



**DESARROLLO DE UN SENSOR
VOLTAMÉTRICO BASADO EN
FTALOCIANINAS SUSTITUIDAS Y
ESTUDIO DEL EFECTO SUPERFICIAL
ELECTROQUÍMICO CON AFM IN SITU**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2019/2020

Autor:

Alfonso González Gil

Tutor/es:

María Luz Rodríguez Méndez

Cristina García Cabezón

Máster en Nanociencia y Nanotecnología Molecular

E.T.S. Ingenierías Industriales, Valladolid

Universidad de Valladolid

Agradecimientos

Quiero agradecer a los diversos organismos que han financiado los proyectos de investigación que han permitido la realización de este trabajo. En concreto:

- Al Ministerio de Educación, por su financiación en el proyecto “*Desarrollo de un sistema multisensor nanoestructurado portátil para análisis de Leche: en el camino hacia la industria 4.0*” (Ref. RTI2018-097990-B-I00)
- A la Junta de Castilla y León y la Consejería de Educación, por su financiación en los proyectos “*Microscopio AFM/STM*” (Ref. UVA01 UIC080) y “*Nuevas estrategias para el diseño de sensores y biosensores para la detección de polifenoles y azúcares basadas en polímeros tubulares*” (Ref. VA275P18)
- A las empresas colaboradoras en los diferentes proyectos, en especial Cellmat Technologies y Calidad Pascual.

En especial, agradecer de nuevo a la Junta de Castilla y León por las subvenciones que permitieron la adquisición del equipo de Microscopía de Fuerza Atómica compartido en la red de Castilla y León INFRARED, y que ha sido de una ayuda inestimable para una parte imprescindible de este trabajo.

Abstract

In the present work a novel voltammetric biosensor for the electrochemical detection of galactose has been developed. The Langmuir-Blodgett technique was employed to transfer Tetra-Carboxy Iron Phthalocyanines (TCFePcs) monolayers on the surface of ITO substrate. The fabricated thin films provide a biocompatible environment where the immobilized enzyme (galactose oxidase) can maximize the enzymatic activity.

The designed biosensor is thought to implement the electrocatalytic effect of phthalocyanines along with the carboxy groups that enhance the immobilization of the enzyme over the electrode surface, while allowing the enzyme to work more efficiently in a biomimetic environment. The structural characterization of the thin films was made through UVVis and FTIR spectroscopies, and AFM imaging. The characterization proved that after the deposition of the films there is an ordered molecular organization on the surface.

The selectivity of the biosensor was determined through cyclic voltammetry performed in an electrochemical cell integrated in the AFM. Electrochemical AFM is a highly innovative technique in the field of electrochemical sensors, which has been developed in the AFM equipment during this research, and allowed to perform a deeper study of the effects that electrochemical reactions have on the surface of the electrode.

Electrochemical in situ AFM was performed and showed that electrochemical reactions on the surface give rise to nucleated structures that see their nucleation rate increased with and increasing number of voltammetry cycles. The immobilization of the enzyme on the surface was tested, resulting in an enhanced immobilization due to the attractive interactions between the carboxy groups of the TCFePcs and the amino groups present in the enzyme. The GaOx was still strongly attached to the surface after ten voltammetry cycles, so the decrease in the enzymatic activity after a sufficiently high number of cycles can be associated to the growth of nucleated structures and not to enzyme desorption off the surface.

Resumen

Se ha desarrollado un biosensor electroquímico para la detección de galactosa mediante la modificación de electrodos de ITO (óxido de estaño e indio) con películas nanoestructuradas de ftalocianinas de hierro sustituidas con cuatro grupos carboxilo (TCFePc). Para ello se ha empleado la técnica de Langmuir-Blodgett, que proporciona un entorno biomimético para mejorar la actividad enzimática.

Con este biosensor se busca aprovechar tanto el carácter electrocatalítico de las ftalocianinas como la presencia de grupos carboxy, que permite una inmovilización más eficiente de la enzima galactosa oxidasa (GaOx), además de aportar un entorno biomimético donde las reacciones enzimáticas vean maximizada su eficiencia. Una vez preparados, los biosensores se han caracterizado con espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis), espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y microscopía de fuerza atómica (AFM), que han demostrado la correcta organización de las películas sobre el sustrato y la presencia de orden molecular sobre la superficie.

Una vez caracterizadas, las películas se han utilizado como sensores para la detección de galactosa, y se ha estudiado la selectividad del biosensor respecto a galactosa mediante voltametría cíclica, utilizando una celda electroquímica integrada en el AFM. Se trata de una técnica muy novedosa en el campo de los sensores electroquímicos, que ha sido puesta a punto durante esta investigación, y que ha permitido el estudio de los efectos superficiales de las reacciones electroquímicas sobre la superficie del biosensor.

La electroquímica in situ con AFM mostró que las reacciones electroquímicas superficiales producen nucleación de estructuras sobre la superficie del biosensor cuyo ritmo de crecimiento aumenta con el número de ciclos de voltametría aplicados. Por otro lado, se comprobó la eficiencia de la inmovilización de la enzima sobre el sensor, que se ve mejorada respecto al ITO debido a las interacciones atractivas entre las TCFcPc y la GaOx, manteniendo la enzima inmovilizada sobre el biosensor sin que haya un deterioro apreciable durante un número creciente de ciclos. La pérdida de actividad enzimática tras un número lo suficientemente grande de ciclos se debe entonces al crecimiento de estructuras sobre la superficie que actúan como centros de nucleación y no a la desorción de la enzima de la superficie del biosensor.

Índice

1. Motivación y justificación	3
2. Objetivos	6
3. Estado del arte	8
3.1. Nanociencia y nanotecnología	8
3.2. Sensores	8
3.2.1. Clasificación de los sensores	9
3.2.2. Sensores químicos	10
3.3. Biosensores	10
3.3.1. Biosensores y alimentos:	11
3.4. Sensores electroquímicos	12
3.5. Electroquímica:	13
3.6. Películas delgadas como biosensores electroquímicos	17
3.6.1. Técnica de Langmuir-Blodgett:	18
3.7. Ftalocianinas como materiales sensibles	24
3.7.1. Sensores electroquímicos basados en ftalocianinas	27
3.7.2. Biosensores electroquímicos que combinan ftalocianina y enzimas	27
3.7.3. Descripción de la enzima Galactosa oxidasa	28
4. Técnicas de Caracterización	29
4.1. UVVis	29
4.1.1. Teoría Cuántica	30
4.1.2. Aspectos químicos	31
4.1.3. Descripción de la técnica	33
4.1.4. Limitaciones y aplicaciones	34
4.2. FTIR	34
4.2.1. Enlaces activos en el Infrarrojo	35
4.2.2. Funcionamiento	36
4.2.3. Ventajas y aplicaciones	37
4.3. Microscopía de Fuerza Atómica	37
4.3.1. Interacción punta-muestra	38
4.3.2. Ventajas	40
4.4. Microscopía de Fuerza Atómica Electroquímica (EC-AFM)	42
5. Materiales y métodos	45

5.1. Metodología	45
5.2. Materiales	46
5.2.1. Reactivos	46
5.2.2. Equipos	46
5.3. Procedimiento	50
5.3.1. Fabricación de los biosensores con la técnica de Langmuir- Blodgett	50
5.3.2. Caracterización de los biosensores	51
5.3.3. Medidas electroquímicas	52
6. Resultados	53
6.1. Fabricación de los biosensores	54
6.2. Caracterización estructural de los biosensores	59
6.2.1. Espectroscopía UV-Vis	59
6.2.2. Espectroscopía FTIR	60
6.2.3. Caracterización de la superficie mediante AFM	62
6.2.4. Caracterización como sensores de galactosa: Respuesta electroquímica	63
6.3. Estudio de los cambios estructurales tras la electroquímica	65
6.3.1. Estudio de la superficie de los electrodos modificados	66
7. Conclusiones	74
A. Anexo: Manual de usuario: EC-AFM	88

Sección 1

Motivación y justificación

Este trabajo se ha desarrollado en el grupo UVaSens enmarcado en el Máster Interuniversitario en Nanociencia y Nanotecnología Molecular. El grupo UvaSens, creado en 1992 en la Escuela de Ingenierías Industriales de Valladolid por la Profesora María Luz Rodríguez Méndez, es un grupo de investigación multidisciplinar en el que químicos, físicos, ingenieros y biólogos trabajan en el desarrollo de nuevos sensores electroquímicos. Su trabajo de investigación se basa en la fabricación y caracterización de sensores y películas nanoestructuradas, para cuya modificación se emplean materiales sensibles electrocatalíticos, como ftalocianinas y nanopartículas metálicas.

Actualmente la industria se encuentra en lo que se conoce como revolución industrial 4.0, o revolución tecnológica, basada en la implementación de las nuevas tecnologías para el control y monitorización de todos los procesos de producción durante todo el ciclo industrial, desde su fabricación hasta el consumidor. El objetivo de la Industria 4.0 es desarrollar sistemas capaces de realizar análisis y tomar decisiones de forma automatizada e inteligente, más rápida y eficientemente, mediante la digitalización de procesos y manejando una gran cantidad de datos.

Esta Industria 4.0 está también siendo implementada en la industria agroalimentaria, que ha experimentado en los últimos años un fuerte crecimiento.

A principios de 2018, en Castilla y León había 2458 empresas en el sector de la industria alimentaria, habiendo experimentado un crecimiento de un 7.2 % respecto al año anterior, una tendencia de crecimiento similar a la del resto del país, creciendo esta industria en España un 8.33 %. Castilla y León ocupaba en 2018 el tercer puesto a nivel nacional en número de empresas en esta industria, con un 9.55 % del total [1]. Estas empresas representan un 32 % de la industria en Castilla y León, y un 18 % en España.

Este sector tiene especial relevancia en las exportaciones nacionales, con cerca de 1.400 millones de euros en productos exportados a países de la Unión Europea en 2017, un 75 % de las importaciones de CyL [2].

Además, la industria alimentaria exige el desarrollo de métodos de control en la calidad de los alimentos, y requiere técnicas robustas, con alta sensibilidad y selectividad. Para el análisis de alimentos, en los últimos años los biosensores se han preferido frente a otras técnicas (cromatografía, espectrometría de masas...) debido a que ofrecen mayor versatilidad, sin necesidad de una

preparación exhaustiva de las muestras y ofrecen resultados en un tiempo menor y con equipos más económicos [3].

Los biosensores son dispositivos que permiten detectar ciertas sustancias, utilizando biomateriales como materiales sensibles (enzimas, anticuerpos, ADN, biorreceptores, etc). El uso de estos biomateriales, aumenta enormemente la selectividad debido a la complementariedad de las reacciones biológicas (enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo, dos hélices de ADN, etc.).

Por otra parte, la Nanociencia ha propiciado un fuerte desarrollo en el campo de los nanosensores para la detección de cambios físicos y químicos, la monitorización de biomoléculas y cambios bioquímicos en células, y la medición de compuestos tóxicos en la industria y el medio ambiente [4]-[5]. La combinación de las propiedades de los materiales nanométricos y su disposición en películas delgadas permite desarrollar nanosensores con altas prestaciones. El uso de películas delgadas permite la incorporación de enzimas a un sensor que simula un entorno biológico (biomimético), adaptando las condiciones naturales en las que se encuentran enzimas y otros compuestos biológicos para mejorar su funcionamiento, que depende en gran medida de la estructura y la interacción entre la enzima y el sustrato [6]-[7].

El desarrollo de sensores más selectivos y eficaces es una de las líneas de investigación del Grupo UvaSens, enfocado en la mejora de métodos de análisis y en la fabricación de sensores nanoestructurados más precisos, reproducibles y fiables que permitan adaptarse a las nuevas necesidades industriales.

Este trabajo se encuadra en un proyecto de investigación en el que colaboran el grupo UVaSens y Calidad Pascual (que se encuentra entre las empresas lácteas más importantes de España), cuyo objetivo es desarrollar sensores más robustos y fiables que los existentes actualmente para la detección de galactosa. En este sentido, el control y la detección de la cantidad de galactosa es fundamental en la industria alimentaria, se trata un monosacárido que al enlazarse con glucosa forma lactosa, y cuyas principales fuentes en la dieta humana son la leche y los productos lácteos.

Detectar la presencia de galactosa y ciertos azúcares en plantas y alimentos es de especial interés, debido a que se ha observado un número creciente de niños que nacen con galactosemia, un trastorno metabólico que impide que puedan metabolizar la galactosa, acumulándose en el torrente sanguíneo y provocando daños en el hígado, riñones y sistema nervioso central. Esto hace necesario el desarrollo de un análisis simple y rápido que sea capaz de detectar galactosa en alimentos de manera eficiente [8].

El análisis de la galactosa en muestras biológicas se dificulta cuando hay

presentes también glucosa y otras aldohexosas debido a las similitudes en estructura y reactividad química. La separación de galactosa de la glucosa y otros azúcares es muy problemática incluso con métodos cromatográficos [9]. Esto hace que desarrollar sensores selectivos, eficientes, y de bajo coste sea todo un reto.

Sección 2

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un nuevo biosensor electroquímico para la detección de galactosa, para posteriormente estudiar cómo los procesos electroquímicos afectan a la superficie del biosensor. Para ello se fabricará un nuevo tipo de sensor electroquímico, basado en películas delgadas nanoestructuradas preparadas mediante la técnica de Langmuir-Blodgett, en la que el enzima se encuentre en un entorno biomimético que preserve y favorezca la actividad enzimática, y en el que se combinen galactosa oxidasa con ftalocianinas metálicas sustituidas como mediador electrónico.

La segunda parte de este trabajo se trata de un estudio novedoso de los efectos superficiales durante las reacciones electroquímicas, que permite conocer los procesos que llevan al deterioro de los sensores durante su uso, de forma que pueda conocerse su robustez frente a estos experimentos, mejorar sus prestaciones y alargar su tiempo de vida útil.

Este objetivo se conseguirá a través de los siguientes objetivos secundarios:

- Desarrollar un biosensor electroquímico nanoestructurado que incorpore nuevos materiales electrocatalíticos (ftalocianinas metálicas sustituidas) mediante la técnica de Langmuir-Blodgett, y su implementación para la detección de sustancias biológicas de interés en la industria láctea (galactosa).
- Caracterización estructural de los biosensores mediante espectroscopía UV-Vis, espectroscopía FTIR y Microscopía de Fuerza Atómica.
- Determinación de la capacidad del biosensor para la detección de galactosa utilizando voltametría cíclica.
- Estudiar qué efecto producen los procesos electroquímicos sobre la superficie del sensor, mediante la monitorización de su topografía con AFM inmediatamente antes y después de los ciclos de voltametría.
- Determinar la resistencia de los biosensores a la voltametría cíclica, para estudiar su posible reutilización en función de su robustez y resistencia tras los experimentos electroquímicos.
- Paralelamente, se pondrá a punto y optimizará el procedimiento para realizar experimentos de electroquímica in situ con la celda electroquí-

mica incorporada en el AFM, de forma que puedan tomarse imágenes simultáneamente con los experimentos.

- Dada la escasa bibliografía hasta la fecha y la novedad de la técnica EC-AFM en el campo de los biosensores electroquímicos, se elaborará un manual de usuario que se añadirá en los *Anexos A* y *B*, que describirá en detalle los aspectos técnicos de la técnica y su realización.

Sección 3

Estado del arte**3.1. Nanociencia y nanotecnología**

La nanociencia se refiere a una amplia rama de la investigación científica que estudia los fenómenos en la materia a escala nanométrica, justificándose en el desarrollo de nuevos materiales (nanomateriales), con propiedades nuevas y mejoradas que surgen de su tamaño nanométrico.

Durante los años 80, la aparición de nuevas técnicas de microscopía que permiten observar y controlar pequeñas cantidades de materia, como la Microscopía de Efecto Túnel (STM) [10], Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) [10] y las Microscopías Electrónicas de Barrido y Transmisión (SEM y TEM) [11], han contribuido enormemente al desarrollo de la nanociencia.

Hoy en día, la nanociencia involucra numerosas ramas del conocimiento científico: física [12], química [13], biología y biotecnología [13], matemáticas [14], medicina [15], ciencia de materiales, e ingeniería [16], que encuentran en la nanociencia un punto común, donde hasta ahora habían sido independientes.

Por su parte, la nanotecnología surge a partir del conocimiento obtenido de la nanociencia para la síntesis, control, y manipulación de la materia en escalas que van desde los 100 *nm* hasta átomos individuales. Es aquí donde se enmarca este trabajo, dado que la posibilidad de controlar el ordenamiento de moléculas con propiedades electrocatalíticas con alta relación superficie-volumen motiva el estudio de las propiedades electroquímicas de monocapas delgadas y ordenadas de estas moléculas [17].

Más concretamente, para este trabajo se han desarrollado sensores voltamétricos utilizando la técnica de Langmuir-Blodgett para la fabricación de películas delgadas de ftalocianinas metálicas sustituidas.

3.2. Sensores

En un sentido amplio, un sensor es cualquier dispositivo capaz de detectar cambios en su entorno. A partir de la información recibida de esos cambios, un sensor convierte la información en una señal eléctrica, óptica, o acústica medible. Dependiendo de su funcionamiento, pueden dividirse en sensores físicos

(sensibles a cambios en parámetros físicos, presión, temperatura, conductividad eléctrica...) o químicos (sensibles a cambios en parámetros químicos, como el pH, la concentración de analito, reacciones...) [18].

3.2.1. Clasificación de los sensores

Como ya se ha mencionado, existen numerosos tipos de sensores, con funcionamientos diferentes debido a los diversos mecanismos para realizar la detección de moléculas, que dependen fundamentalmente de las características de la muestra y el tipo de interacción con el sensor. Algunos de las más relevantes son:

Sensores ópticos: Convierten la radiación electromagnética (luz) en una señal electrónica. Son capaces de detectar una cantidad determinada de luz y traducirla a una señal medible. Existen múltiples tipos, algunos de los más relevantes son los dispositivos fotoconductores (miden un cambio en la intensidad luminosa y lo traducen en un cambio de resistencia) [19], las células solares, que utilizan la luz incidente para producir una diferencia de potencial [20], y los fotodiodos, que convierten la luz incidente en una corriente de salida [21].

Sensores térmicos: Estos sensores pueden detectar y cuantificar la cantidad de energía térmica que genera o absorbe un sistema, permitiendo estudiar los procesos subyacentes a los cambios térmicos que están ocurriendo (reacciones, cambios físicos...) y que como consecuencia hacen que el sistema absorba o emita energía en forma de calor [22].

Sensores másicos: Utilizan diferentes métodos para detectar sustancias o moléculas con una masa determinada, de forma que pueda determinarse unívocamente su presencia. Conocida la frecuencia de resonancia de un nanotubo de carbono con la molécula de interés anclada en su extremo, puede detectarse la presencia de una determinada especie [23]. Otros sensores másicos utilizan materiales piezoeléctricos para detectar la presencia de moléculas de un gas con masa determinada midiendo la frecuencia de la estructura cristalina del piezoeléctrico después de adsorber la molécula del gas [24].

Sensores resistivos: Los sensores resistivos detectan la variación de resistencia eléctrica en la superficie del sensor como consecuencia de la interacción del material sensible con las moléculas del analito [25]. Su principal aplicación es la detección de gases, como gases tóxicos ambientales [26].

Sensores magnéticos: Habitualmente, utilizan nanopartículas metálicas [27] con propiedades magnéticas, y su funcionamiento se basa en fenómenos como el efecto Hall, la magnetorresistencia gigante (GMR), y el efecto túnel [28] para detectar los cambios en la resistencia eléctrica que provoca la interacción entre el material sensible y el analito bajo la influencia de un campo magnético externo [29].

3.2.2. Sensores químicos

Un sensor químico se define como *un dispositivo capaz de determinar cualitativa o cuantitativamente un analito concreto, de forma selectiva, y que puede usarse para la detección o medición de una sustancia química específica* [30].

Dado el gran número de sustancias conocidas, de diferente naturaleza, la detección de moléculas habitualmente se basa en el reconocimiento molecular, o en su reactividad. Además, es preferible que el sensor cuente con una serie de características, que sea capaz de aportar una respuesta rápida, tenga una vida útil larga, sea reutilizable, tenga un bajo coste, tenga un tamaño pequeño, y sea capaz de responder a un único analito (selectivo) [31].

Existen tres parámetros que determinan la eficacia de un sensor químico, la selectividad, la sensibilidad y el límite de detección: La selectividad de un sensor se define como su capacidad para discriminar una sustancia concreta basándose en el reconocimiento de su estructura o su reactividad [32]-[33]. La sensibilidad y el límite de detección se refieren a qué concentración mínima de la sustancia de interés es capaz de detectar el sensor [33].

3.3. Biosensores

En los últimos años se han desarrollado una gran variedad de sensores que utilizan diversos materiales sensibles. Sin embargo, es necesario desarrollar sensores con mayor especificidad. Por esta razón, se están realizando importantes avances en el campo de los biosensores, que utilizan biomateriales con

los que es posible aumentar la selectividad utilizando la alta especificidad enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo, etc.

Los biosensores son herramientas analíticas formadas por un material sensible biológico inmovilizado (enzimas, anticuerpos, receptores...) que se pone en contacto con un transductor que convierte las señales bioquímicas en señales eléctricas medibles [34]. Los biosensores son utilizados en la industria alimentaria para medir niveles de carbohidratos, alcoholes y ácidos en alimentos fermentados [35]-[36], en controles de calidad y detección de contaminantes químicos o biológicos. Para ello, los nanomateriales utilizados deben tener tres características fundamentales, propiedades electrocatalíticas, alta capacidad de movilidad electrónica y alta compatibilidad biológica.

Los biosensores enzimáticos son especialmente prometedores, ya que combinan una alta especificidad con una detección muy sensible debido a la amplificación enzimática de la señal [37]. Su bajo coste y fácil uso los hacen una buena alternativa a las técnicas analíticas usadas en controles de calidad alimentarios.

Recientemente ha habido un creciente interés en modificar la superficie de los electrodos con nuevos materiales para conseguir biosensores electroquímicos que muestren una mayor transferencia electrónica entre biomoléculas y una mayor especificidad. En este trabajo, se pretende mejorar la actividad de la galactosa oxidasa integrando en el biosensor ftalocianinas metálicas en una película nanoestructurada preparada mediante la técnica LB.

3.3.1. Biosensores y alimentos:

En los últimos años el uso de estas técnicas se ha centrado en el desarrollo de biosensores para la detección de múltiples especies biológicas, entre las que destacan compuestos fenólicos [35], azúcares (lactosa [39]-[40], glucosa [41]-[42], galactosa [43]-[44]...), todos ellos presentes en alimentos, y cuyo control y monitorización es importante en la industria alimentaria.

Detección de galactosa:

Habitualmente, la galactosa se analiza mediante métodos cromatográficos y espectroscópicos [45]-[46]. Estos métodos se dificultan especialmente cuando además de galactosa hay presentes otros azúcares como glucosa, lactosa o rafinosa, que tienen estructuras similares a la galactosa y tienen una reactividad química similar.

El problema de la detección de galactosa ha sido abordado de diferentes formas, entre ellas, la detección con biosensores electroquímicos basados en nanoestructuras (nanorods de ZnO [47], nanotubos de carbono [48],[49], grafeno [49]-[50]...), películas delgadas de Langmuir-Blodgett [43]-[44], o la electropolimerización de especies electroactivas [51]. Sin embargo, en comparación con otros azúcares también presentes en la leche (glucosa o lactosa), la investigación realizada hasta ahora en este campo es mucho menos extensa.

Los biosensores electroquímicos presentan numerosas ventajas frente a otros métodos de detección, además de ser más baratos y de ser un método más sencillo, aportan mayor selectividad y presentan una mayor especificidad a la galactosa frente a azúcares similares.

3.4. Sensores electroquímicos

La electroquímica estudia los fenómenos resultantes de la combinación de reacciones químicas y efectos eléctricos dentro de una celda electroquímica. Así, la electroquímica involucra el estudio de las interacciones entre la energía eléctrica y los procesos químicos. Los sensores electroquímicos facilitan la transformación de la información física o química obtenida en la celda electroquímica en una señal eléctrica procesable, para la obtención de información.

Los sensores electroquímicos utilizan un electrodo de trabajo como elemento transductor. La exigencia de la industria alimentaria en la medición de calidad, seguridad, nutrición y estabilidad de los productos aumenta la necesidad de técnicas analíticas que sean rápidas, fiables, reproducibles, y con alta sensibilidad.

Existen numerosos métodos y técnicas para estudiar estos parámetros, pero muchos tienen la desventaja de ser demasiado caros, llevar demasiado tiempo o requerir de un tratamiento previo de la muestra. En comparación con otros métodos, las técnicas electroquímicas de análisis son simples, estables, presentan un bajo coste, y tienen una alta sensibilidad y estabilidad [52].

A continuación se introducen los principios de la electroquímica utilizados habitualmente como método de funcionamiento de los sensores electroquímicos [53].

3.5. Electroquímica:

Técnicas electroquímicas de barridos de potencial:

Las técnicas electroquímicas de barrido de potencial consisten en aplicar una diferencia de potencial dentro de un rango (ventana de potencial) entre dos electrodos, para medir la respuesta en corriente del sistema, que se produce como consecuencia de eventos de transferencia electrónica entre las especies electroactivas y el electrodo de trabajo dados por las reacciones de oxidación y reducción de las especies, por lo que puede considerarse que la corriente medida en la celda es proporcional a la concentración de especies electroactivas en la disolución.

Estos procesos ocurren en la superficie del electrodo, produciendo un desequilibrio entre las cargas en el electrodo y las de la disolución. De esta forma, aparece una diferencia de potencial interfacial que puede afectar al ritmo y la dirección de una determinada reacción. La importancia de la electroquímica reside en cómo esta diferencia de potencial puede relacionarse con la termodinámica y la cinética de las reacciones que tienen lugar en los electrodos.

Habitualmente, este proceso se realiza dentro de una celda que contiene tres electrodos (electrodo de trabajo, contraelectrodo y electrodo de referencia), inmersos en una disolución que contiene las especies electroactivas de interés, y después se aplica con un potenciostato una diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo, mientras que el electrodo de referencia permite mantener un potencial controlado dentro de la celda [52].

Para transformar la información en la celda a una señal detectable, los sensores amperométricos se basan en la proporcionalidad entre la concentración de una especie electroactiva en la celda y la corriente eléctrica al oxidarse o reducirse sobre la superficie del electrodo de trabajo. Esta relación viene dada por la primera Ley de Fick de la difusión [54]:

$$J_i = -D_i \frac{\partial C_i}{\partial x} \quad (3.1)$$

Donde J_i es el flujo (número de partículas que atraviesan una sección eficaz determinada por unidad de tiempo), D_i es el coeficiente de difusión de la partícula i -ésima, y $\partial C_i / \partial x$ el gradiente de concentración.

Ahora hay que distinguir los dos procesos disipativos en una celda electroquímica, que son la *migración*, que tiene lugar por haber un gradiente de

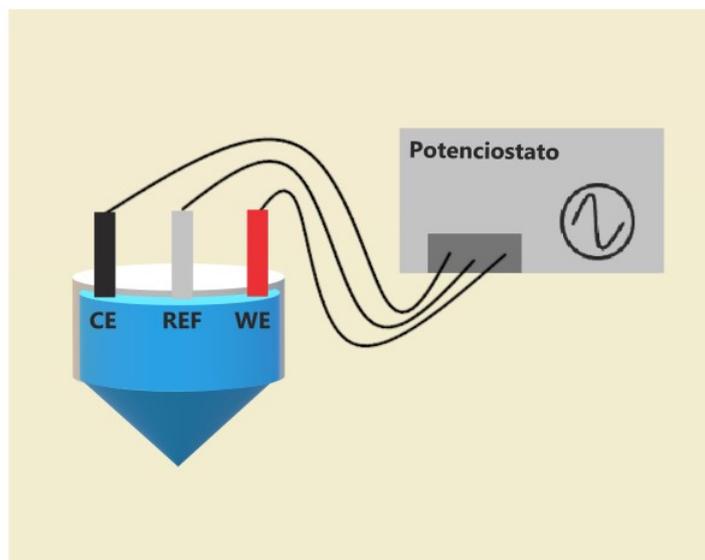


Figura 1: Esquema de una celda electroquímica de tres electrodos.

concentración, y la *convección*, un proceso fácilmente controlable y regido por la hidrodinámica, que viene dado por gradientes de densidad y otros parámetros hidrodinámicos en la celda, y sobre todo por la agitación de la disolución. La contribución de ambos procesos al flujo total $J [\frac{mol}{cm^2 s}]$ está descrita por la ecuación Nernst-Planck:

$$J(x, t) = - \left(D \frac{\partial C(x, t)}{\partial x} \right) - \left(\frac{zF}{RT} D C(x, t) \right) \left(\frac{\partial \phi(x, t)}{\partial x} \right) + C(x, t) v_x \quad (3.2)$$

Con $D [\frac{cm^2}{s}]$ el coeficiente de difusión, $C [\frac{mol}{cm^3}]$ la concentración de especie electroactiva en la disolución, $\phi [V]$ el potencial electrostático aplicado entre los electrodos, y $v_x [\frac{cm}{s}]$ la velocidad hidrodinámica.

Los experimentos electroquímicos pueden diseñarse de forma que se anulen la velocidad hidrodinámica y la contribución del potencial electrostático al flujo total de especies electroactivas, de esta manera, el transporte másico total viene dado únicamente por la contribución difusiva. En estas condiciones, la corriente resultante en el electrodo de trabajo puede relacionarse con el flujo total mediante la ecuación:

$$I_F = n A F D \left(\frac{\partial C(x, t)}{\partial x} \right) \Big|_{x=0} \quad (3.3)$$

Siendo $A [cm^2]$ el área del electrodo. El subíndice F en I_F hace referencia a la naturaleza Faradaica de estas corrientes, que son aquellas producidas dentro de la celda electroquímica como resultado de un proceso de reducción u oxidación [55].

La voltametría cíclica (CV) es la técnica electroquímica más ampliamente utilizada. La señal en el electrodo de trabajo se basa en un aumento de potencial lineal, donde el campo eléctrico \vec{E} cambia con el tiempo de forma constante. Se define entonces la velocidad de barrido (*scan rate*) como la derivada con el tiempo del campo eléctrico entre las dos placas:

$$v = \frac{dE}{dt} \quad (3.4)$$

La velocidad de barrido habitualmente varía entre $1 \frac{mV}{s}$ y $1 \frac{V}{s}$. Así, la ventana de potencial se recorre desde un potencial inicial E_i hasta un potencial final E_f . En voltametría cíclica, la dirección del potencial es revertida al llegar a E_f , y el potencial se recorre en sentido inverso hasta alcanzar de nuevo E_i .

La respuesta en corriente del sistema, I , corresponde a la adición de cargas I_c y corriente Faradaica I_F , asociadas a la carga interfacial y los eventos de transferencia electrónica en la superficie del electrodo, que están relacionados con la concentración de analito en la disolución, C_s , y la constante interfacial capacitiva del sistema, C_d , que puede eliminarse sustrayendo a la señal la intensidad de una señal en blanco, utilizando una disolución electrolítica sin especies electroactivas de forma que:

$$I = I_c + I_F = v C_d + I_F \approx I_F \quad (3.5)$$

Donde $I_F \propto C_s v^{1/2}$. De esta manera, pueden obtenerse límites de detección en voltametría cíclica para concentraciones del orden de $C_s \approx 10^{-5} M$ [52],[56].

En la Figura 2 se muestra el comportamiento habitual de un sistema en un experimento electroquímico de voltametría cíclica. Puede observarse que la corriente empieza a aumentar a un potencial que denominamos potencial

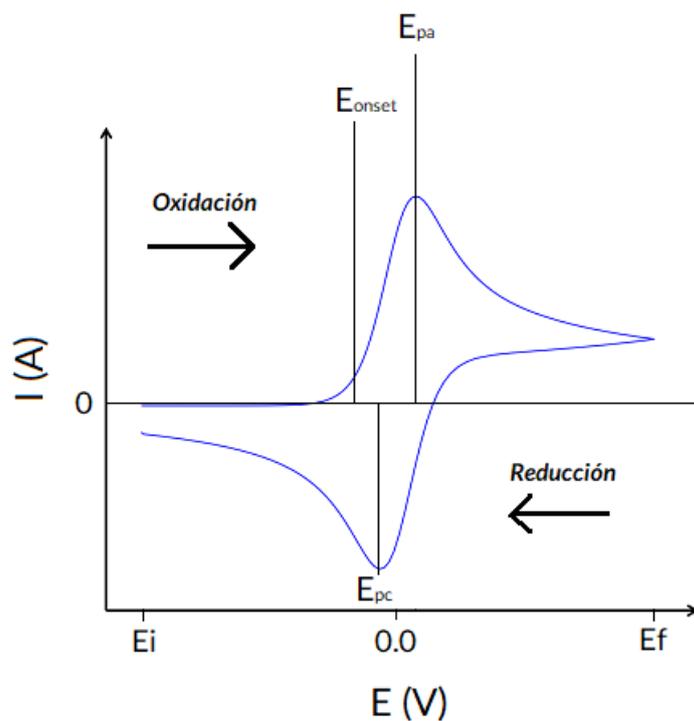


Figura 2: Respuesta típica de un sistema en un experimento de voltametría cíclica.

de activación E_{onset} , que corresponde con la energía en la que la reacción electroquímica ocurre, en este punto, la especie electroactiva en la disolución comienza una reacción de oxidación.

A partir de E_{onset} se produce un aumento lineal de la corriente hasta alcanzar un máximo, en el que la especie electroactiva ha sido completamente oxidada, llamado pico de oxidación (anódico), E_{pa} . Al aumentar el potencial, la intensidad disminuye. Cuando el barrido de potencial comienza en sentido opuesto, tiene lugar un proceso análogo al anterior, en el que el producto de la oxidación inicial sufre una reducción y la corriente disminuye hasta llegar al pico de reducción (catódico), E_{pc} , en el que la especie electroactiva se ha reducido completamente, dando lugar a los picos anódico y catódico, E_{pa} y E_{pc} respectivamente [57].

3.6. Películas delgadas como biosensores electroquímicos

Como se ha mencionado, los sensores electroquímicos utilizan un electrodo de trabajo como elemento transductor de las corrientes en la celda electroquímica. Esto hace que la superficie del electrodo tenga un papel protagonista en el proceso, especialmente cuando incorporan materiales con propiedades electrocatalíticas (que modifican el potencial de oxidación de las especies electroactivas en la disolución) o carácter electroactivo (cuya actividad electroquímica inherente modifica la forma del voltamograma).

La estructura, rugosidad, espesor de los electrodos, tienen un papel fundamental en el funcionamiento de los sensores. Por esta razón, es importante controlar estos parámetros. La nanociencia y la nanotecnología, proporcionan diversos métodos para preparar películas nanoestructuradas que permiten obtener capas de materiales sensibles de superficies de rugosidad controlada y con una alta relación superficie/volumen.

Las películas delgadas (estructuras bidimensionales, uniformes y con espesor nanométrico) han sido de gran interés en investigación debido a sus numerosas aplicaciones, especialmente en aquellos campos en los que la organización molecular da lugar a propiedades que no se presentan en la escala macroscópica [58].

Existen numerosas técnicas de preparación de películas delgadas para la fabricación de sensores, siendo algunas de las más relevantes:

- **Self-Assembled Monolayers:** El auto-ensamblaje es un método para organizar moléculas orgánicas sobre la superficie de un sustrato. Las SAMs se forman por la adsorción espontánea entre moléculas anfífilas, donde la espontaneidad de la adsorción sobre una superficie ocurre por la afinidad entre las moléculas y el sustrato [59]. Este proceso produce regiones del sustrato uniformes y ordenadas (dominios), y son estructuras interesantes para la investigación biológica por sus dimensiones nanométricas y la posibilidad de organizarse en estructuras complejas, que se asimilan a paredes celulares y otros entornos biológicos [60].
- **Layer by Layer:** Consiste en la formación de películas alternando inmersiones del electrodo en disoluciones de polielectrolitos aniónicos y catiónicos de carga opuesta, con un lavado intermedio, de forma que cada capa se adhiere a la anterior por interacciones electrostáticas, dando lugar a películas delgadas muy robustas y versátiles [61].

- **Langmuir-Blodgett:** La técnica de Langmuir-Blodgett permite depositar películas delgadas de moléculas orgánicas sobre la superficie de un sustrato mediante la sucesión de inmersiones y emersiones del mismo en una monocapa de moléculas (monocapa de Langmuir). Las monocapas se adsorben sobre el sustrato homogéneamente con cada inmersión, lo que permite producir películas delgadas de espesor controlado y alto ordenamiento molecular [62]. Al haber sido la técnica utilizada en este trabajo, se describe detalladamente a continuación.

Es interesante comparar las dos últimas técnicas (LbL y LB), ya que el desarrollo de ambas se produjo de forma paralela (dado que tienen aplicaciones similares), habiendo sido empleada una u otra en función de las necesidades y funcionalidades que se aporten en cada caso.

La técnica Layer by Layer aprovecha que las películas depositadas provienen de disoluciones acuosas, pudiéndose depositar especies solubles en agua, pero haciendo a menudo necesario un cross-linking entre los componentes de la película para aumentar su estabilidad [63].

Por otra parte, debido a los importantes avances en el diseño y funcionalidad de los equipos de Langmuir-Blodgett, ésta técnica ganó interés rápidamente, dadas las ventajas que aporta frente a LbL (menor densidad de defectos, mayor control sobre el orden molecular y el grosor de las películas). Además, las películas de LB pueden diseñarse para imitar la composición de las membranas biológicas, pudiéndose así estudiar las interacciones entre moléculas concretas y las membranas celulares [64],[65].

El método LB ha sido extensamente utilizado para la fabricación de películas delgadas de nanoestructuras, como nanohilos metálicos [66] y semiconductores [67], nanopartículas metálicas [68],[69] y nanoestructuras basadas en carbono, como nanotubos de carbono [70] o fulerenos [71]. En particular, estas películas basadas en el ordenamiento de moléculas y nanoestructuras se han empleado como biosensores en la detección de compuestos biológicos.

3.6.1. Técnica de Langmuir-Blodgett:

La técnica de Langmuir-Blodgett permite depositar películas delgadas ordenadas sobre la superficie de un sustrato, mediante la formación de una monocapa molecular sobre una superficie acuosa (monocapa de Langmuir), que posteriormente es transferida a un sustrato sólido (formando una película de Langmuir-Blodgett). La repetición del proceso permite preparar multicapas de un espesor muy pequeño y controlado [72].

La formación de películas consta de tres etapas:

- 1.- Dispersión de la disolución de las moléculas sobre la interfase aire-agua.
- 2.- Compresión de las moléculas en la superficie para formar una monocapa ordenada (monocapa de Langmuir).
- 3.- Transferencia a un sustrato sólido por sucesivas inmersiones y emersiones.

Formación de la monocapa de Langmuir:

Usualmente la sustancia a depositar es un compuesto anfifílico (con un extremo polar y una cola hidrofóbica), en disolución con un disolvente orgánico, y preferiblemente ambos inmiscibles en agua. La disolución se esparce gota a gota por la superficie de un líquido (subfase) que habitualmente es agua desionizada, y se deja evaporar el disolvente. En este punto, las moléculas depositadas están muy dispersas sobre la superficie de la subfase, por lo que es necesario comprimir la superficie para que las moléculas puedan ensamblarse en la monocapa.

Durante la compresión, se reduce gradualmente el área superficial de la subfase para disminuir la dispersión de las moléculas, hasta que eventualmente las moléculas están lo suficientemente juntas para formar una monocapa compacta.

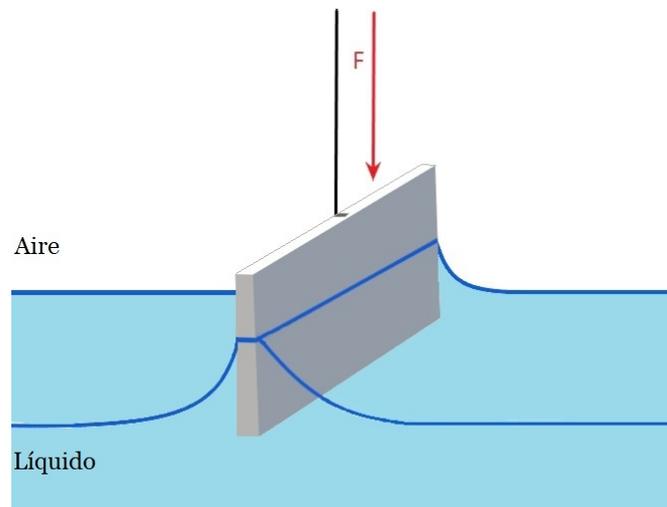


Figura 3

Es por tanto muy importante ser capaces de monitorizar la formación de la monocapa, para ello, se utiliza una balanza de Wilhelmy (Figura 3) para

medir la tensión superficial, consistente en una placa delgada de platino que se sumerge perpendicularmente a la superficie (aprox. 2/3 de su superficie). De esta forma puede medirse la tensión superficial en la interfase aire-agua, midiendo la fuerza que ejerce la monocapa sobre la placa [73].

Esta medición nos permite medir la tensión superficial en la monocapa durante la compresión. Representando la tensión superficial ($\Pi \equiv mN/m$) frente al área superficial (\AA^2), obtenemos una isoterma de Langmuir, que nos da información sobre la formación de la monocapa.

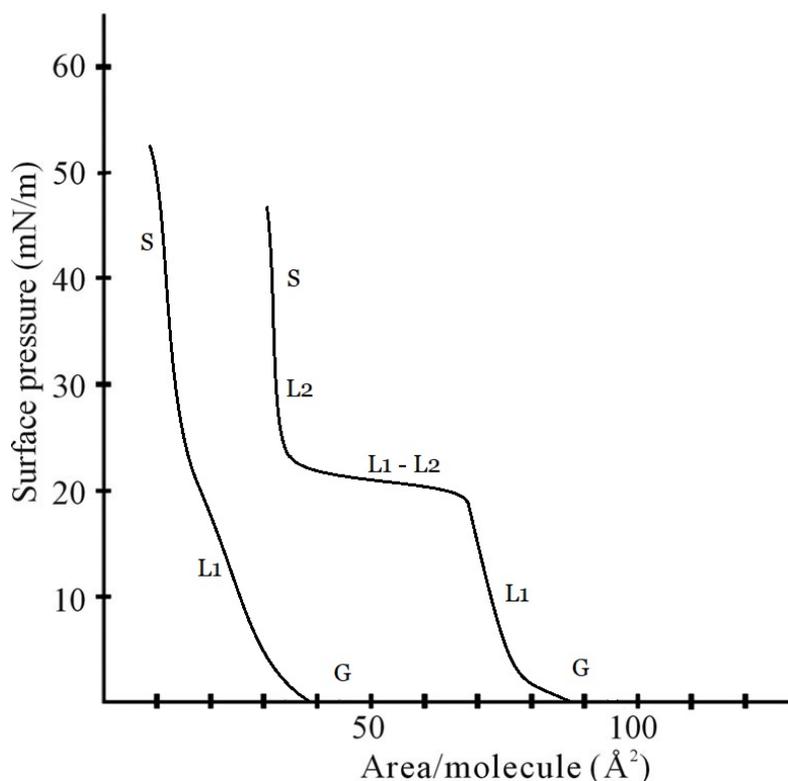


Figura 4: Isotherma de Langmuir típica para dos ácidos grasos, donde pueden observarse las diferentes fases de compactación de las moléculas en la monocapa.

En la Figura 4 se muestra una isoterma típica de un ácido graso. Las diferentes fases corresponden al tipo de compactación entre las moléculas de la monocapa. Al principio de la compresión, las moléculas están muy dispersas en la monocapa, en fase líquido-gaseosa (G), al ir reduciendo el área superficial, las moléculas se van compactando en la fase líquida (que también puede presentar diferentes fases, L1 y L2, o fases híbridas L1-L2), donde las moléculas están lo suficientemente próximas para interactuar entre ellas, pero

pueden fluir por la monocapa, comportándose como un líquido. Finalmente, un incremento agudo en la presión superficial es indicativo de que las moléculas se encuentran en la fase sólida (S), en la que las moléculas se han ensamblado formando una monocapa compacta [74].

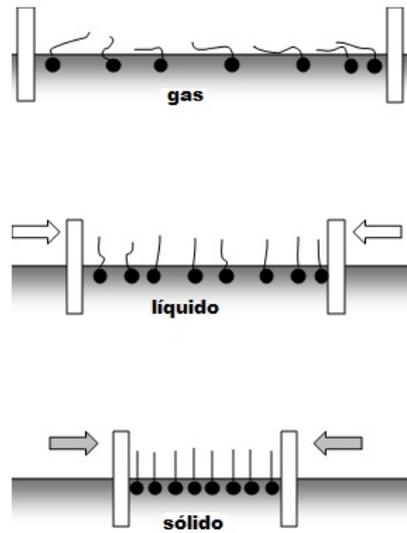


Figura 5: Proceso de la formación de la monocapa de Langmuir en cada una de las diferentes fases. El cambio entre fases se ve reflejado en la isoterma. La compresión de las barreras propicia las interacciones entre moléculas, que se ensamblan en una monocapa ordenada.

Si sigue comprimiéndose la monocapa, eventualmente las moléculas se agregan y amontonan unas sobre otras, provocando el colapso de la monocapa.

Transferencia de la película:

La transferencia (dipping) de la película debe realizarse durante la fase sólida (S) para asegurar la homogeneidad de la monocapa, y a una presión superficial por debajo pero próxima a la presión de colapso. Durante la transferencia, debe mantenerse una presión superficial constante, y tenerse en cuenta la velocidad a la que el sustrato es sumergido en la subfase, para que la monocapa pueda adsorberse sin dejar espacios vacíos. Realizando sucesivas inmersiones, puede controlarse el número de capas de la película. Existen diversas formas de realizar la transferencia, siendo la más habitual la inmersión vertical, pero también puede hacerse de forma horizontal (película de Langmuir-Schaefer) [75].

Dependiendo de la naturaleza del sustrato (hidrofílica o hidrofóbica) y la sustancia a depositar, las moléculas pueden organizarse de formas distintas entre capas sucesivas, dando lugar a tres tipos de configuraciones [76] (Figura 6):

- Configuración tipo Y: Las colas hidrofóbicas se adhieren a la superficie del sustrato durante la inmersión vertical. En la emersión posterior, la monocapa se transfiere en la orientación opuesta, con las cabezas polares hacia el sustrato interactuando con las cabezas polares depositadas en la inmersión. De esta manera, se consiguen interacciones cabeza-cabeza y cola-cola entre capas sucesivas.
- Configuración tipo X: Se da cuando la transferencia se realiza desde el sustrato sumergido y hacia arriba. En este caso, son las cabezas polares las que interactúan con el sustrato, y en las intercapas hay interacciones cabeza-cola.
- Configuración tipo Z: Es análoga a la tipo X, pero la transferencia ocurre mediante inmersión vertical. Las colas se adhieren al sustrato y en las intercapas hay interacciones cabeza-cola.

Como se ha mencionado, la técnica de Langmuir-Blodgett, pese a sus restricciones (necesaria inmiscibilidad de las moléculas y el disolvente, uso de moléculas anfifílicas, limpieza...) ofrece una serie de ventajas frente a otras técnicas de fabricación de películas delgadas.

Dado que es posible elegir el número de monocapas superpuestas, el grosor

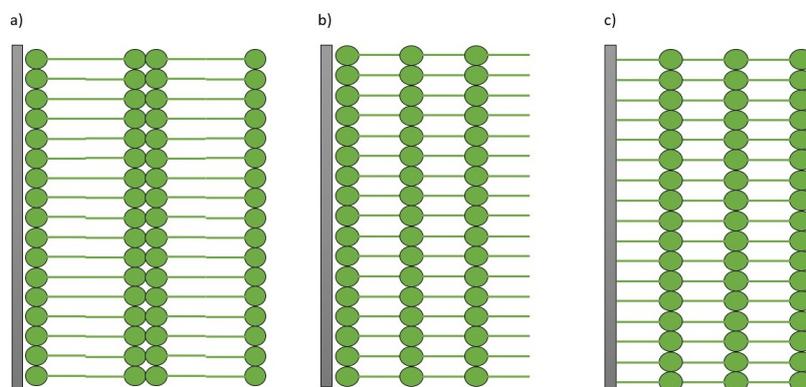


Figura 6: Configuraciones posibles entre capas sucesivas en películas de Langmuir-Blodgett: a) Tipo Y, b) Tipo X, c) Tipo Z.

de la película se puede controlar con gran precisión. Además, la delgadez y el orden de las películas de Langmuir-Blodgett no puede obtenerse con ninguna otra técnica.

El alto grado de orden de las películas puede asociarse con la presencia de la interfase aire-agua. Cuando se comprime la monocapa en la superficie, se eliminan las regiones de menor densidad, y durante la transferencia, la monocapa solidifica sobre el sustrato. Hay pocas moléculas que sean adecuadas para su uso en la técnica de Langmuir-Blodgett, pero pueden clasificarse en tres tipos:

Primero, las moléculas anfifílicas, con cabeza polar y larga cola apolar. Segundo, si se trata de polímeros, deben tener también una parte oleofílica y otra hidrofílica, pero las restricciones de tamaño y forma no son tan exigentes en este caso [77]-[78]. Por último, y las que más relevancia tienen para este trabajo, los macrociclos aromáticos, como porfirinas y ftalocianinas. Es destacable que estos macrociclos no tienen partes polares ni apolares, sino que consisten en un anillo aromático coordinado, usualmente con un metal central, y que habitualmente presentan sustituyentes en los grupos isoindólicos. En este caso, el orden se induce gracias a las interacciones $\pi - \pi$ entre los anillos aromáticos. Los macrociclos, y en concreto las ftalocianinas, han sido un foco de estudio para la fabricación de sensores con la técnica de Langmuir-Blodgett, debido a sus propiedades electrocatalíticas [79].

3.7. Ftalocianinas como materiales sensibles

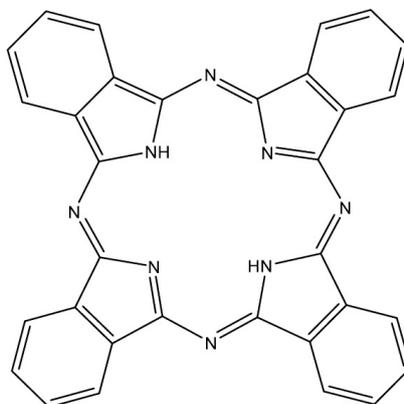


Figura 7: Anillo de ftalocianina

Las ftalocianinas son compuestos de coordinación, semejantes a las porfirinas, que poseen unas interesantes propiedades eléctricas, magnéticas y ópticas que son la razón de su gran interés. En este trabajo, se han utilizado debido a sus propiedades electrocatalíticas y su capacidad de formar películas de Langmuir-Blodgett.

Estructuralmente, las ftalocianinas (Pcs) son macrociclos simétricos, bivalentes, tetradentados y planares con cuatro grupos isoindol unidos por sus posiciones 1,3 con grupos -aza ($-N=C-$). El anillo de ftalocianina tiene en total 42 electrones π , distribuidos por 32 átomos de carbono, aunque la deslocalización está fundamentalmente distribuida en los cuatro anillos de benceno interiores, equivaliendo a un sistema aromático de 18 electrones π deslocalizados en el interior del macrociclo [82]-[81].

Los compuestos tetrapirrólicos son sistemas π macrocíclicos altamente estables, ya que están totalmente conjugados, que muestran una serie de propiedades que los hacen candidatos para diversas aplicaciones. Además, las ftalocianinas forman complejos con una gran cantidad de elementos de la tabla periódica [81].

La forma más simple de ftalocianina es la de la Figura 7 (2HPc), donde los dos hidrógenos del anillo central pueden sustituirse para formar complejos metálicos (MPc), o bien añadirseles sustituyentes periféricos (grupos amino, grupos carboxílicos...), lo que hace que estos compuestos sean una familia muy extensa y da lugar a una gran variedad de configuraciones y propiedades [82].

Los compuestos de Pcs han sido un foco activo de investigación debido a sus propiedades fotoconductoras, eléctricas, y actividad química. Además, presentan la ventaja de ser muy estables térmica y químicamente, y muestran una actividad muy intensa de absorción óptica en el espectro visible. Estas propiedades, junto con su similitud estructural con la clorofila y las porfirinas, las hacen muy interesantes para aplicaciones en conversión de energía solar, pigmentos, y dispositivos electrónicos, como sensores químicos [83]. Algunas de sus propiedades más destacables son:

- **Semiconductividad:** Las ftalocianinas metálicas muestran diferentes tipos de conductividad dependiendo del dopante, actuando como semiconductores de tipo p al doparse con oxígeno, o semiconductores de tipo n al doparse con litio [84].

- **Propiedades ópticas:**
 - **UV-Vis:**

Las Pcs son muy activas en la región del espectro visible (absorben luz entre 300-700 *nm*), pudiéndose distinguir dos regiones absorción: La banda Q (600-700 *nm*), asociada a transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ (HOMO-LUMO) entre orbitales de simetría a_u y b_g , y la banda B o banda de Soret (300-400 *nm*), que está asociada a transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ más energéticas que la banda Q, correspondientes a transiciones desde orbitales ocupados de simetría b_u y a_u de menor energía hacia el LUMO [85],[86].

En el estado sólido, estas bandas se separan en dos debido principalmente al acoplamiento entre excitones entre moléculas solapadas. Los efectos de estos acoplamientos excitónicos dependen en gran medida de la orientación relativa y separación entre moléculas, por lo que dos ftalocianinas con composiciones estructurales diferentes pueden tener espectros de absorción muy distintos, aunque compartan la presencia de las bandas B y Q. Así, una separación en la banda Q, o un desplazamiento de la misma hacia el rojo se utilizan como prueba de orden molecular en películas de Langmuir-Blodgett basadas en ftalocianinas, en función del tipo de orden que muestren las películas [87].

El hecho de que las ftalocianinas puedan absorber en torno a 650-700 *nm* hace que puedan ser utilizadas en terapia fotodinámica del cáncer. En este rango, la penetración de luz en los tejidos es lo suficientemente eficiente, y sus estados triplete pueden interactuar con el oxígeno

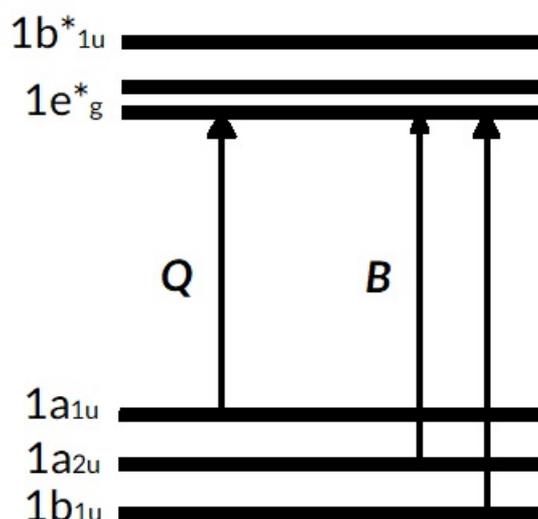


Figura 8: Transiciones electrónicas que dan lugar a las bandas Q y B en el espectro UVVis de las ftalocianinas [88].

molecular generando oxígeno singlete citotóxico [89].

- **Propiedades electroquímicas:** Las ftalocianinas poseen numerosas propiedades electroquímicas y electrocatalíticas. Existe una relación entre las energías del HOMO y el LUMO de las ftalocianinas y los picos de oxidación y reducción, que están relacionados con el desplazamiento hacia el rojo de la banda Q como consecuencia de la adición de un metal central. La posibilidad de incluir un átomo metálico en el centro del anillo, así como sustituyentes periféricos y el tipo de dopado de la ftalocianina cambian los potenciales electroquímicos en los procesos de reducción y oxidación [90]. Las ftalocianinas son muy interesantes para el desarrollo de sensores electroquímicos, ya que presentan actividad electrocatalítica en los procesos de electrooxidación de compuestos fenólicos, peróxidos, aminas, entre otros [91].
- **Estabilidad:** Las ftalocianinas son estables hasta temperaturas de $400\text{ }^\circ\text{C}$, por lo que muestran una alta estabilidad térmica [92]. En cuanto a su reactividad química, los ácidos y bases fuertes no atacan a la estructura de las ftalocianinas metálicas, lo que añade versatilidad a las condiciones de trabajo a las que puede someterse a los sensores elaborados con MPCs. Además, tienen buena estabilidad en disolución en

contacto con el aire, y expuesta a luz ambiente [93].

- **Solubilidad:** Estos compuestos son, en general, solubles en disolventes orgánicos (CHCl_3 , DMF, tolueno...) y otros disolventes habituales, como líquidos iónicos o ácidos. La solubilidad cambia de una ftalocianina a otra dependiendo del metal central y los sustituyentes, siendo estables en disolución en general varios días, y hasta varios meses [94].

3.7.1. Sensores electroquímicos basados en ftalocianinas

En los sensores electroquímicos, la presencia de un mediador electrónico mejora la transferencia de electrones hacia la superficie del electrodo. En este sentido, las ftalocianinas son electrocatalizadores que pueden ser utilizados para mejorar la detección de diversas especies.

En particular, el grupo UVASENS ha demostrado en numerosos estudios que la presencia de ftalocianinas mejora la transferencia electrónica en la detección de compuestos fenólicos [95]-[96].

Además, se demostró que el uso de películas delgadas para construir sensores voltamétricos mejora significativamente la respuesta electroquímica en la detección de fenoles:

La técnica LbL es un método eficiente para fabricar sensores, ya que aumenta el ratio superficie volumen y mejora la interacción entre los componentes del sensor [95]-[96]. Por otro lado, la técnica LB permite construir superficies nanoestructuradas que mejoran la capacidad electrocatalítica de las ftalocianinas [97]. Las películas delgadas aportan otras propiedades interesantes, como la aparición de efectos sinérgicos entre diferentes elementos electrocatalíticos [98]-[99].

3.7.2. Biosensores electroquímicos que combinan ftalocianina y enzimas

Junto con los estudios anteriores, el grupo UVASENS ha desarrollado biosensores que combinan enzimas y ftalocianinas para aprovechar la mejora en la transferencia electrónica aportada por las ftalocianinas, demostrando que estas facilitan el paso de electrones desde el sitio activo de la enzima a la superficie del electrodo de trabajo, en concreto, estos estudios se centran en la detección de fenoles mediante enzimas fenol-oxidasas, como tirosinasa [96].

Las técnicas LB y LbL son muy interesantes para la detección de reacciones enzimáticas, ya que las películas delgadas pueden combinar elementos que actúan como mediador electrónico a la vez que aportan un entorno favorable para la inmovilización de enzimas [100].

Las películas delgadas pueden utilizarse en el diseño de entornos biomiméticos, donde enzimas como la tirosinasa pueden ser adsorbidas por un sistema que simula una bicapa lipídica biológica [101].

Si además se implementan en estos sistemas materiales electrocatalíticos (como las propias ftalocianinas), se consigue una mejora en la transferencia electrónica entre el sitio activo de la enzima y el sustrato del electrodo [97],[101].

Otras estrategias para lograr entornos biomiméticos fueron desarrolladas utilizando fosfolípidos junto con ftalocianinas metálicas, cuya estructura con un metal central las permite actuar como enzimas miméticas [102].

En este trabajo se propone una estrategia similar a las descritas anteriormente, combinando un ácido graso con ftalocianinas metálicas para propiciar un entorno biomimético, y la inmovilización sobre el biosensor de la enzima galactosa oxidasa para la detección de galactosa.

3.7.3. Descripción de la enzima Galactosa oxidasa

La enzima galactosa oxidasa (GaOx) es una enzima oxidorreductasa ampliamente utilizada para el análisis de productos lácteos.

Específicamente, se utiliza para la detección específica de D-galactosa mediante su oxidación, dando como producto D-galacto-hexo-dialdosa junto con la reducción de O_2 a H_2O_2 .

Su centro activo está formado por un átomo de cobre (II) y tiene cinco ligandos coordinados, dos tirosinas, dos histidinas y una molécula de agua, donde una de las tirosinas es un radical libre [103]. Los dos electrones involucrados en la oxidación del sustrato son aceptados por el átomo de cobre (II) y el radical libre del centro activo.

Sección 4

Técnicas de Caracterización

Una vez fabricados los sensores modificados, es necesaria su caracterización mediante diversos métodos de espectroscopía y microscopía, que aportan información sobre sus características (físicas, químicas y estructurales) y confirman la correcta transferencia de las moléculas sobre el sensor, su interacción con la enzima, y su adecuada disposición sobre la superficie del sensor para dar consistencia a los resultados obtenidos posteriormente. El funcionamiento y principio teórico de algunas de las técnicas de caracterización utilizadas en este trabajo se explica a continuación, pero antes, se aporta una vista de pájaro del espectro electromagnético, que será de utilidad para la explicación de las técnicas de caracterización que involucran radiación electromagnética.

La radiación electromagnética es una forma de propagación de energía a través del espacio, y puede considerarse como ondas que se propagan en el vacío a la velocidad de la luz. La radiación electromagnética va, en orden decreciente de energía, desde los rayos γ , rayos X, radiación ultravioleta, luz visible, infrarrojo, microondas y finalmente ondas de radio. Estas ondas electromagnéticas se clasifican en función de su longitud de onda y su frecuencia, dentro de un espectro electromagnético. La zona del espectro visible por el ojo humano es una pequeña porción del mismo que comprende un rango entre los $\sim 350 \text{ nm}$ y los $\sim 700 \text{ nm}$.

El estudio de la interacción entre la materia y cualquier radiación electromagnética se conoce como *espectroscopía*. Hay una relación directa entre la longitud de onda, la frecuencia y la energía, que se utiliza para estudiar selectivamente la radiación de una energía determinada para estudiar las propiedades físicas, químicas y estructurales de los átomos y moléculas [104].

4.1. UVVis

La espectroscopía ultravioleta-visible o espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/VIS) es una espectroscopía de emisión de fotones, en la que radiación electromagnética del espectro visible, infrarrojo cercano (NIR) y ultravioleta cercano (con longitud de onda λ entre 380 nm y 780 nm) interacciona con las moléculas de una muestra, produciendo transiciones electrónicas medibles.

4.1.1. Teoría Cuántica

Las partículas, átomos y moléculas están en unos estados de energía (niveles), de forma que para que ocurra un cambio de nivel, es necesaria la absorción o emisión de energía. Los niveles energéticos están *cuantizados*, y sólo son posibles transiciones con energías discretas, que se denominan *cuantos de energía*. Los fotones son cuantos de radiación electromagnética con una energía que depende de su frecuencia ν de la forma:

$$E = h \nu \quad (4.1)$$

Donde h es la constante de Planck. La velocidad de la luz en el vacío, $c = \nu \lambda$, con λ la longitud de onda de los fotones, de modo que:

$$E = \frac{h c}{\lambda} \quad (4.2)$$

Así, cuanto más corta sea la longitud de onda, mayor es la energía del fotón. En una molécula, su energía interna es la suma de las energías de sus electrones, la energía de vibración entre los átomos que la forman y la energía asociada a la rotación de la molécula. Los niveles electrónicos de moléculas simples (p. ej. diatómicas) están muy discretizados y separados, por lo que la absorción de un fotón ocurrirá si el fotón tiene una longitud de onda muy pequeña (una energía muy alta), excitándose la molécula de un estado energético al siguiente.

En moléculas complejas, hay menos separación entre los niveles energéticos y los fotones del espectro ultravioleta y visible pueden inducir transiciones energéticas. Los fotones con una energía en la región del infrarrojo cercano pueden excitar vibracionalmente a una molécula. Por último, los niveles rotacionales están tan juntos que los fotones del infrarrojo lejano y microondas tienen energía suficiente para producir transiciones.

Lo que se observa en realidad en un espectro UVVis no son picos muy definidos y pronunciados, sino *bandas de absorción*, que indican que las moléculas están absorbiendo radiación en un rango de longitudes de onda. La razón de este fenómeno es que las transiciones electrónicas usualmente vienen acompañadas de transiciones vibracionales simultáneas. Un fotón con un pequeño exceso o defecto de energía respecto de la separación entre dos niveles de energía electrónicos puede inducir una transición electrónica a priori prohibida para dar lugar a una segunda transición (vibracional) de la molécula.

A esto hay que añadir que muchos estados vibracionales tienen estados rotacionales asociados. En una transición entre niveles de energía, hay una gran componente electrónica, pero también componentes vibracional y rotacional con menor contribución. Son las transiciones rotacionales las que permiten que se rellenen los huecos en la estructura fina vibracional.

A esto hay que añadir el empaquetamiento de la muestra. Si las moléculas están muy empaquetadas en disolución, interactúan entre ellas fuertemente, perturbando ligeramente los niveles de energía. Es la suma de la contribución de las transiciones vibracionales y rotacionales junto con el empaquetamiento de las moléculas, lo que explica que los espectros no presenten picos muy definidos, sino bandas de absorción.

4.1.2. Aspectos químicos

En la espectroscopía UV-Vis, se hace interactuar luz del espectro visible con una muestra. Una molécula o ión absorberá radiación en la región UV-Vis cuando ésta sea capaz de inducir transiciones electrónicas en su estructura, y la absorción de luz en esta región viene acompañada de un cambio en el estado electrónico de las moléculas. Los electrones pasan del estado fundamental a sucesivos estados excitados de mayor energía, que se corresponden con estados excitados antienlazantes (*antibonding*). Los diferentes tipos de orbitales electrónicos son:

- 1.- σ (*bonding*)
- 2.- π (*bonding*)
- 3.- n (*non-bonding*)
- 4.- σ^* (*antibonding*)
- 5.- π^* (*antibonding*)

Las transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$ y $n \rightarrow \sigma^*$ requieren de fotones muy energéticos, en la región del ultravioleta lejano (180-240 nm). Como consecuencia, los grupos saturados no exhiben una fuerte absorción en la región ultravioleta. Las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ se dan en moléculas con centros insaturados, ya que requieren menos energía y pueden darse para fotones con longitudes de onda mayores.

La longitud de onda de máxima absorción en un espectro y la absorbancia están completamente determinadas por la estructura molecular y la concen-

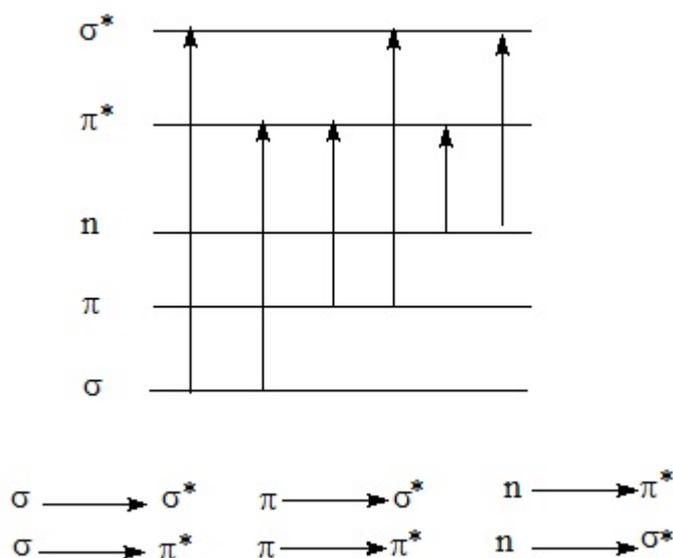


Figura 9: Esquema energético de todas las posibles transiciones moleculares para la absorción de radiación UV-Vis.

tración. Las transiciones a orbitales π^* en la región ultravioleta para una molécula concreta pueden ocurrir en la región visible si se modifica la estructura molecular, como es el caso de muchos compuestos inorgánicos en disolución.

Las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ que ocurren en grupos aislados de una molécula presentan una intensidad de absorción muy baja. Sin embargo, la conjugación de grupos insaturados en una molécula produce un efecto muy importante en el espectro de absorción. La longitud de onda de máxima absorción se mueve a una longitud de onda mayor y la intensidad de absorción aumenta notablemente.

Por último, los sistemas aromáticos (como las ftalocianinas), que contienen electrones π , absorben fuertemente en el rango ultravioleta. En general, cuanto más largo sea un sistema conjugado en una molécula, más se acerca la λ_{max} a la región visible. Por tanto, las características energéticas de una transición y la longitud de onda de absorción y su intensidad son propiedades de grupos de átomos, y no de los electrones.

4.1.3. Descripción de la técnica

En la espectroscopía por absorción, se eligen unas condiciones experimentales tales que la reflexión, la dispersión y la fluorescencia se minimicen. En la región ultravioleta y visible del espectro, las bandas observadas no son lo suficientemente específicas para permitir una identificación adecuada, y suele ser necesaria la complementariedad con otras pruebas. Esto hace que la espectroscopía UVVis sea fundamentalmente una técnica cuantitativa, que nos permite determinar la concentración de analito en la muestra. A continuación se desarrollan algunas de las expresiones que permiten determinar las características del analito:

Ley de Beer-Lambert: Es una ley óptica empírica que relaciona la absorción de luz con las propiedades del material atravesado de forma que:

$$\frac{I_f}{I_i} = 10^{-Al} \quad (4.3)$$

Donde l es la longitud (grosor) de la muestra en la dirección en la que viaja el rayo de radiación y A es el coeficiente de absorción. I_f y I_i son la intensidad de la radiación final e inicial, respectivamente, y el ratio I_f/I_i es la *transmitancia*, expresada a menudo en tanto por ciento. De la Ley de Beer-Lambert puede deducirse que la transmisión de luz a través de una sustancia decrece exponencialmente con la longitud y la concentración de la misma.

Esta ley sólo es válida para luz monocromática (de una única longitud de onda), y supone que las características físico-químicas de la sustancia no dependen de la concentración.

Ley de Beer: Esta ley es complementaria a la anterior, y dice que cada capa de igual grosor en un medio absorbente absorbe una fracción igual de la radiación incidente, independientemente de la intensidad de la radiación incidente:

$$\frac{I_f}{I_i} = T \quad (4.4)$$

Así, si T es la transmitancia definida anteriormente, la absorción sólo depende del grosor (o análogamente, el número de capas) y de la concentración de analito.

Es inmediata la aplicación de estas dos leyes al estudio de películas delgadas donde se conoce el número de capas (como en la técnica de Langmuir Blodgett o Layer by Layer), para confirmar la correcta transferencia de las películas y la homogeneidad de las capas.

4.1.4. Limitaciones y aplicaciones

A pesar de su versatilidad, esta técnica cuenta con algunas limitaciones. Si la muestra es sólida, la mayor parte de la radiación se perderá por reflexiones aleatorias o refracción en la superficie. A menos que la muestra pueda prepararse como un bloque o película altamente pulida, deberá disolverse en un disolvente transparente.

Por otro lado, la espectroscopía de líquidos debe llevarse a cabo en cubetas de un material transparente, como cuarzo o vidrio, con caras pulidas para minimizar la reflexión y las pérdidas dispersivas.

Por último, los gases deben contenerse en celdas similares selladas que mantengan una presión adecuada.

Es habitual emplear como referencia una celda o cubeta en blanco, idéntica a la que contiene la muestra pero que sólo contenga el disolvente, para poder considerar los posibles efectos de la luz transmitida a través de la referencia con respecto a la muestra.

Fundamentalmente pueden hacerse dos experimentos: *Cuánto analito* hay en la muestra (análisis cuantitativo), y *qué analito* hay en la muestra (análisis cualitativo). Con esta técnica puede entonces determinarse la concentración de analito en una disolución, apoyar a otras técnicas en la determinación de estructuras moleculares, e identificar unidades estructurales concretas (e. g. grupos aromáticos o grupos funcionales).

4.2. FTIR

La espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier es un método de espectroscopía que estudia la interacción entre la materia y la radiación infrarroja. El espectro resultante de absorción molecular y transmisión es único para cada molécula, actuando como una "huella dactilar" de la muestra, lo que hace muy útil esta técnica para numerosos análisis.

Las frecuencias vibracionales de las moléculas están en la región infrarroja

del espectro electromagnético, y pueden medirse mediante técnicas de espectroscopía de radiación IR, en las que radiación policromática (a diferencia de UV-Vis, que era monocromática) atraviesa la muestra y se mide la intensidad de la radiación transmitida para cada frecuencia [105].

4.2.1. Enlaces activos en el Infrarrojo

La principal diferencia entre la espectroscopía FTIR y la UVVis es que en FTIR la radiación infrarroja absorbida induce transiciones vibracionales en las moléculas, de forma que son los enlaces, y no los electrones, los que absorben la energía para transicionar entre estados energéticos vibracionales [106].

Un criterio habitual para la absorción de radiación infrarroja es que la absorción induzca un cambio periódico en el momento dipolar de la molécula al vibrar o rotar. El momento dipolar es una magnitud vectorial, que depende de la orientación y conformación eléctrica de la molécula, y cambia cuando los enlaces moleculares se expanden o contraen. En moléculas dipolares heteronucleares puede describirse como una distribución inhomogénea de la densidad electrónica entre los átomos, cuando un átomo es más electronegativo que el otro y hay una carga neta negativa, y matemáticamente se describe como:

$$\vec{\mu} = q \vec{r} \quad (4.5)$$

Por ejemplo, el HBr tiene una distribución de carga asimétrica entre el hidrógeno y el boro debido a la diferencia de electronegatividades y a la gran densidad electrónica del Bromo, por tanto el enlace del HBr tiene un momento dipolar grande y es un enlace polar.

Cuando la molécula vibra, hay una fluctuación en su momento dipolar, lo que causa que el campo eléctrico producido por el momento dipolar interactúe con el campo eléctrico de la radiación. Si la frecuencia de la radiación incidente y la frecuencia natural de vibración de la molécula coinciden, la radiación es absorbida y se altera la amplitud de vibración molecular. Esto también puede ocurrir si la rotación de una molécula asimétrica alrededor de su centro tiene como consecuencia un cambio en el momento dipolar [107]-[108].

4.2.2. Funcionamiento

La técnica FTIR permite superar limitaciones de otras técnicas, principalmente, que el proceso de escaneo frecuencia a frecuencia era demasiado lento. Era necesario un método para medir todas las frecuencias de infrarrojo simultáneamente. En FTIR se usa un interferómetro de Michelson, un instrumento óptico que produce un tipo de señal en el que todas las frecuencias están incluidas en la señal, que puede medirse muy rápidamente, en un intervalo de tiempo de uno a dos segundos, en lugar de varios minutos.

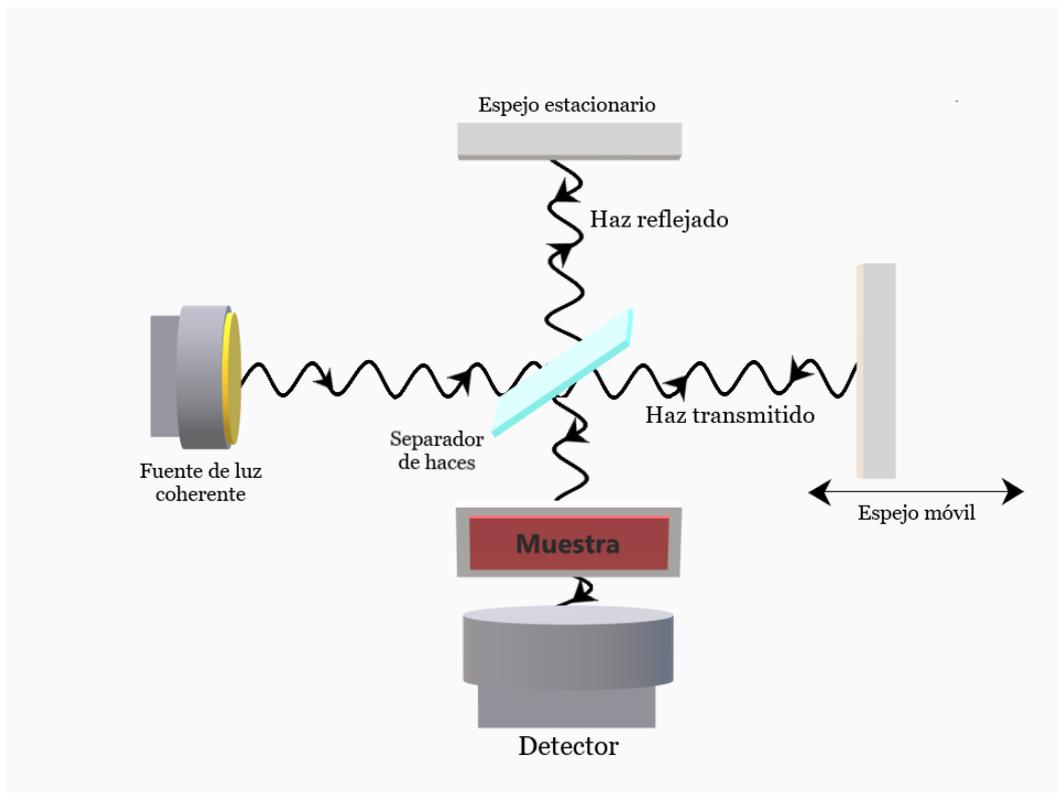


Figura 10: Esquema de funcionamiento de un interferómetro de Michelson para radiación infrarroja.

El haz infrarrojo se hace pasar por un divisor de haces, uno de los haces se refleja en un espejo fijo y el otro se refleja en un segundo espejo móvil. Ambos haces reflejados se recombinan al encontrarse de nuevo en el separador. Dado que ambos haces han recorrido caminos ópticos distintos, la señal recibida es el resultado de la interferencia entre los dos haces. La señal resultante se llama interferograma, y para cada posición del espejo móvil, la señal tiene información de todas las frecuencias infrarrojas provenientes de la fuente.

Al registrar el interferograma, todas las frecuencias se miden simultáneamente, y así pueden realizarse experimentos a mayor velocidad que si se analizan las frecuencias una a una. El inconveniente, es que el analizador necesita un espectro de frecuencias (una función de la intensidad para cada frecuencia individual) para hacer la identificación, así que la señal del interferograma no puede interpretarse directamente. Para "decodificar" la señal en frecuencias individuales, se hace a la señal del interferograma una Transformada de Fourier para descomponerla en sus componentes espectrales en el dominio de la frecuencia [109].

4.2.3. Ventajas y aplicaciones

La espectroscopía FTIR puede utilizarse para la identificación cuantitativa de cualquier tipo de material, así como determinar la calidad y consistencia de la muestra. Además, con la mejora de los algoritmos de software, el análisis de la señal y el tiempo de experimento hacen que esta técnica sea indispensable y de gran utilidad para análisis rutinarios de laboratorio.

Frente a otras técnicas de radiación infrarroja dispersivas, la FTIR ofrece numerosas ventajas, es una técnica no destructiva ni invasiva con la muestra, da una medida precisa que no necesita calibración externa, no es necesaria una preparación exhaustiva de la muestra para su análisis, es más rápida que otras técnicas, y tiene mayor sensibilidad.

4.3. Microscopía de Fuerza Atómica

La microscopía se divide entre ramas principales: Microscopía óptica, microscopía electrónica y microscopía de sonda de barrido (SPM), de la que forma parte la microscopía de fuerza atómica (AFM). Entre ellas, la microscopía óptica y la SPM son las más extendidas en cuanto a la investigación de nanoestructuras, por ser capaces de medir numerosas propiedades de la muestra, sin necesidad de destruir la muestra y poder trabajar en condiciones ambientales normales.

La técnica de AFM fue desarrollada por Quate, Binnig y Gerber en el año 1986 [110], y consiste en una medida superficial de alta resolución que es utilizada para análisis cuantitativo y cualitativo de muestras basándose en la morfología, el tamaño, la rugosidad de la muestra y sus propiedades eléctricas, magnéticas y mecánicas [111]-[112]. AFM es una técnica muy amplia con

muchas variantes, la elección de una u otra dependerá de las características y las propiedades de la muestra que quieran ser investigadas [113].

4.3.1. Interacción punta-muestra

En las técnicas de microscopía se obtiene una imagen de la muestra muy amplificada, aunque la forma de obtener las imágenes es diferente entre ellas. En AFM, se utiliza un cantilever con una punta de silicio con una constante elástica muy pequeña, y no un haz dirigido de radiación electromagnética (que puede ser luz o electrones). En el extremo del cantilever hay una punta muy afilada, de entre 100 y 200 nm de largo y de 10 a 60 nm de radio de curvatura.

Cuando la punta está a una separación interatómica de la muestra, pueden registrarse los potenciales interatómicos entre los átomos de la punta y los de la muestra. Mientras la punta se mueve a través de la superficie, estos potenciales interatómicos fuerzan al cantilever a “doblar” verticalmente con los cambios de la superficie. Así, midiendo la deflexión del cantilever, pueden registrarse las características topográficas de la superficie.

La fuerza atómica entre la muestra y la punta se mide utilizando un láser y un detector que monitoriza el movimiento del cantilever. El cantilever puede moverse arriba o abajo con un sistema piezoeléctrico para mantener la fuerza de interacción punta-muestra constante. La imagen 3D de la topografía de la muestra puede construirse midiendo el movimiento del cantilever en la dirección Z como función de la posición del cantilever en el plano XY (Figura 11). En teoría, este procedimiento es válido para cualquier material, y podrían obtenerse imágenes con resolución atómica, midiendo deflexiones del cantilever de dimensión atómica [114]. Hay tres modos en los que puede operarse un AFM:

Contact mode: En el modo contacto, el cantilever y la punta se arrastran a través de la superficie. Durante el escaneo, se mantiene la deflexión del cantilever constante, de forma que si se produce una deflexión en el eje Z, ésta corresponde a un desplazamiento de la punta una distancia Δz . La fuerza normal aplicada es $F = k \Delta z$, donde k es la constante elástica de la punta. Al cambiar la topografía de la muestra, el escáner del eje Z mueve el cantilever hasta una posición en la que la deflexión coincida con la inicial

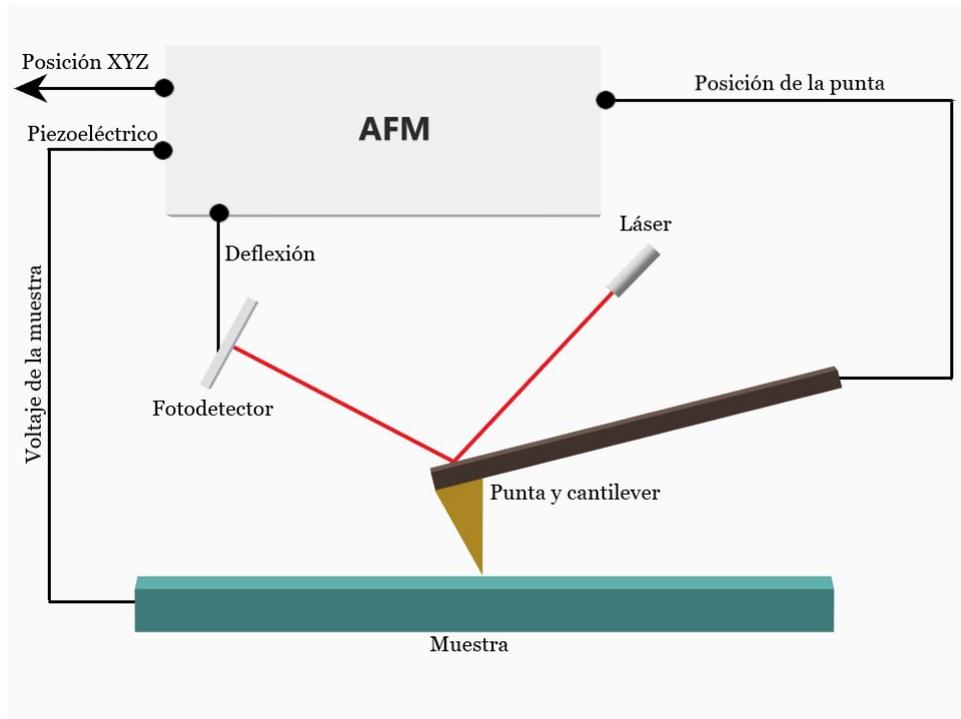


Figura 11: Esquema de un setup habitual de AFM.

para mantenerla constante. El movimiento del escáner en el eje Z puede ser registrado y es directamente proporcional a la topografía de la muestra.

Este modo tiene algunos inconvenientes: existe la posibilidad de que la superficie de la muestra contamine la punta, o bien que la punta dañe la superficie si se aplica mucha fuerza con la punta sobre la muestra.

Non-Contact mode: En este modo, el cantilever se hace vibrar a una frecuencia cercana a la de resonancia, con una distancia entre la punta y la muestra del orden de 1 a 10 nm . La frecuencia de resonancia y la amplitud de oscilación del cantilever cambian mientras este se aproxima a la punta. Con estos cambios pueden tomarse imágenes de la muestra a través de su topografía, manteniendo uno de los parámetros constante y registrando los cambios en el escáner del eje Z, de forma análoga al modo contacto.

En este modo, debe utilizarse una punta con una constante elástica mayor, para evitar la tendencia de la muestra de tirar de la punta hacia la superficie por fuerzas atractivas. El inconveniente de esta técnica, es que la combinación de interacciones débiles de Van der Waals y el uso de una punta con una

constante elástica grande hacen que la señal obtenida sea muy pequeña, reduciendo la sensibilidad y la velocidad de escaneo. Además, la distancia entre la punta y la muestra es mayor, lo que disminuye la resolución lateral.

Tapping mode: El modo tapping ofrece más versatilidad que los otros dos, y es especialmente útil para el estudio de muestras blandas. Aunque la resolución es similar a la obtenida en el modo contacto, las fuerzas aplicadas a ambas la punta y la muestra son menores. De nuevo, se induce al cantilever una vibración cercana a la frecuencia de resonancia, pero con una amplitud de oscilación mayor que en el modo de no contacto, de entre 20 y 200 *nm*. La punta entra en contacto con la superficie durante cada oscilación durante un periodo muy corto de tiempo, y así la interacción punta-muestra altera la amplitud, la frecuencia de resonancia y el ángulo de fase del cantilever. En este modo es en el que más información puede obtenerse de la muestra, con un riesgo menor que en el modo de contacto de contaminar la muestra o la punta.

4.3.2. Ventajas

Las técnicas de AFM tienen numerosas ventajas frente a otras técnicas de microscopía:

- Pueden obtenerse imágenes con alta resolución en las direcciones *X*, *Y* y *Z*, con una resolución en el plano *XY* de $\sim 0,1-1 \text{ nm}$ y en la dirección *Z* de $\sim 0,001 \text{ nm}$ (resolución atómica).
- Las imágenes de AFM obtenidas correctamente están libres de artefactos, mientras que las imágenes obtenidas por microscopía electrónica (TEM/SEM), muestran una gran cantidad de artefactos que pueden llevar a resultados confusos [115].
- Para hacer AFM no es necesario un entorno de vacío ni unas condiciones concretas de presión o temperatura (aunque también pueden obtenerse imágenes en vacío y en un amplio rango de presiones y temperaturas). Las imágenes pueden ser incluso obtenidas en medio acuoso, lo que permite que las muestras biológicas puedan ser estudiadas en su medio nativo.
- La preparación de muestras para AFM lleva menos tiempo y es más simple, ya que no necesitan un tratamiento previo exhaustivo.

- No es una técnica invasiva que pueda llevar a la destrucción de la muestra, haciendo que puedan ser reutilizadas.

4.4. Microscopía de Fuerza Atómica Electroquímica (EC-AFM)

La Microscopía de Fuerza Atómica Electroquímica (EC-AFM) es una combinación de ambas técnicas, la electroquímica y la AFM, que permite el análisis *in situ* de las reacciones electroquímicas que ocurren en la interfase de los electrodos, durante cualquier fase del proceso electroquímico [116]. Con esta técnica es posible monitorizar y controlar la evolución de una superficie inmersa en una disolución electrolítica a un potencial concreto.

Consiste en un equipo habitual de AFM equipado con una celda electroquímica de tres electrodos, en el que se utiliza como electrodo de trabajo la muestra a analizar. Así, la punta del AFM y la muestra están sumergidos en la celda, permitiendo tomar imágenes de AFM en entorno líquido de las reacciones electroquímicas y sus efectos sobre la interfase líquido-sólido. Existen dos variantes de esta técnica: En la primera, la punta es un elemento pasivo (no polarizada) que permite escanear la superficie de la muestra y su evolución. Ya en 1997 Andrew *et al* estudiaron el efecto de la voltametría cíclica en metales y la adsorción de moléculas sobre superficies metálicas [116].

La segunda variante consiste en aplicar una diferencia de potencial a la punta de forma que se convierte en un elemento activo del sistema, permitiendo estudiar y detectar reacciones electroquímicas sobre la superficie a nivel local; Alexandrova *et al* utilizaron un cantilever conductor actuando como electrodo para medir la conductividad protónica a través de membranas de Nafion [117].

Respecto en la primera, donde la punta es un elemento pasivo del sistema, el empleo de esta técnica en investigación se ha centrado especialmente en el estudio de mecanismos de electrocatálisis (para baterías de iones de Li), electropolimerización, y estudios de corrosión:

Más adelante, en 2001 Yamaguchi *et al* estudiaron la superficie de un electrodo de Pb durante las medidas de voltametría cíclica, observando cómo las reacciones de oxidación en el electrodo se ven afectadas por la velocidad de escaneo, y determinaron que el tamaño de los cristales de sulfato de plomo es menor cuando la velocidad de escaneo del barrido de potencial es mayor o cuando la concentración del electrolito es mayor. Compararon los resultados de EC-AFM con los obtenidos en SEM, confirmando la validez de la técnica [118].

En 2009, Singh *et al* estudiaron los cambios conformacionales asociados con los estados de oxidación y reducción de la polyanilina (PANI), mostrando que la PANI tiene dos posibles morfologías, compacta en el estado reducido,

y expandida en el estado oxidado, un proceso que además es reversible entre los límites de potencial (-0.2,0.2)V. Usando EC-AFM, demostraron que se dan cambios de volumen anisotrópicos en microtúbulos, nanohilos y nanopartículas de PANI, unos cambios de volumen dependientes del potencial aplicado al electrodo [119].

Años después, con la mejora de los equipos de AFM y la posibilidad de incorporar celdas electroquímicas comerciales, la técnica se volvió más accesible, siendo utilizada especialmente a partir del año 2016.

En cuanto al estudio de metaloproteínas, en 2016 Wu *et al* estudiaron el efecto de los procesos de reducción-oxidación en la metaloproteína Cu-Azurin, revelando los cambios en altura (de 0,32 nm) que sufría la metaloproteína y sus cambios estructurales tras la voltametría cíclica [120].

En 2017, Reggente *et al* monitorizaron la electrodeposición de PANI sobre electrodos de Platino, y mostraron que los polímeros se depositan preferentemente en las zonas en las que no se encuentra la punta del AFM, lo que indujo a pensar que el microscopio ejercía cierta influencia (presión del cantilever, calor del láser...) sobre las muestras, haciendo necesaria la optimización de los procesos de electropolimerización para que no se vieran afectados por la punta u otros parámetros relativos al equipo de AFM [121].

En 2018 Shi *et al* estudiaron la resistencia a corrosión de diversas aleaciones de alta entropía (HEAs), aleaciones estequiométricas de altas prestaciones. Estudiando las características micrométricas de las superficies con EC-AFM, mostraron que aumentar el contenido de Aluminio en las $Al_xCoCrFeNi$ supone un descenso en la resistencia a corrosión, y que esta resistencia depende directamente del mecanismo de corrosión, siendo mayor para corrosión por formación de pozos y menor a medida que la corrosión se da por disolución de fronteras [122].

Huang *et al* (2018) compararon el comportamiento de electrodos micrométricos de Silicio con electrodos de Silicio nanométrico, demostrando que los micrométricos sufrían expansiones y contracciones que hacían que las capas interfaciales de electrolito crezcan de forma continuamente pero resultando en interfases débiles. Por su parte, los nanométricos mostraban capas interfaciales más delgadas pero más estables, lo que mejoraría el problema de la inestabilidad de las capas interfaciales sólidas sobre electrodos de Silicio [123].

Las técnicas de EC-AFM han resultado ser técnicas muy potentes para el estudio y la caracterización superficial de electrodos con resolución nanométrica, y además, permitiendo la investigación *in situ* de las reacciones

electroquímicas a escalas nanométricas. En los próximos años, con el avance tecnológico de los instrumentos y la mejora de los procedimientos experimentales se espera que pueda alcanzarse resolución atómica que pueda servir para mejorar la comprensión que tenemos de los mecanismos electroquímicos de reacción.

En el campo de los sensores electroquímicos, no se tiene constancia del empleo de esta técnica para la caracterización estructural de las superficies en sensores o biosensores. Sin embargo, numerosos estudios han empleado esta técnica para llevar a cabo experimentos de voltametría cíclica [118],[124].

En este trabajo se propone la aplicación de EC-AFM para la monitorización de las reacciones electroquímicas que tienen lugar en la superficie del electrodo, así como el estudio de los posibles daños o cambios conformacionales que puedan provocar estas reacciones sobre la superficie y evaluar el efecto de estos procesos sobre el rendimiento de los biosensores.

Materiales y métodos

5.1. Metodología

El presente trabajo de investigación se centra en el desarrollo de un nuevo sensor voltamétrico nanoestructurado, basado en ftalocianinas metálicas sustituidas, para la detección de azúcares (galactosa), y el posterior el estudio de los efectos sobre la superficie de los electrodos de las reacciones electroquímicas, para lo cual se han seguido los siguientes pasos:

- Fabricación de películas delgadas con la técnica de Langmuir-Blodgett para la transferencia nanoestructurada de ftalocianinas metálicas sustituidas sobre vidrio cubierto de óxido de indio y estaño (ITO).
- Inmovilización de la enzima de interés (Galactosa oxidasa) sobre la superficie del sensor.
- Caracterización de los sensores anteriormente desarrollados mediante las siguientes técnicas:
 - Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis)
 - Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)
 - Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)
 - Microscopía de Fuerza Atómica Electroquímica (EC-AFM)
- Puesta a punto del procedimiento para llevar a cabo reacciones electroquímicas y el estudio morfológico de la muestra mediante escaneo en líquido con microscopía de fuerza atómica simultáneamente.
- Estudio del comportamiento electroquímico de los sensores por voltametría cíclica.
- Estudio de los cambios inducidos a la superficie del sensor durante los experimentos electroquímicos.

5.2. Materiales

5.2.1. Reactivos

Las ftalocianinas metálicas sustituidas utilizadas para la fabricación de los biosensores, son ftalocianinas tetra-carboxiladas (iron(II) 2,9,16,23 - tetra (carboxy) phthalocyanine) (TCFePc), obtenidas de PorphyChem.

El resto de reactivos, disolventes y productos químicos empleados, fueron utilizados sin purificaciones adicionales y obtenidas de Sigma-Aldrich. Para las disoluciones acuosas, se empleó agua desionizada miliQ (con una resistividad de $18,2 M\Omega \cdot cm$) procedente de un sistema de Mili-Q (*Millipore, Direct-Q*).

La D(+)-galactosa y la enzima galactosa oxidasa de *Dactylium dendroides* (GaOx) utilizadas fueron adquiridas de Amresco y Sigma-Aldrich, respectivamente. La GaOx tiene una actividad de $168,400 U/mg$.

5.2.2. Equipos

UV-Vis: El equipo de espectroscopía de Ultravioleta-Visible utilizado para la caracterización de los biosensores es un espectrofotómetro de doble haz, modelo UV-2600 (Shimadzu).

FTIR: El equipo de espectroscopía por transmisión de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) utilizado es el modelo FT/IR-6600 (Jasco).

Balanza de Langmuir-Blodgett: Modelo KSV-Nima 5000 (Biolin Scientific), incluye barreras de teflón, brazo mecánico para inmersión (dipper) y balanza de Wilhelmy.

Potenciostato: Para las medidas electroquímicas se utilizó un potenciostato PGSTAT 128N (Autolab).

AFM: El equipo de AFM con celda electroquímica integrada (EC Cell) es el modelo Asylum Research Cypher S (Oxford Instruments).



Figura 12: Espectrofotómetro de doble haz UV-2600 (Shimadzu)



Figura 13: Equipo de espectroscopía por transmisión de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) FT/IR-6600 (Jasco).

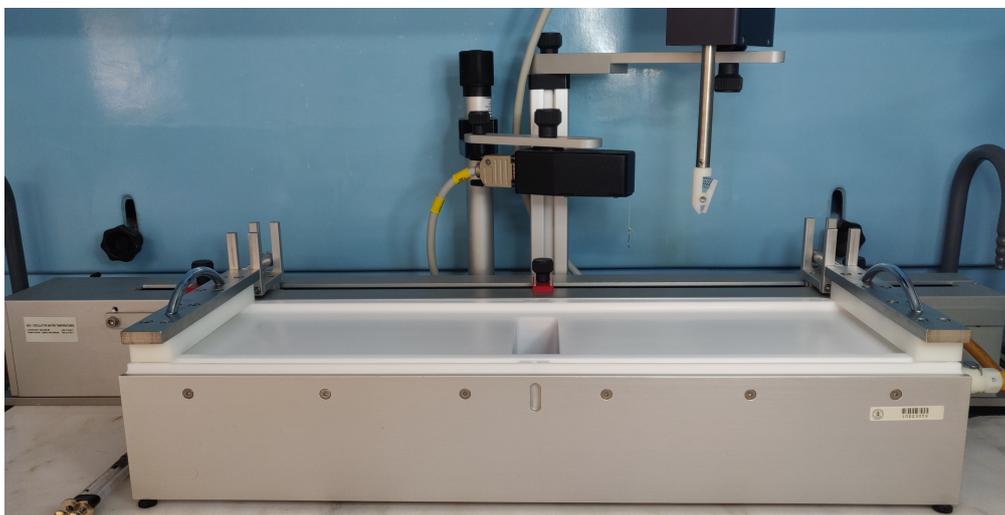


Figura 14: Equipo de Langmuir-Blodgett KSV-NIMA 5000 (Biolin Scientific).



Figura 15: potenciostato PGSTAT 128N (Autolab).



Figura 16: Microscopio de Fuerza Atómica Cypher S (Oxford Instruments).

5.3. Procedimiento

5.3.1. Fabricación de los biosensores con la técnica de Langmuir-Blodgett

Los biosensores fueron preparados utilizando ITO como sustrato, depositando 10 capas de una monocapa de TCFcPc con ácido araquídico (AA) en proporción 1:1, utilizando disoluciones en cloroformo de concentraciones $5 \cdot 10^{-5}$ y $4 \cdot 10^{-4}$, respectivamente. La subfase utilizada fue agua miliQ a 25°C . El volumen utilizado de ambas sustancias se ajusta para que el área inicial por molécula antes de la compresión de las barreras sea $\sim 180 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. Tras la difusión de las moléculas sobre la subfase, se esperó un mínimo de 15 minutos para que se produjera la evaporación del disolvente.

El ácido araquídico es un ácido graso de cadena larga, que cumple dos funciones: Primero, proporcionar un entorno biomimético que simule una membrana celular (bicapa lipídica) en el que la enzima GaOx pueda maximizar su funcionamiento, y además, aportar flexibilidad a la monocapa y evitar que las ftalocianinas formen agregados durante la compresión y la transferencia de la película.

Para la formación de la monocapa (compression), se monitorizó la presión superficial con una balanza de Wilhelmy, mientras se disminuyó el área superficial entre las barreras a razón de $10 \text{ mm}/\text{min}$, hasta que la presión superficial fuera adecuada para la transferencia al sustrato (habiéndose encontrado una presión de colapso de $28 \text{ mN}/\text{m}$, la presión de transferencia se fijó en torno a $25 \text{ mN}/\text{m}$).

La posterior inmersión (dipping) del sustrato se hizo manteniendo constante la presión a la presión de transferencia ajustando la posición de las barreras, siguiendo los siguientes pasos:

- 1.- Inmersión del sustrato a velocidad $5 \text{ mm}/\text{min}$
- 2.- Tiempo de espera con el sustrato sumergido: 3 s
- 3.- Emersión del sustrato a velocidad $5 \text{ mm}/\text{min}$
- 4.- Tiempo de espera con el sustrato emergido: 60 s
- 5.- Repetición de los pasos 1 a 4 en función del número de capas deseado

Tras la fabricación de los electrodos TCFcPc+AA (1:1), se las dejó secar al aire durante 4h antes de realizar los experimentos electroquímicos o la adición de la enzima. La posterior adición de la enzima se hizo con una

disolución de GaOx en buffer fosfato salino a una concentración de 5 mg/mL , directamente depositada sobre la superficie del electrodo con drop-casting, y posteriormente se expusieron a vapores de glutaraldehído durante 10 min. Aunque pueden darse interacciones $\pi - \pi$ entre los anillos aromáticos de las ftalocianinas y la enzima, e interacciones entre los grupos amino de la GaOx y los grupos carboxy de las TCFEPc que inmovilicen la GaOx sobre las películas, el glutaraldehído actúa como elemento cross-linker entre ambos, aumentando la estabilidad del sensor.

5.3.2. Caracterización de los biosensores

Tras la fabricación de los biosensores, fueron caracterizados mediante espectroscopía de UV-Vis, espectroscopía FTIR, y AFM.

UV-Vis: Se midió la absorbancia de radiación por parte de las películas con un barrido en longitudes de onda de 300 nm a 850 nm con una resolución de $2,0\text{ nm}$, utilizando un sustrato de cuarzo sobre el que se transfirieron las películas de TCFEPc+AA (1:1). Como blanco, se utilizó una cubeta de cuarzo conteniendo la disolución de cloroformo y ácido araquídico, para minimizar el ruido al medir la absorción de las TCFEPc.

FTIR: Se tomaron 3000 medidas de absorción por transmisión en un rango espectral de 550 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} , primero de una pastilla de KBr con 2% de TCFEPc en peso y después de las películas de TCFEPc+AA(1:1) sobre un sustrato de ZnSe.

AFM: Las imágenes tomadas en AFM para la caracterización estructural de los sensores se tomaron en entorno líquido, con la muestra sumergida en una disolución acuosa de buffer fosfato. De esta forma pueden tomarse imágenes de la superficie en el entorno de funcionamiento del biosensor, para poder comparar más fehacientemente los cambios posteriores en la estructura. La sonda utilizada fue el modelo FS-1500, que incorpora un cantilever y punta de silicio con una constante elástica $k = 6\text{ N/m}$.

La punta tiene un radio de curvatura de $10 \pm 2\text{ nm}$ y el cantilever cuenta con un recubrimiento de cromo-oro en proporción (5-70), que tiene como función proteger a la punta de la oxidación en caso de trabajar en entornos con ácidos fuertes (H_2SO_4) y además evitar que las posibles reacciones electroquímicas como resultado de la excitación fototermal de la punta dañen la sonda.

La frecuencia de resonancia de la punta se sitúa en torno a $f = 1500\text{ kHz}$ en aire, pero al trabajar en entorno líquido, la resonancia suele disminuir hasta

los $\sim 200 \text{ kHz}$. En los Anexos A y B puede encontrarse toda la información en relación a la frecuencia de resonancia y el acoplamiento entre la punta y el entorno.

5.3.3. Medidas electroquímicas

Los experimentos electroquímicos se realizaron en una celda de tres electrodos conectada a un potenciostato que genera la diferencia de potencial entre los electrodos y registra la densidad de corriente en la misma. La técnica electroquímica empleada fue voltametría cíclica. Los biosensores TCFcPc+AA (1:1) (10 LBs) se utilizaron como electrodo de trabajo, un anillo de platino se usó como contraelectrodo, un electrodo de referencia de hilo de Perfluoroalkoxy alkane (PFA) con recubrimiento de plata, y la velocidad de escaneo empleada fue de 100 mV/s , con una ventana de potencial de $-0,8$ a $0,8 \text{ V}$. El montaje de la celda electroquímica se muestra en la Figura 17.

Como electrolito, se utilizó una disolución buffer fosfato salino con una concentración de galactosa 10^{-4} M .



Figura 17: Celda electroquímica de tres electrodos para toma de imágenes con AFM in situ.

Para el estudio del efecto de los ciclos de voltametría en la superficie del electrodo con EC-AFM, se utilizó la celda electroquímica incluida en el AFM con un volumen de $200 \mu\text{L}$ (EC-AFM), de forma que pudieran tomarse imágenes de AFM en la misma área antes y después del experimento. Véase: Anexos A y B

Sección 6

Resultados

A continuación se muestran los resultados obtenidos durante el desarrollo de los biosensores, comenzando por su diseño, fabricación y posterior caracterización estructural, que confirma la correcta transferencia y organización de las ftalocianinas sobre la superficie del electrodo, así como su orientación.

Se muestran también los resultados de los experimentos electroquímicos llevados a cabo, junto con el estudio realizado en el AFM que consiste en la toma de imágenes de la superficie del biosensor en el entorno de funcionamiento del mismo (disolución acuosa), pudiéndose obtener imágenes de la superficie inmediatamente antes y después del experimento, para comprobar la robustez del sensor y su resistencia a las reacciones electroquímicas, en función del número de ciclos de voltametría a los que es sometido.

6.1. Fabricación de los biosensores

Los biosensores diseñados constan de un sustrato sobre el que se depositan sucesivas películas LB de TCFcPc, en las que las TCFcPc actuarán como mediador electrónico. Sobre esta película se inmoviliza la enzima GaOx que será la encargada de detectar la presencia de galactosa.

El primer paso fue preparar las películas de LB, para lo cual se analizó el comportamiento de la monocapa de TCFcPc sobre la subfase acuosa, que nos permite conocer la orientación y empaquetamiento de las moléculas sobre la subfase, para realizar la transferencia a la presión a la que la monocapa está adecuadamente ordenada.

Estos experimentos previos indicaron que para obtener una monocapa ordenada de buena calidad (sin agregados), era necesario combinar mezclas de TCFcPc y ácido araquídico (AA). Este ácido graso cumple una doble función: mejorar la transferencia al sustrato sólido y proporcionar un medio anfifílico (entorno biomimético) en el que la enzima pueda mejorar su adherencia.

La proporción más adecuada de moléculas de TCFcPc y AA se determinó atendiendo a las isotermas registradas para cada experimento, y los respectivos ratios de transferencia, que se muestran en la Tabla 1.

Capa	TR (10:1)	TR (1:10)	TR (1:1)
1	0.486	0.941	0.885
2	0.645	0.974	0.956
3	0.785	0.989	1.029
4	0.765	0.984	1.072
5	0.769	1.005	1.108
6	0.781	1.081	1.158
7	0.725	1.101	1.086
8	0.654	1.056	1.110
9	0.589	1.071	1.028
10	0.580	1.012	0.989
11	-	1.032	0.932
12	-	0.986	0.873
13	-	0.954	0.822
14	-	0.881	0.749
15	-	0.775	0.655

Tabla 1: Transfer Ratio obtenido durante la transferencia para las diferentes proporciones de TCFcPc y AA.

En la primera configuración, la proporción de TCFcPc y AA fue de 10:1, registrándose la siguiente isoterma:

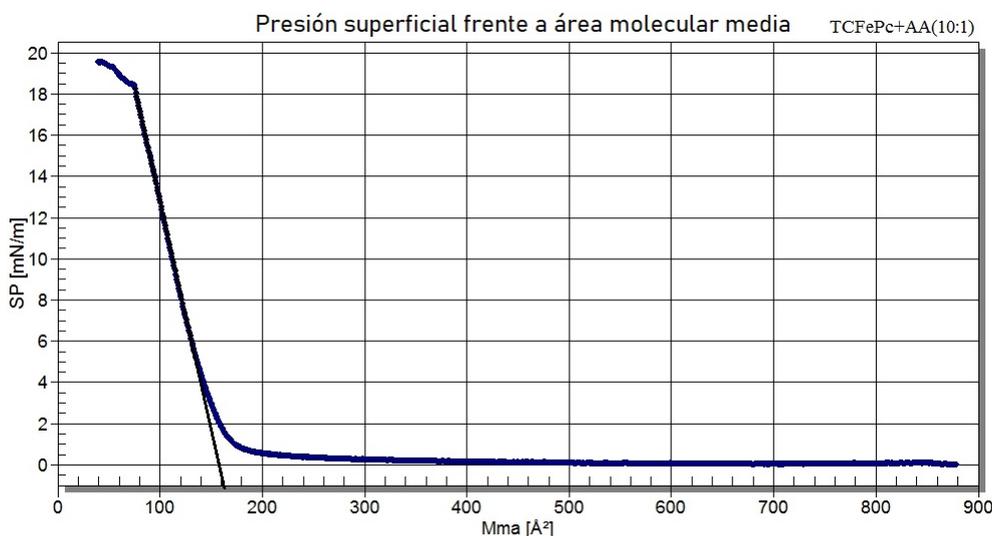


Figura 18: Isoterma registrada durante la compresión de la monocapa de Langmuir compuesta de TCFcPc y AA en proporción 10:1.

Puede observarse en la Figura 18 que al disminuir el área superficial, aumenta la presión superficial sobre la balanza de Wilhelmy, como consecuencia de la compresión de las moléculas sobre la superficie, que eventualmente se ensamblan hasta formar una monocapa de Langmuir, en la que se hará la inmersión del sustrato. En este caso, el colapso de la monocapa ocurre a una presión superficial baja (20 mN/m).

La transferencia se realizó en un experimento posterior a una presión de 17 mN/m , ligeramente por debajo de la presión de colapso. La primera capa se transfirió mediante inmersión vertical, lo que daría como resultado un ordenamiento de tipo Y. El ratio de transferencia para esta proporción (Tabla 1) fue significativamente menor que 1, por tanto la transferencia no se está produciendo de forma homogénea, lo que puede atribuirse a la fuerte tendencia de las ftalocianinas a formar agregados, formando películas LB de baja calidad.

La formación de agregados sugiere la necesidad de aumentar la proporción de ácido araquídico para evitar las interacciones entre moléculas de TCFcPc.

Después se aumentó la cantidad de moléculas de ácido araquídico hasta una proporción de TCFcPc y AA de 1:10, buscando que la mayor proporción de ácido araquídico aportara la suficiente flexibilidad a la película y evitara el agregamiento de las TCFcPc. La isoterma obtenida se muestra en la Figura 19:

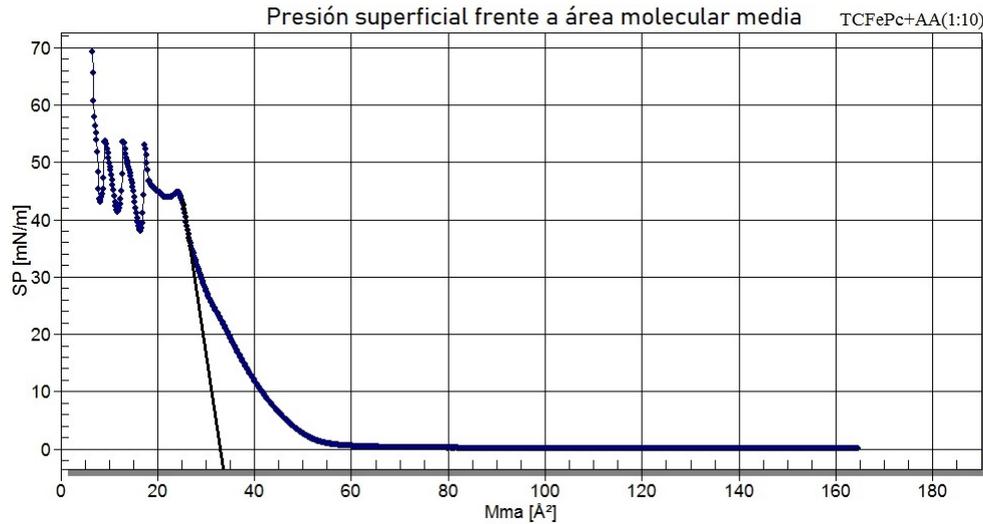


Figura 19: Isoterma registrada durante la compresión de la monocapa de Langmuir compuesta de TCFcPc y AA en proporción 1:10.

En este caso, el colapso de la monocapa se produce para una presión superficial significativamente mayor, debido al mayor número de moléculas de ácido araquídico. El ratio de transferencia en cada capa fue cercano a 1 y estable hasta la capa número 13, sin embargo, la proporción de moléculas de TCFcPc era demasiado baja para que tuvieran un efecto significativo en la posterior detección de galactosa.

Finalmente, se estudió una proporción igual de moléculas de TCFcPc y AA, registrando la siguiente isoterma:

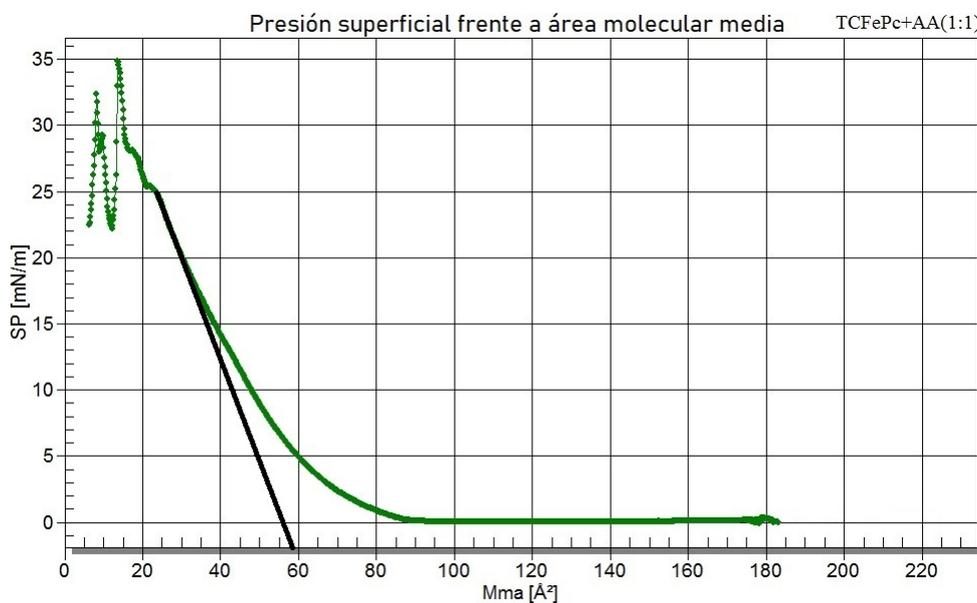


Figura 20: Isoterma registrada durante la compresión de la monocapa de Langmuir compuesta de TCFcPc y AA en proporción 1:1.

El colapso de la monocapa en este caso se dio para una presión superficial algo menor de 30 mN/m , por lo que la transferencia se hizo para una presión de 25 mN/m .

El comportamiento y la disposición de las ftalocianinas puede ser estudiado atendiendo a las características de la isoterma. La monocapa de TCFcPc+AA(1:1) se comporta como un gas bidimensional sobre la subfase a presiones superficiales bajas (hasta 90 \AA^2 , cuando empieza a subir la presión superficial). Puede observarse la transición a la *fase líquida*, pero no hay una distinción clara de cambio de fases entre la *fase líquida* y la *fase sólida*, en su lugar, la presión superficial aumenta de forma lineal con la disminución del área superficial, hasta alcanzarse la presión de transferencia.

La proyección de la recta sobre el eje X nos da el área superficial disponible por molécula en el momento de la transferencia, cuando la monocapa está en la fase sólida. En este caso el área superficial fue de 57 \AA^2 , y dado que las TCFcPc tienen $\sim 180 - 200 \text{ \AA}^2$ de área, esto indicaría que la disposición de las ftalocianinas sobre la monocapa es vertical y ligeramente inclinada respecto al sustrato.

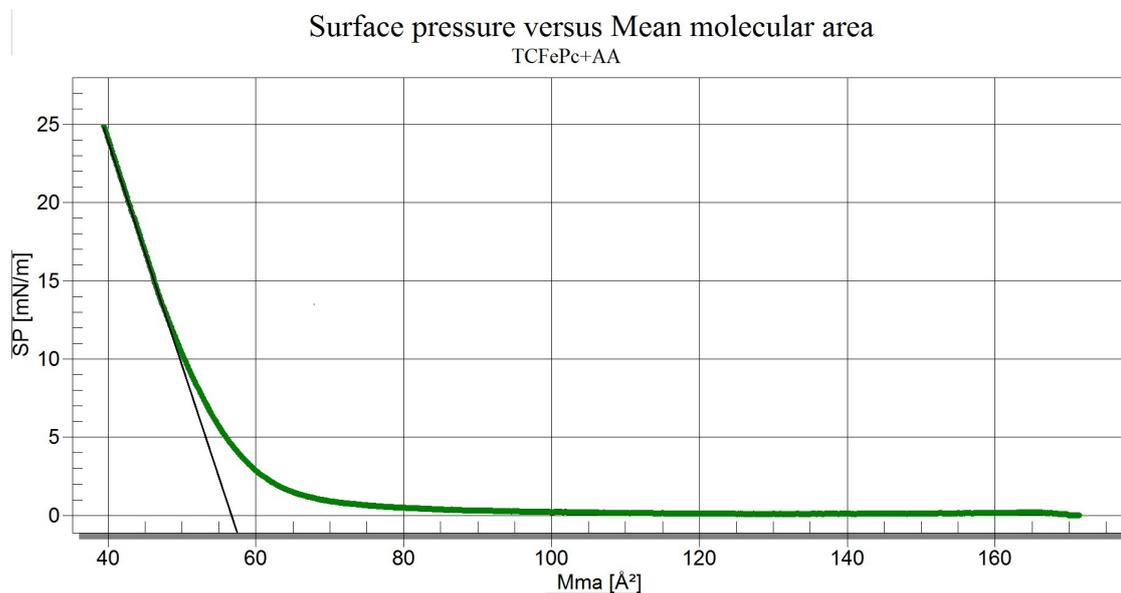


Figura 21: Isotherma registrada durante la compresión de la monocapa de Langmuir compuesta de TCFEPC y AA en proporción 1:1.

De nuevo, al hacerse la primera capa por inmersión vertical, la deposición de las sucesivas capas es de tipo Y, con interacciones cabeza-cabeza y cola-cola entre las moléculas de ácido araquídico entre capas sucesivas, proporcionando un entorno anfifílico que mejore la adherencia y el funcionamiento de la enzima.

La Figura 21 muestra la isoterma registrada hasta la presión de transferencia, momento en el que la monocapa estaría ya en la fase sólida, y a partir del cual la presión se mantendrá constante durante todo el proceso de inmersión del sustrato. Se obtuvo un ratio de transferencia estable y cercano a 1 hasta la décima capa, aunque algo menor ($\sim 0,8$) durante las primeras inmersiones, diferencia causada por el carácter hidrofóbico del sustrato, que dificulta la correcta transferencia de la monocapa. Resultados similares fueron obtenidos durante la preparación de numerosos sensores, con lo que el experimento es reproducible.

6.2. Caracterización estructural de los biosensores

6.2.1. Espectroscopía UV-Vis

Se tomaron dos espectros de absorción de radiación UV-Vis, el primero de ellos se tomó a la disolución de TCFcPc $5 \cdot 10^{-5} M$ antes de la preparación de las películas de Langmuir-Blodgett, y el segundo después de la transferencia de las ftalocianinas sobre el sustrato. En la Figura 22 se muestra la comparación entre ambos espectros.

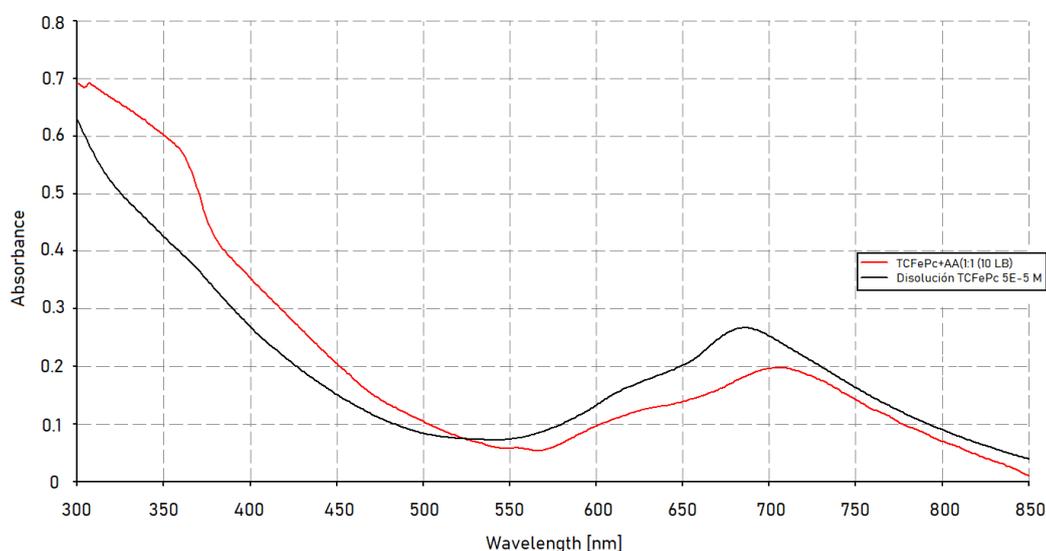


Figura 22: Comparación de los espectros UV-Vis la disolución de TCFcPc y las películas LB de TCFcPc y ácido araquídico (proporción 1:1, 10 capas).

En los espectros pueden observarse las bandas de absorción B y Q características de las ftalocianinas, lo que confirmaría la transferencia de las TCFcPc sobre el sustrato.

Además, es notorio el desplazamiento batocrómico en la posición de los picos en 618 nm y 685 nm en el espectro de la disolución hacia mayores longitudes de onda en el espectro de la película de LB, así como el desplazamiento también hacia mayores longitudes de onda de la banda B, que indican orden molecular de las TCFcPc sobre la superficie del electrodo.

En concreto, es conocido que las ftalocianinas tienen una fuerte tendencia a agregarse, debido a interacciones atractivas de Van der Waals entre los anillos aromáticos. El desplazamiento en los picos de absorción en el espectro

UVVis de la película respecto a la disolución puede explicarse por la interacción de anillos aromáticos sucesivos (ordenamiento tipo J) [125], con lo que puede concluirse que las ftalocianinas están ordenadas de forma vertical en la película. Este resultado está en concordancia con lo observado en la isoterma.

6.2.2. Espectroscopía FTIR

En la Figura 23 se comparan los espectros FTIR de una pastilla de KBr con TCFcPc al 2 % en peso con una película 10 capas de LB sobre un sustrato de ZnSe. En este caso, la comparación entre ambos espectros pone de manifiesto el orden molecular de las TCFcPc en la película, además de confirmar la transferencia de ambos las TCFcPc y el ácido araquídico.

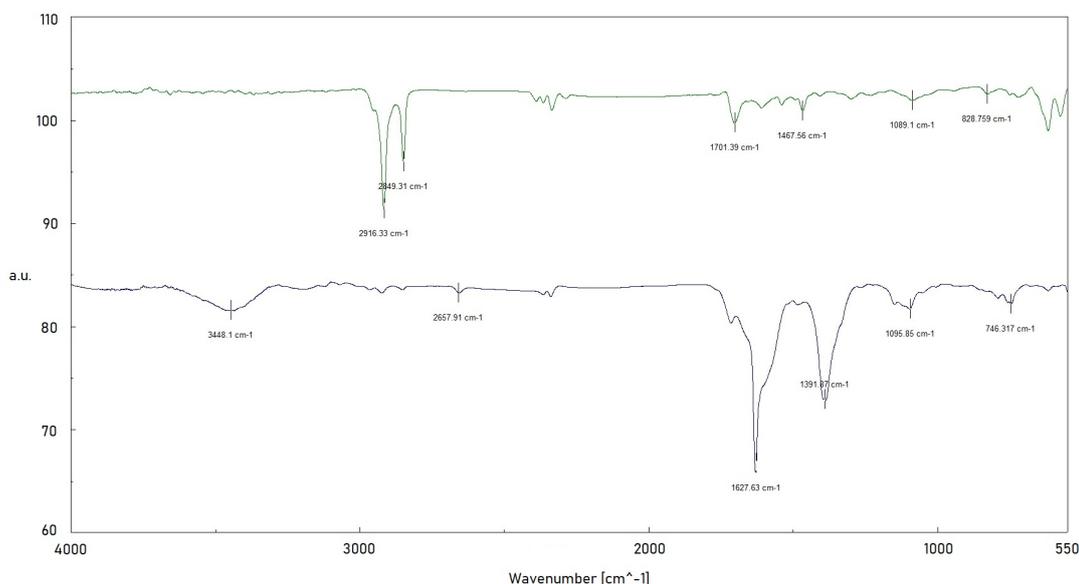


Figura 23: Comparación de la absorbancia por transmisión (en unidades arbitrarias) de espectros FTIR de TCFcPc (línea azul) y de películas LB de TCFcPc y ácido araquídico (proporción 1:1, 10 capas) (línea verde).

El análisis de enlaces y grupos funcionales se muestra en la Tabla 2. La presencia de los picos correspondientes al ácido araquídico y las TCFcPc en el espectro de las películas de LB indica que la transferencia ha sido adecuada sobre el sustrato. En ambos espectros puede observarse la presencia del pico correspondiente al *stretching* del anillo aromático de ftalocianina en $746,32\text{ cm}^{-1}$ y $828,76\text{ cm}^{-1}$, además, la aparición de bandas de absorción en

Asignación	KBr 2% TCFcPc		TCFcPc+AA(1:1) 10 LB	
	Número de onda [cm^{-1}]	Intensidad [u.a.]	Número de onda [cm^{-1}]	Intensidad [u.a.]
Isoindol y Fe-N	746.32	2.1	828.76	0.4
Anillo Pc	1095.85	2.3	1089.10	0.5
-OH	1391.87	11.2	1467.56	1.2
-C=O	1627.63	17.9	1701.39	2.5
-CH	-	-	2849.31	7.5
-CH	-	-	2916.33	12.2

Tabla 2: Asignación de grupos funcionales por frecuencia de aparición en los espectros FTIR de la pastilla de KBr (2% TCFcPc) y las películas LB TCFcPc+AA(1:1) (10 LBs).

la región entre 1200 cm^{-1} y 1700 cm^{-1} puede relacionarse con los grupos carboxilo de las TCFcPc.

La principal diferencia entre ambos espectros es que en la pastilla de KBr las TCFcPc estarían equidistribuidas y aleatoriamente orientadas, mientras que en las películas de LB las TCFcPc estarían ordenadas, teniendo orientaciones preferentes.

El ordenamiento de las ftalocianinas en la película LB puede comprobarse atendiendo a las bandas de absorción en $1200 - 1700\text{ cm}^{-1}$ y $700 - 1100\text{ cm}^{-1}$ en ambos espectros. En la pastilla de KBr, la primera banda muestra una intensidad de absorción mucho mayor que la segunda banda (proporción aproximadamente 7:1), mientras que en la película LB la intensidad relativa se reduce a una proporción de 3.5:1.

Este cambio se explica por el tipo de vibración de los enlaces involucrados. Los picos de la banda $1200 - 1700\text{ cm}^{-1}$ se corresponden a vibraciones fuera del plano de los enlaces de los grupos carboxilo, y los de la banda $700 - 1100\text{ cm}^{-1}$ corresponden a vibraciones en el plano del anillo de ftalocianina y los enlaces Fe-N con el metal central. Al orientarse las ftalocianinas verticalmente, se produce un efecto sinérgico entre las vibraciones de los anillos en el plano que hace aumentar su intensidad respecto a las vibraciones de los grupos carboxy, cuya intensidad no se ve afectada por el orden molecular.

Este resultado sirve como confirmación de que las ftalocianinas presentan

orden en la película, como ya indicaban la isoterma y el espectro UVVis.

6.2.3. Caracterización de la superficie mediante AFM

El siguiente paso en la caracterización de las películas fue el análisis de su superficie mediante microscopía de AFM. Este estudio se realizó en películas de 10 capas de LB de TCFcPc+AA(1:1) sobre ITO, ya que se trata de un sustrato conductor que será el soporte sobre el que se realizarán las medidas electroquímicas.

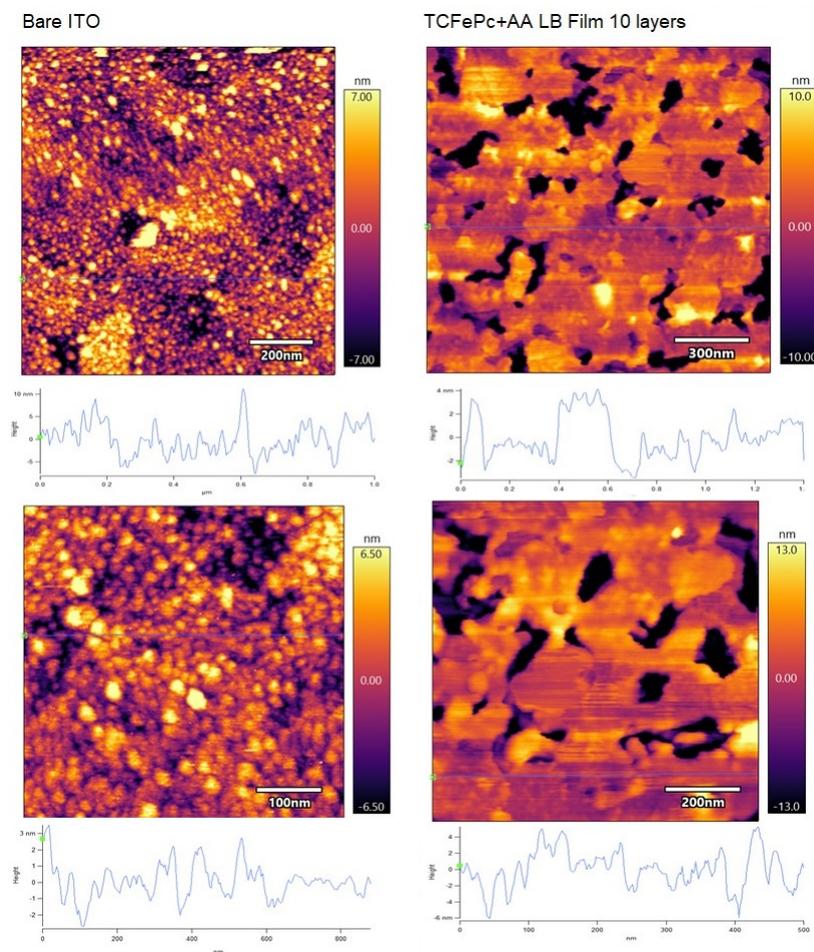


Figura 24: Imágenes de AFM de la superficie de sustrato vidrio con ITO vacío (izquierda) y de las películas de Langmuir-Blodgett (derecha).

En la Figura 24 se muestran las imágenes tomadas con AFM de las superficies de las películas LB de TCFcPc+AA(1:1), así como del sustrato ITO sobre

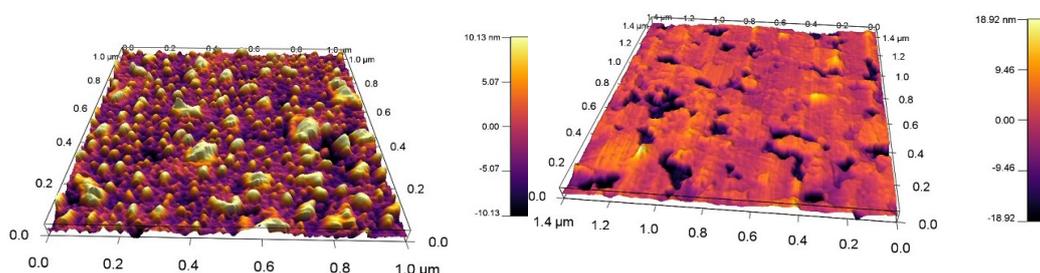


Figura 25: Comparación de imágenes 3D tomadas en AFM de la Figura 21, el sustrato ITO (izquierda) y de la película LB (derecha).

el que fueron depositadas. La gráfica inferior corresponde al perfil de cada superficie marcado con una línea azul sobre la imagen.

Tal y como se observa en la Figura 25, el sustrato de ITO presenta granos cristalinos de pequeño tamaño y tiene una baja rugosidad ($R_q = 2,458 \text{ nm}$ || $R_a = 1,885 \text{ nm}$). La imagen de la película LB muestra una superficie altamente homogénea así como baja rugosidad ($R_q = 5,688 \text{ nm}$ || $R_a = 3,730 \text{ nm}$) lo que confirma la calidad de la película.

6.2.4. Caracterización como sensores de galactosa: Respuesta electroquímica

Una vez caracterizada la estructura de las películas, se estudió su comportamiento como sensores electroquímicos voltamétricos evaluando su capacidad para detectar galactosa.

Las medidas electroquímicas se realizaron con una disolución de D(+)galactosa 10^{-4} M en buffer fosfato $0,01 \text{ M}$ (pH=7). Primero debemos conocer cómo se comporta el ITO sin modificar en estas condiciones, y compararlo con las películas LB TCFEPc+AA(1:1)(10 LBs). Después, se inmoviliza la enzima sobre la superficie del electrodo modificado y se compara con el comportamiento de la película sin la enzima.

En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos. La respuesta de un electrodo de ITO sin modificar presenta un par redox con la onda anódica a $0,75 \text{ mV}$ y la onda catódica a -500 mV . La intensidad de estos picos aumenta claramente cuando se utiliza el electrodo modificado con TCFEPc+AA(1:1) (10 LBs). Por ejemplo, la onda catódica pasa de -36 mA en el ITO sin modificar a -59 mA cuando se utiliza el ITO modificado. Este resultado indica que la película LB mejora la transferencia electrónica entre el electrolito y el

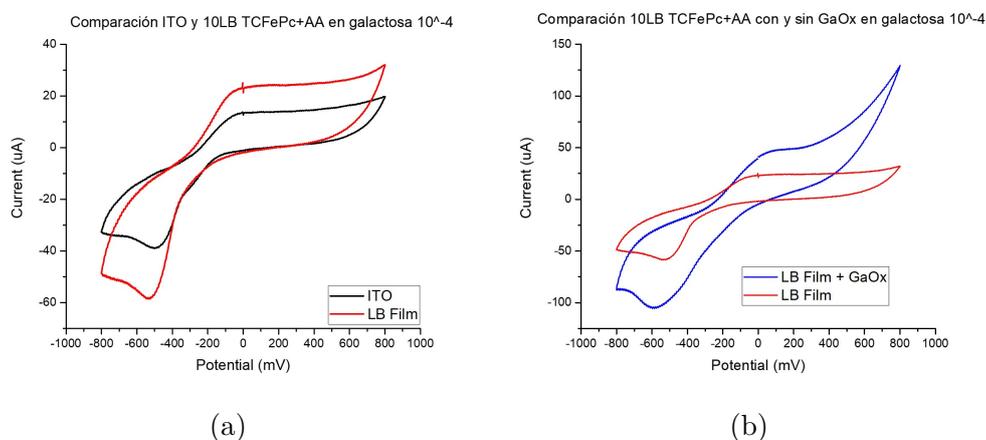


Figura 26: Respuesta voltamétrica de los sensores en galactosa $10^{-4} M$ en buffer fosfato salino $0,01 M$ ($pH = 7$). (a) ITO sin modificar (negro) y Película LB (rojo), (b) Película LB (rojo) y Película LB+GaOx (azul).

electrodo. Este efecto puede explicarse por el carácter electrocatalítico de las TCFcPc.

En la Figura 26(b) puede apreciarse el efecto de la inmovilización de la enzima sobre los electrodos modificados. Comparando ambos voltamogramas (TCFcPc+AA(1:1) vs TCFcPc+AA(1:1)+GaOx), se observa cómo la combinación de la modificación del electrodo con las películas LB y la inmovilización de la enzima juegan un papel fundamental en la mejora de la respuesta electroquímica de los sensores. La adición de la enzima a la superficie del electrodo permite aumentar la velocidad de la oxidación de la galactosa, lo que da lugar a la aparición de picos de reducción-oxidación en torno a $100 mV$ (oxidación) y $-580 mV$ (reducción) como resultado de la actividad enzimática.

6.3. Estudio de los cambios estructurales tras la electroquímica

Una de las limitaciones de los sensores electroquímicos es el acortamiento de su tiempo de uso debido a modificaciones estructurales que ocurren en la superficie del sensor durante los procesos electroquímicos. Estos procesos pueden ser de diferente naturaleza, incluyendo formación de precipitados cristalinos, polimerización en la superficie, desprendimientos, reorganización molecular del material sensible, difusión de material en la superficie, etcétera.

Aunque el deterioro de los sensores es un fenómeno bien conocido, apenas existen estudios de estos fenómenos. La microscopía de AFM es una herramienta extremadamente eficiente para el estudio de superficies. En este caso buscamos combinarla con electroquímica, de modo que sea posible estudiar la superficie del sensor antes y después de las medidas electroquímicas y analizar los cambios.

El AFM nos permite observar regiones muy ampliadas de la superficie del biosensor (500 nm), pero esto imposibilita que tras someter al electrodo al experimento electroquímico en una celda convencional (externa al AFM) puedan tomarse imágenes con AFM en la misma región. Además, la preparación de la muestra para la toma de imágenes usualmente supone la destrucción del electrodo, por lo que si se toman imágenes del electrodo antes de la electroquímica, necesariamente la electroquímica debe hacerse con otro electrodo para observar la superficie después del experimento.

Utilizando una celda electroquímica integrada en el AFM (EC-Cell), podemos realizar un estudio in situ de la superficie a lo largo de los experimentos electroquímicos, combinando dos técnicas conocidas (AFM y electroquímica), para una caracterización más completa. Esta técnica nos aporta la capacidad de poder observar cómo la electroquímica afecta a una región concreta del biosensor, sin tener que sacar el electrodo de la celda y evitando el deterioro del sensor durante el proceso de preparación de la muestra. Así, pueden obtenerse imágenes con AFM de la misma región de la superficie del biosensor, antes y después de la voltametría cíclica, sin necesidad de sacar al electrodo de su entorno de trabajo, mediante la toma de imágenes de AFM con el electrodo inmerso en el propio electrolito de la celda.

La combinación de AFM con electroquímica es extremadamente novedosa. Por esta razón gran parte del trabajo desarrollado en este TFM, ha consistido en combinar los dos instrumentos y establecer un protocolo de funcionamiento. Este protocolo, se ha recogido en los Anexos A y B.

A continuación se muestran los resultados obtenidos con los sensores.

6.3.1. Estudio de la superficie de los electrodos modificados

En primer lugar se tomaron imágenes de AFM de los electrodos modificados con una película de 10 capas de LB de TCFcPc+AA(1:1). Tras la toma de las imágenes, se separó la punta de la superficie del electrodo a una altura de 300 nm . A continuación se sometió al sensor a 5 ciclos de voltametría con una ventana de potencial de $(-0,8\text{ V}, 0,8\text{ V})$ (Figura 23), de forma que pudiera observarse la superficie del electrodo en unas condiciones iguales a las de su funcionamiento habitual, en una celda de tres electrodos de $200\ \mu\text{L}$ de capacidad integrada en el AFM, utilizando buffer fosfato salino con galactosa 10^{-4} M como electrolito. Por último, volvió a ponerse en contacto la punta con el electrodo para registrar imágenes de la misma región del electrodo, inmediatamente después del experimento electroquímico.

Puede observarse en las Figuras 27 y 28 la comparación entre la superficie del electrodo antes y después de los experimentos. Tras 5 ciclos de voltametría, el sensor registra cambios estructurales menores.

Atendiendo al perfil bajo la imagen topográfica en la Figura 28 (derecha), puede apreciarse un perfil escarpado, probablemente a causa de que las capas superiores de la película de TCFcPc se desprendan del electrodo durante la electroquímica, aunque 5 ciclos no destruyen la estructura del sensor ni su funcionalidad, que sigue presentando una rugosidad comparable a la que mostraba antes de la voltametría (Antes: $R_q = 6,075\text{ nm}$ || $R_a = 4,805\text{ nm}$; Después: $R_q = 5,590\text{ nm}$ || $R_a = 4,256\text{ nm}$).

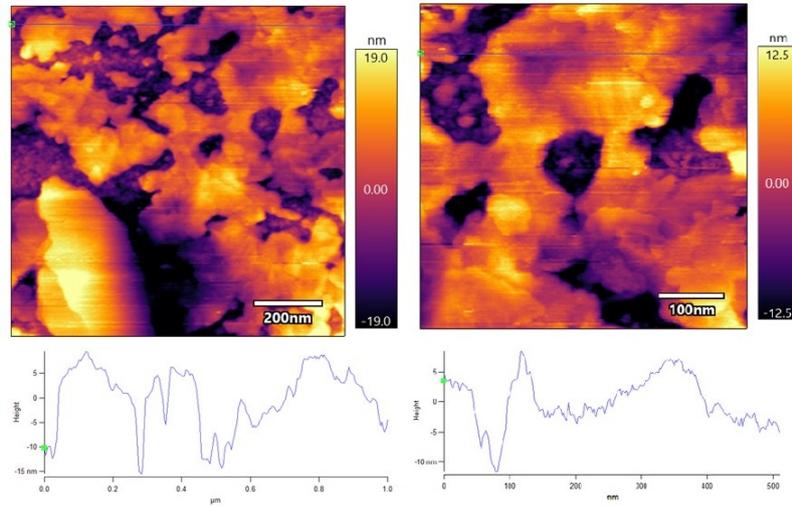


Figura 27: Superficie de un sensor TCFcPc+AA antes de la electroquímica. A la izquierda, imagen de $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$, a la derecha, imagen ampliada de $500 \text{ nm} \times 500 \text{ nm}$.

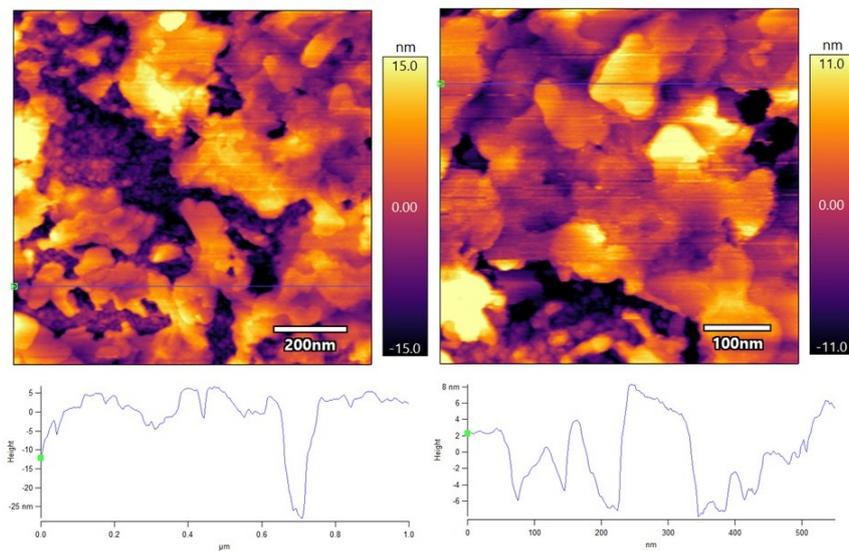


Figura 28: Superficie de un sensor TCFcPc+AA después de la electroquímica. A la izquierda, imagen de $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$, a la derecha, imagen ampliada de $500 \text{ nm} \times 500 \text{ nm}$.

Estudio de la superficie de los electrodos tras la inmovilización de la enzima

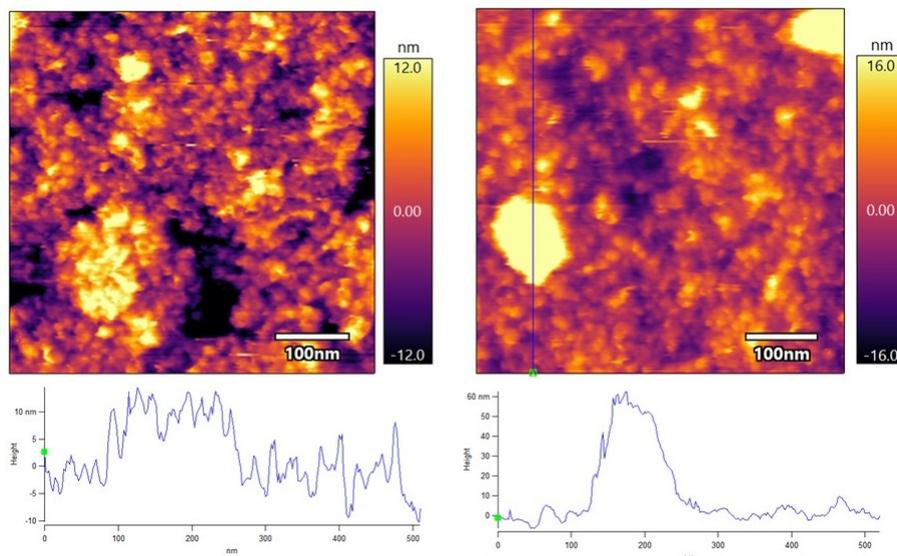


Figura 29: Comparación entre la superficie de un sensor TC-FePc+AA+GaOx, tras la inmovilización de la enzima (izquierda) y después de la electroquímica (derecha). Ampliación de $500\text{ nm} \times 500\text{ nm}$.

La Figura 29 muestra las imágenes de topografía de la superficie del electrodo modificado con una película de LB de 10 capas de TCFcPc+AA(1:1) sobre el que se ha inmovilizado la GaOx, así como la topografía del mismo electrodo tras someterlo a 5 ciclos de voltametría cíclica en buffer fosfato salino con galactosa 10^{-4} M . Tras el proceso electroquímico, puede observarse la aparición de estructuras nucleadas, de hasta 60 nm de altura y 200 nm de largo.

Estas estructuras son consecuencia de las reacciones electroquímicas que tienen lugar en la superficie del electrodo. A pesar de ello, la conformación de la GaOx permanece inalterada, manteniendo la rugosidad del electrodo constante en las zonas libres de estas estructuras, lo cual indica que la inmovilización de la enzima sobre la película es muy eficiente, probablemente debido a las interacciones atractivas entre las TCFcPc y la GaOx, que mejoran la inmovilización y evitan que la enzima se disuelva en el electrolito durante la electroquímica. La Figura 30 muestra las estructuras nucleadas a una escala mayor, donde puede apreciarse la densidad de estructuras por unidad de área.

Puede intuirse en la imagen a mayor escala una tendencia de las estructuras

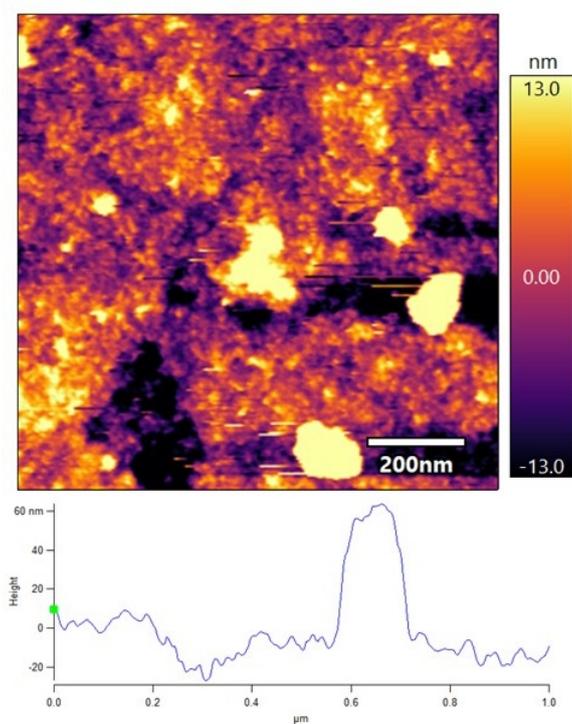


Figura 30: Superficie de un sensor TCFcPc+AA+GaOx, después de 5 ciclos de voltametría cíclica. Ampliación de $1 \mu m \times 1 \mu m$.

nucleadas de aparecer juntas, dejando áreas libres donde la GaOx puede mantener la actividad enzimática en experimentos posteriores.

En las zonas donde se mantiene la GaOx sin nuclear, la rugosidad aumenta ligeramente, (Antes: $R_q = 6,147 nm$ || $R_a = 4,723 nm$; Después: $R_q = 7,296 nm$ || $R_a = 5,096 nm$), aunque tras 5 ciclos de voltametría no se observa la desorción de la enzima ni pérdida de la actividad enzimática.

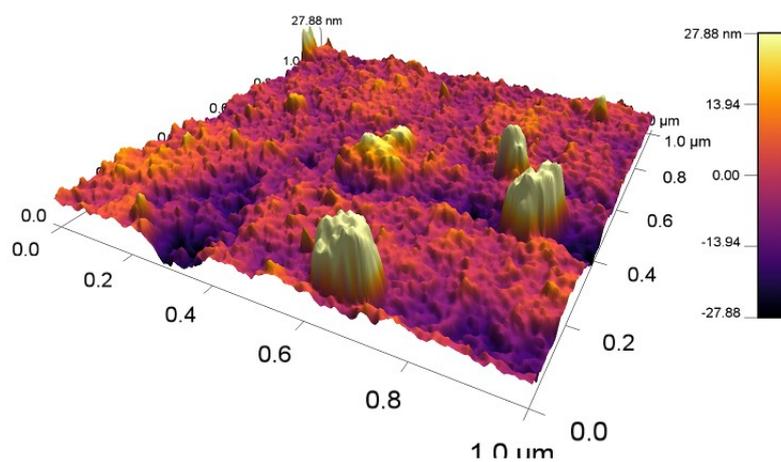


Figura 31: Imagen 3D tomada en AFM (Figura 30) de un sensor TC-FePc+AA+GaOx, después de 5 ciclos de voltametría cíclica en buffer fosfato salino con galactosa $10^{-4} M$. Ampliación de $1 \mu m \times 1 \mu m$.

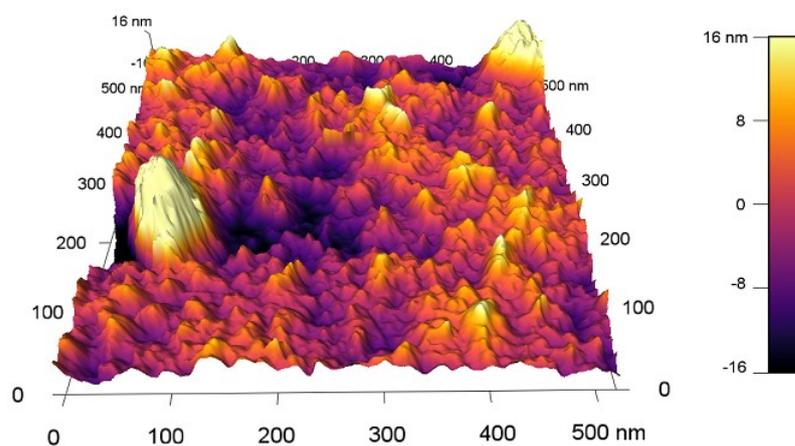


Figura 32: Imagen 3D tomada en AFM (Figura 29 (derecha)) de un sensor TCFePc+AA+GaOx, después de 10 ciclos de voltametría cíclica. Ampliación de $500 nm \times 500 nm$.

Estudio de la resistencia de los electrodos a experimentos de voltametría más largos

Por último se estudió la superficie de los sensores modificados con una película de LB de 10 capas de TCFcPc+AA(1:1) con GaOx inmovilizada sobre la superficie tras 10 ciclos de voltametría, del doble de duración que los mostrados anteriormente, para ver la evolución de las estructuras nucleadas que aparecen en la superficie y la evolución de la GaOx.

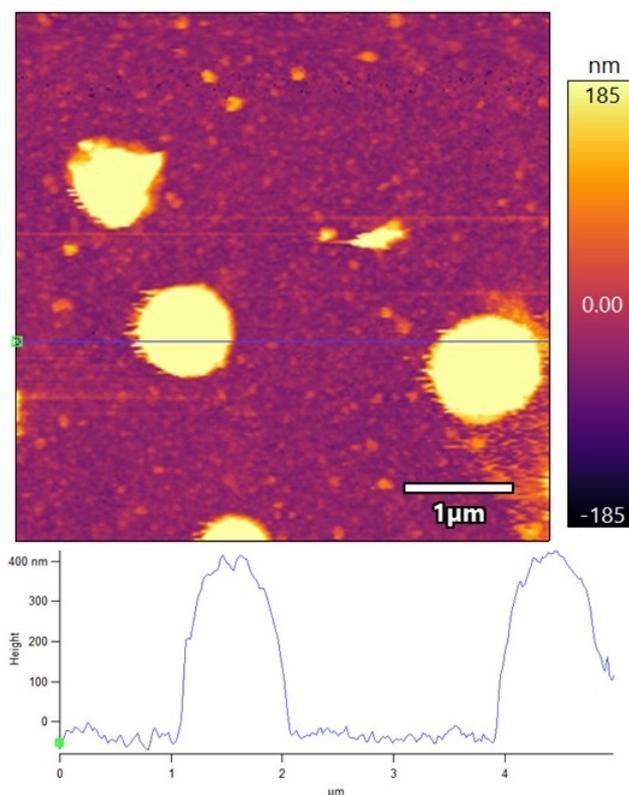


Figura 33: Superficie de un sensor TCFcPc+AA+GaOx, después de 10 ciclos de voltametría. $5 \mu m \times 5 \mu m$.

Como puede verse en la Figura 33, al alargar la voltametría hasta 10 ciclos, se produce un vigoroso crecimiento de las estructuras que se vieron anteriormente, teniendo un tamaño sobre la superficie de hasta 400 nm de altura y 1 μm de altura, como se aprecia en el perfil inferior de la imagen.

En la Figura 34 se muestra una de estas estructuras ampliada, el perfil inferior permite apreciar mejor la relevancia de este efecto de nucleación, que produce un drástico aumento de la rugosidad tras 10 ciclos de voltametría, pasando

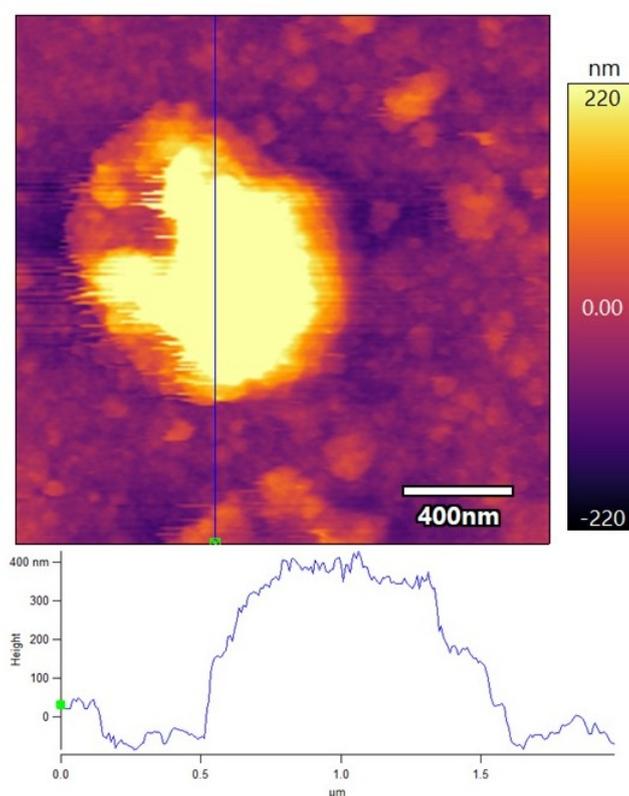


Figura 34: Superficie de un sensor TCFcPc+AA+GaOx, después de 10 ciclos de voltametría. Ampliación de $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$.

de los $R_q = 6,147\ \text{nm} \parallel R_a = 4,723\ \text{nm}$ antes de la voltametría, a $R_q = 150\ \text{nm} \parallel R_a = 124\ \text{nm}$, lo que supone un incremento en la rugosidad de un 2500 %.

Es destacable la diferencia en el ritmo de nucleación de las estructuras entre los 5 primeros ciclos con respecto a los 5 últimos ciclos de voltametría, que crecen hasta los $60\ \text{nm}$ de altura y $200\ \text{nm}$ de largo en el quinto ciclo, y llegan hasta los $400\ \text{nm}$ de altura y $1,1\ \mu\text{m}$ de largo al final del décimo ciclo, lo que supone un ritmo de crecimiento 6,7 veces mayor.

A pesar de la rápida nucleación al pasar del quinto ciclo, la GaOx se mantiene inmovilizada sobre la superficie del electrodo, manteniendo una rugosidad de $R_q = 7,412\ \text{nm} \parallel R_a = 5,206\ \text{nm}$ en las áreas libres de nucleación, de nuevo ligeramente superior a la del electrodo recién fabricado, lo que confirmaría la robusta inmovilización aportada por las TCFcPc junto a los vapores de glutaraldehído.

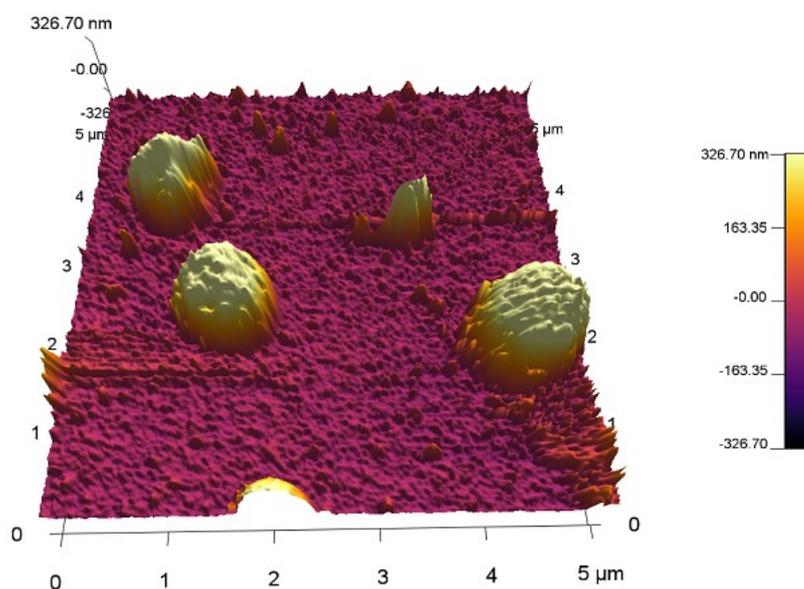


Figura 35: Imagen 3D tomada en AFM (Figura 33) de un sensor TC-FePc+AA+GaOx, después de 10 ciclos de voltametría. $5 \mu m \times 5 \mu m$.

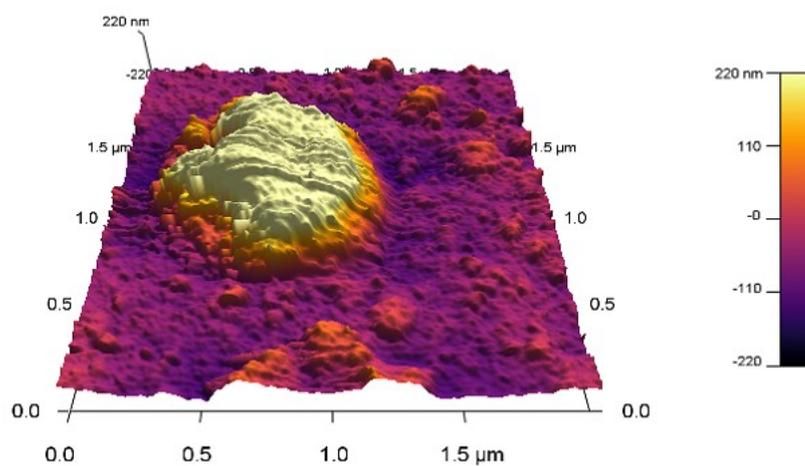


Figura 36: Imagen 3D tomada en AFM (Figura 34) de un sensor TC-FePc+AA+GaOx, después de 10 ciclos de voltametría. Ampliación de $2 \mu m \times 2 \mu m$.

Conclusiones

Del presente trabajo pueden sacarse las siguientes conclusiones:

- Se han desarrollado biosensores electroquímicos nanoestructurados reproducibles para la detección de galactosa basados en la modificación de electrodos con ftalocianinas metálicas sustituidas (TCFePc) con la técnica de Langmuir-Blodgett.
- Los biosensores fueron caracterizados, con los siguientes resultados:
 1. El empleo de espectroscopía UVVis y FTIR permitió comprobar la presencia de orden molecular en la superficie de los biosensores, mostrando las TCFePc una configuración vertical, con los anillos aromáticos alineados entre ellos.
 2. La caracterización estructural con AFM confirmó la formación de películas homogéneas de TCFePc+AA(1:1) sobre la superficie del sustrato. Tras la inmovilización de la GaOx, se observan estructuras de aspecto granuloso propio de las enzimas.
- En cuanto al comportamiento electroquímico:
 1. Los biosensores modificados con TCFePc+AA(1:1) muestran un efecto electrocatalítico hacia la galactosa, que puede ser atribuido al carácter electrocatalítico de las ftalocianinas.
 2. La presencia de ftalocianinas mejora la actividad enzimática y produce un aumento de la intensidad de la respuesta de los sensores hacia la galactosa en concentración 10^{-4} .
- Se ha puesto a punto una novedosa técnica que combina AFM con técnicas electroquímicas que permite estudiar la superficie de los sensores:
 1. Los electrodos modificados con las TCFePc mostraron buena resistencia estructural a la voltametría tras 5 ciclos de voltametría.
 2. Tras la inmovilización de la GaOx sobre la superficie de los sensores, aparecieron estructuras nucleadas sobre la superficie tras 5 ciclos de voltametría, que vieron su ritmo de nucleación drásticamente incrementado durante los 5 ciclos posteriores, dificultando la actividad enzimática a partir del décimo ciclo.

3. Se comprobó la eficiencia de la inmovilización de la GaOx sobre la superficie del electrodo modificado, resultando en una sólida inmovilización que se mantenía tras 10 ciclos de voltametría. Esta mejora puede atribuirse a las interacciones atractivas entre las TCFcPc y la GaOx.

Bibliografía

- [1] Colegio de Economistas de Valladolid, Informe OBSERVATORIO AGROALIMENTARIO DE CASTILLA Y LEÓN (2018)
- [2] EspañaDuero, Informe El Sector agrario de Castilla y León"(2018).
- [3] Safina, G., Ludwig, R., Gorton, L. . A simple and sensitive method for lactose detection based on direct electron transfer between immobilised cellobiose dehydrogenase and screen-printed carbon electrodes. *Electrochimica Acta*, 55(26), 7690–7695. (2010)
- [4] Khan, M., Rao, M., and Li, Q. Recent Advances in Electrochemical Sensors for Detecting Toxic Gases: NO₂, SO₂ and H₂S. *Sensors*, 19(4), 905. (2019)
- [5] Willner, M. R., and Vikesland, P. J. Nanomaterial enabled sensors for environmental contaminants. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1). (2018)
- [6] Li, Y., Soe, C. M. M., Wilson, J. J., Tuang, S. L., Apfel, U.-P., and Lippard, S. J. Triptycene-Based, Carboxylate-Bridged Biomimetic Dii-ron(II) Complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2013(12), 2011–2019 (2013)
- [7] Binder, W. H., Schunack, M., Herbst, F., and Pulamagatta, B. Biomimetic Principles in Macromolecular Science. *Bioinspiration and Biomimicry in Chemistry*, 323–366. (2012)
- [8] Rorem, E. S., Lewis, J. C. A test paper for the detection of galactose and certain galactose-containing sugars. *Analytical Biochemistry*, 3(3), 230–235. (1962)
- [9] C.A. Williams, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition), (2003)
- [10] Vorburger, T. V., Dagata, J. A., Wilkening, G., Lizuka, K., Thwaite, E. G., Lonardo, P. Industrial Uses of STM and AFM * *Contribution of the National Institute of Standards and Technology. Not subject to copyright except for illustrations taken from other sources. *CIRP Annals*, 46(2), 597–620. (1997)
- [11] Inkson, B. J. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. *Materials Cha-*

-
- racterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods, 17–43. (2016)
- [12] Physics in the nanoworld. *Nature Nanotech* 3, 443. (2008)
- [13] E. Nakamura, H. Isoobe Functionalized Fullerenes in Water. *The First 10 Years of Their Chemistry, Biology, and Nanoscience*, *Acc. Chem. Res.* 2003, 36, 11, 807-815. (2003)
- [14] Thamwattana N., Hill J. M. Mathematical modelling in nanotechnology. *Proceedings of the International Conference in Mathematics and Applications ICMA-MU 2005* (pp. 1-17). (2005)
- [15] Saini, Rajiv; Saini, Santosh; Sharma, Sugandha "Nanotechnology: The Future Medicine". *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery.* 3 (1): 32–33. (2010)
- [16] Ortí E. and Brédas J. L., Electronic structure of metalfree phthalocyanine: A valence effective Hamiltonian theoretical study, *J. Chem. Phys.*, 1988, 89, 1009. (1998)
- [17] Milojevic, S. Multidisciplinary cognitive content of nanoscience and nanotechnology. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(1). (2012)
- [18] R.J. Hansman, Jr., Characteristics of instrumentation, in: J.G. Webster (ed.). *Controlled oscillators and their applicability to sensors*, in: L. Ristic (Ed.), *Sensors Technology and Devices*, Chapter 13, Artech House, Norwood (MA). (1994)
- [19] Xu, Y., and Lin, Q. Photodetectors based on solution-processable semiconductors: Recent advances and perspectives. *Applied Physics Reviews*, 7(1), 011315. (2020)
- [20] R. A. Yotter and D. M. Wilson, .^A review of photodetectors for sensing light-emitting reporters in biological systems, in *IEEE Sensors Journal*, vol. 3, no. 3, pp. 288-303 (2003)
- [21] Jansen-van Vuuren, R. D., Armin, A., Pandey, A. K., Burn, P. L., and Meredith, P. Organic Photodiodes: The Future of Full Color Detection and Image Sensing. *Advanced Materials*, 28(24), 4766-4802. (2016)
- [22] Kuo, J. T. W., Yu, L., and Meng, E. Micromachined Thermal Flow Sensors-A Review. *Micromachines*, 3(3), 550–573. (2012)
- [23] Foster LE. *Medical Nanotechnology: Science, Innovation, and Opportunity*. Upper Saddle River: Pearson Education. (2006)

-
- [24] Ngo C., Van de Voorde M.H. Nanotechnology for Defense and Security. In: Nanotechnology in a Nutshell. Atlantis Press, Paris (2014)
- [25] Abdel-Karim, R., Reda, Y., and Abdel-Fattah, A. Review—Nanostructured Materials-Based Nanosensors. *Journal of The Electrochemical Society*, 167(3), 037554. (2020)
- [26] Tonezzer, M., Le, D. T. T., Iannotta, S., and Van Hieu, N. Selective discrimination of hazardous gases using one single metal oxide resistive sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. (2018)
- [27] Indira T. K. Magnetic Nanoparticles – A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, Vol 3 No 3 (2010)
- [28] Slimani, Y., and Hannachi, E. Magnetic nanosensors and their potential applications. *Nanosensors for Smart Cities*, 143-155. (2020)
- [29] Adem, S., Jain, S., Sveiven, M., Zhou, X., O'Donoghue, A. J., and Hall, D. A. Giant magnetoresistive biosensors for real-time quantitative detection of protease activity. *Scientific Reports*, 10(1). (2020)
- [30] B. R. Eggins, *Chemical Sensors and Biosensors*. (2002)
- [31] Peter Gründell, *Chemical Sensors: An Introduction for Scientists and Engineers*. (2007)
- [32] Expanding the Vision of Sensor Materials CHAPTER 6: CHEMICAL SENSORS. (1995)
- [33] Chapter 6 Sensitivity and limit of detection. *Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures*, 143–156. (1978)
- [34] K. Prasad, R. K. Ranjan, Zubala Lutfi, H. Pandey, *Biosensors : Applications and Overview in Industrial Automation*, *International Journal on Applied Bioengineering*, Vol.3, No.1 (2009)
- [35] Raz. Jelinek and S. Kolusheva, *Carbohydrate Biosensors*, *Chem. Rev.* 2004, 104, 5987-6015. (2004)
- [36] Garcia-Hernandez, C., Garcia-Cabezón, C., Martín-Pedrosa, F., and Rodríguez-Mendez, M. L. (2019). Analysis of Musts and Wines by means of a Bio-electronic tongue based on Tyrosinase and Glucose oxidase using Polypyrrole/gold nanoparticles as the electron mediator. *Food Chemistry* 289, 751-756. (2019)

-
- [37] Leontidis, E. Langmuir-Blodgett Films: Sensor and Biomedical Applications and Comparisons with the Layer-by-Layer Method. *Surface Treatments for Biological, Chemical, and Physical Applications*, 181–208. (2016)
- [38] Cabaj, J., Sołoducho, J., and Nowakowska-Oleksy, A. Langmuir-Blodgett film based biosensor for estimation of phenol derivatives. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 143(2), 508–515. (2010)
- [39] Sharma, S. K., Singhal, R., Malhotra, B. D., Sehgal, N., and Kumar, A. Lactose biosensor based on Langmuir-Blodgett films of poly(3-hexyl thiophene). *Biosensors and Bioelectronics*, 20(3), 651–657. (2004)
- [40] Araujo, F. T., Péres, L. O., and Caseli, L. Conjugated polymers blended with lipids and galactosidase as Langmuir-Blodgett films to control the biosensing properties of nanostructured surfaces. *Langmuir*. (2019)
- [41] Wang, K.H., Syu, M.J., Chang, C.H., and Lee, Y.L. Immobilization of glucose oxidase by Langmuir-Blodgett technique for fabrication of glucose biosensors: Headgroup effects of template monolayers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 164(1), 29-36. (2012)
- [42] Ohnuki, H., Saiki, T., Kusakari, A., Endo, H., Ichihara, M., and Izumi, M. Incorporation of Glucose Oxidase into Langmuir-Blodgett Films Based on Prussian Blue Applied to Amperometric Glucose Biosensor. *Langmuir*, 23(8), 4675-4681. (2007)
- [43] Sharma, S. K., Singhal, R., Malhotra, B. D., Sehgal, N., and Kumar, A. Langmuir-Blodgett film based biosensor for estimation of galactose in milk. *Electrochimica Acta*, 49(15), 2479-2485. (2004)
- [44] Sharma S. K. , R. Singhal, B.D. Malhotra, N. Sehgal and A. Kumar, Biosensor based on Langmuir-Blodgett films of poly(3-hexyl thiophene) for detection of galactose in human blood. *Biotechnology Letters* volume 26, pages 645-647. (2004)
- [45] Regina Schuster-Wolff-Bühning, Ronnie Michel, Jörg Hinrichs. A new liquid chromatography method for the simultaneous and sensitive quantification of lactose and lactulose in milk. *Dairy Science and Technology*, EDP sciences/Springer, 91 (1), pp.27-37. (2011)
- [46] Tapie, N., Malhiac, C., Hucher, N., and Grisel, M. Determination of galactose and mannose residues in natural galactomannans using a fast and efficient high-performance liquid chromatography/UV detection. *Journal of Chromatography A*, 1181(1-2), 45–50. (2008)

-
- [47] Khun, K., Ibupoto, Z. H., Nur, O., and Willander, M. Development of Galactose Biosensor Based on Functionalized ZnO Nanorods with Galactose Oxidase. *Journal of Sensors*, 2012, 1-7. (**2012**)
- [48] Labban, N., Wayu, M., Steele, C., Munoz, T., Pollock, J., Case, W., and Leopold, M. First Generation Amperometric Biosensing of Galactose with Xerogel-Carbon Nanotube Layer-By-Layer Assemblies. *Nanomaterials*, 9(1), 42 (**2018**)
- [49] Dalkıran, B., Erden, P. E., and Kılıç, E. Electrochemical biosensing of galactose based on carbon materials: graphene versus multi-walled carbon nanotubes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(16), 4329–4339. (**2016**)
- [50] Kanyong, P., Krampa, F. D., Aniweh, Y., and Awandare, G. A. Polydopamine-functionalized graphene nanoplatelet smart conducting electrode for bio-sensing applications. *Arabian Journal of Chemistry*. (**2018**)
- [51] Wang, Y., Zhu, J., Zhu, R., Zhu, Z., Lai, Z., and Chen, Z. Chitosan/Prussian blue-based biosensors. *Measurement Science and Technology*, 14(6), 831–836. (**2003**)
- [52] Mendoza, S., Bustos, E., Manríquez, J., Godínez, L. A. Voltammetric Techniques. *Agricultural and Food Electroanalysis*, 21-48. (**2015**)
- [53] Cosnier, S., and Innocent, C. Detection of Galactose and Lactose by a Poly(Amphiphilic Pyrrole)-Galactose Oxidase Electrode. *Analytical Letters*, 27(8), 1429–1442. (**1994**)
- [54] Atkins, P. and de Paula, J: "Physical Chemistry for the Life Sciences". (**2006**)
- [55] P.M. Biesheuvel, J.E. Dykstra The difference between Faradaic and Nonfaradaic processes in Electrochemistry, *Phys. Chem. Chem. Phys.* (**2018**)
- [56] Fleury, M.B. and LARGERON, M. *Techniques Electrochimiques D'Analyse*. (**1999**)
- [57] Scholz, F. *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*, Springer-Verlag, Berlin, p. 331. (**2002**)
- [58] Swalen, J.D., Allara, D.L., Andrade, J.D., Chandross, E.A., Garoff, S., Israelachvili, J., McCarthy, T.J., Murray, R., Pease, R.F., Rabolt, J.F.,

- Wynne, K.J., and Yu, H. Molecular monolayers and films. *Langmuir*, 3, 932–950. (1987)
- [59] Park, C. S., Colorado, R., Jamison, A. C., and Lee, T. R. Thiol-Based Self-Assembled Monolayers: Formation, Organization, and the Role of Adsorbate Structure. Reference Module in Materials Science and Materials Engineering. (2016)
- [60] Prashar, D. Self Assembled Monolayers -A Review. *International Journal of ChemTech Research*. 4. (2012)
- [61] Ferreira, M., Zucolotto, V., Oliveira, O. N. Jr. and Wohnrath, K. Encyclopedia of Nanoscience and nanotechnology 4, ed. Nalwa, H.S. (American Scientific Publishers, Los Angeles) pp. 441-460. (2003)
- [62] Peterson I. R. and Girlin I. R., Langmuir-Blodgett films, *Sci. Prog., Oxf.* 69, 533-550. (1985)
- [63] Zhou, Y., Cheng, M., Zhu, X., An, Q., and Shi, F. A facile method to prepare molecularly imprinted layer-by-layer nanostructured multilayers using postinfiltration and a subsequent photo-cross-linking strategy. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 5, 8308–8313. (2013)
- [64] Pavinatto F.J., Caseli L., Pavinatto A., dos Santos D.S., Nobre T.M., Zaniquelli M.E.D., ... de Oliveira O.N. Probing Chitosan and Phospholipid Interactions Using Langmuir and Langmuir-Blodgett Films as Cell Membrane Models. *Langmuir*, 23(14), 7666-7671. (2007)
- [65] Kaladhar, K., and Sharma, C. P. Supported Cell Mimetic Monolayers and Their Interaction with Blood. *Langmuir*, 20(25), 11115–11122. (2004)
- [66] Tim A., Kim F., Hess C., Goldberger J., He R., Sun Y., Xia Y., and Yang P., Langmuir-Blodgett Silver Nanowire Monolayers for Molecular Sensing Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Nano Lett.*, Vol. 3, No. 9. (2003)
- [67] Acharya, S., Panda, A. B., Belman, N., Efrima, S., and Golan, Y. A Semiconductor-Nanowire Assembly of Ultrahigh Junction Density by the Langmuir-Blodgett Technique. *Advanced Materials*, 18(2), 210-213. (2006)
- [68] Paul, S., Pearson, C., Molloy, A., Cousins, M. A., Green, M., Kolliopoulou, S., ... Petty, M. C. Langmuir-Blodgett Film Deposition of Metallic Nanoparticles and Their Application to Electronic Memory Structures. *Nano Letters*, 3(4), 533-536. (2003)

-
- [69] Lemineur, J.-F., and Ritcey, A. M. Controlled Growth of Gold Nanoparticles Preorganized in Langmuir-Blodgett Monolayers. *Langmuir*, 32(46), 12056-12066. (2016)
- [70] Monika P., Manjuladevi V. and Gupta R. K. Ultrathin films of functionalised single-walled carbon nanotubes: a potential bio-sensing platform, *Liquid Crystals*. (2020)
- [71] Nakanishi, T., Ariga, K., Morita, M., Kozai, H., Taniguchi, N., Murakami, H., ... Nakashima, N. Electrochemistry of fullerene C60 embedded in Langmuir-Blodgett films of artificial lipids on electrodes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 284-285, 607-612. (2006)
- [72] Peterson I. R. and Girlin I. R., *Langmuir-Blodgett films*, *Sci. Prog., Oxf.* 69, 533-550. (1985)
- [73] Butt, H.J.; Graf, K.; Kappl, M. *Physics and chemistry of interfaces* (2., rev. and enl. ed.). Weinheim: Wiley-VCH-Verl. p. 16. (2006)
- [74] Roberts, G. G., *Langmuir-Blodgett films*, *Contem. Phys.*, 25, 2, 109-128. (1994)
- [75] Sugi, M., Minari, N., Ikegami, K., Kuroda, S.-I., Saito, K., Saito, M. Vertical dipping method as a means of controlling the in-plane molecular orientation in Langmuir-Blodgett films. *Thin Solid Films*, 178(1-2), 157-164. (1989)
- [76] Ariga K., Yamauchi Y., Mori T., Hill J. P. What Can Be Done with the Langmuir-Blodgett Method? Recent Developments and its Critical Role in Materials Science, *Adv. Mater.* 25, 6477-6512. (2013)
- [77] Kausar A., Survey on Langmuir-Blodgett Films of Polymer and Polymeric Composite, 56, 9. (2017)
- [78] Breton M., Formation and Possible Applications of Polymeric Langmuir-Blodgett Films, A Review, *Journal of Macromolecular Science, Part C*, 21:1, 61-87. (1981)
- [79] Valli, L. Phthalocyanine-based Langmuir-Blodgett films as chemical sensors, *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 116, pp. 13-44. (2005)
- [80] Ortí E. and Brédas J. L., Electronic structure of metalfree phthalocyanine: A valence effective Hamiltonian theoretical study, *J. Chem. Phys.*, 89, 1009. (1989)

-
- [81] Leznoff C. C., Lever A.B.P., Phthalocyanines. Properties and Applications, VCH Publishers (LSK) Ltd., Cambridge, 1989, 1993, 1996, vols. 1-4. (1996)
- [82] N. Nemykina V., A. Lukyanets E., Synthesis of substituted phthalocyanines, Special Issue Reviews and Accounts ARKIVOC, 136-208. (2010)
- [83] Ortí E., Bredas J. L., Electronic structure of phthalocyanines: Theoretical investigation of the optical properties of phthalocyanine monomers, dimers, and crystals, J. Chem. Phys., Vol. 92, No.2, 15. (1990)
- [84] Laurs H., Heiland G., Electrical and Optical Properties of Phthalocyanine films, Thin Solid Films, 149, 129-142. (1987)
- [85] M. J. Cook, I. Chambrier en The Porphyrin Handbook (Ed. K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), R. Academic Press, San Diego vol. 17, pp. 37. (2003)
- [86] Ueno L, Jayme C. et al., Photophysics and spectroscopic properties of zinc phthalocyanine revisited using quantum chemistry, J. Braz. Chem. Soc., 23, 12. (2012)
- [87] Wright J.D., Phthalocyanines, Encyclopedia of Materials: Science and Technology, (2001)
- [88] F. Ghani, J. Kristen, H. Riegler, Solubility Properties of Unsubstituted Metal Phthalocyanines in Different Types of Solvents, J. Chem. Eng.Data, 57, 439-449. (2012)
- [89] Cynthia MA., Wesley M.S., Johan N E. Van L., Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer, Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, Vol. 05, No. 02, pp. 161-169. (2001)
- [90] J. Yamaki, J. Appl. Electrochem. 15, 441. (1985)
- [91] Rodríguez-Méndez M.L., Encyclopedia of Sensors 9, eds. Grimes, C. S., Dickey, E.C. and Pishko, M.V., Sensing properties of phthalocyanines, America Scientific Publishers, pp 111-134. (2006)
- [92] Pająk, A., Rybiński, P., Janowska, G., Kucharska-Jastrząbek, A., The thermal properties and the flammability of pigmented elastomeric materials. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 117(2), 789–798. (2014)
- [93] Furuyama, T., Satoh, K., Kushiya, T., and Kobayashi, N. Design, Synthesis, and Properties of Phthalocyanine Complexes with Main-Group

- Elements Showing Main Absorption and Fluorescence beyond 1000 nm. *Journal of the American Chemical Society*, 136(2), 765-776. (2013)
- [94] Ghani, F., Kristen, J., and Riegler, H. Solubility Properties of Unsubstituted Metal Phthalocyanines in Different Types of Solvents. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 57(2), 439-449. (2012)
- [95] García-Hernández, C., García-Cabezón, C., Martín-Pedrosa, F., De Saja, J. A., and Rodríguez-Méndez, M. L. Layered composites of PEDOT/PSS/nanoparticles and PEDOT/PSS/phthalocyanines as electron mediators for sensors and biosensors. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 7, 1948–1959. (2016)
- [96] Gonzalez-Anton, R., Osipova, M. M., Garcia-Hernandez, C., Dubinina, T. V., Tomilova, L. G., Garcia-Cabezón, C., and Rodriguez-Mendez, M. L. Subphthalocyanines as electron mediators in biosensors based on phenol oxidases: Application to the analysis of red wines. *Electrochimica Acta*, 255, 239–247. (2017)
- [97] Rodríguez-Méndez, M. L., Medina-Plaza, C., ..., de Saja, J. A. Improvement of electrocatalytic effect in voltammetric sensors based on phthalocyanines. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 413-420. (2016)
- [98] Medina-Plaza, C., Furini, L. N., Constantino, C. J. L., de Saja, J. A., and Rodriguez-Mendez, M. L. Synergistic electrocatalytic effect of nanostructured mixed films formed by functionalised gold nanoparticles and bisphthalocyanines. *Analytica Chimica Acta*, 851, 95–102. (2014)
- [99] Ruiz-Carmuega, A. I., Garcia-Hernandez, C., Ortiz, J., Garcia-Cabezón, ..., Rodriguez-Mendez, M. L. Electrochemical Sensors Modified with Combinations of Sulfur Containing Phthalocyanines and Capped Gold Nanoparticles: A Study of the Influence of the Nature of the Interaction between Sensing Materials. *Nanomaterials*, 9(11), 1506. (2019)
- [100] Salvo-Comino, C., Garcia-Hernandez, C., Garcia-Cabezón, C., and Rodriguez-Mendez, M. L. Promoting laccase sensing activity for catechol detection using LBL assemblies of chitosan/ionic liquid/ phthalocyanine as immobilization surfaces. *Bioelectrochemistry*, 107407. (2019)
- [101] Fernandes, E. G. R., Brazaca, L. C., Rodríguez-Mendez, M. L., Saja, J. A. de, and Zucolotto, V. Immobilization of lutetium bisphthalocyanine in nanostructured biomimetic sensors using the LbL technique for phenol detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(12), 4715–4719. (2011)

-
- [102] Alessio, P., Martin, C. S., de Saja, J. A., and Rodriguez-Mendez, M. L. Mimetic biosensors composed by layer-by-layer films of phospholipid, phthalocyanine and silver nanoparticles to polyphenol detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 233, 654–666. (2016)
- [103] Whittaker JW. "Galactose oxidase". *Advances in Protein Chemistry*. 60: 1–49 (2002)
- [104] Khan, Shahid Khan, Sher Khan, Latif Khan, Aliya Farooq, Kalsoom Akhtar, Abdullah Asiri, Abdullah M.. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application in Functional Groups and Nanomaterials Characterization*. (2019)
- [105] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch. *Principles of Instrumental Analysis*, 6th ed. Belmont, CA. Thomson Higher Education. (2007)
- [106] D. C. Harris, M. D. Bertolucci. *Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy*. New York. Dover Publications, INC
- [107] Ahmed, F. A good example of the Franck-Condon principle. *Journal of Chemical Education*, 64(5), 427. (1987)
- [108] Ellis, A. M., Fehér, M., Wright, T. G. Transition probabilities. *Electronic and photoelectron spectroscopy: fundamentals and case studies*(pp. 51-64). Cambridge: Cambridge University Press. (2005)
- [109] Spilsbury Michael, Euceda Armando. Transformada Rápida de Fourier. *Revista de la Escuela de Física*. 4. 45-52. (2019)
- [110] Binng, G. and Quate, C.F. Atomic force microscope. *Appl. Phys. Lett.*, 56 (9), 930–933. (1986)
- [111] Marshall, G. W., Balooch, M., Gallagher, R. R., Gansky, S. A., and Marshall, S. J. Mechanical properties of the dentinoenamel junction: AFM studies of nanohardness, elastic modulus, and fracture. *Journal of Biomedical Materials Research*, 54(1), 87–95. (2000)
- [112] Avila, A., and Bhushan, B. Electrical Measurement Techniques in Atomic Force Microscopy. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 35(1), 38–51. (2010)
- [113] Nasrollahzadeh, M., Atarod, M., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., Issaabadi, Z. Plant-Mediated Green Synthesis of Nanostructures: Mechanisms, Characterization, and Applications. *An Introduction to Green Nanotechnology*, 199–322. (2019)

-
- [114] R N Jagtap, A H Ambre, Overview literature on atomic force microscopy (AFM): Basics and its important applications for polymer characterization, *Indian J. Eng. Mater. Sci.* 13, pp. 368-384. (2006)
- [115] Maraghechi, S., Hoefnagels, J.P.M., Peerlings, R.H.J. et al. Correction of Scanning Electron Microscope Imaging Artifacts in a Novel Digital Image Correlation Framework. *Exp Mech* 59, 489–516. (2019)
- [116] Gardner, C. E., and Macpherson, J. V. Peer Reviewed: Atomic Force Microscopy Probes Go Electrochemical. *Analytical Chemistry*, 74(21), 576 A-584 A. (2002)
- [117] Aleksandrova, E., Hiesgen, R., Eberhard, D., Friedrich, K. A., Kaz, T., and Roduner, E. Proton Conductivity Study of a Fuel Cell Membrane with Nanoscale Resolution. *ChemPhysChem*, 8(4), 519-522. (2007)
- [118] Yamaguchi, Y., Shiota, M., Nakayama, Y., Hirai, N., and Hara, S. Combined in situ EC-AFM and CV measurement study on lead electrode for lead–acid batteries. *Journal of Power Sources*, 93(1-2), 104–111. (2001)
- [119] Singh, P. R., Mahajan, S., Rajwade, S., and Contractor, A. Q. EC-AFM investigation of reversible volume changes with electrode potential in polyaniline. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 625(1), 16-26. (2009)
- [120] Wu, H., Feng, X., Kieviet, B. D., Zhang, K., Zandvliet, H. J. W., Canters, G. W., ... Vancso, G. J. Electrochemical atomic force microscopy reveals potential stimulated height changes of redox responsive Cu-azurin on gold. *European Polymer Journal*, 83, 529–537. (2016)
- [121] Reggente, M., Passeri, D., Rossi, M., Tamburri, E., and Terranova, M. L. Electrochemical atomic force microscopy: In situ monitoring of electrochemical processes. (2017)
- [122] Shi, Y., Collins, L., Balke, N., Liaw, P. K., and Yang, B. In-situ electrochemical-AFM study of localized corrosion of Al x CoCrFeNi high-entropy alloys in chloride solution. *Applied Surface Science*, 439, 533-544. (2018)
- [123] Huang, S., Cheong, L.-Z., Wang, S., Wang, D., and Shen, C. In-situ study of surface structure evolution of silicon anodes by electrochemical atomic force microscopy. *Applied Surface Science*, 452, 67-74.
- [124] Hirai, N., Kubo, S., and Magara, K. Combined cyclic voltammetry and in situ electrochemical atomic force microscopy on lead electrode in

sulfuric acid solution with or without lignosulfonate. *Journal of Power Sources*, 191(1), 97–102. (**2009**)

- [125] Krichevsky, D. M., Zasedatelev, A. V., Tolbin, A. Y., Luchkin, S. Y., Karpo, A. B., Krasovskii, V. I., and Tomilova, L. G. (2017). Highly transparent low-symmetry zinc phthalocyanine-based monolayers for NO₂ gas detection. *Thin Solid Films*, 642, 295-302. (**2018**)

Sección A

Manual de usuario: EC-AFM

A continuación y como complemento a este trabajo se incluye el manual de usuario para hacer experimentos electroquímicos en el equipo de AFM, además de una descripción detallada del proceso de toma de imágenes en líquido, explicando las principales diferencias con el uso de AFM en aire.

Este manual funciona como un documento independiente del trabajo de fin de Master, con el fin de describir el procedimiento y el significado de los parámetros que deben manejarse para comprender la técnica. Al tratarse de un equipo sofisticado y no de un equipo rutinario de laboratorio, cualquier usuario del equipo necesitará unos conocimientos previos que se detallan en el manual.

Manual de usuario: Electroquímica in situ con
Microscopía de Fuerza Atómica en entorno
Líquido

9 de septiembre de 2020

Índice

A. Anexo A - Imágenes en Líquido	2
A.1. Preparación de la muestra	3
A.2. Montaje de la punta	6
A.3. Toma de imágenes de AFM en entorno líquido	9
A.3.1. Localizar la punta	9
A.3.2. Sintonizar la punta	15
A.3.3. Localizar la muestra	19
A.3.4. Acercando la punta a la muestra	20
A.3.5. Escaneo de la superficie y toma de imágenes	24
B. Anexo B - Electroquímica	27
B.1. Estructura de la celda	27
B.2. Conexiones	27

Prefacio

Sirva este documento como *Manual de Usuario* para la utilización y aplicación de la técnica Electroquímica in situ con Microscopía de Fuerza Atómica “EC-AFM”. En este manual se describirá el procedimiento para la correcta utilización de los equipos, errores comunes cometidos por el usuario durante la toma de imágenes de AFM en entorno líquido o el proceso de experimentos electroquímicos, así como los materiales necesarios y su correcta implementación y uso en el procedimiento.

Son necesarios unos conocimientos básicos de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) antes del uso del equipo para EC-AFM. Pueden consultarse los manuales disponibles en el equipo de AFM:

- ARApplicationsGuide.pdf (¿Qué puede hacerse con AFM?)
- ARCypherUserGuide.pdf (¿Cómo se usa el AFM?)
- ARSoftwareUserGuide.pdf (¿Cómo se utiliza el software del AFM?)

Nota: Para la toma de imágenes de AFM en entorno líquido, el usuario debe haber obtenido imágenes de AFM en aire previamente. Aunque el procedimiento es fundamentalmente el mismo, existen diferencias importantes que complican la toma de imágenes en entorno líquido respecto a aire.

A. Microscopía de Fuerza Atómica en entorno líquido

Antes de comenzar con el uso del aparato, siga las siguientes recomendaciones previas:

1. Asegúrese de contar con todos los materiales necesarios para el uso del equipo antes de comenzar, estos incluyen herramientas (destornilladores, pipetas, cortavidrios...), material interno del equipo (puntas, portamuestras, electrodos) y material propio del experimento a realizar (muestras, disoluciones...).
2. Algunos de los elementos que han de manejarse son extremadamente frágiles frente a golpes o tensión provocada por el usuario. Asegúrese de manejarlos siempre encima de la mesa sobre la que se encuentra el equipo, no suspenderlos ni manipularlos en el aire durante su uso y en lo posible, trabaje siempre con guantes para evitar la contaminación de la muestra o los materiales (puntas, electrodos...).
3. Preste especial atención durante el proceso de acercamiento de la punta a la superficie. Durante la toma de imágenes en líquido no puede apreciarse la altura relativa de la punta y la muestra, por lo que el acercamiento debe hacerse siempre con el objetivo óptico. Estrellar la punta contra la muestra conlleva la destrucción de la punta, pero también puede provocar graves daños al portamuestras, el holder de la punta y el equipo.
4. Mantenga el láser rojo apagado mientras esté la puerta del equipo de AFM abierta para evitar que radiación residual reflejada pueda incidir sobre los ojos o una exposición prolongada a la radiación láser.

A.1. Preparación de la muestra

Para la toma de imágenes en entorno líquido, la principal diferencia con la toma de imágenes en aire es la necesidad de una celda que contenga la muestra y la disolución. Para ello se emplea la EC-Cell (Asylum) (Figura 1), cuyos componentes son:

- Disco metálico de soporte
- 4 tornillos
- EC-Cell Cup
- O-Ring
- Conexión para el electrodo de trabajo con un extremo de cobre y un extremo magnético

Montaje de la muestra en la celda:

1. Coloque la muestra sobre el disco metálico. Asegúrese de que la totalidad de la muestra se encuentra dentro del área del disco y que no se superpone sobre ninguno de los cuatro orificios para los tornillos. Si es necesario, corte la muestra para reducir su tamaño. La cara de la muestra a examinar debe estar mirando hacia arriba, no enfrentada al disco metálico.
2. Coloque el O-Ring (disco circular de goma) sobre la superficie de la muestra de forma que los centros del O-Ring y el disco metálico queden concéntricos. La función del O-Ring es evitar que se derrame la disolución al verterla sobre la celda, de modo que no debe sobresalir por ninguna zona de la muestra.
3. Introduzca el contacto para el electrodo de trabajo entre el O-Ring y la muestra de forma que el rectángulo de cobre esté en contacto con la superficie de la muestra (que se supone conductora) y quede fijado por el O-Ring.
4. Superponga la EC-Cell Cup (parte superior de la celda) sobre el O-Ring. La EC-Cell Cup dispone de un raíl circular en la base en el que encaja el O-Ring, de forma que ambos coincidan. Presione firmemente el ensamblado para asegurarse de que todas sus partes están fijas.
5. Atornille con ayuda de unas pinzas (se recomiendan las de punta redonda, que facilitan la manipulación de los tornillos) la EC-Cell Cup al disco metálico. Los tornillos inmovilizarán el ensamblado de forma

que los elementos de la celda queden fijos. Se recomienda mantener la presión sobre la EC-Cell Cup durante todo el proceso de atornillado, para evitar que se desensamblen las piezas.

Después de fijarse los cuatro tornillos, compruebe que la conexión está fija tirando **suavemente** del contacto de cobre, para comprobar que el contacto sobre la superficie es correcto. Esto nos asegura que el O-Ring está dentro del raíl de la EC-Cell Cup, que la presión del O-Ring sobre la muestra es uniforme y que el ensamblado de la muestra es correcto. Si el contacto de cobre se mueve sobre la muestra, puede indicar que la presión de los tornillos no es suficiente (deberán apretarse), o que el O-Ring no está centrado en el raíl, para lo que debe desatornillarse y repetirse el ensamblado. El proceso de montaje de la muestra requiere experiencia, por lo que se recomienda dedicar unos minutos las primeras veces para asegurarse de que el montaje es correcto.

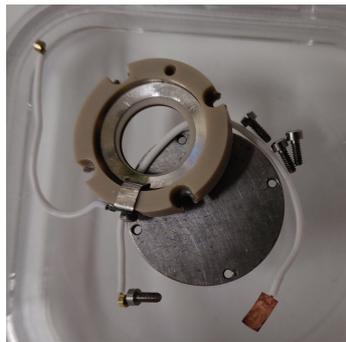


Figura 1: EC-Cell desmontada



Figura 2: Vista lateral de la celda EC-Cell montada correctamente. Nótese que no se observa el O-Ring porque está dentro del raíl de la EC-Cup

Las Figuras 2 y 3 muestran un correcto montaje de la muestra en la EC-Cell.

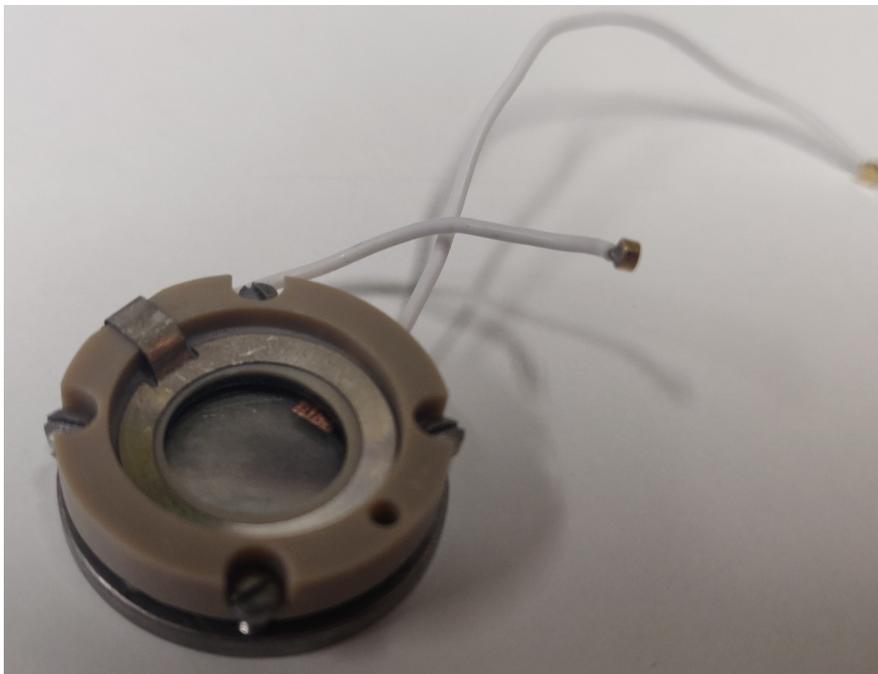


Figura 3: Vista superior de la celda EC-Cell montada correctamente. Nótese que no se observa el O-Ring porque está dentro del raíl de la EC-Cup

A.2. Montaje de la punta

Tras la preparación de la muestra en la celda, debe montarse la punta sobre el Electrochemistry Holder. La diferencia del EC Holder respecto al Holder habitual en seco, es que la inmovilización de la punta en el holder se hace con un clip y no atornillándola a un chip metálico. La Figura 4 muestra el Electrochemistry Holder.

Para inmovilizar el cantilever en el holder, debe colocarse el clip de forma que la tira superior del clip quede superpuesta a la muesca lateral del soporte de cristal. La muesca puede apreciarse por ser una zona rugosa en el extremo del cilindro de vidrio que soporta el cantilever, y sobre la que se apoyará el cantilever para que la punta pueda oscilar correctamente.

En la Figura 5 se muestra un cantilever inmovilizado en el EC Holder, donde puede apreciarse cuánto debe introducirse la punta dentro del clip. Este aspecto es importante porque un cantilever demasiado dentro o demasiado fuera del clip imposibilita encontrar el cantilever con el objetivo óptico por estar fuera del plano focal. Para que puedan obtenerse imágenes en líquido, el chip del cantilever debe estar apoyado sobre la muesca, y no tumbado sobre el soporte de cristal, sino con la base del cantilever apoyado sobre la muesca y el resto del cantilever inclinado y suspendido en el aire.

Deben atenderse dos aspectos durante el proceso de montaje de la punta:

Primero, el clip es de un material muy frágil, por lo que debe ponerse especial cuidado al apretar el clip sobre el vidrio. **Nunca presionar directamente sobre la tira superior.** Siempre que se quiera presionar sobre el clip para introducirlo en el cilindro de cristal, debe hacerse sobre los bordes del anillo del clip, y siempre de forma simétrica, presionando de igual forma sobre ambos lados, pues hundir más un lado que el otro puede dañar el clip. Para comprobar si el clip está sujetando firmemente el cantilever, puede comprobarse directamente agarrando con las pinzas la base del cantilever e intentando moverlo. Si se da la vuelta al holder con la punta incorrectamente sujeta, puede caerse el chip del cantilever con los consecuentes daños que esto puede suponer sobre la punta.

Segundo, es importante que el clip esté bien orientado respecto al cilindro de vidrio sobre el que reposa la punta, de forma que la tira superior del clip esté superpuesta con la muesca. Este aspecto es importante para los experimentos electroquímicos, pues el orificio en el cristal del holder es por donde entrará el electrodo de referencia en la celda, y colocar torcido el clip supondrá que no pueda utilizarse, además de los posibles daños que puede

provocar un montaje incorrecto sobre el clip o el electrodo. En la Figura 5 puede apreciarse el orificio, la tira superior, y la superficie rugosa de la muestra sobre la que descansa el chip del cantilever.

Nota: Para desmontar el cantilever, nunca agarrar con las pinzas directamente el clip. Las puntas de la pinza pueden introducirse por debajo del clip para levantarlo, sin necesidad de agarrarlo.

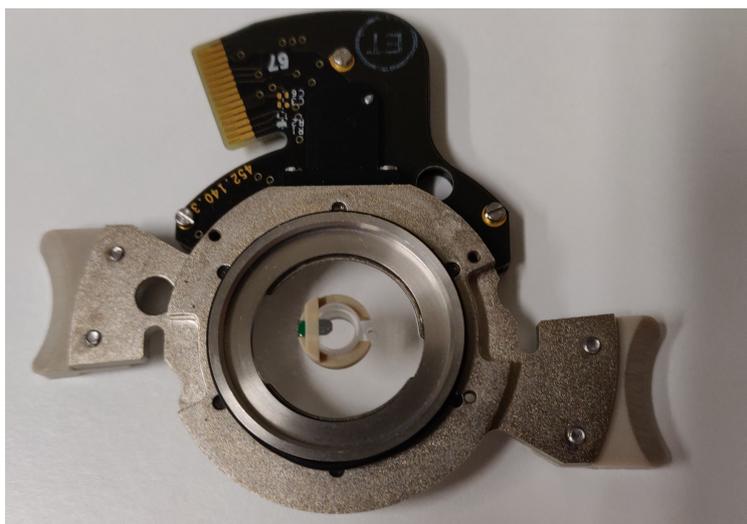


Figura 4: Electrochemistry Holder con la punta montada.

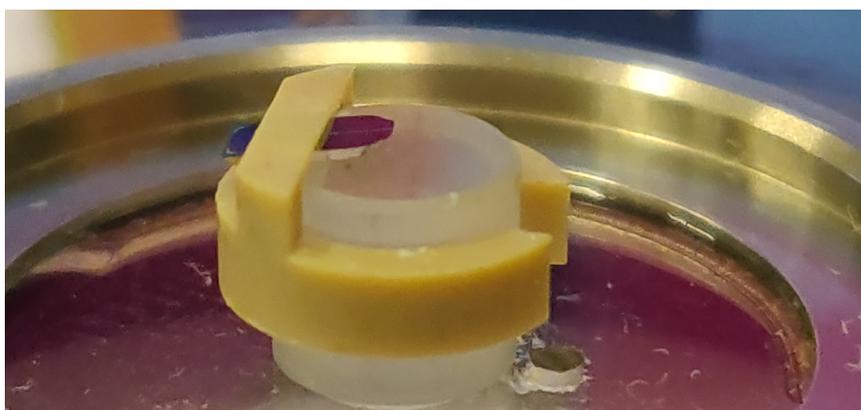


Figura 5: Vista ampliada del Electrochemistry Holder con la punta montada.

Tras la preparación de la muestra y la punta, pueden llevarse al equipo para comenzar con el procedimiento. Primero deberá cargarse la muestra sobre la base magnética y, después, debe girarse el mando de control de altura de la punta hasta la máxima altura (con la punta descargada), para evitar estrellar la punta sobre la muestra al cargar la punta en el equipo. Tras introducir y centrar la muestra en la base magnética, debe vertirse la disolución en la celda, con un volumen de $200 \mu L$.

Por último colocar el Holder de la punta y atornillarla al equipo. Si se mira el Holder desde arriba, puede verse el cantilever a través del cilindro de vidrio. Es importante que pueda distinguirse claramente el cantilever, que deberá bajarse con el mando de control de altura hasta que quede sumergido en la disolución (es suficiente con ver el cantilever sumergirse en la disolución, y prestando atención a no bajar demasiado la punta pues no puede apreciarse la distancia real a la muestra). Si ya se tiene abierto el software y el panel del objetivo óptico, puede verse que la imagen se oscurece en el momento de sumergir la punta, no debe llevarse la punta más abajo de este punto por el momento.

Nota: Es importante utilizar un filtro de BruerDrive adecuado. Los diferentes cubos de atenuación pueden encontrarse en la parte interior de la puerta del sistema de AFM. Para líquido, se recomienda el atenuador $\times 0.30$. Utilizar un atenuador mayor ($\times 1.0$) hará que la punta se caliente demasiado, y con el recubrimiento de oro de algunas puntas puede dar lugar a reacciones electroquímicas que provoquen burbujas en la punta e impidan la correcta toma de imágenes.

A.3. Toma de imágenes de AFM en entorno líquido

Una vez se haya terminado con el setup inicial, puede abrirse el software *Igor Pro* para comenzar con la toma de imágenes. Una vez abierto el software, si es la primera vez que se abre tras el encendido del equipo, se llevará a cabo una calibración automática de los motores que puede llevar unos momentos antes de que pueda utilizarse el software. Una vez los motores estén calibrados se abrirá automáticamente el **Mode Master**, donde debe seleccionarse *AC Water Topography*. La pantalla se reorganizará y mostrará todos los elementos necesarios para este procedimiento.

Nota: Antes de comenzar, debe situarse el foco de imagen óptico (dentro del AFM) en la posición 2, para corregir el cambio de índice de refracción entre el líquido y el aire.

A.3.1. Localizar la punta

La punta debe encontrarse primero en el panel Video con ayuda del Engage Panel, que controla el movimiento y la posición del foco óptico y de los motores que regular la altura de la punta (Figura 6)

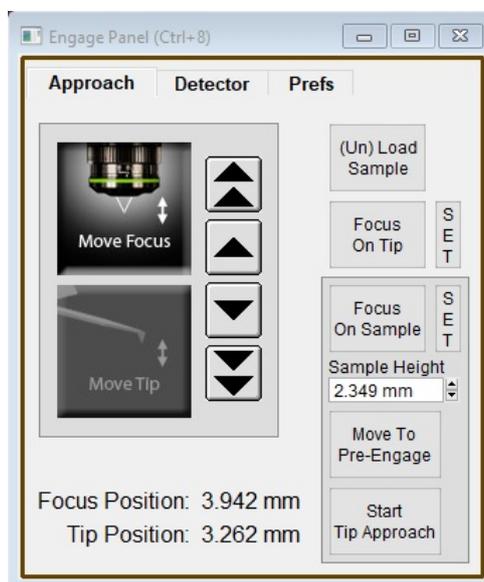


Figura 6: Engage Panel

Localizar directamente la punta sobre el extremo del cantilever puede ser complicado en líquido, especialmente para usuarios poco experimentados.

Por ello se recomienda localizar primero el cantilever (de un tamaño mucho mayor), y moverse por el extremo del cantilever hasta que se encuentre el borde bajo el que debe estar la punta. Después puede bajarse el foco para localizar la punta, que siempre estará por debajo del nivel del cantilever. Enfocar primero el cantilever además es recomendable porque una vez se ha encontrado, se debe enfocar el láser rojo al cantilever y observar un aumento del parámetro Sum en el Sum and Deflection meter, que nos indique que la reflexión de la luz del láser en el cantilever está incidiendo en el fotodetector. De no verse un aumento en la Sum, puede significar que el cantilever está demasiado fuera (o demasiado dentro) del clip, que la punta está tumbada sobre el soporte de cristal y no inclinada, o que el láser rojo está incidiendo en una burbuja de aire y no en el cantilever. En cualquiera de los casos, el problema se soluciona repitiendo el montaje del cantilever.

Nota: Si el láser rojo está apagado, ir a Options en el panel Video y seleccionar Enable Red Laser. El láser debe apagarse siempre al abrir la puerta del AFM, para evitar que haya radiación que incida sobre el usuario. Si el láser azul (BlueDrive) está apagado, puede encenderse desde la pestaña Tune en el Master Panel, en el menú Adv, cambiando el tipo de Tune Drive de Piezo a BlueDrive. (Figura 10)

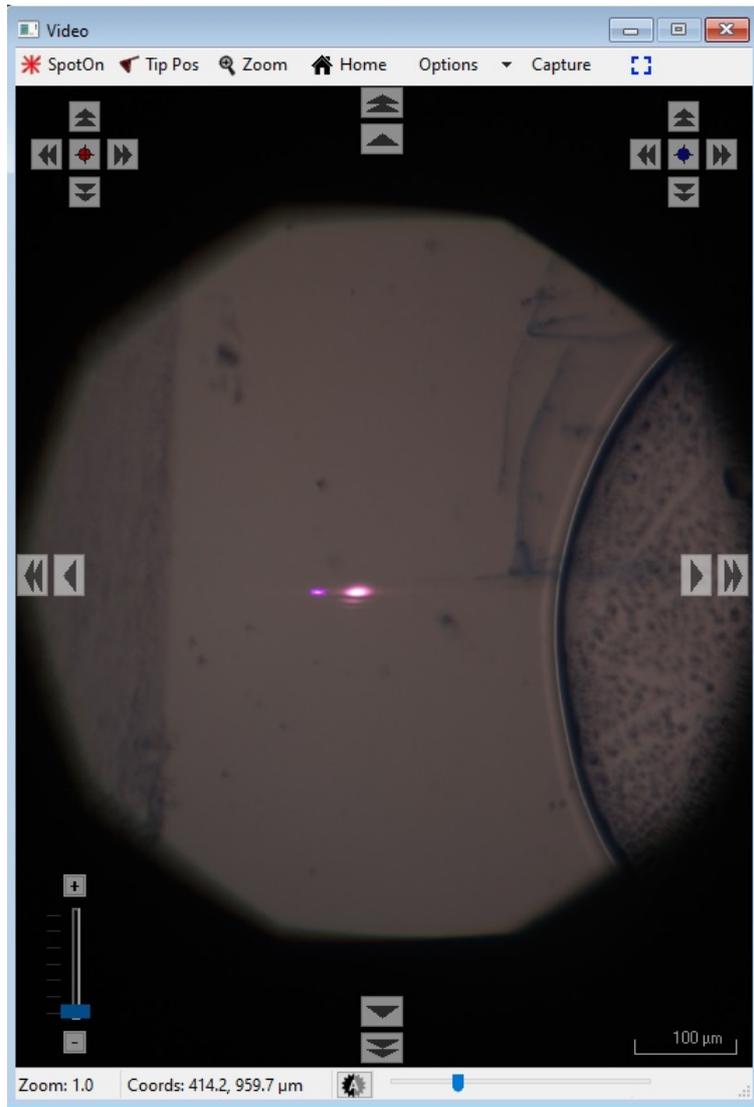


Figura 7: Láser rojo y Láser azul (BlueDrive) incidiendo sobre el cantilever. Puede verse una burbuja de aire que, de abarcar la punta, impediría la toma de imágenes.

Localizar la punta desde el cantilever es sencillo, deberá colocarse el foco sobre el borde derecho del cantilever y bajar el foco hasta encontrar la punta. Después, debe apuntarse el láser rojo a la punta, y el láser azul a la base de la punta, lo que hará que suban los parámetros Sum y Deflection en el Sum and Deflection Meter. Esto es indicativo de que la punta está oscilando (aunque no a la frecuencia correcta todavía), y que puede pasarse a sintonizar la punta. La Figura 9 muestra la correcta colocación de los láseres sobre la punta.

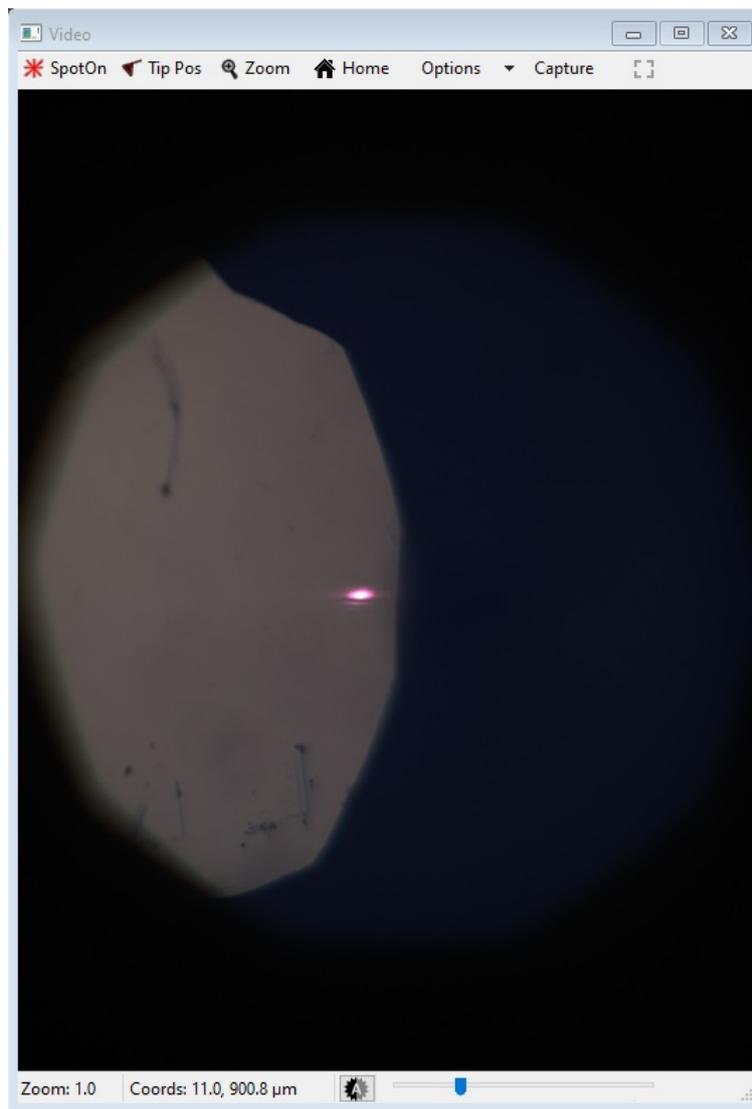


Figura 8: Láser rojo incidiendo sobre el cantilever. Para localizar la punta, deberá bajarse la altura del foco en este punto.

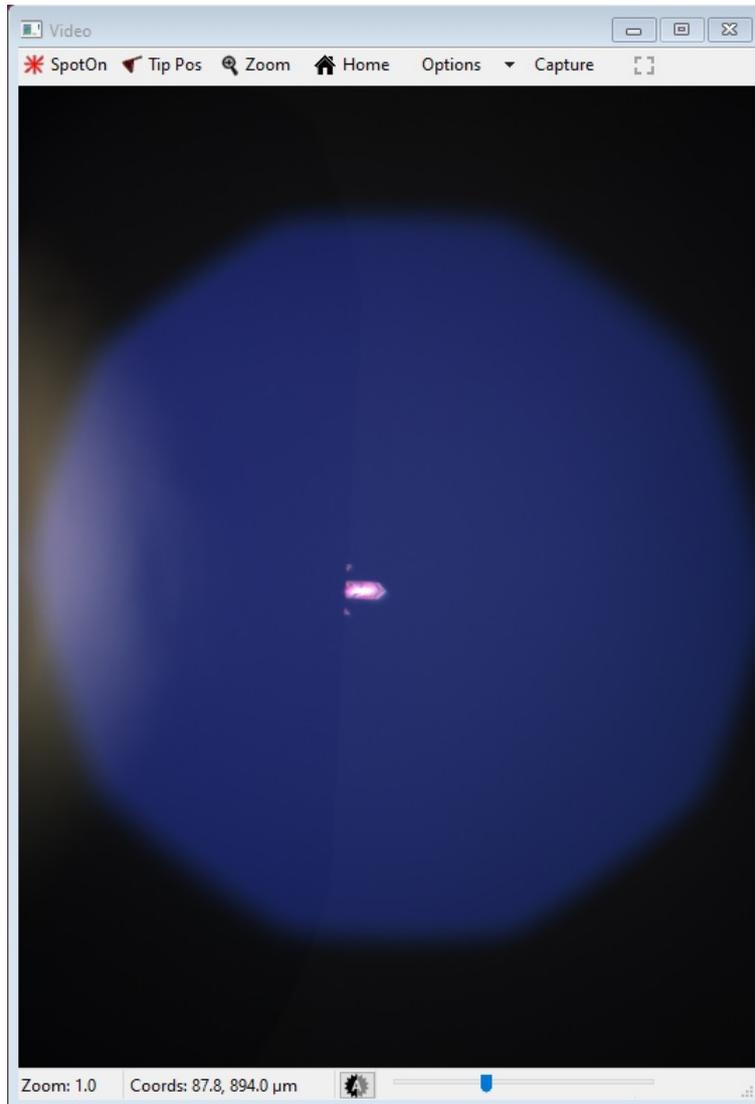


Figura 9: Láser rojo y láser azul (BlueDrive) incidiendo sobre la punta. Puede verse difuminado el borde del cantilever que se veía nítidamente en la Figura 8

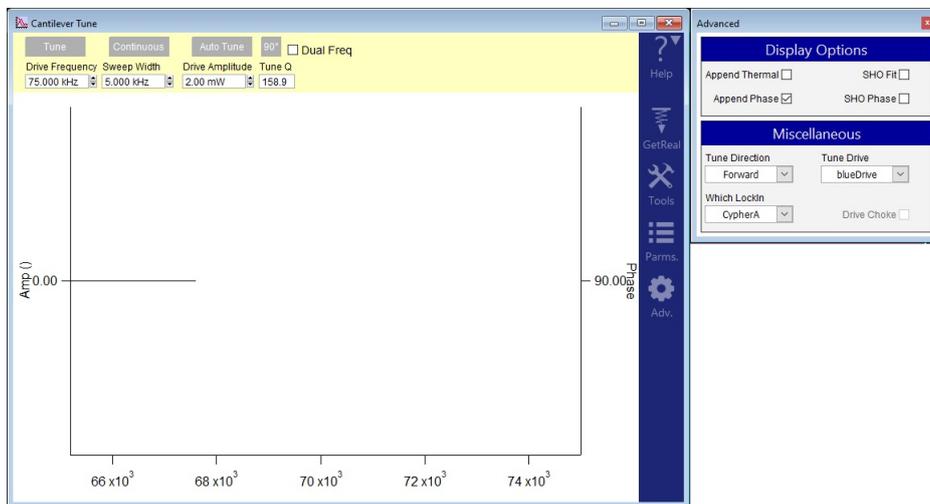


Figura 10: Menú Tune. En la pestaña Advanced puede encenderse el láser azul (BlueDrive) cambiando el Tune Drive de Piezo a bluedrive.

A.3.2. Sintonizar la punta

La técnica de tomar imágenes en entorno líquido con el modo AC Tapping se basa en hacer oscilar un actuador piezoeléctrico que transmita la vibración al cantilever a través del líquido. Esta transmisión se ve muy afectada por numerosos parámetros, como la densidad y el volumen de líquido, la dureza del cantilever y la frecuencia de oscilación. Esto hace que en muchos casos no sea posible seguir el procedimiento de *Auto Tune* que sí puede ser llevado a cabo en aire para llevar a la punta a una oscilación cercana a la frecuencia de resonancia.

En líquido la sintonización de la punta debe hacerse de forma manual. El procedimiento consiste en encontrar el pico de amplitud de oscilación registrando la resonancia térmica del cantilever. El pico de resonancia se elige respecto al espectro térmico, y será el pico más alto dentro o cerca del pico térmico. Como se ha mencionado, hay muchos factores que afectan a la sintonización de la punta, entre ellos la profundidad, por lo que es habitual que una vez hecho el tune, al acercar la punta a la muestra sea necesaria una resintonización, ya que el acople entre la punta y el entorno líquido es diferente a más profundidad, un efecto que no se observa en aire.

Para ello deben seguirse los siguientes pasos:

1. Abrir la pestaña *Thermal* en el Master Panel. Pulsar Ctrl+A, lo que cambia la escala del gráfico a todo el rango de frecuencias. Pulsar Capture. Cuando se hayan tomado en torno a 250 capturas y el espectro sea lo suficientemente fino, pulsar Stop.
2. Localizar el pico de resonancia térmica de la punta. Puede verse un ejemplo de un espectro registrado en la Figura 6. El espectro que se muestra en la Figura 12 fue tomado en aire, pero el procedimiento es el mismo en líquido, la única diferencia es que en líquido la frecuencia de resonancia es unas cinco veces menor, por lo que el pico de resonancia se mostraría en torno a 25 kHz.
3. Hacer click con el botón derecho en el punto más alto del pico y seleccionar *Zoom and Fit*. Esto hará un zoom a la región del pico y mostrará el ajuste del sistema.
4. Hacer click derecho en el punto más alto del pico y seleccionar *Set Drive Frequency*. Hacer click derecho de nuevo y seleccionar *Move Frequency and Phase to Tune*, lo que abrirá la pestaña de Tune del Master Panel y migrará los datos obtenidos en el Thermal para encontrar directamente

el pico de resonancia.

5. En la pestaña Tune, ha de verse un nuevo pico en una frecuencia cercana a la que estaba el pico de resonancia termal. Con el botón derecho de nuevo seleccionar *Set Drive Frequency* en el centro del pico y después centrar la fase con el botón 90° . El ajuste de Tune se muestra en la Figura 13, esta vez correspondiente a una sintonización en líquido.

La razón de mostrar un espectro en aire es prevenir un error común que se comete al sumergir la punta en el líquido. A menudo el usuario cree haber sumergido la punta, pero el desalojo de líquido que supone introducir el cilindro de vidrio del Holder en la celda hace que la punta quede en aire y no en líquido. Esto hace que al llevar a cabo el proceso de Tuning, se hace una sintonización en aire que deberá repetirse al acercarse la punta a la muestra, donde la punta estará ya sumergida. Obtener un espectro con la resonancia en torno a 100 kHz debe hacer pensar que la punta no está en realidad sumergida.

Respecto a la sintonización en la pestaña Tune, es habitual que en líquido se encuentre más ruido que en aire, por los efectos dispersivos que provoca el medio líquido en la oscilación de la punta.

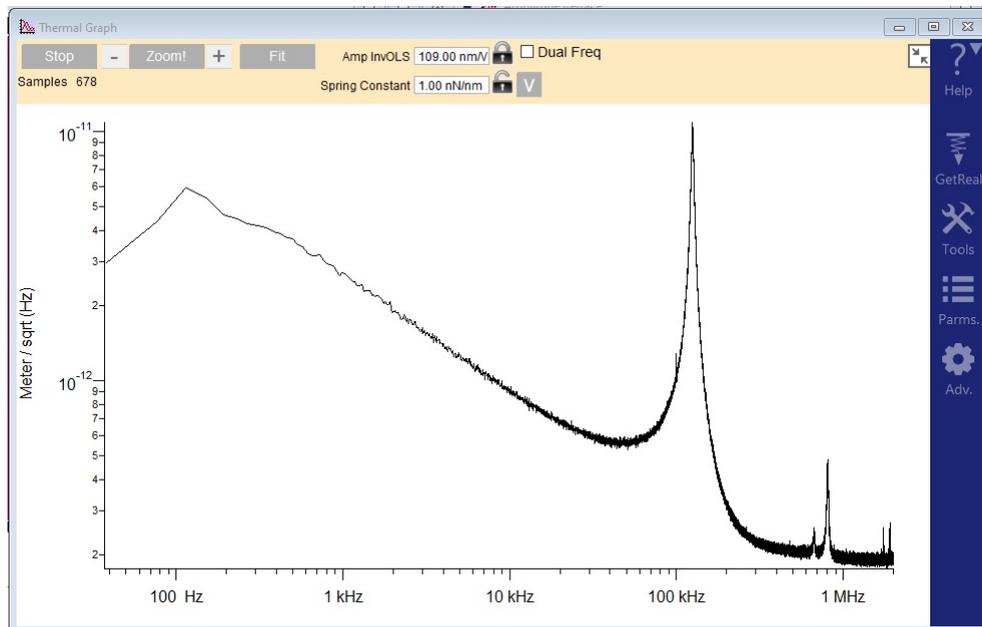


Figura 11: Thermal Peak: Espectro térmico, puede observarse el pico de resonancia de la punta en torno a 100 kHz.

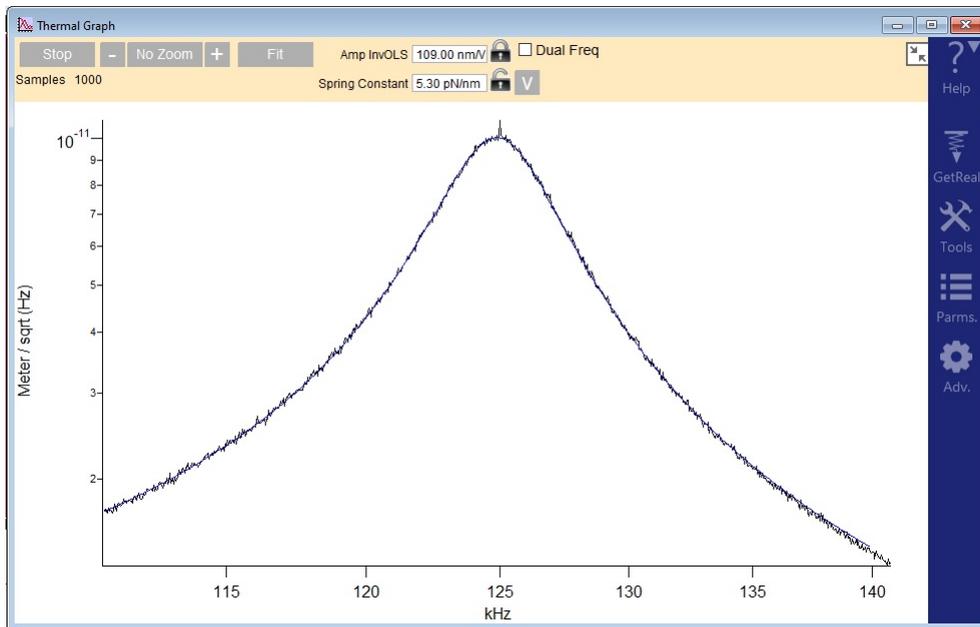


Figura 12: Thermal Peak: Pico de resonancia térmico ampliado y ajustado.

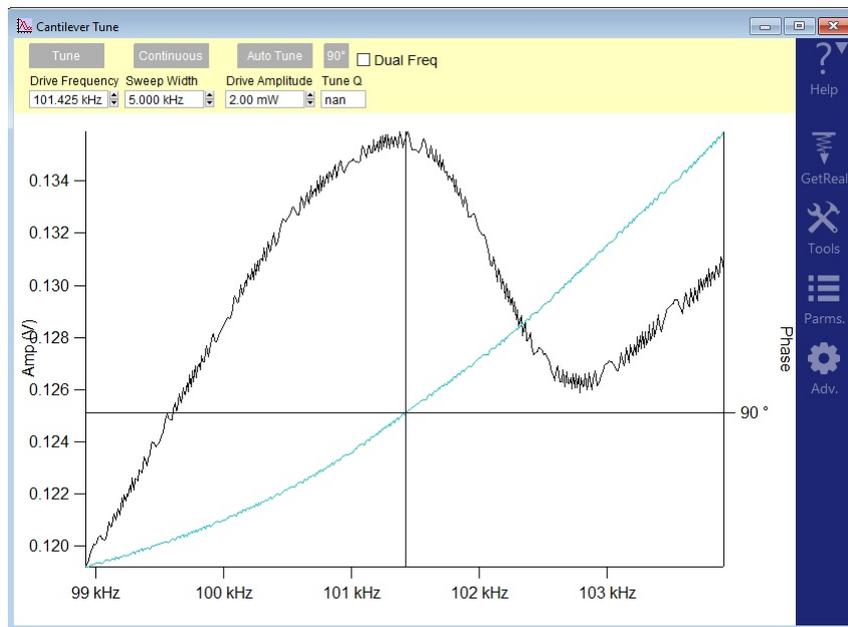


Figura 13: Menú de la pestaña Tune donde puede verse el pico de tuning con la fase centrada (línea azul) y la amplitud de oscilación.

En este punto debe comprobarse que el parámetro Phase en el Sum and

Deflection Meter esté centrada y estable en 90° . Si no fuera así, deberá volver a centrarse en el panel Tune.

En este punto, la amplitud en el Sum and Deflection Meter debe poder aumentarse y disminuirse variando la Drive Amplitude en el Master Panel. Para un Tune adecuado, se recomienda que después de apuntar los láseres a la punta y hacer el Thermal, se aumente la Amplitude hasta un valor entre 7 y 9, para que la curva del Tune sea lo más nítida posible.

A.3.3. Localizar la muestra

La principal dificultad añadida de la toma de imágenes en líquido respecto a la toma de imágenes en aire es la de localizar la muestra y acercar la punta a la muestra sin dañarla, porque no se tiene una visión desde el exterior del equipo, y debe hacerse todo el proceso con el panel Video desde el software de Igor Pro. En este manual se da por hecho que el usuario conoce qué aspecto tiene su muestra y cómo enfocar la muestra en aire.

Desde el momento en el que la punta ha sido sumergida en el líquido (la inmersión de la punta sí puede verse directamente desde arriba del Holder a través del cilindro de vidrio), deben seguirse los siguientes pasos desde el panel Video:

1. Localizar la punta.
2. Bajar el foco óptico hasta el límite.
3. Si al bajar el foco óptico ya se ha encontrado la superficie de la muestra, puede fijarse la posición del foco en la muestra y la punta y proceder a acercar la punta con *Move to Pre-Engage*.
4. Si al llegar el foco a su límite inferior no se ha encontrado aún la superficie de la muestra, debe bajarse la punta manualmente con la ruleta de control de altura (en el equipo de AFM, no desde el Igor) mientras se observa el panel Video. Al bajar la punta de esta manera (siempre bajar la punta lo más despacio posible), el foco baja solidariamente con la punta, y al encontrarse el foco muy por debajo de la punta (recordar que se encuentra en el límite inferior) se evita el riesgo de estrellar la punta contra la muestra.
5. Mientras se baja la punta, si se observa el panel Video puede verse cómo el foco baja también solidariamente con la punta. Durante este proceso debe prestarse atención al panel Video, que eventualmente acabará enfocando la superficie de la muestra. Si el sustrato de la muestra es transparente, es posible que llegue a observarse el disco metálico bajo la celda. Si esto llegase a ocurrir, inmediatamente dejar de bajar la punta, pues es posible que si sigue bajando se estrellé contra la muestra.
6. Una vez que se ha encontrado la superficie de la muestra, fijar la posición del foco con Set Focus y seguir con el proceso de acercamiento como habitualmente. Si se llega a enfocar el disco metálico (característico por ser una superficie metálica estriada), es intuitivo que la muestra siempre estará por encima del disco, así que la muestra podrá encontrarse

subiendo el foco óptico (no la punta).

Enfocar la superficie de la muestra en líquido puede ser complicado y requiere práctica, especialmente si el líquido de la celda no es agua ultrapura sino disolución acuosa, que puede contener agregados salinos (o también trazas de polvo del ambiente, elementos desprendidos de la superficie...) que a menudo pueden confundirse con la superficie. Para diferenciar estos elementos flotantes de la disolución de la muestra, puede moverse la punta en el plano XY (a derecha e izquierda, por ejemplo). Si los elementos que se cree que pertenecen a la superficie se mueven al lado contrario al que se ha desplazado la punta, entonces es claro que forman parte de la muestra. Si se mantienen en el mismo sitio, entonces significará que están flotando en la disolución, así que deben ignorarse y continuar con el enfoque de la muestra.

A.3.4. Acercando la punta a la muestra

Una vez se esté seguro de que la posición de la punta y la muestra son correctas, puede pulsarse *Move to Pre-Engage*. Esto hará que el software utilice la posición que se le ha dado de la punta y la muestra para acercar la punta hasta una distancia aún segura pero cercana a la muestra. Es recomendable asegurarse de que la posición de la muestra es la adecuada, pues haber enfocado otro elemento puede llevar a la destrucción de la punta si el elemento enfocado se encuentra en realidad por debajo de la superficie de la muestra.

Después de mover la punta a la posición de Pre-Engage, debe comprobarse que los parámetros de la punta son lo adecuados. En concreto, debe comprobarse que la Amplitud sigue pudiendo modularse con la Drive Amplitude, y que la Deflection sigue cercana a cero. Es habitual que la deflexión de la punta cambie al sumergir la punta en la disolución, y esto puede corregirse pulsando *Zero PD* en el Sum and Deflection meter, que devolverá al fotodetector a su posición centrada, y mostrará el valor de la Amplitude adecuado. Si al sumergir la punta estos ajustes se han desconfigurado, es posible que los láseres se hayan descentrado (es suficiente con recolocarlos sobre la punta), o que sea necesario un segundo proceso de Tune. Si los parámetros son adecuados, hay que terminar de acercar la punta a la muestra hasta que estos interaccionen, para lo que deben seguirse los siguientes pasos:

1. Fijar el parámetro Amplitude en torno 0.4 V. El valor óptimo de este parámetro en líquido (recordar que en aire se buscaba una amplitud de 1 V), es de entre 0.4 V y 0.5 V.
2. Adecuar el setpoint al valor de la amplitud. El Setpoint habitualmente

se fija en torno al 50 % del valor de la amplitud, así que en líquido puede fijarse en torno a 180 mV.

3. Hacer click en *Start Tip Approach*.

Esto iniciará un proceso en el que la punta se hace descender hacia la superficie por los motores, en el que se comprueba después de cada iteración si la punta ha empezado a interactuar con la superficie (momento en el que el setpoint se iguala con la amplitud). Una vez que el sistema reconoce la amplitud libre como igual al setpoint, el sistema para el descenso y se considera que la punta está lo suficientemente cerca de la superficie para interactuar y comenzar con la toma de imágenes.

Este proceso iterativo es muy eficiente en aire, pero en líquido, como es habitual, hay otros factores que afectan al rendimiento del proceso, y que pueden llevar a falsos acercamientos. La mayor fuente de errores en este caso es el efecto que tiene la presencia del líquido sobre la amplitud, que cambia debido al cambio en el pico de frecuencias al disminuir la profundidad y acercarse a la superficie. A medida que se baja la punta hacia la muestra, la cantidad de líquido entre la punta y la superficie es menor y esto puede cambiar el acoplamiento entre la señal del láser y la del cantilever, lo que excitará el cantilever a una frecuencia distinta a la que se ha sintonizado, perdiendo la resonancia. Esta es la razón de que a menudo sea necesario un segundo (o incluso tercer) Tune después de acercar la punta a la muestra.

Cuando el software considere que la punta y la muestra están lo suficientemente cerca y termine el proceso de Tip Approach, debe comprobarse que hay un acercamiento real y no se ha producido uno de los efectos descritos anteriormente. Para ello, hacer click en *Engage* en el Sum and Deflection meter. Debe observarse un decrecimiento de la amplitud, que comenzará a oscilar en valores cercanos al setpoint (si el setpoint se fijó en 180 mV, la amplitud oscilará entre 0.16 V y 0.20 V, por ejemplo). Además, el Z Voltage que describe la altura de la punta debe estar fijo, y al disminuir el setpoint debe observarse un cambio en el Z Voltage. Si al disminuir el setpoint no se observa un cambio en el Z Voltage, o el Z Voltage está en -10 V después de hacer click en Engage, probablemente se ha producido un falso acercamiento, y deberá repetirse el proceso.

Si después de varios intentos el sistema no ha conseguido hacer el acercamiento, puede hacerse de forma manual bajando la punta hacia la superficie, pero este proceso supone un riesgo muy grande de aplastar la punta contra la muestra.

Sobre la punta: Resulta útil monitorizar la señal de deflexión durante todo el procedimiento desde que se enfoca el láser sobre la punta hasta que se ha terminado de acercar la punta a la superficie, pues da información sobre cómo está yendo el proceso. En algunos casos la deflexión dará saltos, que indicarán que la punta está vibrando a una frecuencia diferente a la que se ha sintonizado. Puede corregirse haciendo click en *Zero PD*, y resintonizando el sistema.

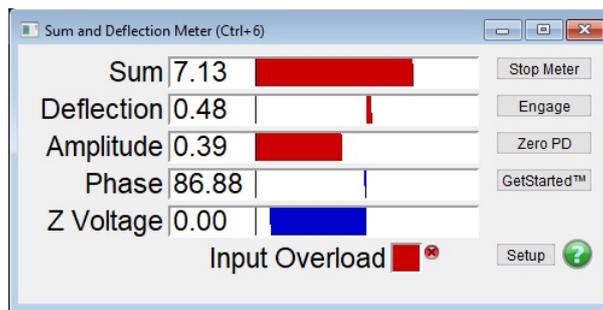


Figura 14: Menú de la pestaña Sum and Deflection meter.

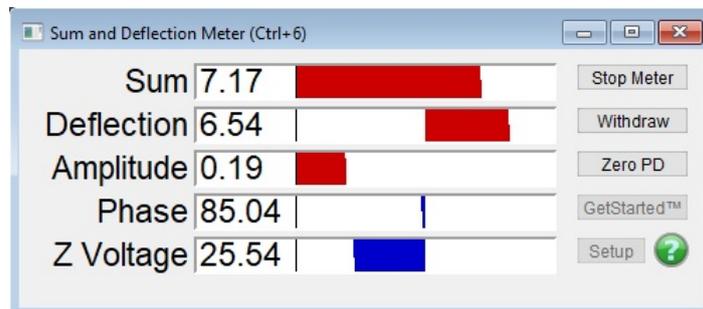


Figura 15: Menú de la pestaña Sum and Deflection meter durante un Engage real.

Las Figuras 14 y 15 son muy ilustrativas del significado de los parámetros en el Sum and Deflection meter:

Un alto valor de Sum indica que hay la suficiente potencia del láser llegando a la punta, por lo que es importante que se mantenga alto y a poder ser, constante.

Deflection indica a qué punto del fotodetector llega la luz reflejada en la punta, por lo que un valor cercano 0 es deseable para leer un valor correcto de la amplitud.

Amplitude refleja la amplitud de oscilación de punta, que como se ha comentado, la amplitud libre debe ser entre 0.4 V y 0.5 V en el escaneo en líquido. En la Figura 15 puede verse cómo al realizar el Engage, la amplitud baja hasta el valor del setpoint (190 mV en este caso).

Phase muestra la diferencia de fase entre la oscilación de la punta y el láser. Para comenzar a escanear es deseable una fase cercana a 90° , que se consigue centrando la fase en el proceso de Tune. Por último, el Z Voltage indica la altura de la punta respecto del cantilever, y debe mantenerse fijo durante el Engage, como se ve en la Figura 15.

Cuando se obtengan unos parámetros similares a los que se muestran en la figura 15 (que se corresponde con un Engage real), puede comenzarse con el escaneo.

A.3.5. Escaneo de la superficie y toma de imágenes

Para comenzar a escanear la superficie, primero deben elegirse los parámetros de las imágenes que quieran obtenerse. Primero, seleccionar el tamaño con Scan Size (una buena resolución inicial sobre la que ir ampliando son $10\ \mu\text{m}$), la velocidad de escaneo con Scan Rate (en Hz), y la resolución (Points+Lines), aunque se recomienda mantener la resolución en el valor fijado por defecto. De estos parámetros, el único que afectará a la calidad de la imagen será el Scan Rate.

Una vez se hayan elegido los parámetros en el Master Panel, debe hacerse click en *Frame Up* o *Frame Down* para comenzar a escanear la imagen.

Inmediatamente después, el equipo comenzará a escanear la superficie con la punta línea a línea, y se irán rellenando los cuatro marcos de imagen con la información obtenida a través de la interacción punta-muestra, como se muestra en la Figura 16, donde aparecen todos los parámetros y paneles disponibles durante la toma de imágenes, y que se explican a continuación.

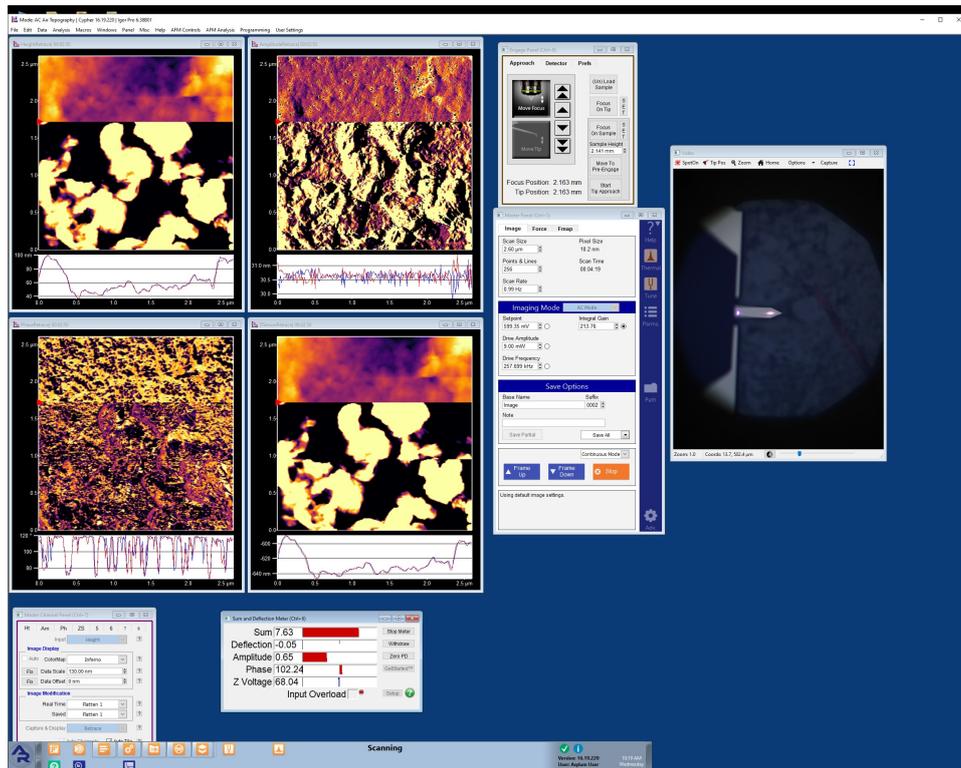


Figura 16: Toma de imágenes donde pueden verse todos los parámetros y paneles disponibles.

Uno de los parámetros más importantes que han de ajustarse al principio del escaneo es la Integral Gain. Integral Gain es un valor totalmente arbitrario cuyo valor óptimo depende de numerosos parámetros que cambian con cada muestra y del que no puede darse un valor de referencia, por lo que su ajuste requiere práctica al principio. Tiene un valor mínimo de 0 y un valor máximo de 1000, aunque rara vez será necesario subir de 300, y es recomendable no subir de 600, lo que puede provocar daños al equipo.

La Integral Gain controla la “agresividad” del algoritmo que registra la ida y vuelta de la punta (feedback), por lo que un valor más alto significará mayor feedback. Un valor demasiado bajo significará que la respuesta de la electrónica es demasiado lenta, lo que lleva a que el perfil registrado no se corresponda con el real. Por el contrario, un valor demasiado alto puede inducir excitaciones de alta frecuencia en la punta (fenómeno conocido como *ringing* que impiden tomar imágenes).

El feedback se muestra directamente al usuario debajo de los dos paneles de imagen **ZSensorRetrace** y **HeightRetrace**, que muestran la topografía real de la muestra (altura de la punta respecto a un valor de referencia en cada punto de la superficie). Para que el feedback sea óptimo, la línea roja y azul que aparecen bajo el marco de la imagen deben superponerse. Esto indicará que la línea roja (perfil de la muestra), está siendo correctamente registrada por el algoritmo de feedback (línea azul). Para que ambas estén superpuestas lo máximo posible, deberá comenzarse con una integral gain baja (cercana a 0), y que se irá incrementando hasta alcanzar el fenómeno de *ringing*, momento en el cual se disminuirá la integral gain hasta que el fenómeno desaparezca. En este punto (máxima Integral Gain posible por debajo del *ringing*), se obtiene la mejor calidad de imagen y de feedback.

Por último respecto a la Integral Gain, debe prestarse atención al marco de imagen **AmplitudeRetrace**, cuyo significado es análogo al ruido que se tiene durante el escaneo, por lo tanto deberá ser una imagen lo más plana posible. Puede comprobarse cómo aumentar el Integral Gain irá reduciendo gradualmente el ruido en la imagen, hasta el punto en el que el *ringing* impide distinguir la imagen del **AmplitudeRetrace**, momento en el cual si se disminuye la Integral Gain, se obtiene la menor señal posible en **AmplitudeRetrace**.

Existen otros parámetros que pueden afectar a la calidad del feedback, entre ellos la Amplitude (controlable con Drive Amplitude), el Setpoint (controlable con Setpoint) y la fase (que depende de los valores relativos de amplitud y setpoint). En líquido, un valor adecuado de la amplitud es de $0,4 - 0,5 V$, mientras que el setpoint puede establecerse en $180 mV$. Variar éstos paráme-

tros en torno a estos valores puede mejorar o empeorar el feedback, y deberá buscarse en cada caso el valor relativo de ambos que nos dé el mejor feedback.

Por último, la fase da información sobre la interacción entre la punta y la muestra. Al hacer la sintonización de la punta cerca de la frecuencia de resonancia se fijó la fase en 90° , por lo que cuando la punta no esté interactuando con la muestra, siempre debe mantenerse en torno a este valor. Una vez que se ha hecho el Engage, la fase subirá o bajará dependiendo del tipo de interacción (atractiva o repulsiva, respectivamente) con la muestra. Puede pasarse de un régimen a otro, atractivo o repulsivo, según interese variando la amplitud y el setpoint, aunque se recomienda no mantener la fase cercana a 90° durante el escaneo porque pueden producirse fenómenos de *hopping* entre ambos regímenes, lo que da lugar a artefactos en la imagen.

La imagen **PhaseRetrace** por tanto registra los cambios en la fase durante el escaneo, i.e. da información sobre la interacción entre la punta y las diferentes regiones de la muestra. Así, si por ejemplo se escanearan nanopartículas metálicas sobre un polímero, es decir, una muestra blanda con regiones muy localizadas de dureza mucho mayor (las nanopartículas sobre plástico), y en las imágenes de topografía se observaran numerosas estructuras globulares que podrían ser nanopartículas metálicas o bien tratarse de agregados de otra naturaleza, pueden discriminarse los agregados de las nanopartículas atendiendo a la imagen de fase. Si se trata de regiones que contienen metales, la imagen de fase en esas zonas mostrará zonas muy definidas más oscuras que el resto de la muestra, lo que indica que la dureza de la muestra es mucho mayor en esa zona que en el resto. Así, las estructuras globulares que se vean oscuras en la muestra serán las correspondientes a nanopartículas metálicas, y las que se vieran de igual color que el resto de la muestra serán agregados del polímero.

B. Experimentos electroquímicos en el equipo de Microscopía de Fuerza Atómica *in situ*

La segunda parte de este manual describirá el procedimiento para realizar experimentos electroquímicos en la celda incluida en el equipo de AFM EC-Cell. De nuevo se presuponen al usuario conocimientos sobre cómo llevar a cabo experimentos electroquímicos en celdas habituales de tres electrodos.

B.1. Estructura de la celda

El montaje de la celda es el mismo que el descrito para la toma de imágenes en líquido (Subsección A.1), pero ahora las conexiones de la celda (el anillo de platino y el cable con contacto de cobre) pasan a tener un papel activo en la celda. De la celda salen dos conexiones con extremos magnéticos, la correspondiente al anillo de platino que actuará como contraelectrodo y la conexión del rectángulo de cobre que será el contacto entre la superficie de la muestra (electrodo de trabajo y que se supone conductora) y el potencióstato. Estas conexiones pueden verse en la Figura 3.

B.2. Conexiones

Las conexiones irán a sus correspondientes contactos magnéticos en la cavidad de la celda, y cuya disposición puede verse en la Figura 17. Si se observa la placa azul externa, puede verse una leyenda de a qué electrodo corresponde cada conexión, aunque se trata de una leyenda arbitraria, porque pueden conectarse como se desee mientras se mantenga la polaridad del circuito adecuada, se recomienda seguir el orden indicado en la leyenda, porque la longitud de los cables de las conexiones de la celda están adecuadas a esta disposición. Estas conexiones dan a los tres cables que salen del aparato y cuyos extremos siguen una leyenda de colores análoga a la descrita anteriormente, y que serán conectados al potencióstato.

Tras hacer las conexiones entre los dos electrodos (WE y CE), debe vertirse el electrolito en la celda y comprobar que las conexiones entre los cables externos del aparato y los respectivos anillo de platino y superficie de la muestra son correctas y estables. Además, debe comprobarse que no se producen cortocircuitos entre ambos electrodos, que pueden producir daños en

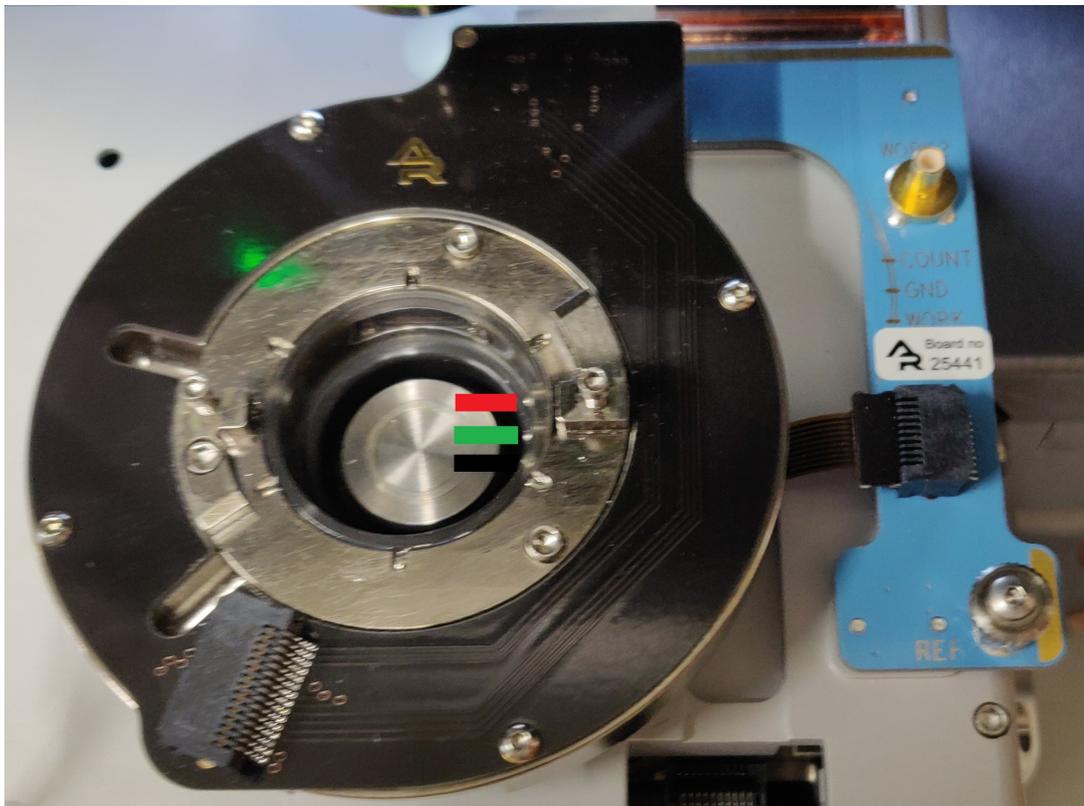


Figura 17: Conexiones externas para los electrodos. Las marcas indican dónde deben conectarse las conexiones magnéticas del electrodo de trabajo (rojo), a tierra (verde), y del contraelectrodo (negro), respectivamente.

la muestra. Por último, debe comprobarse que la celda no presenta pérdidas de líquido para después montar el EC Holder con la punta instalada para cerrar la celda.

El último electrodo a conectar es el de referencia, cuya conexión externa del equipo corresponde con el cable con cabeza blanca. La conexión interna se realiza desde el pivote metálico que se observa en la esquina inferior derecha de la Figura 17 con la etiqueta *REF*. A este pivote se conectará (con ayuda de una pinza metálica externa, si fuera necesario), un cable de PFA con recubrimiento de plata que actuará como electrodo de referencia en la celda, y que se introducirá en la celda a través del orificio en el cristal del EC Holder. Durante la guía para montar la punta se insistió en la correcta colocación del clip que fija la punta, de forma que el clip no tape el orificio en el cristal (Figura 4), precisamente porque llegados a este punto, un clip torcido puede imposibilitar el acceso del electrodo de referencia a la celda.

La correcta colocación del electrodo de referencia es uno de los aspectos clave de los experimentos electroquímicos en la EC-Cell y requiere práctica, porque una colocación errónea puede llevar a cortocircuito con alguno de los electrodos, o a que el electrodo de referencia no esté lo suficientemente sumergido (lo que equivale a realizar el experimento sin electrodo de referencia), que son dos de los errores más habituales que llevan a voltamogramas con señales inconsistentes, y que pueden provocar la destrucción del electrodo de trabajo al ser atravesado por una densidad de corriente demasiado alta.

Un montaje deficiente del electrodo de referencia puede identificarse al comenzar el experimento por un vigoroso burbujeo en la celda como consecuencia del sobrecalentamiento del electrolito por un electrodo de trabajo que se está quemando por un exceso de densidad de corriente. Si se observa este burbujeo al comenzar a registrar el voltamograma (que también puede identificarse por saltos muy grandes en la señal), puede corregirse el montaje del electrodo de referencia antes de que se quemara el electrodo de trabajo.

Una vez comprobado que en el montaje de la celda, la punta, y las conexiones de los electrodos se han hecho correctamente, pueden registrarse los voltamogramas con un ordenador externo conectado al potencióstato, de la misma forma que en un procedimiento convencional de electroquímica.