CT-*ds*DNA en disolución, se elige el nanohíbrido de CT-*ds*DNA-Na[COSANE] para aislarlo y caracterizarlo por IR, raman, microscopio óptico y TEM.

Para aislar el nanohíbrido se deja durante 6 horas a temperatura ambiente una disolución con 25 mM de Na[COSANE] y 2 mM de CT-*ds*DNA. Pasado las 6 h de incubación se centrifuga y se separa. Se calcula la concentración final de Na[COSANE] enlazado al ADN a partir del Na[COSANE] libre que ha quedado en el sobrenadante mediante UV-Visible, siendo la concentración final de 6 mM. Una vez aislado se caracteriza por IR y raman (**Figura 2. 16**), donde se observa en ambos casos que el nanohíbrido formado presenta la señal característica sobre 2500 cm^{-1} correspondiente al B-H del COSANE y las señales sobre 1224 y 1080 cm^{-1} correspondientes al grupo fosfato del CT-*ds*DNA, sugiriendo que el nanohíbrido aislado está formado por CT-*ds*DNA y por Na[COSANE], como era de esperar.

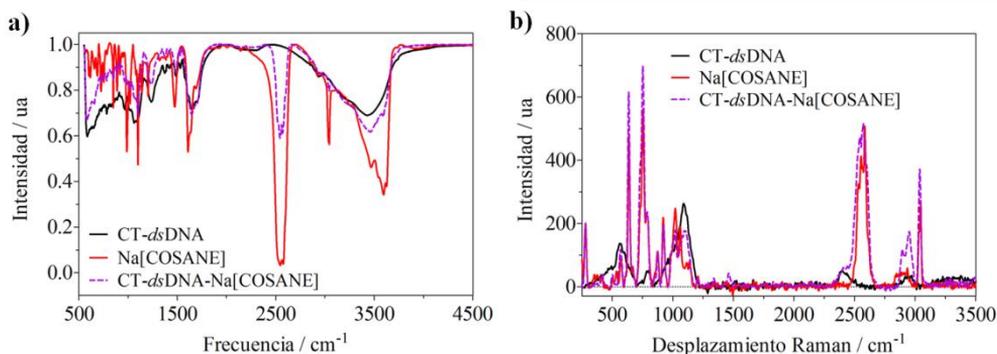


Figura 2. 16. a) Espectro de IR y b) espectro de Raman del CT-*ds*DNA (en negro), del Na[COSANE] (en rojo) y del CT-*ds*DNA-Na[COSANE] (en morado).

En la **Figura 2. 17** se pueden observar las imágenes de microscopio óptico del CT-*ds*DNA, del Na[COSANE] y del nanohíbrido CT-*ds*DNA-Na[COSANE]. La morfología del ADN (forma tipo flor) y el COSANE (forma tipo bastón y desordenada) es diferente, mientras que el nanohíbrido sigue la morfología del COSANE, pero en vez de estar desordenada está ensamblada y alineada, sugiriendo que el ADN actúa en este caso como aglomerante.

-----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

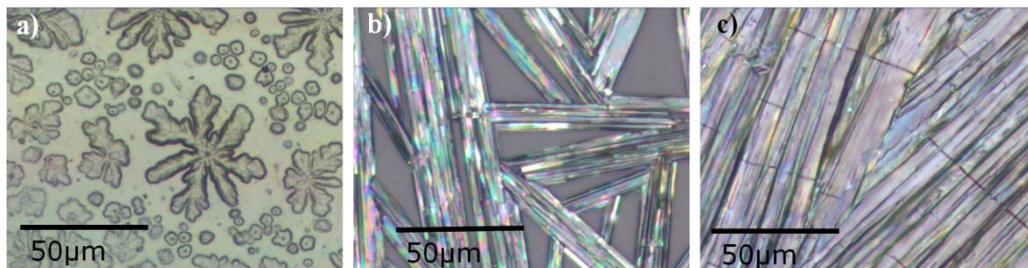


Figura 2. 17. Imágenes de microscopio óptico de a) CT-*dsDNA*, b) Na[COSANE] y c) CT-*dsDNA*-Na[COSANE]. Objetivo de la lente 50x.

Si la misma muestra se mira en TEM (**Figura 2. 18. a**), se puede ver como el nanohíbrido forma agregados globulares y heterogéneos en dimensiones nanométricas. Y si se hace el *mapping* en STEM de la misma figura (**Figura 2. 18. b c**), indicando el nitrógeno, cobalto y fósforo en color azul, verde y rojo, respectivamente, se puede observar como el COSANE se encuentra justo en la misma posición que los nitrógenos y los fósforos del ADN.

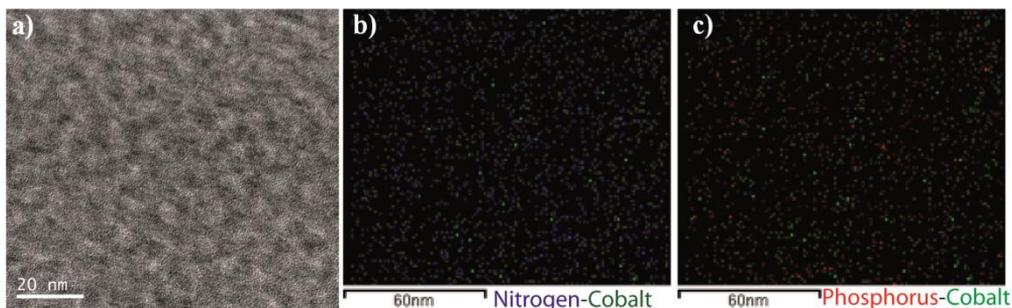


Figura 2. 18. a) Imagen de TEM del CT-*dsDNA*-Na[COSANE] y mapping de STEM con la relación b) N/Co en azul y verde respectivamente y c) P/Co en rojo y verde respectivamente.

2.4. Distribución de Na[COSANE] en células, sangre y ratones.

El segundo objetivo de este capítulo se basa en el estudio de la distribución del Na[COSANE] en células, en sangre y en ratones, para ver en qué parte de las células y en qué órganos se acumula en mayor proporción, y así saber si sería un buen candidato para utilizarse en BNCT. Esta parte del trabajo se ha realizado en colaboración con el profesor Hiroyuki Nakamura del Instituto de Tecnología de Tokio en Japón y con la profesora Fernanda Marques de la Universidad de Lisboa en Portugal.

Interacción entre el ADN y los metalacboranos

Antes de empezar con los estudios en células, se estudiará la estabilidad del Na[COSANE] en diferentes medios, ya sea en disoluciones salinas o en medios de cultivo, a partir de los estudios de $^{11}\text{B}\{^1\text{H}\}$ RMN.

La **Figura 2. 19** muestra los espectros de $^{11}\text{B}\{^1\text{H}\}$ RMN del Na[COSANE] en diferentes medios salinos (tampón fosfato, NaCl, KNO_3 y KCl). En todos los casos no se aprecia ningún cambio en el espectro de RMN, indicando que el COSANE es estable en cualquier disolución salina.

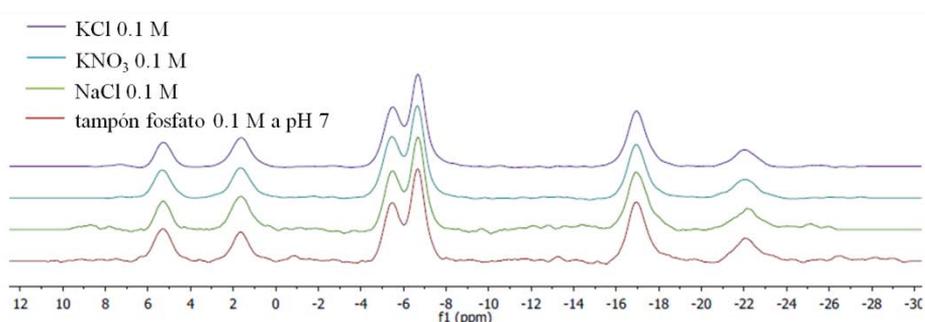


Figura 2. 19. Espectro de $^{11}\text{B}\{^1\text{H}\}$ RMN de Na[COSANE] 2 mM en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 (en rojo), en NaCl 0.1 M (en verde), en KNO_3 0.1 M (en azul) y en KCl 0.1 M (en morado).

Pero si en vez de estudiar la estabilidad del Na[COSANE] en disoluciones salinas se hace en el medio de cultivo DMEM (**Figura 2. 20. a**) o en el medio de cultivo DMEM + 10% FBS (**Figura 2. 20. b**), se puede observar como en DMEM se forman agregados a concentraciones bajas (100 μM); mientras que en presencia de un 10% de proteína, el Na[COSANE] forma agregados hasta llegar a la concentración de 6 mM.

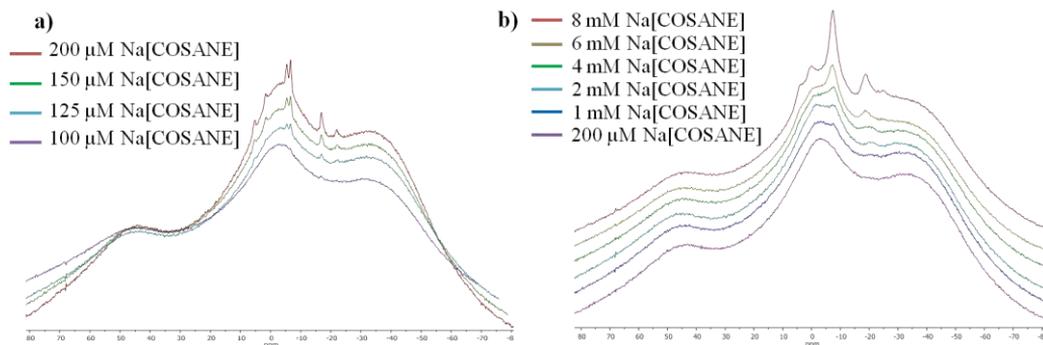


Figura 2. 20. Espectros de $^{11}\text{B}\{^1\text{H}\}$ RMN a diferentes concentraciones de Na[COSANE] en el medio de cultivo a) DMEM y b) DMEM + 10% FBS.

-----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

Si se mantiene la concentración de Na[COSANE] a 200 μM y se estudia su estabilidad a lo largo del tiempo en el medio de cultivo DMEM (**Figura 2. 21. a**) y DMEM + 10% FBS (**Figura 2. 21. b**), se puede observar que en ambos casos el COSANE permanece estable por lo menos 12 días.

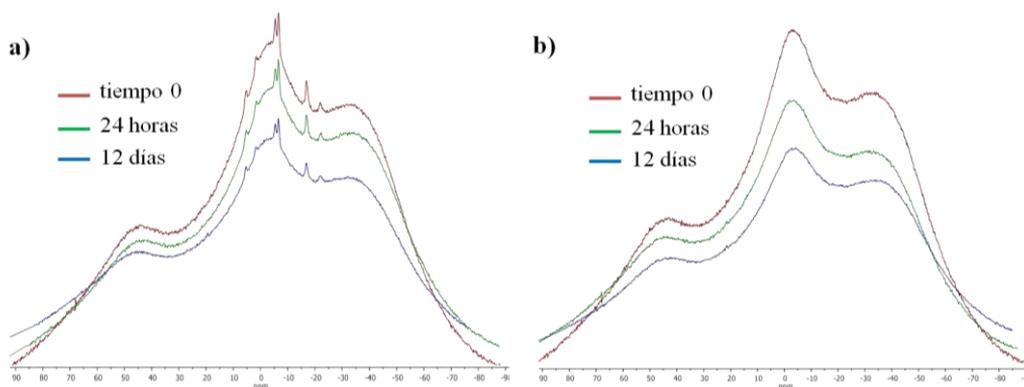


Figura 2. 21. Espectros de $^{11}\text{B}\{^1\text{H}\}$ RMN a diferentes tiempos (tiempo 0, 24 horas y 12 días) a 200 μM de Na[COSANE] en el medio de cultivo a) DMEM y b) DMEM + 10% FBS.

2.4.1. Distribución de Na[COSANE] en células.

Las células elegidas para estudiar en qué partes de la misma se acumula preferencialmente Na[COSANE] son el glioblastoma (U87) y el melanoma (A375). Estos dos tipos de células representan tumores cancerígenos que están siendo investigados en la terapia de BNCT (descrito en el capítulo de la introducción).²⁸ Aunque hoy en día los compuestos con alto contenido en boro que se están utilizando clínicamente en pacientes son el BPA y el BSH, es necesario encontrar compuestos de boro con muy baja toxicidad, que sean selectivos y entren dentro de células cancerígenas en gran cantidad, y que estén localizados dentro del núcleo o alrededor de él.²⁹

Por este motivo, antes de ver en qué partes de la célula está localizado el Na[COSANE], se hace un estudio de su citotoxicidad. Para ello, se incubó el Na[COSANE] a distintas concentraciones (de 10 μM a 1 mM) y a distintos tiempos (6, 24 y 48 horas) en las células U87 y A375, ver **Figura 2. 22**. Una vez incubado el Na[COSANE], se añade el reactivo MTT (sal de tetrazolio) que reaccionará con el NADPH de las células vivas, formando el compuesto formazano insoluble en agua de color violeta, y así obtener los distintos valores de % de viabilidad celular.

Interacción entre el ADN y los metalcarboranos

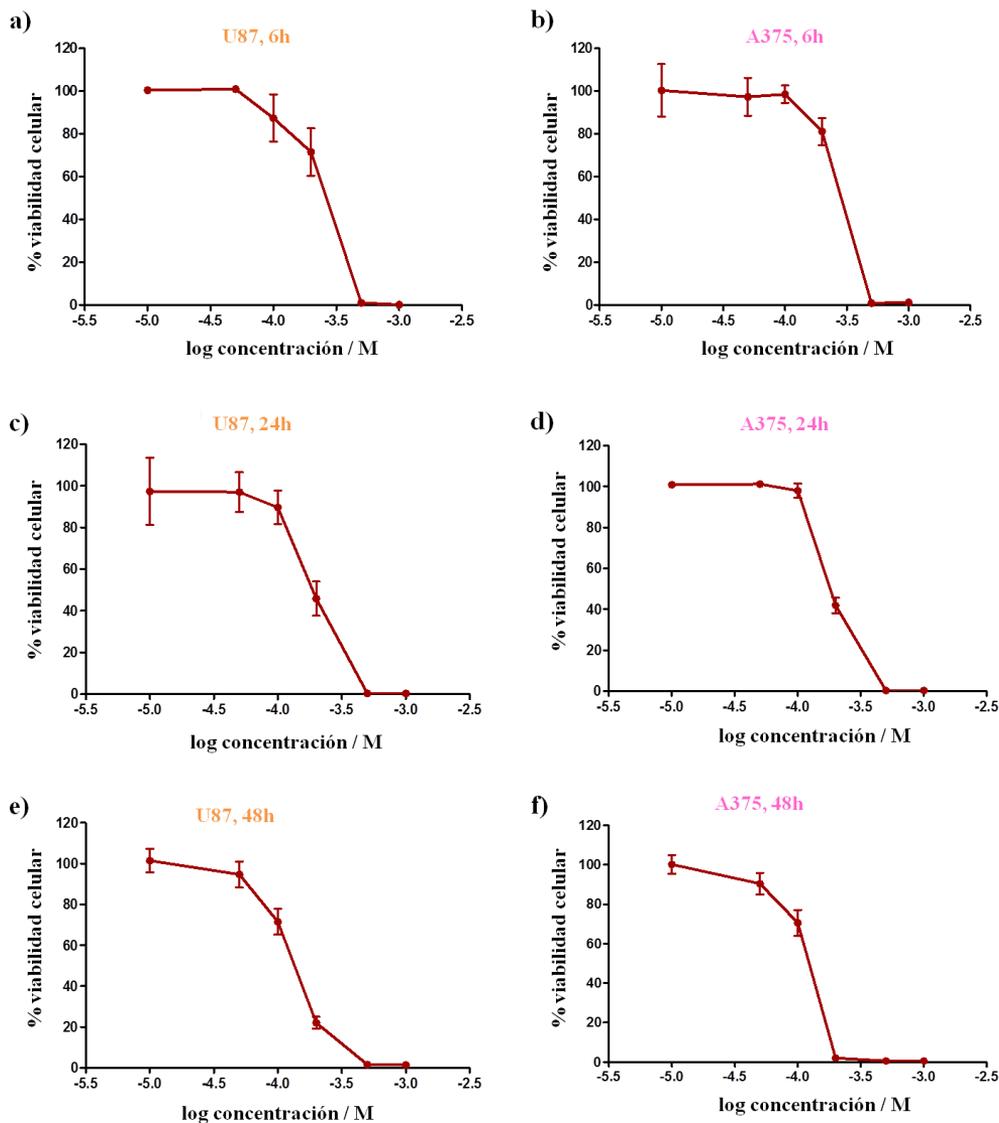


Figura 2. 22. Viabilidad celular (%) en frente del logaritmo de la concentración de Na[COSANE] de la célula glioblastoma U87 con tiempos de incubación de Na[COSANE] de a) 6h, c) 24h y e) 48 h; y de la célula melanoma A375 con tiempos de incubación de Na[COSANE] de b) 6h, d) 24h y f) 48h.

A partir de las curvas obtenidas en la **Figura 2. 22** se calcula el valor de IC_{50} (valor de concentración del compuesto que causa el 50% de inhibición de viabilidad celular), ver **Figura 2. 23**. Para tiempos de incubación cortos (6 y 24 h), los valores de IC_{50} obtenidos en ambas células no indican que haya una actividad celular relevante. Aunque al cabo de 48 horas parece que el Na[COSANE] sea más activo para las células de melanoma, no se observa

-----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

una pérdida importante del % de viabilidad celular, sugiriendo que el Na[COSANE] no es citotóxico. Aun así, se repite el mismo procedimiento de incubación de Na[COSANE] durante 48 horas para una célula normal, el fibroblastos V79, dando un valor de IC_{50} de 102 μM y confirmando que el Na[COSANE] no es citotóxico.

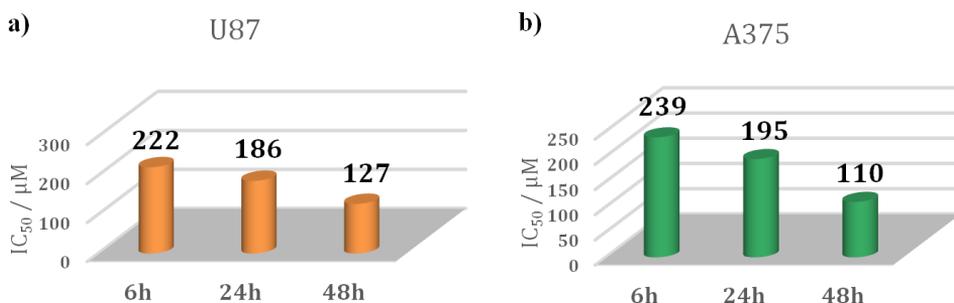


Figura 2. 23. Valores de IC_{50} (μM) de Na[COSANE] en las células a) glioblastoma U87 y b) melanoma A375, al cabo de 6, 24 y 48 horas de incubación.

Una vez comprobado que el Na[COSANE] no presenta actividad citotóxica en las células de estudio, se incubó durante 6 horas y a una concentración equivalente a la obtenida en IC_{50} (200 μM). Se lavan las distintas células y por centrifugación se separan los componentes: citosol, membrana, núcleo y citoesqueleto. Se estudia el contenido en boro y en cobalto en cada una de las partes de las células por ICP-MS, ver **Figura 2. 24**, con los valores expresados en ng B o Co/ 10^6 células.

Tanto en el estudio de boro como en el de cobalto se observa que la célula glioblastoma U87 acumula mucho más COSANE que la célula melanoma A375, siendo en todos los casos la membrana y el núcleo las partes de las células más abundantes en B y Co. Con este estudio se comprueba que el COSANE traspasa la membrana celular y llega hasta el núcleo de la célula. Aunque se acumula más Na[COSANE] en la membrana, debido a su carácter anfifílico, queda alrededor de un 30 y un 14% del total en B en el núcleo de la célula U87 y A375 respectivamente, siendo estos valores interesantes para la terapia de BNCT. El clúster de boro no presenta ningún tipo de degradación una vez entra en la célula, ya que el cobalto se encuentra distribuido por todos los componentes; pero sí que se comporta de forma diferente dependiendo del tipo de célula a tratar.

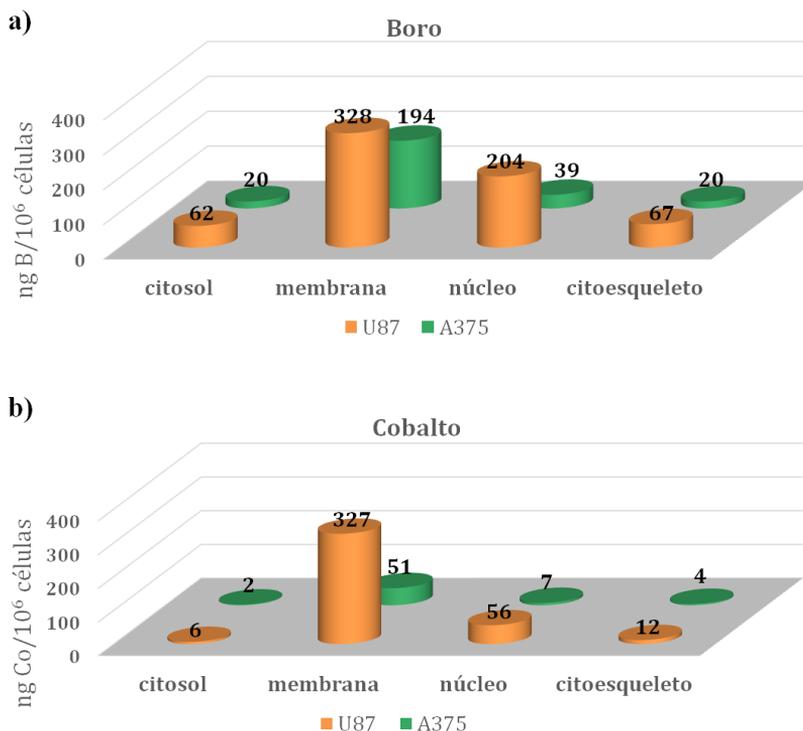


Figura 2. 24. Contenido de a) boro y b) cobalto de las distintas partes de las células U87 y A375 (citósol, membrana, núcleo y citoesqueleto), después de 6 h de incubación con Na[COSANE] 200 μ M.

2.4.2. Distribución de Na[COSANE] en sangre.

Una vez visto la citotoxicidad y la distribución de Na[COSANE] en la célula de glioblastoma U87 y melanoma A375, se estudiará su distribución en el plasma y las células sanguíneas (eritrocitos y granulocitos) de sangre de caballo. Para ello, se incubó Na[COSANE] 0.3 mM en la sangre durante 10 y 60 minutos a 37°C con agitación. Pasado el tiempo de estudio se separan las distintas partes por centrifugación y se mide el contenido en boro por ICP-OES (ver **Figura 2. 25**).

Respecto a la concentración de boro encontrada en la sangre (35.7 ng/ml) con la encontrada en los eritrocitos/ granulocitos (9.2 y 9.4 ng/ml) y en el plasma (20.4 y 19.8 ng/ml) para 10 y 60 min de incubación de COSANE, sólo el 25% del clúster de boro se encuentra en las células sanguíneas, mientras que el 50% se encuentra en el plasma. El tiempo de incubación es independiente del contenido de B en plasma y en las células sanguíneas.

---Interacción entre el ADN y los metalacarboranos---

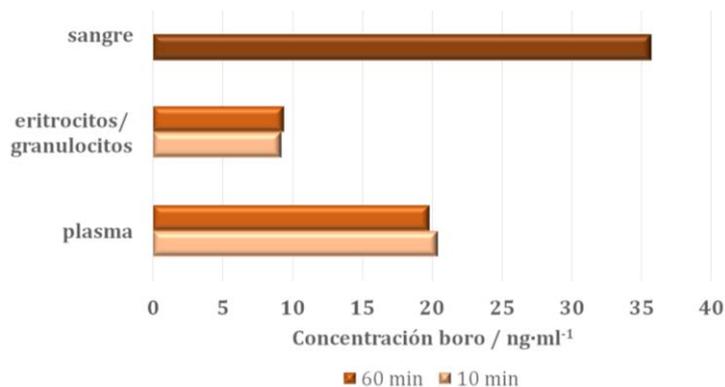


Figura 2. 25. Contenido de boro en ng/ml en sangre, células sanguíneas (eritrocitos y granulocitos) y en plasma con tiempo de incubación de Na[COSANE] de 10 y 60 minutos.

El hecho de haber el 50% de boro en el plasma indica que posiblemente el Na[COSANE] interaccione con las proteínas plasmáticas como la albumina. Para comprobar si tiene lugar dicha interacción se hace un estudio de RMN de boro con Na[COSANE] 200 μ M en el medio de cultivo DMEM + 10% FBS, ya que el FBS está compuesto en su mayoría por albúminas, y se compara con Na[COSANE] 200 μ M en DMEM (ausencia de proteínas), en agua y en tampón fosfato 0.1 M a pH 7. La **Figura 2. 26** muestra los espectros de RMN obtenidos, observando que únicamente el Na[COSANE] forma agregados en presencia de proteínas. En el Capítulo 3 se estudiará la interacción entre las proteínas y los metalacarboranos.

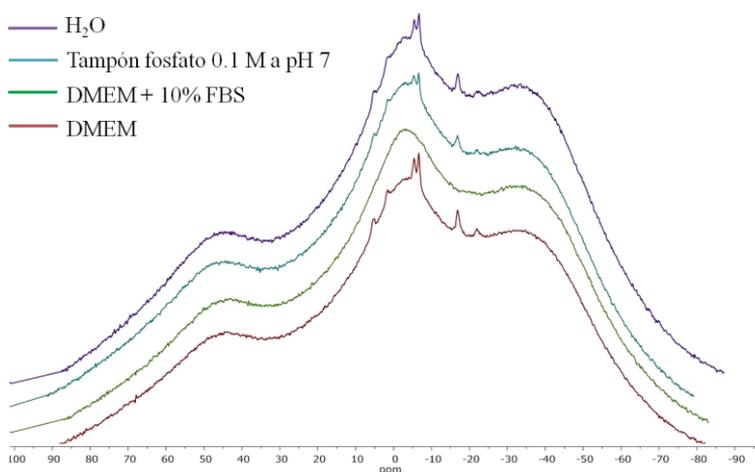


Figura 2. 26. Espectro de $^{11}\text{B}\{^1\text{H}\}$ RMN de Na[COSANE] 200 μ M en agua (en morado), en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 (en azul), en DMEM + 10% FBS (en verde) y en DMEM (en rojo).

2.4.3. Distribución de Na[COSANE] en ratones.

Como último experimento se estudiará la distribución de Na[COSANE] en ratones albinos (hembras de 5 semanas de vida), inyectando 7.5 mg B/ kg (100 μ l Na[COSANE] con 1500 ppm B) durante 30 y 60 min de incubación. Luego se diseccionarán los ratones, se lavaran, se separaran los distintos órganos de estudio (sangre, corazón, hígado, pulmón, riñón, bazo, músculo y cerebro) y se medirá el contenido en boro por ICP-OES (ver **Figura 2. 27**).

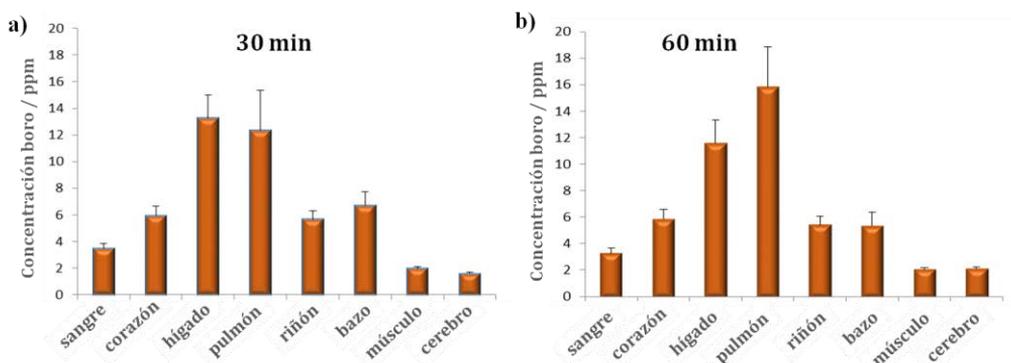


Figura 2. 27. Contenido de boro en sangre, corazón, hígado, pulmón, riñón, bazo, músculo y cerebro de ratones con tiempo de incubación de a) 30 min y b) 60 min de Na[COSANE] (7.5 mg B/ kg).

La dosis de Na[COSANE] elegida para inyectarla a los ratones fue 7.5 mg B/ kg porque no se observó señales de toxicidad. En cambio, incrementando la dosis a 30 mg B/ kg, 2 de cada 3 ratones presentaban toxicidad aguda.

La **Figura 2. 27** muestra la distribución de COSANE en los distintos órganos de los ratones con tiempos de incubación de 30 y 60 minutos, siendo los pulmones y el hígado los órganos donde se acumula preferencialmente el Na[COSANE]. La diferencia de tiempos de incubación hace que el COSANE se distribuya más en los pulmones, disminuyendo su concentración de B en el hígado y en el bazo. El hecho de que el Na[COSANE] se acumule más en los pulmones puede ser debido a que como interacciona con las proteínas plasmáticas de la sangre y la sangre pasa a través de los pulmones por la arteria pulmonar, puede quedar atrapado en los capilares pulmonares dando lugar a una mayor concentración de B. Como la síntesis de proteínas plasmáticas tiene lugar en el hígado, hace que éste órgano sea el segundo en abundancia de boro.

2.5. Marcadores electroquímicos en sensores de ADN.

Para ver cuál de los metalacarboranos se puede utilizar como marcador electroquímico en sensores de ADN, se estudian primero sus propiedades electroquímicas en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 y en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 + NaCl 0.4 M (**Figura 2. 28**). Los electrodos de trabajo utilizados fueron oro para FESANE y Cl₆-FESANE, y carbono vítreo, llamado en inglés *glassy carbon*, para el COSANE. Se utilizó el *glassy carbon* para el COSANE porque su potencial redox está cercano a la descomposición del disolvente y la ventana electroquímica del oro no permite visualizar su voltagrama cíclico. A simple vista se puede observar que tanto el Na[FESANE] como el Na[Cl₆-FESANE] presentan el mismo voltagrama a baja y alta fuerza iónica con un valor de potencial redox de -0.283 y 0.348 V, respectivamente; mientras que el Na[COSANE] presenta dos voltagramas cíclicos diferentes con un desplazamiento del potencial redox hacia valores más positivos, pasa de -1.426 a -1.345 V, afectando la fuerza iónica del medio. En todos los casos se obtiene un valor de ΔE de los picos redox cercano al valor teórico (60 mV/ e⁻ intercambiado), indicando que el proceso redox es reversible.

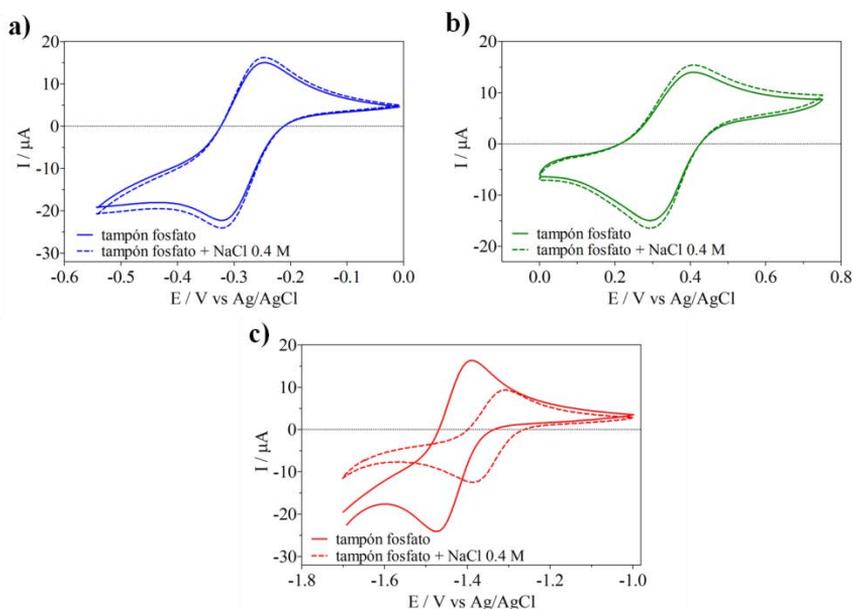


Figura 2. 28. Voltagramas cíclicos de a) Na[FESANE], b) Na[Cl₆-FESANE] en oro y c) Na[COSANE] en *glassy carbon*, en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 (línea sólida) y en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 + NaCl 0.4 M (línea discontinua). Velocidad de barrido: 100 mV/s.

Interacción entre el ADN y los metalacarboranos

Ahora bien, si se realiza el mismo experimento midiendo la voltametría cíclica de los metalacarboranos pero con CT-*ds*DNA anclado a la superficie del electrodo en tampón fosfato y en tampón fosfato + NaCl 0.4 M, si que tiene lugar un ligero desplazamiento del potencial redox. En el caso del Na[COSANE] en tampón fosfato (**Figura 2. 29 a**) se observa como el potencial redox se desplaza hacia valores más negativos (-1.444 V) y el valor de ΔE de los picos redox es superior a los 60 mV teóricos (102 mV), indicando que hay un impedimento en la transferencia electrónica y que el COSANE interacciona con el CT-*ds*DNA quedando retenido en la superficie del electrodo. Cuando se incrementa la fuerza iónica (**Figura 2. 29. b**) se observa que el desplazamiento del potencial redox tiene lugar hacia valores más positivos (-1.330 V), pero en este caso el valor de ΔE es similar al obtenido con el electrodo *glassy carbon* sin modificar. Estos resultados confirman que la interacción entre el electrodo CT-*ds*DNA/GC y el COSANE es dependiente de la fuerza iónica del medio.

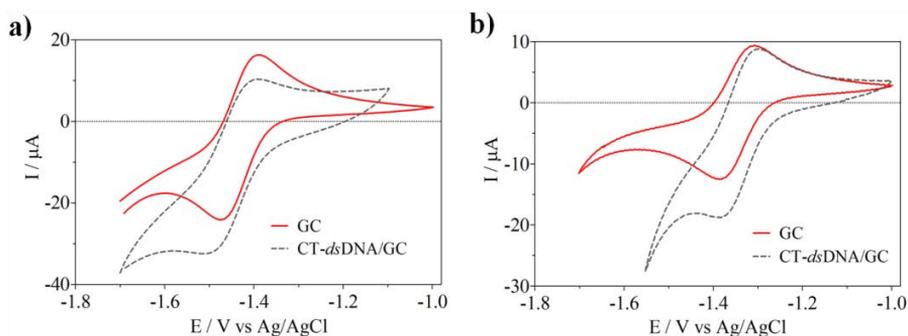


Figura 2. 29. Voltograma cíclico de Na[COSANE] en a) tampón fosfato 0.1 M a pH 7 y b) tampón fosfato 0.1 M a pH 7 + NaCl 0.4 M. Utilizando como electrodo de trabajo *glassy carbon* sin modificar (GC) en rojo y CT-*ds*DNA anclado a la superficie del *glassy carbon* (CT-*ds*DNA/GC) en gris. Velocidad de barrido: 100 mV/s.

En el caso del Na[FESANE] y del Na[Cl₆-FESANE] (**Figura 2. 30 a b**) se observa que a baja y alta fuerza iónica se obtiene el mismo voltograma cíclico, indicando en ambos casos que la interacción entre el CT-*ds*DNA/Au y los metalacarboranos es independiente de la fuerza iónica. El potencial redox para Na[FESANE] y Na[Cl₆-FESANE] es -0.276 y 0.334 V vs Ag/AgCl respectivamente, sólo se observa un ligero desplazamiento del potencial hacia valores más positivos para el FESANE y hacia valores más negativos para el Cl₆-FESANE.

-----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

Para comprobar que el Na[FESANE] y el Na[Cl₆-FESANE] interaccionan con el CT-*ds*DNA/Au y quedan adsorbidos en la superficie del electrodo, se prueba ciclando 50 veces el Na[FESANE] sobre el electrodo CT-*ds*DNA/Au (Figura 2. 30 c), donde en todos los ciclos la posición del pico catódico y el pico anódico se mantiene y sólo va aumentando la intensidad de la señal. Una vez pasados los 50 ciclos, se lava el electrodo y se sumerge en una disolución que sólo contiene tampón fosfato 0.1 M a pH 7 (ver Figura 2. 30 d), el voltagrama cíclico que se obtiene (en azul) muestra el proceso redox correspondiente al FESANE, confirmando que sí que queda adsorbido en la superficie del electrodo interaccionando con el CT-*ds*DNA. En negro se muestra el voltagrama del CT-*ds*DNA/Au en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 sin estar previamente sumergido en Na[FESANE].

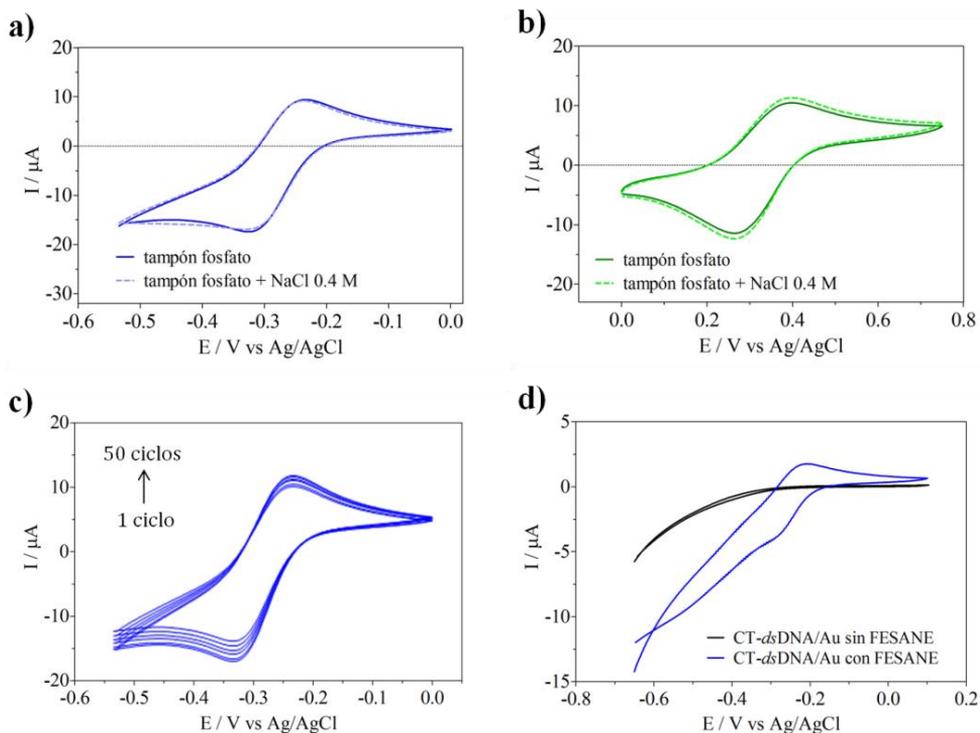


Figura 2. 30. Voltagramas cíclicos de a) Na[FESANE] y b) Na[Cl₆-FESANE] en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 y tampón fosfato 0.1 M a pH 7 + NaCl 0.4 M en CT-*ds*DNA/Au; c) voltagramas cíclicos de Na[FESANE] en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 en CT-*ds*DNA/Au durante 50 ciclos; y d) voltagramas cíclicos en tampón fosfato 0.1 M a pH 7 de CT-*ds*DNA/Au antes (en negro) y después (en azul) de las acumulaciones de Na[FESANE] y posterior lavado. Velocidad de barrido: 100 mV/s.

-----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

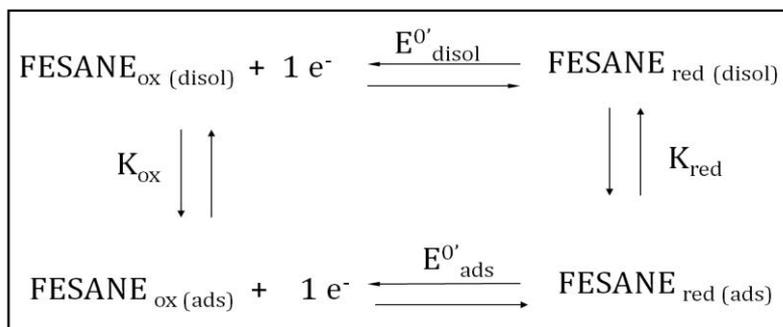
El proceso que tiene lugar entre los metalacarboranos en disolución y los que están adsorbidos en la superficie del electrodo se puede expresar como en el **Esquema 2. 1**, siguiendo el modelo descrito por Bard y Carter³⁰ donde se puede calcular la relación K_{ox}/K_{red} mediante la siguiente ecuación:

$$E'_{sol} - E'_{ads} = \frac{0.059}{n} \log \left(\frac{K_{ox}}{K_{red}} \right) \quad (2)$$

Siendo E'_{sol} el potencial redox del metalacarborano en disolución, E'_{ads} el potencial redox del metalacarborano adsorbido en la superficie del electrodo y n el número de electrones.

Según los valores obtenidos de potencial redox en la **Figura 2. 28** (E'_{sol}), en la **Figura 2. 29** (E'_{ads}) para el COSANE y en la **Figura 2. 30 a b** (E'_{ads}) para el FESANE y el Cl₆-FESANE, se pueden calcular los valores de K_{ox}/K_{red} de todos ellos. Como el Na[COSANE] es dependiente de la fuerza iónica del medio, se calculan los valores de K_{ox}/K_{red} en tampón fosfato y en tampón fosfato + NaCl 0.4 M, siendo 2.01 y 0.56, respectivamente. Mientras que los valores de K_{ox}/K_{red} para el Na[FESANE] y el Na[Cl₆-FESANE] son 0.76 y 1.73 respectivamente, en tampón fosfato.

Estos valores sugieren que el Na[COSANE] en tampón fosfato (2.01) y el Na[Cl₆-FESANE] (1.73) interaccionan más fuertemente con el CT-*ds*DNA en la forma oxidada que en la reducida, indicativo de una interacción electrostática. Mientras que el Na[COSANE] en tampón fosfato + NaCl 0.4 M (0.56) y el Na[FESANE] (0.76) interaccionan fuertemente con el CT-*ds*DNA en la forma reducida, indicativo de una interacción intercalativa.



Esquema 2. 1. Esquema del proceso redox del FESANE en disolución y adsorbido en el electrodo.

-----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

Una vez estudiadas las propiedades electroquímicas de los distintos metalacarboranos en ausencia y en presencia de CT-*dsDNA* inmovilizado en la superficie del electrodo a baja y alta fuerza iónica, se decide descartar el Na[COSANE] para seguir con los experimentos porque el valor de su potencial redox varía en función de la fuerza iónica del medio y porque la inmovilización del CT-*dsDNA* sobre la superficie del electrodo es mejor con oro que en *glassy carbon*.

2.5.1. Interacción entre CT-*dsDNA* y Na[FESANE]/ Na[Cl₆-FESANE] mediante voltametría de pulso diferencial (DPV).

Antes de estudiar si el FESANE y el Cl₆-FESANE pueden ser utilizados como marcadores electroquímicos en sensores de ADN, se hará un último estudio en disolución manteniendo fija la concentración de FESANE y Cl₆-FESANE y añadiendo concentraciones crecientes de CT-*dsDNA* (Figura 2. 31 a b).

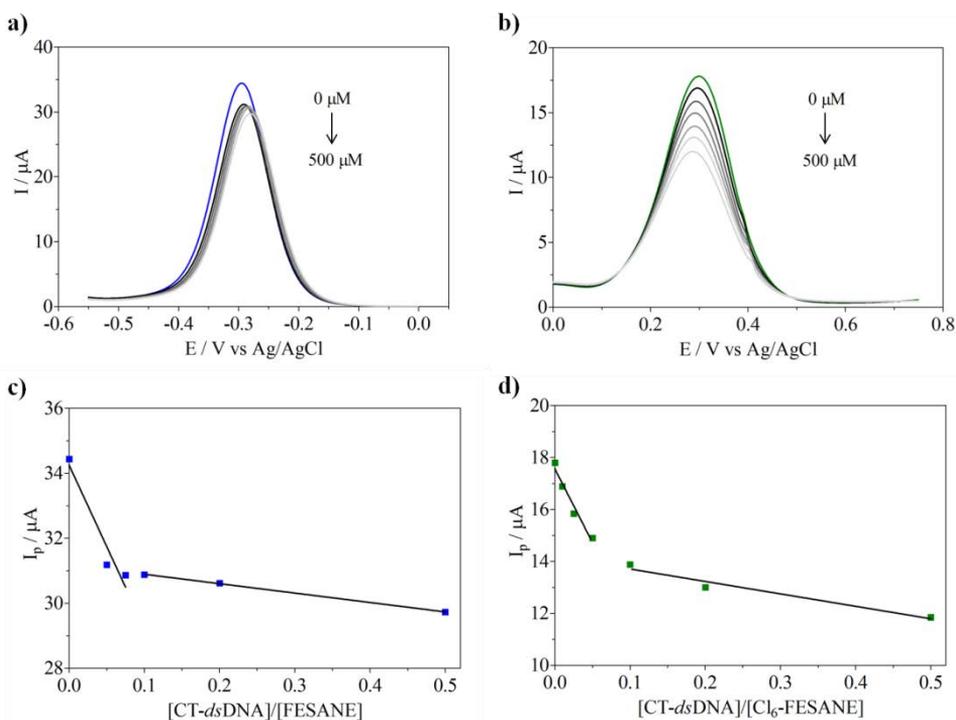


Figura 2. 31. Voltagramas de pulso diferencial manteniendo fija la concentración de a) Na[FESANE] y b) Na[Cl₆-FESANE] en presencia de concentraciones crecientes de CT-*dsDNA* (de 0 a 500 μM). Representación gráfica de la intensidad en el máximo del pico vs la relación de concentraciones entre CT-*dsDNA* y c) Na[FESANE] y d) Na[Cl₆-FESANE]. Velocidad de barrido: 10 mV/s.

-----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

La técnica electroquímica utilizada es la voltametría de pulso diferencial (DPV) que permite discriminar entre corrientes faradaicas y capacitivas (esta técnica será utilizada posteriormente para la aplicación de sensor de ADN). Según las curvas de DPV obtenidas, la intensidad en el máximo del pico para el Na[FESANE] es 34.44 μA y para el Na[Cl₆-FESANE] es 17.80 μA , en ambos casos se observa una disminución de la intensidad a medida que la concentración de CT-*dsDNA* se incrementa. En el caso del Na[FESANE] la disminución de la intensidad conlleva el desplazamiento del máximo del pico hacia valores más positivos, mientras que en Na[Cl₆-FESANE] es hacia valores más negativos (como en la **Figura 2. 30 a b**).

Si se cogen los distintos valores de intensidad en el máximo del pico y se representan en frente a la relación de concentraciones entre el CT-*dsDNA* y el Na[FESANE] (**Figura 2. 31 c**) y el Na[Cl₆-FESANE] (**Figura 2. 31 d**), se obtienen dos rectas cuya intersección indica el número de moléculas de metalacarborano que hay por cada par de base de ADN. En ambos casos se obtiene un valor de 15 moléculas de metalacarborano por par de base, valor muy similar al obtenido en la titulación UV-Visible (apartado 2.3.2.), corroborando dichos resultados.

2.5.2. Sensor de ADN.

Se ha comprobado que el Na[FESANE] y el Na[Cl₆-FESANE] pueden ser buenos candidatos para ser utilizados como marcadores electroquímicos en sensores de ADN; ya que sus potenciales redox están cerca de 0 V (-0.28 y 0.35 V vs Ag/AgCl, respectivamente) pudiendo utilizar el electrodo de oro (permite una mejor inmovilización del ADN en su superficie). Y además la interacción con el ADN en ambos compuestos es por intercalación entre los pares de bases habiendo unas 15-18 moléculas de metalacarborano por par de base, dando lugar a una amplificación de la señal electroquímica.

La secuencia de ADN utilizada para construir el sensor es una secuencia sintética con 25 nucleótidos (**Tabla 2. 2** secuencia **S**), en cuya terminación 5' hay un grupo tiol para ser anclado en la superficie del electrodo de oro. Durante el proceso de hibridación se utilizan tres secuencias diferentes: la primera secuencia es complementaria a la inmovilizada en el electrodo de oro (**Tabla 2. 2** secuencia **SC**), la segunda secuencia no es complementaria a

-----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

la inmovilizada (**Tabla 2. 2** secuencia **SNC**) y la tercera es una secuencia que presenta dos polimorfismos (en negrita en la **Tabla 2. 2** secuencia **SP**). Por tanto, de los tres sensores de ADN diseñados se estudiará si el Na[FESANE] y el Na[Cl₆-FESANE] actúan como marcadores electroquímicos dando una señal en todos los casos y si existe algún tipo de discriminación entre las distintas secuencias.

Tabla 2. 2. Secuencias sintéticas de ADN con 25 pares de bases utilizadas en el sensor de ADN.

| Oligonucleótidos sintéticos (25 pares de bases) | | |
|--|---|------------|
| Secuencia tiolada | 5'-HS(CH ₂) ₆ - GCGTTCCAAAGGGCAGGATCATTGA | S |
| Secuencia complementaria | 5'-TCAATGATCCTGCCCTTTGGAACGC | SC |
| Secuencia no complementaria | 5'-GACCGTCGAAGTAAAGGGTTCCATA | SNC |
| Secuencia con polimorfismos | 5'-TCAATGATCCT ACC TTT GGAAGCG | SP |

Después del proceso de hibridación, se lava el electrodo y se sumerge en una disolución de Na[FESANE] y de Na[Cl₆-FESANE] en tampón fosfato 0.1 M a pH 7. Se cicla 100 veces a 100 mV/s por voltametría cíclica en el rango de potencial donde tiene lugar el proceso redox de cada metalacarborano para que se acumule entre los pares de bases del ADN y se lava. Finalmente el electrodo se sumerge en una disolución de tampón fosfato 0.1 M a pH 7 libre de metalacarboranos, y se hace una DPV en el rango de potencial del proceso redox del Na[FESANE] y del Na[Cl₆-FESANE] (**Figura 2. 32 a b**).

Dependiendo de la secuencia analizada se obtiene un valor de intensidad del máximo del pico de los voltagramas diferente (**Figura 2. 32 c d**). Cuando se analiza el sensor de ADN con la secuencia **S** (sensor sin hibridar sólo una cadena de ADN) se obtiene un valor de intensidad pequeño, debido a que los metalacarboranos sólo pueden interaccionar electrostáticamente. Pero cuando tiene lugar la hibridación con la secuencia complementaria **SC**, al estar todos los pares de bases enlazados por puentes de hidrógeno, el Na[FESANE] y el Na[Cl₆-FESANE] se acumulan entre todos los pares de bases, siendo la señal de intensidad obtenida la máxima posible.

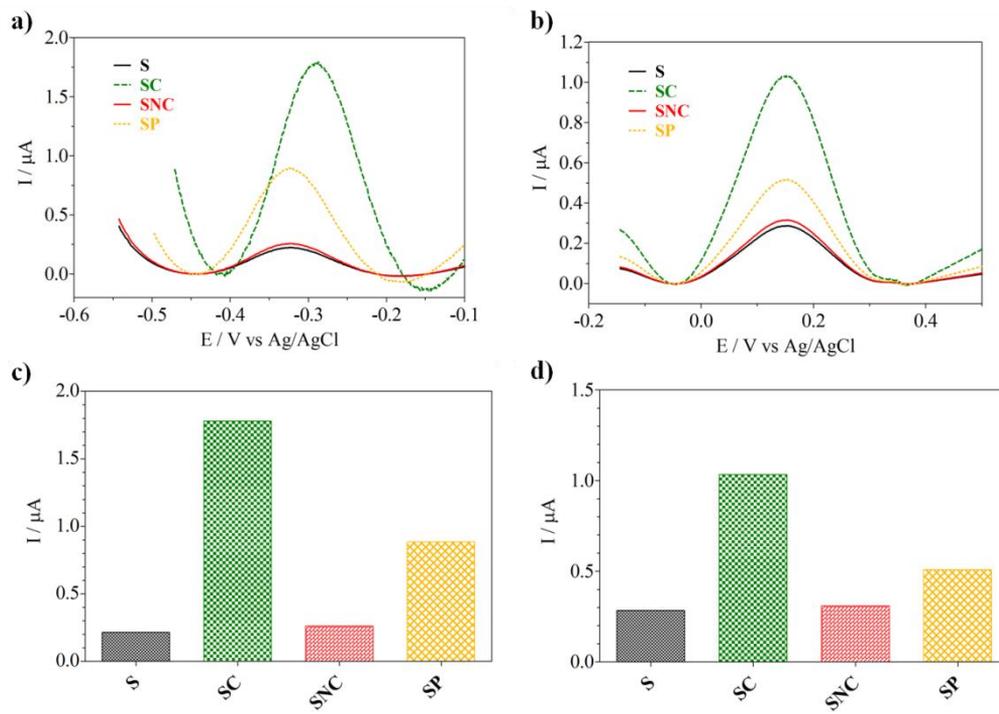
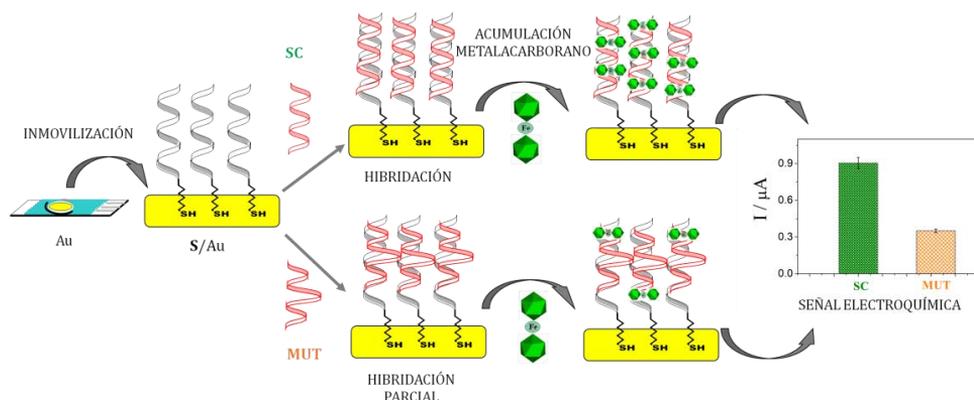


Figura 2. 32. Voltograma de pulso diferencial del sensor de ADN con las 4 secuencias (S, SC, SNC y SP) utilizando como marcador electroquímico a) Na[FESANE] y b) Na[Cl₆-FESANE]. Representación gráfica de los valores obtenidos en el máximo del pico de los voltagramas de pulso diferencial utilizando el c) Na[FESANE] y d) Na[Cl₆-FESANE]. Velocidad de barrido: 10 mV/s.

Ahora bien, si la hibridación es con la secuencia no complementaria **SNC**, no se formarán los puentes de hidrógeno entre los pares de bases y los metalacarboranos no se podrán acumular con facilidad entre ellos, dando lugar a una señal de intensidad pequeña y cercana a la secuencia **S**. Pero si la secuencia sólo tiene pequeñas regiones en donde no coincide el par de base, es decir, que la secuencia tiene una mutación (secuencia **SP**), sólo se acumularán los clústeres de boro en las zonas donde sí que se formen los puentes de hidrógeno, causando una disminución de la señal de intensidad del 50% en comparación con la secuencia complementaria **SC**.

Tanto el Na[FESANE] como el Na[Cl₆-FESANE] pueden ser utilizados en sensores de ADN como marcadores electroquímicos; ya que ambos clústeres consiguen discriminar entre secuencias complementarias, de las no complementarias y de las que tienen mutaciones. En el **Esquema 2. 2** se puede observar el procedimiento del desarrollo del biosensor.

Interacción entre el ADN y los metalacarboranos



Esquema 2. 2. Esquema del desarrollo del biosensor de ADN utilizando metalacarboranos como marcadores electroquímicos.

2.5.3. Biosensor para detectar mutaciones genéticas.

Una vez visto que el Na[FESANE] y el Na[Cl₆-FESANE] se pueden utilizar como indicadores electroquímicos en un sensor de ADN, diferenciando entre una secuencia complementaria de una que presenta una mutación; se estudiará si ambos clústeres de boro también son capaces de discriminar una mutación cuando la secuencia de ADN no es sintética, sino que es una muestra por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) extraída de las células sanguíneas de un paciente con fibrosis cística.

Se han elegido dos tipos de mutaciones diferentes de la fibrosis cística, la mutación F508del (Tabla 2. 3 secuencia **SM₁**) que consiste en una delección de tres nucleótidos y la mutación p.Gly542Stop (en negrita en la Tabla 2. 3 secuencia **SP₂**) que consiste en un polimorfismo por cambio de nucleótido.

Para comprobar si el Na[FESANE] y el Na[Cl₆-FESANE] también actúan como marcadores electroquímicos de las dos mutaciones, se utiliza una secuencia tiolada y una secuencia complementaria para cada una de las mutaciones, es decir, para la mutación **SM₁** se utilizará la secuencia tiolada **S₁** (Tabla 2. 4) y la secuencia complementaria **SC₁** (Tabla 2. 3), y para la mutación **SP₂** se utilizará la secuencia tiolada **S₂** (Tabla 2. 4) y la secuencia complementaria **SC₂** (Tabla 2. 3). La construcción del biosensor es la misma que en el **Esquema 2. 2**, teniendo lugar una hibridación total cuando las secuencias son complementarias y una hibridación parcial cuando las secuencias están mutadas.

Tabla 2. 3. Secuencias de PCR utilizadas en el biosensor.

| Secuencias de PCR | |
|----------------------------------|--|
| Secuencia complementaria 1 | <p>5'-AACCGATTGAATATGGAGCCAAATATATAAATTTG GGTAGTGTGAAGGGTTCATATGCATAATCAAAAAGT TTTCACATAGTTTCTTACCTCTTCTAGTTGGCATGCT TTGATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAA CACCAAAGATGATATTTTCTTTAATGGTGCCAGGCAT AATCCAGGAAAACCTGAGAACAGAATGAAATTCCTCC ACTGTGCTTAATTTTACCCTCTGAAGGCTCCAGTTCT CCCATAATCACCATTAGAAGTGAAGTCTGGAAATAA AACCCATCATTATTAGGTCATTATCAAATCACGCTCA GGATTCACTTGCCTCCAATTATCATCCTAAGCAGAAG TGTATATTC</p> <p align="right">SC₁</p> |
| Secuencia mutada con delección 1 | <p>5'-AACCGATTGAATATGGAGCCAAATATATAAT TTGGGTAGTGTGAAGGGTTCATATGCATAATCAA AAGTTTTACATAGTTTCTTACCTCTTCTAGTTGGCA TGCTTTGATGACGCTTCTGTATCTATATTCATCATAG GAAACACCA__ATGATATTTTCTTTAATGGTGCCAGG CATAATCCAGGAAAACCTGAGAACAGAATGAAATTC TCCACTGTGCTTAATTTTACCCTCTGAAGGCTCCAGT TCTCCATAATCACCATTAGAAGTGAAGTCTGGAAAT AAAACCCATCATTATTAGGTCATTATCAAATCACGCT CAGGATTCACTTGCCTCCAATTATCATCCTAAGCAGA AGTGTATATTC</p> <p align="right">SM₁</p> |
| Secuencia complementaria 2 | <p>5'-ACTAGCCATAAAAACCCAGGATTTTTTTCAATTCCA GAAACAGAATATAAAGCAATAGAGAAATGTCTGTAA TTTTTTTACATGAATGACATTTACAGCAAATGCTTGC TAGACCAATAATTAGTTATTCACCTTGCTAAAGAAAT TCTTGCTCGTTGACCTCCACTCAGTGTGATTCCACCT TCTCCAAGAACTATATTGTCTTTCTCTGCAAACCTGG AGATGTCCCTATTACCAAAAATAGAAAATTAGAGAGT CACTTTTAGTATGCTCAATCTGAATTTGAAAGGCACA TCTTCCTTCTAATGT</p> <p align="right">SC₂</p> |
| Secuencia con polimorfismo 2 | <p>5'-ACTAGCCATAAAAACCCAGGATTTTTTTCAATTCCA GAAACAGAATATAAAGCAATAGAGAAATGTCTGTAA TTTTTTTACATGAATGACATTTACAGCAAATGCTTGC TAGACCAATAATTAGTTATTCACCTTGCTAAAGAAAT TCTTGCTCGTTGACCTCCACTCAGTGTGATTCCACCT TCTCAAGAAGAACTATATTGTCTTTCTCTGCAAACCTGG AGATGTCCCTATTACCAAAAATAGAAAATTAGAGAGT CACTTTTAGTATGCTCAATCTGAATTTGAAAGGCACA TCTTCCTTCTAATGT</p> <p align="right">SP₂</p> |

El Instituto de Genética Médica y Molecular de Madrid (España) ha proporcionado las secuencias de PCR utilizadas en el biosensor.

-----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

Tabla 2. 4. Secuencias sintéticas de ADN con 100 pares de bases utilizadas en el biosensor.

| Oligonucleótidos sintéticos (100 pares de bases) | | |
|---|---|----------------------|
| Secuencia tiolada 1 | 5'-HS (CH ₂) ₆ -CTCAGTTTTCCTGGATTAT GCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCT TTGGTGTTCCTATGATGAATATAGATA CAGAAGCGTCATCAAA GCATGCC | S₁ |
| Secuencia tiolada 2 | 5'-HS (CH ₂) ₆ -TTGGTAATAGGACATCTCC AAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTC TTGGAGAAGGTGGAATCACACTGAGTGG AGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTA | S₂ |

La **Figura 2. 33** muestra en diagrama de barras los valores de intensidad obtenidos en el máximo del pico de los distintos voltagramas de DPV para los dos tipos de mutaciones, utilizando como indicadores electroquímicos el Na[FESANE] y el Na[Cl₆-FESANE]. En todos los casos se observa una señal intensa para las secuencias complementarias **SC₁** y **SC₂**, mientras que para las secuencias mutadas la intensidad disminuye, consiguiendo de esta manera que ambos metalacarboranos tengan la capacidad de distinguir entre un ADN complementario de uno mutado. Además, también es posible discriminar entre los dos tipos de mutaciones, ya que la mutación **SP₂** al sólo verse afectado un nucleótido presenta un valor de intensidad mayor que la mutación **SM₁**, donde se ven afectados tres nucleótidos.

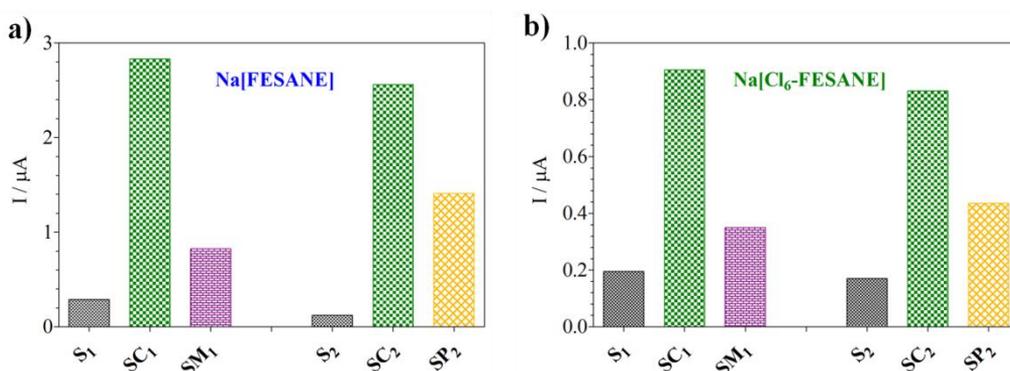


Figura 2. 33. Representación gráfica de los valores obtenidos en el máximo del pico de los voltagramas de pulso diferencial utilizando el a) Na[FESANE] y b) Na[Cl₆-FESANE] como marcador electroquímico en la detección de **SC₁**, **SM₁**, **SC₂** y **SP₂**. Velocidad de barrido: 10 mV/s.

-----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

Por tanto, se ha conseguido comprobar que el FESANE y el Cl₆-FESANE pueden ser utilizados como marcadores electroquímicos en biosensores, discriminando entre ADN complementario y ADN mutado, e incluso entre distintas mutaciones. Siendo en todos los casos el Na[FESANE], el clúster de boro con mayor facilidad para su acumulación entre los pares de bases.

2.6. Conclusiones.

En este apartado se resumirán los resultados más relevantes obtenidos en cada uno de los objetivos propuestos:

Objetivo 1: Interacción entre el ADN y los metalacarboranos.

- ✓ Se ha podido comprobar que los metalacarboranos Na[FESANE], Na[Cl₆-FESANE] y Na[COSANE] interaccionan fuertemente con CT-*ds*DNA. El Na[FESANE] y el Na[Cl₆-FESANE] interaccionan por intercalación entre los pares de bases; mientras que el Na[COSANE] interacciona en los surcos. Si se aumenta la fuerza iónica del medio en el caso del Na[COSANE], la interacción con el CT-*ds*DNA pasa a ser por intercalación entre los pares de bases. Medidas de dicroísmo circular corroboran el tipo de interacción.
- ✓ Mediante estudios de UV-Visible se consigue saber cuántas moléculas de metalacarboranos hay por cada par de base de ADN. El Na[FESANE] y el Na[Cl₆-FESANE] presentan 18 moléculas por cada par de base; mientras que el Na[COSANE] tiene 28 moléculas a baja fuerza iónica y 6 moléculas a alta fuerza iónica por cada par de bases. Como los metalacarboranos forman vesículas o micelas en medio acuoso, se ha estudiado su tamaño por DLS y por CryoTEM en ausencia y en presencia de CT-*ds*DNA, aumentando su tamaño a medida que la concentración de ADN se incrementa.
- ✓ Se ha conseguido aislar el nanohíbrido CT-*ds*DNA-Na[COSANE] y se ha caracterizado por IR, raman, microscopio óptico y TEM, comprobando en todos los casos que el nanohíbrido está formado por ambas especies y que presenta una morfología ordenada y ensamblada tipo bastón.

-----Interacción entre el ADN y los metalacarboranos-----

- ✓ Se ha comprobado la estabilidad del Na[COSANE] por $^{11}\text{B}\{^1\text{H}\}$ RMN en disoluciones salinas (tampón fosfato, NaCl, KNO_3 y KCl) y en medio de cultivo DMEM en ausencia y en presencia de 10% FBS. En el caso de las distintas disoluciones salinas, el Na[COSANE] es estable en todas ellas; mientras que en el medio de cultivo forma agregados en presencia de la proteína FBS.

Objetivo 2: Distribución de Na[COSANE] en células, sangre y ratones.

- ✓ Se ha estudiado la citotoxicidad del COSANE en la célula glioblastoma U87 y melanoma A375, siendo el valor de IC_{50} en ambas células alrededor de 200 μM de Na[COSANE]. También se ha estudiado la distribución en las distintas partes de la célula (citósol, membrana, núcleo y citoesqueleto) del contenido de B y Co, acumulándose el COSANE en mayor proporción en la célula U87 y dentro de la célula en la membrana y en el núcleo.
- ✓ Se ha estudiado la distribución de boro en la sangre (plasma y eritrocitos/ granulocitos), dando un 50% de abundancia en boro en plasma y un 25% en las células sanguíneas. El alto contenido de boro en el plasma se debe a que el Na[COSANE] interacciona con las proteínas plasmáticas.
- ✓ Se ha estudiado la distribución de boro en distintos órganos de ratones albinos (sangre, corazón, hígado, pulmón, riñón, bazo, músculo y cerebro), dando una mayor acumulación de COSANE en el pulmón, seguido por el hígado. La principal razón de que el Na[COSANE] se distribuya en estos dos órganos es porque al interactuar con las proteínas plasmáticas, queda retenido en los capilares pulmonares y en el hígado que es donde se sintetizan estas proteínas.

Objetivo 3: Marcadores electroquímicos en sensores de ADN.

- ✓ Se han estudiado las propiedades electroquímicas de los distintos metalacarboranos (COSANE, FESANE y $\text{Cl}_6\text{-FESANE}$) en ausencia y en presencia de CT-*ds*DNA inmovilizado en la superficie del electrodo (*glassy carbon* para COSANE y oro para FESANE y $\text{Cl}_6\text{-FESANE}$) a baja y

alta fuerza iónica. En todos los casos se produce un ligero desplazamiento del potencial redox hacia valores más positivos o más negativos dependiendo del metalacarborano, únicamente en el caso del Na[COSANE] se ha observado que dependiendo de la fuerza iónica del medio su potencial redox varía.

- ✓ Se ha conseguido comprobar que el FESANE y el Cl₆-FESANE se pueden utilizar como marcadores electroquímicos para sensores de ADN, ya que se acumulan entre los pares de bases consiguiendo discriminar entre secuencias complementarias, de las no complementarias y de las que están mutadas.
- ✓ También se ha comprobado que tanto el FESANE como el Cl₆-FESANE se pueden utilizar en muestras de ADN reales amplificadas por PCR para detectar mutaciones genéticas, ya que tienen la capacidad de distinguir entre ADN complementario del que está mutado, e incluso pueden diferenciar entre una mutación por delección o por polimorfismo.

2.7. Referencias.

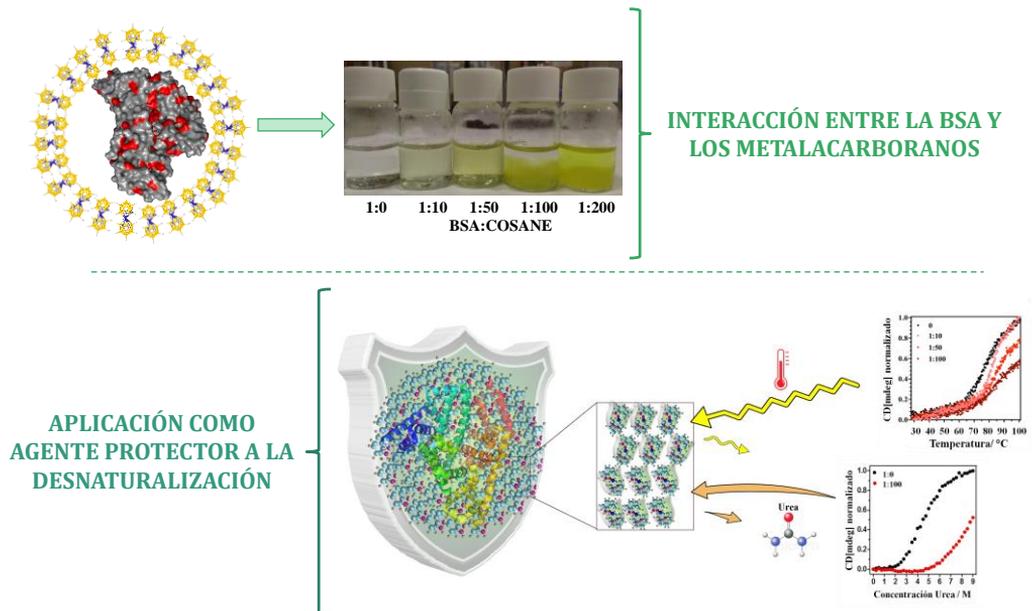
1. I. Fuentes, T. García-Mendiola, S. Sato, M. Pita, H. Nakamura, E. Lorenzo, F. Teixidor, F. Marques and C. Viñas, *Chem. Eur. J.*, 2018, **24**, 17239-17254.
2. T. García-Mendiola, V. Bayon-Pizarro, A. Zaulet, I. Fuentes, F. Pariente, F. Teixidor, C. Vinas and E. Lorenzo, *Chem. Sci.*, 2016, **7**, 5786-5797.
3. M. Tarrés, E. Canetta, C. Viñas, F. Teixidor and A. J. Harwood, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 3370-3372.
4. M. Tarrés, E. Canetta, E. Paul, J. Forbes, K. Azzouni, C. Viñas, F. Teixidor and A. J. Harwood, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 7804.
5. A.-I. Stoica, C. Kleber, C. Viñas and F. Teixidor, *Electrochim. Acta*, 2013, **113**, 94-98.
6. A.-I. Stoica, C. Viñas and F. Teixidor, *Chem. Commun.*, 2008, 6492-6494.
7. A.-I. Stoica, C. Viñas and F. Teixidor, *Chem. Commun.*, 2009, 4988-4990.
8. R. L. Adams, *The biochemistry of the nucleic acids*, Springer Science & Business Media, 2012.
9. A. B. Olejniczak, J. Plešek, O. Kříž and Z. J. Lesnikowski, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, **42**, 5740-5743.
10. Z. J. Leśnikowski, E. Paradowska, A. B. Olejniczak, M. Studzińska, P. Seekamp, U. Schuessler, D. Gabel, R. F. Schinazi and J. Plešek, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 4168-4175.

---Interacción entre el ADN y los metalacarboranos---

11. A. B. Olejniczak, J. Plešek and Z. J. Leśnikowski, *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**, 311-318.
12. A. B. Olejniczak, A. Sut, A. E. Wróblewski and Z. J. Leśnikowski, *Vib. Spectrosc.*, 2005, **39**, 177-185.
13. A. B. Olejniczak, J. Milecki and G. Schroeder, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2010, **2010**.
14. A. B. Olejniczak, P. Mucha, B. Grüner and Z. J. Lesnikowski, *Organometallics*, 2007, **26**, 3272-3274.
15. A. B. Olejniczak, B. Grüner, V. Šicha, S. Broniarek and Z. J. Lesnikowski, *Electroanalysis*, 2009, **21**, 501-506.
16. Z. J. Lesnikowski, *J. Organomet. Chem.*, 2009, **694**, 1771-1775.
17. A. B. Olejniczak, M. Corsini, S. Fedi, P. Zanello and Z. J. Lesnikowski, *Electrochem. Commun.*, 2007, **9**, 1007-1011.
18. R. Ziótkowski, A. B. Olejniczak, Ł. Górski, J. Janusik, Z. J. Leśnikowski and E. Malinowska, *Bioelectrochemistry*, 2012, **87**, 78-83.
19. I. Grabowska, A. Stachyra, A. Góra-Sochacka, A. Sirko, A. B. Olejniczak, Z. J. Leśnikowski, J. Radecki and H. Radecka, *Biosens. Bioelectron.*, 2014, **51**, 170-176.
20. S. Bhuiya, S. Chowdhury, L. Haque and S. Das, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, **120**, 1156-1169.
21. <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/dicroismocircular2013.pdf>.
22. S. Charak, M. Shandilya, G. Tyagi and R. Mehrotra, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2012, **51**, 406-411.
23. R. Hajian and M. Tavakol, *J. Chem.*, 2012, **9**, 471-480.
24. T. Meehan, H. Gamper and J. Becker, *J. Biol. Chem.*, 1982, **257**, 10479-10485.
25. D. Schmechel and D. Crothers, *Biopolymers*, 1971, **10**, 465-480.
26. P. Bauduin, S. Prevost, P. Farràs, F. Teixidor, O. Diat and T. Zemb, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 5298-5300.
27. D. Brusselle, P. Bauduin, L. Girard, A. Zaulet, C. Viñas, F. Teixidor, I. Ly and O. Diat, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 12114-12118.
28. R. L. Moss, *Appl. Radiat. Isot.*, 2014, **88**, 2-11.
29. D. Gabel, S. Foster and R. G. Fairchild, *Radiat. Res.*, 1987, **111**, 14-25.
30. M. T. Carter, M. Rodriguez and A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 8901-8911.

CAPÍTULO 3

INTERACCIÓN ENTRE LA ALBÚMINA SÉRICA BOVINA Y LOS METALACARBORANOS Y SU APLICACIÓN COMO AGENTE PROTECTOR A LA DESNATURALIZACIÓN



RESUMEN DEL CAPÍTULO 3

Este capítulo se basa principalmente en el estudio de la interacción entre la BSA y el metalacarborano Na[COSANE] mediante las siguientes técnicas: DLS, TEM, RMN, dicróismo circular, fluorescencia, ξ -potencial, IR, SEM-EDX y análisis elemental. Observando en todas ellas la formación de una capa alrededor de la BSA de unas 100 moléculas de COSANE, donde por puentes de hidrógeno y di-hidrógeno interacciona el COSANE con los aminoácidos histidina, lisina y arginina de la proteína. A partir de este hecho también se ha estudiado la estabilidad de la BSA frente a su desnaturalización térmica y química (con urea) en ausencia y en presencia de Na[COSANE].

Índice del Capítulo

| | pag. |
|--|------|
| 3. INTERACCIÓN ENTRE LA ALBÚMINA SÉRICA BOVINA Y LOS METALACARBORANOS Y SU APLICACIÓN COMO AGENTE PROTECTOR A LA DESNATURALIZACIÓN | 75 |
| 3.1. Estado actual. | 75 |
| 3.1.1. Proteínas. | 75 |
| 3.1.2. Proteínas y metalacarboranos. | 78 |
| 3.2. Objetivos. | 79 |
| 3.3. Interacción entre la BSA y los metalacarboranos. | 80 |
| 3.3.1. Dispersión dinámica de luz, TEM y RMN. | 81 |
| 3.3.2. Dicroísmo circular y fluorescencia. | 87 |
| 3.3.3. ξ -potencial, IR, SEM-EDX y análisis elemental. | 88 |
| 3.4. Aplicación como agente protector a la desnaturalización. | 94 |
| 3.4.1. Agente protector a la desnaturalización térmica. | 94 |
| 3.4.2. Agente protector a la desnaturalización química. | 98 |
| 3.5. Conclusiones. | 99 |
| 3.6. Referencias. | 101 |

3. INTERACCIÓN ENTRE LA ALBÚMINA SÉRICA BOVINA Y LOS METALACARBORANOS Y SU APLICACIÓN COMO AGENTE PROTECTOR A LA DESNATURALIZACIÓN

3.1. Estado actual.

A partir de los estudios realizados por Viñas y col.^{1, 2} donde se empezó a cuestionar sobre: ¿Por qué el metalacarborano tiene más afinidad dentro de la célula que fuera? ¿Qué moléculas biológicas hay dentro de la célula con las que pueda interactuar? Se intenta responder a estas preguntas a partir del estudio de interacción entre los metalacarboranos y los ácidos nucleicos y las proteínas, ya que son las moléculas biológicas con más probabilidad de interactuar.

En el Capítulo 2 se ha estudiado la interacción entre los metalacarboranos y el ADN, sabiendo que interactúan fuertemente ya sea por intercalación entre los pares de bases en el caso de Na[FESANE] y Na[Cl₆-FESANE],³ como en los surcos a baja fuerza iónica o por intercalación a alta fuerza iónica en el caso del Na[COSANE].⁴ Así que en este capítulo se estudiará la interacción entre los metalacarboranos y las proteínas, para así poder responder a las preguntas cuestionadas.

3.1.1. Proteínas.

Las proteínas son macromoléculas biológicas constituidas básicamente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, y en algunos casos azufre. Están formadas por cadenas lineales de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos (se considera proteína a partir de 50 aminoácidos), dando lugar a estructuras tridimensionales.⁵

Todos los aminoácidos se caracterizan por presentar un grupo amino (-NH₂), un grupo carboxilo (-COOH), un hidrógeno y una cadena lateral R unidos a un carbono central α, **Figura 3. 1.**⁵

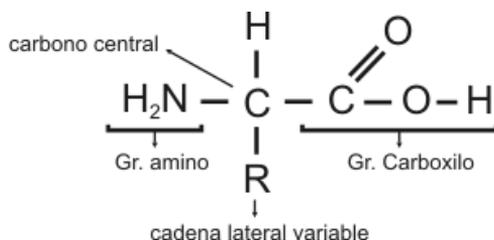


Figura 3. 1. Fórmula general de un aminoácido.

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

Pero dependiendo de la cadena lateral R se pueden encontrar 20 tipos de aminoácidos diferentes (ver **Figura 3. 2**): no polares, polares, no polares aromáticos y cargados positiva y negativamente.

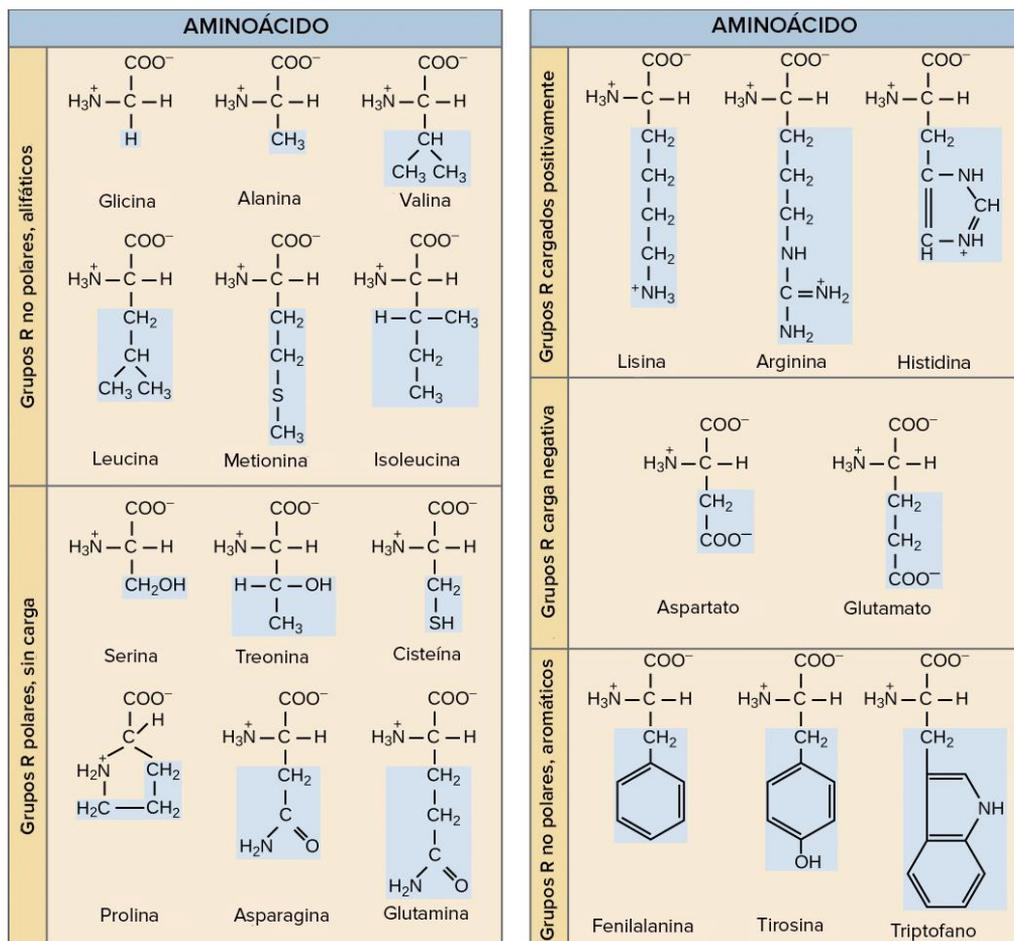


Figura 3. 2. Los 20 aminoácidos comunes clasificados según si la cadena lateral R es no polar, polar, no polar aromáticos o si están cargados positiva o negativamente.

La gran variedad de combinaciones posibles entre los 20 aminoácidos hace que las proteínas sean las moléculas biológicas más versátiles y diversas en los seres vivos, desempeñando un papel fundamental para la vida; ya que son imprescindibles durante el crecimiento del organismo y realizan una cantidad enorme de funciones diferentes: función estructural, función enzimática, hormonal, defensiva, reguladora, de transporte, de reserva, en la contracción muscular, función homeostática, etc.⁵

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

Ahora bien, aunque cada proteína tenga una secuencia de aminoácidos diferente, todas se organizan de la misma manera. Las proteínas tienen cuatro niveles de organización distintos (ver **Figura 3. 3**). La estructura primaria viene determinada por la secuencia de aminoácidos en la cadena proteica (número de aminoácidos y orden en que están enlazados). La estructura secundaria viene determinada por el tipo de plegamiento que adopta la cadena proteica a través de los puentes de hidrógeno y puentes disulfuro que tienen lugar entre los distintos átomos de la cadena, dando lugar a dos conformaciones posibles: α -hélice y lámina- β . La estructura terciaria es la distribución tridimensional de todos los aminoácidos que componen la proteína, es decir, es la suma de todas las α -hélice, lámina- β y estructuras al azar que presenta una proteína, formando proteínas fibrosas o globulares que pueden albergar grupos hemo. Y por último la estructura cuaternaria es el conjunto de diversas cadenas polipeptídicas que mediante interacciones no covalentes (interacciones hidrofóbicas, puentes salinos o puentes de hidrógeno) forman multímeros.⁵

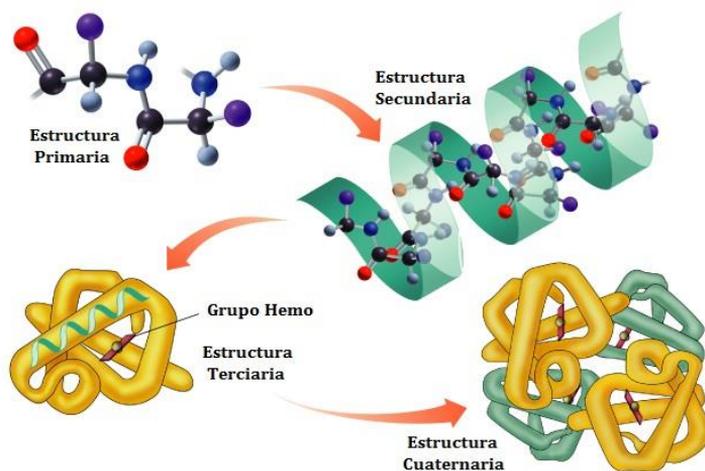


Figura 3. 3. Niveles de organización de las proteínas: estructura primaria, estructura secundaria, estructura terciaria y estructura cuaternaria.

Aunque las proteínas sean muy estables en su forma nativa, pueden sufrir cambios en su estructura terciaria, se desnaturalizan, teniendo una mayor repulsión con el disolvente y llegando a precipitar. Los agentes causantes de la desnaturalización son la temperatura, el pH, los disolventes orgánicos y el aumento de la fuerza iónica del medio.⁵

3.1.2. Proteínas y metalacboranos.

Cígler y *col.* utilizaron en 2005 el COSANE y los derivados del COSANE-DIOXANATO para ver si podían ser utilizados como inhibidores de la enzima proteasa-VIH, dando lugar a valores de constantes de inhibición que sugieren que el COSANE y sus derivados compiten con el sustrato peptídico en el centro activo de la enzima. Además a partir del análisis de rayos-X del complejo formado por la enzima y el COSANE se ha visto que en la cavidad del centro activo caben perfectamente dos moléculas de COSANE.⁶ Tres años más tarde estudiaron la especificidad y la selectividad del COSANE y sus derivados hacia la enzima proteasa-VIH con siete tipos de mutaciones distintos, resultando que para todas las mutaciones también actúan como inhibidores.^{7, 8}

A partir de estos resultados, Hobza y *col.* estudiaron mediante cálculos teóricos el tipo de interacción que tenía lugar entre el carborano $CB_{11}H_{12}^-$ y los aminoácidos arginina, fenilalanina, lisina, glicina, serina, glutamato y el péptido formado por glicina-serina, obteniendo en todos los casos que la interacción entre ambas especies es debida a puentes de hidrógeno y de di-hidrógeno entre los nitrógenos de las biomoléculas y los B-H del clúster.⁹ Además, también estudiaron por cálculos teóricos el tipo de interacción que existe entre los metalacboranos de Fe, Co y Ni y el péptido Ala-Gly-Ala-Ala (péptido que hay en el centro activo de la proteasa-VIH), en todos los casos observaron que la interacción es debida a puentes de hidrógeno y di-hidrógeno con distancias de enlace muy similares entre los distintos metalacboranos.¹⁰

Una vez sabido que los metalacboranos interaccionan con péptidos y con la enzima proteasa-VIH mediante puentes de hidrógeno y di-hidrógeno, se estudió la influencia de tener un metalacborano unido covalentemente a un residuo de la enzima lisozima, concretamente el COSANE-DIOXANATO. Observando que la lisozima modificada con el COSANE-DIOXANATO no presenta ningún cambio en su estructura primaria, secundaria ni terciaria (confirmado por HPLC-ESI-TOF, CD y DLS), pero sí que se observa un pequeño cambio en cuanto al tamaño de la lisozima y la lisozima con el COSANE-DIOXANATO a elevadas temperaturas (la lisozima desnaturaliza y

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

aumenta su tamaño ~68 nm, pero la lisozima con el COSANE-DIOXANATO forma unos grandes agregados >900 nm a 70°C), y también en la actividad enzimática a temperatura ambiente (la lisozima modificada con COSANE-DIOXANATO tiene una actividad enzimática del 37% en vez del 100%).¹¹

También se estudió la solubilidad del COSANE y derivados del COSANE-DIOXANATO en agua, en medio salino y en medio salino + HSA (albúmina sérica humana), observando que la presencia de la proteína HSA hace que la solubilidad de los metalacarboranos aumente, debido principalmente a que la interacción entre el metalacarborano y la proteína es por su carácter lipofílico.¹² Goszczyński y *col.* estudiaron en 2017 la interacción entre las proteínas séricas y los clústeres de boro, observando que la interacción es más fuerte para los metalacarboranos > carboranos > boranos mediante cálculos de constantes de enlace.¹³

Dentro de las aplicaciones que se han estudiado, se ha utilizado el FESANE como mediador redox en un biosensor de glucosa estando la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en la superficie del electrodo con el polímero quitosan, sugiriendo por los resultados obtenidos que el FESANE presenta además de una interacción por puentes de hidrógeno y de di-hidrógeno con la enzima, una interacción electrónica.¹⁴

3.2. Objetivos.

Los objetivos de este capítulo se basan principalmente en responder a las preguntas formuladas a partir de las investigaciones realizadas por Viñas y *col.*^{1,2} y que se resumen a continuación:

- Estudio de la interacción entre la proteína albúmina sérica bovina (BSA) y el metalacarborano Na[COSANE] en disolución (en agua y en tampón fosfato) utilizando las técnicas de DLS, TEM, RMN, CD, fluorescencia, ξ -potencial, IR, SEM-EDX y análisis elemental.
- Estudio de la estabilidad de la proteína albúmina sérica bovina utilizando el metalacarborano Na[COSANE] como agente protector a la desnaturalización térmica y química por urea.

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

3.3. Interacción entre la BSA y los metalacarboranos.

El metalacarborano elegido para este estudio es el COSANE, aunque también se utilizarán el $\text{Cl}_4\text{-COSANE}$, $\text{Cl}_6\text{-COSANE}$ y el borano $[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]^{2-}$ para ser comparados con el COSANE (**Figura 3. 4**). En todos los casos se ha utilizado la sal de Na para que sean solubles en agua y que el pH sea neutro. El $\text{Cl}_4\text{-COSANE}$ y $\text{Cl}_6\text{-COSANE}$ se sintetizaron a partir de COSANE con SO_2Cl_2 en acetonitrilo (ver la síntesis en el Capítulo 4).¹⁵

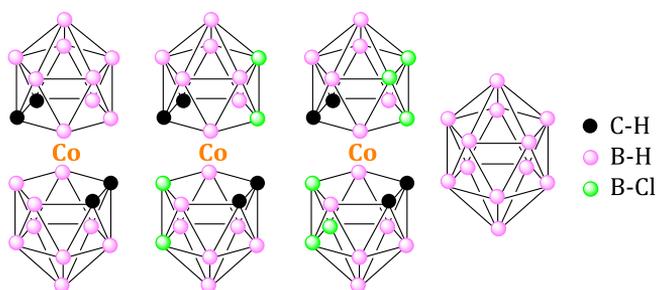


Figura 3. 4. Estructura del COSANE, $\text{Cl}_4\text{-COSANE}$, $\text{Cl}_6\text{-COSANE}$ y $[\text{B}_{12}\text{H}_{12}]^{2-}$ (de izquierda a derecha).

La proteína elegida para este estudio es la albúmina sérica bovina, BSA, ya que es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo (que como se vio en el Capítulo 2 forma agregados con el $\text{Na}[\text{COSANE}]$ en el medio de cultivo DMEM)⁴ y además, tanto su estructura como sus propiedades están ampliamente estudiadas.

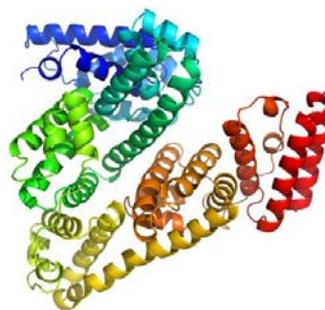


Figura 3. 5. Estructura de la BSA.

Por tanto, se estudiará su interacción principalmente mediante DLS, ya que esta técnica permite conocer el diámetro hidrodinámico de partículas consideradas como esferas. La BSA es una proteína globular que tiene un tamaño por DLS de 3 nm en agua Milli-Q. Mientras que la sal protonada del COSANE, como se explicó en el Capítulo 1, forma agregados en agua con un diámetro aproximado de 40 nm para las vesículas y 2.32 nm para las micelas, siendo el valor de la concentración crítica de la transición de fase de vesículas a micelas de 18.6 mM.¹⁶

3.3.1. Dispersión dinámica de luz, TEM y RMN.

Al utilizar la sal de Na del COSANE para que el pH sea neutro (H[COSANE] tiene un pH ácido), se estudiará por DLS el tamaño de las vesículas y de las micelas formadas así como de la concentración crítica en la transición de fase de vesícula a micela, para ver si la presencia del catión sodio influye en los tamaños de los agregados formados en agua.

La **Figura 3. 6 a** muestra el diámetro hidrodinámico en nm del Na[COSANE] en agua Milli-Q a diferentes concentraciones (curva en negro), siendo el valor aproximado del tamaño de las vesículas de 64 nm y de las micelas de 1.4 nm y siendo la concentración crítica de transición de fase de vesículas a micelas de 29 mM. El cambio del catión Na por el protón hace que el valor del diámetro hidrodinámico de las vesículas aumente, que el de las micelas disminuya y que el valor de la concentración crítica de transición de fase pase de 18.6 a 29 mM. El tamaño de las vesículas se confirma con los datos obtenidos por DLS y por CryoTEM en la **Tabla 2.1** del Capítulo 2.⁴

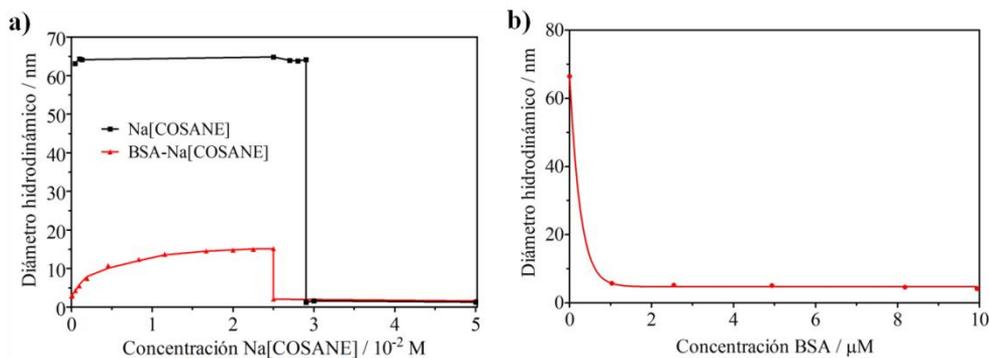


Figura 3. 6. a) Diámetro hidrodinámico en nm de Na[COSANE] a diferentes concentraciones en ausencia (en negro) y en presencia de BSA a una concentración fija de 10 μM (en rojo); b) diámetro hidrodinámico en nm de la BSA a diferentes concentraciones en presencia de 1 mM Na[COSANE]. Todos los experimentos se han hecho en agua Milli-Q.

Una vez sabido el tamaño de los agregados del Na[COSANE] y de la BSA en agua, tres situaciones posibles pueden ocurrir en su interacción:

1) Si la BSA interacciona con la superficie de las vesículas de Na[COSANE], el valor del diámetro hidrodinámico de las vesículas aumentará 6 nm más, debido a que la BSA tiene un diámetro hidrodinámico de 3 nm.

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

2) Si la BSA es encapsulada por las vesículas de Na[COSANE], el valor del diámetro hidrodinámico de las vesículas quedará aproximadamente igual.

3) Si la BSA interacciona fuertemente con el Na[COSANE] haciendo que las vesículas se destruyan y queden moléculas de Na[COSANE] alrededor de la BSA, el valor del diámetro hidrodinámico obtenido sería un poco mayor del de la BSA aproximadamente 5 nm (Na[COSANE] tiene unas dimensiones de 0.6 x 1.1 nm).

Por tanto, se repite el mismo experimento que en la **Figura 3. 6 a** curva en negro, pero manteniendo fijada la concentración de BSA a 10 μ M (**Figura 3. 6 a** curva en rojo). De las tres situaciones posibles que pueden ocurrir al interaccionar la BSA y el Na[COSANE] en agua Milli-Q, la que tiene lugar es la tercera. Las vesículas de Na[COSANE] se destruyen, interaccionando las moléculas de Na[COSANE] fuertemente sobre la superficie de la BSA, dando lugar a valores de diámetro hidrodinámico de 3 a 15 nm. La diferencia de tamaño sugiere que el Na[COSANE] forma diferentes capas alrededor de la BSA. Como se ha visto que el COSANE tiene afinidad por formar puentes de hidrógeno y de di-hidrógeno con grupos amino,¹⁷⁻¹⁹ lo más probable es que interaccione con los aminoácidos His, Lys y Arg (según la estructura cristalina de la BSA en PDB²⁰ hay 18 His, 59 Lys y 23 Arg superficiales), llegando a una concentración crítica de transformación de fase a 25 mM, donde a partir de esa concentración sólo se observan las micelas de 1.8 nm.

Si se repite el mismo experimento pero a la inversa, manteniendo fija la concentración de Na[COSANE] a 1 mM y variando la concentración de BSA (**Figura 3. 6 b**), se observa el mismo efecto. Con sólo el contacto de ambas especies en disolución, se destruyen inmediatamente las vesículas de Na[COSANE] para formar el nanohíbrido de BSA-Na[COSANE]. Por tanto, a partir de estos dos experimentos se concluye que el Na[COSANE] y la BSA presentan una interacción muy fuerte cuando el Na[COSANE] se encuentra en el rango de concentraciones que forman las vesículas.

Como la parte de estudio que nos interesa es hasta la concentración crítica de 25 mM, se repite el mismo experimento que en la **Figura 3. 6 a** curva en rojo, pero con los metalacarboranos Na[COSANE], Na[Cl₄-COSANE], Na[Cl₆-COSANE], Na₂[B₁₂H₁₂] en agua y tampón fosfato (**Figura 3. 7 a**).

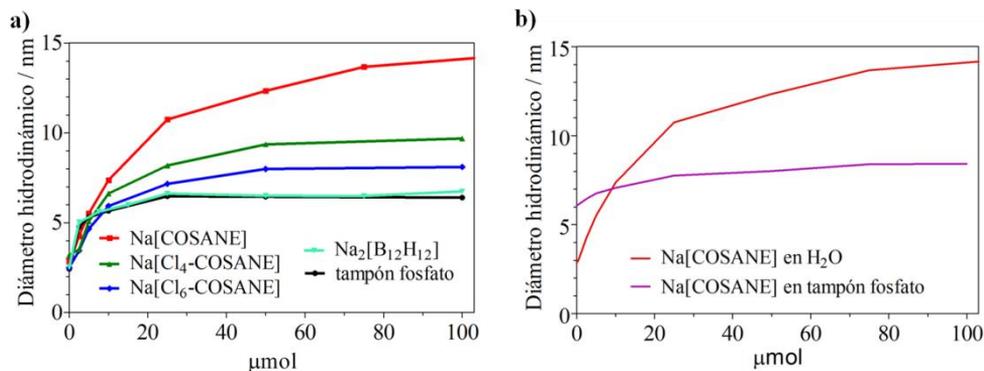


Figura 3. 7. a) Diámetro hidrodinámico en nm de Na[COSANE] (en rojo), Na[Cl₄-COSANE] (en verde), Na[Cl₆-COSANE] (en azul), Na₂[B₁₂H₁₂] (en turquesa) en agua y en tampón fosfato (en negro) a diferentes concentraciones, manteniendo la concentración fija de BSA a 10 μM; b) diámetro hidrodinámico en nm de Na[COSANE] a diferentes concentraciones en agua (en rojo) y en tampón fosfato (en morado), manteniendo la concentración fija de BSA a 10 μM.

Con este estudio se quiere ver la distinta capacidad que tienen los clústeres de boro en formar puentes de hidrógeno y de di-hidrógeno en agua con la BSA y compararlo con el tampón fosfato. En el caso del tampón fosfato (curva en negro) que sólo tiene la capacidad de envolver la BSA en una capa electrostática, se observa que una vez llegado al tamaño de saturación el diámetro hidrodinámico se mantiene constante. Al igual que pasa con el Na₂[B₁₂H₁₂] (curva en amarillo), como no forma agregados en agua no tiene la capacidad de autoensamblarse, y por ese motivo una vez llega al tamaño de saturación de una capa el diámetro hidrodinámico se mantiene igual.

En cambio, los clústeres Na[COSANE] (curva en rojo), Na[Cl₄-COSANE] (curva en verde) y Na[Cl₆-COSANE] (curva en azul) pueden llegar a formar más de una capa en comparación con el tampón fosfato y el Na₂[B₁₂H₁₂]; ya que además de presentar puentes de hidrógeno y de di-hidrógeno entre los grupos B-H entre sí y los grupo amino de las histidinas, las lisinas y las argininas formando la primera capa, también pueden formar puentes de hidrógeno y di-hidrógeno entre ellos dando lugar a las siguientes capas. La principal diferencia entre los distintos metalacarboranos es el número de B-H disponibles, el COSANE tiene 18 B-H y 4 C_c-H, el Cl₄-COSANE tiene 14 B-H y 4 C_c-H y el Cl₆-COSANE tiene 12 B-H y 4 C_c-H. Por esta razón, el COSANE es el metalacarborano que presenta valores de diámetro hidrodinámico más altos, seguido por el Cl₄-COSANE y por el Cl₆-COSANE.

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

Los estudios hechos hasta ahora han sido en agua, donde la BSA tiene un tamaño de 3 nm y el nanohíbrido BSA-Na[COSANE] dependiendo de la concentración de Na[COSANE] tiene un tamaño de 3 a 15 nm. Si se repite el mismo estudio pero en vez de agua Milli-Q en tampón fosfato (**Figura 3. 7 b**), se observa como el diámetro hidrodinámico de la BSA aumenta a 6 nm y que la capacidad de autoensamblaje del COSANE para formar más de una capa se ve reducida llegando a un tamaño de 8.5 nm.

Para estimar el número de capas formadas en agua en el nanohíbrido BSA-Na[COSANE] se hacen cálculos de cubrimiento de superficies considerando que el DLS es una técnica que proporciona el valor del diámetro hidrodinámico de partículas esféricas (como la BSA es una proteína globular el error del cálculo será mínimo). El diámetro hidrodinámico de la BSA en agua es de 3 nm con un área superficial de 28.27 nm²; mientras que el COSANE mide 0.6 x 1.1 nm y su área superficial dependerá de si interacciona vertical (0.28 nm²) u horizontalmente (0.66 nm²) con la BSA, se pueden calcular distintos modelos.

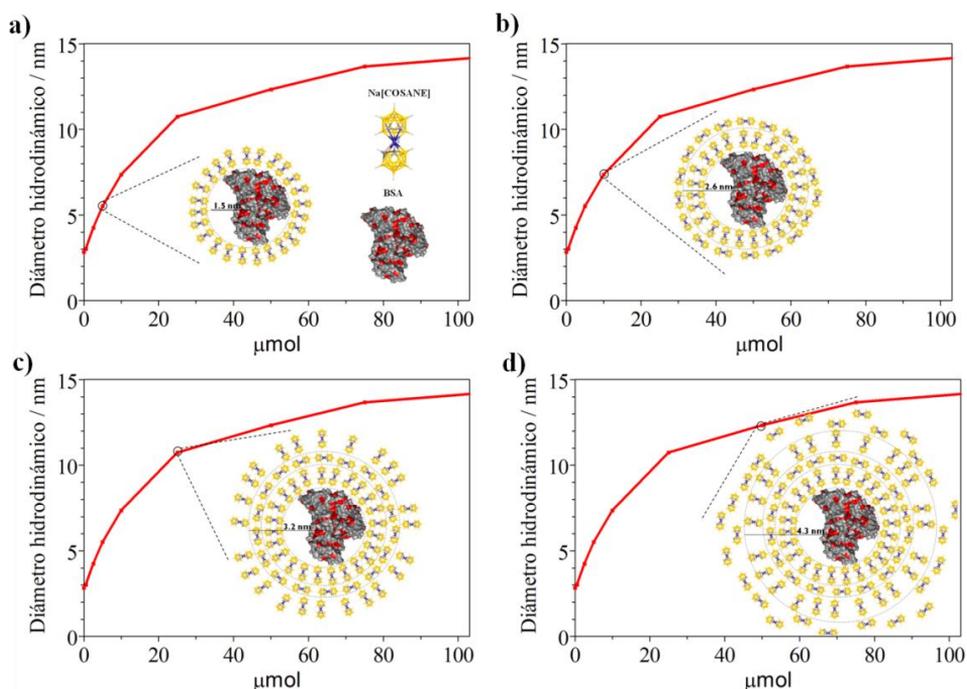


Figura 3. 8. Representación teórica de la a) primera, b) segunda, c) tercera y d) cuarta capa del Na[COSANE] alrededor de la BSA en agua, a partir de los diámetros hidrodinámicos obtenidos.

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

Por tanto, para conocer el número de capas y de moléculas de Na[COSANE] alrededor de la BSA, cómo están distribuidas dichas moléculas y el grado de recubrimiento, se utilizan algunos valores de diámetro hidrodinámico de la curva en rojo de la **Figura 3. 7 a**. Como se puede ver en la **Figura 3. 8 a**, si se coge el valor de 5.5 nm que corresponde aproximadamente a 3 nm de la BSA + 1.1 nm de COSANE + 1.1 nm de COSANE estando el COSANE en posición *end-on*, se obtiene un total de 101 moléculas de Na[COSANE] que caben en la primera capa. A partir del valor de μmol de Na[COSANE] en ese punto, se sabe que en la disolución hay 98 moléculas dando lugar a un 98% de recubrimiento superficial en la primera capa.

La **Figura 3. 8 b** muestra la formación de la segunda capa de Na[COSANE] teniendo en cuenta que ahora el área superficial es la suma de la BSA con la primera capa (84.95 nm²). Si se coge el valor de 7.3 nm se necesitan 128 moléculas de Na[COSANE] distribuidas horizontalmente para formar la segunda capa, mientras que en la disolución sólo hay 94, obteniendo un total del 73% de recubrimiento superficial. Para formar la tercera capa (**Figura 3. 8 c**) se necesitan 459 moléculas de Na[COSANE] distribuidas en vertical, pero sólo 262 moléculas están disponibles para tal fin, dando lugar a un recubrimiento superficial del 57%. A partir de la tercera capa la interacción entre las distintas moléculas de Na[COSANE] se va debilitando, dando lugar a capas más difusas (**Figura 3. 8 d**). Una vez estudiado la interacción de la BSA con los metalacarboranos por DLS, se comprueba por TEM y por RMN si los valores obtenidos de tamaño son correctos y si forman agregados.

Para confirmar que los tamaños de diámetro hidrodinámico obtenidos por DLS son correctos, se mide por TEM el tamaño de partícula y su desviación estándar (ver **Figura 3. 9**). Se toma la BSA en agua y la BSA con Na[COSANE] y Na[Cl₆-COSANE] en agua y tampón fosfato en el punto del eje x correspondiente a 20 μmol de la **Figura 3. 7 a**. Según el DLS los valores obtenidos de diámetro hidrodinámico son 3 nm para 10 μM BSA en agua, 9.5 nm para el nanohíbrido BSA-Na[COSANE], 6.8 nm para el nanohíbrido BSA-Na[Cl₆-COSANE] y 6.2 nm para la BSA en tampón fosfato. Estos valores se comparan con los obtenidos a partir del TEM de la **Figura 3. 9**, donde todos los valores se encuentran dentro del error, confirmándose que los tamaños de diámetro hidrodinámico obtenidos por DLS son correctos.

Interacción entre la BSA y los metalacarboranos

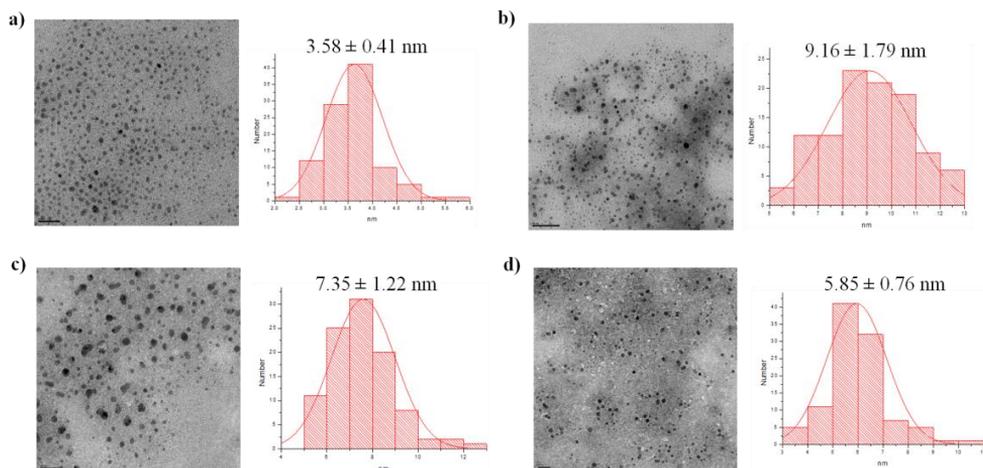


Figura 3. 9. Imágenes de TEM e histogramas con el valor de tamaño de partícula medio \pm desviación estándar de a) 10 μ M BSA, b) nanohíbrido BSA-Na[COSANE], c) nanohíbrido BSA-Na[Cl₆-COSANE] en agua Milli-Q y d) BSA en tampón fosfato. Las condiciones elegidas para hacer las medidas por TEM corresponden al valor del eje x a 20 μ mol de la **Figura 3. 7 a**. Escala 20 nm (a c d) y 50 nm (b).

Si se compara el $^{11}\text{B}\{^1\text{H}\}$ RMN de Na[COSANE] en ausencia y en presencia de cantidades crecientes de BSA (**Figura 3. 10**), se puede observar como el COSANE forma agregados (en azul y morado) cuando todas las moléculas de COSANE se encuentran participando en la primera capa alrededor de la BSA. En cambio, una vez formada la primera capa (en verde) hay moléculas de COSANE que empiezan a formar la segunda capa más débilmente y en consecuencia el espectro de RMN es más similar al del COSANE libre (en rojo). Por tanto, se comprueba por RMN que el Na[COSANE] y la BSA interactúan fuertemente durante la formación de la primera capa.

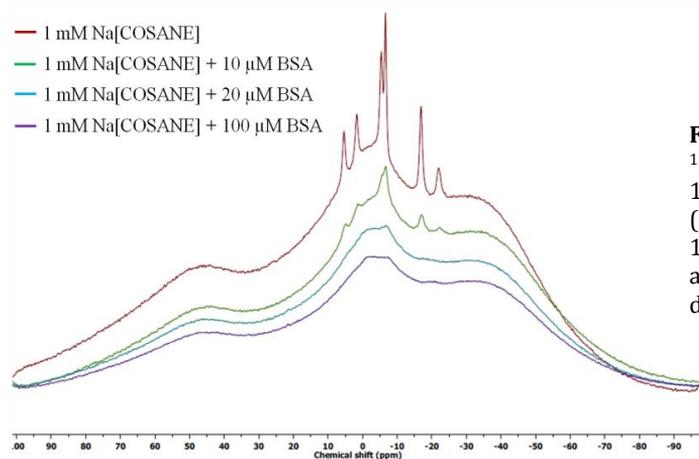


Figura 3. 10. Espectro de $^{11}\text{B}\{^1\text{H}\}$ RMN de Na[COSANE] 1 mM en agua en ausencia (en rojo) y en presencia de 10 μ M (en verde), 20 μ M (en azul) y 100 μ M (en morado) de BSA.

3.3.2. Dicroísmo circular y fluorescencia.

Una vez confirmado que el Na[COSANE] interacciona fuertemente con la BSA durante la formación de la primera capa y que para envolver la BSA con una capa son necesarias 100 moléculas de COSANE, se estudiará por dicroísmo circular si la presencia de COSANE alrededor de la BSA con la formación de puentes de hidrógeno y de di-hidrógeno entre los B-H del clúster y los grupo amino de las histidinas, las lisinas y las argininas afecta a la estructura secundaria de la proteína en tampón fosfato.

En la **Figura 3. 11** se puede observar el espectro de dicroísmo circular de la BSA en negro con dos mínimos a 210 y 222 nm característicos de las proteínas con estructura α -hélice, como bien se puede ver en la **Figura 3. 5**. El efecto que puede producir el Na[COSANE] en la forma y la elipticidad de la BSA cuando forma la primera capa (1:10, 1:50 y 1:100 en la relación BSA: COSANE) es despreciable, ya que como se puede observar en el espectro de dicroísmo circular, al ser tan similar al de la BSA nativa, sugiere que se conserva la estructura de α -hélice.

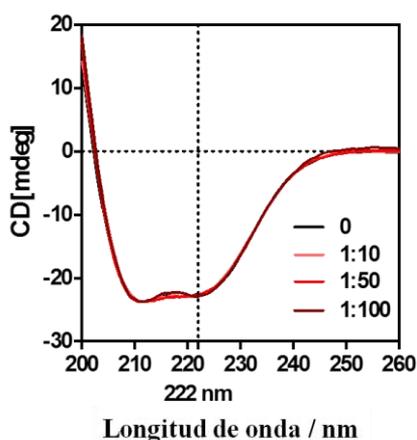


Figura 3. 11. Espectro de dicroísmo circular de la BSA en ausencia (en negro) y en presencia de Na[COSANE] siguiendo la relación BSA: COSANE 1:10, 1:50 y 1:100 en tampón fosfato.

Se ha comprobado que la estructura secundaria de la BSA permanece sin ninguna modificación cuando las moléculas de COSANE forman la primera capa, conservando la estructura de α -hélice. Ahora sólo falta conocer si la presencia de Na[COSANE] afecta a la propiedad intrínseca de fluorescencia de la BSA, siendo los aminoácidos responsables de dicha fluorescencia el triptófano, la tirosina y la fenilalanina.

En la **Figura 3. 12** se puede observar el espectro de fluorescencia de la BSA en negro a 200 nM y cómo va disminuyendo la intensidad de fluorescencia a medida que se añaden concentraciones crecientes de Na[COSANE] (de 7 a 700 nM), dando lugar a un proceso de *quenching* por parte del COSANE (el COSANE no muestra ninguna señal de fluorescencia a la λ_{ex} de 280 nm).

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

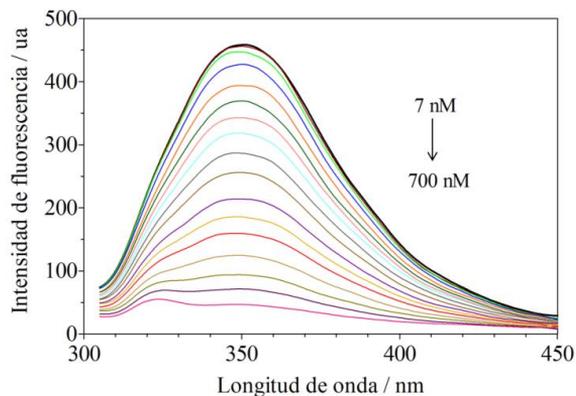


Figura 3. 12. Espectro de fluorescencia de la BSA a 200 nM en ausencia (en negro) y en presencia de concentraciones crecientes de Na[COSANE] (de 7 a 700 nM) en tampón fosfato. $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$

Utilizando la siguiente ecuación¹³ se puede saber el grado de *quenching* que produce el Na[COSANE] hacia la BSA:

$$\text{Grado de quenching} = \left(1 - \frac{F}{F_0}\right) \cdot 100 \quad (3)$$

Siendo F la intensidad de fluorescencia de la BSA en presencia del COSANE y F_0 la intensidad de fluorescencia de la BSA.

Como para cada concentración de COSANE la intensidad de fluorescencia de la BSA varía haciéndose cada vez menor, se calculan distintos valores de grado de *quenching* con la relación BSA:COSANE 1:0.5, 1:1, 1:2 y 1:3.5, siendo los valores 30.69, 59.66, 72.87 y 89.81%, respectivamente. Con sólo una molécula de Na[COSANE] por cada BSA, se reduce la fluorescencia un 60%, si en vez de una molécula son dos la fluorescencia se reduce un 73%, indicando que con muy poca cantidad de Na[COSANE] (sin llegar a llenar la primera capa) se ve afectada en gran medida la propiedad intrínseca de fluorescencia de la BSA.

3.3.3. ξ -potencial, IR, SEM-EDX y análisis elemental.

Para confirmar que el Na[COSANE] se encuentra alrededor de la BSA formando una capa completa se utilizará la técnica del ξ -potencial, ya que las medidas obtenidas por esta técnica proporcionan información acerca de la carga (repulsión/atracción) entre las distintas partículas y acerca de su estabilidad en disolución (dispersión, agregación o floculación).

Interacción entre la BSA y los metalacarboranos

El Na[COSANE] a pH 7 en agua Milli-Q presenta un valor de ξ -potencial de -60 mV, indicando que la carga global de las vesículas es negativa y que al ser un valor superior a ± 30 mV presenta una buena estabilidad en agua sin llegar a formar agregados entre las distintas vesículas.

Además de proporcionar información acerca de la carga global y de la estabilidad en agua, la técnica de ξ -potencial también es muy utilizada en proteínas para conocer el valor del punto isoeléctrico (pI). El pI es el valor de pH en que la carga global superficial de la proteína es 0 (se compensan los residuos básicos y ácidos). En el caso de la BSA (**Figura 3. 13** en negro) se puede observar como el valor del pI es 4.7, siendo una proteína cargada positivamente a $\text{pH} < 4.7$ y cargada negativamente a $\text{pH} > 4.7$. El valor de ξ -potencial en todos los pHs medidos es inferior a ± 30 mV indicando que la BSA tiene tendencia a agregarse en disolución.

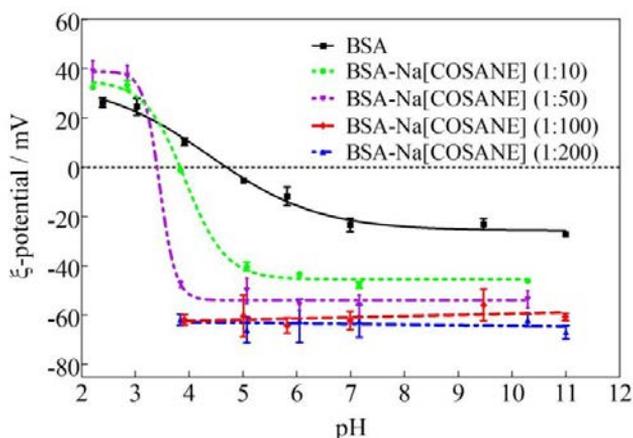


Figura 3. 13. Valores de ξ -potencial de la BSA en ausencia (en negro) y en presencia de Na[COSANE] en la relación BSA: COSANE 1:10 (en verde), 1:50 (en morado), 1:100 (en rojo) y 1:200 (en azul) a diferentes valores de pH en agua a 25°C.

Como el Na[COSANE] interacciona con la superficie de la BSA, se repite el mismo experimento pero con la relación BSA: COSANE 1:10, 1:50, 1:100 y 1:200 (ver **Figura 3. 13**). En el caso del nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:10 y 1:50 (en verde y en morado respectivamente), se observa como aumenta la estabilidad en agua (ξ -potencial $> |\pm 30|$ mV) y como se desplaza el valor de pI (3.8 y 3.4 respectivamente), sugiriendo que las moléculas de COSANE cubren parcialmente la superficie de la BSA dejando libre residuos básicos que son los causantes de los valores positivos de ξ -potencial.

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

En cambio, cuando la relación de BSA: COSANE es 1:100 (en rojo) se llega a observar en todo el rango de pHs que el valor de ξ -potencial es aproximado a -60 mV, al igual que el Na[COSANE] libre, sugiriendo que se ha formado la primera capa completa. Si se añade exceso de Na[COSANE] (1:200 curva en azul) se llega al mismo resultado, confirmando que el COSANE recubre completamente la superficie de la BSA.

Los valores de ξ -potencial en las disoluciones con la relación 1:100 y 1:200 en el rango de pH de 2 a 4 no se han podido medir debido a que el complejo BSA-Na[COSANE] ha precipitado (**Figura 3. 14**). Este hecho se debe a que el COSANE en contacto con aminas protonadas forma un complejo insoluble en agua y precipita.¹⁷⁻¹⁹

Como se puede ver en la **Figura 3. 14** las disoluciones de BSA en ausencia y en presencia de 10 y 50 moléculas de Na[COSANE] por proteína a pH 2.21 son completamente solubles en agua, pero cuando se forma la primera capa completa (1:100) precipita al instante todo el nanohíbrido formado (se ha comprobado por UV-Visible que el sobrenadante no contiene ninguna molécula de BSA ni de Na[COSANE]). En cambio, en la disolución de 1:200 donde ya se ha formado la primera capa y hay exceso de COSANE para formar la segunda, se observa como únicamente precipita el nanohíbrido formado por una capa y queda en disolución el exceso de Na[COSANE] (además del color se ha comprobado por UV-Visible).

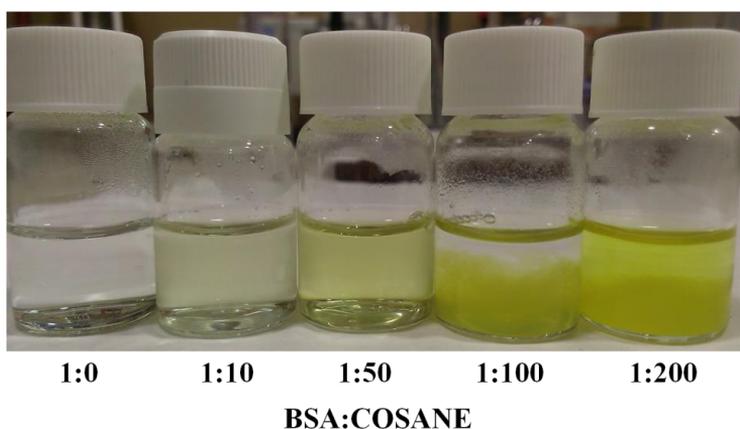


Figura 3. 14. Imagen de distintas disoluciones con la relación BSA: COSANE 1:0, 1:10, 1:50, 1:100 y 1:200 (de izquierda a derecha) en agua a pH 2.21 a 25°C.

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

Una vez precipitado el nanohíbrido BSA-Na[COSANE] se centrifuga, se lava y se separa para tenerlo aislado y poder caracterizarlo por IR, SEM-EDX y análisis elemental. En la **Figura 3. 15** se puede observar el espectro de IR de la BSA (en negro), siendo características las bandas de vibración de los carboxílicos de las amidas sobre 1524 y 1644 cm^{-1} , los C-H alifáticos de la cadena proteica sobre 2962 cm^{-1} y la banda ancha de los O-H sobre 3290 cm^{-1} . El IR del Na[COSANE] (en azul) presenta la banda de vibración del B-H característica de los clústeres de boro sobre 2522 cm^{-1} , los C_c-H del clúster sobre 3035 cm^{-1} y las aguas de hidratación del sodio sobre 3591 y 1604 cm^{-1} . En consecuencia, el espectro de IR del nanohíbrido BSA-Na[COSANE] (en naranja) presenta una mezcla de ambas bandas de vibración características de cada molécula, confirmando la presencia del COSANE por la banda B-H sobre 2544 cm^{-1} y la presencia de la BSA por la banda de los carboxílicos de las amidas sobre 1535 y 1652 cm^{-1} .

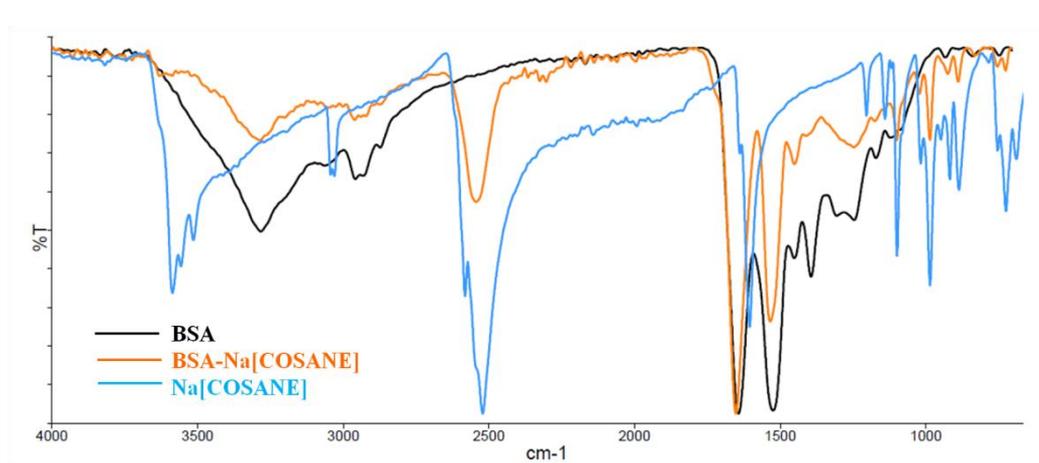


Figura 3. 15. Espectro de IR de la BSA (en negro), del Na[COSANE] (en azul) y del nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:100 precipitado (en naranja).

También se ha caracterizado el nanohíbrido BSA-Na[COSANE] precipitado con la relación 1:100 y 1:500 por SEM-EDX. Se ha observado su morfología a distintas magnificaciones (1000x, 4000x y 5000x), ver **Figura 3. 16** (el nanohíbrido 1:500 muestra la misma morfología), observando en todos los casos una distribución completamente homogénea sin llegar a tener una morfología definida. En cambio, cuando el nanohíbrido está en disolución y se seca en la rejilla del TEM tiene forma esférica (**Figura 3. 9**), como era de esperar a partir del modelo teórico de la **Figura 3. 8**.

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

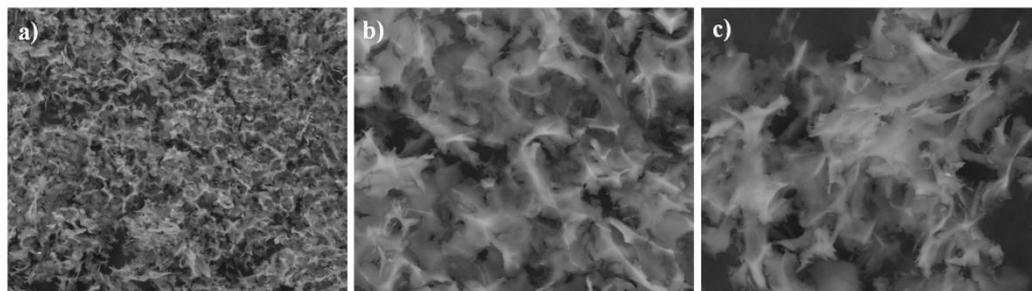


Figura 3. 16. Imágenes de SEM del nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:100 precipitado con a) 1000x, b) 4000x y c) 5000x de magnificación.

A partir del análisis por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX) se puede conocer el % en peso o atómico de los elementos presentes en el nanohíbrido BSA-Na[COSANE] precipitado 1:100 (**Tabla 3. 1**) y 1:500 (**Tabla 3. 2**). Los elementos elegidos para saber la relación BSA: COSANE teórica según los resultados de EDX son el S presente únicamente en la BSA (cada BSA tiene 39 azufres, 35 Cys + 4 Met) y el Co presente únicamente en el COSANE (cada COSANE tiene 1 cobalto). En ambos casos se mide el EDX de cinco muestras distintas, se calcula el % teórico en peso y atómico que corresponden a 1 BSA y *n* moléculas de COSANE, obteniendo así la relación BSA: COSANE teórica de 1:(96 ± 5) para 1:100 y 1:(128 ± 10) para 1:500.

Tabla 3. 1. Valores del % en peso y atómico del S y el Co obtenido por EDX (izquierda) y calculado teóricamente sabiendo que el COSANE tiene 1 Co y la BSA tiene 39 S (derecha). Valor de la relación BSA: COSANE calculada teóricamente coincidiendo con los valores de EDX. Nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:100 precipitado.

| Nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:100 | | | | | |
|---|---------------|------------------|----------------|------------------|--------------------|
| | EDX | | Teórico | | |
| | % peso | % atómico | % peso | % atómico | BSA: COSANE |
| S | 16.32 | 26.39 | 16.30 | 26.36 | 1:95 |
| Co | 83.68 | 73.61 | 83.70 | 73.64 | |
| S | 16.15 | 26.15 | 16.16 | 26.15 | 1:96 |
| Co | 83.85 | 73.85 | 83.84 | 73.85 | |
| S | 15.40 | 25.07 | 15.35 | 25.00 | 1:102 |
| Co | 84.60 | 74.93 | 84.65 | 75.00 | |
| S | 16.13 | 26.11 | 16.16 | 26.15 | 1:96 |
| Co | 83.87 | 73.89 | 83.84 | 73.85 | |
| S | 17.23 | 27.67 | 17.21 | 27.64 | 1:89 |
| Co | 82.77 | 72.33 | 82.79 | 72.36 | |

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

Tabla 3. 2. Valores del % en peso y atómico del S y el Co obtenido por EDX (izquierda) y calculado teóricamente sabiendo que el COSANE tiene 1 Co y la BSA tiene 39 S (derecha). Valor de la relación BSA: COSANE calculada teóricamente coincidiendo con los valores de EDX. Nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:500 precipitado.

| Nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:500 | | | | | |
|---|---------------|------------------|----------------|------------------|--------------------|
| | EDX | | Teórico | | |
| | % peso | % atómico | % peso | % atómico | BSA: COSANE |
| S | 13.01 | 21.56 | 13.07 | 21.66 | 1:123 |
| Co | 86.99 | 78.44 | 86.93 | 78.34 | |
| S | 11.84 | 19.80 | 11.82 | 19.77 | 1:138 |
| Co | 88.16 | 80.20 | 88.18 | 80.23 | |
| S | 13.72 | 22.62 | 13.75 | 22.67 | 1:116 |
| Co | 86.28 | 77.38 | 86.25 | 77.33 | |
| S | 11.71 | 19.60 | 11.75 | 19.65 | 1:139 |
| Co | 88.29 | 80.40 | 88.25 | 80.35 | |
| S | 12.88 | 21.37 | 12.89 | 21.38 | 1:125 |
| Co | 87.12 | 78.63 | 87.11 | 78.62 | |

En el caso de la relación del nanohíbrido 1:100 se obtuvo un valor por EDX de $1:(96 \pm 5)$, confirmando que precipita completamente la primera capa debido a la fuerte interacción que presenta el Na[COSANE] con la BSA. En cambio, en la relación del nanohíbrido 1:500 se obtuvo un valor por EDX de $1:(128 \pm 10)$, confirmando que la primera capa y muy débilmente la segunda forman parte del precipitado, no llegando a precipitar el resto de las capas y quedando en disolución moléculas de COSANE.

Por último, para corroborar los resultados obtenidos por EDX para el nanohíbrido BSA: COSANE 1:100, se realiza el análisis elemental del C, H, N y S. Los valores obtenidos fueron 38.3% C, 7.07% H, 10.3% N y 1.05 % S, teniendo en cuenta la fórmula molecular del COSANE ($\text{Co}_1\text{C}_4\text{B}_{18}\text{H}_{22}$) y de la BSA ($\text{C}_{2932}\text{H}_{4614}\text{N}_{780}\text{O}_{898}\text{S}_{39}$), se calcula la relación BSA: COSANE a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\%C \frac{(2932+4n) \cdot 12}{66334+324n+68n} = 0.383 \quad (4)$$

$$\%N \frac{(780+0n) \cdot 14}{66334+324n+68n} = 0.103 \quad (5)$$

Siendo n el número de moléculas de COSANE.

---Interacción entre la BSA y los metalacarboranos---

Obteniendo un valor de la relación BSA: COSANE de $1:(99 \pm 4)$, se confirma que tanto la técnica de EDX como el análisis elemental corroboran que la primera capa de COSANE está formada alrededor de 100 moléculas, como bien se dijo en el modelo teórico de la **Figura 3. 8**.

3.4. Aplicación como agente protector a la desnaturalización.

Una vez conocido que el Na[COSANE] interacciona fuertemente con la superficie de la BSA, concretamente con los residuos histidina, arginina y lisina, mediante puentes de hidrógeno y de di-hidrógeno, formando una primera capa completa con aproximadamente 100 moléculas de COSANE que no perturban la estructura secundaria de la proteína, se estudiará si la capa de COSANE puede proteger a la BSA de su desnaturalización causada por un aumento de temperatura y por estar en contacto con urea.

3.4.1. Agente protector a la desnaturalización térmica.

Esta parte del trabajo se ha realizado en colaboración con el profesor Salvador Ventura y su colaborador Jordi Pujols de la Universidad Autónoma de Barcelona. Para saber si el COSANE puede proteger a la BSA de su desnaturalización térmica, se utilizarán las técnicas de DLS y dicroísmo circular. La BSA desnaturalizada a diferencia de la nativa está desplegada, con una conformación más abierta, perdiendo su estructura secundaria y aumentando su tamaño.

En la **Tabla 3. 3** se puede observar cómo va aumentando el tamaño de la BSA a medida que aumenta la temperatura en tampón fosfato, pasando de un diámetro hidrodinámico de 6.50 nm a 25°C, a un diámetro de 20.55 nm a 90°C (tiene tendencia a formar agregados entre sí de gran dimensión).

Tabla 3. 3. Tamaño del diámetro hidrodinámico de la BSA y del nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:100 a 25, 60, 70, 80 y 90°C en tampón fosfato. Tiempo de equilibrio entre temperaturas: 30 min.

| Temperatura / °C | Tamaño BSA / nm | Tamaño BSA-Na[COSANE] / nm |
|------------------|-----------------|----------------------------|
| 25 | 6.50 | 8.72 |
| 60 | 8.22 | 8.73 |
| 70 | 11.47 | 8.82 |
| 80 | 15.92 | 8.66 |
| 90 | 20.55 | 8.77 |

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

En cambio, el nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:100 (**Tabla 3. 3** derecha) no muestra ningún cambio de tamaño al aumentar la temperatura en tampón fosfato, teniendo un diámetro hidrodinámico alrededor de 8.72 nm durante todo el rango de temperaturas. Este hecho confirma que el Na[COSANE] forma una capa protectora alrededor de la BSA, cubriendo completamente la superficie y previniendo su desnaturalización a temperaturas altas, hasta 90°C, estabilizando la proteína en su forma nativa.

Ahora bien, si en vez de cubrir la BSA con 100 moléculas de Na[COSANE] se hace con 10 y con 1000 moléculas de Na[COSANE], se esperaría según el modelo teórico propuesto en la **Figura 3. 8** que el nanohíbrido 1:10 no proteja la BSA frente a la desnaturalización térmica y que el nanohíbrido 1:1000 sí. En la **Tabla 3. 4** se puede observar que como era de esperar el nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:10 no protege a la BSA térmicamente, aumentando su diámetro hidrodinámico de 8.68 nm a 25°C a 13.27 nm a 90°C. En cambio, el nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:1000 sí que protege la BSA térmicamente, manteniendo el tamaño constante en todo el rango de temperaturas. Estos resultados confirman que para proteger a la BSA de su desnaturalización térmica es necesario cubrir completamente su superficie con moléculas de Na[COSANE].

Tabla 3. 4. Tamaño del diámetro hidrodinámico del nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:10 y 1:1000 a 25, 70, 80 y 90°C en tampón fosfato. Tiempo de equilibrio entre temperaturas: 30 min.

| Temperatura / °C | Tamaño BSA-Na[COSANE] 1:10 / nm | Tamaño BSA-Na[COSANE] 1:1000 / nm |
|------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| 25 | 8.68 | 8.79 |
| 70 | 9.08 | 8.65 |
| 80 | 11.01 | 8.39 |
| 90 | 13.27 | 8.83 |

Una vez visto que el Na[COSANE] protege térmicamente a la BSA hasta 90°C con un tiempo de equilibrio de 30 minutos, se estudiará si el tiempo puede afectar a la capacidad protectora del COSANE. Para ello, se mide el tamaño por DLS a distintos tiempos de incubación a 90°C (**Tabla 3. 5**). En todos los tiempos el tamaño del nanohíbrido BSA-Na[COSANE] se mantiene constante, indicando que el Na[COSANE] protege a la BSA térmicamente independientemente de la temperatura y del tiempo de incubación.

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

Tabla 3. 5. Tamaño del diámetro hidrodinámico de la BSA y del nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:100 a tiempo 0 a 25°C y a tiempos 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min a 90°C en tampón fosfato.

| Tiempo / min | Tamaño BSA / nm | Tamaño BSA-Na[COSANE] / nm |
|--------------|-----------------|----------------------------|
| 0 | 6.50 | 8.72 |
| 30 | 16.96 | 8.78 |
| 60 | 17.20 | 8.69 |
| 90 | 17.01 | 8.72 |
| 120 | 18.83 | 8.96 |
| 150 | 20.70 | 8.82 |
| 180 | 20.96 | 8.87 |

Una vez visto por DLS que el tamaño del nanohíbrido BSA-Na[COSANE] se mantiene constante a altas temperaturas, se comprobará por dicroísmo circular si la estructura secundaria de la BSA sigue nativa o sufre alguna modificación. Para ello, se hace el CD de la BSA y de los nanohíbridos 1:10, 1:50 y 1:100 a diferentes temperaturas (25, 60, 70, 80 y 90°C) en tampón fosfato con un tiempo de incubación de 5 min (ver **Figura 3. 17**).

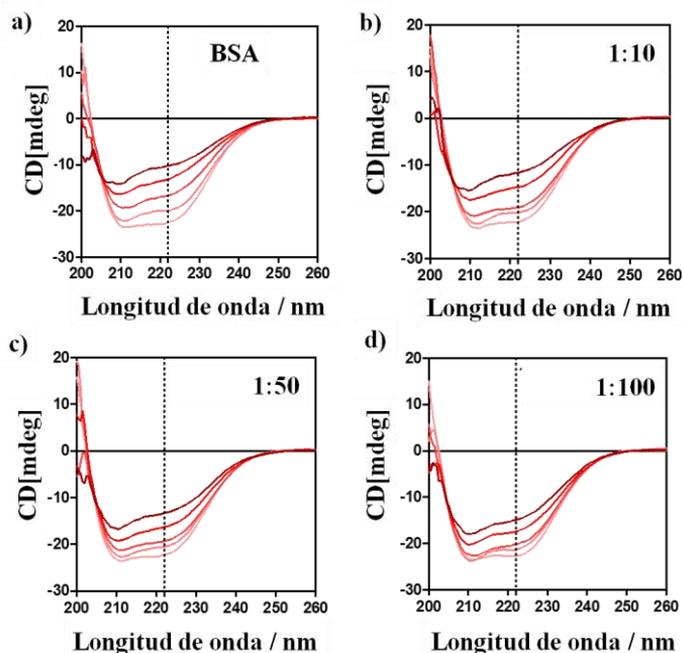


Figura 3. 17. Espectros de dicroísmo circular de a) BSA y de los nanohíbridos BSA-Na[COSANE] b) 1:10, c) 1:50 y d) 1:100 a diferentes temperaturas (25, 60, 70, 80 y 90°C, curvas de color más claro a más oscuro respectivamente) en tampón fosfato.

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

En todos los casos se puede observar que a medida que aumenta la temperatura el espectro de dicroísmo circular tiende a 0 mdeg, indicando que sí que hay una pérdida de la estructura secundaria de la proteína. Si se compara la BSA con el nanohíbrido 1:100 (**Figura 3. 17 a d**) se puede ver como a 222 nm la BSA pierde 12.2 mdeg y el nanohíbrido 1:100 pierde 7.2 mdeg de 25 a 90°C, sugiriendo que el COSANE minimiza la pérdida de la estructura secundaria estabilizando la BSA a alta temperatura. Y si se comparan los espectros de dicroísmo circular de los distintos nanohíbridos se puede observar como a medida que hay más moléculas de Na[COSANE] formando parte de la primera capa de la BSA, la diferencia entre el espectro a 25 y a 90°C se va reduciendo, estabilizando cada vez más la proteína.

Para ver mejor que el COSANE estabiliza a la BSA de su desnaturalización térmica se hacen dos experimentos diferentes. En el primero se monitoriza a 222 nm el dicroísmo circular en el rango de temperaturas de 25 a 100°C cogiendo una medida cada 0.2°C y a una velocidad de 1°C/min, para la BSA y para los nanohíbridos BSA-Na[COSANE] 1:10, 1:50 y 1:100 (**Figura 3. 18 a**). Y en el segundo se hace el mismo experimento de monitorizar a 222 nm en el rango de temperaturas de 25 a 100°C en las mismas condiciones, pero una vez llega a los 100°C (primera curva de desnaturalización) se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente y al cabo de 30 min se vuelve a subir la temperatura hasta 100°C (segunda curva de desnaturalización) para la BSA (**Figura 3. 18 b**) y para BSA-Na[COSANE] 1:100 (**Figura 3. 18 c**).

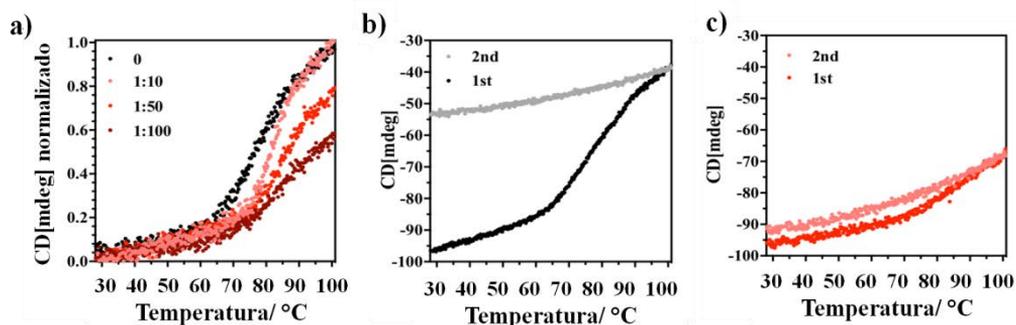


Figura 3. 18. Monitorización a 222 nm del dicroísmo circular en el rango de temperaturas de 25 a 100°C de a) BSA y nanohíbridos BSA-Na[COSANE] 1:10, 1:50 y 1:100; b) BSA primera y segunda curva de desnaturalización; y c) nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:100 primera y segunda curva de desnaturalización. Cada punto se recoge cada 0.2°C a una velocidad de 1°C/min, y el tiempo entre la primera y la segunda curva de desnaturalización es de 30 min.

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

Como se puede observar en la **Figura 3. 18 a** la curva de desnaturalización de la BSA (en negro) muestra un valor de T_m de $73 \pm 1^\circ\text{C}$; mientras que para los nanohíbridos BSA-Na[COSANE] 1:10, 1:50 y 1:100 el valor de T_m aumenta a 78 ± 0.6 , 83 ± 1 y $92 \pm 3^\circ\text{C}$ respectivamente, estabilizando cada vez más la BSA y retrasando su desnaturalización.

Cuando se desnaturaliza una proteína a elevada temperatura y se enfría su conformación puede volver parcial o totalmente a su estado nativo. Por ese motivo se hizo un segundo experimento (**Figura 3. 18 b c**) donde una vez enfriada la muestra durante 30 minutos, se volvió a hacer una segunda curva de desnaturalización en las mismas condiciones que la primera. En el caso de la BSA (**Figura 3. 18 b**) se puede observar una primera curva de desnaturalización (en negro) y una segunda curva (en gris), indicando que una vez desnaturalizada a 100°C y enfriada durante 30 min no es capaz de recuperar su estado nativo, perdiendo irreversiblemente su estructura secundaria. En cambio, el nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:100 (**Figura 3. 18 c**) muestra una segunda curva de desnaturalización muy similar a la primera, indicando que la capa de COSANE protege a la BSA térmicamente de su desnaturalización y hace que sea reversible la recuperación casi completa de su estructura secundaria volviendo a su estado nativo.

3.4.2. Agente protector a la desnaturalización química.

Esta parte del trabajo se ha realizado en colaboración con el profesor Salvador Ventura y su colaborador Jordi Pujols de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Para saber si el COSANE puede proteger a la BSA de su desnaturalización química, se utiliza la urea como agente desnaturalizante. Para ello, se deja incubando diferentes cantidades de urea (de 0 a 9 M) durante 24 horas con BSA y BSA-Na[COSANE] 1:100 y se monitoriza a 222 nm su dicroísmo circular (**Figura 3. 19**).

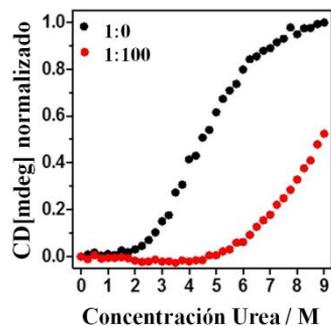


Figura 3. 19. Desnaturalización química por urea de la BSA (en negro) y del nanohíbrido 1:100 (en rojo) a pH 7 y 25°C , monitorizando la señal de CD a 222 nm.

-----Interacción entre la BSA y los metalacboranos-----

Como se puede observar en la **Figura 3. 19** en negro, la BSA presenta una curva de desnaturalización completa en todo el rango de concentraciones de urea, llegando a la mitad de su desnaturalización a 4.5 M. Mientras que el nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:100 (**Figura 3. 19** en rojo), no presenta una curva de desnaturalización completa protegiendo a la BSA frente a la desnaturalización química con urea, quedando el ~50% de la proteína en estado nativo a 9 M de urea.

3.5. Conclusiones.

En este apartado se resumirán los resultados más relevantes obtenidos en cada uno de los objetivos propuestos:

Objetivo 1: Interacción entre la BSA y los metalacboranos.

- ✓ Se ha podido comprobar que el Na[COSANE] interacciona fuertemente con la BSA en el rango de concentraciones en que el Na[COSANE] forma las vesículas (hasta 25 mM), destruyendo las vesículas para enlazarse por puentes de hidrógeno y de di-hidrógeno con los grupos amino de los aminoácidos histidina, lisina y arginina superficiales de la BSA, y así envolverla formando más de una capa.
- ✓ Se ha estudiado por DLS la capacidad que tienen los clústeres de boro Na[COSANE], Na[Cl₄-COSANE], Na[Cl₆-COSANE] y Na₂[B₁₂H₁₂] para formar puentes de hidrógeno y di-hidrógeno con la BSA en agua y se han comparado con el tampón fosfato. El Na₂[B₁₂H₁₂] se comporta como el tampón fosfato formando una única capa alrededor de la BSA, mientras que los metalacboranos además de interactuar con la superficie de la BSA tienen una mayor o menor capacidad de autoensamblarse entre ellos formando más de una capa dependiendo del número de grupos B-H disponibles en su estructura.
- ✓ La capacidad de autoensamblaje del Na[COSANE] para formar más de una capa alrededor de la BSA se ve reducida cuando en vez de agua Milli-Q se utiliza tampón fosfato, aumentando el tamaño de la BSA de 3 a 6 nm y disminuyendo el diámetro hidrodinámico del nanohíbrido BSA-Na[COSANE] de 15 a 8.5 nm.

-----Interacción entre la BSA y los metalacarboranos-----

- ✓ Se ha estimado el número de capas y de moléculas de COSANE alrededor de la BSA, cómo están distribuidas y el grado de recubrimiento mediante modelos de cubrimiento de superficies a partir de los valores de tamaño obtenidos por DLS, estando la primera capa formada por 100 moléculas de COSANE con un grado de recubrimiento del 98%, las capas posteriores son cada vez más difusas con grados de recubrimiento del 73 y del 57%. La distribución de las moléculas de COSANE sigue el orden vertical-horizontal-vertical.
- ✓ Se ha comprobado por TEM que los valores de diámetro hidrodinámico obtenidos por DLS son correctos, ya que coinciden en ambas técnicas. Y además, también se ha comprobado por RMN que el Na[COSANE] y la BSA presentan una fuerte interacción cuando forman la primera capa.
- ✓ Se ha comprobado por dicroísmo circular que la estructura secundaria de la BSA (una vez forma la primera capa con las moléculas de COSANE) sigue conservando la estructura nativa de α -hélice. En cambio, la propiedad intrínseca de fluorescencia de la BSA se ve reducida en gran medida con muy pocas moléculas de Na[COSANE], ya que éste produce un *quenching* a su fluorescencia.
- ✓ Se ha comprobado mediante la técnica de ξ -potencial que la formación de la primera capa completa tiene lugar a las 100 moléculas de COSANE por BSA, ya que además de estabilizar la proteína se ha obtenido un valor de ξ -potencial de -60 mV, igual que el Na[COSANE] libre, durante el rango de pH de 4 a 11. Se ha confirmado el resultado del ξ -potencial cuando a pH < 4 el nanohíbrido ha precipitado y en el sobrenadante no se ha encontrado ninguna molécula de Na[COSANE] ni de BSA.
- ✓ Se ha conseguido aislar el nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:100 y se ha caracterizado por IR, SEM-EDX y análisis elemental. Se ha confirmado que la primera capa está formada aproximadamente por 100 moléculas de COSANE con una interacción fuerte; mientras que las moléculas de COSANE que forman la segunda capa tienen una interacción más débil.

Objetivo 2: Aplicación como agente protector a la desnaturalización.

- ✓ Se ha comprobado por DLS que el Na[COSANE] protege a la BSA frente a su desnaturalización térmica cuando cubre completamente la superficie de la proteína (nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:100 y 1:1000), ya que no se observa ningún cambio de tamaño en el rango de temperaturas estudiadas (de 25 a 90°C), ni a distintos tiempos de incubación a 90°C. En cambio, la BSA y el nanohíbrido 1:10 sí que aumentan de tamaño a medida que aumenta la temperatura y el tiempo de incubación (forman agregados de gran dimensión) llegando a su desnaturalización.
- ✓ Se ha comprobado por CD que a medida que aumenta la temperatura (de 25 a 90°C), el nanohíbrido BSA-Na[COSANE] minimiza la pérdida de la estructura secundaria de la proteína estabilizando la BSA frente a su desnaturalización. A medida que hay más moléculas de Na[COSANE] formando parte de la primera capa (10, 50 y 100), la pérdida de la estructura secundaria es menor.
- ✓ A partir de la monitorización del diámetro circular a 222 nm en el rango de temperaturas de 25 a 100°C, se ha podido comprobar que la BSA tiene un valor de T_m de 73°C con una desnaturalización térmica irreversible perdiendo completamente su estructura secundaria una vez es enfriada a 25°C durante 30 min. En cambio, la BSA-Na[COSANE] 1:100 protege a la BSA de su desnaturalización ya que presenta una T_m de 92°C y una vez es enfriada a 25°C recupera casi completamente su estructura secundaria de forma reversible.
- ✓ Se ha comprobado que el Na[COSANE] protege químicamente a la BSA de su desnaturalización con urea, ya que para desnaturalizar el 50% de la proteína es necesario 4.5 M de urea, mientras que si está protegida con COSANE la concentración necesaria es el doble, 9 M.

3.6. Referencias.

1. M. Tarrés, E. Canetta, E. Paul, J. Forbes, K. Azzouni, C. Vinas, F. Teixidor and A. J. Harwood, *Sci. Rep.*, 2015, **5**, 7804.

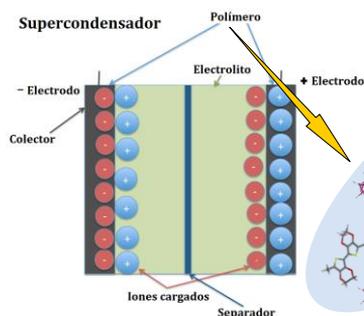
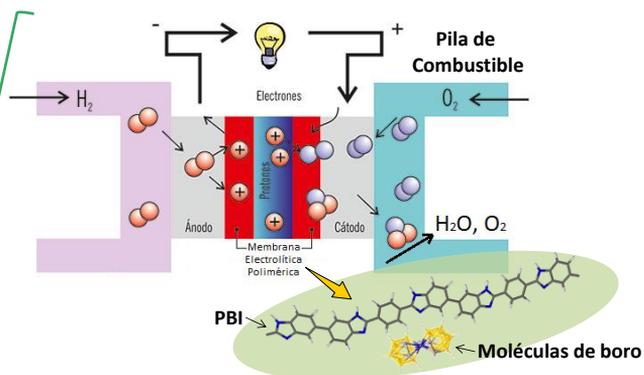
---Interacción entre la BSA y los metalacarboranos---

2. M. Tarrés, E. Canetta, C. Vinas, F. Teixidor and A. J. Harwood, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 3370-3372.
3. T. García-Mendiola, V. Bayon-Pizarro, A. Zaulet, I. Fuentes, F. Pariente, F. Teixidor, C. Vinas and E. Lorenzo, *Chem. Sci.*, 2016, **7**, 5786-5797.
4. I. Fuentes, T. García-Mendiola, S. Sato, M. Pita, H. Nakamura, E. Lorenzo, F. Teixidor, F. Marques and C. Viñas, *Chem. Eur. J.*, 2018, **24**, 17239-17254.
5. M. K. Campbell, S. O. Farrell, A. C. Reyes, J. H. C. Gasco, J. B. Talavera, A. C. Bonilla and G. R. Muñoz, *Bioquímica*, Thomson, 2004.
6. P. Cígler, M. Kožíšek, P. Řezáčová, J. Brynda, Z. Otwinowski, J. Pokorná, J. Plešek, B. Grüner, L. Dolečková-Marešová and M. Máša, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2005, **102**, 15394-15399.
7. M. Kožíšek, P. Cígler, M. Lepšík, J. i. Fanfrlík, P. n. Řezáčová, J. i. Brynda, J. Pokorná, J. r. Plešek, B. r. Grüner and K. r. Grantz Šašková, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 4839-4843.
8. P. n. Řezáčová, J. Pokorná, J. i. Brynda, M. Kožíšek, P. Cígler, M. Lepšík, J. i. Fanfrlík, J. Rezac, K. r. Grantz Šašková and I. Siegllová, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 7132-7141.
9. J. Fanfrlík, M. Lepšík, D. Horinek, Z. Havlas and P. Hobza, *Chem. Phys. Chem.*, 2006, **7**, 1100-1105.
10. J. Fanfrlík, D. Hnyk, M. Lepšík and P. Hobza, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, **9**, 2085-2093.
11. K. Kowalski, T. Goszczyński, Z. J. Leśnikowski and J. Boratyński, *ChemBioChem*, 2015, **16**, 424-431.
12. J. Rak, B. Dejlová, H. Lampová, R. Kaplánek, P. Matějček, P. Cígler and V. Král, *Mol. Pharmaceutics*, 2013, **10**, 1751-1759.
13. T. M. Goszczyński, K. Fink, K. Kowalski, Z. J. Leśnikowski and J. Boratyński, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 9800.
14. S. W. Buckner, P. A. Jelliss, A. Nukic, E. R. Zalocusky and J. Schumacher, *Bioelectrochemistry*, 2010, **78**, 130-134.
15. R. Ruiz-Rosas, I. Fuentes, C. Viñas, F. Teixidor, E. Morallón and D. Cazorla-Amorós, *Sustainable Energy Fuels*, 2018, **2**, 345-352.
16. P. Bauduin, S. Prevost, P. Farràs, F. Teixidor, O. Diat and T. Zemb, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 5298-5300.
17. A.-I. Stoica, C. Kleber, C. Viñas and F. Teixidor, *Electrochim. Acta*, 2013, **113**, 94-98.
18. A.-I. Stoica, C. Viñas and F. Teixidor, *Chem. Commun.*, 2008, 6492-6494.
19. A.-I. Stoica, C. Viñas and F. Teixidor, *Chem. Commun.*, 2009, 4988-4990.
20. <https://www.rcsb.org/structure/4F5S>].

CAPÍTULO 4

POLÍMEROS DOPADOS CON METALACARBORANOS Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES PARA SU APLICACIÓN EN PILAS DE COMBUSTIBLE, BATERÍAS Y SUPERCONDENSADORES.

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DEL PBI@M[COSANE] PARA SU USO EN PILAS DE COMBUSTIBLE Y BATERÍAS



ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DEL PEDOT:M[COSANE] Y PEDOT:Cs[Cl_x-COSANE] PARA SU USO EN SUPERCONDENSADORES

RESUMEN DEL CAPÍTULO 4^{1, 2}

Este capítulo se basa principalmente en el estudio de las propiedades de polímeros dopados con metalacboranos para su uso en baterías, pilas de combustible y supercondensadores. Para las pilas de combustible y las baterías se utiliza el polímero PBI dopado con M[COSANE] ($M = Na^+, Li^+ \text{ y } H^+$) y se estudian sus propiedades fisicoquímicas, térmicas y conductividad iónica. Para los supercondensadores se utiliza el polímero PEDOT dopado con M[COSANE] ($M = Cs^+, Na^+, Li^+ \text{ y } H^+$) y $Cs[Cl_x\text{-COSANE}]$ ($x = 2, 4 \text{ y } 6$) y se estudian sus propiedades electroquímicas (capacidad específica y límite de resistencia a la sobreoxidación), SEM-EDX, conductividad eléctrica y ATG.

Índice del Capítulo

| | pag. |
|---|------|
| 4. POLÍMEROS DOPADOS CON METALACARBORANOS Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES PARA SU APLICACIÓN EN PILAS DE COMBUSTIBLE, BATERÍAS Y SUPERCONDENSADORES. | 105 |
| 4.1. Estado actual. | 105 |
| 4.1.1. Polímeros. | 105 |
| 4.1.2. Polímeros utilizados en pilas de combustible. | 106 |
| 4.1.3. Polímeros utilizados en baterías. | 108 |
| 4.1.4. Polímeros utilizados en supercondensadores. | 110 |
| 4.1.5. Polímeros dopados con metalacarboranos. | 112 |
| 4.2. Objetivos. | 114 |
| 4.3. Propiedades del PBI dopado con M[COSANE] y con M'[TPB] para su uso en pilas de combustible y baterías. | 114 |
| 4.3.1. Conductividad iónica del M[COSANE] y del M'[TPB]. | 115 |
| 4.3.2. PBI@M[COSANE] y PBI@M'[TPB], propiedades fisicoquímicas y térmicas. | 117 |
| 4.3.3. PBI@M[COSANE] y PBI@M'[TPB], conductividad iónica. | 119 |
| 4.4. Propiedades del PEDOT dopado con M[COSANE] y con Cs[Cl _x -COSANE] para su uso en supercondensadores. | 121 |
| 4.4.1. Síntesis del Cl _x -COSANE (x = 2, 4 y 6) | 122 |
| 4.4.2. Electropolimerización del PEDOT:M[COSANE]. | 123 |
| 4.4.3. Propiedades electroquímicas del PEDOT:M[COSANE]. | 125 |
| 4.4.4. SEM-EDX, cond. eléctrica y ATG del PEDOT:M[COSANE]. | 127 |
| 4.4.5. Electropolimerización del PEDOT:Cs[Cl _x -COSANE]. | 129 |
| 4.4.6. Propiedades electroquímicas del PEDOT:Cs[Cl _x -COSANE]. | 131 |
| 4.4.7. SEM-EDX, cond. eléctrica y ATG del PEDOT:Cs[Cl _x -COSANE] | 134 |
| 4.5. Conclusiones. | 136 |
| 4.6. Referencias. | 139 |

4. POLÍMEROS DOPADOS CON METALACBORANOS Y ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES PARA SU APLICACIÓN EN PILAS DE COMBUSTIBLE, BATERÍAS Y SUPERCONDENSADORES.

4.1. Estado actual.

Los clústeres de boro utilizados en las aplicaciones de pilas de combustible, baterías y supercondensadores son muy pocos, únicamente las sales de boranos y carboranos han sido utilizadas en baterías.³⁻⁶ Por esta razón, se ha querido estudiar en esta tesis si los metalacboranos pueden utilizarse en algunas de las aplicaciones mencionadas.

Para ello, se utilizaran diferentes sales y derivados de metalacboranos como agentes dopantes de polímeros, ya sean polímeros utilizados en membranas poliméricas para pilas de combustible y baterías o polímeros conductores orgánicos para supercondensadores (Capítulo 4), y aditivos de carbones activados para supercondensadores (Capítulo 5).

4.1.1. Polímeros.

Un polímero es una macromolécula formada por la unión mediante enlaces covalentes de una o más unidades simples llamada monómero, formando largas cadenas que se unen entre sí por fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas.⁷

Hay una gran variedad de polímeros tanto naturales (almidón, ADN, seda, celulosa, caucho) como sintéticos (teflón, nailon, poliestireno, polietileno). Dependiendo de si se utiliza un monómero o más de un monómero para formar el polímero se obtiene un homopolímero o un copolímero. Distintas conformaciones de los monómeros hacen que el copolímero esté formado con una distribución alternada, en bloque, al azar o ramificado.⁷

Los polímeros sintéticos pueden ser sintetizados o polimerizados química o electroquímicamente, por adición o condensación o aplicando una cierta corriente, un cierto potencial o luz. La gran variedad de polímeros que existe hace que se puedan utilizar en muchas aplicaciones, ya que las propiedades que presentan abarcan desde las propiedades mecánicas y eléctricas hasta las ópticas y las térmicas.^{7, 8}

4.1.2. Polímeros utilizados en pilas de combustible.

Una pila de combustible es un dispositivo electroquímico que está formado principalmente por dos electrodos, un ánodo y un cátodo, separados por el electrolito o por una membrana polimérica electrolítica (ver **Figura 4. 1**), donde por el ánodo fluye una corriente de H_2 y por el cátodo una corriente de O_2 . En el ánodo tiene lugar la semireacción del H_2 donde se generan 2 electrones y 2 H^+ , los electrones pasaran del ánodo al cátodo produciendo energía eléctrica y los H^+ pasaran por la membrana polimérica o por el electrolito hasta llegar al cátodo donde reaccionará con el O^{2-} para producir moléculas de agua y liberar calor.⁹

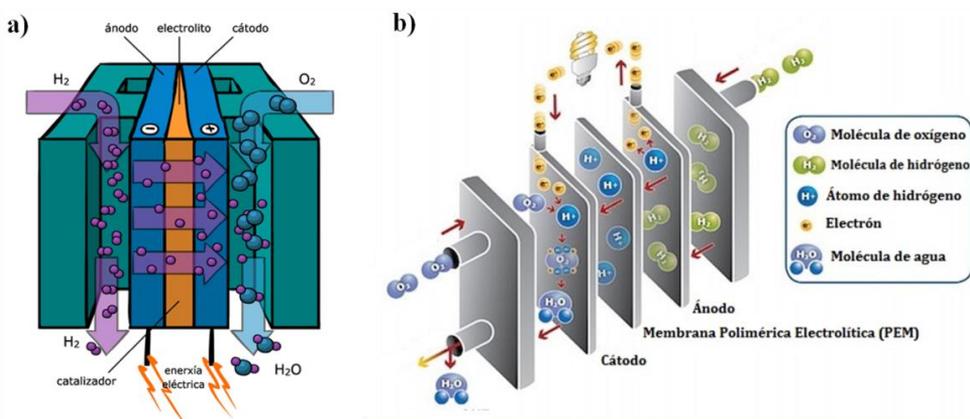


Figura 4. 1. Esquemas de pilas de combustible utilizando a) electrolito y b) membrana polimérica electrolítica como medio de separación entre el ánodo y el cátodo.

Una de las partes importantes en una pila de combustibles es la membrana polimérica electrolítica (PEM) que tiene como función el transporte de los H^+ del ánodo hacia el cátodo, separar los gases de reacción y ser aislante para no dejar pasar los electrones a través de la membrana. Por tanto, las membranas poliméricas deben cumplir los siguientes requisitos: tener una alta conductividad de protones, una baja conductividad eléctrica, tener buenas propiedades mecánicas, tener un buen control de humedad y una buena estabilidad química, electroquímica y térmica.⁹

En 1970 DuPont desarrolló una membrana que hoy en día se sigue utilizando y que es un estándar para las pilas de combustible basadas en membranas poliméricas, el nafion, consiguiendo un aumento del tiempo de

vida media y de conductividad iónica de algunos órdenes de magnitud respecto a las membranas que habían en esa época. Aun teniendo una conductividad iónica muy alta, el nafion presenta algunos inconvenientes (no se puede utilizar a alta temperatura y es un polímero muy caro), y por este motivo a lo largo del tiempo se ha estado estudiando otras membranas poliméricas como las que se observan en la **Figura 4. 2**.¹⁰

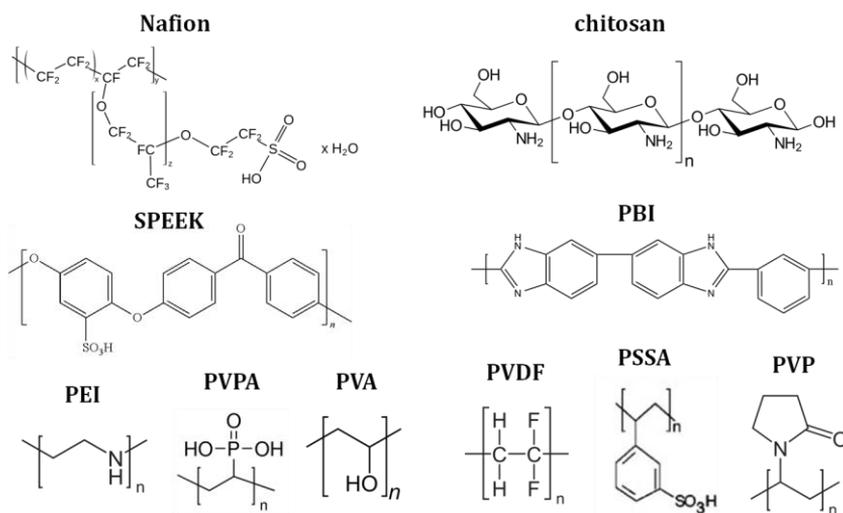


Figura 4. 2. Algunos polímeros utilizados en pilas de combustible como membranas poliméricas. SPEEK (poli(éter éter cetona sulfonado)), PBI (polibenzimidazol), PEI (polietilenimina), PVPA (ácido polivinilfosfónico), PVA (alcohol de polivinilo), PVDF (polifluoruro de vinilideno), PSSA (ácido poliestireno sulfónico) y PVP (polivinilpirrolidona).

Para llegar a conseguir las mismas o similares prestaciones que el nafion o incluso mejorar los inconvenientes del nafion, se ha llegado a formar membranas híbridas orgánicas-inorgánicas introduciendo dentro de las matrices poliméricas aditivos como H_3PO_4 , grafeno oxidado, nanotubos de carbono, nanopartículas de SiO_2 , zeolitas, MOFs, etc; se han modificado las membranas con polímeros conductores como la polianilina, se ha probado de copolimerizar polímeros ya utilizados en pilas de combustibles (PVDF-g-PSSA, SPEEK-PBI, entre otros); pero aun así todavía falta investigar más para poder remplazar el nafion.^{9, 11} En la **Tabla 4. 1** se pueden observar algunos valores de conductividad iónica de diferentes polímeros dopados con MOFs en ausencia o presencia de aditivos, observando que en todos los casos al añadir un dopante o un aditivo se consigue mejorar los valores de conductividad iónica, pero aun así el nafion sigue siendo mejor.

-----Polímeros dopados con metalacarboranos-----

Tabla 4. 1. Valores de conductividad iónica (S/cm) de algunos polímeros dopados con MOFs en ausencia o presencia de aditivos, con su correspondiente temperatura y humedad relativa.¹¹

| Polímero | MOF | Aditivo | Cond. S/cm | Temp. °C | RH* % |
|----------|-----------------|--------------------------------|----------------------|----------|---------|
| Nafion | MIL-101 (12wt%) | Ácido fólico | 0.228 | 100 | 100 |
| | ZIF-8 (1wt%) | GO* | 0.280 | 120 | 100 |
| SPEEK | MIL-101 (9 wt%) | Ácido fosfotúngstico | 0.272 | 65 | 100 |
| | ZIF-8 (2.5 wt%) | CNTs* | 0.05 | 120 | 30 |
| | ZIF-8 (2.5 wt%) | - | 0.025 | 120 | 30 |
| PVA | ZIF-8 (5 wt%) | PAM* | 0.134 | 80 | 100 |
| PVPA | ZIF-8 (25 wt%) | - | 3.2×10^{-3} | 140 | anhidro |
| PBI | ZIF-8 (5 wt%) | H ₃ PO ₄ | 3.1×10^{-3} | 120 | anhidro |
| | ZIF-67 (5 wt%) | H ₃ PO ₄ | 0.042 | 120 | anhidro |
| ADN | ZIF-8 (20 wt%) | - | 3.4×10^{-4} | 25 | 97 |

*GO = óxido de grafeno; CNTs = nanotubos de carbono; PAM = poliacrilamida; RH = humedad relativa

4.1.3. Polímeros utilizados en baterías.

Una batería es un dispositivo electroquímico formado principalmente por dos electrodos, un cátodo y un ánodo, separados por un electrolito y una membrana porosa (ver **Figura 4. 3**). Dependiendo del tipo de electrodo y de electrolito las baterías se pueden clasificar en baterías orgánicas, basadas en metales, híbridas metal-orgánica o de ion litio, siendo las más utilizadas y estudiadas las baterías de ion litio, ya que presentan una alta densidad de energía, alta capacidad específica y alta eficiencia.^{12, 13}

La **Figura 4. 3** muestra una batería de ion litio clásica formada por grafeno en el ánodo y por CoO₂ en el cátodo. Durante el proceso de descarga tanto los iones Li⁺ como los electrones van del ánodo al cátodo; mientras que en el proceso de carga van del cátodo al ánodo. También se ha utilizado como ánodo: carbones, nitruros, óxidos y aleaciones de metales de transición y como cátodo: óxidos y fosfatos de metales de transición.¹⁴

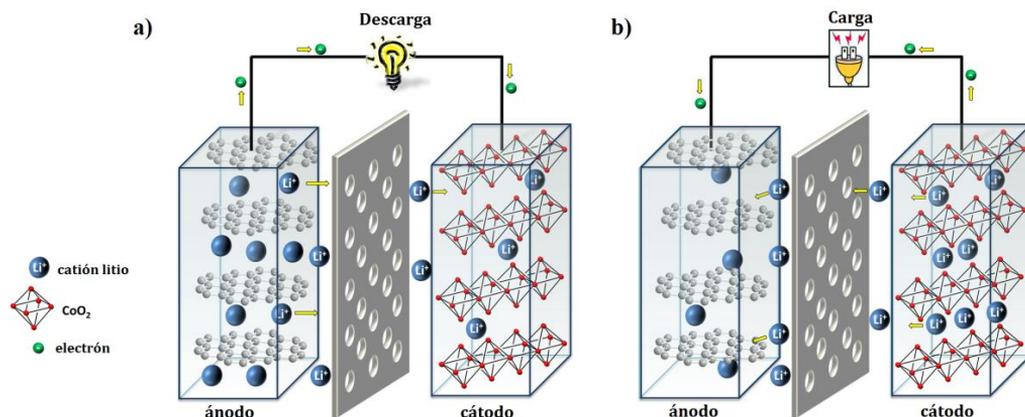


Figura 4. 3. Esquema de una batería de ion litio utilizando como ánodo grafeno y como cátodo CoO₂ en proceso de a) descarga y b) carga.

El electrolito puede ser un líquido orgánico o inorgánico, un líquido iónico, un polímero, un sólido inorgánico o una mezcla de todos ellos (ver **Tabla 4. 2**), pero tiene que tener como propiedades una buena conductividad iónica, baja conductividad eléctrica, buena estabilidad química, electroquímica y térmica y baja toxicidad; ya que su principal función es el transporte del ion Li⁺ entre los electrodos. En la **Tabla 4. 2** se pueden observar valores de conductividad que van desde 10 a 0.03 mS/cm.¹⁵

Tabla 4. 2. Valores de conductividad iónica (mS/cm) a temperatura ambiente de distintos tipos de electrolitos utilizados en baterías de ion litio.¹⁵

| Electrolito | Ejemplo | Cond.* mS/cm |
|--|---|--------------|
| Líquido orgánico | 1 M LiPF ₆ en EC:DMC [†] | 10 |
| Líquido iónico | 1 M LiBF ₄ en EMI-BF ₄ | 8.0 |
| Polímero | LiTFSI-P(EO/MEEGE) | 0.10 |
| Sólido inorgánico | Li _{4-x} Ge _{1-x} P _x S ₄ (x = 0.75) | 2.2 |
| Líquido inorgánico | LiAlCl ₄ + SO ₂ | 70 |
| Líquido orgánico + polímero | LiClO ₄ + EC + PC + PVDF | 3.0 |
| Líquido iónico + polímero | 1 M LiTFSI + P ₁₃ TFSI + PVDF-HFP | 0.18 |
| Líquido iónico + polímero + líquido orgánico | LiTFSI-Py ₂₄ TFSI + PVDF-HFP + EC/PC | 0.81 |
| Sólido inorgánico + polímero | LiClO ₄ -TEC-19 + 95 (0.6Li ₂ S + 0.4Li ₂ S) + 5Li ₄ SiO ₄ | 0.03 |

* a temperatura ambiente, [†]EC:DMC = carbonato de etileno:dimetil carbonato

---Polímeros dopados con metalacarboranos---

El uso de un polímero como electrolito sólido hace que no sea necesaria la membrana porosa para separar los electrodos y además cuando la batería cambia el proceso de descarga a carga o viceversa (hay un pequeño cambio de volumen al intercalarse el Li^+ en el cátodo o en el ánodo), el polímero conserva el contacto de la interfase electrodo/electrolito.¹⁵

Un polímero utilizado en baterías es el PEO (óxido de polietileno) ya que puede contener sales de litio como LiPF_6 o LiAsF_6 , no es tóxico, tiene buena estabilidad química, pero tiene una baja conductividad iónica ($< 10^{-5}$ S/cm a temperatura ambiente). Se ha intentado mejorar su conductividad iónica introduciendo óxidos de partículas como Al_2O_3 , TiO_2 , SiO_2 o ZrO_2 , pero aun así no llega a tener una buena conductividad como otros electrolitos.^{15, 16}

Otro polímero utilizado como electrolito sólido es el copolímero PVDF-HFP (polifluoruro de vinilideno - hexafluoruro de propileno) cuyo valor de conductividad iónica es de 1.59 mS/cm, mucho mejor que el polímero PEO. Se ha intentado mejorar el valor de conductividad añadiendo aditivos como SiO_2 (3.78 mS/cm), SiO_2 , NH_4BF_4 y dimetilacetamida (7.20 mS/cm), CNTs (4.88 mS/cm), CaTiO_3 (3.56 mS/cm) y $\text{Li}_{1.5}\text{Al}_{0.5}\text{Ti}_{1.5}(\text{PO}_4)_3$ (7.41 mS/cm), llegando a valores de conductividad de electrolitos líquidos.¹⁶

También se han utilizado otros polímeros como electrolitos sólidos PAN (poliacrilonitrilo) y PMMA (polimetilmetacrilato) entre otros, donde se han añadido aditivos o se han formado copolímeros para mejorar su conductividad iónica.^{16, 17} Pero hoy en día el alto precio para obtener el litio y las pocas reservas que hay en el mundo hace que una parte de los estudios se enfoque en las baterías basadas en ion Na^+ , siendo mucho más baratas y teniendo una química de intercalación muy similar a la del Li^+ .¹⁸

4.1.4. Polímeros utilizados en supercondensadores.

Un supercondensador es un dispositivo electroquímico formado por dos electrodos separados por una membrana porosa y un electrolito (**Figura 4. 4**). El componente más importante es el material del electrodo que tiene que tener una gran área superficial y una gran porosidad, dependiendo del tipo de material se pueden distinguir tres tipos de supercondensadores: el condensador electroquímico de doble capa (el material del electrodo es un

material carbonoso y el mecanismo para almacenar carga tiene lugar mediante la formación de la doble capa eléctrica, proceso capacitivo, ver **Figura 4. 4. a)**, el pseudocondensador (el material del electrodo es un polímero conductor o un óxido de un metal de transición, y el mecanismo para almacenar carga tiene lugar mediante reacciones redox, proceso farádico, ver **Figura 4. 4. b)** y el condensador híbrido (es la combinación de los dos tipos de supercondensadores con un proceso capacitivo y farádico para almacenar carga).¹⁹

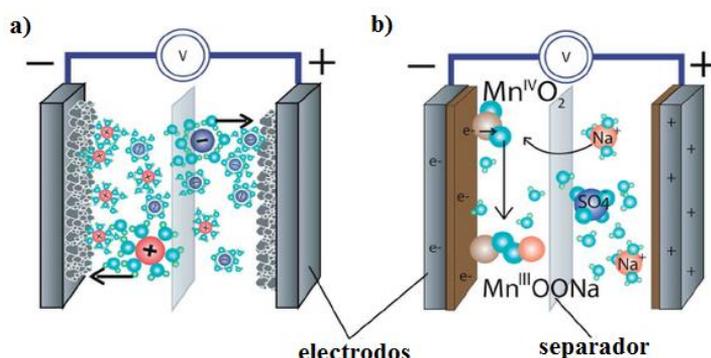


Figura 4. 4. Esquema de a) supercondensador de doble capa eléctrica y b) pseudocondensador.

Algunos de los materiales carbonosos utilizados en supercondensadores son el carbón activado, el aerogel de carbono, el óxido de grafeno reducido, CNTs, entre otros, siendo los más utilizados los carbones activados debido a su gran área superficial y alta conductividad eléctrica (se explicará con más detalle en el Capítulo 5).¹⁹

Los polímeros conductores y óxidos de metales de transición utilizados en pseudocondensadores son PVA, PANI, PPy, PTh, PEDOT, RuO₂, IrO₂, Fe₃O₄, MnO₂, NiO, Co₃O₄, entre otros. Todos los materiales utilizados como electrodos tienen que tener una alta capacidad específica para almacenar carga, una buena conductividad eléctrica y una buena estabilidad química, electroquímica y térmica. Para ello, muchas veces se recurre al dopaje o a añadir aditivos para poder mejorar sus propiedades, se han dopado materiales carbonosos con polímeros conductores y con óxidos de metales de transición, se han dopado polímeros conductores con óxidos de metales de transición, con especies electroactivas, con MOFs y con fósforo negro.¹⁹

-----Polímeros dopados con metalacarboranos-----

En la **Tabla 4. 3** se pueden observar algunos valores de capacidad específica de distintos materiales de electrodo basados en polímeros conductores en ausencia y en presencia de dopantes o aditivos, observando en todos los casos una mejora en la capacidad específica.

Tabla 4. 3. Valores de capacidad específica (F/g) de distintos materiales de electrodo utilizados en supercondensadores con sus respectivos electrolitos.¹⁹⁻²²

| Material del electrodo | Capacidad específica F/g | Electrolito |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| PEDOT | 72 | 1 M H ₂ SO ₄ |
| PEDOT-PPy | 290 | 1 M KCl |
| PEDOT-CNTs | 120 | 1 M H ₂ SO ₄ |
| PEDOT-Fc | 363 | organogel |
| PPy-Fe ₂ O ₃ | 420 | 1 M LiClO ₄ |
| PPy-CNTs | 320 | 1 M H ₂ SO ₄ |
| PPy-grafeno | 165 | 1 M NaCl |
| PANI-Si | 409 | 0.5 M H ₂ SO ₄ |
| PANI-grafeno | 763 | 1 M H ₂ SO ₄ |

4.1.5. Polímeros dopados con metalacarboranos.

En el año 2000 Teixidor y *col.* utilizaron el COSANE como agente dopante aniónico para electropolimerizar el pirrol. Comprobaron por XPS que cada molécula de COSANE interaccionaba con cuatro unidades de pirrol y que además, el material polimérico formado mostraba un límite de resistencia a la sobreoxidación superior a otros agentes dopantes (DBS, PF₆⁻).²³⁻²⁵

Dos años más tarde, el mismo grupo enlazó covalentemente una unidad de pirrol con una unidad de COSANE mediante el COSANE-DIOXANATO. De esta forma obtuvo un copolímero formado por unidades de pirrol y pirrol enlazado al COSANE y un material polimérico formado por unidades de pirrol enlazado al COSANE. Sólo en el caso del copolímero observaron que al sobreoxidarlo no aparecía ningún pico de degradación, dando lugar a un material aún más resistente que el PPy con COSANE libre.²⁶

El polímero conductor más estudiado utilizando el metalacarborano como agente dopante es el PPy. Se han hecho estudios para calcular el límite de resistencia a la sobreoxidación,²⁷ se ha utilizado como intercambiador de

caciones,²⁸ se ha estudiado la influencia de utilizar metalacarboranos con diferente carga, sustituyente, forma y composición,^{27, 29, 30} se ha estudiado la capacidad de recuperación después de sobreoxidarse el polímero³¹ y se ha utilizado como capa conductora en electrodos selectivos de iones.^{32, 33}

Además del PPy también se han utilizado como polímeros conductores el PEDOT y el PTh, aunque han sido estudios preliminares. En el caso del PEDOT se ha usado como agente dopante aniónico el COSANE y se han estudiado sus propiedades electroquímicas y electrocrómicas en su estado oxidado y reducido.³⁴ Y en el caso del PTh se ha electropolimerizado utilizando el COSANE enlazado a dos unidades de tiofeno directamente por el carbono y se han estudiado sus propiedades electroquímicas y de conductividad por AFM, obteniendo un valor de conductividad eléctrica de 1 mS/cm.³⁵

Aparte de los polímeros conductores, el COSANE también ha sido utilizado en otros tipos de polímeros. En el año 2009 Matejicek y *col.* estudiaron la interacción entre el COSANE y el polímero PEO, observando la formación de un complejo insoluble en agua (utilizaron las sales de Li, Na, K, Cs, Mg y Ca del COSANE). También observaron por UV-Visible que por cada molécula de COSANE había 10 monómeros de PEO y supieron mediante cálculos teóricos que el tipo de interacción era mediante puentes de hidrógeno y di-hidrógeno.³⁶ El mismo grupo también estudió la interacción entre el copolímero PEO-PMA y el COSANE, obteniendo como resultado unas nanopartículas de aproximadamente 100 nm formadas por un *core* de PEO-COSANE insoluble y un *shell* de PMA soluble en agua (el COSANE no interacciona con el PMA).³⁷

A partir de estos estudios el mismo grupo estudió la interacción entre el COSANE y el polímero PEOX (poli(etiloxazolina)), obteniendo un complejo totalmente soluble en agua; y la interacción del COSANE con el copolímero PEO-PEOX, obteniendo unas nanopartículas homogéneas solubles en agua, con el objeto de ser utilizadas en bioaplicaciones como *drug delivery*.³⁸ También estudió la influencia de utilizar distintas sales de COSANE (Na, Li y K) con el copolímero PEO-PEOX, observando un cambio de tamaño en las nanopartículas formadas y en su compartimentación.³⁹

4.2. Objetivos.

Los objetivos de este capítulo se basan principalmente en estudiar las propiedades de algunos polímeros utilizados en pilas de combustible y en baterías (membranas poliméricas) y en supercondensadores (electrodos) al estar dopados con metalacarboranos.

- Dopaje del polímero PBI con diferentes sales de COSANE (Na, Li y H) y diferentes sales de tetrafenilborato (TPB) (Na y Li), y estudio de sus propiedades fisicoquímicas, térmicas y de conductividad iónica para ser utilizado en pilas de combustible y baterías.
- Electropolimerización del polímero PEDOT utilizando como agente dopante aniónico diferentes sales de COSANE (Cs, Na, Li y H) y sus derivados halogenados ($\text{Cl}_x\text{-COSANE}$, $x = 2, 4$ y 6), y estudio de sus propiedades electroquímicas y fisicoquímicas para ser utilizado en supercondensadores.

4.3. Estudio de las propiedades del PBI dopado con $\text{M}[\text{COSANE}]$ ($\text{M} = \text{Na}^+, \text{Li}^+$ y H^+) y con $\text{M}'[\text{TPB}]$ ($\text{M}' = \text{Na}^+$ y Li^+) para su uso en pilas de combustibles y baterías.

El polímero elegido para este estudio es el PBI (**Figura 4. 5**), ya que es un polímero muy utilizado como membrana polimérica electrolítica en pilas de combustible, se ha medido su conductividad iónica utilizando diferentes dopantes y aditivos para mejorar sus propiedades exhibiendo una mayor conductividad cuando está dopado con H_3PO_4 .⁴⁰ Respecto a las baterías no es el polímero más utilizado porque al estar normalmente dopado con H_3PO_4 sólo se utiliza como intercambiador de H^+ y no de Li^+ ni de Na^+ , pero hace unos años se ha empezado a utilizar en baterías de vanadio.^{41, 42}

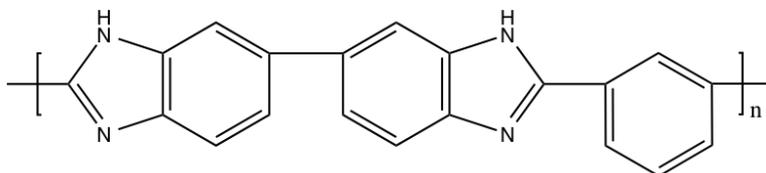


Figura 4. 5. Estructura química del monómero del polibenzimidazol.

Como se quieren estudiar las propiedades fisicoquímicas, térmicas y de conductividad iónica del PBI dopado con COSANE y con TPB para su uso en pilas de combustible y baterías de ion Li o de ion Na, se utilizan las sales de Na, Li y H para el COSANE y las sales de Na y Li para el TPB.

Se ha elegido el compuesto TPB para ser comparado con el COSANE ya que los dos tienen la misma carga y el mismo número de átomos (45). Pero tienen una forma diferente, el COSANE más alargada y el TPB más globular, y además el COSANE tiene la capacidad de formar puentes de hidrógeno y di-hidrógeno y el TPB no.

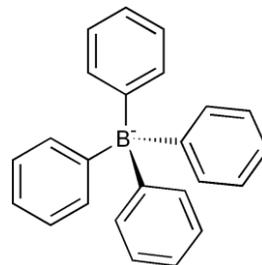


Figura 4. 6. Estructura del TPB.

Esta parte del trabajo se ha realizado en colaboración con el catedrático Vicente Compañ de la Universidad Politécnica de Valencia y con el profesor Andreu Andrio de la Universidad Jaume I en Castellón.

4.3.1. Estudio de la conductividad iónica del $M[\text{COSANE}]$ ($M = \text{Na}^+$, Li^+ y H^+) y del $M'[\text{TPB}]$ ($M' = \text{Na}^+$ y Li^+).

Antes de dopar al polímero PBI con las diferentes sales de COSANE y de TPB se hace un estudio de la conductividad iónica de los compuestos libres. Para ello, se preparan dos tipos de membranas, en seco y en húmedo (con una humedad relativa del 100%) a partir del polvo, y se mide la conductividad iónica mediante la espectroscopia de impedancia en el rango de temperaturas de 20 a 120°C.

A partir de los datos obtenidos por impedancia se puede obtener el valor de conductividad iónica de cada muestra a cada temperatura.¹ En la **Figura 4. 7** y en la **Tabla 4. 4** se pueden observar los valores de conductividad iónica de las muestras húmedas $\text{H}[\text{COSANE}]$, $\text{Na}[\text{COSANE}]$, $\text{Li}[\text{COSANE}]$, $\text{Li}[\text{TPB}]$ y $\text{Na}[\text{TPB}]$ a diferentes temperaturas, siendo las conductividades iónicas del COSANE superiores a las del TPB ($\sigma_{\text{H}[\text{COSANE}]} > \sigma_{\text{Na}[\text{COSANE}]} > \sigma_{\text{Li}[\text{COSANE}]} > \sigma_{\text{Li}[\text{TPB}]} > \sigma_{\text{Na}[\text{TPB}]}$). En el caso de las muestras de COSANE puede observarse un incremento lineal de la conductividad a medida que aumenta la temperatura; mientras que las muestras de TPB llegan a un máximo de conductividad sobre los 90-100°C y luego disminuye.

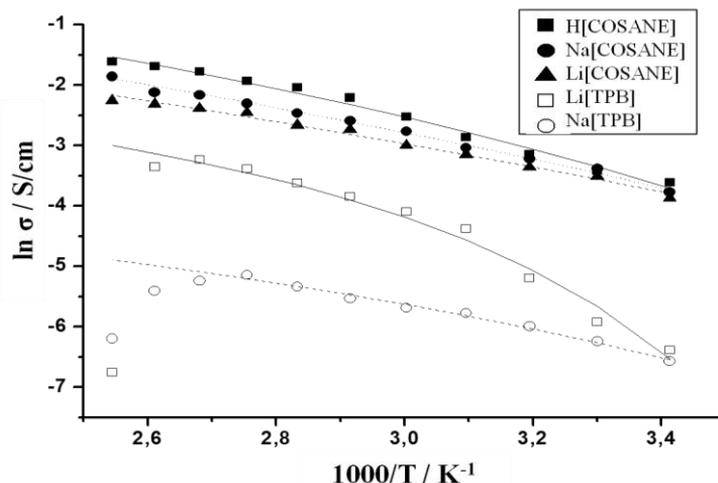


Figura 4. 7. Representación gráfica del ln de la conductividad iónica (S/cm) en función de la temperatura para las muestras húmedas H[COSANE] (■), Na[COSANE] (●), Li[COSANE] (▲), Li[TPB] (□) y Na[TPB] (○).

Si se comparan los valores de conductividad iónica obtenidos con valores de muestras utilizadas en pilas de combustible (sales,⁴³ el MOF ZIF-8 tiene un valor de conductividad a 94°C de 0.45 mS/cm⁴⁴) y baterías (Tabla 4. 2), se puede observar como el M[COSANE] y el M'[TPB] tienen valores de conductividad iónica aptos para ser utilizados como aditivos en polímeros. Además, como la conductividad iónica del Na[COSANE] es superior a la del Li[COSANE], podría ser interesante su uso en baterías de ion Na.

Tabla 4. 4. Valores de conductividad iónica (mS/cm) de las muestras húmedas H[COSANE], Na[COSANE], Li[COSANE], Li[TPB], Na[TPB] a diferentes temperaturas (de 20 a 120°C).

| Temp. °C | Conductividad iónica de las muestras húmedas mS/cm | | | | |
|-------------|--|------------|------------|---------|---------|
| | H[COSANE] | Na[COSANE] | Li[COSANE] | Li[TPB] | Na[TPB] |
| 20 | 27 | 23 | 21 | 1.70 | 1.40 |
| 30 | 33 | 34 | 30 | 2.70 | 1.97 |
| 40 | 43 | 40 | 35 | 5.55 | 2.50 |
| 50 | 57 | 49 | 43 | 12.6 | 3.10 |
| 60 | 81 | 63 | 50 | 16.7 | 3.40 |
| 70 | 111 | 74 | 65 | 21.4 | 3.95 |
| 80 | 130 | 85 | 70 | 26.8 | 4.81 |
| 90 | 145 | 101 | 86 | 34.0 | 5.83 |
| 100 | 170 | 115 | 92 | 39.7 | 5.35 |
| 110 | 187 | 119 | 99 | 35.0 | 4.50 |
| 120 | 200 | 156 | 107 | 1.16 | 2.04 |

A nuestro entender la diferencia entre las conductividades del M[COSANE] y del M'[TPB] es debido al tipo de mecanismo en que los respectivos cationes se mueven a través de los monómeros COSANE y TPB. El movimiento de los cationes que tiene lugar en M[COSANE] es debido al mecanismo de Grotthuss (los cationes saltan de una molécula a otra a través de puentes de hidrógeno); mientras que en M'[TPB] es debido al mecanismo vehicular (los cationes difunden a través del medio acuoso), ver **Figura 4. 8.**⁹

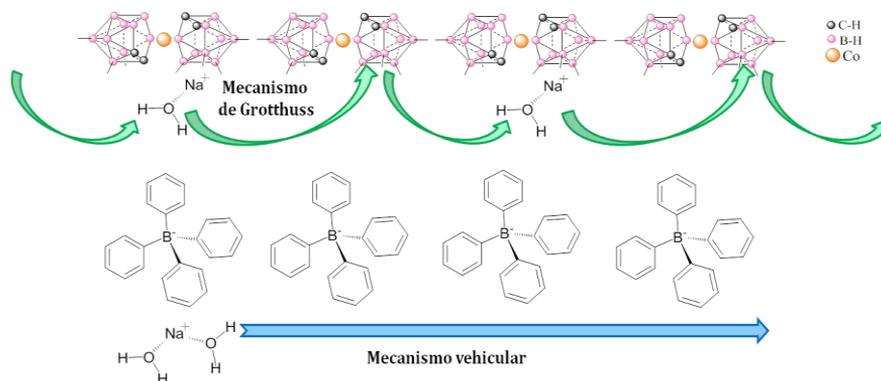


Figura 4. 8. Representación esquemática de los mecanismos propuestos para explicar la movilidad de los cationes a través de los monómeros COSANE y TPB. En M[COSANE] es debido al mecanismo de Grotthuss y en M'[TPB] es debido al mecanismo vehicular.

Además de los valores de conductividad iónica a distintas temperaturas, también se puede obtener el valor de la energía de activación para cada una de las muestras.: 5.6 ± 0.2 , 7.8 ± 0.1 , 7.9 ± 0.2 , 2.3 ± 0.2 y 3.5 ± 0.1 KJ/mol para H[COSANE], Na[COSANE], Li[COSANE], Li[TPB] y Na[TPB], respectivamente.

Cabe decir, que las medidas de conductividad iónica de las muestras secas no se incluyen en la tesis debido a que sus valores son bastante inferiores a los de las muestras húmedas, p. ej. el Li[COSANE] tiene una conductividad iónica en húmedo a 30°C de 3.1×10^{-2} S/cm y en seco sobre los 10^{-7} S/cm.

4.3.2. PBI@M[COSANE] (M = Na⁺, Li⁺ y H⁺) y PBI@M'[TPB] (M' = Na⁺ y Li⁺), estudio de sus propiedades fisicoquímicas y térmicas.

El PBI utilizado en este estudio no está dopado con H₃PO₄ ni con ningún otro dopante o aditivo, únicamente con las sales de COSANE y de TPB en

-----Polímeros dopados con metalacarboranos-----

una proporción del 5%wt. A partir del número de moles de PBI y de las distintas sales de COSANE y de TPB, se puede calcular cuántos monómeros de PBI hay por cada molécula de COSANE (25 monómeros/Na[COSANE], 24 monómeros/Li[COSANE] y 21 monómeros/H[COSANE]) o de TPB (25 monómeros/Na[TPB] y 24 monómeros/Li[TPB]).

Una vez formadas las membranas de PBI@M[COSANE] y PBI@M'[TPB] se estudian sus propiedades fisicoquímicas de espesor, retención de agua y grado de hinchamiento a 25°C. El espesor se mide cuando las membranas están secas, y la retención de agua y el grado de hinchamiento cuando las membranas han estado sumergidas en agua durante 2 días a temperatura ambiente. Las ecuaciones utilizadas son las siguientes:

$$\text{Retención de agua (\%)} = \frac{W_{\text{húmedo}} - W_{\text{seco}}}{W_{\text{seco}}} 100 \quad (6)$$

$$\text{Grado de hinchamiento (\%)} = \frac{L_{\text{húmedo}} - L_{\text{seco}}}{L_{\text{seco}}} 100 \quad (7)$$

Siendo W_{seco} y $W_{\text{húmedo}}$ el peso de la membrana antes y después de estar en contacto con el agua, y L_{seco} y $L_{\text{húmedo}}$ el espesor de la membrana seca y húmeda, respectivamente.

En la **Tabla 4. 5** se pueden observar los valores de espesor para todas las muestras (en todos los casos el espesor es aproximadamente 200 μm), la retención de agua (todas las membranas absorben bastante agua, sobre todo las que contienen litio) y el grado de hinchamiento (todas las membranas ganan volumen cuando están hidratadas).

Tabla 4. 5. Valores de espesor (μm), retención de agua (%) y grado de hinchamiento (%) a 25°C del PBI, PBI@H[COSANE], PBI@Na[COSANE], PBI@Li[COSANE], PBI@Na[TPB] y PBI@Li[TPB].

| Muestra | Espesor μm | Retención de agua % | Grado de hinchamiento % |
|----------------|-----------------------|---------------------|-------------------------|
| PBI | 210 \pm 14 | 108 \pm 2 | 53 \pm 2 |
| PBI@H[COSANE] | 222 \pm 8 | 122 \pm 2 | 58 \pm 2 |
| PBI@Na[COSANE] | 218 \pm 7 | 118 \pm 2 | 56 \pm 2 |
| PBI@Li[COSANE] | 214 \pm 10 | 136 \pm 2 | 62 \pm 2 |
| PBI@Na[TPB] | 209 \pm 9 | 127 \pm 2 | 60 \pm 2 |
| PBI@Li[TPB] | 203 \pm 5 | 134 \pm 2 | 63 \pm 2 |

Respecto a las propiedades térmicas de las muestras PBI, PBI@M[COSANE] y PBI@M'[TPB], se puede observar en la **Figura 4. 9** como en los primeros 200°C se mantienen todas las muestras con una estabilidad térmica similar, perdiendo un 1-2% en peso. A partir de 200°C las muestras PBI@M'[TPB] se degradan más fácilmente perdiendo un 25% en peso sobre los 450°C y llegando a retener un 45 y un 56% en peso (PBI@Li[TPB] y PBI@Na[TPB] respectivamente) a los 800°C. En cambio, las muestras PBI@M[COSANE] y PBI presentan una mejor estabilidad térmica, llegando a perder un 10-15% en peso sobre los 450°C y llegando a retener a 800°C un 81, 78, 74 y 72% en peso del PBI@H[COSANE], PBI@Li[COSANE], PBI@Na[COSANE] y PBI, respectivamente. A partir de 450 y 650°C el PBI@M[COSANE] presenta una mejor estabilidad térmica que el PBI sin dopar.

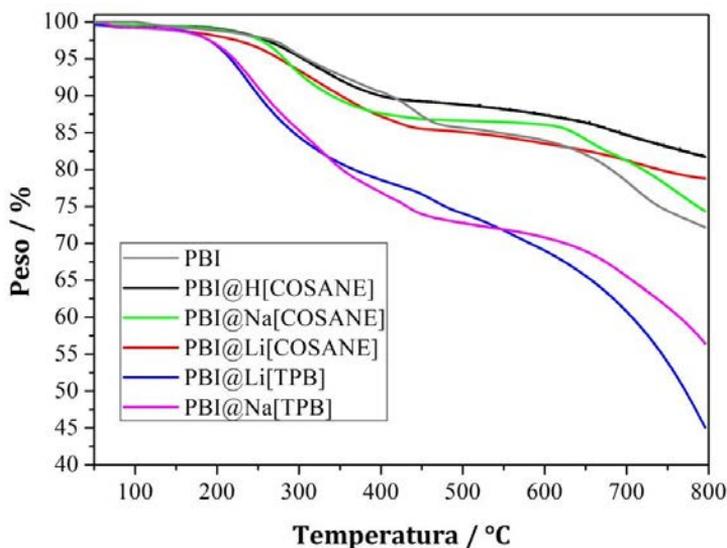


Figura 4. 9. Curva de ATG de las muestras PBI (gris), PBI@H[COSANE] (negro), PBI@Na[COSANE] (verde), PBI@Li[COSANE] (rojo), PBI@Li[TPB] (azul) y PBI@Na[TPB] (rosa) en atmósfera de N₂.

4.3.3. PBI@M[COSANE] (M = Na⁺, Li⁺ y H⁺) y PBI@M'[TPB] (M' = Na⁺ y Li⁺), estudio de la conductividad iónica.

Como el PBI es un polímero utilizado para funcionar a altas temperaturas, se mide la conductividad iónica del PBI, PBI@M[COSANE] y PBI@M'[TPB] mediante la espectroscopia de impedancia en el rango de temperaturas de 20 a 180°C. En este caso todas las membranas están hidratadas.

A partir de los datos obtenidos por impedancia se puede obtener el valor de conductividad iónica de cada muestra a cada temperatura.² En la **Figura 4. 10** y en la **Tabla 4. 6** se pueden observar los valores de conductividad iónica de las muestras PBI, PBI@M[COSANE] y PBI@M'[TPB] a diferentes temperaturas, observando dos comportamientos diferentes de 20 a 100°C y de 100 a 150°C.

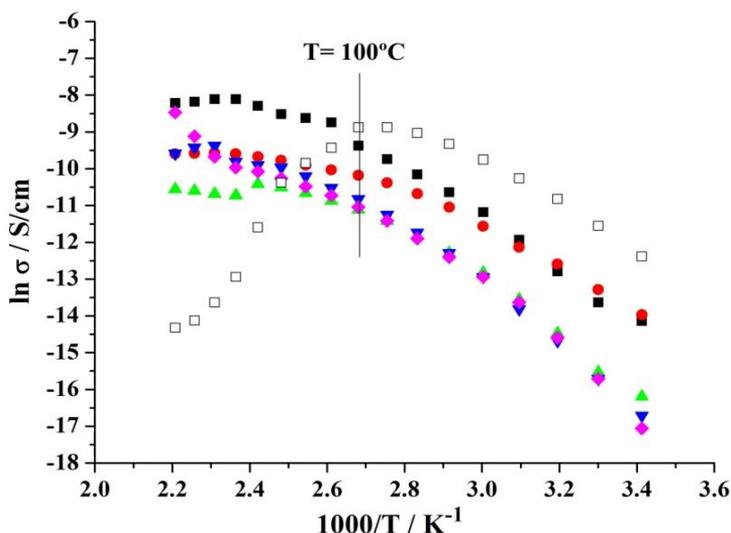


Figura 4. 10. Representación gráfica del ln de la conductividad iónica (S/cm) en función de la temperatura para las muestras PBI (□), PBI@H[COSANE] (■), PBI@Na[COSANE] (▲), PBI@Li[COSANE] (●), PBI@Li[TPB] (▼) y PBI@Na[TPB] (◆).

En el tramo de 20 a 100°C se puede ver como la conductividad de todas las muestras aumenta linealmente con la temperatura en el orden $\sigma_{\text{PBI}} > \sigma_{\text{PBI@H[COSANE]}} > \sigma_{\text{PBI@Li[COSANE]}} > \sigma_{\text{PBI@Na[COSANE]}} = \sigma_{\text{PBI@Li[TPB]}} = \sigma_{\text{PBI@Na[TPB]}}$, siendo sus energías de activación 20.5 ± 2.3 , 24.7 ± 0.7 , 19.1 ± 0.8 , 26.1 ± 1.2 , 29.5 ± 0.9 y 29.1 ± 1.6 KJ/mol, respectivamente (superiores a las de M[COSANE] y M'[TPB] sin PBI, debido a que ahora forman parte de una matriz polimérica).

Mientras que en el tramo de 100 a 150°C la conductividad iónica del PBI disminuye a medida que la temperatura aumenta; pero en cambio, si está dopado con M[COSANE] o con M'[TPB] su conductividad iónica aumenta ligeramente, siendo el PBI@H[COSANE] la única membrana que supera el valor máximo de conductividad del PBI puro.

Tabla 4. 6. Valores de conductividad iónica en mS/cm de las muestras PBI, PBI@H[COSANE], PBI@Na[COSANE], PBI@Li[COSANE], PBI@Li[TPB] y PBI@Na[TPB] de 20 a 180°C.

| Temp. °C | PBI | PBI@M[COSANE] | | | PBI@M'[TPB] | |
|-------------|--------|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| | | M = H ⁺ | M = Na ⁺ | M = Li ⁺ | M' = Li ⁺ | M' = Na ⁺ |
| 20 | 0.0042 | 0.0007 | 0.0001 | 0.0009 | 0.0001 | 0.0001 |
| 30 | 0.0096 | 0.0012 | 0.0002 | 0.0017 | 0.0002 | 0.0002 |
| 40 | 0.020 | 0.0028 | 0.0005 | 0.0034 | 0.0004 | 0.0005 |
| 50 | 0.035 | 0.0066 | 0.0013 | 0.0054 | 0.0010 | 0.0012 |
| 60 | 0.058 | 0.014 | 0.0027 | 0.0095 | 0.0024 | 0.0024 |
| 70 | 0.089 | 0.024 | 0.0046 | 0.016 | 0.0046 | 0.0041 |
| 80 | 0.120 | 0.039 | 0.0073 | 0.023 | 0.0080 | 0.0068 |
| 90 | 0.140 | 0.059 | 0.011 | 0.031 | 0.013 | 0.011 |
| 100 | 0.140 | 0.085 | 0.015 | 0.038 | 0.020 | 0.016 |
| 110 | 0.080 | 0.160 | 0.019 | 0.044 | 0.027 | 0.022 |
| 120 | 0.053 | 0.180 | 0.023 | 0.050 | 0.037 | 0.028 |
| 130 | 0.031 | 0.200 | 0.027 | 0.057 | 0.047 | 0.035 |
| 140 | 0.0092 | 0.250 | 0.030 | 0.063 | 0.050 | 0.042 |
| 150 | 0.0024 | 0.300 | 0.022 | 0.068 | 0.055 | 0.047 |
| 160 | 0.0012 | 0.300 | 0.023 | 0.070 | 0.085 | 0.063 |
| 170 | 0.0007 | 0.280 | 0.025 | 0.069 | 0.081 | 0.110 |
| 180 | 0.0006 | 0.270 | 0.026 | 0.068 | 0.069 | 0.210 |

Si se comparan los valores de conductividad iónica del PBI@H[COSANE] con valores de PBI dopado con H₃PO₄ (10⁻² – 10⁻¹ S/cm),^{40, 45} se puede pensar que en un principio el H[COSANE] no es tan buen aditivo como el H₃PO₄, pero hay que tener en cuenta que el H₃PO₄ está en una proporción del 300% y el H[COSANE] al 5%. Por tanto, el H[COSANE] podría ser un buen candidato como aditivo de PBI en pilas de combustible. Por lo que se refiere al COSANE y TPB de Na y de Li, si se comparan sus conductividades iónicas con las de la **Tabla 4. 2**, se observa que son muy inferiores a 25°C pero similares a altas temperaturas.

4.4. Estudio de las propiedades del PEDOT dopado con M[COSANE] (M = Cs⁺, Na⁺, Li⁺ y H⁺) y con Cs[Cl_x-COSANE] (x = 2, 4 y 6) para su uso en supercondensadores.

El polímero elegido para este estudio es el PEDOT (ver **Figura 4. 11**), ya que es uno de los polímero utilizados como electrodo en supercondensadores. Al ser un polímero conductor orgánico es necesario que durante su síntesis

Polímeros dopados con metalacarboranos

o electrosíntesis haya un anión para compensar la carga positiva que es generada en el polímero durante el proceso de oxidación (ver Capítulo 1). El anión más comúnmente utilizado con el PEDOT es el PSS (sulfato de poliestireno), dando valores de conductividad eléctrica de 0.4 a 2084 S/cm dependiendo del tipo de disolvente, y valores de capacidad específica de 108 a 1068 F/g con distintos aditivos y métodos de fabricación.⁴⁶

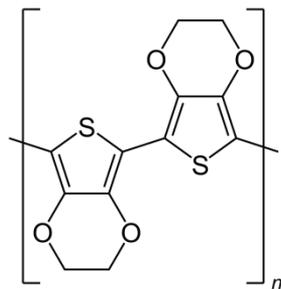


Figura 4. 11. Estructura química del monómero del PEDOT.

En este trabajo se utilizarán como aniones dopantes el COSANE y el $\text{Cl}_x\text{-COSANE}$ ($x = 2, 4$ y 6) (Figura 4. 12). Primero se realizará un estudio para ver si el catión que acompaña al anión dopante influye en las propiedades del polímero formado, utilizando las sales de COSANE de Cs, Na, Li y H. Y luego se realizará un segundo estudio donde se utilizará el $\text{Cl}_x\text{-COSANE}$ ($x = 2, 4$ y 6) para estudiar si la incorporación de más o menos halógenos en la estructura del anión dopante influye en las propiedades del PEDOT y si se puede utilizar en supercondensadores.

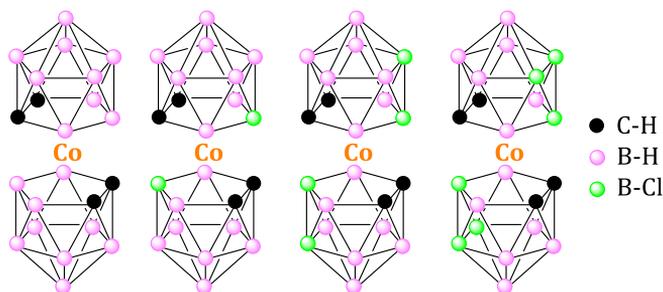


Figura 4. 12. Estructura del COSANE, $\text{Cl}_2\text{-COSANE}$, $\text{Cl}_4\text{-COSANE}$ y $\text{Cl}_6\text{-COSANE}$ (izquierda a derecha).

4.4.1. Síntesis del $\text{Cl}_x\text{-COSANE}$ ($x = 2, 4$ y 6).

Antes de empezar con los estudios de electropolimerización del PEDOT con $\text{M}[\text{COSANE}]$ y $\text{Cs}[\text{Cl}_x\text{-COSANE}]$ y estudiar sus propiedades, se describe el procedimiento utilizado para obtener los distintos derivados halogenados del COSANE ($\text{Cl}_2\text{-COSANE}$, $\text{Cl}_4\text{-COSANE}$ y $\text{Cl}_6\text{-COSANE}$). A partir de estudios previos del grupo de investigación se sabe que para obtener el $\text{Cl}_6\text{-COSANE}$ es necesario utilizar un agente clorante fuerte como el SO_2Cl_2 en ACN (1:1) durante 2h a reflujo partiendo del $\text{Cs}[\text{COSANE}]$.⁴⁷

-----Polímeros dopados con metalacboranos-----

La técnica de MALDI-TOF proporciona información sobre el porcentaje de cloros que tiene el COSANE, ya que la reacción de halogenación produce una mezcla (en el Cl₆-COSANE se obtiene un porcentaje del 83.20%). Por tanto, con esta técnica se puede saber fácilmente las condiciones óptimas de reacción para tener un porcentaje de cloros superior al 80%.

Las condiciones óptimas para sintetizar el Cl₄-COSANE son las siguientes: se parte de Cs[COSANE] y se utiliza como agente clorante el SO₂Cl₂ en ACN en la proporción 1:2 durante 40 min a temperatura ambiente, obteniendo un porcentaje de Cl₄-COSANE del 89.10% (ver **Tabla 4. 7**).

Tabla 4. 7. Porcentaje de cloros en el COSANE mediante MALDI-TOF de la reacción de halogenación usando SO₂Cl₂ en ACN (1:2) a temperatura ambiente partiendo de Cs[COSANE] a distintos tiempos.

| tiempo / min | %Cl ₂ | %Cl ₃ | %Cl ₄ | %Cl ₅ |
|--------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 5 | 15.41 | 67.38 | 17.21 | - |
| 10 | 2.41 | 42.67 | 53.12 | 1.80 |
| 20 | - | 26.92 | 69.89 | 3.19 |
| 40 | - | 1.22 | 89.10 | 9.68 |

Mientras que las condiciones óptimas para sintetizar el Cl₂-COSANE son las siguientes: se utilizan 2.3 eq. de un agente clorante más débil como la N-clorosuccinimida en THF y 1 eq. de Cs[COSANE] durante 24h a reflujo, obteniendo un porcentaje de Cl₂-COSANE del 96.97% (ver **Tabla 4. 8**).

Tabla 4. 8. Porcentaje de cloros en el COSANE mediante MALDI-TOF de la reacción de halogenación usando 1 eq. Cs[COSANE] y 2.3 eq. N-clorosuccinimida en THF a reflujo y a distintos tiempos.

| tiempo / h | %Cl ₀ | %Cl ₁ | %Cl ₂ | %Cl ₃ |
|------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 4 | 66.71 | 31.50 | 1.79 | - |
| 9 | 8.32 | 87.41 | 4.22 | - |
| 12 | - | 41.59 | 57.50 | 0.91 |
| 24 | - | 1.60 | 96.97 | 1.43 |

4.4.2. Electropolimerización del PEDOT:M[COSANE] (M = Cs⁺, Na⁺, Li⁺ y H⁺).

La electropolimerización del PEDOT:M[COSANE] se ha llevado a cabo en acetonitrilo seco utilizando EDOT 10 mM y M[COSANE] 10 mM mediante la voltametría cíclica de -1 a 1.5 V vs Ag a 50 mV/s (ver **Figura 4. 13**).

Polímeros dopados con metalacarboranos

A partir de los voltagramas cíclicos de la electropolimerización de todas las muestras se puede observar el potencial en el que empieza la oxidación del monómero, en PEDOT:Cs[COSANE] y PEDOT:H[COSANE] es a 1.1 V y en PEDOT:Na[COSANE] y PEDOT:Li[COSANE] es a 1.2 V. Además, también se puede observar como a medida que pasan los ciclos el polímero crece más o menos en intensidad dependiendo de la sal de COSANE utilizada (usando Cs[COSANE] y H[COSANE] como dopantes se obtiene una mayor cantidad de polímero formado), con picos de oxidación y de reducción a diferentes potenciales dando lugar a potenciales redox de -0.100, -0.075, 0.150 y -0.125 V vs Ag para las sales del PEDOT:M[COSANE] de Cs, Na, Li y H, respectivamente. Debido a la diferencia entre cada una de las muestras (potencial, intensidad y forma del voltagrama), se puede pensar que los cationes (Cs, Na, Li y H) del anión dopante tienen mucha importancia en la electropolimerización del PEDOT pudiendo influir en sus propiedades electroquímicas y fisicoquímicas.

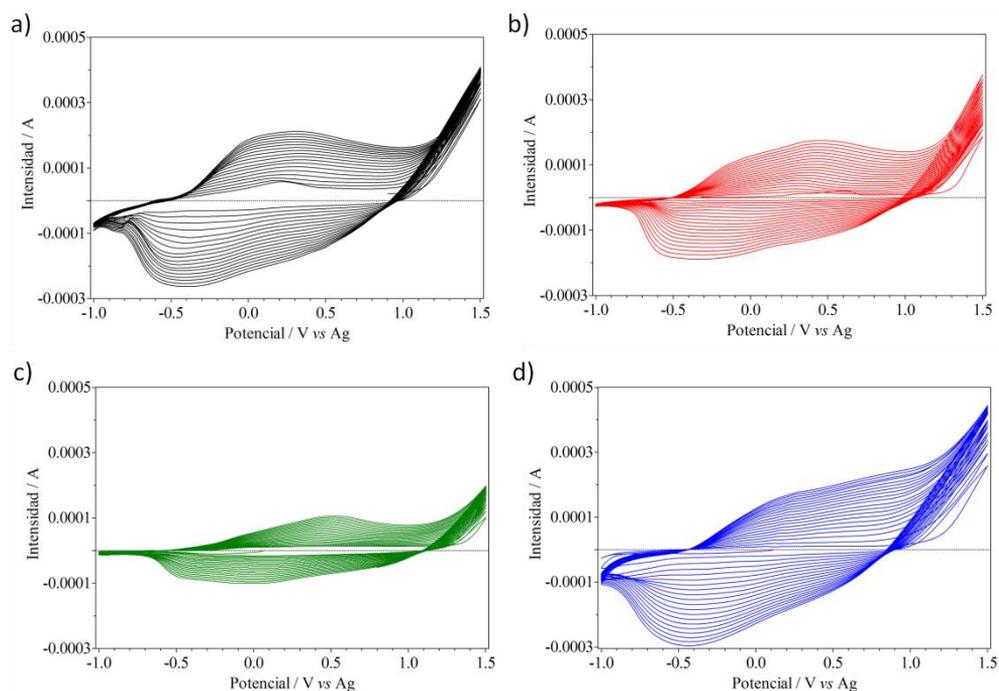


Figura 4. 13. Voltagramas cíclicos de la electropolimerización de EDOT 10 mM y M[COSANE] 10 mM, a) Cs[COSANE], b) Na[COSANE], c) Li[COSANE] y d) H[COSANE], de -1 a 1.5 V vs Ag, 20 ciclos a 50 mV/s en acetonitrilo seco.

4.4.3. Propiedades electroquímicas del PEDOT:M[COSANE] (M = Cs⁺, Na⁺, Li⁺ y H⁺).

Las propiedades electroquímicas del PEDOT:M[COSANE] fueron estudiadas en Na₂SO₄ 0.1 M mediante las técnicas de voltametría cíclica (CV) y de voltametría de barrido lineal (LSV). En la **Figura 4. 14** se pueden observar los voltagramas cíclicos del PEDOT:M[COSANE] diferenciándose dos tipos de procesos, el proceso redox del Co^{3+/2+} que aparece a -1.56, -1.36, -1.51 y -1.36 V para las sales de COSANE de Cs, Na, Li y H respectivamente, confirmando la presencia del metalacarborano en la matriz polimérica y observando un desplazamiento del potencial redox hacia valores más negativos si se compara con el del COSANE libre (-1.27 V vs Ag/AgCl). Y un segundo proceso redox del polímero, que dependiendo de la muestra tiene una forma diferente con más o menos picos de oxidación y de reducción, sugiriendo que los cationes del COSANE influyen en la polimerización electroquímica del PEDOT afectando a sus propiedades electroquímicas.

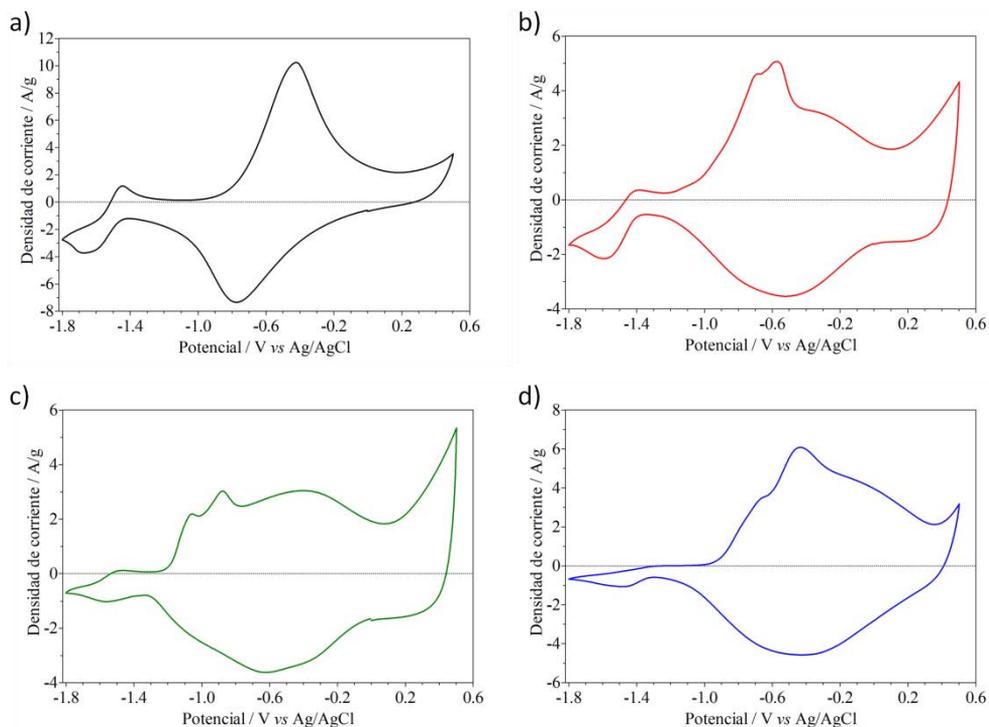


Figura 4. 14. Voltagramas cíclicos de la caracterización electroquímica del a) PEDOT:Cs[COSANE], b) PEDOT:Na[COSANE], c) PEDOT:Li[COSANE] y d) PEDOT:H[COSANE] en Na₂SO₄ 0.1 M a 100 mV/s.

-----Polímeros dopados con metalacarboranos-----

A partir de los voltagramas cíclicos se puede calcular el valor de capacidad específica en F/g de cada una de las muestras utilizando la ecuación:

$$C_g = \frac{S}{\Delta V \cdot v \cdot w} \quad (8)$$

Siendo C_g la capacidad específica, S el área debajo de la curva de la CV, ΔV la ventana de potencial, v la velocidad de barrido y w el peso (g) del polímero.

Por tanto, si se calculan las capacidades específicas de todas las muestras en la ventana de potencial de -1.3 a 0.5 V (ΔV 1.8 V) sin tener en cuenta el proceso redox del $\text{Co}^{3+/2+}$, se obtienen los valores de 289, 228, 234 y 269 F/g para los cationes Cs, Na, Li y H, respectivamente. Mientras que si se calculan las capacidades específicas teniendo en cuenta el proceso redox del $\text{Co}^{3+/2+}$ (de -1.8 a 0.5 V, ΔV 2.3 V) se obtienen valores de 243, 188, 191 y 216 F/g para el PEDOT:M[COSANE] con los cationes Cs, Na, Li y H respectivamente. En todos los casos los valores de capacidad específica son más altos cuando ΔV es 1.8 V, sugiriendo que el proceso redox $\text{Co}^{3+/2+}$ al no solapar con el del polímero no proporciona mejores valores de capacidad.

Si se comparan los valores de capacidad obtenidos con los reportados en la **Tabla 4. 3** y en el review⁴⁶ del PEDOT:PSS (valores de capacidad específica de 108 a 1068 F/g con distintos aditivos y métodos de fabricación), se puede ver que los del PEDOT:M[COSANE] se encuentran dentro del rango de la bibliografía, siendo mejores que los del PEDOT sin dopar o sin añadir aditivos (72 F/g). Pero si se compara con la capacidad específica obtenida para el PEDOT-Fc (363 F/g) los valores son inferiores, pero aun así se podrían utilizar como electrodos en supercondensadores.

Por otro lado, los estudios realizados mediante la técnica de LSV en Na_2SO_4 0.1 M a 0.5 mV/s (**Figura 4. 15**), muestran el valor del límite de resistencia a la sobreoxidación (el máximo del pico, que es cuando el material empieza a ser aislante perdiendo sus propiedades conductoras) de cada una de las muestras, siendo dicho valor 1.06, 1.06, 1.08 y 1.06 V para los cationes Cs, Na, Li y H, respectivamente. En este caso, no se observa una influencia al dopar el PEDOT con diferentes sales de COSANE, obteniendo similares valores del límite de resistencia a la sobreoxidación.

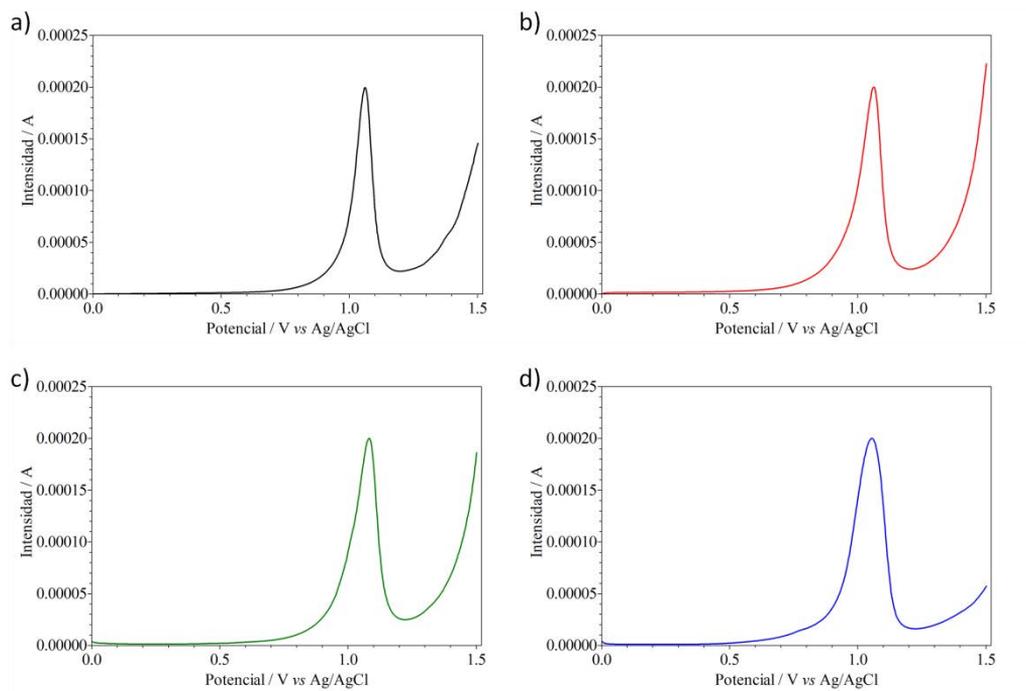


Figura 4. 15. Curvas de LSV de las muestras a) PEDOT:Cs[COSANE], b) PEDOT:Na[COSANE], c) PEDOT:Li[COSANE] y d) PEDOT:H[COSANE] en Na_2SO_4 0.1 M a 0.5 mV/s.

4.4.4. Estudio de SEM-EDX, de conductividad eléctrica y de ATG del PEDOT:M[COSANE] (M = Cs⁺, Na⁺, Li⁺ y H⁺).

Con la técnica de SEM-EDX se puede observar la morfología del polímero y se puede saber que elementos están presentes en su composición. En la **Figura 4. 16** se pueden observar las imágenes de SEM de todas las muestras exhibiendo en todas ellas una morfología de pequeñas esferas con tamaños de 2.5, 2.0, 1.0 y 1.0 μm para los cationes Cs, Na, Li y H respectivamente. Sólo en el caso del PEDOT:Li[COSANE] se producen agregados esféricos.

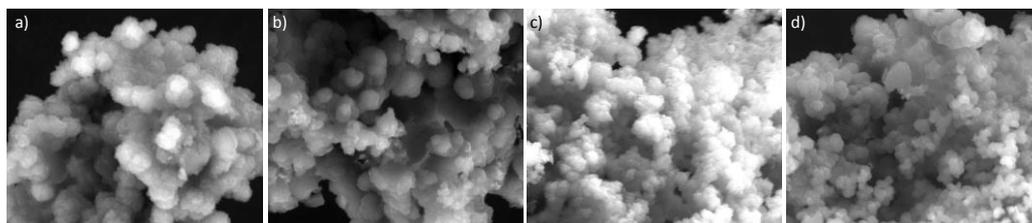


Figura 4. 16. Imágenes de SEM a 5000x de a) PEDOT:Cs[COSANE], b) PEDOT:Na[COSANE], c) PEDOT:Li[COSANE] y d) PEDOT:H[COSANE].

---Polímeros dopados con metalacarboranos---

Por lo que respecta al análisis de EDX de cada uno de los polímeros, en la **Tabla 4. 9** se puede observar la proporción encontrada de S/Co, es decir, de cada monómero EDOT por cada molécula de COSANE. En el caso de usar el Cs[COSANE] y el H[COSANE] hay 2 monómeros de EDOT por cada molécula de COSANE; mientras que al usar el Na[COSANE] y el Li[COSANE] hay por cada 3 monómeros de EDOT una molécula de COSANE aproximadamente, confirmando en todos los casos que el COSANE forma parte de la matriz polimérica.

Tabla 4. 9. Proporción S/Co %Atómico (S proviene del EDOT y el Co del COSANE), proporción Co/Cs y Co/Na %Atómico de las muestras PEDOT:M[COSANE] por análisis de EDX.

| Muestra | S/Co %At | Co/Cs %At | Co/Na %At |
|------------------|-------------|-----------|-----------|
| PEDOT:Cs[COSANE] | 1.87 ± 0.13 | 3.00 | - |
| PEDOT:Na[COSANE] | 2.80 ± 0.24 | - | 4.80 |
| PEDOT:Li[COSANE] | 2.73 ± 0.42 | - | - |
| PEDOT:H[COSANE] | 2.35 ± 0.19 | - | - |

Como se ha visto en otros estudios que los cationes afectan a las propiedades del polímero formado, se ha analizado mediante EDX si en la composición del polímero se encuentran los elementos de Cs y de Na (el Li y el H no son aptos para el EDX) y se han comparado con los de Co. De esta forma se confirma la presencia de los cationes en la estructura polimérica y se relaciona la cantidad de moléculas de COSANE por catión.

También se ha calculado la conductividad eléctrica de todas las muestras con el método de las 4 puntas, obteniendo valores de 275.2, 188.3, 220.8 y 238.0 S/cm para las muestras PEDOT:M[COSANE] con los cationes Cs, Na, Li y H, respectivamente. Una vez más se comprueba cómo influyen los cationes en las propiedades del polímero, siendo el PEDOT:Cs[COSANE] el que mejor valor de conductividad eléctrica tiene. Si se comparan estos valores de conductividad con los obtenidos en PEDOT:PSS (de 0.4 a 2084 S/cm dependiendo del tipo de disolvente y tratamiento)⁴⁶ se pueden considerar que están bastante bien ya que no han sido tratados con ningún disolvente ni térmicamente.

Por último, se ha estudiado la estabilidad térmica en atmósfera de N₂ de todas las muestras poliméricas (**Figura 4. 17**), obteniendo como resultado

una mejor estabilidad para el PEDOT:Cs[COSANE] y el PEDOT:H[COSANE]. Una vez más la influencia del catión hace que las propiedades del polímero no sean las mismas y que el dopante Cs[COSANE] sea el mejor candidato.

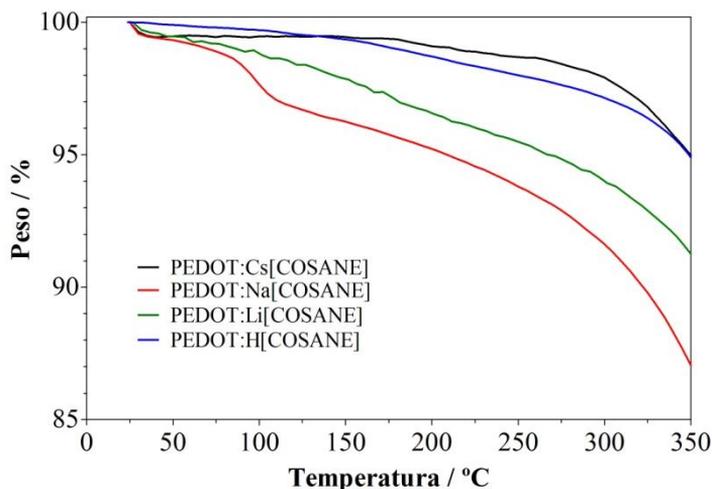


Figura 4. 17. Curva de ATG de las muestras PEDOT:Cs[COSANE] (negro), PEDOT:Na[COSANE] (rojo) PEDOT:Li[COSANE] (verde) y PEDOT:H[COSANE] (azul) en atmósfera de N₂.

4.4.5. Electropolimerización del PEDOT:Cs[Cl_x-COSANE] (x = 2, 4 y 6) y del PEDOT:PSS.

Una vez visto que las distintas sales de COSANE (Cs, Na, Li y H) influyen en las propiedades del PEDOT formado y que el Cs[COSANE] es el que mejor prestaciones tiene, se elige el Cs como catión de los derivados clorados del COSANE (Cs[Cl₂-COSANE], Cs[Cl₄-COSANE] y Cs[Cl₆-COSANE]). Además de estudiar sus propiedades electroquímicas y fisicoquímicas, se comparará con el PEDOT:PSS polimerizado de la misma manera.

En este estudio, a diferencia del anterior se utilizan aniones dopantes que tienen potenciales redox diferentes. Cuantos más átomos de cloro haya en la estructura del COSANE, el potencial redox se desplazará hacia valores más positivos. En la **Figura 4. 18** se pueden observar los procesos redox que tienen lugar en cada uno de los derivados de COSANE, todos ellos están referenciados respecto al Fc, siendo los potenciales redox del Co^{3+/2+} -1.75, -1.39, -1.20 y -1.01 V vs Fc para COSANE, Cl₂-COSANE, Cl₄-COSANE y Cl₆-COSANE respectivamente (o -1.27, -0.98, -0.86 y -0.66 V vs Ag/AgCl).

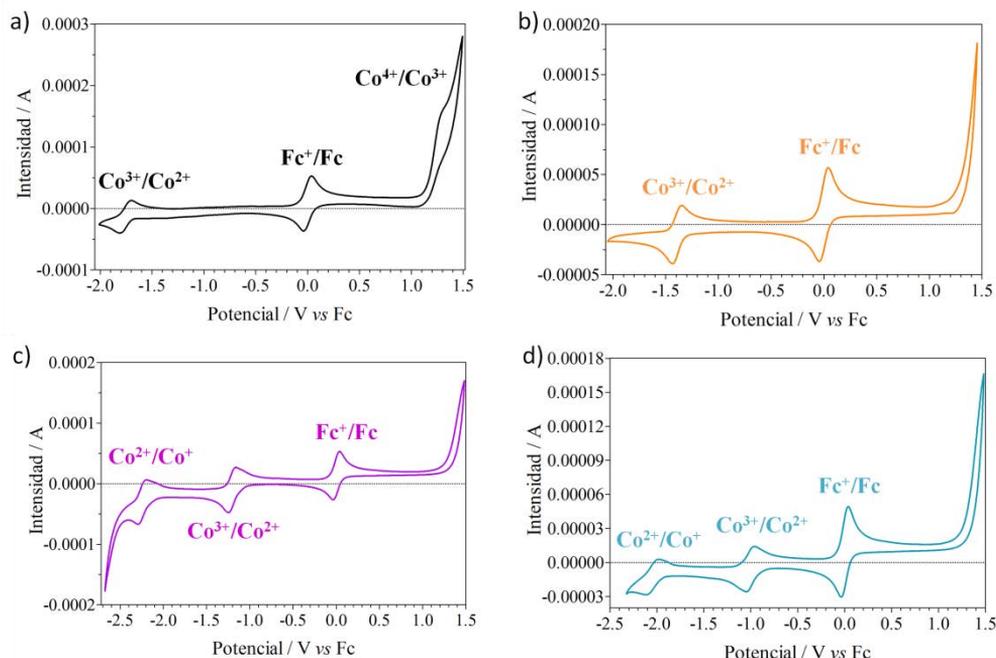


Figura 4. 18. Voltagramas cíclicos del a) COSANE, b) Cl₂-COSANE, c) Cl₄-COSANE y d) Cl₆-COSANE con ferroceno como referencia interna en acetonitrilo seco.

Por tanto, para electropolimerizar el PEDOT:Cs[Cl_x-COSANE] se utiliza EDOT 10 mM y Cs[Cl_x-COSANE] 10 mM en acetonitrilo seco de -1.3 a 1.65 V vs Ag a 50 mV/s. Se decide ampliar la ventana de electropolimerización respecto al estudio anterior del PEDOT:M[COSANE], para poder ver el proceso redox del Co³⁺/²⁺ durante la electropolimerización del polímero. En cambio, para electropolimerizar el PEDOT:PSS se tiene que hacer en agua de -1 a 1.5 V vs Ag a 50 mV/s (ver **Figura 4. 19**).

A partir de los voltagramas cíclicos de la electropolimerización de todas las muestras se puede observar el potencial redox del Co³⁺/²⁺ que tiene lugar, siendo -0.94, -0.80 y -0.71 V para PEDOT:Cs[Cl₂-COSANE], PEDOT:Cs[Cl₄-COSANE] y PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE], respectivamente. En la **Figura 4. 19 a b** se observan dos procesos redox por separado, el del Co³⁺/²⁺ y el del crecimiento del polímero (la forma de los voltagramas es similar aunque difieren en intensidad, obteniendo una menor cantidad de polímero en el caso del PEDOT:Cs[Cl₄-COSANE]). Mientras que en la **Figura 4. 19 c** se solapa el proceso redox del Co³⁺/²⁺ y el del crecimiento del polímero, ya que

el Cl₆-COSANE tiene el potencial redox hacia valores más positivos, y en consecuencia el voltagrama cíclico es más intenso. Este hecho sugiere que el PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE] puede presentar propiedades diferentes a las del PEDOT:Cs[Cl₂-COSANE] y PEDOT:Cs[Cl₄-COSANE].

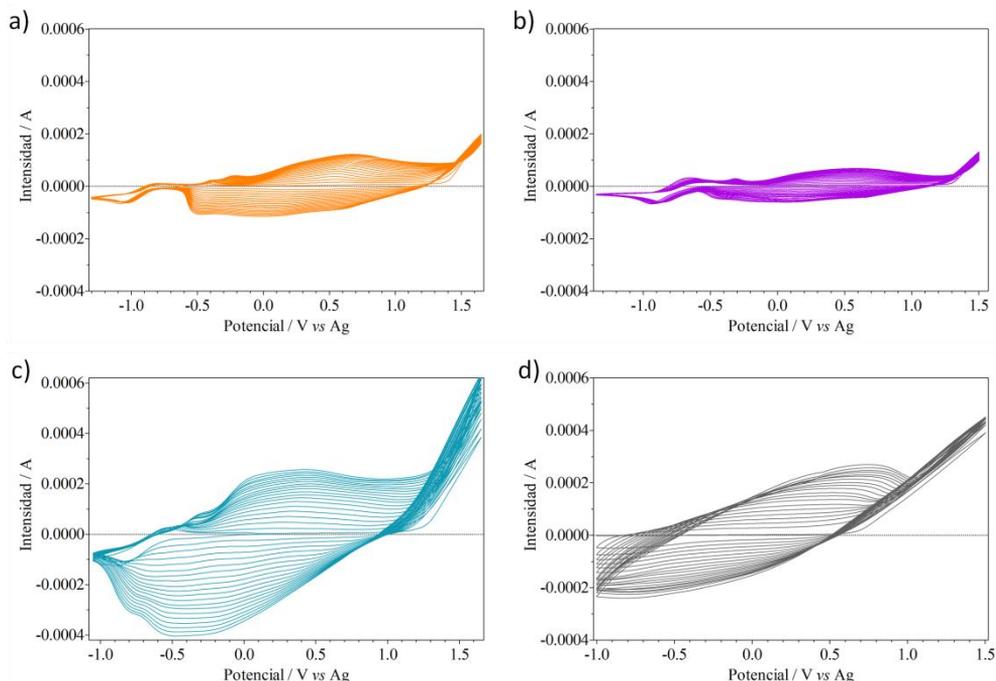


Figura 4. 19. Voltagramas cíclicos de la electropolimerización de EDOT 10 mM y Cs[Cl_x-COSANE] 10 mM, a) Cs[Cl₂-COSANE], b) Cs[Cl₄-COSANE] y c) Cs[Cl₆-COSANE], de -1.3 a 1.65 V vs Ag, 20 ciclos a 50 mV/s en acetonitrilo seco; y d) PSS 10 mM de -1 a 1.5 V vs Ag, 20 ciclos a 50mV/s en agua.

Por otra parte, el valor de potencial en el que empieza la oxidación del monómero es 1.3 V para PEDOT:Cs[Cl_x-COSANE] (el uso de Cs[Cl_x-COSANE] como agente dopante requiere aplicar +0.2 V más que en Cs[COSANE] para que empiece la electropolimerización), y 0.6 V para PEDOT:PSS, mostrando un voltagrama completamente diferente.

4.4.6. Propiedades electroquímicas del PEDOT:Cs[Cl_x-COSANE] (x = 2, 4 y 6) y del PEDOT:PSS.

Las propiedades electroquímicas del PEDOT:Cs[Cl_x-COSANE] y PEDOT:PSS fueron estudiadas en Na₂SO₄ 0.1 M mediante las técnicas de CV y LSV. En la **Figura 4. 20** se pueden observar los voltagramas cíclicos de los distintos

Polímeros dopados con metalacarboranos

polímeros, mostrando un solapamiento entre el proceso redox del $\text{Co}^{3+/2+}$ y el del polímero (en el PEDOT:Cs[COSANE] ambos procesos tienen lugar de manera independiente), siendo los valores de potencial redox del $\text{Co}^{3+/2+}$ -1.17, -0.97 y -0.83 V para el PEDOT:Cs[Cl₂-COSANE], PEDOT:Cs[Cl₄-COSANE] y PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE], respectivamente. Si se comparan estos valores de potencial con los del metalacarborano libre (ver **Figura 4. 18**), se puede ver un desplazamiento hacia valores más negativos. Sólo en el caso del PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE] se observa el pico redox del $\text{Co}^{2+}/+$ a -1.5 V. La presencia de los picos redox del $\text{Co}^{3+/2+}$ confirma que el metalacarborano forma parte de la matriz polimérica; mientras que el PEDOT:PSS sólo presenta una contribución capacitiva debida al polímero.

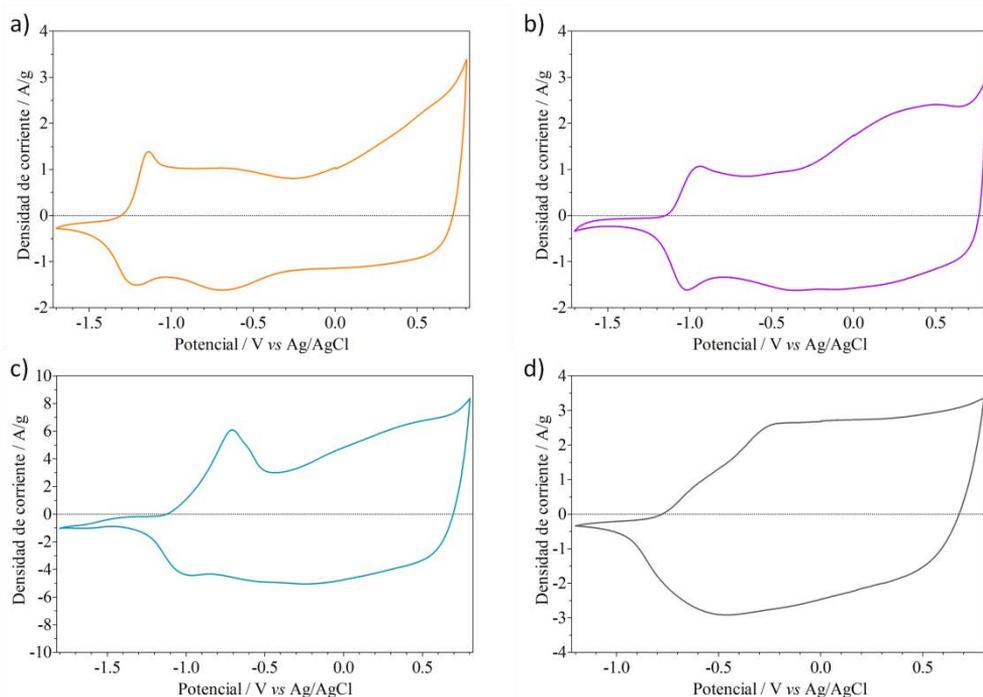


Figura 4. 20. Voltagramas cíclicos de la caracterización electroquímica del a) PEDOT:Cs[Cl₂-COSANE], b) PEDOT:Cs[Cl₄-COSANE], c) PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE] y d) PEDOT:PSS en Na₂SO₄ 0.1 M a 100 mV/s.

A partir de los voltagramas cíclicos se puede calcular el valor de capacidad específica en F/g de cada una de las muestras con la ecuación (8), siendo 106, 114, 321 y 175 F/g para PEDOT:Cs[Cl₂-COSANE], PEDOT:Cs[Cl₄-COSANE], PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE] y PEDOT:PSS, respectivamente.

Los valores de capacidad específica obtenidos para los polímeros dopados con Cl₂-COSANE y Cl₄-COSANE son muy similares, mientras que para el dopante Cl₆-COSANE es el valor más alto (incluso que el del Cs[COSANE]), indicando que durante el proceso de polimerización electroquímica influye el solapamiento entre el proceso de crecimiento del polímero y del Co^{3+/2+}.

Si se comparan los valores de capacidad obtenidos con los reportados (Tabla 4. 3 y el review⁴⁶ del PEDOT:PSS donde los valores de capacidad específica son de 108 a 1068 F/g), se puede ver que tanto en PEDOT:Cs[Cl_x-COSANE] como en PEDOT:PSS los valores se encuentran dentro del rango de la bibliografía. El valor de capacidad del PEDOT:PSS es comparable al obtenido en el review,⁴⁶ indicando que el proceso de electropolimerización utilizado proporciona materiales poliméricos aptos para ser utilizados en supercondensadores. Además, de todos los metalacarboranos utilizados para dopar el PEDOT, el Cs[Cl₆-COSANE] es el que presenta un mejor valor de capacidad específica (321 F/g), llegando a un valor muy similar al del PEDOT-Fc (363 F/g).

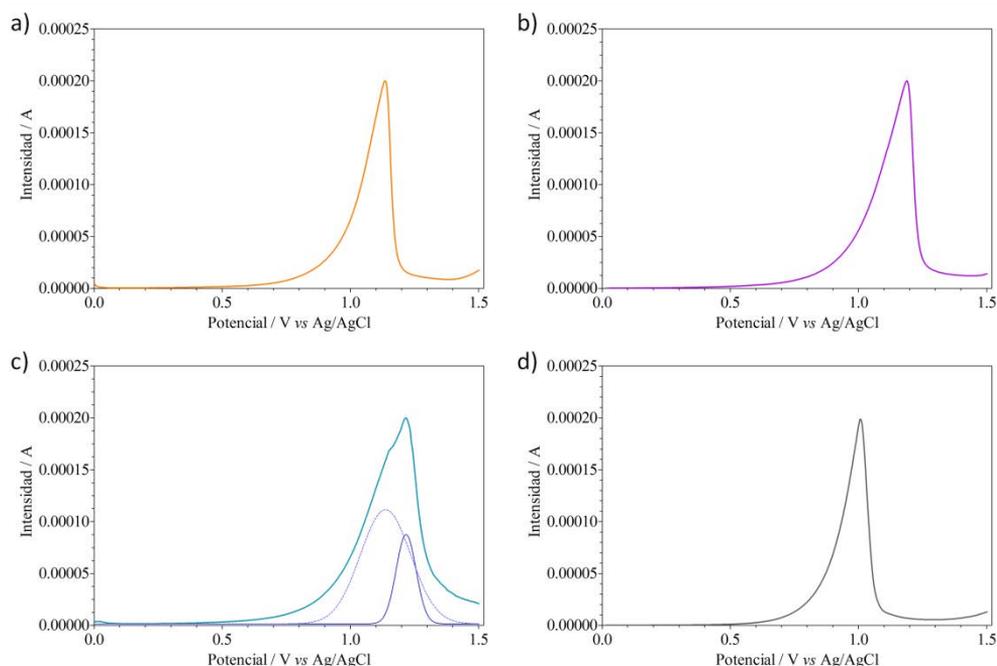


Figura 4. 21. Curvas de LSV de las muestras a) PEDOT:Cs[Cl₂-COSANE], b) PEDOT:Cs[Cl₄-COSANE], c) PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE] y d) PEDOT:PSS en Na₂SO₄ 0.1 M a 0.5 mV/s.

-----Polímeros dopados con metalacarboranos-----

Por otro lado, los estudios realizados mediante la técnica de LSV en Na_2SO_4 0.1 M a 0.5 mV/s (**Figura 4. 21**), muestran el valor del límite de resistencia a la sobreoxidación (cuando el material empieza a ser aislante perdiendo sus propiedades conductoras) de cada una de las muestras, siendo dicho valor 1.14, 1.19, 1.22 y 1.01 V para PEDOT:Cs[Cl₂-COSANE], PEDOT:Cs[Cl₄-COSANE], PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE] y PEDOT:PSS, respectivamente. El hecho de tener más o menos cloros en la estructura del COSANE hace que a mayor cantidad de B-Cl, mejor sea el límite de resistencia a la sobreoxidación; por tanto, el PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE] además de tener la capacidad específica más alta, es el que tiene mejor límite de resistencia a la sobreoxidación. En cambio, el PEDOT:PSS es el polímero que se degrada más rápidamente.

4.4.7. Estudio de SEM-EDX, de conductividad eléctrica y de ATG del PEDOT:Cs[Cl_x-COSANE] (x = 2, 4 y 6) y del PEDOT:PSS.

Con la técnica de SEM-EDX se puede observar la morfología del polímero y se puede saber que elementos están presentes en su composición. En la **Figura 4. 22** se pueden observar las imágenes de SEM de todas las muestras exhibiendo en el PEDOT:Cs[Cl₂-COSANE] y en el PEDOT:Cs[Cl₄-COSANE] pequeños agregados esféricos rugosos de 5.5 y 4.5 μm , respectivamente. Mientras que el PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE] presenta agregados esféricos de 2.0 μm , parecidos a los del PEDOT:Cs[COSANE]. El PEDOT:PSS tiene una morfología completamente distinta, debido a que el PSS es un polímero.

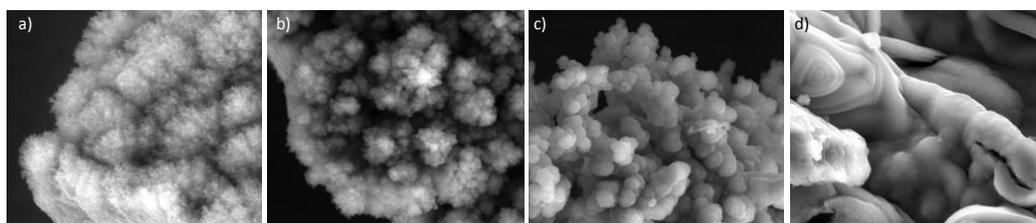


Figura 4. 22. Imágenes de SEM a 5000x de a) PEDOT:Cs[Cl₂-COSANE], b) PEDOT:Cs[Cl₄-COSANE], c) PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE] y d) PEDOT:PSS.

Por lo que respecta al análisis de EDX de las muestras, sólo se han podido analizar las que contienen COSANE, (el PEDOT:PSS sólo tiene el elemento de S para analizar, y tanto el PEDOT como el PSS contienen S). Por tanto, la proporción obtenida de S/Co para los polímeros con Cs[Cl_x-COSANE] son 1.55 ± 0.10 , 2.18 ± 0.09 y 1.54 ± 0.21 (%At), para los aniones dopantes

Cs[Cl₂-COSANE], Cs[Cl₄-COSANE] y Cs[Cl₆-COSANE], respectivamente, que al igual que el PEDOT:Cs[COSANE], se obtiene una relación aproximada de cada dos monómeros de EDOT hay 1 molécula de metalacarborano. En todas las muestras se ha encontrado el elemento Cs.

También se ha calculado la conductividad eléctrica con el método de las 4 puntas, obteniendo valores de 230.1, 247.6, 284.1 y 210.1 S/cm para las muestras PEDOT:Cs[Cl₂-COSANE], PEDOT:Cs[Cl₄-COSANE], PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE] y PEDOT:PSS, respectivamente. La influencia de la cantidad de enlaces B-Cl en la estructura del COSANE hace que a mayor número de cloros, mejor conductividad eléctrica presente. Por tanto, el PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE] es el polímero con mejor conductividad eléctrica, incluso más alta que la del PEDOT:PSS, que es el menos conductor de todos ellos.

Por último, se ha estudiado la estabilidad térmica en atmósfera de N₂ de todas las muestras poliméricas (ver **Figura 4. 23**), siendo el PEDOT:PSS el polímero con menor estabilidad térmica, incluso el PEDOT:M[COSANE] es más estable. Respecto a la estabilidad del PEDOT:Cs[Cl_x-COSANE], a mayor cantidad de enlaces B-Cl en la estructura del COSANE, mejor estabilidad térmica presenta, siendo el PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE] el mejor.

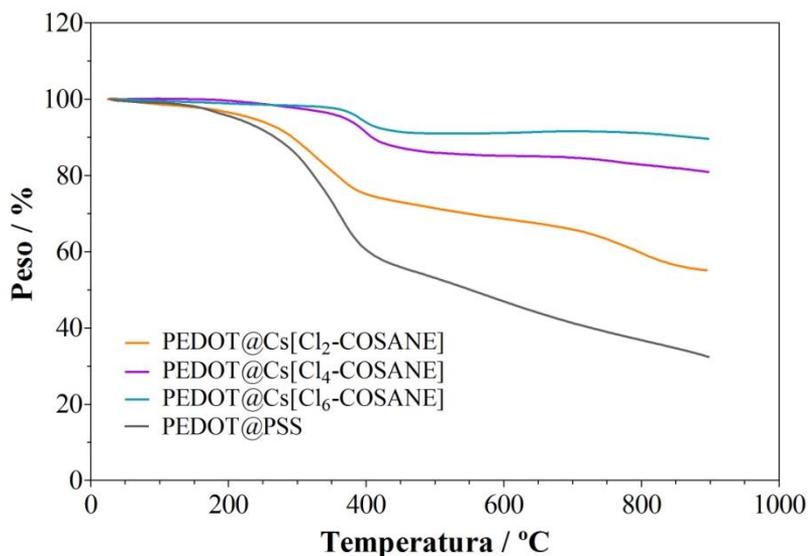


Figura 4. 23. Curva de ATG de las muestras PEDOT:Cs[Cl₂-COSANE] (naranja), PEDOT:Cs[Cl₄-COSANE] (morado), PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE] (azul) y PEDOT:PSS (gris) en atmósfera de N₂.

4.5. Conclusiones.

En este apartado se resumirán los resultados más relevantes obtenidos en cada uno de los objetivos propuestos:

Objetivo 1: Estudio de las propiedades del PBI dopado con M[COSANE] (M = Na⁺, Li⁺ y H⁺) y con M'[TPB] (M' = Na⁺ y Li⁺) para su uso en pilas de combustibles y baterías.

- ✓ Se ha estudiado la conductividad iónica del M[COSANE] (M = Na⁺, Li⁺ y H⁺) y del M'[TPB] (M' = Na⁺ y Li⁺) en húmedo mediante la espectroscopía de impedancia en el rango de temperaturas de 20 a 120°C, siendo las conductividades iónicas del COSANE superiores a las del TPB ($\sigma_{H[COSANE]} > \sigma_{Na[COSANE]} > \sigma_{Li[COSANE]} > \sigma_{Li[TPB]} > \sigma_{Na[TPB]}$).
- ✓ Se han comparado los valores de conductividad iónica obtenidos por el M[COSANE] y por el M'[TPB] con valores de conductividad de sales, aditivos o dopantes de polímeros utilizados en pilas de combustible y baterías, presentando valores similares o del orden que confirman que son aptos para utilizarse como aditivos en el polímero PBI.
- ✓ Se han preparado las membranas de PBI dopadas con M[COSANE] y con M'[TPB] en una proporción del 5%wt. Se han estudiado sus propiedades fisicoquímicas de espesor, retención de agua y grado de hinchamiento a 25°C, siendo el espesor de todas las muestras en seco sobre los 200 μm . Una vez hidratadas se ha comprobado que absorben bastante agua (sobre todo las sales de Li) aumentando su espesor en un 53-63%.
- ✓ También se ha estudiado la estabilidad térmica del PBI@M[COSANE], PBI@M'[TPB] y PBI, siendo las membranas PBI@M[COSANE] las más estables térmicamente en todo el rango de temperaturas. El PBI tiene una estabilidad térmica similar a la del PBI@M[COSANE] hasta los 450-650°C donde empieza a degradarse y ser menos estable. Mientras que el PBI@M'[TPB] presenta una estabilidad térmica pobre llegando a retener a 800°C un 45 (PBI@Li[TPB]) y un 56% en peso (PBI@Na[TPB]).

-----Polímeros dopados con metalacarboranos-----

- ✓ Se ha estudiado la conductividad iónica del PBI, PBI@M[COSANE] y PBI@M'[TPB] mediante la espectroscopía de impedancia en el rango de temperaturas de 20 a 180°C, observando dos comportamientos distintos de 20 a 100°C y de 100 a 150°C. Se han comparado los valores de conductividad iónica del PBI dopado con H[COSANE] y con H₃PO₄, observando una diferencia de dos órdenes de magnitud a favor del H₃PO₄. Si se tiene en cuenta que el H₃PO₄ está en una proporción del 300%, mientras que el H[COSANE] está al 5%, se puede pensar que el H[COSANE] podría ser utilizado como aditivo de PBI en pilas de combustible. En cambio el resto de muestras presentan valores muy inferiores de conductividad iónica en comparación con los reportados a 25°C en baterías.

Objetivo 2: Estudio de las propiedades del PEDOT dopado con M[COSANE] (M = Cs⁺, Na⁺, Li⁺ y H⁺) y con Cs[Cl_x-COSANE] (x = 2, 4 y 6) para su uso en supercondensadores.

- ✓ Se ha polimerizado electroquímicamente el EDOT utilizando como anión dopante el M[COSANE] (M = Cs⁺, Na⁺, Li⁺ y H⁺) mediante la voltametría cíclica, observando un comportamiento diferente para cada una de las muestras, tanto en intensidad como en la forma y los potenciales de los picos de oxidación y de reducción formados. Este comportamiento sugiere que los cationes del anión dopante juegan un papel importante en la polimerización electroquímica del PEDOT y en consecuencia en sus propiedades electroquímicas y fisicoquímicas.
- ✓ Se han estudiado las propiedades electroquímicas del PEDOT dopado con M[COSANE] mediante las técnicas de CV y LSV. Los voltagramas cíclicos muestran dos procesos redox, uno debido al Co^{3+/2+} y el otro debido al polímero, aunque ambos procesos se ven afectados con los diferentes cationes (valores de potencial y forma). Además, al calcular la capacidad específica también se han obtenido valores distintos según el catión utilizado, siendo el valor más alto el del PEDOT:Cs[COSANE]. En cambio, el límite de resistencia a la sobreoxidación es independiente del catión, siendo el valor en todos los casos sobre 1.06 V.

-----Polímeros dopados con metalacarboranos-----

- ✓ Se ha confirmado por EDX la presencia de COSANE y de los cationes en la estructura del polímero formado, dependiendo de la sal de COSANE utilizada se obtiene una proporción monómero de EDOT por molécula de COSANE diferente (2:1 para Cs y H, y 3:1 para Na y Li). Respecto a la morfología, todas las muestras presentan formas esféricas de tamaños similares entre 2.5 y 1 μm .
- ✓ También se ha calculado la conductividad eléctrica y se ha medido la estabilidad térmica de las muestras PEDOT:M[COSANE]. En ambos casos la influencia de los cationes del COSANE hace que las propiedades de los polímeros no sean las mismas y que el Cs[COSANE] sea el mejor dopante del PEDOT.
- ✓ Se ha polimerizado electroquímicamente el EDOT utilizando como anión dopante el Cs[Cl_x-COSANE] (x = 2, 4 y 6) y el PSS para ver la influencia de utilizar diferentes aniones electroactivos con valores de potencial redox distintos y compararlos con el PEDOT:PSS. Los voltagramas cíclicos obtenidos al utilizar el Cl₂-COSANE y el Cl₄-COSANE muestran dos procesos redox independientes, mientras que al utilizar el Cl₆-COSANE estos dos procesos están solapados debido a que el potencial redox está desplazado hacia valores más positivos. En cambio el PEDOT:PSS tiene un voltagrama cíclico completamente distinto.
- ✓ Se ha caracterizado el PEDOT:Cs[Cl_x-COSANE] y el PEDOT:PSS mediante las técnicas de CV y LSV, obteniendo el valor de capacidad específica y del límite de resistencia a la sobreoxidación más alto cuando se utiliza el Cs[Cl₆-COSANE] como dopante del PEDOT. Se ha visto que al solapar el proceso de crecimiento del polímero y del Co^{3+/2+} en la polimerización electroquímica del PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE], se obtienen los valores más altos de capacidad; y que al tener más enlaces B-Cl en la estructura, proporciona una mejor estabilidad a la degradación del polímero.
- ✓ Se ha comprobado la tendencia de cuanto mayor es el número de cloros en el COSANE, mejor propiedades tiene (mejor conductividad eléctrica y mejor estabilidad térmica), siendo el mejor dopante el Cs[Cl₆-COSANE].

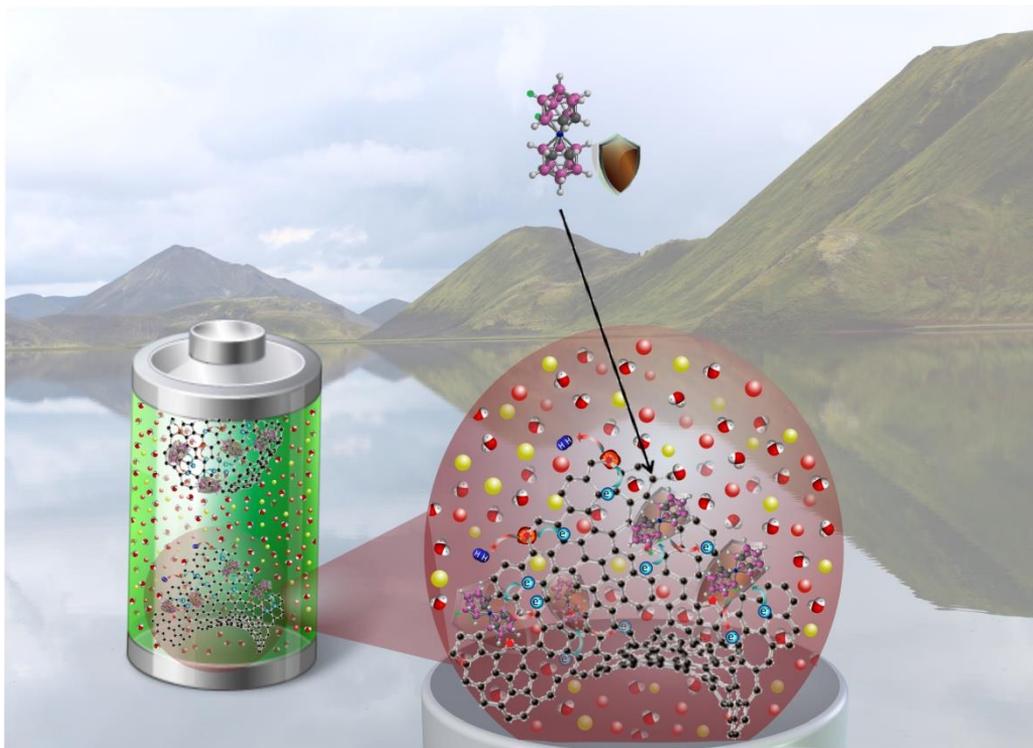
4.6. Referencias.

1. I. Fuentes, A. Andrio, F. Teixidor, C. Viñas and V. Compañ, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, **19**, 15177-15186.
2. I. Fuentes, A. Andrio, A. García-Bernabé, J. Escorihuela, C. Viñas, F. Teixidor and V. Compañ, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, **20**, 10173-10184.
3. S. Giri, S. Behera and P. Jena, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 13916-13919.
4. W. S. Tang, A. Unemoto, W. Zhou, V. Stavila, M. Matsuo, H. Wu, S.-i. Orimo and T. J. Udovic, *Energy Environ. Sci.*, 2015, **8**, 3637-3645.
5. T. J. Udovic, M. Matsuo, W. S. Tang, H. Wu, V. Stavila, A. V. Soloninin, R. V. Skoryunov, O. A. Babanova, A. V. Skripov and J. J. Rush, *Adv. Mater.*, 2014, **26**, 7622-7626.
6. T. J. Udovic, M. Matsuo, A. Unemoto, N. Verdal, V. Stavila, A. V. Skripov, J. J. Rush, H. Takamura and S.-i. Orimo, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 3750-3752.
7. R. B. Seymour and C. E. Carraher, *Introducción a la química de los polímeros*, Reverté, 1995.
8. T. F. Otero, *Revista Iberoamericana Polímeros*, 2003, **4**, 1-50.
9. S. J. Peighambardoust, S. Rowshanzamir and M. Amjadi, *Int. J. Hydrog. Energy*, 2010, **35**, 9349-9384.
10. A. Kraytsberg and Y. Ein-Eli, *Energy Fuels*, 2014, **28**, 7303-7330.
11. J. Escorihuela, R. Narducci, V. Compañ and F. Costantino, *Adv. Mater. Interfaces*, 2019, **6**, 1801146.
12. S. Muench, A. Wild, C. Friebe, B. Häupler, T. Janoschka and U. S. Schubert, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 9438-9484.
13. K. Amin, L. Mao and Z. Wei, *Macromol. Rapid Commun.*, 2019, **40**, 1800565.
14. J. Tarascon and M. Armand, *Nature*, 2001, **414**, 359-367.
15. J. B. Goodenough and Y. Kim, *Chem. Mater.*, 2009, **22**, 587-603.
16. Y. Shi, D. Tan, M. Li and Z. Chen, *Nanotechnology*, 2019.
17. Q. Wang, L. Jiang, Y. Yu and J. Sun, *Nano Energy*, 2019.
18. V. Palomares, P. Serras, I. Villaluenga, K. B. Hueso, J. Carretero-González and T. Rojo, *Energy Environ. Sci.*, 2012, **5**, 5884-5901.
19. K. Sharma, A. Arora and S. Tripathi, *J. Energy Storage*, 2019, **21**, 801-825.
20. G. A. Snook, P. Kao and A. S. Best, *J. Power Sources*, 2011, **196**, 1-12.
21. G. Wang, L. Zhang and J. Zhang, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 797-828.
22. H. Zhang, J. Li, C. Gu, M. Yao, B. Yang, P. Lu and Y. Ma, *J. Power Sources*, 2016, **332**, 413-419.
23. C. Masalles, S. Borrós, C. Viñas and F. Teixidor, *Adv. Mater.*, 2000, **12**, 1199-1202.
24. R. Núñez, I. Romero, F. Teixidor and C. Viñas, *Chem. Soc. Rev.*, 2016, **45**, 5147-5173.
25. R. Núñez, M. r. Tarrés, A. Ferrer-Ugalde, F. F. de Biani and F. Teixidor, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 14307-14378.
26. C. Masalles, J. Llop, C. Viñas and F. Teixidor, *Adv. Mater.*, 2002, **14**, 826-829.

27. S. Gentil, E. Crespo, I. Rojo, A. Friang, C. Viñas, F. Teixidor, B. Grüner and D. Gabel, *Polymer*, 2005, **46**, 12218-12225.
28. C. Masalles, S. Borrós, C. Viñas and F. Teixidor, *Adv. Mater.*, 2002, **14**, 449-452.
29. A. Pepiol, F. Teixidor, R. Sillanpää, M. Lupu and C. Viñas, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 12491-12495.
30. M. Tarrés, C. Viñas, A. M. Cioran, M. M. Hänninen, R. Sillanpää and F. Teixidor, *Chem. Eur. J.*, 2014, **20**, 15808-15815.
31. E. Crespo, S. Gentil, C. Vinas and F. Teixidor, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 18381-18386.
32. C. Masalles, S. Borros, C. Vinas and F. Teixidor, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **372**, 513-518.
33. I. M. De Oliveira, D. Risco, F. Vocanson, E. Crespo, F. Teixidor, N. Zine, J. Bausells, J. Samitier and A. Errachid, *Sens. Actuators B Chem.*, 2008, **130**, 295-299.
34. V. David, C. Viñas and F. Teixidor, *Polymer*, 2006, **47**, 4694-4702.
35. B. Fabre, E. Hao, Z. M. LeJeune, E. K. Amuhaya, F. Barrière, J. C. Garno and M. G. H. Vicente, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2010, **2**, 691-702.
36. J. Brus, A. Zhigunov, J. í. Czernek, L. Kobera, M. Uchman and P. Matějček, *Macromolecules*, 2014, **47**, 6343-6354.
37. P. Matějček, J. i. Zedník, K. i. Ušelová, J. Pleštil, J. Fanfrik, A. Nykanen, J. Ruokolainen, P. Hobza and K. Procházka, *Macromolecules*, 2009, **42**, 4829-4837.
38. V. Ďord'ovič, M. Uchman, K. Procházka, A. Zhigunov, J. Pleštil, A. Nykänen, J. Ruokolainen and P. Matějček, *Macromolecules*, 2013, **46**, 6881-6890.
39. V. Ďord'ovič, M. Uchman, M. Reza, J. Ruokolainen, A. Zhigunov, O. I. Ivankov and P. Matějček, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 9884-9892.
40. Q. Li, J. O. Jensen, R. F. Savinell and N. J. Bjerrum, *Prog. Polym. Sci.*, 2009, **34**, 449-477.
41. S. M. Ahn, H. Y. Jeong, J.-K. Jang, J. Y. Lee, S. So, Y. J. Kim, Y. T. Hong and T.-H. Kim, *RSC Adv.*, 2018, **8**, 25304-25312.
42. L. Ding, X. Song, L. Wang, Z. Zhao and G. He, *Electrochim. Acta*, 2018, **292**, 10-19.
43. G. Alberti and M. Casciola, *Solid State Ionics*, 2001, **145**, 3-16.
44. P. Barbosa, N. C. Rosero-Navarro, F.-N. Shi and F. M. Figueiredo, *Electrochim. Acta*, 2015, **153**, 19-27.
45. M. F. Schuster and W. H. Meyer, *Annu. Rev. Mater. Res.*, 2003, **33**, 233-261.
46. Z. Zhao, G. F. Richardson, Q. Meng, S. Zhu, H.-C. Kuan and J. Ma, *Nanotechnology*, 2015, **27**, 042001.
47. A. Zaullet, *On the verge of bioorganic and inorganic chemistry metallacarboranes in nanomedicine*, 2015, **Tesis**.

CAPÍTULO 5

USO DEL METALACARBORANO COMO MEDIADOR PARA AUMENTAR LA ESTABILIDAD DE SUPERCONDENSADORES ACUOSOS BASADOS EN CARBÓN ACTIVADO



RESUMEN DEL CAPÍTULO 5¹

Este capítulo se basa principalmente en utilizar el metalacborano $\text{Na}[\text{Cl}_4\text{-COSANE}]$ como aditivo en el carbón activado comercial YP50F, y utilizarlo en un supercondensador acuoso asimétrico para mejorar la densidad de energía del dispositivo. Para ello, se adsorben distintas cantidades de $\text{Cl}_4\text{-COSANE}$ en los poros del carbón activado (0.15, 0.45 y 1.00 mmol/g), se caracteriza mediante isoterma de adsorción de N_2 , DRX y XPS, y se mide en una celda de 3 electrodos la capacidad específica y la ventana de potencial de trabajo estable en la ventana positiva y negativa. Todo para luego montar el supercondensador en Na_2SO_4 0.5 M y comprobar que la presencia de $\text{Cl}_4\text{-COSANE}$ en el carbón activado protege y estabiliza al electrodo de las reacciones de oxidación que lo degradan.

Índice del Capítulo

| | pag. |
|--|------|
| 5. USO DEL METALACARBORANO COMO MEDIADOR PARA AUMENTAR LA ESTABILIDAD DE SUPERCONDENSADORES ACUOSOS BASADOS EN CARBÓN ACTIVADO | 143 |
| 5.1. Estado actual. | 143 |
| 5.1.1. Carbones activados. | 143 |
| 5.1.2. Supercondensadores basados en carbón activado. | 144 |
| 5.1.3. Materiales carbonosos y metalacboranos. | 146 |
| 5.2. Objetivos. | 147 |
| 5.3. Adsorción del Cl ₄ -COSANE como aditivo del carbón activado. | 147 |
| 5.3.1. Isotherma de adsorción del Cl ₄ -COSANE en carbón activado. | 148 |
| 5.3.2. Isotherma de adsorción de N ₂ , DRX y XPS. | 149 |
| 5.4. Supercondensador acuoso asimétrico. | 151 |
| 5.4.1. Caracterización mediante una celda de 3 electrodos. | 152 |
| 5.4.2. Caracterización del supercondensador acuoso. | 154 |
| 5.5. Conclusiones. | 158 |
| 5.6. Referencias. | 160 |

5. USO DEL METALACBORANO COMO MEDIADOR PARA AUMENTAR LA ESTABILIDAD DE SUPERCONDENSADORES ACUOSOS BASADOS EN CARBÓN ACTIVADO

5.1. Estado actual.

Como se ha visto en el Capítulo 4, los metalacboranos presentan buenas propiedades para utilizarse en aplicaciones de energía. Se ha comprobado que las distintas sales de COSANE (Na, Li y H) tienen altas conductividades iónicas en húmedo² y en consecuencia se han utilizado para dopar el PBI en un 5%wt y estudiar sus propiedades fisicoquímicas y conductividad iónica para su uso en pilas de combustible y baterías.³ También se utilizaron distintas sales de COSANE (Cs, Na, Li y H) y derivados halogenados Cl_x-COSANE (x = 2, 4 y 6) para dopar al PEDOT y estudiar sus propiedades electroquímicas y fisicoquímicas para su uso en supercondensadores.

En este capítulo se utilizarán carbones activados comerciales que ya tienen una capacidad específica alta y se doparan con metalacboranos para ver si al dopar con una especie electroactiva mejora la capacidad o la estabilidad del material carbonoso en supercondensadores acuosos asimétricos.

5.1.1. Carbones activados.

Un carbón activado es un material carbonoso fabricado artificialmente a partir de cualquier materia prima rica en carbono mediante un proceso de activación específico, con el fin de dotarlo de una estructura porosa muy desarrollada y de una elevada superficie específica. Las principales características que presenta son su alta estabilidad térmica y química, su elevada superficie específica pudiendo llegar hasta los 3000 m²/g, su estructura porosa con una variedad de tamaños y disposiciones, y una química superficial modificable mediante la inserción de distintos heteroátomos y funcionalidades. Dependiendo del proceso de fabricación y de las características del carbón activado, se pueden encontrar aplicaciones en adsorción (tratamientos de aguas), catálisis (soporte de catalizadores) y almacenamiento de energía (supercondensadores).^{4,5}

---Metalacarboranos en supercondensadores---

Dentro de las características de los carbones activados, la química superficial tiene un papel muy importante, ya que con la incorporación de distintos heteroátomos se pueden modificar las propiedades del carbón activado original. De ella dependen la acidez, la polaridad, el grado de hidrofobicidad y la reactividad química superficial. Todos estos cambios son debidos al diferente tamaño atómico y de electronegatividad de los distintos heteroátomos con respecto al carbono.^{4,6}

Un carbón activado presenta una estructura muy desordenada formada por láminas de carbono sp^2 dobladas entre sí, que se enlazan unas con otras mediante grupos alifáticos puente (**Figura 5. 1**). Entre las láminas se crean huecos de distinto tamaño que dan lugar a la elevada porosidad de los carbones activados. Los grupos funcionales y heteroátomos que modulan la química superficial del carbón activado suelen disponerse más en los extremos de esas láminas gráficas.⁵

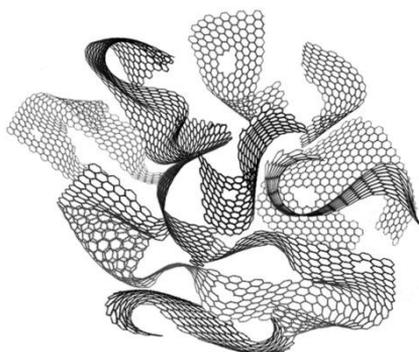


Figura 5. 1. Estructura de un carbón activado.

Por lo que se refiere a los heteroátomos que modifican la química superficial de un carbón activado, el oxígeno y el nitrógeno son los más abundantes y los que más aplicaciones presentan, siendo en consecuencia los heteroátomos más estudiados. Además del oxígeno y el nitrógeno, también hay otros heteroátomos que constituyen la química superficial de los carbones, como son el azufre, el boro, el fósforo y los elementos del grupo de los halógenos. Cabe decir, que cuando un carbón activado es dopado con metales su química superficial también es modificada.^{4,6,7}

5.1.2. Supercondensadores basados en carbón activado.

Como ya se ha explicado en el Capítulo 4, un supercondensador es un dispositivo electroquímico formado por dos electrodos separados por una membrana porosa y un electrolito. Los supercondensadores basados en carbón activado (ver **Figura 5. 2**) son conocidos como condensadores electroquímicos de doble capa, donde el mecanismo para almacenar carga tiene lugar mediante la formación de la doble capa eléctrica.⁸

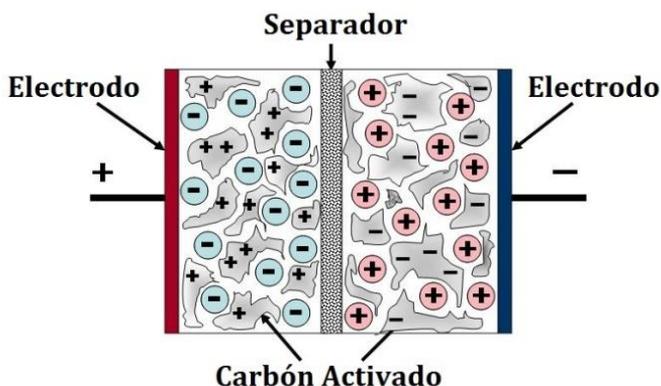


Figura 5. 2. Esquema de un supercondensador de doble capa eléctrica basado en carbón activado.

Aunque los supercondensadores son dispositivos con alta densidad de potencia, tienen como inconveniente que poseen baja densidad de energía. Muchas investigaciones se han centrado en solventar este problema, ya que a partir de la fórmula $E = 1/2C_g\Delta V^2$, donde C_g es la capacidad específica y ΔV el rango de la ventana de potencial, se podría incrementar la densidad de energía del supercondensador aumentando el rango de la ventana de potencial de trabajo o aumentando la capacidad específica del material.⁹

El máximo valor del rango de la ventana de potencial de trabajo depende de la estabilidad de los componentes del supercondensador (electrodo, disolvente y electrolito). En electrolitos acuosos el ΔV utilizado es de 1.2 V, mientras que en sistemas orgánicos es de 2.7 V y en líquidos iónicos de 3 V. Aunque el uso de líquidos iónicos y de disolventes orgánicos proporcionen una mayor densidad de energía, el uso de electrolitos acuosos proporciona ventajas en cuanto a seguridad, rendimiento de potencia y bajo coste.¹⁰

Por tanto, para poder maximizar el valor de ΔV usando electrolitos acuosos se debe aumentar el sobrepotencial de las reacciones de descomposición del agua,^{11, 12} para ello se deben usar electrolitos neutros como el Na_2SO_4 , en vez de electrolitos ácidos como el H_2SO_4 o básicos como el KOH , de esta manera se consigue aumentar la ventana de estabilidad y llegar a valores por encima de 2 V.^{13, 14} También se debe optimizar la relación de masas de los electrodos, a partir de las capacidades específicas y de los límites de estabilidad de cada uno de ellos.^{15, 16}

---Metalacarboranos en supercondensadores---

La química superficial de los carbones activados también es importante en cuanto a la estabilidad, es decir, la introducción de ciertos heteroátomos como el N o el P pueden retrasar la degradación de los electrodos causada por las reacciones electroquímicas de oxidación,^{17, 18} aunque ello conlleve a cambios importantes en porosidad.

En cuanto a la mejora de la capacidad específica se han utilizado aditivos electroactivos, ya que permiten almacenar energía a través de reacciones farádicas además de las capacitivas del carbón activado, como el par redox quinona/hidroquinona¹⁹ y el yodo.²⁰ Algunos aditivos también han sido utilizados para mejorar la estabilidad del supercondensador y aumentar el voltaje de trabajo, protegiendo a los colectores de procesos de corrosión al aplicar altos voltajes durante la carga.²¹ Desafortunadamente ninguno de esos aditivos consigue reducir la descomposición electroquímica del agua o evitar la degradación electroquímica de los electrodos de carbón activado.

5.1.3. Materiales carbonosos y metalacarboranos.

Dentro de la gran variedad de materiales carbonosos que hay, únicamente los nanotubos de carbono y el grafeno han sido estudiados conjuntamente con los metalacarboranos.^{22, 23} No hay ningún estudio en la bibliografía sobre metalacarboranos utilizados en supercondensadores.

En el caso del nanotubo de carbono se ha enlazado covalentemente la molécula de COSANE-DIOXANATO a la superficie del CNT mediante ácidos carboxílicos (previamente generados en la superficie al oxidar con HNO_3). Se confirmó la presencia del COSANE en la superficie del CNT por ATG y XPS; además se comprobó la tendencia a la dispersión en agua siendo mayor para el CNT-COSANE que para el CNT. Y por último, se observó mediante HRTEM y STEM el COSANE enlazado al nanotubo de carbono.²²

En el caso del grafeno también se ha enlazado covalentemente la molécula de COSANE-DIOXANATO a la superficie mediante ácidos carboxílicos y se ha caracterizado por IR, ATG y XPS, confirmando en todos los casos la presencia del COSANE en la superficie del grafeno. Y por último, se observó mediante EFTEM y EELS un *mapping* de una zona donde por colores se distingue el COSANE del grafeno, teniendo una distribución homogénea.²³

5.2. Objetivos.

Los objetivos de este capítulo se basan principalmente en utilizar un derivado del metalacarborano como aditivo en un carbón activado y utilizarlo en un supercondensador acuoso asimétrico para mejorar la densidad de energía del dispositivo.

- Estudio de la adsorción del Cl₄-COSANE como aditivo en un carbón activado mediante isoterma de adsorción, UV-Visible, isoterma de adsorción de N₂, DRX y XPS.
- Estudio de las propiedades electroquímicas del supercondensador acuoso asimétrico utilizando como electrodo el carbón activado con el Cl₄-COSANE para mejorar la densidad de energía del dispositivo.

5.3. Adsorción del Cl₄-COSANE como aditivo del carbón activado.

Como el objetivo final de este trabajo es mejorar la densidad de energía de un supercondensador usando un aditivo electroactivo en el electrodo de carbón activado, uno de los requisitos que tiene que cumplir el aditivo es tener el proceso redox en el rango de la ventana de potencial de trabajo del carbón activado (pudiendo aumentar el valor de la capacidad específica) y que dicho proceso redox esté lo más cerca posible de los extremos de la ventana de estabilidad del supercondensador (pudiendo aumentar el valor de ΔV del supercondensador y proteger al electrodo de la degradación).

No es fácil encontrar una molécula electroactiva en la que poder ajustar el potencial redox deseado a partir de su funcionalización y que siga teniendo las mismas propiedades. Por ese motivo se ha utilizado en este trabajo el metalacarborano, ya que como se ha visto en el Capítulo 4 a partir de la halogenación del COSANE se puede modular el potencial redox. De los distintos derivados de COSANE se ha elegido el Cl₄-COSANE (ver **Figura 5. 3**), ya que posee un potencial redox de -0.86 V vs Ag/AgCl. Se ha utilizado la sal de Na para que sea soluble en agua y el pH sea neutro.

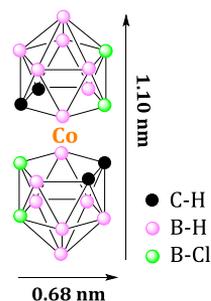


Figura 5. 3. Estructura del Cl₄-COSANE.

-----Metalacarboranos en supercondensadores-----

El carbón activado elegido para este estudio es el YP50F, carbón activado comercial específicamente diseñado para su uso en supercondensadores, con un área superficial de 2050 m²/g y un volumen de microporo de 0.86 cm³/g. La química superficial del YP50F revela que tiene una baja proporción de grupos oxigenados en la superficie (quinonas, éteres, ácidos carboxílicos), favoreciendo que el carbón activado no sea degradado tan fácilmente (la degradación del carbón activado en un supercondensador empieza en los grupos oxigenados superficiales).

Este trabajo se ha hecho en colaboración con el doctor Ramiro Ruiz, con el catedrático Diego Cazorla y con la catedrática Emilia Morallón del Instituto Universitario de Materiales de Alicante y de la Universidad de Alicante.

5.3.1. Isotherma de adsorción del Cl₄-COSANE en carbón activado.

Como el carbón activado YP50F tiene microporosidad (diámetro del poro < 2 nm) y el Cl₄-COSANE mide 0.68 x 1.10 nm, la intención es adsorber las moléculas del metalacarborano en los poros del carbón activado. Para ello, se tiene que hacer un estudio previo de la isoterma de adsorción del Cl₄-COSANE en el carbón activado a diferentes temperaturas (**Figura 5. 4 a**), para poder observar cuando se satura completamente los poros del carbón activado y comprobar si la adsorción es dependiente de la temperatura.

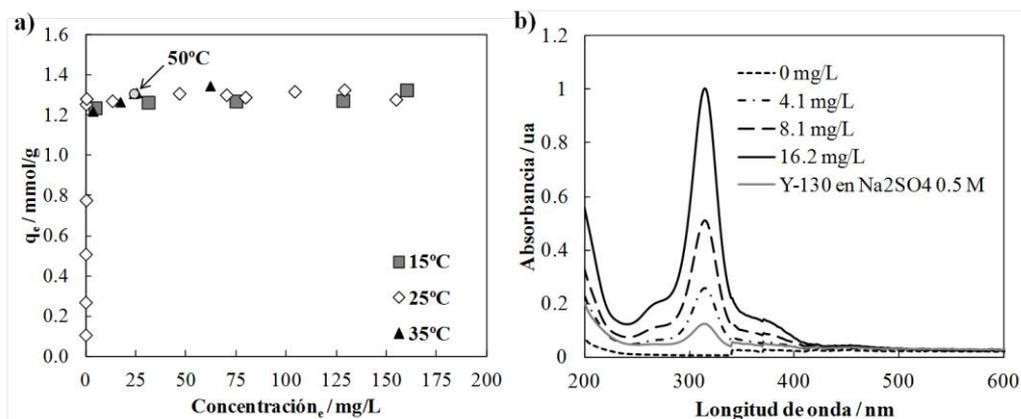


Figura 5. 4. a) Isotherma de adsorción del Na[Cl₄-COSANE] a diferentes temperaturas (15, 25, 35 y 50°C) representando la concentración en equilibrio en mg/L y la carga en equilibrio en mmol Cl₄-COSANE/g de YP50F. b) Espectros de absorción del Na[Cl₄-COSANE] utilizados durante la adsorción con el carbón activado.

Para hacer la isoterma de adsorción se preparan varias disoluciones a distintas concentraciones de Na[Cl₄-COSANE] en agua Milli-Q con 10 mg de YP50F previamente secado. Todas estas muestras se dejan durante 36h en una incubadora con agitación a las temperaturas de 15, 25, 35 y 50°C. Pasadas las 36h se mide el espectro de absorción del Na[Cl₄-COSANE] que queda en disolución y no se ha adsorbido en los poros del carbón activado (**Figura 5. 4 b**), siendo el valor de concentración en el equilibrio (eje x de la **Figura 5. 4 a**). Sabiendo la concentración de Cl₄-COSANE en el equilibrio y la inicial, se calcula la cantidad adsorbida en el carbón activado en mmol/g de carbón activado (eje y en la **Figura 5. 4 a**).

Por tanto, a partir de la isoterma de adsorción del Cl₄-COSANE en YP50F se puede observar como el metalacarborano es adsorbido en los poros del carbón activado con gran afinidad, adsorbiendo todas las moléculas de Cl₄-COSANE en disolución hasta llegar a la saturación a 1.25 mmol/g. A medida que se incrementa la concentración del Cl₄-COSANE se mantiene constante el valor de saturación a 1.25 mmol/g, coexistiendo con la concentración en equilibrio del metalacarborano sobrante. También se ha comprobado que la adsorción es independiente de la temperatura, ya que tanto a 25°C como a 15, 35 y 50°C se llega a la saturación a 1.25 mmol/g. Por último, se ha estudiado la presencia del electrolito (Na₂SO₄ 0.5 M) en un carbón activado cargado a 1.3 mmol/g durante 24h, observando por UV-Visible (**Figura 5. 4 b**) que únicamente el 0.3% del total es liberado de los poros, indicando la gran afinidad que presenta el Cl₄-COSANE con el YP50F.

A partir de los resultados obtenidos de la isoterma de adsorción, se utilizan las cargas de 0.15, 0.45 y 1 mmol Cl₄-COSANE/g YP50F. La nomenclatura utilizada a partir de ahora para las distintas muestras es Y-XXX, siendo XXX los mmol/g utilizados. Por tanto las muestras serán Y-000, Y-015, Y-045 y Y-100, siendo Y-000 el carbón activado YP50F y Y-100 el carbón activado cargado con 1.00 mmol/g.

5.3.2. Isotherma de adsorción de N₂, DRX y XPS.

Antes de utilizar las distintas muestras (Y-000, Y-015, Y-045 y Y-100) en el supercondensador, se caracterizan fisicoquímicamente para confirmar la presencia del metalacarborano en los poros del carbón activado y para

saber cómo afecta la presencia de más o menos cantidad de Cl₄-COSANE a las propiedades del carbón YP50F. En la **Figura 5. 5 a** se pueden observar las distintas isothermas de adsorción de N₂ de las muestras Y-000, Y-015, Y-045 y Y-100, observando que a medida que hay más moléculas de Cl₄-COSANE en los poros, la adsorción del N₂ se va reduciendo llegando a tener valores del área superficial específica (S_{BET}) de 2050, 1530, 1140 y 60 m²/g y de volumen de microporo (V_{DR}) de 0.86, 0.60, 0.47 y 0.02 cm³/g para Y-000, Y-015, Y-045 y Y-100, respectivamente. Y en la **Figura 5. 5 b** se puede observar la distribución de tamaño de poros para cada una de las muestras, confirmando que el Cl₄-COSANE se coloca preferencialmente en los poros de tamaños entre 0.7 y 1.5 nm, como era de esperar debido a su tamaño.

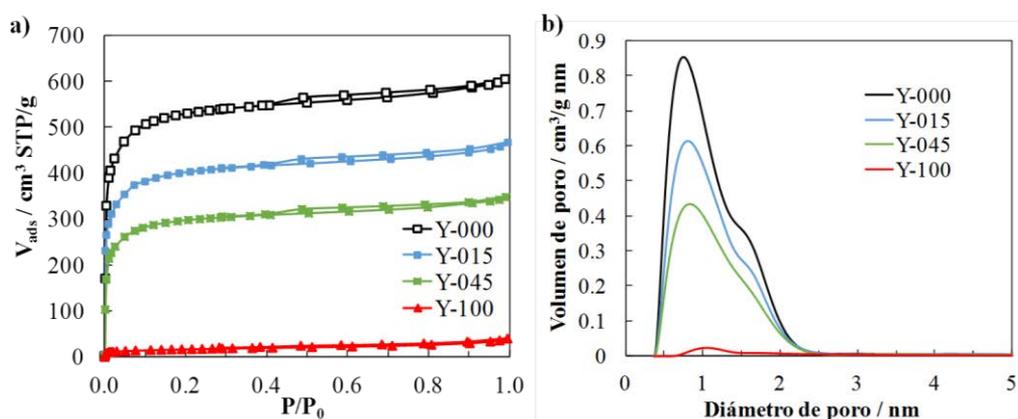


Figura 5. 5. a) Isothermas de adsorción de N₂ y b) curvas de distribución de tamaño de poro de las muestras Y-000 (negro), Y-015 (azul), Y-045 (verde) y Y-100 (rojo).

Por lo que respecta al análisis de difracción de Rayos-X (DRX, **Figura 5. 6 a**), se puede observar como la curva de la muestra Y-000 por debajo de los 10° (en 2 θ) se vuelve más intensa, lo cual es un comportamiento característico de sólidos microporosos; mientras que en la muestra Y-100 al tener todos los poros llenos de Cl₄-COSANE no se observa dicho comportamiento. Además, en el sólido cristalino Na[Cl₄-COSANE] se observan picos característicos que en la muestra Y-100 desaparecen, sugiriendo que el Cl₄-COSANE tiene una fuerte interacción con la superficie del carbón activado impidiendo el reordenamiento de las moléculas de metalacarborano dentro de los poros.

Por último, el análisis de XPS (**Figura 5. 6 b**) confirma la presencia de boro dentro de los poros de las muestras Y-015 y Y-045. Cabe decir que el carbón activado YP50F no está dopado con boro, por tanto las señales de boro de las muestras Y-015 y Y-045 corresponden completamente al $\text{Cl}_4\text{-COSANE}$. También se observa la aparición de una nueva banda a 192.1 eV para Y-015 y a 192.8 eV para Y-045 que no es presente en el sólido $\text{Na}[\text{Cl}_4\text{-COSANE}]$, y además la banda característica del metalacarborano a 189.2 eV está ligeramente desplazada a 188.8 eV para Y-015 y a 189.0 eV para Y-045 confirmando la fuerte interacción entre el $\text{Cl}_4\text{-COSANE}$ adsorbido y la superficie del carbón activado.

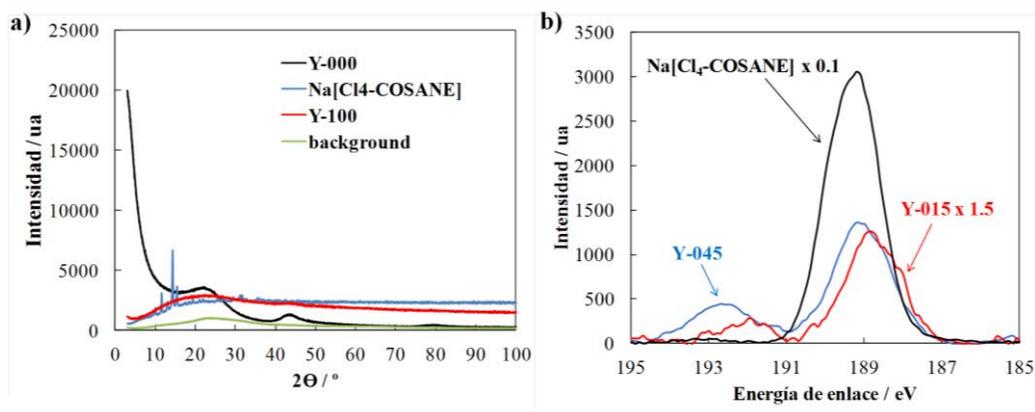


Figura 5. 6. a) Espectro de difracción de Rayos-X de la muestra Y-000 (negro), $\text{Na}[\text{Cl}_4\text{-COSANE}]$ (azul), Y-000 (rojo) y del fondo (verde). b) Espectro de XPS de $\text{Na}[\text{Cl}_4\text{-COSANE}]$ (negro), Y-015 (rojo) y Y-045 (azul).

5.4. Supercondensador acuoso asimétrico.

Una vez caracterizado el carbón activado en ausencia y en presencia de $\text{Cl}_4\text{-COSANE}$ (Y-000, Y-015, Y-045 y Y-100), se preparan las muestras para ser utilizadas en supercondensadores como electrodos. Para ello se prepara una pasta del carbón activado con negro de acetileno y PTFE en proporción 90:5:5 en peso, respectivamente. Primero se caracterizaran los electrodos en una celda de 3 electrodos para saber el rango de potencial de trabajo estable y el valor de las capacidades específicas, para luego optimizar las masas de los electrodos y poder medir en una celda de 2 electrodos los valores de capacidad específica y de energía del supercondensador acuoso durante 5000 ciclos de carga y descarga.

5.4.1. Caracterización mediante una celda de 3 electrodos.

Se caracterizan los electrodos Y-000, Y-015, Y-045 y Y-100 con una celda de 3 electrodos, siendo el electrodo de referencia Ag/AgCl y el auxiliar el electrodo Y-000 pero con el doble de masa que el electrodo de trabajo. Se utiliza una membrana de nylon para separar el electrodo de trabajo y el auxiliar y Na_2SO_4 0.5 M como electrolito.

En la **Figura 5. 7 a** se puede observar el voltagrama cíclico de los electrodos Y-000 y Y-100 en la ventana de potencial negativa, es decir, desde el OCP (potencial a circuito abierto) hasta -1.3 V, que es donde normalmente operan los supercondensadores.

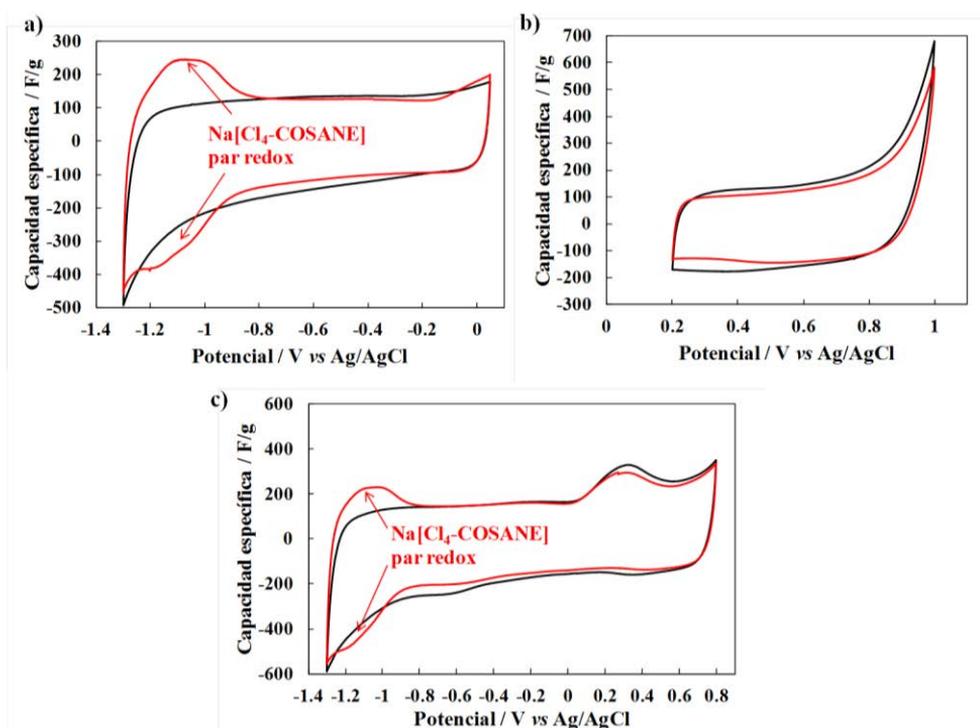


Figura 5. 7. Voltagramas cíclicos de los electrodos Y-000 (negro) y Y-100 (rojo) en la ventana de potencial a) negativa, b) positiva y c) completa en Na_2SO_4 0.5 M a 2 mV/s.

En el electrodo Y-100 se observa el par redox reversible del Cl_4 -COSANE a -1.1 V, aunque se ha visto que a medida que pasan los ciclos la intensidad disminuye debido a la desorción de una pequeña cantidad de Cl_4 -COSANE (sólo el 53% del Cl_4 -COSANE inicial se mantiene en el electrodo, es decir,

0.53 mmol/g, coincidiendo con los 0.52 mmol/g de grupos oxigenados superficiales del YP50F). Además, el hecho de tener el par redox dentro de la ventana de potencial de trabajo hace que aumente el área del voltagrama y en consecuencia su capacidad específica en comparación con el electrodo Y-000 (ver **Tabla 5. 1**).

En el caso del electrodo Y-000 se puede observar como a partir de -1 V empieza el proceso de electroadsorción del hidrógeno, mientras que en el electrodo Y-100 la intensidad de dicho proceso se ve reducida a causa del proceso farádico del Cl₄-COSANE. El mismo comportamiento tiene lugar en la ventana positiva (**Figura 5. 7 b**), en este caso el Y-100 presenta menores corrientes de oxidación y menores contribuciones de procesos redox asociados a la presencia de grupos electroactivos oxigenados superficiales del carbón activado, con la consecuencia de tener una capacidad específica más pequeña que el electrodo Y-000 (ver **Tabla 5. 1**).

Por lo que respecta a la ventana de potencial de trabajo completa (**Figura 5. 7 c**), se puede ver como la presencia del Cl₄-COSANE en el electrodo Y-100 reduce el proceso redox asociado a los grupos oxigenados superficiales del carbón activado y reduce el pico de oxidación a potenciales positivos altos.

Tabla 5. 1. Valores de capacidad específica en F/g de los electrodos Y-000, Y-015, Y-045 y Y-100 de la ventana positiva (del OCP a 0.9 V) y de la ventana negativa (del OCP a -1.3 V).

| Electrodo | C_g^{OCP/0.9 V} F/g | C_g^{OCP/-1.3 V} F/g |
|------------------|--|---|
| Y-000 | 149 | 135 |
| Y-015 | 125 | 150 |
| Y-045 | 130 | 162 |
| Y-100 | 120 | 168* |

*el valor no es estable

Todos estos resultados confirman que la presencia de Cl₄-COSANE modifica el comportamiento electroquímico de la interfase electrodo/electrolito, en concreto en el proceso redox de los grupos oxigenados del carbón activado y en las reacciones de descomposición del agua. Una posible explicación a este hecho es que el Cl₄-COSANE se adsorbe en sitios del carbón activado que son más susceptibles a reaccionar, sugiriendo que una adsorción adecuada de Cl₄-COSANE en el YP50F podría proteger al supercondensador acuoso cuando es expuesto a voltajes altos.

---Metalacarboranos en supercondensadores---

Por tanto, a partir de los estudios de Y-100 se elige el valor de 0.45 mmol/g como valor máximo para asegurar que todo el Cl₄-COSANE adsorbido queda retenido en el carbón activado. En consecuencia, sólo se utilizarán los electrodos Y-000, Y-015 y Y-045 en el supercondensador. En la **Tabla 5. 1** se pueden observar los valores de capacidad específica en la ventana de potencial de trabajo positiva y negativa. Estos valores serán utilizados posteriormente para calcular el balance de masas.

5.4.2. Caracterización del supercondensador acuoso.

Para montar el supercondensador (celda de 2 electrodos) se utilizará el mismo material como electrodo positivo y negativo, ya que la presencia de Cl₄-COSANE en la ventana negativa (mejor valor de capacidad específica y menor corriente en la reacción de evolución de hidrógeno) y en la ventana positiva (menor corriente de oxidación y menor contribución de los procesos redox de los grupos oxigenados superficiales del carbón activado) puede ser beneficiosa para el supercondensador.

Por tanto, para optimizar el supercondensador en Na₂SO₄ 0.5 M se hace un balance de masas de los electrodos con la siguiente ecuación:

$$\frac{m^+}{m^-} = \frac{C_g^- \cdot \Delta V^-}{C_g^+ \cdot \Delta V^+} \quad (9)$$

Siendo m⁺ y m⁻ la masa del electrodo en la ventana positiva y negativa respectivamente; C_g⁺ y C_g⁻ la capacidad específica en la ventana positiva y negativa respectivamente; y ΔV⁺ y ΔV⁻ la ventana de potencial de trabajo positiva y negativa respectivamente.

Una vez sabido el balance de masas de cada uno de los electrodos (**Tabla 5. 2**), se construye el supercondensador separando los electrodos con una membrana de nylon humedecida con Na₂SO₄ 0.5 M. Cada electrodo será caracterizado en cuanto a capacidad específica y energía mediante las curvas de carga y descarga (GCD) a 1 A/g durante 5000 ciclos y con un potencial de trabajo del supercondensador de 2.2 V, siendo el potencial de trabajo más alto alcanzado para el Na₂SO₄.¹¹ Las ecuaciones utilizadas para calcular la capacidad específica y la energía a partir de las curvas GCD son las siguientes:

$$C_g = \frac{Q}{\Delta V \cdot w} \quad (10)$$

$$E = \frac{\int_0^Q \Delta V \cdot dQ}{3.6 \cdot w} \quad (11)$$

Siendo Q la carga total medida durante la descarga en culombios, ΔV la ventana de potencial de trabajo en voltios y w la masa de la fase activa en g.

En la **Tabla 5. 2** se pueden observar los valores de capacidad específica y de energía en los primeros ciclos del supercondensador, siendo superiores en ambos casos para el electrodo Y-000, aunque los electrodos Y-015 y Y-045 tiene valores muy cercanos. Pero al cabo de 5000 ciclos de carga y descarga la capacidad específica retenida y la energía retenida es mucho mayor para el electrodo Y-015, reteniendo un 79% de la capacidad específica y un 68% de la energía inicial. En cambio el electrodo Y-000 sólo retiene un 23% de la capacidad específica y un 8% de la energía, valores muy inferiores a los del electrodo Y-015. El electrodo Y-045 presenta mejores valores que el Y-000, pero no superiores a los del Y-015.

Tabla 5. 2. Valores de m⁺/m⁻, capacidad específica y energía del inicio del supercondensador y capacidad específica y energía en % retenido al cabo de 5000 ciclos de carga y descarga.

| Muestra | m ⁺ /m ⁻ | C _g F/g | E Wh/kg | C _g %retenido* | E %retenido* |
|---------|--------------------------------|-----------------------|------------|------------------------------|-----------------|
| Y-000 | 1.3 | 33 | 16.3 | 23 | 8 |
| Y-015 | 1.8 | 30 | 15.7 | 79 | 68 |
| Y-045 | 1.9 | 29 | 13.0 | 32 | 21 |

* después de 5000 ciclos

En la **Figura 5. 8** se pueden observar las curvas de GCD de 50 a 5000 ciclos de los supercondensadores Y-000 y Y-015. En el caso del Y-000 se puede ver como a medida que pasan más ciclos, el perfil de la curva de carga y descarga se va reduciendo en tiempo (valores de capacidad específica y de energía menores), aumentando la caída óhmica e indicando la degradación del dispositivo. En cambio, en el caso del Y-015 se puede ver como el perfil de la curva de carga y descarga es muy similar a medida que pasan los ciclos, aunque con un mínimo impacto en el rendimiento del dispositivo (a 5000 ciclos se reduce el tiempo de 140 a 100 segundos), haciendo que el supercondensador sea más estable que el de Y-000.

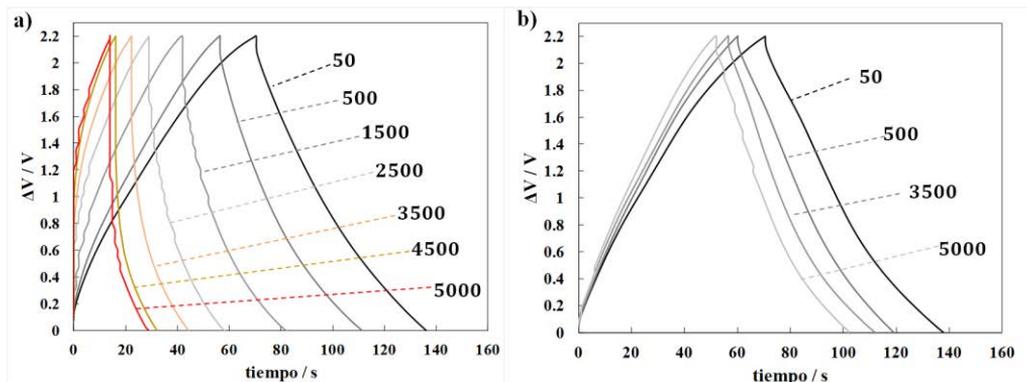


Figura 5. 8. Test de durabilidad de los supercondensadores a) Y-000 y b) Y-015 con la masa de los electrodos optimizada, curvas de GCD a 1 A/g y ΔV de 2.2 V de 50 a 5000 ciclos.

Como se puede ver en la **Figura 5. 9** el supercondensador Y-015 presenta valores de capacidad específica y densidad de energía muy superiores a los del Y-000 al cabo de 5000 ciclos de carga y descarga. El supercondensador Y-000 no es estable en las condiciones de potencial de trabajo de 2.2 V con una densidad de corriente de 1 A/g en Na_2SO_4 0.5 M durante 5000 ciclos, mientras que la presencia de Cl_4 -COSANE en el carbón activado (0.15 mmol/g) hace que sea más estable, reteniendo un 68% de la energía y un 79% de la capacidad específica al cabo de 5000 ciclos.

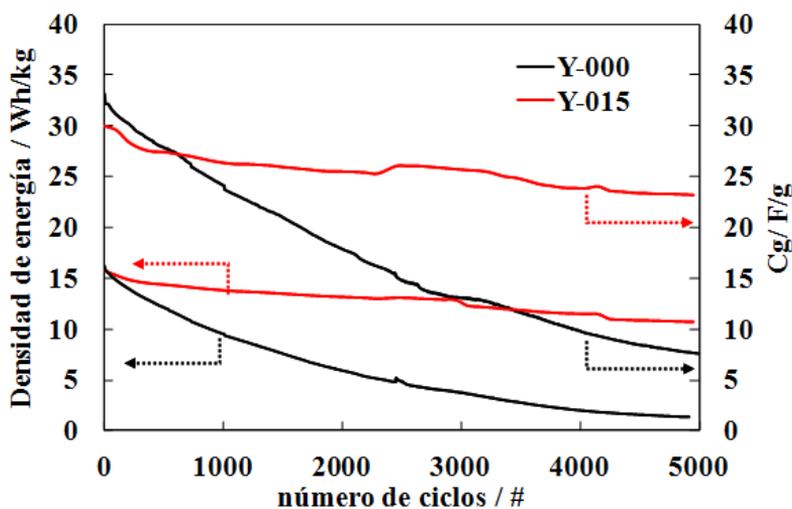


Figura 5. 9. Representación gráfica de la densidad de energía y capacidad específica en función del número de ciclos de carga y descarga de los supercondensadores Y-000 (negro) y Y-015 (rojo).

Una vez hecho el test de durabilidad se cogen esos supercondensadores de Y-000 y Y-015 y se les hace otro test donde se mantiene fijo el potencial a 2.2 V y se mide la curva de GCD cada 2h. En la **Figura 5. 10 a** se puede ver como el supercondensador Y-015 resiste las primeras 2h, pero a medida que pasa el tiempo se va degradando cada vez más hasta llegar a las 10h donde se degrada completamente. En cambio, en la **Figura 5. 10 b** se puede observar como el supercondensador Y-000 a las 2h ya está destruido.

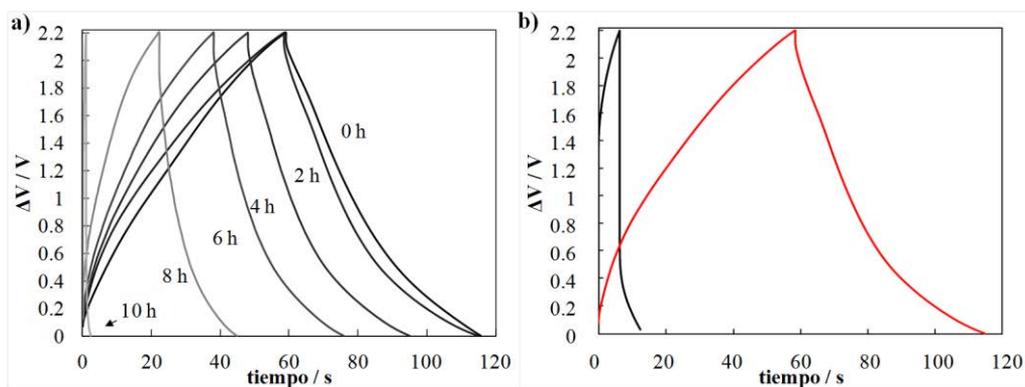


Figura 5. 10. Curvas de GCD de los supercondensadores después de hacer el test de durabilidad y mantenerse al potencial fijo de 2.2 V durante horas. a) Supercondensador Y-015 durante 2, 4, 6, 8 y 10h y b) supercondensador Y-000 (negro) y Y-015 (rojo) durante 2h.

Es la primera vez que un supercondensador como el Y-015 llega a tener esa estabilidad en las condiciones de 2.2 V a 1 A/g durante 5000 ciclos, con Na_2SO_4 0.5 M como electrolito.¹¹ Aunque los valores de capacidad son del mismo orden que de un carbón activado convencional, el valor de densidad de energía es superior al de electrolitos ácidos o básicos,²⁴ y del mismo orden que electrolitos tóxicos orgánicos,²⁵ aditivos redox¹⁹ o electrodos híbridos con nanotubos y polímeros conductores.¹⁶

Para comprobar que el Cl_4 -COSANE ayuda a proteger al carbón activado frente a la oxidación del carbón y la descomposición del agua, se analiza la química superficial del electrodo positivo Y-000 y Y-015 después del test de estabilidad mediante la técnica de desorción a temperatura programada (TPD), ver **Figura 5. 11**. El electrodo Y-015 presenta una menor cantidad de grupos oxigenados superficiales en comparación con el electrodo Y-000, sugiriendo que el Cl_4 -COSANE interacciona con los grupos oxigenados superficiales del carbón activado protegiéndolos frente a su degradación.

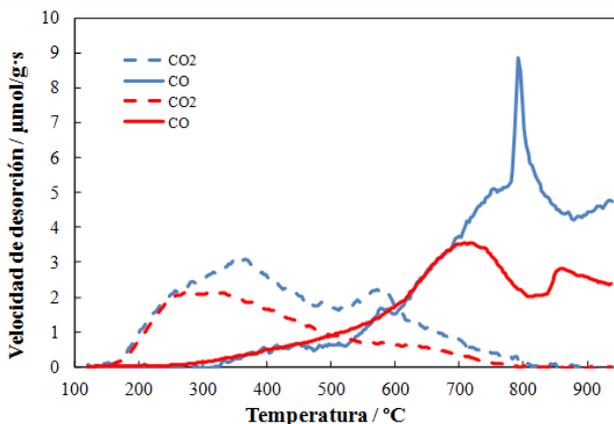


Figura 5. 11. Curva de TPD de CO y CO₂ de los electrodos positivos Y-000 (azul) y Y-015 (rojo) después del test de durabilidad a 2.2 V.

5.5. Conclusiones.

En este apartado se resumirán los resultados más relevantes obtenidos en cada uno de los objetivos propuestos:

Objetivo 1: Adsorción del aditivo Cl₄-COSANE en el carbón activado.

- ✓ Se ha estudiado la adsorción del aditivo Cl₄-COSANE en los poros del carbón activado YP50F, observando en la isoterma de adsorción como las moléculas del metalacarborano en disolución son completamente adsorbidas en los poros hasta llegar a la saturación de 1.25 mmol/g, indicando una gran afinidad entre el Cl₄-COSANE y el carbón activado. También se ha comprobado que la adsorción es independiente de la temperatura y no compite con el electrolito Na₂SO₄.
- ✓ Se han caracterizado las muestras Y-000, Y-015, Y-045 y Y-100 por isoterma de adsorción de N₂, DRX y XPS. Se ha confirmado la presencia del Cl₄-COSANE en los poros de las muestras Y-015, Y-045 y Y-100, disminuyendo el área superficial específica y el volumen de microporos a medida que había más cantidad de Cl₄-COSANE adsorbido en los poros. También se ha confirmado por XPS la fuerte interacción que tiene el Cl₄-COSANE adsorbido con la superficie del carbón activado, ya que han aparecido nuevas bandas a energías de enlace sobre 192 eV que en el sólido Na[Cl₄-COSANE] no aparecen.

Objetivo 2: Supercondensador acuoso asimétrico.

- ✓ Se han caracterizado los electrodos Y-000, Y-015, Y-045 y Y-100 en una celda de 3 electrodos. Se ha medido el voltagrama cíclico de la ventana de potencial de trabajo negativa (del OCP a -1.3 V), positiva (del OCP a 0.9 V) y completa (de -1.3 a 0.9 V), observando que la presencia de Cl₄-COSANE modifica el comportamiento electroquímico de la interfase electrodo/electrolito comparado con el electrodo Y-000, en concreto en el proceso redox de los grupos oxigenados del carbón activado y en las reacciones de descomposición del agua.
- ✓ También se ha comprobado que si hay mucho Cl₄-COSANE adsorbido al carbón activado, a medida que pasan los ciclos de oxidación y reducción tiene lugar la desorción de pequeñas cantidades de metalacarborano (el electrodo Y-100 pasa a 0.53 mmol/g de Cl₄-COSANE retenido). Por tanto, se elige el valor de 0.45 mmol/g como valor máximo para asegurar que todo el Cl₄-COSANE adsorbido queda retenido en el carbón activado. En consecuencia, sólo se utilizarán los electrodos Y-000, Y-015 y Y-045 en el supercondensador.
- ✓ Se ha utilizado el mismo material como electrodo positivo y negativo, ya que la presencia de Cl₄-COSANE en la ventana negativa y en la ventana positiva puede ser beneficiosa para el supercondensador. Por tanto, se han balanceado las masas para optimizar el supercondensador, se ha utilizado Na₂SO₄ 0.5 M como electrolito, se ha utilizado un potencial de trabajo de 2.2 V con una densidad de corriente de 1 A/g y se ha medido su estabilidad durante 5000 ciclos en carga y descarga.
- ✓ Se ha comprobado que el supercondensador Y-015 es más estable que el Y-000, ya que retiene un 79% de capacidad específica y un 68% de densidad de energía después de 5000 ciclos, mientras que el Y-000 sólo retiene un 23% de capacidad específica y un 8% de densidad de energía. Se ha analizado la química superficial del electrodo positivo Y-000 y Y-015 para confirmar la suposición de que el Cl₄-COSANE puede proteger al carbón activado frente a su degradación debido a que interacciona con los grupos oxigenados superficiales.

- ✓ Se ha realizado un test de estabilidad más agresivo, manteniendo fijo el potencial a 2.2 V durante horas, comprobando que el supercondensador Y-000 se degrada a las 2h, mientras que el Y-015 a las 2h todavía resiste pero a medida que van pasando las horas va degradándose hasta llegar a su completa degradación al cabo de 10h.

5.6. Referencias.

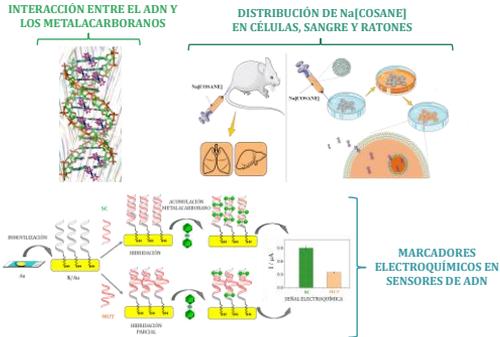
1. R. Ruiz-Rosas, I. Fuentes, C. Viñas, F. Teixidor, E. Morallón and D. Cazorla-Amorós, *Sustainable Energy Fuels*, 2018, **2**, 345-352.
2. I. Fuentes, A. Andrio, F. Teixidor, C. Viñas and V. Compañ, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, **19**, 15177-15186.
3. I. Fuentes, A. Andrio, A. García-Bernabé, J. Escorihuela, C. Viñas, F. Teixidor and V. Compañ, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, **20**, 10173-10184.
4. T. J. Badosz and C. Ania, in *Interface Science and Technology*, Elsevier, 2006, vol. 7, pp. 159-229.
5. H. Marsh and F. R. Reinoso, *Activated carbon*, Elsevier, 2006.
6. F. Maldonado-Hódar, S. Morales-Torres, A. Pérez-Cárdenas and F. Carrasco-Marín, *Bol. Grupo Español del Carbón*, 2011, **20**, 10-15.
7. S. Biniak, G. Szymański, J. Siedlewski and A. Świątkowski, *Carbon*, 1997, **35**, 1799-1810.
8. K. Sharma, A. Arora and S. Tripathi, *J. Energy Storage*, 2019, **21**, 801-825.
9. T.-H. Wu, C.-T. Hsu, C.-C. Hu and L. J. Hardwick, *J. Power Sources*, 2013, **242**, 289-298.
10. F. Béguin, V. Presser, A. Balducci and E. Frackowiak, *Adv. Mater.*, 2014, **26**, 2219-2251.
11. K. Fic, G. Lota, M. Meller and E. Frackowiak, *Energy Environ. Sci.*, 2012, **5**, 5842-5850.
12. Q. Gao, L. Demarconnay, E. Raymundo-Piñero and F. Béguin, *Energy Environ. Sci.*, 2012, **5**, 9611-9617.
13. Q. Abbas, P. Ratajczak, P. Babuchowska, A. L. Comte, D. Bélanger, T. Brousse and F. Béguin, *J. Electrochem. Soc.*, 2015, **162**, A5148-A5157.
14. I. Piñeiro-Prado, D. Salinas-Torres, R. Ruiz-Rosas, E. Morallón and D. Cazorla-Amorós, *Frontiers in Materials*, 2016, **3**.
15. V. Khomeiko, E. Raymundo-Piñero and F. Béguin, *J. Power Sources*, 2006, **153**, 183-190.
16. C. Peng, S. Zhang, X. Zhou and G. Z. Chen, *Energy Environ. Sci.*, 2010, **3**, 1499-1502.
17. R. Berenguer, R. Ruiz-Rosas, A. Gallardo, D. Cazorla-Amorós, E. Morallón, H. Nishihara, T. Kyotani, J. Rodríguez-Mirasol and T. Cordero, *Carbon*, 2015, **95**, 681-689.
18. M. J. Mostazo-López, R. Ruiz-Rosas, E. Morallón and D. Cazorla-Amorós, *J. Hydrogen Energy*, 2016, **41**, 19691-19701.

19. S. Roldán, C. Blanco, M. Granda, R. Menéndez and R. Santamaría, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 1699-1701.
20. G. Lota and E. Frackowiak, *Electrochem. Commun.*, 2009, **11**, 87-90.
21. Q. Abbas, P. Ratajczak and F. Béguin, *Faraday Discuss.*, 2014, **172**, 199-214.
22. L. Cabana, A. González-Campo, X. Ke, G. Van Tendeloo, R. Núñez and G. Tobias, *Chem. Eur. J.*, 2015, **21**, 16792-16795.
23. J. Cabrera-González, L. Cabana, B. Ballesteros, G. Tobias and R. Núñez, *Chem. Eur. J.*, 2016, **22**, 5096-5101.
24. M. Sevilla and R. Mokaya, *Energy Environ. Sci.*, 2014, **7**, 1250-1280.
25. L. L. Zhang and X. Zhao, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 2520-2531.

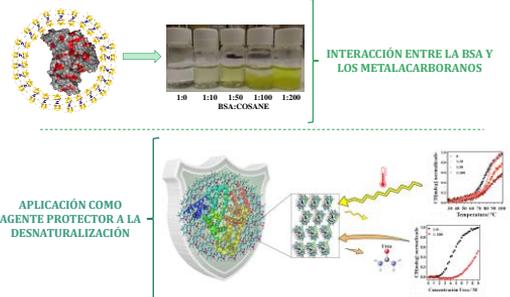
CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

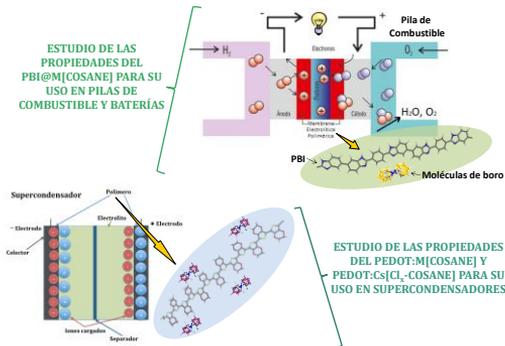
CAPÍTULO 2



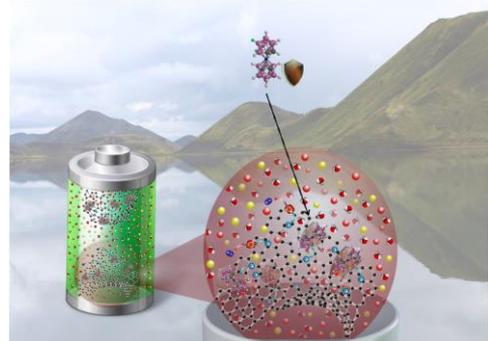
CAPÍTULO 3



CAPÍTULO 4



CAPÍTULO 5



RESUMEN DEL CAPÍTULO 6

Este capítulo se basa principalmente en explicar los resultados obtenidos en cada uno de los Capítulos 2, 3, 4 y 5 a partir de los objetivos propuestos.

Índice del Capítulo

| | pag. |
|-----------------------------------|------|
| 6. CONCLUSIONES | 165 |
| 6.1. Conclusiones del Capítulo 2. | 165 |
| 6.2. Conclusiones del Capítulo 3. | 166 |
| 6.3. Conclusiones del Capítulo 4. | 167 |
| 6.4. Conclusiones del Capítulo 5. | 169 |

6. CONCLUSIONES

6.1. Conclusiones del Capítulo 2.

En este apartado se resumirán los resultados más relevantes obtenidos en cada uno de los objetivos propuestos del Capítulo 2:

Objetivo 1: Interacción entre el ADN y los metalacarboranos.

- ✓ Se ha podido comprobar que los metalacarboranos Na[FESANE], Na[Cl₆-FESANE] y Na[COSANE] interaccionan fuertemente con CT-*ds*DNA. El Na[FESANE] y el Na[Cl₆-FESANE] interaccionan por intercalación entre los pares de bases; mientras que el Na[COSANE] interacciona en los surcos. Si se aumenta la fuerza iónica del medio en el caso del Na[COSANE], la interacción con el CT-*ds*DNA pasa a ser por intercalación entre los pares de bases.
- ✓ Mediante estudios de UV-Visible se consigue saber cuántas moléculas de metalacarboranos hay por cada par de base de ADN. El Na[FESANE] y el Na[Cl₆-FESANE] presentan 18 moléculas por cada par de base; mientras que el Na[COSANE] tiene 28 moléculas a baja fuerza iónica y 6 moléculas a alta fuerza iónica por cada par de bases.

Objetivo 2: Distribución de Na[COSANE] en células, sangre y ratones.

- ✓ Se ha estudiado la citotoxicidad del COSANE en la célula glioblastoma U87 y melanoma A375, siendo el valor de IC₅₀ en ambas células alrededor de 200 μM de Na[COSANE]. También se ha estudiado la distribución en las distintas partes de la célula (citósol, membrana, núcleo y citoesqueleto) del contenido de B y Co, acumulándose el COSANE en mayor proporción en la célula U87 y dentro de la célula en la membrana y en el núcleo.
- ✓ Se ha estudiado la distribución de boro en la sangre (plasma y eritrocitos/ granulocitos), dando un 50% de abundancia en boro en plasma y un 25% en las células sanguíneas.

Conclusiones

- ✓ Se ha estudiado la distribución de boro en distintos órganos de ratones albinos (sangre, corazón, hígado, pulmón, riñón, bazo, músculo y cerebro), dando una mayor acumulación de COSANE en el pulmón, seguido por el hígado.

Objetivo 3: Marcadores electroquímicos en sensores de ADN.

- ✓ Se ha conseguido comprobar que el FESANE y el Cl₆-FESANE se pueden utilizar como marcadores electroquímicos para sensores de ADN, ya que se acumulan entre los pares de bases consiguiendo discriminar entre secuencias complementarias, de las no complementarias y de las que están mutadas.

6.2. Conclusiones del Capítulo 3.

En este apartado se resumirán los resultados más relevantes obtenidos en cada uno de los objetivos propuestos del Capítulo 3:

Objetivo 1: Interacción entre la BSA y los metalacarboranos.

- ✓ Se ha podido comprobar que el Na[COSANE] interacciona fuertemente con la BSA en el rango de concentraciones en que el Na[COSANE] forma las vesículas (hasta 25 mM), destruyendo las vesículas para enlazarse por puentes de hidrógeno y de di-hidrógeno con los grupos amino de los aminoácidos histidina, lisina y arginina superficiales de la BSA, y así envolverla formando más de una capa.
- ✓ Se ha estimado el número de capas y de moléculas de COSANE alrededor de la BSA, cómo están distribuidas y el grado de recubrimiento mediante modelos de cubrimiento de superficies a partir de los valores de tamaño obtenidos por DLS, estando la primera capa formada por 100 moléculas de COSANE con un grado de recubrimiento del 98%, las capas posteriores son cada vez más difusas con grados de recubrimiento del 73 y del 57%.
- ✓ Se ha caracterizado el nanohíbrido BSA-Na[COSANE] mediante TEM, RMN, CD, fluorescencia, ξ -potencial, IR, SEM-EDX y análisis elemental.

Objetivo 2: Aplicación como agente protector a la desnaturalización.

- ✓ Se ha comprobado por DLS que el Na[COSANE] protege a la BSA frente a su desnaturalización térmica cuando cubre completamente la superficie de la proteína (nanohíbrido BSA-Na[COSANE] 1:100 y 1:1000).
- ✓ También se ha comprobado por CD que a medida que aumenta la temperatura de 25 a 90°C el nanohíbrido BSA-Na[COSANE] minimiza la pérdida de la estructura secundaria de la proteína estabilizando la BSA frente a su desnaturalización.
- ✓ Se ha comprobado que el Na[COSANE] protege químicamente a la BSA de su desnaturalización con urea, ya que para desnaturalizar el 50% de la proteína es necesario 4.5 M de urea, mientras que si está protegida con COSANE la concentración necesaria es el doble, 9 M.

6.3. Conclusiones del Capítulo 4.

En este apartado se resumirán los resultados más relevantes obtenidos en cada uno de los objetivos propuestos del Capítulo 4:

Objetivo 1: Estudio de las propiedades del PBI dopado con M[COSANE] (M = Na⁺, Li⁺ y H⁺) y con M'[TPB] (M' = Na⁺ y Li⁺) para su uso en pilas de combustibles y baterías.

- ✓ Se ha estudiado la conductividad iónica del M[COSANE] (M = Na⁺, Li⁺ y H⁺) y del M'[TPB] (M' = Na⁺ y Li⁺) en húmedo mediante la espectroscopía de impedancia en el rango de temperaturas de 20 a 120°C, siendo las conductividades iónicas del COSANE superiores a las del TPB ($\sigma_{\text{H}[\text{COSANE}]} > \sigma_{\text{Na}[\text{COSANE}]} > \sigma_{\text{Li}[\text{COSANE}]} > \sigma_{\text{Li}[\text{TPB}]} > \sigma_{\text{Na}[\text{TPB}]}$).
- ✓ Se ha estudiado la conductividad iónica del PBI, PBI@M[COSANE] y PBI@M'[TPB] en el rango de temperaturas de 20 a 180°C, observando dos comportamientos distintos de 20 a 100°C y de 100 a 150°C, siendo mejor el PBI@H[COSANE] a temperaturas altas.

-----Conclusiones-----

Objetivo 2: Estudio de las propiedades del PEDOT dopado con M[COSANE] (M = Cs⁺, Na⁺, Li⁺ y H⁺) y con Cs[Cl_x-COSANE] (x = 2, 4 y 6) para su uso en supercondensadores.

- ✓ Se ha polimerizado electroquímicamente el EDOT utilizando como anión dopante el M[COSANE] (M = Cs⁺, Na⁺, Li⁺ y H⁺) mediante la voltametría cíclica, observando un comportamiento diferente para cada una de las muestras, tanto en intensidad como en la forma y los potenciales de los picos de oxidación y de reducción formados. Este comportamiento sugiere que los cationes del anión dopante juegan un papel importante en la polimerización electroquímica del PEDOT y en consecuencia en sus propiedades electroquímicas y fisicoquímicas.
- ✓ Se han estudiado las propiedades electroquímicas del PEDOT dopado con M[COSANE] mediante las técnicas de CV y LSV. Los voltagramas cíclicos muestran dos procesos redox, uno debido al Co^{3+/2+} y el otro debido al polímero, aunque ambos procesos se ven afectados con los diferentes cationes (valores de potencial y forma). Además, al calcular la capacidad específica también se han obtenido valores distintos según el catión utilizado, siendo el valor más alto el del PEDOT:Cs[COSANE].
- ✓ Se ha confirmado por EDX la presencia de COSANE y de los cationes en la estructura del polímero formado, dependiendo de la sal de COSANE utilizada se obtiene una proporción monómero de EDOT por molécula de COSANE diferente (2:1 para Cs y H, y 3:1 para Na y Li).
- ✓ Se ha polimerizado electroquímicamente el EDOT utilizando como anión dopante el Cs[Cl_x-COSANE] (x = 2, 4 y 6) y el PSS para ver la influencia de utilizar diferentes aniones electroactivos con valores de potencial redox distintos y compararlos con el PEDOT:PSS. Los voltagramas cíclicos obtenidos al utilizar el Cl₂-COSANE y el Cl₄-COSANE muestran dos procesos redox independientes, mientras que al utilizar el Cl₆-COSANE estos dos procesos están solapados debido a que el potencial redox está desplazado hacia valores más positivos. En cambio el PEDOT:PSS tiene un voltagrama cíclico completamente distinto.

- ✓ Se ha caracterizado el PEDOT:Cs[Cl_x-COSANE] y el PEDOT:PSS mediante las técnicas de CV y LSV, obteniendo el valor de capacidad específica y del límite de resistencia a la sobreoxidación más alto cuando se utiliza el Cs[Cl₆-COSANE] como dopante del PEDOT. Se ha visto que al solapar el proceso de crecimiento del polímero y del Co^{3+/2+} en la polimerización electroquímica del PEDOT:Cs[Cl₆-COSANE], se obtienen los valores más altos de capacidad; y que al tener más enlaces B-Cl en la estructura, proporciona una mejor estabilidad a la degradación del polímero.
- ✓ Se ha comprobado la tendencia de cuanto mayor es el número de cloros en el COSANE, mejor propiedades tiene (mejor conductividad eléctrica y mejor estabilidad térmica), siendo el mejor dopante el Cs[Cl₆-COSANE].

6.4. Conclusiones del Capítulo 5.

En este apartado se resumirán los resultados más relevantes obtenidos en cada uno de los objetivos propuestos del Capítulo 5:

Objetivo 1: Adsorción del aditivo Cl₄-COSANE en el carbón activado.

- ✓ Se ha estudiado la adsorción del aditivo Cl₄-COSANE en los poros del carbón activado YP50F, observando en la isoterma de adsorción como las moléculas del metalacarborano en disolución son completamente adsorbidas en los poros hasta llegar a la saturación de 1.25 mmol/g, indicando una gran afinidad entre el Cl₄-COSANE y el carbón activado.
- ✓ Se han caracterizado las muestras Y-000, Y-015, Y-045 y Y-100 por isoterma de adsorción de N₂, DRX y XPS. Se ha confirmado la presencia del Cl₄-COSANE en los poros de las muestras Y-015, Y-045 y Y-100, disminuyendo el área superficial específica y el volumen de microporos a medida que había más cantidad de Cl₄-COSANE adsorbido en los poros. También se ha confirmado por XPS la fuerte interacción que tiene el Cl₄-COSANE adsorbido con la superficie del carbón activado, ya que han aparecido nuevas bandas a energías de enlace sobre 192 eV que en el sólido Na[Cl₄-COSANE] no aparecen.

Objetivo 2: Supercondensador acuoso asimétrico.

- ✓ Se han caracterizado los electrodos Y-000, Y-015, Y-045 y Y-100 en una celda de 3 electrodos. Se ha medido el voltagrama cíclico de la ventana de potencial de trabajo negativa, positiva y completa, observando que la presencia de Cl₄-COSANE modifica el comportamiento electroquímico de la interfase electrodo/electrolito (en las reacciones de descomposición del agua y en el proceso redox de los grupos oxigenados del CA).
- ✓ Se ha utilizado el mismo material como electrodo positivo y negativo, ya que la presencia de Cl₄-COSANE en la ventana negativa y en la ventana positiva puede ser beneficiosa para el supercondensador. Por tanto, se han balanceado las masas para optimizar el supercondensador, se ha utilizado Na₂SO₄ 0.5 M como electrolito, se ha utilizado un potencial de trabajo de 2.2 V con una densidad de corriente de 1 A/g y se ha medido su estabilidad durante 5000 ciclos en carga y descarga.
- ✓ Se ha comprobado que el supercondensador Y-015 es más estable que el Y-000, ya que retiene un 79% de capacidad específica y un 68% de densidad de energía después de 5000 ciclos, mientras que el Y-000 sólo retiene un 23% de capacidad específica y un 8% de densidad de energía. Se ha analizado la química superficial del electrodo positivo Y-000 y Y-015 para confirmar la suposición de que el Cl₄-COSANE puede proteger al carbón activado frente a su degradación debido a que interacciona con los grupos oxigenados superficiales.
- ✓ Se ha realizado un test de estabilidad más agresivo, manteniendo fijo el potencial a 2.2 V durante horas, comprobando que el supercondensador Y-000 se degrada a las 2h, mientras que el Y-015 a las 2h todavía resiste pero a medida que van pasando las horas va degradándose hasta llegar a su completa degradación al cabo de 10h.

ANEXO I:

Artículos aprobados el 30 de Abril del 2019 por la Comisión de Doctorado en Química de la Universidad Autónoma de Barcelona para presentar la tesis como compendio de publicaciones:

Capítulo 2:

T. García-Mendiola, V. Bayon-Pizarro, A. Zaulet, I. Fuentes, F. Pariente, F. Teixidor, C. Vinas and E. Lorenzo, *Chem. Sci.*, 2016, **7**, 5786-5797.

DOI: 10.1039/c6sc01567k

I. Fuentes, T. García-Mendiola, S. Sato, M. Pita, H. Nakamura, E. Lorenzo, F. Teixidor, F. Marques and C. Viñas, *Chem. Eur. J.*, 2018, **24**, 17239-17254.

DOI: 10.1002/chem.201803178

Capítulo 4:

I. Fuentes, A. Andrio, F. Teixidor, C. Viñas and V. Compañ, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, **19**, 15177-15186.

DOI: 10.1039/c7cp02526b

I. Fuentes, A. Andrio, A. García-Bernabé, J. Escorihuela, C. Viñas, F. Teixidor and V. Compañ, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2018, **20**, 10173-10184.

DOI: 10.1039/c8cp00372f

Capítulo 5:

R. Ruiz-Rosas, I. Fuentes, C. Viñas, F. Teixidor, E. Morallón and D. Cazorla-Amorós, *Sustainable Energy Fuels*, 2018, **2**, 345-352.

DOI: 10.1039/c7se00503b

