



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**MATERIALES ELECTROACTIVOS POLIMÉRICOS E HÍBRIDOS
COMO SUSTRATO DE CRECIMIENTO NEURONAL**

Antonio Javier Moral Vico

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado en Ciencia de Materiales

Directora: Prof. Nieves Casañ Pastor

Tutor: Dr. José Antonio Ayllón Esteve

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS



Junio de 2012



Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Campus de la UAB
08193 Bellaterra (Barcelona)

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Ciències
Departament de Química
08193 Bellaterra (Barcelona)

Nieves Casañ Pastor,
Profesora de Investigación del CSIC en el
Institut de Ciència de Materials de Barcelona (CSIC)

Certifica:

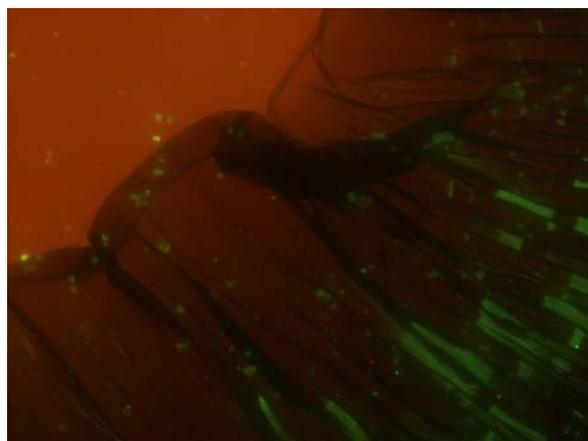
Que **Antonio Javier Moral Vico**, Ingeniero Químico, ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título “Materiales Electroactivos Poliméricos e Híbridos como Sustrato de Crecimiento Neuronal”, el cual se presenta en esta memoria para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que así conste, firma el presente certificado.

Bellaterra, Junio de 2012

A mi padre

Polipirrol-DBS sobre oro translúcido (ICMAB-HNP)



“No entiendes realmente algo a menos que seas capaz de explicárselo a tu abuela”

(Albert Einstein)

AGRADECIMIENTOS

Después del largo camino que representa una Tesis doctoral hay mucha gente que en algún momento ha aportado algo de ayuda para su realización, tanto en el terreno personal como en el profesional, así que trataré de resumir en pocas palabras lo mucho que tengo que agradecer a tantas personas, espero no dejarme a nadie.

Primero de todo, me gustaría dar un especial agradecimiento a mi familia, que siempre estuvo ahí y me apoyó en cada momento, a mis hermanos Jose y Mari y a mi madre Antonia, con una especial mención a mi padre Antonio. Gracias a ellos soy quien soy. Gracias especiales a Ana también por el cariño, el apoyo y la comprensión. Y también por la portada!

A mi directora de Tesis la Prof. Nieves Casañ Pastor, por haberme hecho crecer científica y profesionalmente, por toda la ayuda y el apoyo durante la tesis, por su constante disponibilidad y por intentar siempre tener una sonrisa para sus estudiantes.

A las niñas del equipo de trabajo, Ana Milena y Nina “mi Antonia”, por aportarme siempre sus conocimientos y ayuda y ser siempre unas compañeras geniales en todos los aspectos. Gracias por hacer del día en el trabajo siempre una alegría. También gracias a la nueva incorporación en el equipo, Estela y a Carme y Liber que trabajaron con nosotros.

A los científicos y profesores del departamento, Amparo, Rosa, Gerard, Dino y Concha, y a Judith por su esfuerzo y amabilidad. A todo el personal de administración y servicios del ICMAB, por su trabajo y eficiencia.

A la gente del despacho on fire, y todos los que por allí suelen rondar, Laura por sus popiconsejos musicales, a Jullieth y Jessica por los constantes halagos y alegría, siempre subiendo la moral! A Ángela, a Stefania, a Ana López, a Nerea, a Marixa, a Marta, a Alexandre... qué buenas tertulias de despacho! A los demás compañeros del ICMAB, Diego, Roque, Peskerovich... A Marc por ser un crack de la informática y estar presto siempre a solucionar los problemas. A todos con los que pasé unos buenísimos momentos de fútbol. A todos ellos por el “gambiteo” y por ser unos amigos y compañeros geniales.

A los que pasaron por el ICMAB, Adrián en especial, que bueno eres tiarrón, Omar “el chaval”, Fred, Belencita, David, Pedro, Sebastián “er tomate”, Ana Bea, Corina, Costana, Zakaria,...y tantos otros. A los amigos Pablo, Jacke, James, Sara, Arpi “el mago”, Pedro “Peter”, España campeona!!!

Al Dr. Ángel Pérez del ICMAB por su ayuda con el AFM, al Dr. Jordi Fraxedas del CIN2, a Pilar Lozano (Aidico, Valencia) y a Guillermo Antorrena (INA) por su ayuda con el XPS. A Vega y a Amable por su ayuda con el infrarrojo.

A la Dra. Cristina Suñol y a Sara Sánchez del IIBB-CSIC por su ayuda con los cultivos celulares. A la gente del Hospital Nacional de parapléjicos de Toledo, en especial Vanesa Padial por el trabajo conjunto.

A mis amigos de toda la vida, Lomas, Salva, Dani, María. Sois los mejores.

A todos los amiguetes y familia del pueblo, Alcaudete en Jaén, en especial a mis tíos y mis primos, gracias Jose por las largas charlas pa arreglar el mundo. Y a mi pueblecito Sabariego, que gustico llegar al hoyón!

A los amigos que dejé en Italia y Bélgica, y a todos aquellos que en algún momento de esta Tesis me dieron su apoyo. Gracias a todos de corazón!

Me gustaría destacar que este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida del Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) de Ministerio de Educación y de los proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia (MAT2005-07683, MAT2008-29316-E, FIS08-03951 y MAT2011-24363), del CSIC (PIF06-021), de la Comisión Europea Programa FP6 NEST STREP (Contrato 028473) y del proyecto de la Marató de TV3 de 2011.

RESUMEN

Los polímeros conductores han destacado en los últimos años por ser materiales electroactivos con aplicaciones en una gran variedad de campos. Entre ellos están el de los dispositivos electrónicos orgánicos, las baterías, los sensores y actuadores y los condensadores. Dos de ellos, el polipirrol (PPy) y el Poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT), destacan por su biocompatibilidad y sus prometedoras propiedades como biomateriales, en especial como bioelectrodos. Su bajo potencial electroquímico de superficie (no requieren aplicación de altos potenciales para ser modificados), su alta estabilidad ambiental, su flexibilidad física y su conductividad mixta iónica-electrónica, hacen de ellos excelentes candidatos para el campo de la ingeniería de tejidos, en especial como sustratos de crecimiento neuronal.

La electroactividad es, no obstante, la característica crucial que podría hacer de ellos materiales importantes para su aplicación como electrodos en dispositivos protésicos neuronales y en electroestimulación funcional, donde la conductividad y la capacidad de almacenamiento de carga son esenciales.

La posibilidad de modular el estado de oxidación del material de partida mediante la intercalación de iones presentes en el medio biológico, y por tanto su potencial de actuación podría ayudar a regular su efecto en la adhesión, viabilidad y crecimiento neuronal. Además el hecho de poder intercalar aniones durante su síntesis, los cuales formarán parte de la estructura del polímero, permite obtener un tipo de material con características diferentes según el contraión usado. Así pues, pueden formar parte del polímero biomoléculas beneficiosas para el funcionamiento neuronal, o bien otro tipo de compuestos que pueden aumentar la capacidad de carga del material, la adhesión, o mejorar otras características del material. La posibilidad de formar híbridos de polímeros conductores con otros materiales permite aunar las propiedades de estos, y además crear nuevos materiales con nuevas propiedades nacidas de la sinergia establecida.

En este trabajo se sintetizaron capas finas de PPy y PEDOT, con aniones de diversos tamaños, entre ellos grandes moléculas que garantizaran el intercambio catiónico de los materiales durante la modulación electroquímica como son los surfactantes. Posteriormente se ensayó la síntesis de capas finas de polímeros con biómoleculas para identificar posibles mejoras en términos de cultivos celulares gracias a la incorporación de estas especies. Finalmente se estudió la interacción de los polímeros con diversos compuestos de iridio a través de la formación de híbridos de ambos materiales en forma de capa y de polvo. Todos los materiales sintetizados se caracterizaron con profundidad estructuralmente, a través de técnicas como el ATR y el XPS; microestructuralmente con técnicas como el AFM y el ángulo de contacto; y eléctrica y electroquímicamente mediante voltametrías

cíclicas, microbalanza electroquímica de cuarzo y espectroscopía de impedancia. También se estudió el comportamiento de los materiales como sustrato de crecimiento neuronal a través de cultivos de neuronas corticales de embriones de ratón, lo cual se intentó relacionar con las características físico-químicas encontradas.

RESUM

Els polímers conductors han destacat en els últims anys per ser materials electroactius amb aplicacions en una gran varietat de camps. Entre ells estan el dels dispositius electrònics orgànics, les bateries, els sensors i actuadors i els condensadors. Dos d'ells, el polipirrol i el Poli(3,4-etilendioxitiofè) (PEDOT), destaquen per la seva biocompatibilitat i les seves propietats prometedores com a biomaterials, en especial com a bioelectrodes. El seu baix potencial de superfície (no requereixen l'aplicació de grans potencials per ésser modificats), la seva alta estabilitat ambiental, la seva flexibilitat física i la seva conductivitat mixta iònica-electrònica, fan d'ells candidats excel·lents per al camp de l'enginyeria de teixits, en especial com a substrats de creixement neuronal.

L'electroactivitat és, no obstant, la característica crucial que podria fer d'ells materials importants per a la seva aplicació com a electrodes en dispositius protèsics neuronals i en electroestimulació funcional, on la conductivitat i la capacitat d'enmagatzematge de càrrega són essencials.

La possibilitat de modular l'estat d'oxidació del material inicial mitjançant la intercalació d'ions presents al medi biològic, i per tant el seu potencial d'actuació podria ajudar a regular el seu efecte en l'adhesió, viabilitat i creixement neuronal. A més, el fet de poder intercalar anions durant la seva síntesi, els quals entraran a formar part de l'estructura del polímer permet obtenir un tipus de material amb característiques diferents segons el contraïó utilitzat. Així doncs, poden formar part del polímer biomolècules beneficioses per al funcionament neuronal, o bé altre tipus de compostos que puguin augmentar la capacitat de càrrega del material, l'adhesió, o millorar altres característiques del material. La possibilitat de formar híbrids de polímers conductors amb altres materials permet unir les propietats d'aquests, i a més crear nous materials amb les noves propietats nascudes de la sinèrgia establerta.

En aquest treball es van sintetitzar capes primes de PPy i PEDOT amb anions de diversos tanams, entre ells molècules que garantitzaran l'intercanvi catiònic dels materials durant la modulació electroquímica com són els surfactants. Posteriorment es va assajar la síntesi de capes primes amb biomolècules per a identificar possibles millores en termes de cultius cel·lulars gràcies a la incorporació d'aquestes espècies. Finalment es va estudiar la interacció dels polímers amb diversos compostos d'iridi mitjançant la formació d'híbrids d'ambdós materials en forma de capa i pols. Tots els materials sintetitzats es van caracteritzar en profunditat estructuralment, mitjançant tècniques com ara el ATR i el XPS; microestructuralment amb tècniques com ara el AFM i l'angle de contacte; i elèctrica i electroquímicament amb voltametries cícliques, microbalança electroquímica de quars i espectroscopia d'impedància. També es va estudiar el comportament dels materials com a

substrat de creixement neuronal mitjançant cultius de neurones corticals d'embrions de ratolí, el que es va intentar relacionar amb les característiques físico-químiques trobades.

ABSTRACT

Much attention has been focused on conductive polymers in recent years for being electroactive materials with applications in a great variety of fields such as organic electronic devices, batteries, sensors and actuators and capacitors. Two of them, polypyrrole (PPy) and poly (3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) stand out due to their biocompatibility and their promising properties as biomaterials, especially as bioelectrodes. Their low surface electrochemical potential (they do not need the application of high potentials to be modified), their high environmental stability, their physical flexibility and their mixed ionic-electronic conductivity, makes them excellent candidates for the field of tissue engineering, especially as substrates for neural growth.

Their electroactivity is the crucial point that could make of them important materials in neural prosthetic devices and functional electrostimulation, where conductivity and charge capacity storage are crucial.

The possibility of modulating the starting material oxidation state by electrochemical intercalation of ions present in biological media and therefore its acting potential may help modulate its effect on neural adhesion, viability and growth. Moreover, being able to intercalate anions during their synthesis, which will form part of the polymer structure, allows us to obtain a material with different characteristics depending on the counterion used. Thus, it is possible to have a polymer containing beneficial biomolecules for neurons to function, as well as other compounds that can increase the charge capacity of the material, improve the adhesion, and other material features. The possibility of forming hybrid materials consisting of conducting polymers and other compounds allows us to combine the properties of both, and also to create new materials with novel properties arising from the synergy established.

In this work, thin layers of PPy and PEDOT were synthesized with anions of different sizes, among them large molecules such as surfactants, which would guarantee the cation exchange of the materials during electrochemical modulation. Subsequently, the synthesis of thin films with biomolecules was performed to identify possible improvements in terms of cell cultures with the addition of these species. Finally, the interaction of the polymers with various compounds of iridium was studied through the formation of hybrids of both materials. All synthesized materials were characterized structurally in depth, through techniques such as ATR and XPS; microstructurally with techniques such as AFM and contact angle, and electrically and electrochemically with cyclic voltammetries, quartz electrochemical microbalance and impedance spectroscopy. The behavior of these materials as substrates for neuronal growth through mice embryos cortical neuron cultures was studied as well, and these results were correlated with the physico-chemical features found.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	ix
RESUMEN	xi
RESUM	xiii
ABSTRACT	xv
ÍNDICE GENERAL	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS	xxi
ÍNDICE DE TABLAS	xxix
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Lesiones neuronales.....	2
1.2 Biomateriales como sustrato de crecimiento neuronal: bioelectrodos ...	6
1.3 Polímeros conductores como bioelectrodos.....	9
1.4 Polímeros conductores: mecanismo de síntesis.....	11
1.5 Regeneración neuronal: Motivación y objetivos.....	14
1.6 Bibliografía.....	15
Capítulo 2. Técnicas Experimentales	19
2.1 Síntesis de las Muestras	20
2.1.1 Síntesis electroquímica	20
2.1.1.1 Técnicas Electroquímicas de Síntesis de Control Estático de Potencial de Electrodo o de Corriente	22
2.1.1.2 Técnicas Electroquímicas de Síntesis de Control Dinámico de Potencial: deposición potenciodinámica.....	22
2.1.2 Síntesis química.....	23
2.1.3 Síntesis hidrotermal.....	23
2.2 Caracterización Estructural	23
2.2.1 Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)	23
2.2.2 Espectroscopia de Infrarrojo (ATR).....	24
2.3 Caracterización microestructural.....	24

2.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	24
2.3.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	25
2.3.2.1 Difracción de electrones.....	25
2.3.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	25
2.3.4 Ángulo de contacto.....	26
2.4 Caracterización eléctrica y electroquímica.....	27
2.4.1 Voltametría cíclica (CV) de capas finas de polímero.....	27
2.4.1.1 Voltametría de barrido lineal de polvos híbridos de polímero- IrO_x	28
2.4.1.2 Voltametría cíclica de discos de teflón de polvos híbridos de polímero- IrO_x	29
2.4.2 Microbalanza de cuarzo electroquímica (EQCM)	29
2.4.1 Espectroscopia de Impedancia Compleja Electroquímica (EIS).....	31
2.5 Análisis celular.....	31
2.5.1 Cultivos celulares.....	31
2.5.2 Inmunocitoquímica y Cuantificación de las Células	32
2.5.3 Ensayos celulares de citotoxicidad (MTT).....	33
2.5.4 Ensayos preliminares de cultivos en presencia de campos eléctricos	33
2.6 Bibliografía.....	34
Capítulo 3. Capas de polímero conductor con perclorato y grandes aniones	35
3.1 Introducción: selección del contraión.....	36
3.2 Capas de PPy dopadas con perclorato.....	37
3.3 Capas de PPy dopadas con polioxometalato.....	39
3.4 Capas Finas de polímero-surfactante	40
3.4.1 Capas Finas de PPy-DBS.....	40
3.4.2 Modulación electroquímica de las capas de PPy-DBS: Procesos Redox	43
3.4.3 Capas Finas de PPy-PSS.....	46
3.4.4 Modulación electroquímica de las capas de PPy-PSS: Procesos Redox	48
3.4.5 Evaluación del proceso de síntesis y reducción de las capas mediante balanza electroquímica de cuarzo (EQCM).....	49
3.4.5.1 Proceso de síntesis.....	49
3.4.5.2 Proceso de reducción.....	53
3.4.6 Análisis de XPS.....	55
3.4.6.1 Capas Finas de PPy-DBS.....	55
3.4.6.2 Capas Finas de PPy-PSS.....	58
3.4.6.3 Deconvolución espectros XPS.....	58

3.4.7 Análisis de infrarrojo (ATR).....	63
3.4.8 Análisis microestructural.....	64
3.4.8.1 Microscopio de fuerza atómica (AFM).....	64
3.4.8.1 Ángulo de contacto.....	66
3.4.9 Propiedades electroquímicas: voltametrías cíclicas.....	67
3.4.10 Propiedades eléctricas: espectroscopía de impedancia.....	70
3.5 Capas finas de Poli (3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) sintetizado con Poliestireno sulfonato (PSS): PEDOT-PSS.....	72
3.5.1 Evaluación del proceso de síntesis y reducción de las capas mediante balanza electroquímica de cuarzo (EQCM).....	75
3.5.1.1 Proceso de síntesis.....	75
3.5.1.2 Proceso de reducción.....	76
3.5.2 Análisis de superficie (XPS).....	77
3.5.2.1 Deconvolución de los espectros de XPS.....	79
3.5.3 Análisis microestructural.....	80
3.5.4 Propiedades electroquímicas: voltametrías cíclicas.....	82
3.5.5 Propiedades eléctricas: espectroscopía de impedancia.....	84
3.6 Cultivos neuronales.....	84
3.7 Conclusiones.....	85
3.8 Bibliografía.....	87
Capítulo 4. Capas polímero conductor con biomoléculas.....	91
4.1 Polímero-biomolécula.....	92
4.2 Obtención electroquímica de monocapas de PEDOT-aminoácido y PLL y de bicapas de PEDOT/PPy-aminoácido y PLL.....	95
4.3 Evaluación del proceso de síntesis y reducción de las capas mediante balanza electroquímica de cuarzo (EQCM)	99
4.4 Análisis de superficie (XPS).....	100
4.5 Análisis de infrarrojo (ATR).....	106
4.6 Análisis microestructural.....	107
4.7 Propiedades electroquímicas	109
4.8 Cultivos neuronales.....	111
4.8.1 Efecto de la PLL adsorbida	114
4.9 Conclusiones.....	115
4.10 Bibliografía.....	116

Capítulo 5. Híbridos de polímeros conductores	119
5.1 Compuestos polímero-molécula inorgánica	120
5.2 Obtención electroquímica de capas de polímero-IrCl ₃ y polímero-K ₃ Ir(NO ₂) ₆	121
5.2.1 Procesos de síntesis de las capas: Balanza electroquímica de cuarzo (EQCM).....	124
5.2.2 Análisis de superficie (XPS).....	126
5.2.3 Análisis de infrarrojos (ATR).....	131
5.2.4 Análisis microestructural.....	132
5.2.4.1 AFM.....	132
5.2.4.2 Ángulo de contacto.....	133
5.2.5 Propiedades electroquímicas.....	134
5.2.6 Cultivos celulares.....	135
5.3 Obtención química de polvo de PPy-IrCl ₃ y PPy-K ₃ Ir(NO ₂) ₆	136
5.3.1 Análisis de superficie (XPS).....	139
5.3.2 Análisis de infrarrojos (ATR).....	143
5.4 Obtención hidrotérmica de polvos de PPy y IrO ₂ y de PEDOT y IrO ₂ .	144
5.4.1 Caracterización morfológica de los compuestos híbridos de PPy-IrO _x y de PEDOT-IrO _x (SEM).....	146
5.4.2 Análisis estructural y de superficie.....	147
5.4.3 Análisis de infrarrojos (ATR).....	151
5.4.4 Propiedades electroquímicas.....	152
5.4.5 Ensayos celulares de toxicidad (MTT).....	154
5.5 Conclusiones.....	156
5.6 Bibliografía.....	157
Capítulo 6. Conclusiones	161
APÉNDICE	165
A1. Lista de Congresos y Reuniones	166
A2. Lista de publicaciones derivadas y directamente relacionadas con este trabajo.....	168

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 Partes de una neurona.	2
Figura 1.2 Resonancia magnética de una lesión de una espina dorsal humana con epicentro en la vértebra C7, un año después de la lesión. Un quiste de aproximadamente 3cm dividido por una fibra reemplaza el tejido neural. (Foto cedida por el Laboratorio de Reparación Neuronal del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo – España).	3
Figura 1.3 Transplante de células olfativas ensheating (azul) en la vértebra C7 de una rata donde hay una contusión en la espina dorsal. Las células olfativas ensheating no promueven la regeneración de las vías corticoespinales (rojo), pero inducen un brote aberrante del axón (parte C) [56].	5
Figura 1.4 Crecimiento de neuronas <i>Xenopus</i> de la espina dorsal a través del cátodo in Vitro. A) y B) Primera y última imagen de una secuencia time-lapse de neuronas creciendo en ausencia de campo eléctrico. El tiempo transcurrido (min) se muestra en la esquina inferior derecho. C) Imagen compuesta, en la cual los cuerpos de las células (punto central amarillo) de algunas neuronas han sido superpuestos para mostrar el camino del crecimiento neuronal hacia el exterior durante 5 horas (sin campo eléctrico). D) y E) Neuronas en presencia de un campo eléctrico de 150 mV/mm durante 3 horas, con el vector del campo eléctrico mostrado en D). Los conos de crecimiento comienzan a dirigirse al cátodo en cuestión de minutos y uno de los conos cruza la otra dendrita para migrar hacia el cátodo. F) Imagen compuesta de las células expuestas a un campo eléctrico de 150 mV/mm por 5 horas. Los caminos dendríticos se curvan dramáticamente hacia el cátodo y las dendritas se extienden más rápidamente en dirección del cátodo que del ánodo. Barras de escala: A) y B) 100 μm . C) y F) 25 μm [50].	7
Figura 1.5 Imágenes de la estructura química de: A) Polipirrol (PPy) y B) Poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT).	10
Figura 1.6 Detalle del mecanismo de formación del Polipirrol dividido entre los pasos iniciales y los pasos de propagación de la cadena polimérica.	13
Figura 2.1 Esquema de la síntesis electroquímica de las capas de óxido de iridio.	21
Figura 2.2 A) Unión de las tensiones interfaciales de una superficie sólida en contacto con un líquido y B) Equipo utilizado en la medida del ángulo de contacto.	26
Figura 2.3 Esquema general de una voltametría cíclica.	28
Figura 2.4 Configuración de la voltametría de barrido lineal de los polvos híbridos de polímero- IrO_x .	29
Figura 2.5 Esquema del funcionamiento de una balanza electroquímica de cuarzo (EQCM).	30

- Figura 3.1 Curva de síntesis I vs t de una muestra de PPy-ClO₄, desde OCP a 1V vs Pt, a 5mV/s, en una disolución acuosa de 0.1M de pirrol y 0.1M de NaClO₄. 38
- Figura 3.2 Fotografías tomadas en un microscopio óptico de diversas muestras de polipirrol: A) PPy-ClO₄ en seco, B) PPy-ClO₄ después de 10 días sumergida en agua, C) PPy-PSS en seco y D) PPy-PSS después de 10 días sumergida en agua. 39
- Figura 3.3 Curva de síntesis de una muestra de PPy-POM, desde OCP a 0.8V vs Pt, a 5mV/s, en una disolución acuosa de 0.1M de pirrol y 0.001M de H₄[SiMo₁₂O₄₀].xH₂O. 40
- Figura 3.4 Detalle de capas finas de PPy-DBS depositadas sobre un sustrato de oro con el cambio de color que provocan los patrones de interferencia. 42
- Figura 3.5 Gráficos de la curva de síntesis de las capas finas de PPy-DBS: A) de OCP a E_{max} 0.6V vs Pt a 5mV/s y parada durante 3 minutos en 0.6V vs Pt, B) de OCP a E_{max} 0.75V vs Pt a 5mV/s. 42
- Figura 3.6 Gráficos I vs t de la curva de reducción a E constante de -0.8V vs Pt de las capas finas de PPy-DBS: A) Capa sintetizada a E_{max} 0.6V vs Pt: reducida en un 80%, B) Capa sintetizada a E_{max} 0.75V vs Pt: reducida en un 80%, C) Capa sintetizada a E_{max} 0.6V vs Pt: reducida en un 50% D) Capa sintetizada a E_{max} 0.75V vs Pt: reducida en un 50%, E) Capa sintetizada a E_{max} 0.6V vs Pt: reducida en un 30% y F) Capa sintetizada a E_{max} 0.75V vs Pt: reducida en un 30%. 45
- Figura 3.7 Detalle de la diferencia en el patrón de interferencia de las muestras de polipirrol sintetizadas con DBS mediante un potencial dinámico con un E_{max} de 0.6V vs Pt y con PSS a un potencial constante de 0.6V vs Pt. 47
- Figura 3.8 Curvas de síntesis para dos capas de PPy-PSS con exactamente las mismas características. 48
- Figura 3.9 Corriente vs t para la reducción a potencial constante de las capas finas de PPy-PSS sintetizadas a 0.6V vs Pt: A) reducida en un 100%, B) reducida en un 50%. 49
- Figura 3.10 Evolución de la masa depositada con respecto a la carga depositada durante el proceso de síntesis de polipirrol registrados mediante EQCM de: A) Muestra sintetizada dinámicamente desde 0 hasta un E_{max} de 0.6V vs Pt con DBS, B) Muestra sintetizada dinámicamente desde 0 hasta un E_{max} de 0.75V vs Pt con DBS, C) Muestra sintetizada potencioestáticamente a 0.6V vs Pt con PSS. 52
- Figura 3.11 Evolución de la frecuencia de resonancia del cuarzo de la EQCM durante un proceso de reducción de PPy-DBS a -0.8V vs Pt en un tampón de fosfato sódico de pH 7.4, señalando el punto de máxima reducción teórica de la capa. 54
- Figura 3.12 Espectro XPS general de capas de PPy-DBS depositadas hasta 0.6V vs Pt as prepared y en diferentes grados de reducción: 80, 50 y 30%. 55

-
- Figura 3.13 Espectro XPS general de capas de PPy-DBS depositadas hasta 0.75V vs Pt as prepared y en diferentes grados de reducción: 80, 50 y 30%. 56
- Figura 3.14 Deconvolución del pico C 1s de A) capa de PPy-DBS depositada hasta 0.6V vs Pt, B) capa de PPy-DBS depositada hasta 0.75V vs Pt y C) capa de PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt. 59
- Figura 3.15 Deconvolución del pico O 1s de A) capa de PPy-DBS depositada hasta 0.6V vs Pt, B) capa de PPy-DBS depositada hasta 0.75V vs Pt, C) capa de PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt. 61
- Figura 3.16 Espectros de ATR de la capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, una capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt y una capa de PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt. 63
- Figura 3.17 Figuras de AFM de las capas: A) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, B) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt, C) PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt. Se incluyen las medidas de rugosidad y tamaño de grano. 64
- Figura 3.18 Gráficas de los resultados de rugosidad y tamaño de grano de todas las capas sintetizadas en función de su nivel de reducción: A y B) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, C y D) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt, E y F) PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt 65
- Figura 3.19 Curvas de evolución del ángulo de contacto de las capas en función de su nivel de reducción, con y sin PLL adherida y con agua y medio de cultivo como fluido experimental: A) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, B) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt, C) PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt. También se muestra un detalle de la medida de ángulo de contacto con D) una muestra más hidrofóbica y E) una más hidrofílica. 66
- Figura 3.20 Voltametrías de reducción de las capas ‘as-prepared’ de OCP a -1.5V vs Pt a 20mV/s: PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt y PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt en A) Tampón fosfato sódico a pH 7 y B) Medio de cultivo celular. 67
- Figura 3.21 Curvas de evolución del pico de reducción principal de la voltametría de las capas en función del nivel de reducción previo a la voltametría de estas, utilizando tampón fosfato o medio de cultivo como electrolito sobre capas con y sin PLL adherida: A) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, B) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt, C) PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt. 69
- Figura 3.22 Diagrama de Nyquist de una solución de NaCl 0.1M. 70
- Figura 3.23 Diagrama de Nyquist de capas de PPy-DBS electrodepositadas a potencial dinámico hasta E_{max} de 0.75V vs Pt “as prepared” y con diferentes grados de reducción, además de un substrato de platino utilizado para hallar la resistencia del electrolito utilizado en la medida (NaCl 0.1M). 71

- Figura 3.24 Diagrama de Nyquist de capas de PPy-PSS electrodepositadas a 0.6V vs Pt “as prepared” y con diferentes grados de reducción, además de un substrato de platino utilizado para hallar la resistencia del electrolito utilizado en la medida (NaCl 0.1M). 72
- Figura 3.25 Configuración esquematizada de la estructura química del PEDOT-PSS: el punto representa el electrón desaparejado y el signo positivo es la carga positiva del PEDOT (ver apartado 3.1 del PPy). 73
- Figura 3.26 Curvas de síntesis para dos capas de PEDOT-PSS: A) a potencial constante 0.9V vs Pt y B) a corriente constante 1.25mA. 74
- Figura 3.27 Evolución de la masa depositada con respecto a la carga depositada durante el proceso de síntesis PPy-PSS y PEDOT-PSS, resultados del aumento de la masa en la EQCM respecto al crecimiento de carga: A) Muestra de PPy-PSS sintetizada potencioestáticamente a 0.6V vs Pt, B) Muestra de PEDOT-PSS sintetizada potencioestáticamente a 0.9V vs Pt. 76
- Figura 3.28 Evolución de la frecuencia de resonancia del cuarzo de la EQCM durante un proceso de reducción de PEDOT-PSS a -0.8V vs Pt en un tampón de fosfato sódico de pH 7, señalando el punto de máxima reducción teórica de la capa. 77
- Figura 3.29 Espectro XPS general de capas de PPy-PSS depositadas a 0.6V vs Pt y capas de PEDOT-PSS depositadas a 0.9V vs Pt. 78
- Figura 3.30 Deconvolución de los espectros XPS de la capa de PEDOT-PSS sintetizada a 0.9V vs Pt de los picos: A) C 1s, B) O 1s y C) S 2p. 79
- Figura 3.31 Figuras de AFM de las capas: A) PEDOT-PSS depositada potencioestáticamente a 0.9V vs Pt, B) PEDOT-PSS depositada galvanostáticamente a 1.25mA, C) PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt. Se incluyen las medidas de rugosidad y tamaño de grano. 80
- Figura 3.32 Gráficas de los resultados de A) rugosidad y B) tamaño de grano, se muestran las capas as prepared sintetizadas a corriente constante 1.25mA y a potencial constante 0.9V vs Pt y esta última en función de su nivel de reducción. 81
- Figura 3.33 Curvas de evolución del ángulo de contacto de las capas en función de su nivel de reducción, con y sin PLL adherida y con agua y medio de cultivo como fluido experimental: A) PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt. Y B) PEDOT-PSS depositada a 0.9V vs Pt. 82
- Figura 3.34 Voltametrías de reducción de las capas de OCP a -1.5V vs Pt a 20mV/s: PPy-PSS depositada a potencial constante 0.6V vs Pt, PEDOT-PSS depositada a potencial constante 0.9V vs Pt en A) Tampón fosfato sódico a pH 7.4 y B) Medio de cultivo celular. 82

- Figura 3.35 Curvas de evolución del pico de reducción principal de la voltametría de las capas en función del nivel de reducción previo a la voltametría de estas, utilizando tampón fosfato sódico a pH 7 como electrolito sobre capas de PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt y PEDOT-PSS depositada a 0.9V vs Pt. 83
- Figura 3.36 Diagrama de Nyquist de capas de PEDOT-PSS electrodepositadas a potencial constante 0.9V vs Pt “as prepared” y con un 50% de reducción, además de un substrato de platino utilizado para hallar la resistencia del electrolito utilizado en la medida (NaCl 0.1M). 84
- Figura 3.37 Imágenes de microscopía de fluorescencia de la tinción inmunoquímica Tau de neuronas de córtex cerebral de rata sembradas a 25000 cel/cm² y cultivadas a 4 días sobre: A) capa de PPy-DBS sintetizada dinámicamente hasta 0.75V vs Pt y B) control Borosilicato H. 85
- Figura 4.1 Detalle de A) una capa de PPy dopada con PSS junto a una bicapa de PEDOT/PPy dopada con lisina y de B) una bicapa de PEDOT/PPy dopada con glutamina junto a otra bicapa dopada con PLL. 93
- Figura 4.2 Estructura química de cada uno de los aminoácidos utilizados junto a su dato de punto isoeléctrico. 94
- Figura 4.3 Detalle de una bicapa de PEDOT/PPy dopada con aminoácido. 95
- Figura 4.4 Curvas de síntesis correspondientes a: A) I vs E de PEDOT dopado con glutamina 0.1M a pH 7.4, B) I vs E de PPy dopado con glutamina 0.1M a pH 7.4 sobre la capa depositada en A, C) I vs E de PEDOT dopado con lisina 0.01M a pH 12, D) I vs E de PPy dopado con lisina 0.01M a pH 12 sobre la capa depositado en C, E) I vs t de PEDOT dopado con lisina 0.01M a pH 12 y F) I vs t de PPy dopado con lisina 0.01M a pH 12 sobre la capa depositado en E. 98
- Figura 4.5 Curvas de la evolución de la masa registrada por la EQCM con respecto al tiempo correspondientes a: A) síntesis de PEDOT dopado con glutamina 0.1M a pH 7.4, B) PPy dopado con glutamina 0.1M a pH 7.4 sobre la capa depositada en A. (Nótese que el potencial es dinámico y por ello Δm oscila también). 99
- Figura 4.6 Espectro XPS general de una monocapa de PEDOT dopada con lisina 0.01M a pH 7.4, una bicapa de PEDOT/PPy dopada con 0.8 $\mu\text{g/ml}$ PLL a pH 7.4, una bicapa de PEDOT/PPy dopada con glutamina 0.1M a pH 7.4, una bicapa de PEDOT/PPy dopada con lisina 0.01M a pH 7.4, una bicapa de PEDOT/PPy dopada con glutamina 0.01M a pH 7.4 y una bicapa de PEDOT/PPy dopada con lisina 0.01M a pH 12. 101
- Figura 4.7 Deconvolución de los espectros XPS del C 1s y el O 1s de bicapas de PEDOT/PPy sintetizadas con: A) Glutamina 0.1M a pH 7.4, B) Glutamina 0.01M a pH 7.4, C) Lisina 0.01M a pH 12, D) Lisina 0.01M a pH 12, E) PEDOT/PPy-PLL 0.8 $\mu\text{g/ml}$ a pH 7.4 y F) una monocapa de PEDOT dopada con lisina 0.01M a pH 7.4. 104
- Figura 4.8 Espectros de ATR de bicapas de PEDOT/PPy dopadas con glutamina 0.1M a pH 7.4, con lisina 0.01M a pH 7.4 y con PLL 0.8 $\mu\text{g/ml}$ a pH 7.4. Nótese ruido 107

significativo de la señal de H₂O debido al bajo espesor de la capa.

- Figura 4.9 Figuras de AFM de las capas especificadas, todas sintetizadas a pH 7.4 excepto la indicada a pH 12. Cada imagen presenta su propia escala de color debido a la gran variabilidad de los valores de rugosidad. 108
- Figura 4.10 Voltametrías de reducción comparativas de bicapas de PEDOT/PPy de OCP a -1.5V vs Pt a 20mV/s indicadas con su color correspondiente: A)dopada con glutamina 0.1M pH 7.4 y monocapa de PPy dopada con DBS, B)dopada con glutamina 0.1M y dopada con PLL 0.8 µg/ml, ambas a pH 7.4, C)dopada con glutamina 0.1M y con glicina 0.1M, ambas a pH 7.4, D)dopada con lisina y con glutamina, ambas a 0.1M y pH 7.4, E) dopada con glutamina a pH 7.4, una a 0.1M y otra a 0.01M, F) dopada con lisina 0.1M, una a pH 7.4 y otra a pH 12. 111
- Figura 4.11 Microfotografías representativas y supervivencia celular de neuronas de córtex cerebral sembradas a 25000 células/cm² y cultivadas durante 4 días sobre un control de vidrio borosilicato-H (A y B) y una bicapa PEDOT/PPy-lisina 0.01M a pH 12 (C y D). A y C, tinción inmunocitoquímica Tau; B y D, tinción Hoechst del núcleo correspondiente a las células de A y C, respectivamente. Barra de escala = 50 µm. 112
- Figura 4.12 Estadística de supervivencia celular en cultivos de alta densidad (25000 células/cm²) después de 4 días in Vitro (DIV) de bicapas de PEDOT/PPy sintetizadas con aminoácidos, todas ellas a pH 7.4 excepto la especificada a pH 12: 2PLL indica las capas con el doble de concentración de PLL adherida a su superficie. * muestra los resultados de todas las capas dopadas con surfactantes, todas las monocapas de PEDOT dopadas con biomoléculas y las siguientes bicapas: PEDOT/PPy-glicina 0.1M, PEDOT/PPy-ácido glutámico 0.1M, PEDOT/PPy-glutamato sódico 0.1M y PEDOT/PPy-PLL 0.8 µg/ml. 113
- Figura 5.1 Curvas I vs t de síntesis correspondientes a: A) PPy dopado con IrCl₃·xH₂O 8mM, B) PPy dopado con K₃Ir(NO₂)₆ 3 mM C) PEDOT dopado IrCl₃·xH₂O 8mM,, D) PEDOT dopado con K₃Ir(NO₂)₆ 3 mM. 122
- Figura 5.2 Curva de síntesis de una capa de PPy 0.1M dopado con IrCl₃·xH₂O 8mM, de OCP a 1V vs Pt, a 20mV/s. 20 ciclos. 123
- Figura 5.3 Imágenes obtenidas en el microscopio TEM: A) Detalle de partículas de IrO₂ dentro de la capa de PPy-IrCl₃ y B) fotografía de difracción de electrones del IrO₂ de la imagen A. 124
- Figura 5.4 Curvas de la evolución de la frecuencia registrada por la EQCM (proporcional a la masa depositada) con respecto a la carga de síntesis correspondientes a: A) síntesis de PPy dopado con IrCl₃·xH₂O 8mM, B) PPy dopado con K₃Ir(NO₂)₆ 3 mM. 125
- Figura 5.5 Espectro XPS general de capas de PPy-IrCl₃ y PPy-K₃Ir(NO₂)₆ depositadas a 0.6 V vs Pt y PEDOT-IrCl₃ y PEDOT- K₃Ir(NO₂)₆ depositadas a 1 V vs Pt. 126
- Figura 5.6 Deconvolución de los espectros XPS del C 1s de las capas de: A) PPy-IrCl₃ depositada a 0.6V vs Pt, B) PPy-K₃Ir(NO₂)₆ depositada a 0.6V vs Pt, C) PEDOT-IrCl₃ depositada a 1 V vs Pt, D) PEDOT- K₃Ir(NO₂)₆ depositada a 1 V vs Pt. 129

- Figura 5.7 Deconvolución de los espectros XPS del O 1s de las capas de: A) PPy-IrCl₃ depositada a 0.6V vs Pt, B) PPy-K₃Ir(NO₂)₆ depositada a 0.6V vs Pt, C) PEDOT-IrCl₃ depositada a 1 V vs Pt, D) PEDOT- K₃Ir(NO₂)₆ depositada a 1 V vs Pt. 130
- Figura 5.8 Espectros de ATR de la capas de PPy-IrCl₃ y PPy-K₃Ir(NO₂)₆ depositadas a 0.6 V vs Pt y PEDOT-IrCl₃ y PEDOT- K₃Ir(NO₂)₆ depositadas a 1 V vs Pt. 132
- Figura 5.9 Figuras de AFM de las capas especificadas. Cada imagen presenta su propia escala de color adecuada al tamaño. 133
- Figura 5.10 Gráficas comparativas de voltametrías de reducción a 20 mV/s de A) PPy-IrCl₃ depositada a 0.6V vs Pt y PPy-K₃Ir(NO₂)₆ depositada a 0.6V vs Pt, B) PEDOT-IrCl₃ depositada a 1 V vs Pt y PEDOT- K₃Ir(NO₂)₆ depositada a 1 V vs Pt. 135
- Figura 5.11 Estadística de supervivencia celular en cultivos de alta densidad (25000 células/cm²) después de 4 días In Vitro (DIV) de una capa de PPy-K₃Ir(NO₂)₆ sintetizada a 0.6V vs Pt y las capas englobadas en *: PPy-IrCl₃ sintetizada a 0.6V vs Pt, PEDOT-IrCl₃ y PEDOT- K₃Ir(NO₂)₆, ambas sintetizadas a 1V vs Pt. 136
- Figura 5.12 Imágenes de la disolución inicial de pirrol-IrCl₃, y la misma disolución 7 días después. 137
- Figura 5.13 Imágenes de SEM de polvo de: A) PPy-IrCl₃ y B) PPy-K₃Ir(NO₂)₆ . 137
- Figura 5.14 Gráfico de la distribución de tamaños de las esferas de PPy-IrCl₃ correspondiente a la Figura 5.13 A. 138
- Figura 5.15 Espectro XPS general de polvos de PPy-IrCl₃ y PPy-K₃Ir(NO₂)₆. 140
- Figura 5.16 Deconvolución de los espectros XPS del C 1s y del O 1s de los polvos de: A) PPy-IrCl₃ y B) PPy-K₃Ir(NO₂)₆ . Obsérvese que la señal de O en A es muy inferior y su señal más ruidosa, así como su pico más ancho. 141
- Figura 5.17 Espectros de ATR de los polvos de PPy-IrCl₃ y PPy-K₃Ir(NO₂)₆ . 143
- Figura 5.18 Imágenes de SEM de PPy-IrO_x sintetizado a 150 °C durante 96 horas: A) esferas de polímero puro con nanopartículas blancas de IrO_x, B) Nanopartículas de IrO_x encapsuladas en polímero (material híbrido) y C) imagen de BSED en la cual el IrO_x presenta un color más claro. 146
- Figura 5.19 Imágenes de SEM de PPy-IrO_x sintetizado a 150 °C durante: A) 96 horas, B) 168 horas y C)240 horas. 146
- Figura 5.20 Imágenes de SEM de PEDOT-IrO_x sintetizado a 150 °C durante 96 horas: A) nanoesferas de polímero puro, B) nanoesferas de polímero puro mezcladas con nanopartículas de IrO_x puro, C) Nanopartículas de IrO_x encapsuladas en polímero (material híbrido) y formas esféricas de polímero puro. 147

- Figura 5.21 Espectro XPS general de polvos de IrO₂ comercial y PPy-IrO_x y PEDOT-IrO_x sintetizados a 150 °C durante 96 horas. 148
- Figura 5.22 Deconvolución de los espectros XPS C 1s y del O 1s de los polvos de: A) IrO₂ comercial y de B) PPy-IrO_x y C) PEDOT-IrO_x sintetizados a 150 °C durante 96 horas. 149
- Figura 5.23 Espectros de ATR de los polvos de A) PPy-IrO_x y B) PEDOT-IrO_x sintetizados a 150 °C durante 96 horas. 152
- Figura 5.24 Voltametrías de barrido lineal de OCP a -0.75V vs Pt a 2 mV/s de los polvos de A) PPy-IrO_x y B) PEDOT-IrO_x sintetizados a 150 °C durante 96 horas en un electrolito de tampón de fosfato sódico 0.1M a pH 7.4. i) Curva del electrolito (blanco), ii) material reducido, iii) material as-prepared y iv) material oxidado. 153
- Figura 5.25 Voltametrías cíclicas realizadas en medio de tampón fosfato sódico 0.1M a pH 7.4 a 20 mV/s de A) disco de teflón puro B) disco de teflón y IrO₂ comercial, C) disco de teflón y PPy-IrO_x sintetizado a 150 °C durante 96 horas y D) PEDOT-IrO_x sintetizado a 150 °C durante 96 horas. 154
- Figura 5.26 Histogramas de los ensayos MTT a 6 días in vitro: A) PPy-IrO_x, secuencia 1, B) PPy-IrO_x, secuencia 2, C) PEDOT-IrO_x, secuencia 1, B) PEDOT-IrO_x, secuencia 2. Todos los resultados son el valor medio de 6 a 11 cultivos. 155
- Figura 5.27 Histogramas de los ensayos MTT a 9 días in vitro: A) PPy-IrO_x, secuencia 1, B) PPy-IrO_x, secuencia 2, C) PEDOT-IrO_x, secuencia 1, B) PEDOT-IrO_x, secuencia 2. Todos los resultados son el valor medio de 6 a 11 cultivos. 156

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<p>Tabla 3.1 Valores del grosor de las muestras de PPy-DBS sintetizadas con Emax 0.6V vs Pt y 0.75V vs Pt en su parte central halladas mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) y relacionados con su grado de reducción. Los cambios de volumen (ΔV) están referidos al grosor de la muestra as prepared.</p>	44
<p>Tabla 3.2 Valores del grosor de las muestras de PPy-PSS en su parte central medidos con el microscopio electrónico de barrido (SEM) relacionados con su grado de reducción. Los cambios de volumen (ΔV) están referidos al grosor de la muestra as prepared. Obsérvese el menor cambio de volumen respecto a DBS.</p>	49
<p>Tabla 3.3 Resultados teóricos y experimentales de Q y m para la síntesis de capas de Polipirrol-DBS y Polipirrol-PSS. Se muestra la eficiencia del proceso y el peso molecular calculado a partir de $n = 2.33$.</p>	53
<p>Tabla 3.4 Cuantificación molar de los picos del espectro general de XPS de capas de PPy-DBS depositadas con Emax 0.6V vs Pt y con Emax 0.75V vs Pt y de PSS depositada a potencial constante de 0.6V vs Pt, todas ellas as prepared. Se incluyen las relaciones molares de los propios resultados de S/N y Na/N, y el exceso de C calculado.</p>	57
<p>Tabla 3.5 Cuantificación molar de los picos del espectro general de XPS de capas de PPy-DBS depositadas con Emax 0.6V vs Pt y con Emax 0.75V vs Pt y de PSS depositada a potencial constante de 0.6V vs Pt, todas ellas sobrerreducidas con posterioridad. Se incluyen las relaciones molares de los propios resultados de S/N y Na/N, y el exceso de C calculado.</p>	57
<p>Tabla 3.6 Cuantificación molar de los picos del espectro general de XPS de capas de PPy-PSS depositadas a 0.6V vs Pt as prepared y en diferentes grados de reducción: 100 y 50%. Se incluyen las relaciones molares de los propios resultados de S/N y Na/N, y el exceso de C calculado.</p>	58
<p>Tabla 3.7 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal C 1s para una capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, una capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt y una capa de PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt.</p>	60
<p>Tabla 3.8 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal O 1s para una capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, una capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt y una capa de PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt.</p>	61

Tabla 3.9 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal N 1s para una capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, una capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt y una capa de PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt.	62
Tabla 3.10 Valores del grosor de las muestras de PEDOT-PSS en su parte central medidos con el microscopio electrónico de barrido (SEM) relacionados con su grado de reducción. Los cambios de volumen (ΔV) están referidos al grosor de la muestra as prepared.	75
Tabla 3.11 Cuantificación molar de los picos del espectro general de XPS de capas de PPy-PSS depositadas a 0.6V vs Pt y de dos capas de PEDOT-PSS sintetizadas a 0.9V vs Pt en exactamente las mismas condiciones. Resultados en %.	78
Tabla 4.1 Relación de capas sintetizadas en función del pH del electrolito y de la concentración de aminoácido.	96
Tabla 4.2 Resultados teóricos y experimentales de la síntesis de capas de PEDOT y PPy dopados con glutamina y lisina a las condiciones de concentración de pH y concentración del aminoácido especificadas.	100
Tabla 4.3 Cuantificación molar expresada en porcentajes de los picos del espectro general de XPS de monocapas de PEDOT-biomolécula y bicapas de PEDOT/PPy-biomolécula, cuyo dopante está especificado en cada caso. Todas fueron sintetizadas potenciodinámicamente con una concentración de dopante de 0.1M y un pH de 7.4, excepto en los casos debidamente especificados.	102
Tabla 4.4 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal C 1s, se muestran los ratios molares en forma de porcentaje para cada tipo de enlace para las muestras analizadas en la Figura 4.7, bicapas de PEDOT/PPy dopadas con: glutamina 0.1M a pH 7.4, glutamina 0.01M a pH 7.4, lisina 0.01M a pH 7.4, lisina 0.01M a pH 12, PLL 0.8 $\mu\text{g/ml}$ a pH 7.4 y una monocapa de PEDOT dopada con lisina 0.01M a pH 7.4.	105
Tabla 4.5 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal O 1s, se muestran los ratios molares en forma de porcentaje para cada tipo de enlace para las muestras analizadas en la Figura 4.7, bicapas de PEDOT/PPy dopadas con: glutamina 0.1M a pH 7.4, glutamina 0.01M a pH 7.4, lisina 0.01M a pH 7.4, lisina 0.01M a pH 12, PLL 0.8 $\mu\text{g/ml}$ a pH 7.4 y una monocapa de PEDOT dopada con lisina 0.01M a pH 7.4. Las muestras con mayor éxito en cultivos celulares se marcan con un *.	106
Tabla 4.6 Datos microestructurales extraídos del análisis AFM de las capas: Rugosidad, Distancia pico valle tamaño de grano. Datos de grosor obtenidos mediante imágenes de SEM. La columna de ángulo de contacto describe la hidrofiliicidad de la capa medida mediante un goniómetro (valores más hidrofóbicos cuanto más lejanos a 90°).	109

Tabla 5.1 Resultados teóricos y experimentales del análisis de la síntesis de capas de PPy-IrCl ₃ , PPy-K ₃ Ir(NO ₂) ₆ , PEDOT-IrCl ₃ y PEDOT-K ₃ Ir(NO ₂) ₆ mediante EQCM	125
Tabla 5.2 Cuantificación molar expresada en porcentajes de los picos del espectro general de XPS de capas de PPy-IrCl ₃ y PPy-K ₃ Ir(NO ₂) ₆ depositadas a 0.6 V vs Pt y PEDOT-IrCl ₃ y PEDOT- K ₃ Ir(NO ₂) ₆ depositadas a 1 V vs Pt.	128
Tabla 5.3 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal C 1s para capas de PPy-IrCl ₃ y PPy-K ₃ Ir(NO ₂) ₆ depositadas a 0.6 V vs Pt y PEDOT-IrCl ₃ y PEDOT- K ₃ Ir(NO ₂) ₆ depositadas a 1 V vs Pt.	129
Tabla 5.4 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal O 1s para capas de PPy-IrCl ₃ y PPy-K ₃ Ir(NO ₂) ₆ depositadas a 0.6 V vs Pt y PEDOT-IrCl ₃ y PEDOT- K ₃ Ir(NO ₂) ₆ depositadas a 1 V vs Pt.	131
Tabla 5.5 Datos microestructurales extraídos del análisis AFM de las capas: Rugosidad, Distancia pico valle y tamaño de grano. Datos de grosor obtenidos mediante imágenes de SEM. La columna de ángulo de contacto describe la hidrofiliicidad de la capa medida mediante un goniómetro.	134
Tabla 5.6 Cuantificación molar expresada en porcentajes de los picos del espectro general de XPS de polvos de PPy-IrCl ₃ y PPy-K ₃ Ir(NO ₂) ₆ .	141
Tabla 5.7 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal C 1s para polvos de PPy-IrCl ₃ y PPy-K ₃ Ir(NO ₂) ₆ .	142
Tabla 5.8 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal O 1s para polvos de PPy-IrCl ₃ y PPy-K ₃ Ir(NO ₂) ₆ .	142
Tabla 5.9 Cuantificación molar expresada en porcentajes de los picos del espectro general de XPS de polvos de IrO ₂ comercial y de PPy-IrO _x y PEDOT-IrO _x sintetizados a 150 °C durante 96 horas.	149
Tabla 5.10 Resultado de la deconvolución y asignación de picos C 1s de IrO ₂ comercial y de PPy-IrO _x y PEDOT-IrO _x sintetizados a 150 °C durante 96 horas.	150
Tabla 5.11 Resultado de la deconvolución y asignación de picos O 1s de IrO ₂ comercial y de PPy-IrO _x y PEDOT-IrO _x sintetizados a 150 °C durante 96 horas.	150
Tabla 5.12 Porcentaje atómico de elementos obtenidos mediante análisis de EDX en cada una de las fases del polvo de PPy-IrO _x .	151

Tabla 5.13 Porcentaje atómico de elementos obtenidos mediante análisis de EDX 151
en cada una de las fases del polvo de PEDOT-IrO_x.

Capítulo 1

Introducción

1.1 Lesiones neuronales

El cerebro está formado por millones de células llamadas neuronas o células nerviosas. Estas neuronas se pueden describir esquemáticamente como procesadores de información con un canal de entrada de información (dendritas), un órgano de cómputo (soma) y un canal de salida de información (axón) como se muestra en la Figura 1.1.

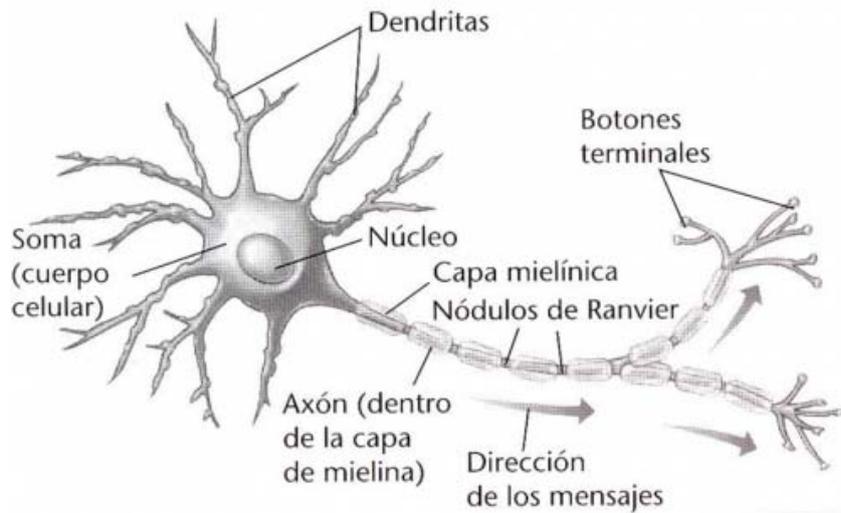


Figura 1.1 Partes de una neurona.

Los traumas, tumores, infecciones y enfermedades vasculares y degenerativas pueden perjudicar las neuronas, las células glia y los vasos sanguíneos en el sistema nervioso central. En estos casos la neurona muere o los axones son dañados, interrumpiendo la transmisión de la información. Las lesiones del sistema nervioso central en humanos asociadas a traumas o isquemias están en un rango entre 1 cm y 10 cm [1,2] o incluso más de 10 cm. Además se forman cavidades llenas de fluido extracelular como resultado de la pérdida de la estructura del tejido, la fagocitosis o muerte de las células (Figura 1.2) y de la extirpación quirúrgica de cicatrices fibróticas mesenquimales [3,4]. La extirpación de tumores y muchas otras enfermedades neurológicas también causan la formación de cavidades y cicatrices en el tejido. Estas pueden convertirse en una barrera mecánica para el crecimiento axonal y la migración celular e interferir con las señales espaciales que podrían ayudar a la reparación.



Figura 1.2 Resonancia magnética de una lesión de una espina dorsal humana con epicentro en la vértebra C7, un año después de la lesión. Un quiste de aproximadamente 3cm dividido por una fibra reemplaza el tejido neural. (Foto cedida por el Laboratorio de Reparación Neuronal del Hospital Nacional de Parapléjicos de Toledo – España).

En el caso de los mamíferos adultos, tras una lesión en el sistema nervioso central (CNS) se crea también un entorno inhibitorio en forma de cicatriz de glía, impidiendo una reparación regenerativa del tejido dañado [5,6]. Sin embargo, los daños en el sistema nervioso periférico (PNS) a menudo pueden tener un cierto grado de reparación regenerativa del tejido dañado si las dos partes del tejido dañado no están separadas más de 10mm [7]. Esto es debido en gran medida a que en el PNS existen señales de crecimiento regenerativo proporcionadas por las células gliales presentes en el entorno neuronal (e.g. células de Schwann), macrófagos y monocitos [8]. En el caso de que la lesión fuera mayor habría que intervenir quirúrgicamente para transplantar células nerviosas que proporcionen señales de crecimiento regenerativo adicionales [7]. En el caso del CNS se han experimentado sin éxito estrategias similares usando células de espina dorsal de embriones o tejido nervioso periférico [9,10]. También se han usado actores neurotróficos y enzimas o anticuerpos que neutralizan los inhibidores del crecimiento de las dendritas [11]. Esta aproximación con células de Schwann ha producido los mejores resultados en el crecimiento de fibras nerviosas en ratas. Sin embargo, el número de axones regenerados aún es muy bajo (menos del 1% del valor normal) [12], aún cuando el trasplante es complementado con la administración de neurotrofinas.

Otro impedimento adicional importante para una exitosa regeneración es el proceso conocido como Schwannosis, una proliferación intra y extra celular aberrante de células Schwann, sin regeneración de las vías interrumpidas por la lesión. La Schwannosis ocurre

espontáneamente en más de la mitad de los casos de lesiones en la medula espinal en humanos, y además no hay recuperación de las funciones normales [4,13-14]. Por el contrario, se incrementa la producción de proteoglicanos que pueden obstaculizar la regeneración axonal [34] y potencialmente contribuir al dolor y la hipertonia muscular o espasticidad creando un efecto de masa que debe ser evitado [4,13].

La Schwannosis es un claro indicador de que no todas las respuestas de crecimiento glial o axonal permiten la reparación del sistema nervioso central. Desafortunadamente, muchas terapias experimentales para lesiones en la médula espinal inducen respuestas comparables con la Schwannosis que son malinterpretadas como reparaciones de las lesiones sólo debido al número de células y dendritas vistas dentro de las cavidades. El uso de métodos inapropiados para evaluar la recuperación funcional complica aún más el análisis de este tipo de intervenciones.

Por otro lado, la respuesta de crecimiento se restringe a un tipo particular de neuronas, y la mayor parte de las fibras de crecimiento son colaterales de axones vecinos y no están asociadas a la recuperación funcional. Las células olfativas *ensheating* (palabra que viene a significar “envainadoras”) son las primeras en haber sido estudiadas como células Schwann [15,16] habiéndose observado efectos pro-regenerativos después de su trasplante en modelos de roedores. Sin embargo, dichos resultados no han sido confirmados [17,18]. En algunas investigaciones se han inyectado células *ensheating* en contusiones de la médula espinal en ratas que se parecen mucho a las lesiones humanas en relación con el patrón de daño neuronal y la formación de cavidades [19,20]. A pesar del tamaño relativamente pequeño de las lesiones experimentales (alrededor de 3 mm), los trasplantes de células olfativas *ensheating* no promueven la regeneración de vías interrumpidas pero sí inducen brotes patológicos de axones adicionales (Figura 1.3) similares a los observados en la Schwannosis [4,13-14].

Aunque la siembra con células inyectadas por sí sola no tiene éxito en la reparación de lesiones, hay pacientes con lesiones en la espina dorsal en todo el mundo que están siendo tratados con inyecciones de diversos tipos de células. Tal estrategia origina barreras adicionales a la regeneración y exponen al paciente a riesgos quirúrgicos innecesarios.

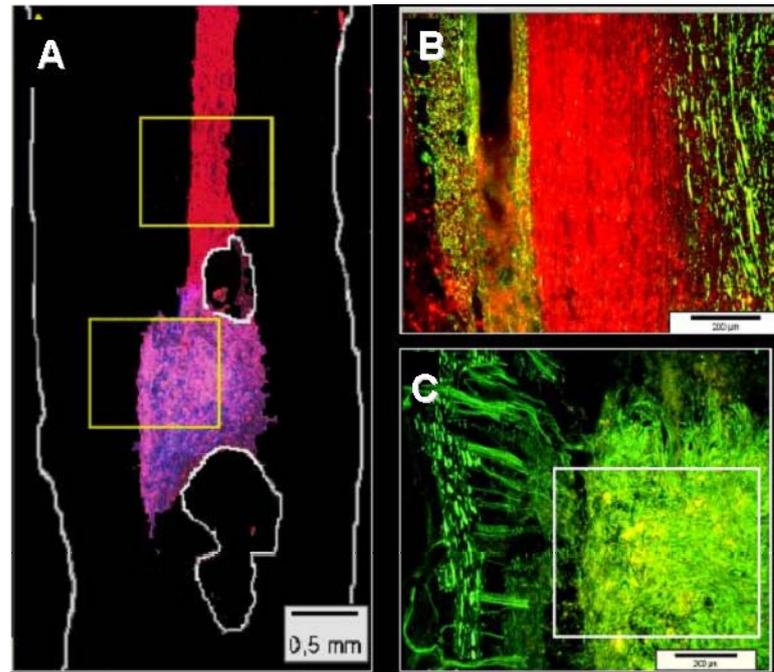


Figura 1.3 Transplante de células olfativas ensheating (azul) en la vértebra C7 de una rata donde hay una contusión en la espina dorsal. Las células olfativas ensheating no promueven la regeneración de las vías corticoespinales (rojo), pero inducen un brote aberrante del axón (parte C) [56].

Los tejidos del sistema nervioso, y en general las células, desarrollan campos eléctricos que mantienen gradientes iónicos en contra del equilibrio termodinámico y que se usan en la transmisión de señales nerviosas. Estos campos son claramente observados en la forma de potenciales de membrana. Por otro lado la presencia de heridas origina gradientes de campo eléctrico adicionales que ayudan en el proceso de curación de heridas favoreciendo el mecanismo de cierre de membranas [20]. Esto indujo a la investigación de campos eléctricos externos que puedan ayudar a esa curación, minimizando los efectos secundarios de la formación de cicatrices. Es ahí donde cobran importancia los biomateriales, que además de dar un soporte estructural deben estar programados para interactuar con los tejidos a través de su actividad eléctrica o electroquímica. Para este propósito es necesario que los materiales conductores soporten la existencia de campos sin calentamiento excesivo y pérdida de energía, y que puedan llevar a cabo procesos eléctricos y electroquímicos a las cercanías del tejido biológico sin reacciones químicas secundarias. A través de ellos sería posible introducir estímulos a los tejidos para regular la adherencia, crecimiento, migración, supervivencia y diferenciación celular. La aplicación de potenciales ha sido probada para actuar en algunos tejidos *in vitro*. Los ejemplos más conocidos son los efectos en el sistema nervioso [21], tema que nos ocupa, huesos y cartílagos [22], el epitelio de la córnea [23] y células del tejido endotelial [24].

1.2 Biomateriales como sustrato de crecimiento neuronal: bioelectrodos

Desde hace dos siglos, se sabe de la existencia de campos eléctricos constantes en el espacio extracelular en plantas y animales, así como la existencia de “potenciales de acción” dinámicos que constituyen la base de la comunicación celular. De hecho, esta información se ha utilizado en el registro de señales (electrocardiogramas) o en estimulación (marcapasos). La bioelectricidad es un fenómeno pues conocido, y el crecimiento, la migración y la división celular ocurren en presencia de dichos campos eléctricos y gradientes iónicos, en los que un potencial concreto está presente durante horas o días.

Por tanto las células integran señales químicas y eléctricas en su desarrollo, y al igual que existen factores de crecimiento químico pueden existir factores eléctricos.

En base a ello, se han llegado a realizar experimentos que muestran que la aplicación de campos eléctricos en un medio de crecimiento neuronal de células de xenopus (ranas), induce el crecimiento axonal hacia el cátodo cuando los electrodos se sitúan alejados de las células (Figura 1.4) [29]. Que ello funcione en neuronas de mamífero no está claro, ni que lo haga cuando el material en sí es el sustrato del crecimiento neuronal.

El trabajo de McCaig [30] muestra la influencia de la existencia de un gradiente de campo eléctrico en el medio de cultivo celular, al mantener los electrodos fuera del medio mediante el uso de puentes salinos en celdas electroquímicas de 3 compartimentos.

Los mecanismos que se proponen para explicar la influencia que tiene el campo eléctrico sobre el crecimiento y direccionamiento celular están relacionados tanto con los mecanismos de intercalación de Ca^{2+} , como con otros efectos de gradiente iónico. Sin embargo la naturaleza “eléctrica” de las conexiones neuronales, los gradientes de campo eléctrico a través de membranas sanas o dañadas así como el tamaño micro o nanoestructurado de las propias células hacen prever una influencia del material más compleja. Incluso en esos experimentos iniciales, el papel que juega la adhesión celular al material puede ser determinante, así como la química o la microestructura de este [30].

Aunque no se ha conocido hasta el momento la interacción que se establece entre el material y el medio celular, o las células, el uso de materiales electroactivos en los casos biocompatibles, podría crear campos eléctricos locales de menor intensidad que los utilizados en algunos trabajos [29] y por ello minimizar los posibles efectos secundarios tanto en estimulación funcional como en inducción del desarrollo, de darse este.

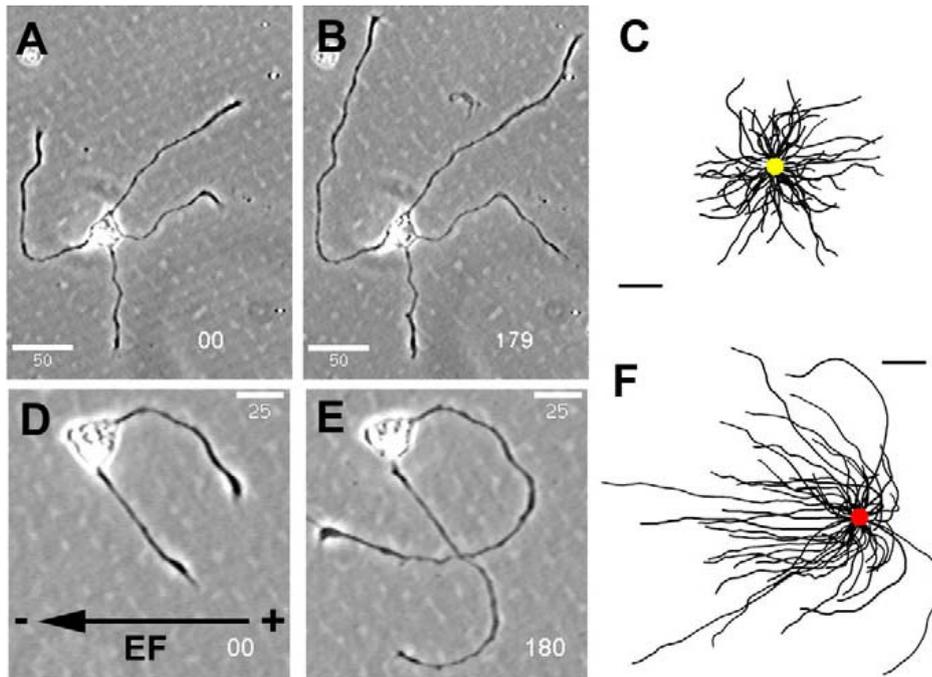


Figura 1.4 Crecimiento de neuronas *Xenopus* de la espina dorsal a través del cátodo *in Vitro*. A) y B) Primera y última imagen de una secuencia *time-lapse* de neuronas creciendo en ausencia de campo eléctrico. El tiempo transcurrido (min) se muestra en e la esquina inferior derecho. C) Imagen compuesta, en la cual los cuerpos de las células (punto central amarillo) de algunas neuronas han sido superpuestos para mostrar el camino del crecimiento neuronal hacia el exterior durante 5 horas (sin campo eléctrico). D) y E) Neuronas en presencia de un campo eléctrico de 150 mV/mm durante 3 horas, con el vector del campo eléctrico mostrado en D). Los conos de crecimiento comienzan a dirigirse al cátodo en cuestión de minutos y uno de los conos cruza la otra dendrita para migrar hacia el cátodo. F) Imagen compuesta de las células expuestas a un campo eléctrico de 150 mV/mm por 5 horas. Los caminos dendríticos se curvan dramáticamente hacia el cátodo y las dendritas se extienden más rápidamente en dirección del cátodo que del ánodo. Barras de escala: A) y B) 100 μm . C) y F) 25 μm [50].

Si los materiales elegidos presentan además de su actividad como electrodos, reacciones propias de intercalación en presencia de campos eléctricos, estas pueden servir de alternativa a las reacciones que usualmente ocurren en la superficie de metales nobles como el Pt o las aleaciones Pt/Ir por ejemplo, como la formación de radicales libres que se llega a dar en electrodos de electroestimulación por la oxidación del agua o reducción del O_2 disuelto. Por tanto la elección de los posibles materiales a estudiar como prótesis neuronal debe tener en cuenta aspectos como:

- Electroactividad en un medio iónico
- Biocompatibilidad
- Existencia de una ventana de potencial amplia en la que no ocurran reacciones que den lugar a productos tóxicos como la generación de radicales libres

- El material debe permitir la adhesión y proliferación de células en su superficie, sin toxicidad, presentar propiedades estables a largo plazo, y cuando el estímulo eléctrico sea aplicado continuar siendo compatible sin producir daño a las células o retracción de las dendritas.

Los materiales implantados hasta ahora en el sistema nervioso han sido hasta el presente sobretodo sensores y electrodos de estimulación, que han contribuido al tratamiento funcional de trastornos neurológicos como el Parkinson o el dolor neuropático mediante la aplicación de pulsos cortos del orden de μs [25]. Los más habituales han sido Pt y sus aleaciones con iridio. Sin embargo, aún hay problemas que limitan el uso de electrodos implantables, casi siempre relacionados con la biocompatibilidad del material [26] o con la eficacia de la transferencia de carga entre el material y el tejido, lo que da lugar a radicales libres en la interfase electrodo-tejido [27]. Los pacientes muchas veces desarrollan intolerancia al tratamiento debido a que la inflamación y fibrosis alrededor del electrodo aumentan la impedancia y se requiere finalmente eliminar el implante. También se ha propuesto el uso de estimulación mediante el uso de corriente directa para el tratamiento del daño en la médula espinal pero hasta ahora el efecto terapéutico está limitado por la aparición de productos citotóxicos en las reacciones catódicas y anódicas cuando se usa Pt y otros electrodos inertes. Estos factores evidencian la necesidad de desarrollar nuevos materiales con mejores propiedades electroquímicas que permitan gracias a sus propiedades redox la existencia de procesos faradaicos alternativos, y no en el tejido sino en el propio material. Entre ellos, óxidos como el de iridio, o los polímeros conductores son los candidatos más prometedores por su probada biocompatibilidad.

Los materiales estudiados en este trabajo, los polímeros conductores, cumplen las condiciones expuestas anteriormente y ya han tenido éxito en algunos ensayos previos [49,51-52,28]. Además de estos se está estudiando el IrO_2 en el campo de la electroestimulación neuronal por su alta capacidad de transferencia de carga y por sus buenos resultados como sustrato de adhesión y crecimiento neuronal [31,32]. Sin embargo, este material presenta la desventaja de su rigidez como óxido, lo cual no sería útil para un dispositivo de regeneración neuronal alojado en el organismo. Por esta razón en este trabajo se realizó la síntesis de materiales híbridos de polímeros conductores y especies de iridio, los cuales podrían combinar las propiedades de ambos materiales. Hay otros materiales que han presentado buenos resultados como sustrato de crecimiento neuronal, uno de ellos conocido por su biocompatibilidad y su uso como biomaterial por su capacidad antiinflamatoria como es el TiO_2 [33], pero que se descartaron para este trabajo por su condición de aislantes.

Una de las grandes ventajas de los polímeros conductores además de su capacidad para intercalar posibles sustancias perniciosas para las células por su actividad redox es su flexibilidad, y también la posibilidad de ser sintetizados usando diferentes contraiones, lo que permitió el uso de biomoléculas que mejoraron las condiciones para el éxito de los cultivos celulares en otros medios en la literatura [34].

1.3 Polímeros conductores como bioelectrodos

El primer polímero conductor de la electricidad descubierto fue el polipirrol (PPy), sintetizado por primera vez en la década de los 60, pero el descubrimiento no se consideró adecuadamente y se perdió [37]. No fue hasta el año 1977, cuando Alan Macdiarmid, Hideki Sirakawa y Alan Hegger consiguieron incrementar la conductividad del poliacetileno mediante su dopaje con yodo que fue reconocido el primer polímero conductor [38]. Aunque este polímero es aún uno de los más estudiados en este campo, tiene importantes limitaciones como la dificultad de su procesado y su alta inestabilidad en aire. Por ello se empezó a centrar la atención en otros polímeros como los polifenilenos, que al ser cíclicos son mucho más estables térmicamente. Como resultado se desarrollaron en la década de los 80 varios tipos de polímeros conductores aromáticos como son el polipirrol (PPy), el politiofeno (PT), la polianilina (PANI) y el poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT). Estos han mostrado una buena estabilidad y conductividad, además de una gran facilidad de síntesis [39,40]. En concreto, y hablando de los polímeros estudiados en este trabajo, el PPy y el PEDOT (Figura 1.5) son fáciles de producir tanto de forma química como electroquímica y poseen una gran versatilidad de preparación, pudiendo ajustar sus propiedades finales en función del dopante o contraión necesario para su síntesis. Todas estas propiedades, eléctricas, ópticas y electroquímicas, hacen que el PPy tenga aplicaciones en campos como condensadores, dispositivos electrocrómicos, recubrimientos anticorrosión, baterías, sensores y actuadores [41]. Esta última aplicación es posible gracias al incremento de volumen que se produce en estas capas durante los procesos redox, que transcurren con intercalación de iones o moléculas de disolvente [42,43]. El PEDOT tiene unas propiedades muy similares al PPy, de hecho el anillo del monómero EDOT es muy parecido al de pirrol, aunque en el primero el azufre ocupa el lugar del nitrógeno en el pirrol. Además el EDOT cuenta con átomos de oxígeno donadores de electrones ocupando sus posiciones β en el anillo de tiofeno [44], que hacen al polímero más estable ante la oxidación una vez sintetizado, siendo este uno de los factores importantes que confieren más estabilidad a este material con respecto a otros polímeros conductores. Asimismo, es más resistente a cambios de temperatura y pH. Por ejemplo, el

PPy tiene una vida más corta debido a que durante su actividad redox se pueden producir en él cambios estructurales que resultan irreversibles. Algunas otras ventajas del PEDOT con respecto al PPy son su mayor conductividad y su menor *bandgap* [45]. Todas estas propiedades le permiten que sea usado para aplicaciones como electrodos en dispositivos semiconductores orgánicos y conexiones eléctricas, baterías [44], dispositivos electrocrómicos, supercondensadores, biosensores [46], celdas solares [47] y actuadores electroquímicos [48], con una gran reproducibilidad

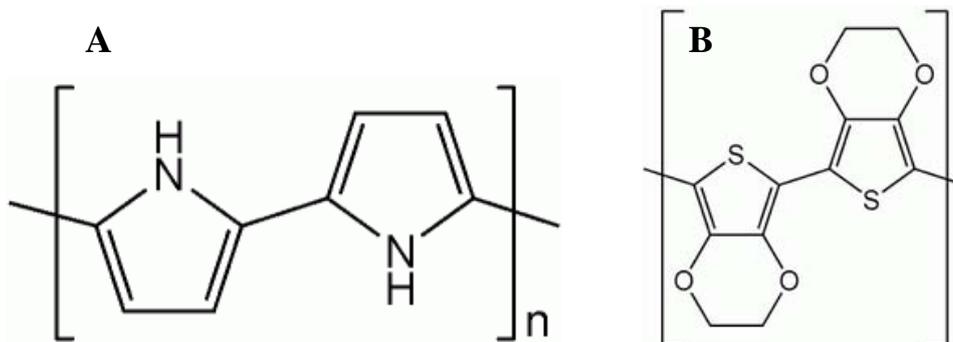


Figura 1.5 Imágenes de la estructura química de: A) Polipirrol (PPy) y B) Poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT).

Ambos polímeros han sido ensayados en el campo que nos ocupa, el de la evaluación en sistemas neuronales con buenos resultados gracias a todas las propiedades explicadas en el anterior apartado y sobretodo a su biocompatibilidad [49,50].

Las propiedades redox de estos materiales que permiten oxidaciones y reducciones repetidas con procesos de intercalación simultáneos permiten a su vez la liberación e intercalación de dopantes y otras especies que podrían ser moléculas importantes a nivel celular como factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular, ácidos nucleicos, etc. [51]. Además, la flexibilidad estructural que poseen estos materiales por el hecho de ser polímeros les da un gran potencial para su buen funcionamiento en futuros dispositivos implantados en tejido blando. Hay que señalar que el PPy ha sido mucho más estudiado que el PEDOT en este campo y su biocompatibilidad está más contrastada [52], aunque últimamente también se ha propuesto en varios laboratorios, incluido el nuestro, el PEDOT por su baja impedancia y su gran capacidad de almacenaje de carga en áreas pequeñas del material, lo cual resulta muy interesante en aplicaciones para microelectrodos que deben actuar en tejidos biológicos [48,53-54,36].

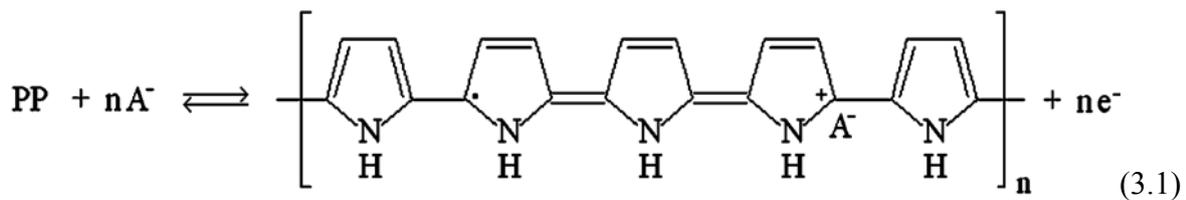
Las propiedades de estos dos materiales dependen en gran medida del contraión o dopante de carga negativa utilizado en su síntesis, cuyo mecanismo se explicará en el siguiente apartado. Por tanto su elección es de gran importancia. El estudio se inició usando una

molécula sencilla como el perclorato (ClO_4^-), pero las capas sufrían un gran cambio de volumen en procesos redox y una baja adherencia al sustrato. Se continuó con dos tipos de moléculas de gran tamaño: 1) un polioxometalato, el ácido silicomolibdico, que se descartó una vez detectadas sus propiedades tóxicas en los cultivos neuronales, y 2) dos tipos de surfactantes, el dodecibenceno sulfonato de sodio (DBS) que se ensayó primero y el poliestireno sulfonato de sodio (PSS) después, los cuales presentaron una mejor adherencia al sustrato y menor cambio de volumen en procesos redox. El primero de ellos, sin embargo mostró un alto grado de impurezas en su composición comercial y por tanto en las capas resultantes, lo que podía perjudicar los cultivos celulares. Por ello se decidió utilizar el segundo, el PSS, con menos impurezas y además dando lugar a capas con un cambio de volumen incluso menor en procesos redox. Un comportamiento poco satisfactorio de los polímeros sintetizados con surfactantes en los cultivos neuronales motivó el uso finalmente de biomoléculas como contraiones de los polímeros, ya con mejores resultados en cultivos. Paralelamente a todo ello se sintetizaron los polímeros con compuestos de iridio en forma de capa y de polvo con el objetivo de unir las buenas propiedades de ambos como se comentó anteriormente.

1.4 Polímeros conductores: mecanismo de síntesis

La formación de PPy y PEDOT requiere la oxidación del monómero, ya sea electroquímicamente o mediante un agente químico oxidante. Al oxidar se produce una carga positiva en el polímero que se compensa gracias a un ión de carga negativa presente en la reacción (contraión o dopante) y que pasará a formar parte de la estructura del polímero e incluso determinará su cross-linking y propiedades. Se estima que la cantidad de contraión presente en el polímero final se sitúa en un rango que va del 20 al 40% (porcentaje molar) [55]. Este porcentaje está directamente relacionado con el grado de dopaje del polímero, y la oxidación usual tras la síntesis corresponde a un dopaje del 33%, es decir, hay un “hueco” por cada tres unidades de monómero [56]. Además del contraión utilizado, otros factores como el disolvente, el material del electrodo donde se electrodeposita, el pH, la concentración de monómero y el potencial o corriente de síntesis son importantes en el proceso de formación del polímero, en su estructura y sus propiedades finales [57].

La reacción de oxidación que se produce es la siguiente:



Donde PP es el monómero pirrol, A^- es el contraión que formará parte de la estructura y que compensa de la carga positiva que se genera en la formación del polímero. En la Figura 1.6 se puede apreciar el mecanismo de formación del polímero, que al oxidarse genera una carga positiva perdiendo un electrón y generando un hueco, dos monómeros cargados positivamente se enlazan entre sí, y éstos a su vez se unirán a otro monómero, así sucesivamente hasta crear una estructura llamada conjugada tipo π extendida del sistema heteroaromático, que da lugar a una gran estabilidad química y conductividad eléctrica [56]. La extracción de electrones durante la oxidación (dopaje) involucra una deformación local de la estructura quinoide, y la conducción eléctrica del polímero resultante es la de esos huecos asociados a la deformación. A este conjunto hueco-deformación se le suele llamar polarón. A medida que la oxidación continúa, la extracción de otro electrón en la cadena polimérica que ya contiene un polarón puede dar lugar a un bipolarón, que es energéticamente más favorable que la formación de dos polarones. El bipolarón se extiende, en una imagen simplificada, a través de cuatro anillos de pirrol y a medida que su número crece los estados energéticos del polímero se solapan y forman bandas de energía intermedias, lo cual reduce ostensiblemente el espaciado entre bandas y por tanto facilita la conductividad electrónica. En el proceso de oxidación del pirrol son obtenidos 2.33 electrones por mol, de los cuales se estima que 0.33 son utilizados para el proceso por el cual se forma la pareja de portadores de carga polarón/bipolarón y los 2 restantes se utilizan en la formación de la unión entre anillos que forma la cadena polimérica. Una vez que esta es lo suficientemente extensa se hace insoluble y precipita formando así el polímero. Hay que aclarar que el mecanismo de síntesis del PEDOT es igual al del PPy sustituyendo el nitrógeno por azufre, si bien es cierto que pequeñas variaciones en la nucleación pueden llegar a crear estructuras poliméricas notablemente diferentes en su *cross-linking* y estructura interna [55].

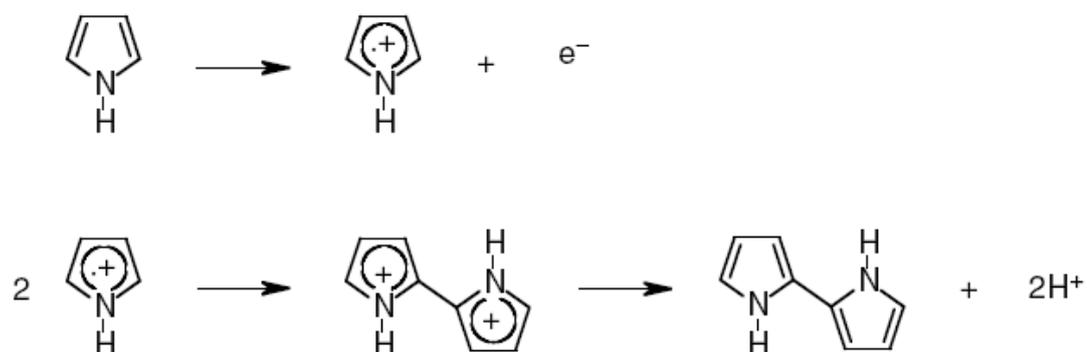
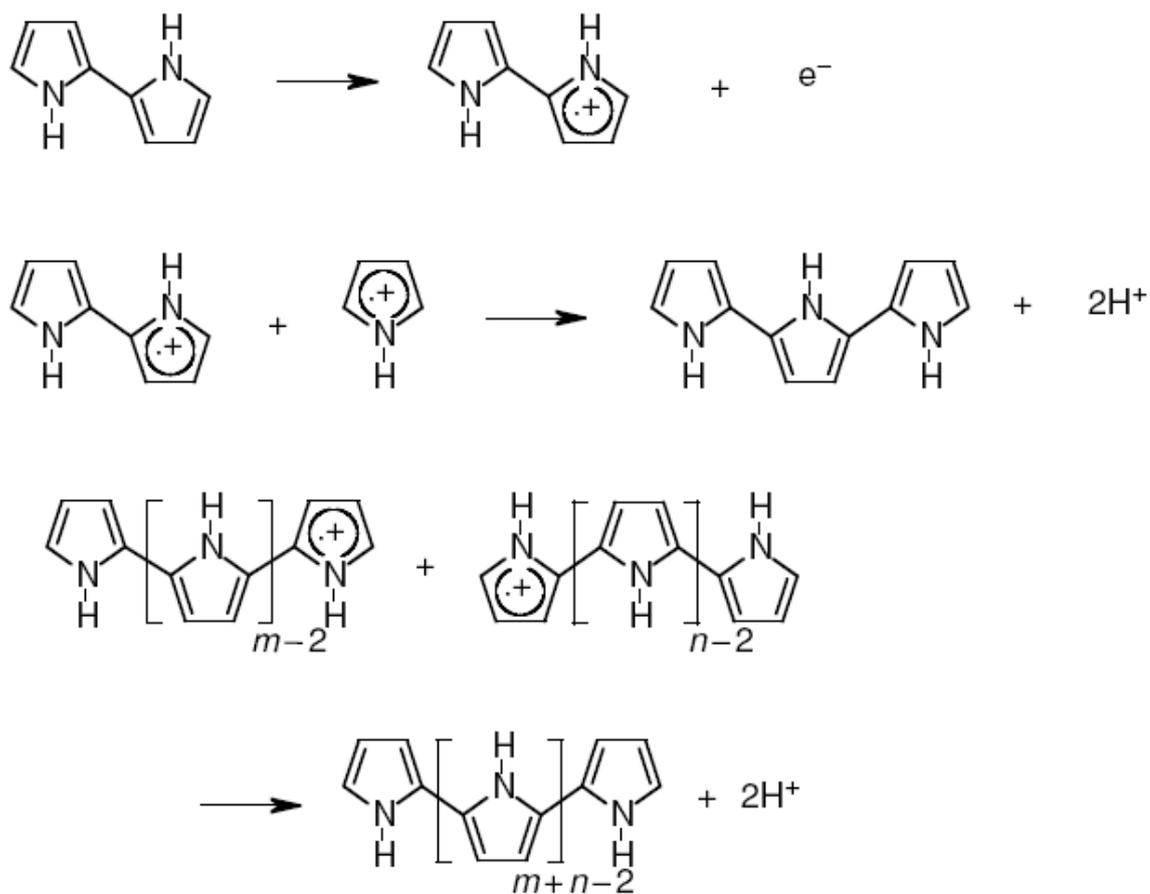
Paso inicial*Pasos de propagación*

Figura 1.6 Detalle del mecanismo de formación del polipirrol dividido entre los pasos iniciales y los pasos de propagación de la cadena polimérica.

1.5 Regeneración neuronal: Motivación y objetivos

El objetivo general de este trabajo es el desarrollo de sustratos para regeneración y crecimiento neuronal basados en dos tipos de polímeros conductores, el polipirrol (PPy) y el Poli(3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT). Se realizó un profundo estudio sobre las propiedades fisicoquímicas de los materiales y sobre el efecto de estas en las posibles aplicaciones como sustrato de crecimiento neuronal. Para ello se realizó su síntesis en forma de capas finas sobre sustratos conductores, en una configuración transparente que facilita la observación del desarrollo de cultivos celulares incluso sin fijación y por tanto un estudio *in situ* de su efecto en las células. También se han sintetizado polímeros en forma de polvo, de los cuales se ha hecho un estudio preliminar de su posible toxicidad sobre las células neuronales.

En sí mismo el trabajo constituye un humilde inicio que contiene una perspectiva a largo plazo: la posibilidad de que los materiales electroactivos y su modulación en términos de potencial superficial o de aplicación de campos eléctricos utilizándolos como electrodos pudiera favorecer el crecimiento neuronal o el direccionamiento de este para reparar lesiones medulares. Para ello ha sido básico el desarrollo de electrodos neuronales, campo en el cual el PPy y el PEDOT son buenos candidatos debido a su doble conductividad iónica y electrónica, a su actividad redox y la presencia de procesos de intercalación, y a su gran área superficial, lo que ayuda a promover un intercambio de iones efectivo entre los electrodos y el tejido neuronal y también aumenta la capacitancia y disminuye la impedancia, que a su vez impide el calentamiento o generación de radicales [28].

Así pues, los objetivos centrales de nuestro trabajo se resumen en los siguientes puntos:

- Evaluar el comportamiento de polímeros conductores biocompatibles como electrodos en un medio neuronal.
- Sintetizar capas finas de dos tipos de polímeros conductores, el PPy y el PEDOT, con dos tipos de surfactantes como dopantes, el dodecilbenceno sulfonato de sodio (NaDBS) y el poliestireno sulfonato de sodio (NaPSS). Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de estas capas y confirmar su electroactividad y sobretodo su funcionamiento como soporte de crecimiento neuronal, intentando correlacionar esto último con las propiedades fisicoquímicas encontradas.
- Sintetizar capas finas de PPy y PEDOT utilizando biomoléculas, principalmente aminoácidos, como dopantes. Realizar los mismos análisis que en las capas que utilizaban surfactantes como dopantes. Elucidar la posible mejora en biocompatibilidad que comporta el uso de biomoléculas.

- Sintetizar capas finas de PPy y PEDOT utilizando dos especies de iridio como dopantes, el cloruro de iridio (III) y el hexanitroiridato de potasio con el fin de combinar los beneficios que ambos tipos de materiales tienen por separado para los cultivos neuronales, e intentando superar también las desventajas que ambos presentan por separado. Realizar los mismos análisis fisicoquímicos que en los apartados anteriores y correlacionarlo con los resultados en cultivos neuronales
- Sintetizar híbridos de polímeros conductores con las especies de iridio antes mencionadas, caracterizándolos fisicoquímicamente y comprobando su citotoxicidad.
- Sintetizar híbridos de PPy y PEDOT con IrO₂, intentando obtener un material que aúne sus beneficios en todos los aspectos, creando un mejor material por la unión de ellos y superando desventajas que presentan los materiales en solitario. Caracterizar fisicoquímicamente los materiales y analizar su citotoxicidad.
- En todos los casos primar la biocompatibilidad y buen funcionamiento como soporte de crecimiento neuronal y la electroactividad de los materiales como característica primordial para su futuro desarrollo.
- Evaluar las propiedades óptimas observadas en medios de cultivo y sus posibles correlaciones con la estructura y microestructura del material, e implementar posibles cambios.

1.6 Bibliografía

- [1] T.H.Milhorat, A.L. Capocell, A.P. Anzil, R.M. Kotzen and R.H. Milhorat. *J. Neurosurg.* **82** (1995) 802–812.
- [2] M.H. Tuszynski, K. Gabriel, K. Gerhardt, S. Szollar. *J. Neurotrauma* **16** (1999) 523–531.
- [3] R.P. Bunge, W.R. Puckett, and E.D.Hiester. *Adv Neurol.* **72**, (1997) 305–315.
- [4] M.D. Norenberg, J. Smith and A. Marcillo. *J Neurotrauma* **21** (2004) 429-440.
- [5] M.E. Schwab, J.P. Kapfhammer y C.E. Bandtlow. *Annu. Rev. Neurosci.* **16** (1993) 565-95.
- [6] J.W. Fawcett and R.A. Asher. *Brain Res. Bulletin* **49** (1999) 377-91.
- [7] C.E. Schmidt and J.B. Leach. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **5** (2003) 293-347.
- [8] J.W. Fawcett and R.J. Keynes. *Annu. Rev. Neurosci.* **13** (1990) 43-60.
- [9] T. Carlsted. *J. Anat.* **190** (1997) 51-56.
- [10] J.J. Bernstein, W.J. Goldberg. *Paraplegia* **33** (1995) 250-253.

- [11] M.H. Tuszynski and J.H. Kordower. *CNS Regeneration, Basic Science and Clinical Advances*. Academic Press, San Diego-USA, 1999.
- [12] M.B. Bunge. *Prog. Brain Res.* **137** (2002) 275-282.
- [13] J.H. Bruce, M.D. Norenberg, S. Kraydieh, W. Puckett, A. Marcillo and D Dietrich. *J. Neurotrauma* **17(9)** (2000) 781-788.
- [14] J.T. Hughes and B. Brownell *J Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **26** (1963) 528-534.
- [15] Y. Li, P. M. Field and G. Raisman. *Science* **277** (1997) 2000-2002,
- [16] A. Ramón-Cueto, M.I. Cordero, F.F. Santos Benito and J. Avila. *Neuron.* **25** (2000) 425-435.
- [17] J.E. Collazos-Castro, V.C. Muñeton-Gómez and M. Nieto-Sampedro. *J. Neurosurg. Spine* **3** (2005) 308-317.
- [18] K. Fouad, L. Schnell, M.B. Bunge, M.E. Schwab, T. Liebscher and D.D. Pearse. *J. Neurosci.* **25** (2005) 1169 -1178.
- [19] J.E. Collazos-Castro, V.M. Soto, M. Gutierrez-Davila, M. Nieto-Sampedro. *J. Neurotrauma* **22**, n. 5 (2005) 544-558.
- [20] Kononenko, N.I; Medina, I; Dudek, F.E. *Neuroscience* **129**, n. 1 (2004) 85-92.
- [21] A.M. Rajnicek, L.E. Smith and C.D. McCaig, *Mol. Biol. Cell.* **13** (2002) 1849.
- [22] D.M. Ciombor and R.K. Aaron. *J. Cell. Biochem.* **52**, n. 1 (1993) 37-41.
- [23] B. Song, M. Zhao, J. V. Forrester and C. D. McCaig. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the Unites States of America* **99**, n. 21 (2002) 13577-13582.
- [24] X.F. Li, and J. Kolega. *J. Vasc. Res.* **39**, n. 5 (2002) 391-404.
- [25] A. Rickle et al. *Neuroreport* **15**, n. 5, (2004) 955-959.
- [26] J. Moss, T. Ryder, T. Z. Aziz, M.B. Graeber and P. G. Bain. *Brain* **127**, n. 12 (2004) 2755-2763.
- [27] D.B. McCreery, W.F. Agnew, T.G.H. Yuen and L. Bullara. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **37**, n. 10 (1990) 996-1001.
- [28] N.K. Guimard, N. Gomez and C.E. Schmidt. *Prog. Polym. Sci.* **32** (2007) 876-921.
- [29] C.D. McCaig, B. Song and A.M. Rajnicek. *J. of Cell Sci.* **122** (2005) 4267- 4276.
- [30] C.D. McCaig, A.M. Rajnicek, B. Song and M.Zhao. *Physiol. Rev.* **85** (2005) 943-978.
- [31] A. M Cruz et al. *Journal of physical chemistry C* **116** (2012) 5155-5168.
- [32] E. Slavcheva, R. Vitushinsky, W. Mokwa and U. Schnakenberg. *J. Electrochem. Soc.* **151**, n. 7 (2004) E226-E237.
- [33] J.E. Collazos-Castro et al. *Thin solid films* **518** (2009) 160-170.
- [34] B. Garner, A. Georgevich, A.J. Hodgson, L. Liu and G.G. Wallace. *J. Biomed. Mater. Research* **44** (1999) 121-129.
- [35] A. Nyska and R. Kohen. *Toxicol. Pathol.* **30**, n. 6 (2002) 620-650.

- [36] X. Luo, C.L. Weaver, D.D. Zhou, R. Greenberg, X.T. Cui. *Biomaterials* **32** (2011) 5551-5557.
- [37] G.B. Street. Polypyrrole: from powders to plastics. In: T.A. Skotheim, editor. *Handbook of conducting polymers, vol. I*, New York: Marcel Dekker; 1986. p. 265-91.
- [38] H. Shirakawa, E.J. Louis, A.G. MacDiarmid, C.K. Chiang and A.J. Heeger. *J. Chem. Soc. Chem. Commun* 1977: 578-80.
- [39] K.Kundu and D. Giri. *Am. Inst. Phys.* **105** (1996) 11075-80.
- [40] S.Y. Hong and D.S. Marnick. *Macromolecules* 1992: 4652-7.
- [41] C.M. Li, C.Q. Sun, W. Chen and L. Pan. *Surface & Coatings Technology* **198** (2005) 474-477.
- [42] S. Shimoda and E. Smela. *Electrochimica Acta* **44** (1998) 219-238.
- [43] V. Tabard-Cossa, M. Godin, I. Burgess, R.B. Lennox and P.Grütter. *J. of Physical Chemistry B* **109** (2005) 17531-17537.
- [44] L. Zhan, Z. Song, J. Zhang, J. Tang, H. Zhan, Y. Zhou and C. Zhan. *Electrochimica Acta* **53** (2008) 8319-8323.
- [45] H. Yamato, M. Ohwa and W. Wernet. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **397** (1995) 163-170.
- [46] X. Du and Z. Wang. *Electrochimica acta* **48** (2003) 1713-1717.
- [47] W. Cai , X. Gong and Y. Cao. *Solar energy materials & solar cells* **94** (2010) 114-127.
- [48] V. Syritski, K. Idla and A. Opik. *Synthetic metals* **144** (2004) 235-239.
- [49] X. Wang, X. Gu, C. Yuan, S. Chen, P. Zhang, T. Zhang, J. Yao, F. Chen and G. Chen. *J. Biomed. Materials Research Part A* **68A** (2004) 411-422.
- [50] M.A. Careem, Y. Velmurugu, S. Skaarup, K. West. *Journal of Power Sources* **159** (2006) 210-214.
- [51] E. M. Stewart, X. Liu, G.M. Clark, R.M.I. Kapsa and G.G. Wallace. *Acta Biomaterialia* **8** (2012) 194-200.
- [52] A. Kotwal and C.E. Schmidt, *Biomaterials* **22** (2001) 1055-1064.
- [53] Z.A. King, C.M. Shaw, S.A. Spanninga and D.C. Martin. *Polymer* **52** (2011) 1302-1308.
- [54] M. Asplund, H. von Holst and O. Inganäs. *Biointerphases* **3(3)** (2008).
- [55] T.A. Skotheim (ed.). *Handbook of conducting polymers*, 3rd edition. CRC Press, Boca Raton, 2007.
- [56] S. H. Cho et al. *Conjugated polymers*. CRC Press 2007.
- [57] J.M. Ko, H.W. Ree, S.M. Park and C.Y. Kim. *J. Electrochem. Soc.* 1990, **137**:905.

Capítulo 2

Técnicas Experimentales

En el capítulo a continuación se explican las diferentes técnicas de síntesis de los materiales, tanto en forma de polvo como en forma de capa y las técnicas de análisis utilizadas para los mismos, tanto químicos como físicos. Para comenzar se detallan las técnicas de síntesis electroquímica para las capas, y posteriormente se explican las síntesis química e hidrotermal de los materiales en polvo. Después se enumeran las técnicas de análisis, que se dividen entre las de análisis estructural y microestructural, para más adelante continuar con las de caracterización electroquímica, y ya finalmente detenerse en todos los aspectos de los análisis celulares realizados.

2.1 Síntesis de las Muestras

Dado el carácter electroactivo de precursores y polímeros estudiados es posible la síntesis electroquímica de estas fases, lo que facilita la formación de capas sobre sustratos planos que a su vez permitirán la caracterización en medios celulares. A continuación se describen los métodos.

2.1.1 Síntesis electroquímica

Entre las varias ventajas de los métodos electroquímicos está la posibilidad de realizar procesos de síntesis con condiciones de potencial o corriente controladas que facilitan el control de las fases obtenidas y a su vez el control de la microestructura y de la homogeneidad de los recubrimientos. En el caso de los polímeros estudiados aquí (PPy y PEDOT) también hay otras variables que influyen en las propiedades del producto final de la electrosíntesis como el anión dopante utilizado, el solvente, concentraciones, pH, etc. Los métodos electroquímicos se distinguen por su alta sensibilidad y selectividad, y otras ventajas de tipo tecnológico como utilizar la energía eléctrica como reactivo “limpio”, trabajar en condiciones de operación ambientales (temperatura y presión) y regenerar ciertos agentes oxidantes y reductores en electrosíntesis por vía directa entre otros. Además permite la formación de depósitos sobre sustratos de cualquier geometría y de tamaños variables en formas tradicionalmente no accesibles para la mayoría de las técnicas.

En el caso que nos ocupa se utilizó la configuración de trabajo descrita en la Figura 2.1, donde la celda de síntesis contaba con 3 electrodos (electrodo de trabajo, contra-electrodo y de pseudoreferencia). El electrodo de trabajo es el sustrato donde se realiza el depósito. Este es una pieza transparente de vidrio soda lime (76 mm x 25 mm de AFORA) recubierto con 5 nm de titanio y 12 nm de platino. La deposición del titanio y del platino se realizó por evaporación térmica en el laboratorio de Óptica de la Universidad Autónoma de Barcelona con control de espesor mediante microbalanza de cuarzo. La homogeneidad del recubrimiento de Ti y Pt se optimizó modificando la velocidad de deposición. El Ti es depositado como una capa de adhesión, ya que el Pt no presenta una buena adherencia al vidrio. El espesor total fue optimizado para asegurar un sustrato translúcido. Las dimensiones del contra-electrodo, que es una lámina fina de platino son iguales a las del electrodo de trabajo. El potencióstato/galvanostato usado fue el modelo VMP3 de Biologic Science Instruments. En todas las operaciones electroquímicas realizadas en esta tesis se

desoxigena el electrolito con burbujeo de argón durante 30 minutos antes de cada experimento. La superficie depositada fue siempre de 10 cm².

Para la obtención de los materiales de PPy y PEDOT se utilizó respectivamente pirrol (Sigma-Aldrich 98%), el cual fue previamente destilado al vacío y guardado a -10 °C y EDOT (3,4-etilendioxitiofeno) (Sigma-Aldrich), almacenado a 5 °C hasta su uso.

Los contraiones utilizados (ClO_4^- , $[\text{Si Mo}_{12}\text{O}_{40}]^{4-}$, DBS, PSS y aminoácidos) fueron comprados de la mayor pureza disponible comercialmente. Sin embargo, el DBS resultó cambiar mucho su composición original de un frasco a otro, en este sentido, se llegó a averiguar que contenía un 15% de Na_2SO_4 , y que la estequiometría $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3$ resultó ser solo la promedio. Este promedio se mantenía pero la distribución cambiaba de bote a bote. Los sistemas de purificación disponibles no garantizaban mejorar la pureza. El PSS era más reproducible aunque también oscilaba.

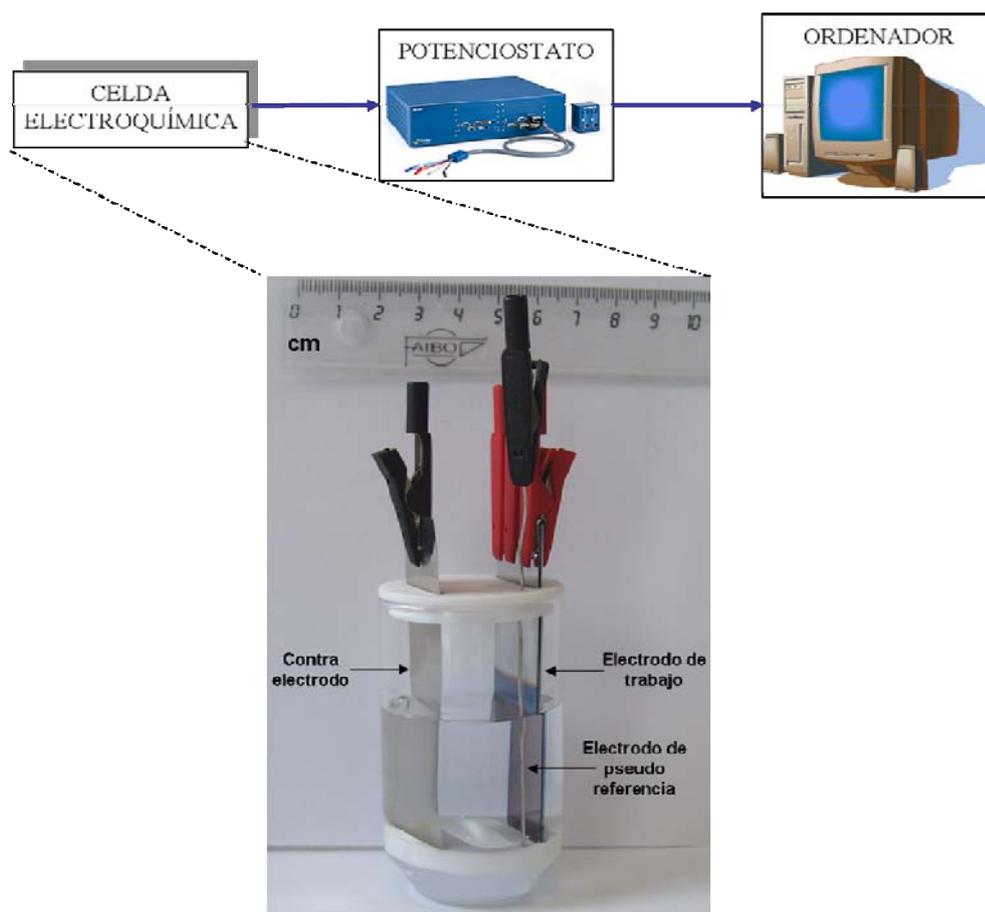


Figura 2.1 Esquema de la síntesis electroquímica de las capas de óxido de iridio.

Para asegurar la máxima homogeneidad del campo eléctrico creado y la reproducibilidad de recubrimientos y espesores, el contra-electrodo de Pt se colocó siempre equidistante (1.5 cm) del de trabajo, a cualquier altura, mediante 2 piezas de teflón diseñadas a tal efecto. Se utilizó como electrodo de pseudo-referencia un hilo de platino, cuyo potencial se equipara al electrodo de Ag/AgCl, y que ha mostrado ser estable durante las voltametrías cíclicas debido a la formación de un óxido en la superficie [1,6]. Una vez obtenidas las muestras, son lavadas con abundante agua milliQ y secadas con una pistola de nitrógeno a presión. Aunque la configuración usada en las síntesis y en las caracterizaciones electroquímicas fue siempre la misma, en cada apartado correspondiente se especifican las condiciones de trabajo para cada muestra. Todas las muestras fueron evaluadas largo tiempo después de su síntesis mediante XPS, y resultaron no haber cambiado su composición superficial (dato especialmente importante para el contenido de H₂O y aminoácidos).

A continuación se detallan las diferentes técnicas electroquímicas de síntesis usadas.

2.1.1.1 Técnicas Electroquímicas de Síntesis de Control Estático de Potencial de Electrodo o de Corriente.

En general los procesos de síntesis electroquímica se realizan a A) potencial de electrodo constante (deposición potencioestática), lo que permite impedir reacciones adicionales que ocurren a otros potenciales, o B) a corriente constante (deposición galvanostática), en casos donde no hay otras interferencias y se pretende obtener una velocidad constante de formación de un producto, como en el caso de la electrocristalización/electrodeposición [2]. Adicionalmente, el uso de potenciales pulsados, o de barridos de potencial aporta un método alternativo de control de la microestructura, adhesión etc. En nuestro caso se aplicó la alternativa A dada la mayor importancia de no tener reacciones adicionales frente a una velocidad constante de formación.

2.1.1.2 Técnicas Electroquímicas de Síntesis de Control Dinámico de Potencial: deposición potenciodinámica

Se trata de una técnica de deposición mediante un barrido de potencial similar a la voltametría cíclica explicada en el apartado 2.4.1, que puede ser utilizada en un proceso de síntesis. Cuando las condiciones de cristalización a potencial o corriente constantes no son

óptimas [3], por ejemplo en un proceso de deposición, la variación dinámica permite mantener una situación próxima al equilibrio, al tiempo que el *reversal* de potencial elimina parte del depósito mal adherido. El proceso puede ser repetido tantas veces como sea necesario mediante la repetición de ciclos [3].

2.1.2 Síntesis química

La formación del polímero puede ser llevada a cabo por oxidación directa de un oxidante que luego a su vez puede actuar como contraión. Se obtuvieron polvos de PPy dopados con IrCl_3 y $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ mediante la síntesis química descrita en el apartado 5.5. En este caso la polimerización no se produce mediante el uso de un potencióstato que establece unas condiciones de potencial o corriente determinados, sino que la oxidación es inducida por un agente químico oxidante, que puede ser externo o puede ser el propio dopante con propiedades oxidantes.

2.1.3 Síntesis hidrotermal

Esta aproximación constituye una alternativa para la formación de híbridos de polímero y fases de iridio, y se llevó a cabo en paralelo a intentos de preparación electroquímica de los mismos. Se obtuvieron polvos híbridos de PPy y PEDOT con IrO_2 según se describe en el apartado 5.6. Este tipo de síntesis se realiza en medio acuoso y a altas temperaturas, con lo que se consigue acelerar la reacción por las condiciones especiales de presión y temperatura.

2.2 Caracterización Estructural

El carácter típicamente amorfo de los polímeros restringe la utilidad de ciertas técnicas como la difracción de rayos X. Las que se muestran a continuación han permitido en conjunto una buena comparación entre las fases.

2.2.1 Espectroscopia Fotelectrónica de Rayos X (XPS)

Mediante la técnica de XPS es posible realizar la identificación de los elementos que componen la superficie de la muestra. Se puede también evaluar la composición

cuantitativa de estos (20-30 Å de espesor). Las líneas espectrales de XPS son identificadas por el nivel de energía del cual el electrón es expulsado o arrancado (1s, 2s, 2p, etc.).

Las muestras fueron analizadas por XPS en el Instituto de Nanociencia de Aragón con un equipo marca Kratos Analytical modelo AXIS Ultra DLD equipado con una fuente de rayos X de aluminio monocromático (Al K alpha: 1486.6 eV) con potencia máxima de 15 kV x 15 mA y una presión en cámara de análisis de 2×10^{-9} Torr., así como en los servicios científico técnicos de la Universitat de Barcelona con un PHI 5500 Multitechnique System (Physical Electronics) con una fuente de rayos X monocromática (Al K alpha: 1486.6 eV) perpendicular al eje del analizador y calibrada usando la línea $3d_{5/2}$ de la Ag con un ancho máximo a la altura media (FWHM) de 0.8 eV. Todas las medidas fueron realizadas en una cámara de presión de ultra alto vacío (UHV) entre 5×10^{-9} Torr y 2×10^{-8} Torr. En ambos equipos se diseñó un protocolo específico para cada tipo de muestra dependiendo de los elementos presentes. Las energías fueron determinadas con un error de ± 0.3 eV. Las cuantificaciones de las señales de los espectros generales de XPS así como las deconvoluciones y los ajustes de los espectros detallados del C 1s y del O 1s fueron realizados por medio del programa WINSPEC. En el caso de los ajustes, los picos fueron deconvolucionados mediante combinaciones de Gaussianas-Lorentzianas en diferentes proporciones.

2.2.2 Espectroscopia de Infrarrojo (ATR)

Las medidas de espectroscopía infrarroja fueron realizadas en el Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona en Modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR) mediante un espectrómetro de infrarrojo Perkin Elmer HART con un accesorio ZeSe flat plate de 60° . La existencia de conductividad a través de poltrones produce ondulaciones de la línea base que se observarán a lo largo de todos los espectros [9].

2.3 Caracterización Microestructural

2.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La microestructura de la superficie de las capas fue observada por medio de un microscopio SEM QUANTA FEI 200 FEG-ESEM (Instituto de Ciencia de Materiales de

Barcelona) con un potencial de 5 kV y una presión de 50 Pa. El grosor de las capas pudo ser evaluado también utilizando dicho microscopio mediante cortes transversales. En este mismo equipo se pudieron obtener imágenes de electrones retrodispersados (BESD) y también con él se realizó la identificación de los elementos químicos presentes en el material de la imagen mediante la técnica de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDX). Esta técnica se basa en la detección de la radiación X emitida por la materia cuando esta se irradia con electrones, y debido a que esta radiación es característica de cada elemento se puede realizar el análisis cuantitativo y cualitativo de los elementos presentes en cada muestra.

2.3.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para la observación de las muestras por TEM (apartado 5.2) se prepara una dispersión del polvo en un disolvente orgánico, en nuestro caso el etanol, que se deposita sobre una rejilla de cobre o aluminio recubierta de una película de carbón. Se utiliza el mismo equipo que en el siguiente apartado.

2.3.2.1 Difracción de electrones

El equipo utilizado para la difracción de electrones fue un microscopio electrónico de transmisión de 120 KV JEOL 1210, con una resolución punto a punto de 3.2 Å. Se utilizó un portamuestras analítico GATAN con ángulos máximos de inclinación de $\pm 60^\circ$ en X y \pm en Y. Esta técnica permite determinar los parámetros de celda y el grupo espacial de una fase cristalina. El método utilizado es el de la rotación, y consiste en la reconstrucción de la red recíproca a partir de un conjunto de planos que contienen un eje común que coincide con un eje cristalográfico.

2.3.3 Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

La microestructura fue también analizada mediante AFM en modo dinámico con un microscopio Pico Plus Molecular Imaging utilizando puntas de silicio de 10 y 4 nm. La fuerza del cantilever utilizada fue de aproximadamente 40 N/m y la frecuencia de resonancia fue de 170 kHz. Fueron escogidas al azar 10 áreas de cada muestra para evaluar la rugosidad y el tamaño de grano presentes mediante un análisis global de las imágenes utilizando el software Mountains. Los valores de rugosidad media fueron calculados a partir de la relación:

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (z_i - z)^2} \quad (2.1)$$

donde z_i es la altura del punto (x_i, y_i) tomado de la imagen de AFM, N es el número de puntos de la medida y z está definida por:

$$z = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (z_i - z) \quad (2.2)$$

Dicho valor representa pues un promedio de alturas sobre la media de altura.

2.3.4 Ángulo de Contacto

La estimación de la hidrofiliicidad o la afinidad por el medio biológico se realizó mediante medidas de ángulo de contacto con agua y con medio de cultivo. Puesto que el ángulo de contacto está relacionado con la química del material y la microestructura de la superficie se utiliza a modo comparativo como sonda a correlacionar con los cultivos celulares o adhesión de células.

El ángulo de contacto de los substratos utilizados, definido como el ángulo θ que se forma entre una fase líquida (en forma de gota) que está en contacto con la superficie (Figura 2.2A), fue realizado mediante un Pocket Goniometer modelo PG2 a temperatura ambiente con micro gotas de agua milliQ y medio de cultivo Neurobasal (Invitrogen) [7] (Figura 2.2B). El ángulo de contacto es una medida de la hidrofiliicidad de la muestra.

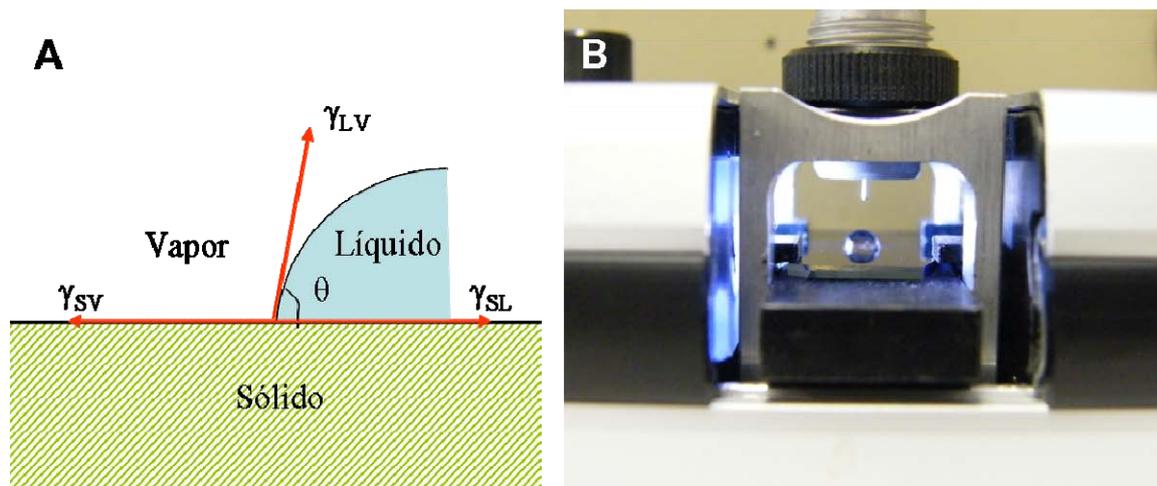


Figura 2.2 A) Unión de las tensiones interfaciales de una superficie sólida en contacto con un líquido y B) Equipo utilizado en la medida del ángulo de contacto.

2.4 Caracterización Eléctrica y Electroquímica

Además de los métodos de síntesis electroquímica tipo voltametría cíclica que se describen en el apartado 2.1.1.2 se han utilizado las siguientes técnicas de caracterización eléctrica y electroquímica:

2.4.1 Voltametría cíclica (CV) de capas finas de polímero

La voltametría cíclica (CV) es un tipo de voltametría que utiliza tres electrodos (electrodo de trabajo, contra-electrodo y electrodo de referencia) sumergidos en una disolución sin agitación, de modo que la corriente medida es limitada por la difusión del analito en la superficie del electrodo en caso de que éste esté disuelto. Esta técnica ayuda a conocer los sucesos ocurridos en el electrodo de trabajo. En general el potencial del electrodo parte del reposo o potencial de circuito abierto (OCP) y es elevado a un potencial más negativo (o más positivo) a una cierta velocidad hasta alcanzar el valor deseado y después es llevado al potencial de reposo nuevamente. Cuando se produce un proceso de transferencia de carga entre el conductor eléctrico y el iónico a un potencial determinado, como por ejemplo la reducción, la corriente aumenta hasta un valor máximo pero después decae generando una onda ya que la concentración del analito se agota cerca de la superficie del electrodo. Al barrer en el sentido contrario se alcanza el potencial de oxidación del producto formado en la reacción de reducción produciendo una corriente de polaridad inversa. Esta onda tiene una forma similar a la de reducción si el proceso es reversible (Figura 2.3).

La existencia de reacciones secundarias para el producto, o de reorganización estructural en un sólido formado puede hacer aparecer nuevas ondas o dar lugar a una ausencia en el barrido de retorno. El proceso se puede repetir tantos ciclos como sea deseado. En el caso de que el proceso vaya del OCP al potencial deseado en un solo barrido estaremos hablando de una voltametría de barrido lineal.

Los electrolitos utilizados en esta tesis para la caracterización de las capas depositadas electroquímicamente fueron el tampón de fosfato sódico a pH 7.4 y medio de cultivo celular Neurobasal [7].

La muestra en sí se utilizó con el tamaño de síntesis y también con el del cristal de cuarzo de la microbalanza: en el primer caso las ondas pueden ensancharse debido a la geometría y amplia superficie empleada, pero a su vez resulta una voltametría más real y cercana a la de la aplicación directa sobre células. En general, todas las voltametrías mostradas se refieren a esa dimensión.

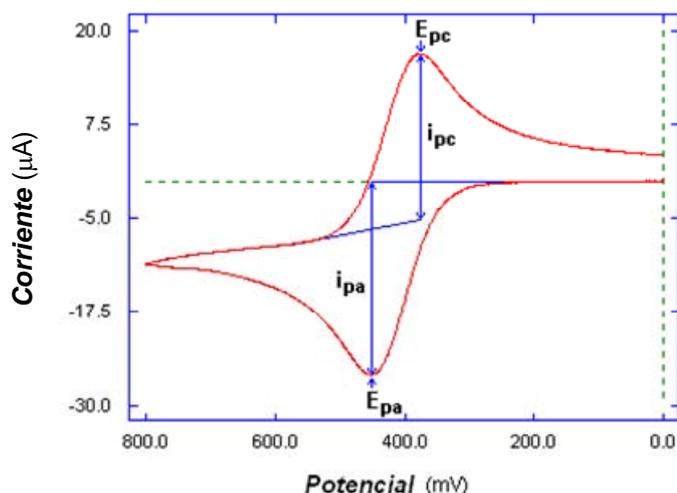


Figura 2.3 Esquema general de una voltametría cíclica.

2.4.1.1 Voltametría de barrido lineal de polvos híbridos de polímero-IrO_x

Las capas de polímero estudiadas se caracterizaron electroquímicamente mediante CV tal y como se describe en el apartado 2.4.1. Sin embargo la caracterización de los polvos de material híbrido descritos en el apartado 5.6 se realizó mediante una suspensión debido a la dificultad de generar un electrodo macroscópico: se dispersó el polvo a estudiar en un electrolito de tampón fosfato sódico 0.1M a pH 7.4 en una celda con la configuración que se puede observar en la Figura 2.4. Esta es una técnica novedosa que da buenos resultados a velocidades de barrido lentas [8]. El electrodo de trabajo fue una placa de platino idéntica a la que se utilizó como contra-electrodo en los otros experimentos electroquímicos, el contra-electrodo fue un hilo de platino en forma de espiral y situado en un compartimento diferente del electrodo de trabajo para evitar las interferencias con el oxígeno, y el electrodo de referencia fue el hilo de platino habitualmente usado. Se hizo una voltametría para todos los casos de OCP a -0.75V vs Pt a una velocidad de 2mV/s con una agitación de unos 500 rpm.



Figura 2.4 Configuración de la voltametría de barrido lineal de los polvos híbridos de polímero- IrO_x .

2.4.1.2 Voltametría cíclica de discos de teflón de polvos híbridos de polímero- IrO_x

Un intento adicional de caracterización del polvo obtenido por reacción química se llevó a cabo de modo similar al usual en baterías formando un *composite* con teflón. Este análisis también correspondiente a los materiales descritos en el apartado 5.6 se realizó en una celda tipo swagelok con una configuración también de tres electrodos con el mismo medio de tampón fosfato sódico 0.1M a pH 7.4. El disco de teflón se hizo mediante una dispersión en etanol de 85 mg del material a estudiar, 10 mg de carbón súper P (Csp, Timcal) y 5mg de politetrafluoroetileno (PTFE) (Aldrich, 60% dispersión en agua). La mezcla se agitaba y calentaba a unos 100 °C hasta la formación de una pasta, de la cual se cortaba un disco del tamaño de la celda swagelok y se dejaba secar en condiciones ambientales. La voltametría se realizó desde OCP a -1V vs Pt para ir después hasta 1V vs Pt y volver finalmente al potencial de descanso a una velocidad de 20 mV/s.

2.4.2 Microbalanza de Cuarzo Electroquímica (EQCM)

La EQCM (Seiko EG&G PAR), de la cual se puede ver un esquema en la Figura 2.5, acoplada a un potenciostato/galvanostato VMP3 BioLogic fue utilizada para evaluar la cantidad de masa depositada durante la síntesis electroquímica y relacionarla con la carga utilizada para la síntesis. Ello permite evaluar el grado de oxidación llevado a cabo y

estimar la eficiencia del proceso. Se utilizaron como electrodos cristales de cuarzo de 0.157 cm^2 de superficie recubiertos con Pt (suministrados por EG&G PAR).

Además, se estudió el proceso de dopaje electroquímico una vez el material estaba ya formado, en los respectivos procesos de reducción para las muestras dopadas con surfactantes, lo que a su vez permite evaluar el grado de intercalación iónica que ocurre durante el proceso y relacionarlo con la capacidad de carga.

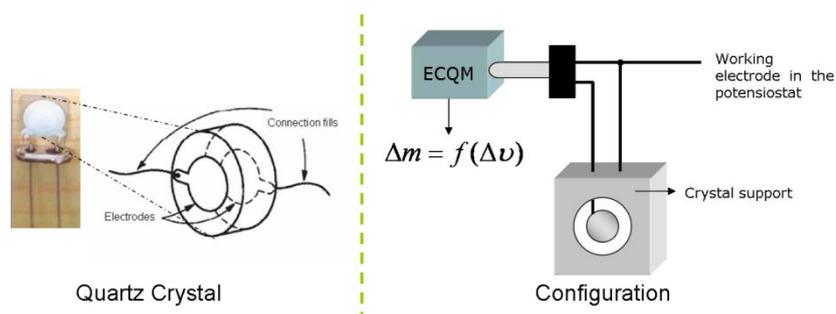


Figura 2.5 Esquema del funcionamiento de una balanza electroquímica de cuarzo (EQCM).

La masa depositada (Δm) sobre el cristal de cuarzo se calcula a partir del diferencial de frecuencia ($\Delta \nu$) del proceso mediante la ecuación de Sauerbrey:

$$\Delta m = \frac{\Delta \nu \sqrt{\rho_q \mu_q} S}{2\nu_o^2}$$

(2.3)

donde ρ_q es el módulo de cizalladura ($2.947 \cdot 10^{11} \text{ g/cm.s}^2$), μ_q es la densidad del cuarzo (2.649 g/cm^3), S es el área de la superficie del cristal (0.157 cm^2) y ν_o es la frecuencia inicial en hertz.

El uso de esta forma simplificada de la ecuación implica que el cambio de admitancia es despreciable. Esto ha sido cierto en otros materiales estudiados, como los óxidos de iridio [6]. Sin embargo, en polímeros no es una aproximación totalmente correcta. Los resultados mostrados en los siguientes capítulos lo confirman y por tanto serán interpretados de modo relativo.

2.4.3 Espectroscopia de Impedancia Compleja Electroquímica (EIS)

Todas las muestras son conductoras en un sistema DC, con dos puntas, evaluados con el current sensing-AFM o la propia corriente de las voltametrías. Las medidas de EIS fueron realizadas con el propósito de evaluar la capacidad de transferencia de carga y el flujo de corriente de las capas de PPy-DBS, PPy-PSS y PEDOT-PSS en un sistema real que incluye la interfase, y no solamente a través del material. Ello implica una configuración de 3 electrodos que incluye el sistema material + interfase análogo a las celdas electroquímicas de síntesis. Estas medidas fueron llevadas a cabo mediante un potenciostato Autolab PGSTAT 302N-High performance con la misma configuración utilizada en la síntesis electroquímica usando una placa de platino como contra-electrodo, un hilo de platino como electrodo de referencia y el material en estudio como electrodo de trabajo, los tres sumergidos en NaCl 0.1 M como electrolito. En todos los casos se aplicó un potencial alterno de 5 mV de amplitud en un barrido de frecuencia de 1MHz a 40Hz. En algunos casos se aplicó un potencial bias de $\pm 0.5V$ para oxidar o reducir el material *in situ* y observar cambios de impedancia tras el proceso redox.

2.5 Análisis Celular

2.5.1 Cultivos Celulares

Los procesos descritos a continuación fueron realizados en el Department of Neurochemistry and Neuropharmacology del Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC-IDIBAPS, tras una etapa muy inicial en el Hospital Nacional de parapléjico de Toledo.

El objetivo de los cultivos fue evaluar la respuesta de los materiales como sustratos de crecimiento neuronal de los materiales sintetizados y caracterizados en este trabajo, lo que puede ser una primera sonda de su uso en medios *in vivo* como electrodos. Antes de cultivar las células sobre los materiales, las muestras a analizar y el vidrio de control de borosilicato (cubreobjetos de microscopía No 1, Marienfeld GmbH & Co. KG Lauda-Königshofen) fueron lavadas y “esterilizadas” por inmersión en agua destilada a 60 – 80°C durante 2 horas. Después las superficies fueron cubiertas por una disolución de Poly-L-Lisina (PLL, 4 μ g/cm², Sigma-Aldrich). La disolución de L-Polilisina (PLL) fue aplicada durante 30 minutos a 37°C y luego las muestras fueron lavadas en baños de agua destilada y secadas a temperatura ambiente. Las células neuronales fueron obtenidas del córtex cerebral de embriones de 16 días de ratones NMRI. Los córtex aislados fueron disociados

por 30 minutos a 37°C en medio HBSS (sin calcio y magnesio) suplementado con piruvato, albumina, tripsina y DNAasa (todos de Sigma-Aldrich), a lo que siguió un proceso de trituración con pipetas

Pasteur pulidas al fuego. Las células fueron cultivadas con una densidad de 25000 células/cm² en medio DMEM-F12 que contiene 10% de suero fetal. Después de dos horas el medio fue cambiado a un suplemento neurobasal con L-glutamina, B27 (Gibco), Gentamicina y Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich). Los cultivos se incubaron en ambiente humidificado a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 días. La mitad del medio de cultivo fue reemplazado a los 3 días.

2.5.2 Inmunocitoquímica y Cuantificación de las Células

Cuatro días después de “plaquear” las células sobre la superficie de los materiales en estudio, los cultivos fueron fijados en una disolución neurobasal con 2% de paraformaldehído durante 12 minutos. Las células fijadas fueron incubadas a 37 por 30 minutos en un tampón de fosfato 0.1 M con 0.2% Triton y 5% NGS. Después fueron lavadas e incubadas una noche a 4°C con anticuerpos primarios. Se usaron los siguiente anticuerpos: policlonal anti-TAU de conejo (Sigma T-6402, 1:100), monoclonal anti-GFAP de rata (Dako Z-0334, 1:500), anti-NF200 de rata (Sigma N-0142, 1:400), policlonal 6 anti-NF de conejo (Affinity NA-1297, 1:750), anti-vimentin de rata (Neomarkers, MS-129, clone U9, 1:1000), alexa-488 anti-conejo (Molecular Probes, 1:500) y alexa-594 anti-rata (Molecular Probes, 1:1000). Por último, fueron utilizados marcadores Hoechst (Molecular Probes 33342) para marcar el núcleo de la célula y complementar el conteo de la supervivencia neuronal. Para esto, después de lavar los anticuerpos secundarios, se aplicó a las células una disolución de Hoechst (2 µl/ml en PBS) durante 50 minutos. Los cultivos fueron lavados con PBS, montados en PBS-Glicerol (50:50) y observados en un microscopio de fluorescencia.

Para la cuantificación celular fueron tomadas imágenes (2776 x 2074 pixels) usando un microscopio digital de imagen equipado con contraste de fase (Olympus YX70), y las imágenes de fluorescencia tanto del ensayo Hoescht como de los anticuerpos fueron combinadas y procesadas digitalmente (Analysis, Soft Imaging System GMBH). Fueron fotografiados 6 campos radiales (563 x 401 µm) en total por cada muestra, y el número de células encontrado fue extrapolado al área superficial total.

2.5.3 Ensayos celulares de citotoxicidad (MTT)

Se utilizó el método conocido en inglés como *3,-4,5 dimethylthiazol-2,5 diphenyl tetrazolium bromide* (MTT) de viabilidad celular para evaluar los posibles efectos citotóxicos de los polvos híbridos de PPy-IrO_x y PEDOT-IrO_x sobre cultivos celulares primarios. Este es un método ampliamente usado y contrastado para este fin [4,5]. Para su realización se pesaba el compuesto a estudiar y se preparaba su suspensión en medio de cultivo celular a una alta concentración, y una vez obtenida una suspensión homogénea, esta se diluía hasta obtener una concentración 10 veces mayor a la deseada, ya que 10 µl de esta se diluían en 90µl de medio de cultivo que ya contenía el pocillo donde se realiza el test. Para ello se usaba una placa de cultivo celular de múltiples pocillos, los cuales en nuestro caso tenían una superficie de 0.3 cm². Las células usadas fueron del córtex cerebral de ratones embrionarios de 16 días del tipo NMRI. Se utilizaron 2 secuencias diferentes de trabajo en cada uno de los tests realizados a 6 y 9 días *in Vitro* (DIV):

- 1) El pocillo se cubre previamente con Poli-D-lisina (PDL), y a continuación se añade la suspensión del material. A las 24 horas se extrae la suspensión del pocillo de forma que ya haya material depositado y después se siembran las células y se dejan crecer hasta 6 o 9 DIV.
- 2) El pocillo se cubre previamente con Poli-D-lisina (PDL), y a continuación se siembran las células. Tras 24 horas de sembrado, el material en suspensión se añade al pocillo conteniendo las células, que crecerán durante 6 o 9 DIV.

2.5.4 Ensayos preliminares de cultivos en presencia de campos eléctricos

Se llevaron a cabo ensayos preliminares en pocillos donde el material estaba conectado a un electrodo de trabajo y se conectaban también un contraelectrodo y electrodo de referencia de Pt a través del electrolito. Se aplicaron potenciales DC de 20 segundos y también potenciales dinámicos. No se muestran los resultados de estos porque los cambios de volumen impidieron mantener el foco del microscopio (Olympus DP50). Dichos experimentos preliminares sin embargo están sirviendo de base para perfeccionar la técnica en un nuevo proyecto.

2.6 Bibliografía

- [1] K.K. Kasem and S. Jones. *Platinum metals review* **52** (2008) 100-106.
- [2] P. Zanello. *Inorganic electrochemistry*. Cambridge. The Royal Society of Chemistry, 2003.
- [3] V.S. Bagotsky, *Fundamentals of Electrochemistry*. New-Jersey-USA. John Wiley and Sons inc, 2006.
- [4] E. Borenfreund H. Babich, N. Martin-Alguacil. *Toxicology in Vitro* **2** n. 1 (1988) 1-6.
- [5] B.J. Brüsweiler, F.E Wurgler and K.Fent. *Aquatic Toxicology* **32** (1995) 143-1 60.
- [6] A.M. Cruz et al. *J. of physical chemistry C* **116** (2012) 5155-5168.
- [7] P.J. Price and G.J. Brewer. *Protocols for Neural cell culture*, Humana Press, Totowa (2001).
- [8] D. Muñoz-Rojas, J. Oró, P. Gómez-Romero, J. Fraxedas and N. Casañ-Pastor. *Electrochem. Comm.* **4** (2002) 684-689.
- [9] N. Costantini and J.M. Lupton. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **5** (2003) 749-757.

Capítulo 3

Capas de Polímero conductor con perclorato y grandes aniones

En este capítulo se enumeran los resultados obtenidos después de la caracterización de los materiales poliméricos estudiados en estas tesis, Polipirrol y PEDOT, los cuales se dividen en su caracterización según el anión que se haya utilizado como dopante para su síntesis. De esta manera se estudian polipirroles dopados con iones pequeños tales como el ClO_4^- , y también dopados con grandes moléculas que por su mayor volumen pueden reemplazar el mecanismo de intercalación aniónica/catiónica combinada por la intercalación solo catiónica. Entre ellos el polioxometalato $[\text{Si Mo}_{12}\text{O}_{40}]^{4-}$, o surfactantes como el DBS y el PSS. También se estudia el PEDOT dopado con PSS. Todos ellos se sintetizan en forma de capa fina. El uso de estas grandes de moléculas tiene como objetivo aumentar la adhesión de la capa al sustrato y minimizar los cambios de volumen en los procesos redox de los polímeros. Primero se realiza una breve introducción sobre el material en cuestión y posteriormente se explica la síntesis de este, electroquímica en todos los casos del capítulo, y a continuación la caracterización tanto a nivel estructural, microestructural, electroquímico y eléctrico. Posteriormente se explican los resultados de estos materiales en cuanto a cultivos celulares y la relación de estos con las propiedades físico-químicas descritas previamente y para acabar se enumeran las conclusiones.

3.1 Introducción: selección del contraión

Dada la importancia que tiene el contraión para la síntesis y propiedades de los polímeros conductores se procedió a la selección de aquel óptimo evaluando sus características una vez sintetizado el polímero. El estudio se inició con perclorato de sodio (NaClO_4). Aunque es posible obtener capas de polipirrol dopadas con perclorato en medios acuosos de modo reproducible, como se muestra en el apartado 3.5, pequeños cambios de potencial inducían grandes cambios de volumen y por ello la capa se desprendía del electrodo.

Puesto que la reducción puede transcurrir con la desintercalación del anión y la intercalación de cationes, como dos procesos compitiendo, se consideró que evitando el proceso de desintercalación de aniones, que sería el que podría provocar un mayor cambio de volumen, se aumentaría la estabilidad macroestructural del polímero. Para ello se eligió utilizar grandes aniones durante la síntesis, que no pueden desintercalarse durante el proceso redox. El primero que se ensayó fue un polioxometalato, el ácido silicomolíbico, cuya incorporación en el polímero ha sido probada con éxito [4].

La toxicidad de este ensayo nos hizo buscar alternativas entre las encontradas en la literatura. Se ensayó por tanto a continuación con surfactantes típicamente utilizados en la síntesis del polipirrol como son el NaDBS, Dodecibenceno sulfonato de sodio y el NaPSS, Poliestireno sulfonato de sodio. Su alto peso molecular los hacen ideales para conseguir capas que a la hora de modular su estado de oxidación no pierdan el contraión para la compensación de carga. Si el anión es de gran tamaño y no desintercala, el intercambio de carga es catiónico durante el proceso redox y por tanto el material tendrá una capacitancia superior y una mayor capacidad de intercambio de iones, además de generar capas con buena estabilidad, alta conductividad y alto nivel de dopaje. Además este tipo de surfactantes ayudan a conseguir capas de baja rugosidad y de alta resistencia al desgaste en remojo [1].

El hecho de que los surfactantes sean compuestos anfífilicos (moléculas con una parte hidrofílica y otra hidrofóbica) será útil en principio para la adsorción de proteínas o polipéptidos sobre la superficie del polímero, ya que se podrán adsorber tanto sus partes hidrofílicas como aquellas hidrofóbicas [2]. Este fenómeno puede resultar muy importante para el cultivo y la posible regeneración neuronal [3].

No se ha estudiado todo el rango de posibles concentraciones que darían lugar a distintas configuraciones coloidales, micelas, etc., sino que se ha enfocado el trabajo empíricamente hacia la concentración que permite la mejor calidad del depósito. No obstante, siempre se

trabajó por encima de la concentración micelar crítica (cmc), lo que contribuye sustancialmente a mejorar la velocidad de difusión de los iones con las capas de polímero [28].

En este capítulo se estudiarán en profundidad capas de polipirrol sintetizadas electroquímicamente con Dodecil bencenosulfonato de sodio (NaDBS) y con Poliestireno sulfonato de sodio (NaPSS) como contraiones. No obstante la terminología usada para referirnos a estos surfactantes será DBS y PSS respectivamente, ya que el sodio no entra formar parte de la capa. También se incluye información sobre las capas de polipirrol dopadas con perclorato y polioxometalato.

Para las muestras dopadas con surfactantes se realizó una profunda caracterización estructural, microestructural y electroquímica a través de diversas técnicas que se explicarán en los próximos apartados. También se realizaron cultivos neuronales sobre ellas para establecer una relación entre los resultados de su caracterización y los resultados de supervivencia y desarrollo celular.

3.2 Capas de PPy dopadas con perclorato

Continuando en la búsqueda de capas poliméricas como sustrato de crecimiento neuronal se hicieron ensayos y estudios variando el tipo de contraión o dopante utilizado en la síntesis, ya que en función de este varían en gran medida las propiedades del polímero resultante. Uno de los dopantes probados había sido originalmente el perclorato de sodio, en cuya síntesis se utilizaba una concentración de 0.1M de pirrol y 0.1M de NaClO₄, en medio acuoso, usando agua ultrapura milliQ. Las celdas y el procedimiento usados fueron idénticos a los ya mencionados durante la tesis, haciendo esta vez una deposición potenciodinámica desde el potencial de circuito abierto a 1V vs Pt a una velocidad de 5mV/s, cuya curva se puede apreciar en la Figura 3.1.

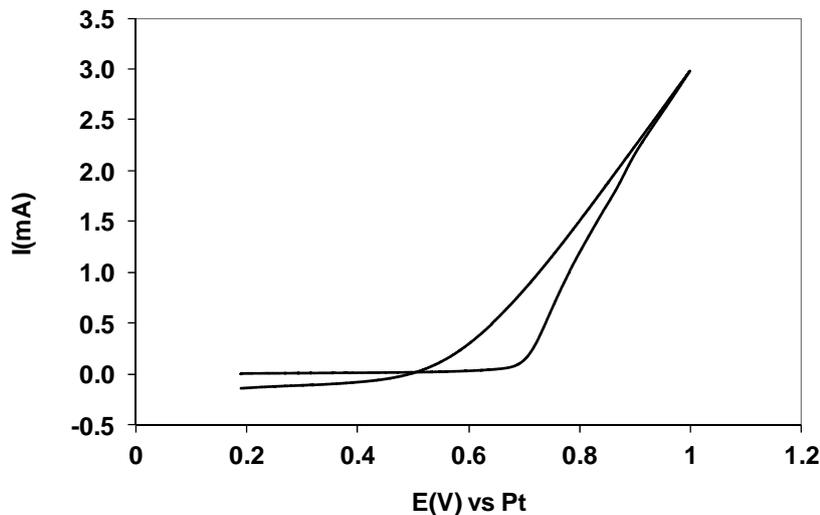


Figura 3.1 Curva de síntesis I vs t de una muestra de $PPy-ClO_4$, desde OCP a $1V$ vs Pt, a $5mV/s$, en una disolución acuosa de $0.1M$ de pirrol y $0.1M$ de $NaClO_4$.

Después de la síntesis se apreció a simple vista una baja adherencia de la capa y una mala calidad de la misma, cosa que ya se indica en la literatura [44], y que motivó los posteriores ensayos con DBS y PSS. Por ello se realizó un estudio comparativo de la evolución de estas muestras y las dopadas con PSS, sumergidas tanto en medio acuoso como en medio de cultivo celular con la intención de observar posibles deterioros. En la Figura 3.2 se pueden observar las imágenes tomadas con un microscopio óptico de unas muestras de $PPy-ClO_4$ y $PPy-PSS$ en seco y después de 10 días sumergidas en agua, y queda bastante clara la degradación sufrida por la muestra dopada con perclorato, en la que ya hay varias zonas despegadas, con respecto a la dopada con PSS. Ya después de solo 4 días en remojo la diferencia era bastante evidente. El mismo fenómeno ocurre en medio de cultivo celular. Por todo ello se decidió no continuar el estudio de muestras de polímero dopadas con perclorato sódico.

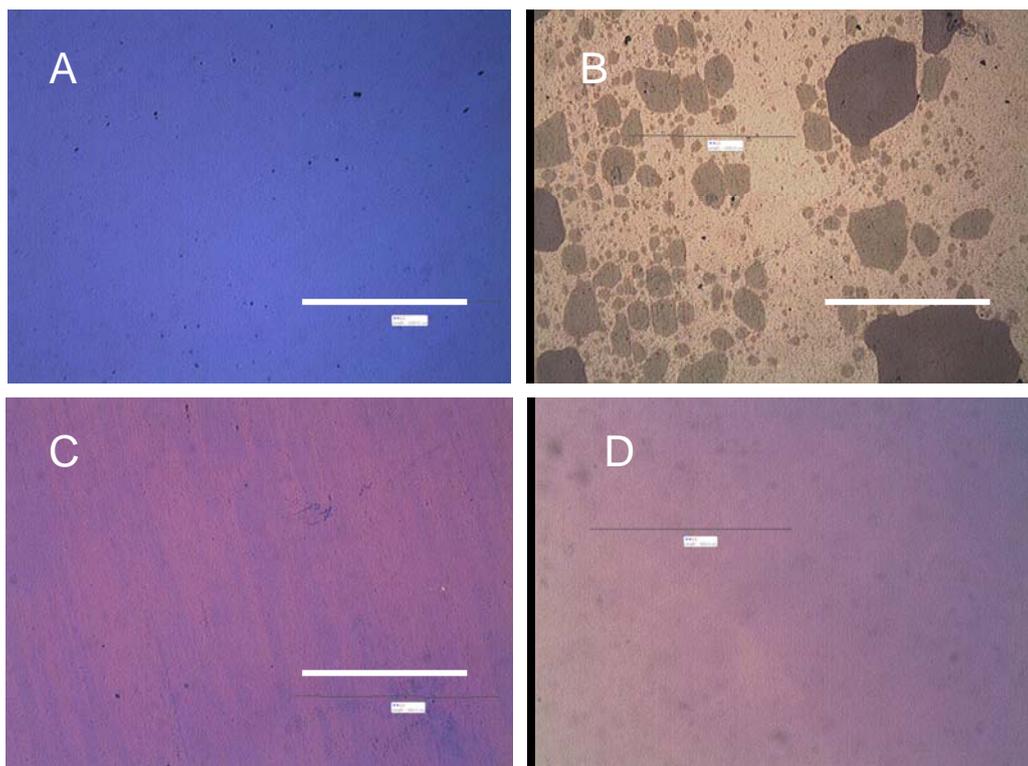


Figura 3.2 Fotografías tomadas en un microscopio óptico de diversas muestras de polipirrol: A) PPy-ClO₄ en seco, B) PPy-ClO₄ después de 10 días sumergida en agua, C) PPy-PSS en seco y D) PPy-PSS después de 10 días sumergida en agua.

3.3 Capas de PPy dopadas con polioxometalatos, [Si Mo₁₂O₄₀]⁴⁻

Otro de los contraiones o dopantes utilizados fue un compuesto del grupo de los polioxometalatos (POM), concretamente el ácido silicomolibdico hidratado, H₄[SiMo₁₂O₄₀].xH₂O. Estos compuestos presentan varias ventajas como una gran potencial en aplicaciones como la catálisis, la fotoquímica y la medicina, además de la alta capacidad de almacenaje de carga, lo que les hace ser muy útiles como materiales para aplicaciones en supercondensadores [45-46]. Por todo ello se pensó en ellos como buenos dopantes del polipirrol para la aplicación biomédica que nos ocupa, ya que aportarían una capacidad de carga adicional y una mayor variabilidad redox. Se realizó la electrosíntesis en la misma celda que los demás materiales poliméricos, también en medio acuoso, usando agua ultrapura milliQ, con una concentración 0.1M de pirrol y 1mM de ácido silicomolibdico. La electrodeposición se efectuó de forma potenciodinámica desde OCP hasta un E_{max} de 0.8V vs Pt (Figura 3.3), se consiguió una capa de muy buen aspecto y con una buena adherencia, muy similar a las capas que tenían surfactantes como dopantes.

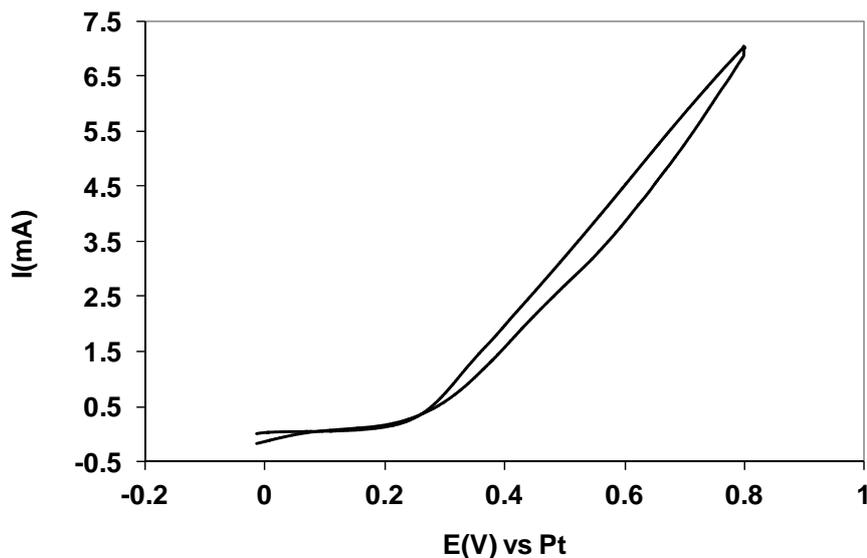


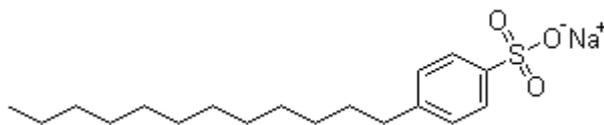
Figura 3.3 Curva de síntesis I vs E de una muestra de PPy-POM, desde OCP a 0.8V vs Pt, a 5mV/s, en una disolución acuosa de 0.1M de pirrol y 0.001M de $H_4[SiMo_{12}O_{40}].xH_2O$.

Una vez sintetizada la muestra se procedió a comprobar la supervivencia celular sobre esta capa. Los ensayos realizados similares al resto de muestras su carácter totalmente tóxico para las células, que morían nada más ser depositadas sobre su superficie. En otras muestras estudiadas, incluso no siendo óptimas, y a pesar de que a 4 días *in vitro* la supervivencia no fue satisfactoria en muchas de ellas, las células se adherían bien y sobrevivían al menos un día, mientras en este caso morían instantáneamente. Por ello se decidió dejar de trabajar con los polioxometalatos y no proceder a una más profunda caracterización de estas muestras.

3.4 Capas finas de Polímero-surfactante

3.4.1 Capas finas de PPy-DBS

Como se ha explicado en el apartado anterior el NaDBS es una molécula de alto peso molecular, su fórmula estequiométrica es $NaC_{12}H_{25}C_6H_4SO_3$ con un peso molecular de 348,48 g/mol y tiene la siguiente configuración:



(3.1)

Con una considerable cola hidrofóbica y la cabeza hidrofílica. El ión Na^+ no intervendrá en la reacción y quedará en disolución, el resto de la molécula pasará a formar parte de la estructura del polipirrol cuando este condense en forma de polímero sólido.

Las capas finas de PPy-DBS obtenidas fueron sintetizadas según se describe en el apartado 2.1.1.2, con una concentración de pirrol 0.1M y 0.1M de NaDBS (Aldrich, grado técnico) en agua, sobre un sustrato de vidrio soda lime recubierto por una capa de adhesión de 5nm de Ti y una capa conductora de 15nm de Au.. Además del potencial dinámico se evaluaron otros métodos como la deposición a potencial constante tal y como se hace en la síntesis con PSS, pero se desestimó ya que las capas no presentaban una buena uniformidad. Esto es muy probablemente debido a que el anión DBS, al ser una molécula más pesada que el PSS tiene una movilidad más limitada, haciendo que el electrolito utilizado en la deposición sea más resistivo, lo que se logró eliminar realizando la electrodeposición con un potencial dinámico y utilizando un sustrato de Au en lugar de Pt. Por todo ello se decidió realizar además una deposición potenciodinámica, que presenta problemas para uniformizar la carga final, y por tanto el espesor de la capa, con lo cual se encontraron unas condiciones óptimas de deposición que se repitieron para todas las muestras para uniformizar sus características finales. Se creyó importante completar el ciclo de potencial dinámico hasta su vuelta al potencial de circuito abierto o de descanso (OCP), dejando así a todas las muestras la misma capacidad para la relajación del sistema y la reorganización necesaria de las cadenas poliméricas. Como en todas las capas finas de polímero estudiadas en esta tesis siempre se primó el hecho de tener un espesor que permitiera una muestra translúcida, lo que es importante para los estudios celulares.

Así pues, las capas finas fueron obtenidas mediante un solo ciclo con las siguientes condiciones que agrupamos en dos grupos: (1) Sintetizadas de OCP hasta un potencial máximo (E_{max}) de 0.6V vs Pt a una velocidad de 5mV/s, se mantuvo el potencial a 0.6V durante 3 minutos. (2) Sintetizadas de OCP a una E_{max} de 0.75V vs Pt a una velocidad de 5mV/s, se mantuvo el potencial a 0.75V durante 10 segundos. Al mantener el potencial estable durante un cierto tiempo en su valor máximo se persigue la máxima uniformización de carga en el depósito. Una vez alcanzado el E_{max} el barrido volvía al OCP.

Las capas presentaban un patrón de interferencia tal y como se aprecia en la Figura 3.4, es decir, un color variable en la capa debido al diferente espesor de la capa en diferentes zonas. El origen de este fenómeno es el efecto que producen las líneas de campo eléctrico en los bordes y que en este caso es visible gracias al bajo espesor de las capas en el rango de longitud de onda de la luz visible. Se eligió una zona central de las capas para determinar su espesor mediante la visión de una sección transversal de la muestra con SEM

y se determinó un espesor medio de 780 nm para las muestras sintetizadas con Emax de 0.75V vs Pt y de 570 nm para las muestras sintetizadas con Emax de 0.6V vs Pt.

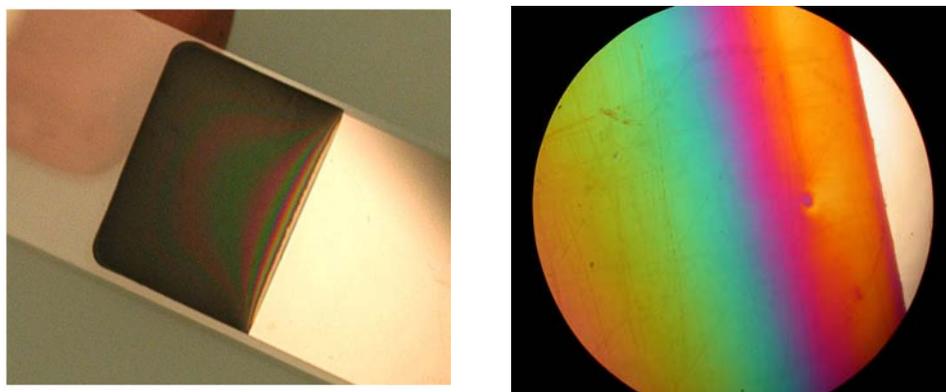


Figura 3.4 Detalle de capas finas de PPy-DBS depositadas sobre un sustrato de oro con el cambio de color que provocan los patrones de interferencia.

En la Figura 3.5 se muestra la curva de potencial dinámico (voltametría cíclica) que se define durante la formación de las capas en los 2 tipos de síntesis estudiados. En el caso de la muestra depositada con Emax 0.6V vs Pt se aprecia una caída de la corriente en este mismo punto debido al espacio de tiempo durante el cual se mantiene este potencial, con ello se observa claramente el fenómeno antes comentado del efecto de la resistencia del electrolito por la presencia del DBS. En ambos casos se puede apreciar como la corriente empieza su aumento en torno a 0.4V, ello implica también el inicio de la deposición del polímero a este potencial.

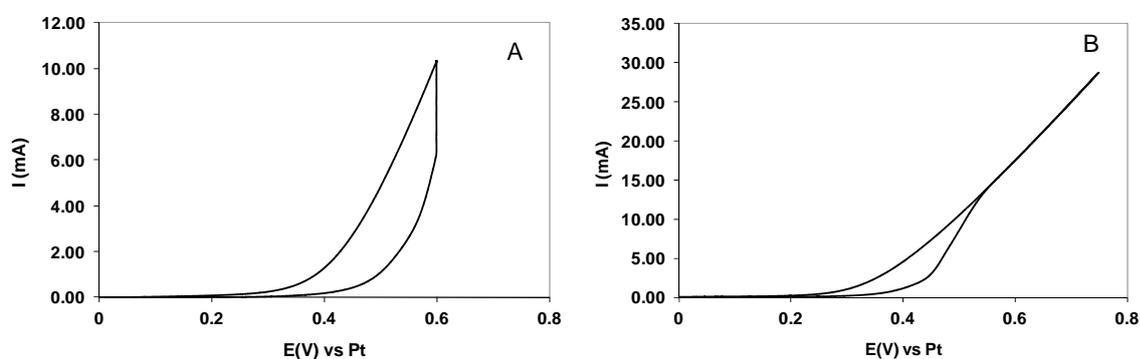


Figura 3.5 Gráficos de la curva de síntesis de las capas finas de PPy-DBS: A) de OCP a Emax 0.6V vs Pt a 5mV/s y parada durante 3 minutos en 0.6V vs Pt, B) de OCP a Emax 0.75V vs Pt a 5mV/s.

3.4.2 Modulación electroquímica de las capas de PPy-DBS: Procesos Redox

Una vez que la capa ha sido sintetizada se encuentra en estado oxidado, y dicho estado puede ser modulado posteriormente aplicando un potencial o corriente de reducción. A medida que la capa se va reduciendo se van intercalando cationes que compensarán esa carga negativa, posiblemente acompañados de moléculas del solvente [5]. En ello se modifican sus propiedades eléctricas y puede ocurrir un cambio de volumen de magnitud no conocida. Como se explicó en el apartado 1.4, teóricamente en la síntesis del polipirrol se necesita oxidar 2.33 electrones por mol de monómero, considerando que el nivel de dopaje del polímero es del 33% [6]. De esos 2.33 electrones, 2 participarán en el proceso de polimerización, mientras que los 0.33 huecos restantes son los implicados en la conductividad del polímero. Ello implica que aproximadamente un 14% de la carga utilizada durante la polimerización corresponde a la capacidad de reducción posterior del material y por tanto para la modulación electrónica de la capa. Si la carga de reducción fuera mayor se pasaría a un estado de sobrerreducción, en el cual las capas perderían los portadores de carga y se volverían aislantes [5,7]. Teniendo en cuenta lo anterior, una vez sintetizadas se procedió a preparar capas con distintos grados de reducción aplicando un potencial de -0.8V vs Pt, punto en el que se observa el pico de reducción según las voltametrías cíclicas de caracterización que se pueden apreciar en el apartado 3.4.9. Se realizaron reducciones de las capas en diferentes estados, llegando al 30, 50 y 80% de la teórica carga susceptible de reducción, y además se sobrerredujo una de las capas. Todas ellas fueron estudiadas con el mismo detalle que las capas *as prepared* (sin ningún tipo de modulación electroquímica), y se evaluaron los efectos que la reducción tiene tanto a nivel estructural, microestructural, electroquímico y de cultivo celular. Como era de esperar para todas las muestras reducidas los espesores medios fueron mayores, por ejemplo en el caso de las muestras sobrerreducidas se midieron espesores medios de 1400 nm para las muestras sintetizadas hasta 0.75V y 750 nm para las muestras sintetizadas hasta 0.6V. En la tabla 3.1 se pueden observar los grosores medios en la parte central de cada muestra en relación con su grado de reducción. Obsérvese que cuanto más reducida está más gruesa es la muestra. También se pueden observar los porcentajes de aumento de volumen, que se calculan a partir del incremento de grosor con respecto a la muestra *as prepared*, asumiendo la relación directa que hay entre el aumento de volumen y el de grosor, que supera el 30% significativamente a 0.75V y la mayor reducción.

Tabla 3.1 Valores del grosor de las muestras de PPy-DBS sintetizadas con E_{max} 0.6V vs Pt y 0.75V vs Pt en su parte central halladas mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) y relacionados con su grado de reducción. Los cambios de volumen (ΔV) están referidos al grosor de la muestra as prepared.

Tipo de muestra	Grosor (nm)	ΔV	Grosor (nm)	ΔV
	E_{max} 0.6V		E_{max} 0.75V	
<i>As prepared</i>	570	-	780	-
Reducida al 30%	590	4%	905	16%
Reducida al 50%	600	5%	975	25%
Reducida al 80%	710	25%	998	28%
Sobrerreducida	750	31%	1400	79%

El electrolito utilizado en la reducción fue un tampón fosfato sódico 0.1M a pH7, equivalente al medio iónico biológico, que evita posibles efectos de cambio de pH, con lo cual el catión que entra en la estructura para la compensación de carga será el Na^+ , el cual entra solvatado por moléculas de agua [5,8]. Todo ello comporta un aumento en el peso y volumen de la capa que observaremos en el apartado 3.4.5.

En la figura 3.6 se pueden observar las curvas I vs t durante la reducción para los dos tipos de muestras para cada grado de reducción. En todos los casos se aprecia un descenso exponencial de la corriente, lo que indica que el proceso de reducción se produce muy rápidamente al aplicar el potencial, a lo que contribuye la posible formación de una doble capa. El leve aumento de corriente posterior sugiere una reorganización del polímero que permite asumir aún más carga negativa. Si el proceso continúa se tiende hacia una corriente nula que indica la pérdida de las propiedades conductoras del polímero y su conversión a un material aislante.

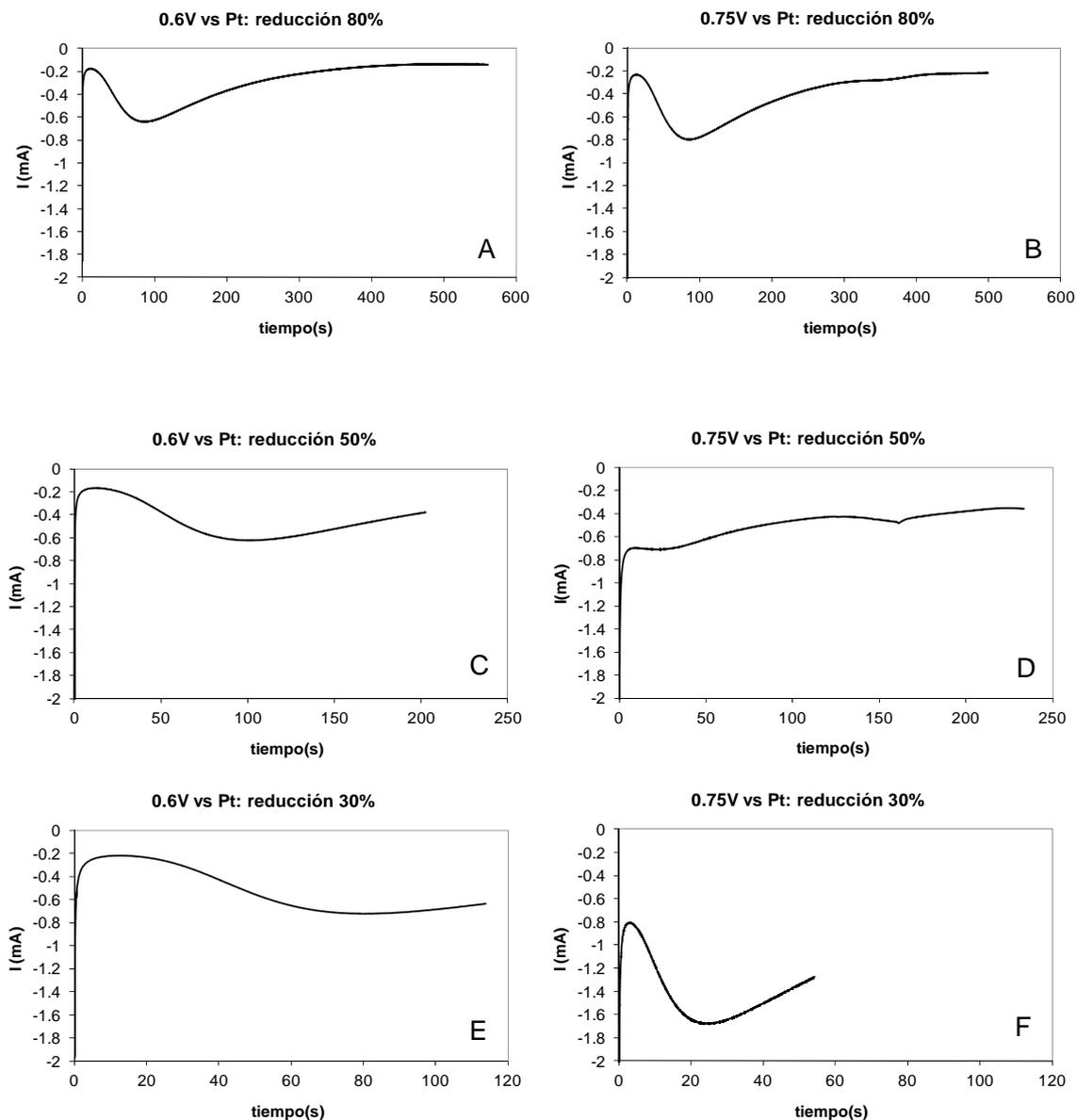
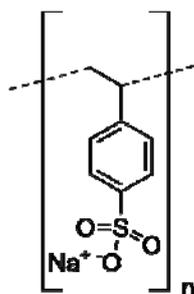


Figura 3.6 Gráficos I vs t de la curva de reducción a E constante de $-0.8V$ vs Pt de las capas finas de PPy-DBS: A) Capa sintetizada a E_{max} 0.6V vs Pt: reducida en un 80%, B) Capa sintetizada a E_{max} 0.75V vs Pt: reducida en un 80%, C) Capa sintetizada a E_{max} 0.6V vs Pt: reducida en un 50% D) Capa sintetizada a E_{max} 0.75V vs Pt: reducida en un 50%, E) Capa sintetizada a E_{max} 0.6V vs Pt: reducida en un 30% y F) Capa sintetizada a E_{max} 0.75V vs Pt: reducida en un 30%.

3.4.3 Capas finas de PPy-PSS

El resultado negativo a nivel de cultivos celulares del PPy dopado con DBS que se describen en el apartado 3.6 indujo a una caracterización del DBS comercial utilizado, que resultó ser una mezcla de compuestos con un promedio de 18 carbonos en la cadena pero con un alto grado de impurezas, variables en cada bote diferente, en donde se llegó a encontrar hasta un 15% de grupos sulfatos en algún caso. A raíz de ello se buscó un surfactante aniónico alternativo con mayor reproducibilidad comercial, el poliestireno sulfonato de sodio (NaPSS) (Aldrich). Al igual que el DBS el PSS es una molécula de alto peso molecular del grupo de los surfactantes aniónicos. La fórmula estequiométrica del monómero es $\text{CH}_2\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{Na})$, con un peso molecular de 206 g/mol y con la siguiente configuración



(3.2)

Como se puede observar la molécula es muy parecida a la de DBS pero su parte hidrofóbica es de menor tamaño, haciendo de él un surfactante más ligero.

Las capas finas de PPy-PSS obtenidas fueron sintetizadas según se describe en el apartado 2.1.1.1 utilizando una concentración de 0.1M de Pirrol y 0.1M de NaPSS (Aldrich) sobre un sustrato de vidrio soda-lime recubierto en este caso por una capa de adhesión de 5nm de Ti y una capa conductora de 12nm de Pt, a un potencial constante de 0.6V vs Pt hasta alcanzar una carga de síntesis de 900 mC. Con ello se intentó conseguir la máxima uniformidad en las capas sintetizadas y espesores en el rango de la transparencia. El patrón de interferencia de las capas resulta visiblemente diferente al de las capas sintetizadas de DBS tal y como se aprecia en la Figura 3.7, lo que pone de manifiesto la influencia del contraión usado en la morfología de la capa, y muy posiblemente en el tipo de polimerización o cross-linking en el polímero final.

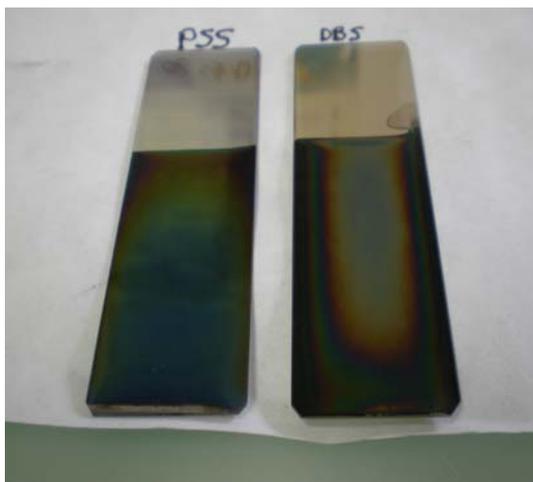


Figura 3.7 Detalle de la diferencia en el patrón de interferencia de las muestras de polipirrol sintetizadas con DBS mediante un potencial dinámico con un Emax de 0.6V vs Pt y con PSS a un potencial constante de 0.6V vs Pt.

Las corrientes que se alcanzan en la síntesis alcanzan un valor prácticamente constante poco después del inicio de la reacción, y su valor oscila entre 4 y 8 mA. Ello indica la existencia de un único proceso de oxidación y garantiza la homogeneidad de la capa. En la Figura 3.8 se pueden observar las curvas para dos muestras sintetizadas exactamente con las mismas condiciones. Se puede apreciar, sin embargo, una gran diferencia en la corriente resultante sin haber variado las condiciones iniciales. Aunque esto es común en polímeros, en especial en aquellos que utilizan surfactantes como contraiones, es significativo que se produzca también en muestras sintetizadas a potencial constante con idéntica carga. La presencia de este tipo de moléculas puede generar la presencia de micelas de distintos tipos en la disolución, lo que crea un factor variable y caótico en función del grado de agitación, y pequeñas variaciones de temperatura, lo cual debe ser tenido en cuenta, ya que puede afectar incluso a la transferencia de carga en el electrodo, que podría pasivarse debido a las micelas. Así pues se hace imposible conseguir dos muestras idénticas, ya que la curva de síntesis se comportaba de una manera totalmente aleatoria. Como comentaremos más adelante este puede ser uno de los factores determinantes para el desarrollo de los cultivos neuronales sobre estos materiales.

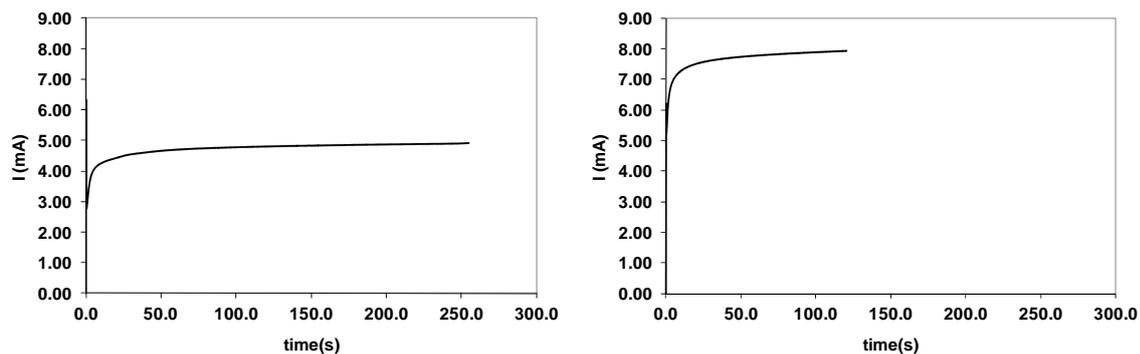


Figura 3.8 Curvas de síntesis para dos capas de PPy-PSS con exactamente las mismas características.

3.4.4 Modulación electroquímica de las capas de PPy-PSS: Procesos Redox

Las condiciones para los procesos redox realizados a las capas de PPy-PSS son idénticas a las de las capas de PPy-DBS, salvo la extensión de la reducción llevada a cabo, que fue reevaluada. En este caso serán del 50 y el 100%, en el límite de su capacidad de reducción, además de la muestra sobrerreducida. Este cambio se origina en el hecho de que no se apreció demasiada diferencia entre los tres de las capas dopadas con DBS, y en el hecho de que se quiso evaluar la reducción teórica total.

En la Figura 3.9 se puede observar la respuesta de la corriente vs tiempo de dos muestras reducidas al 50 y al 100% teórico. El comportamiento no difiere del obtenido para las muestras de DBS. A medida que se alarga la reducción la corriente se acerca a 0, pero no existe aumento inicial de la corriente. Por ello, dicho aumento se considera debido a cambios en la resistencia o la estructura del polímero con DBS que no ocurren en el que contiene PSS.

En la tabla 3.2 se pueden observar los grosores de las capas de PPy-PSS según su grado de reducción, el mismo efecto antes explicado de mayor grosor a mayor reducción también se produce en este caso. También se detallan los valores de cambio de volumen con respecto a la muestra *as prepared*. Estos datos son ligeramente inferiores con respecto a los de las capas sintetizadas con DBS, lo cual es positivo en términos de adherencia y estabilidad de la capa, y muestra una vez más la conveniencia del uso del PSS.

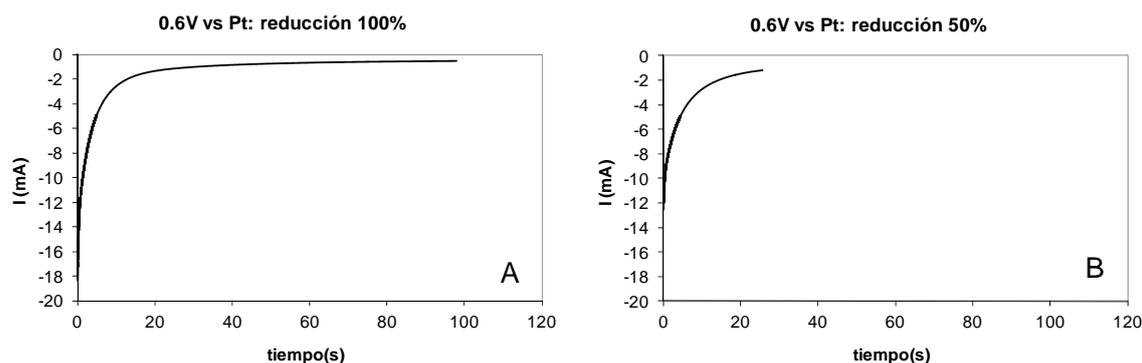


Figura 3.9 Corriente vs t para la reducción a potencial constante de las capas finas de PPy-PSS sintetizadas a 0.6V vs Pt: A) reducida en un 100%, B) reducida en un 50%.

Tabla 3.2 Valores del grosor de las muestras de PPy-PSS en su parte central medidos con el microscopio electrónico de barrido (SEM) relacionados con su grado de reducción. Los cambios de volumen (ΔV) están referidos al grosor de la muestra as prepared. Obsérvese el menor cambio de volumen respecto a DBS.

Tipo de muestra	Grosor central (nm) 0.6V	ΔV
<i>As prepared</i>	290	-
Reducida al 50%	293	1%
Reducida al 100%	350	21%
Sobrerreducida	400	38%

3.4.5 Evaluación del proceso de síntesis y reducción de las capas mediante balanza electroquímica de cuarzo (EQCM)

3.4.5.1 Proceso de síntesis

Uno de los puntos importantes en la valoración relativa de las capas de polímeros reside en el estudio de su formación. La balanza electroquímica de cuarzo permite conocer la masa real de polímero depositada y al poder relacionarla con la carga utilizada para ello se puede averiguar la eficiencia del proceso, el peso molecular de los iones intercalados y el número

real de moles de electrones por cada mol de polímero depositado. Para ello se llevó a cabo la reacción sobre los cristales de cuarzo del modo más similar posible a la preparación sobre los soportes de vidrio descritos, y se utilizaron las mismas condiciones de síntesis. Se realizaron experimentos de potencial dinámico desde 0 hasta un E_{max} de 0.6V vs Pt y desde 0 a un E_{max} de 0.75V vs Pt para el DBS y de potencial estático a 0.6V vs Pt para el PSS. Además se emularon los procesos de reducción para conocer parámetros como el peso molecular de la especie intercalada.

Un proceso de síntesis de polímero conductor caracterizado por EQCM con un comportamiento ideal implicaría la obtención de una horquilla de 2.20 a 2.40 electrones por mol de monómero utilizado (ver apartado 1.4), lo cual implica un grado de dopaje de 0.2 a 0.4 huecos por monómero, ello significa también que existen de 2.5 a 5 monómeros de pirrol por cada molécula de contraión intercalada. El solvente, en este caso el agua, es muy posible que entre a formar parte del material [9]. Si la eficiencia fuera del 100% toda la corriente utilizada iría a parar a la formación del polímero. Como es de esperar, en el estudio realizado no se consigue el proceso ideal, pero en este capítulo se intentan comparar los resultados reales con aquellos que habrían sido los ideales para estos polímeros. Puesto que el dopaje teórico es de 0.33 huecos, se asumió esta cifra para hacer los cálculos de una síntesis ideal, es decir existen 3 monómeros de pirrol por cada molécula de contraión intercalada. También se asumió una densidad del polipirrol de 1.5 g/ml [10]. Teniendo en cuenta esto se calculó, sumando el peso molecular del monómero pirrol y el 33% del peso molecular de los contraiones, el peso molecular (PM) teórico de la que se llamará la unidad del polímero, que fue de 171.3 g/mol para el PPy-DBS y de 134.2 g/mol para el PPy-PSS. Según la ley de Faraday la masa y la carga se relacionan según la expresión:

$$m = \frac{QM}{Fn} \quad (3.4)$$

donde m es la masa del polímero depositado en gramos, Q es la carga utilizada en Coulombios, M es el peso molecular de la unidad de polipirrol, F es el número de Faraday: 96485 C/mol y n es el número de moles de electrones utilizados por mol de unidad de polipirrol sintetizada: 2.33 en el caso teórico. Dado que Q y m se obtienen experimentalmente, fijando la M teórica antes mencionada se puede calcular n , que servirá para calcular la eficiencia del proceso, que se calculará según la expresión: $[2.33/\text{dato experimental } n] \times 100$ (Tabla 3.3). Fijando $n = 2.33$ se puede calcular una M experimental

de la unidad de polímero. Cualquier desviación por tanto apuntará a aspectos intrínsecos del proceso.

Asimismo, teóricamente en el proceso de reducción deberían de utilizarse hasta un máximo de 0.33 electrones por mol de polipirrol para llegar al grado máximo de dopaje, y el peso molecular del catión intercalado debería corresponder al del ión disponible para la intercalación (23 g/mol para sodio).

Las curvas de I vs t o I vs E obtenidas en las síntesis sobre el cristal de cuarzo de la EQCM son muy parecidas a las de las síntesis en los sustratos de mayor tamaño que podíamos observar en las Figuras 3.5 para el DBS y 3.8 para el PSS, lo cual indica en primera instancia que estamos ante un buen método para caracterizar la síntesis real de las capas. En la Figura 3.10 podemos observar como para todos los casos la masa depositada aumenta a medida que la carga va aumentando, y lo hace de manera lineal, lo cual indica que el polímero se comporta como una capa rígida creciendo de modo homogéneo. La fase inicial de la gráfica que parece un poco más curvada corresponde al proceso de nucleación de la capa [9]. La masa se calculó a partir de los datos de frecuencia utilizando la ecuación de Sauerbrey mencionada en el apartado 2.4.2 [11].

La ecuación de Sauerbrey solo puede utilizarse en caso de que los cambios de viscosidad y densidad del líquido sean despreciables [12], hecho que se comprueba a raíz de los resultados iniciales.

Como se explicó en los apartados 3.4.1 y 3.4.3 y se verá en el apartado 3.4.6, hay cierta incertidumbre en el grosor obtenido en dos síntesis con exactamente los mismos parámetros, también en los experimentos de EQCM. A pesar de que no fue posible obtener dos deposiciones con exactamente el mismo peso o carga, la masa obtenida por unidad de carga sí es reproducible, lo que implica una capa rígida y con composición uniforme. De hecho la desviación estándar de varios experimentos está en torno a 0.25 de masa por unidad de carga.

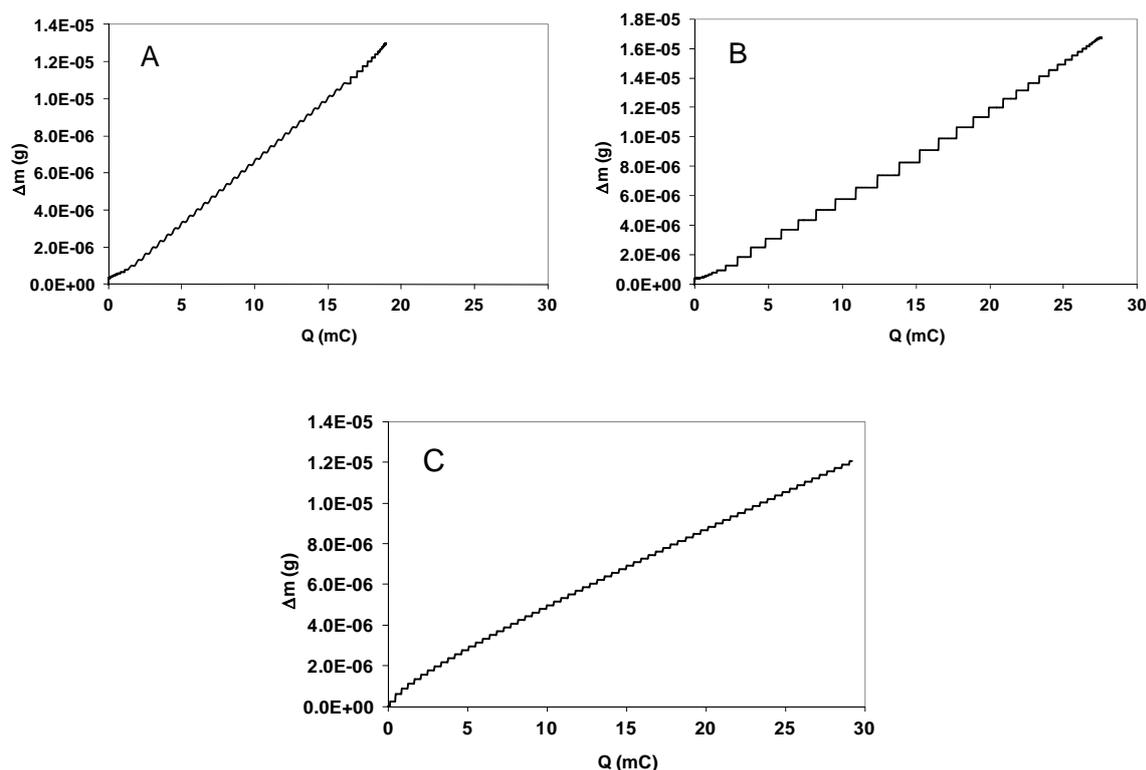


Figura 3.10 Evolución de la masa depositada con respecto a la carga depositada durante el proceso de síntesis de polipirrol registrados mediante EQCM de: A) Muestra sintetizada dinámicamente desde 0 hasta un E_{max} de 0.6V vs Pt con DBS, B) Muestra sintetizada dinámicamente desde 0 hasta un E_{max} de 0.75V vs Pt con DBS, C) Muestra sintetizada potencioestáticamente a 0.6V vs Pt con PSS.

El ratio entre la diferencia entre los moles de polipirrol obtenidos y los calculados a partir de la carga con las consideraciones antes explicadas es considerada la eficiencia del proceso. En la Tabla 3.3 se pueden observar estos últimos datos. La penúltima fila corresponde al cálculo del peso molecular que debería tener la unidad de polímero si el ratio mol e^- /mol unidad PPy hubiera sido el teórico (2.33) mediante la ecuación 3.4. Nótese que este dato es inversamente proporcional al ratio molar de la primera fila (ley de Faraday).

En el caso del DBS se obtienen valores de eficiencia muy similares a ambos potenciales máximos, mientras que la eficiencia del caso del PSS es muy distinta. Esto deja patente la importancia del contraión utilizado. El proceso de síntesis es notablemente más eficiente con el DBS que con el PSS, y el número de electrones por mol de PPy está cerca del valor teórico de 2.33. Cuanto menos eficiente es el proceso más lejos nos situamos de los valores ideales.

Tabla 3.3 Resultados teóricos y experimentales de Q y m para la síntesis de capas de Polipirrol-DBS y Polipirrol-PSS. Se muestra la eficiencia del proceso y el peso molecular calculado a partir de $n = 2.33$.

	DBS 0.6V	DBS 0.75V	PSS
Mol e^- /Mol unidad PPy si PM teórico	2.64±0.34	2.73±0.40	3.65±0.25
Ratio Moles teór./exp. (n)	0.88	0.84	0.64
Eficiencia Proceso	88%	84%	64%
PM calculado si $n = 2.33$ (g/mol)	64.9±1.3	62.2±4.9	36.9±2.7
PM teórico= PM monómero + 0.33·PM contraión	171.3	171.3	134.2

Como se podrá comprobar en el apartado 3.4.6 en todas estas capas hay una gran cantidad de agua, lo que involucra un Δm mayor, el hecho de que el peso molecular calculado asumiendo $n = 2.33$ sea mayor en términos relativos para las capas con DBS que las de PSS puede implicar que las primeras incorporan más agua durante la síntesis. Entre los factores de los actores que pueden alejar el sistema de la idealidad hay que tener en cuenta los procesos no-faradaicos existentes en los procesos electroquímicos, que generan corrientes capacitivas [13,14].

3.4.5.2 Proceso de reducción

El parámetro de moles de electrones/moles de unidad de polímero depositado en el proceso de reducción depende en principio solamente de la cantidad de carga empleada durante esta y de los moles depositados como polímero. Así pues, se puede regular el parámetro en función del grado de reducción que se desee obtener, con un máximo de 0.33 moles de e^- /mol de unidad polímero. La Figura 3.11 es consistente con ese valor ya que la Δv se estabiliza cuando ese valor se alcanza. A partir de ese punto, la reducción posible requerirá potenciales más extremos y no implicaría intercalación, mientras que sí afectaría a la identidad química del polímero, lo que sería una sobrerreducción.

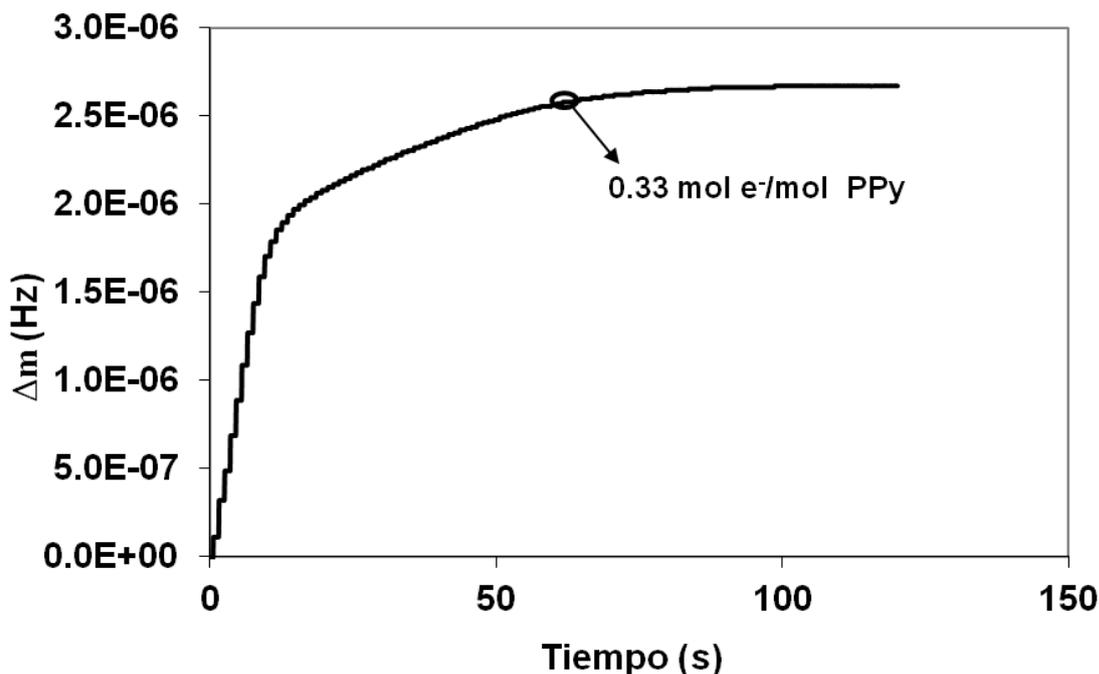


Figura 3.11 Evolución de la frecuencia de resonancia del cuarzo de la EQCM durante un proceso de reducción de PPy-DBS a $-0.8V$ vs Pt en un tampón de fosfato sódico de pH 7.4, señalando el punto de máxima reducción teórica de la capa.

La relación Q/m obtenida permite obtener el valor del M/n (peso molecular por unidad de carga) de la especie intercalada según la ecuación 3.4 explicada en el anterior apartado. Los valores obtenidos fueron de 120 ± 17 g/mol para la reducción de la muestra de DBS sintetizada hasta E_{max} de $0.6V$ vs Pt y de 113 ± 11 g/mol para la reducción de la sintetizada hasta E_{max} de $0.75V$ vs Pt, una diferencia pequeña dentro del error de medida. Sin embargo, para la muestra de PSS el resultado fue de 76 ± 15 g/mol. En todos los casos la diferencia de estos pesos moleculares con el del catión sodio (23 g/mol), que es el catión más probablemente intercalado, tiene que ser debida a la intercalación del agua que solvata al ión, que ya ha sido reportada en la literatura [5,8]. Estimamos que la diferencia de peso molecular de la especie insertada en la reducción del PPy-DBS y del PPy-PSS es debida a que la capa que contiene PSS absorbe iones menos solvatados y por tanto las capas intercalan menos agua y se hinchan menos, algo que confirma lo que ya se comentó en el apartado 3.2.4.

Se realizó también el proceso de reducción de la capa en el medio de cultivo celular neurobasal con el fin de contrastar posibles diferencias de comportamiento en medios biológicos, sin encontrar grandes diferencias entre los resultados de este y los del tampón fosfato.

3.4.6 Análisis de XPS

3.4.6.1. Capas finas de PPy-DBS

Dado que el cultivo celular estará en contacto con la superficie de la capa, la caracterización de la misma constituye un factor esencial. Las medidas de XPS nos ayudaron a conocer la composición atómica de la superficie de las capas de polipirrol, tanto de las sintetizadas con DBS como de las sintetizadas con PSS, pudiendo establecer elementos diferenciales y comunes entre ellas.

En la Figura 3.12 se pueden observar los espectros de las muestras sintetizadas hasta un E_{max} de 0.6V con DBS. Como era de esperar en la superficie de las capas hay C, O, N y S. El C es un elemento común al pirrol y el DBS o PSS, la presencia de N es debida solo al pirrol y el O y el S existen en la capa gracias al DBS o PSS. En las muestras reducidas existe Na y no así en la *as prepared*, poniendo de manifiesto la intercalación del catión en el proceso de reducción. La presencia de Si es debida a las impurezas por el hecho de que el sustrato de las capas es vidrio soda lime.

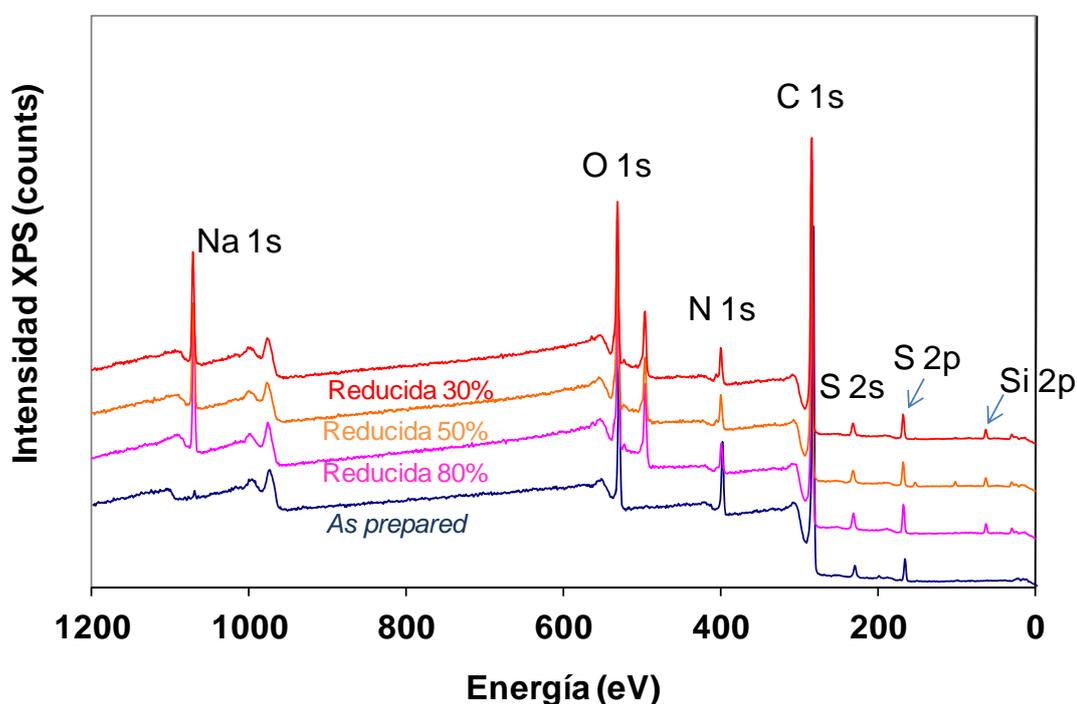


Figura 3.12 Espectro XPS general de capas de PPy-DBS depositadas hasta 0.6V vs Pt *as prepared* y en diferentes grados de reducción: 80, 50 y 30%.

En la Figura 3.13 se pueden observar para la muestra sintetizada hasta 0.75V el mismo tipo de espectros.

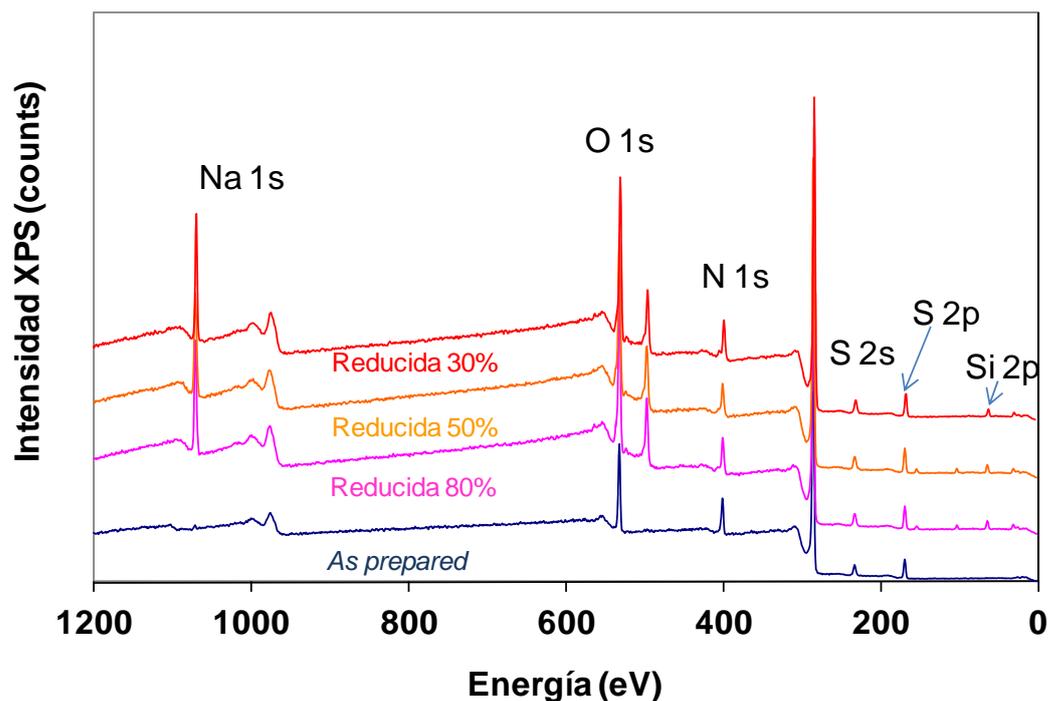


Figura 3.13 Espectro XPS general de capas de PPy-DBS depositadas hasta 0.75V vs Pt *as prepared* y en diferentes grados de reducción: 80, 50 y 30%.

En la Tabla 3.4 aparecen los resultados de las cuantificaciones de los espectros de las muestras *as prepared* de cada una de las capas estudiadas, los datos son los porcentajes molares de cada uno de los elementos existentes en la superficie de la capa. La relación molar entre azufre y nitrógeno permite evaluar el número de contraiones por monómero, es decir el grado de dopaje, mientras que el de Na/N permite estimar el grado de intercalación al reducir el material. Aunque el carbono es endémico en cualquier superficie, y su magnitud más imprecisa, la diferencia entre el C encontrado experimentalmente y el teórico que proviene del anillo de pirrol, donde por cada Nitrógeno hay 4 Carbonos, y del anión, donde existen 18 Carbonos por cada azufre en la cadena de DBS y 12 en la de PSS, nos dará una idea del exceso de carbono en superficie.

Como se explicó anteriormente el grado de dopaje del polímero debería estar en un rango de 0.2 a 0.4, lo cual se cumple en el caso de los tres tipos de muestras *as prepared* (DBS Emax 0.6V, DBS Emax 0.75V y PSS), y también para las muestras que se redujeron después de su preparación como se puede apreciar en las Tablas 3.4 y 3.5. Sin embargo, esto no es así para las muestras sintetizadas con DBS y reducidas en diferentes grados, cuyos datos oscilan entre 0.1 y 0.6, con una gran variabilidad. Lo mismo ocurre con el dato de Na/N que indica el grado de intercalación de iones en la reducción. Este valor del polímero no debería superar al de dopaje, es decir, no debería estar muy por encima de 0.4.

Sin embargo llega a alcanzar cifras de 1.2 para estas muestras. Este valor tan alto no parece ser debido solo al Na^+ endémico y puede estar relacionado con las impurezas del DBS. Todo esto no ocurre en el caso de las muestras sintetizadas con PSS y reducidas posteriormente como se explicará en el siguiente apartado, lo que confirma la mayor reproducibilidad y homogeneidad de estas con respecto a las sintetizadas con DBS. Para todas las capas existe un exceso de Carbono, que podría corresponde a dióxido de carbono absorbido de la atmósfera, a suciedad orgánica y a un posible exceso de surfactante en la superficie, la cual cosa será problemática posteriormente para la adhesión del polipéptido y el crecimiento celular.

Tabla 3.4 Cuantificación molar de los picos del espectro general de XPS de capas de PPy-DBS depositadas con $E_{\text{max}} 0.6\text{V vs Pt}$ y con $E_{\text{max}} 0.75\text{V vs Pt}$ y de PSS depositada a potencial constante de 0.6V vs Pt , todas ellas as prepared. Se incluyen las relaciones molares de los propios resultados de S/N y Na/N, y el exceso de C calculado.

Muestra	C 1s	O 1s	N 1s	S 2p	Na 1s	S/N	Na/N	Exceso C
DBS $E_{\text{max}} 0.6\text{V}$	78.52	10.83	8.70	1.98	-	0.23	-	8.08
DBS $E_{\text{max}} 0.75\text{V}$	81.30	9.11	6.84	2.75	-	0.40	-	4.44
PSS	73.87	13.32	9.26	3.55	-	0.38	-	8.43

Tabla 3.5 Cuantificación molar de los picos del espectro general de XPS de capas de PPy-DBS depositadas con $E_{\text{max}} 0.6\text{V vs Pt}$ y con $E_{\text{max}} 0.75\text{V vs Pt}$ y de PSS depositada a potencial constante de 0.6V vs Pt , todas ellas sobrerreducidas con posterioridad. Se incluyen las relaciones molares de los propios resultados de S/N y Na/N, y el exceso de C calculado.

Muestra	C 1s	O 1s	N 1s	S 2p	Na 1s	S/N	Na/N	Exceso C
DBS $E_{\text{max}} 0.6\text{V}$	78.01	9.82	7.15	2.25	2.53	0.31	0.35	8.91
DBS $E_{\text{max}} 0.75\text{V}$	77.34	10.32	6.65	2.48	3.20	0.37	0.48	6.10
PSS	73.48	15.17	7.45	2.24	1.66	0.30	0.22	25.76

3.4.6.2 Capas finas de PPy-PSS

En cuanto a las muestras sintetizadas con PSS, en la Tabla 3.6 podemos observar que los resultados sí son en este caso más reproducibles y entran dentro de los rangos teóricos. Sin embargo, es destacable como también en este caso se produce una cierta irreproducibilidad, ya que la muestra ‘as prepared (2)’ está sintetizada y procesada en exactamente las mismas condiciones que la ‘as prepared (1)’ y sin embargo sus datos son muy diferentes para todos los elementos. Así pues, aunque las muestras de PPy sintetizadas con PSS son más homogéneas y reproducibles que las de DBS, parece haber un problema de irreproducibilidad y variabilidad en la composición superficial inherente a las capas de polímero dopadas con surfactantes, lo cual puede ser negativo para el desarrollo de los cultivos celulares. La diferente nucleación original puede ser muy sensible a las pequeñas variaciones del sustrato de Pt y modificar la estructura final del polímero sustancialmente.

Tabla 3.6 Cuantificación molar de los picos del espectro general de XPS de capas de PPy-PSS depositadas a 0.6V vs Pt as prepared y en diferentes grados de reducción: 100 y 50%. Se incluyen las relaciones molares de los propios resultados de S/N y Na/N, y el exceso de C calculado.

Muestra	C 1s	O 1s	N 1s	S 2p	Na 1s	S/N	Na/N	Exceso C
<i>As prepared (1)</i>	87.08	9.80	2.16	0.95	-	0.44	-	70.84
<i>As prepared (2)</i>	73.87	13.32	9.26	3.55	-	0.38	-	8.43
Sobrerreducida	73.48	15.17	7.45	2.24	1.66	0.30	0.22	25.76
Reducida 100%	84.71	10.60	3.16	1.13	0.40	0.36	0.12	63.03
Reducida 50%	71.68	15.64	7.38	2.75	2.55	0.37	0.34	20.16

3.4.6.3 Deconvolución espectros XPS

Se realizó un espectro XPS de las muestras ‘as prepared’ localizado sobre los picos de carbono y oxígeno y se hizo una deconvolución de estos mediante el uso de Gaussianas-Lorentzianas, con lo que fue posible ajustar la señal del C y el O a varios componentes. En la Figura 3.14 se puede observar la deconvolución del pico de C con sus mencionadas componentes, de las cuales la mayor es la del carbono alifático para todos los casos.

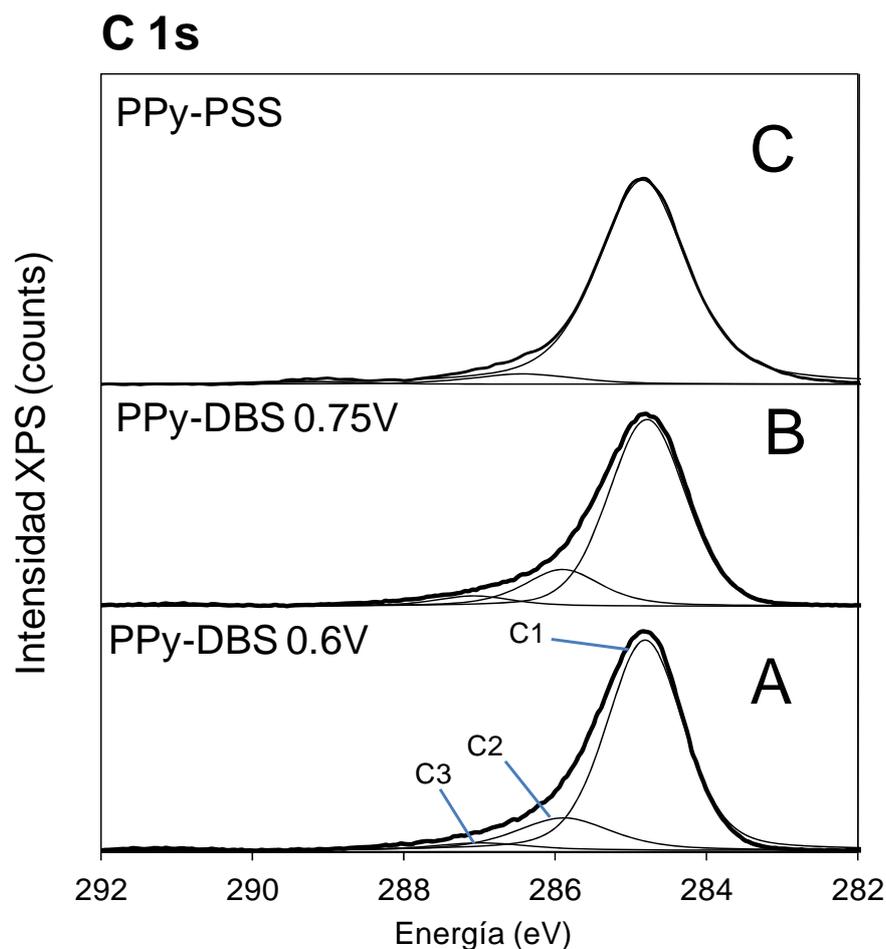


Figura 3.14 Deconvolución del pico C 1s de A) capa de PPy-DBS depositada hasta 0.6V vs Pt, B) capa de PPy-DBS depositada hasta 0.75V vs Pt y C) capa de PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt.

En la Tabla 3.7 aparecen los porcentajes atómicos de cada uno de los componentes de la señal del carbono, C1, C2, C3 y C4, y se hace evidente como el alifático, situado en 284.8 eV es con diferencia mayoritario. C2 se sitúa en la zona que corresponde al enlace C-N característico del pirrol y al enlace C-S propio de los surfactantes, por lo cual no es posible distinguir qué cantidad de carbono forma parte de cada uno de los enlaces. El hecho de que esta cantidad sea menor para el PSS que para el DBS, junto con la mayor cantidad de carbono alifático en la muestra de PSS hace pensar que en la superficie de la última existe una mayor cantidad de surfactante como se apuntó anteriormente en el análisis del espectro general de XPS. C3 describe la zona de energía en la que se sitúan los enlaces C=O y C-O, que indican una posible sobreoxidación del polímero, al ser esta una cantidad baja no se puede considerar este fenómeno como reseñable en estas muestras, estos enlaces además hacen pensar en la existencia de contaminación en la capa. En el caso de las muestras de DBS se encuentra una cantidad residual de carbonato en la superficie, que también es debido a la contaminación de las capas [1-15,16].

Tabla 3.7 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal C 1s para una capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, una capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt y una capa de PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt.

	C1: C-C/C-H		C2: C-N/C-S		C3: C=O/C-O		C4: CO ₃ ²⁻	
	Posición (eV)	Molar %	Posición (eV)	Molar %	Posición (eV)	Molar %	Posición (eV)	Molar %
PPy-DBS 0.6V	284.8	77.1	285.9	17.8	287.0	3.6	291.3	1.5
PPy-DBS 0.75V	284.8	77.6	286.0	17.7	287.1	3.9	291.1	0.8
PPy-PSS	284.8	93.7	286.7	4.7	289.2	1.6	-	-

La deconvolución de los picos del oxígeno para las mismas capas se muestra en la Figura 3.15, y en este caso se encontraron solo 2 componentes de la señal del oxígeno, O1 y O2. Tal y como se muestra en la Tabla 3.8, el primero delimita la zona energética en la que se encuentran los enlaces S-O del sulfonato presente en el surfactante y los enlaces C=O propios de la ligera sobreoxidación del polímero y de la existencia de contaminación. No obstante la cantidad de oxígeno implicada en este enlace es mucho menor que la del enlace sulfonato porque como ya vimos en el análisis del pico del carbono el porcentaje de C=O era muy bajo.

Una vez más se aprecia por tanto como la cantidad de surfactante en la superficie de la capa de PPy-PSS es mayor que la de las capas de PPy-DBS. La componente O2 indica la zona que corresponde a los enlaces C-O cuyo origen se presume el mismo que en el caso de los enlaces C=O, asimismo en esta zona se engloban los grupos OH⁻ y los oxígenos hidratados, con lo cual se confirma la presencia de agua en la capa como se apuntó en el apartado 3.4.5 [1,15-17].

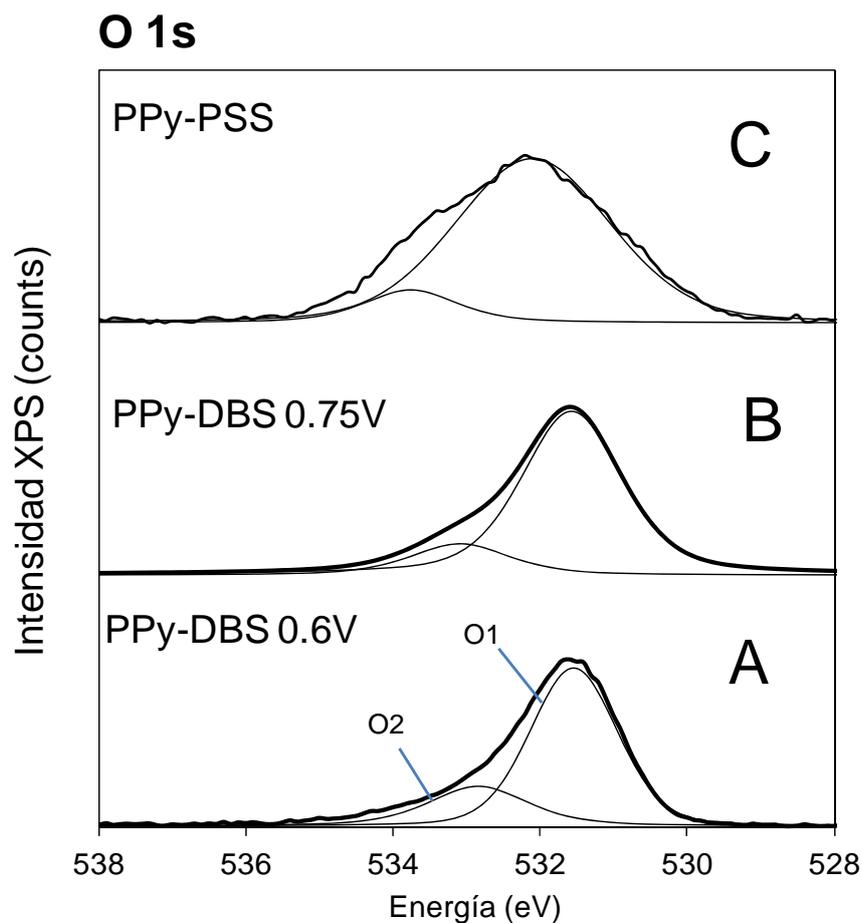


Figura 3.15 Deconvolución del pico O 1s de A) capa de PPy-DBS depositada hasta 0.6V vs Pt, B) capa de PPy-DBS depositada hasta 0.75V vs Pt, C) capa de PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt.

Tabla 3.8 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal O 1s para una capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, una capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt y una capa de PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt.

	O1: SO ₃ ⁻ /C=O		O2: Oxígeno hidratado/C-O	
	Posición (eV)	Molar %	Posición (eV)	Molar %
PPy-DBS 0.6V	531.4	72.7	532.8	27.3
PPy-DBS 0.75V	531.6	83.7	533.1	16.3
PPy-PSS	532.0	90.0	533.8	10.0

Se realizó también la deconvolución del espectro N 1s de las tres capas, mostrando unos resultados muy similares a los encontrados en la literatura [1]. El espectro se divide en 3 componentes que se pueden observar en la Tabla 3.9: N1 corresponde al enlace atribuido al

nitrógeno neutral de la amina presente el monómero pirrol, en N2 se encuentran las energías atribuidas al nitrógeno de la amina positivamente cargado, también llamado polarón, y en la zona de N3 se adscribe el nitrógeno de la amina con doble carga positiva, llamado bipolarón. Estas dos últimas estructuras son las responsables de la conductividad electrónica del polímero como ya se explicó en el apartado , con lo cual una mayor cantidad de estos grupos hace pensar en una mayor conductividad de las capas de DBS, lo cual se demostrará más tarde en el estudio de impedancia comparativo de las capas.

Tabla 3.9 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal N 1s para una capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, una capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt y una capa de PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt.

	N1: -NH-		N2: N ⁺		N3: N ²⁺	
	Posición (eV)	Molar %	Posición (eV)	Molar %	Posición (eV)	Molar %
PPy-DBS 0.6V	400.1	60.8	401.2	28.6	402.5	10.6
PPy-DBS 0.75V	400.1	64.4	401.3	24.2	402.5	11.4
PPy-PSS	399.7	74.8	400.9	17.8	402.2	7.4

El último de los elementos de los cuales se realizó un estudio detallado del espectro fue el S 2p. En este caso cabe destacar la similitud de los espectros de las 3 capas y la existencia de 2 componentes, el ya esperado grupo SO₃⁻ correspondiente al grupo sulfonato de los surfactantes y la forma oxidada del mismo grupo [1]. El porcentaje de cada uno es muy similar para las tres capas, un 85% para el primero y un 15% para el segundo.

Se quiso estudiar el efecto que la sobrerreducción anteriormente mencionada tenía sobre la superficie de la capa a través del mismo estudio explicado hasta ahora en este tipo de capas. El espectro C 1s no sufre cambios destacables con respecto a las muestras ‘as prepared’ y en el caso del espectro O 1s la mayor observación es el aumento de los grupos de oxígeno hidratado, que implica una introducción de agua en la capa durante el proceso de reducción como ya se apuntó en el apartado 3.4.5. Los mayores cambios se observan en los espectros N 1s y S 2p, en el primer caso la reducción disminuye ostensiblemente el porcentaje de polarones y bipolarones en favor del aumento del enlace amina neutro (-NH-) y de la aparición del grupo imina (=N-) en un porcentaje cercano al 10% en todos los casos. Con todos estos datos se confirma la degradación de la capa de polipirrol y la consecuente desaparición de las propiedades conductoras del polímero [7]. La sobrerreducción también conlleva la absoluta desaparición del grupo sulfonato oxidado.

3.4.7 Análisis de infrarrojo (ATR)

El espectro de reflectancia atenuada total (ATR) de las capas (Figura 3.16) muestra resultados muy similares entre las 3 y muy similares también a la bibliografía para este tipo de compuestos, en los cuales la mayoría de picos característicos se encuentran en el intervalo 650-1600 cm^{-1} , concretamente en esta figura se pueden observar la banda a 800 cm^{-1} , que corresponde a la vibración fuera del plano del enlace C-H. Las bandas en 1030 y 1150 cm^{-1} indica la existencia de la vibración de estiramiento de los enlaces sulfonato. Otra banda de absorción en 1280 cm^{-1} corresponde a la vibración de deformación de los enlaces C-H y N-H. La banda de absorción de la vibración de estiramiento del enlace C-N característico del pirrol se encuentra en 1450 cm^{-1} y la banda en 1520 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento de C-C y C=C.

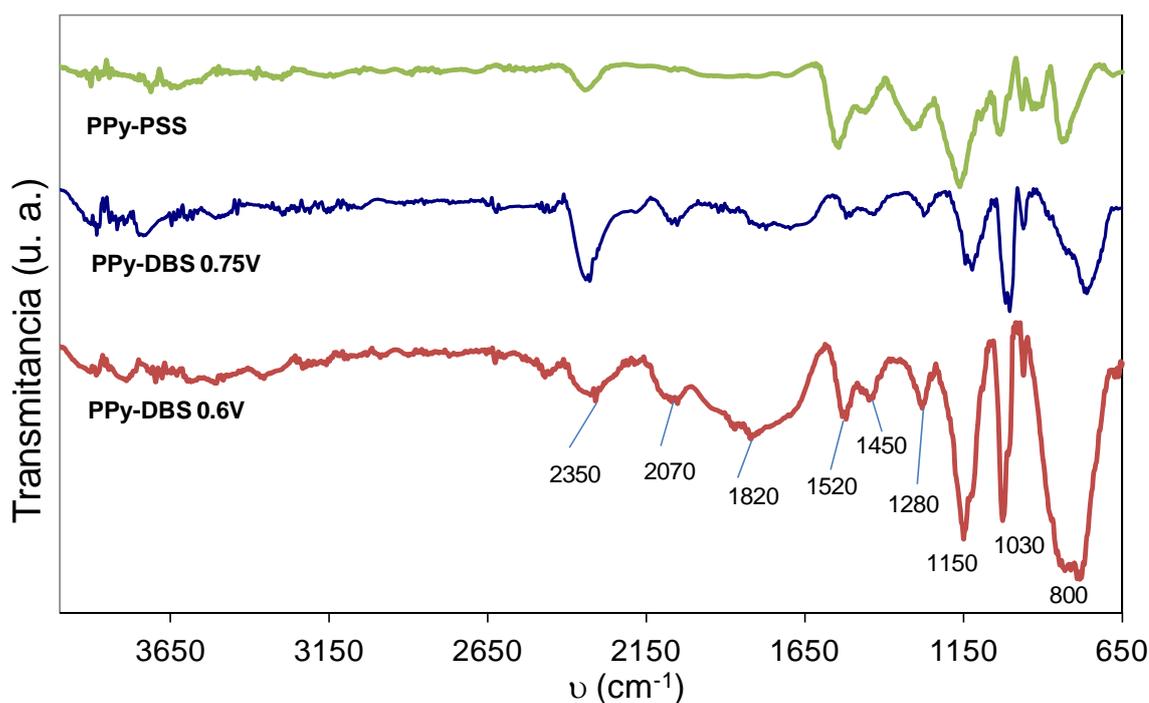


Figura 3.16 Espectros de ATR de la capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, una capa de PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt y una capa de PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt.

En la banda a 1820 cm^{-1} se encuentra la señal que confirma existencia del grupo carbonilo [18]. Se pudo también confirmar que estas capas absorben contaminación atmosférica por la presencia de una banda a 2070 cm^{-1} que indica la absorción de CO y otra a 2350 cm^{-1} que indica la absorción de CO₂ [19,20]. Todo ello corrobora datos que ya se apuntaron en el análisis XPS.

3.4.8 Análisis Microestructural

3.4.8.1 Microscopio de fuerza atómica (AFM)

La morfología de la superficie resulta un parámetro importante en las propiedades de las capas poliméricas debido a su influencia en la cinética de los procesos de modulación y de respuesta electroquímica. Además, constituye una influencia importante en el comportamiento celular [21,22]. La caracterización morfológica de las capas en estudio se realizó con un microscopio de fuerza atómica (AFM), y a partir del análisis de las imágenes (Figura 3.17) se halló el dato de rugosidad media de las superficies (RMS) con un error aproximado del 10% y el tamaño de grano, este último a partir del análisis de 50 perfiles de cada muestra. Como se puede apreciar todas las muestras tienen la estructura globular común a este tipo de polímeros [22], también conocida como estructura tipo ‘coliflor’.

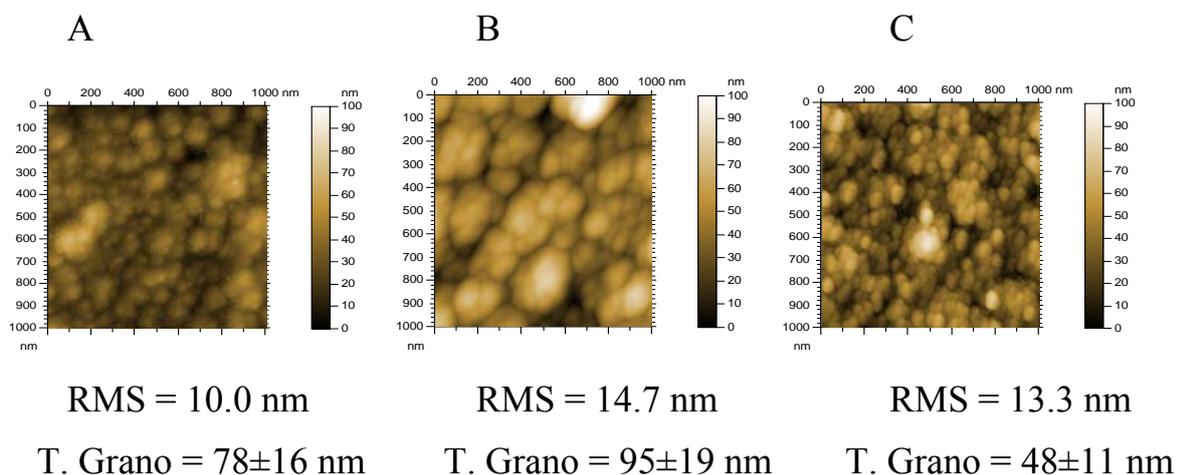


Figura 3.17 Figuras de AFM de las capas: A) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, B) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt, C) PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt. Se incluyen las medidas de rugosidad y tamaño de grano.

La rugosidad es bastante similar entre todas las muestras y está en el orden de los 10-15 nm, sin embargo, como se puede apreciar en la figura, el tamaño de grano difiere bastante según el tipo de muestra. Son más similares en este aspecto las capas sintetizadas con DBS entre sí, mientras que la de PSS tiene un tamaño de grano visiblemente menor.

Se realizaron los mismos análisis para toda la serie de muestras reducidas de cada una de las capas, que confirmaron la misma tendencia en el comportamiento según el tipo de dopante utilizado.

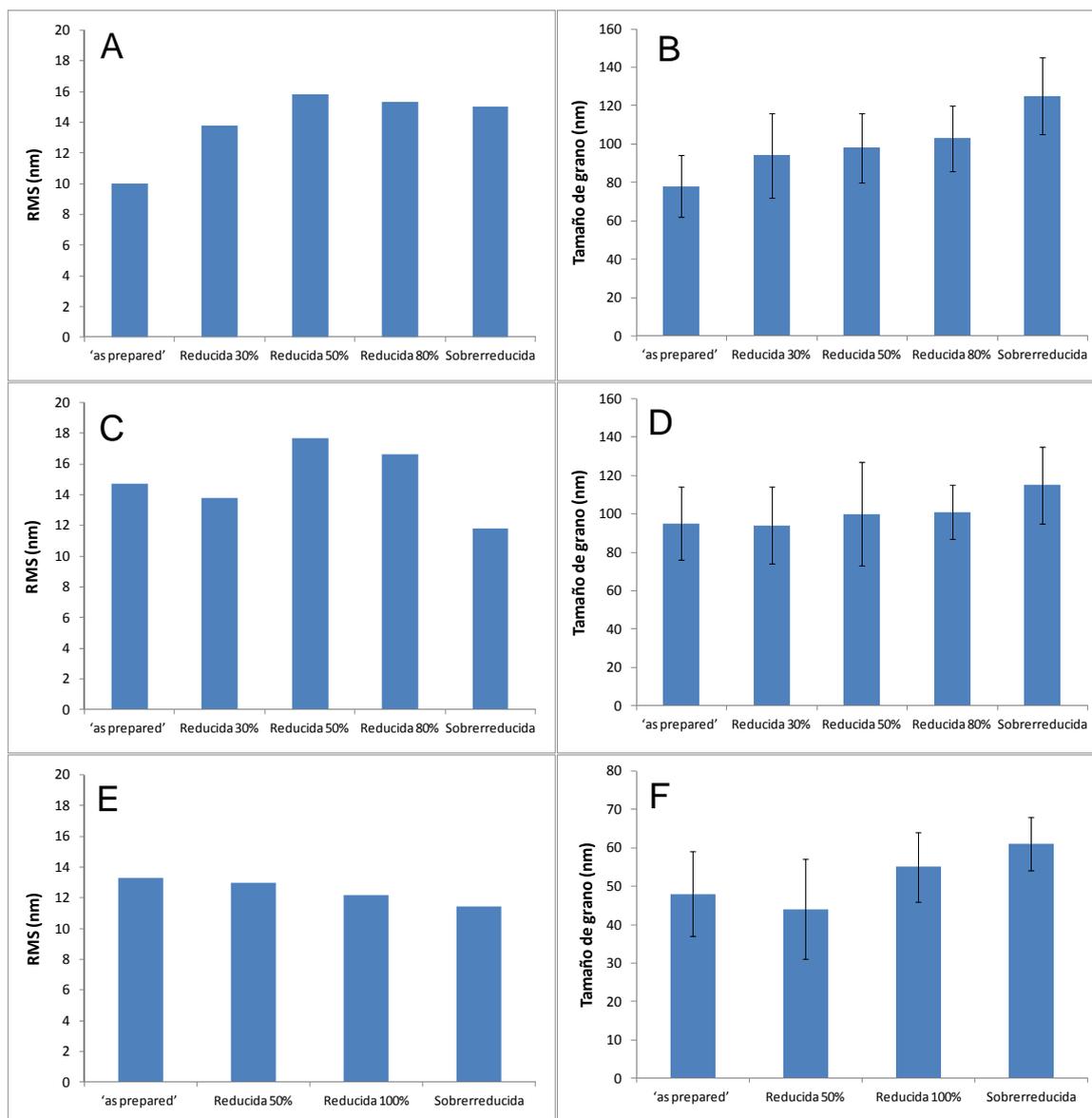


Figura 3.18 Gráficas de los resultados de rugosidad y tamaño de grano de todas las capas sintetizadas en función de su nivel de reducción: A y B) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, C y D) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt, E y F) PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt

El hecho de que las capas se hinchen al ser reducidas hace que estas ganen grosor como se pudo apreciar en los apartados 3.4.2 y 3.4.4, además en la Figura 3.18 se puede apreciar como esto provoca que los granos que conforman la topografía de la capa también se hinchen y sean mayores a medida que el grado de reducción aumenta. Asimismo en dos de las capas estudiadas (0.75V DBS y PSS) este fenómeno hace que las capas sobrerreducidas sean menos rugosas que todas las demás. Todas las muestras estudiadas mostraban la morfología globular que se mencionó anteriormente.

3.4.8.2 Ángulo de contacto

El hecho de que la superficie deba estar en contacto constante con fluidos en su aplicación como sustrato de crecimiento neuronal hace importante la evaluación de su hidrofiliidad, que se realizó a partir de estudios de ángulo de contacto con los dos fluidos con los que más contacto tendrá: agua y medio de cultivo celular.

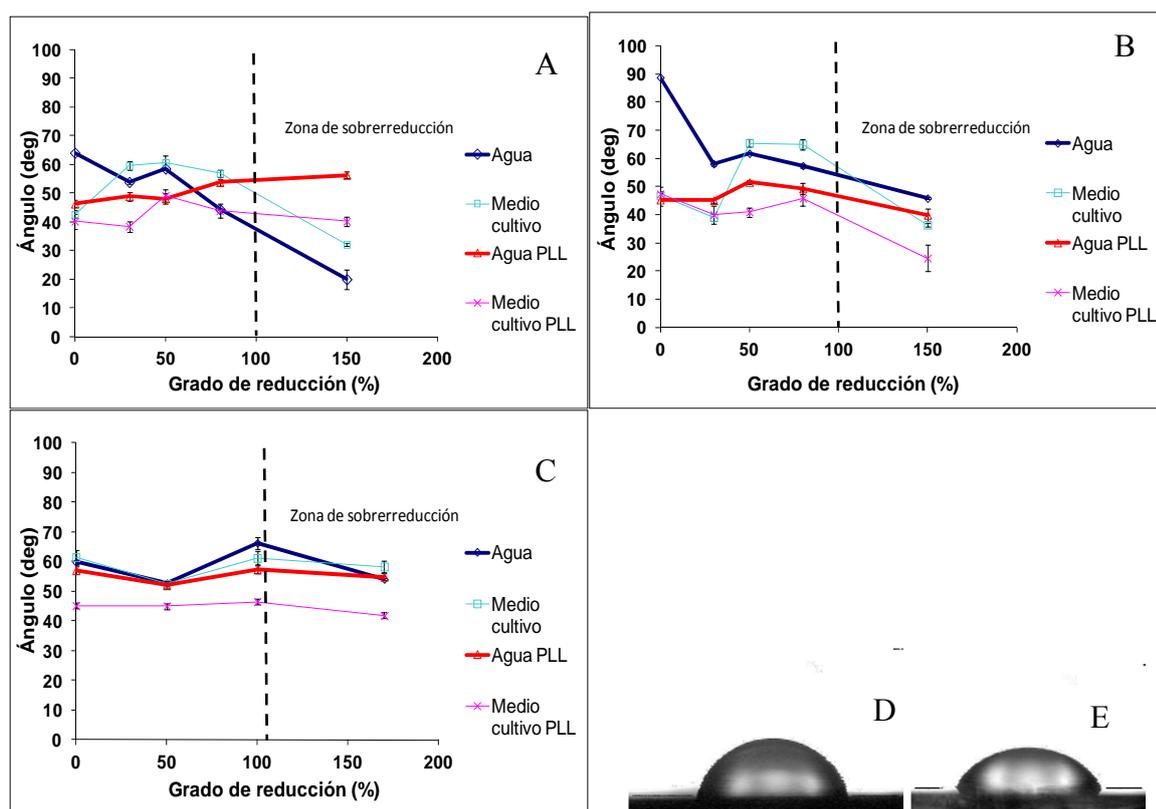


Figura 3.19 Curvas de evolución del ángulo de contacto de las capas en función de su nivel de reducción, con y sin PLL adherida y con agua y medio de cultivo como fluido experimental: A) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, B) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt, C) PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt. También se muestra un detalle de la medida de ángulo de contacto con D) una muestra más hidrofóbica y E) una más hidrofílica.

En la Figura 3.19 se pueden apreciar los resultados de ángulo de contacto de todas las muestras estudiadas en función de su grado de reducción, se considera que cuando la muestra está reducida al 100% se pasa a la zona de sobrerreducción. Se puede decir que en general la afinidad por el agua y el medio de cultivo crecen con el grado de reducción, siendo mayor en casi todos los casos la afinidad por el segundo. Este punto resulta positivo, puesto que es este fluido el más parecido con el entorno que puede encontrar el polímero en un organismo. La reducción produce el ya mencionado aumento de volumen

de las capas, y una de las razones es la incorporación de agua las mismas, lo cual hace crecer la afinidad de estas con los fluidos [23].

En las curvas también se muestran los resultados de estos análisis en capas sobre las que se ha depositado poli-L-lisina (PLL), que es el polipéptido usado como interfaz material-célula en los cultivos celulares, con el fin de conocer los posibles cambios que este produce en la hidrofobicidad. La PLL está cargada positivamente, lo cual se traduce en una buena afinidad con el agua, de hecho estas capas son en general más hidrofílicas. También se puede observar como la hidrofiliidad de estas capas no es tan sensible a los cambios en el nivel de reducción como las que no tenían el polipéptido. Todo ello confirma una buena adhesión de PLL sobre las capas.

3.4.9 Propiedades electroquímicas: voltametrías cíclicas

Una de las principales características del polipirrol es su conductividad eléctrica, con lo cual resulta importante conocer su comportamiento tanto eléctrico como electroquímico. Este último se evaluó en dos medios diferentes: tampón de fosfato sódico a pH 7.4 y medio de cultivo celular.

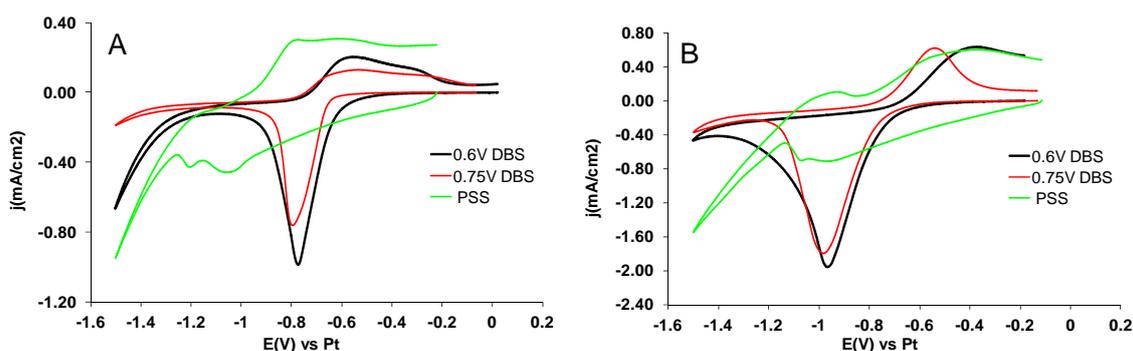


Figura 3.20 Voltametrías de reducción de las capas 'as-prepared' de OCP a $-1.5V$ vs Pt a $20mV/s$: PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta $0.6V$ vs Pt, PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta $0.75V$ vs Pt y PPy-PSS depositada a $0.6V$ vs Pt en A) Tampón fosfato sódico a pH 7 y B) Medio de cultivo celular.

En la Figura 3.20 se muestran las voltametrías de reducción y oxidación de las capas. La de la muestra sintetizada con PSS difiere bastante de las de DBS, que son muy similares entre sí. Resulta complicada la comparativa de las voltametrías aquí presentadas con las ya existentes en la literatura, ya que es muy difícil reproducir exactamente las mismas condiciones experimentales debido a la gran cantidad de variables existentes en el estudio.

No obstante hay comportamientos generales de estos materiales que se reproducen y ayudan a explicar las curvas.

El primer detalle que salta a la vista es la diferencia entre las curvas de las capas de PPy-DBS, y las capas de PPy-PSS; las primeras tienen un solo pico de reducción y la segunda cuenta con dos. Esto confirma que el contraíón utilizado para la síntesis es crucial para las propiedades electroquímicas del polímero [24]. La voltametría de las capas de PPy-DBS presenta la forma típica de capas de PPy-bencenosulfonato, con un solo pico, que indica una gran movilidad del catión y muy baja movilidad del DBS. El pico es más estrecho que en el caso de la capa PPy-PSS, lo cual se debe al hecho de que esta última es más fina (la mitad en el caso de la de 0.6V y un tercio en el caso de la de 0.75V). Ello se debe a que las capas más finas podían presentar algún movimiento aniónico para satisfacer la electroneutralidad [25,26]. La capa de PPy-PSS también presenta la curva típica de este material, en la cual el primer pico, de potencial menos negativo, se debe a la incorporación de Na^+ (electrolito fosfato) u otras especies con carga positiva (medio de cultivo) con el fin de compensar la carga negativa creada durante la reducción. El segundo, más pequeño, es debido a la reducción de otras especies presentes en el electrolito [27]. Las curvas tienen un pico de oxidación originado por la salida de los cationes incorporados durante la reducción [28], y este no está en la misma zona del pico de reducción por la irreversibilidad interna de la capa debida la reorganización de la estructura interna del polímero [29]. La irreversibilidad parcial a esta velocidad de barrido indica la conveniencia del uso de estos materiales para pulsos largos de electroestimulación (ver apartado 1.2). Esto es así gracias también a la buena capacidad de carga del PPy-DBS y el PPy-PSS, en torno a $5\text{mC}/\text{cm}^2$ el primero y $7\text{mC}/\text{cm}^2$ el segundo, a $20\text{mV}/\text{s}$ durante 1.5V . Aunque la importancia de estos valores varía en función del protocolo de electroestimulación usado, altas capacidades de carga son convenientes para pulsos largos y corriente directa (DC) y siempre en general ya que previenen la formación de radicales [46]. El valor de la capacidad de carga varía ostensiblemente en función del método de medida, tanto es así que la misma medida a un potencial estático de -0.8V vs Pt durante 600s hacía aumentar el valor de la capacidad de carga del PPy-DBS a $50\text{mC}/\text{cm}^2$ y el del PPy-PSS a $70\text{mC}/\text{cm}^2$. Ello vuelve a confirmar la conveniencia de estos materiales para pulsos largos y también confirma el mayor dato de capacidad de carga que se obtiene en una medida estática que en una dinámica, lo que se explica también en la bibliografía para el óxido de iridio [46,47].

Cuando el medio de cultivo es el electrolito los picos se hacen más anchos y se desplazan a potenciales más negativos, lo cual es debido a la mayor resistividad de este en comparación con el tampón fosfato o a la pasivación parcial de la superficie en su presencia.

Se hizo un estudio del cómo afectaba el grado de reducción y la adhesión de PLL sobre la capas en la posición de los picos de reducción principales (Figura 3.21) obtenidos en las curvas de reducción. Como picos de reducción principales se entienden aquellos atribuidos a la incorporación de cationes a la capa durante la reducción.

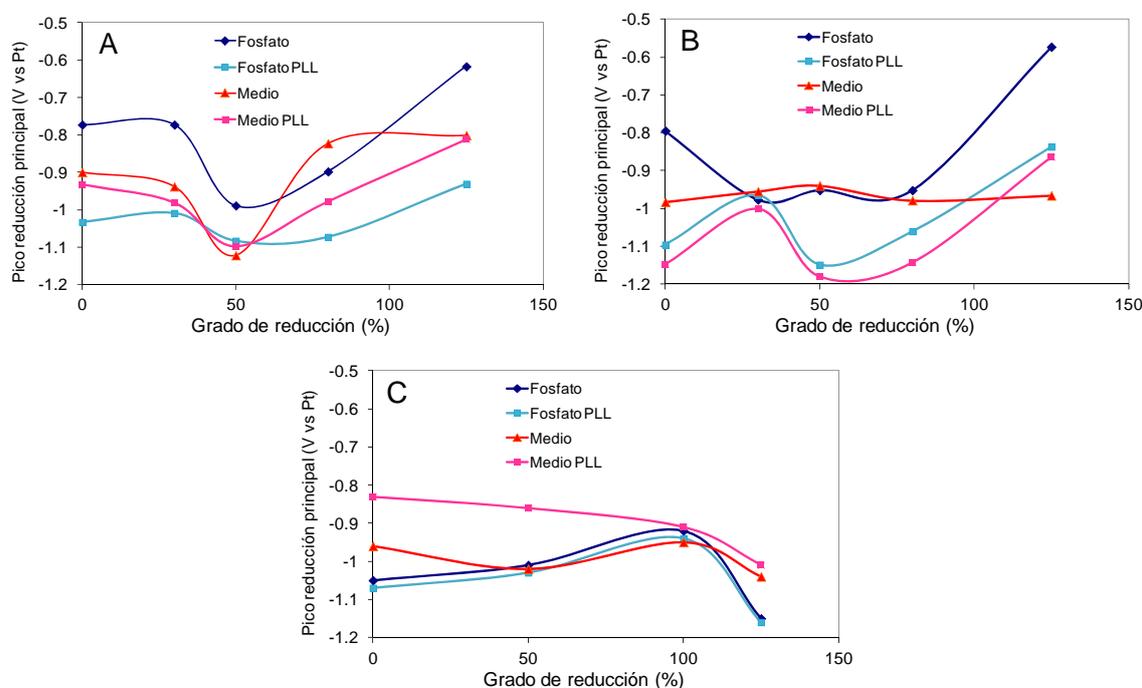


Figura 3.21 Curvas de evolución del pico de reducción principal de la voltametría de las capas en función del nivel de reducción previo a la voltametría de estas, utilizando tampón fosfato o medio de cultivo como electrolito sobre capas con y sin PLL adherida: A) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.6V vs Pt, B) PPy-DBS depositada a potencial dinámico hasta 0.75V vs Pt, C) PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt.

El comportamiento es diferente en las capas de PPy-DBS y las de PPy-PSS, en las primeras hay un orden decreciente de pico de reducción según el electrolito y la presencia de PLL con el orden: Fosfato > Medio > Muestras con PLL, por lo que la presencia de PLL parece hacer desplazar el pico a potenciales más negativos, lo que confirma la buena adhesión de PLL a las capas, pero en ningún caso produce una pasivación de la superficie. La primera reducción del 30% no produce cambios en la posición del pico, hay una bajada a potenciales más negativos con la reducción del 50%, y se vuelve a potenciales menos negativos cuando la reducción aumenta. En el caso del PPy-PSS todas las curvas son muy parecidas, el pico se va yendo a potenciales más positivos con el grado de reducción, y la muestra sobrerreducida tiene picos de reducción más negativos, sin embargo la muestra con PLL adherida analizada con medio de cultivo como electrolito ve descender su pico

de reducción con el aumento del grado de reducción, además es la que tiene los picos de reducción más positivos.

3.4.10 Propiedades eléctricas: espectroscopía de impedancia

Debido a que se pretenden utilizar estos materiales en aplicaciones biológicas donde estarán en contacto con medios biológicos la conductividad macroscópica de las capas fue evaluada mediante medidas de espectroscopía de impedancia compleja electroquímica (EIS) usando NaCl 0.1M como electrolito y con la misma configuración usada en la síntesis (ver sección 2.1.1), es decir teniendo en cuenta el aporte de la interacción de la interfase con el electrolito, en su modo real de aplicación.

La Figura 3.22 muestra la medida de EIS para el electrolito. Para ello la medida fue realizada utilizando una placa de platino igual a la del contraelectrodo en lugar del electrodo de trabajo para utilizar la respuesta obtenida como blanco en las medidas con las capas de PPy-DBS y PPy-PSS.

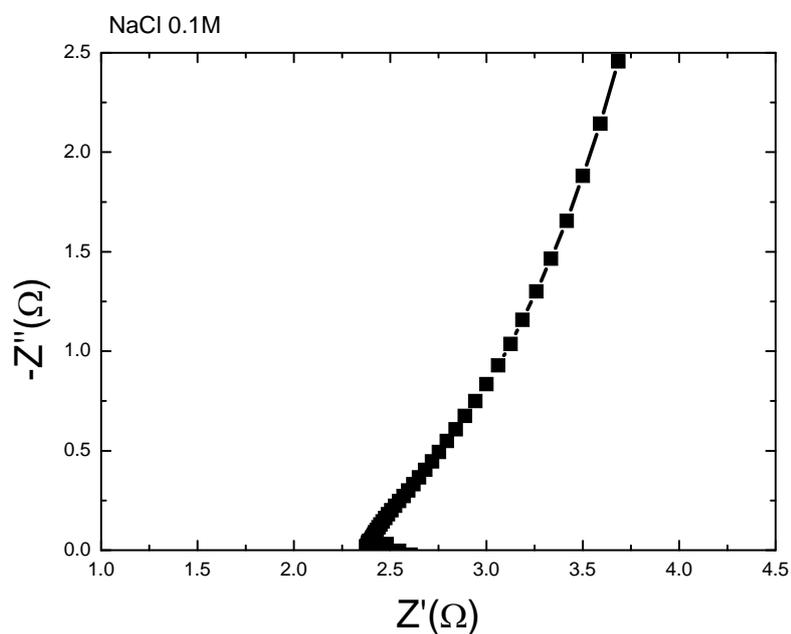


Figura 3.22 Diagrama de Nyquist de una solución de NaCl 0.1M.

La intersección con el eje real proporciona el valor de la resistencia del electrolito que en este caso está alrededor de 2.5 Ω. Además de proporcionar los valores de resistencia o capacidad del sistema electroquímico mediante esta técnica, es posible diferenciar los

diferentes fenómenos eléctricos o electrónicos que se producen en el sistema, ya que cada uno de ellos posee una frecuencia de relajación diferente. En este caso, es posible diferenciar un solo tipo de respuesta representada por una línea de pendiente aproximada de 45° . Esta respuesta es debida a la difusión iónica a través del electrolito y puede ser representada en términos de circuitos equivalentes como una resistencia en serie con una impedancia tipo Warburg.

En la Figura 3.23 es posible comparar la respuesta del electrolito con una muestra de PPy-DBS sintetizada hasta 0.75V vs Pt “as prepared” y dos muestras con diferentes grados de reducción: al 50% y sobrerreducida (previa a la medida).

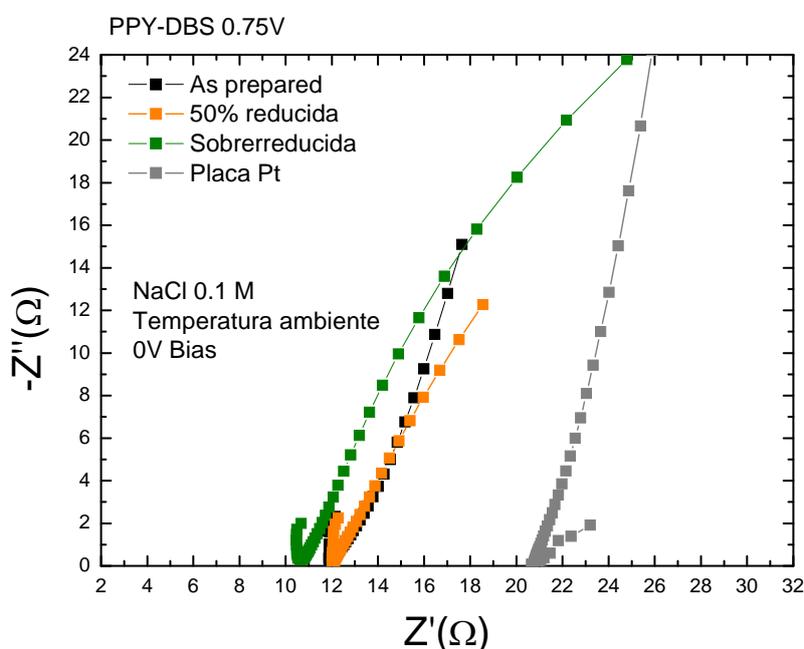


Figura 3.23 Diagrama de Nyquist de capas de PPy-DBS electrodepositadas a potencial dinámico hasta E_{max} de 0.75V vs Pt “as prepared” y con diferentes grados de reducción, además de un sustrato de platino utilizado para hallar la resistencia del electrolito utilizado en la medida ($\text{NaCl } 0.1\text{M}$).

La resistencia del electrolito es menor con las capas de polímero que con el sustrato de Pt, con lo cual el PPy-DBS resulta un excelente conductor, en cambio, las capas de PPy-PSS presentan una resistencia un poco más elevada que la del Pt (Figura 3.24). Se puede concluir pues que las capas de PPy-DBS son mejores conductoras que las de PPy-PSS, lo cual también se encuentra en la literatura [30]. Todas las curvas de impedancia de las capas estudiadas presentan la misma forma, con lo cual los experimentos se ajustan a un mismo modelo de impedancia.

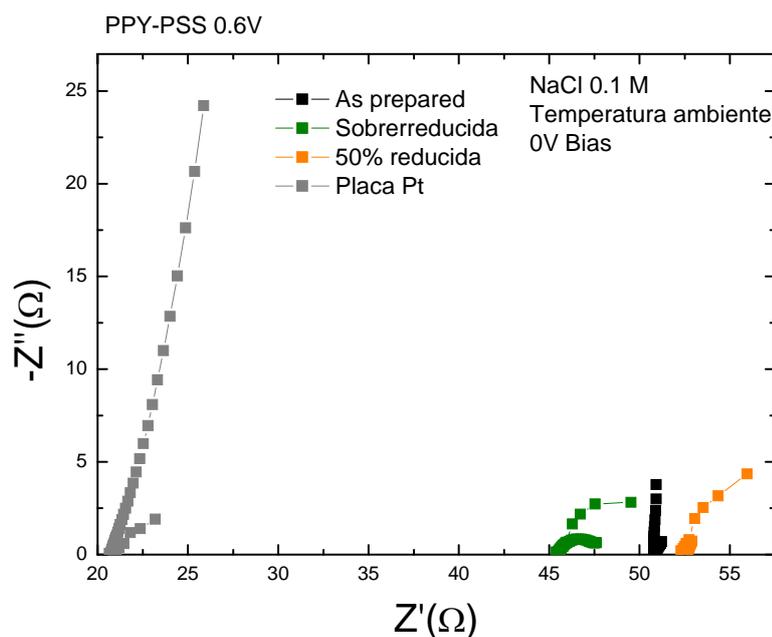


Figura 3.24 Diagrama de Nyquist de capas de PPy-PSS electrodepositadas a 0.6V vs Pt “as prepared” y con diferentes grados de reducción, además de un substrato de platino utilizado para hallar la resistencia del electrolito utilizado en la medida (NaCl 0.1M).

3.5 Capas finas de Poli (3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) sintetizado con Poliestireno sulfonato (PSS): PEDOT-PSS

El PEDOT es, junto con el polipirrol (ambos del grupo de los polímeros con enlaces π -conjugados), uno de los polímeros conductores más prometedores para aplicaciones biomédicas, gracias a sus propiedades físicas, químicas y de biocompatibilidad [31,32]. El mecanismo de formación del PEDOT es muy similar al del PPy, y la morfología resultante también [13], con lo cual se puede extrapolar en este apartado lo explicado para el PPy en cuanto a mecanismo de formación y los factores que influyen en las características finales de la capa. Sin embargo el PEDOT ofrece algunas ventajas con respecto al PPy como son su mayor conductividad, su menor *bandgap* y su alta estabilidad química, de hecho es más resistente a cambios de temperatura y pH. Por ejemplo, el PPy tiene una duración más corta debido a que durante su actividad redox se pueden producir en él cambios estructurales irreversibles. Otras ventajas del PEDOT son su baja impedancia y su gran capacidad de almacenaje de carga en áreas pequeñas del material, lo cual resulta muy interesante en aplicaciones para electrodos en el sistema nervioso [33-35]. Además sus propiedades le permiten que sea usado para otras aplicaciones como electrodos en

dispositivos semiconductores orgánicos y conexiones eléctricas, baterías [36], dispositivos electrocrómicos, supercondensadores, biosensores [37], celdas solares [38] y actuadores electroquímicos [34].

Todos estos factores hicieron pensar en la conveniencia en el estudio y en el ensayo del PEDOT en cultivos celulares, del mismo modo que se hizo para las capas de PPy. El surfactante utilizado para su síntesis fue el PSS, con el fin de poder hacer una comparación directa del PEDOT-PSS con el PPy-PSS (punto en el que nos centraremos). Han de tenerse en cuenta, además todas las ventajas que proporciona el uso de un surfactante de alto peso molecular, que son las mismas ya mencionadas para el PPy en el apartado 3.1. Como se puede ver en la Figura 3.25 el anillo del monómero EDOT es muy similar al de pirrol, aunque el primero con azufre en lugar de nitrógeno, además el EDOT cuenta con átomos de oxígeno donadores de electrones ocupando sus posiciones β en el anillo de tiofeno [36], que hacen al polímero más estable ante la deslocalización de cargas positivas durante el proceso de síntesis, siendo este uno de los factores importantes que confieren más estabilidad a este material con respecto a otros polímeros conductores [39]. (Nótese que ello hace que el peso molecular del monómero sea mayor con respecto al de pirrol).

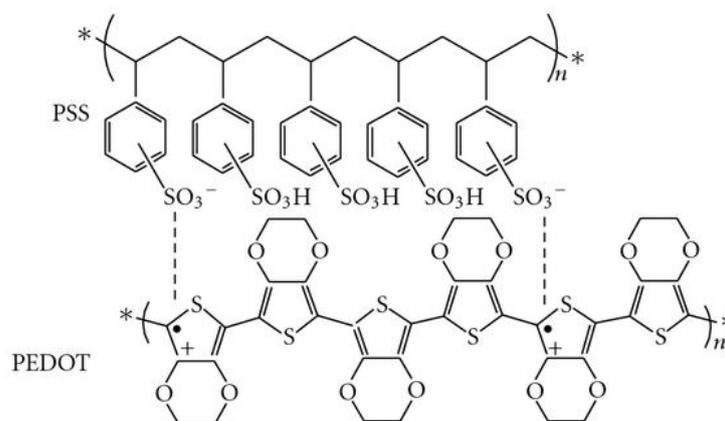


Figura 3.25 Configuración esquematizada de la estructura química del PEDOT-PSS: el punto representa el electrón desaparejado y el signo positivo es la carga positiva del PEDOT (ver apartado 3.1 del PPy).

Las capas obtenidas presentan un patrón de interferencia creado por las líneas de campo eléctrico igual al de las capas de PPy-PSS, de hecho a simple vista la única diferencia entre ellas es que el PEDOT-PSS presenta un tono más azulado que el PPy-PSS.

El sustrato utilizado fue también un portaobjetos de soda-lima recubierto por una capa de Ti de 5nm y otra de 12nm de Pt encima de esta. Se sintetizaron dos tipos de capas: a un potencial constante (potenciostáticamente) de 0.9V vs Pt, a una corriente constante (galvanostáticamente) de 1.25mA, ambas sobre una superficie de 10cm². Resultaba importante no sobrepasar el potencial de 1.1 V durante la síntesis debido arriesgo de sobreoxidación, y a la vez el potencial debía ser mayor que la del PPy puesto que el PEDOT es más difícil de ser oxidado [37]. La carga alcanzada por todas las muestras sintetizadas fue de 900mC para mantener la uniformidad entre todas y poder ser comparadas con las de PPy-PSS. Por ello también el análisis principal se centró en las muestras de PEDOT-PSS sintetizadas a potencial constante, aunque también se analizaron las sintetizadas a corriente constante. En la Figura 3.26 se pueden apreciar las gráficas de síntesis de las muestras a potencial y a corriente constante, en ambas se llega a una corriente y un potencial respectivamente bastante estable. No obstante, tal y como pasaba con el PPy-PSS, no es posible conseguir curvas de síntesis iguales para condiciones de síntesis idénticas, con lo cual tampoco en el caso del PEDOT se consigue una alta reproducibilidad.

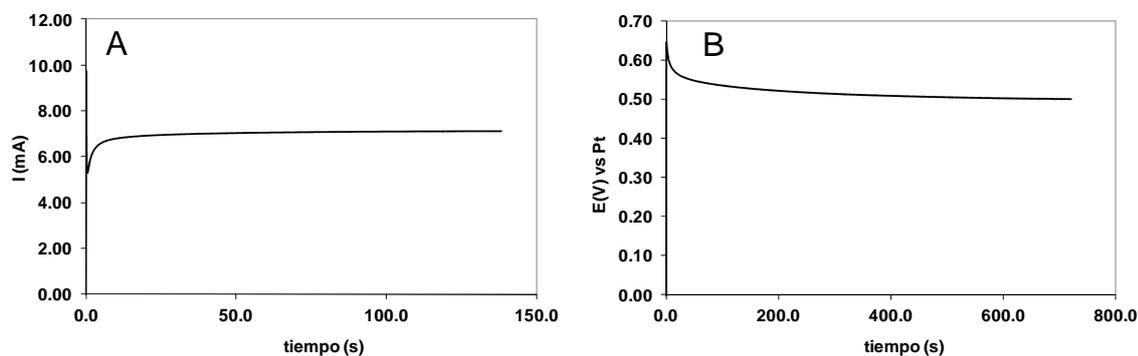


Figura 3.26 Curvas de síntesis para dos capas de PEDOT-PSS: A) a potencial constante 0.9V vs Pt y B) a corriente constante 1.25mA.

Se realizó también la modulación electroquímica de las capas de PEDOT-PSS, exactamente en las mismas condiciones y en el mismo grado de reducción que las de PPy-PSS. Las curvas de reducción también tienen el mismo comportamiento. Para la misma carga, sin embargo, las capas de PEDOT-PSS son más gruesas, tanto las muestras *as prepared* como las reducidas, tal y como se puede observar en la Tabla 3.10, algo que se debe a la mayor eficiencia de la síntesis del PEDOT-PSS como veremos en el próximo apartado. El incremento de volumen en la reducción es mayor también que en el caso del PPy-PSS, pero la adherencia de las capas es muy buena.

Tabla 3.10 Valores del grosor de las muestras de PEDOT-PSS en su parte central medidos con el microscopio electrónico de barrido (SEM) relacionados con su grado de reducción. Los cambios de volumen (ΔV) están referidos al grosor de la muestra *as prepared*.

Tipo de muestra	Grosor central (nm) 0.9V	ΔV
<i>As prepared</i>	350	-
Reducida al 50%	370	6%
Reducida al 100%	480	37%
Sobrerreducida	560	60%

3.5.1 Evaluación del proceso de síntesis y reducción mediante balanza electroquímica de cuarzo (EQCM)

3.5.1.1 Proceso de síntesis

Como se apuntó en capítulo 1, la síntesis del PEDOT-PSS es muy similar a las del PPy-PSS, con lo cual se pueden extrapolar en este apartado las mismas consideraciones ya hechas en el apartado 3.4.5. No obstante el proceso de síntesis del PEDOT-PSS es más eficiente que el del PPy-PSS, es decir, tal y como se aprecia en la Figura 3.27 para una misma cantidad de carga se sintetiza más cantidad de PEDOT-PSS que de PPy-PSS. Esta afirmación se traduce en un dato de moles de e^- /moles de unidad de polímero de 2.63 ± 0.28 , muy cerca del dato teórico de 2.33, y una eficiencia del proceso del 88%. Si consideramos $n = 2.33$ se encuentra un peso molecular de 82.1 ± 8.5 g/mol de unidad polimérica, mayor que el del PPy-PSS en términos relativos (ver tabla 3.3), teniendo en cuenta que en sí el peso molecular teórico del PEDOT es mayor (209.2 g/mol), por lo que parece que se intercala más agua durante la síntesis en el caso del PEDOT. Otra diferencia observable es la forma lineal de la curva de síntesis del PPy, con una primera curva más pequeña perteneciente a la fase de nucleación, mientras que el PEDOT tiene dos etapas lineales más diferenciadas y sin fase inicial de nucleación apreciable: 1) inicio del proceso más eficiente, con más producto sintetizado por unidad de carga, y 2) ralentización del proceso. Que no se vea nucleación puede ser debido a una menor creación inicial de núcleos por una menor concentración de monómero EDOT que de monómero pirrol [40].

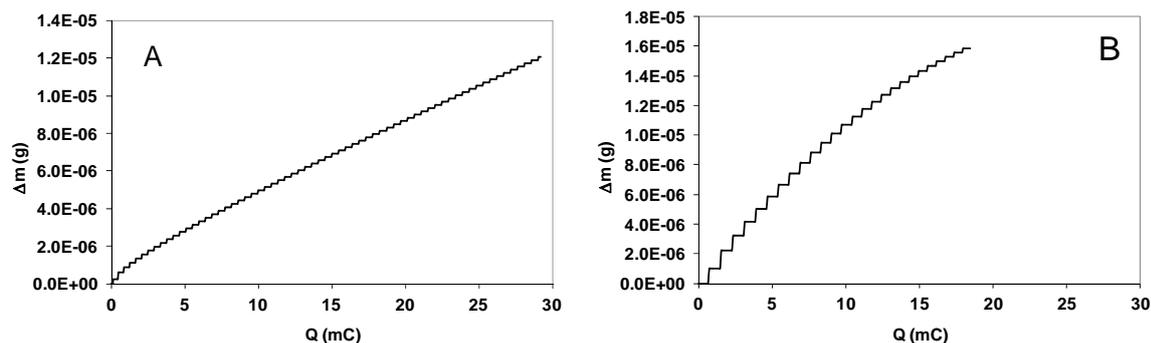


Figura 3.27 Evolución de la masa depositada con respecto a la carga depositada durante el proceso de síntesis PPy-PSS y PEDOT-PSS, resultados del aumento de la masa en la EQCM respecto al crecimiento de carga: A) Muestra de PPy-PSS sintetizada potencioestáticamente a 0.6V vs Pt, B) Muestra de PEDOT-PSS sintetizada potencioestáticamente a 0.9V vs Pt.

3.5.1.2 Proceso de reducción

El PEDOT-PSS fue, al igual que el PPy-PSS investigado mediante la microbalanza de cuarzo para elucidar el proceso de reducción aplicando un potencial constante de -0.8V vs Pt en medio tampón fosfato de sodio a pH 7.4. En la Figura 3.28 se ve como la reducción es un proceso bastante rápido, que se produce en mayor medida en la primera parte del estudio, después continúa más lentamente hasta que al llegar al valor teórico de 0.33 moles de e^- /moles de unidad de PEDOT se estanca, con lo que la capa ya no gana más peso, y no hay más intercalación. El peso molecular medio encontrado para la especie intercalada es de 28.8 ± 8.8 g/mol, por tanto en este caso parece que el agua no juega un papel tan importante como en los polipirroles (ver apartado 3.4.5.2). Los experimentos de reducción de la capa en presencia de medio de cultivo no comportaron cambios significativos en los resultados. La relativa rapidez de la intercalación en el polímero permite contemplar aplicaciones de los materiales en el rango de segundos.

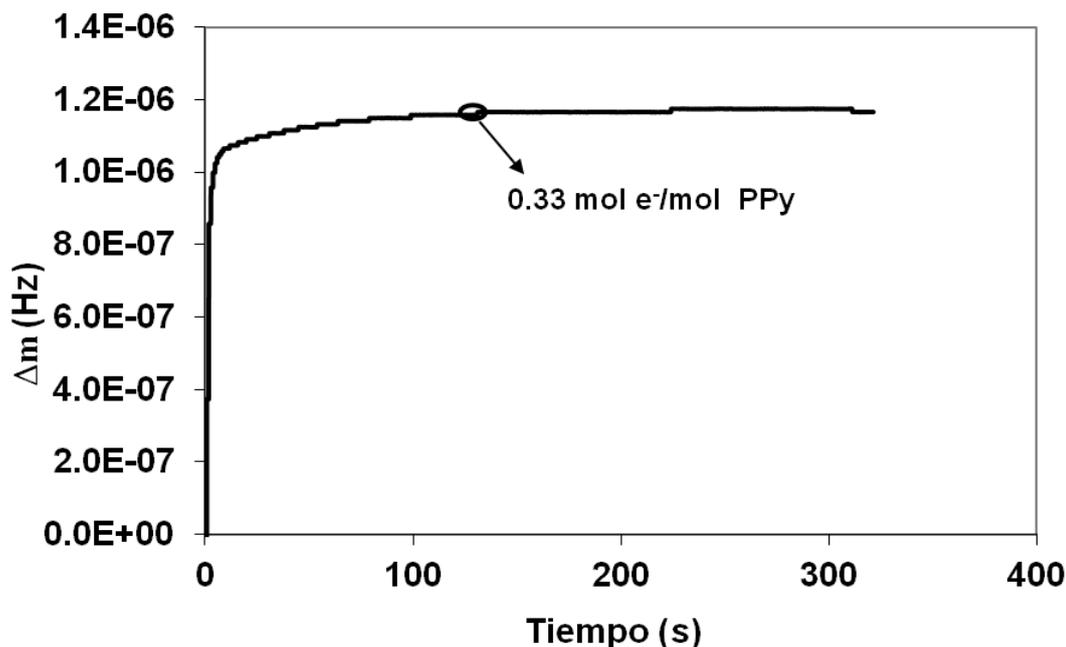


Figura 3.28 Evolución de la frecuencia de resonancia del cuarzo de la EQCM durante un proceso de reducción de PEDOT-PSS a $-0.8V$ vs Pt en un tampón de fosfato sódico de pH 7, señalando el punto de máxima reducción teórica de la capa.

3.5.2 Análisis de superficie (XPS)

Este apartado versará principalmente sobre la caracterización superficial de las capas PEDOT-PSS y las principales diferencias encontradas entre el PPy-PSS y esta a través de estudios de composición superficial realizados con XPS.

En la Figura 3.29 se aprecia el espectro XPS de una capa de PPy-PSS comparado con una capa de PEDOT-PSS sintetizada a potencial constante y otra sintetizada a corriente constante, los picos más importantes para el PEDOT son los esperados: el C, el O y el S, también contiene impurezas de N, Si y Na, aunque estos últimos representan cantidades muy pequeñas que no aparecen en los resultados de las cuantificaciones molares de la Tabla 3.10. Como era de esperar el PEDOT-PSS contiene más S y O debido a la presencia de estos en el monómero EDOT. Hay que destacar que para el análisis XPS en zonas similares de dos muestras de PEDOT-PSS sintetizadas con las mismas condiciones se obtienen resultados de cuantificación atómica diferente (Tabla 3.11), lo que pone de manifiesto que estas capas son también irreproducibles, al igual que ocurriría con el PPy-PSS, implicando un crecimiento granular del polímero muy sensible a pequeños factores

externos no identificados. Sin embargo, el factor en el que más se nota no es el S como indicador del polímero, sino en el contenido de O. Probablemente esto se debe a una variabilidad en el contenido de agua.

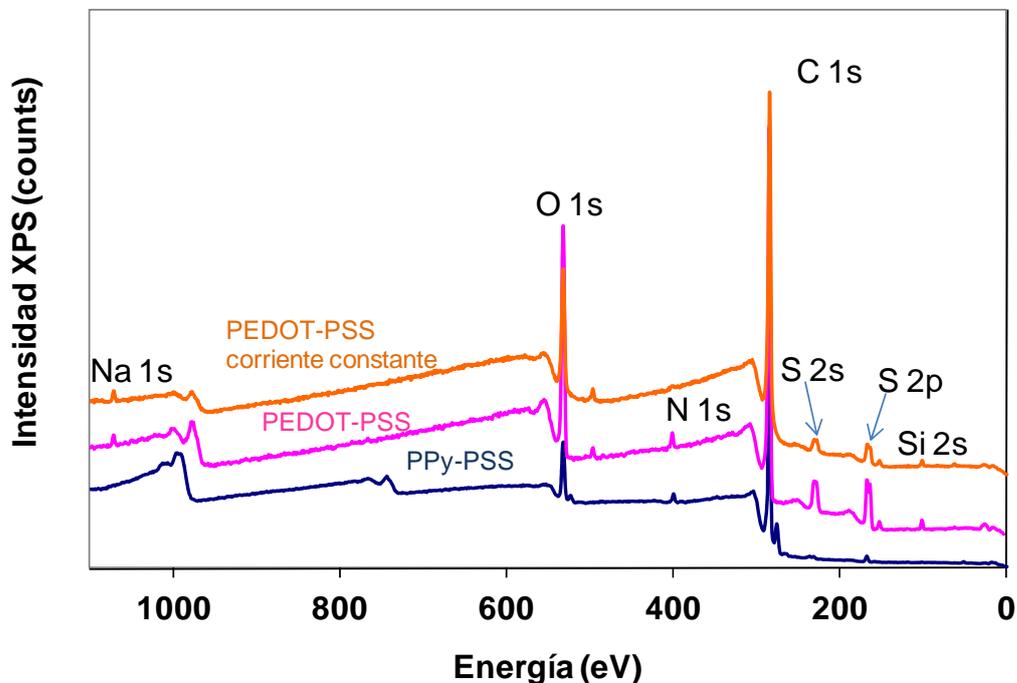


Figura 3.29 Espectro XPS general de capas de PPy-PSS depositadas a 0.6V vs Pt y capas de PEDOT-PSS depositadas a 0.9V vs Pt.

Tabla 3.11 Cuantificación molar de los picos del espectro general de XPS de capas de PPy-PSS depositadas a 0.6V vs Pt y de dos capas de PEDOT-PSS sintetizadas a 0.9V vs Pt en exactamente las mismas condiciones. Resultados en %.

Muestra	C 1s	O 1s	N 1s	S 2p
PPy-PSS	87.08	9.80	2.16	0.95
PEDOT-PSS (1)	75.38	17.34	-	7.27
PEDOT-PSS (2)	68.28	25.37	-	6.35
PEDOT-PSS (corriente constante)	79.08	15.20	-	4.04

3.5.2.1 Deconvolución de los espectros de XPS

La deconvolución de los picos de C 1s, O 1s y S 2p se realizó mediante el uso de Gaussianas-Lorentzianas, cuyos resultados para una muestra de PEDOT-PSS sintetizada a potencial 0.9V constante se observan en la Figura 3.30. Todos los espectros mostrados tienen 2 componentes que se corresponden con lo descrito en la literatura [41-43]. El espectro C 1s tiene un componente a 284.8 eV que corresponde al enlace de carbono alifático del monómero de EDOT y la molécula de PSS, en este pico también se encuentra comprendido el enlace del carbono con el grupo sulfonato del PSS, el porcentaje de este componente en el total del carbono es del 63%, reproducible en todas las muestras, tanto las *as prepared* a corriente y potencial constante como las sintetizadas a potencial constante y después reducidas en diferentes grados. El segundo componente del C 1s se encuentra en 286.4 eV, correspondiente al enlace C-O-C presente en el PEDOT y supone el 37% del carbono total.

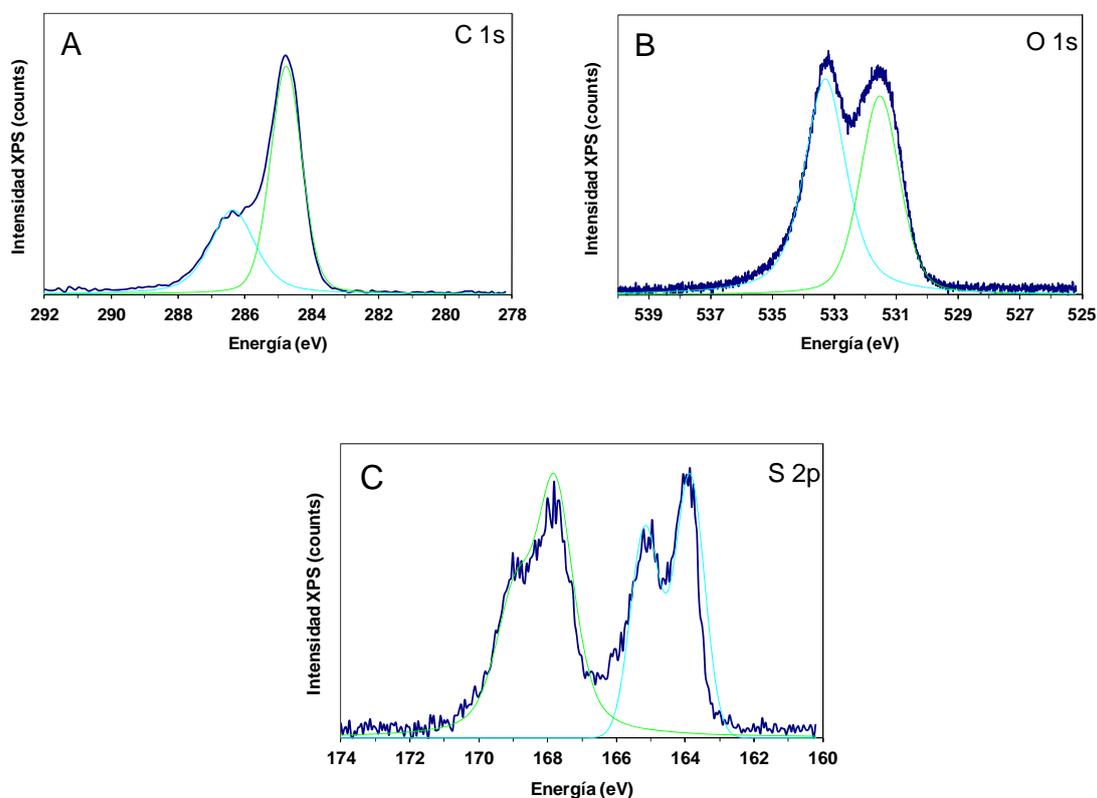


Figura 3.30 Deconvolución de los espectros XPS de la capa de PEDOT-PSS sintetizada a 0.9V vs Pt de los picos: A) C 1s, B) O 1s y C) S 2p.

El espectro O 1s también tiene 2 componentes, uno a 531.5 eV correspondiente al enlace S=O presente en el grupo sulfonato del PSS con un porcentaje del 44%, y otro a 533.33 eV correspondiente al enlace C-O-C del PEDOT y a los grupos hidratados.

Los picos del espectro S 2p son dobletes (Figura 3.30 C), como es de esperar debido al orbital 2p, y cuenta también con 2 componentes, comunes a todas las capas de PEDOT PSS, uno a 164.0 eV perteneciente al S presente en el PEDOT con un porcentaje del 45% y otro a 168.0 eV perteneciente al S del PSS, con un porcentaje del 55%. Se confirma así también para el PEDOT-PSS una alta presencia de surfactante en la superficie, ya que este último porcentaje tendría que estar en el rango del 25-40%, y está en un 55%. Los datos de las deconvoluciones son reproducibles, no así las de las cantidades absolutas del elemento, lo que es debido a una gran variabilidad de las composiciones absolutas en la superficie.

3.5.3 Análisis microestructural

A partir de los análisis de AFM se encontraron los parámetros de morfología de las capas de PEDOT-PSS. En la Figura 3.31 se observa que este material tiene la estructura globular que ya se describió en el apartado de los polipirroles, sin embargo el PEDOT-PSS presenta una morfología más rugosa que los polipirroles estudiados en esta tesis y con un mayor tamaño de grano.

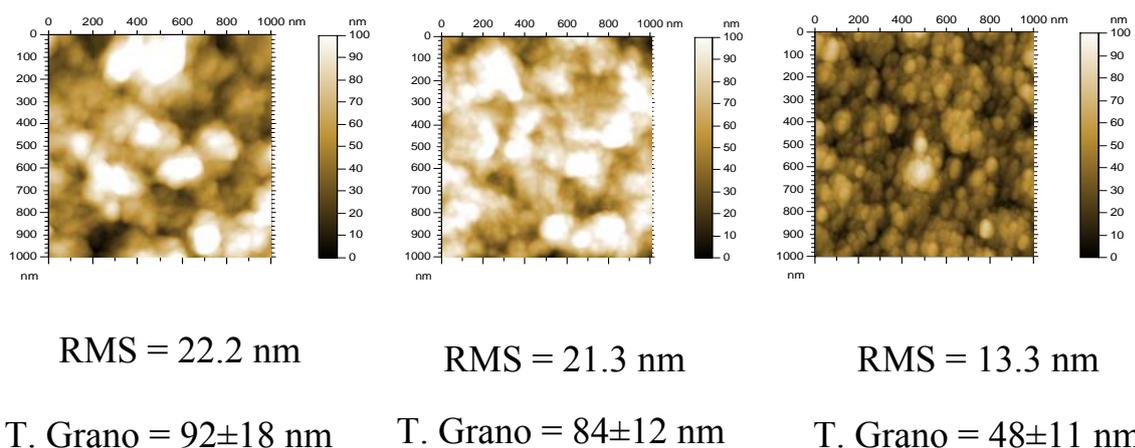


Figura 3.31 Figuras de AFM de las capas: A) PEDOT-PSS depositada potencioestáticamente a 0.9V vs Pt, B) PEDOT-PSS depositada galvanostáticamente a 1.25mA, C) PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt. Se incluyen las medidas de rugosidad y tamaño de grano.

El modo de síntesis de las capas de PEDOT-PSS no provoca un cambio destacable en los parámetros morfológicos del material, sin embargo, y como era de esperar la reducción tiende a disminuir la rugosidad y provoca claramente un aumento del tamaño de grano (Figura 3.32), debido al aumento de volumen de las capas en este proceso, aunque menos que el PPy.

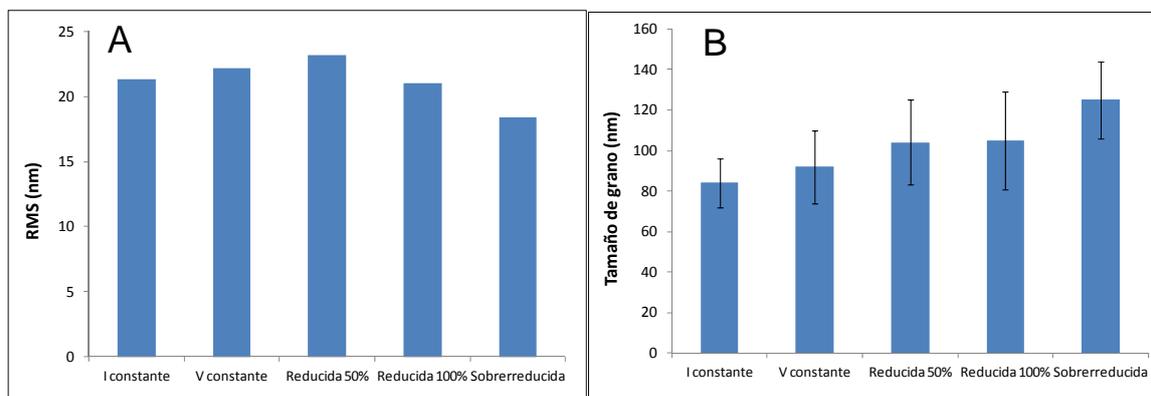


Figura 3.32 Gráficas de los resultados de A) rugosidad y B) tamaño de grano, se muestran las capas as prepared sintetizadas a corriente constante 1.25mA y a potencial constante 0.9V vs Pt y esta última en función de su nivel de reducción.

Se hizo también un estudio de hidrofiliidad de las capas de PEDOT-PSS, de las cuales se muestra una comparativa con las de PPy-PSS en la Figura 3.33, en la cual se aprecia como las primeras son ligeramente más hidrofóbicas que las segundas. Una vez más las capas con más afinidad al fluido son las que han sido cubiertas con PLL y en las cuales se ha utilizado el medio de cultivo para el experimento, lo cual resulta positivo, ya que este es el entorno más real en el que se encontrarán los materiales. También se demuestra un poco más de afinidad al agua que al medio de cultivo, y contrariamente a lo que sucedía con el PPy-PSS el aumento del grado de reducción de las muestras parece disminuir la afinidad de estas con el fluido como comportamiento general, sobretodo en el caso de las cubiertas con PLL. Todo ello confirma una buena adhesión de PLL a las capas y perfila posibles cambios en los cultivos celulares.

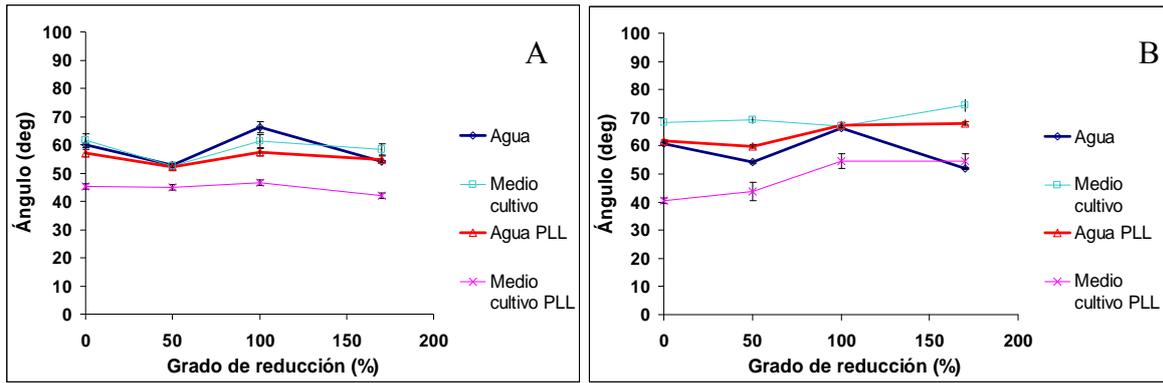


Figura 3.33 Curvas de evolución del ángulo de contacto de las capas en función de su nivel de reducción, con y sin PLL adherida y con agua y medio de cultivo como fluido experimental: A) PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt. Y B) PEDOT-PSS depositada a 0.9V vs Pt.

3.5.4 Propiedades electroquímicas: voltametrías cíclicas

Como se explicó en el apartado capítulo 1 el PEDOT es al igual que el PPy un buen conductor eléctrico, incluso con una conductividad más alta que este último. Se realizaron por tanto los mismos análisis que con el PPy-PSS. Las voltametrías de reducción de ambos materiales fueron comparadas, tanto en electrolito tampón fosfato de sodio como en electrolito medio de cultivo (Figura 3.34), dando resultados muy similares entre ellos, con lo cual se demuestra que los procesos redox de uno y otro son equiparables. El PEDOT-PSS también tiene 2 picos de reducción y el electrolito utilizado no parece cambiar mucho los resultados. El hecho de adherir PLL a la capa antes de hacer la voltametría desplaza los picos de reducción a potenciales menos negativos, una tendencia que ya mostraba el PPy-PSS pero no el PPy-DBS. No obstante, las curvas con o sin PLL son muy similares (datos no mostrados), cosa que demuestra al igual que en el PPy-PSS que la presencia de este polipéptido no pasiva la capa y que se produce una buena adhesión de este.

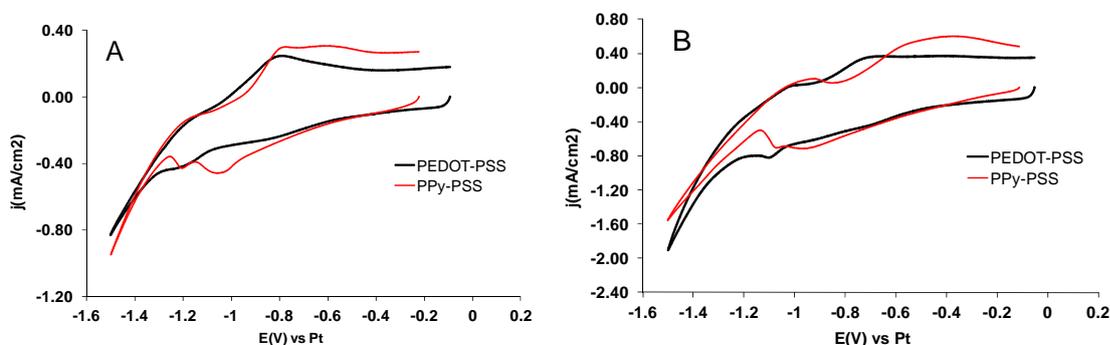


Figura 3.34 Voltametrías de reducción de las capas de OCP a -1.5V vs Pt a 20mV/s: PPy-PSS depositada a potencial constante 0.6V vs Pt, PEDOT-PSS depositada a potencial constante 0.9V vs Pt en A) Tampón fosfato sódico a pH 7.4 y B) Medio de cultivo celular.

Se observa la misma irreversibilidad que en el apartado 3.4.9, por lo que este material se comporta como el PPy y parece conveniente para pulsos largos de electroestimulación, aunque su capacidad de carga es aún mayor, de unos 11 mC/cm^2 medida a 20 mV/s durante 1.5V , como ya se apunta en la literatura. Esto sumado a su baja impedancia le da muy buenas propiedades para su uso en microelectrodos de electroestimulación [46]. Este dato se midió al igual que los polipirroles en el apartado 3.4.9 en condiciones estáticas, dando un valor de 90mC/cm^2 durante 600s a -0.8V vs Pt.

A medida que el grado de reducción de las capas de PEDOT-PSS crece, los picos de reducción encontrados en las voltametrías se desplazan a potenciales menos negativos, del mismo modo que sucedía con el PPy-PSS (Figura 3.35). Solo la muestra sobrerreducida se comporta de forma diferente, hecho debido al cambio estructural que debe haberse producido por reducción del anillo o la conexión entre ellos.

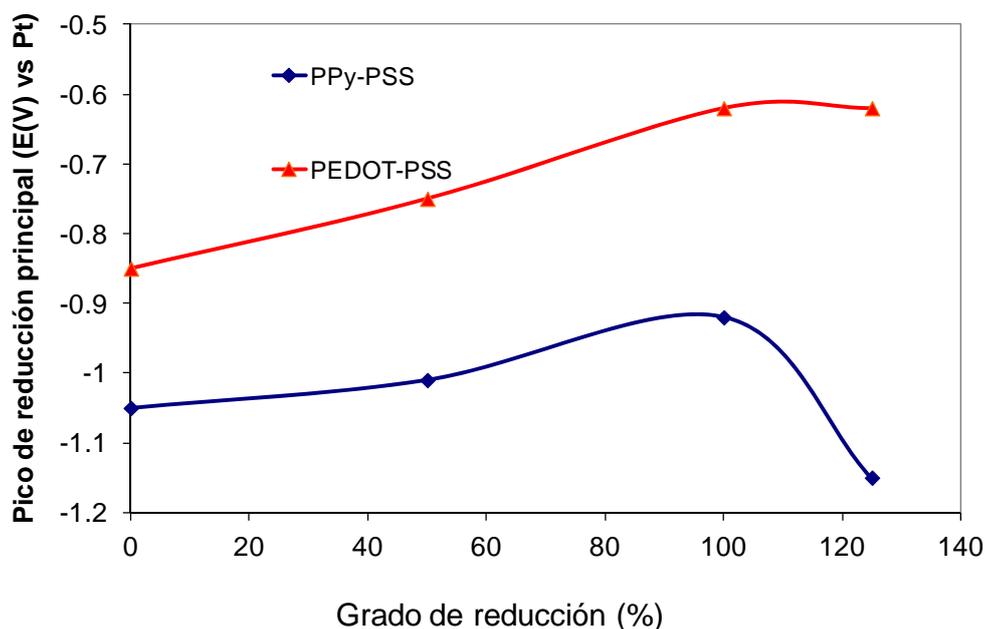


Figura 3.35 Curvas de evolución del pico de reducción principal de la voltametría de las capas en función del nivel de reducción previo a la voltametría de estas, utilizando tampón fosfato sódico a pH 7 como electrolito sobre capas de PPy-PSS depositada a 0.6V vs Pt y PEDOT-PSS depositada a 0.9V vs Pt.

3.5.5 Propiedades eléctricas: espectroscopía de impedancia

El diagrama de Nyquist resultante de los análisis de EIS en las capas de PEDOT-PSS (Figura 3.36) no presenta muchas diferencias en la forma de las curvas con el de las capas de PPy-PSS (ver Figura 3.24, apartado 3.4.8), con lo cual se ajustan al mismo modelo, pero las primeras son mejores conductoras que las últimas, ya que la resistencia del electrolito es menor. No obstante las capas que mejor resultado dieron en este aspecto son las de PPy-DBS depositadas potenciodinámicamente hasta un E_{max} de 0.75 V vs Pt.

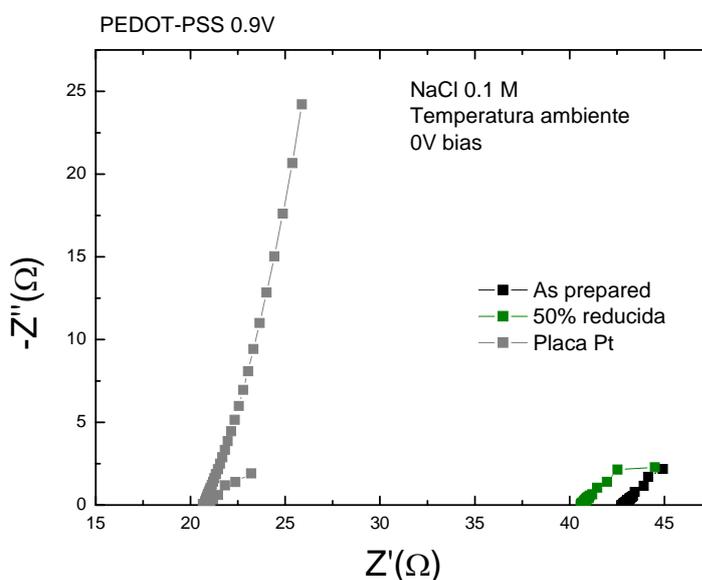


Figura 3.36 Diagrama de Nyquist de capas de PEDOT-PSS electrodepositadas a potencial constante 0.9V vs Pt “as prepared” y con un 50% de reducción, además de un sustrato de platino utilizado para hallar la resistencia del electrolito utilizado en la medida (NaCl 0.1M).

3.6 Cultivos neuronales

La realización de cultivos neuronales constituye una primera aproximación al uso de estos materiales como promotor de crecimiento en dispositivos de reparación neuronal, y se realizaron tal y como se describe en el apartado 2.5.

Hay que señalar que los estudios de cultivos neuronales realizados tanto en las capas de PPy-DBS, PPy-PSS y PEDOT-PSS *as prepared* y reducidas en diferentes grados no fueron del todo satisfactorios debido a un muy bajo grado de supervivencia celular, y a un nulo crecimiento de dendritas o axones en todas ellas. Por estas razones no se creyó conveniente realizar el conteo de los cultivos. Todo ello se puede observar en la Figura 3.37, donde se

comparan las imágenes de microscopía de fluorescencia de una muestra PPy-DBS con el control, es decir la muestra de referencia del mismo cultivo.

Las posibles razones son:

- 1) El bajo grado de reproducibilidad de las muestras
- 2) La baja uniformidad morfológica de las muestras, donde se crean líneas de interferencia originadas por las líneas de campo eléctrico. Esto se confirmó con las diferencias en los resultados del análisis XPS en dos puntos diferentes de la misma capa
- 3) La presencia de una gran cantidad de surfactante en la superficie, el cual puede ocasionar problemas en la supervivencia y desarrollo de las neuronas debido a sus propiedades como solubilizadores de membranas celulares y su carácter ácido [35,44].

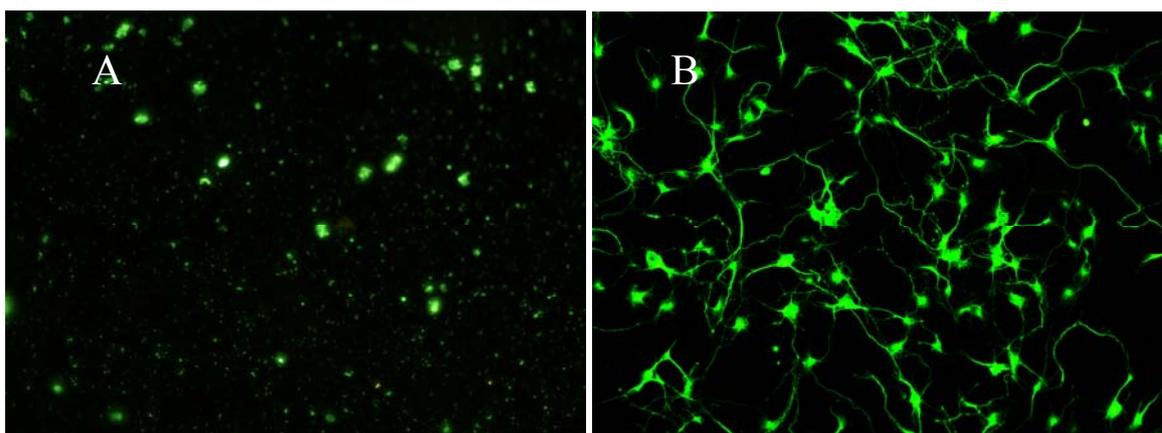


Figura 3.37 Imágenes de microscopía de fluorescencia de la tinción inmunológica Tau de neuronas de córtex cerebral de rata sembradas a 25000 cel/cm^2 y cultivadas a 4 días sobre: A) capa de PPy-DBS sintetizada dinámicamente hasta 0.75V vs Pt y B) control Borosilicato H.

3.7 Conclusiones

- Las capas de PPy dopadas con perclorato y polioxometalato no resultaron efectivas, la primera por su mala adhesión y resistencia a los fluidos y la segunda por sus efectos tóxicos con las células.
- El uso de dos surfactantes (DBS y PSS) como contraiones del PPy dio como resultado capas finas de baja rugosidad y buena conductividad, y con una buena adherencia a la superficie. El uso de uno u otro provoca cambios en el proceso de síntesis y en la morfología final de las capas a nivel visual, siendo diferentes sus patrones de interferencia

debidos al campo eléctrico. Ello viene acompañado de una baja homogeneidad morfológica de las muestras. El uso de diferentes contraiones también hizo diferentes muchas otras de sus características como la conductividad y la eficiencia de síntesis (EQCM). Ello confirma la importancia del contraión en la síntesis de polímeros conductores. No se consiguió una buena reproducibilidad en la síntesis de las muestras ni en su composición final, tampoco se consiguió una homogeneidad satisfactoria en la composición a lo largo de una misma capa. El esfuerzo de caracterización extra en estos casos solo logró atisbar la irreproducibilidad del DBS comercial como gran factor determinante de estas dificultades. El PSS, sin alcanzar dichos límites también está sujeto a cierta variabilidad comercial.

- El incremento de volumen con la reducción es mayor para las capas de PPy-DBS que para las de PPy-PSS, lo que es una ventaja en términos de adherencia para las segundas. Este hecho se confirmó mediante EQCM.

- El estudio de la síntesis mediante el uso de la microbalanza electroquímica de cuarzo demostró un mayor rendimiento en la síntesis del PPy dopado con DBS que dopado con PSS. Además confirmó la intercalación de cationes solvatados por agua durante el proceso de reducción de las capas de los polímeros conductores y por tanto el aumento de volumen de estas, que es la base de las aplicaciones en músculos artificiales. El peso molecular de la especie intercalada es menor en el caso del PEDOT-PSS y por tanto está menos hidratada.

- Los análisis de composición superficial (XPS) y el análisis de infrarrojos detectaron contaminación ambiental en las muestras y la presencia de agua. Se observó además el alto contenido en sodio superficial de las muestras reducidas. También se detectó un excesivo contenido superficial en carbono, seguramente debido al uso de surfactantes, lo que puede suponer un problema para los cultivos celulares.

- Se observó una buena adherencia de la PLL, y como su presencia aumenta la afinidad de las capas con los fluidos (agua y medio de cultivo).

- Todas las capas obtenidas fueron electroactivas, describiendo los picos de reducción típicos para estos compuestos. La adhesión de PLL no pasivó las muestras, que conservaron por tanto su electroactividad. Las capas obtenidas tuvieron una buena conductividad.

- Las capacidades de carga son de 5 y 7 mC/cm^2 para el PPy-DBS y el PPy-PSS respectivamente. La del PEDOT-PSS es de 11 mC/cm^2 , mayor como indica la literatura [46]. Esto hace de ellos buenos candidatos como materiales para electroestimulación, sobretodo para pulsos largos. Las capacidades de carga fueron mayores en condiciones estáticas de potencial.

- La caracterización de las capas de PEDOT-PSS dio resultados muy parecidos a las del PPy, pero mayor reproducibilidad y linealidad en propiedades electroquímicas e impedancia.
- Los resultados de los cultivos celulares no resultaron del todo satisfactorios en ninguna de las muestras dopadas con surfactantes, seguramente debido a su baja reproducibilidad, baja homogeneidad en una misma capa, y una alta presencia de carbono o surfactante en la superficie.

3.8 Bibliografía

- [1] W. Prissanaroon, N. Brack, P.J. Pigram, J. Liesegang and T.J. Cardwell. *Surf. Interface anal.* 2002; **33**: 653-662.
- [2] M. Liu, Y. Zhang, M. Wang, C. Deng, Q. Xie, S. Yao. *Polymer* **47** (2006) 3372-3381.
- [3] J. E. Collazos-castro et al. *Thin solid Films* **518** (2009) 160-170.
- [4] P. Gómez-Romero et al. *Electrochemistry Communications* **5** (2003) 149–153.
- [5] V. Tabard-Cossa, M. Godin, I. Burgess, R.B. Lennox and P.Grütter. *J. of Physical Chemistry B* **109** (2005) 17531-17537.
- [6] S. Suematsu, Y. Oura, H. Tsujimoto, H. Kanno, and K. Naoi. *Electrochimica acta* **45** (2000) 3813-3821.
- [7] D.Y. Kim, J.Y. Lee, D.K. Moon and C.Y. Kim. *Synthetic metals* **69** (1995) 471-474.
- [8] S. Shimoda and E. Smela. *Electrochimica acta* **44** (1998) 219-238.
- [9] S. Bruckenstein et al. *Electrochimica Acta* **45** (2000) 3801-3811.
- [10] J. Tietje-Girault et al. *Surface & Coatings Technology* **201** (2007) 6025-6034.
- [11] M. Skompska. *Electrochimica acta* **45** (2000) 3841-3850.
- [12] J.A. Lori and T. Hanawa. *Corrosion science* **43** (2001) 2111-2120.
- [13] Gordon G. Wallace et al. *Conductive Electroactive polymers: Intelligent materials systems*. CRC Press 2003.
- [14] P. Zanello. *Inorganic electrochemistry: theory, practice and application*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2003.
- [15] K. Idla, A. Talo, H. E.-M. Niemi, O. Forsén and S. Yläsaari. *Surface and interface analysis* **25** (1997) 837-854.
- [16] C. Malitesta, I. Losito, L. Sabbatini and P.G. Zambonin. *J. Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **76** (1995) 629-634.
- [17] L. Ruangchuay, J. Schwank, A. Sirivat. *Applied Surface Science* **199** (2002) 128-137.
- [18] M. Omastova, M. Trchova, J. Kovarova and J. Stejskal. *Synthetic Metals* **138** (2003) 447-455.

- [19] Z. Liu, A. Rittermeier, M. Becker, K. Kähler, E. Löffler, and M. Muhler. *Langmuir* **27(8)** (2011) 4728-4733.
- [20] Z. H. Cheng, A. Yasukawa, K. Kandori and T. Ishikawa. *Langmuir* **14(23)** (1998) 6681-6686.
- [21] T. Silk, Q. Hong, J. Tamm, R.G. Compton. *Synthetic Metals* **93** (1998) 59-64.
- [22] A. Gelmi, M.J. Higgins and G.G. Wallace. *Biomaterials* **31** (2010) 1974-1983.
- [23] C. Saltó et al. *Langmuir* **24** (2008) 14133-14138.
- [24] U. Johanson, M. Marandi, T. Tamm and J. Tamm. *Electrochimica acta* **50** (2005) 1523-1528.
- [25] J. Tamm, T. Raudsepp, M. Marandi and T. Tamm, *Synthetic metals* **157** (2007) 66-73.
- [26] F.J. Guillamón Frutos, T. Fernández Otero and A.J. Fernández Romero. *Electrochimica acta* **52** (2007) 3621-3629.
- [27] M.J. González-Tejera, M.A. de la Plaza, E. Sanchez de la Blanca and I. Hernández-Fuentes. *Polymer International* **31** (1993) 45-50.
- [28] K. Naoi, Y. Oura, M. Maeda and S. Nakamura. *J. Electrochem. Soc.* **142**, No. 2 (1995).
- [29] M. A. Careem, Y. Velmuguru, S. Skaarup and K. West. *Journal of power sources* **159** (2006) 210-214.
- [30] P.M. George et al. *Biomaterials* **26** (2005) 3511-3519.
- [31] M.R. Abidian, J.M. Corey, D.R. Kipke and D.C. Martin. *Advanced functional materials* **19** (2009) 573-585.
- [32] N.K. Guimard, N. Gomez and C.E. Schmidt. *Prog. Polym. Sci.* **32** (2007) 876-921.
- [33] Z.A. King, C.M. Shaw, S.A. Spanninga, D.C. Martin. *Polymer* **52** (2011) 1302-1308.
- [34] V. Syritski, K. Idla and A. Opik. *Synthetic metals* **144** (2004) 235-239.
- [35] M. Asplund, H. von Holst and O. Inganäs. *Biointerphases* **3(3)** (2008).
- [36] L. Zhan, Z. Song, J. Zhang, J. Tang, H. Zhan, Y. Zhou and C. Zhan. *Electrochimica Acta* **53** (2008) 8319-8323.
- [37] X. Du and Z. Wang. *Electrochimica acta* **48** (2003) 1713-1717.
- [38] W. Cai, X. Gong and Y. Cao. *Solar energy materials & solar cells* **94** (2010) 114-127.
- [39] H. Yamato, M. Ohwa and W. Wernet. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **397** (1995) 163-170.
- [40] N. Gómez, J.Y. Lee, J.D. Nickels and C.E. Schmidt. *Advanced functional materials* **17** (2007) 1645-1653.
- [41] S.K.M. Jönsson et al. *Synthetic metals* 139 (2003) 1-10.
- [42] P. Tehrani, A. Kanciurzevska, X. Crispin, N.D. Robinson, M. Fahlman and M. Berggren. *Solid state ionics* **177** (2007) 3521-3527.

-
- [43] S. Bhandari, M. Deepa, S. Singh, G. Gupta and R. Kant. *Electrochimica acta* **53** (2008) 3189-3199.
- [43] M.N. Jones. *International Journal of Pharmaceutics* **177** (1999) 137-159.
- [44] D.A. Kaplin and S. Qutubuddin. *Polymer* **36** (1995) 1275-1286.
- [45] H. Fu, W. Chen, E. Wang, J. Liu, S. Chang. *Inorganica Chimica Acta* **362** (2009) 1412–1420.
- [46] S.F. Cogan. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **10** (2008) 275-309.
- [47] A. M. Cruz et al. *J. of physical chemistry C* **116** (2012) 5155-5168.

Capítulo 4

Capas de Polímero conductor con biomoléculas

En este capítulo se habla de los dos polímeros conductores polipirrol y PEDOT, esta vez dopados con contraiones sencillos de significancia biológica. El propósito de estos nuevos materiales es generar polímeros con mayor biocompatibilidad con el medio biológico en base a cultivos neuronales. Se usaron cinco tipos de aminoácidos: glutamina, lisina, ácido glutámico, glutamato sódico y glicina, y un polipéptido, la poli-L-lisina. Primero se describen los materiales con una breve introducción que también explicará características de las biomoléculas utilizadas. A continuación se detallan los tipos de capas finas sintetizadas y se describe la propia síntesis, que será electroquímica en todos los casos. Posteriormente se detallan los análisis estructurales, microestructurales y electroquímicos de los materiales. Finalmente se explican los resultados de los cultivos neuronales, para acabar con las conclusiones, donde se relacionan estos últimos con los resultados de las caracterizaciones físicoquímicas.

4.1 Polímero-biomolécula

Tal y como fue mencionado en el capítulo anterior referido a la síntesis de polímeros conductores con grandes aniones como dopantes, el uso de estos conlleva ciertos problemas de biocompatibilidad [1,2], lo que llevó a pensar en la conveniencia del uso de biomoléculas para mejorar la interacción celular en la interfaz polímero-célula con el consiguiente aumento de la supervivencia y el crecimiento neuronal [3]. Los problemas vistos se relacionaron con el contraíón, por ello se consideró la opción de enfocar el trabajo utilizando contraiones biológicamente aceptables, modificando así el polímero desde el origen, en su preparación.

Sería posible modificar la superficie de los polímeros conductores con biomoléculas, entre las más conocidas y usadas están la inmovilización sobre la capa polimérica, como en el caso de la poli-L-lisina (PLL), que será de gran importancia para los cultivos celulares como se verá en el apartado 4.7 [4]. Otros métodos han sido utilizados en varios casos [1,5-7]. El uso de contraiones biológicos tiene ventajas en comparación con el resto porque no conlleva problemas de adhesión ya que la molécula está integrada en la capa, además podría permitir liberar o incorporar los dopantes, que pueden ser compuestos utilizados para mejorar las propiedades del polímero para aplicaciones biológicas como factores de crecimiento, moléculas que ayuden a adherir células o ácidos nucleicos [8]. Las propiedades finales del polímero sintetizado dependerán de la biomolécula utilizada. Entre las más utilizadas hasta el momento está la heparina [8,9], el ácido hialurónico [6], el ácido poliglutámico [7], laminina [10], factores de crecimiento como la neurotrofina-3 [4], quitosano [11] y colágeno [12].

Se consideraron dos posibilidades en cuanto la modificación de la superficie del polímero mediante PLL: 1) aumento de la adhesión de PLL en la superficie tras la preparación o 2) incorporación de péptidos en su interior como contraiones. Se ensayó el primer caso aplicando campos eléctricos que favorecieran la adhesión electrostática de la molécula sin grandes cambios en los resultados de cultivos de neuronas corticales. Dicho trabajo se realizó en colaboración con el Hospital Nacional de Parapléjicos (HNP), quienes eventualmente abordaron modificaciones en esa aproximación y obtuvieron resultados apoyados en lo mostrado en esta tesis [2]. En cuanto a la segunda posibilidad de trabajo con la PLL los resultados se muestran a lo largo de este capítulo.

En primera instancia se intentó mejorar el funcionamiento de polímeros sintetizados con surfactantes o compuestos de iridio mediante la adición extra de PLL a la capa, sin resultados satisfactorios, por lo que se pensó en utilizar como dopantes moléculas biológicas como los aminoácidos (Figura 4.2), que fueron elegidos por ser moléculas simples y muy conocidas, y por su condición de neurotransmisores: Glutamato, la sal

sódica del ácido glutámico (L-ácido glutámico, sal monosódica monohidratada (Fluka, $\geq 98\%$)), ácido glutámico (DL-ácido glutámico monohidrato (Sigma, $\geq 98\%$ (TLC)) y Glicina (Reagent PlusTM, $\geq 99\%$, Sigma), por su participación esencial en el metabolismo celular: glutamina, o por el hecho de ser el monómero formador del polipéptido PLL (PLL bromuro, Sigma-aldrich): Lisina (L-Lisina hidratada, 97% (Aldrich)) [35]. También se usó la PLL como dopante.

Además de la biocompatibilidad el uso de aminoácidos y sus derivados permite mejorar otros aspectos de las capas poliméricas, uno de los más importantes es la homogeneidad de las capas en comparación con las dopadas con surfactantes (Figura 4.1 A), en las que como se vio en el anterior capítulo, el campo eléctrico crea líneas que se traducen en la capa en zonas de diferente color y grosor. Se cree que este punto será importante para mantener la reproducibilidad de los cultivos celulares.

Sin embargo, la síntesis de polímeros con PLL como contraión produjo capas con muy baja homogeneidad (Figura 4.1B) que finalmente dieron como resultado unos cultivos celulares poco exitosos, lo cual quizá sea debido a que la molécula presenta una mayor complejidad y a que la síntesis se produjo con un pH neutro por debajo de su punto isoeléctrico de 9 [17] y por tanto su carga total es positiva, dificultando la síntesis, lo que resultó ser crucial en contra de posibles equilibrios presentes.

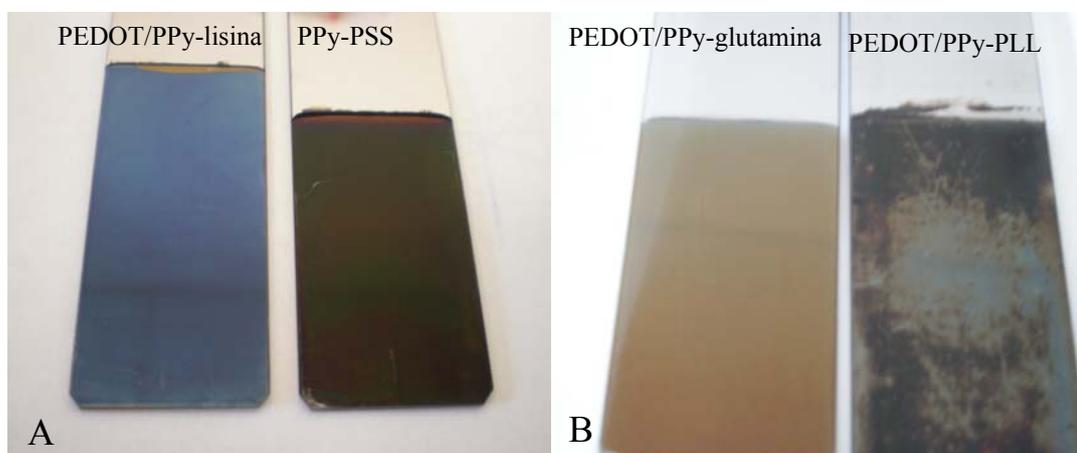


Figura 4.1 Detalle de A) una capa de PPy dopada con PSS junto a una bicapa de PEDOT/PPy dopada con lisina y de B) una bicapa de PEDOT/PPy dopada con glutamina junto a otra bicapa dopada con PLL.

Asimismo, el sustrato utilizado resultó de gran importancia en la síntesis de este tipo de capas, ya que no se consiguió sintetizar la capa de polipirrol dopada con aminoácido sobre el sustrato de platino, pero tras múltiples pruebas el PPy sí se puede depositar sobre una capa de PEDOT. Así pues se sintetizaron monocapas de PEDOT- aminoácido y PEDOT-PLL y bicapas de PEDOT/PPy-aminoácido y PEDOT/PPy-PLL (Figura 4.3), en el caso de

la bicapa se sintetizó una capa de PEDOT dopada con aminoácido y sobre esta última una de PPy sintetizada en las mismas condiciones y con el mismo aminoácido.

Las bicapas de polímero ya han sido usadas en diversas aplicaciones de estos como son los músculos artificiales [13] y también en el área que nos ocupa, las aplicaciones biomédicas [6].

Con esta configuración se consigue una mejora de las propiedades del polímero, ya que se unen las de ambos: se gana en conductividad gracias al PEDOT y la superficie en contacto con las células será el PPy, cuya fiabilidad en cultivos celulares está más contrastada [14-16].

Un dato importante a tener en cuenta en la síntesis con aminoácidos es el comportamiento anfotérico de los mismos, es decir su carga cambia según el pH en el cual nos encontremos, si este está por encima de su punto isoeléctrico la carga neta de la molécula será negativa, siendo positiva en caso contrario. Aunque en todo el trabajo se intentó emular el pH biológico del sistema neural durante el proceso de síntesis para evitar impurezas, es importante que el aminoácido esté cargado negativamente para que pueda actuar de contraión en la síntesis del polímero como se comentó en el apartado 3.1. En nuestro caso siempre se trabajó por encima del punto isoeléctrico, excepto en el caso de la lisina trabajando a pH 7.4, con lo que se quiso conocer el efecto producido en este caso a pH biológico. Siempre se trabajó con un tampón dada la importancia del pH.

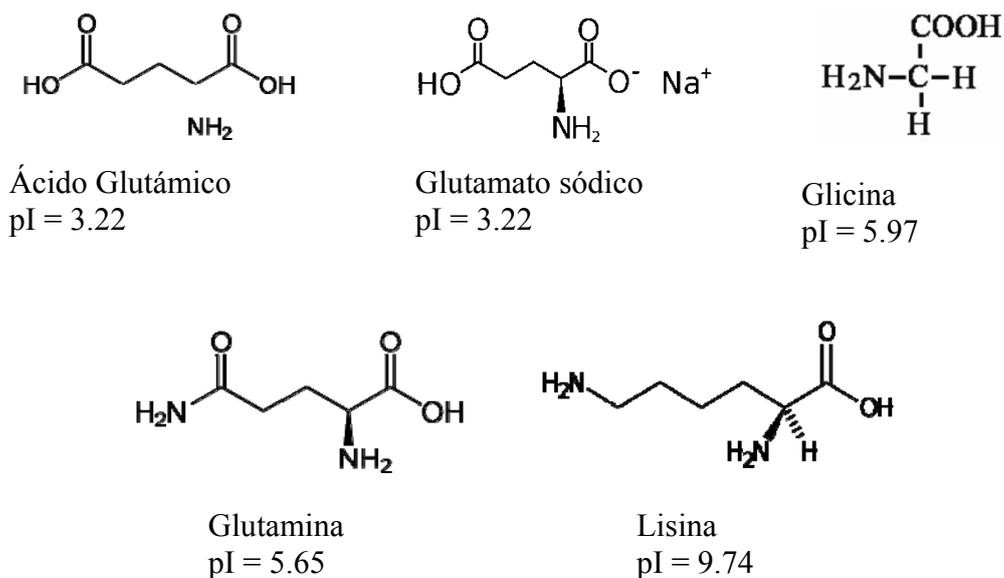


Figura 4.2 Estructura química de cada uno de los aminoácidos utilizados junto a su dato de punto isoeléctrico.

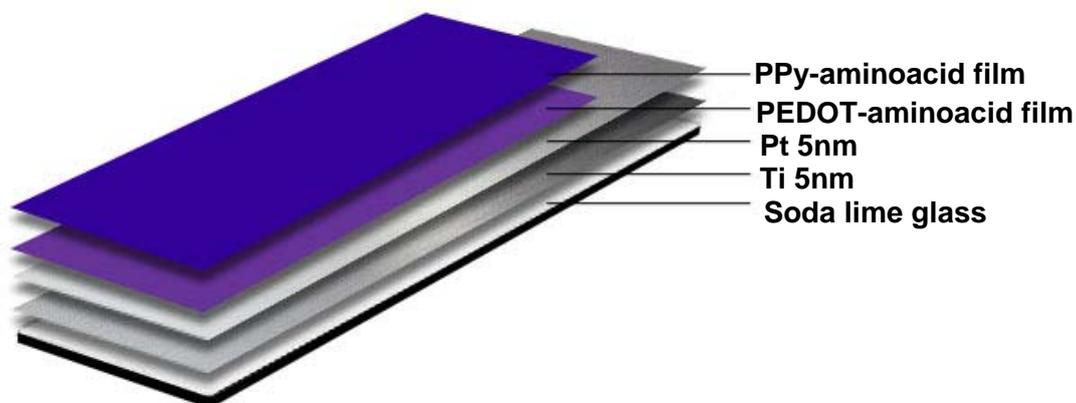


Figura 4.3 Detalle de una bicapa de PEDOT/PPy dopada con aminoácido.

En este capítulo se describe la síntesis potenciodinámica de monocapas de PEDOT y bicapas de PEDOT/PPy (PPy sobre PEDOT) dopadas con los siguientes aminoácidos: glutamato, ácido glutámico, glicina, glutamina y lisina y con el polipéptido PLL. Se obtiene con ello una ostensible mejora en los resultados de los cultivos celulares con respecto a las capas dopadas con surfactantes, sobretodo en el caso de capas dopadas con glutamina y lisina, por lo cual en estos dos casos se varió concentración de aminoácido y pH de síntesis para evaluar su efecto en los cultivos celulares. También serán por ello estas muestras aquellas con una caracterización más profunda. La caracterización de las muestras será igual a la realizada en el capítulo anterior: electroquímica, estructural, microestructural y de composición superficial, para posteriormente realizar lo estudios celulares y la relación de estos con los resultados de la caracterización.

4.2 Obtención electroquímica de monocapas de PEDOT-aminoácido y PLL y de bicapas de PEDOT/PPy-aminoácido y PLL

La síntesis de las capas se realizó utilizando la misma celda y electrodos que se muestra en capítulos anteriores (apartado 2.1.1). La deposición se realizó potenciodinámicamente de

OCP a 0.9V vs Pt a una velocidad de 5mV/s en el caso del PEDOT y de OCP a 0.8V vs Pt a 10mV/s para el PPy. Tal y como fue optimizado tras diversas pruebas, se obtuvieron dos tipos de capas, monocapas de PEDOT-aminoácido y PLL y bicapas de PEDOT/PPy-aminoácido y PLL. Las segundas se obtienen por deposición de PPy-aminoácido o PLL sobre las primeras. Se puede observar una relación de todas las capas sintetizadas en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Relación de capas sintetizadas en función del pH del electrolito y de la concentración de aminoácido.

Monocapas	Concentración aminoácido y pH	Bicapas	Concentración aminoácido y pH
<i>PEDOT-ácido glutámico</i>	0.1M, pH 7.4	<i>PPy/PEDOT-ácido glutámico</i>	0.1M, pH 7.4
<i>PEDOT-glicina</i>	0.1M, pH 7.4	<i>PPy/PEDOT-glicina</i>	0.1M, pH 7.4
<i>PEDOT-glutamato</i>	0.1M, pH 7.4	<i>PPy/PEDOT-glutamato</i>	0.1M, pH 7.4
<i>PEDOT-glutamina</i>	0.1M, pH 7.4	<i>PPy/PEDOT-glutamina</i>	0.1M, pH 7.4 0.01M, pH 7.4
<i>PEDOT-lisina</i>	0.01M, pH 7.4	<i>PPy/PEDOT-lisina</i>	0.01M, pH 7.4 0.01M, pH 12
<i>PEDOT-PLL</i>	0.8 µg/ml, pH 7.4	<i>PPy/PEDOT-PLL</i>	0.8 µg/ml, pH 7.4

En las bicapas se usa el mismo aminoácido a la misma concentración y pH para los dos polímeros. La carga total de síntesis utilizada por la capa de PEDOT es 64.8 mC/cm² y de 48.4 mC/cm², valores que se optimizaron para obtener capas translúcidas. El electrolito utilizado fue un tampón de fosfato sódico 0.1M a pH 7.4, excepto en el caso de la lisina en el que también se realizó un experimento con el tampón fosfato a pH 12. Todos los aminoácidos tenían una concentración de 0.1M, excepto la lisina que tenía una

concentración de 0.01M. Para la glutamina se realizó un experimento a concentración 0.1M de aminoácido y otro a concentración 0.01M para evaluar las posibles diferencias (Tabla 4.2). En el caso de la PLL se trabajó con una concentración del polipéptido de 0.8 $\mu\text{g/ml}$. En esa misma tabla se puede apreciar como el número total de muestras sintetizadas es de 14. En todos los casos se usó una concentración de EDOT de 0.01M y de pirrol de 0.1M. El primero presentó algún problema de solubilidad, lo que no influyó para obtener óptimas deposiciones.

Originalmente, se intentaron sintetizar las capas a potencial y corriente constante pero el resultado fueron capas con poca homogeneidad, con lo cual se optó por una deposición potenciodinámica que como se ha visto producía capas homogéneas en otros casos anteriores. Las respuestas I vs E durante la síntesis de una bicapa de PEDOT/PPy-glutamina pueden ser observadas en la Figura 4.4, donde se puede apreciar que las corrientes alcanzadas son mucho menores que en el caso de los aniones DBS o PSS. La corriente decrece progresivamente a medida que avanzan los ciclos de deposición tanto para el PEDOT como para el PPy, como se aprecia claramente en las curvas I vs t, esto implica que las capas pueden autolimitarse durante su síntesis por posibles problemas de resistividad en el electrolito y también porque muy probablemente sean menos conductoras que las dopadas con surfactantes. La forma de las curvas I vs E de deposición es muy similar expuesto en la literatura [18]. La síntesis del polímero dopado con lisina a pH 12 presentó una curva diferente a la del resto de capas (siendo estas otras muy parecidas entre sí) debido a las limitaciones que presenta la síntesis de polímeros conductores a pHs muy alcalinos. El alto pH provoca una desprotonación de los radicales catiónicos que da lugar a radicales neutros, interfiriendo con la reacción de apareamiento descrita en el apartado 3.1 [19]. Esta diferencia será apreciable sobretodo en sus propiedades electroquímicas y su microestructura como se verá en los siguientes apartados.

Para las muestras dopadas con biomoléculas no se consideró primordial realizar experimentos de modulación electroquímica debido al nulo efecto que estos tuvieron en los cultivos celulares de las muestras dopadas con surfactantes.

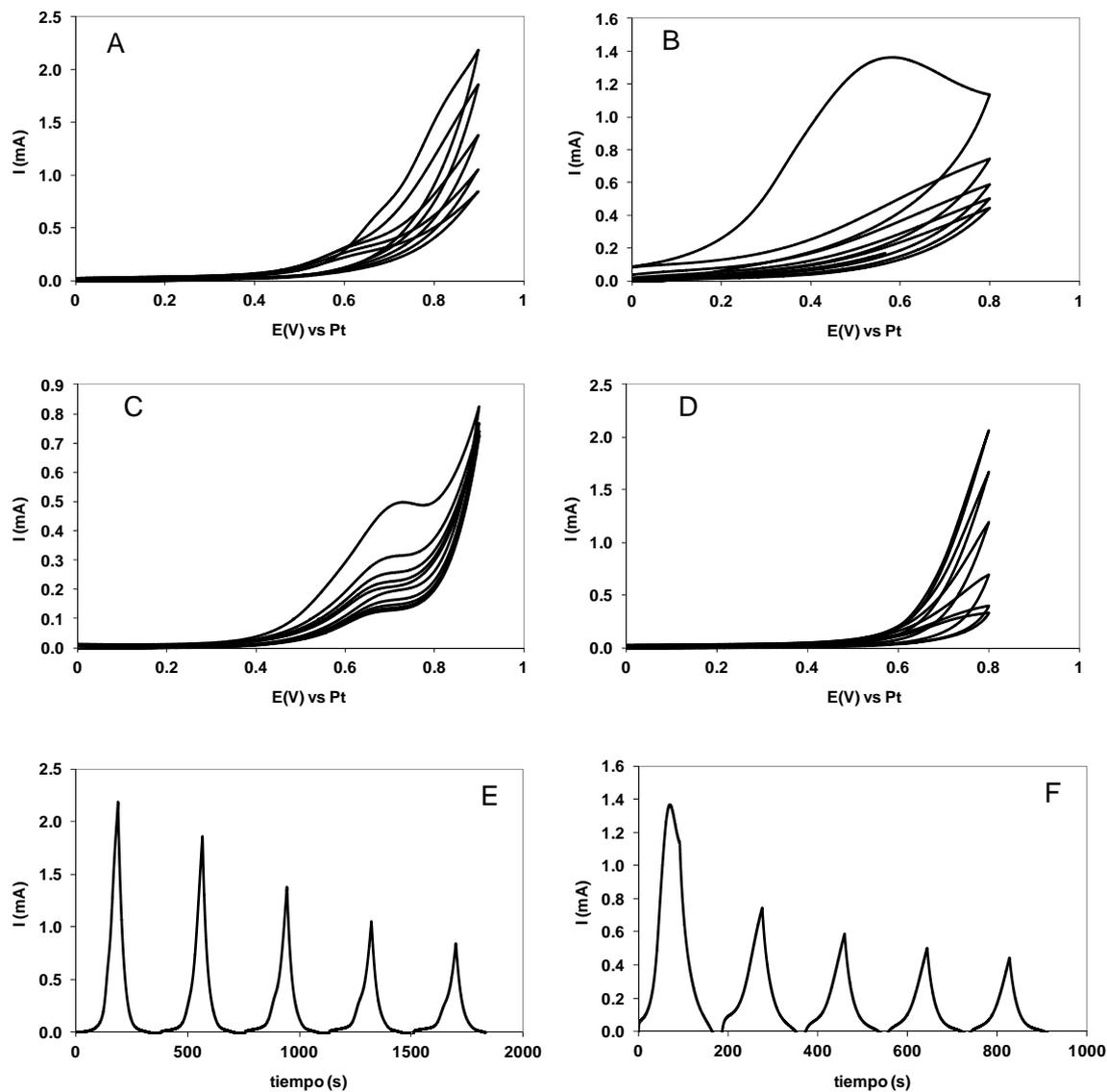


Figura 4.4 Curvas de síntesis correspondientes a: A) I vs E de PEDOT dopado con glutamina 0.1M a pH 7.4, B) I vs E de PPy dopado con glutamina 0.1M a pH 7.4 sobre la capa depositada en A, C) I vs E de PEDOT dopado con lisina 0.01M a pH 12, D) I vs E de PPy dopado con lisina 0.01M a pH 12 sobre la capa depositado en C, E) I vs t de PEDOT dopado con lisina 0.01M a pH 12 y F) I vs t de PPy dopado con lisina 0.01M a pH 12 sobre la capa depositado en E.

4.3 Estudio de los procesos de síntesis de las capas: Balanza electroquímica de cuarzo (EQCM)

Al igual que en las capas dopadas con surfactante, se realizó un estudio del proceso de síntesis de las capas mediante el uso de la balanza electroquímica de cuarzo con el fin de evaluar el aumento real de masa por unidad de carga. El valor teórico de moles de electrones por moles de monómero de la síntesis es también de 2.33 para las capas dopadas con biomoléculas. Se evaluó del mismo modo que en el capítulo anterior (densidad de 1.5 g/ml y peso molecular calculado con el del monómero más el 33% del contraión (aminoácido)). Su valor es de 190.4 g/mol para las capas de PEDOT-glutamina o lisina y de 115.3 g/mol para las capas de PPy-glutamina o lisina. En general, la eficiencia del proceso de síntesis de las capas descritas en este capítulo fue sensiblemente menor al de las capas dopadas con surfactante (ver tabla 3.3), es decir se genera menor masa polimérica con la misma carga de síntesis (Tabla 4.2), lo que puede ser provocado por el hecho de que la corriente sea mayor en los primeros ciclos de la síntesis y después vaya decreciendo como se pudo ver en la Figura 4.4. Eso hace también que se deposite más masa del polímero en las primeras etapas, lo que se puede apreciar en la Figura 4.5, tanto para el PEDOT como para el PPy. Después la deposición se produce de forma lineal. Se pueden observar los ciclos de síntesis en la Figura 4.5, donde el descenso de frecuencia más acusado corresponde a la parte de oxidación del ciclo y la parte más plana corresponde a la parte de reducción, donde por tanto se deposita mucho menos polímero.

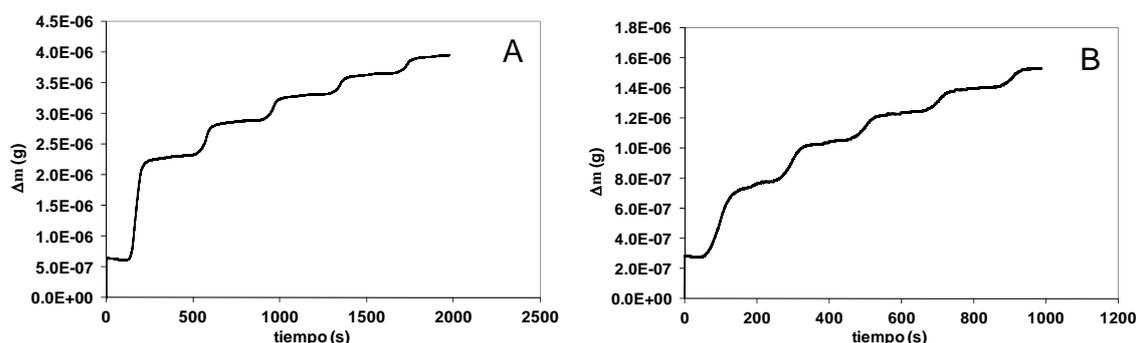


Figura 4.5 Curvas de la evolución de la masa registrada por la EQCM con respecto al tiempo correspondientes a: A) síntesis de PEDOT dopado con glutamina 0.1M a pH 7.4, B) PPy dopado con glutamina 0.1M a pH 7.4 sobre la capa depositada en A. (Nótese que el potencial es dinámico y por ello Δm oscila también).

En la tabla 4.2 se puede apreciar como la capa con menor rendimiento en su síntesis y con mayor error en los datos es la dopada con lisina y a pH 12 en el medio, lo que se debe muy

probablemente a la peor calidad de los depósitos en medio alcalino como se apuntó anteriormente. El resto de capas presenta una eficiencia de síntesis en el mismo rango de valores.

El peso molecular calculado tiene una relación directa con la eficiencia, aquellas capas con mayor eficiencia de síntesis tienen un mayor peso molecular, y esta diferencia de peso puede ser debida a una mayor incorporación de agua. Esto es siempre así para las capas de PEDOT con respecto a las de PPy, lo que concuerda con los datos de ATR (apartado 4.5) y con los datos de contenido de grupos hidratados de la Tabla 4.5, donde la monocapa de PEDOT es la que mayor cantidad tiene de este tipo de grupos. Nótese el error contemplado en los datos de la capa a pH, de la que ya hemos comentado los problemas que presenta su síntesis.

Tabla 4.2 Resultados teóricos y experimentales de la síntesis de capas de PEDOT y PPy dopados con glutamina y lisina a las condiciones de concentración de pH y concentración del aminoácido especificadas.

	Glutamina 0.1M pH 7.4		Glutamina 0.01M pH 7.4		Lisina 0.01M pH 7.4		Lisina 0.01M pH 12	
	PEDOT	PPy sobre PEDOT	PEDOT	PPy sobre PEDOT	PEDOT	PPy sobre PEDOT	PEDOT	PPy sobre PEDOT
Mol e/Mol unidad polímero si PM teórico	4.67±0.35	6.08±1.16	4.11±0.35	5.16±0.92	4.28±0.35	4.75±0.95	12.78±7.81	6.35±3.09
Ratio Moles teóricos/experimentales (n)	0.50	0.38	0.57	0.45	0.54	0.49	0.18	0.36
Eficiencia Proceso	50%	38%	57%	45%	54%	49%	18%	36%
PM calculado si n=2.33 (g/mol)	40.9±3.0	19.4±3.1	46.5±4.4	23.0±4.2	44.7±3.3	25.0±4.2	18.3±11.2	20.6±10.0
PM teórico (g/mol)	190.4	115.3	190.4	115.3	190.4	115.3	190.4	115.3

4.4 Análisis de superficie (XPS)

El análisis de composición superficial de las capas mediante XPS reveló la presencia de los elementos esperados en cada una de ellas, es decir, las monocapas de PEDOT contienen C, N, O y S y las bicapas contienen lo mismo excepto el S propio del PEDOT, ya que la superficie de estas es el PPy y el PEDOT queda lejos del área de impacto de los rayos X.

En general los resultados obtenidos para las capas dopadas con aminoácidos concuerdan con aquellos existentes en la literatura para estos últimos [20]. En la figura 4.6 se pueden apreciar los espectros generales de diversas capas dopadas con aminoácidos con los respectivos picos señalados. En ningún caso se encontró fósforo correspondiente al tampón fosfato, asegurando que el contraíón que forma parte de la capa es la biomolécula utilizada.

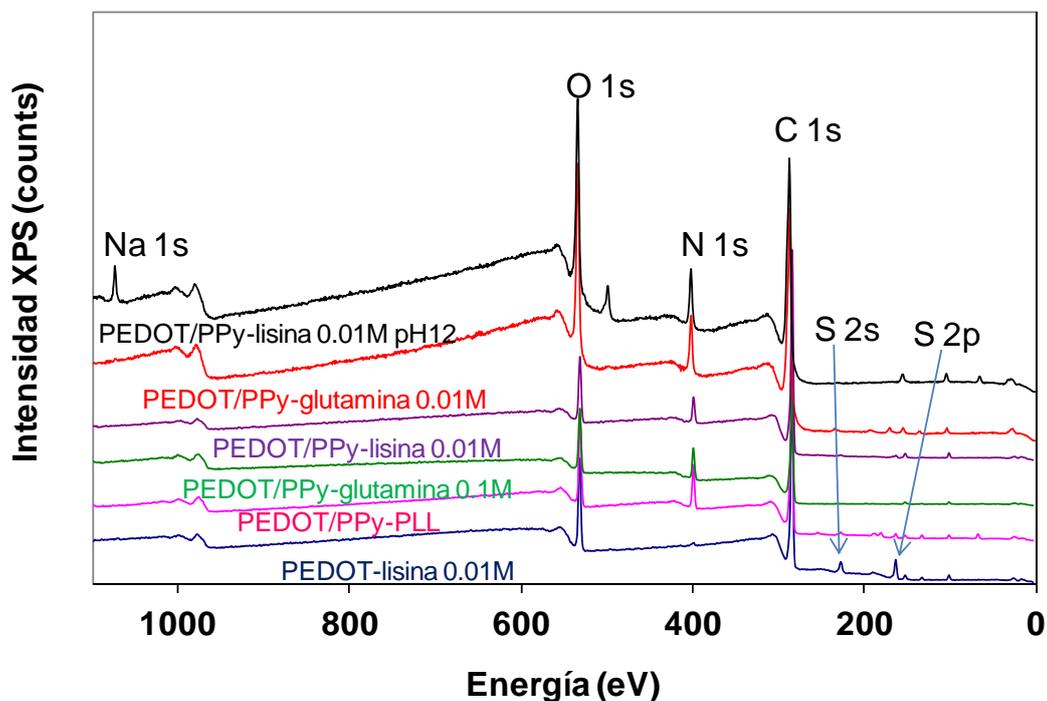


Figura 4.6 Espectro XPS general de una monocapa de PEDOT dopada con lisina 0.01M a pH 7.4, una bicapa de PEDOT/PPy dopada con 0.8 $\mu\text{g/ml}$ PLL a pH 7.4, una bicapa de PEDOT/PPy dopada con glutamina 0.1M a pH 7.4, una bicapa de PEDOT/PPy dopada con lisina 0.01M a pH 7.4, una bicapa de PEDOT/PPy dopada con glutamina 0.01M a pH 7.4 y una bicapa de PEDOT/PPy dopada con lisina 0.01M a pH 12.

La cuantificación atómica referida a la Figura 4.6 expresada en porcentajes molares está detallada en la Tabla 4.3. Además de los elementos incluidos en la tabla se encontraron impurezas de Si y de Na debido al soporte de vidrio. Existe un relativo parecido de todas las muestras en cuanto a composición superficial. Un dato a tener en cuenta es que dos de las tres muestras que contienen la menor proporción de C (65%) y una alta cantidad de oxígeno son aquellas con mejor funcionamiento en cultivos celulares, como se verá en el apartado correspondiente. La cantidad de oxígeno denota para las bicapas el grado de dopaje de las mismas, ya que al encontrarse el PPy en la superficie el oxígeno procede del dopante (exceptuando aquel proveniente del agua). Parece, por tanto que un mayor dopaje puede inducir a un mejor comportamiento de las muestras para la supervivencia y crecimiento neuronal. Dentro de las mejores muestras en este aspecto (las dopadas con

lisina y glutamina), aquellas más efectivas resultaron ser a las que no se les detectó azufre en la superficie.

Tabla 4.3 Cuantificación molar expresada en porcentajes de los picos del espectro general de XPS de monocapas de PEDOT-biomolécula y bicapas de PEDOT/PPy-biomolécula, cuyo dopante está especificado en cada caso. Todas fueron sintetizadas potenciodinámicamente con una concentración de dopante de 0.1M y un pH de 7.4, excepto en los casos debidamente especificados.

Muestra	C 1s	O 1s	N 1s	S 2p
<i>PEDOT-lisina 0.01M</i>	79.6	14.1	-	3.7
<i>PEDOT-PLL 0.8 µg/ml</i>	64.5	22.4	4.3	5.6
<i>PEDOT/PPy-PLL 0.8 µg/ml</i>	74.2	13.6	10.5	0.9
<i>PEDOT/PPy-glicina</i>	79.8	10.8	10.3	-
<i>PEDOT/PPy-glutamato</i>	76.9	11.7	9.5	-
<i>PEDOT/PPy-ácido glutámico</i>	79.1	12.5	6.5	-
<i>PEDOT/PPy-lisina 0.01M</i>	83.3	9.7	6.5	0.5
<i>PEDOT/PPy-lisina 0.01M pH12</i>	64.6	22.4	9.1	-
<i>PEDOT/PPy-glutamina 0.1M</i>	77.2	12.2	9.4	-
<i>PEDOT/PPy-glutamina 0.01M</i>	65.3	23.6	8.9	0.7

Dada la aparente correlación de las cantidades superficiales de C y O en el éxito de los cultivos celulares se realizó un análisis más detallado de los picos a través de la deconvolución de los mismos en varios picos que contribuyen en mayor o menor medida a la forma del pico final correspondiente al elemento. Cada uno de estos picos se atribuye a un tipo de enlace del elemento en cuestión. Ello podría evidenciar características diferentes en la superficie expuesta a las células. Este estudio se realizó con especial enfoque sobre las bicapas de lisina y glutamina, que resultaron ser buenos sustratos, y sobre una

monocapa de PEDOT-lisina y una bicapa de PEDOT/PPy-PLL que resultaron peores, con el fin de ver las diferencias entre muestras que funcionaron bien a nivel celular y muestras que no lo hicieron. En la Figura 4.7 se muestran los resultados de las deconvoluciones para los espectros C 1s y O 1s de las muestras antes mencionadas. El pico de C 1s se puede dividir en tres componentes para todos los casos: C1, C2 y C3, que corresponden a un enlace del específico del C en cada caso (Tabla 4.4) y el pico O 1s se puede dividir en dos componentes (O1 y O2) para todos los casos excepto la monocapa de PEDOT dopada con lisina 0.01M a pH 7.4, en la cual se encuentran tres componentes: O1, O2 y O3, lo que se debe a que este es el único caso en que la superficie es PEDOT y no PPy. Estas componentes también corresponden a un tipo determinado de enlace del oxígeno (Tabla 4.5).

La componente C1 se atribuye al enlace C-C alifático del carbono y dentro de C2 se pueden englobar diversos enlaces como son el C=O y el CH-R típicos de los aminoácidos y el C-N propio del pirrol, que se solapan. En C3 se incluyen los grupos hidratados C-OH y el COO⁻ [21]. Existe una cierta variabilidad en los resultados de la cuantificación de los componentes C1, C2 y C3 del carbono que no hace pensar en una relación directa entre estos y los resultados celulares.

La deconvolución del pico de O 1s revela dos componentes, el primero (O1) se atribuye al grupo C=O existente en los aminoácidos y en la PLL, mientras que en O2 se engloban los grupos carboxilo (COO⁻) y los grupos hidratados (OH⁻) además de los enlaces C-O-C propios del PEDOT, por lo que la cantidad de O2 es mayor para la monocapa de PEDOT-lisina. En este caso también se encuentra una cantidad del 35.5% de una tercera componente (O3) que corresponde a grupos sulfona (S=O) que se han formado en la cadena de PEDOT [21,22]. Las muestras que tuvieron un mejor funcionamiento (glutamina 0.1M y lisina 0.01M a pH 12) son aquellas que presentan una menor cantidad del componente O2, es decir, son las menos hidratadas. Ello implica una ordenación del aminoácido concreta hacia el exterior, exponiendo más C=O y menos C-O⁻.

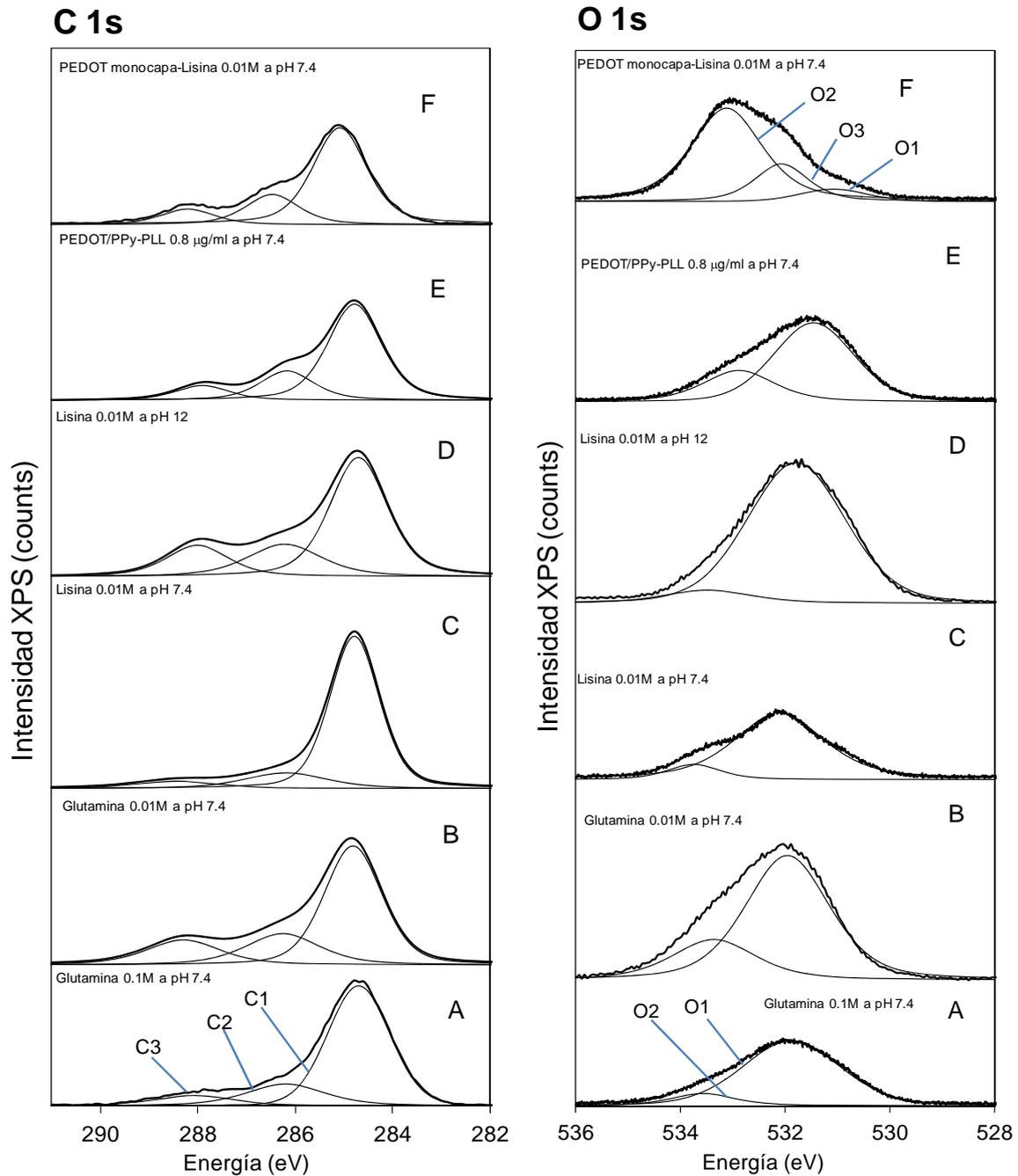


Figura 4.7 Deconvolución de los espectros XPS del C 1s y el O 1s de bicapas de PEDOT/PPy sintetizadas con: A) Glutamina 0.1M a pH 7.4, B) Glutamina 0.01M a pH 7.4, C) Lisina 0.01M a pH 7.4, D) Lisina 0.01M a pH 12, E) PEDOT/PPy-PLL 0.8 $\mu\text{g/ml}$ a pH 7.4 y F) una monocapa de PEDOT dopada con lisina 0.01M a pH 7.4.

Tabla 4.4 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal C 1s, se muestran los ratios molares en forma de porcentaje para cada tipo de enlace para las muestras analizadas en la Figura 4.7, bicapas de PEDOT/PPy dopadas con: glutamina 0.1M a pH 7.4, glutamina 0.01M a pH 7.4, lisina 0.01M a pH 7.4, lisina 0.01M a pH 12, PLL 0.8 µg/ml a pH 7.4 y una monocapa de PEDOT dopada con lisina 0.01M a pH 7.4.

PEDOT/PPy -contraíón Conc. y pH	C1: C-C/C-H		C2: C-N/C=O/CHR		C3: COO ⁻ /C-OH	
	Posición (eV)	Ratio molar de C (%)	Posición (eV)	Ratio molar de C (%)	Posición (eV)	Ratio molar de C (%)
Glutamina 0.1M	284.7	76.7	286.4	15.0	288.2	8.3
Glutamina 0.01M	284.8	60.1	286.1	22.5	288.3	17.4
Lisina 0.01M	284.8	81.1	286.5	13.2	288.7	5.7
Lisina 0.01M pH12	284.8	59.8	286.3	22.4	288.1	17.8
PLL 0.8 µg/ml	284.8	67.3	286.2	21.6	287.9	11.1
PEDOT- lisina 0.01M	284.8	61.2	286.2	33.6	288.9	5.2

El espectro N 1s presenta dos componentes (excepto la monocapa de PEDOT-lisina que no tiene N), uno de los cuales es común a todas las muestras situado a 400.0 eV correspondiente al enlace N-H del pirrol y al grupo amina de las biomoléculas. Este representa para todas las muestras el 90% del contenido total del nitrógeno, el 10% restante pertenece al segundo componente que está situado en 398.0 eV y se atribuye al enlace imina (=N-), el cual quizá sea creado por las reacciones redox producidas durante la síntesis del polímero.

Para todas las muestras excepto para la bicapa dopada con glutamina 0.1M a pH 7.4, en la cual este 10% se sitúa en 401.8 eV y pertenece al grupo amino protonado $-\text{NH}_3^+$, característico de la glutamina a pH inferior a 9.13, lo que evidencia la exposición del grupo amino en la superficie de la capa.

Tabla 4.5 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal O 1s, se muestran los ratios molares en forma de porcentaje para cada tipo de enlace para las muestras analizadas en la Figura 4.7, bicapas de PEDOT/PPy dopadas con: glutamina 0.1M a pH 7.4, glutamina 0.01M a pH 7.4, lisina 0.01M a pH 7.4, lisina 0.01M a pH 12, PLL 0.8 $\mu\text{g/ml}$ a pH 7.4 y una monocapa de PEDOT dopada con lisina 0.01M a pH 7.4. Las muestras con mayor éxito en cultivos celulares se marcan con un *.

PEDOT/PPy- contraíón Conc. y pH	O1: C=O		O2: COO ⁻ /OH ⁻	
	Posición (eV)	Ratio molar de O (%)	Posición (eV)	Ratio molar de O (%)
*Glutamina 0.1M	531.9	83.9	533.3	16.1
Glutamina 0.01M	532.1	74.4	533.5	25.6
Lisina 0.01M	532.0	75.9	533.4	24.1
*Lisina 0.01M pH12	531.9	89.7	533.6	10.3
PLL 0.8 $\mu\text{g/ml}$	531.4	71.4	532.9	28.6
PEDOTmonocapa- lisina 0.01M#	531.2	9.3	533.2	55.2

#Esta muestra tiene un tercer componente O3 a 532.2eV con un 35.5%

4.5 Análisis de infrarrojos (ATR)

El espectro ATR de las capas (Figura 4.8) muestra resultados muy similares a las muestras de surfactantes analizadas en el capítulo anterior sobretodo en el intervalo $750\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, que corresponde a los picos típicos del pirrol, concretamente en esta figura se pueden observar la banda en 1050 cm^{-1} , que indica la existencia de la deformación del enlace N-H [23] y la banda en 1200 cm^{-1} , atribuido a la banda de estiramiento del enlace C-N [24], ambas vibraciones debidas al pirrol y las biomoléculas. Otra banda de absorción en 1280 cm^{-1} corresponde a la vibración de deformación de los enlaces C-H y N-H. La banda de absorción de la vibración de estiramiento del enlace C-N característico del pirrol se encuentra en 1450 cm^{-1} y la banda en 1520 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento de C-C y C=C.

En la banda a 1820 cm^{-1} se encuentra la señal que confirma existencia del grupo C=O [25]. Se pudo también confirmar que estas capas absorben CO_2 por la presencia de la banda a 2350 cm^{-1} [26,27].

La Figura 4.8 muestra el espectro ATR de tres capas representativas, y son similares entre sí, con la excepción de que como ya apuntaba el XPS, la señal atribuida a la cantidad de

agua en la muestra dopada con PLL es mucho mayor. Esta muestra también muestra absorción de CO_2 . El resto de bicapas sintetizadas revelan un espectro muy parecido a las dopadas con lisina y glutamina en la Figura 4.8. Las monocapas de PEDOT muestran los picos típicos de este polímero según la literatura (datos no mostrados), que se encuentran en la misma zona que los del PPy, pero en este caso la cantidad de agua es mucho mayor, resultando pues una mayor afinidad con el agua de las monocapas de PEDOT que de las bicapas PEDOT/PPy que ya indicaba el mayor contenido en agua mostrado en la Tabla 4.5.

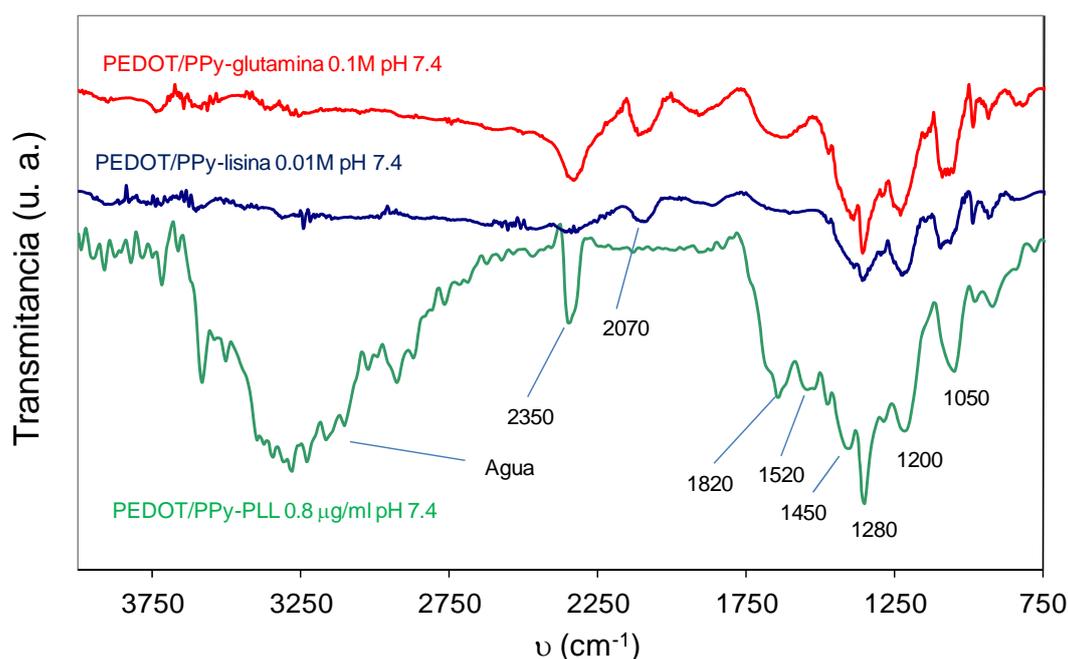


Figura 4.8 Espectros de ATR de bicapas de PEDOT/PPy dopadas con glutamina 0.1M a pH 7.4, con lisina 0.01M a pH 7.4 y con PLL 0.8 $\mu\text{g/ml}$ a pH 7.4. Nótese ruido significativo de la señal de H_2O debido al bajo espesor de la capa.

4.6 Análisis microestructural

Las imágenes de AFM mostradas en la Figura 4.9 revelan una microestructura globular para todas las capas analizadas, el cual es un comportamiento común a las capas dopadas con surfactantes descritas en el capítulo 3, aunque estas últimas presentan en general una menor rugosidad (Tabla 4.6). No se observa ninguna diferencia microestructural destacable entre las bicapas y las monocapas, las primeras además son morfológicamente muy parecidas entre sí, como se puede ver en la Figura 4.9 y en los datos de la Tabla 4.6. Hay dos bicapas, no obstante, que son un poco diferentes, la dopada con PLL y la dopada con lisina 0.01M a pH 12. La primera presenta una rugosidad y un tamaño de grano mayor que

las demás debido a la presencia del polipéptido, más complejo, y que parece incorporar más agua a la capa como se apuntó en los análisis de XPS y FTIR. Ello causa que esta muestra sea más gruesa que las demás para las mismas condiciones de síntesis. La segunda presenta una rugosidad y un tamaño de grano mucho menor debido a que sus condiciones de síntesis en medio alcalino provocan una gran diferencia en las características microestructurales como se indicó en el apartado 4.2. La menor eficiencia de su síntesis mencionada en el apartado 4.3 también hace que esta sea la bicapa con un menor grosor. No se observó una relación directa entre las características morfológicas de las capas y la supervivencia celular en las mismas, aunque aquella con mejores resultados fue la de menor rugosidad (lisina 0.01M a pH 12).

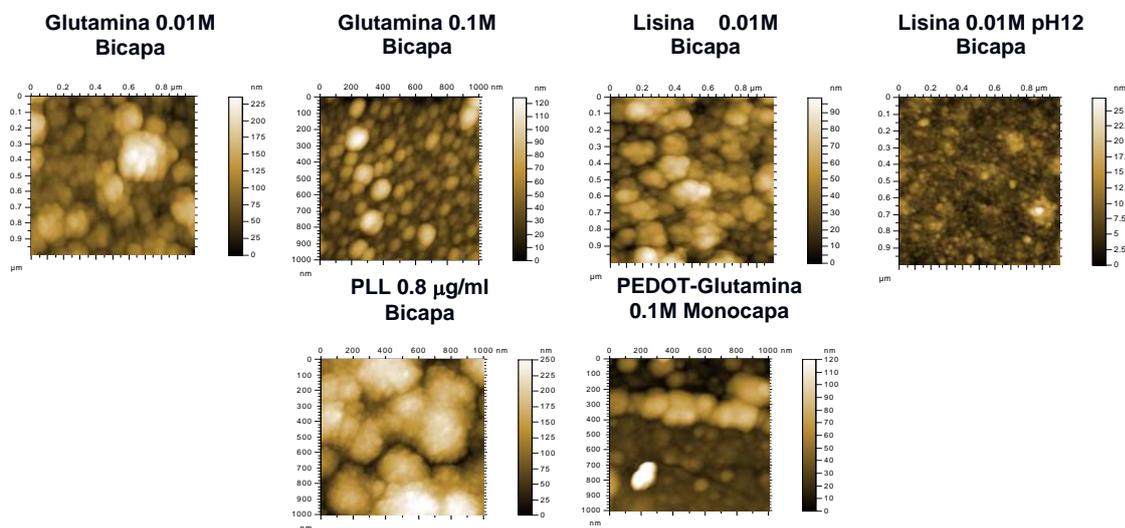


Figura 4.9 Figuras de AFM de las capas especificadas, todas sintetizadas a pH 7.4 excepto la indicada a pH 12. Cada imagen presenta su propia escala de color debido a la gran variabilidad de los valores de rugosidad.

Se realizaron también los estudios de afinidad de las capas tanto con agua (hidrofilicidad) como con medio de cultivo celular como ya se hizo con las muestras dopadas con surfactante mediante medidas de ángulo de contacto. También se recubrieron con PLL para realizar el mismo estudio. Las tendencias generales que ya se apuntaron en el capítulo 3 se confirmaron (Tabla 4.6), las capas presentan mayor afinidad con el medio de cultivo que con el agua, lo cual es positivo ya que este medio se acerca más a la realidad en lo que será la aplicación final de los materiales. Asimismo se confirma una buena adhesión de polilisina, ya que la presencia de esta provoca una mayor afinidad entre la capa y el fluido. Ello provoca que la bicapa que usa la PLL como dopante sea la más hidrofílica y afín al medio. El hecho de que la hidrofílicidad sea mayor puede ser conveniente porque así se debería conseguir una mayor adhesión de PLL a través de una mayor polaridad definida

por una gran afinidad con el agua, y siempre será mejor una buena adhesión de la PLL ya que este polipéptido será el que ayude a la adhesión celular [28]. De hecho dos de las capas con mayor supervivencia celular (glutamina 0.1M y lisina 0.01M a pH 12) están entre las tres más hidrofílicas de la Tabla 4.6.

Tabla 4.6 Datos microestructurales extraídos del análisis AFM de las capas: Rugosidad, Distancia pico valle tamaño de grano. Datos de grosor obtenidos mediante imágenes de SEM. La columna de ángulo de contacto describe la hidrofiliicidad de la capa medida mediante un goniómetro (valores más hidrofóbicos cuanto más lejanos a 90°).

Muestra	Grosor de capa (nm)	Rugosidad RMS (nm)	Distancia pico-valle (nm)	Tamaño de grano (nm)	Ángulo de contacto H ₂ O (°)	Ángulo de contacto medio (°)
PEDOT-glutamina 0.1M	90	21.3	136.8	45±18	76.3±1.1	70.1±2.3
PEDOT/PPy-PLL 0.8 µg/ml	400	51.9	280.0	104±14	50.1±0.9	47.3±1.1
PEDOT/PPy-glutamina 0.01M	350	38.5	235.4	47±18	79.4±0.8	68.3±2.3
PEDOT/PPy-glutamina 0.1M	170	18.3	124.3	56±12	67.4±0.6	65.7±1.2
PEDOT/PPy-lisina 0.01M	160	16.3	98.6	59±9	83.6±4.0	73.5±3.1
PEDOT/PPy-lisina 0.01M pH12	100	2.7	27.0	18±7	53.1±0.6	52.4±1.0

4.7 Propiedades electroquímicas

Al igual que con las capas estudiadas en el capítulo 3, se realizaron voltametrías cíclicas hacia potenciales de reducción para conocer las características electroquímicas de las muestras en dos electrolitos diferentes: tampón fosfato sódico a pH 7.4 y medio de cultivo celular. El uso del último no aportó ninguna información relevante al estudio, como dato más destacable se observó que cuando el electrolito es el medio de cultivo los picos se hacen más anchos y se desplazan a potenciales más negativos, lo cual es debido a la mayor resistividad de este en comparación con el tampón fosfato.

En la Figura 4.10 se puede observar como las voltametrías de los polímeros dopados con aminoácidos son prácticamente iguales, no les afecta el tipo de aminoácido, y su

concentración en muy poca medida, aunque sí se puede ver una señal más intensa a mayor concentración del aminoácido (Figura 4.10 E) [29]. No obstante, el uso de un polipéptido como la PLL y en mucha mayor medida un surfactante como el DBS sí afectan a la curva resultante. También se aprecia un cambio importante en el caso de la muestra sintetizada a pH 12, ya que este parámetro afecta en gran medida a su síntesis, cambiando también sus propiedades electroquímicas significativamente respecto a la misma preparación a pH 7.4.

Todas las bicapas dopadas con biomolécula revelan la existencia de dos picos de reducción, el de potenciales más positivos en torno a -0.8V vs Pt pertenece a la intercalación del catión Na^+ en la capa durante la reducción, tal y como se explicó en el capítulo 3, y el segundo pico corresponde a la reducción de otras especies como podrían ser los aminoácidos. El pico de oxidación de retorno se puede atribuir a la desintercalación del Na^+ antes intercalado [30]. Existe una importante asimetría entre las partes catódica y anódica de las curvas, lo que es debido a una irreversibilidad inherente al sistema producido por la reorganización interna de la estructura del polímero. Se puede aplicar por tanto a estas capas lo dicho en el apartado 3.2.9. La capacidad de carga a 20 mV/s durante 1.5V de las capas dopadas con biomoléculas está entre 4 y 7 mC/cm^2 , un poco menor a la de las capas dopadas con surfactante, pero aún adecuadas para servir como materiales para electroestimulación, ya que materiales como el Pt están en el orden de $100\text{ }\mu\text{C/cm}^2$, y aquí ya se consigue un salto en el orden de magnitud. Una vez más la medida a potencial estático a -0.8V durante 600s dio valores mayores, en torno a $15\text{-}20\text{ mc/cm}^2$, tal y como pasaba en los materiales dopados con surfactantes. Ello vuelve a confirmar las buenas condiciones de estas capas para estimulación en DC o pulsos largos.

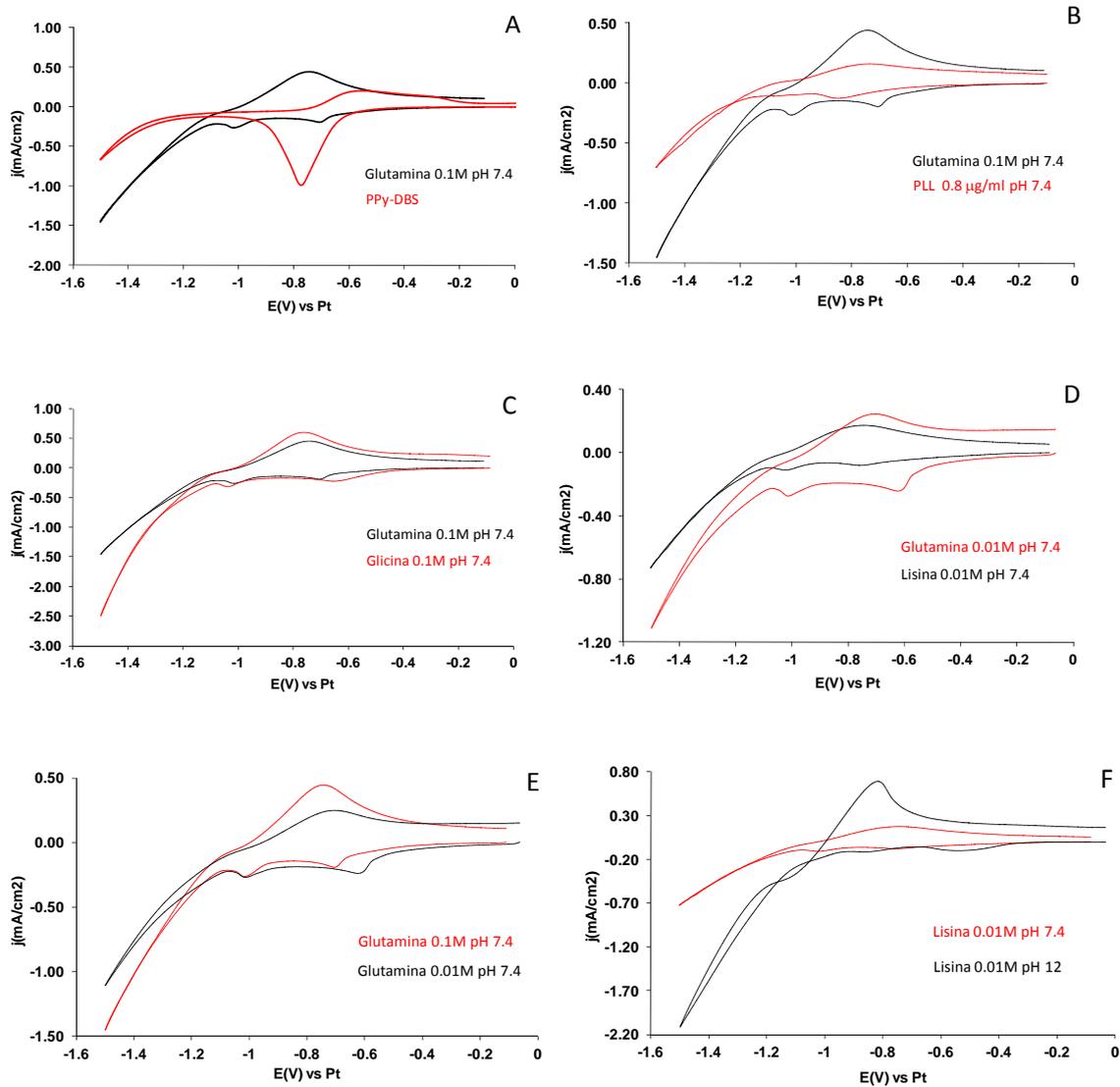


Figura 4.10 Voltametrías de reducción comparativas de bicapas de PEDOT/PPy de OCP a $-1.5V$ vs Pt a $20mV/s$ indicadas con su color correspondiente: A) dopada con glutamina $0.1M$ pH 7.4 y monocapa de PPy dopada con DBS, B) dopada con glutamina $0.1M$ y dopada con PLL $0.8 \mu g/ml$, ambas a pH 7.4 , C) dopada con glutamina $0.1M$ y con glicina $0.1M$, ambas a pH 7.4 , D) dopada con lisina y con glutamina, ambas a $0.1M$ y pH 7.4 , E) dopada con glutamina a pH 7.4 , una a $0.1M$ y otra a $0.01M$, F) dopada con lisina $0.1M$, una a pH 7.4 y otra a pH 12 .

4.8 Cultivos neuronales

Como se ha ido comentando a lo largo del capítulo, alguna de las muestras dopadas con aminoácidos dieron resultados muy satisfactorios a nivel de adhesión, supervivencia y crecimiento celular, contrariamente a lo sucedido con las muestras dopadas con surfactante.

Las capas fueron ensayadas como sustrato para la adhesión y crecimiento de neuronas en cultivos *In Vitro* de 4 días (4 DIV) con un sembrado de 25000 células/cm². Las células fueron obtenidas del córtex cerebral de embriones de ratón NMRI. Este ensayo fue realizado como una evaluación primaria de la conveniencia del uso de estos materiales como electrodos en prótesis implantables en el cerebro.

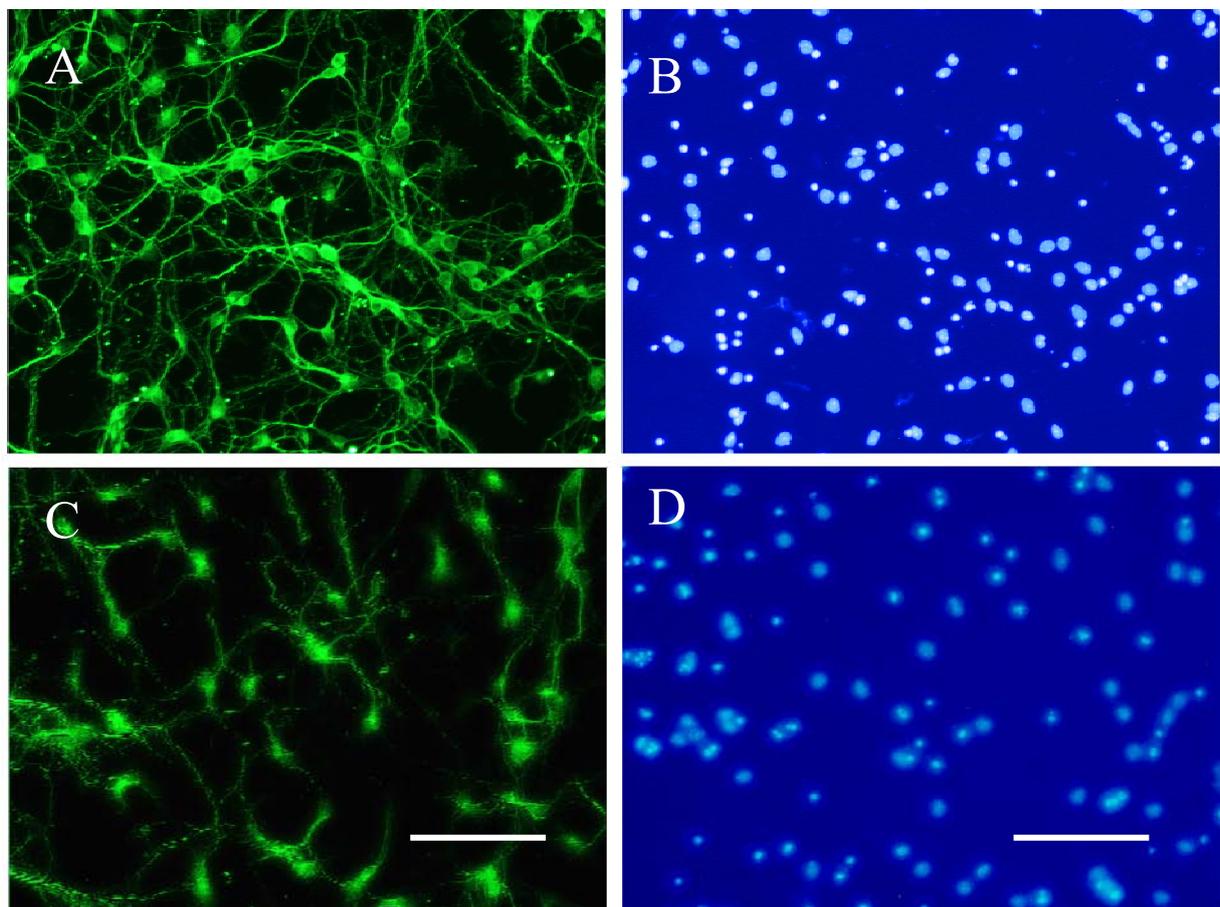


Figura 4.11 Microfotografías representativas y supervivencia celular de neuronas de córtex cerebral sembradas a 25000 células/cm² y cultivadas durante 4 días sobre un control de vidrio borosilicato-H (A y B) y una bicapa PEDOT/PPy-lisina 0.01M a pH 12 (C y D). A y C, tinción inmunocitoquímica Tau; B y D, tinción Hoechst del núcleo correspondiente a las células de A y C, respectivamente. Barra de escala = 50 μ m.

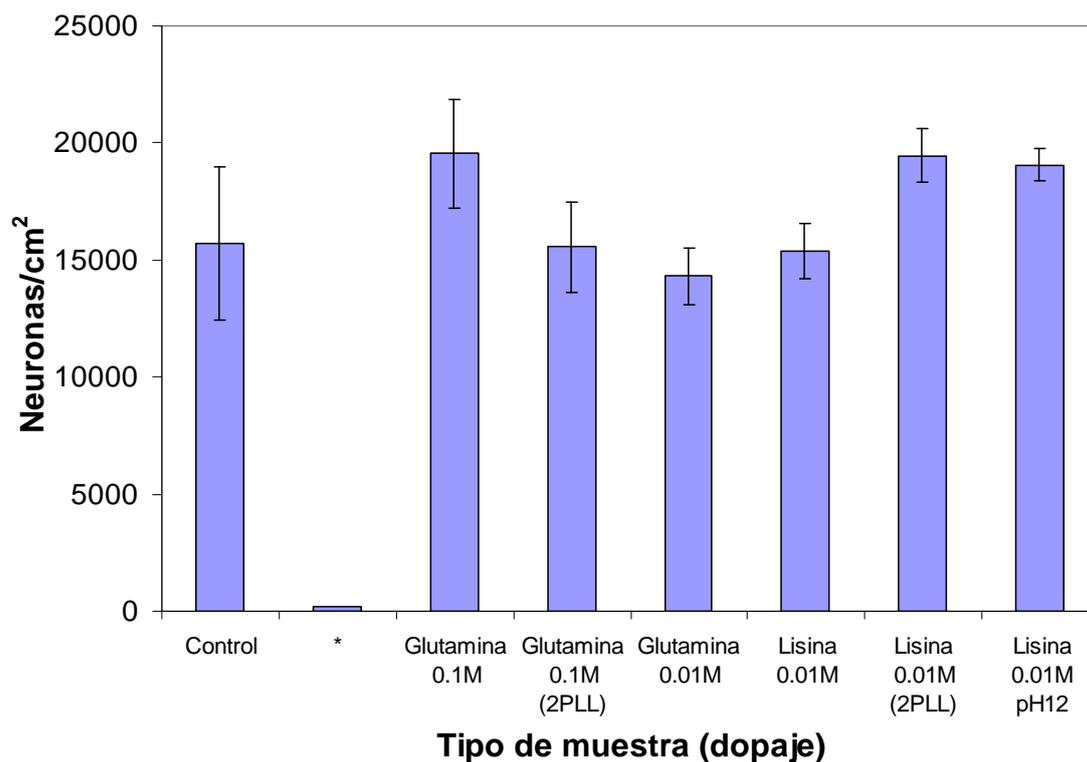


Figura 4.12 Estadística de supervivencia celular en cultivos de alta densidad (25000 células/cm²) después de 4 días *in Vitro* (DIV) de bicapas de PEDOT/PPy sintetizadas con aminoácidos, todas ellas a pH 7.4 excepto la especificada a pH 12: 2PLL indica las capas con el doble de concentración de PLL adherida a su superficie. * muestra los resultados de todas las capas dopadas con surfactantes, todas las monocapas de PEDOT dopadas con biomoléculas y las siguientes bicapas: PEDOT/PPy-glicina 0.1M, PEDOT/PPy-ácido glutámico 0.1M, PEDOT/PPy-glutamato sódico 0.1M y PEDOT/PPy-PLL 0.8 µg/ml.

Fueron las bicapas dopadas con dos tipos de aminoácidos, lisina y glutamina, las que dieron mejores resultados. En el resto de bicapas y en todas las monocapas, aunque la PLL se adhería bien y en el primer día de cultivo (1 DIV) las células se adherían y crecían bien, al día siguiente estas empezaban a retraerse y agruparse, y como resultado el día 3 de cultivo (3 DIV) las células se despegaban y morían. Por tanto a 4 días (4 DIV) los resultados no fueron satisfactorios.

Sin embargo las bicapas PEDOT/PPy dopadas con lisina y glutamina dieron resultados estadísticamente muy similares a los del control de vidrio borosilicato-H (Figura 4.12). A 4 DIV, la supervivencia celular era muy buena, con largos axones y buen aspecto del núcleo (Figura 4.11). Los estudios inmunocitoquímicos junto con la tinción nuclear Hoechst mostraron que a 4 DIV los cultivos contenían casi exclusivamente neuronas, y otras células solo representaban menos del 0.1% del total. Se probaron bicapas dopadas con glutamina a dos diferentes concentraciones: 0.1M y 0.01M, ambas a pH 7.4, y también se probaron capas dopadas con lisina 0.01M a dos pH diferentes: 7.4 y 12, todo ello con el fin de estudiar el efecto que el cambio de estos dos parámetros podían tener en los resultados de

los cultivos celulares. Aunque las diferencias no fueron grandes entre estos cuatro tipos de muestras, se observó un ligero mejor funcionamiento de las dopadas con glutamina 0.1M a pH 7.4 y de las dopadas con lisina 0.01M a pH 12. Los resultados obtenidos indican que la presencia de glutamina y lisina es beneficiosa para las células, por lo tanto al incrementar el pH en el caso de la lisina se incrementan las cargas negativas y aumenta la incorporación del aminoácido como ya se apuntó en el apartado 4.3, con el consiguiente beneficio celular. En el caso de la glutamina, el incremento de la concentración también podría producir este efecto. Además, en el apartado 4.5 se vio una mayor hidrofiliidad de estas muestras, lo que puede favorecer la adhesión de la PLL y por tanto también la adhesión celular. Los cultivos se realizaron con muestras de hasta 60 días de antigüedad, con lo cual se comprobó la estabilidad de estas capas para el buen funcionamiento en cultivos.

4.8.1 Efecto de la PLL adsorbida

La polilisina (PLL) es un polipéptido sintético que como se ha ido apuntando a lo largo de esta tesis, juega un papel muy importante en los cultivos celulares como fase adhesiva [31]. Los recubrimientos de PLL promueven la adhesión y el crecimiento celular en varios materiales mediante la mejora de las interacciones electrostáticas entre las membranas celulares y la superficie del sustrato [32,33]. El principio detrás de este método es que las moléculas de PLL se pueden adsorber fuertemente a la superficie sólida mediante interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas, cambiando la carga superficial de la muestra debido a las zonas catiónicas y mejorando la interacción electrostática con la membrana celular cargada negativamente. Este cambio en la carga superficial después de la adsorción de la PLL puede ser demostrado por medidas de ángulo de contacto como se vio en el apartado 4.5, haciendo este valor menor, más hidrofílico por tanto, lo que se debe a más carga catiónica en la superficie por la presencia de la PLL. Con el objetivo de aumentar la biocompatibilidad de las muestras se hizo un breve estudio de la adhesión de la PLL sobre la capa. Para ello los resultados obtenidos se compararon con los un material de conocida reproducibilidad como el óxido de iridio (IrO_x) [34]. Se observó cómo partiendo de una solución de la misma concentración de PLL ($4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) sobre la fase polimérica se adhería un 65% de PLL más sobre el IrO_x . Considerando los buenos resultados en supervivencia y desarrollo celular de este material, se consideró la cantidad de PLL adsorbida como un factor importante y se probó a incrementar la concentración de PLL adsorbida sobre las fases poliméricas. La microscopía confocal fluorescente junto con una PLL con fluorescente de isotiocianato (FITC-PLL, Sigma-aldrich) demostró que sí era posible incrementar la concentración de PLL sobre la superficie. De hecho al hacer el estudio con

una FITC-PLL con una concentración siete veces mayor ($28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) se conseguía una adhesión diez veces superior.

Por todo ello se hizo un cultivo de dos de las bicapas (lisina 0.01M a pH 7.4 y glutamina 0.1M pH 7.4) doblando la concentración de PLL, estudiando su efecto. Ello provocó una mejora de los resultados en el caso de la muestra dopada con lisina, pero el efecto contrario en el caso de la muestra dopada con glutamina (Figura 4.12). La diferencia de todas formas no es muy destacable, por lo que se cree que en el caso de estas muestras el incremento de la concentración de PLL en la superficie no es representativo de los factores esenciales que permiten el desarrollo y crecimiento/supervivencia neuronal.

Resultados alternativos en semicolaboración con el Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo (HNP) muestran que la simple adhesión de PLL extra mediante aplicación de campos eléctricos tampoco permite mejoras en cultivos de neuronas corticales, aunque sí para otras células en presencia de factores de crecimiento neuronal (NGF) [2].

4.9 Conclusiones

- Se utilizaron biomoléculas como contraión para la síntesis de polímeros conductores (PPy y PEDOT) con el objetivo de mejorar la biocompatibilidad y la supervivencia y crecimiento celular con resultados satisfactorios. Se confirmó la mejora que comporta usar una bicapa respecto a una monocapa [6].
- La síntesis resultó de menor eficiencia que la de las capas dopadas con surfactantes. Se observó como la síntesis a pH 12 fue diferente a las demás y con menor eficiencia, confirmando el efecto negativo de los pH alcalinos en la síntesis de polímero conductores [19]. Esto provocó que esa muestra tuviera resultados diferentes a nivel morfológico, electroquímico, etc.
- La síntesis por encima del punto isoeléctrico de los aminoácidos aumenta su carga negativa y facilita el dopaje de las capas.
- Las muestras son más rugosas que las dopadas con surfactantes. Se observó el aumento que la PLL provoca en la afinidad de las capas con los fluidos, y también se observó una buena adherencia de PLL a las capas. Además se confirmó la electroactividad de todas las capas.
- El aumento de la concentración de PLL adherida a la capa no tuvo efectos significativos en los resultados de los cultivos celulares de neuronas corticales, aunque parece haberlos producido con otro tipo de células según la colaboración con el HNP [2] si además se añadían factores de crecimiento neural (tema fuera de los objetivos de esta tesis).

- Las capacidades de carga de estas capas están entre 4 y 7 mC/cm², menores a las de las capas dopadas con surfactantes, pero aún adecuadas para su aplicación en electroestimulación.
- Los resultados de los cultivos celulares fueron muy satisfactorios con el uso de dos aminoácidos como dopantes: la glutamina y la lisina, y entre ellas la mejor fue una bicapa de PEDOT/PPy dopada con lisina 0.01M a pH 12, la de mayor concentración de dopante, con lo cual parece que una mayor concentración de la biomolécula dopante en la capa sea beneficioso para el comportamiento celular. Esto dará origen a nuevos trabajos en el marco de un proyecto recién iniciado.

4.10 Bibliografía

- [1] M. Asplund, H. von Holst and O. Inganäs. *Biointerphases* **3(3)** (2008).
- [2] J.E. Collazos-Castro, J.L. Polo, G.R. Hernández-Labrado, V. Padial-Cañete, C. García-Rama. *Biomaterials* **31** (2010) 9244-9255.
- [3] A. Gelmi, M.J. Higgins and G.G. Wallace. *Biomaterials* **31** (2010) 1974-1983.
- [4] R.T. Richardson et al. *Biomaterials* **28** (2007) 513-523.
- [5] M. C. Kum, K.A. Joshi, W. Chen, N.V. Myung and A. Mulchandani. *Talanta* **74** (2007) 370-375.
- [6] J.H. Collier, J.P. Camp, T.W. Hudson and C.E. Schmidt. *J. Biomed. Research* **50** (2000) 574-584.
- [7] H.K. Song, B. Toste, K. Ahmann, D. Hoffman-Kim and G.T.R. Palmore. *Biomaterials* **27** (2006) 473-484.
- [8] E. M. Stewart, X. Liu, G.M. Clark, R.M.I. Kapsa and G.G. Wallace. *Acta Biomaterialia* **8** (2012) 194-200.
- [9] B. Garner, A. Georgevich, A.J. Hodgson, L. Liu and G.G. Wallace. *J. Biomed. Mater. Research* **44** (1999) 121-129.
- [10] X. Cui, J. Wiler, M. Dzaman, R.A. Altschuler, D.C. Martin. *Biomaterials* **24** (2003) 777-787.
- [11] S. Yalçinkaya, C. Demetgül, M. Timur, N. Çolak. *Carbohydrate Polymers* **79** (2010) 908-913.
- [12] H.C. Li et al. *Macromol. Chem. Phys.* **26** (1995) 183-187.
- [13] V. Syritski, K. Idla and A. Opik. *Synthetic metals* **144** (2004) 235-239.
- [14] M. Deng et al. *Sensors and actuators B: chemical* **158** (2011).
- [15] A. Kotwal and C.E. Schmidt. *Biomaterials* **22** (2001) 1055-1064.

- [16] U.L. Zainudeen, M.A. Careem and S. Skaarup et al. *Sensors and actuators B* **134** (2008) 467-470.
- [17] D. Volodkin, V. Ball, J.C. Voegel, H. Möhwald, R. Dimova and V. Marchi-Artzner. *Journal of Controlled Release* **117** (2007) 111–120.
- [18] B. Paczosa-Bator, J. Migdalski and A. Lewenstam. *Electrochimica acta* **51** (2006) 2173-2181.
- [19] S. Shimoda and E. Smela. *Electrochimica acta* **44** (1998) 219-238.
- [20] M. Schmidt and S. Steinemann. *J. Anal. Chem.* **341** (1992) 412-415.
- [21] L. Ruangchuay, J. Schwank, A. Sirivat. *Applied Surface Science* **199** (2002) 128-137.
- [22] P. Tehrani, A. Kanciurzevska, X. Crispin, N.D. Robinson, M. Fahlman and M. Berggren. *Solid state ionics* **177** (2007) 3521-3527.
- [23] M.V. Murugendrappa et al. *Materials science and engineering A* **459** (2007) 371-374.
- [24] T.K. Vishnuvardhan, V.R. Kulkarni, C. Basavaraja and S.C. Raghavendra. *Bull. Mater. Sci.* **29** (2006) 77-83.
- [25] M. Omastova, M. Trchova, J. Kovarova and J. Stejskal. *Synthetic Metals* **138** (2003) 447-455.
- [26] Z. Liu, A. Rittermeier, M. Becker, K. Kähler, E. Löffler, and M. Muhler. *Langmuir* **27(8)** (2011) 4728-4733.
- [27] Z. H. Cheng, A Yasukawa, K. Kandori and T. Ishikawa. *Langmuir* **14(23)** (1998) 6681-6686.
- [28] J.E. Collazos-Castro et al. *Thin solid Films* **518** (2009) 160-170.
- [29] Y.J. Yuan, S.B. Adeloju and G.G. Wallace. *European Polymer Journal* **35**(1999) 1761-1772.
- [30] K. Naoi, Y. Oura, M. Maeda and S. Nakamura. *J. Electrochem. Soc.* **142**, No. 2 (1995).
- [31] D. Mazia, G. Schatten and W. Sale. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. *Journal of Cell Biology*, 1975. 66. 198-200.
- [32] M. Schmidt and S.G. Steinemann. *Fresenius J. Anal. Chem.* **341** (1992) 412-415.
- [33] S. Lakard, N. Morrand-Villeneuve, E. Lesniewska, B. Lakard, G. Michel, G. Herlem, T. Gharbi and B. Fahys. *Electrochimica acta* **53** (2007) 1114-1126.
- [34] A.M. Cruz et al. *J. of physical chemistry C* **116** (2012) 5155-5168.
- [35] D. Purves et al, ed. *Neuroscience* Sinauer Associates, Sunderland (2004).

Capítulo 5

Híbridos de polímeros conductores

En este capítulo se resumen los resultados obtenidos en la síntesis y caracterización de híbridos de los polímeros conductores polipirrol y PEDOT, dopados con compuestos inorgánicos, formando un compuesto polímero-molécula inorgánica que pueda aunar lo mejor de las propiedades de sus componentes, en un intento de mejorar las características de los polímeros en medios biológicos. Primero de todo se hace una breve introducción. Se enumera también a lo largo del capítulo su síntesis con perclorato y con ácido silicomolibdico, pero la mayor parte está dedicada a la descripción de polímeros sintetizados con tres compuestos de iridio: IrCl_3 , $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ y IrO_2 . Así pues se divide el estudio en tres tipos de materiales principales: polímero- IrCl_3 y polímero- $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ en forma de capa fina sintetizados electroquímicamente, de los cuales se realiza una breve introducción y se describe la síntesis, para continuar con su análisis estructural, microestructural y electroquímico, y después se detallan los cultivos neuronales realizados con estas capas. A continuación se detalla la síntesis química de polvos de polipirrol con IrCl_3 y $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ y se realiza su análisis estructural. Por último se describe la obtención hidrotermal de polvos compuestos de polipirrol y PEDOT con IrO_2 , se realiza su caracterización morfológica, su análisis estructural y su caracterización electroquímica, para acabar con un estudio MTT sobre su citotoxicidad y las conclusiones del capítulo.

5.1 Compuestos polímero-molécula inorgánica

El estudio de materiales híbridos orgánico-inorgánico es un campo prolífico y que ha dado muchos frutos en los últimos años. En particular, en el caso de los nanocompuestos que nos ocupan, hablamos de materiales compuestos por dos o más objetos nanométricos con unas propiedades físicas únicas que superan la simple suma de las propiedades de los componentes [1]. Las propiedades finales del material compuesto pueden ser controladas mediante los procedimientos de síntesis y propiedades de los materiales implicados en el producto final [2]. Las aplicaciones de este tipo de materiales son muy amplias, por ejemplo los compuestos híbridos de polímeros conductores y nanopartículas inorgánicas (*e.g.*, Pt, Pd, Zr(HPO₄)₂, MoO₃, Mo₃Se₃, γ -Fe₂O₃ y IrO₂) presentan aplicaciones en campos como la electrocatálisis [3-4], dispositivos de almacenamiento energético como supercondensadores electroquímicos [5], sensores [6], cátodos de baterías [7], microelectrónica [8], materiales magnéticos [9] y dispositivos electroquímicos [10].

Las aplicaciones biomédicas estudiadas en esta tesis también se pueden beneficiar del uso de materiales híbridos orgánico-inorgánico, en vista de lo observado en capítulos anteriores. Un ejemplo claro es la interacción establecida entre el polipirrol y los nanotubos de carbono como materiales compuestos, con los cuales ya se han obtenido buenos resultados siendo usados como electrodos para interfaces neuronales en sondas neuronales implantables [11]. Uno de los metales cuyos compuestos dan mejores resultados en aplicaciones neuronales es el Ir, en concreto su óxido se ha utilizado con éxito como soporte para adhesión y crecimiento de células neuronales [12,13] y como recubrimiento en electrodos de electroestimulación médica [14]. Por otro lado, en cuanto a materiales orgánicos dos de los que tienen una más alta biocompatibilidad y que mejor han funcionado en estas aplicaciones son los polímeros conductores tratados en esta tesis: polipirrol y PEDOT [15,16], de los cuales el mejor comportamiento lo hemos encontrado nosotros mismos con aminoácidos. Por consiguiente, se pensó en un nanomaterial orgánico-inorgánico compuesto por los elementos mencionados como un material con propiedades prometedoras en el área de las aplicaciones biomédicas, y en concreto en el sistema nervioso y en los cultivos neuronales. Los compuestos de iridio son mecánicamente demasiado rígidos por sí solos, por lo que su uso junto a polímeros conductores dará al sistema final más flexibilidad, lo cual es necesario para el uso de estos materiales como dispositivo de reparación en seres vivos, pues ambos tipos de materiales se complementan y forman un material final con propiedades mejoradas.

También otras áreas de investigación se podrían beneficiar de la mezcla del polipirrol o PEDOT con por ejemplo el IrO₂, ya que los tres materiales tienen posibles aplicaciones en

dispositivos energéticos (*e.g.*, energía fotovoltaica, supercondensadores), dispositivos electrocrómicos y sensores [17-29].

En este capítulo se estudió la síntesis de materiales compuestos de polipirrol o PEDOT y óxido de iridio (IrO_2), cloruro de iridio ($\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) y hexanitroiridato de potasio ($\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$). En concreto en los dos últimos casos se pudo sintetizar el híbrido electroquímicamente dando capas de PEDOT y PPy dopadas con cloruro de iridio hidratado y con hexanitroiridato de potasio. El primero de ellos se eligió debido a su contrastado papel en la síntesis de óxidos de iridio mediante oxidación [12], y con el segundo se intentó evitar la contaminación con Cl^- , que suele ser nociva biológicamente y genera Cl_2 en oxidaciones electroquímicas.

Se hicieron por otra parte dos tipos de síntesis química: 1) a temperatura ambiente de polipirrol y PEDOT mezclando los monómeros de estos con $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ y con $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$, donde estos últimos actuaron como agente oxidante, dando como resultado a los varios días el polímero en forma de polvo, 2) hidrotermal de polipirrol o PEDOT con IrO_2 , siendo este el agente oxidante, y dando como resultado también un producto en forma de polvo, del cual se hizo un estudio de la citotoxicidad.

Además se sintetizaron electroquímicamente capas de polímero dopadas con otros compuestos que no fueron de iridio como el ácido silicomolibdico hidratado $\text{H}_4[\text{SiMo}_{12}\text{O}_{40}] \cdot x\text{H}_2\text{O}$ del grupo de los polioxometalatos y el perclorato de sodio (NaClO_4), ambos ampliamente usados en la síntesis de polipirrol y PEDOT [30-32], para observar las diferencias entre estos y los de iridio a nivel de cultivos celulares.

5.2 Obtención electroquímica de capas de polímero- IrCl_3 y polímero- $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$

La síntesis de las capas se realizó con la misma celda y electrodos que en el apartado anterior tal y como se explica en el apartado 2.1.1. La disolución usada contenía siempre 8mM para el $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich), 3mM para el $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ (Aldrich, 99.9%), 0.01M para el EDOT y 0.1M para el pirrol. Las capas de polipirrol se doparon con los dos compuestos de iridio a un potencial constante de 0.6V vs Pt hasta una carga de 900mC y las capas de PEDOT dopadas con los mismos compuestos a un potencial de 1V vs Pt hasta la misma carga. Siempre se utilizó agua destilada milliQ como disolvente. Así pues las capas sintetizadas fueron: PPy- IrCl_3 , PPy- $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ y PEDOT- IrCl_3 , PEDOT- $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$.

El iridio es un elemento que puede poseer valencia mixta, y que forma una gran variedad de complejos, por ejemplo en agua se puede encontrar formando varios hidróxidos $\text{Ir}(\text{OH})_x$ o oxohidróxidos dependiendo del grado de hidrólisis [12,33]. Ello hace muy complicado

identificar cuales son exactamente las especies que se forman al disolver el IrCl_3 y el $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ en agua, pero muy probablemente formen aniones hidratados que sirvan como contraión en la síntesis de los polímeros.

En la Figura 4.1 se pueden apreciar las curvas I vs t de síntesis de estas 4 capas a potencial constante, todas ellas mantienen una corriente bastante parecida durante todo el proceso con un valor de I relativamente constante. Hay que decir que al igual que sucedía con las muestras dopadas con surfactantes no hubo dos síntesis con los mismos valores de corriente, aunque sí parecidos, por lo que la síntesis no tiene una alta reproducibilidad. También en este caso se describen sobre la capa unos patrones de interferencia causados por el campo eléctrico muy parecidos a los descritos en el apartado 3.1.1, que también varían de forma en función del polímero y el contraión utilizado.

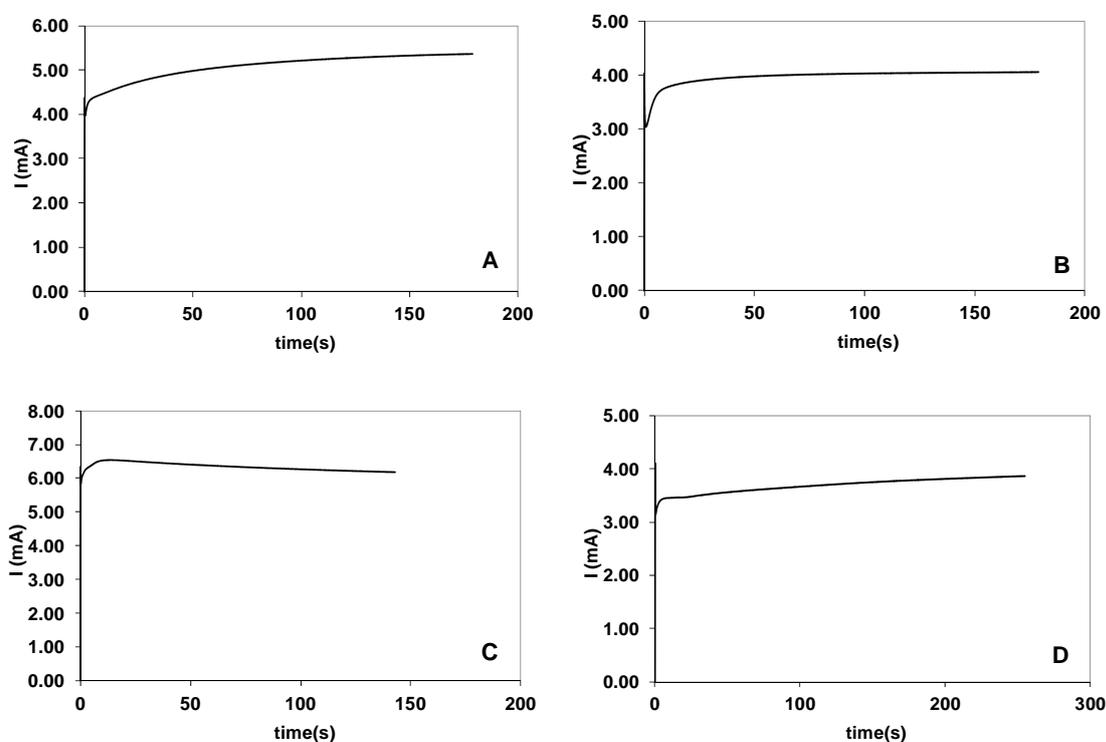


Figura 5.1 Curvas I vs t de síntesis correspondientes a: A) PPy dopado con $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 8mM, B) PPy dopado con $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ 3 mM C) PEDOT dopado $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 8mM, D) PEDOT dopado con $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ 3 mM.

Para las muestras dopadas con compuestos de iridio no se consideró primordial realizar experimentos de modulación electroquímica debido al nulo efecto que estos tuvieron en los cultivos celulares de las muestras dopadas con surfactantes.

Se realizaron también procesos de electrodeposición de forma potenciodinámica de la misma disolución de pirrol e IrCl_3 para obtener también una capa de PPy- IrCl_3 y estudiar la posible formación de IrO_2 en la capa mediante un proceso dinámico [12,48]. En este caso

el potencial se cicló entre OCP y 1V vs Pt a 20 mV/s durante 20 ciclos. Su respuesta I vs t durante la síntesis (Figura 5.2) describe cómo todos los ciclos son muy parecidos y la corriente aumenta de forma lineal con el potencial.

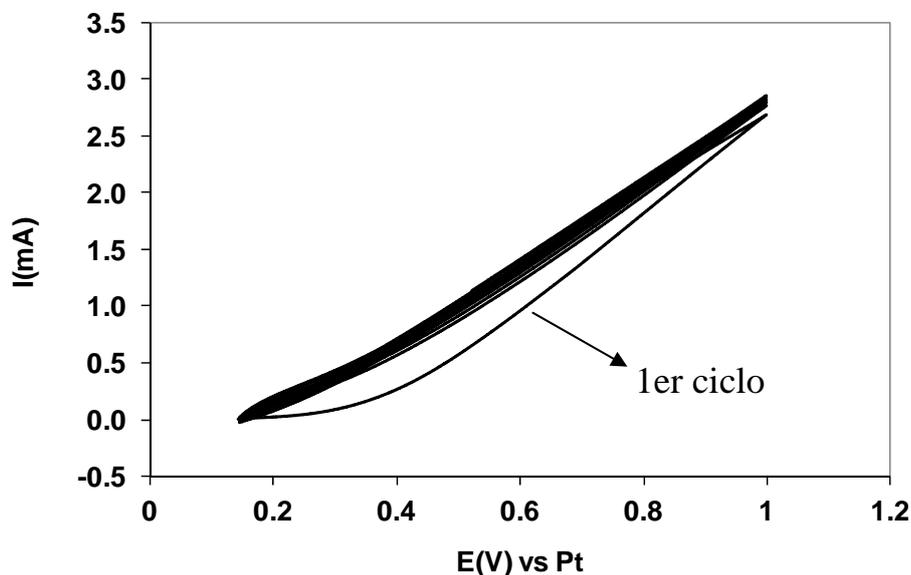


Figura 5.2 Curva I vs E de síntesis de una capa de PPy 0.1M dopado con $\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ 8mM, de OCP a 1V vs Pt, a 20mV/s. 20 ciclos.

Una vez obtenida, la capa se despegó del soporte y se analizó mediante un microscopio electrónico de transmisión (TEM) y difracción de electrones. Con ello se confirmó la formación de IrO_2 policristalino (Figura 5.3). En concreto, mediante el análisis de los planos de la estructura descrita en la Figura 5.3 A, se encontró una estructura rutilo que se correspondía con la celda tetragonal del grupo espacial de simetría $P 4_2/m n m$ del IrO_2 , con $a = 4.5051$, $b = 4.5051$, $c = 3.1586$ y $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Ello demuestra la formación de un híbrido PPy- IrO_2 .

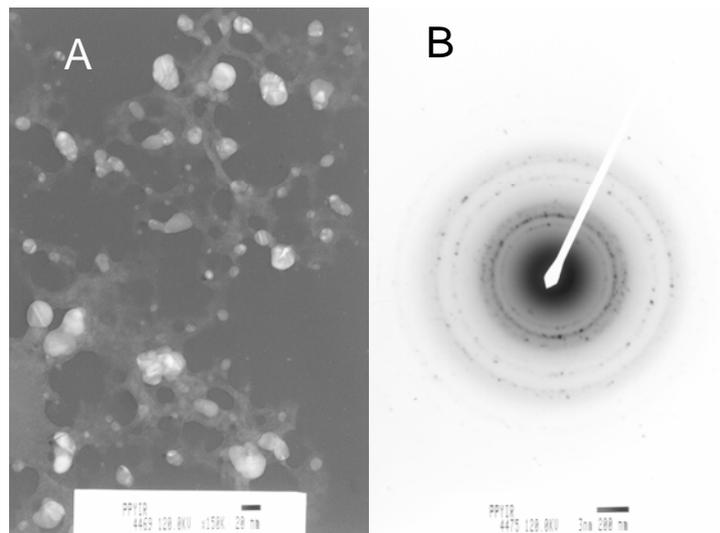


Figura 5.3 Imágenes obtenidas en el microscopio TEM: A) Detalle de partículas de IrO_2 dentro de la capa de PPy-IrCl_3 y B) fotografía de difracción de electrones del IrO_2 de la imagen A.

5.2.1 Procesos de síntesis de las capas: Balanza electroquímica de cuarzo (EQCM)

El estudio de la síntesis de las capas de polímero dopadas con compuestos de iridio reveló un comportamiento muy dispar en función del tipo de polímero y el tipo de dopante. Se hicieron las mismas consideraciones teóricas que en los apartados 3.1.5 y 4.3, con pesos moleculares teórico por unidad polimérica de las capas de PPy-IrCl_3 de 165.6 g/mol, 260.3 g/mol para las de $\text{PPy-K}_3\text{Ir(NO}_2)_6$, 240.7 g/mol para las de PEDOT-IrCl_3 y 335.4 g/mol para las de $\text{PEDOT-K}_3\text{Ir(NO}_2)_6$. Con este dato y la relación entre frecuencia y masa que se obtiene con la ecuación de Sauerbrey (2.3) se pueden saber los moles de polímero depositados sobre el cristal de cuarzo. A partir de la carga utilizada en esa síntesis podemos saber la relación moles de e^- /moles de unidad de PPy de cada una de las deposiciones, las cuales deberían ser idealmente 2.33. En la medida que el dato se aleje de esta cifra se tendrá una idea de la eficiencia del proceso o de la identidad de los aniones dopantes si hay una disparidad notable. La eficiencia se medirá a través de un porcentaje: $[2.33/\text{dato experimental}] \times 100$ (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Resultados teóricos y experimentales del análisis de la síntesis de capas de PPy-IrCl₃, PPy-K₃Ir(NO₂)₆, PEDOT-IrCl₃ y PEDOT-K₃Ir(NO₂)₆ mediante EQCM.

	PPy-IrCl ₃	PPy-K ₃ Ir(NO ₂) ₆	PEDOT-IrCl ₃	PEDOT-K ₃ Ir(NO ₂) ₆
Mol e ⁻ /Mol unidad de polímero si PM teórico	2.06±0.60	35.27±2.22	4.73±0.33	7.37±0.73
Ratio Moles teóricos/experimentales (n)	1.13	0.06	0.49	0.32
Eficiencia Proceso	113%	6%	49%	32%

La variabilidad de los datos expuestos en la Tabla 5.1 los convierte en valores ilógicos, por lo que se hace evidente que no son exactamente esos los aniones intercalados, salvo en el caso del PPy-IrCl₃ que se acerca al 100%.

En base a la idea teórica de la deposición, en la síntesis de la capa de PPy-IrCl₃ se obtiene un número menor a 2.33, lo que evidencia que la especie insertada puede proceder de la hidrólisis parcial del cloruro. Por otro lado, la cantidad de agua incorporada puede ser muy alta. Un aspecto a tener en cuenta en la síntesis de las capas dopadas con IrCl₃ es su menor pH debido a la hidrólisis, que facilita la formación del polímero [50].

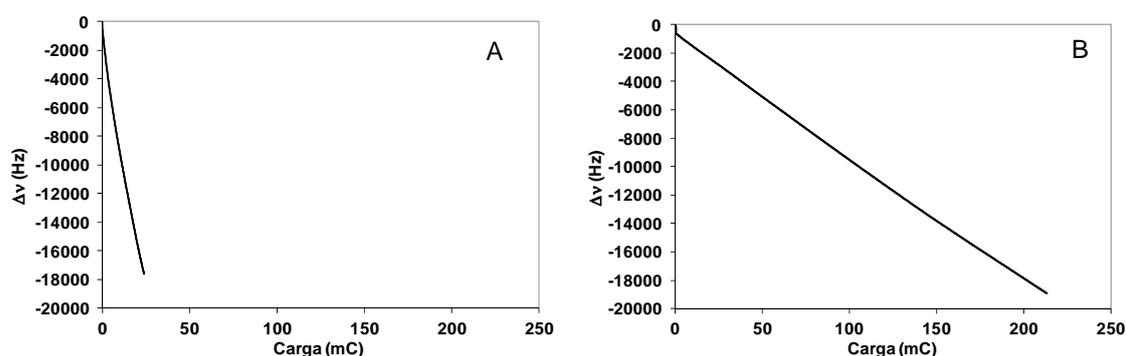


Figura 5.4 Curvas de la evolución de la frecuencia registrada por la EQCM (proporcional a la masa depositada) con respecto a la carga de síntesis correspondientes a: A) síntesis de PPy dopado con IrCl₃·xH₂O 8mM, B) PPy dopado con K₃Ir(NO₂)₆ 3 mM.

En la Figura 5.4 se hace una comparativa entre dos procesos muy dispares y se observa como uno de ellos (PPy-K₃Ir(NO₂)₆) necesita casi 10 veces más carga para depositar una

cantidad de masa parecida. La poca eficiencia de los polímeros dopados con hexanitroiridato ya da una idea de su alto grado de impurezas confirmado en el apartado siguiente.

5.2.2 Análisis de superficie (XPS)

El análisis de composición superficial de las capas mediante XPS reveló la presencia de los elementos habituales de los polímeros conductores como el C, O, N y S. Sin embargo, en estas capas también se encontraron elementos correspondientes a los contraiones utilizados como el Ir y el Cl (Figura 5.5).

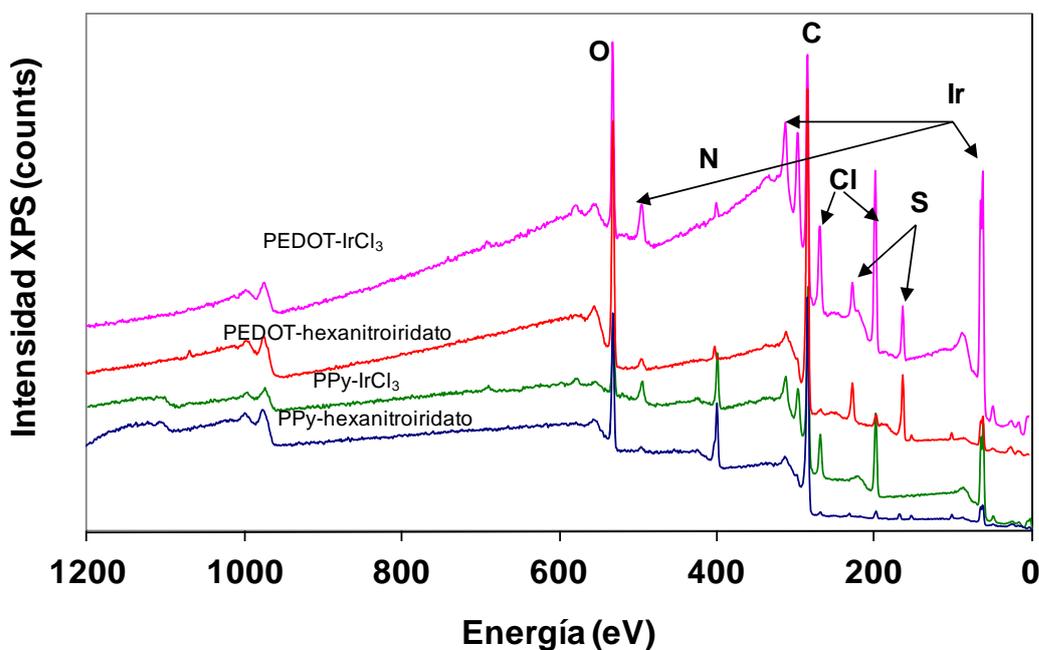


Figura 5.5 Espectro XPS general de capas de PPy-IrCl₃ y PPy-K₃Ir(NO₂)₆ depositadas a 0.6 V vs Pt y PEDOT-IrCl₃ y PEDOT-K₃Ir(NO₂)₆ depositadas a 1 V vs Pt.

Los resultados de la cuantificación atómica de los espectros XPS mostrados en porcentajes molares de los elementos (Tabla 5.2) muestra que para las capas dopadas con IrCl₃ efectivamente se encuentran 3 átomos de cloro por cada uno de iridio, confirmando la existencia de un tricloruro de aniónico o un IrO_xCl_{3^{-x/2}}. El análisis de las muestras en las que se trabajó con K₃Ir(NO₂)₆ se encontraba siempre una impureza de cloro que finalmente

se confirmó que procedía del compuesto de iridio comercial mediante un análisis fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (EDX) realizado en el microscopio electrónico de barrido (SEM) estudiando producto comercial. Por ello se trabajó con esta sustancia teniendo en cuenta la posibilidad de un alto grado de impurezas. Por otro lado también se encuentra S en la muestra de PPy-hexanitroiridato. Ello se volvió a confirmar utilizando el contenido de N o S (en PPy o PEDOT respectivamente) expresado en la Tabla 5.1. El cálculo del contenido de carbono que teóricamente debían tener las muestras, derivado de multiplicar el N o S por 4 (PPy) o 6 (PEDOT) carbonos que tienen los monómeros tuvo en cuenta ese factor. La diferencia de este dato con la cantidad total de carbono obtenida con el análisis XPS da una idea del exceso de carbono de cada muestra, que en gran parte es debido a las impurezas. Este valor es de alrededor del 30% para las capas dopadas con hexanitroiridato y del 20% en las capas dopadas con IrCl_3 . Se puede utilizar el mismo procedimiento para hallar el exceso de oxígeno en las capas, que también puede ser debido a impurezas provenientes del hexanitroiridato o de la contaminación atmosférica, pero que en su mayor parte provendrán del agua como explicaremos más adelante en este apartado. Así pues en las muestras de PPy-hexanitroiridato hay un 6.2% correspondiente exceso de oxígeno, en las de PEDOT- IrCl_3 un 3% y en las de PEDOT-hexanitroiridato un 5.1%. En el caso del PPy- IrCl_3 el 9.7% de oxígeno encontrado es debido a impurezas o agua, ya que ninguno de los compuestos implicados contiene O. Todos estos datos apuntan a unas muestras con alto contenido en agua. Y se puede decir que el uso de hexanitroiridato introduce variables poco controlables.

En estas capas se puede calcular el grado de dopaje a partir de la relación Ir/N o Ir/S según sea PPy o PEDOT (Tabla 5.2). Así pues la capa de PPy- IrCl_3 tiene un grado de dopaje de 0.29, que está dentro del rango teórico de dopaje explicado en el apartado 3.1, sin embargo la capa de PEDOT dopada con IrCl_3 tiene un dopaje de 0.95, lo cual implicaría una presencia muy alta de dopante en la superficie. Las capas dopadas con hexanitroiridato presentan un grado de dopaje en torno al 0.1, lo que hace pensar en una baja cantidad de dopante en la superficie o en el alto grado de impurezas de este compuesto antes comentado, y ya evidencian que este complejo no resultará adecuado ya que introduce variables poco controlables.

Al igual que en los capítulos anteriores se realizó la deconvolución de los espectros C 1s y O 1s de todas las muestras que se pueden observar en las Figuras 5.6 y 5.7, además de los de N 1s y S 2p para PPy y PEDOT respectivamente.

Tabla 5.2 Cuantificación molar expresada en porcentajes de los picos del espectro general de XPS de capas de PPy-IrCl₃ y PPy-K₃Ir(NO₂)₆ depositadas a 0.6 V vs Pt y PEDOT-IrCl₃ y PEDOT-K₃Ir(NO₂)₆ depositadas a 1 V vs Pt.

Muestra	C 1s	O 1s	N 1s	S 2p	Cl 2p	Ir 4f	Ir/N	Ir/S
PPy-IrCl ₃	64.3	9.7	11.7	-	10.8	3.4	0.29	-
PPy-K ₃ Ir(NO ₂) ₆	70.2	14.6	13.6	0.9	-	0.7	0.05	-
PEDOT-IrCl ₃	57.5	15.2	-	6.1	15.4	5.8	-	0.95
PEDOT-K ₃ Ir(NO ₂) ₆	73.2	18.5	-	6.7	0.9	0.7	-	0.10

Las cuantificaciones en porcentajes molares de cada uno de los componentes del espectro C 1s de las capas se pueden observar en la Tabla 5.3, cuyos resultados apuntan a una cantidad mucho mayor de carbono alifático (hidrofóbico) que el observado en otros casos. A su vez esto se verá refrendado en los resultados de ángulo de contacto. El componente C2 del espectro C 1s corresponde en el caso del PPy casi íntegramente al enlace C-N del pirrol ya que el porcentaje de este componente en el contenido total de la muestra (contenido total de C x porcentaje C2) es muy cercano al contenido total de nitrógeno (7.7% de C2 en el total de la muestra por 11.7% de contenido total de nitrógeno para la muestra de PPy-IrCl₃ y 12.3% de C2 por 13.6% de nitrógeno para la muestra de PPy-K₃Ir(NO₂)₆). Sin embargo la contribución de C2 en el caso del PEDOT se debe tanto al enlace C-S como al típico enlace C-O-C de este polímero. El componente C3 solo se observa para la capa de PPy-IrCl₃ y la de PEDOT- K₃Ir(NO₂)₆, y se debe a una ligera sobreoxidación del polímero y a la contaminación.

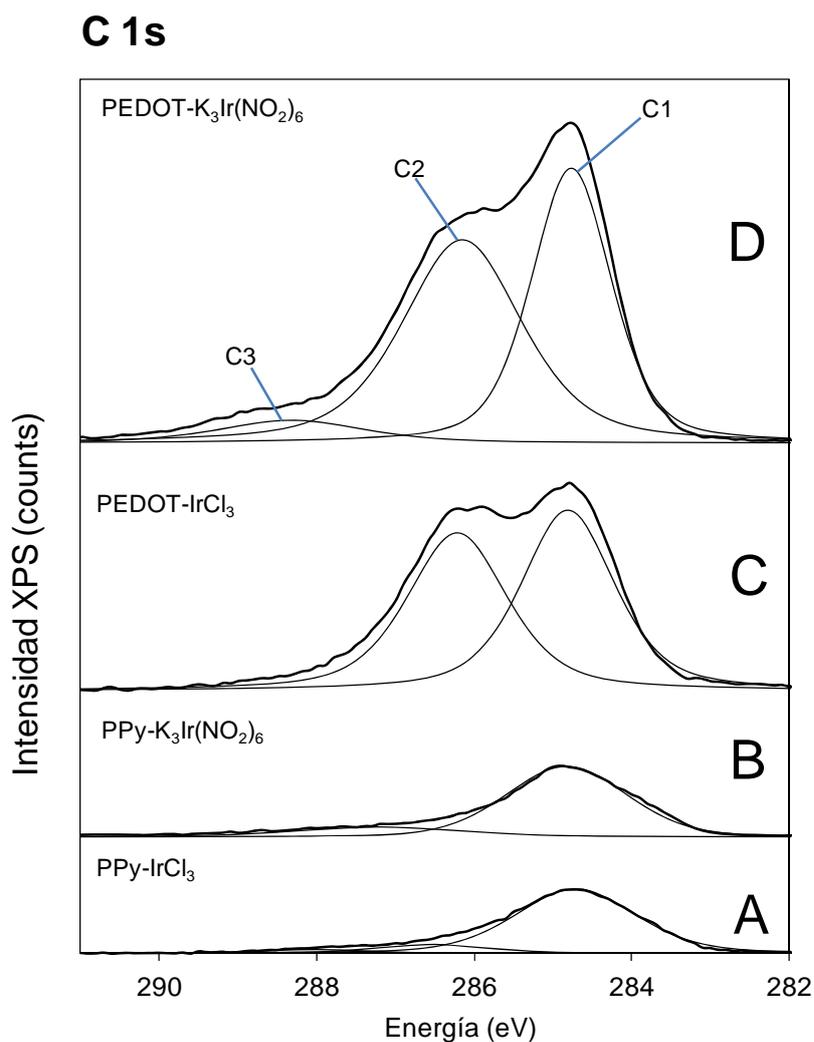


Figura 5.6 Deconvolución de los espectros XPS del C 1s de las capas de: A) PPy-IrCl₃ depositada a 0.6V vs Pt, B) PPy-K₃Ir(NO₂)₆ depositada a 0.6V vs Pt, C) PEDOT-IrCl₃ depositada a 1 V vs Pt, D) PEDOT- K₃Ir(NO₂)₆ depositada a 1 V vs Pt.

Tabla 5.3 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal C 1s para capas de PPy-IrCl₃ y PPy-K₃Ir(NO₂)₆ depositadas a 0.6 V vs Pt y PEDOT-IrCl₃ y PEDOT- K₃Ir(NO₂)₆ depositadas a 1 V vs Pt.

	C1: C-C/C-H		C2: C-N/C-S/C-O-C		C3: C=O/C-O	
	Posición (eV)	Molar %	Posición (eV)	Molar %	Posición (eV)	Molar %
PPy-IrCl ₃	284.7	84.4	286.5	11.4	288.0	4.2
PPy- K ₃ Ir(NO ₂) ₆	284.7	82.5	287.1	17.5	-	-
PEDOT- IrCl ₃	284.8	51.7	286.2	48.3	-	-
PEDOT- K ₃ Ir(NO ₂) ₆	284.8	43.2	286.2	49.9	288.3	6.9

La cuantificación de la deconvolución del pico O 1s da como resultado los datos expuestos en la Tabla 5.4. Como se comentó anteriormente, el oxígeno encontrado en la capa de PPy-

IrCl_3 es debido al agua necesariamente o a la hidrólisis parcial del Ir, pero se puede ver que la componente O1 es importante y esto es debido a la ligera sobreoxidación de la capa. En la capa de PPy dopada con hexanitroiridato la mayor parte del oxígeno es debido al oxígeno de red, es decir, a los enlaces N-O del NO_2^- dopante, el resto es debido al agua.

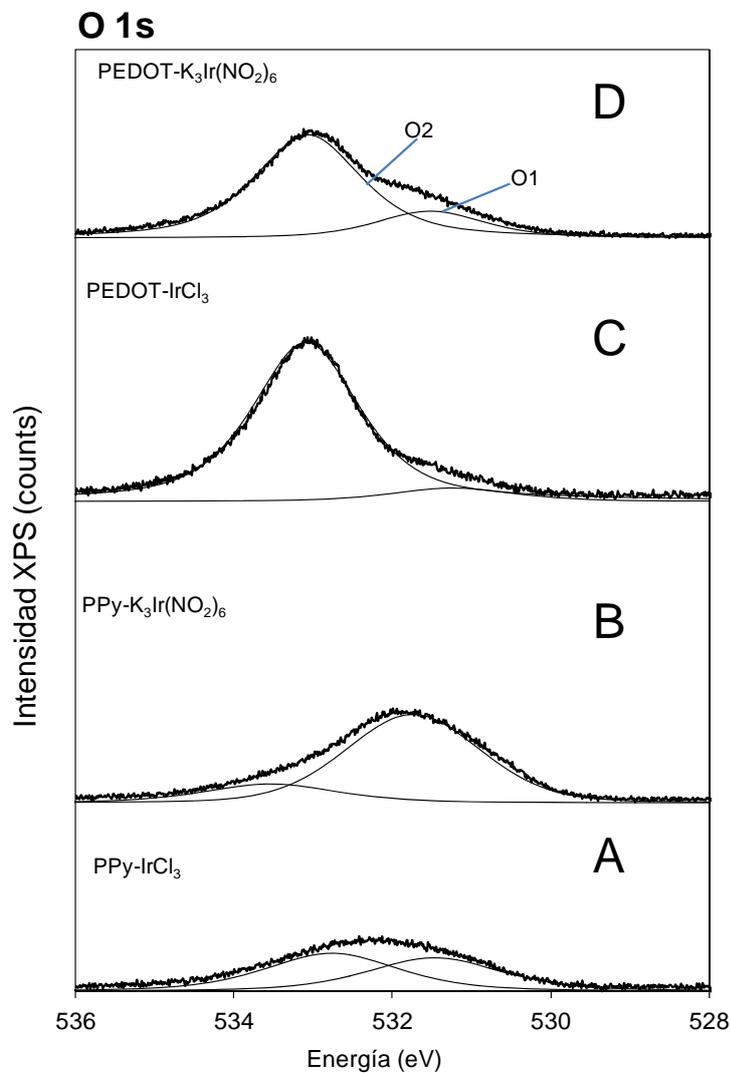


Figura 5.7 Deconvolución de los espectros XPS del O 1s de las capas de: A) PPy-IrCl₃ depositada a 0.6V vs Pt, B) PPy-K₃Ir(NO₂)₆ depositada a 0.6V vs Pt, C) PEDOT-IrCl₃ depositada a 1 V vs Pt, D) PEDOT- K₃Ir(NO₂)₆ depositada a 1 V vs Pt.

En la comparación se observa la similitud de las dos capas de PEDOT de un lado y las dos de PPy entre sí. En el primer caso se observa una muy significativa cantidad de grupos hidratados, que se confirma en el análisis de hidrofiliidad del apartado 5.2.4, donde estas capas presentan una gran afinidad a los fluidos. Esto puede ser debido una hidrólisis del iridio mucho mayor que en caso del otro contraíón.

Tabla 5.4 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal O 1s para capas de PPy-IrCl₃ y PPy-K₃Ir(NO₂)₆ depositadas a 0.6 V vs Pt y PEDOT-IrCl₃ y PEDOT- K₃Ir(NO₂)₆ depositadas a 1 V vs Pt.

	O1: Oxígeno de red/C=O		O2: Oxígeno hidratado/C-O-C	
	Posición (eV)	Molar %	Posición (eV)	Molar %
PPy-IrCl ₃	531.5	46.5	532.8	53.5
PPy- K ₃ Ir(NO ₂) ₆	531.6	80.5	533.4	19.5
PEDOT- IrCl ₃	531.2	8.2	533.1	91.8
PEDOT- K ₃ Ir(NO ₂) ₆	531.5	20.0	533.1	80.0

También se realizó la deconvolución del pico N 1s para las muestras de PPy, en el caso de la dopada con IrCl₃ se encontró un 83.1% de un componente a 400.0 eV correspondiente al nitrógeno neutral de la amina típico del pirrol (N-H), el 16.9% restante pertenece al nitrógeno de la amina positivamente cargado N⁺, que cuenta con un hueco localizado en esta escala de tiempo responsable de la conductividad. En el caso de la capa dopada con hexanitroiridato se encuentra un 70.9% de nitrógeno neutro, un 11.7% de N⁺ y un 17.4% de un tercer componente de un nitrógeno con dos cargas positivas (N²⁺). Estas estructuras cargadas son las responsables de la conductividad de los polipirroles como ya se apuntó en el capítulo 3. En los picos S 2p del PEDOT solo se encontró la contribución del azufre del polímero [34-38].

5.2.3 Análisis de infrarrojos (ATR)

El espectro ATR mostrado en la Figura 5.8 confirma una vez más el gran contenido en agua de estas muestras, que se aprecia por la curvatura amplia y de gran señal en el rango de 4000-2000 cm⁻¹. Debido a la conductividad del polímero, representativa de la existencia del polarón (apartado 1.4) [65], se hace difícil poder apreciar con nitidez los picos típicos de PEDOT y PPy que se encuentran en el rango 1750-750 cm⁻¹. Sin embargo, las dos muestras de PEDOT tienen los mismos picos y lo mismo pasa entre las de PPy, lo que indica iguales estados de oxidación. En el caso de este último la banda a 800 cm⁻¹ corresponde a la vibración fuera del plano del enlace C-H. La banda en 1030 cm⁻¹ muestra la señal de la vibración en el plano del enlace =C-H. Otra banda de absorción en 1280 cm⁻¹ corresponde a la vibración de deformación de los enlaces C-H y N-H. La banda de absorción de la vibración de estiramiento del enlace C-N característico del pirrol se

encuentra en 1450 cm^{-1} y en 1150 cm^{-1} . Finalmente, la banda en 1520 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento de C-C y C=C [39-40].

Para el PEDOT se encuentran igualmente varios de sus picos característicos como la banda en 880 cm^{-1} , que corresponde al modo de vibración del enlace C-S en el anillo de tiofeno, la banda en 950 cm^{-1} debida a la deformación del anillo del etilendioxi, las bandas en 1000 y 1150 cm^{-1} debidas a los modos de estiramiento también del grupo etilendioxi y finalmente las bandas en 1270 y 1500 cm^{-1} , que son atribuidas a la vibración de estiramiento de los enlaces C=C, C-C y C-S del anillo de tiofeno [41-42]. El pico a 2350 cm^{-1} se debe a la absorción de CO_2 e indica contaminación atmosférica [43].

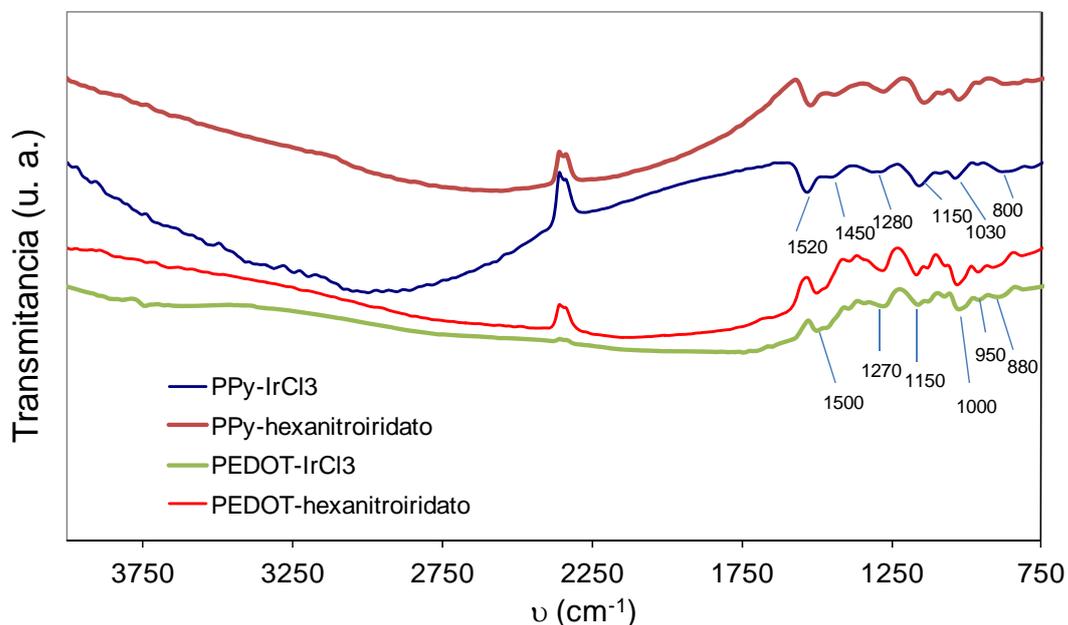


Figura 5.8 Espectros de ATR de la capas de PPy-IrCl₃ y PPy-K₃Ir(NO₂)₆ depositadas a 0.6 V vs Pt y PEDOT-IrCl₃ y PEDOT- K₃Ir(NO₂)₆ depositadas a 1 V vs Pt.

5.2.4 Análisis Microestructural

5.2.4.1 AFM

Las imágenes de AFM mostradas en la Figura 5.9 revelan una microestructura globular para todas las capas analizadas, común a todas las capas poliméricas preparadas, como se muestra en capítulos anteriores.

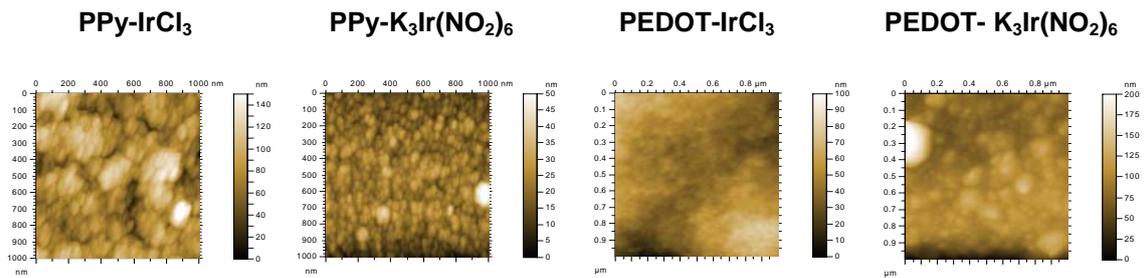


Figura 5.9 Figuras de AFM de las capas especificadas. Cada imagen presenta su propia escala de color adecuada al tamaño.

El análisis de las imágenes de la Figura 5.9 correlacionada con la Tabla 5.5 muestra rugosidades bastante dispares, siendo las de PPy- $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ y la de PEDOT- IrCl_3 las capas menos rugosas y con menor tamaño de grano. Al igual que sucedía en los capítulos anteriores no se encontró una relación clara entre rugosidad y la supervivencia celular.

5.2.4.2 Ángulo de contacto

Los datos de hidrofiliidad revelan, junto al gran espesor de las capas el alto contenido en agua de las de PEDOT. La capa de PPy- $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ es la más hidrofóbica y por tanto la que menos agua contiene, como demuestra la deconvolución del pico O 1s de esta capa. Al igual que en los capítulos 3 y 4 los datos de afinidad de las muestras con el medio de cultivo era mayor que con el agua, y la adhesión de PLL en la superficie también hacía aumentar la afinidad de la capa con los fluidos como era de esperar. Un dato a tener en cuenta es que ha sido la muestra de PPy- $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ la de mejores resultados a nivel de cultivos celulares, mientras que en el caso de las muestras dopadas con aminoácidos hubo muestras con menor hidrofiliidad y mayor rugosidad que funcionaron mucho mejor en términos de supervivencia celular. Por ello, aunque la topografía y la afinidad con los fluidos pueden ser factores que tengan una cierta influencia en los cultivos celulares no parecen ser tan determinantes como el tipo de dopante utilizado en la síntesis.

Tabla 5.5 Datos microestructurales extraídos del análisis AFM de las capas: Rugosidad, Distancia pico valle y tamaño de grano. Datos de grosor obtenidos mediante imágenes de SEM. La columna de ángulo de contacto describe la hidrofiliicidad de la capa medida mediante un goniómetro.

Muestra	Grosor de capa (nm)	Rugosidad RMS (nm)	Distancia pico-valle (nm)	Tamaño de grano (nm)	Ángulo de contacto H ₂ O (deg)	Ángulo de contacto medio (deg)
PPy-IrCl ₃	650	20.9	168.9	43±12	65.1±0.3	52.9±0.3
PPy-K ₃ Ir(NO ₂) ₆	360	6.0	59.8	31±11	80.2±1.6	79.6±3.9
PEDOT- IrCl ₃	750	12.5	79.3	26±9	39.1±0.4	34.2±0.6
PEDOT-K ₃ Ir(NO ₂) ₆	800	25.3	222.4	55±11	39.3±1.4	36.3±0.9

5.2.5 Propiedades electroquímicas

Se hicieron para estas capas los mismos estudios electroquímicos que en el resto de capas estudiadas en otros capítulos, en dos electrolitos diferentes: tampón fosfato sódico a pH 7.4 y medio de cultivo celular y hasta un potencial de reducción de -1.5V vs Pt. El uso del medio de cultivo como electrolito no aportó ninguna información relevante al estudio. Como dato más destacable se observó que cuando el medio de cultivo es el electrolito los picos se hacen más anchos y se desplazan a potenciales más negativos, lo cual es debido a la mayor resistividad de este en comparación con el tampón fosfato o a la pasivación parcial de la superficie en su presencia.

En la Figura 5.10 se puede apreciar como las curvas de reducción de estas capas presentan una forma más irregular que el resto de las capas estudiadas, con la presencia de un número mayor de picos, lo cual es debido a la capacidad de los compuestos dopantes de iridio de formar compuestos complejos y a su capacidad para tener valencia mixta, que inducen señales electroquímicas adicionales. En cualquier caso, el principal pico de reducción sigue siendo debido a la incorporación de Na⁺ en la capa [44], y el pico de oxidación también es debido a la salida de la capa del mismo catión. La irreversibilidad inherente al sistema debida a la reorganización interna del polímero provoca la diferencia entre las partes de oxidación y reducción de las curvas, por lo que aquí también se puede aplicar lo dicho en el apartado 3.2.9. El hecho de que las capas contengan compuestos de iridio aumenta la capacidad de carga con respecto a las capas de capítulos anteriores. La cifra a 20 mV/s durante 1.5V es de 10 mC/cm² para el PPy-IrCl₃, 9 mC/cm² para el PPy-K₃Ir(NO₂)₆, y mayor como sucedía con las capas dopadas con surfactantes para el PEDOT

con 14 mC/cm^2 para el PEDOT- IrCl_3 y 16 mC/cm^2 para el PEDOT- $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$, haciendo de ellas capas con muy buena capacidad de carga, mayor que en el caso de los polímeros dopados con surfactantes y con aminoácidos, tanto para el PPy como para el PEDOT, lo que confirma que el uso de compuestos de iridio como contraiones aumenta la capacidad de carga. Los valores fueron mayores en condiciones de potencial estático durante la medida, a -0.8 V vs Pt durante 600s, tal y como pasaba en los anteriores capítulos: 80 mC/cm^2 para el PPy- IrCl_3 , 70 mC/cm^2 para el PPy- $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$, 110 mC/cm^2 para el PEDOT- IrCl_3 y 115 mC/cm^2 para el PEDOT- $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$.

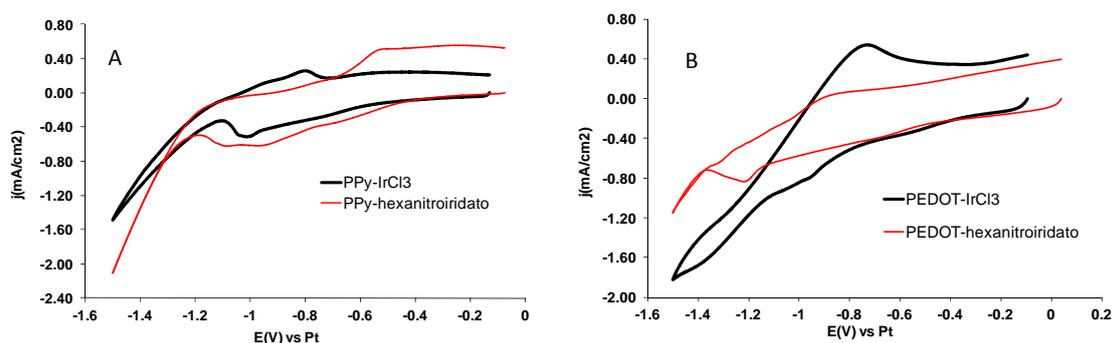


Figura 5.10 Gráficas comparativas de voltametrías de reducción a 20 mV/s de A) PPy- IrCl_3 depositada a 0.6 V vs Pt y PPy- $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ depositada a 0.6 V vs Pt, B) PEDOT- IrCl_3 depositada a 1 V vs Pt y PEDOT- $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ depositada a 1 V vs Pt.

5.2.6 Cultivos celulares

Las capas descritas de PPy y PEDOT dopadas con IrCl_3 y $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ fueron ensayadas como sustrato para la adhesión y crecimiento de neuronas en cultivos *in Vitro* de 4 días (4 DIV) con un sembrado de $25000 \text{ células/cm}^2$. Las células fueron obtenidas del córtex cerebral de un ratón embrionario. Este ensayo fue realizado como una evaluación primaria de la conveniencia del uso de estos materiales como electrodos en prótesis implantables en el cerebro. Los resultados obtenidos no fueron del todo satisfactorios, En tres de las capas, aunque la PLL se adhería bien y en el primer día de cultivo (1 DIV) las células se adherían y crecían bien, al día siguiente estas empezaban a retraerse y agruparse, y como resultado el día 3 de cultivo (3 DIV) las células se despegaban y morían. Por tanto a 4 días (4 DIV) los resultados no fueron satisfactorios. Sin embargo en la muestra de PPy- $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$, aunque la evolución fue muy parecida, a 4DIV aún quedaba viva una cantidad razonable de células como se puede observar en la Figura 5.11. No obstante se observaba un crecimiento y supervivencia muy variables en función de la zona de la capa estudiada, lo que demuestra una baja homogeneidad como se comentó en el apartado 5.2. Los resultados

no fueron comparables a los de las muestras dopadas con aminoácidos, que mostraban mucha mayor homogeneidad y unos resultados mucho mejores.

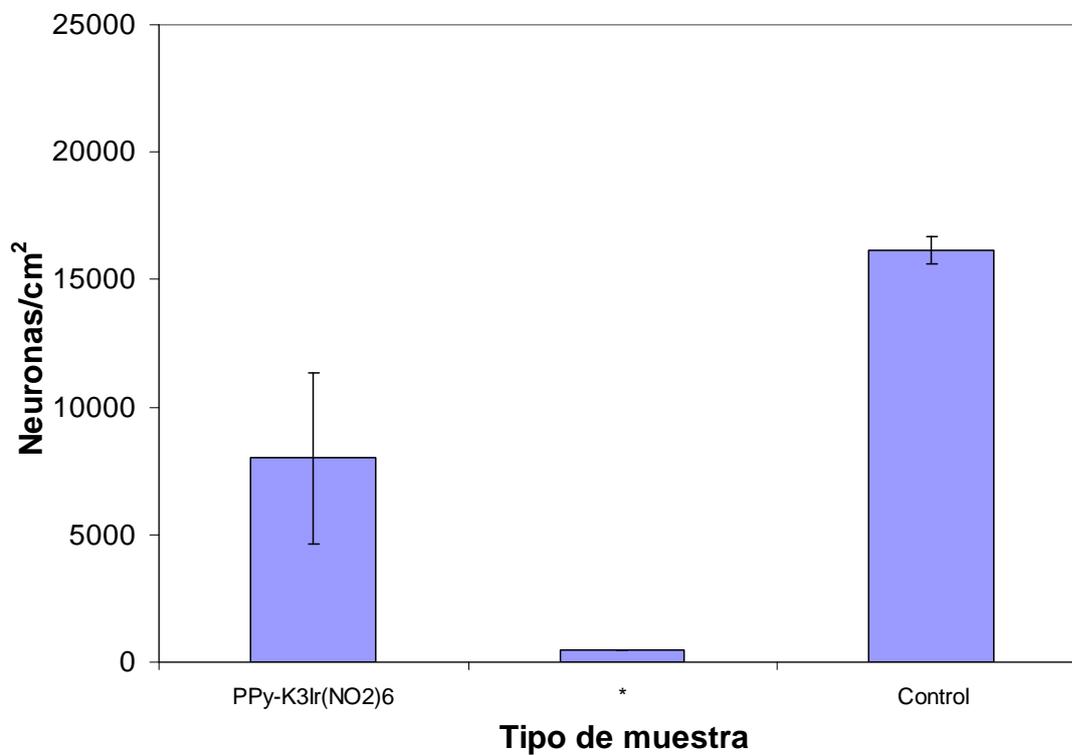


Figura 5.11 Estadística de supervivencia celular en cultivos de alta densidad (25000 células/cm²) después de 4 días In Vitro (DIV) de una capa de PPy-K₃Ir(NO₂)₆ sintetizada a 0.6V vs Pt y las capas englobadas en *: PPy-IrCl₃ sintetizada a 0.6V vs Pt, PEDOT-IrCl₃ y PEDOT- K₃Ir(NO₂)₆, ambas sintetizadas a 1V vs Pt.

5.3 Obtención química de polvo de PPy-IrCl₃ y PPy-K₃Ir(NO₂)₆

Debido a los posibles resultados de los híbridos descritos anteriormente, se ensayaron rutas químicas partiendo de los reactivos ya ensayados y de otros. Se preparó una disolución con exactamente las mismas condiciones y concentraciones que las usadas para la electrosíntesis de las capas de PPy-IrCl₃ y de PPy-K₃Ir(NO₂)₆, es decir, 8mM para el IrCl₃·xH₂O, 3mM para el K₃Ir(NO₂)₆, y 0.1M para el pirrol. Y se dejó reposar la disolución a temperatura ambiente. A los 7 días, en la disolución de pirrol y IrCl₃, que tenía una tonalidad amarillenta, se había formado una suspensión de un material negro (Figura 5.12), que posteriormente se filtró al vacío con un filtro Millipore de poros de 0.8μm de diámetro, el material negro filtrado se dejó secar al aire. El producto final fue un polvo negro que resultó contener polipirrol. Se siguió exactamente el mismo procedimiento con la disolución de pirrol y K₃Ir(NO₂)₆, que dio también un resultado final de un polvo de polipirrol, aunque el color inicial de la disolución no era amarillento sino transparente. La

disolución inicial en este caso tenía una tonalidad más blanca y la disolución final no tenía precipitado como en el caso del PPy-IrCl₃, sino que era más uniformemente negra.

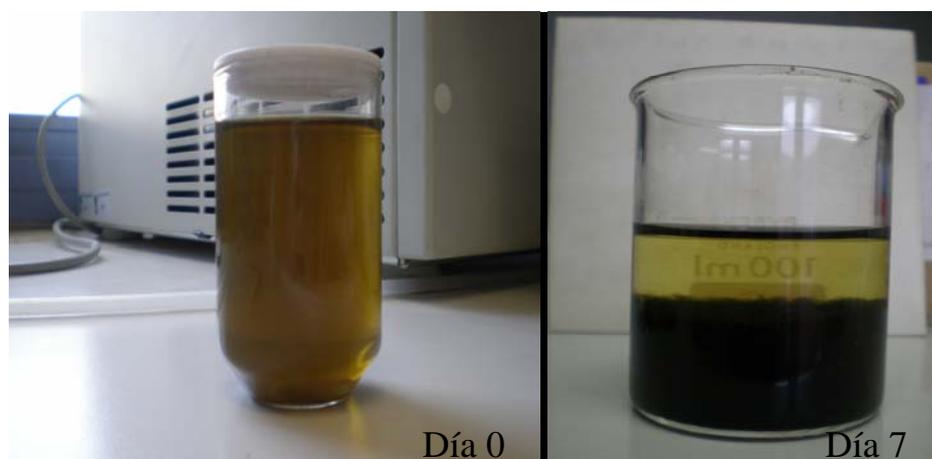


Figura 5.12 Imágenes de la disolución inicial de pirrol-IrCl₃, y la misma disolución 7 días después.

Una vez obtenido se procedió a su caracterización, y mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 5.13), en las cuales se puede apreciar la diferente morfología de los dos tipos de polvo.

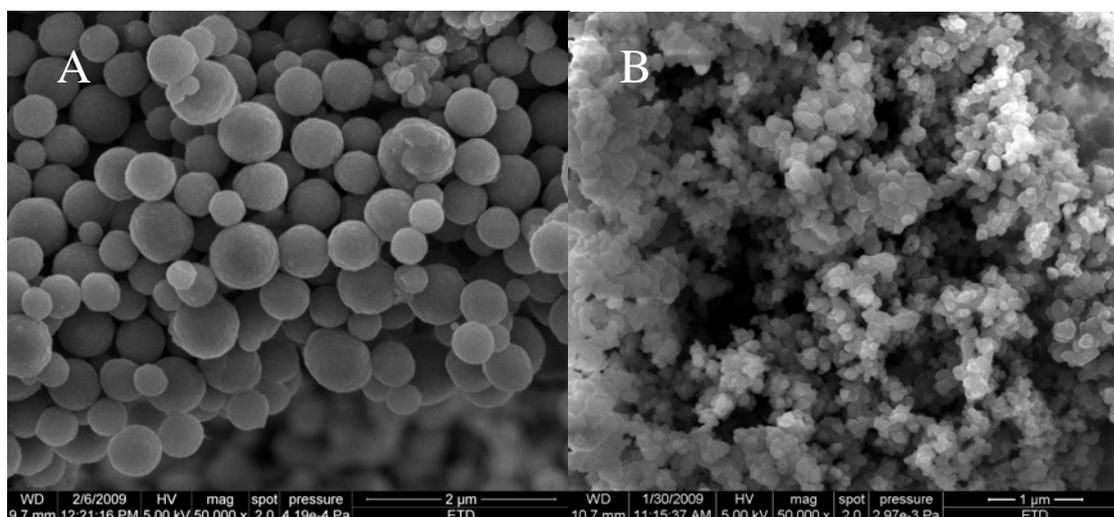


Figura 5.13 Imágenes de SEM de polvo de: A) PPy-IrCl₃ y B) PPy-K₃Ir(NO₂)₆.

El polvo de PPy-K₃Ir(NO₂)₆ tiene una morfología más aleatoria, sin una forma definida, aunque la muestra es bastante uniforme en todas sus zonas. Sin embargo, el polvo de PPy-IrCl₃ presenta una morfología claramente esférica y bastante uniforme. La distribución de tamaños se muestra en la Figura 5.14. Se puede observar que la mayor parte de esferas

tiene un tamaño de diámetro de 201 a 250 nanómetros. No existen esferas mayores de diámetro mayor de 600 nm ni menor de 50nm, lo que implica una distribución altamente uniforme.

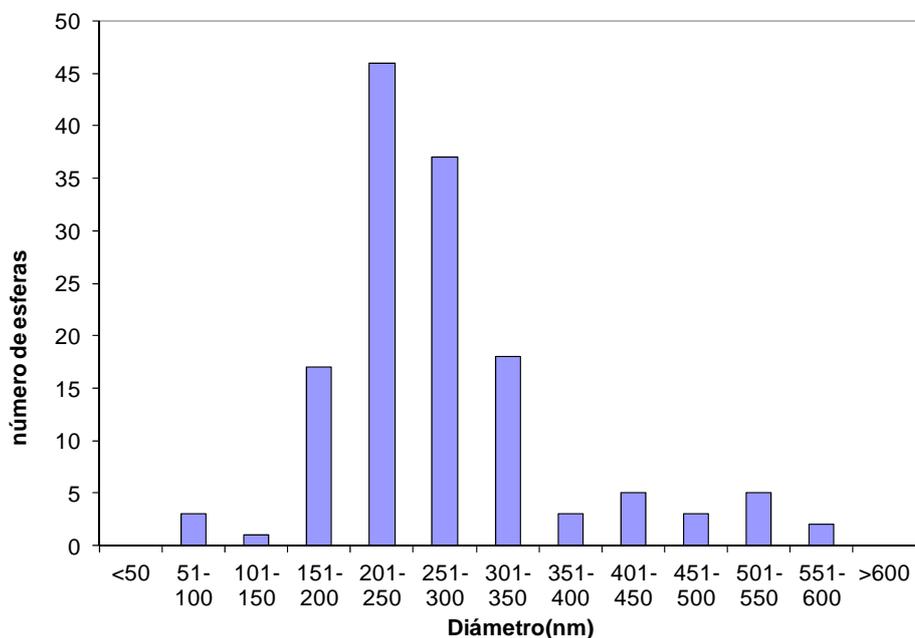
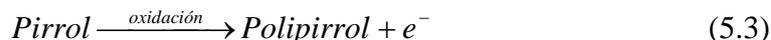
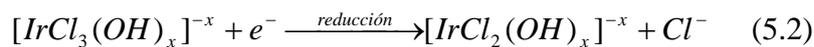


Figura 5.14 Gráfico de la distribución de tamaños de las esferas de PPy-IrCl₃ correspondiente a la Figura 5.13 A.

Aunque es difícil saber cuál es el mecanismo exacto de formación de este polipirrol en polvo, y no sabemos con exactitud tampoco el número de especies de iridio implicadas en él debido a la facilidad de formación de complejos por parte del iridio y de su hidrólisis, se puede hacer una hipótesis del mismo a partir de las especies presentes y los procesos más comunes para ellas. Un suceso que es seguro es la oxidación del pirrol a polipirrol, y que este necesita un contraión o dopante de carga negativa para formarse (A⁻):



Al ser un proceso en medio acuoso se pensó que el H₂O y el O₂ jugarían un papel importante en el mismo. La medida del pH durante el proceso nos puede dar idea del papel que juega la presencia de protones o grupos OH⁻ en el medio. Al diluir el IrCl₃ en el medio se produce un descenso de 2 unidades de pH, por lo cual se sospecha que esta especie atrapa grupos OH⁻ a través de la hidrólisis del ión Ir³⁺. Al cabo de una semana, una vez la formación del polímero es visible, el pH apenas ha variado, con lo cual además de la ayuda del oxígeno en el proceso de oxidación del pirrol se produce una reducción de las especies de iridio, las cuales son las que actuarán como contraiones, junto con los aniones de cloro (A⁻). Una posible hipótesis sería:



Por el contrario, en el mismo proceso con el $K_3Ir(NO_2)_6$ la disolución ve aumentar en hasta 4 unidades su valor de pH del principio al final. En este caso además de la oxidación expresada en (5.1), en la reducción se produce una gran liberación de OH^- en el medio. Esta se podría resumir de la siguiente manera:



También en este caso serán los complejos formados por el iridio los que actuarán como contraiones.

Solo se realizó el análisis estructural y de superficie de estos polvos debido a su alta toxicidad en cultivos celulares, por lo que se abandonó su estudio posterior.

5.3.1 Análisis de superficie (XPS)

El espectro XPS de los polvos obtenidos reveló la presencia de los elementos esperados, C, O, N, Ir y Cl (Figura 5.15). Se observa también que los espectros son muy parecidos a las capas sintetizadas con las mismas especies y descritas en el apartado 5.2.2. A través de las Tablas 5.5, 5.6 y 5.7 de cuantificación atómica de los espectros se confirma este hecho. En los polvos sintetizados con pirrol y $K_3Ir(NO_2)_6$ se detectó la presencia de cloro, como ya se había apuntado para las capas. La cantidad encontrada se debe tener en cuenta ya que su porcentaje atómico es cercano al de iridio en el producto final (Tabla 5.6), el cual por tanto contendrá un alto grado de impurezas.

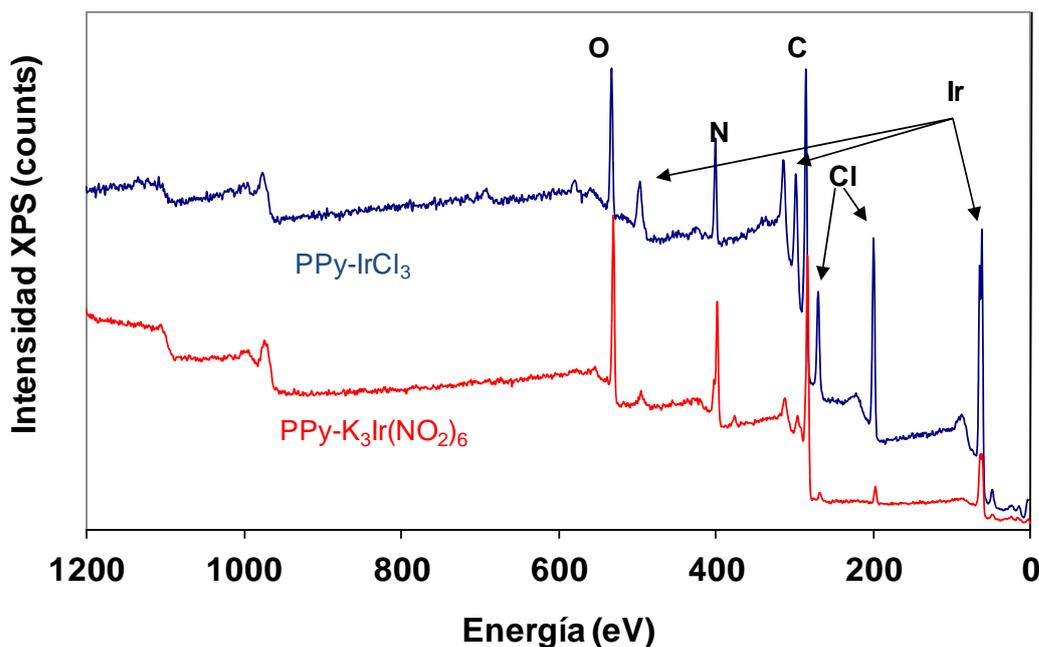


Figura 5.15 Espectro XPS general de polvos de PPy-IrCl₃ y PPy-K₃Ir(NO₂)₆.

Como ya se explicó en el apartado 5.2.2 se puede encontrar el grado de dopaje del polímero a partir de los ratios Ir/N, 0.47 para el PPy-IrCl₃, cercano a la cantidad ideal que está en torno a un 0.25-0.40. En el caso del PPy- K₃Ir(NO₂)₆ hay que tener en cuenta que hay más nitrógeno por el propio hexanitroiridato, y que hay 6 de ellos por cada iridio, con lo cual del 20.6 % de N existente en el polvo, casi la mitad, un 10.8 proviene del hexanitroiridato. El resto, el 9.8% sería del pirrol, con lo cual el ratio Ir/N queda en 0.18, también cercano al rango ideal. Sin embargo al igual que pasaba con las capas el producto dopado con hexanitroiridato tiene un menor dopaje, lo que muy probablemente tiene que ver con las impurezas. Se comprueba por otra parte que hay 3 cloros por cada iridio para el PPy-IrCl₃, lo que concuerda con el compuesto de partida e implica que los complejos resultantes de la hidrólisis no entran en el material. Sabiendo que hay 4 carbonos por cada nitrógeno del pirrol, sabemos que el PPy-IrCl₃ contiene un 12.9% de exceso de C correspondiente a contaminación o impurezas, y que el PPy- K₃Ir(NO₂)₆ contiene un 21% de exceso de C, lo que es acorde con la idea de mayor grado de impurezas en este compuesto. Este grado de impurezas es un poco menor que el de las capas de la misma composición explicadas anterior (ver apartado 5.2.2).

Tabla 5.6 Cuantificación molar expresada en porcentajes de los picos del espectro general de XPS de polvos de PPy-IrCl₃ y PPy-K₃Ir(NO₂)₆.

Muestra	C 1s	O 1s	N 1s	Cl 2p	Ir 4f	Ir/N
PPy-IrCl ₃	58.1	10.8	11.3	14.5	5.3	0.47
PPy-K ₃ Ir(NO ₂) ₆	60.2	15.8	20.6	1.6	1.8	0.09

Parece que todo el oxígeno presente en el PPy-K₃Ir(NO₂)₆ en forma de polvo proviene del dopante, con lo cual contiene poca agua, mientras que la mayor parte del O presente en el polvo de PPy-IrCl₃ parece provenir del agua, como se comprueba en la Tabla 5.8 en la cuantificación de la deconvolución del pico de O 1s (como las especies implicadas no contienen O, el resto debe provenir de impurezas).

La deconvolución de los espectros XPS de C 1s y O 1s se pueden observar en la Figura 5.16, cuyas tablas de cuantificación atómica son la 5.7 y 5.8.

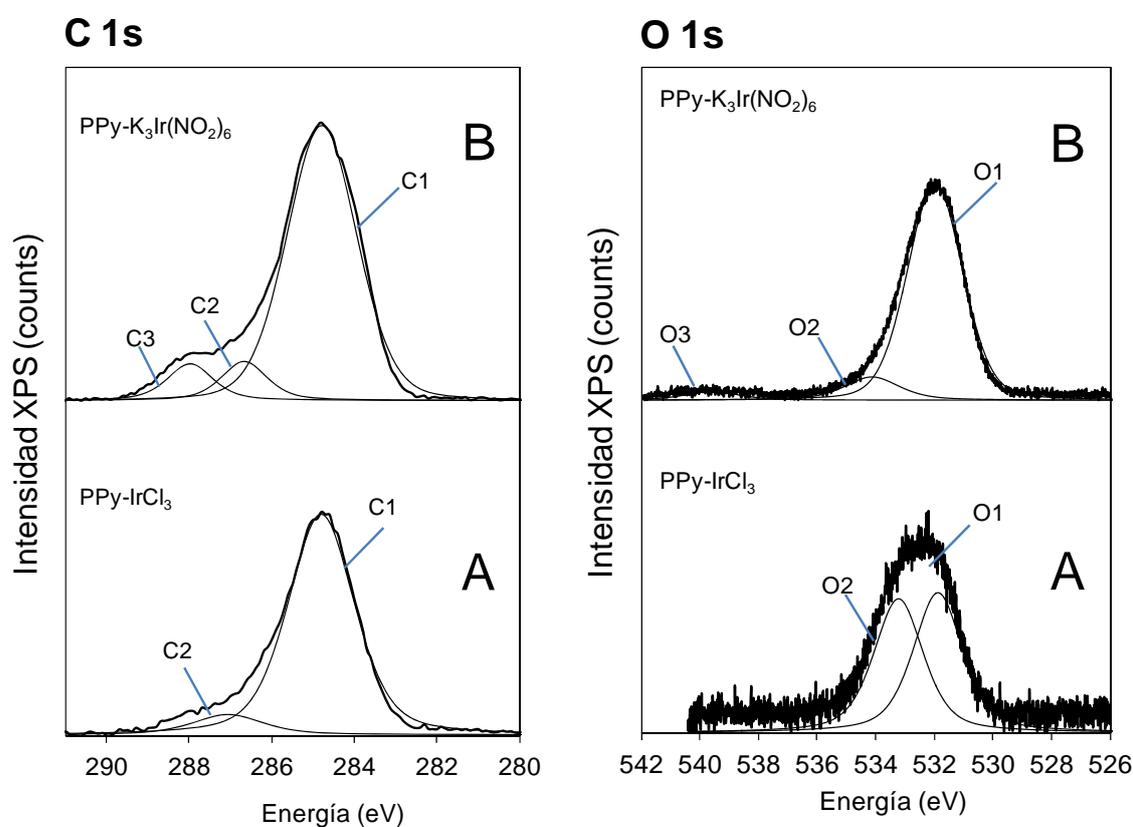


Figura 5.16 Deconvolución de los espectros XPS del C 1s y del O 1s de los polvos de: A) PPy-IrCl₃ y B) PPy-K₃Ir(NO₂)₆. Obsérvese que la señal de O en A es muy inferior y su señal más ruidosa, así como su pico más ancho.

La mayor parte de carbono presente es alifático, presente en el pirrol, y en las impurezas, y en torno a un 9% pertenece al enlace C-N típico del pirrol, cuya cantidad es muy parecida para cada tipo de compuesto. Esto confirma que la cantidad pirrol es parecida en los dos compuestos, cosa que ya se vio en el análisis del espectro general. Parece que el polvo de PPy-K₃Ir(NO₂)₆ presenta una cierta sobreoxidación del polipirrol por la presencia de enlaces C-O y C=O.

Tabla 5.7 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal C 1s para polvos de PPy-IrCl₃ y PPy-K₃Ir(NO₂)₆.

	C1: C-C/C-H		C2: C-N		C3: C=O/C-O	
	Posición (eV)	Molar %	Posición (eV)	Molar %	Posición (eV)	Molar %
PPy-IrCl ₃	284.8	90.4	286.7	9.6	-	-
PPy- K ₃ Ir(NO ₂) ₆	284.9	83.0	286.8	8.7	288.1	8.3

El oxígeno de red pertenece al enlace N-O del dopante en el caso del PPy-K₃Ir(NO₂)₆, y a las impurezas en el caso del otro polvo. El polvo de PPy-IrCl₃ contiene más agua que el de PPy-K₃Ir(NO₂)₆ como se apuntó antes. El primero de ellos tiene un tercer componente de un 4.0% oxígeno O3 con una energía de 537.7 eV que corresponde a un *shake up satellite*, una señal debida a transiciones $\pi-\pi^*$ [34–36].

Tabla 5.8 Resultado de la deconvolución y asignación de picos de la señal O 1s para polvos de PPy-IrCl₃ y PPy-K₃Ir(NO₂)₆.

	O1: Oxígeno de red		O2: Oxígeno hidratado	
	Posición (eV)	Molar %	Posición (eV)	Molar %
PPy-IrCl ₃	531.9	51.0	533.2	49.0
PPy- K ₃ Ir(NO ₂) ₆	532.0	85.7	534.1	10.3

También se realizó la deconvolución del pico N 1s, del cual se encontraron dos componentes, la primera, de un 85% de ratio molar, en los dos casos correspondiente al enlace N-H típico del pirrol, a 400.0 eV de energía. El restante 15% en el caso del PPy-IrCl₃ está situado a 401.8 eV y corresponde al grupo NH⁺, el hueco que dará lugar a la conducción por poltrones responsable de la conductividad electrónica del polipirrol. En el caso del PPy-K₃Ir(NO₂)₆ el pico situado a 404.3 eV correspondía al enlace N-O del dopante. Más adelante en el análisis de FTIR veremos como también hay grupos polarón en el polvo de PPy-K₃Ir(NO₂)₆.

5.3.2 Análisis de infrarrojos (ATR)

En la Figura 5.17 se muestran los espectros FTIR de los polvos bajo estudio, que demuestran otra vez el mayor contenido en agua del polvo de PPy-IrCl₃. Aunque ambos compuestos presentan picos típicos para el polipirrol, existen ciertas diferencias entre ellos, poniendo de manifiesto la importancia del dopante en el compuesto polimérico final. En el caso del PPy-IrCl₃ la banda a 1580 cm⁻¹ indica la vibración de estiramiento del enlace C-C del pirrol, a 1280 cm⁻¹ se encuentra la vibración dentro de plano de los enlaces C-N y C-H, mientras que la banda a 1050 cm⁻¹ se atribuye a la deformación dentro del plano de los enlaces C-H y N-H. A 950 cm⁻¹ se aprecia la deformación fuera de plano del enlace C-C del anillo de pirrol. La banda a 800 cm⁻¹ corresponde a la vibración fuera del plano del enlace C-H. Por último la banda a 730 cm⁻¹ indica la vibración de deformación del enlace C-H. En el caso del PPy-K₃Ir(NO₂)₆ encontramos una banda a 1650 cm⁻¹ que se atribuye a la vibración de estiramiento del C=C, a 1400 cm⁻¹ hay otra banda que indica la vibración de estiramiento del enlace C-N del anillo de pirrol, la banda a 1320 cm⁻¹ se atribuye a la vibración dentro del plano del enlace =C-H, a 1100 cm⁻¹ se aprecia la banda de vibración de la deformación dentro del plano del grupo NH⁺. Por último, la banda a 800 es la misma encontrada en ambos. Se puede ver una mayor presencia de dobles enlaces en el polvo de PPy-K₃Ir(NO₂)₆, lo que como ya se había comentado indica una mayor sobreoxidación de este compuesto [39-40,49].

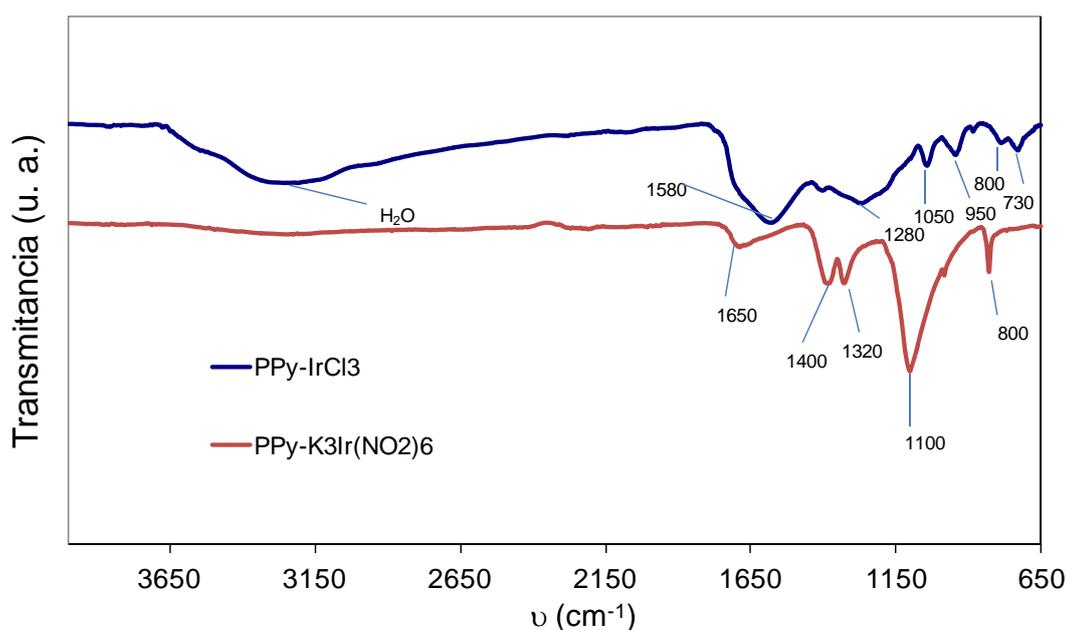


Figura 5.17 Espectros de ATR de los polvos de PPy-IrCl₃ y PPy-K₃Ir(NO₂)₆.

5.4 Obtención hidrotermal de polvos de PPy y IrO₂ y de PEDOT y IrO₂.

El fallo en la transformación de IrCl₃ soluble a óxido en los híbridos en forma de polvo, que era un pretensión inicial, nos hizo abordar la reacción directa de IrO₂ con los monómeros. Para la obtención de compuestos híbridos de polipirrol y de PEDOT con óxido de iridio (IV) (IrO₂) (Sigma-aldrich, 99.9%) se añadieron 75mg de este producto a una botella de vidrio Pyrex que contenía 25 ml de agua ultrapura milliQ, usando el 71% del volumen total del recipiente. La mezcla fue agitada durante una hora. A continuación se investigaron las cantidades óptimas de pirrol o EDOT para la reacción, estudiando diferentes ratios de monómero/IrO₂ en una serie de experimentos. Se probaron los ratios 1.0, 4.5 y 18.0 de pirrol/IrO₂ y los ratios 1.0, 4.5 y 5.3 de EDOT/IrO₂, y en el primer caso fue 18.0 el ratio óptimo y en el segundo fue 5.3, lo cual correspondía a 415 µl de pirrol y 185 µl de EDOT. Las suspensiones resultantes fueron cerradas herméticamente en las botellas de Pyrex con una tapa de teflón y fueron calentadas a 100, 150 y 200 °C durante 96, 168 y 240 horas. El sólido resultante se filtró al vacío, se lavó con agua milliQ y se secó en aire a temperatura ambiente. A través de las diversas temperaturas probadas en la síntesis se pudo comprobar que el híbrido no se forma a 100 °C, pero sí a 150 y 200 °C. Como esta última temperatura era muy alta y ocasionaba una presión muy alta para la botella de Pyrex con el tapón de teflón, se escogió la temperatura de 150 °C como óptima para todos los experimentos. También se optimizaron las otras variables: concentración de polímero y tiempo de síntesis. En cuanto a la primera se encontró que un ratio molar polímero/IrO₂ 1:1 no daba ningún resultado, pero sí un ratio de 4.5:1, con lo cual es necesario un exceso de monómero para que se produzca la reacción. A partir de la realización de más experimentos se encontró que el ratio molar óptimo de pirrol/IrO₂ era 18.0 y 5.3 el de EDOT/IrO₂. En este último caso se generaba mucho más polímero, con lo cual era necesario un mucho menor exceso de monómero. Se intentó doblar el ratio aumentando la cantidad de monómero en los dos casos pero solo se consiguió aumentar la cantidad de fase de polímero puro y no la fase de material híbrido. Este último punto y el tiempo de reacción óptimo se explicarán en el siguiente apartado.

Además de la síntesis como tal, se realizaron oxidaciones y reducciones de los compuestos en estudio, lo que se consiguió añadiendo un agente oxidante (persulfato de potasio) y un agente reductor (tiosulfato de sodio pentahidratado) en un ratio de 1:1 con respecto al óxido de iridio justo después del tratamiento hidrotermal de síntesis del compuesto polímero-óxido de iridio.

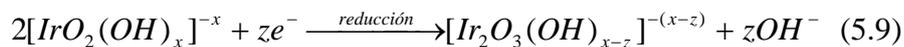
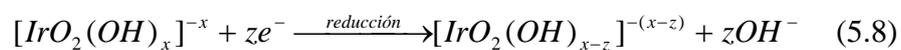
Al igual que se hizo en el apartado 5.3, para determinar una posible composición y secuencia de reacciones ocurridas en el proceso de síntesis se hizo la medida del pH del agua de la reacción antes y después de la adición de IrO₂ comercial, que varió de 6.0 a 6.4

con la misma. Por tanto se propone la siguiente reacción que implica la liberación de grupos hidróxido que puedan estar presentes en el IrO_2 comercial usado en los experimentos, hecho que se confirma con el análisis XPS (apartado 5.5.2).



Cuando el pirrol o el EDOT se añaden a esta suspensión de IrO_2 se produce una acidificación del medio de 0.6 y 3.0 unidades de pH respectivamente al final de la reacción, lo que concuerda con el hecho de que la polimerización implica la liberación de H^+ [51]. Los grupos OH^- podrían actuar como contraiones en la formación de los polímeros, provocando el descenso de su concentración y el consiguiente descenso del pH. Como se explicará en el siguiente apartado la cantidad de PEDOT sintetizado es mucho mayor que la de PPy, con lo cual se cree que ello origina el mayor descenso de pH en el primer caso.

En base a ello se proponen las siguientes reacciones, las cuales pueden describir el proceso redox completo, en el cual también los grupos $[\text{IrO}_2(\text{OH})_x]^{-x}$ y $[\text{Ir}_2\text{O}_3(\text{OH})_x]^{-x}$ pueden actuar como contraiones. Por ello a los productos finales de las dos reacciones los llamaremos PPy- IrO_x y PEDOT- IrO_x , ya que no podemos estar seguros de que solo exista IrO_2 . También se tiene en cuenta que se realizó uno de los experimentos después de haber desoxigenado la mezcla de síntesis con argón durante 30 minutos, tras lo cual no se observaron diferencias destacables en el resultado final. Ello indica que el O_2 no es esencial para que se produzca la oxidación del monómero, aunque la participación de este no es descartable cuando está presente:



En todos los casos, la reacción da lugar como veremos a un compuesto donde el polímero encapsula partículas de óxido de taquimetría $\text{IrO}_x(\text{OH})_y$. Tal y como se muestra en estas ecuaciones hay un proceso de oxidación principal, la de pirrol a polipirrol, expresada en la ecuación 5.5, donde A es el contraión. Podría ser que la encapsulación tuviera lugar en las zonas donde las especies de iridio generadas en las ecuaciones de reducción actúen como contraiones, mientras que donde el hidróxido actúe como contraión se generará polímero puro, lo que se explicará más ampliamente en el siguiente apartado.

5.4.1 Caracterización morfológica de los compuestos híbridos de PPy-IrO_x y de PEDOT-IrO_x (SEM).

En todos los casos el producto resultante fue un polvo negro, cuyo análisis se realizó a través de microscopio electrónico de barrido (SEM), el cual revelando la existencia de tres fases diferenciadas: 1) polímero puro, 2) óxido de iridio puro y 3) material híbrido óxido de iridio encapsulado en una matriz polimérica (Figuras 5.18 y 5.20). Mediante imágenes de difracción de electrones retrodispersados (BSED) se pudo confirmar que el polímero se encuentra encapsulando al óxido en la fase de material híbrido (Figura 5.18).

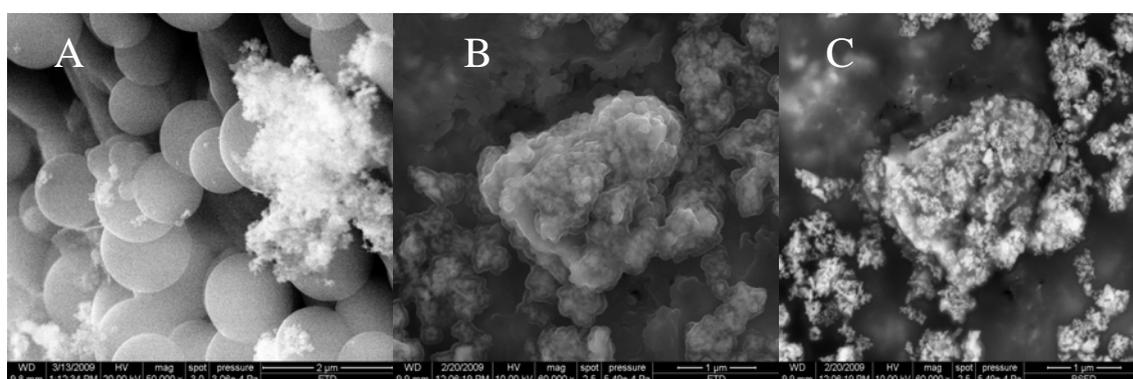


Figura 5.18 Imágenes de SEM de PPy-IrO_x sintetizado a 150 °C durante 96 horas: A) esferas de polímero puro con nanopartículas blancas de IrO_x, B) Nanopartículas de IrO_x encapsuladas en polímero (material híbrido) y C) imagen de BSED en la cual el IrO_x presenta un color más claro.

Se observó también la evolución de la reacción final en función del tiempo. En el caso de la reacción con pirrol, las primeras 96h daban lugar a las tres fases mencionadas (Figura 5.18). A su vez, en ese tiempo de reacción se observó la formación por separado de una película de polímero con una morfología hexagonal (Figura 5.19 A), que se deforma si la reacción se prolonga (Figura 5.19 B,C).

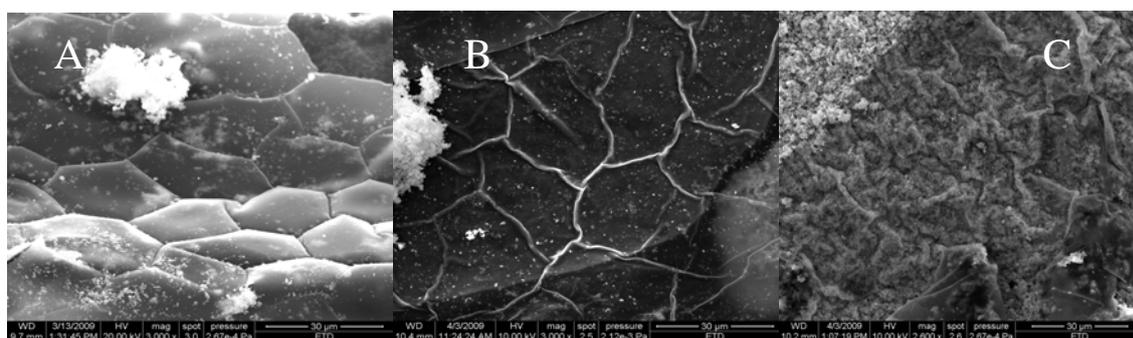


Figura 5.19 Imágenes de SEM de PPy-IrO_x sintetizado a 150 °C durante: A) 96 horas, B) 168 horas y C) 240 horas.

Sin embargo, con la reacción del EDOT no se observaron cambios morfológicos del producto en función del tiempo. En todos los tiempos de reacción probados se obtuvieron las tres fases mencionadas. Por tanto se usó el tiempo de 96 horas como óptimo, ya que prolongar la reacción no aportaba mejoras interesantes. En las Figuras 5.18 y 5.20 se puede observar también como en las fases de polímero puro se forman nanopartículas esféricas usando cualquiera de los monómeros.

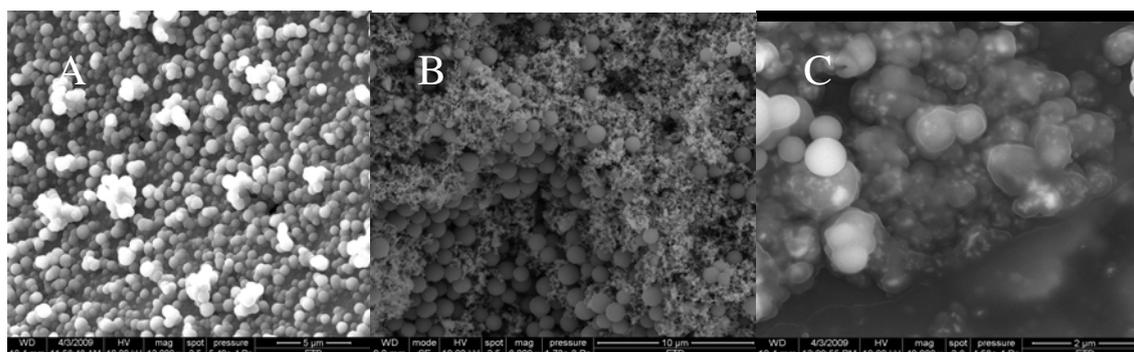


Figura 5.20 Imágenes de SEM de PEDOT-IrO_x sintetizado a 150 °C durante 96 horas: A) nanoesferas de polímero puro, B) nanoesferas de polímero puro mezcladas con nanopartículas de IrO_x puro, C) Nanopartículas de IrO_x encapsuladas en polímero (material híbrido) y formas esféricas de polímero puro.

5.4.2 Análisis estructural y de superficie

Los resultados de XPS revelan la presencia de los elementos esperados por la composición de los materiales analizados. En la Figura 5.21 se pueden observar los espectros de XPS generales de los dos compuestos sintetizados junto al del IrO₂ utilizado en las reacciones, para comparar antes y después de la reacción. La cuantificación en forma de porcentaje molar de estos espectros se puede observar en la Tabla 5.9, a partir de cuyos datos se puede saber la relación molar de polímero/IrO_x, usando los porcentajes de N o S (según si hablamos de PPy o PEDOT) con el porcentaje de iridio, lo que da una relación de polímero/Ir de 3.2 para el PPy-IrO_x y 9.9 para el PEDOT-IrO_x, con lo cual se confirma la mayor formación de polímero puro en el segundo caso como ya se apuntó previamente. La baja cantidad de iridio encontrado confirma el exceso de monómero esperado.

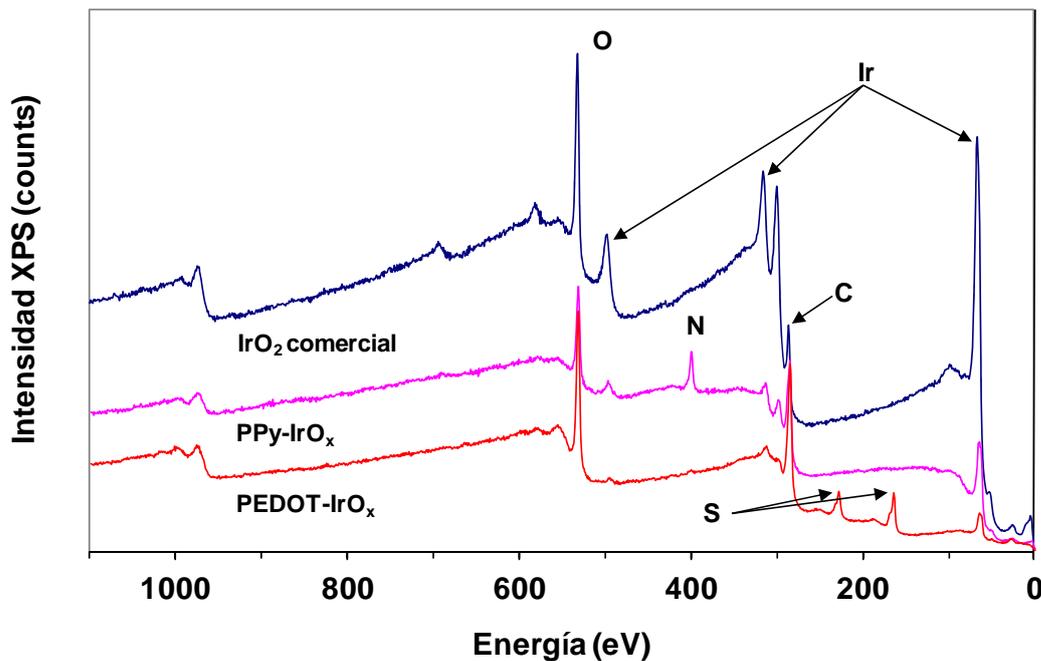


Figura 5.21 Espectro XPS general de polvos de IrO_2 comercial y PPy-IrO_x y PEDOT-IrO_x sintetizados a 150°C durante 96 horas.

En el caso del IrO_2 comercial se debería esperar una relación O/Ir de 2, pero se encuentra un dato de 2.8 que indica un exceso de oxígeno similar al del óxido electrodepositado [12]. Ello también puede ser debido a impurezas de carbonatos, agua absorbida o grupos OH^- formando parte del material como $\text{IrO}_2(\text{OH})\cdot\text{H}_2\text{O}$ como ya se apuntó. Todo ello hace pensar más en un oxohidróxido de iridio más que en un óxido. Es sabido que el IrO_2 puede formar fácilmente el óxido hidratado en contacto con la humedad del aire, coordinando H_2O y OH^- en su estructura [12,52,53].

Sabiendo que por cada nitrógeno del pirrol hay 4 carbonos y que por cada azufre del PEDOT hay 6 carbonos, se encuentra un exceso de carbono del 0.5% para el PPy-IrO_x y del 3.2% para el PEDOT-IrO_x , principalmente debido a especies carbonatadas pueden ser causadas por una reacción del material con el CO_2 presente en el aire [54], algo a tener en cuenta ya que el IrO_2 comercial contiene un 33.7% de contenido de carbono.

Tabla 5.9 Cuantificación molar expresada en porcentajes de los picos del espectro general de XPS de polvos de IrO_2 comercial y de PPy-IrO_x y PEDOT-IrO_x sintetizados a 150°C durante 96 horas.

Muestra	C 1s	O 1s	N 1s	S 2p	Ir 4f	O /Ir	S/Ir	N/Ir
IrO_2 comercial	33.7	48.9	-	-	17.4	2.8	-	-
PPy-IrO_x	57.3	24.1	14.2	-	4.4	5.5	-	2.6
PEDOT-IrO_x	60.3	29.2	-	9.5	1.0	29.2	9.5	-

En la Figura 5.26 se pueden observar los espectros XPS del C 1s y O1s de los materiales estudiados en este apartado con su deconvolución Lorentziana-Gausiana. En el caso del carbono los espectros de los tres tipos de polvo se pueden dividir en tres componentes, C1, C2 y C3, que se atribuyen a los enlaces alifáticos o aromáticos del carbono, a los enlaces C-N del pirrol o C-S del PEDOT además de los enlaces C-O que pueden estar en ambos materiales y a los enlaces O=C-O típicos de la contaminación por CO_2 [35,55-56].

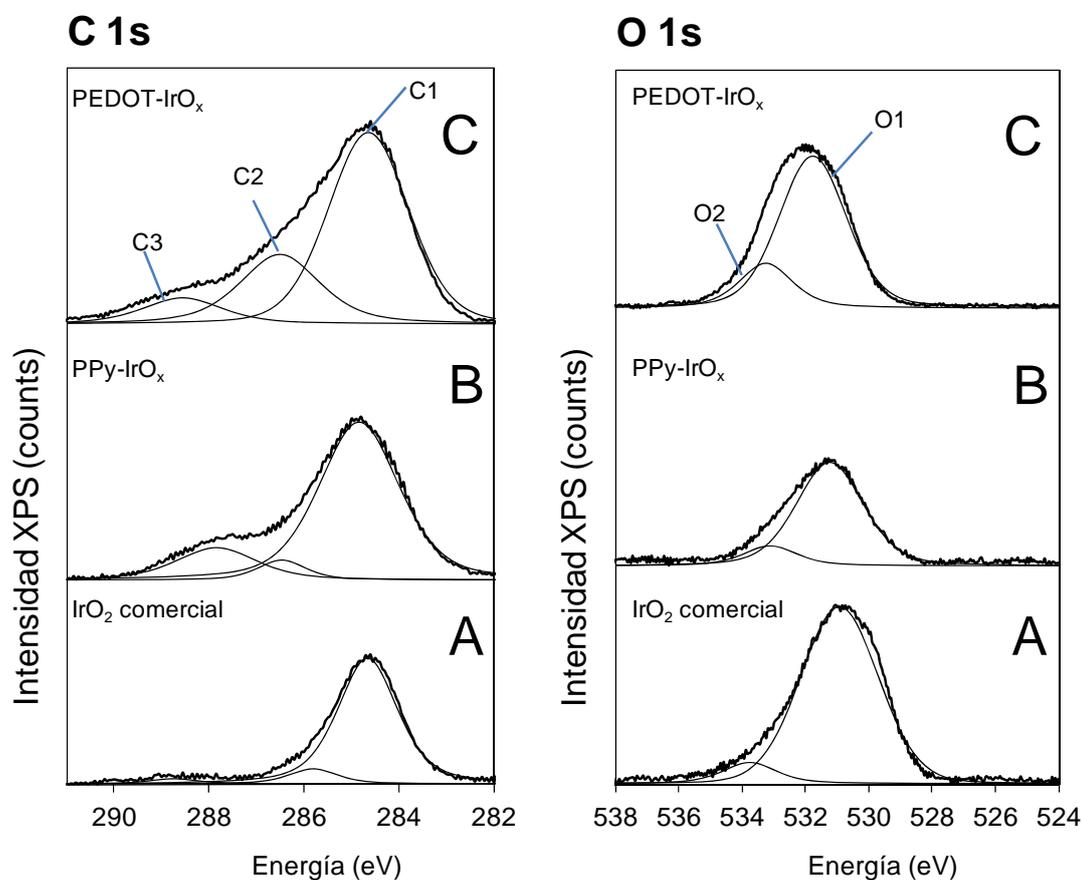


Figura 5.22 Deconvolución de los espectros XPS C 1s y del O 1s de los polvos de: A) IrO_2 comercial y de B) PPy-IrO_x y C) PEDOT-IrO_x sintetizados a 150°C durante 96 horas.

Los resultados de las cuantificaciones atómicas en IrO_2 comercial a partir de las deconvoluciones de C 1s y O 1s (Tablas 5.10 y 5.11) muestran una alta cantidad de carbono alifático sintomático de contaminación y oxígeno hidratado, lo que confirma la tendencia de esta especie a absorber productos orgánicos volátiles, CO_2 y humedad. Este fenómeno también se produce en el PPy- IrO_x y en el PEDOT- IrO_x . El componente C2 es mayor en el PEDOT que en el PPy debido a que el enlace C-O está presente en la estructura del primero.

Tabla 5.10 Resultado de la deconvolución y asignación de picos C 1s de IrO_2 comercial y de PPy- IrO_x y PEDOT- IrO_x sintetizados a 150 °C durante 96 horas.

	C1: C-C/C-H		C2: C-O/C-N/C-S		C3: O=C-O	
	Posición (eV)	Molar %	Posición (eV)	Molar %	Posición (eV)	Molar %
IrO_2	284.7	84.4	286.1	7.0	288.6	3.6
PPy- IrO_x	284.8	77.4	286.4	5.9	287.8	16.7
PEDOT- IrO_x	284.7	64.0	286.5	26.0	288.6	10.0

En el espectro O 1s la componente O1 se atribuye al oxígeno presente en el óxido y en los grupos OH [57]. Como los polvos de polímero- IrO_x tienen este componente en energías más altas, estos deben contener más grupos hidróxido de tipo $[\text{Ir}(\text{OH})]$ o oxohidróxido de tipo $[\text{IrO}_2(\text{OH})_x]$ que el IrO_2 comercial, como es de lógica ya que su reacción se produce en medio acuoso [14,56,58]. El material con mayor contenido de agua es el PEDOT- IrO_x , seguido del PPy- IrO_x por su formación en agua y por la alta capacidad de los polímeros para absorber agua [59], aunque el óxido comercial también contiene una cantidad alta por su absorción de la humedad.

Tabla 5.11 Resultado de la deconvolución y asignación de picos O 1s de IrO_2 comercial y de PPy- IrO_x y PEDOT- IrO_x sintetizados a 150 °C durante 96 horas.

	O1: Oxígeno de red		O2: Oxígeno hidratado	
	Posición (eV)	Molar %	Posición (eV)	Molar %
IrO_2	530.9	90.9	533.8	9.1
PPy- IrO_x	531.2	85.9	533.1	14.1
Pedot- IrO_x	531.8	79.0	533.3	21.0

Se realizaron además análisis de EDX focalizándose en cada una de las tres zonas del producto antes mencionadas: 1) polímero puro, 2) óxido de iridio puro y 3) material híbrido óxido de iridio encapsulado en una matriz polimérica. Con ello se confirmó esta

hipótesis, ya que la cantidad de iridio y de oxígeno es mucho mayor en la zona 1, mientras que la cantidad de carbono es mayor en la zona donde hay polímero, siendo esta incluso mayor en las zonas de polímero puro (Tablas 5.12 y 5.13). Es bien sabido que esta técnica tiene más error que el XPS, pero nos permite focalizarnos en una de las fases en concreto y comparar de modo relativo, mientras que en el análisis de XPS el área de incidencia implica un promedio de todo.

Tabla 5.12 Porcentaje atómico de elementos obtenidos mediante análisis de EDX en cada una de las fases del polvo de PPy-IrO_x.

PPy-IrO _x	C	O	N	Ir
Híbrido	66.2	16.7	16.4	0.7
PPy puro	76.0	9.2	14.4	0.4
IrO ₂ puro	53.9	19.8	10.9	15.4

Tabla 5.13 Porcentaje atómico de elementos obtenidos mediante análisis de EDX en cada una de las fases del polvo de PEDOT-IrO_x.

PEDOT-IrO _x	C	O	S	Ir
Híbrido	70.5	17.7	11.2	0.6
PPy puro	72.7	16.7	10.3	0.3
IrO ₂ puro	50.2	34.7	9.8	5.3

5.4.3 Análisis de infrarrojos (ATR)

La presencia de agua y carbonatos mencionada durante este apartado se confirmó a través del análisis de FTIR (Figura 5.23), de hecho la banda a 2150 cm⁻¹ indica la presencia de grupos C-O propios de los carbonatos [60] y la amplia banda en el rango 2500-3500 cm⁻¹ indica la presencia del grupo O-H del agua [61]. Los polvos de PPy-IrO_x muestran los picos típicos del PPy en el rango de 650-1700 cm⁻¹; la banda a 1590 cm⁻¹ se atribuye a la vibración de estiramiento del enlace C=C, y las bandas a 1350 y 1050 cm⁻¹ se atribuyen a la vibración dentro del plano del enlace =C-H, la banda a 800 cm⁻¹ corresponde a la vibración fuera del plano del enlace C-H y finalmente la banda a 730 cm⁻¹ se atribuye a la deformación del enlace C-H [40,62].

En el caso del PEDOT-IrO_x también se encuentran los picos típicos de este polímero, la banda a 1360 cm⁻¹ se asigna a la vibración de estiramiento del enlace C-C en el anillo de EDOT, la banda a 1280 cm⁻¹ se atribuye a la vibración inducida por el dopaje. La vibración a 1050 cm⁻¹ es provocada por el estiramiento del grupo alquilendioxi (-COROC-), y la

banda a 800 cm^{-1} se debe a la vibración de estiramiento del enlace C-S en el anillo de tiofeno. Finalmente la banda a 730 cm^{-1} indica la deformación del grupo C-S-C del mismo anillo [41,63]. La espectroscopia FTIR del IrO_2 no proporcionó información destacable.

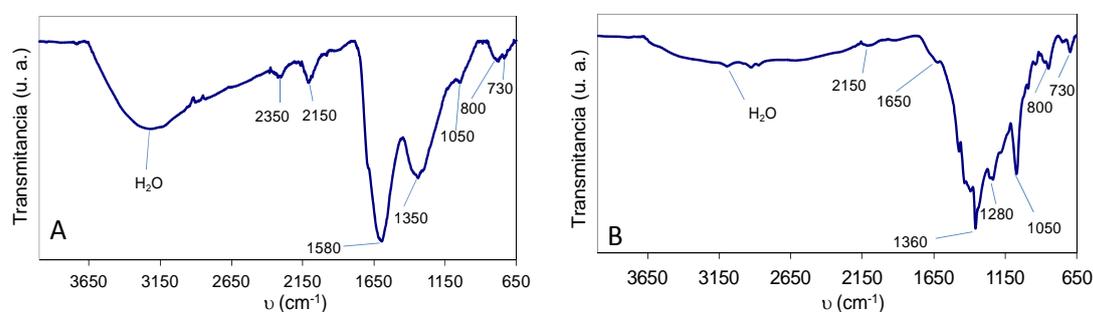


Figura 5.23 Espectros de ATR de los polvos de A) PPy- IrO_x y B) PEDOT- IrO_x sintetizados a 150°C durante 96 horas.

5.4.4 Propiedades electroquímicas

Las propiedades electroquímicas de los polvos se investigaron a través de voltametrías de barrido lineal hacia potenciales de reducción con el material utilizando suspensión agitada (ver apartado 2.4.3.1).

Las Figuras 5.24 A y B comparan diferentes estados de oxidación (*as-prepared*, reducido y oxidado) del PPy- IrO_x y el PEDOT- IrO_x respectivamente. Cuando en el electrolito de tampón de fosfato sódico a pH 7.4 no hay ningún material la curva potencial-corriente es prácticamente una línea recta, al igual que ocurre con el IrO_2 comercial, sin embargo al añadir el material *as-prepared* en suspensión aparece un pequeño hombro alrededor de -0.5V vs Pt, y la corriente aumenta mostrando una mayor actividad electroquímica en el electrolito. Las corrientes son incluso mayores en el caso del PEDOT- IrO_x , lo que sugiere que es mayor la parte polimérica de este material, como ya se comentó en el anterior apartado. También es destacable como el material oxidado presenta corrientes mayores y el reducido presenta una curva muy cerca del blanco, lo que confirma que el estado de oxidación es muy importante para la respuesta electroquímica, y pone de manifiesto que el material *as-prepared* solo está oxidado en parte y requiere de un agente oxidante adicional para ser más electroquímicamente activo.

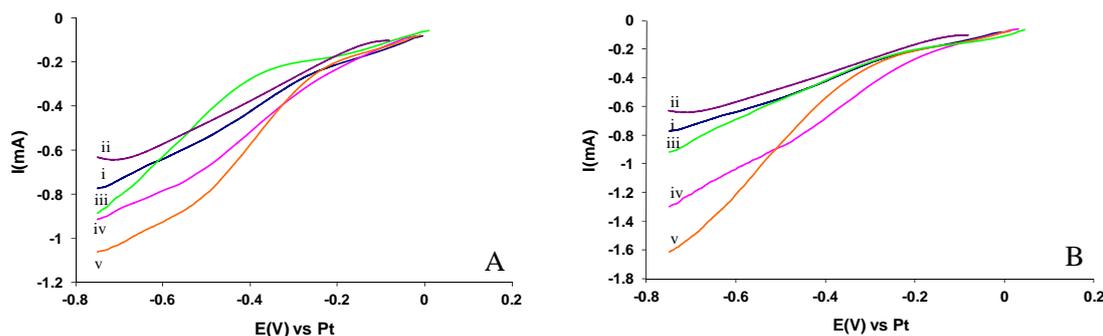


Figura 5.24 Voltametrías de barrido lineal de OCP a -0.75V vs Pt a 2 mV/s de los polvos de A) PPy- IrO_x y B) PEDOT- IrO_x sintetizados a $150\text{ }^\circ\text{C}$ durante 96 horas en un electrolito de tampón de fosfato sódico 0.1M a $\text{pH } 7.4$. i) Curva del electrolito (blanco), ii) IrO_2 comercial, iii) material reducido, iv) material as-prepared y v) material oxidado.

Las propiedades electroquímicas dependen en gran medida de las condiciones de polimerización y las especies implicadas [16], pero el pico de reducción del PPy está siempre en el rango de -0.7V a -0.5V vs Pt [64]. Teniendo en cuenta que el pico de reducción principal del IrO_2 está cerca de -0.23 vs Pt [48] se puede deducir que la parte polimérica del material es la principal responsable de la respuesta electroquímica del material. Igualmente el pico de reducción típico del PEDOT está en torno a -0.45V vs Pt y electroquímicamente se comporta de manera muy similar al PPy. Ello hace pensar que el IrO_x no tiene acceso superficial al electrolito.

También se lograron realizar satisfactoriamente voltametrías con discos de Teflón sintetizados con IrO_2 comercial, PPy- IrO_x y PEDOT- IrO_x (ver apartado 2.4.3.2), cuyos resultados se muestran en la Figura 5.28. Los picos de reducción de los materiales híbridos en torno a -0.45V vs Pt observados en la Figura 5.24A y B también se pueden observar en la Figura 5.25C y D. Se puede ver como la presencia del alguno de los materiales estudiados incrementa la respuesta del sistema comparado con el teflón sin el material. Sin embargo, en este análisis electroquímico se produce un efecto contrario al de la Figura 5.24, seguramente debido a la diferente disposición del experimento en teflón, y la señal aumenta a medida que la cantidad de óxido crece. Parece que este efecto es debido a que el IrO_x es un buen catalizador para la oxidación del agua [52], y por ello en la parte catódica de las figuras comienza a potenciales más bajos con mayor cantidad de óxido y las corrientes también son cada vez mayores.

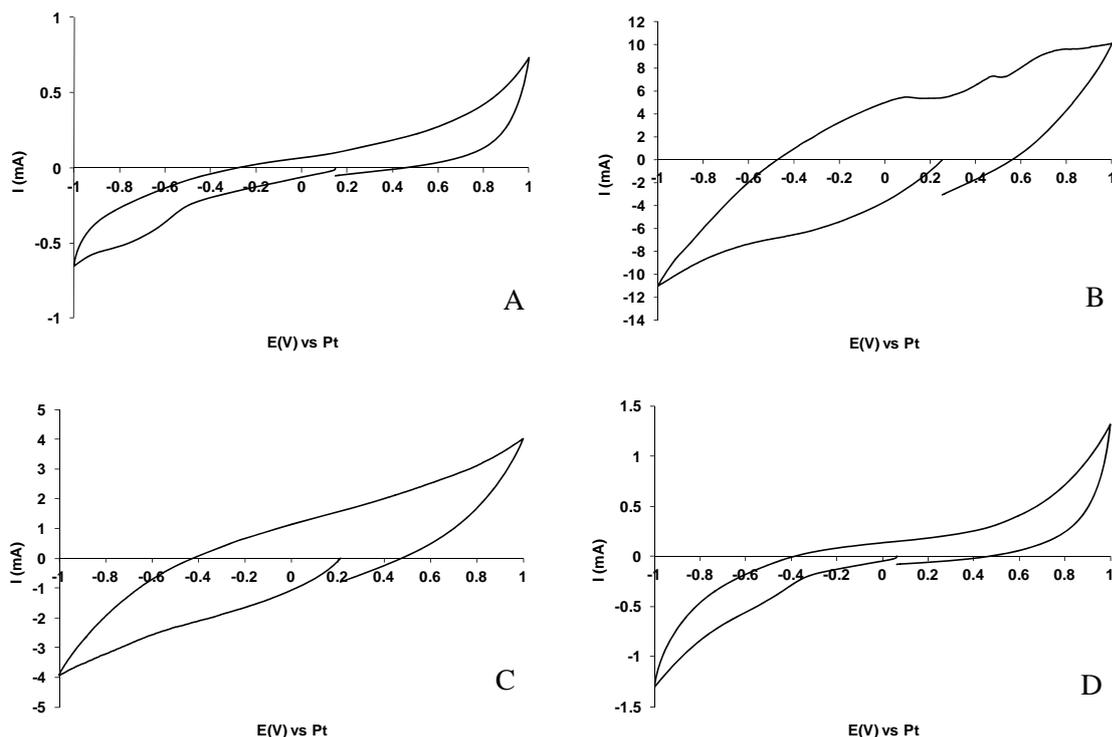


Figura 5.25 Voltametrías cíclicas realizadas en medio de tampón fosfato sódico 0.1M a pH 7.4 a 20 mV/s de A) disco de teflón puro B) disco de teflón y IrO_2 comercial, C) disco de teflón y PPy- IrO_x sintetizado a 150 °C durante 96 horas y D) PEDOT- IrO_x sintetizado a 150 °C durante 96 horas.

Los experimentos descritos muestran el posible uso de estos materiales después de su puesta a punto, objetivo que no ha sido abordado en esta tesis.

5.4.5 Ensayos celulares de citotoxicidad (MTT)

Se estudiaron los posibles efectos citotóxicos de los materiales estudiados, PPy- IrO_x y PEDOT- IrO_x sobre cultivos celulares primarios, en una configuración distinta, ya que serán en forma de polvo.

Para ello se utilizó el método conocido en inglés como *3,-4,5 dimethylthiazol-2,5 diphenyl tetrazolium bromide*, (MTT) de viabilidad celular, el cual es ampliamente usado para este fin (apartado 2.5.3). Los tests realizados se prolongaron durante 6 y 9 días *in vitro* (DIV) utilizando varias concentraciones de los polvos. Las células utilizadas fueron de neuronas corticales de ratones embrionarios NMRI de 16 días. Se probaron dos secuencias diferentes en los tests: 1) Primero se añade al pocillo que tiene ya un depósito de Poli-D-lisina (PDL) el medio de cultivo con el polvo de polímero- IrO_x , después de 24h se realiza el sembrado de las células cuando el polvo ya está depositado en el pocillo; 2) Primero se realiza el

sembrado de las células en el pocillo previamente cubierto con PDL y después se añade al pocillo el medio de cultivo que contiene el polvo de polímero- IrO_x .

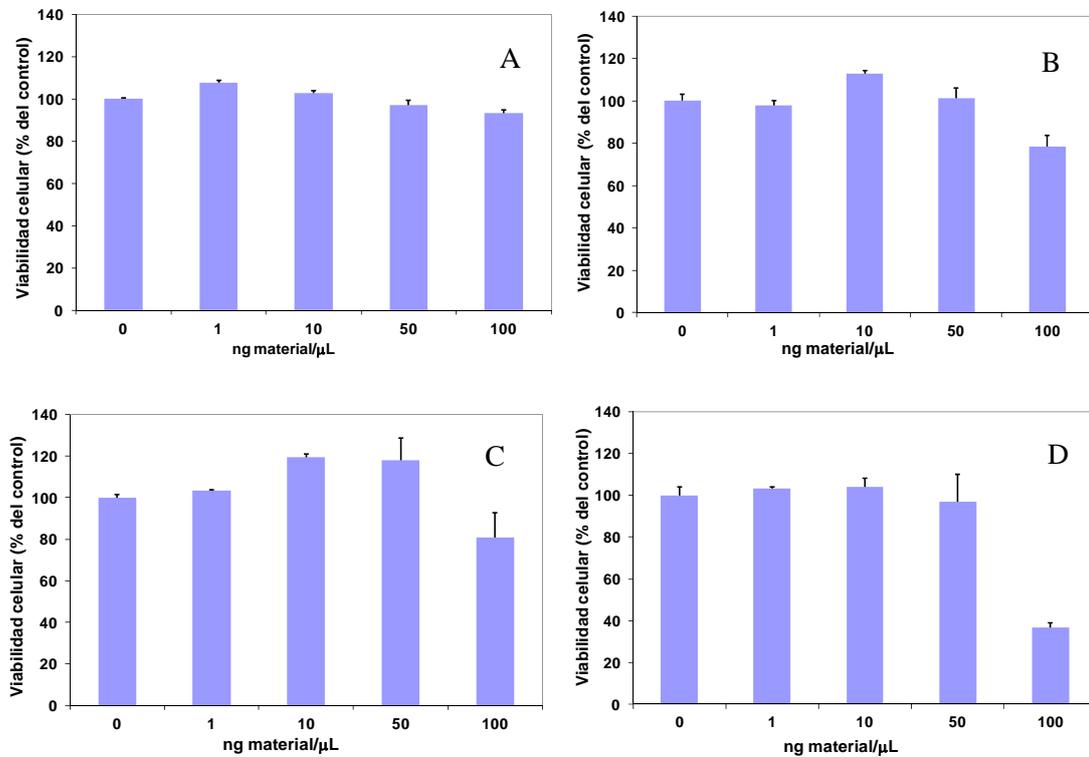


Figura 5.26 Histogramas de los ensayos MTT a 6 días *in vitro*: A) PPy- IrO_x , secuencia 1, B) PPy- IrO_x , secuencia 2, C) PEDOT- IrO_x , secuencia 1, B) PEDOT- IrO_x , secuencia 2. Todos los resultados son el valor medio de 6 a 11 cultivos.

Se detectó en todos los casos estudiados una concentración crítica de polvo de 50 ng/μl a partir de la cual las células eran significativamente afectadas por la toxicidad (Figuras 5.26 y 5.27). A partir de este punto se producía un importante descenso en la viabilidad celular, y por tanto en la supervivencia celular. Todos los casos estudiados muestran la misma tendencia y como era de esperar existe mayor supervivencia en los cultivos a 6 días que en los de 9. La supervivencia celular es mayor en el caso de los materiales depositados sobre PDL (Figuras 5.26, 5.27 A y C, secuencia 1) y para ambos materiales se puede establecer la concentración de 10 ng/μl como segura para la supervivencia y crecimiento celular hasta 9 días *in vitro*. El polvo de PEDOT- IrO_x parece ser ligeramente más tóxico que el PPy- IrO_x , ya que la viabilidad celular se reduce un 23% (secuencia 1) y un 50% (secuencia 2) cuando la concentración del material pasa de 10 a 50 ng/μl en cultivos de 6 días; en el caso del PPy- IrO_x estos valores son de un 10% (secuencia 1) y de un 18% (secuencia 2) también en cultivos de 6 días. Sin embargo, en el caso de la secuencia 2 la toxicidad de los dos materiales se equiparaba al incrementar los días de cultivo de 6 a 9.

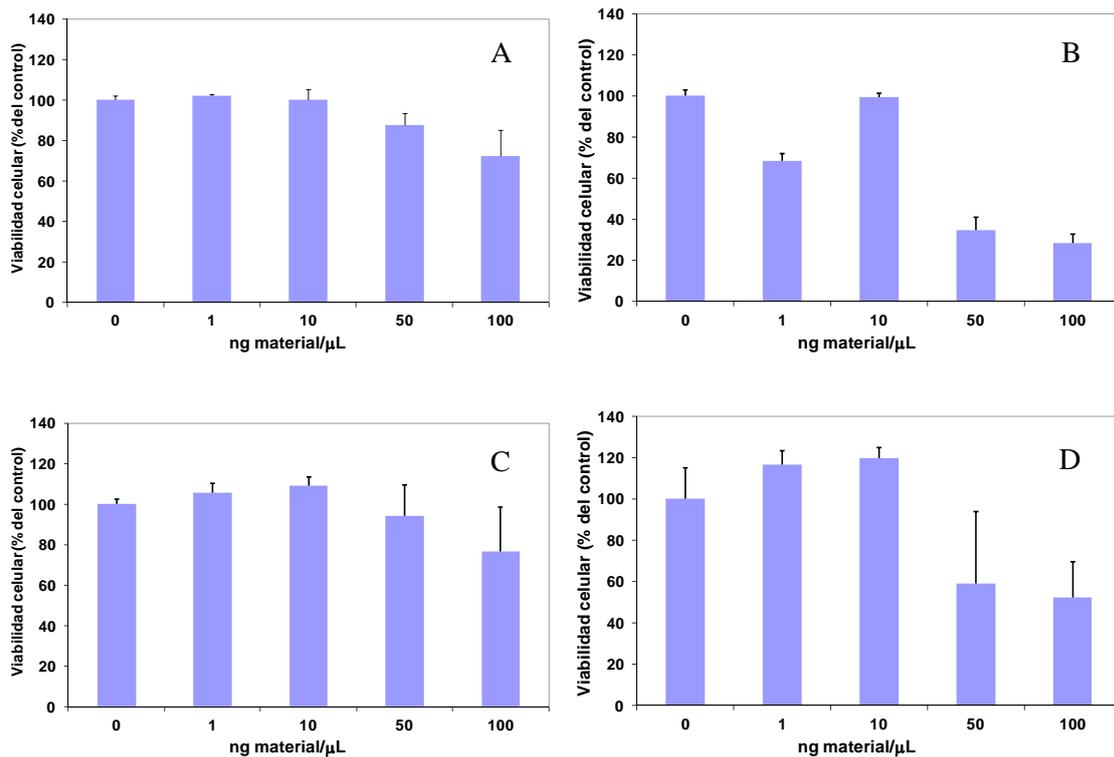


Figura 5.27 Histogramas de los ensayos MTT a 9 días *in vitro*: A) PPy-IrO_x, secuencia 1, B) PPy-IrO_x, secuencia 2, C) PEDOT-IrO_x, secuencia 1, B) PEDOT-IrO_x, secuencia 2. Todos los resultados son el valor medio de 6 a 11 cultivos.

5.5 Conclusiones

- Se sintetizaron capas de polipirrol y PEDOT utilizando como dopantes dos especies de iridio como el cloruro de iridio hidratado (IrCl₃·xH₂O) y con hexanitroiridato de potasio (K₃Ir(NO₂)₆) de modo potencioestático. La deposición potenciodinámica del PPy-IrCl₃ origina la formación de nanopartículas cristalinas de óxido de iridio (IV).
- Las síntesis se producen de forma lineal y aleatoria en cuanto a lo que el rendimiento o eficiencia de síntesis se refiere. Un menor pH aumenta este valor.
- Se encuentra un menor contenido de iridio en las muestras dopadas con hexanitroiridato de potasio y alto grado de impurezas. Todas las muestras contienen una gran cantidad de agua, lo que es confirmado por el XPS y las medidas de ángulo de contacto, solo en el caso de la muestra de PPy-K₃Ir(NO₂)₆ parece que se encuentra una baja cantidad de agua. Esta muestra también presenta una rugosidad mucho más baja que las demás.
- En la voltametría de reducción de las capas se encuentran más picos que en las especies estudiadas en otros capítulos debido a la valencia mixta del iridio y a la capacidad de este a

formar complejos. La conjunción polímero-compuesto de iridio aumentó la capacidad de carga de las muestras.

- Las capacidades de carga de estas capas son mayores a todas las de las otras capas estudiadas en esta tesis, y la capacidad del PEDOT es mayor que la del PPy como sucedía en las capas dopadas con surfactantes. Ello confirma que la incorporación de compuestos de iridio aumenta la capacidad de carga. Los valores fueron mayores en condiciones estáticas de potencial durante la medida.
- Solo la muestra de PPy dopada con $K_3Ir(NO_2)_6$ dio resultados algo satisfactorios en cuanto a cultivos celulares.
- Se obtuvo PPy dopado con $IrCl_3$ y con $K_3Ir(NO_2)_6$ mediante síntesis química en condiciones ambientales durante una semana. El primer compuesto dio un polvo negro formado por nanoesferas como resultado. En el segundo caso el polvo tuvo una morfología aleatoria. Estos polvos resultaron tóxicos a nivel celular por lo que no se prosiguió su investigación.
- Se obtuvieron polvos de PPy y PEDOT con IrO_2 de forma hidrotermal sintetizados a 150 °C durante 96h en los cuales parte del óxido está encapsulado en el polímero.
- El óxido comercial parece formar oxohidróxidos de iridio durante la reacción, y se detectan tres fases finales en el producto resultante: 1) óxido puro, 2) polímero puro y 3) material híbrido encapsulado.
- Se detectó actividad electroquímica de los materiales obtenidos.
- Se realizó un ensayo MTT de citotoxicidad con células neuronales y con los materiales descritos, donde se averiguó la fiable viabilidad celular hasta una concentración de los mismos de 50 ng/ μ l en medio de cultivo celular a 6 y 9 días *in Vitro*.

5.6 Bibliografía

- [1] P. Gómez-Romero, *Advanced Materials* **13**, No. 3 (2001).
- [2] R. Gangopadhyay and D. Amitabha. *Chemistry of Materials* **12** (2000) 608.
- [3] C.S.C. Bose and K. Rajeshwar, *J. Electroanal. Chem.* **333** (1992) 235-256.
- [4] C.C. Chen, C.S.C. Bose and K. Rajeshwar. *J. Electroanal. Chem.* **350** (1993) 161-176.
- [5] Chi-Chang Hu and Chien-How Chu. *Materials Chemistry and Physics* **65** (2000) 329-338.
- [6] G. Cao, M.E. Garcia, M. Alcala, L.F. Burgess and T.E. Mallouk, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 7574-7575.
- [7] L. F. Nazar, Z. Zhang and D. Zinkweg, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 6239-6240.

- [8] J.K. Vassiliou, R.P. Ziebarth, F.J. DiSalvo and A. Rosenberg. *Chem. Mater.* **2** (1990) 738-741.
- [9] M. Kryszewski and J.K. Jeszka. *Synth. Metals* **94** (1998) 99-104.
- [10] B. Aurian-Blajeni, S.C. Holleck and B.H. Jackman, *J. of Appl. Electrochem.* **19** (1989) 331-335.
- [11] Y. Lu, T. Li, X. Zhao, M. Li, Y. Cao, H. Yang, Y.Y. Duan. *Biomaterials* **31** (2010) 5169-5181.
- [12] A. M. Cruz et al. *J. of physical chemistry C* **116** (2012) 5155-5168.
- [13] S. C. Mailley, M. Hyland, P. Mailley, J.A.D. McLaughlin, and E.T. McAdams. *Materials science and engineering* **21** (2002) 167-175.
- [14] J. D. Weiland and D.J. Anderson. *IEEE transactions on biomedical engineering* **47**, no. 7 (2000).
- [15] X. Wang, X. Gu, C. Yuan, S. Chen, P. Zhang, T. Zhang, J. Yao, F. Chen and G. Chen. *J. Biomed. Materials Research Part A* **68A** (2004) 411-422.
- [16] M.A. Careem, Y. Velmurugu, S. Skaarup and K. West. *Journal of power sources* **159** (2006) 210-214.
- [17] T. Sotomura, H. Uemachi, K. Takeyama, K. Naoi and N. Oyama. *Electrochim. Acta* **37** (1992) 1851.
- [18] J.M. Pope and N. Oyama. *J. Electrochem. Soc.* **145** (1998) 1893.
- [19] F. Leroux, G. Goward, W.P. Power and L.F. Nazar. *J. Electrochem. Soc.* **144** (1997) 3886.
- [20] M. Hepel. *J. Electrochem. Soc.* **145** (1998) 124.
- [21] C. Barbero, M.C. Miras, O. Haas and R. Kotz. *J. Electrochem. Soc.* **144** (1997) 4170.
- [22] T.F. Otero, I. Cantero and H. Grande. *Electrochim. Acta* **44** (1999) 2053.
- [23] B. Wessling and J. Posdorfer. *Electrochim. Acta* **44** (1999) 2139.
- [24] T. Makris, V. Dracopoulos, T. Stergiopoulos and P. Lianos. *Electrochimica acta* **56** (2011) 2004-2008.
- [25] W. Cai, X. Gong and Y. Cao. *Solar energy materials & Solar Cells* **94** (2010) 114-127.
- [26] G.H. Jung, K.G. Lim, T.W. Lee and J.L. Lee. *Solar energy materials & Solar Cells* **95** (2011) 1146-1150.
- [27] J. Zhu, R.R. Sattler, A. Garsuch, O. Yezpez and P.G. Pickup. *Electrochimica Acta* **51** (2006) 4052-4060.
- [28] C. Arbizzani, M. Bisio, E. Manferrari and M. Mastragostino. *Journal of Power Sources* **178** (2008) 584-590.
- [29] W. Yao, J. Yang, J. Wang and Y. Nuli. *Electrochemistry Communications* **9** (2007) 1029-1034.

- [30] L. Atanasoska et al. *Chemistry of materials* **4** (1992) 988-994.
- [31] X. Ren et al. *Journal of physical chemistry* **97** (1993) 5356-5362.
- [32] S. A. Cheng et al. *Synthetic metals* **129** (2002) 53-59.
- [33] A. F. Torman-Dickenson, ed. *Comprehensive Inorganic Chemistry, vol. 3*. Pergamon press, Oxford (1973).
- [34] K. Idla, A. Talo, H. E.-M. Niemi, O. Forsén and S. Yläsaari. *Surface and Interface analysis* **25** (1997) 837-854.
- [35] W. Prissanaroon, N. Brack, P.J. Pigram, J. Liesegang and J.T. Cardwell. *Surface and Interface Analysis* **33** (2002) 653-662.
- [36] C. Malitesta, I. Losito, L. Sabbatini and P.G. Zambonin. *J. Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **76** (1995) 629-634.
- [37] S.K.M. Jönson et al. *Synthetic metals* **139** (2003) 1-10.
- [38] S. Bhandari, M. Deepa, S. Singh, G. Gupta and R. Kant. *Electrochimica acta* **53** (2008) 3189-3199.
- [39] M. Omastova, M. Trchova, J. Kovarova and J. Stejskal. *Synthetic Metals* **138** (2003) 447-455.
- [40] T.K. Vishnuvardhan, V.R. Kulkarni, C. Basavaraja and S.C. Raghavendra. *Bull. Mater. Sci.* **29** (2006) 77-83.
- [41] L. Zhan, Z. Song, J. Zhang, J. Tang, H. Zhan, Y. Zhou and C. Zhan. *Electrochimica Acta* **53** (2008) 8319-8323.
- [42] P. Damlin, C. Kvarnstrom and A. Ivaska. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **570** (2004) 113-122.
- [43] Z. H. Cheng, A. Yasukawa, K. Kandori and T. Ishikawa. *Langmuir* **14(23)** (1998) 6681-6686.
- [44] K. Naoi, Y. Oura, M. Maeda and S. Nakamura. *J. Electrochem. Soc.* **142**, No. 2 (1995).
- [48] A.M. Cruz, Tesis doctoral UAB 2010, <http://www.tdx.cat/TDX-0125111-114530>.
- [49] N.V. Blinova, J. Stejskal, M. Trchová, J. Prokeš and M. Omastová. *European Polymer Journal* **43** (2007) 2331-2341.
- [50] S. Shimoda and E. Smela. *Electrochimica acta* **44** (1998) 219-238.
- [51] *Handbook of Conducting Polymers, 3rd ed.*, CRC Press, Boca Raton, FL 2007.
- [52] G.S. Nahor, P. Hapiot, P. Neta and A. Harriman, *J. Phys. Chem.* **95** (1991) 616-621
- [53] L.D. Burke and D.P. Whelan. *J. Electroanal. Chemistry* **162** (1984) 121-141.
- [54] I.A. Lervik, M. Tsyppkin, L. E. Owe and S. Sunde. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **645** (2010) 135-142.

- [55] Schaarschmidt, A. A. Farah, A. Aby and A. S. Helmy. *J. Phys. Chem. B.* **113**, No. 28, 2009.
- [56] R. Rajagopalan and J.O. Iroh. *Applied Surface Science* **218** (2003) 58-69.
- [57] W. Won, H. J. Yun and Y.S. Yun. *Journal of Colloid and Interface Science* **331**(2009) 83-89.
- [58] L.D. Burke and D.P. Whelan. *J. Electroanal. Chemistry* **162** (1984) 121-141.
- [59] L. Ruangchuay, J. Schwank and A. Sirivat. *Applied Surface Science* **199** (2002) 128–137.
- [60] H. Soo Han and K. Kim. *Journal of Molecular Structure (Teochem)* **418** (1997) 1-10.
- [61] H. A. Al-Abadleh and V. H. Grassian. *Langmuir* 2003, **19**, 341-347.
- [62] M.V. Murugendrappa, A. Parveen and M.V.N. Ambika Prasad. *Materials Science and Engineering A* **459** (2007) 371-374.
- [63] C. Kvarnström, H. Neugebauer, S. Blomquist, H.J. Ahonen, J. Kankare and A. Ivaska. *Electrochimica Acta* **44** (1999) 2739-2750.
- [64] J. Tamm, T. Raudsepp, M. Marandi and T. Tamm. *Synthetic Metals* **157** (2007) 66-73.
- [65] N. Costantini and J.M. Lupton. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **5** (2003) 749-757.

Capítulo 6

Conclusiones

- El uso de dos surfactantes (DBS y PSS) como contraiones del PPy dio como resultado capas finas de baja rugosidad y buena conductividad, con una buena adherencia a la superficie. El uso de uno u otro provoca cambios en el proceso de síntesis y en la morfología final de las capas a nivel visual.
- Las capas de PPy dopadas con perclorato y polioxometalato no resultaron efectivas, la primera por su mala adhesión y resistencia a los fluidos y la segunda por sus efectos tóxicos con las células.
- La caracterización de las capas de PEDOT-PSS dio resultados muy parecidos a las del PPy-PSS, pero mayor reproducibilidad y linealidad en propiedades electroquímicas e impedancia.
- Los resultados de los cultivos celulares no resultaron del todo satisfactorios en ninguna de las muestras dopadas con surfactantes, seguramente debido a su baja reproducibilidad, baja homogeneidad en una misma capa, y una alta presencia de carbono o surfactante en la superficie.
- Se utilizaron biomoléculas como contraión para la síntesis de polímeros conductores (PPy y PEDOT) con el objetivo de mejorar la biocompatibilidad y la supervivencia y crecimiento celular con resultados satisfactorios. Y se confirmó la mejora que comporta usar una bicapa respecto a una monocapa.
- Los resultados de los cultivos celulares fueron muy satisfactorios con el uso de dos aminoácidos como dopantes: la glutamina y la lisina, y entre ellas la mejor fue una bicapa de PEDOT/PPy dopada con lisina 0.01M a pH 12, la de mayor concentración de dopante, con lo cual parece que una mayor concentración de la biomolécula en la capa sea beneficioso para el comportamiento celular.
- Se sintetizaron capas de polipirrol y PEDOT utilizando como dopantes dos especies de iridio como el cloruro de iridio hidratado ($\text{IrCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) y con hexanitroiridato de potasio ($\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$) de modo potencioestático. La deposición potenciodinámica del PPy- IrCl_3 origina la formación de nanopartículas cristalinas de óxido de iridio (IV).
- Solo la muestra de PPy dopada con $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ dio resultados algo satisfactorios en cuanto a cultivos celulares.
- Todas las capas obtenidas fueron electroactivas, describiendo los picos de reducción típicos para estos compuestos. La adhesión de PLL no pasivó las muestras, que conservaron por tanto su electroactividad. Las capas obtenidas tuvieron una buena conductividad.
- Las capas sintetizadas revelaron una buena capacidad de carga. La medida se realizó a 20mV/s durante 1.5V. El PEDOT siempre tuvo más capacidad de carga que el PPy. Por orden las capas con mayor capacidad de carga son las dopadas con compuestos de iridio, seguidas por las dopadas con surfactantes y las dopadas con aminoácidos. El valor de estas

últimas, que son las de mejor funcionamiento a nivel de cultivos celulares, permite también una buena electroestimulación, sobretodo en corrientes DC y con pulsos largos. En todos los casos los valores de capacidad son un orden de magnitud mayor que el de materiales como los metales nobles (Pt o Pt/Ir, no faradaicos), lo que muestra que la aproximación del uso de materiales electroactivos con propiedades redox planteada en la introducción es apropiada.

- El aumento de la concentración de PLL adherida a la capa no tuvo efectos significativos en los resultados de los cultivos celulares de neuronas corticales.
- Se obtuvo PPy dopado con IrCl_3 y con $\text{K}_3\text{Ir}(\text{NO}_2)_6$ mediante síntesis química en condiciones ambientales durante una semana. El primer compuesto dio un polvo negro formado por nanoesferas como resultado. En el segundo caso el polvo tuvo una morfología aleatoria. Estos polvos resultaron tóxicos a nivel celular.
- Se obtuvieron polvos de PPy y PEDOT con IrO_2 de forma hidrotermal sintetizados a 150 °C durante 96h en los cuales parte del óxido está encapsulado en el polímero. Se detectó actividad electroquímica de los materiales obtenidos. Se realizó un ensayo MTT de citotoxicidad con células neuronales y con los materiales descritos, donde se averiguó la fiable viabilidad celular hasta una concentración de los mismos de 50 ng/ μl en medio de cultivo celular a 6 y 9 días *in Vitro*.
- Los polímeros estudiados en esta tesis muestran una irreversibilidad parcial en sus voltametrías cíclicas de caracterización realizadas a 20 mV/s (equivale a un pulso cada 500s), lo que permite sugerir que la aplicación de estos materiales sería más apropiada para procesos lentos o de corriente directa. Es decir, pulsos de varios segundos o con esperas entre ellos de varios segundos, justo lo contrario de los protocolos usados hoy día para electroestimulación funcional para patologías como el Parkinson. Estos estímulos largos podrían ser más apropiados en una posible regeneración en el futuro.
- Los valores de rugosidad y de hidrofiliidad no resultaron definitivos para el éxito de los cultivos celulares, ya que un material que funcionó satisfactoriamente en este sentido como es la bicapa de PPy/PEDOT dopada con glutamina presenta valores de rugosidad y hidrofiliidad similares a los de una capa con peores resultados en cultivos celulares como la de PPy-DBS. No se puede decir que las capas más rugosas o más hidrofílicas o más rugosas sean las mejores para los cultivos celulares, sino que parece que los valores intermedios son aquellos más deseables.
- Como conclusión final, se puede decir que el factor que mejora más significativamente el funcionamiento de los polímeros conductores como sustrato de crecimiento neuronal es el uso de biomoléculas como contraiones.

Apéndice

Publicaciones y congresos

A1. Lista de congresos y reuniones

- Zhiqiang Zhao, **Javier Moral-Vico**, Ana M. Cruz, Nieves Casañ-Pastor, Colin D. McCaig and Ann M. Rajnicek*. *Neuron growth and survival on conductive materials during electrical stimulation*. Gordon Research Seminar on Bioelectrochemistry, Toscana (Italia), Junio 2012.
- **Javier Moral***, N. Carretero, C. Suñol, S. Sánchez-Redondo, N. Casañ-Pastor. “*Conducting polymers as electrodes in neural systems. Bilayer composites and aminoacid counterions*”. QIES 2012, Girona (España). Julio 2012. Presentación oral
- Nina. M. Carretero, **J. Moral**, A.M. Cruz and N. Casañ-Pastor*. “*Iridium Oxide hybrids as electrodes for the Neural System*”. MRS fall meeting, Boston (USA), Noviembre 2011. Presentación oral.
- Nina M. Carretero*, **Javier Moral**, Ana M. Cruz and N. Casañ-Pastor. “Study of polypeptide adhesion on biomaterials”. *Summer School on Nanoscale Science of Biological Interfaces*. California – USA 2010. Póster.
- **Javier Moral***, Nina M. Carretero, Ana M. Cruz and N. Casañ-Pastor. “Modificación y funcionalización superficial de materiales para aplicaciones biomédicas”. *XI Congreso Nacional de Materiales*. Zaragoza – España, 2010.
- **Javier Moral***, V. Padial and N. Casañ-Pastor. “*Electrodeposition of Conductive polymers containing aminoacids: Electrochemical and Biological applications*”. *XI Congreso Nacional de Materiales*. Zaragoza – España, 2010.
- **J. Moral-Vico***, A.M. Cruz, N. Carretero, J.P. Sordo, F. García, N. Casañ-Pastor. “Conductive polymers containing aminoacids and inorganic IrOx electroactive materials for soft tissue applications”. *2nd China-Europe Symposium on Biomaterials in Regenerative Medicine*. Barcelona – Spain 2009. Presentación oral.
- A.M. Cruz, C. de Haro, **J. Moral**, N. M. Carretero, Ll. Abad, M. Carballo, V. Padial, J. Collazos Castro, N. Casañ-Pastor*. “Electroactive Materials, Electrochemistry, Field Application, Interfaces and Cultures”. *4st PROGRESS MEETING NERBIOS PROJECT*. Aberdeen – Escocia 2009. Presentación oral.
- **J. Moral***, N. Casañ-Pastor. “*Electrodeposition of Conductive polymers containing aminoacids: Electrochemical and Biological applications*”. *216th ECS Meeting*. Viena – Austria 2009. Presentación oral.

-
- **J. Moral***, F. García, N. Casañ-Pastor. “Conductive polymers as substrates for neural growth”. *22nd European Conference on Biomaterials*. Lausanne – Suiza 2009. Poster.
 - **J. Moral***, N. Casañ-Pastor. “Conducting polymeric materials”. *3st PROGRESS MEETING NERBIOS PROJECT*. Porto – Portugal 2009. Presentación oral.
 - **J. Moral***, J. Collazos-Castro, C. De Haro, Ll. Abad, M. Carballo, N. Casañ-Pastor. “Conductive polymers as substrates for neural growth”. *59th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry*. Sevilla – España 2008. Póster.
 - **J. Moral***, Ll. Abad, C. de Haro, M. Carballo, J. Collazos Castro y N. Casañ-Pastor. “Conductive polymers as substrates for neural growth”. *X Congreso Nacional de Materiales*.- San Sebastián – España 2008. Presentación oral.
 - Ll. Abad*, **J. Moral**, A.M. Cruz, C. De Haro, A. Pérez del Pino and N. Casañ-Pastor. “Topographical Changes versus preparation procedures and versus Oxidation state in Conducting Oxides and Polymers”. *International SPM User Meeting*. Barcelona – España 2008. Póster
 - **J. Moral***, N. Casañ-Pastor. “Polymeric materials for neural growth”. *2st PROGRESS MEETING NERBIOS PROJECT*. Platja d’Aro – España 2008. Presentación oral.
 - **J. Moral***, C. de Haro, J.E. Collazos-Castro, M. Carballo-Vila, N. Casañ-Pastor. “Conductive polymers as substrates for neural growth”. *IV World congress on biomimetic, artificial muscles and nano-bio*. Cartagena – España 2007. Presentación oral
 - **J. Moral***, C. de Haro y N. Casañ-Pastor. “Polymeric materials for neural growth”. *1st PROGRESS MEETING NERBIOS PROJECT*. Patras – Grecia 2007. Presentación oral.
 - **J. Moral***, A.M. Cruz, C. De Haro, J. Frexedas, N. Casañ-Pastor. “Thin coatings for neural growth”. *Summer School in Polymeric and Self Assembled gels*. Santa Bárbara – USA 2007. Póster

A.2 Lista de publicaciones derivadas y directamente relacionadas con este trabajo

- A.M. Cruz, Ll. Abad, N.M. Carretero, **J. Moral-Vico**, J. Fraxedas, P. Lozano, G. Subías, V. Padial, M. Carballo, J. E. Collazos-Castro and N. Casañ-Pastor. *J. of physical chemistry C* **116** (2012) 5155-5168.
- J.E. Collazos-Castro, J.L. Polo, G.R. Hernández-Labrado, V. Padial-Cañete, C. García-Rama. *Biomaterials* **31** (2010) 9244-9255. (Trabajo originado directamente en el ICMAB).
- **J. Moral-Vico**, C. Suñol, N. Casañ-Pastor. *Nanocomposites of iridium oxide and conducting polymers as electroactive phases in biological media*. En proceso de elaboración.
- **J. Moral-Vico**, N.M. Carretero, S. Sánchez, C. Suñol, N. Casañ-Pastor. *Biocompatibility enhancing in conducting polymers as electrodes in neural systems. Bilayer composites and aminoacid counterions*. En proceso de elaboración.
- Zhiqiang Zhao, **Javier Moral-Vico**, Ana M. Cruz, Nieves Casañ-Pastor, Colin D. McCaig and Ann M. Rajnicek. *Neuron growth and survival on conductive materials during electrical stimulation*. En proceso de elaboración.